

**NOD2 (NÜKLEOTİD BAĞLANMA VE OLİGOMERİZASYON DOMEYN 2)
GEN VARYANTLARININ KRONİK OBSTRÜKTİF AKCİĞER HASTALIĞI (KOAİ)
GELİŞİMİ VE HASTALIĞIN ŞİDDETİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fadime MUTLU İÇDUYGU

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN**

Tez No: 2015-004

2015-Afyonkarahisar

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NÜKLEOTİD BAĞLANMA VE OLİGOMERİZASYON DOMEYN
2 (NOD2) GEN VARYANTLARININ KRONİK OBSTRÜKTİF
AKCİĞER HASTALIĞI (KOAİ) GELİŞİMİ VE HASTALIĞIN
ŞİDDETİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fadime MUTLU İÇDUYGU

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN

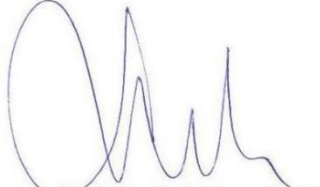
**Bu tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından BAP 13SAĞ.1.01
proje numarası ile desteklenmiştir**

Tez No: 2015-004

2015- AFYONKARAHİSAR

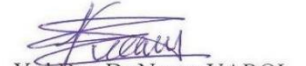
Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.
Tez savunması tarihi: 07/05/2015


Prof. Dr. Afif BERDELI
Ege Tıp Fakültesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Fethi Sırrı ÇAM
Celal Bayar Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Danışman


Doç. Dr. Sevinç SARINÇ ULAŞLI
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Yrd. Doç. Dr. Nuray VAROL
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Doktora programı öğrencisi Fadime MUTLU İÇDUYGU'nun "NOD2 (Nükleotid bağlanma ve oligomerizasyon domeyn 2) gen varyantlarının kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) gelişimi ve hastalığın şiddeti üzerine etkisinin araştırılması." başlıklı tezi 21.05.2015 günü saat 14:00 de Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Abdullah ERYAVUZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|----------|
| KABUL VE ONAY..... | ii |
| İÇİNDEKİLER..... | iii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... | vi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | viii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | ix |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 1.1. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH)..... | 1 |
| 1.1.1. KOAH Prevalansı..... | 2 |
| 1.1.2. KOAH Morbiditesi..... | 3 |
| 1.1.3. KOAH Mortalitesi..... | 3 |
| 1.1.4. KOAH'ın Ekonomik Yükü..... | 4 |
| 1.1.5. KOAH Risk Faktörleri..... | 5 |
| 1.1.5.1. Genetik Faktörler..... | 5 |
| 1.1.5.2. Yaş ve Cinsiyet..... | 8 |
| 1.1.5.3. Akciğer Büyümesi ve Gelişimi..... | 8 |
| 1.1.5.4. Çevresel Faktörler..... | 9 |
| 1.1.5.5. Sosyoekonomik Statü..... | 10 |
| 1.1.5.6. Bronşiyal Hiperaktivite..... | 10 |
| 1.1.5.7. Kronik Bronşit..... | 11 |
| 1.1.5.8. Enfeksiyonlar..... | 11 |
| 1.1.6. KOAH Patoloji, Patogenez ve Patofizyolojisi..... | 11 |
| 1.1.6.1. KOAH Patolojisi..... | 12 |
| 1.1.6.2. KOAH Patogenezi..... | 12 |
| 1.1.6.2.1. İnflamasyon..... | 13 |
| 1.1.6.2.2. Oksidatif Stres..... | 14 |
| 1.1.6.2.3. Proteaz/Antiproteaz Dengesi..... | 15 |
| 1.1.6.3. KOAH Patofizyolojisi..... | 15 |
| 1.1.7. KOAH Alevlenmeleri..... | 16 |
| 1.1.8. KOAH'ta Tanı ve Evreleme..... | 17 |
| 1.1.8.1. Tanı..... | 17 |
| 1.1.8.2. Evreleme..... | 17 |
| 1.2. KOAH ve Doğuştan Gelen İmmün Sistem Reseptörleri..... | 18 |
| 1.2.1. NOD Benzeri Reseptörler (NLR) Ailesi..... | 20 |
| 1.2.2. NOD2'nin Moleküler Özellikleri..... | 21 |
| 1.2.3. NOD2 Sinyal Yolağı..... | 23 |
| 1.2.4. NOD2 Varyantları ve Hastalıklar..... | 25 |
| 1.2.4.1. NOD2 ve KOAH..... | 29 |
| 1.3. Polimorfizm | 31 |
| 1.3.1. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP)..... | 31 |
| 1.4. Eş Zamanlı PCR..... | 32 |
| 1.5. Amaç..... | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 2. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 39 |
| 2.1. Gereçler..... | 39 |
| 2.1.1. Materyal Seçimi..... | 39 |
| 2.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar..... | 40 |
| 2.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler..... | 41 |
| 2.1.4. Kullanılan Solüsyon ve Tamponların Hazırlanması..... | 42 |
| 2.2. Yöntemler..... | 42 |
| 2.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu..... | 42 |
| 2.2.2. Rs2066844 Polimorfizmi için PCR-RFLP Yöntemiyle Genotipleme..... | 43 |
| 2.2.2.1. PCR Karışımı..... | 44 |
| 2.2.2.2. Thermal Cycler Isı Döngüsü..... | 44 |
| 2.2.2.3. %2'lik Agaroz Jelde PCR Ürünlerinin Kontrolü..... | 44 |
| 2.2.2.4. Enzim Kesimi..... | 45 |
| 2.2.3. Rs1077861 Polimorfizmi için Eş Zamanlı PCR Yöntemiyle Genotipleme..... | 46 |
| 2.2.3.1. Light Cycler FastStart DNA Master HybProbe içeriği..... | 47 |
| 2.2.3.2. Reaksiyon Karışımı..... | 47 |
| 2.2.3.3. LightCycler 480 cihazı için Programlama Değerleri..... | 47 |
| 2.2.3.4. İşlem basamakları..... | 48 |
| 2.2.4. Rs3135500 Polimorfizmi için Eş Zamanlı PCR Yöntemiyle Genotipleme..... | 49 |
| 2.2.4.1. Light Cycler FastStart DNA Master HybProbe içeriği..... | 49 |
| 2.2.4.2. Reaksiyon Karışımı..... | 50 |
| 2.2.4.3. LightCycler 480 cihazı için Programlama Değerleri..... | 50 |
| 2.2.4.4. İşlem Basamakları..... | 50 |
| 2.2.5. İstatistiksel Değerlendirme..... | 51 |
| | |
| 3. BULGULAR..... | 53 |
| 3.1. Rs2066844 (R702W) Polimorfizmine Ait Bulgular..... | 55 |
| 3.1.1. Hasta ve Kontrol Grupları Arasında Rs2066844 Polimorfizmi Genotip ve Allel Sıklıkları..... | 55 |
| 3.1.2. Alevlenme Sıklığına Göre Ayrılan Hasta Grupları Arasında Rs2066844 Polimorfizmi Genotip ve Allel Sıklıkları..... | 56 |
| 3.1.3. Hava Akımı Kısıtlamasına ve GOLD Kriterlerine Göre Evrelenen Hasta Grupları Arasında Rs2066844 Polimorfizmi Genotip ve Allel Sıklıkları..... | 56 |
| 3.1.4. Aile Öyküsü Olan ve Olmayan Hasta Grupları Arasında Rs2066844 Polimorfizmi Genotip ve Allel Sıklıkları..... | 58 |
| 3.2. Rs1077861 ve Rs3135500 Polimorfizmlerine Ait Bulgular..... | 59 |
| 3.2.1. Hasta ve Kontrol Grupları Arasında Rs1077861 ve Rs3135500 Polimorfizmlerinin Genotip ve Allel Sıklıkları..... | 59 |
| 3.2.2. Rs1077861 ve Rs3135500 Polimorfizmleri ile KOAH Riski Arasındaki İlişki..... | 60 |
| 3.2.3. Alevlenme Sıklığına Göre Ayrılan Hasta Grupları Arasında Rs1077861 ve Rs3135500 Polimorfizmlerinin Genotip ve Allel Sıklıkları..... | 64 |
| 3.2.4. Hava Akımı Kısıtlamasına ve GOLD Kriterlerine Göre Evrelenen Hasta Grupları Arasında Rs1077861 ve Rs3135500 Polimorfizmlerinin Genotip ve Allel Sıklıkları..... | 64 |
| 3.2.5. Aile Öyküsü Olan ve Olmayan Hasta Grupları Arasında Rs1077861 ve Rs3135500 Polimorfizmlerinin Genotip ve Allel Sıklıkları..... | 66 |

| | |
|--|------------|
| 3.3. Yaş, Sigara İçme Durumu, Alevlenme Sıklığı, Sigara İçme Miktarı (Paket-Yıl) ve Polimorfizmlerin FEV1 Düşüşü Üzerine Etkisi..... | 67 |
| 4. TARTIŞMA..... | 69 |
| 4.1. NOD2 geni rs2066844 (R702W) Polimorfizminin Değerlendirilmesi..... | 71 |
| 4.2. NOD2 geni rs1077861 ve rs3135500 Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi.... | 76 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 83 |
| ÖZET..... | 85 |
| SUMMARY..... | 86 |
| KAYNAKLAR..... | 87 |
| ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ..... | 106 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|--------------------------|--|
| α -1 Antitripsin: | Alfa 1 Antitripsin (Alpha-1-Antitrypsin) |
| Bç | : Baz Çifti |
| BOLD | : Obstrüktif Akciger Hastalıkları Yükü Programı (Burden of Obstructive Lung Disease) |
| CARD | : Kaspaz Aktifleştireci Domeyn (Caspase Recruitment Domain) |
| cIAP1 | : Apoptoz Protein 1'in Hücresele İnhibitörü (Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein-1) |
| DAMP | : Tehlike İlişkili Moleküler Kalıplar (Danger Associated Molecular Patterns) |
| EBS | : Erken Başlangıçlı Sarkoidoz |
| FEV1 | : 1. Saniyedeki Zorlu Ekspiretuar Hacim (Forced Expiratory Volume in 1. Second) |
| FVC | : Zorlu Vital Kapasite (Forced Vital Capacity) |
| GOLD | : Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığına Karşı Küresel Girişim (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) |
| GWAS | : Genom Çaplı Asosiasyon Çalışmaları (Genome-Wide Association Studies) |
| IgE | : İmmünglobulin E (Immunoglobulin E) |
| IKK | : I KappaB Kinaz (I Kappa B Kinase) |
| IL8 | : İnterlökin 8 (Interleukin 8) |
| IL10 | : İnterlökin 10 (Interleukin 10) |
| IRF | : İnterferon Düzenleyici Faktörler (İnterferon Regulatory Factor) |
| İBH | : İnflamatuar Bağırsak Hastalığı |
| KOAH | : Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı |
| LRR | : Lösince Zengin Tekrarlar (Leucine-Rich Repeats) |
| MAP | : Mitojen ile Aktive Edilmiş Protein (Mitogen-Activated Protein) |
| MDP | : Muramil Di-Peptid (Muramyl Dipeptide) |
| μ l | : Mikrolitre |
| NAID | : NOD2 İlişkili Otoinflammatuar Hastalık (NOD2-Associated Autoinflammatory Disease) |
| NBD/NACHT: | Nükleotid Bağlanma Domeyni (Nucleotide-Binding Domain/ NAIP, CIITA, HET-E, and TP1) |
| NEMO | : NF- κ B Temel Modulatörü (NF-kappa-B Essential Modulator) |
| NF- κ B | : Nükleer Faktör κ B (Nuclear Factor kappa B) |
| NHANES | : Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Araştırması (The National Health and Nutrition Examination Survey) |
| NLR | : NOD Benzeri Reseptörler (NOD-Like Receptors) |
| NOD | : Nükleotid Bağlanma ve Oligomerizasyon Domeyn (Nucleotide-Binding Oligomerization Domain) |
| OECD | : Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (Organisation for Economic Co-operation and Development) |
| PAMP | : Mikrobiyal Patojenlerle İlişkili Korunmuş Moleküler Kalıplar (Pathogen-Associated Molecular Patterns) |
| PCR | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction) |

| | |
|----------------|---|
| PYD | : Pirin Domeyn (PYRIN Domain) |
| RE | : Restriksiyon Endonükleaz (Restriction Endonuclease) |
| RFLP | : Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism) |
| RIP2 | : Reseptör Etkileşimli Serin/Treonin Protein Kinaz 2 (Receptor-Interacting Serine/Threonine Kinase 2) |
| RLR | : Retinoik Asitle Uyarılabilir Gen Benzeri Reseptörler (Retinoic Acid Inducible Gene/RIG-Like Receptor) |
| ⁰ C | : Santigrat Derece |
| SFT | : Solunum Fonksiyon Testi |
| SNP | : Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism) |
| TAB2 | : TAK1 Bağlanma Proteini 2 (TAK1-Binding Protein 2) |
| TAK1 | : Dönüştürücü Büyüme Faktörü β ile Aktive Edilmiş Protein Kinaz 1 (Transforming Growth Factor β Activated Kinase-1) |
| Th2 | : Yardımcı T Hücreleri 2 (T Helper 2) |
| TLR | : Toll Benzeri Reseptörler (Toll-Like Receptors) |
| T _m | : Erime Sıcaklığı (Melting Temperature) |
| TRAF2 | : TNF Reseptör İlişkili Faktör 2 (TNF Receptor-Associated Factor 2) |
| ÜK | : Ülseratif Kolit |
| V/Q | : Ventilasyon/Perfüzyon (Ventilation/Perfusion) |
| WHO | : Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization) |
| XIAP | : Apoptoz Proteinin X'e Bağlı İnhibitörü (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) |
| % | : Yüzde |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 1.1: KOAH'taki hava akımı kısıtlanmasının altında yatan mekanizmalar..... | 1 |
| Şekil 1.2: WHO 2011 verilerine göre dünya genelinde ilk 10'da yer alan ölüm nedenleri..... | 4 |
| Şekil 1.3: KOAH'la ilişkisi araştırılan genler ve bu ilişkilerin doğrulandığı çalışma sayıları..... | 7 |
| Şekil 1.4: KOAH'ta inflamatuvar kaskad ve sonuçları..... | 14 |
| Şekil 1.5: KOAH' ta patofizyolojik değişimler..... | 16 |
| Şekil. 1.6: NOD2 geninin 16. kromozom üzerindeki lokasyonu..... | 22 |
| Şekil 1.7: NOD2 proteini domeynleri ve fonksiyonları..... | 23 |
| Şekil 1.8: NOD2 aracılı NF- κ B aktivasyonu..... | 25 |
| Şekil 1.9: SYBR Green I'in kullanıldığı özgül olmayan belirleme sistemi..... | 34 |
| Şekil 1.10: FRET prensibi ile çalışan hibridizasyon problemleri..... | 35 |
| Şekil 1.11: TaqMan (Hidroliz) Problemleri..... | 36 |
| Şekil 1.12: Moleküler Boncuk Problemleri..... | 37 |
| Şekil 1.13: Lightcycler sistemi erime eğrisi pikleri..... | 38 |
| Şekil 2.1: Rs2066844 polimorfizmine ait PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jel görüntüleri..... | 45 |
| Şekil 2.2: Rs2066844 polimorfizmine ait enzim kesim ürünlerinin % 3'lük agaroz jel görüntüleri..... | 46 |
| Şekil 2.3: Rs1077861 polimorfizmi AA, AT ve TT genotiplerindeki hastalara ait erime eğrisi pikleri..... | 49 |
| Şekil 2.4: Rs3135500 polimorfizmi AA, AG ve GG genotiplerindeki hastalara ait erime eğrisi pikleri..... | 51 |
| Şekil 3.1: Rs3135500 polimorfizminin farklı genotiplerini taşıyan hastalardaki yıllık FEV1 (L) düşüşü..... | 68 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Tablo 1.1: KOAH tanısı için anahtar bulgular..... | 17 |
| Tablo 1.2: GOLD kriterlerine göre KOAH'ta hava akımı kısıtlanmasının evrenlenmesi..... | 18 |
| Tablo 1.3: Üç farklı yaygın NOD2 gen mutasyonunun İBH ve normal populasyonda görülme sıklıkları..... | 26 |
| Tablo 2.1: Rs1077861 ve rs3135500 polimorfizmleri için eş zamanlı PCR cihazında oluşturulan programlama değerleri..... | 48 |
| Tablo 3.1: KOAH'lı olgular ve kontrol grubu olgularına ait genel özellikler ve bulgular..... | 54 |
| Tablo 3.2: Hasta ve kontrol gruplarında rs2066844 (R702W) polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları..... | 55 |
| Tablo 3.3: Alevlenme sayıları az ve çok olan hasta grupları arasında rs2066844 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları..... | 56 |
| Tablo 3.4: Hava akımı kısıtlamasına göre orta, ağır ve çok ağır olarak ayrılan hasta grupları arasında rs2066844 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları..... | 57 |
| Tablo 3.5: GOLD kriterlerine göre A, B, C ve D şeklinde gruplandırılan hastalar arasında rs2066844 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları..... | 58 |
| Tablo 3.6: Aile öyküsü olan ve olmayan hasta grupları arasında rs2066844 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları..... | 58 |
| Tablo 3.7: Hasta ve kontrol gruplarında rs1077861 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları..... | 59 |
| Tablo 3.8: Hasta ve kontrol gruplarında rs3135500 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları..... | 60 |
| Tablo 3.9: Bağımsız değişkenlerin bireysel olarak modele katkılarını gösteren skorlar ve p değerleri..... | 61 |
| Tablo 3.10: Adımsal Regresyon Analizi Sonuçları..... | 63 |
| Tablo 3.11: Alevlenme sayıları az ve çok olan hasta grupları arasında rs1077861 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları..... | 64 |
| Tablo 3.12: Alevlenme sayıları az ve çok olan hasta grupları arasında rs3135500 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları..... | 64 |
| Tablo 3.13: Hava akımı kısıtlamasına göre orta, ağır ve çok ağır olarak ayrılan hasta grupları arasında rs1077861 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları..... | 65 |
| Tablo 3.14: Hava akımı kısıtlamasına göre orta, ağır ve çok ağır olarak ayrılan hasta grupları arasında rs3135500 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları..... | 65 |
| Tablo 3.15: GOLD kriterlerine göre A, B, C ve D şeklinde gruplandırılan hastalar arasında rs1077861 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları..... | 66 |
| Tablo 3.16: GOLD kriterlerine göre A, B, C ve D şeklinde gruplandırılan hastalar arasında rs3135500 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları..... | 66 |
| Tablo 3.17: Aile öyküsü olan ve olmayan hasta grupları arasında rs1077861 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları..... | 67 |
| Tablo 3.18: Aile öyküsü olan ve olmayan hasta grupları arasında rs3135500 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları..... | 67 |

| | |
|---|----|
| Tablo 4.1: Dünya genelinde farklı populasyonlarda sağlıklı bireylerde gözlenen mutant allel sıklıkları..... | 74 |
| Tablo 4.2: Dünya genelindeki farklı hasta ve kontrol gruplarında gözlenen mutant allel sıklıkları..... | 75 |

1. GİRİŞ

1.1. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH)

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH), tam olarak geri dönüşümlü olmayan hava akımı kısıtlanması ile karakterize, önlenebilir ve tedavi edilebilir bir akciğer hastalığıdır. Hava akımı kısıtlanması, zararlı partikül ve gazlara karşı akciğerler ve havayollarının verdiği artmış kronik inflamatuvar yanıtla ilişkilendirilmekte ve ilerleyici şekilde seyretmektedir. Alevlenmeler ve eşlik eden diğer problemler ise hastalığın şiddetini etkilemektedir. Kronik inflamasyonun yol açtığı akciğer parankim yıkımı gibi yapısal değişiklikler ve küçük hava yollarındaki daralma akciğer esnek geri çekilme basıncının düşmesine neden olmaktadır. Bu değişimler ise, soluk verme boyunca hava yollarının açık kalma kabiliyetinin azalması ile sonuçlanmaktadır. Özetle KOAH'taki kronik hava akımı kısıtlanmasına neden olan temel değişiklikler, küçük hava yolları hastalığı (obstrüktif bronşiolit) ve parankimal yıkım (amfizem) olmakla birlikte, bunların hastalık oluşumuna etki oranları kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Şekil 1.1'de KOAH'taki hava akımı kısıtlanmasının altında yatan mekanizmalar özetlenmiştir (GOLD, 2013; Lee ve ark, 2014; Molino ve ark, 2007; Sethi ve ark, 2012).



Şekil 1.1: KOAH'taki hava akımı kısıtlanmasının altında yatan mekanizmalar (GOLD 2013 kaynağından uyarlanmıştır).

1.1.1. KOAH Prevalansı

Mevcut KOAH prevalans bilgileri, araştırma metodları, tanı kriterleri ve analitik yaklaşımlardaki farklılıklardan dolayı belirgin çeşitlilik göstermektedir. Örneğin Halbert ve arkadaşlarının yaptığı meta-analizde, farklı çalışmalara ait verilerin çoğu, yetişkin popülasyonun %6'sından daha azının KOAH'lı olduğunu göstermektedir (Halbert ve ark, 2006). Bu veriler tanı almamış bir çok KOAH'lı hastanın olduğuna işaret etmektedir (Van den boom ve ark, 1998).

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization) "WHO" 2005 yılı verilerine göre dünya genelinde KOAH tanılı 65 milyon insan bulunmaktadır (<http://www.who.int/respiratory/copd/burden/en/>). Bin dokuz yüz doksan ve 2004 yılları arasında 28 ülkede yapılan çalışmaların meta-analizi ve Japonlarda yapılan ek bir çalışma, KOAH prevalansının sigara içenler ve geçmişte sigara içenler arasında içmeyenlere, 40 yaş üzerinde olanlarda 40 yaş altında olanlara ve erkeklerde bayanlara kıyasla farkedilir şekilde yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Fukuchi ve ark, 2004; Halbert ve ark, 2006).

Obstrüktif Akciger Hastalıkları Yüğü Programının (Burden of Obstructive Lung Disease) "BOLD" dünyanın bazı bölgelerinde yaptığı bir araştırma, hiç sigara kullanmamış olanlar arasında prevalansın %3-11 olduğunu göstermiştir (Buist ve ark, 2007). Yine BOLD çalışmasına göre, dünya genelinde 40 yaş üstü erkeklerde KOAH prevalansı %5,7 ile %23 arasında değişirken, bayanlarda %4,2 ile %20,7 arasında değişmektedir. BOLD Türkiye (Adana) pilot çalışması sonucuna göre, bu oran erkeklerde %19,8 iken, bayanlarda % 9,1 olarak bildirilmiştir (Burney ve ark, 2014). Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (Organisation for Economic Cooperation and Development) "OECD" tarafından 2012 yılında yayınlanan bir çalışmada ise ülkemizde 15 yaş ve üzerinde KOAH prevalansı %6,2 olarak bildirilmiş olup, bu değer çalışmada yer alan diğer Avrupa ülkeleri içinde en yüksek yüzdeyi temsil etmektedir (<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/8112121ec019.pdf?expires=1402165552&id=id&ac>

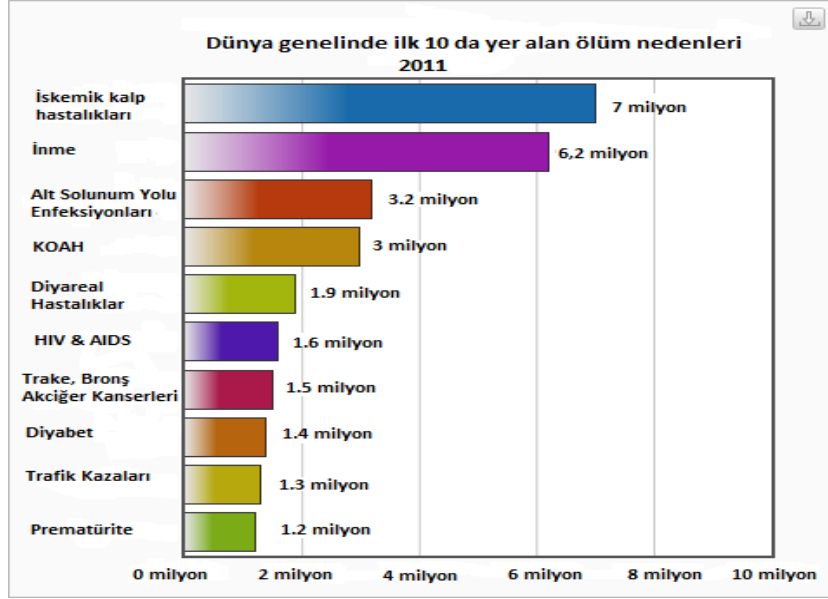
cname=guest&checksum=CBF46195613E8063CF9A2496BA3C108E). Ülkemizde KOAH prevalansının araştırıldığı Kocaeli’nde yapılan bir çalışmada (Arslan ve ark, 2013) 40 yaş üstü bireylerde doktorlar tarafından tanısı koyulmuş KOAH prevalansı % 8,9, Malatya’da yapılan bir çalışmada (Gunen ve ark, 2008) ise %7,9 olarak bildirilirken, Kocaeli’nde yapılan çalışmada spirometre sonuçları dikkate alındığında bu oran %13,3’e yükselmiştir.

1.1.2. KOAH Morbiditesi

Morbidite ile ilgili eldeki ölçümler, hekim ziyaretleri, acil servis başvuruları ve hastane yatışlarındaki verilere dayanılarak yapılmaktadır. Her ne kadar morbidite parametrelerini içeren veriler, mortalite verilerinden daha sınırlı ve daha az güvenilir olsa da, eldeki sınırlı veriler morbiditenin yaşla beraber arttığına işaret etmektedir (Fukuchi ve ark 2004; Menezes ve ark, 2005; Schirnhofner ve ark, 2007). KOAH’a bağlı morbidite kardiyovasküler hastalıklar, iskelet- kas hastalıkları ve diyabet gibi KOAH’la ilişkili diğer komorbid kronik hastalıklardan etkilenebilir. Ayrıca bu komorbid hastalıkların kişinin sağlık durumu ve KOAH tedavisi üzerine de etkisi olabilmektedir (GOLD, 2013).

1.1.3. KOAH Mortalitesi

Mortalite bilgilerinin güvenilirliği halen tanı almamış KOAH olgularından olumsuz şekilde etkilenmektedir. Ayrıca primer ölüm nedeni olmasına rağmen, KOAH genellikle dolaylı ölüm nedeni olarak bildirilmekte veya hiç bildirilmemektedir. Buna karşın birçok ülkede KOAH en yaygın ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. WHO 2011 verilerine göre dünya genelinde ölüm nedenleri sıralamasında KOAH 4. sırada yer almaktadır (Şekil 1.2.) (<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>).



Şekil 1.2: WHO 2011 verilerine göre dünya genelinde ilk 10'da yer alan ölüm nedenleri. (<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> kaynağından uyarlanmıştır)

Küresel hastalık yükü çalışmasının yaptığı bir projeye göre dünya genelinde 1990 yılında KOAH 6. ölüm nedeni olarak bildirilirken, 2020 yılında 3. ölüm nedeni olacağı tahmin edilmektedir. Daha yeni bir projede ise 2030 yılında 4. ölüm nedeni olacağı öngörülmektedir (Mathers ve Loncar, 2006). KOAH mortalitesindeki bu artış temel olarak sigara içme oranındaki artışa, diğer hastalıklardan (iskemik kalp hastalıkları ve enfeksiyöz hastalıklar gibi) kaynaklanan ölüm oranlarındaki azalmalara ve dünya nüfusunun yaşlanmasına bağlanmaktadır (GOLD, 2013).

1.1.4. KOAH'ın Ekonomik Yükü

KOAH'ın neden olduğu ekonomik yükün oldukça fazla olduğu bildirilmiştir. Avrupa Birliği'nde respiratuar hastalıkların direkt maliyetinin, toplam sağlık harcamalarının %6'sını oluşturduğu tahmin edilmektedir. KOAH maliyeti ise 38.6 milyar euro ile respiratuar hastalıkların maliyetinin %56'sına karşılık gelmektedir (ERS, 2003). Amerika'da KOAH'ın direkt maliyetinin 29,5 milyar dolar, dolaylı maliyetinin ise 20,4 milyar dolar olduğu bildirilmiştir. KOAH alevlenmelerinin giderleri, genel hastalık giderleri içinde en büyük paya sahiptir. Ayrıca hastalığın seyrine bağlı

olarak değişmekle birlikte, ileri evrelerdeki hastaların giderleri hafif evredeki hastalarinkinden daha fazladır. Gelişmiş ülkelerde KOAH'ın medikal giderleri, hastaların ve hasta yakınlarının çalışmamasından kaynaklanan işyeri ve evdeki üretkenliğin düşmesinden daha önemsiz bulunmaktadır (GOLD, 2013).

1.1.5. KOAH Risk Faktörleri

KOAH risk faktörleri arasında genetik faktörler, özellikle sigara dumanı olmak üzere çevresel faktörler, yaş, cinsiyet, akciğer büyümesi ve gelişimi, sosyoekonomik statü, bronşiyal hiperaktivite, kronik bronşit ve enfeksiyonlar yer almaktadır. Dünya genelinde belirlenen en yaygın risk faktörü sigara dumanıdır (GOLD, 2013). Bununla birlikte benzer sigara içme öyküsüne sahip kişilerin bir kısmında KOAH gelişirken bir kısmında gelişmemektedir. Bu durum, genetik yatkınlıktaki farklılıkların sigara dumanı ve çevresel faktörlere maruziyetin etkilerinin değişmesine neden olması ile açıklanabilir. KOAH risk faktörlerinin birbirleriyle etkileşim halinde olduğu düşünülmektedir (Umut S., Erdinç E., 2008)

1.1.5.1.Genetik Faktörler

KOAH'ın genetik bileşenlerini belirlemek amacıyla yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, araştırılan genler arasında çoğunlukla inflamatuvar yolda rol alanlar, proteaz/antiproteaz dengesinden sorumlu olanlar ve oksidatif stresle ilişkili genler yer almakla birlikte, KOAH'la ilişkili diğer yollarda görev alan genler de araştırılmıştır (Bosse Y., 2012; Vijayan V.K. 2013).

Alfa 1 Antitripsin (α -1 Antitripsin) eksikliği özellikle gençlerde KOAH'ın genetik nedenlerinden biri olup, 14q31-32.3'de lokalize olan Serpin Peptidase Inhibitor, Clade A Member 1 (*SERPINA1*) genindeki mutasyondan kaynaklanmaktadır. (Goopu ve ark, 2009) Yapılan çalışmalarda KOAH'lı

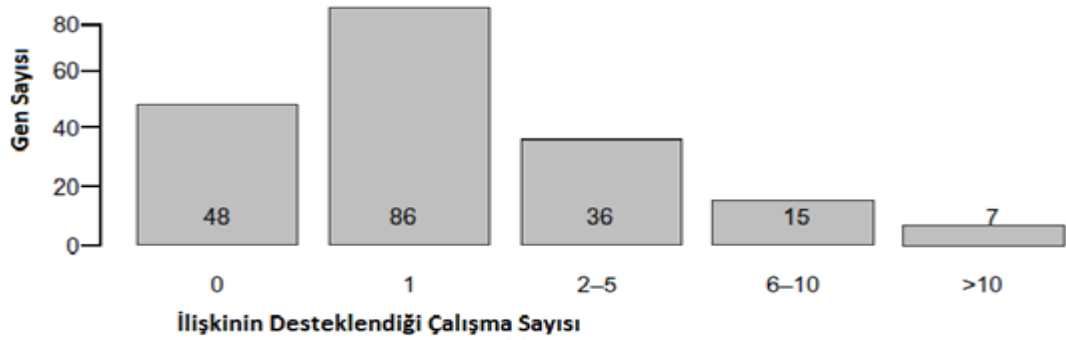
bireylerin %1-2'sinde α -1 Antitripsin eksikliği bildirilmiştir (Stoller ve Aboussouan, 2012).

Yapılan genom çaplı ilişkilendirme çalışmalarıyla (Genome-Wide Association Studies) “GWAS”, KOAH'a yatkınlıkla ilişkili 3 lokus [Cholinergic Receptor, Nicotinic, Alpha (*CHRNA3/CHRNA5*)/ Iron-Responsive Element-Binding Protein (*IREB2*), Hedgehog Interacting Protein (*HHIP*) ve Family With Sequence Similarity 13, Member A (*FAM13A*)] belirlenmiştir. (Pillai ve ark, 2009; Cho ve ark, 2010; Bosse Y., 2012) Son dönemde ise 19q13 de lokalize Ras-Related GTP-Binding Protein 4b (*RAB4B*), Egl-9 Family Hypoxia-Inducible Factor 2 (*EGLN2*), Melanoma-Inhibiting Protein (*MIA*) ve Cytochrome P450, Family 2, Subfamily A, Polypeptide 6 (*CYP2A6*) genlerini içeren yeni bir lokus bildirilmiştir (Cho ve ark, 2012).

Pulmoner fonksiyon üzerinde yapılan çalışmalarla Birinci Saniyedeki Zorlu Ekspiratuar Hacim (Forced Expiratory Volume in 1. Second) “FEV1” ile ilişkili üç ve Birinci Saniyedeki Zorlu Ekspiratuar Hacim/Zorlu Vital Kapasite (Forced Expiratory Volume in One Second/Forced Vital Capacity) “FEV1/FVC” ile ilişkili iki önemli lokus rapor edilmiştir. Bunlardan FEV1'le ilişkili olanlar 2q35'de lokalize Tensin 1 (*TNSI*), 4q24'de lokalize Glutathione S-transferase, C-terminal Domain (*GSTCD*) ve 5q33'de lokalize Hydroxytryptamine (Serotonin) Receptor 4 (*HTR4*) iken, FEV1/FVC ile ilişkili olanlar 6p21'de lokalize Advanced Glycosylation End Product-Specific Receptor (*AGER*) ve 15q23'de lokalize Thrombospondin, Type I, Domain Containing 4 (*THSD4*) genidir (Repai ve ark, 2010).

