

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Tammam SİPAHI

**ASTIM HASTALARINDA SPINK5 GEN
POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Orhan ERKAN

Referans no: 465561

EDİRNE – 2013

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Tammam SİPAHİ

**ASTIM HASTALARINDA SPINK5 GEN
POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Orhan ERKAN

Destekleyen Kurum: TÜBAP – 2011 - 112

EDİRNE-2013

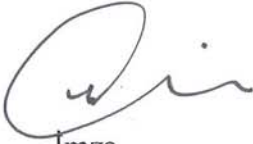
Tez No:

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Tammam SİPAHİ danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Orhan ERKAN tarafından tez başlığı “Astım Hastalarında SPINK5 Gen Polimorfizmlerinin Belirlenmesi” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 10/04/2013 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “Yüksek Lisans Tezi” olarak kabul edilmiştir.

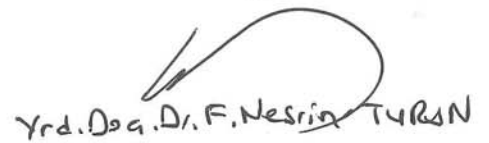
İmza
Unvanı Adı Soyadı
JÜRİ BAŞKANI

Doç. Dr. Tammam SİPAHİ



İmza
Unvanı Adı Soyadı
ÜYE

Doç. Dr. Tefrik GÜLYAZAR.



İmza
Unvanı Adı Soyadı
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

Doç. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŐEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinden tezimin bitim aŐamasına kadar bana kendileri ile çalışma olanağı sağlayan, bu çalıŐmamın gerçekleŐmesinde yardımlarını ve rehberliklerini esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Tammam SİPAHİ ve Prof. Dr. Celal KARLIKAYA'ya, bana daima yardımcı olan değerli hocalarım Prof. Dr. Seralp ŐENER ve Doç. Dr. Tefvik GÜLYAŞAR'a, Dr. Ayhan ÜNLÜ ve Doktora Öğrencisi Fulya YÜKÇÜ'ye, istatistik analizinde bana yardımcı olan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Nesrin TURAN ve Selçuk KORKMAZ'a her zaman her konuda yardımlarını benden esirgemeyen Biyofizik AD. bütün arkadaŐlarıma, projemizi destekleyen TÜBAP başkanlığına, manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen aileme sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	2
ASTIMIN TANIMI.....	2
ASTIMIN TARİHÇESİ.....	2
EPİDEMİYOLOJİ VE PREVALANS.....	3
PATOGENEZ.....	4
RİSK FAKTÖRLERİ.....	5
TANI VE SINIFLAMA.....	9
SPINK5 GEN POLİMORFİZMİ.....	12
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	13
BULGULAR.....	21
TARTIŞMA.....	27
SONUÇLAR.....	29
ÖZET.....	31
SUMMARY.....	32
KAYNAKLAR.....	33
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	38
ÖZGEÇMİŞ.....	39
EKLER.....	

SİMGE VE KISALTMALAR

bç	: Baz çifti
DNA	: Deoksi Ribonükleik Asit
dNTP	: Deoksi Nükleotid Trifosfat
DSÖ	:Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Etilen Diamnin Tetra Asetik Asit
FEV1	: Birinci saniye zorlu ekspiratuar volüm
FVC	: Zorlu vital kapasite
IgE	: İmmünglobulin E
Kb	: Kilobaz
OD	: Optik dansisite
PEF	: Peak expiratory flow
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
SPINK5	: Serin Proteaz İnhibitör (Kazal tip) 5
Th	: Tianhe
UV	: Ultraviyole

GİRİŞ VE AMAÇ

Astım Yunanca “soluksuzluk” veya “ağız açık solumak” sözlük anlamlarını taşır. Hava yollarının anatomik ve fonksiyonel özellikleri belirlenmeden çok önce farkedilerek bu adlandırma yapılmıştır. Astım; mast hücreleri, eozinofiller ve T-lenfositler başta olmak üzere değişik hücrelerin rol oynadığı havayollarının kronik inflamatuvar bir hastalığıdır. Astım sıklıkla bir alerjiye bağlı olmakla beraber (%60-80) alerji olmadan da olabilir (1). 1970’lerden beri astım prevalansı önemli ölçüde artmıştır. Astım ile ilgili Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) son açıklamalarına göre yeryüzünde ortalama 300 milyon bireyin astım hastası olduğu ve bunun çoğunluğunun 18 yaş altı çocuklar olduğu raporlanmıştır (2,3). Astım hastalığına yakalanan bireyler öksürük, hemen yorulma ve sürekli oluşan nefes darlığı gibi rahatsızlıklarla fark edilmektedir. Astımın oluşmasında çevresel nedenlerden başka kişilerin genetik yapıları da önemlidir. Anne babadan birinin astımlı olması durumunda çocukta astım görülme riski %20-30’a yükselmekte, anne ve babanın her ikisinin de astımlı olması durumunda bu risk % 60-70’e ulaşmaktadır. Astımın patogenezinde birçok gen rol oynamaktadır (4). Ayrıca kişilerin genetik yapılarındaki farklılıkların (polimorfizmler) da çevresel faktörler ile birleşerek bireylerde değişik sonuçlar doğurmasına yol açtığı gözlenmektedir. Bu polimorfizmler fizyolojik fonksiyonlara etki ederek bireyler arasında hastalıklara karşı değişik yatkınlık düzeyleri oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarla serin proteaz inhibitörü kazal-tip 5 enziminin (SPINK5) astım hastalığıyla ilişkili olduğunun belirlenmesiyle SPINK5 gen polimorfizimlerinin astım hastalığının oluşmasında ve gelişmesinde önemli rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

Bu çalışmada astımlı olduğu tespit edilmiş olan hastalarda SPINK5 geninin G-206A ve G-1258A gen polimorfizimlerinin astımlı olgulardaki etkisinin olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

ASTIMIN TANIMI

Astım; mast hücreleri, eozinofiller ve T-lenfositler gibi çok sayıda inflamatuvar hücrenin rol oynadığı hava yollarının kronik inflamatuvar bir hastalığıdır (1). Kronik enflamasyon, hava yollarında aşırı duyarlılığa neden olarak özellikle gece veya sabaha karşı gelişen, tekrarlayıcı özellik gösteren öksürük, nefes almada zorlanma, göğüste tıkanma hissi ve hırıltılı solunum atakları ile karşımıza çıkar (2,3). Bu ataklar yaygın olmakla birlikte kendiliğinden veya ilaçlar ile düzelen geri dönüşümlü değişken hava yolu obstrüksiyonu ile seyreder (4).

Astım 3 özelliği ile tanımlanır:

- i. Kronik havayolu inflomasyonu
- ii. Bronş hiperaktivitesi
- iii. Diffüz, reverzibl hava yolu obstrüksiyonu

ASTIMIN TARİHÇESİ

Hipokrat astımda hava giriş ve çıkışını engelleyen çeşitli maddelerden söz etmiştir. Yirminci yüzyılda solunum fizyolojisi bilimin gelişmesiyle astımda semptomlara neden olan temel fonksiyonel bozukluğun hava yollarının daralması olduğu anlaşılmıştır. Buna göre astımın tanımı “hava yollarının kendiliğinden veya tedavi sonucunda değişebilen, yaygın daralmasıdır” şeklinde belirtmiştir. Astım Eski Mısır ve yahudi yazıtlarında geniş olarak yer alan dünyanın bilinen en eski hastalıklarından biridir. Kelime anlamı eski Yunancada sıkıntılı solunum veya açık ağızla nefes alıp verme anlamına gelir ve asırlardır her türlü nefes darlığı astım olarak isimlendirilmiştir (5).

Astım tedavisi bitkilerden ve hayvan ürünlerinden elde edilen maddelerle ve bunların karışımı ile yapılmaya çalışılmıştır. Sümer, Mezapotamya ve Babil uygarlıklarında milattan 3000 yıl önce yaban yasemininden elde edilen atropine benzer bir maddenin astımın

tedavisinde kullanılan ilk ilaç olduğu bilinmektedir. Babiller milattan önce 630 yılında içinde 150 bitkinin tıbbi kullanımının tarif edildiği ilk botanik kitabı yazdılar. Eski Mısırda ise daha çok batıl inançlara ve büyülere dayalı bir tıp sistemi mevcuttu. Astım hakkında ilk ayrıntılı kitap 1968’de Floyer tarafından yazılmış olsa da kitaptaki tavsiyeler kendinden önceki 2000 yıllık tedavi şekline çok da farklı değildi. Astım için etkili ilaçların bulunması ancak 19 yy’ın ikinci yarısından sonra gerçekleşmiştir (5).

Astım insanoğlunun asırlar boyunca tedavi aradığı bir hastalık olmuştur. Elimizde şu anda çok etkili ilaçlar olmasına karşın hastanın tedavisini düzenli ve etkili şekilde uygulanamaması hekimlerin hastalara çoğu kez hastalıklarının özellikleri konusunda yeterince bilgi verememeleri gibi nedenlerle bu hastalıkların tıp dışında bilimsel olmayan yöntemlerden medet ummaları günümüzde de sürmektedir.

EPİDEMİYOLOJİ VE PREVALANS

Astım; 2012 yılındaki DSÖ’nün bilgilerine göre dünyada yaklaşık 300 milyon kişinin etkilendiği kronik bir hastalıktır (2,6). Elli altı ülke ve 155 merkezde gerçekleştirilen uluslararası çocukluk çağı astım ve alerji çalışması “The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)” sonuçlarına göre prevalans değerlerinin %1 ile %30.8 arasında değiştiği görülmüştür (7). Ülkemizde yapılan çalışmalarda, astım prevalansı çocuklarda % 0.7 ile %14.8 arasında (8,9), erişkinlerde ise %0.3 ile %7.6 arasında bildirilmiştir (10,11).

2003 yılı Ulusal Hastalık Yüğü ve Maliyet Etkinlik (UHY-ME) çalışmasına göre Türkiyede 18 yaş üzeri astım sıklığı %3.87 şeklinde verilmiştir. Cinsiyete göre astım sıklığı ise erkeklerde %3.11 kadınlarda %4.44’tür (12).

Türk Toraks Derneği desteğiyle hazırlanan 2004 yılında 14 şehir merkezi ve kırsalında yapılan “Prevalence and Risk Factors of Allergies in Turkey (PARFAIT)” çalışmasında astım prevalansı erişkin erkeklerde şehirde %6.2 kırsal kesimde %8.5, kadınlarda şehirde %7.5 ve kırsal kesimde %11.2 olarak bulunmuştur (13).

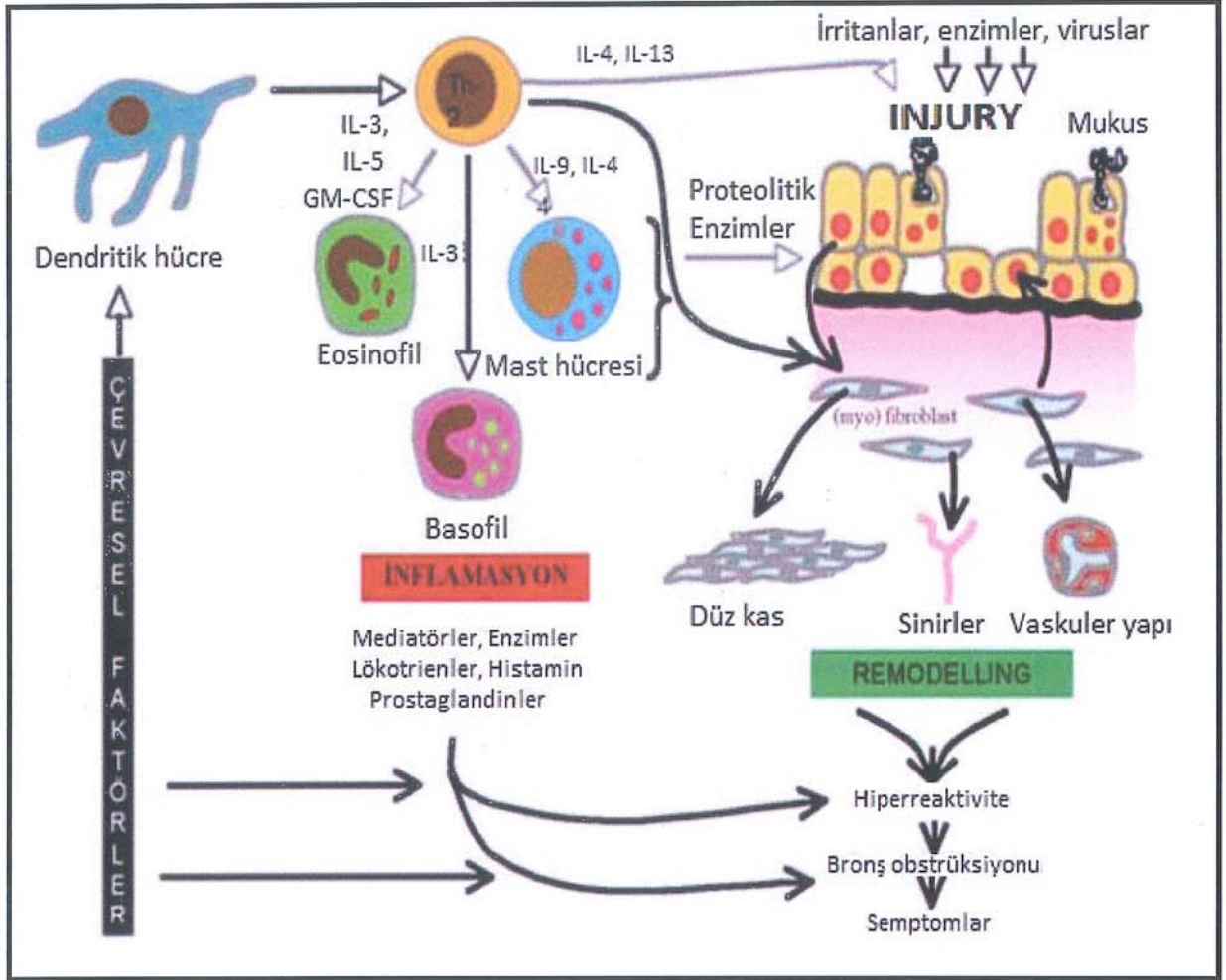
DSÖ verilerine göre 1990 yılının sonunda dünya çapında 180.000’den fazla astımdan ölüm rapor edilmiştir (2). Astım morbiditesi, yaşam kalitesi, sağlık hizmeti, astımın ciddiyeti, ilaç kullanımı, tedavi maliyeti, prevalans ve insidans gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (14).

PATOGENEZ

Astım bronşların boyutu ve hastalığın yaygınlığı hastadan hastaya değişen bir bronş sistemi hastalığıdır. Genellikle hastalarda orta çaplı bronşlar ve duvarında kartilaj içeren en küçük çaplı bronşlar etkilenirken, bazen bronşiyol seviyesindeki daha küçük hava yolları tutulabilir (15).

Astımın kalıcı histomorfolojik özelliklerinin en başında, yüzey epitelinin bazal membranında kalınlaşma meydana gelir. Bazal membrandaki bu kalınlaşma yine inflamasyon sonucu salınan sitokinlerin etkisi ile retiküler tabaka olarak da isimlendirilen bazal membranda tip I, II, V kollajen ve fibronektin artışı ile karakterizedir (16,17). Yapılan araştırmalar bazal membran kollajenizasyonunun astımdaki en erken ve kalıcı patoloji olduğunu göstermiştir. Astım krizi çok hafif olduğunda bile kollajen artışı oluşabilmektedir (18). Bazal membran kalınlaşmasının astımlılarda yeniden yapılanmanın en önemli parametresi ve hastalığın ciddiyeti ile ilişkili olabileceği vurgulanmaktadır (19) (Şekil 1). Hastalığın kronikleşme bulguları arasında olan kollajen artışı, sadece retiküler bazal membranda değil, epitelyum altındaki submukozada da meydana gelir (20). Bronş duvarındaki yeniden yapılanma kapsamındaki diğer değişiklik, mukus sekresyonuna neden olacak goblet hücre hiperplazisi-metaplazisidir (16).

Astımın kronik döneminde bronş ve bronşiyol duvarındaki kalıcı patolojik değişiklikler arasında en belli başlı bulgulardan biri bronş duvarında düz kas hipertrofi-hiperplazidir. Astımda düz kas hücrelerinin çap ve sayısındaki artış kronik bronşitin aksine, genellikle daha büyük ve orta çaplı bronş duvarlarında görülür (16-18). Astım hastalarının bronş duvarındaki düz kas hiperplazisi klinik semptomların ortaya çıkmasında çok önemli rol oynar. Yapılan araştırmalar antijene maruz kalma yoğunluğu ve sıklığı ile düz kas hiperplazisinin yoğunluğu arasında ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Antijenin epiteli aşarak bronş duvarında migrasyon gösterdiği, bunun sonucunda oluşan inflamasyon ile salınan iltihabi mediatörler, sitokin ve büyüme faktörlerinin düz kas hücrelerinde çoğalma ve diferansiyasyon kaybına yol açtığı gösterilmiştir (21).



Şekil 1. Astımda hava yollarındaki inflamatuvar cevap ve yeniden yapılanma

RİSK FAKTÖRLERİ

Astımın gelişmesinde genetik ve çevresel faktörlerle etkileşerek hastalığın ortaya çıkmasına neden olur (22). Astıma yatkınlık, genlerin hem başka genlerle hem de çevresel faktörlerle olası etkileşimi sonucunda belirlenir (23).

Astım gelişimini ve ortaya çıkmasını etkileyen faktörler konak ve çevresel olarak iki başlıkta toplanabilirler:

Konak Faktörler

Genetik faktörler

Atopi gelişimine yatkınlık yaratan genler

Havayolu aşırı duyarlılığının gelişmesine yatkınlık yaratan genler

Obezite

Cinsiyet

Çevresel Faktörler

Allerjenler

Ev içi: ev içi akarları, kürklü hayvanlar (köpek, kedi, fare), hamam böceği, mantarlar, küf, mayalar

Ev dışı: polenler, mantarlar, küf, mayalar

Enfeksiyonlar

Meslek Astımı

Sigara dumanı

Aktif içicilik

Pasif içicilik

İç ve Dış Ortam Hava Kirliliği

KONAK FAKTÖRLER

Genetik Faktörler

Genetik yatkınlıkta atopi varlığı astım için en önemli predispozen etkidir. Genetik yatkınlıkta multifaktöryel poligenik kontrol söz konusudur. Astım, atopi ve solunum yolu aşırı duyarlılığı ile ilişkili olduğu varsayılan gen grupları 2., 3., 4., 5., 6., 7., 9., 11., 12., 13., 14., 16., 17. ve 19. kromozomlar üzerindeki lokuslarda yerleşmiştir (26, 27). Özellikle bugün sorumlu tutulan kromozomlar: 5. kromozom, 11. kromozom, 6. kromozom, 12. kromozom, 14. kromozomdur. Bu kromozomlar astım patogenezindeki önemli stoking ve reseptörlerin kodlandığı bölgeleri bulundurlar. Ancak daha az oranda diğer kromozomlarda da çeşitli patolojiler belirtilmiştir. 5. kromozom üzerindeki 5q23-q33 ve q31 alanı β 2-adrenerjik reseptör etkinliği için sorumlu iken, 11. kromozom atopiden, IgE seviyesinden ve deri testlerinin pozitifliğinden sorumlu tutulmaktadır. Kromozom 12 üzerindeki lokuslar ise IL-4 yapımından, mast hücre büyümesinden, astım- atopi ilişkisinden sorumludur (28).

Dünya popülasyonunda astım %5-10 civarında görülürken anne veya babanın birisi astımlı ise çocuklarında astım görülme oranı 2-3 kat, her ikisi de astımlı ise bu oran 6-7 kat artmaktadır. Bu bulgular astımlı hastalarda genetik faktörlerin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (1).

Astım patogenezinde birçok gen rol oynamaktadır (1, 24). Astım gelişiminde rol oynayan genetik değişiklikler dört temel alanda olmaktadır.