Başka bir GWAS ile yine FEV1/FVC oranı ile ilişkili Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin (Single Nucleotide Polymorphism) “SNP” lokalize olduğu daha önce belirlenmemiş 7 lokus bildirilmiştir. Bunlar 6q24'de lokalize G Protein-Coupled Receptor 126 (*GPR126*), 5q33'de lokalize A Disintegrin And Metalloproteinase 19 (*ADAM19*), 6p21'de lokalize Advanced Glycosylation end Product Receptor (*AGER*) ve Palmitoyl-Protein Thioesterase 2 (*PPT2*), 4q22'de lokalize Family With Sequence Similarity 13, Member A (*FAM13A*), 9q22'de

lokalize Patched Homolog 1 (*PTCH1*), 2q36'da lokalize phosphotyrosine interaction domain containing 1 (*PIDI*) ve 5q33'de lokalize Hydroxytryptamine (Serotonin) Receptor 4 (*HTR4*) genleridir. Diğer taraftan 4q24'de yer alan Integrator Complex Subunit 12 (*INTS12*), glutathione S-transferase, C-terminal domain (*GSTCD*) ve Nephronectin (*NPNT*) genleri de FEV1'le ilişkili bulunmuştur (Hancock ve ark, 2010). Akciğer fonksiyonundaki düşme ile ilişkili ilk GWAS'da ise Deleted In Lymphocytic Leukemia (*DLEU7*) genini de içeren 13q14.3'deki bir lokusun FEV1 düşüklüğü ile sıkı ilişkili olduğu bildirilmiştir (Imboden ve ark, 2012). Şekil 1.3.'de Bosse Y. tarafından hazırlanmış derlemede yer alan, KOAH'la ilişkisi araştırılan genler ve bu ilişkilerin doğrulandığı çalışma sayıları görülmektedir (Bosse Y., 2012).



| 0 Çalışma | | 1 Çalışma | | 2-5 Çalışma | | 6-10 Çalışma | | >10 Çalışma | |
|-----------|----------|-----------|----------|-------------|------------|--------------|--------------|---------------|--|
| AGER | HSP90AB1 | A2M | GCLM | NQO1 | AQP5 (2) | TP53 (2) | ACE (6) | ADRB2 (12) | |
| CASP8 | HSPA1A | ALOX5AP | GSTCD | NR3C1 | CD14 (2) | ABCC1 (3) | ADAM33 (6) | TGFB1 (13) | |
| CCL17 | HSPA1B | BCL2 | GSTO1 | OGG1 | CYP1A2 (2) | CTLA4 (2) | IL1B (6) | GSTM1 (16) | |
| CCL2 | HSPA1L | BDKRB2 | GSTO2 | OR4X1 | CYP2E1 (2) | EDN1 (3) | IL6 (6) | GSTP1 (16) | |
| CFLAR | HSPA8 | CASP10 | HCK | PDE4D | DEFB1 (2) | HHIP (3) | CFTR (7) | SERPINA1 (19) | |
| COL6A5 | IL11 | CAT | HTR4 | PPARG | ELN (2) | IFNG (3) | HMOX1 (7) | TNF (20) | |
| CXADR | IL13RA2 | CCL5 | IL12B | PTEN | HLA (2) | IL4 (3) | IL10 (7) | EPHX1 (25) | |
| CYP1B1 | ITGB5 | CCR2 | IL13RA1 | PTGDR | IL4R (2) | MMP1 (3) | SERPINA3 (7) | | |
| CYP2D6 | JAK3 | CD40 | IL17F | SFTPA2 | IREB2 (2) | SFTPD (3) | SFTPB (7) | | |
| DCN | KCND2 | CD63 | IL1A | SFTPC | LTBP4 (2) | SOD2 (3) | SOD3 (7) | | |
| DNAJB1 | MAP3K5 | CD86 | IL2 | SIRT2 | MBL2 (2) | TIMP2 (3) | GC (8) | | |
| EDNRA | miR-146A | CDC6 | IL27 | SLC11A1 | MSR1 (2) | VDR (3) | MMP9 (8) | | |
| FGA | MRPL44 | CDKN1A | IL5 | SLC6A4 | NFE2LS (2) | IL1RN (4) | SERPINE2 (8) | | |
| FGB | ORMDL3 | CH13L1 | IL8 | SMAD3 | PLAUR (2) | MMP12 (4) | GSTT1 (9) | | |
| FGG | PTGES3 | CLCA1 | IL8RA | SMOC2 | PTGS2 (2) | NOS3 (4) | IL13 (9) | | |
| FKBP4 | RARES2 | COL4A3 | IL8RB | SOX5 | SFTPA1 (2) | 15q24/25 (5) | | | |
| FKBP5 | SCGB1A1 | CRP | KCNMB1 | STAT1 | TBXA2R (2) | LTA (5) | | | |
| FLCN | SOD1 | CSF2 | KEAP1 | STAT3 | TLR4 (2) | | | | |
| GABPA | TBX21 | CSF3 | LEP | STAT6 | | | | | |
| GPX1 | THSD4 | CTSS | LEPR | STIP1 | | | | | |
| GSTM3 | TLR2 | CYBA | LTA4H | TGFBR3 | | | | | |
| HDAC2 | TLR6 | CYP2F1 | MICB | TIMP1 | | | | | |
| HDAC5 | TLFRSF1A | CYP3A5 | miR196a2 | TNS1 | | | | | |
| HSP90A1 | TLFRSF1B | DEFB4A | miR-499 | TRPV4 | | | | | |
| | | EDNRB | MMP14 | TSLP | | | | | |
| | | ESR1 | MMP2 | VEGFA | | | | | |
| | | FAM13A | MMP3 | XRCC1 | | | | | |
| | | FGF10 | NAT2 | XRCC5 | | | | | |
| | | GCLC | NFKBIB | | | | | | |

Şekil 1.3: KOAH'la ilişkisi araştırılan genler ve bu ilişkilerin doğrulandığı çalışma sayıları (Bosse Y., 2012 kaynağından uyarlanmıştır).

1.1.5.2. Yaş ve Cinsiyet

Yaş, KOAH için sıklıkla risk faktörleri arasında sayılmakla birlikte, KOAH'a neden olabilecek unsurun yaşlanmanın direkt olarak kendisinden mi, yoksa yaşlanmayla birlikte risk faktörlerine maruziyetin artmasından mı kaynaklandığı henüz anlaşılamamıştır. Geçmişte yapılan çalışmaların çoğunda, KOAH prevalans ve mortalitesinin erkeklerde kadınlara nazaran daha fazla olduğu gösterilmiştir (<http://www.nhlbi.nih.gov/resources/docs/cht-book.htm>; Mannino ve ark, 2002). Gelişmiş ülkelerde yapılan çalışmalar ise, muhtemelen sigara içme alışkanlıklarındaki değişikliklere bağlı olarak prevalansın erkek ve kadınlarda hemen hemen aynı olduğunu ortaya koymuştur. Hatta bazı çalışmalarda kadınların sigara dumanının etkilerine erkeklerden daha yatkın olduğu bildirilmiştir (Foreman ve ark, 2011; Lopez Varela ve ark, 2010; Silverman ve ark, 2000; Sorheim ve ark, 2010).

1.1.5.3. Akciğer Büyümesi ve Gelişimi

Akciğer büyümesi, hamilelik ve doğumdaki süreçler ile çocukluk ve yetişkinlikteki maruziyetlerle ilişkilidir (Barker ve ark, 1991; Todisco ve ark, 1993). Akciğer fonksiyonundaki azalma spirometre ile ölçülerek, KOAH gelişme riski olan bireyler belirlenebilir (Stern ve ark, 2007). Hamilelik ve çocukluk dönemi boyunca akciğer büyümesini etkileyen herhangi bir faktör, bireyde KOAH gelişme riskini artırabilir. Yetişkinlikteki FEV1 ile doğum kilosu arasında pozitif bir ilişki olduğu meta-analizlerle gösterilmiştir (Lawlor ve ark, 2005). Yine erken çocukluk döneminde geçirilen akciğer enfeksiyonlarının, akciğer büyümesi üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (GOLD, 2013). Başka bir çalışmada ise, “çocukluk çağı dezavantaj faktörleri” olarak adlandırılan tüm bu olumsuzlukların, erken yetişkinlikteki akciğer fonksiyonları üzerine etkisinin, yoğun sigara içimi kadar önemli olduğu rapor edilmiştir (Svanes ve ark, 2010).

1.1.5.4. Çevresel Faktörler

Dünya genelinde KOAH için en yaygın şekilde belirlenen risk faktörü sigara kullanımınıdır. Sigara içenler, içmeyenlere kıyasla respiratuar semptomlar ve akciğer fonksiyon bozuklukları için daha yüksek bir prevalansa, artmış yıllık FEV1 düşüş oranına ve yüksek KOAH mortalite oranına sahiptir (Kohansal ve ark, 2009). Tütünün diğer tiplerinin de (puro, pipo, marihuana, nargile) KOAH için risk faktörü olduğu bilinmektedir (Raad ve ark, 2011; Tan ve ark, 2009; GOLD, 2013; Tetrault ve ark, 2007). Yine sigara dumanına pasif maruziyet, akciğerler tarafından inhale edilen toplam partikül ve gaz miktarının artmasından dolayı respiratuar semptomların ve KOAH gelişiminin nedeni olabilir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44324/?report=reader#!po=16.6667>; Eisner ve ark, 2005). Hamilelik sırasında sigara içmek, uterusu akciğer büyüme ve gelişimini etkileyerek ve immün sistem değişikliklerine neden olarak fetüs için risk oluşturabilir (Holt ve ark, 1987; Tager ve ark, 1995).

Organik ve inorganik tozlara, kimyasal ajanlara ve dumanlara maruziyeti içeren mesleki maruziyet, yeterince önemsenmemiş bir risk faktörüdür (Trupin ve ark, 2003; Matheson ve ark, 2005; Hnizdo ve ark, 2004). Amerikan toplumu üzerinde yapılan ve 35-70 yaşları arasında 10.000 yetişkinin dahil edildiği Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Araştırması III (The National Health and Nutrition Examination Survey) “NHANES III” ’de mesleki maruziyet nedeniyle KOAH’ın, çalışmaya dahil edilenlerin %19,2’sini oluşturduğu ve bunların da %31,1’inin sigara içmediği bildirilmiştir (Hnizdo ve ark, 2002).

Odun, hayvan gübresi, tahıl artıkları ve kömür genellikle direkt olarak veya fonksiyonel olmayan basit sobalarda yakıldığı için, yüksek seviyelerde iç mekan hava kirliliğine neden olabilmektedir. Düzgün şekilde havalandırılmayan mekanlarda, biyoyakıtların yemek pişirme ve ısınma için kullanımının, KOAH için risk faktörü olduğu artan sayıdaki kanıtlarla desteklenmektedir (GOLD, 2013). Dünya genelinde 3 milyar insan, biyoyakıtları ve kömürü çeşitli ihtiyaçları için temel enerji kaynağı olarak kullanmaktadır ki, bu da risk altındaki popülasyonun oldukça

geniş olduğuna işaret etmektedir (Oroczo-Levi ve ark, 2006; Torres-Duque ve ark, 2008).

Yüksek seviyelerdeki kentsel hava kirliliği kalp veya akciğer hastalığı olan bireyler için zararlıdır. Kentsel hava kirliliğinin KOAH'a yol açmadaki rolü anlaşılammıştır fakat sigara ile karşılaştırıldığında daha küçük bir rolü olduğu görülmektedir. Tek bir kirletenin atmosferik kirliliğe etkisini değerlendirmek oldukça zordur. Buna rağmen primer olarak motorlu araçlardaki kullanım olmak üzere, fosil yakıtların yanması sonucu oluşan hava kirliliği, respiratuar fonksiyonlardaki düşmeyle ilişkilendirilmektedir (Abbey ve ark, 1998). Kısa dönem, yüksek seviyeli maruziyet ile uzun dönem, düşük seviyeli maruziyetin bağıl etkisi henüz tam olarak çözümlenememiştir (GOLD, 2013).

1.1.5.5. Sosyoekonomik Statü

Yoksulluk, KOAH için açık bir risk faktörüdür fakat KOAH'a neden olan yoksulluk kaynaklı faktörler tam olarak belirlenememiştir. Sosyoekonomik durum ile KOAH gelişim riski arasında ters bir orantının olduğu güçlü kanıtlarla desteklenmektedir (Prescott ve ark, 1999).

1.1.5.6. Bronşiyal Hiperaktivite

Populasyon çalışmaları ile, bronşiyal hiperaktivitenin hafif KOAH'ı olan hastalarda akciğer fonksiyonlarında düşme riskinin göstergesi olmasına ek olarak, KOAH'ın bağımsız bir prediktörü olabileceği gösterilmiştir (Rijcken ve ark, 1987; Tashkin ve ark, 1996).

1.1.5.7. Kronik Bronşit

Fletcher ve arkadaşları tarafından yapılan taslak bir çalışmada, kronik bronşit akciğer fonksiyonlarında düşme ile ilişkilendirilmemiştir. (Fletcher ve Peto, 1977). Fakat takip eden çalışmalarda, mukus hipersekresyonu ve FEV1 düşmesi arasında ilişki saptanmıştır (Vestbo ve ark, 1996). Ayrıca sigara içen genç yetişkinlerde kronik bronşit varlığı artmış KOAH gelişim riskiyle ilişkilendirilmiştir (Guerra ve ark, 2009; De Marco ve ark, 2007).

1.1.5.8. Enfeksiyonlar

Çocukluk dönemindeki ciddi respiratuar enfeksiyonlar, yetişkinlik döneminde düşmüş akciğer fonksiyonu ve artmış respiratuar semptomlarla ilişkilendirilmektedir (Barker ve ark, 1991; De Marco ve ark, 2011). Enfeksiyonlara yatkınlık, KOAH alevlenmelerinde rol oynamasına karşın hastalık gelişimi üzerine etkisi tam olarak belirlenememiştir. HIV enfeksiyonlarının, sigara içme nedenli amfizem başlangıcını hızlandırdığı gösterilmiştir (Crothers ve ark, 2011). Diğer taraftan tüberkülozun KOAH için risk faktörü olduğu bulunmuştur (Lam ve ark, 2010; Menezes ve ark, 2007).

1.1.6. KOAH'ın Patoloji, Patogenez ve Patofizyolojisi

İnhale edilen sigara dumanı ve diğer zehirli partiküller akciğer inflamasyonuna neden olur. KOAH'ı olan bireylerde bu inflamasyona verilen normal cevap modifiye edilmiştir. Bu kronik inflamatuvar cevap, amfizemle sonuçlanan parankimal doku yıkımını ve küçük hava yolları fibrözü ile sonuçlanan normal tamir ve savunma mekanizmalarının bozulmasını indükleyebilir. Bu patolojik değişimler havanın içerde hapsolmesine ve ilerleyici hava akımı sınırlandırılmasına neden olur (GOLD, 2013).

1.1.6.1. KOAH Patolojisi

KOAH'taki patolojik değişimler, hava yollarında, akciğer parankiminde ve pulmoner damar sisteminde gerçekleşir (Hogg ve ark, 2004). Bu değişimler, akciğerin farklı kesimlerinde spesifik inflamatuvar hücre tiplerinin sayısında artışla izlenen kronik inflamasyonu ve tekrarlanan harabiyet ve onarımla sonuçlanan yapısal değişiklikleri içerir. Hava yollarındaki inflamatuvar ve yapısal değişiklikler genellikle hastalığın kötüleşmesi ve sigara içiminin devam etmesiyle artar (GOLD, 2013).

1.1.6.2. KOAH Patogenezi

KOAH, sigara dumanı gibi inhale edilen zararlı gazlara ve partiküllere verilen anormal inflamatuvar yanıtla karakterize bir hastalıktır. Respiratuvar sistemdeki bu anormal inflamasyonun, kronik tahriş edicilere karşı modifiye edilen inflamatuvar cevaptan kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Amplifiye edilmiş bu inflamasyonun mekanizması tam olarak anlaşılammakla birlikte genetik faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Sigaranın bırakılmasından sonra da inflamasyon devam eder. İnflamasyonun devamında her ne kadar otoantijenlerin ve dirençli mikroorganizmaların rol oynayabileceğı düşünülse de, mekanizma tam olarak anlaşılammıştır. Sigara içmeyen kişilerde de KOAH gelişebilmekte, fakat bu hastalarda inflamatuvar cevabın şekli bilinmemektedir. Oksidatif stres ve akciğerlerde aşırı proteinaz birikimi akciğer inflamasyonunu modifiye eder. KOAH patogenezinde bu mekanizmaların birlikteliğı söz konusudur (Cosio ve ark, 2009). Tüm bu mekanizmaların meydana getirdiğı patolojik değişiklikler kabaca üç gruba ayrılabilir:

1. **Kronik bronşit**, aşırı mukus üretimi ve sekresyonu ile seyreden mukosilyer sistemdeki problemler ile ilişkilendirilmektedir. Bu problemlerin temel kaynağı büyük hava yollarındaki submukozal bezlerin genişlemesi ve inflamasyonudur.

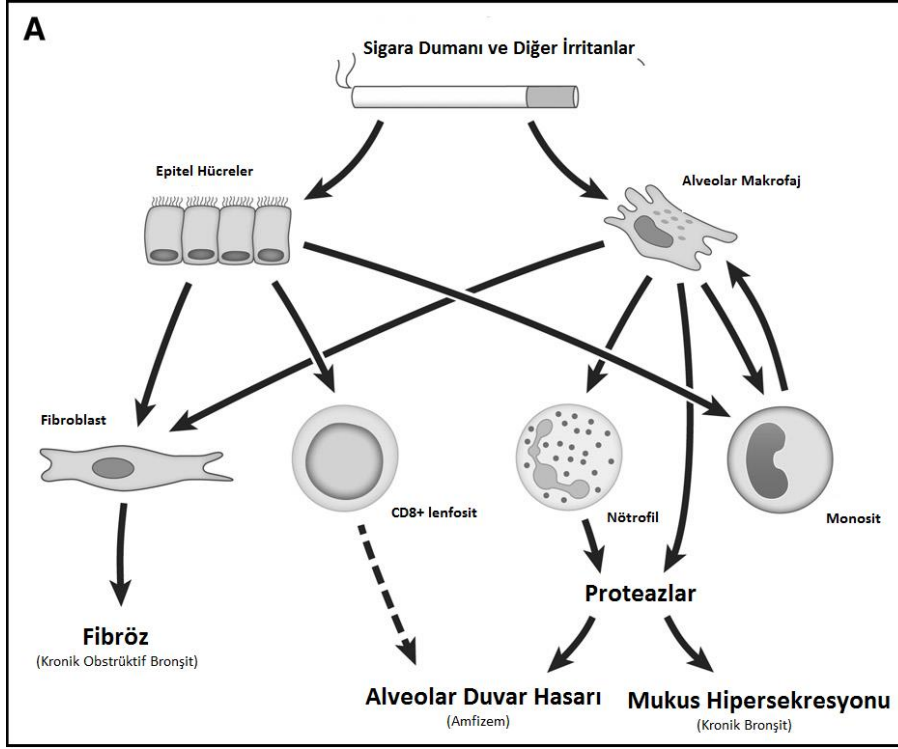
2. **Kronik obstrüktif bronşolit**, obstrüksiyondan sorumlu temel anatomik yapılar olan, yaklaşık 2 mm çapındaki küçük hava yollarındaki değişikliklerden kaynaklanır. İnflamasyon ve yapısal değişiklikler obstrüksiyonun temel sebepleridir. Yapısal değişiklikler mukoz metaplazisi, fibroz ve düz kas kitlesinin artışından kaynaklanan hava yolu duvarlarının kalınlaşması ve lümeninin daralmasını içermektedir.
3. **Amfizem**, terminal bronşiollerin ucundaki hava keselerinin genişlemesidir (Molfino ve ark, 2007).

1.1.6.2.1. İnflamasyon

KOAH hastalarının küçük hava yollarında ve akciğer parankimindeki kronik inflamasyon, doku biyopsi, balgam ve postmortem örneklerin analizi ile gösterilmiştir. KOAH'ta özellikle sigara dumanı gibi zararlı partiküllere tekrarlayıcı şekilde maruziyet, küçük hava yollarında ve akciğer parankiminde değişik hücre tiplerini (nötrofiller, makrofajlar ve lenfositler gibi) ve inflamatuvar mediatörleri (büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler, proteinazlar gibi) içeren farklı bir inflamatuvar kaskadı tetiklemektedir (Şekil 1.4.) (Barnes, 2008).

Artmış akciğer proteinaz üretimi ve alveolar septal hücre apoptozu alveolar yapıların yıkımına, yani amfizeme neden olmaktadır. Proteinazlar aynı zamanda büyük hava yollarındaki submukozal bezlerde genişlemeye, goblet hücrelerinin sayısında artışa ve bunların sonucunda da mukus hipersekresyonuna neden olur. Küçük hava yollarının etrafındaki konnektif doku artışı ise obstrüktif bronşolit adı verilen küçük hava yollarının daralmasına yol açmaktadır. Hastalığın ileri evreleri, hava yolu lümeninde ve hatta duvarlarında nötrofil sayısında artışla ilişkilendirilmektedir. Küçük hava yolları ve parankimdeki makrofajların artması ise direkt olarak amfizem derecesiyle ilişkilendirilmektedir. CD8+ T lenfositler amfizematöz alanların hava yolu duvarında, küçük ve büyük hava yollarında ve

periferal düz kaslarda bulunurlar. İnflamatuar hücre aktivasyonu, büyüme faktörlerinin, sitokinlerin, metalloproteinazların ve serin proteinazların miktarını değiştirir. Bu değişimler mukus hipersekresyonu, ekstraselüler matriks yıkımı (özellikle akciğer elastininin) ve alveolar epitel hücre harabiyetine neden olur. Küçük hava yollarının daralması ise buradaki fibroblastların aktivasyonu ve proliferasyonu ile tetiklenen kollajen birikiminden kaynaklanmaktadır. CD8+ T lenfositler, makrofajları aktive eden ligandların salınımı ve akciğer epiteline zarar veren perforin ve granzimlerin salınımıyla amfizem oluşumuna neden olur (Sethi ve ark, 2012).



Şekil 1.4: KOAH'ta inflamatuvar kaskad ve sonuçları (Sethi ve ark, 2012 kaynağından uyarlanmıştır).

1.1.6.2.2. Oksidatif Stres

Oksidatif stresin, KOAH'ın şiddetlenmesinde önemli bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (Rahman, 2005). KOAH'lı hastaların sistemik dolaşımında, balgamında ve nefesinde, oksidatif stres biyomarkırlarının (hidrojen peroksit, 8-

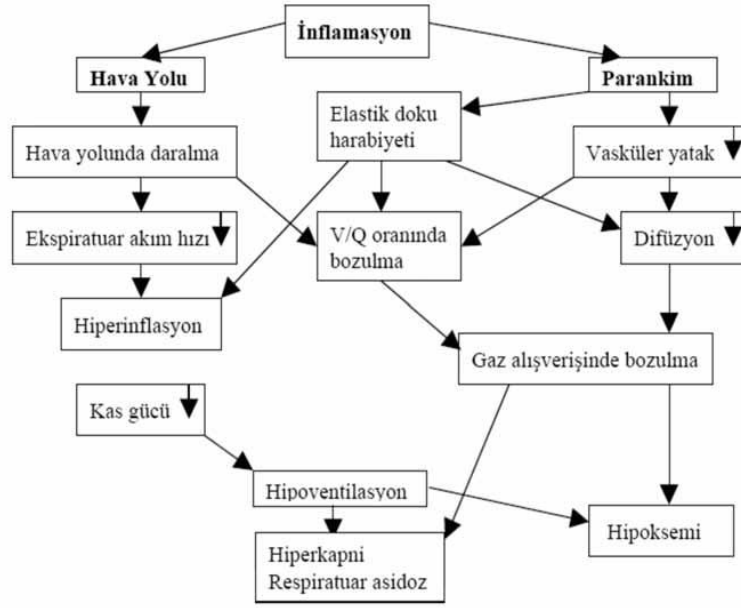
izoprostan gibi) arttığı bildirilmiştir. Oksidatif stres, alevlenme dönemlerinde çok daha fazla artmaktadır. Oksidanlar, sigara dumanı, diğer inhale edilen partiküller ve aktive edilen inflamatuvar hücrelerden (makrofajlar, nötrofiller gibi) kaynaklanmaktadır (GOLD, 2013).

1.1.6.2.3. Proteaz-Antiproteaz Dengesi

KOAH'lı hastaların akciğerlerinde, bağ dokuyu yıkan proteazlar ve bunu önleyen antiproteazlar arasındaki dengenin bozulduğuna dair çelişkili kanıtlar bulunmaktadır. Bu hastalarda, inflamatuvar ve epitel hücrelerden derive olan bazı proteazlarda artış gözlenmektedir. Bu proteazların birbirleriyle etkileşim içinde olabileceklerine dair kanıtlar artmaktadır. Akciğer parankimindeki major bağ doku bileşeni elastinin proteaz aracılı yıkımının, amfizemin önemli özelliklerinden biri olduğu ve muhtemelen geri dönüşümsüz olduğu düşünülmektedir. Nitekim bir proteaz inhibitörü olan α -1 Antitripsinin eksikliği KOAH ile ilişkilendirilmiştir. (GOLD, 2013; Sorroche ve ark, 2015).

1.1.6.3.KOAH Patofizyolojisi

KOAH'taki patofizyolojik değişiklikler arasında hava akımı kısıtlanması, havanın içerde hapsolmesi, gaz değişim anormallikleri, silyer disfonksiyon, mukus hipersekresyonu, pulmoner hipertansiyon, kor pulmonale ve sistemik problemler sayılabilir. Bu değişiklikler ise hastalarda nefes darlığı, öksürük, balgam çıkarma, hipoksemi, hiperkapni, egzersiz kapasitesinde azalma ve bazı sistemik bulgulara neden olur (Şekil 1.5.) (Başyigit, 2010).



Şekil 1.5: KOAH' ta patofizyolojik değişimler (Başyigit, 2010 kaynağından uyarlanmıştır).

1.1.7. KOAH Alevlenmeleri

KOAH alevlenmeleri genellikle bakteri ve virüs enfeksiyonları ile tetiklenmektedir. Çevresel kirlenmeler ve bilinmeyen bazı faktörler de diğer nedenler arasında sayılabilir. Bakteri ve virüs enfeksiyonlarına karşı hastalarda karakteristik artmış bir inflamatuvar cevap gözlenmektedir. Alevlenmeler sırasında azalmış ekspiratuar akımla birlikte, hiperinflamasyonda ve hava hapsinde artış neticesinde dispne de artış gözlenmektedir (Parker ve ark, 2005). Bozulan ventilasyon/perfüzyon (ventilation/perfusion) "V/Q" oranına bağlı gelişen hipoksemi de yine alevlenmeler sırasında izlenebilen diğer bir bulgudur (Barbera ve ark, 1997). Pnömoni, tromboembolizm ve akut kardiyak yetmezlik gibi diğer durumlar KOAH alevlenmelerini taklit edebilir veya şiddetlendirebilir (GOLD, 2013).

1.1.8. KOAH'ta Tanı ve Evreleme

1.1.8.1.Tanı

Nefes darlığı, kronik öksürük veya balgam çıkarma şikayetleri olan ve Tablo 1.1.'de belirtilen risk faktörlerine maruz kaldığı düşünülen tüm hastalarda KOAH tanısı düşünülmelidir. Klinik olarak tanının konulabilmesi için spirometre gereklidir. Bronkodilatör uygulaması sonrasında FEV1/FVC < 0.70 ise KOAH tanısı doğrulanır (Zwar ve ark, 2011).

Tablo 1.1: KOAH tanısı için anahtar bulgular (GOLD, 2013).

| | |
|--|--|
| 40 yaş üstü bireylerde bu bulgulardan bir veya daha fazlasının bulunması halinde KOAH düşünülür ve spirometre yapılır. | |
| Nefes Darlığı | İlerleyici Egzersizle artan Kalıcı |
| Kronik Öksürük | Aralıklı olabilir veya balgam eşlik etmeyebilir |
| Kronik Balgam Üretimi | Kronik balgam üretimi her durumda KOAH'a işaret edebilir |
| Risk Faktörlerine Maruziyet Öyküsü | Sigara dumanı, Duman (Biyoyakıtlarla yemek pişirme ve ısınmadan) kaynaklanan mesleki maruziyet) |

1.1.8.2.Evreleme

KOAH'ta hava akımı kısıtlanmasının sınıflandırılması spirometre ölçümü ile yapılmaktadır. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığına karşı Küresel Girişim (Global

Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) “GOLD” kriterlerine göre spirometrik ölçümler kullanılarak yapılan evreleme Tablo 1.2.’de yer almaktadır (GOLD, 2013).

Tablo 1.2: GOLD kriterlerine göre KOAH’ta hava akımı kısıtlanmasının evrenmesi (GOLD, 2013 kaynağından uyarlanmıştır).

| Bronkodilatör uygulaması sonrasında FEV1/FVC < 0.70 olan hastalarda | | |
|--|----------|----------------------|
| GOLD 1: | Hafif | FEV1 ≥ % 80 predikte |
| GOLD 2: | Orta | FEV1 % 50 - 80 |
| GOLD 3: | Ağır | FEV1 % 30 - 50 |
| GOLD 4: | Çok ağır | FEV1 < % 30 |

Spirometrik evrelemeye ek olarak, bazı anketler yardımıyla hastalık semptomlarının, alevlenme riskinin ve komorbid hastalıkların değerlendirilmesi neticesinde, hastalığın ciddiyeti ve kişinin genel sağlık durumuna etkisi belirlenerek, en uygun tedavi şekilleri seçilir. Hastalık semptomlarını değerlendirmek amacıyla kullanılan Modifiye Medikal Araştırma Konseyi dispne testi, KOAH değerlendirme testi ve KOAH’ın klinik olarak sorgulanması gibi anketler GOLD tarafından önerilmektedir (GOLD, 2013).

1.2. KOAH ve Doğuştan Gelen İmmün Sistem Reseptörleri

İmmün sistem, doğuştan gelen ve edinilmiş immün sistem olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Doğuştan gelen immün sistemde, yabancı moleküllere karşı spesifik olmayan fakat hızlı bir cevap oluşturulur. Toll Benzeri Reseptörler (Toll-Like Receptors) “TLRs”, Nükleotid Bağlanma ve Oligomerizasyon Domeyn (Nucleotide-Binding Oligomerization Domain) “NOD” Benzeri Reseptörler (NOD-like

Receptors) “NLRs” ve Retinoik Asitle Uyarılabilir Gen Benzeri Reseptörler (Retinoic Acid Inducible Gene/RIG-Like Receptor) “RLRs” gibi, doğuştan gelen immün sistemin kalıp tanıma reseptörleri, Patojenlerle İlişkili Korunmuş Moleküler Kalıpları (Pathogen-Associated Molecular Patterns) “PAMP” veya zararlı moleküler motifleri tanır ve inflamatuvar cevabı indükler (Cosio ve ark, 2009; Hogg ve ark, 2009).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda doğuştan gelen immün sistemin KOAH’ın patofizyolojisinde rol oynadığı öne sürülmüştür. Hava kirliliği ve sigara dumanı gibi çevresel partiküllere maruziyet, KOAH’ın en önemli risk faktörleri arasında yer almakta ve hava yolu inflamasyonuna neden olmaktadır. Bu partiküller doğuştan gelen immün sistem reseptörlerinin bazı üyeleri tarafından ligand olarak algılanarak inflamatuvar yanıt oluşumuna neden olmaktadır (Kinose ve ark, 2012).

Diğer taraftan, latent adenoviral enfeksiyonlar ve çocukluk çağı respiratuvar enfeksiyonlarının hastalık patogenezinde etkili olması, enfeksiyonlara yatkınlıkla ilişkilendirilebilecek faktörlerin KOAH gelişiminde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda, son dönemde yapılan çalışmalar, doğuştan gelen immün sistem reseptörlerinin sinyal yolağındaki bozulmaların KOAH patogenezinde katkıda bulunabileceğini göstermiştir (Spelatas ve ark, 2009; Rohde ve ark, 2006).

KOAH hastalarında respiratuvar semptomların kötüleştiği alevlenme dönemleri izlenmektedir. Akciğer fonksiyonlarının düşmesine neden olan ve hastalığın kliniğini etkileyen alevlenmelere, hastaların bazılarında daha sık (yılda 3 ya da daha fazla) rastlanmaktadır.

KOAH alevlenmelerinin nedenleri arasında viral enfeksiyonlar, kirlilik, soğuk hava ve rutin tedavinin aksaması yer almakla birlikte alevlenmelerin % 40- 60 kadarında bakteriyel enfeksiyonlara rastlanmaktadır (Pabst ve ark, 2009). Dolayısıyla doğuştan gelen immün sistem reseptörlerinden NLR ailesinin üyesi olan NOD2 proteinin işlevinin bozulması, bakteriyel enfeksiyonlara yatkınlıkla sonuçlanabileceği için, *NOD2* geninin hem hastalığın patogenezinde hem de

alevlenme sıklığı üzerinde etkisi olabileceği düşünülmektedir (Kinose ve ark, 2012).

1.2.1. NOD Benzeri Reseptörler (NLR) Ailesi

İnsan vücudu sürekli olarak çok fazla çeşitlilikteki mikroorganizmalarla mücadele etmektedir. Bu mücadelede enfeksiyöz ajanlara karşı ilk cevap, doğuştan gelen immün sistem tarafından verilmektedir. Doğuştan gelen immün sistem genleri, bağırsaklar, deri, akciğer ve çeşitli vücut bölgelerinde homeostazı sağlamak amacıyla, yabancı maddelere karşı immün cevabın baskılanması veya stimüle edilmesi arasındaki hassas dengeyi düzenler. Bu dengenin bozulması ciddi enfeksiyöz hastalıklara, kronik inflamasyona ve otoimmün hastalıklara neden olabilir. Bu sistemin oluşturduğu immün cevabın başarısı ise patojenler tarafından sunulan korunmuş moleküler kalıpların tanınmasına bağlıdır. (Correa ve ark, 2012).

NLR ailesi, doğuştan gelen immünite proteinlerinin major alt ailelerinden biridir ve sitoplazmik PAMP'ları ve doku yaralanmalarının endojen ürünlerini tanıyan intraselüler kalıp tanıma reseptörleri olarak iş görürler (Correa ve ark, 2012). Reseptörler tarafından algılanan sinyal, Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B), stres kinazlar, İnterferon Düzenleyici Faktörler (İnterferon Regulatory Factor) "IRF", inflamatuvar kaspazlar ve otofaji aracılığıyla çeşitli konak savunma yollarını başlatır (Murray ve ark, 2005; Martinon ve ark, 2007; Petrilli ve ark, 2007; Tattoli ve ark, 2007). İnsanda NLR ailesi 22 üyeden oluşmaktadır (Correa ve ark, 2012). NLR proteinleri C terminal bölgesinde çeşitli sayılarda Lösince Zengin Tekrarlar (Leucine-Rich Repeats) "LRR" ve merkezde konumlanmış bir Nükleotid Bağlanma Domeyni (Nucleotide-Binding Domain/ NAIP, CIITA, HET-E, and TP1) "NBD/NACHT" içerirler. LRR bölgesi korunmuş mikrobiyal kalıpların ya da diğer ligandların tanınmasından sorumlu iken, NBD ise kendi oligomerizasyonunda görev alarak NLR aktivasyonunu sağlar. N terminal efektör domeyn ise sinyal aktarımına aracılık etmek için adaptör moleküllerle veya yolağın aşağısında yeralan efektör proteinlerle etkileşirler. N terminal domeynlerine bağlı olarak NLR ailesi üç alt

gruba ayrılmaktadır. Bunlar Kaspaz Aktifleştirici Domeyn (Caspase Recruitment Domain) “CARD” içerenler, Pirin Domeyn (PYRIN Domain) “PYD” içerenler ve diğer domeynleri içerenlerdir (Kanneganti ve ark, 2007; Murray ve ark, 2005; Inohara ve ark, 2005; Carneiro ve ark, 2007).

İnsan genomu CARD domaini içeren en az 5 tane NLR kodlar. Bunlar arasında NOD1, NOD2, NACHT, LRR ve PYD Domeynlerini İçeren Protein 1 (NACHT, LRR and PYD Domains-Containing Protein 1) “NLRP1”, NLR Ailesi CARD Domeyn İçeren Protein 4 (NLR Family CARD Domain-Containing Protein 4) “NLRC4” ve NOD Benzeri Reseptör A (NOD-Like Receptor A) “NLRA” yer almaktadır (Proell ve ark, 2008; Chamaillard ve ark, 2003a). Bu ailenin ilk keşfedilen üyelerinden biri NOD2 proteindir (Chaput ve ark, 2013).

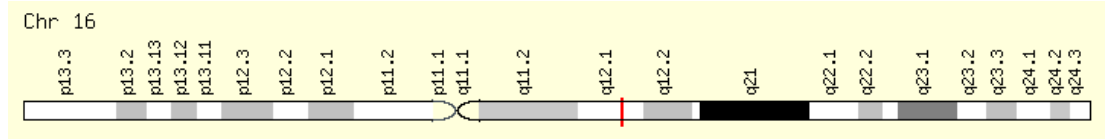
1.2.2. NOD2'nin Moleküler Özellikleri

NOD2'yi kodlayan gen kromozom 16q21'de lokalize, 39.5 kilobaz uzunluğunda ve 16 ekzondan oluşmaktadır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/64127#general-protein-info>). Genin alternatif kesilmeden kaynaklanan 10 farklı transkripti olduğu bilinmektedir. Bu transkriptlerin uzunlukları 338 nükleotidden 4486 nükleotide (35-1040 aminoasit) kadar değişmektedir. Bunlardan 3 tanesinin protein ürünü mevcutken, 5 tanesi degradasyona uğramakta, 2 tanesinin ise protein ürünü bulunmamaktadır

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_Protein?db=core;g=ENSG00000167207;r=16:50727514-50766988;t=ENST00000300589). *NOD2* geninin 16. kromozom üzerindeki lokasyonu Şekil 1.6.'da gösterilmektedir (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOD2>).

Yapılan çalışmalarla standart ilk ekzonun 5' ucunda ve yaklaşık 3.5 kilobazlık yoğun CpG adasının içinde yer alan, alternatif iki ilk ekzonun varlığı ortaya konmuştur. Bu alternatif ilk ekzonların (ekzon 1a ve 1b) standart ekzon 2'ye bağlanması sonucu ifadelenen iki farklı izoform (ekzon 1a/1b/ 2 ve ekzon 1a/2)

bulunmaktadır. Fizyolojik şartlarda bu izoformlar yüksek miktarda ifade edilmekte ve *NOD2* transkriptlerinin çoğunluğunu oluşturmaktadır. Bu izoformların ifadenme miktarlarının, inflamatuvar şartlar altında değiştiği ve bu değişimin *NOD2* regülasyonu üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. (Rosentiel ve ark, 2007). *NOD2*'nin bir diğer izoformu *NOD2-S* olarak adlandırılmaktadır. Bu izoformda ekzon 3 atlanmıştır ve oluşan proteinde sadece bir tane CARD domeyni bulunmaktadır. Bu izoformun fazla ifadenmesi, *NOD2* ile indüklenen NF κ B aktivasyonunu ve İnterlökin 8 (Interleukin 8) “IL-8” salınımını azaltır (Rosentiel ve ark, 2006).

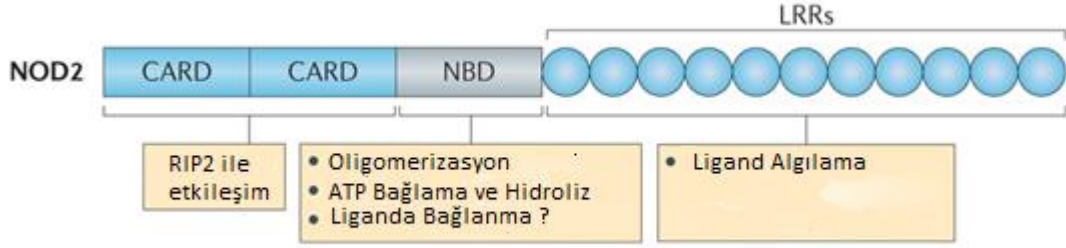


Şekil 1.6: *NOD2* geninin 16. kromozom üzerindeki lokasyonu (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOD2>).

NOD2 proteini 2 adet CARD domeyni, 1 adet NBD domeyni ve 11 adet LRR domeyni içeren 1040 aminoasit uzunluğunda bir proteindir. *NOD2* proteininin domeynleri ve bu domeynlerin fonksiyonları Şekil 1.7.'de görülmektedir (Philpott ve ark, 2014). *NOD2* makrofajlarda, dentritik hücrelerde, paneth hücrelerinde, keratinositlerde, intestinal epitelde, akciğerde, oral boşlukta ve osteoblastlarda ifadenmektedir (Correa ve ark, 2012). *NOD2*, hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerin hücre duvarlarında bulunan Muramil Di-Peptidi (Muramyl Di-Peptide) “MDP” LRR domeynleri aracılığıyla tanır. MDP'nin tanınmasıyla birlikte Reseptör Etkileşimli Serin/Treonin Protein Kinaz 2 (Receptor- Interacting Serine/Threonine Kinase 2) “RIP2” *NOD2* proteininin N terminal ucundaki CARD domeynleri ile bir araya gelir ve sonrasında standart IKK/I κ B/NF- κ B yolağı aktive edilerek immün cevap başlatılır (Rosentiel ve ark, 2007).

NOD2'nin bakteriyel olmayan enfeksiyonlarda da rolü olduğuna dair görüşler bulunmaktadır. Tek zincirli viral RNA'nın tanınmasını takiben, *NOD2* tarafından interferon- β aracılı antiviral cevabın indüklendiği düşünülmektedir. Respiratuvar sinsityal virüs, veziküler somatitis virüs ve influenza virüsünün tek zincirli

RNA'larının, standart NOD2 sinyal yolağının dışında, yine NOD2'nin yönlendirdiği ve mitokondrial antiviral sinyal proteininin de yer aldığı bir yolağı başlattığı gösterilmiştir. Bu sinyal yolağı, interferon 1 üretimine neden olan interferon 3 aktivasyonunun indüklenmesine neden olur. Bu verilere rağmen NOD2 eksikliğinde viral enfeksiyonlara yatkınlık gelişip gelişmediği net değildir (Zhong ve ark, 2013)



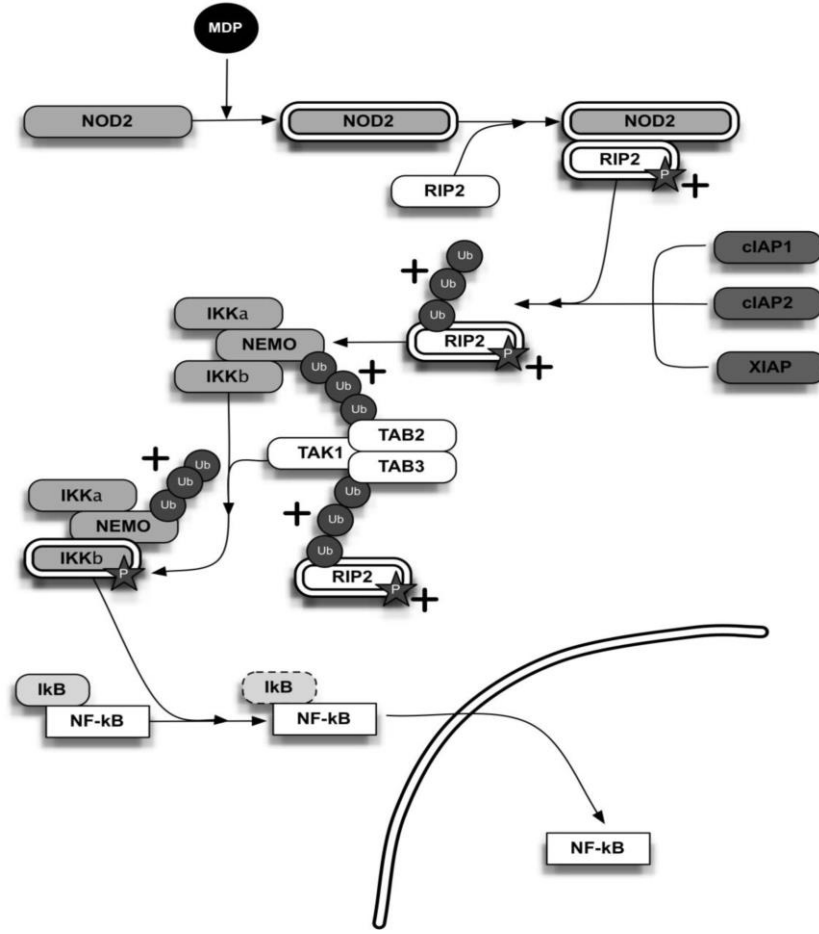
Şekil 1.7: NOD2 proteini domeynleri ve fonksiyonları (Philpott ve ark, 2014 kaynağından uyarlanmıştır).

1.2.3. NOD2 Sinyal Yolağı

NOD2 proteini, hem gram pozitif, hem de gram negatif bakterilerin peptidoglikan tabakasının yıkımı sonucu ortaya çıkan MDP'ye duyarlı intraselüler bir proteindir. Hücre içindeki bakterinin MDP aracılığıyla tanınması sonrasında patojenin temizlenmesi için, NOD2 yolağı aracılığıyla bir taraftan direkt olarak antimikrobiyal peptidlerin, sitokinlerin ve kemokinlerin salınması sağlanarak doğuştan gelen immün sistem indüklenirken, diğer taraftan kazanılmış immün sistemin bakteriyel savaşa zemin hazırlanır (Tigno-Aranjuez ve Abbott, 2012). Uyarılmamış durumdayken NOD2'nin LRR domainleri, geriye doğru NBD domeyni üzerine katlanarak proteinin inaktif halde kamasını sağlarlar. MDP ile karşılaşma sonrasında NOD2'de meydana gelen konformasyonel değişimler, hem NBD domeyni aracılığıyla proteinin oligomerizasyonuna, hem de homotipik CARD-CARD etkileşimleri ile RIP2'nin bağlanmasına izin verir (Ogura ve ark, 2001). NOD2'ye bağlanma RIP2 aktivasyonuna neden olur ve bu aktif NOD2-RIP2 kompleksi, sonrasında Mitojen ile Aktive Edilmiş Protein (Mitogen-Activated Protein) "MAP"

kinaz (JNK, ERK, p38) yolağı, NF-κB yolağı, otofaji ve antijen sunumu gibi bir takım intraselüler sinyal yolaklarını aktive eder (Kobayashi ve ark, 2005; Mccarthy ve ark, 1998; Inohara ve ark, 2000; Pauleau ve Murray, 2003; Cooney ve ark, 2010; Travassos ve ark, 2010; Homer ve ark, 2010). Fakat bu yolaklardan ve etkileşimlerden en iyi anlaşılmış olan NOD2 nin NF-κB transkripsiyon faktörü üzerine olan etkisidir.

İnflamatuvar hastalıklardan sakınmak için NF-κB aktivasyonunun iyi bir şekilde düzenlenmesi gerekmektedir. Hem aktivasyonun, hem de deaktivasyonun doğru bir şekilde koordine edilmesiyle, sadece fizyolojik olarak gerekli olan durumlarda inflamasyon gerçekleşir. Sitolik peptidoglikan ligandlarının tanınmasını takiben gerçekleşen NOD2 aktivasyonu ve bunu takiben RIP2 ile etkileşim, poliubikitinasyon ağı aracılığıyla I KappaB Kinaz (I Kappa B Kinase) “IKK” sinyal kompleksinin bir araya gelmesine yardım eder. RIP2, NF-κB Temel Modulatörünün (NF-kappa-B Essential Modulator) ”NEMO” lizin (K) 63 bağımlı poliubikitinasyonunu teşvik eder ve kendisi de aynı şekilde ubikitinlenmiş RIP2, oklu E3 ligazlar Apoptoz Protein 1’in Hücreyel İnhibitörü (Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein-1) “cIAP1”, Apoptoz Proteinin X’e Bağlı İnhibitörü (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) “XIAP”, TNF Reseptör İlişkili Faktör 2 (TNF Receptor-Associated Factor 2) “TRAF2”, TRAF5 ve TRAF6 tarafından bağlanır. (Yang ve ark 2007; Abbott ve ark, 2007; Hasegawa ve ark, 2008; Bertrand ve ark, 2009; Krieg ve ark, 2009). Hem RIP2 hem de NEMO üzerindeki K63 ubikitin zinciri, ubikitin bağlanma domeynleri içeren TAK1 Bağlanma Proteini 2 (TAK1-Binding Protein 2) “TAB2” ve TAB3 için kenetlenme bölgesi oluşturarak, Dönüştürücü Büyüme Faktörü β ile Aktive Edilmiş Protein Kinaz 1 (Transforming Growth Factor β Activated Kinase-1) “TAK1” yapıya katılmasını teşvik eder (Hasegawa ve ark, 2008; Bertrand ve ark, 2009; Krieg ve ark, 2009; Kanayama ve ark, 2004). TAK1’in yapıya katılmasıyla birlikte IKK kompleksinin TAK1 aracılı fosforilasyon ve aktivasyonunu takiben NF-κB aktivasyonu gerçekleşir (şekil 1.8) (Wang ve ark, 2001).



Şekil 1.8: NOD2 aracılı NF-κB aktivasyonu (Wang ve ark, 2001 kaynağından uyarlanmıştır).

1.2.4. NOD2 Varyantları ve Hastalıklar

NOD2 geninde 1384 adet genetik varyasyon bildirilmiştir. Bu varyasyonlardan bazılarının hastalıklarla ilişkisini araştıran çok sayıda çalışma yapılmış ve elde edilen sonuçlar, *NOD2*'nin bakteriyel ve viral enfeksiyonlardaki rolüne ek olarak, diğer bazı hastalıklarla olan ilişkisini de ortaya koymuştur (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Variation_Gene/Table?db=core;g=ENSG00000167207;r=16:50727514-50766988#ALL_tablePanel; Yao, 2013).

NOD2 mutasyonlarının İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı (İBH) ile ilişkisi yoğun şekilde araştırılmış ve üç yaygın varyantın (1007fs, G908R ve R702W) Ülseratif Kolitiden (ÜK) ziyade Crohn hastalığına yatkınlıkla ilişkisi olduğu bildirilmiştir

(Hugot ve ark, 2001; Hampe ve ark, 2001; Cuthbert ve ark, 2002). Avrupa popülasyonunda yapılan kapsamlı bir çalışmada bu üç varyantın İBH ve sağlıklı kontrol gruplarındaki sıklığı Tablo 1.3' de yer almaktadır (Lesage ve ark, 2002).

Tablo 1.3: Üç farklı yaygın *NOD2* gen mutasyonunun İBH ve normal popülasyonda görülme sıklıkları (Lesage ve ark, 2002).

| Populasyon | 1007fs | G908R | R702W |
|-------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Olgu/Çalışma grubu (%) | Olgu/Çalışma grubu (%) | Olgu/Çalışma grubu (%) |
| Avrupa | | | |
| Crohn | 96/906 (11) | 55/906 (6) | 98/906 (11) |
| ÜK | 4/318 (2) | 1/318 (0.3) | 10/318 (3) |
| Sağlıklı | 4/206 (2) | 2/206 (1) | 9/206 (4) |
| Ülke | | | |
| İngiltere | 22/587 (1.9) | 13/587 (1.1) | 49/587 (4.2) |
| Amerika | 21/273 (3.8) | 9/273 (1.6) | 20/273 (3.7) |
| Kanada | 6/100 (3) | 4/100 (2) | 10/100 (5) |

Crohn hastalığı ile ilişkili *NOD2* varyasyonlarının, heterozigot durumdayken hastalık riskini 2-4 kat, homozigot durumdayken 20-40 kat arttırdığı bildirilmiştir. Hastalıkla ilişkili varyasyonların proteinin LRR kısmında yer aldığı ve fonksiyon kaybına yol açan mutasyonlar olduğu anlaşılmıştır (Tigno-Aranjuez, Abbott, 2012). 1007fs, G908R, R702W ve diğer 13 *NOD2* varyantının peptidoglikan bağımlı cevabı bozduğu rapor edilmiştir. İn vitro hücrel transfeksiyon çalışmalarında major 3 varyanttan sadece 1007fs'nin tam fonksiyon kaybına neden olduğu gözlenmiştir. G908R ve R702W varyantları düşük seviyede de olsa aktivite gösterirken yabancıl tip *NOD2*'ye kıyasla önemli seviyede NF-κB aktivasyonunun azalmasına neden olduğu belirtilmiştir (Chamaillard ve ark, 2003b; Yao ve ark, 2013).

NOD2 proteini NF- κ B aktivasyonu ile inflamasyona neden olmaktadır ve normalde bu inflamatuvar cevap dengeli bir şekilde oluşturulmaktadır. Crohn hastalığı gibi inflamatuvar hastalıklarda, NOD2'nin fonksiyon kazandıran mutasyonlarının, NF- κ B'nin aşırı aktivasyonu aracılığıyla anormal inflamasyon artışına neden olması hiç de şaşırtıcı bir durum değildir. Diğer taraftan fonksiyon kaybettiren mutasyonların da düşünülenin aksine inflamasyon artışına neden olduğu görülmektedir. Bu durum her ne kadar çelişkili gibi görünse de, immün yetersizlik çerçevesinden bakıldığında durum anlaşılabilir. Fonksiyon kaybı sonucunda patojenlere gerekli cevap verilemediğinde, patojen istilası artmakta ve bu patojenlerin başka yollar aracılığıyla tanınması sonucunda, çok daha şiddetli bir immün cevap oluşturulmaktadır. Bu açıklamaya alternatif olarak bazı araştırmacılar, 1007fs varyantının, bir anti-inflamatuvar sitokin olan İnterlökin 10'un (Interleukin 10) "IL-10" baskılanmasına neden olduğunu, bunun da aşırı inflamasyona yol açtığını düşünmektedirler (Tigno-Aranjuez, Abbott, 2012).

NOD2 genetiğinin ilginç yönlerinden biri, hepsi NBD domeyninde yer alan farklı mutasyon setlerinin, farklı granülo-matoz hastalıklara neden olmasıdır. Bunlardan biri Erken başlangıçlı sarkoidoz, diğeri ise Blau sendromudur (Miceli-Richard ve ark, 2001; Kanazawa ve ark, 2005). Crohn hastalığından farklı olarak bu iki granülo-matoz hastalıkla ilişkilendirilen *NOD2* mutasyonları, otozomal dominant ve fonksiyon kazandıran mutasyonlardır. (Kanazawa ve ark, 2005; Okafuji ve ark, 2009). Erken başlangıçlı sarkoidoz ve Blau sendromu deri, eklem ve göz iltihabı ile karakterizedir, ve aynı genetik hastalığın sporadik ve ailesel formları olduğu düşünülmektedir (Kanazawa ve ark, 2005; Rose ve ark, 2005). İki bin bir yılında Blau sendromlu 4 Fransız ve Alman ailede NBD domeyninde yer alan yanlış anlamlı üç mutasyon (R334Q, R334W ve L469F) saptanmış, fakat bu mutasyonlara 457 Crohn hastasında rastlanmamıştır. İki bin üç yılında ise bu mutasyonların fonksiyon kazandıran mutasyonlar olduğu anlaşılmıştır (Stronati ve ark, 2008; Miceli-Richard ve ark, 2001).

Son dönemde yapılan araştırmalar *NOD2* mutasyonlarıyla ilişkili yeni bir Otoinflamatuvar hastalığı ortaya koymuştur. Bu hastalık NOD2 İlişkili Otoinflamatuvar

Hastalık (NOD2-Associated Autoinflammatory Disease) “NAID” olarak adlandırılmaktadır. Hastalık periyodik ateş, dermatit, poliartrit, gastrointestinal ve sikka benzeri semptomlarla karakterize olup *NOD2* geni IVS8+158, R702W ve R703C varyantlarıyla ilişkilendirilmiştir. (Yao ve ark, 2011; Yao ve ark, 2012a; Yao ve ark, 2012b). Bu varyasyonlar, *NOD2*'nin NBD ve LRR domeynleri arasında yer almaktadır ve fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir (Chamaillard ve ark, 2003b; Miceli-Richard ve ark, 2001).

NOD2'nin alerjik cevap gelişiminde de rolü olduğu düşünülmektedir. İki farklı Alman çalışma grubunda yapılan çalışmalarda, bazı *NOD2* polimorfizmlerinin artmış total serum İmmünglobulin E (Immunoglobulin E) “IgE” seviyesi, atopik dermatit ve atopik rinitle ilişkili olduğu, diğer bazı polimorfizmlerin ve haplotiplerin ise bu problemlere karşı koruyucu etkisi olabileceği ifade edilmiştir (Weidinger ve ark, 2005; Kabesch ve ark, 2003). Kanada ve Avustralya populasyonlarında yapılan bir diğer çalışmada, *NOD2* polimorfizmleri ve hava yolu aşırı duyarlılığı arasında ilişki saptanmıştır (Daley ve ark, 2009). Farelerde *NOD2* agonisti MDP kullanılarak yapılan çalışmalar da, benzer şekilde *NOD2*'nin Yardımcı T Hücre 2 (T Helper 2) “Th2” immünesinin oluşturulması, astım ve alerjik cevap gelişiminde rolü olduğunu göstermiştir (Magalhaes ve ark, 2008).

NOD2 geninin yaygın 3 varyasyonu ve romatoid artrit, sistemik lupus eritamosus, ankilozan spondilit, Behçet hastalığı, multipl skleroz ve ailesel akdeniz ateşi gibi çeşitli romatizmal hastalıklar arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalar, *NOD2* varyantlarıyla bu hastalıklar arasında anlamlı bir ilişki olmadığına işaret etmektedir. Yine sedef/sedefe bağlı artrit ile *NOD2* varyantları arasında potansiyel bir ilişki olduğu düşünülmesine rağmen, yapılan çalışmalardan sadece birinde sedefe bağlı artrit ve R702W polimorfizmi arasında ilişki bildirilmiştir (Yao, 2013). Buna karşın bazı çalışmalarda da farklı sonuçlar bildirmektedir. Örneğin, *NOD2*'nin multipl skleroz ve sistemik lupus eritamosus ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada, *NOD2* geni 908R varyasyonunun sistemik lupus eritamosus gelişiminde artmış riske neden olabileceği sonucuna varılmıştır (De Jager ve ark, 2006). Romatoid artrit ve *NOD2* ilişkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise, hastaların sinoviumlarında

NOD2'nin ifade olduğu ve *NOD2* aktivasyonunun TLR'lerle birlikte proinflamatuvar ve yıkıcı mediatörlerin üretimine neden olduğu anlaşılmıştır. Bu veriler, *NOD2*'nin romatoid artritteki inflamasyonda rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Ospelt ve ark, 2009).

NOD2 varyasyonlarının malignensilerdeki rolü hala tam olarak aydınlatılamamıştır (Kütikhin, 2011). Fakat 2014 yılında *NOD2* polimorfizmlerinin kanserle ilişkisini araştırmak amacıyla, 30 hasta-kontrol çalışmasının değerlendirildiği bir meta-analiz yapılmıştır. Bu meta-analiz sonucunda rs2066844, rs2066845 ve rs2066847 varyasyonlarının artmış kanser riski ile ilişkili olabileceği, rs2066842 varyasyonunun ise kanser riski ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir (Liu ve ark, 2014).

NOD2'nin, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. Pneumoniae* ve *Mycobacterium tuberculosis* gibi akciğer patojenlerine duyarlı olduğu bilinmektedir. *NOD2* geni susturulmuş farelerin kemokin üretiminde ve nötrofillerin prosele katılımındaki bozulmalara ek olarak, *C. pneumoniae* ve *L. pneumophila*'ye karşı geliştirdikleri antibakteriyel defansda da azalmalar gözlenmiştir. *NOD2*'nin aynı zamanda pulmoner tüberkülozun kronik fazında geliştirilen immünitede gerekli olduğu ve genin polimorfizmlerinin tüberküloza duyarlılık ya da dirençle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Chaput ve ark, 2013).

1.2.4.1. NOD2 ve KOAH

Yapılan çalışmalarla KOAH patofizyolojisinde doğuştan gelen immün sistemin rol oynadığı ileri sürülmüştür. KOAH'ın en önemli risk faktörleri arasında yer alan sigara dumanı ve çevresel kirliliklere maruziyet hava yolunda inflamasyonuna neden olmaktadır. Doğuştan gelen immün sistem reseptörlerinden bazılarının bu partikülleri ligand olarak algılaması, bu reseptörlerin KOAH gelişiminde rolü olduğunu düşündürmektedir (Kinose ve ark, 2012).

Respiratuar bakteriyel enfeksiyonlar KOAH gelişimine katkıda bulunan bir diğer etkidir. Ayrıca latent adenoviral enfeksiyonlar ve çocukluk çağı respiratuar enfeksiyonların hastalık patogeneğinde etkili olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda, enfeksiyonlara yatkınlıkla sonuçlanabilecek doğuştan gelen immün sistem reseptörlerinin fonksiyonundaki bozulmaların, KOAH gelişimine neden olabileceği düşünülmektedir (Rohde ve ark, 2006; Spelatas ve ark, 2009; Green ve ark, 2009).

Diğer taraftan KOAH hastalarında respiratuar semptomların kötüleştiği alevlenme dönemleri izlenmektedir. Alevlenmeler, akciğer fonksiyonunun düşmesine ve hastanın durumunun kötüleşmesine neden olmaktadır. KOAH alevlenmelerinin nedenleri arasında viral enfeksiyonlar, kirlilik, soğuk hava ve rutin tedavinin aksaması yer almakla birlikte, alevlenmelerin % 40- 60 kadarında bakteriyel enfeksiyonlara rastlanmaktadır (Pabst ve ark, 2009).

Dolayısıyla doğuştan gelen immün sistem reseptörlerinden NLR ailesinin üyesi olan NOD2 proteininin fonksiyonunun bozulması, bakteriyel enfeksiyonlara yatkınlıkla sonuçlanabileceği için, bu proteini kodlayan *NOD2* genindeki varyasyonların, hem KOAH gelişimi hem de ilerlemesi üzerine etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Literatürde NOD2 ile KOAH arasındaki ilişkinin araştırıldığı yalnızca bir çalışma bulunmaktadır. Japon popülasyonu üzerinde yapılan bu çalışmada *NOD2* rs1077861 polimorfizminin sıklığı, sigara içen veya geçmişte sigara içmiş olan KOAH hastaları ve kontrol grubu arasında anlamlı şekilde farklı bulunmuştur. Ayrıca bu polimorfizmin daha düşük FEV1 yüzdesi ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Araştırmacılar bu sonuca dayanarak, Japon toplumunda *NOD2* rs1077861 polimorfizminin KOAH gelişimi ve ilerlemesi üzerinde etkili olabileceğini rapor etmişlerdir (Kinose ve ark, 2012).

1.3. Polimorfizm

DNA dizisindeki kalıtılabilir değişiklikler mutasyon ya da polimorfizm olarak adlandırılmaktadır. Mutasyon terimi bu değişikliklerin bir populasyonun çok az bir kesiminde (%1'den az) görülmesi durumunda kullanılırken, polimorfizm terimi daha yaygın (%1'den fazla) şekilde görülmesi halinde kullanılmaktadır. Hem mutasyonlar hem de polimorfizmler fenotipik değişikliklere neden olabilirler veya olmayabilirler. Polimorfizmlerin fenotipi ciddi şekilde etkilemediği düşünölmektedir ve bunun genellikle doğru olduğu bildirilmiştir. Çünkü yaşam veya üreme yeteneği üzerine negatif etkisi olan bir genotipin populasyonda görülme sıklığı bu negatif etkilerinden dolayı düşmektedir. Polimorfizmler veya mutasyonlar DNA dizisindeki tek bir baz çiftini (bç) veya binlerce bç'ni içerebilir. Polimorfizmler genel olarak 4 grupta sınıflandırılmaktadırlar: (Buckingham ve Flaws, 2007)

- Restriksiyon frafragment uzunluk polimorfizmleri
- Değişken sayıdaki ardışık dizi tekrarları
- Kısa ardışık tekrar dizileri
- Tek nükleotid polimorfizmleri

1.3.1. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism) “RFLP”

Restriksiyon Endonükleazlar (Restriction Endonuclease) “RE”, özellikle bakteriler olmak üzere prokaryotik organizmalarda bulunurlar. Literatürde 3000'den fazla restriksiyon enziminin tanımlandığı bildirilmiştir. Bu enzimlerin temel biyolojik fonksiyonları, genomu bakteriyofaj gibi yabancı DNA'ya karşı korumaktır. Diğer taraftan, bakteri DNA'sı enzimin tanıma bölgelerinden metillendiği için, RE'ların kesimlerinden etkilenmezler. İsimlerini de bu özelliklerinden alan RE'ların, diğer fonksiyonları hala tartışılmakla birlikte, rekombinasyon ve transpozisyonda rol aldıkları düşünölmektedir.

RE'lar metilaz aktivitelere, alt ünite yapılarına, kesim özgüllüklerine ve kofaktör ihtiyaçlarına göre tip I, tip II, tip III, tip IV restriksiyon endonükleazlar olarak sınıflandırılırlar. Hedef nükleotidden veya çok yakınından kesim yapma özellikleri nedeniyle bilimsel çalışmalarda en çok kullanılan tip II restriksiyon endonükleazlar, çift zincirli DNA üzerinde yaklaşık 4-8 baz uzunluğundaki spesifik dizileri tanır ve her iki zinciri de bu tanıma bölgelerinden keserler (Pingoud ve Jeltsch, 2001, Lüleyap, 2008).

RE'ların kesim bölgelerini değiştiren, yani, ya yeni bir kesim bölgesi oluşturan, ya da var olan kesim bölgesini ortadan kaldıran, genellikle transisyon ya da transversiyon tipteki varyasyonlar, kesim sonucu elde edilen DNA fragmentlerinin uzunluklarındaki farklılıklardan yararlanılarak tespit edilebilirler. Bunun için, öncelikle varyasyonun olduğu bölgeyi içeren DNA kesimi uygun primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction) "PCR" işlemine tabi tutulur. Elde edilen hedef DNA, uygun restriksiyon enzimiyle muamele edilerek kesim gerçekleştirilir. Son olarak kesim sonrası elde edilen fragmentler agaroz jel elektroforezinde görüntülenerek genotipleme yapılır. (Lüleyap 2008). Genotipleme için PCR'la birlikte kullanılan bu yöntem PCR-RFLP yöntemi olarak adlandırılmaktadır.

1.4. Eş Zamanlı PCR

Eş zamanlı PCR yöntemi, farklı amaçlarla nükleik asitlerin kalitatif veya kantitatif olarak saptanabilmesi için kullanılan bir yöntemdir. Eş zamanlı PCR'ı standart PCR'dan ayıran iki önemli özellik vardır: (i) bu yöntemde termal döngü cihazıyla birleştirilmiş bir optik okuma sistemi bulunmaktadır, (ii) İkincisi ise PCR sırasında DNA çoğalmasını bilgisayar ekranına yansıtacak prob veya problemlerin kullanımı gerekmektedir. Bu yöntemde floresan işaretli prob ve boyaların kullanılmasıyla, oluşan DNA miktarı ile orantılı olarak floresan miktarı artar, dolayısıyla PCR, bu floresan ışığa sayesinde eş zamanlı olarak görüntülenebilir ve sonuçlar analiz

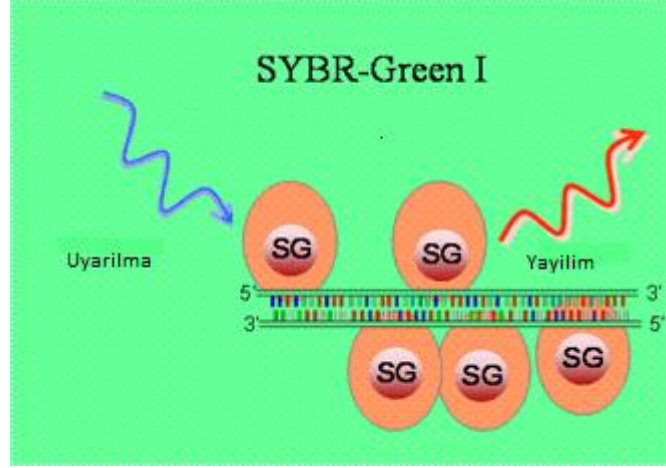
edilebilir. Bu özellikleri sayesinde eş zamanlı PCR, DNA'nın çoğaltılması ve ürün analizini tek bir tüpte yapmaya olanak vermektedir (Günel, 2007; Alp ve ark, 2012).

Eş zamanlı PCR'ın kullanım alanları arasında, biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını ve mRNA düzeyini kantitatif olarak belirleme, SNP analizi, DNA hasarı ve metilasyon tespiti, kromozom bozukluklarının ve patojenlerin belirlenmesi yer almaktadır. Yöntemin avantajları arasında hassas, verimli, hızlı ve kontaminasyon riskinin düşük olması sayılabilir (Günel, 2007).

Eş zamanlı PCR'da amplifikasyon sonrasında elde edilen ürünlerin saptanması çeşitli şekillerde yapılabilir:

Özgül Olmayan Belirleme Sistemi: Bu sistemde diziye spesifik olmayan çift zincirli DNA'ya bağlanabilen boyalar kullanılmaktadır. Bu amaçla en sık kullanılan boya **SYBR Green I**'dir. Primerlerin bağlanmasından sonra gerçekleşen polimerizasyon aşamasında, hedef DNA çift zincirli hale geldikçe, DNA'ya bağlanan boya miktarı artar ve buna bağlı olarak yayılan floresan miktarında artış gözlenir (Şekil 1.9) (<http://sequencereferral.com/technology.php>). Bu yöntemle optimize edilmiş PCR şartlarında çok sayıda gen çoğaltılabilir.

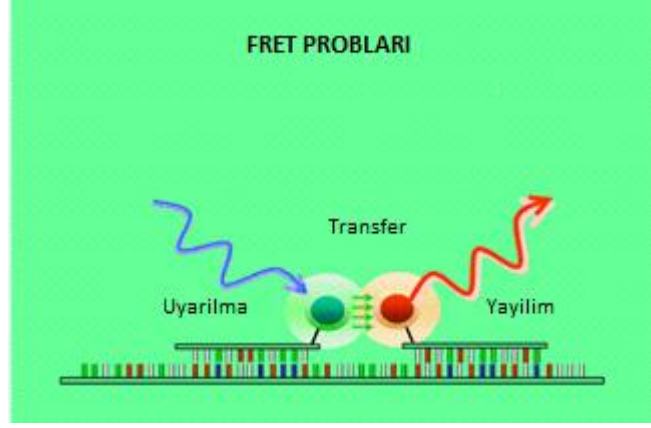
Elde edilen floresan ışımının istenen bölgenin çoğalmasıyla mı gerçekleştiği, yoksa non-spesifik bir ürün mü olduğunu anlamak için "melting curve" (erime eğrisi) analizi yapılır. Erime eğrisi analizinde cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. Elde edilen ürün ısının etkisiyle Erime Sıcaklığına (Melting Temperature) "T_m" ulaştığında, çift zincir açılmaya başlar, boya serbest kalır ve buna bağlı olarak floresan miktarı düşer. Örneğin T_m derecesi, pozitif kontrolün T_m derecesiyle karşılaştırılarak elde edilen ürünün hedef ürün olup olmadığı saptanır. T_m dereceleri aynı ise, aranan hedef bölgenin amplifikasyonun gerçekleştirildiği kabul edilir. Farklı T_m dereceleri saptanması durumunda, elde edilen amplifikasyonun özgül olmayan bir ürüne ait olduğu sonucuna varılır (Günel, 2007; Alp ve ark, 2012).



Şekil 1.9: SYBR Green I'in kullanıldığı özgül olmayan belirleme sistemi (<http://sequencereferral.com/technology.php> kaynağından uyarlanmıştır).

Özgül Belirleme Sistemi: Çoğaltılmak istenen hedef DNA dizisinin özgül olarak saptanması amacıyla işaretli probler kullanılır. Bu sistemde prob çoğaltılmış olan ürünün tamamına değil, ürün içinde özgül bir bölgeye bağlanır. Bu belirleme yönteminde kullanılan farklı probler mevcuttur.

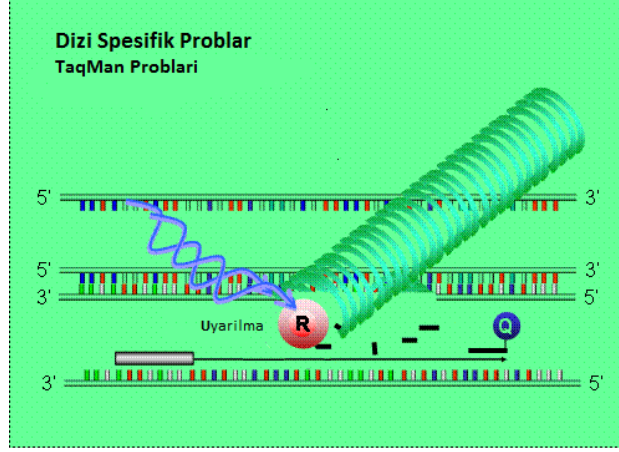
Hibridizasyon Probları: Bu probler LightCycler PCR cihazında kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Sistem Floresans Rezonans Enerji Transferi (FRET) prensibi ile çalışmaktadır. Özgül problardan biri 3' ucundan "donör" boya ile işaretli, diğeri 5' ucundan "akseptör" boya ile işaretlidir. PCR sırasında bu iki prob hedef bölgeye bağlanıp birbirine yaklaştığında enerji yayılımı gerçekleşir. Enerji donör boyadan akseptör boyaya transfer olur (Şekil 1.10). (<http://sequencereferral.com/technology.php>). Bu transfer sonucunda oluşan floresans miktarı, PCR süresince oluşan ürün miktarı ile orantılı olarak artar. (Günel, 2007; Alp ve ark, 2012).



Şekil 1.10: FRET prensibi ile çalışan hibridizasyon problemleri (<http://sequencereferral.com/technology.php>. Kaynağından uyarlanmıştır.)

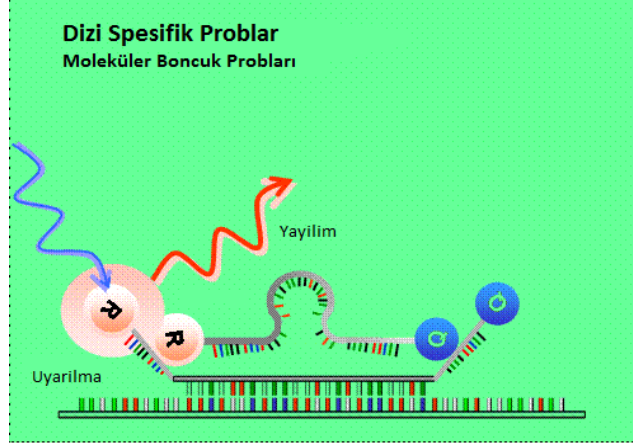
TaqMan (Hidroliz) Problemleri: TaqMan problemleri (dual labelled probe) 5' ucunda raportör florokrom, 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom ile işaretli problemlerdir. TaqMan problemleri hedef bölge tek zincirli hale geldiğinde primerlerin bağlanma bölgesinin arasında yer alan spesifik bir bölgeye bağlanır. Hedef bölge ile prob arasında hibridizasyon devam ettiği sürece baskılayıcı florokrom raportör florokromun sinyal oluşturmasını engeller. Primer uzaması başladığında ise probun olduğu bölgeye gelince Taq DNA polimeraz 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi ile probu 5' ucundan başlayarak yıkar. Bunu takiben raportör florokrom serbest kalır ve sinyal oluşturur. (Şekil 1.11) (<http://sequencereferral.com/technology.php>). Her döngüde üretilen ürün arttıkça floresan miktarında artma gözlenir. Bu belirleme sisteminde ışığa probun hedefe hibridize olması ile değil probun kırılarak ayrılması yani hidroliz olmasıyla gerçekleşir.