- 1) Allerjene spesifik antijen yapımı (IgE yapısında)
- 2) Hava yolu aşırı cevaplılığında etkili olan genler

- 3) İnflamatuvar mediatörlerin sentezini etkileyen genler (sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri)
- 4) Th1 ve Th2 immün cevap arasındaki denge (25)

Obezite

Obezite de astım için risk faktörü olarak bulunmuştur (22). Obezite özellikle ağır astımı olan olgularda önemlidir, çünkü ülkemizde acil servise başvuran astımlıların %75'inin obez olduğu saptanmıştır (27). Leptin gibi belli mediatörlerin hava yolu fonksiyonunu etkilemesi ve astım eğilimi artmasında ve allerjik hava yolu inflamasyonunun oluşmasında etkili olabileceği düşünülmektedir (28). Örneğin, leptinin tümör nekroz factor α (TNF α), interlökin 6 (IL6), interlökin 12 (IL12) gibi proinflamatuvar sitokinlerin yağ dokusunda salınımını arttırdığı bilinmektedir. Bunun sonucu olarak astımda TNF α seviyelerinin arttığı ve allerjene maruziyet devam ettikçe sentezin artmaya devam ettiği ve TNF α 'nın adhezyon moleküllerinin salınımını artırarak hava yolu duvarına inflamatuvar hücrelerin göçünü arttırabileceği düşünülmektedir (29).

Cinsiyet

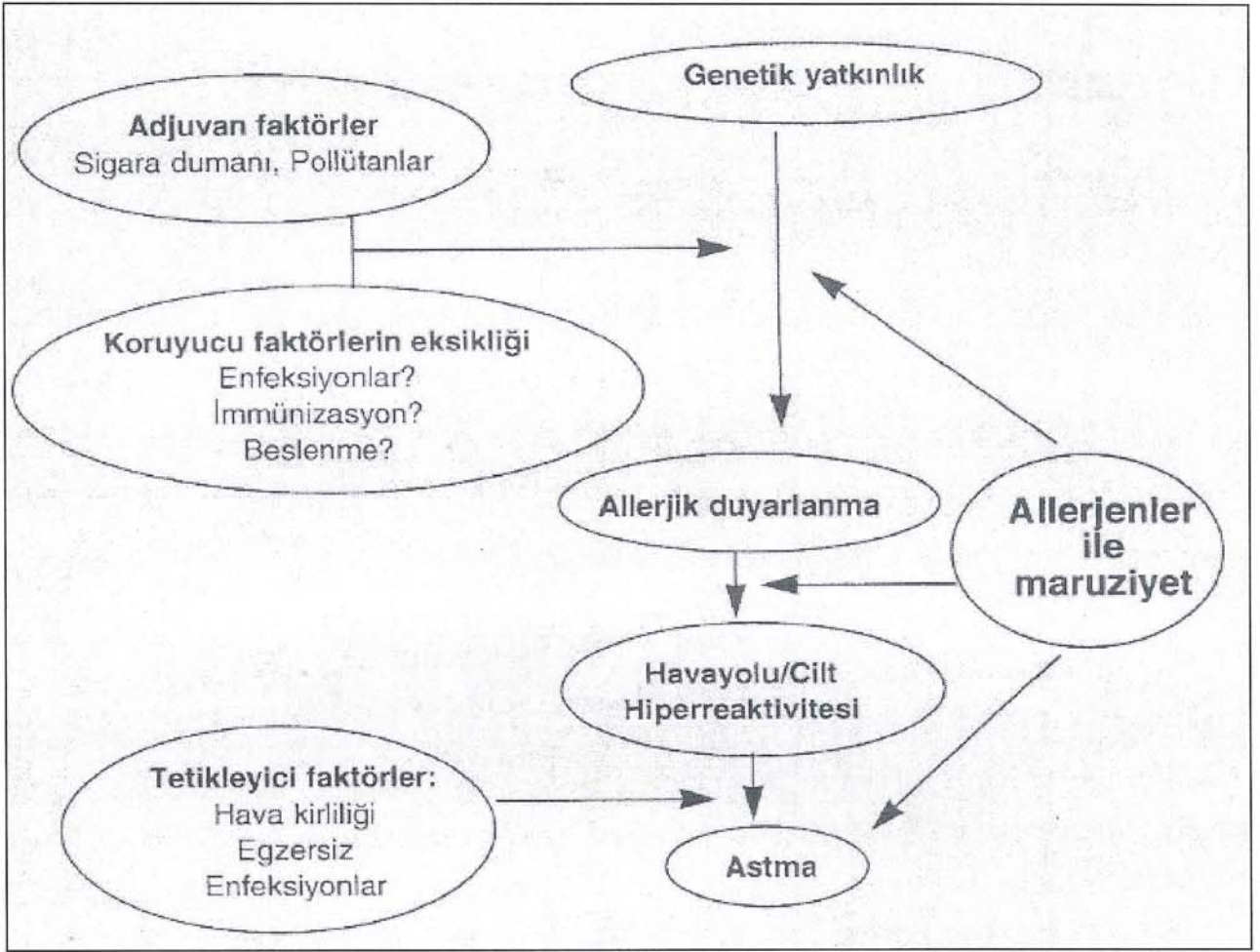
Çocukluk döneminde bulunan erkeklerde astım önemli bir risk faktörüdür. 14 yaşından küçük çocuklarda, astım prevalansının erkek çocuklarda kız çocukların yaklaşık iki misli olduğu bulunmuştur (30). Fakat yaş ilerledikçe bu fark kapanmakta ve yetişkin döneme geldiğinde astım kadınlarda daha sık görülür hale gelmektedir (22).

ÇEVRESEL FAKTÖRLER

Allerjenler

Allerjik astımda, kişilerin duyarlı olduğu allerjen(ler) ile maruziyetini takiben astım semptomlarının ortaya çıktığı görülmüştür (30-32). Buna ek olarak astıma yatkın bir bireyde allerjen maruziyeti ile birlikte bazı çevresel faktörlerin varlığının da hastalığın ortaya çıkmasında arttırıcı etkisinin olduğunu (33) düşündürmektedir (Şekil 2).

Genel anlam ile allerjen, tip1 IgE aracılıklı reaksiyona neden olan antijenlere verilen addir (34). Ev tozu akarı, hamam böceği ve polen insan hayatının erken döneminde duyarlanmaya yol açan önemli allerjen kaynaklarıdır. Yapılan çalışmalar insan hayatının ilk yıllarında az miktarda allerjene maruziyetin duyarlanmayı geciktirme ve ciddi astım gelişme riskini azaltma potansiyeline sahip olduğunu düşündürmektedir (35-37).



Şekil 2. Astımın ortaya çıkmasındaki faktörler

Enfeksiyonlar

Astımlı kişilerde solunum yolu enfeksiyonlarının astım ataklarını tetiklediği bilinmektedir. Astımlı bireylerde basit bir grip, nefes darlığına yol açabilmektedir.

C.pneumoniae ve *M.pneumoniae* varlığı kronik astım hastalarında gerek serolojik yöntemlerle gerekse PCR yöntemleri ile sıklıkla gösterilmiştir. Astım ataklarında antibiyotik kullanımının etkinliği üzerine sınırlı sayıda kontrollü çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan alınan izlenim antibiyotik tedavisinin ancak pnömoni gibi radyolojik olarak akciğer enfeksiyonunun varlığının kanıtlandığı hastalar dışında astım ataklarında etkinliğinin olmadığı şeklindedir (38).

Meslek Astımı

Meslek astımı ilk olarak işyerinde karşılaşılan allerjenlere bağlı olarak ortaya çıkan “iş ile ilişkili astım”dır. Üçyüzden fazla maddenin mesleksel astım ile ilişkili olduğu bulunmuştur (22, 39). Bunlar arasında izosiyonatlar gibi yüksek molekül ağırlıklı maddeler, havayolu

duyarlılığını arttıran iritanlar, platin tuzları gibi immünojenik maddeler ve IgE aracılı reaksiyona yol açan bitki ve hayvan kökenli biyolojik ürünler sayılabilir (40).

Astım endüstrileşmiş ülkelerdeki en yaygın mesleki solunum sistemi hastalığı olup (41), mesleki duyarlaştırıcıların çalışma yaşındaki erişkin astımın yaklaşık 10' da birinden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (42). Hastalığın ortaya çıkması için gerekli duyarlaştırıcı dozu kişiden kişiye farklılık göstermektedir (38, 43).

Sigara

Sigara kullanımı ve/veya dumanına maruziyet, astımlılarda akciğer fonksiyonlarında bozulmanın şiddetlenmesi, astım semptomları ve ağırlığında artışa yol açmaktadır (22, 44, 45). Gerek prenatal gerekse de postnatal olarak tütün dumanına maruziyet, erkek çocukluk döneminde astım benzeri semptomlar dahil, bir dizi zarara yol açtığı (44, 46) ve ayrıca annenin sigara içiminin bebeğin akciğer gelişimini olumsuz etkilediği ve anneleri sigara içen infantların, hayatlarının ilk yılında hışıltı geçirme olasılıklarının dört kat arttığı bilinmektedir (47).

İç ve Dış Ortam Hava Kirliliği

Toplum üzerinde yapılan çalışmalarda dış ortam hava kirliliğinin astım ataklarını arttırdığı ve günlük aktivite kısıtlamaya neden olduğu tespit edilmiştir (48). İç ve dış ortam hava kirliliğini oluşturan maddelerin başında bir yakıt ürünü olan nitrojen ürünleri gelmektedir (nitrojendioksit, nitrozoksit).

Diğerleri de sülfür dioksit, ozon ve havada asılı partiküllerdir. Nitroz asit ev içi yakıtlarından ve sigara dumanından daha fazla bulunur. Bu sonuçlara bakıldığında iç ve dış ortam hava kirliliğini azaltan önlemlerin alınmasının astım tedavisinde önemli olduğu görülmektedir (1, 49).