Hibridizasyon problemleri özellikle mutasyonların saptanmasına yönelik erime eğrisi analizine uygunken hidroliz problemleri bu amaçla kullanılmazlar (Günel, 2007; Alp ve ark, 2012).



Şekil 1.11: TaqMan (Hidroliz) Probları (<http://sequencereferral.com/technology.php> kaynağından uyarlanmıştır).

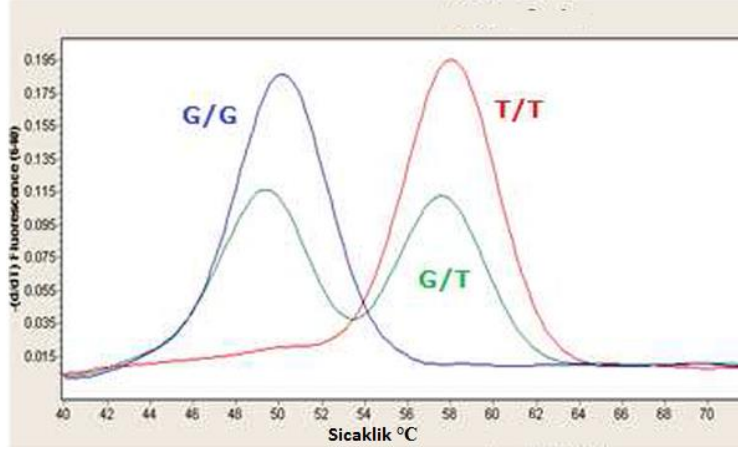
Moleküler Boncuk ve Diğer Konformasyonel Problar: Bu problemlerle PCR ürününü belirleme, DNA'ya bağlandıktan sonra problemlerde konformasyonel değişikliklerin olması ve bu değişikliklerin de ışımaya yol açması esasına dayanmaktadır. Moleküler boncuk problemleri, TaqMan problemlerinden geliştirilmiştir. Bu problemlerinde 5' ve 3' uçlarında baskılayıcı ve raportör florokromları bulunmaktadır. Ancak ürünün belirlenme aşaması probun kırılarak ışımaya oluşturması şeklinde olmamaktadır. Bu problemlerin 5' ve 3' uçları bir filamentin iki ucu gibi bükülerek dizayn edilmiştir. Raportör ve baskılayıcı florokromların komşuluğunda birbirine komplementer diziler bulunmakta, böylece florokromlar birbirine yakın konumlanmaktadır. Prob hedef DNA bölgesine bağlanırken bu yapıların doğrusal olarak açılması sonucu bağlanma gerçekleşmekte ve bunun sonucunda da florokromlar birbirinden ayrıldığı ve baskılayıcı etki ortadan kalktığı için ışımaya meydana gelmektedir (Şekil 1.12). (Günel, 2007; Alp ve ark, 2012; <http://sequencereferral.com/technology.php>).



Şekil 1.12: Moleküler Boncuk Probları (<http://sequencereferral.com/technology.php>. Kaynağından uyarlanmıştır).

Günümüzde reaksiyon sayısı kapasiteleri, eksitasyon-emisyon dalga boylarındaki farklılıkları, hızları ve kanal sayıları açısından farklılık gösteren farklı eş zamanlı PCR cihazları mevcuttur. Bunlardan en fazla kullanılanları arasında “Stratagene M x 3000p, M x 3005p ve M x 4000”, “Applied Biosystems 7300 ve 7500”, “Chromo4”, “Smart Cycler”, “Rotor-Gene” ve “LightCycler” yer almaktadır (Günel, 2007; Alp ve ark, 2012).

Lightcycler sisteminde FRET prensibine dayalı hibridizasyon problemleri kullanılmakta ve sonrasında genotipleme için erime eğrisi analizi yapılmaktadır. (Şekil 1.13) (<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0088879>).



Şekil 1.13: Lightcycler sistemi erime eğrisi pikleri. (<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0088879> kaynağından uyarlanmıştır).

1.5. Amaç

Bu çalışmanın amacı, KOAH ile *NOD2* gen varyantları arasındaki ilişkinin incelenmesidir. Elde edeceğimiz veriler, *NOD2* varyantlarının KOAH gelişimi ve hastalığın ilerlemesi üzerinde etkili olup olmadığının anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Çalışmamız Türk popülasyonunda KOAH ve *NOD2* gen varyantları arasındaki ilişkinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

“Nükleotid bağlanma ve Oligomerizasyon Domeyn 2 (*NOD2*) gen varyantlarının Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOA) gelişimi ve hastalığın şiddeti üzerine etkisinin araştırılması” isimli bu tezin çalışmalarına başlanmadan önce Afyon Kocatepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı’ndan 06.12.2012 tarihli ve 2012/8 toplantı numaralı etik kurul onayı alınmıştır.

2.1. Gereçler

2.1.1. Materyal Seçimi

Bu çalışmaya başlamadan önce istatistiksel olarak yeterli hasta sayısı 108 olarak belirlenmiştir (etki büyüklüğü medium (0,3), yanılma düzeyi % 5 ve güç % 80 olarak kabul edilmiştir). Çalışmaya Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları AD. ve Afyon Devlet Hastanesi Göğüs Hastalıkları kliniğinde GOLD standartları dikkate alınarak KOA tanısı almış 45 yaş üstü, en az 10 paket-yıl sigara içen, diğer inflamatuvar, diğer obstrüktif veya malign hastalıkları olmayan 168 hasta ve 45 yaş üstü, en az 10 paket-yıl sigara içen, Solunum Fonksiyon Testinde (SFT) obstrüksiyon saptanmamış, bilinen herhangi bir hastalığı olmayan ve aralarında akrabalık bağı bulunmayan 100 sağlıklı birey dahil edildi.

Çalışma kriterlerine uygun olan bireylere etik kurulca onaylanmış onam formları imzalatılarak çalışma grubu oluşturuldu. Daha önceden hazırlanmış hasta bilgi formlarında yer alan yaş, sigara içme durumu, sigara içme miktarı (paket-yıl), son 1 yıl içindeki alevlenme ve hastaneye yatış sayısı, aile öyküsü ve SFT parametreleri gibi bilgiler kayıt altına alındı. Mümkün olan hastalardan bir yıl aralıkla yapılmış iki farklı SFT alındı.

Kontrol grubu için ise, yaş, sigara içme durumu, sigara içme miktarı, aile öyküsü ve SFT parametrelerini içeren kontrol grubu bilgi formları dolduruldu.

Hasta ve kontrol gruplarından EDTA'lı tüplere 4cc kan alındı. Alınan kanlar DNA izolasyonu yapılana kadar +4°C' de muhafaza edildi. İzole edilen DNA örnekleri etiketlenerek -20 °C' de saklandı.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

| Cihaz Adı | Marka-Model |
|--|--|
| Mikro santrifüj | Heraeus – Biofuge pico |
| Soğutmalı santrifüj | Thermo |
| Hassas terazi | Sartorius |
| Hot plate | Nüve |
| Vorteks | Nüve |
| Spektrofotometre | NanoDrop ND-1000 |
| Termal Cyclers | Eppendorf - Mastercycler personal |
| Termal Cyclers | Techne |
| Mikropipetler (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl) | Eppendorf Research |
| Çeker ocak | |
| Distile su cihazı | Barnstead |
| Yatay elektroforez tankı | Thermo |
| Mikrodalga fırın | Arçelik |
| Buzdolabı | Profilo |
| Derin dondurucu | Bosch |
| Jel görüntüleme sistemi | BioDoc-It® Imaging System-UVP |
| Güç kaynağı | Apelex |
| Eş Zamanlı PCR | LightCycler 480 Instrument (Roche Diagnostics) |

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

| Kİmyasal veya Sarf Malzeme Adı | Marka |
|--|-----------------------|
| DNA İzolasyon Kiti | Roche |
| Rs2066844 (R702W) polimorfizmi için primerler F: 5'- CTCCTGGCAGGGCTGTTGTC -3' R: 5'- CATGCACGCTCTTGGCCTCAC -3' | Thermo Scientific |
| HpaII restriksiyon enzimi-10U/μl, | Thermo Scientific |
| HpaII enzim tamponu | Thermo Scientific |
| Taq DNA polimeraz-5U/μl, | Thermo Scientific |
| MgCl ₂ , 25mM | Thermo Scientific |
| 10X PCR tamponu | Thermo Scientific |
| dNTP mix, her biri 10 mM | Thermo Scientific |
| 100 bp DNA Ladder, 0,5μg/μl | Thermo Scientific |
| Ultra low range DNA ladder 0,5μg/μl | Thermo Scientific |
| Light Cycler FastStart DNA Master HybProbe | Roche Diagnostics |
| Rs 1077861 polimorfizmi için LightSNip Reagent Mix | Tıbbi Molbiol |
| Rs 3135500 polimorfizmi için LightSNip Reagent Mix | Tıbbi Molbiol |
| MgCl ₂ , 25mM | Tıbbi Molbiol |
| PCR Grdæ H ₂ O | Tıbbi Molbiol |
| Isopropanol | Sigma |
| Ethanol absolute | Merck |
| Agaroz | Multicell |
| 5 X TBE Buffer | Biological Industries |
| Etidyum bromür | Sigma |
| 6X Loading Dye | Fermentas |
| Bromphenol blue (Sodium Salt % 0,25, Ficoll 400 % 15) | Applichem |
| Steril 0,1-10 μl pipet ucu | Axygen |
| Steril 10-200 μl pipet ucu | Axygen |
| Steril 100-1000 μl pipet ucu | Axygen |
| PCR tüpleri (0,2ml, 0,7ml, 1,5 ml, 2ml) | Axygen |

2.1.4. Kullanılan Solüsyon ve Tamponların Hazırlanması

| Solüsyon veya Tampon Adı | Hazırlama Şekli |
|---|--|
| Inhibitör removal Buffer | 20 ml absolute ethanol eklenerek hazırlandı. |
| Wash Buffer | 80 ml absolute ethanol eklenerek hazırlandı. |
| Proteinaz K | 4,5 ml PCR grade suda çözülerek hazırlandı. |
| Rs2066844 Forward Primer | Liyofilize içeriğe 439,1 µl PCR grade su eklenerek hazırlandı. |
| Rs2066844 Reverse Primer | Liyofilize içeriğe 353,6 µl PCR grade su eklenerek hazırlandı. |
| 0,5 X TBE Buffer | 5 X TBE Buffer'dan 1'e 9 oranında distile su ile seyreltilerek hazırlandı. |
| LightSNip Reagent Mix | Her vial 100 µl PCR grade su eklenerek hazırlandı. |
| LightCycler FastStart Reaction Mix HybProbe | 1b solüsyonu 1a solüsyonuna eklenerek hazırlandı. |

2.2. Yöntemler

2.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

- Önceden 70 C⁰'ye getirilmiş su banyosuna son basamakta ilave edilmek üzere yeterli miktarda elution buffer inkübasyona bırakıldı.
- 200 µl kan, 200 µl binding buffer ve 40 µl Proteinaz K 1,5 ml'lik tüpe sırasıyla eklendi.

3. Karışım vortekslendikten sonra santrifüjde spin atıldı ve 70 °C'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. 20 dakika sonunda karışımın üzerine 100 µl isopropanol eklendikten sonra vortekslendi, santrifüjde spin atıldı ve altında collection tüp (toplama tüpü) bulunan filtreli tüpe aktarıldı.
5. Filtreli tüpe aktarılan karışım 10 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve collection tüpler değiştirildi.
6. Inhibitor removal buffer'dan 500 µl ilave edildi ve 10 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra collection tüpler değiştirildi.
7. 500 µl wash buffer ilave edildi ve 10 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra collection tüpler değiştirildi.
8. Yıkama işlemi, yani 7. basamak tekrar edildi.
9. Yıkamalardan sonra boş collection tüple 13 000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Collection tüpler atıldı ve filtreli tüpler 1,5 ml'lik tüplere yerleştirildikten sonra 120 µl elution buffer ilave edilerek 10 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

2.2.2 Rs2066844 (R702W) Polimorfizmi için PCR-RFLP Yöntemiyle Genotipleme

NOD2 geninin 4. ekzonunda yer alan rs2066844 (R702W) (C/T) polimorfizminin genotiplemesi için PCR-RFLP yöntemi kullanıldı. Bunun için öncelikle toplam 50 µl'lik PCR karışımı hazırlandı. Thermal Cycler cihazında amplifikasyon gerçekleştirildikten sonra, kesim ürünleri % 2'lik agaroz jelde görüntülendi. Amplifikasyonu gerçekleştiren PCR ürünlerine uygulanan restriksiyon enzim kesimi sonrasında, kesim ürünleri % 3'lük agaroz jelde görüntülenerek genotipleme yapıldı.

2.2.2.1. PCR Karışımı

| Kullanılan Malzeme | Miktar |
|----------------------------|---------|
| 10X PCR Buffer | 5 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 2 µl |
| dNTP mix (25 mM) | 1 µl |
| F primer (10 pmol) | 1 µl |
| R primer (10 pmol) | 1 µl |
| Taq DNA polimeraz | 0.4 µl |
| PCR grade H ₂ O | 37,6 µl |
| Kalıp DNA | 2 µl |

Eppendorf tüpler içinde hazırlanan karışım pipetaj ve kısa bir santrüfuj işleminden sonra ısı döngüsü aşağıdaki şekilde hazırlanmış olan thermal cyclers'a yerleştirildi.

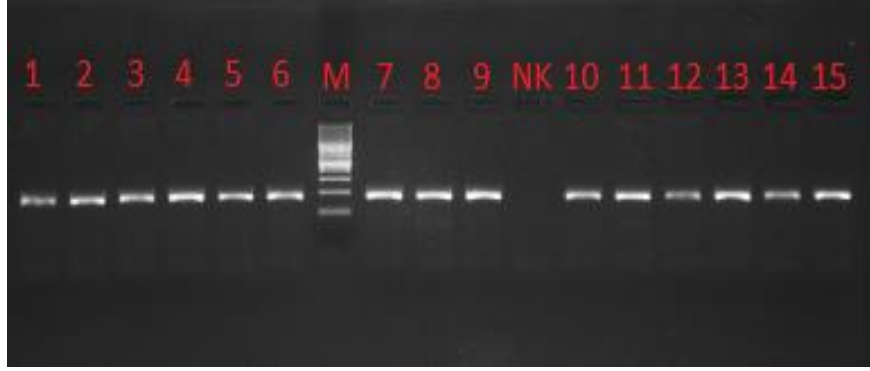
2.2.2.2. Thermal Cyclers Isı Döngüsü

| Basamak Numarası | Sıcaklık (°C) | Süre (Dakika) | Döngü Sayısı |
|------------------|---------------|---------------|--------------|
| 1 | 95 | 5 | 1 |
| 2 | 95 | 1 | 35 |
| 3 | 60 | 1 | 35 |
| 4 | 72 | 2 | 35 |
| 5 | 72 | 7 | 1 |
| 6 | 4 | Saklama | |

2.2.2.3. %2'lik Agaroz Jelde PCR Ürünlerinin Kontrolü

PCR sonunda, amplifikasyon ürünlerinin kontrol edilmesi için %2'lik agaroz jel hazırlandı. Jeli hazırlamak için 150 ml 0,5X TBE içine 3 g agaroz eklenerek

mikrodalga fırında saydamlaşınca kadar kaynatıldı ve içerisine çeker ocak altında 7,5 µl EtBr ilave edildi. Hazırlanan jel, jel aparatına döküldükten sonra taraklar yerleştirildi ve jel sertleşinceye kadar beklendi. Jel sertleştikten sonra taraklar çıkarılarak tanka yerleştirildi ve üzerine 0,5X TBE tampon eklendi. Beş µl PCR ürünü ve 1 µl 6X yükleme solüsyonu karıştırılarak jele yüklendi. PCR ürünlerinin büyüklüklerini belirlemek amacıyla DNA marker (100bp) kullanıldı. Negatif kontrol olarak PCR grade su kullanıldı PCR ürünleri 150 voltta yaklaşık 30 dakika yürütüldükten sonra, UV ışık altında görüntülendi. Şekil 2.1’de 176 bç uzunluğunda beklenen PCR ürünlerinin jel görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 2.1: Rs2066844 polimorfizmine ait PCR ürünlerinin % 2’lik agaroz jel görüntüleri. **M (Marker DNA):** 1000bç, 900bç, 800bp, 700bç, 600bç, 500bç, 400bç, 300bp, 200bç, 100bç. **NK:** Negatif kontrol. **1-15:** Hastalara ait 176 bç’lik PCR ürünleri.

2.2.2.4. Enzim Kesimi

Amplifiye olan örneklere HpaII enzimi kullanılarak enzim kesimi uygulandı. Enzim kesimi için hazırlanan karışım aşağıda verilmiştir.

| Kullanılan Malzeme | Miktar |
|--------------------|--------|
| PCR ürünü | 10 µl |
| PCR grade su | 18 µl |
| 10X Buffer B | 2 µl |
| HpaII enzim | 1 µl |

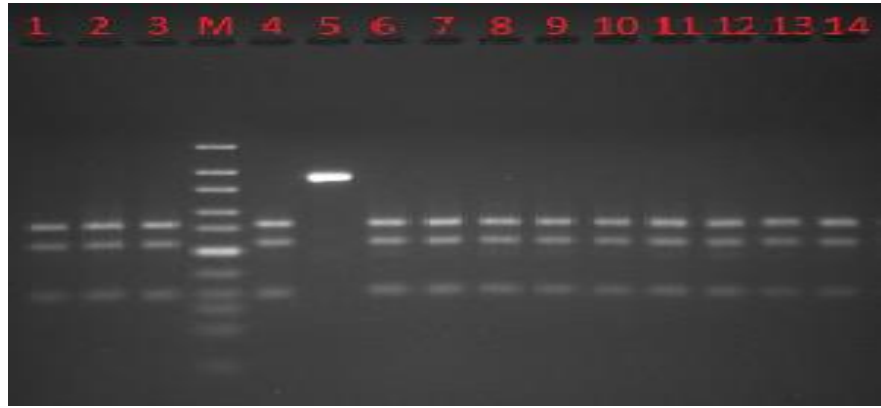
PCR tüpleri içinde hazırlanan karışım 37 °C’de 16 saat inkübe edildi. Kesim ürünleri ve DNA marker (ultra low range) % 3’lük agaroz jele yüklenerek 130 voltta 1,5 saat yürütüldükten sonra, jel görüntüleme sisteminde görüntüledi ve örneklerin genotipleri belirlendi. Olası genotipler için beklenen bant büyüklükleri aşağıda verilmektedir:

CC genotipi (yabanıl tip): 76 bç, 54 bç, 24 bç, 22 bç.

CT genotipi: 130 bç, 76 bç, 54 bç, 24 bç, 22 bç.

TT genotipi: 130 bç, 24 bç, 22 bç.

Şekil 2.2’de enzim kesim ürünlerinin jel görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 2.2: Rs2066844 polimorfizmine ait enzim kesim ürünlerinin % 3’lük agaroz jel görüntüleri. **M (Marker DNA):** 300 bç, 200 bç, 150 bç, 100 bç, 75 bç, 50 bç, 35 bç, 25 bç, 20 bç, 15 bç, 10 bç. **1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14:** CC. **5:** 176 bç’ lik PCR ürünü.

2.2.3. Rs1077861 Polimorfizmi için Eş Zamanlı PCR Yöntemiyle Genotipleme

NOD2 geninin 10. intronunda yera alan rs1077861 (A/T) polimorfizminin genotiplemesi için eş zamanlı PCR yöntemi kullanıldı.

2.2.3.1.Light Cycler FastStart DNA Master HybProbe İçeriği

Light Cycler FastStart DNA Master HybProbe Kiti:

1. LightCycler FastStart Enzim
2. LightCycler FastStart Reaction Mix HybProbe
3. MgCl₂ stok solüsyon, 25 mM
4. PCR grade su

İçermektedir.

2.2.3.2.Reaksiyon Karışımı

| Kullanılan Malzeme | Miktar |
|--|---------|
| PCR grade su | 14,4 µl |
| LightSNip Reagent Mix | 1 µl |
| Light Cycler FastStart DNA Master HybProbe | 2 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 1,6 µl |
| Kalıp DNA | 1 µl |

2.2.3.3. LightCycler 480 Cihazı İçin Programlama Değerleri

Eş zamanlı PCR cihazında rs1077861 polimorfizmi için oluşturulan programlama değerleri Tablo 2.1.' de yer almaktadır.

Tablo 2.1: Rs1077861 ve rs3135500 polimorfizmleri için eş zamanlı PCR cihazında oluşturulan programlama değerleri

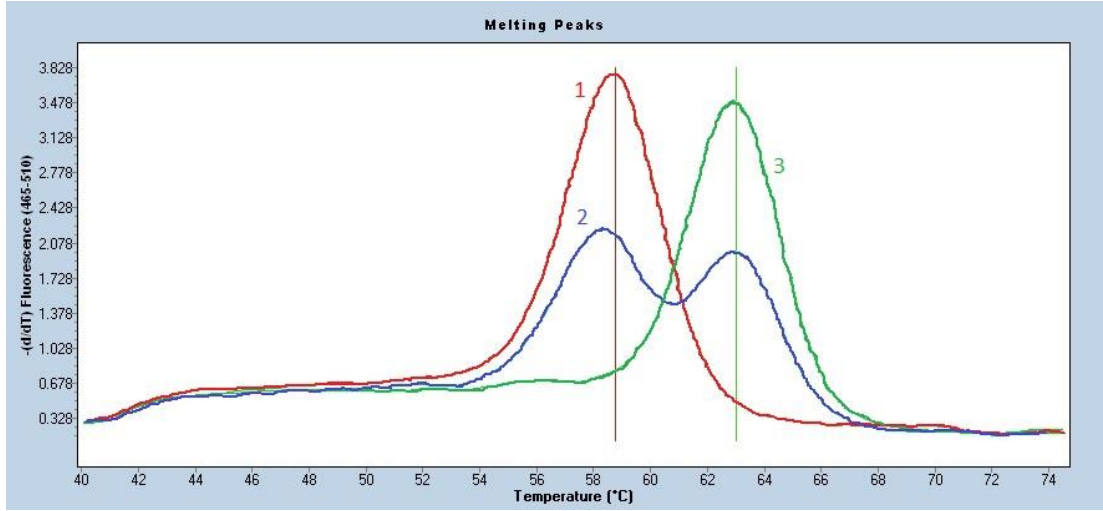
| Program | Denat. | Amplifikasyon | | | | Erime | | Soğuma |
|-------------------------|--------|---------------|-------|-------|-------|----------------|---------|--------|
| Parametreler | | | | | | | | |
| Analiz Modu | Yok | Ölçme | | | | Erime Eğrileri | | Yok |
| Döngüler | 1 | 45 | | | | 1 | | 1 |
| Segment | 1 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 |
| Hedef Sıcaklık (°C) | 95 | 95 | 60 | 72 | 95 | 40 | 75 | 40 |
| İnküb. Süresi (mm:ss) | 10:00 | 00:10 | 00:10 | 00:15 | 00:30 | 02:00 | 00:00 | 00:30 |
| Geçiş Hızı (°C/s) | 4,4 | 4,4 | 2,2 | 4,4 | 4,4 | 1,5 | - | 1,5 |
| Yakalama Modu | Yok | Yok | Tek | Yok | Yok | Yok | Sürekli | Yok |
| Veri Sayısı (°C başına) | | | | | | | 3 | |

2.2.3.4. İşlem Basamakları

1. PCR karışımı hazırlanmadan önce LightCycler cihazı açılarak self test yapması sağlandı.
2. Cihaza rs1077861 polimorfizmi için daha önceden yüklenmiş protokol seçilerek hasta listesi girişi yapıldı ve sistem çalışmaya hazır hale getirildi.
3. Çalışılacak hasta sayısı kadar reaksiyon karışımı hazırlanarak 96 kuyucuklu PCR plakasının her bir kuyucuğuna 19 µl dağıtıldı.
4. Cihaza girilen hasta listesindeki sıraya uygun olarak her kuyucuğa 1 µl hasta DNA'sı, negatif kontrol olarak seçilen kuyucuğa ise 1 µl PCR grade su eklendi.
5. Dağıtım işlemi tamamlandıktan sonra PCR plakasının üstü özel kaplama jelatini ile sıkıca kaplanarak cihaza yerleştirildi.
6. Cihaz çalıştırıldıktan yaklaşık 50 dakika sonra PCR döngüleri tamamlandı.

7. Erime eğrisi analizi seçilerek bu analiz yaptırıldıktan sonra, rs1077861 polimorfizminin genotiplemesi A alleli için $59,60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$), T alleli için $64,16\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) deki erime eğrilerine göre yapıldı.

Rs1077861 polimorfizmi AA, AT ve TT genotipine sahip olduğu belirlenen üç farklı hastaya ait erime eğrisi pikleri şekil 2.3.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.3: Rs1077861 polimorfizmi AA, AT ve TT genotiplerindeki hastalara ait erime eğrisi pikleri. 1: AA genotipi, 2: AT genotipi, 3: TT genotipi.

2.2.4. Rs3135500 Polimorfizmi İçin Eş Zamanlı PCR Yöntemiyle Genotipleme

NOD2 geninin 3' UTR bölgesinde yer alan rs3135500 (A/G) polimorfizminin genotiplemesi için eş zamanlı PCR yöntemi kullanıldı.

2.2.4.1. Light Cycler FastStart DNA Master HybProbe İçeriği

Light Cycler FastStart DNA Master HybProbe Kiti:

1. LightCycler FastStart Enzim
2. LightCycler FastStart Reaction Mix HybProbe

3. MgCl₂ stok solüsyon, 25 mM
4. PCR grade su

İçermektedir.

2.2.4.2. Reaksiyon Karışımı

| Kullanılan Malzeme | Miktar |
|--|---------|
| PCR grade su | 14,4 µl |
| LightSNip Reagent Mix | 1 µl |
| Light Cycler FastStart DNA Master HybProbe | 2 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 1,6 µl |
| Kalıp DNA | 1 µl |

2.2.4.3. LightCycler 480 cihazı için Programlama Değerleri

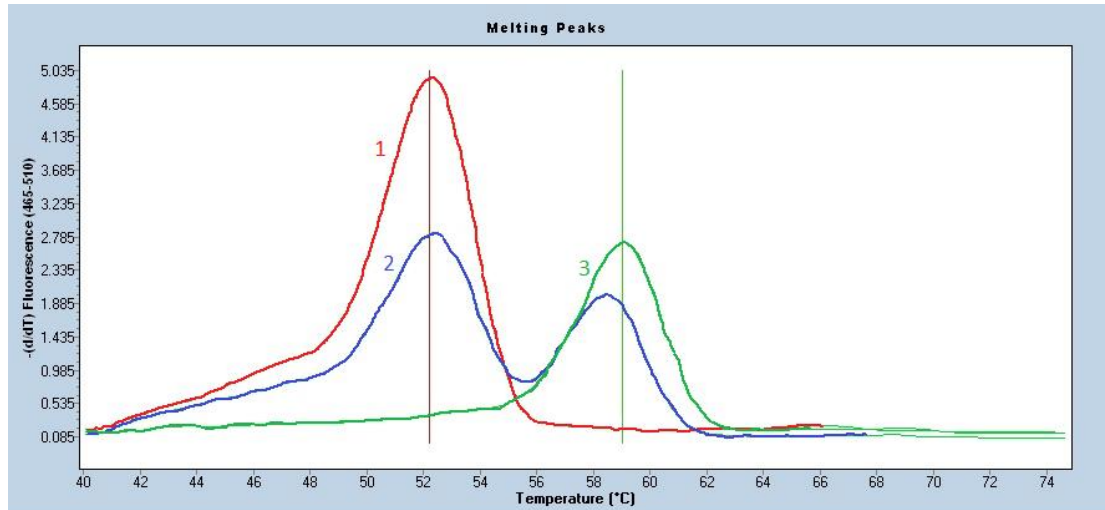
Eş zamanlı PCR cihazında rs3135500 polimorfizmi için oluşturulan programlama değerleri tablo 2.1.' de yer almaktadır.

2.2.4.4. İşlem Basamakları

1. PCR karışımı hazırlanmadan önce LightCycler cihazı açılarak self test yapması sağlandı.
2. Cihaza rs3135500 polimorfizmi için daha önceden yüklenmiş protokol seçilerek hasta listesi girişi yapıldı ve sistem çalışmaya hazır hale getirildi.
3. Çalışılacak hasta sayısı kadar reaksiyon karışımı hazırlanarak 96 kuyucuklu PCR plakasının her bir kuyucuğuna 19 µl dağıtıldı.

4. Cihaza girilen hasta listesindeki sıraya uygun olarak her kuyucuğa 1 µl hasta DNA'sı, negatif kontrol olarak seçilen kuyucuğa ise 1 µl PCR grade su eklendi.
5. Dağıtım işlemi tamamlandıktan sonra PCR plakasının üstü özel kaplama jelatini ile sıkıca kaplanarak cihaza yerleştirildi.
6. Cihaz çalıştırıldıktan yaklaşık 50 dakika sonra PCR döngüleri tamamlandı.
7. Erime eğrisi analizi seçilerek bu analiz yaptırdıktan sonra, rs3135500 polimorfizminin genotipleme A alleli için 53,64 °C ($\pm 2,5$ °C), G alleli için 60,15 °C ($\pm 2,5$ °C) deki erime eğrilerine göre yapıldı.

Rs3135500 polimorfizmi AA, AG ve GG genotipine sahip olduğu belirlenen üç farklı hastaya ait erime eğrisi pikleri şekil 2.4.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.4: Rs3135500 polimorfizmi AA, AG ve GG genotiplerindeki hastalara ait erime eğrisi pikleri. 1: AA genotipi, 2: AG genotipi, 3: GG genotipi.

2.2.5. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analiz IBM SPSS 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak yapıldı. Demografik özelliklerin hasta ve kontrol gruplarında normal dağılıp dağılmadığı Shapiro Wilk testi kullanılarak belirlendi. Hasta ve kontrol

grupları arasında demografik özellikler Mann-Whitney U ve Pearson Chi-Square testleri ile karşılaştırıldı. Hasta ve kontrol grupları arasında genotip ve allel sıklıklarının dağılımı için Fisher's Exact Test ve Pearson Chi-Square Testi (X^2 dağılımı) kullanıldı. KOAH riski ile rs1077861 ve rs3135500 polimorfizmleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için çok değişkenli lojistik regresyon analizi yapıldı. Bağımsız değişkenlerin seçimi ve en geçerli regresyon modelinin oluşturulması için geriye doğru adımsal regresyon analizi uygulandı. Kullanılan sigara miktarı (paket-yıl) ile yıllık FEV1 düşüşü arasında korelasyon olup olmadığını anlamak için Spearman Rho katsayısı hesaplandı. Yıllık FEV1 düşüşünün yaşa göre, sigara içme durumuna göre ve alevlenme sıklığına göre ayrı ayrı gruplandırılan hastalar arasında farklı olup olmadığını belirlemek için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Polimorfizmlerin farklı genotiplerini taşıyan hastalar arasında yıllık FEV1 düşüşünün farklı olup olmadığını belirlemek için Kruskal-Wallis testi uygulandı. P değeri $< 0,05$ olduğunda istatistiksel açıdan anlamlı olduğu kabul edildi.

3. BULGULAR

Bu çalışmada;

- Hasta ve kontrol grupları arasında *NOD2* geni rs2066844, rs1077861 ve rs3135500 varyasyonlarının genotip ve allel sıklıkları karşılaştırılmış,
 - Rs1077861 ve rs3135500 polimorfizmleri ile KOAH riski arasındaki ilişkiyi arştırmak için
 - o Rs1077861, rs3135500 polimorfizmleri, yaş (60 yaş altı ve üstü şeklinde kategorize edilerek), aile öyküsü, sigara (paket-yıl) bağımsız değişkenleri kullanılarak geriye doğru adimsal regresyon analizi yapılmış,
 - Alevlenme ve hastaneye yatış sayıları dikkate alınarak hastalar iki gruba ayrılmış
 - o **Alevlenme sayısı az olan hastalar:** Hiç alevlenmesi olmayan veya 1 alevlenmesi olan fakat hastane yatışı olmayan hastalar.
 - o **Alevlenme sayısı çok olan hastalar:** İki veya daha fazla sayıda alevlenmesi olanlar veya 1 kere hastane yatışı olan hastalar.
- ve bu iki grup arasında tüm polimorfizmlerin allel ve genotip sıklıkları karşılaştırılmış,
- Hava akımı kısıtlaması dikkate alınarak hastalar orta, ağır ve çok ağır olarak gruplara ayrılmış ve bu gruplar arasında tüm polimorfizmlerin allel ve genotip sıklıkları karşılaştırılmış,
 - GOLD'a göre FEV1 değerleri, alevlenme sayıları, hastaneye yatış sayıları ve hastalık semptomları göz önünde bulundurularak hastalar A, B, C, D gruplarına ayrılmış ve bu gruplar arasında tüm polimorfizmlerin allel ve genotip sıklıkları karşılaştırılmış,
 - Hastalar aile öyküsü olanlar ve olmayanlar olarak iki gruba ayrılmış ve bu gruplar arasında tüm polimorfizmlerin allel ve genotip sıklıkları karşılaştırılmış,
 - Bir yıl aralıkla hastalardan alınan iki farklı solunum fonksiyon testinin FEV1 değerleri arasındaki fark alınarak yıllık FEV1 düşüşü hesaplanmış, bu düşüş ile sigara içme miktarı (paket-yıl) arasında ilişki olup olmadığı,
 - Yıllık FEV1 düşüşünün yaş (60 yaş altı / 60 yaş ve üstü), sigara içme durumu ve alevlenme sıklığına göre ayrı ayrı gruplandırılan hastalar arasında değişip değişmediği,

- Yıllık FEV1 düşüşünün polimorfizmlerin farklı genotiplerini taşıyan hastalar arasında farklı olup olmadığı araştırılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen KOAH'lı olgular ve kontrol grubu olgularına ait genel özellikler ve bulgular Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1: KOAH'lı olgular ve kontrol grubu olgularına ait demografik özellikler ve bulgular.

| | KOAH Grubu (ort±SD) veya N, (%) | Kontrol Grubu (ort±SD) veya N, (%) | P değeri |
|--|---------------------------------------|--|----------|
| Sayı | 168 | 100 | |
| Yaş Ortalaması | 64 ± 8,55 | 60 ± 7,96 | 0,000 |
| Aile Öyküsü (+) | 54 (32) | 16 (16) | 0,004 |
| Sigara (paket-yıl) | 47,6 ± 33,8 | 37,4 ± 22,3 | 0,059 |
| Eski FEV1 (L) | 1,37 ± 0,58 | | |
| Yeni FEV1 (L) | 1,15 ± 0,56 | 2,95 ± 0,48 | 0,000 |
| Eski FEV1 (%) | 47 ± 18,79 | | |
| Yeni FEV1 (%) | 40,7 ± 17,86 | 97 ± 11,34 | 0,000 |
| FEV1/FVC (%) | 60,6 ± 7,02 | 85,5 ± 8,08 | 0,000 |
| FEF 25-75 (%) | 35 ± 17,31 | 100,8 ± 26,49 | 0,000 |
| SPO ₂ (%) | 93 ± 6,00 | 97 ± 1,20 | 0,000 |
| Sigara içme durumu | | | 0,077 |
| Eski içici | 138 (82,1) | 73 (73) | |
| Aktif içici | 30 (17,9) | 27 (27) | |
| Alevlenme Sayısı | | | |
| Alevlenme sayısı az olanlar | 53 (31,7) | | |
| Alevlenme sayısı çok olanlar | 114 (68,3) | | |
| Evreleme (Hava akımı kısıtlamasına göre) | | | |
| Orta | 50 (29,9) | | |
| Ağır | 64 (38,3) | | |
| Çok ağır | 53 (31,7) | | |
| Evreleme A-D (GOLD'a göre) | | | |
| A | 52 (31,1) | | |
| B | 10 (6) | | |
| C | 64 (38,3) | | |
| D | 41 (24,6) | | |

3.1. Rs2066844 (R702W) Polimorfizmine Ait Bulgular

3.1.1. Hasta ve Kontrol Grupları Arasında Rs2066844 Polimorfizmi Genotip ve Allel Sıklıkları

NOD2 geninin 4. ekzonunda yer alan rs2066844 (R702W) (C/T) polimorfizmi için insanda CC (atasal), CT ve TT olmak üzere 3 ayrı genotip bulunmaktadır. Bu çalışmada hasta grubunda genotip dağılımı % 99,4 (167/168) CC, % 0,6 (1/168) CT olarak bulunmuş, TT genotipine rastlanmamıştır. Kontrol grubunda ise olguların hepsinin % 100 (100/100) CC, genotipine sahip olduğu anlaşılmıştır. Rs2066844 (R702W) polimorfizmi için genotip dağılımı hasta ve kontrol grupları arasında değerlendirilmiş ve aralarında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. ($p>0,05$) (Tablo 3.2.).

Hasta grubunda C ve T allellerinin sıklıkları sırasıyla % 99,7 ve % 0,3 olarak bulunurken, kontrol grubunda T alleleline rastlanmamıştır. Rs2066844 (R702W) polimorfizmi için allel sıklıkları hasta ve kontrol grupları arasında değerlendirilmiş ve aralarında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2: Hasta ve kontrol gruplarında rs2066844 (R702W) polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları.

| Rs2066844 | Hasta | Kontrol | Toplam | p değeri |
|---------------------------------|------------|-----------|------------|-------------|
| Genotip Sıklıkları N (%) | | | | |
| CC | 167 (99,4) | 100 (100) | 267 (99,6) | |
| CT | 1 (0,6) | 0 | 1 (0,4) | 1,00 |
| TT | 0 | 0 | 0 | |
| Allel Sıklıkları % | | | | |
| C | 99,7 | 100 | 99,8 | 1,00 |
| T | 0,3 | 0 | 0,2 | |

3.1.2. Alevlenme Sıklığına Göre Ayrılan Hasta Grupları Arasında Rs2066844 Polimorfizmi Genotip ve Allel Sıklıkları

Alevlenme sayıları ve hastaneye yatış sayıları dikkate alınarak hastalar iki gruba ayrılmıştır:

- **Alevlenme sayısı az olanlar:** Hiç alevlenmesi olmayan veya 1 alevlenmesi olan fakat hastane yatışı olmayan hastalar.
- **Alevlenme sayısı çok olan hastalar:** İki veya daha fazla sayıda alevlenmesi olanlar veya 1 kere hastane yatışı olan hastalar.

Bu iki grup arasında rs2066844 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: Alevlenme sayıları az ve çok olan hasta grupları arasında rs2066844 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları.

| Rs2066844 | Alevlenme Sayısı | | Toplam | p değeri |
|---------------------------------|------------------|------------|------------|-------------|
| | Az | Çok | | |
| Genotip Sıklıkları N (%) | | | | |
| CC | 53 (100) | 113 (99,1) | 166 (99,4) | |
| CT | 0 | 1 (0,9) | 1 (0,6) | 1,00 |
| TT | 0 | 0 | 0 | |
| Allel Sıklıkları % | | | | |
| C | 100 | 99,6 | 99,7 | 1,00 |
| T | 0 | 0,4 | 0,3 | |

3.1.3. Hava Akımı Kısıtlamasına ve GOLD kriterlerine göre Evrelenen Hasta Grupları Arasında Rs2066844 Polimorfizmi Genotip ve Allel Sıklıkları

Hava akımı kısıtlaması dikkate alınarak hastalar orta (FEV1 % 50 – 80), ağır (FEV1 % 30 – 50) ve çok ağır (FEV1 < % 30) olmak üzere üç gruba ayrılarak bu gruplar arasında rs2066844 polimorfizminin genotip ve allel sıklıkları karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 3.4). Yine GOLD'a göre FEV1 değerleri, alevlenme sayıları, hastaneye yatış sayıları ve hastalık semptomları göz önünde bulundurularak hastalar A, B, C, D gruplarına ayrılmıştır:

A grubu (Düşük Risk, Daha Az Semptom) : GOLD kriterlerine göre hafif veya orta şiddette hava akımı kısıtlanması olan ve/veya yılda 0-1 alevlenmesi olan ve alevlenme nedeniyle hastane yatışı olmayan ve semptomu az olan hastalar.

B grubu (Düşük Risk, Daha Fazla Semptom): GOLD kriterlerine göre hafif veya orta şiddette hava akımı kısıtlanması olan ve/veya yılda 0-1 alevlenmesi olan ve alevlenme nedeniyle hastane yatışı olmayan ve semptomu daha fazla olan hastalar.

C grubu (Yüksek Risk, Daha Az Semptom): GOLD standartlarına göre ağır veya çok ağır şiddette hava akımı kısıtlanması olan ve/veya yılda ≥ 2 alevlenmesi olan ve alevlenme nedeniyle yılda ≥ 1 hastane yatışı olan ve semptomu az olan hastalar.

D grubu (Yüksek Risk, Daha Fazla Semptom): GOLD standartlarına göre ağır veya çok ağır şiddette hava akımı kısıtlanması olan ve/veya yılda ≥ 2 alevlenmesi olan ve alevlenme nedeniyle yılda ≥ 2 hastane yatışı olan ve semptomu fazla olan hastalar.

Bu gruplar arasında rs2066844 polimorfizminin genotip ve allel sıklıkları karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p > 0,05$) (Tablo 3.4).

Tablo 3.4: Hava akımı kısıtlamasına göre orta, ağır ve çok ağır olarak ayrılan hasta grupları arasında rs2066844 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları.

| Rs2066844 | Hava Akımı Kısıtlaması | | | | p değeri |
|---------------------------------|------------------------|----------|----------|------------|--------------|
| | Orta | Ağır | Çok Ağır | Toplam | |
| Genotip Sıklıkları N (%) | | | | | |
| CC | 49 (98) | 64 (100) | 53 (100) | 166 (99,4) | |
| CT | 1 (2) | 0 | 0 | 1 (0,6) | 0,308 |
| TT | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Allel Sıklıkları % | | | | | |
| C | 99 | 100 | 100 | 99,7 | 0.309 |
| T | 1 | 0 | 0 | 0,3 | |

Tablo 3.5: GOLD kriterleri dikkate alınarak A, B, C ve D şeklinde gruplandırılan hastalar arasında rs2066844 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları.

| Rs2066844 | Evreleme (GOLD) | | | | p değeri |
|---------------------------------|-----------------|----------|-----------|----------|--------------|
| | A | B | C | D | |
| Genotip Sıklıkları N (%) | | | | | |
| CC | 52 (100) | 10 (100) | 63 (98,4) | 41 (100) | |
| CT | 0 | 0 | 1 (1,6) | 0 | 0,655 |
| TT | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Allel Sıklıkları % | | | | | |
| C | 100 | 100 | 99,2 | 100 | 0.656 |
| T | 0 | 0 | 0,8 | 0 | |

3.1.4. Aile Öyküsü Olan ve Olmayan Hasta Grupları Arasında Rs2066844 Polimorfizmi Genotip ve Allel Sıklıkları

Hasta grup aile öyküsünde KOAH olanlar ve olmayanlar şeklinde 2 gruba ayrılarak bu gruplar arasında rs2066844 polimorfizminin genotip ve allel sıklıkları karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 3.6).

Tablo 3.6: Aile öyküsü olan ve olmayan hasta grupları arasında rs2066844 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları.

| Rs2066844 | Aile Öyküsü | | Toplam | p değeri |
|---------------------------------|-------------|------------|------------|-------------|
| | Pozitif | Negatif | | |
| Genotip Sıklıkları N (%) | | | | |
| CC | 54 (100) | 113 (99,1) | 167 (99,4) | |
| CT | 0 | 1 (0,9) | 1 (0,6) | 1,00 |
| TT | 0 | 0 | 0 | |
| Allel Sıklıkları % | | | | |
| C | 100 | 99,6 | 99,7 | 1.00 |
| T | 0 | 0,4 | 0,3 | |

3.2. Rs1077861 ve Rs3135500 Polimorfizmlerine Ait Bulgular

3.2.1. Hasta ve Kontrol Grupları Arasında Rs1077861 ve Rs3135500 Polimorfizmlerinin Genotip ve Allel Sıklıkları

NOD2 geninin 10. intronunda yer alan rs1077861 (T/A) polimorfizmi için insanda TT (atasal), TA ve AA olmak üzere 3 ayrı genotip bulunmaktadır. Bu çalışmada hasta grubunda genotip dağılımı % 27,4 (46/168) TT, % 60,1 (101/168) TA ve % 12,5 (21/168) AA, kontrol grubunda ise % 26 (26/100) TT, % 59 (59/100) TA ve % 15 (15/100) AA olarak bulunmuştur. Rs1077861 polimorfizmi için genotip dağılımı hasta ve kontrol grupları arasında değerlendirilmiş ve aralarında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 3.7.). Rs1077861 polimorfizminin genotip dağılımı hasta grupta Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu bulunmazken ($p=0.003$), kontrol grubunda uyumlu bulunmuştur ($p=0.052$).

Hasta grubunda T ve A allellerinin sıklıkları sırasıyla % 57,4 ve % 42,6 kontrol grubunda ise % 55,5 ve % 44,5 olarak bulunmuş ve allel sıklıkları açısından iki grup arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 3.7.). Ayrıca rs1077861 TT, TA ve AA genotipleri arasında FEV1 değerleri açısından da istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. ($p=0.121$)

Tablo 3.7: Hasta ve kontrol gruplarında rs1077861 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları.

| Rs1077861 | Hasta | Kontrol | Toplam | p değeri |
|---------------------------------|------------|---------|------------|--------------|
| Genotip Sıklıkları N (%) | | | | |
| TT | 46 (27,4) | 26 (26) | 72 (26,9) | 0,840 |
| TA | 101 (60,1) | 59 (59) | 160 (59,7) | |
| AA | 21 (12,5) | 15 (15) | 36 (13,4) | |
| Allel Sıklıkları % | | | | |
| T | 57,4 | 55,5 | 56,7 | 0,661 |
| A | 42,6 | 44,5 | 43,3 | |

NOD2 geninin 3' UTR bölgesinde yer alan rs3135500 (A/G) polimorfizmi için insanda AA (atasal), AG ve GG olmak üzere 3 ayrı genotip bulunmaktadır. Bu

çalışmada hasta grubunda genotip dağılımı % 12,5 (21/168) AA, % 44 (74/168) AG ve % 43,5 (73/168) GG, kontrol grubunda ise % 22 (22/100) AA, % 41 (41/100) AG ve % 37 (37/100) GG olarak bulunmuştur. Rs3135500 polimorfizmi için genotip dağılımı hasta ve kontrol grupları arasında değerlendirilmiş ve aralarında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 3.8). Rs3135500 polimorfizminin genotip dağılımı hasta ($p=0.74$) ve kontrol ($p=0.11$).gruplarında Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu bulunmuştur.

Hasta grubunda A ve G allellerinin sıklıkları sırasıyla % 34,5 ve % 65,5 kontrol grubunda ise % 42,5 ve % 57,5 olarak bulunmuştur. Rs3135500 polimorfizmi için allel sıklıkları hasta ve kontrol grupları arasında değerlendirilmiş ve aralarında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 3.8). Ayrıca rs3135500 GG, GA ve AA genotipleri arasında FEV1 değerleri açısından da istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. ($p=0.457$)

Tablo 3.8: Hasta ve kontrol gruplarında rs3135500 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları.

| Rs3135500 | Hasta | Kontrol | Toplam | p değeri |
|---------------------------------|--------------|----------------|---------------|-----------------|
| Genotip Sıklıkları N (%) | | | | |
| AA | 21 (12,5) | 22 (22) | 43 (16) | 0,117 |
| AG | 74 (44) | 41 (41) | 115 (43) | |
| GG | 73 (43,5) | 37 (37) | 110 (41) | |
| Allel Sıklıkları % | | | | |
| A | 34,5 | 42,5 | 37,5 | 0,065 |
| G | 65,5 | 57,5 | 62,5 | |

3.2.2. Rs1077861 ve Rs3135500 Polimorfizmleri ile KOAH Riski Arasındaki İlişki

Hasta ve kontrol grupları arasında rs1077861 ve rs3135500 polimorfizmlerinin genotip ve allel sıklıkları açısından istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Bununla birlikte hem rs3135500 polimorfizmi allel sıklıkları için bulunan p değerinin ($p=0,065$) önemlilik düzeyine yakın olması, hem de hasta ve kontrol grupları

arasında yaş ($p=0,000$), aile öyküsü ($p=0,004$) ve sigara içme miktarı (paket-yıl) ($p=0,059$) açısından fark olması nedeniyle, KOAH riski ve bu polimorfizmler arasındaki ilişki bu faktörlerin de dahil edildiği bir model kullanılarak çok değişkenli lojistik regresyon analizi ile tahmin edilmeye çalışılmıştır.

Bağımsız değişken seçimi ve en uygun regresyon modelinin oluşturulması için geriye doğru adımsal regresyon analizi uygulanmıştır. Bu analize dahil edilen aday bağımsız değişkenler arasında yaş (60 yaş altı/60 yaş ve üstü), aile öyküsü, sigara içme miktarı (paket-yıl), rs3135500 ve rs1077861 polimorfizmleri yer almaktadır. Bu bağımsız değişkenlerin bireysel olarak modele katkılarını gösteren skorlar ve p değerleri Tablo 3.9'da verilmektedir. Bu değerlere göre yaş (60 yaş altı/60 yaş ve üstü) ($p= 0,000$), aile öyküsü ($p= 0,004$), sigara içme miktarı (paket-yıl) ($p= 0,008$) ve rs3135500 polimorfizminin ($p= 0,117$, $p= 0,626$, $p= 0,040$) bireysel olarak modele katkı sağlayabilecek p değerlerine sahip olduğu, rs1077861 polimorfizminin ($p= 0,840$, $p= 0,857$, $p= 0,562$) ise modele katkı sağlamayacağı görülmektedir.

Tablo 3.9: Bağımsız değişkenlerin bireysel olarak modele katkılarını gösteren skorlar ve p değerleri.

| Bağımsız Değişken | Skor | df | p değeri |
|--------------------|--------|----|----------|
| Yaş (1) | 13,150 | 1 | ,000 |
| Sigara (Paket-Yıl) | 7,053 | 1 | ,008 |
| Aile Öyküsü (1) | 8,465 | 1 | ,004 |
| Rs1077861 (TT) | ,349 | 2 | ,840 |
| Rs1077861 (TA) (1) | ,033 | 1 | ,857 |
| Rs1077861 (AA) (2) | ,337 | 1 | ,562 |
| Rs3135500 (GG) | 4,298 | 2 | ,117 |
| Rs3135500 (AG) (1) | ,238 | 1 | ,626 |
| Rs3135500 (AA) (2) | 4,200 | 1 | ,040 |
| Genel İstatistik | 33,131 | 7 | ,000 |

Bu bağımsız değişkenlerle yapılan geriye doğru adimsal lojistik regresyon analizi 3. adımda sonlanmıştır. İlk adımda rs1077861 polimorfizmi, ikinci adımda ise rs3135500 polimorfizmi model dışı bırakılmıştır. Final modelde yaş, aile öyküsü ve sigara içme miktarı (paket-yıl) yer almaktadır. Sonuç olarak elde ettiğimiz modelde KOAH riskini tahmin etmek için kullanılan bağımsız değişkenler arasında rs1077861 ve rs3135500 polimorfizmleri bulunmamaktadır. Bu sonuç ise, çalışma grubumuzda bu polimorfizmler ile KOAH riski arasında ilişki olmadığına işaret etmektedir. Bununla birlikte KOAH riski 60 yaş ve üstü bireylerde 2,72 kat ($p=0,000$), aile öyküsü olanlarda 2,94 kat artarken ($p=0,001$), sigara içme miktarındaki (paket-yıl) bir birimlik artış, KOAH riskinde 1,013 kat artışa ($p=0,010$) neden olmaktadır. (Tablo 3.10). Buna göre lojistik regresyon denklemimiz:

$$Y = -0,882 + 1,001x_{YAŞGRUP} + 0,013x_{SİGARA(PAKET-YIL)} + 1,078x_{AİLE ÖYKÜSÜ}$$

şeklinde belirlenmiştir. Modelimizin doğru sınıflandırma oranı %68,3, Hosmer and Lemeshow testi p değerimiz 0,439 bulunmuştur.

Tablo 3.10: Adımsal regresyon analizi sonuçları. 1 ve 2 sayıları belirtilen bağımsız değişkenlerin referans kategorisi haricindeki ilk ve ikinci kategorileri ifade etmektedir.

| Adm | Bağımsız Değişken | β Değeri | Standart Hata | Wald Değeri | p değeri | Odds. Oranı | Güven Aralığı |
|-----|-------------------|----------------|---------------|-------------|----------|-------------|----------------|
| 1 | Yaş(1) | 0,972 | 0,277 | 12,307 | 0,000 | 2,643 | 1,536 - 4,550 |
| | Aile öyküsü(1) | 1,035 | 0,334 | 9,609 | 0,002 | 2,816 | 1,463 - 5,420 |
| | Rs1077861 | | | 1,455 | 0,483 | | |
| | Rs1077861(1) | -0,244 | 0,351 | 0,484 | 0,487 | 0,783 | 0,394 - 1,559 |
| | Rs1077861(2) | -0,597 | 0,496 | 1,452 | 0,228 | 0,550 | 0,208 - 1,454 |
| | Rs3135500 | | | 3,280 | 0,194 | | |
| | Rs3135500(1) | -0,164 | 0,311 | 0,278 | 0,598 | 0,849 | 0,,461 - 1,561 |
| | Rs3135500(2) | -0,780 | 0,433 | 3,242 | 0,072 | 0,458 | 0,196 - 1,071 |
| | Sigara (pak-yıl) | 0,013 | 0,005 | 6,086 | 0,014 | 1,013 | 1,003 - 1,023 |
| | Sabit | -0,408 | 0,474 | 0,740 | 0,390 | 0,665 | |
| 2 | Yaş(1) | 0,992 | 0,275 | 12,980 | 0,000 | 2,696 | 1,572 - 4,624 |
| | Aile öyküsü(1) | 1,048 | 0,335 | 9,811 | 0,002 | 2,853 | 1,480 - 5,497 |
| | Rs3135500 | | | 2,281 | 0,320 | | |
| | Rs3135500(1) | -0,089 | 0,297 | 0,090 | 0,764 | 0,915 | 0,511 - 1,637 |
| | Rs3135500(2) | -0,571 | 0,387 | 2,184 | 0,139 | 0,565 | 0,265 - 1,205 |
| | Sigara (pak-yıl) | 0,013 | 0,005 | 6,145 | 0,013 | 1,013 | 1,003 - 1,023 |
| | Sabit | -0,716 | 0,357 | 4,022 | 0,045 | 0,489 | |
| 3 | Yaş(1) | 1,001 | 0,274 | 13,340 | 0,000 | 2,722 | 1,590 - 4,657 |
| | Aile Öyküsü(1) | 1,078 | 0,333 | 10,453 | 0,001 | 2,939 | 1,529 - 5,651 |
| | Sigara (pak-yıl) | 0,013 | 0,005 | 6,622 | 0,010 | 1,013 | 1,003 - 1,023 |
| | Sabit | -0,882 | 0,309 | 8,157 | 0,004 | 0,414 | |

3.2.3. Alevlenme Sıklığına Göre Ayrılan Hasta Grupları Arasında Rs1077861 ve Rs3135500 Polimorfizmlerinin Genotip ve Allel Sıklıkları

Alevlenme sayısı az ve çok olan hasta grupları arasında rs1077861 ve rs3135500 polimorfizmlerinin genotip ve allel sıklıkları karşılaştırılmış, istatistiksel olarak fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 3.11 ve Tablo 3.12).

Tablo 3.11: Alevlenme sayıları az ve çok olan hasta grupları arasında rs1077861 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları.

| Rs1077861 | Alevlenme Sayısı | | Toplam | p değeri |
|---------------------------------|------------------|-----------|------------|--------------|
| | Az | Çok | | |
| Genotip Sıklıkları N (%) | | | | |
| TT | 17 (32,1) | 28 (24,6) | 45 (26,9) | 0,387 |
| TA | 28 (52,8) | 73 (64) | 101 (60,5) | |
| AA | 8 (15,1) | 13 (11,4) | 21 (12,6) | |
| Allel Sıklıkları % | | | | |
| T | 58,5 | 56,6 | 57,2 | 0,742 |
| A | 41,5 | 43,4 | 42,8 | |

Tablo 3.12: Alevlenme sayıları az ve çok olan hasta grupları arasında rs3135500 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları.

| Rs3135500 | Alevlenme Sayısı | | Toplam | p değeri |
|---------------------------------|------------------|-----------|-----------|--------------|
| | Az | Çok | | |
| Genotip Sıklıkları N (%) | | | | |
| AA | 6 (11,3) | 14 (12,3) | 20 (12) | 0,879 |
| AG | 25 (47,2) | 49 (43) | 74 (44,3) | |
| GG | 22 (41,5) | 51 (44,7) | 73 (43,7) | |
| Allel Sıklıkları % | | | | |
| A | 34,9 | 33,8 | 34,1 | 0,839 |
| G | 65,1 | 66,2 | 65,9 | |

3.2.4. Hava Akımı Kısıtlamasına ve GOLD Kriterlerine Göre Evrelenen Hasta Grupları Arasında Rs1077861 ve Rs3135500 Polimorfizmlerinin Genotip ve Allel Sıklıkları

Hava akımı kısıtlaması dikkate alınarak orta, ağır ve çok ağır olarak ayrılan hasta grupları arasında rs1077861 ve rs3135500 polimorfizmlerinin genotip ve allel

sıklıkları karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 3.13 ve Tablo 3.14).

Tablo 3.13: Hava akımı kısıtlamasına göre orta, ağır ve çok ağır olarak ayrılan hasta grupları arasında rs1077861 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları.

| Rs1077861 | Hava Akımı Kısıtlaması | | | | p değeri |
|---------------------------------|------------------------|-----------|-----------|------------|--------------|
| | Orta | Ağır | Çok Ağır | Toplam | |
| Genotip Sıklıkları N (%) | | | | | |
| TT | 17 (34) | 19 (29,7) | 10 (18,9) | 46 (27,5) | 0,185 |
| TA | 30 (60) | 34 (53,1) | 36 (67,9) | 100 (59,9) | |
| AA | 3 (6) | 11 (17,2) | 7 (13,2) | 21 (12,6) | |
| Allel Sıklıkları % | | | | | |
| T | 64 | 56,3 | 52,8 | 57,5 | 0.252 |
| A | 36 | 43,8 | 47,2 | 42,5 | |

Tablo 3.14: Hava akımı kısıtlamasına göre orta, ağır ve çok ağır olarak ayrılan hasta grupları arasında rs3135500 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları.

| Rs3135500 | Hava Akımı Kısıtlaması | | | | p değeri |
|---------------------------------|------------------------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| | Orta | Ağır | Çok Ağır | Toplam | |
| Genotip Sıklıkları N (%) | | | | | |
| AA | 6 (12) | 12 (18,8) | 3 (5,7) | 21 (12,6) | 0,202 |
| AG | 22 (44) | 23 (35,9) | 28 (52,8) | 73 (43,7) | |
| GG | 22 (44) | 29 (45,3) | 22 (41,5) | 73 (43,7) | |
| Allel Sıklıkları % | | | | | |
| A | 34 | 36,7 | 32,1 | 34,4 | 0.754 |
| G | 66 | 63,3 | 67,9 | 65,6 | |

Yine GOLD'a göre A, B, C ve D şeklinde ayrılan hasta grupları arasında rs1077861 ve rs3135500 polimorfizmlerinin genotip ve allel sıklıkları karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 3.15 ve Tablo 3.16)

Tablo 3.15: GOLD kriterlerine göre A, B, C ve D şeklinde gruplandırılan hastalar arasında rs1077861 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları.

| Rs1077861 | Evreleme (GOLD) | | | | p değeri |
|---------------------------------|-----------------|--------|-----------|-----------|--------------|
| | A | B | C | D | |
| Genotip Sıklıkları N (%) | | | | | |
| TT | 16 (30,8) | 3 (30) | 20 (31,3) | 7 (17,1) | 0,703 |
| TA | 30 (57,7) | 5 (50) | 36 (56,3) | 29 (70,7) | |
| AA | 6 (11,5) | 2 (20) | 8 (12,5) | 5 (12,2) | |
| Allel Sıklıkları % | | | | | |
| T | 59,6 | 55 | 59,4 | 52,4 | 0.733 |
| A | 40,4 | 45 | 40,6 | 47,6 | |

Tablo 3.16: GOLD kriterlerine göre A, B, C ve D şeklinde gruplandırılan hastalar arasında rs3135500 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları.

| Rs3135500 | Evreleme (GOLD) | | | | p değeri |
|---------------------------------|-----------------|--------|-----------|-----------|--------------|
| | A | B | C | D | |
| Genotip Sıklıkları N (%) | | | | | |
| AA | 8 (15,4) | 1 (10) | 10 (15,6) | 2 (4,9) | 0,359 |
| AG | 24 (46,2) | 6 (60) | 22 (34,4) | 21 (51,2) | |
| GG | 20 (38,5) | 3 (30) | 32 (50) | 18 (43,9) | |
| Allel Sıklıkları % | | | | | |
| A | 38,5 | 40 | 32,8 | 30,5 | 0.629 |
| G | 61,5 | 60 | 67,2 | 69,5 | |

3.2.5. Aile Öyküsü Olan ve Olmayan Hasta Grupları Arasında Rs1077861 ve Rs3135500 Polimorfizmlerinin Genotip ve Allel Sıklıkları

Aile öyküsünde KOAH olan ve olmayan hasta grupları arasında rs1077861 ve rs3135500 polimorfizmlerinin genotip ve allel sıklıkları karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 3.17 ve Tablo 3.18).

Tablo 3.17: Aile öyküsü olan ve olmayan hasta grupları arasında rs1077861 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları.

| Rs1077861 | Aile Öyküsü | | Toplam | p değeri |
|---------------------------------|-------------|-----------|------------|--------------|
| | Pozitif | Negatif | | |
| Genotip Sıklıkları N (%) | | | | |
| TT | 14 (25,9) | 32 (28,1) | 46 (27,4) | 0,60 |
| TA | 35 (64,8) | 66 (57,9) | 101 (60,1) | |
| AA | 5 (9,3) | 16 (14) | 21 (12,5) | |
| Allel Sıklıkları % | | | | |
| T | 58,3 | 57 | 57,4 | 0,820 |
| A | 41,7 | 43 | 42,6 | |

Tablo 3.18: Aile öyküsü olan ve olmayan hasta grupları arasında rs3135500 polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları.

| Rs3135500 | Aile Öyküsü | | Toplam | p değeri |
|---------------------------------|-------------|-----------|-----------|--------------|
| | Pozitif | Negatif | | |
| Genotip Sıklıkları N (%) | | | | |
| AA | 8 (14,8) | 13 (11,4) | 21 (12,5) | 0,497 |
| AG | 26 (48,1) | 48 (42,1) | 74 (44) | |
| GG | 20 (37) | 53 (46,5) | 73 (43,5) | |
| Allel Sıklıkları % | | | | |
| A | 32,5 | 38,9 | 34,5 | 0,247 |
| G | 67,5 | 61,1 | 65,5 | |

3.3. Yaş, Sigara İçme Durumu, Alevlenme Sıklığı, Sigara İçme Miktarı (Paket-Yıl) ve Polimorfizmlerin FEV1 Düşüşü Üzerine Etkisi

Hastaların çalışmaya dahil edildiği tarihten 1 yıl önce veya sonra alınan ikinci bir SFT'deki FEV1 (L) değeri ile mevcut SFT'deki FEV1 (L) değeri birbirinden çıkarılarak yıllık FEV1 (L) düşüşü hesaplanmıştır.

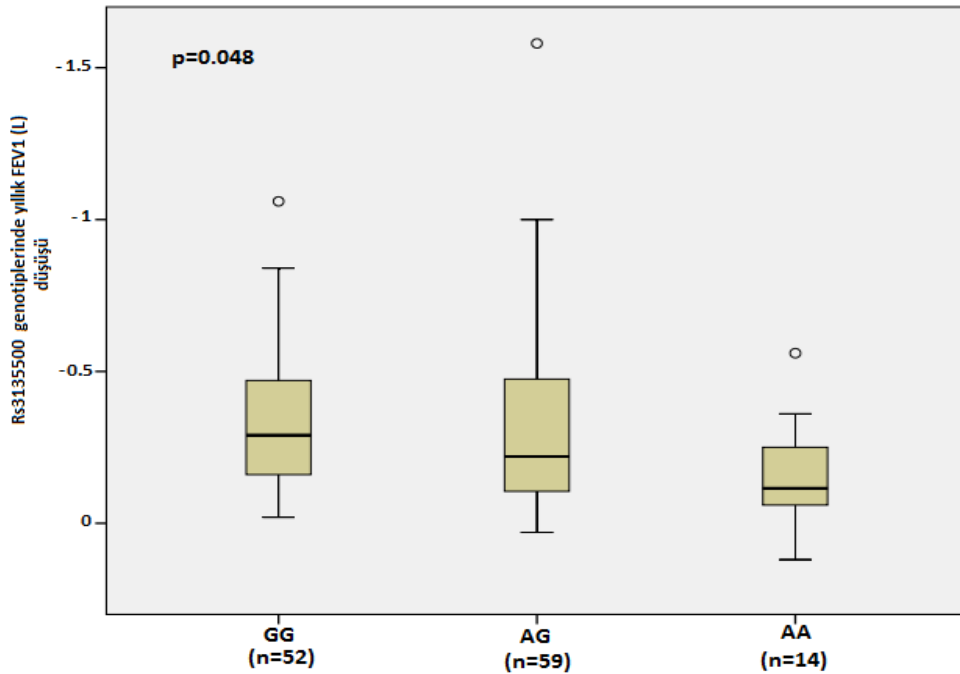
Yaş (60 yaş altı / 60 yaş ve üstü), sigara içme durumu ve alevlenme sıklığına göre ayrı ayrı gruplandırılan hastalar arasında yıllık FEV1 (L) düşüşünün normal dağılım testi için Shapiro Wilk, gruplar arasında yıllık FEV1 düşüşü açısından fark olup olmadığını belirlemek için Mann-Whitney U testleri kullanılmıştır. Uygulanan testler sonrasında yaş (p=0,344), sigara içme durumu (p=0,492) ve alevlenme

sıklığına ($p= 0,466$) göre gruplandırılan hastalar arasında FEV1 (L) düşüşü açısından istatistiksel fark olmadığı sonucuna varılmıştır.

Yıllık FEV1 (L) düşüşü ile sigara içme miktarı (paket-yıl) arasında ilişki olup olmadığını değerlendirmek için Spearman's Rho Katsayısı (0,037) hesaplanmış ve sigara içme miktarı (paket-yıl) ile yıllık FEV1 (L) düşüşü arasında bir ilişki bulunmamıştır ($p= 0,679$).

Polimorfizmlerin farklı genotiplerini taşıyan hastalar arasında yıllık FEV1 (L) düşüşünün karşılaştırılması için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Rs1077861 polimorfizminin farklı genotiplerini taşıyan hastalar arasında yıllık FEV1 düşüşü açısından istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Diğer taraftan Rs3135500 polimorfizmi AA genotipine sahip hastalarda yıllık FEV1 düşüşü daha az iken, GG genotipine sahip hastalarda daha fazla düşüş olduğu saptanmıştır ($p:0,048<0,05$) (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1: Rs3135500 polimorfizminin farklı genotiplerini taşıyan hastalardaki yıllık FEV1 (L) düşüşü. N= Hasta sayısı.

4. TARTIŞMA

KOAH, sıklıkla sigara dumanına maruziyetle ilişkilendirilen inflamatuvar bir hava yolu hastalığıdır. Hastalık amfizem, parankim yıkımı ve havayolu obstrüksiyonundan kaynaklanan, geri dönüşümsüz ve ilerleyici özellikteki akciğer fonksiyonunun düşmesi ile karakterizedir. Başta sigara dumanı olmak üzere inhale edilen çevresel kirleticilerin, akciğerdeki yapısal ve inflamatuvar hücrelerin aktivasyonuna ve bunun sonucu olarak kronik havayolu inflamasyonuna neden olduğu düşünülmektedir. Ancak sigara içenlerin yalnızca %15-20'sinde KOAH gelişmesi, hastalığın patogeneğinde genetik yatkınlığın ve çevresel faktörlerin rol oynadığını akla getirmektedir (Rovina ve ark, 2013).

İnsan vücudunda mikrobiyal enfeksiyonlara karşı geliştirilen ilk savunma doğuştan gelen immün sistem tarafından gerçekleştirilir. (Rovina ve ark, 2013) Doğuştan gelen immün sistemde PAMP ve Tehlike İlişkili Moleküler Kalıpları (Danger Associated Molecular Patterns) “DAMP” tanıyan ve acil immün cevap oluşturan reseptör aileleleri bulunmaktadır. Bunlardan biri NLR ailesidir ve NOD2'nin de içinde bulunduğu yapısal özelliklerine göre sınıflandırılmış 6 alt aileden ve 22 üyeden oluşmaktadır (Correa ve ark, 2012; Kinose ve ark, 2012).

NOD2 yapısal olarak 3 farklı domeynden oluşmaktadır. Bunlardan biri C terminal bölgede bulunan, PAMP ve diğer moleküler kalıpların tanınmasını sağlayan LRR domeyni, diğeri merkezde bulunan, molekülün self-oligomerizasyonundan ve aktivasyonundan sorumlu NOD (NACHT) domeyni, sonuncusu ise adaptör moleküllerle etkileşimi sağlayan N terminal efektör domeynidir (Zhong ve ark, 2013). NOD2, tüm bakterilerdeki peptidoglikanın bir bileşeni olan MDP'i LRR aracılığıyla tanımakta ve sonrasında RICK ve/veya kaspaz 1'in aktivasyonunu sağlamaktadır. Sonuç olarak NFκB yolağı aktive olmakta ve bunu takiben IL-1b'nin olgunlaşması ve salınımı gerçekleşerek, patojenlere karşı geliştirilen immün cevap oluşturulmaktadır (Ferwerda ve ark, 2008).

Doğuştan gelen immün sistem genleri, bağırsak, deri, akciğer gibi çeşitli vücut yüzeylerinde homeostasiyi sağlamak için, yabancı maddelere karşı geliştirilen immün cevabın stimülasyonu veya baskılanması arasındaki nazik dengeyi düzenler. Doğuştan gelen immün cevaptaki bu dengenin bozulması, çeşitli enfeksiyonel hastalıkların, kronik inflamatuvar hastalıkların veya otoimmün hastalıkların oluşmasına neden olabilmektedir (Correa ve ark, 2012).

Yapılan son çalışmalarda, KOAH patofizyolojisinde doğuştan gelen immün sistemin rol oynadığı ileri sürülmüştür. KOAH'ın en önemli risk faktörleri arasında yer alan sigara dumanı ve çevresel kirliliklere maruziyet hava yolunda inflamasyona neden olmaktadır. Doğuştan gelen immün sistem reseptörlerinden bazılarının bu partikülleri ligand olarak algılaması, bu reseptörlerin KOAH gelişiminde rolü olduğunu düşündürmektedir (Kinose ve ark, 2012).

Respiratuvar bakteriyel enfeksiyonlar KOAH gelişimine katkıda bulunan bir diğer etkidir. Ayrıca latent adenoviral enfeksiyonlar ve çocukluk çağı respiratuvar enfeksiyonların hastalık patogenezinde etkili olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda, enfeksiyonlara yatkınlıkla sonuçlanabilecek doğuştan gelen immün sistem reseptörlerinin fonksiyonundaki bozulmaların, KOAH gelişimine neden olabileceği düşünülmektedir (Rohde ve ark, 2006; Spelatas ve ark, 2009; Green ve ark, 2009).

Diğer taraftan KOAH hastalarında respiratuvar semptomların kötüleştiği alevlenme dönemleri izlenmektedir. Alevlenmeler, akciğer fonksiyonunun düşmesine ve hastanın durumunun kötüleşmesine neden olmaktadır. KOAH alevlenmelerinin nedenleri arasında viral enfeksiyonlar, kirlilik, soğuk hava ve rutin tedavinin aksaması yer almakla birlikte, alevlenmelerin % 40- 60 kadarında bakteriyel enfeksiyonlara rastlanmaktadır (Pabst ve ark, 2009).

Dolayısıyla doğuştan gelen immün sistem reseptörlerinden NLR ailesinin üyesi olan NOD2 proteininin fonksiyonunun bozulması, bakteriyel enfeksiyonlara yatkınlıkla sonuçlanabileceği için, bu proteini kodlayan *NOD2* genindeki varyasyonların, hem KOAH gelişimi hem de ilerlemesi üzerine etkisi olabileceği

düşünülmektedir. Nitekim literatürde Japon toplumunda yapılan bir çalışmada *NOD2* geninin bir polimorfizmi KOAH ile ilişkilendirilmiştir (kinose ve ark, 2012).