TANI VE SINIFLAMA

Klinik Tanı

Bronş astımında tanı, semptomlar ve klinik bulgular ile konur, diğer yöntemler tanıya yardımcı olarak veya ayırıcı tanıda kullanılır (50). Astım tanısında anamnez çok önemlidir. Klinik astım tanısı, ataklarla seyreden nefes darlığı, hışıltılı solunum, öksürük ve göğüste sıkışma hissi gibi semptomlarla konulmaktadır (51). Rastlantı sonucunda alerjene maruz kaldıktan sonra ataklarla seyreden semptomların ortaya çıkması, bu semptomların mevsimsel değişiklikler göstermesi, aile öyküsünde astım ve atopik hastalık bulunması da tanıya

yardımcı olur (52). Semptomların gün içinde veya mevsimsel değişkenlik göstermesi, sis, duman, çeşitli kokular veya egzersiz gibi nedenlerle tetiklenmesi, geceleri artış olması ve uygun astım tedavilerine yanıt vermesi astım tanısını destekleyen bulgulardır (50). Hasta semptomatik değilse solunum sistemi muayenesi normal bulunabilir fakat fizik incelemenin normal olması astım tanısını dışlamaz. En sık rastlanan muayene bulgusu hava yolu obstrüksiyonu gösteren hışıltı ve ronküslerdir (51, 52).

Tanı ve Takip İçin Kullanılan Testler

Solunum fonksiyonlarının ölçümü

Astım tanısı genellikle astıma karakteristik semptomların varlığı ile konur. Bununla birlikte, akciğer fonksiyonunun ölçülmesi ve özellikle akciğer fonksiyon anormalliklerinin geri dönüşlü olması tanıyı destekler. Hava akımı kısıtlamasını ve reverzibilitesini ölçmek ve astım tanısını koymak için önerilen yöntem spirometrik incelemedir. İlk başvuruda hastalık tanısını koymak ve ağırlığını belirlemek, tedavi sırasında ise hastanın en iyi değerlerini belirlemek için kullanılır. Zorlu ekspirasyon manevrası ile zorlu ekspiratuvar akım 1. saniye (FEV1), zorlu vital kapasite (FVC), Tiffanue (FEV1/FVC), zirve ekspiratuvar akım (PEF) ölçülebilir. FEV1/FVC oranının %75'den düşük bulunması hava yolu obstrüksiyonunu gösterir (53, 54). Hava yolu obstrüksiyonu saptanan hastalarda kısa etkili beta-2 agonist inhalasyonundan (4 puf salbutamol, 400 mikrogram veya 4 puf terbutalin, 1000 mikrogram) 15-20 dakika sonra FEV1'de bazal değere göre >%12 veya >200 ml, PEF değerinde %20 artış olması hava akımı kısıtlılığının reverzibl olduğunu gösterir. Bazı hastalarda reverzibl hava akımı kısıtlanması 2-3 hafta oral kortikosteroid (20- 40 mg/gün prednizolon) veya 6-8 hafta uygun dozda inhaler steroid tedavisi ile ortaya konulabilir. Tedavi sonrası FEV1 değerlerinde başlangıca göre %15 artış görülmesi geç reverzibilite varlığı olarak değerlendirilir (52, 53).

Zirve akım hızı (PEF) ölçümü

PEF metre ile elde edilen PEF ölçümü astım tanısının doğrulanması ve takibinde önemlidir. Genellikle PEF değerleri sabah bronkodilatör ilaç kullanmadan önce yani PEF değerinin en düşük olmasının beklendiği zamanda; akşam ise bronkodilatör kullandıktan sonra yani değerler en yüksek durumdayken ölçülür. Günlük PEF değişkenliği, o gün içerisindeki en yüksek ve en düşük PEF değerleri arasındaki farkın yüzde olarak ifade edilmesidir. Bu farkın %20'nin üzerinde olması astım lehine kabul edilir (53, 54).

Hava yolu duyarlılığının ölçülmesi

Semptomların astımı düşündürdüğü fakat solunum fonksiyonlarının normal olduğu hastalarda metakolin, histamin, adenozin, mannitol veya egzersiz ile bronş provokasyonu astım tanısının konmasına yardımcı olabilir. Hava yolu duyarlılığı, hava yollarında tetik çeken etkenler olarak adlandırılan ve astım semptomlarına neden olan faktörlere karşı duyarlılığını gösterir (55,56). Test sonucu genellikle FEV₁'de başlangıca göre %20 veya daha fazla azalmayı provoke eden doz (veya konsantrasyon) olarak ifade edilir. Bu test astım tanısı için duyarlıdır fakat özgül değildir (53,55).

Astımın Sınıflandırılması

Astım ağırlığı semptomlar ve solunum fonksiyon parametreleri kullanılarak intermittan, hafif persistan, orta persistan ve ağır persistan olarak sınıflanmıştır (52) (Tablo 1).

Tablo 1. Astımın stabil dönemde semptomlar ve fonksiyonel parametrelere göre sınıflaması (GINA rehberi 2006)

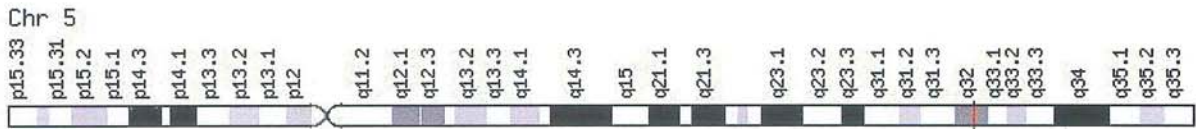
İntermittan
Semptomlar: haftada bir kezden az Kısa alevlenmeler Gece semptomları ayda iki kezden fazla değil • FEV ₁ ya da PEF değerleri beklenenin > %80'i • FEV ₁ ya da PEF değişkenliği < %20
Hafif Persistan
Semptomlar: haftada bir kezden fazla ama günde bir kezden az Alevlenmeler aktiviteyi ve uykuyu etkileyebilir Gece semptomları ayda iki kezden fazla • FEV ₁ ya da PEF değerleri beklenenin > %80'i • FEV ₁ ya da PEF değişkenliği < %20-30
Orta Persistan
Semptomlar: her gün var Alevlenmeler aktiviteyi ve uykuyu etkileyebilir Gece semptomları haftada bir kezden fazla Her gün kısa etkili b ₂ -agonisti kullanımı • FEV ₁ ya da PEF değerleri beklenenin %60-80'i

• FEV ₁ ya da PEF değışkenliği > %30
Ağır Persistan
Semptomlar: her gün var Sık alevlenmeler Sık gece astım semptomları Fiziksel aktivitelerin kısıtlanması • FEV ₁ ya da PEF değeri beklenenin < %60 • FEV ₁ ya da PEF değışkenliği > %30

Astımın ağırlığına göre yapılan sınıflama, hastanın tedavisi ile ilgili kararların alındığı ilk değeriendirmede yararlıdır. Bu sınıflamanın tedavi kararlarına temel oluşturması artık önerilmemektedir; ancak bu sınıflama, daha önce tedavi almamış hasta grubunda ağırlığın tanımlanması ya da astımla ilgili bir çalışmaya alınacak hastaların seçilmesinde kullanılabilir (57).

SPINK5 GEN POLİMORFİZMİ

Astım ve alerjik fenotipleri, 5q kromozomu ile ilişkisi olduğu bilinen kompleks genetik hastalıklardır. Bu bölgede pek çok aday gen astım ve atopik dermatit ile ilişkilendirilmiştir (1). IL4, IL13, CD14, ADRB2, LTC4S birçok toplumda astım fenotipi ile ilişkilendirilmiş aday genlerdir. Yapılan genetik çalışmalar, serin proteaz inhibitör kazal-tip 5 enziminin (SPINK5) astım, netherton sendromu ve atopik hastalıklarla ilişkili olabileceğini göstermektedir (58, 59). 5q32 kromozomunda bulunan SPINK5 geni (şekil 3), substrat bağlama bölgelerinde bulunan peptid bağlarını parçalamak amacıyla aktif serinleri kullanan enzimleri inhibe eden serin proteaz inhibitörünü kodlar.



şekil 3. Kromozom 5q32

GEREÇ VE YÖNTEMLER

GEREÇLER

Çalışmamız 66 hasta ve 74 kontrol grubu olmak üzere toplam 140 kişi ile gerçekleştirildi. Hasta grubunun yaş ortalaması (36.62±11.16) ve kontrol grubunun yaş ortalaması (30.82±10.21) olarak hesaplandı.

Hasta grubu oluşturulurken Trakya Üniversitesi Göğüs Hastalığı polikliniğinde yapılan incelemeler sonucunda astım tanısı konan hastalar; kontrol grubu oluşturulurken ise malignite ve astım tanısı almamış, alerjik rahatsızlığı, uzun süreli ilaç kullanımı öyküsü ve herhangi bir kronik rahatsızlığı bulunmayan sağlıklı bireyler çalışmaya alındı. Çalışma için etik kurul onayı (EK 1) ve çalışmaya katılanların yapılan çalışma hakkında ayrıntılı bilgi verildikten sonra çalışma onayları alındı.

Hasta ve kontrol gruplarından 2'şer ml periferik kan örnekleri EDTA'lı vakumlu tüplere alınıp, İnvitrogen kiti kullanılarak DNA'ları izole edildi. DNA kalitesi % 0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek gözlemlendi. DNA izolasyonundan sonra polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile G-206A polimorfizmini içeren bölgelerin ürünleri % 2'lik agaroz jellere yüklenip Etidyum Bromid (EtBr) ile boyanarak elektroforezde 80 voltta yürütüldü. Daha sonra PZR ürünleri G-206A polimorfizm bölgesine özgü Fast Digest Kpn I restriksiyon enzimi kullanılarak Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemi ile, 37°C'de 20 dk inkübasyon yapılarak kesime bırakıldı. Kesim sonucu ürünler % 3'lük agaroz jelde EtBr ile boyanarak elektroforezde 80 voltta yürütüldükten sonra UV ışık altında transillilatör kullanılarak polimorfizmler saptandı. G-1258A polimorfizmi için yine DNA'lar PZR ile istenen bölgelere özgün primerlerle çoğaltıldı. PZR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek ürün oluşup oluşmadığına bakıldı. Daha sonra PZR ürünleri G-1258A polimorfizm bölgesine özgü Hinf I restriksiyon enzimi kullanılarak Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemi ile, 37°C'de 3 saat inkübasyon yapılarak kesime

brakıldı. Kesim sonucu ürünler % 3'lük agaroz jelde EtBr ile boyanarak elektroforezde 80 voltta yürütüldükten sonra UV ışık altında polimorfizmler saptandı.

KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER

Agaroz (Sigma)
Borik Asit (Sigma)
DNA Marker seti, 50bç-100bç (Fermentas)
dNTP (deoksi Nükleotit Tri Fosfat; dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (MBI)
Etanol %100 (Riedel)
Etidyum Bromür (Sigma)
Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) (Sigma)
KpnI restriksiyon enzimi (Fermentas)
Hinf I restriksiyon enzimi (Fermentas)
Primerler (Fermentas)
Proteinaz K (İnvitro)
Taq DNA polimeraz seti (Fermentas)
Trisma (Base) (Bio Basic)

KULLANILAN CİHAZLAR

Agaroz elektroforez tankı (MINICELL PRIMO EC 320)
Derin dondurucu (AEG)
Dijital fotoğraf makinesi (Kodak Easy Share 2330)
Güç kaynağı (EC-105)
Manyetik karıştırıcı (Nüve)
Otoklav (Heraeus)
Otomatik mikro pipetler (ISOLAB)
Santrifüj (Allegra X-22R)
Terazi (Sartorius)
Thermo Shaker (Boeco TS-100)
Vorteks (VELP Scientifica)

ÇÖZELTİLER

10xTris EDTA Borik Asit (TEB) Çözeltisi (1 litre) pH: 7.4

60.5 gr Tris

3.72 gr Na₂EDTA.2H₂O

30.85 gr Borik Asit

YÖNTEMLER

DNA İZOLASYONU

Hasta ve kontrol gruplarından EDTA'lı tüplere alınan 2 ml kan örneklerinden İnvitrogen DNA İzolasyon Kiti ile DNA'lar izole edildi. DNA miktarları aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi.

DNA (µg/ml)=260nm'deki optik yoğunluğu x Seyreltme faktörü x Katsayı (DNA için 50)

DNA'nın saflığı 260 nm ile 280 nm dalga boylarındaki optik yoğunluk değerlerinin 260/280 oranıyla belirlendi. DNA'ların kalitesini belirlemek için DNA'lar agaroz jellere yüklendi.

DNA İzolasyon Protokolü (İnvitrogen)

1. 1,5 ml ependorf tüpü içinde 200 µl EDTA'lı tam kan, "bağlanma tamponu" ve proteinaz K karıştırıldı ve vortekslendi.
2. 20 µl RNase A eklendi, vortekslendi.
3. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
4. 200 µl Pure Ling Genomic Lysis /Bind. Buffer eklendi, vortekslendi.
5. 55 °C de 10 dakika inkübe edildi.
6. Karışım özel filtrelü tüplere alındı.
7. 1 dakika 10.000 rpm' de santrifüj edildi. Filtreden geçen karışım atıldı.
8. Filtrelü tüpün içine 500 µl Genomic Wash Buffer 1 eklendi.
9. 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Filtreden geçen karışım atıldı.
10. Filtrelü tüpün içine 500 µl Genomic Wash Buffer 2 eklendi.
11. 3 dakika 10.000 rpm' de santrifüj edildi. Filtreden geçen karışım atıldı.
12. Filtrelü tüp boşaltıldıktan sonra 10 saniye 12.000 rpm'de santrifüj edildi.
13. Filtrelü tüp, yeni bir ependorf tüpün içine yerleştirildi.
14. 200 µl Genomic Elution Buffer eklendi.

15. 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Filtre tüpten ayırdıktan sonra, saf DNA elde edilmiş oldu.

DNA'ların kalitesi %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek gözlemlendi. Elde edilen DNA örnekleri -20°C'de saklandı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

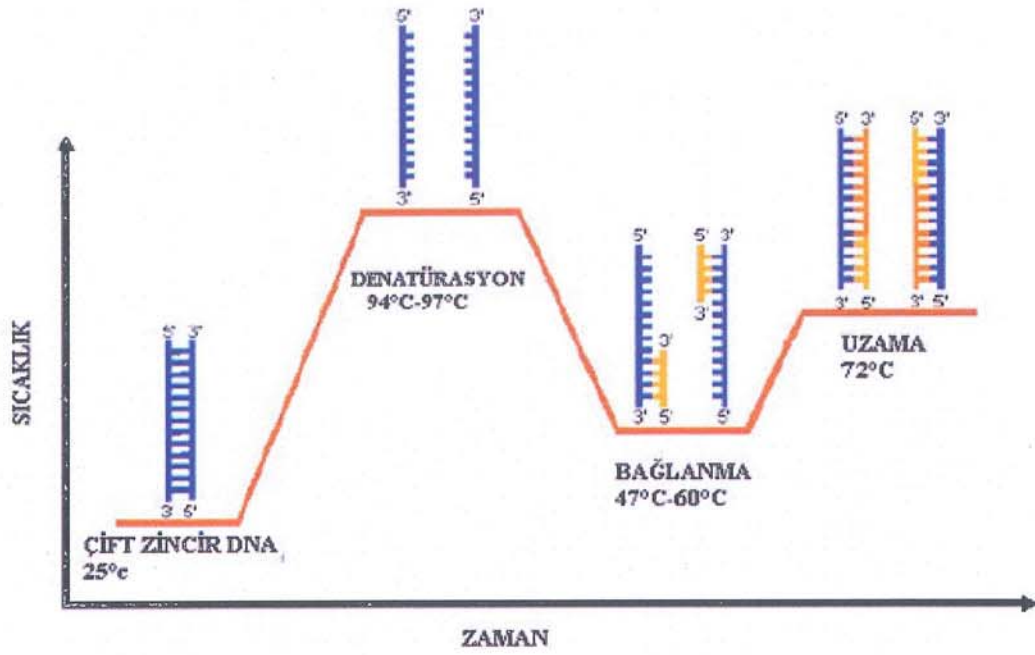
PZR, ilk kez 1985 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan, Cetus şirketine bağlı olarak çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilen metodla bilim dünyasına sunulduğundan itibaren hem araştırmada hem de klinik laboratuvarlarında tanıma yeni bir çığır açmıştır. Kary Mullis bu çalışması ile 1998'de Nobel ödülü almıştır. PZR invitro koşullarında DNA'nın belirlenen bir kısmının çoğaltılması olarak tanımlanmıştır. PZR'de üç temel basamak vardır ve çoğaltılmış DNA miktarı, bu üç adımın tekrarına bağlıdır.

1. Denatürasyon (94-97°C)
2. Primer bağlanması (47-60°C)
3. DNA sentezi (72°C)

Bu üç adım bir PZR siklusünü oluşturur (Şekil 4). İlk adımda çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. İkinci adımda primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Son aşamada ise DNA sentezi gerçekleşir.

PZR'nin temel bileşenleri; kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi (Taq polimeraz), enzim tamponu, primerler, dNTP (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) karışımı ve MgCl₂'dir.

İlgili gen bölgeleri verilen primer dizileri kullanılarak çoğaltıldı. Reaksiyon toplam 25µl'lik hacimde gerçekleştirildi. Daha sonra PZR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek, ilgili hastaların G-206A ve G-1258A genleri incelendi, ürünler EtBr ile boyandıktan sonra UV ışık altında incelendi.



Şekil 4. PZR döngüsü (36)

PZR’de kullanılan primer dizileri (Tablo 2), PZR için hazırlanan karışımlar (Tablo 3) ve PZR için gerekli koşullar (Tablo 4)’te verilmiştir.

Tablo 2. SPINK5 geninde G-206A ve G-1258A gen polimorfizmlerinin gözleendiği promotör bölgesini çoğaltmada kullanılan primerler ve ürün uzunluğu

G-206A	G-1258A
F: 5'-TCTGCCTGCTCCAATAA-3'	F: 5'-TTTTAGCCAAGCAGAAGAAG-3'
R: 5'-CACTGACACTGTGGCTATCTT-3'	R: 5'-CAGTTTTAAGGAATGCACGT-3'
674 baz çifti	177 baz çifti

Tablo 3. PZR İçin Hazırlanan Karışımlar

G-206A için:	G-1258A için:
Bir hasta için kullanılan miktarlar:	Bir hasta için kullanılan miktarlar:
2 mM MgCl ₂ 2 µl MgCl ₂	2.5 mM 2.5 µl MgCl ₂
1x PZR Tamponu 2.5 µl Buffer	1x PZR Tamponu 2.5 µl Buffer
0.5 nmol primer 1 0.5 µl primer 1	1 nmol primer 1 0.5 µl primer 1
0.5 nmol primer 2 0.5 µl primer 2	1 nmol primer 2 0.5 µl primer 2
0.2 mM dNTP 1 µl dNTP	0.2 mM dNTP 1 µl dNTP
1.25 U 0.25 µl Taq polimeraz	1.25 U 0.25 µl Taq polimeraz
	16.25 µl dH ₂ O
	2 µl izole edilmiş DNA
Toplam hacim: 25µl	Toplam hacim: 25 µl

Tablo 4. PZR İçin Gerekli Koşullar

G-206A ve G-1258A	
Başlangıç: 94°C	5 dakika
94°C	40 saniye
55°C	40 saniye
72°C	60 saniye
} 35 Döngü	
Sonlanma: 72°C, 10 dakika	

Restriksiyon Enzim Kesimi Yöntemi

Restriksiyon enzimleri, kısa DNA dizilimlerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden çift yönlü simetrik olarak DNA'yı kesen enzimlerdir. Bu enzimlerin büyük bir kısmı bakterilerde, çok az bir kısmı da virüs ve ökaryotlarda bulunmaktadır (60, 61). Belli bir restriksiyon enzimi DNA'yı keseceği, 4-8 nükleotitlik (genelde 6) restriksiyon noktası tanır. DNA parçalarının büyüklüğü restriksiyon noktalarının dağılımına bağlıdır (62).

Hastaların G-206A polimorfizmi; PZR aşamasından sonra PZR ürünlerinin KpnI restriksiyon enzimi ile 20 dk 37°C'de kesime bırakılmaları, % 3'lük agaroz jelde yürütülmeleri ve UV ışık altında incelenmeleri sonucunda belirlendi. G-1258A polimorfizmi için ise, PZR aşamasından sonra PZR ürünlerinin Hinf I restriksiyon enzimi ile 3 saat 37°C'de kesime bırakılmaları, % 3'lük agaroz jelde yürütülmeleri ve UV ışık altında incelenmeleri sonucunda belirlendi.