Çalışmamız Türk popülasyonunda *NOD2* geni varyasyonlarının KOAH ile ilişkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

4.1. *NOD2* geni rs2066844 (R702W) Polimorfizminin Değerlendirilmesi

NOD2 geni, kromozom 16q21'de lokalize, 39.5 kilobaz uzunluğunda ve 16 ekzondan oluşmaktadır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/64127#general-protein-info>). R702W polimorfizmi *NOD2* geninin 4. ekzonunda yer alan, atasal allel olan C allelinin T alleleine değiştiği yanlış anlamlı bir polimorfizmdir. Bu değişim neticesinde *NOD2* proteininin primer yapısında 702. pozisyonda bulunan arjinin (R) aminoasiti triptofan (W) aminoasitine dönüşmektedir (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2066844). R702W fonksiyon kaybettiren bir polimorfizmdir ve NF-κB aktivasyonunun bozulmasına neden olur (Roberts ve ark, 2010). R702W polimorfizminin de içinde bulunduğu *NOD2* varyasyonları, Crohn hastalığı, ülseratif kolit, Blau sendromu, erken başlangıçlı sarkoidoz ve bazı kanser türleri gibi hastalıklara yakınlıkla ilişkilendirilmiştir (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOD2>).

Çalışmamızda sigara içen veya bırakmış 168 KOAH hastası ve 100 kontrolden oluşan iki farklı grupta *NOD2* geni R702W polimorfizmi değerlendirilmiş, hasta grupta sadece 1 hastada CT genotipine rastlanırken, kontrol grubunda bu polimorfizme rastlanmamıştır. Hasta grupta CC ve CT genotip dağılımı sırasıyla %99,4 ve %0,6, C ve T allel sıklıkları ise %99,7 ve %0,3 olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol grupları arasında genotip ve allel sıklıkları açısından istatistiksel olarak fark bulunmamıştır.

Literatürde KOAH ve *NOD2* geni varyasyonları arasındaki ilişkinin araştırıldığı tek çalışma Kinose ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar

sigara içen 228 KOAH hastası ve 101 kontrolden oluşan çalışma grubunda, *NOD2* geni R702W, G908R ve 3020Cins varyasyonlarına ek olarak *NOD2* geni için seçilen beş tag ve *NOD1* geni için seçilen altı tag snp için genotipleme yapmışlardır. R702W polimorfizminin de içinde bulunduğu bu üç varyasyona olguların hiçbirinde rastlanmamıştır (Kinose ve ark, 2012). Araştırmacılar R702W polimorfizmi ile KOAH gelişim riski veya hastalığın ilerlemesi arasında bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir. R702W polimorfizmi açısından sonuçlarımız Kinose ve arkadaşlarının çalışma sonuçları ile uyumludur.

Allel sıklığı açısından değerlendirildiğinde, bizim çalışmamızda saptanan R702W polimorfizmi T alleli sıklığı Türk toplumunda yapılan diğer çalışmalardan daha düşük bulunmuştur (Özen ve ark, 2006; Uyar ve ark, 2006; İnce ve ark, 2008; Tekin ve ark, 2012).

Bu çalışmalardan biri Tekin ve arkadaşları tarafından Türk çocuklarında sepsis ve *NOD2* gen varyantları arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmadır. Çalışmaya 128 sepsisli çocuk ve 128 kontrol dahil edilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarında R702W polimorfizmi TT genotipine rastlanmazken, T allelinin sıklığı sırasıyla %5,5 ve %1,6 olarak bulunmuştur (Tekin ve ark, 2012).

Özen ve arkadaşları tarafından 70 Crohn hastası, 120 ülseratif kolit hastası ve 106 kontrol üzerinde yapılan çalışmada, R702W polimorfizmi T allel sıklığı Crohn grubunda %1,4, ülseratif kolit grubunda %1,7 ve kontrol grubunda %1,9 olarak bulunmuştur (Özen ve ark, 2006).

İnce ve arkadaşları toplam 130 inflamatuvar bağırsak hastası ve 87 kontrolden oluşan çalışma grubunda, R702W polimorfizmi TT genotipine kontrol grubunda 1 bireyde rastlamışlardır. T allel sıklığını ise Crohn, ülseratif kolit ve kontrol grubunda sırasıyla %0,7, %2,4 ve %4,8 olarak bildirmişlerdir (İnce ve ark, 2008).

Uyar ve arkadaşlarının 56 Crohn hastası ve 100 kontrolden oluşan çalışma grubunda yaptıkları araştırmada, R702W polimorfizmi T alleli sıklığı hasta grupta % 0,9, kontrol grubunda ise % 0,5 olarak bulunmuştur (Uyar ve ark, 2006).

Çalışmamızda hem hasta hem de kontrol grubunda R702W polimorfizmi TT genotipine rastlanmazken, T allelinin sıklığı sırasıyla %0,3 ve %0 olarak bulunmuştur. Türk toplumunda yapılan çalışmalardan sadece İnce ve arkadaşlarının çalışmalarında 1 hastada TT genotipine rastlanmış, diğer çalışmalarda bu genotipe rastlanmamıştır. Çalışma sonuçlarımız TT genotip sıklığı açısından Türk toplumunda yapılan diğer çalışmalarla uyum göstermektedir. Bu çalışmalarda T alleli sıklığına bakıldığında ise, en yüksek oran Tekin ve arkadaşlarının çalışmalarına aitken, en düşük oran Uyar ve arkadaşlarının çalışmalarına aittir. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar Uyar ve arkadaşlarının sonuçlarına yakın görünmektedir (Özen ve ark, 2006; Uyar ve ark, 2006; İnce ve ark, 2008; Tekin ve ark, 2012).

R702W polimorfizmi için dünya genelinde farklı popülasyonlarda gözlenen sıklıklar Tablo 4.1 (Hugot ve ark, 2007) ve Tablo 4.2’de verilmiştir. Tablo 4.1’de sağlıklı bireylerde gözlenen, Tablo 4.2’de ise farklı hasta ve kontrol gruplarında gözlenen mutant allel sıklıkları görülmektedir. Sağlıklı bireyler ve kontrol gruplarındaki allel sıklıklarına bakıldığında Çin, Kore ve Japon toplumlarında R702W polimorfizmi T alleleline rastlanmazken, Amerikalılar (özellikle Afrika kökenli bireyler üzerinde yapılanda) ve Avustralyalılarda gözlenen sıklıklar, Avrupa toplumlarında gözlenenlere kıyasla düşük bulunmuştur. Avrupa’da ise Finlandiya, Slovenya, Güney İtalya ve Yunanistan’daki sıklıklar diğerlerine göre düşük bulunmuştur. Diğer taraftan hasta ve kontrol gruplarındaki karşılaştırmalar dikkate alındığında genel olarak hasta gruplarındaki sıklıkların (özellikle Crohn hastalarında) daha yüksek olduğu göze çarpmaktadır. Bizim çalışmamızda saptanan R702W polimorfizmi T allelinin sıklığı Japonya Çin ve Kore’de yapılan çalışma sonuçlarına yakın görünmektedir. Fakat bizim çalışmamız ve Türk toplumunda yapılan diğer çalışmalar (Özen ve ark, 2006; Uyar ve ark, 2006; İnce ve ark, 2008; Tekin ve ark, 2012) beraberce değerlendirildiğinde, sadece kontrol gruplarının toplamındaki sıklık %1,6 olarak, hasta ve kontrol gruplarının toplamındaki sıklık ise

%1,8 olarak hesaplanmıştır. Bu sıklık ise Japon, Çin ve Kore toplumunda görülen sıklıktan yüksek iken, Avrupa, Amerika ve Avustralya'daki sıklıklardan daha düşüktür.

Tablo 4.1: Dünya genelinde farklı popülasyonlarda sağlıklı bireylerde gözlenen mutant allel sıklıkları.

| Populasyon | Çalışma Grubu (Sayı) | Allel sıklığı (%) |
|-----------------------------------|----------------------|-------------------|
| Finlandiya | 300 | 1,8 |
| İskoçya | 136 | 4,8 |
| İngiltere (Oxford) | 587 | 4,2 |
| İngiltere (Cambridge) | 351 | 5,7 |
| Belçika | 144 | 6,6 |
| Almanya | 370 | 4,5 |
| Fransa | 174 | 4,9 |
| Quebec | 58 | 5,2 |
| İtalya | 205 | 4,1 |
| Orta Atlantik, USA | 45 | 3,3 |
| Kaliforniya, USA | 220 | 3,6 |
| Şikago, USA | 273 | 3,7 |
| Toronto | 100 | 5 |
| Avustralya (Brisbane) | 203 | 3,9 |
| Avustralya (Canberra) | 409 | 4,5 |
| Türkiye (mevcut çalışma verileri) | 100 | 0 |
| Toplam | 3575 | 4,3 |

Tablo 4.2: Dünya genelindeki farklı hasta ve kontrol gruplarında gözlenen mutant allel sıklıkları.

| Çalışma Grubu | Hasta/ Kontrol (Sayı) | Hasta/ Kontrol (Allel sıklığı (%)) | Kaynak |
|-----------------------------|--|------------------------------------|----------------------------|
| Avusturya | Crohn (216/86) | 8,8/11,6 | Rodrigo ve ark, 2007 |
| Portekiz | Gastrik kanser (150/202) | 10/7 | Freire ve ark, 2013 |
| Çin | Parkinson (237/190) | 0/0 | Ma ve ark, 2013 |
| İtalya | Beta laktam alerjisi (387/326) | 4,7/4,8 | Bursztejn ve ark, 2013 |
| Kuzey İspanya | İBD (278/188) | 7,2/4,5 | Elguezabal ve ark, 2012 |
| Slovenya | Crohn (353/253) Ülseratif kolit (196/253) | 4,2/2,8 3/2,8 | Mitrovič ve Potočnik, 2011 |
| İran | Crohn (906/206) Ülseratif kolit (318/206) | 11/4 3/4 | Naderi ve ark, 2011 |
| Amerika (Afrika kökenliler) | Crohn (183/143) | 1,6/1 | Dassopoulos ve ark, 2011 |
| Güney İtalya | Crohn (133/103) Ülseratif kolit (63/103) | 9,8/2,4 2,3/2,4 | Rigoli ve ark, 2008 |
| Slovakya (Çek ve Slovaklar) | Crohn (45/59) Ülseratif kolit (22/59) | 13/10 2/10 | Hosek ve ark, 2008 |
| Almanya | Gastrik kanser (159/150) | 6,6/4,67 | Wex ve ark, 2008 |
| Almanya | KVH (900/632) | 4,6/5,5 | El Mokhtari ve ark, 2007 |
| Yunanistan | Crohn (120/100) | 10/1 | Gazouli ve ark, 2004 |
| Macaristan | Crohn (74/107) | 16/8 | Nagy ve ark, 2005 |
| İsrail | Crohn (144) | 5 | Weiss ve ark, 2004 |
| Çin (Han Çinlileri) | Crohn ve ülseratif kolit (142/292) | 0/0 | Gao ve ark, 2005 |
| Japonya | KOAH (228/101) | 0/0 | Kinose ve ark, 2012 |
| Türkiye | KOAH (168/100) | 0/0,3 | Mevcut çalışma verileri |
| Kore | Ankilozan spondilit (205/200) | 0/0 | Kim ve ark, 2004 |

Sonuç olarak; verilerimiz R702W polimorfizmi ile KOAH gelişimi ve hastalığın ilerlemesi arasında ilişki olmadığını göstermiştir. Ayrıca çalışmamızda mutant allel sıklığı Türk toplumunda yapılan diğer çalışmalardan daha düşük bulunmuştur.

Türk toplumunun etnik anlamda çeşitlilik ihtiva eden bir toplum olması sonuçlarımızdaki farklılığı açıklayabilir. Dünya genelindeki diğer populasyonlarla

karşılaştırıldığında ise, bizim sonuçlarımız Japon, Kore ve Çin toplumlarındaki sonuçlara benzerlik gösterirken, Türk toplumunda yapılan diğer çalışmalarla beraber değerlendirildiğinde toplumumuzdaki sıklığın Avrupa, Amerika ve Avustralya'ya kıyasla düşük, Japonya, Kore ve Çin'e kıyasla yüksek olduğu görülmektedir.

4.2. *NOD2* geni rs1077861 ve rs3135500 Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi

Rs1077861 polimorfizmi *NOD2* geninin 10. intronunda yer alan T allelinin A alleleine dönüştüğü bir polimorfizmdir. Atasal allel T allelidir. Literatürde bu polimorfizm atopik hastalıklar ve KOAH ile ilişkilendirilmiştir. Rs3135500 polimorfizmi ise genin 3' UTR bölgesindeki miRNA bağlanma bölgesinde (hsa-miR158, hsa-miR215, hsa-miR98 ve hsa-miR573) yer alan ve atasal allel olan A allelinin G alleleine dönüştüğü bir polimorfizmdir. Bu polimorfizmin ilişkilendirildiği hastalıklar arasında Crohn hastalığı, kolorektal kanser, atopik hastalıklar ve KOAH yer almaktadır.

Çalışmamızda sigara içen veya bırakmış 168 KOAH hastası ve 100 kontrol grubunda rs1077861 polimorfizminin genotip dağılımı hasta grubunda %27,4 TT, %60,1 TA ve %12,5 AA, kontrol grubunda ise %26 TT, %59 TA ve %15 AA olarak bulunmuştur. Hasta grubunda T ve A allelerinin sıklığı sırasıyla %57,4 ve %42,6, kontrol grubunda ise %55,5 ve %44,5 bulunmuştur. Rs3135500 polimorfizminin genotip dağılımı hasta grubunda %43,5 GG, %44 AG ve %12,5 AA iken, kontrol grubunda %37 GG, %41 AG ve %22 AA'dır. Allel sıklıkları ise hasta grubunda %65,5 G, %34,5 A, kontrol grubunda %57,5 G, %42,5 A olarak belirlenmiştir.

Kinose ve arkadaşları sigara içen 228 KOAH hastası ve 101 kontrolden oluşan çalışma grubunda rs1077861 polimorfizminin genotip dağılımını hasta grupta %61 TT, %36 AT ve %2 AA, kontrol grubunda %76 TT, %22 TA ve %2 AA olarak bulmuşlardır. Hasta grubunda T ve A allelerinin sıklıklarının sırasıyla %79 ve %21, kontrol grubunda ise %87 ve %13 olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada hasta ve kontrol grupları arasında genotip ve allel sıklıklarının dağılımında istatistiksel olarak

anlamli farklilik bulunmuştur. Araştırmacılar rs1077861 polimorfizmi TA/AA genotiplerinin ve A alleli sıklığının hasta grupta kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğunu, dolayısıyla A allelinin Japon populasyonunda artmış KOAH riski ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Buna ilaveten bu çalışmada AT/AA genotiplerine sahip olanların daha düşük FEV1 (%) değerlerine sahip olduğu anlaşılmıştır. Bu veri ise araştırmacılar tarafından A allelinin hastalığın ilerlemesi ile ilişkili olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Aynı çalışmada rs3135500 polimorfizmi ile bağlantılı olan rs3135499 polimorfizmi C allelinin sıklığı istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hasta grupta kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Dolayısıyla rs3135500 polimorfizmi A allelinin KOAH'a yatkınlıkta rolünün olabileceği öne sürülmüştür (Kinose ve ark, 2012).

Weidinger ve arkadaşları tarafından 1875 Alman yetişkin üzerinde yapılan çalışmada *NOD2* geni ile atopik hastalıklar arasındaki ilişki araştırılmıştır. Rs1077861 polimorfizmi T alleli taşıyanların astım gelişimi açısından düşük risk grubunda, rs3135500 polimorfizmi A alleli taşıyanların ise yüksek risk grubunda oldukları bildirilmiştir. Tüm çalışma grubunda rs1077861 polimorfizmi A allel sıklığı %70,82, T allel sıklığı %29,18 iken, rs3135500 G allel sıklığı %59.83, A allel sıklığı %40.17 bulunmuştur (Weidinger ve ark, 2005).

Ahangari ve arkadaşları tarafından İran populasyonunda 88 kolorektal kanserli hasta ve 88 sağlıklı kontrol üzerinde yapılan çalışma sonucunda *NOD2* geni rs3135500 polimorfizminin genotip dağılımı hasta grupta %17 GG, %47,7 AG, %35,2 AA iken kontrol grubunda %39,8 GG, %48,9 AG ve %11,4 AA olarak bulunmuştur. Araştırmacılar AA genotipi ile artmış kolorektal kanser riski arasında ilişki olduğunu bildirilmiştir (Ahangari ve ark, 2014).

Çalışmamızda Kinose, Weidinger ve Ahangari'nin çalışmalarından farklı olarak, hasta ve kontrol grupları arasında rs1077861 ve rs3135500 polimorfizmlerinin genotip ve allel sıklıklarının dağılımı istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır. Buna ek olarak, bizim çalışmamızda Kinose ve Weidinger'in çalışmalarına kıyasla hem hasta hem de kontrol grubunda rs1077861 polimorfizmi

TA ve AA genotiplerinin ve A allelinin sıklığı çok daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmalar karşılaştırıldığında, rs1077861 polimorfizmi açısından bizim çalışma grubumuzun en polimorfik grup olduğu görülmektedir. Rs3135500 polimorfizminin minör allel sıklığı hem Weidinger hem de Ahangari'nin çalışmaları ile benzerlik gösterirken, Kinose ve arkadaşlarınınkinden yüksek bulunmuştur. Ayrıca minör allel olan A alleli bu çalışmaların tümünde hasta grupta anlamlı şekilde yüksek bulunurken, bizim çalışmamızda sınıra yakın bir p değeri ile kontrol grubunda daha yüksek bulunmuştur. Dolayısıyla bu polimorfizm için bizim verilerimiz söz konusu çalışmalarla benzerlik göstermemektedir. (Weidinger ve ark, 2005; Kinose ve ark, 2012; Ahangari ve ark, 2014).

Çalışmamızda hasta ve kontrol grupları arasında rs1077861 ve rs3135500 polimorfizmlerinin genotip ve allel sıklıkları açısından istatistiksel fark bulunmamıştır. Bununla birlikte hem rs3135500 polimorfizmi allel sıklıkları için bulunan p değerinin ($p=0,065$) önemlilik düzeyine yakın olması hem de hasta ve kontrol grupları arasında yaş ($p=0,000$), aile öyküsü ($p=0,004$) ve sigara içme miktarı (paket-yıl) ($p=0,059$) açısından fark olması nedeniyle, KOAH riski ve bu polimorfizmler arasındaki ilişki bu faktörlerin de dahil edildiği bir model kullanılarak çok değişkenli lojistik regresyon analizi ile tahmin edilmeye çalışılmıştır. Yapılan analizler neticesinde belirlenen regresyon modelinde rs1077861 ve rs3135500 polimorfizmleri yer almamaktadır. Bu sonuç, çalışma grubumuzda KOAH riski ile bu polimorfizmler arasında ilişki olmadığını düşündürmektedir. Bununla birlikte KOAH riski 60 yaş ve üstü bireylerde 2,72 kat ($p=0,000$), aile öyküsü olanlarda 2,94 kat artarken ($p=0,001$), sigara içme miktarındaki (paket-yıl) bir birimlik artış, KOAH riskinde 1,013 kat artışa ($p=0,010$) neden olmaktadır.

Elde ettiğimiz veriler ailesinde (anne, baba, kardeşler ve çocuklar) KOAH olan başka bireylerin varlığında bireyin KOAH riskinin arttığını göstermektedir ve bu sonuç literatürde KOAH'ta ailesel yığılımın olduğunu gösteren diğer çalışmaların verilerini desteklemektedir (Silverman ve ark, 1998; Patel ve ark, 2008; Mc Closkey ve ark, 2001; Hersh ve ark, 2011). Bu çalışmalardan biri Zhou ve arkadaşları tarafından Çin'de yapılan geniş çaplı bir araştırmadır. Çalışma verileri, ailesinde

KOAH ile ilişkili hastalığı olan (KOAH, kronik bronşit, amfizem, astım) tek bireyin olması durumunda kişinin KOAH riskinin 2,10 kat, ailede birden fazla bu hastalıkları taşıyan bireylerin olması durumunda ise 2,48 kat arttığını ortaya koymuştur. Sonuçlarımız Zhou ve arkadaşlarının sonuçları ile uyumlu bulunmakla beraber, bizim çalışmamızda aile öyküsünde sadece KOAH dikkate alınmış, ve ailesinde bir tane KOAH olan birey varlığında aile öyküsü pozitif kabul edilmiştir. Her ne kadar ailesel yığılımın nedenlerinden biri benzer çevresel etkenlere maruziyet olsa da, asıl nedenin ortak genetik yatkınlık olduğu düşünülmektedir (Mc Closkey ve ark, 2001).

Ayrıca verilerimiz literatürle uyumlu şekilde artan sigara içme miktarı (paket-yıl) ve ilerleyen yaşın hastalık riskini arttırdığını göstermektedir (Domej ve ark, 2006; Xu ve ark, 2007; Vijayan ve ark,2013; Al Omari ve ark, 2014; Incalzi ve ark, 2014; Lee ve ark, 2015).

Çalışmamızda ayrıca hasta grup alevlenme sayılarına, GOLD evrelerine ve aile öyküsü olup olmamasına göre gruplara ayrılmış ve gruplar arasında genotip ve allel sıklıklarının dağılımı araştırılmıştır.

Alevlenme sayısı az olan grupta rs1077861 polimorfizmi için genotip dağılımı %32,1 TT, %52,8 TA ve %15,1 AA, çok olanlarda %24,6 TT, %64 TA ve %11,4 AA bulunmuştur. İlk grupta allel sıklığı %58,5 T ve %41,5 A iken, ikinci grupta %56,6 T ve %43,4 A olarak bulunmuştur. Gruplar arasında genotip ve allel sıklıkları açısından istatistiksel fark bulunmamıştır.

Alevlenme sayısı az olan grupta rs3135500 polimorfizmi için genotip dağılımı %41,5 GG, %47,2 AG ve %11,3 AA, çok olanlarda %44,7 GG, %43 AG ve %12,3 AA bulunmuştur. İlk grupta allel sıklığı %65,1 G ve %34,9 A iken, ikinci grupta %66,2 G ve %33,8 A olarak bulunmuştur. Gruplar arasında genotip ve allel sıklıkları açısından istatistiksel fark bulunmamıştır.

Hava akımı kısıtlamasına göre evrelenen orta evre hastalarda rs1077861 polimorfizmi TT genotipi %34, TA genotipi %60, AA genotipi %6, ağır evre

hastalarda TT genotipi %29,7, TA genotipi %53,1, AA genotipi %17,2, çok ağır evre hastalarda TT genotipi %18,9, TA genotipi %67,9 ve AA genotipi %13,2 sıklıkta bulunmuştur. Allel sıklıkları ise orta grupta %64 T, %36A, ağır grupta %56,3 T, %43,8 A ve çok ağır grupta %52,8 T, %47,2 A olarak belirlenmiştir. Her ne kadar gruplar arasında genotip ve allel sıklıklarının dağılımı açısından istatistiksel fark belirlenmemiş olsa da Kinose ve arkadaşlarının verileriyle uyumlu şekilde orta evre hastalarda A allelinin sıklığı ağır ve çok ağır evre hastalarda kıyasla daha düşük bulunmuştur (Kinose ve ark, 2012).

Rs3135500 polimorfizmi için aynı gruplarda genotip dağılımı hava akımı kısıtlaması orta düzeyde olan hastalarda %44 GG, %44 AG, %12 AA, ağır düzeyde olan hastalarda %45,3 GG, %35,9 AG, %18,8 AA ve çok ağır düzeyde olan hastalarda %41,5 GG, %52,8 AG, %5,7 AA şeklinde bulunmuştur. Allel sıklıkları ise hava akımı kısıtlaması orta düzeyde olan hastalarda %66 G, %34 A, ağır düzeyde olan hastalarda %63,3 G, %36,7 A ve çok ağır düzeyde olan hastalarda %67,9 G, %32,1 A olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında allel sıklıklarının dağılımına bakıldığında A alleli için en düşük sıklık çok ağır evre hastalarda gözlenmiştir. Bu sonuç Kinose ve arkadaşlarının çalışmaları ile farklılık göstermekle birlikte gruplar arasında genotip ve allel sıklıklarının dağılımı istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır (Kinose ve ark, 2012).

GOLD kriterlerine göre evrelenen A grubu hastalarda rs1077861 polimorfizmi TT genotipi %30,8, TA genotipi %57,7, AA genotipi %11,5, B grubu hastalarda TT genotipi %30, TA genotipi %50, AA genotipi %20, C grubu hastalarda TT genotipi %31,3, TA genotipi %56,3 ve AA genotipi %12,5, D grubu hastalarda TT genotipi %17,1, TA genotipi %70,7 ve AA genotipi %12,2 sıklıkta bulunmuştur. Allel sıklıkları ise A grubunda %59,6 T, %40,4 A, B grubunda %55 T, %45 A, C grubu hastalarda %59,4 T, %40,6 A ve D grubu hastalarda %52,4 T, %47,6 A olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında genotip ve allel sıklıklarının dağılımı açısından istatistiksel fark bulunmamıştır. Fakat yine hem düşük risk grubunda olan, hem de semptomları az olan A grubu hastalarda A allelinin sıklığı diğer gruplardan daha düşük bulunmuştur.

A grubu hastalarda rs3135500 polimorfizmi GG genotipi %38,5, AG genotipi %46,2, AA genotipi %15,4, B grubu hastalarda GG genotipi %30, AG genotipi %60, AA genotipi %10, C grubu hastalarda GG genotipi %50, AG genotipi %34,4 ve AA genotipi %15,6, D grubu hastalarda GG genotipi %43,9, AG genotipi %51,2 ve AA genotipi %4,9 sıklıkta bulunmuştur. Allel sıklıkları ise A grubunda %61,5 G, %38,5 A, B grubunda %60 G, %40 A, C grubu hastalarda %67,2 G, %32,8 A ve D grubu hastalarda %69,5 G, %30,5 A olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında genotip ve allel sıklıklarının dağılımı açısından istatistiksel fark bulunmamıştır. Literatürde hastaların GOLD kriterlerine göre sınıflandırılarak karşılaştırıldığı bu konuda bir çalışma bulunmamıştır. Mevcut çalışmada yüksek risk grubunda olan ve semptomları fazla olan D grubu hastalarda A allel sıklığı diğer gruplardakinden daha düşük bulunmuştur.

Aile öyküsü pozitif olanlarda rs1077861 polimorfizmi için genotip dağılımı %25,9 TT, %64,8 AT ve %9,3 AA, negatif olanlarda %28,1 TT, %57,9 AT ve %14 AA bulunmuştur. Allel sıklıkları ise ilk grupta %58,3 T, %41,7 A, ikinci grupta ise %57 T ve %43 A olarak belirlenmiştir. Genotip ve allel sıklıkları açısından iki grup arasında istatistiksel fark bulunmamıştır.

Yine rs3135500 polimorfizmi için aile öyküsü pozitif olanlarda genotip dağılımı %37 GG, %48,1 AG, %14,8 AA, negatif olanlarda %46,5 GG, %42,1 AG ve %11,4 AA bulunmuştur. Allel sıklıkları ise ilk grupta %67,5 G, %32,5 A, ikinci grupta ise %61,1 G ve %38,9 A olarak belirlenmiştir. İki grup arasında genotip ve allel sıklıklarının dağılımı istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır.

Çalışmamızda yıllık FEV1 düşüşü ile ilgili analizler, yaş ve sigara içme durumunun yıllık FEV1 düşüşü üzerine etkili olmadığını ortaya koymaktadır. Benzer şekilde sigara içme miktarı (paket-yıl) ile yıllık FEV1 düşüşü arasında ilişki bulunmamıştır. Ayrıca alevlenme sıklığı az ve çok olan hasta grupları arasında da yıllık FEV1 düşüşü açısından istatistiksel fark bulunmamıştır. Yine yıllık FEV1 düşüşü açısından rs1077861 polimorfizminin farklı genotiplerini taşıyan hastalar arasındaki farklılık anlamlı değildir. Diğer taraftan rs3135500 polimorfizmi AA

genotipine sahip hastalarda yıllık FEV1 düşüşü daha az iken, GG genotipine sahip hastalarda daha fazla düşüş olduğu anlaşılmıştır. (**p=0,048**) Buna göre Kinose, Weidinger ve Ahangari'nin çalışmaları ile karşılaştırıldığında bu çalışmaların hepsinde AA genotipi araştırılan hastalıklarla ilişkilendirilirken, bizim çalışmamızda GG genotipi daha fazla yıllık FEV1 düşüşü ile ilişkilendirilmiştir (Weidinger ve ark, 2005; Kinose ve ark, 2012; Ahangari ve ark, 2014). Dolayısıyla sonuçlarımız literatürle uyumlu değildir.

Sonuç olarak verilerimiz Türk toplumunda rs1077861 polimorfizminin KOAH gelişimi veya ilerlemesi ile ilişkili olmadığını ortaya koymuştur. Diğer taraftan rs3135500 polimorfizmi G alleli hasta grupta kontrol grubuna kıyasla istatistiksel önemlilik düzeyine yakın şekilde yüksek bulunmuştur. Fakat yaş, aile öyküsü, sigara (paket-yıl) değişkenleriyle birlikte değerlendirildiğinde rs3135500 polimorfizmi ile KOAH riski arasında ilişki bulunmamıştır. Bununla birlikte pozitif aile öyküsü, ileri yaş ve artan sigara içme miktarının (paket-yıl) hastalık riskini arttırdığı belirlenmiştir. Rs3135500 polimorfizminin yıllık FEV1 düşüşü üzerine etkisi incelendiğinde ise, yıllık FEV1 düşüşünün GG genotipini taşıyan hastalarda AA genotipini taşıyanlara kıyasla daha fazla olması rs3135500 polimorfizminin toplumumuzda KOAH'nın ilerlemesi ile ilişkili olabileceğini akla getirmektedir. Fakat literatürden farklı olarak rs3135500 polimorfizminin GG genotipi FEV1 düşüşü ile ilişkilendirilmiştir (Weidinger ve ark, 2005; Kinose ve ark, 2012; Ahangari ve ark, 2014). Bunun nedeni, farklı populasyonlarda polimorfizmlerin sıklıklarının ve etkilerinin farklı olması olabilir. Daha net bir sonuca ulaşmak, ancak Türk toplumunda yapılacak daha fazla olgu sayılı yeni çalışmalarla mümkün olabilecektir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada inflamatuvar bir hastalık olan KOAH gelişimi ve hastalığın ilerlemesi ile inflamasyon prosesinde rol alan *NOD2* geninin polimorfizmleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bunun için tüm çalışma grubunda *NOD2* geni rs2066844, rs1077861 ve rs3135500 polimorfizmleri için genotipleme yapılarak, elde edilen veriler hem hasta ve kontrol grupları arasında hem de hasta alt grupları arasında karşılaştırılmıştır. Çalışma verileri ışığında:

- *NOD2* geni rs2066844, rs1077861 ve rs3135500 polimorfizmlerinin genotip ve allel sıklıklarının hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak farklı olmadığı ve bu polimorfizmlerin hastalık riski ile ilişkili olmadığı,
- Pozitif aile öyküsü, ileri yaş ve artan sigara içme miktarının (paket-yıl) hastalık riskini arttırdığı,
- Rs3135500 polimorfizmi GG genotipine sahip olan hastalardaki yıllık FEV1 düşüşünün AA genotipinde olanlara kıyasla istatistiksel olarak daha fazla olduğu,
- Alevlenme sıklığı, hava akımı kısıtlaması, GOLD evreleri ve aile öyküsüne göre sınıflandırılan gruplar arasında polimorfizmlerin genotip ve allel sıklıkları açısından anlamlı bir fark olmamakla birlikte
 - Orta evre hastalarda rs1077861 polimorfizmi A allelinin ağır ve çok ağır evre hastalara kıyasla daha düşük olduğu,
 - Çok ağır evre hastalarda rs3135500 polimorfizmi A allelinin orta ve ağır evre hastalara kıyasla daha düşük olduğu,
- Alevlenme sayısına göre gruplandırılan hastalar arasında FEV1 düşüşü açısından anlamlı bir fark olmadığı ve sigara içme miktarı ile FEV1 düşüşü arasında korelasyon olmadığı,
- Bizim çalışma grubumuzda rs2066844 polimorfizmi minör allel sıklığının Türk toplumunda yapılan diğer çalışmalardan daha düşük olduğu,
- Rs1077861 polimorfizmi minör allel sıklığının bizim çalışma grubumuzda literatürdeki diğer çalışmalardan daha yüksek olduğu anlaşılmıştır.

Sonuç olarak, çalışmamızda *NOD2* geni rs2066844, rs1077861 ve rs3135500 polimorfizmleri ile Türk toplumunda KOAH gelişimi arasında bir ilişki bulunmamıştır. Bununla birlikte pozitif aile öyküsü, ileri yaş ve artan sigara içme miktarının (paket-yıl) hastalık riskini arttırdığı belirlenmiştir. Diğer taraftan yıllık FEV1 düşüşünün GG genotipini taşıyan hastalarda AA genotipini taşıyanlara kıyasla daha fazla olması, toplumumuzda bu polimorfizmin KOAH'nın ilerlemesi ile ilişkili olabileceğini akla getirmektedir. Literatürdeki diğer çalışmalarda bizim çalışmamızdan farklı olarak, bu polimorfizmin AA genotipi KOAH, astım ve kolorektal kanserlerle ilişkilendirilmiştir (Weidinger ve ark, 2005; Kinose ve ark, 2012; Ahangari ve ark, 2014). Bunun nedeni farklı popülasyonlarda ve etnik gruplarda polimorfizmlerin sıklıklarının ve etkilerinin değişebilmesi olabilir.

Türk toplumunda yapılan ilk çalışma bizim çalışmamız olduğu için, sonuçlarımızın karşılaştırılabileceği daha geniş ölçekli çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu sayede Türk toplumunda elde edilebilecek sonuçlar diğer toplumlarla karşılaştırılarak KOAH ve *NOD2* geni arasındaki ilişki daha net bir şekilde ortaya koyulabilecek ve hastalıkla ilişkili genetik etkenlerin aydınlatılmasına katkı sağlanacaktır. Hastalığın genetik yönünün aydınlatılması ise risk profili dikkate alınarak erken teşhis sağlanması, daha etkin ve kişiye özel tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi gibi uzun vadeli hedeflerin gerçekleştirilmesine olanak sağlayacaktır.

ÖZET

Nükleotid Bağlanma ve Oligomerizasyon Domeyn 2 (NOD2) Gen Varyantlarının Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOA) Gelişimi ve Hastalığın Şiddeti Üzerine Etkisinin Araştırılması

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOA), zararlı partikül ve gazlara karşı akciğerler ve havayolları tarafından oluşturulan artmış kronik inflamatuvar yanıtın neden olduğu, tam olarak geri dönüşümlü olmayan hava akımı kısıtlanması ile karakterize bir hastalıktır. KOA için en önemli risk faktörü sigara dumanına maruziyet olmakla birlikte, sigara kullananların ancak %10-20'sinde KOA gelişmesi hastalık üzerinde etkili olabilecek genetik faktörlerin önemini ortaya koymaktadır. Son zamanlarda doğuştan gelen immün sistem reseptörlerinin KOA patofizyolojisinde rol oynadığı öne sürülmüştür. NOD2 molekülü doğuştan gelen immün sistem reseptörlerinden biridir ve inflamatuvar proseste rol almaktadır.

Bu çalışmanın amacı, *NOD2* geni rs2066844, rs1077861 ve rs3135500 polimorfizmlerinin genotip ve allel sıklıklarını hem KOA hastaları ve kontrol grubu arasında, hem de çeşitli parametrelere göre sınıflandırılmış hasta alt grupları arasında karşılaştırılarak, sözkonusu polimorfizmlerin KOA gelişimi ve hastalığın şiddeti üzerine etkisini araştırmaktır. Bunun için 168 KOA'lı birey ve 100 kontrolden oluşan çalışma grubunda PCR-RFLP ve eş zamanlı PCR yöntemleri kullanılarak genotipleme yapılmıştır.

Çalışmamız sonucunda rs2066844, rs1077861 ve rs3135500 polimorfizmlerinin genotip ve allel sıklıkları hasta ve kontrol grupları arasında farklı bulunmamış ve bu polimorfizmler hastalık riski ile ilişkilendirilmemiştir. Bununla birlikte pozitif aile öyküsü, ileri yaş ve artan sigara içme miktarının (paket-yıl) hastalık riskini arttırdığı gözlenmiştir. Diğer taraftan rs3135500 polimorfizmi GG genotipini taşıyan hastalarda FEV1 düşüşünün daha fazla olduğu belirlenmiştir. Alevlenme sıklığı, hava akımı kısıtlaması, aile öyküsü ve GOLD evrelerine göre alt gruplara ayrılan hastalar arasında polimorfizmlerin genotip ve allel sıklıkları farklı bulunmamıştır. Rs2066844 polimorfizmi minör allel sıklığı Türk toplumunda yapılan diğer çalışmalardan daha düşük, rs1077861 polimorfizmi minör allel sıklığı ise literatürdeki diğer çalışmalardan daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak, verilerimiz *NOD2* geni rs2066844, rs1077861 ve rs3135500 polimorfizmlerinin KOA gelişimi ile ilişkili olmadığını, fakat rs3135500 polimorfizmi GG genotipinin hastalığın ilerlemesi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı, NOD2, Polimorfizm, rs2066844, rs1077861, rs3135500.

SUMMARY

Investigation of the effect of Nucleotide Binding and Oligomerization Domain 2 (Nod2) Gene Variants on Development and Severity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is characterized by persistent air flow limitation caused by enhanced chronic inflammatory response to the noxious particles and gases in the lung and the air ways. Even exposure to cigarette smoke is the most important risk factor for COPD, development of COPD only in 10-20% of habitual smokers exhibits the importance of genetic factors which could be effective on this disease. In recent years, it has been proposed that innate immune system receptors play role on pathophysiology of COPD. NOD2 is one of these innate immune system receptors and play role in inflammatory processes.

Aim of the present study was to investigate the effect of NOD2 gene rs2066844, rs1077861 and rs3135500 polymorphisms on development and severity of COPD by comparing genotype and allele frequency of these polymorphisms among both COPD patients and control group and patient subgroups categorized according to various parameters. Thus genotyping of 168 COPD patients and 100 controls was performed by using PCR-RFLP and Real Time PCR methods.

Our results revealed that there were not any significant differences in terms of genotype and allele frequencies of rs2066844, rs1077861 and rs3135500 polymorphisms between patient and control groups. We did not find any association between these polymorphisms and COPD risk. In addition it was observed that family history, older age and higher amount of cigarette smoke (pack-year) increased the risk of COPD development. On the other hand, annual FEV1 decrease was higher in the patients carrying rs3135500 polymorphism GG genotype. No differences in genotype and allele frequencies of polymorphisms were detected between patients with and without frequent exacerbations and among moderate, severe and very severe patients ($p > 0,05$). Moreover, no differences were found in terms of genotype and allele frequencies among A, B, C and D patients and between patients with and without family history of COPD ($p > 0,05$). Minor allele frequency of rs2066844 polymorphism was lower than other studies conducted on Turkish population and rs1077861 polymorphism's minor allele frequency was found higher than other studies in the literature. Consequently, our results indicate that *NOD2* gene rs2066844, rs1077861 and rs3135500 polymorphisms are not associated with development of COPD, but rs3135500 polymorphism GG genotype can be associated with progression of the disease.

Key Words: Chronic Obstructive Pulmonary Disease, NOD2, polymorphism, rs2066844, rs1077861, rs3135500.

KAYNAKLAR

- ABBEY, D.E., BURCHETTE, R.J., KNUTSEN, S.F., MCDONNELL, W.F., LEBOWITZ, M.D., ENRIGHT, P.L. (1998). Long-term particulate and other air pollutants and lung function in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med.*, **158**:289-98.
- ABBOTT, D.W., YANG, Y., HUTTI, J.E., MADHAVARAPU, S., KELLIHER, M.A., CANTLEY, L.C. (2007). Coordinated regulation of Toll-like receptor and NOD2 signaling by K63-linked polyubiquitin chains. *Molecular and cellular biology*, **27**:6012–6025.
- AHANGARİ, F., SALEHİ, R., SALEHİ, M., KHANAHMAD, H. (2014). A miRNA-binding site single nucleotide polymorphism in the 3'-UTR region of the NOD2 gene is associated with colorectal cancer. *Med Oncol.* **31(9)**:173.
- AL OMARİ, M., KHASSAWNEH, B.Y., KHADER. Y., DAUOD, A.S., BERGUS, G. (2014). Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease among adult male cigarettes smokers: a community-based study in Jordan. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* **9**:753-8.
- ALP, A., PINAR, A., ESER Ö., SARIBAŞ Z., ERGÜNAY K. (2012). Real-Time PCR Kurs Kitapçığı. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.
- ARSLAN, Z., ILGAZLI, A., ETILER N., HAMZAOĞLU, O. (2013). Prevalence of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Kocaeli: An Industrialised City in Turkey. *Balkan Med J* **30**: 387-93.
- BARBERÀ, J.A., ROCA, J., FERRER, A., FÉLEZ, M.A, DÍAZ, O., ROGER, N., RODRÍGUEZ-ROÍSİN, R. (1997). Mechanisms of worsening gas exchange during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.*, **10**:1285-91.
- BARKER, D.J., GODFREY, K.M., FALL, C., OSMOND, C., WINTER, P.D., SHAHEEN, S.O. (1991). Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease. *BMJ.*, **303**:671-5.
- BARNES, P.J. (2008). Emerging pharmacotherapies for COPD. *Chest*.**134(6)**:1278-86
- BAŞYİĞİT, İ. (2010). Koah patogenezi ve Fizyopatolojisi. *TTD Toraks Cerrahisi Bulteni*, Cilt: 1 Sayı: 2

- BERTRAND, M.J., DOIRON, K., LABBE, K., KORNELUK, R.G., BARKER, P.A., SALEH, M. (2009). Cellular inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 are required for innate immunity signaling by the pattern recognition receptors NOD1 and NOD2. *Immunity*, **30**:789–801.
- BORZUTZKY, A., FRIED, A., CHOU, J., BONILLA, F.A., KIM, S., DEDEOGLU, F. (2010). NOD2-associated diseases: Bridging innate immunity and autoinflammation. *Clin Immunol.*, **134**(3):251-61.
- BOSSE, Y. (2012). Updates on the COPD gene list. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.*, **7**: 607-31.
- BUCKINGHAM L, FLAWS ML (2007). Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods, & Clinical Applications. Philadelphia: F. A. Davis Company.
- BUÍST, A.S., MCBURNIE, M.A., VOLLMER, W.M., GILLESPIE, S., BURNEY, P., MANNINO, D.M., MENEZES, A.M., SULLIVAN, S.D., LEE, T.A., WEISS, K.B., JENSEN, R.L., MARKS, G.B., GULSVIK, A., NIZANKOWSKA-MOGILNICKA, E. (2007). International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet*, **370**: 741-50.
- BURNEY, P., JITHOO, A., KATO, B., JANSON, C., MANNINO, D., NIZANKOWSKA-MOGILNICKA, E., STUDNICKA, M., TAN, W., BATEMAN, E., KOÇABAS, A., VOLLMER, W.M., GÍSLASON, T., MARKS, G., KOUL, P.A., HARRABI, I., GNATIUC, L., BUÍST, S. (2014). Chronic obstructive pulmonary disease mortality and prevalence: the associations with smoking and poverty--a BOLD analysis. *Thorax*. **69**(5):465-73.
- BURSZTEJN, A.C., ROMANO, A., GUÉANT-RODRIGUEZ, R.M., CORNEJO, J.A., OUSSALAH, A., CHERY, C., GASTIN, I., GAETA, F., BARBAUD, A., BLANCA M, GUÉANT JL. (2013). Allergy to betalactams and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) gene polymorphisms. *Allergy*. **68**(8):1076-80.
- CARNEIRO, L. A., TRAVASSOS, L. H., GIRARDIN, S. E. (2007). Nod-like receptors in innate immunity and inflammatory diseases. *Ann Med.*, **39**(8):581-593.
- CHAMAILLARD, M., GIRARDIN, S. E., VIALA, J., PHILPOTT, D. J. (2003a). Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol.*, **5**(9):581-592.
- CHAMAILLARD, M., PHILPOTT, D., GIRARDIN, S.E., ZOUALI, H., LESAGE, S., CHAREYRE, F., BUÍ, T.H., GIOVANNINI, M., ZAEHRINGER, U., PENARD-LACRONIQUE, V., SANSONETTI, P.J., HUGOT, J.P., THOMAS, G. (2003b). Gene–environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**(6):3455–60.
- CHAPUT, C., SANDER, L.E., SUTTORP, N., OPITZ, B. (2013). NOD-Like Receptors in Lung Diseases. *Front Immunol.*, **21**(4):393.

- CHO, M.H., BOUTAOU, I.N., KLANDERMAN, B.J., SYLVIA, J.S., ZINITI, J.P., HERSH, C.P., DEMEO, D.L., HUNNINGHAKE, G.M., LITONJUA, A.A., SPARROW, D., LANGE, C., WON, S., MURPHY, J.R., BEATY, T.H., REGAN, E.A., MAKE, B.J., HOKANSON, J.E., CRAPO, J.D., KONG, X., ANDERSON, W.H., TAL-SINGER, R., LOMAS, D.A., BAKKE, P., GULSVIK, A., PILLAI, S.G., SILVERMAN, E.K. (2010). Variants in *FAM13A* are associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Genetics*, **42**: 200–202.
- CHO, M.H., CASTALDI, P.J., WAN, E.S., SIEDLINSKI, M., HERSH, C.P., DEMEO, D.L., HIMES, B.E., SYLVIA, J.S., KLANDERMAN, B.J., ZINITI, J.P., LANGE, C., LITONJUA, A.A., SPARROW, D., REGAN, E.A., MAKE, B.J., HOKANSON, J.E., MURRAY, T., HETMANSKI, J.B., PILLAI, S.G., KONG, X., ANDERSON, W.H., TAL-SINGER, R., LOMAS, D.A., COXSON, H.O., EDWARDS, L.D., MACNEE, W., VESTBO, J., YATES, J.C., AGUSTI, A., CALVERLEY, P.M., CELLI, B., CRIM, C., RENNARD, S., WOUTERS, E., BAKKE, P., GULSVIK, A., CRAPO, J.D., BEATY, T.H., SILVERMAN, E.K. (2012). A genome-wide association study of COPD identifies a susceptibility locus on chromosome 19q13. *Hum Mol Genet.*, **21** : 947-5.
- COONEY, R., BAKER, J., BRAIN, O., DANIS, B., PICHULIK, T., ALLAN, P., FERGUSON, D.J., CAMPBELL, B.J., JEWELL, D., SIMMONS, A. (2010). NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nature medicine*, **16**:90–97.
- CORREA, R.G., MILUTINOVIC, S., REED, J.C. (2012). Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases. *Biosci Rep.*, **32(6)**:597-608.
- COSIO, M.G., SAETTA, M., AGUSTI, A. (2009). Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.*, **360**:2445-54.
- CROTHERS, K.H.L., GOULET, J.L., GOETZ, M.B., BROWN, S.T. (2011). HIV infection and risk for incident pulmonary diseases in the combination antiretroviral therapy era. *Am J Respir Crit Care Med.*, **183**:388-95.
- CUTHBERT, A.P., FISHER, S.A., MIRZA, M.M., KING, K., HAMPE, J., CROUCHER, P.J., MASCHERETTI, S., SANDERSON, J., FORBES, A., MANSFIELD, J., SCHREIBER, S., LEWIS, C.M., MATHEW, C.G. (2002). The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. **122(4)**:867-74.
- DALEY, D., LEMIRE, M., AKHABIR, L., CHAN-YEUNG, M., HE, J.Q., MCDONALD, T., SANDFORD, A., STEFANOWICZ, D., TRIPP, B., ZAMAR, D., BOSSE, Y., FERRETTI, V., MONTPETIT, A., TESSIER, M.C., BECKER, A., KOZYRSKYJ, A.L., BEILBY, J., MCCASKIE, P.A., MUSK, B., WARRINGTON, N., JAMES, A., LAPRISE, C., PALMER, L.J., PARE, P.D., HUDSON, T.J. (2009). Analyses of associations with asthma in four asthma population samples from Canada and Australia. *Human genetics*. **125**:445–459.

- DASSOPOULOS, T., NGUYEN, G.C., TALOR, M.V., DATTA, L.W., ISAACS, K.L., LEWIS, J.D., GOLD, M.S., VALENTINE, J.F., SMOOT, D.T., HARRIS, M.L., OLIVA-HEMKER, M., BAYLESS, T.M.; NIDDK IBD GENETICS CONSORTIUM, BUREK, C.L., BRANT, S.R. (2010). NOD2 mutations and anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies are risk factors for Crohn's disease in African Americans. *Am J Gastroenterol.* **105(2)**:378-86.
- DE JAGER, P.L., GRAHAM, R., FARWELL, L., SAWCER, S., RICHARDSON, A., BEHRENS, T.W., COMPSTON, A., HAFLER, D.A., KERE, J., VYSE, T.J., RIOUX, J.D. (2006). The role of inflammatory bowel disease susceptibility loci in multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Genes and immunity.* **7**:327–334.
- DE MARCO, R., ACCORDINÌ, S., CERVERÌ, I., CORSICO, A., ANTÓ, J.M., KÜNZLI, N., JANSON, C., SUNYER, J., JARVÍS, D., CHINN, S., VERMEIRE, P., SVANES, C., ACKERMANN-LIEBRICH, U., GÍSLASON, T., HEINRICH, J., LEYNAERT, B., NEUKIRCH, F., SCHOUTEN, J.P., WJST, M., BURNEY, P. (2007). Incidence of chronic obstructive pulmonary disease in a cohort of young adults according to the presence of chronic cough and phlegm. *Am J Respir Crit Care Med.*, **175**:32-9.
- DE MARCO, R., ACCORDINÌ, S., MARCON, A., CERVERÌ, I., ANTÓ, J.M., GÍSLASON, T., HEINRICH, J., JANSON, C., JARVÍS, D., KUENZLI, N., LEYNAERT, B., SUNYER, J., SVANES, C., WJST, M., BURNEY, P. (2011). Risk factors for chronic obstructive pulmonary disease in a European cohort of young adults. *Am J Respir Crit Care Med.*, **183**:891-7.
- DOMEJ W, FÖLDES-PAPP Z, FLÖGEL E, HADITSCH B. (2006). Chronic obstructive pulmonary disease and oxidative stress.

| | |
|---|--|
| 1 | |
|---|--|

Curr Pharm Biotechnol. **7(2)**:117-23.
- EISNER, M.D., BALMES, J., KATZ, B.P., TRUPIN, L, YELIN, E., BLANC, P. (2005). Lifetime environmental tobacco smoke exposure and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Environ Health Perspect.*, **4**:7-15.
- ELGUEZABAL, N., CHAMORRO, S., MOLINA, E., GARRIDO, J.M., IZETA, A., RODRIGO, L., JUSTE, R.A. (2012). Lactase persistence, NOD2 status and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection associations to Inflammatory Bowel Disease. *Gut Pathog.* **4(1)**:6.
- EL MOKHTARI, N.E., OTT, S.J., NEBEL, A., SCHÄFER, A., ROSENSTIEL, P., FÖRSTER, M., NOTHNAGEL, M., SIMON, R., SCHREIBER, S. (2007). Role of NOD2/CARD15 in coronary heart disease. *BMC Genet.* **8**:76.
- EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY (ERS). (2003). EUROPEAN LUNG WHITE BOOK: Huddersfield, *European Respiratory Society Journals, Ltd.*

- FERWERDA G, KRAMER M, DE JONG D, PICCINI A, JOOSTEN LA, DEVESAGINER I, GIRARDIN SE, ADEMA GJ, VAN DER MEER JW, KULLBERG BJ, RUBARTELLI A, NETEA MG (2008). Engagement of NOD2 has a dual effect on proIL-1beta mRNA transcription and secretion of bioactive IL-1beta. *Eur J Immunol.* **38(1)**:184-91.
- FLETCHER C, PETO R. (1977). The natural history of chronic airflow obstruction. *BMJ* **1**:1645-8.
- FOREMAN, M.G., ZHANG, L., MURPHY, J., HANSEL, N.N., MAKE, B., HOKANSON, J.E., WASHKO, G., REGAN, E.A., CRAPO, J.D., SILVERMAN, E.K., DEMEO, D.L. (2011), Early-onset chronic obstructive pulmonary disease is associated with female sex, maternal factors, and African American race in the COPD Gene Study. *Am J Respir Crit Care Med.*, **184**:414-20.
- FREIRE, P., FIGUEIREDO, P., CARDOSO, R., DONATO, M.M., SÁ, A., PORTELA, F., ROMÃOZINHO, J.M., SOFIA, C. (2013). Card15 mutations and gastric cancer in a Portuguese population. *Scand J Gastroenterol.* **48(10)**:1188-97.
- FUKUCHI, Y., NISHIMURA, M., ICHINOSE, M., ADACHI, M., NAGAI, A., KURIYAMA, T., TAKAHASHI, K., NISHIMURA, K., ISHIOKA, S., AIZAWA, H., ZAHER, C. (2004). COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study. *Respirology*, **9**:458-65.
- GAO, M., CAO, Q., LUO, L.H., WU, M.L., HU, W.L., SI, J.M. (2005). NOD2/CARD15 gene polymorphisms and susceptibility to Crohn's disease in Chinese Han population. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* **44(3)**:210-2.
- GAZOULI, M., ZACHARATOS, P., MANTZARIS, G.J., BARBATIS, C., IKONOMOPOULOS, I., ARCHIMANDRITIS, A.J., LUKAS, J.C., PAPALAMBROS, E., GORGOLIS, V. (2004). Association of NOD2/CARD15 variants with Crohn's disease in a Greek population. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* **16(11)**:1177-82.
- GLOBAL INITIATIVE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE (GOLD). (Updated 2013). Global Strategy for The Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.
- GOOPTU, B., EKEOWA, U.I., LOMAS, D.A. (2009). Mechanisms of emphysema in α 1-antitrypsin deficiency: molecular and cellular insights. *Eur Respir J.*, **34**: 475-88.
- GREEN, R.M, GALLY, F., KEENEY, J.G., ALPER, S., GAO, B., HAN, M., MARTIN, R.J., WEINBERGER, A.R., CASE, S.R., MINOR, M.N., CHU, H.W. (2009). Impact of cigarette smoke exposure on innate immunity: a *Caenorhabditis elegans* model. *PLoS One.* **4(8)**:e6860.

- GUERRA, S., SHERRILL, D.L., VENKER, C., CECCATO, C.M., HALONEN, M., F.D. M. (2009). Chronic bronchitis before age 50 years predicts incident airflow limitation and mortality risk. *Thorax*, **64**:894-900.
- GÜNEL T. (2007). Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.*, **27**:763-767.
- GUNEN, H., HACİEVİLİYAGİL, S.S., YETKİN, O., GULBAS, G., MUTLU, L.C., PEHLİVAN, E. (2008). Prevalence of COPD: first epidemiological study of a large region in Turkey. *Eur J Intern Med* **19**:499-504.
- HALBERT, R.J., NATOLI, J.L., GANO, A., BADAMGARAV, E., BUIST, A.S., MANNINO, D.M. (2006). Global burden of COPD: Systematic review and meta-analysis. , *Eur Respir J.*, **28**:523-32.
- HAMPE, J., CUTHBERT, A., CROUCHER, P.J., MİRZA, M.M., MASCHERETTİ, S., FİŞHER, S., FRENZEL, H., KİNG, K., HASSELMEYER, A., MACPHERSON, A.J., BRİDGER, S., VAN DEVENTER, S., FORBES, A., NİKOLAUS, S., LENNARD-JONES, J.E., FOELSCH, U.R., KRAWCZAK, M., LEWİS, C., SCHREİBER, S., MATHEW, C.G. (2001). Association between insertion in NOD2 gene and Crohn’s disease in German and British populations. *Lancet* **357**:1925–8.
- HANCOCK, D.B., EIJGELSHEIM, M., WILK, J.B., GHARIB, S.A., LOEHR, L.R., MARCIANTE, K.D., FRANCESCHINI, N., VAN DURME, Y.M., CHEN, T.H., BARR, R.G., SCHABATH, M.B., COUPER, D.J., BRUSSELLE, G.G., PSATY, B.M., VAN DUIJN, C.M., ROTTER, J.I., UITTERLINDEN, A.G., HOFMAN, A., PUNJABI, N.M., RIVADENEIRA, F., MORRISON, A.C., ENRIGHT, P.L., NORTH, K.E., HECKBERT, S.R., LUMLEY, T., STRICKER, B.H., O’CONNOR, G.T., AND LONDON, S.J. (2010). Meta-analyses of genome-wide association studies identify multiple loci associated with pulmonary function. *Nature Genetics*, **42** (1):45-52.
- HASEGAWA, M., FUJIMOTO, Y., LUCAS, P.C., NAKANO, H., FUKASE, K., NUNEZ, G., INOHARA, N. (2008). A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *The EMBO journal.*, **27**:373–383.
- HERSH, C.P., HOKANSON, J.E., LYNCH, D.A., WASHKO, G.R., MAKE, B.J., CRAPO, J.D., SİLVERMAN, E.K. (2011). Family history is a risk factor for COPD. *Chest*. **140**(2):343-50
- HNIZDO, E., SULLIVAN, P.A., BANG, K.M., WAGNER, G. (2002). Association between chronic obstructive pulmonary disease and employment by industry and occupation in the US population: a study of data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol.*, **156**:738-46.
- HNIZDO, E., SULLIVAN, P.A., BANG, K.M., WAGNER, G. (2004). Airflow obstruction attributable to work in industry and occupation among U.S. race/ethnic groups: a study of NHANES III data *Am J Ind Med.*, **46**:126-35.

HOGG, J.C. (2004). Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, **364**:709-21.

HOGG, J.C., TIMENS, W. (2009). The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu. Rev Pathol.*, **4**: 435–59.

HOLT PG. (1987). Immune and inflammatory function in cigarette smokers. *Thorax*, **42**:241-9.

HOMER, C.R., RICHMOND, A.L., REBERT, N.A., ACHKAR, J.P., MCDONALD, C. (2010). ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology*, **139**:1630–1641.

HOSEK, J., BARTOSOVÁ, L., GREGOR, P., KOLORZ, M., DÍTE, P., BÁTOVSKÝ, M., BARTOS, M. (2008). Frequency of representative single nucleotide polymorphisms associated with inflammatory bowel disease in the Czech Republic and Slovak Republic. *Folia Biol (Praha)*. **54(3)**:88-96.

[<http://sequencereferral.com/technology.php>] Erişim tarihi: 07.06.2014.

[<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>] Erişim tarihi: 08.06.2014

[<http://www.who.int/respiratory/copd/burden/en/>] Erişim tarihi: 07.06.2014

[<http://www.who.int/respiratory/copd/en/>] Erişim tarihi: 08.06.2014

[http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Variation_Gene/Table?db=core;g=ENSG00000167207;r=16:50727514-50766988#ALL_tablePanel] Erişim tarihi: 30.07.2014.

[http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_Protein?db=core;g=ENSG00000167207;r=16:50727514-50766988;t=ENST00000300589] Erişim tarihi: 08.06.2014.

[<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOD2>] Erişim tarihi: 08.06.2014

[<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOD2>] Erişim tarihi: 30.12.2014

[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44324/?report=reader#!po=16.6667>] Erişim tarihi: 08.06.2014

[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/64127#general-protein-info>] Erişim tarihi: 08.06.2014

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2066844] Erişim tarihi: 03.01.2015

[<http://www.nhlbi.nih.gov/resources/docs/cht-book.htm>] Erişim tarihi: 08.06.2014

[<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/8112121ec019.pdf?expires=1402164532&id=id&accname=guest&checksum=FF89411C1181309CAA1254B627FD72DC>] Erişim tarihi: 07.06.2014.

[<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0088879>] Erişim tarihi: 07.06.2014.

HUGOT, J.P., CHAMAÏLLARD, M., ZOUALİ, H., LESAGE, S., CEZARD, J.-P., BELAÏCHE, J., ALMER, S., TYSK, C., O'MORAİN, C. A., GASSULL, M., BİNDER, V., FİNKEL, Y., CORTOT A., MODİGLİANİ R., PUİG P.L., ROUSSEAU C.G., MACRY J., COLOMBEL J.F., SAHBATOU M., THOMAS G. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**: 599-603.

HUGOT, J.P., ZACCARİA, I., CAVANAUGH, J., YANG, H., VERMEİRE, S., LAPPALAINEN, M., SCHREİBER, S., ANNESE, V., JEWELL, D.P., FOWLER, E.V., BRANT, S.R., SİLVERBERG, M.S., CHO, J., RİOUX, J.D., SATSANGİ, J., PARKES, M. (2007). Prevalence of CARD15/NOD2 mutations in Caucasian healthy people. *Am J Gastroenterol.* **102(6)**:1259-67.

IMBODEN, M., BOUZİGON, E., CURJURİC, I., RAMASAMY, A., KUMAR, A., HANCOCK, D.B., WİLK, J.B., VONK, J., THUN, G.A., SİROUX, V., NADİF, R., MONİER, F., GONZALEZ, J.R., WJST, M., HEİNRİCH, J., LOEHR, L., FRANCESCHİNİ, N., NORTH, K.E., KOPPELMAN, G.H., GUERRA, S., KRONENBERG, F, LATHROP, MOFFATT, M.F., O'CONNOR, G.T., STRACHAN, D.P., POSTMA, D., LONDON, S.J., SCHİNDLER, C., KOGEVİNAS, M., KAUFFMANN, F., JARVİS, D.L., DEMENAİS, F. (2012). Genome wide association study of lung function decline in adults with and without asthma. *J Allergy Clin Immunol.*, **129** : 1218-28.

INCALZİ, R.A., SCARLATA, S., PENNAZZA, G., SANTONİCO M, PEDONE C. (2014). Chronic Obstructive Pulmonary Disease in the elderly. *Eur J Intern Med.* **(4)**:320-8.

İNCE, A.T., HATİRNAZ, O., OVÜNÇ, O., OZBEK, U. (2008). 1007fs, G908R, R702W mutations and P268S, IVS8+158 polymorphisms of the CARD15 gene in Turkish inflammatory bowel disease patients and their relationship with disease-related surgery. *Dig Dis Sci.* **53(6)**:1683-92.

İNOHARA, CHAMAÏLLARD, MCDONALD, C., NUNEZ, G. (2005). NOD-LRR proteins: role in hostmicrobial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem.*, **74**:355-83.

- INOHARA, N., KOSEKI, T., LIN, J., DEL PESO, L., LUCAS, P.C., CHEN, F.F., OGURA, Y., NUNEZ, G. (2000). An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*. **275**:27823–27831.
- KABESCH, M., PETERS, W., CARR, D., LEUPOLD, W., WEILAND, S.K., VON MUTIUS, E. (2003). Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations. *J Allergy Clin Immunol*. **111**(4):813-7.
- KANAYAMA, A., SETH, R.B., SUN, L., EA, C.K., HONG, M., SHAITO, A., CHIU, Y.H., DENG, L., CHEN, Z.J. (2004). TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Molecular cell*. **15**:535–548.
- KANAZAWA, N., OKAFUJI, I., KAMBE, N., NISHIKOMORI, R., NAKATA-HIZUME, M., NAGAI, S., FUJI, A., YUASA, T., MANKI, A., SAKURAI, Y., NAKAJIMA, M., KOBAYASHI, H., FUJIWARA, I., TSUTSUMI, H., UTANI, A., NISHIGORI, C., HEIKE, T., NAKAHATA, T., MIYACHI, Y. (2005). Early-onset sarcoidosis and CARD15 mutations with constitutive nuclear factor-kappaB activation: common genetic etiology with Blau syndrome. *Blood*. **105**:1195–1197.
- KANNEGANTI, T. D., LAMKANFI, M., NUNEZ, G. (2007). Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*, **27**(4):549-559.
- KIM, T.H., RAHMAN, P., JUN, J.B., LEE, H.S., PARK, Y.W., IM, H.J., SNELGROVE, T., PEDDLE, L., HALLETT, D., INMAN, R.D. (2004). Analysis of CARD15 polymorphisms in **Korean** patients with ankylosing spondylitis reveals absence of common variants seen in western populations. *J Rheumatol*. **31**(10):1959-61.
- KINOSE, D., OGAWA, E., HIROTA, T., ITO, I., KUDO, M., HARUNA, A., MARUMO, S., HOSHINO, Y., MURO, S., HIRAI, T., SAKAI, H., DATE, H., TAMARI, M., MISHIMA, M. (2012). A NOD2 gene polymorphism is associated with the prevalence and severity of chronic obstructive pulmonary disease in a Japanese population. *Respirology*, **17**(1):164-71.
- KOBAYASHI, K.S., CHAMAILLARD, M., OGURA, Y., HENEGARIU, O., INOHARA, N., NUNEZ, G., FLAVELL, R.A. (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*, **307**:731–734.
- KOHANSAL, R., MARTINEZ-CAMBLOR, P., AGUSTI, A., BUIST, A.S., MANNINO, D.M., SORIANO, J.B. (2009). The natural history of chronic airflow obstruction revisited: an analysis of the Framingham offspring cohort. *Am J Respir Crit Care Med*, **180**:3-10.
- KRIEG, A., CORREA, R.G., GARRISON, J.B., LE NEGRATE, G., WELSH, K., HUANG, Z., KNOEFEL, W.T., REED, J.C. (2009). XIAP mediates NOD signaling via interaction with RIP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **106**:14524–14529.

- KUTIKHIN, A.G. (2011). Role of NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 gene polymorphisms in cancer etiology. *Hum Immunol.*, **72(10)**:955–68.
- LAM, K.B., JIANG, C.Q., JORDAN, R.E., MILLER, M.R., ZHANG, W.S., CHENG, K.K., LAM, T.H., ADAB, P. (2010). Prior TB, smoking, and airflow obstruction: a cross-sectional analysis of the Guangzhou Biobank Cohort Study. *Chest*, **137**:593-600.
- LAWLOR, D.A., EBRAHIM, S., DAVEY SMITH, G. (2005). Association of birth weight with adult lung function: findings from the British Women's Heart and Health Study and a meta-analysis. *Thorax*, **60**:851-8.
- LEE, S.J. KİM, S.W., KONG, K.A., RYU, Y.J., LEE, J.H., CHANG, J.H. (2015). Risk factors for chronic obstructive pulmonary disease among never-smokers in Korea. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* **10**:497-506.
- LEE YM. (2014). Chronic obstructive pulmonary disease: respiratory review of 2014. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. **77(4)**:155-60.
- LESAGE, S., ZOUALI, H., CEZARD, J.P., COLOMBEL, J.F., BELAICHE, J., ALMER, S., TYSK, C., O'MORAIN, C., GASSULL, M., BINDER, V., FINKEL, Y., MODIGLIANI, R., GOWER-ROUSSEAU, C., MACRY, J., MERLIN, F., CHAMAILLARD, M., JANNOT, A.S., THOMAS, G., HUGOT, J.P. (2002). CARD15/ NOD2 mutational analysis and genotype–phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet.*, **70(4)**:845–57.
- LİU, J., HE, C., XU, Q., XİNG, C., YUAN. Y. (2014). NOD2 polymorphisms associated with cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One*, **9(2)**:e89340.
- LOPEZ, VARELA, M.V., MONTES DE OCA, M., HALBERT, R.J., MUIÑO, A., PEREZ-PADILLA, R., TÁLAMO, C., JARDİM, J.R., VALDIVÍA, G., PERTUZÉ, J., MORENO, D., MENEZES, A.M. (2010). Sex-related differences in COPD in five Latin American cities: the PLATINO study. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, **36**:1034-41.
- LÜLEYAP, H.Ü. (2008). Moleküler Genetiğin Esasları. Nobel Kitabevi, Adana.
- MA, Q., AN, X., LI, Z., ZHANG, H., HUANG, W., CAI, L., HU, P., LIN, Q., TZENG, C.M. (2013). P268S in NOD2 associates with susceptibility to Parkinson's disease in Chinese population. *Behav Brain Funct.* **9**:19.
- MAGALHAES, J.G., FRITZ, J.H., LE BOURHIS, L., SELLGE, G., TRAVASSOS, L.H., SELVANANTHAM, T., GIRARDIN, S.E., GOMMERMAN, J.L., PHILPOTT, D.J. (2008). Nod2-dependent Th2 polarization of antigen-specific immunity. *J Immunol.*, **181**:7925–7935.

- MANNINO, D.M., HOMA, D.M., AKINBAMI, L.J., FORD, E.S., REDD, S.C. (2002). Chronic obstructive pulmonary disease surveillance-United States, 1971-2000. *MMWR Surveill Summ.*, **51**:1-16.
- MARTINON, F., TSCHOPP, J. (2007). Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ.*, **14**(1):10-22.
- MATHERS, C.D., LONCAR, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 *PLoS Med.*, **3**:e442.
- MATHESON, M.C., BENKE, G., RAVEN, J., SÌM, M.R., KROMHOUT, H., VERMEULEN, R., JOHNS, D.P., WALTERS, E.H., ABRAMSON, M.J. (2005). Biological dust exposure in the workplace is a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, **60**:645-51.
- MCCARTHY, J.V., NI, J., DIXIT, V.M. (1998). RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *The Journal of biological chemistry*. **273**:16968–16975.
- MCCLOSKEY, S.C., PATEL, B.D., HINCHLIFFE, S.J., REID, E.D., WAREHAM, N.J., LOMAS, D.A. (2001). Siblings of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease have a significant risk of airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med*. **15**;164(8 Pt 1):1419-24.
- MENEZES, A.M., HALLAL, P.C., PEREZ-PADILLA, R., JARDÌM, J.R., MUIÑO, A., LOPEZ, M.V., VALDIVÌA, G., MONTES DE OCA, M., TALAMO, C., PERTUZE, J., VÌCTORA, C.G. (2007). Tuberculosis and airflow obstruction: evidence from the PLATINO study in Latin America. *Eur Respir J.*, **30**:1180-5.
- MENEZES, A.M., PEREZ-PADILLA, R., JARDÌM, J.R., MUIÑO, A., LOPEZ, M.V., VALDIVÌA, G., MONTES DE OCA, M., TALAMO, C., HALLAL, P.C., VÌCTORA, C.G. (2005). Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet*, **366**:1875-81.
- MICELI-RICHARD, C., LESAGE, S., RYBOJAD, M., PRIEUR, A.M., MANOUVRIER-HANU, S., HAFNER, R., CHAMAILLARD, M., ZOUALI, H., THOMAS, G., HUGOT, J.P. (2001). CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nature genetics.*, **29**: 19-20.
- MITROVIČ, M., POTOČNIK, U. (2011). High-resolution melting curve analysis for high-throughput genotyping of NOD2/CARD15 mutations and distribution of these mutations in Slovenian inflammatory bowel diseases patients. *Dis Markers*. **30**(5):265-74.
- MOLFINO, N.A., JEFFERY, P.K. (2007). Chronic obstructive pulmonary disease: histopathology, inflammation and potential therapies. *Pulm Pharmacol Ther.*, **20**(5):462-72.

- MURRAY, P. J. (2005). NOD proteins: an intracellular pathogen-recognition system or signal transduction modifiers? *Curr Opin Immunol.*, **17(4)**: 352-8.
- NADERI, N., FARNOOD, A., HABIBI, M., ZOJAJI, H., BALAI, H., FIROUZI, F., CHIANI, M., DERAKHSHAN, F., TAHAMI, A., AGHAZADEH, R., DARYANI, N.E., ZALI, M.R. (2011). NOD2 exonic variations in Iranian Crohn's disease patients. *Int J Colorectal Dis.* **26(6)**:775-81.
- NAGY, Z., KARÁDI, O., RUMI, G., RUMI, G JR., PÁR, A., MÓZSIK, G., CZIRJÁK, L., SÜTO, G. (2005). Crohn's disease is associated with polymorphism of CARD15/NOD2 gene in a Hungarian population. *Ann N Y Acad Sci.* **1051**:45-51.
- OGURA, Y., BONEN, D. K., INOHARA, N., NÍCOLAE, D. L., CHEN, F. F., RAMOS, R., BRÍTTON, H., MORAN, T., KARALIÚSKAS, R., DUERR, R. H., ACHKAR, J.-P., BRANT, S. R., BAYLESS, T. M., KÍRSCHNER, B. S., HANAUER, S. B., NUNEZ, G., CHO, J. (2001). H. A frameshift mutation in Nod2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**: 603-606.
- OGURA, Y., INOHARA, N., BENITO, A., CHEN, F.F., YAMAOKA, S., NUNEZ, G. (2001). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *The Journal of biological chemistry*, **276**: 4812–4818.
- OKAFUJI, I., NISHIKOMORI, R., KANAZAWA, N., KAMBE, N., FUJISAWA, A., YAMAZAKI, S., SAITO, M., YOSHIOKA, T., KAWAI, T., SAKAI, H., TANIZAKI, H., HEIKE, T., MIYACHI, Y., NAKAHATA, T. (2009). Role of the NOD2 genotype in the clinical phenotype of Blau syndrome and early-onset sarcoidosis. *Arthritis and rheumatism.* **60**:242–250.
- OROCZO-LEVI, M., GARCIA –AYMERICH, J., VILLAR, J., RAMIREZ- SARMIENTO, A., ANTO, J.M., GEA, J. (2006). Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.*, **27**:542-6.
- OSPELT, C., BRENTANO, F., JÜNGEL, A., RENGEL, Y., KOLLÍNG, C., MÍCHEL, B.A., GAY, R.E., GAY, S. (2009). Expression, regulation, and signaling of the pattern-recognition receptor nucleotide-binding oligomerization domain 2 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.*, **60(2)**:355-63.
- OZEN, S.C., DAGLI, U., KİLİÇ, M.Y., TÖRÜNER, M., CELİK, Y., OZKAN, M., SOYKAN, I., CETINKAYA, H., ULKER, A., OZDEN, A., BOZDAYI, A.M. (2006). NOD2/CARD15, NOD1/CARD4, and ICAM-1 gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* **41(4)**:304-10.
- PABST, S., YENİCE, V., LENNARZ, M., TULETA, I., NÍCKENİG, G., GÍLLISSEN, A., GROHÉ, C. (2009). Toll-like receptor 2 gene polymorphisms Arg677Trp and Arg753Gln in chronic obstructive pulmonary disease. *Lung*, **187(3)**:173-8.