G-206A İçin Restriksiyon Enzim Kesimi Yöntemi

PZR sonucu elde edilen ürünler kullanılarak;

1xM (Enzim kesme) tamponu	1.0µl
5 U KpnI Restriksiyon enzimi	0.5µl Kpn I Restriksiyon enzimi
	5 µl PZR reaksiyon ürünü
	5.5 µl dH ₂ O
Toplam hacim:	12 µl

Karışım birkaç saniye yavaşça karıştırıldı. 37°C'de 20 dk inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresinin sonunda ürünler 1.5 µl EtBr ile hazırlanan % 3'lük agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında oluşan bantlar gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar tablodaki enzim kesimi sonuçları ile karşılaştırıldı.

G-1258A İçin Restriksiyon Enzim Kesimi Yöntemi

PZR sonucu elde edilen ürünler kullanılarak;

1xM (Enzim kesme) tamponu	1.0µl
5 U Hinf I Restriksiyon enzimi	0.5µl Hinf I Restriksiyon enzimi
	5 µl PZR reaksiyon ürünü
	5.5µl dH ₂ O
Toplam hacim:	12 µl

Karışım birkaç saniye yavaşça karıştırıldı. 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresinin sonunda ürünler 1.5 µl EtBr ile hazırlanan % 3'lük agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında oluşan bantlar gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar tablodaki enzim kesimi sonuçları ile karşılaştırıldı.

Kpn I ve Hinf I İçin Restriksiyon Enzim Mekanizması

Kpn I restriksiyon enzimi 5'-.....C G T A C[↓]C.....-3' veya 3'-.....C[↑]C A T G G.....-5' baz dizisinin bulunduğu bölgeden kesim yapar.

Hinf I restriksiyon enzimi ise 5'-.....G[↓]A N T C-3' veya 3'-.....C T N A[↑]G.....-5' baz dizisinin bulunduğu bölgeden kesim yapar.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme, SPSS 20 programı kullanılarak yapıldı. Ölçülebilen verilerin normal dağılıma uygunlukları tek örnek Kolmogorov-Smirnov testi ile bakıldıktan sonra gruplar arası kıyaslamalarda; bağımsız gruplarda t testi, Mann Whitney U testi kullanıldı. Yates düzeltmeli Pearson χ^2 testi, Pearson χ^2 testi, Kolmogorov-Smirnov iki örnek testi kullanıldı. $P \leq 0.05$ düzeyinde istatistiksel yönden anlamlı fark bulunan değişkenler Lojistik Regresyon Analiziyle değerlendirilerek risk faktörleri belirlendi.

Tanımlayıcı istatistikler olarak ölçümsel verilerde; aritmetik ortalama \pm SS ve ortalama (min-maxs), niteliksel verilerde sayı ve % ler verildi. Tüm istatistikler için anlamlılık sınırı $P \leq 0.05$ olarak seçildi.

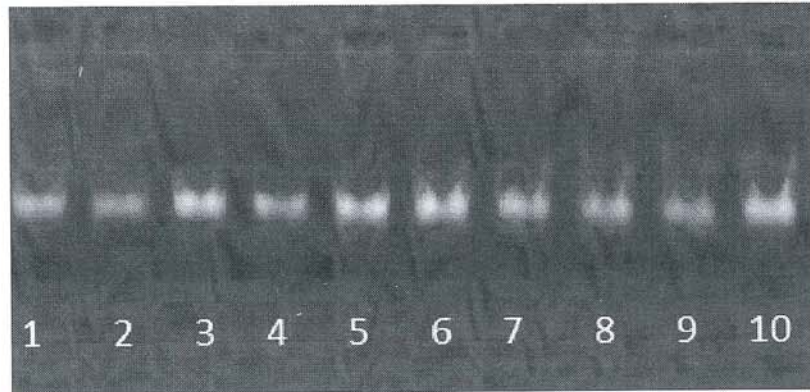
BULGULAR

Çalışmaya alınan hasta ve kontrol gruplarının yaş, cinsiyet, FVC, FEV₁ ve FEV₁ % değişimi SPSS (versiyon 20) programında hesaplanmış olup elde ettiğimiz sonuçlar Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5. G-206A ve G1258A için kontrol ve hasta gruplarının klinik bulguları

Özellik	Hasta (n=66)	Kontrol (n=74)
Yaş	36.62±11.16	30.82±10.22
Cinsiyet(bay/bayan)	14/52	27/47
FVC	66.9±15.7	79.4±18.4
FEV ₁	57.2±13.7	83.8±13.9
FEV ₁ % değişimi	26.8±13.7	4.7±3.6

Hasta ve kontrol gruplarından alınan kanlar İnvitrogen DNA kiti ile izole edildi. DNA örnekleri PZR’den önce %0.8’lik agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında izlendi (Şekil 5).



Şekil 5. Hasta ve kontrol DNA örneklerinin %0.8 lik agaroz jelde yürütülmesi ve UV ışık altında görüntülenmesi.

DNA'lar %0.8'lik agaroz jelde gözlemlendikten sonra G-206A ve G-1258A gen polimorfizmleri için PZR işlemi yapıldı ve PZR ürünleri de %2'lik agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında izlendi.

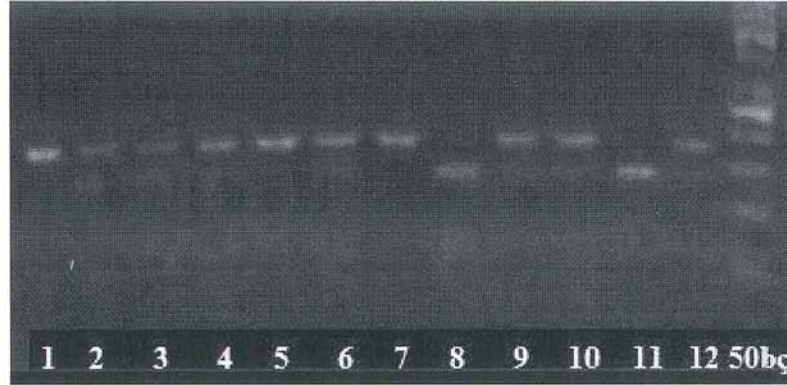
G-206A İçin Restriksiyon Enzim Kesimi

G-206A bölgesinin kesimi için PZR sonucu elde edilen ürünlerle KpnI enzimi kullanılarak, enzim kesim protokolünde gösterilen şekilde enzim kesimi gerçekleştirildi. Restriksiyon işlemi sonucunda SPINK5 geninin 4. ekson bölgesindeki G/A polimorfizmin varlığına bağlı olarak bant oluşumları gözlemlendi (Şekil 6).

GG genotipinde kesim görülmez ve tek bant oluşur.

AA genotipinde iki allelde kesim gerçekleşir (iki bant).

GA genotipinde ise bir allelde kesim gerçekleşir (üç bant).



Şekil 6. G-206A polimorfizmini gösteren EtBr ile boyanan % 3'lük agaroz jel görüntüsü. (GG; 1, 5 ve 7, GA; 2, 3, 4, 6, 9, 10 ve 12, AA 8 ve 11 nolu hasta gen polimorfizmini gösterir. 50 bç; DNA markeridir).

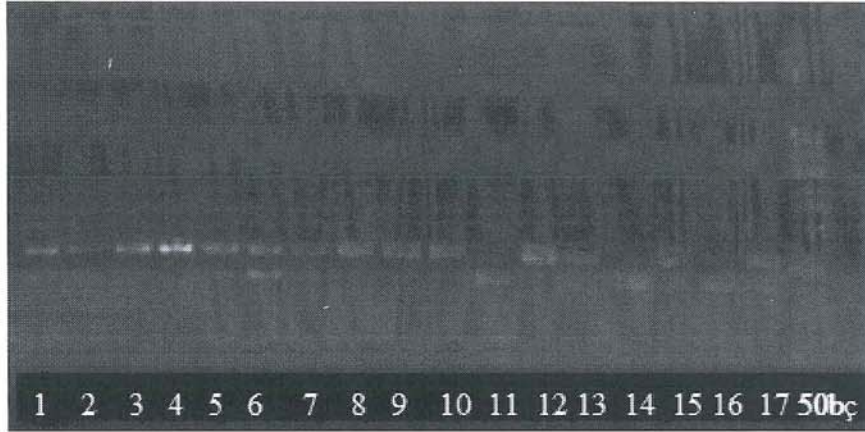
G-1258A İçin Restriksiyon Enzim Kesimi

G-1258A bölgesinin kesimi için PZR sonucu elde edilen ürünlerle Hinf I enzimi kullanılarak yöntemde gösterilen şekilde enzim kesimi gerçekleştirildi. Enzim kesimi işlemi sonucunda SPINK5 geninin promotör bölgesindeki G/A polimorfizmin varlığında bant oluşumları gözlemlendi (Şekil 7).

GG genotipinde kesim görülmez ve tek bant oluşur.

AA genotipinde iki bölgede kesim gerçekleşir (2 bant).

GA genotipinde ise her iki allel de kesim gerçekleşir (üç bant).



Şekil 7. G1258A polimorfizmini gösteren EtBr ile boyanan % 3'lük agaroz jel görüntüsü. (GG; 3, 4, 8, 9, 10 ve 12, GA; 1, 2, 5, 6, 7, 13, 15 ve 17, AA; 11, 14 ve 16 nolu hasta gen polimorfizmini gösterir. 50 bç; DNA markeridir).