- PARKER, C.M., VODUC, N., AARON, S.D., WEBB, K.A., O'DONNELL, D.E. (2005). Physiological changes during symptom recovery from moderate exacerbations of COPD. *Eur Respir J.*, **26**:420-8.
- PATEL, B.D., COXSON, H.O., PILLAI, S.G., AGUSTÍ, A.G., CALVERLEY, P.M., DONNER, C.F., MAKE, B.J., MÜLLER, N.L., RENNARD, S.I., VESTBO, J., WOUTERS, E.F., HJØRNS, M.P., NAKANO, Y., CAMP, P.G., NASUTE, FAUERBACH, P.V., SCREATON, N.J., CAMPBELL, E.J., ANDERSON, W.H., PARÉ, P.D., LEVY, R.D., LAKE, S.L., SILVERMAN, E.K., LOMAS, D.A. (2008). Airway wall thickening and emphysema show independent familial aggregation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* **178**(5): 500-5.
- PAULEAU, A.L., MURRAY, P.J. (2003). Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists. *Molecular and cellular biology.* 2003; 23:7531–7539.
- PETRILLI, V., DOSTERT, C., MURUVE, D. A., TSCHOPP, J. (2007). The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol*, **19**(6):615-622.
- PHILPOTT, D.J., SORBARA, M.T., ROBERTSON, S.J., CROITORU, K., GIRARDIN, S.E. (2014). NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol.*, **14**(1): 9-23.
- PILLAI, S.G., GE, D., ZHU, G., KONG, X., SHIANNAN, K.V., NEED, A., FENG, S., HERSH, C.P., BAKKE, P., GULSVIK, A., RUPPERT, A., LODRUP CARLSEN, K.C., ROSES, A. (2009). A genome-wide association study in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of two major susceptibility loci. *PLoS Genet.*, **5**: e000421.
- PINGOUD, A., JELTSCH, A. (2001). Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.* **29**(18):3705-27.
- PRESCOTT, E., LANGE, P., VESTBO, J. (1999). Socioeconomic status, lung function and admission to hospital for COPD: results from the Copenhagen City Heart Study. *Eur Respir J.*, **13**:1109-14.
- PROELL, M., RIEDL, S. J., FRITZ, J. H., ROJAS, A. M., SCHWARZENBACHER, R. (2008). The Nodlike receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences. *PLoS One*, **3**(4): e2119.
- RAAD, D., GADDAM, S., SCHUNEMANN, H.J., IRANI, J., ABOU JAOUDE, P., HONEINE, R., AKL, E.A. (2011). Effects of water-pipe smoking on lung function: a systematic review and meta-analysis. *Chest*, **139**:764-74.
- RAHMAN, I. (2005). Oxidative stress in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: cellular and molecular mechanisms. *Cell Biochem Biophys.*, **43**:167-88.

- REPAPÍ, E., SAYERS, I., WAÏN, L.V., BURTON, P.R., JOHNSON, T., OBEÏDAT, M., ZHAO, J.H., RAMASAMY, A., ZHAÏ, G.J., VÏTART, V., HUFFMAN, J.E., IGL, W., ALBRECHT, E., DELOUKAS, P., HENDERSON, J., GRANELL, R., MCARDLE, W.L., RUDNÏCKA, A.R., BARROSO, I., LOOS, R.J.F., WAREHAM, N.J., MUSTELÏN, L., RANTANEN, T., SURAKKA, I., IMBODEN, M., WÏCHMANN, H.E., GRKOVÏC, I., JANKOVÏC, S., ZGAGA, L., HARTIKAINEN, A.L., PELTONEN, L., GYLLENSTEN, U., JOHANSSON, A., ZABOLÏ, G., CAMPBELL, H., WÏLD, S.H., WÏLSON, J.F., GLASER, S., HOMUTH, G., VOLZKE, H., MANGÏNO, M., SORANZO, N., SPECTOR, T.D., POLASEK, O., RUDAN, I., WRIGHT, A.F., HELÏOVAARA, M., RÏPATTÏ, S., POUTA, A., NALUAÏ, A.T., OLÏN, A.C., TOREN, K., COOPER, M.N., JAMES, A.L., PALMER, L.J., HÏNGORANÏ, A.D., WANNAMETHEE, S.G., WHÏNCUP, P.H., SMÏTH, G.D., EBRAHÏM, S., MCKEEVER, T.M., PAVORD, I.D., MACLEOD, A.K., MORRÏS, A.D., PORTEOUS, D.J., COOPER, C., DENNÏSON, E., SHAHEEN, S., KARRASCH, S., SCHNABEL, E., SCHULZ, H., GRALLERT, H., BOUATÏA-NAJÏ, N., DELPLANQUE, J., FROGUEL, P., BLAKEY, J.D., BRÏTTON, J.R., MORRÏS, R.W., HOLLOWAY, J.W., LAWLOR, D.A., HUÏ, J., NYBERG, F., JARVELÏN, M.R., JACKSON, C., KAHONEN, M., KAPRÏO, J., PROBST-HENSCH, N.M., KOCH, B., HAYWARD, C., EVANS, D.M., ELLÏOTT, P., STRACHAN, D.P., HALL, I.P., TOBÏN, M.D. (2010). Genome-wide association study identifies five loci associated with lung function. *Nat Genet.*, **42**: 36-44.
- RIGOLI, L., ROMANO, C., CARUSO, R.A., LO PRESTI, M.A., DI BELLA, C., PROCOPIO, V., LO GIUDICE, G., AMORINI, M., COSTANTINO, G., SERGI, M.D., CUPPARI, C., CALABRO, G.E., GALLIZZI, R., SALPIETRO, C.D., FRIES, W. (2008). Clinical significance of NOD2/CARD15 and Toll-like receptor 4 gene single nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* **14(28)**:4454-61.
- RIJCKEN, B., SCHOUTEN, J.P., WEISS, S.T., SPEIZER, F.E., VAN DER LENDE, R. (1987). The relationship of nonspecific bronchial responsiveness to respiratory symptoms in a random population sample. *Am Rev Respir Dis.*, **136**:62-8.
- ROBERTS, R.L., TOPLESS, R.K., PHÏPPS-GREEN, A.J., GEARRY, R.B., BARCLAY, M.L., MERRIMAN, T.R. (2010). Evidence of interaction of CARD8 rs2043211 with NALP3 rs35829419 in Crohn's disease. *Genes Immun.* **11(4)**:351-6.
- RODRIGO, L., MARTÏNEZ-BORRA, J., GARROTE, J.A., NIÑO, P., LEÓN, A.J., RIESTRA, V., BERNARDO, D., BARREIRO, M., ARRANZ, E. (2007). CARD15 mutations are poorly related to Crohn's disease phenotypes in Asturias. *Rev Esp Enferm Dig.* **99(10)**:570-757.
- ROHDE, G., KLEÏN, W., ARÏNÏR, U., HAGEDORN, M., DUERÏG, N., T BAUER, T., GÏLLÏSSEN, A., SCHULTZE-WERNÏNGHAUS, G., T EPPLER, J. (2006). Association of the ASP299GLY TLR4 polymorphism with COPD. *Respir Med.*, **100(5)**:892-6.

- ROSE, C.D., DOYLE, T.M., MCILVAIN-SIMPSON, G., COFFMAN, J.E., ROSENBAUM, J.T., DAVEY, M.P., MARTIN, T.M. (2005). Blau syndrome mutation of CARD15/NOD2 in sporadic early onset granulomatous arthritis. *The Journal of rheumatology*, **32**:373–375.
- ROSENSTIEL, P., HUSE, K., FRANKE, A., HAMPE, J., REICHWALD, K., PLATZER, C., ROBERTS, R.G., MATHEW, C.G., PLATZER, M., SCHREIBER, S. (2007). Functional characterization of two novel 5' untranslated exons reveals a complex regulation of NOD2 protein expression. *BMC Genomics*, **(8)**: 472.
- ROSENSTIEL, P., HUSE, K., TILL, A., HAMPE, J., HELLMIG, S., SINA, C., BILLMANN, S., VON KAMPEN, O., WAETZIG, G.H., PLATZER, M., SEEGER, D., SCHREIBER, S. (2006). A short isoform of NOD2/CARD15, NOD2-S, is an endogenous inhibitor of NOD2/receptor-interacting protein kinase 2-induced signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103(9)**:3280-5.
- ROVINA, N., KOUTSOUKOU, A., KOULOURIS, N.G. (2013). Inflammation and immune response in COPD: where do we stand? *Mediators Inflamm*. **2013**:413735.
- SABBAH A, CHANG TH, HARNACK R, FROHLICH V, TOMINAGA K, DUBE PH, XIANG Y, BOSE S (2009). Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat Immunol*. **10(10)**:1073-80
- SCHIRNHOFER, L., LAMPRECHT, B., VOLLMER, W.M., ALLISON, M.J., STUDNICKA, M., JENSEN, R.L., BUIST, A.S. (2007). Results from the Burden of Obstructive Lung Disease (BOLD) Study. *Chest*, **131**:29-36.
- SETHI, S., MAHLER, D.A., MARCUS, P., OWEN, C.A., YAWN, B., RENNARD, S. (2012). Inflammation in COPD: implications for management. *Am J Med*, **125(12)**:1162-70.
- SILVA, G.E., SHERRILL, D.L., GUERRA,S., BARBEE, R.A. (2004). Asthma as a risk factor for COPD in a longitudinal study. *Chest*, **126**:59-65.
- SILVERMAN, E.K., CHAPMAN, H.A., DRAZEN, J.M., WEISS, S.T., ROSNER, B., CAMPBELL, E.J., O'DONNELL, W.J., REILLY, J.J., GINNS, L., MENTZER, S., WAİN, J., SPEIZER, F.E. (1998). Genetic epidemiology of severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. Risk to relatives for airflow obstruction and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. **157(6 Pt 1)**:1770-8.
- SILVERMAN, E.K., WEISS, S.T., DRAZEN, J.M., CHAPMAN, H.A., CAREY, V., CAMPBELL, E.J., DENISH, P., SILVERMAN, R.A., CELEDON, J.C., REILLY, J.J., GINNS, L.C., SPEIZER, F.E. (2000). Gender related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, **162**:2152-8.

- SORHEIM, I.C., JOHANNESSEN, A., GULSVIK, A., BAKKE, P.S., SILVERMAN, E.K., DEMEO, D.L. (2010). Gender differences in COPD: are women more susceptible to smoking effects than men? *Thorax*, **65**:480-5.
- SORROCHE, P.B., FERNÁNDEZ ACQUIER, M., LÓPEZ JOVE, O., GIUGNO, E., PACE, S., LÍVELLARA, B., LEGAL, S., OYHAMBURU, J., SAEZ, M.S. (2015). Alpha-1 Antitrypsin Deficiency in COPD Patients: A Cross-Sectional Study. *Arch Bronconeumol*. doi: 10.1016/j.arbres.2015.01.008.
- SPELETAS, M., MERENTITÍ, V., KOSTIKAS, K., LIADAKÍ, K., MÍNAS, M., GOURGOULIANÍS, K., GERMENÍS, A.E. (2009). Association of TLR4-T399I polymorphism with chronic obstructive pulmonary disease in smokers. *Clin Dev Immunol.*, **2009**:260286.
- STERN, D.A., MORGAN, W.J., WRIGHT, A.L., GUERRA, S., MARTINEZ, F.D. (2007). Poor airway function in early infancy and lung function by age 22 years: a non-selective longitudinal cohort study. *Lancet*, **370**:758-64.
- STOLLER, J.K., ABOUSSOUAN, L.S. (2012). A review of α 1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.*, **185**: 246-59.
- STRONATI, L., NEGRONI, A., MEROLA, P., PANNONE, V., BORRELLI, O., CIRULLI, M., ANNESE, V., CUCCHIARA, S. (2008). Mucosal NOD2 expression and NF-kappaB activation in pediatric Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. **14**:295–302.
- SVANES, C., SUNYER, J., PLANA, E. (2010). Early life origins of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, **65**:14-20.
- TAGER, I.B., NGO, L., HANRAHAN, J.P. (1995). Maternal smoking during pregnancy. Effects on lung function during the first 18 months of life. *Am J Respir Crit Care Med.*, **152**:977- 83.
- TAN, W.C., LO, C., JONG, A., XING, L., FITZGERALD, M.J., VOLLMER, W.M., BUÍST, S.A., SÍN, D.D. (2009). Marijuana and chronic obstructive lung disease: a population-based study. *CMAJ*, **180**:814-20
- TASHKIN, D.P., ALTOSE, M.D., CONNETT, J.E., KANNER, R.E., LEE, W.W., WISE, R.A. (1996). Methacholine reactivity predicts changes in lung function over time in smokers with early chronic obstructive pulmonary disease. The Lung Health Study Research Group. *Am J Respir Crit Care Med.*, **153**:1802-11.
- TATTOLI, I., TRAVASSOS, L. H., CARNEIRO, L. A., MAGALHAES, J. G., GIRARDIN, S. E. (2007). The Nodosome: Nod1 and Nod2 control bacterial infections and inflammation. *Semin Immunopathol.*, **29**(3):289-301.

- TEKİN, D., DALGİC, N., KAYAALTI, Z., SOYLEMEZOGLU, T., DİLER, B., KUTLUBAY, B.I. (2012). Importance of NOD2/CARD15 gene variants for susceptibility to and outcome of sepsis in Turkish children. *Pediatr Crit Care Med.* **13(2)**:e73-7.
- TETRAULT, J.M., CROTHERS, K., MOORE, B.A., MEHRA, R., CONCATO, J., FIELLIN, D.A.(2007). Effects of marijuana smoking on pulmonary function and respiratory complications: a systematic review. *Arch Intern Med.*, **167**:221-8.
- TİGNO-ARANJUEZ, J.T., ABBOTT, D.W. (2012). Ubiquitination and phosphorylation in the regulation of NOD2 signaling and NOD2-mediated disease. *Biochim Biophys Acta.* **1823(11)**: 2022-8.
- TODİSCO, T., DE BENEDİCTİS, F.M., IANNACCI, L., BAGLİONİ, S., ESLAMİ, A., TODİSCO, E., DOTTORİNİ, M. (1993). Mild prematurity and respiratory functions. *Eur J Pediatr.*, **152**:55-8.
- TORRES-DUQUE, C., MALDONADO, D., PEREZ-PADILLA, R., EZZATI, M., VIEGLI, G. (2008). Biomass fuels and respiratory diseases: a review of the evidence. *Proc Am Thorac Soc.*, **5**:577-90.
- TRAVASSOS, L.H., CARNEIRO, L.A., RAMJEET, M., HUSSEY, S., KIM, Y.G., MAGALHAES, J.G., YUAN, L., SOARES, F., CHEA, E., LE BOURHIS, L., BONECA, I.G., ALLAOUİ, A., JONES, N.L., NUNEZ, G., GIRARDIN, S.E., PHILPOTT, D.J. (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nature immunology*, **11**:55–62.
- TRUPİN, L., EARNEST, G., SAN PEDRO, M., BALMES, J.R., EİSNER, M.D., YELİN, E., KATZ, P.P., BLANC, P.D. (2003). The occupational burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.*, **22**:462-9.
- UMUT, S., ERDİNÇ, E. (2008). Tanımdan Tedaviye Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı.Toraks Kitabı. Sayı 6. Galenos Yayıncılık. İstanbul.
- UYAR, F.A., OVER-HAMZAOĞLU, H., TÜRE, F., GÜL, A., TÖZÜN, N., SARUHAN-DİRESKENELİ, G. (2006). Distribution of common CARD15 variants in patients with sporadic Crohn's disease: cases from Turkey. *Dig Dis Sci.* **51(4)**:706-10.
- VAN DEN BOOM, G., VAN SCHAYCK, C.P., VAN MÖLKEN, M.P.M.H.R., TIRIMANNA, P.R. S., DEN OTTER, J.J., VAN GRUNSVEN, P.M., BUITENDIJK, M.J., VAN HERWAARDEN, C.L.A., VAN WEEL, C. (1998). Active detection of chronic obstructive pulmonary disease and asthma in the general population. Results and economic consequences of the DIMCA program. *Am J Respir Crit Care Med.*, **158**:1730-8.
- VESTBO, J., PRESCOTT, E., LANGE, P., GROUP AT CCHS. (1996). Association between chronic mucus hypersecretion with FEV1 decline and COPD morbidity *Am J Respir Crit Care Med.*, **153**:1530-5

- VIJAYAN, V.K. (2013). Chronic obstructive pulmonary disease. *Indian J Med Res.*, **137(2)**: 251-269.
- WANG, C., DENG, L., HONG, M., AKKARAJU, G.R., INOUE, J., CHEN, Z.J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*. **412**:346–351.
- WEIDINGER, S., KLOPP, N., RUMMLER, L., WAGENPFEIL, S., BAURECHT, H.J., GAUGER, A., DARSOW, U., JAKOB, T., NOVAK, N., SCHAFER, T., HEINRICH, J., BEHRENDT, H., WICHMANN, H.E., RING, J., ILLIG, T. (2005). Association of CARD15 polymorphisms with atopy-related traits in a population-based cohort of Caucasian adults. *Clin Exp Allergy*, **35(7)**:866-72.
- WEISS, B., SHAMIR, R., BUJANOVER, Y., WATERMAN, M., HARTMAN, C., FRADKIN, A., BERKOWITZ, D., WEINTRAUB, I., ELIAKIM, R., KARBAN, A. (2004). NOD2/CARD15 mutation analysis and genotype-phenotype correlation in Jewish pediatric patients compared with adults with Crohn's disease. *J Pediatr*. **145(2)**:208-12.
- WEX, T., EBERT, M.P., KROPF, S., DIERKES, J., SCHÜTTLER, K., RÖCKEN, C., HÖCKER, M., MALFERTHEINER, P. (2008). Gene polymorphisms of the NOD-2/CARD-15 gene and the risk of gastric cancer in Germany. *Anticancer Res*. **28(2A)**:757-62.
- XU, F., YIN, X., SHEN, H., XU, Y., WARE, R.S., OWEN, N. (2007). Better understanding the influence of cigarette smoking and indoor air pollution on chronic obstructive pulmonary disease: a case-control study in Mainland China. *Respirology*. **12(6)**:891-7.
- YAMAZAKI, K., TAKAZOE, M., TANAKA, T., ICHIMORI, T., NAKAMURA, Y. (2002). Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *J. Hum. Genet.* **47**: 469-472, 2002.
- YANG, Y., YIN, C., PANDEY, A., ABBOTT, D., SASSETTI, C., KELLIHER, M.A. (2007). NOD2 pathway activation by MDP or Mycobacterium tuberculosis infection involves the stable polyubiquitination of Rip2. *The Journal of biological chemistry*, **282**:36223–36229.
- YAO, Q. (2013). Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2: structure, function, and diseases. *Semin Arthritis Rheum.*, **43(1)**:125-30.
- YAO, Q., PILIANG, M., NICOLACAKIS, K., ARROSSI, A. (2012a). Granulomatous pneumonitis associated with adult-onset Blau-like syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.*, **186(5)**:465–6.
- YAO, Q., SU, L.C., TOMECKI, K.J., ZHOU, L., JAYAKAR, B., SHEN, B. (2012b). Dermatitis as a characteristic phenotype of a new autoinflammatory disease associated with NOD2 mutations. *J Am Acad Dermatol*. **68(4)**:624-31.

YAO, Q., ZHOU, L., CUSUMANO, P., BOSE, N., PILIANG, M., JAYAKAR, B., SU, L.C., SHEN, B. (2011). A new category of autoinflammatory disease associated with NOD2 gene mutations. *Arthritis Res Ther.*, **13(5)**:R148.

ZHONG, Y., KINIO, A., SALEH, M. (2013). Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front Immunol.*, **16(4)**: 333.

ZWAR, N.A., MARKS, G.B., HERMÍZ, O., MIDDLETON, S., COMÍNO, E.J., HASAN, I., VAGHOLKAR, S., WILSON, S.F. (2011). Predictors of accuracy of diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease in general practice. *Med J.*, **195(4)**:168-71.

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fadime MUTLU İÇDUYGU

Öğrenim Durumu:

| Derece | Bölüm/Program | Üniversite | Yıl |
|-----------|---------------------|-----------------------------|------|
| Lisans | Biyoloji | İnönü Üniversitesi | 2002 |
| Y. Lisans | Tıbbi Genetik (TIP) | Afyon Kocatepe Üniversitesi | 2009 |
| Doktora | Tıbbi Genetik (TIP) | Afyon Kocatepe Üniversitesi | 2015 |

Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı:

“Meme Kanserli Hastalarda MDR1 geni C3435T, T1236C,G2677T ve A2956G Polimorfizmlerinin Arastirilmesi”

Danışman: Doç. Dr. Hale ŞAMLI

Doktora Tez Başlığı ve Tez Danışmanı:

“Nükleotid bağlanma ve oligomerizasyon domeyn 2 (NOD2) gen varyantlarının kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) gelişimi ve hastalığın şiddeti üzerine etkisinin araştırılması.”

Danışman: Doç. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN

Yabancı Dili: İngilizce

ÜDS Sağlık Bilimleri: 83,75 (Mart 2007)

Projelerde Yaptığı Görevler:

1. İnmemiş testis tanısı konmuş çocukların Y-kromozom mikrolelesyonu, MTHFR gen polimorfizmleri ve kromozom düzensizlikleri açısından değerlendirilmesi, AKÜ Bilimsel Araştırma Fonu Projesi,08.TIP.15 **Yardımcı Araştırmacı**, 2008.
2. Visfatin geni polimorfizmlerinin diabetik nefropati ile ilişkisinin araştırılması, AKÜ Bilimsel Araştırma Fonu Projesi, 08.TIP.26, **Yardımcı Araştırmacı** 2008.
3. Meme Kanseri Hastalarda MDR1 geni C3435T, T1236C, G2677T ve A2956G Polimorfizmlerinin Arastirilmesi AKÜ Bilimsel Araştırma Fonu Projesi, 08.TIP.13, **Yardımcı Araştırmacı**, 2008.
4. Yaşa Bağlı Maküler Dejenerasyon Hastalığında Complement Factor H(Y402H) ve rs1410966, LOC387715/HTRA1 ve rs11200638, Complement component 3 (r102g),Varyantlarının İlişkilendirme Çalışması **Yardımcı Araştırmacı** 2010.
5. NOD2 (Nükleotid bağlanma ve oligomerizasyon domeyn 2) gen varyantlarının kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) gelişimi ve hastalığın şiddeti üzerine etkisinin araştırılması. **Yardımcı Araştırmacı** 2013.

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

1. Tıbbi Genetik Derneği
2. Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Derneği
3. Biyologlar Derneği

ESERLER**A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :**

A1. Samli H, **İçduygu FM**, Özgöz A, Akbulut G, Hekimler K, İmirzalioglu N. Surgery for acute abdomen and MEFV mutations in patients with FMF. Acta Reumatol Port. 34(3):520-4, (2009) . (*SCI EXPANDED, ISSN:0303-464X*)

A2. Soysal Y., Balci S., Hekimler K., Liehr T., Ewers E., Schoumans J., Bui T. H., **İçduygu F. M.**, Kosyakova N., İmirzalioglu N. Characterization of Double Ring Chromosome 4 Mosaicism Associated With Bilateral Hip Dislocation, Cortical Dysgenesis, and Epilepsy. Am J Med Genet Part A 149A:2782–2787 (2009) (*SCI, ISSN:*)

A3. S. Demir, A. Özgöz, **FM İçduygu**, K Hekimler, T Köken, N İmirzalioglu. Visfatin polymorphism may increase tendency to diabetic nephropathy. Nephrology Reviews. Vol 4, No 1, 2012. (DOI: 10.4081/nr.2012.e4) (*eISSN: 2035-813X*)

A4. Hekimler Öztürk K, Özgöz A, **Mutlu İçduygu F**, Soysal Y, Yılmaz Küsbeci Ö, İmirzalioglu N. “Prothrombotic gene polymorphisms in young patients with cerebrovascular accident.” Journal of Clinical and Analytical Medicine. Epub:21.05.2012 doi: 10.4328/JCAM.1024.

A5. Özgöz A, Samli H, Öztürk KH, Orhan B, **İçduygu FM**, Aktepe F, İmirzalioglu N. An investigation of the effects of FGFR2 and B7-H4 polymorphisms in breast cancer. J Can Res Ther. [Epub ahead of print] [cited 2013 Jul 15]. (*SCI EXPANDED*)

A6. H Samli, Ozgoz A., **Mutlu İçduygu F.**, Hekimler K., Sivaci Y., İmirzalioglu N. Mosaic ring chromosome 18 case. Journal of Pediatric Genetics. 2013

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler :

B1. Mutlu İçduygu F., Şamli H., Hekimler K., Özgöz A., Sivaci Y., İmirzalıoğlu N..
“Evaluation of a case with 5p deletion syndrome“ European Journal of Human Genetics Conference, Poster No: P03.160, 23 - 26 May, Vienna, Austria, 2009.

B2. Şamli H., Özgöz A, Mutlu İçduygu F., Hekimler K., İmirzalıoğlu N., Sivaci Y..
“A Case with Mosaic Ring Chromosome 18“ European Journal of Human Genetics Conference, Poster No: P03.112, 23 - 26 May, Vienna, Austria, 2009.

B3. Samli H., Mutlu İcduygu F., Ozgoz A., Akbulut G., Hekimler K., İmirzalıoğlu N.
“Acute Abdomen Reasoned Surgery Frequency and MEFV Mutations in the Patients with FMF“ European Journal of Human Genetics Conference, Poster No: P13.14, 23 - 26 May, Vienna, Austria, 2009.

B4. A. Özgöz, H. Şamli, K. Hekimler, B. Orhan, F. Mutlu İçduygu, F. Aktepe, N. İmirzalıoğlu.
“Investigating FGFR2 and B7-H4 gene polymorphisms and their effects in breast cancer.” European Journal of Human Genetics Conference, Poster No: P06.038 28 – 31 May, Amsterdam, The Netherlands, 2011.

B5. S. Demir, A. Özgöz, FM İçduygu, K Hekimler, T Köken, N İmirzalıoğlu.
“Investigation of the relationship between visfatin gene polymorphism and diabetic nephropathy.” European Journal of Human Genetics Conference, Poster No: P09.234 28 – 31 May, Amsterdam, The Netherlands, 2011.

B6. F. Mutlu İçduygu, H. Şamli, T. Evrensel, A. Özgöz, K. Hekimler, M. Canhoroz, N. İmirzalıoğlu.
“The influence of MDR1 gene C3435T, T1236C, G2677T/A, A2956G polymorphisms on breast cancer development risk.” European Journal of Human Genetics Conference, Poster No: P06.039 28 – 31 May, Amsterdam, The Netherlands, 2011.

B7. Hekimler K, Ozgoz A, **Mutlu Icduygu F**, Cetinkursun S, Narci A, Akin E, Imirzalioglu N. "Y chromosome microdeletion analysis, thromborisk factors and cytogenetic analysis in patients with undescended testis." 4th İnternational Congress of Molecular Medicine 27-30 June, İstanbul, 2011.

B8. Cetisli A, Kulaç M, **Mutlu Icduygu F**, Ozgoz A, Hekimler K, Imirzalioglu N "Evaluating MEFV gene mutations in patients with Behcet's Disease." 4th İnternational Congress of Molecular Medicine 27-30 June, İstanbul, 2011.

B9. Asuman Özgöz, Hale Şamlı, Ayşegül Bacaksız, Kuyaş Hekimler Öztürk, **Fadime Mutlu İcduygu**, Necat İmirzalıoğlu. "FGFR2 gene in breast cancer." International Science and Technology Conference (ISTEC 2013), 25-28 June, Rome, Italy, 2013.

B10. Soysal Y, İnan ÜU, **İcduygu FM**, Akıllı A, İmirzalıoğlu N. "Age related macular degeneration and association of CFH Y402H, rs1410966, LOC387715 A69S, rs11200638 and complement component 3 (R102G) polymorphisms in Turkish population. " European Society of Human Genetics Conference. European Journal of Human Genetics Volume 21 Supplement 2. No: P03.18 page: 123, Paris, France, 8-11 Haziran 2013.

C. Yazılan uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler :

D. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

D1. Y. Soysal, N Sensoy, **FM Icduygu**, DB Embleton, N Imirzalioglu. "Turner Sendromlu Hastaya 1. Basamakta Yaklasim ve Olgu Sunumu" Klinik Tip Aile Hekimligi 2 (5): 10-15 (2010)

E. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

E1. F. Mutlu İçduygu, H. Şamlı, K. Hekimler, A. Özgöz, Y. Sıvacı, N. İmirzalıoğlu. “5p Delesyon Sendromu Olan Bir Olgunun Değerlendirilmesi.” VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. Poster No:PS-178, 06-09 Mayıs 2008, Çanakkale.

E2. H. Şamlı, A. Özgöz, F. Mutlu İçduygu, K. Hekimler, Y. Sıvacı, N. İmirzalıoğlu. “Mozaik Ring 18 Olan Bir Olgunun Değerlendirilmesi.” VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. Poster No:PS-193, 06-09 Mayıs 2008, Çanakkale.

E3. A. Özgöz, H. Şamlı, F. Mutlu İçduygu, K.Hekimler, N. İmirzalıoğlu. “45,XX,t(13q14q) Karyotipi Olan Bir Olgunun Değerlendirilmesi.” VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. Poster No:PS-151, 06-09 Mayıs 2008, Çanakkale.

E4. A. Cetişli, M. Kulaç, F. Mutlu İçduygu, A. Özgöz, K. Hekimler, N. İmirzalıoğlu. “Behçet Hastalarında MEFV Geni Mutasyon Frekansının Değerlendirilmesi.” XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. 28-31 Ekim 2009, Bodrum.

E5. S. Demir, A. Özgöz, FM İçduygu, K Hekimler, T Köken, N İmirzalıoğlu. “Investigation of the relationship between visfatin gene polymorphism and diabetic nephropathy.” Clinical Genetics 2010; 78 (Suppl. 1): 112-133. 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. Poster No:X50, 01-05 Aralık 2010, İstanbul.

E6. Y. Soysal, N Sensoy, FM İcduygu, DB Embleton, N İmirzalıoğlu. ‘Turner Syndrome: Approach to the patient in primary care and case report.’ Clinical Genetics 2010; 78 (Suppl. 1): 49-51. 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. Poster No:F08, 01-05 Aralık 2010, İstanbul.

E7. S. Çetinkurşun, K. Hekimler, A. Narcı, A Özgöz, EÖ Boyacı, FM İçduygu, AA Tuncer, N, İmirzalıoğlu. “İnmemiş Testisli Olgularda Y Delesyonu ve Trombofili Panelinin Prognostik Önemi” Poster No: SBÜ43. 29. Ulusal Çocuk Cerrahisi

Kongresi.16-19.MAYIS.2011,İstanbul, Çocuk Cerrahisi Dergisi, Kongre Özel Sayısı, Cilt 25, Ek Sayı, 2011.

E8. Asuman Özgöz, Hale Şamlı, Kuyaş Hekimler, Bülent Orhan, Fadime Mutlu İçduygu, Fatma Aktepe, Necat İmirzalıoğlu. "Meme kanserinde FGFR2 ve B7-H4 geni polimorfizmlerinin ve etkilerinin araştırılması - Investigating FGFR2 and B7-H4 gene polymorphisms and their effects in breast cancer" Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011;31 (Suppl) S92. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. 27-30 Ekim 2011, Antalya.

E9. Fadime Mutlu İçduygu, Hale Şamlı, Türkkın Evrensel, Asuman Özgöz, Kuyaş Hekimler, Mustafa Canhoroz, Necat İmirzalıoğlu. "MDR1 geni C3435T, T1236C, G2677T/A, A2956G polimorfizmlerinin meme kanseri gelişim riski üzerine etkisi - The influence of MDR1 gene C3435T, T1236C, G2677T/A, A2956G polymorphisms on breast cancer development risk" Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011;31 (Suppl) S94. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27-30 Ekim 2011, Antalya.

E10. K. Hekimler, A. Özgöz, F. Mutlu İcduygu, Ö. Kusbeci, Y. Soysal, N. İmirzalıoğlu. "Serebrovasküler Olay Geçiren Genç Hastalarda Protrombotik Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması." Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011;31 (Suppl) S241. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. 27-30 Ekim, 2011.

E11. Yasemin Soysal, Umit Ubeyt İnan, Fadime Mutlu İcduygu, Aslı Akıllı, Necat İmirzalıoğlu. "Yaşa Bağlı Makuler Dejenerasyon Hastalığında Complement Factor H (Y402H), rs1410966, LO C387715/HTRA 1, rs11200638 ve Complement Component 3 (R102G) Varyantlarının İlişkilendirme Çalışması." 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. Poster No:0274, 19-23 Aralık 2012, Bursa.

E12. Fadime Mutlu İcduygu, Tarkan Kalkan, Yasemin Soysal, Ali Topak, Gulen Gul Koken. "Ensefalosel ve Bilateral Fibula Agenezi Bulunan 6p Delesyon Sendromlu

22 Haftalık Fetus: Olgu Sunumu.” 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. Poster No:0461, 19-23 Aralık 2012, Bursa.

E13. Fadime Mutlu İcduygu, Yasemin Soysal, Tarkan Kalkan, Mustafa Solak. “Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesinde Fetal Anomali Nedeniyle İnvaziv Prenatal Tanı Yöntemleri Uygulanan Olgularda Saptanan Karyotip Anomalileri: Retrospektif Analiz.” 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. Poster No:0463, 19-23 Aralık 2012, Bursa.

E14. Yasemin Soysal, Nazlı Şensoy, Fadime Mutlu İcduygu. “Diyabetik Ayak Sendromu ile Takip Edilen Tip 2 Diyabet Hastalarında Anjiotensin Donuşturucu Enzim (ACE), Paraoksonaz (PON1), Manganaz Superoksit Dismutaz (MnSOD), Endotelyal Nitrik Oksit Sentetaz (eNOS) Gen Polimorfizmleri İlişkilendirme Çalışması.” 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. Poster No:0443, 19-23 Aralık 2012, Bursa.

E15. Soysal Y, Çınar M, Şensoy N, Yılmaz S, , Şimşek İ, Erdem H, Pay S. 13. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi dahilinde “13. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi” bildiri kitapçığı, sayfa 383, Poster PS-09 06, “Programlı hücre ölümü (PDCD1) geni polimorfizmleri ve Ankilozan Spondilit arasındaki ilişkinin Türk hastalarında araştırılması” Kuşadası-Aydın, Türkiye, 27-30 Ekim 2013.

Katıldığı Kongre ve Kurslar

1. Ortadoğu Teknik Üniversitesi Yabancı Dil Sertifikası Programı (2005-2006)
2. II. Ege Genetik Sempozyumu, Afyonkarahisar, 24 Kasım, 2006 (Katilimci).
3. III. Ege Genetik Sempozyumu, Denizli, 1 Aralık 2007 (Katilimci).
4. VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. 06-09 Mayıs 2008, Çanakkale (Katilimci).
5. IV. Ege Genetik Sempozyumu, Kuşadası, 21 Kasım 2008 (Katilimci)
6. The University of Oklahoma Intensive English Program at the Center for English as a Second Language (2010)

Mesleki Deneyimler

1- Prenatal Tanı (Hücre ve Doku Kültürü)

- a. Amniotik mayii hücre kültürü ve kromozom analizi
- b. Kord kanı hücre kültürü ve kromozom analizi
- c. Tahliye materyali doku kültürü ve kromozom analizi
- d. Cilt biyopsi materyali doku kültürü ve kromozom analizi

2- Postnatal Tanı (Hücre ve Doku Kültürü)

- a. Lenfosit hücre kültürü ve kromozom analizi
- b. Tümör doku kültürü ve kromozom analizi

3- Moleküler Genetik

- a. PCR-RFLP
- b. Ters hibridizasyon yöntemi (strip metodu)
- c. RT-PCR