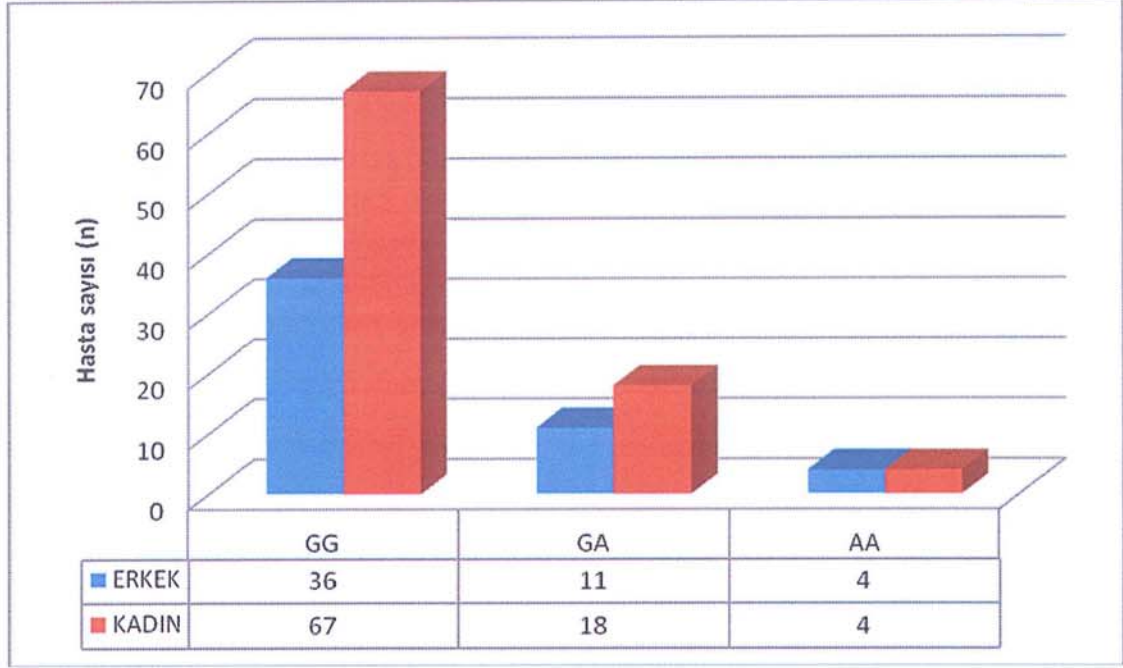
Çalışılan hasta ve kontrol gruplarının G-206A ve G-1258A genotip dağılımları incelendiğinde;

G-206A için; astımlı grubun AA genotipli 3 hasta olup % 5, GA genotipli 6 hasta olup % 9 ve GG genotipli 57 hasta olup %86, kontrol grubunun AA genotipli 6 hasta olup % 9, GA genotipli 23 hasta olup %31 ve GG genotipli 45 hasta olup %60'dır. Hasta grubunun GG genotipleri kontrole göre daha yüksek bulunmuşken, GA ve AA genotipleri daha düşük bulunmuştur. İstatistiksel değerlendirme sonucunda astımlılarda G-206A genotipleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (Tablo 6). Ayrıca G-206A bölgesinin cinsiyetlere göre genotip dağılımı Şekil 8 de gösterilmiştir.

Tablo 6. G-206A genotiplerinin hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı

G-206A Genotip	GRUP		Toplam	P
	Hasta (n=66)	Kontrol(n=74)		
GG	57 (% 86)	45 (% 60)	102 (% 72.9)	0.021
GA	6 (% 9)	23 (% 31)	29 (% 20.7)	
AA	3 (%5)	6 (% 9)	9 (% 6.42)	
Toplam	66 (% 47.1)	74 (% 52.9)	140 (%100.0)	

Kolmogorov-Smirnov iki örnek testi



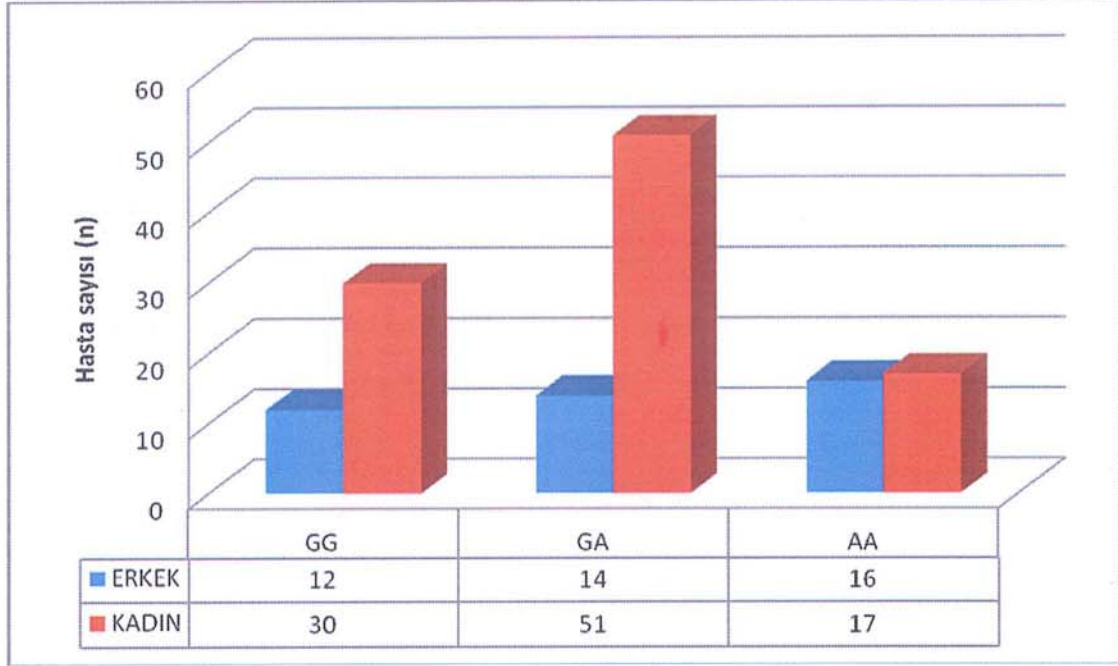
Şekil 8. G-206A bölgesinin cinsiyetlere göre genotip dağılımı

G1258A için; astımlı grubun GG genotipli 31 hasta olup % 47, GA genotipli 25 hasta olup % 38 ve AA genotipli 10 hasta olup % 15'tir. Kontrol grubunun GG genotipli 11 hasta olup % 15, GA genotipli 40 hasta olup % 54 ve AA genotipli 23 hasta olup % 31'dir. Astımlı grubun GG genotipi kontrole göre daha yüksek bulunmuşken GA ve AA genotipleri daha düşük bulunmuştur. Ancak istatistiksel olarak değerlendirildiğinde astımlılarda G-1258A'daki genotipler arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (Tablo 7). Ayrıca G-1258A bölgesinin cinsiyetlere göre genotip dağılımı Şekil 9 de gösterilmiştir.

Tablo 7. G-1258A genotiplerinin hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı

G-1258A Genotip	GRUP		Toplam	P
	Hasta (n=66)	Kontrol(n=74)		
GG	31 (% 47)	11 (% 15)	42 (% 30)	0.0001
GA	25 (% 38)	40 (% 54)	65 (% 46.42)	
AA	10 (% 15)	23 (% 31)	33 (% 23.57)	
Toplam	66 (% 47.1)	74 (% 52.9)	140 (% 100)	

Pearson Ki kare testi



Şekil 9. G-1258A bölgesinin cinsiyetlere göre genotip dağılımı

G-206A ve G-1258A gen polimorfizmleri için 140 kişinin (hasta+kontrol) istatistiksel sonuçlarına göre astımlı hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (sırasıyla $P=0.021$, $P=0.0001$).

Sonuçlar sayı (yüzde) ya da ortalama \pm std. sapma olarak ifade edildiler. Yaş, cinsiyet, baş ve burun şikayetleri, göğüs şikayeti ve ailede en az 1 kişinin astım olması astım için risk faktörü olarak tespit edilmiştir. İstatistiksel hesaplamaları tablo 8, 9 ve 10'da ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 8. Cinsiyete göre grupların dağılımı

		GRUP		p	OR	%95 CI
		Kontrol	Hasta			
Cinsiyet	Erkek	27	14	.047	2.1337	1.0014 - 4.5466
	Kadın	47	52			
Toplam		74	66			

Ki-kare testi sonucunda cinsiyet ile astım hastalığı arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p<0.05$). Yapılan çapraz tablo sonucunda, erkeklerin %34.1'nin hasta, kadınların ise %52.5'inin hasta olduğu görülmüştür. Bu nedenle, astım hastalığının kadınlarda erkeklere oranla daha fazla görüldüğü söylenebilir.

Tablo 9. Yaşa göre grupların dağılımı

	Grup	n	Ort.	p	%95 CI
Yaş	Kontrol	74	30.82 ± 10.22	.002	2.224 – 9.369
	Hasta	66	36.62± 11.16		

Yapılan bağımsız gruplarda t-testi sonucunda hasta ve kontrol grubu arasında yaş açısından anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Buna göre kontrollerin yaşı 30.82 ± 10.22 bulunurken hastaların yaşı 36.62 ± 11.16 bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubu arasındaki yaklaşık 6 yıllık fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuş ve ilerleyen yaşın astım üzerinde etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Tablo 10. Yaş, göğüs ağrısı ve baş-burun şikayeti olan hastalar arasında yapılan lojistik regresyon analizi

	Kat sayı	Standart Hata	p	OR	%95 CI
Baş Burun	1.376	0.729	.059	3.96	0.950 – 16.514
Göğüs	4.946	0.839	.000	140.61	27.173 – 727.629
Yaş	0.072	0.031	.019	1.075	1.012 – 1.142

Yapılan lojistik regresyon analizi sonucunda, göğüs rahatsızlığı çeken hastalar ve yaş değişkenleri istatistiksel açıdan anlamlı bulunurken ($p<0.05$), başburun şikayeti çeken hasta değişkeni istatistiksel açıdan anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$). Analiz sonuçlarına göre yaş 1 yıl arttığında astım olma riski %7.5 artmaktadır (OR=1.075, $p=0.019$). Göğüs şikayeti olanların olmayanlara göre astıma yakalanma riski yaklaşık 140 kat daha fazladır (OR=140.613, $p<0.001$). Baş burun şikayeti olanların olmayanlara göre astıma yakalanma riski yaklaşık 4 kat fazladır ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen klinik açıdan anlamlıdır (OR=3.960, $p=0.059$). Bununla birlikte, göğüs şikayeti değişkeni için klinik anlamlılığın araştırılmasında yarar vardır.

TARTIŞMA

Astım alt solunum yollarının kronik inflamatuvar bir hastalığıdır. Çevresel ve genetik risk faktörlerinin etkisi sonucunda oluşan bu inflamasyon bronş hiperreaktivitesine ve diffüz reverzibl hava yolu obstrüksiyonuna yol açar (52,56).

1970'lerden beri astım prevalansı önemli ölçüde artmıştır. DSÖ dünyada 300 milyon astım hastasının olduğunu hastalarının yaş ortalamasının 18 olduğunu bildirmektedir. Türkiye'de ise ortalama 7.5 milyon kişinin astım hastası olduğu tahmin edilmektedir (7). Hastalık öksürük, çabuk yorulma ve sürekli görülen nefes darlığı gibi semptomlarla fark edilmektedir.

Astım hastalığında birçok gen rol oynamaktadır (1). Aynı çevresel faktörler içerisinde bulunan bireylerin genetik yapılarındaki küçük farklılıklar (polimorfizmler) bireylerde farklı sonuçların gözükmesine neden olmaktadır. Bu polimorfizmler fizyolojik fonksiyonlara etki ederek bireyler arasında hastalıklara karşı değişik yatkınlık düzeyleri oluştururlar (24).

SPINK5 gen polimorfizimleri astım hastalıklarının gelişmesinde önem kazanmaktadır. Yapılan çalışmalardan bazılarında hastalarda SPINK5 geni incelendiğinde G206A ve G1258A varyant oranları yüksek bulunmuşken, bazılarında da bu oranın farklı olmadığı bulunmuştur (59).

Astım hastalığında, serum IgE düzeyi, aeroallerjenlere karşı deri testi cevabı, bronşial hava yolu duyarlılığı, solunum fonksiyon testlerinin cevabı ve steroid bağımlılığı gibi fenotipik özellikler atopik ve nonatopik astım patolojisinin gelişiminde önemlidir. Astım tanısı almamış ve herhangi bir semptomu olmayan bireylerde son bir yıl içinde tekrarlayan nefes darlığı, gece öksürmesi ile karakterize astım atakları, aeroallerjenlere karşı deri cevabı ve metakolin testine karşı havayolu duyarlılığı gibi astımın fenotipik özellikleri ile SPINK5 gen polimorfizmi arasında herhangi bir ilişki mevcut değilken; astım hastalığı tanısı almış bireylerdeki yukarıda sayılan astımın fenotipik özellikleri ile SPINK5 reseptör geninin lokalize olduğu 5q31-33 kromozmu arasında belirgin bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (59).

Astım hastalığının da dahil olduğu kronik obstrüktif akciğer hastalıkları (KOAİ) gibi kompleks yapıdaki poligenik hastalıkların, polimorfizmden kaynaklanan çeşitli genetik olaylara bağlı patolojiler ile yakın ilişkisi tespit edilmiştir (63).

Çin’de yapılan bir çalışmada Liu ve ark. SNP de G alelinin çalışma gruplarında astım duyarlılığını önemli ölçüde arttırdığını ve G206A polimorfizminin astım duyarlılığıyla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (59). Jangopier ve ark. Hollanda’da yaptıkları çalışmada SPINK5 ile astım ve atopik dermatit arasında hiçbir ilişki bulamamışlardır. (58). Kato ve ark. G1258A içeren SPINK5’in 13. ve 14. eksonlarında sekiz eş olmayan SNP analiz etmişlerdir ve Japonlarda yapılan bu çalışmada yedi SNP’nin astım ve atopik dermatit ile pozitif ilişkisi olduğunu bulmuşlardır (64). Kabesch ve ark. Almanya’da okul çocuklarında yaptıkları bir çalışmada astım ve atopik dermatitin beraber meydana gelmesinin yanı sıra SPINK5 in doğrudan astm ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (65). Folster- Holst ve ark. Kuzey Almanya popülasyonunda dört eş olmayan SNP genotiplemişlerdir ve SPINK5 ile astım arasında hiçbir ilişki bulamamışlardır (66). Birbiriyle uyuşmayan bu bulgular muhtemelen çeşitli toplumlarda farklı genetik ve çevresel faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bizim çalışmamızda astım şikayeti ile Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalına başvuran ve yapılan tetkikler sonucu astım oldukları saptanan 66 hasta grubu ile 74 kontrol grubu olmak üzere toplam 140 kişide G-206A ve G-1258A gen polimorfizmleri incelendi.

İki grubun klinik parametreleri incelendiğinde cinsiyet, baş ve burun şikayetleri, göğüs şikayeti, ailede astım ve yaş beklendiği gibi istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuşken ($p<0.05$), G-206A polimorfizmi için AA, GA ve GG allellerinin sıklığı astımlı hasta grubunda sırasıyla 3 (% 5), 6 (% 9) ve 57 (% 86) bulunmuşken; kontrol grubunda sırasıyla 6 (% 8), 23 (% 31) ve 45 (% 60) bulunmuştur. Ki-kare Testi değerlerine bakıldığında astımlı hasta grubu ile kontrol grubu arasında G-206A polimorfizmi açısından anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Yine G-1258A polimorfizmi için AA, GA ve GG allellerinin sıklığı astımlı hasta grubunda sırasıyla 10 (% 15), 25 (% 38) ve 31 (% 47) bulunmuşken; kontrol grubunda sırasıyla 23 (% 31), 40 (% 54) ve 11 (% 15) bulunmuştur. Ki-kare Testi değerlerine bakıldığında astımlı hasta grubu ile kontrol grubu arasında G-1258A polimorfizmi açısından anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.001$).

SONUÇLAR

Çalışmaya alınan astımlı hasta ve kontrol gruplarının yaş, cinsiyet, FVC, FEV₁, baş ve burun şikayetleri, göğüs şikayeti klinik bulguları belirlendikten sonra çalışma Biyofizik Anabilim Dalında başlatılmıştır.

Bizim çalışmamızda astım şikayeti ile Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Ana Bilim Dalına başvuran ve yapılan tetkikler sonucu astım oldukları saptanan 66 hasta grubu ile 74 kontrol grubunun G-206A ve G-1258A gen polimorfizmleri incelendi.

Bu polimorfizmlerden G-206A polimorfizmi için AA, GA ve GG allellerinin sıklığı astımlı hasta grubunda sırasıyla 3 (% 5), 6 (% 9) ve 57 (% 86) bulunmuşken; kontrol grubunda sırasıyla 6 (% 8), 23 (% 31) ve 45 (% 60) bulunmuştur. Ki-kare Testi değerlerine bakıldığında Astımlı hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$).

G-1258A polimorfizmi için ise AA, GA ve GG allellerinin sıklığı astımlı hasta grubunda sırasıyla 10 (% 15), 25 (% 38) ve 31 (% 47) bulunmuşken; kontrol grubunda sırasıyla 23 (% 31), 40 (% 54) ve 11 (% 15) bulunmuştur. Ki-kare Testi değerlerine bakıldığında astımlı hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.001$).

Çalışma sonucunda elde edilen bu değerler G-206A ve G-1258A gen polimorfizmlerinin astım üzerinde etkili olduğu yönünde bilgi vermektedir.

Birçok çalışmada da görüldüğü gibi G-206A ve G-1258A polimorfizmlerinin astım üzerindeki etkileri açısından farklı sonuçlar bulunmuştur. Bu genetik çalışmalardaki çeşitliliğin etnik farklılıklardan veya hasta ve kontrol grupları için farklı seçim kriterlerinin olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, SPINK5 gen polimorfizmi astım ve astımın ciddiyeti ile ilişkilendirilmiştir. Ancak çalışmadaki karşıt sonuçların nedenleri tam olarak açık olmamakla beraber çalışma gruplarının seçildiği popülasyonlar veya özellikle astımın en önemli fenotipik özelliği olan bronşial havayolu duyarlılığının tanımlanmasındaki farklılıklardan

kaynaklanabileceği üzerinde durulmalıdır. Ek olarak, sağlıklı popölasyonlara ait farklı alel frekanslarının da tespit edilmesinin önemli olduğu vurgulanmaktadır.

İleride çalışmanın geliştirilmesi ve çalışmaya devam edilmesi tasarlanmaktadır.

ÖZET

Astım; mast hücreleri, eozinofiller ve T-lenfositler gibi çok sayıda inflamatuvar hücrenin rol oynadığı hava yollarının kronik inflamatuvar bir hastalığıdır. Kronik enflamasyon, hava yollarında aşırı duyarlılığa neden olarak özellikle gece veya sabaha karşı gelişen, tekrarlayıcı özellik gösteren öksürük, nefes almada zorlanma, göğüste tıkanma hissi ve hırıltılı solunum atakları ile karşımıza çıkar. Bu ataklar yaygın olmakla birlikte kendiliğinden veya ilaçlar ile düzelen geri dönüşümlü değişken hava yolu obstrüksiyonu ile seyreder.

Astım ve alerjik fenotipleri, 5q kromozomu ile ilişkisi olduğu bilinen kompleks genetik hastalıklardır. Bu bölgede pek çok aday gen astım ve atopik dermatit ile ilişkilendirilmiştir. IL4, IL13, CD14, ADRB2, LTC4S birçok toplumda astım fenotipi ile ilişkilendirilmiş aday genlerdir. Serin proteaz inhibitör kazal-tip 5 (SPINK5) enzimi, substrat bağlama bölgelerinde bulunan peptid bağlarını parçalamak amacıyla aktif serinleri kullanan enzimleri inhibe eden serin proteaz inhibitörünü kodlar. Yapılan genetik çalışmalar, 5q32 kromozomunda bulunan SPINK5 astım, netherton sendromu ve atopik hastalıklarla ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Yapılan çalışmalar SPINK5'in Asn368Ser, Asp386Asn, Glu420Lys ve Glu825Asp gen polimorfizmlerinin astım hastalarında rolü olabileceği anlaşılmasıyla G-1258A ve G206A polimorfizmlerinin bir rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıklarına başvuran erişkin astım hastalarında SPINK5 geninin G-206A ve G-1258A polimorfizmlerinin sağlıklı kontrollere göre dağılımlarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışma 66 hasta ve 74 kontrol grubu içermektedir. G-206A ve G-1258A gen polimorfizmleri polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon fragmant uzunluk polimorfizmi yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda G-206A ve G-1258A gen polimorfizmlerinin astım gelişmesinde genetik risk faktörlerinin istatistiksel olarak anlamlı oldukları belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Astım, SPINK5 geni, polimorfizm

SUMMARY

Asthma is a chronic airway inflammatory illness in which a large number of inflammatory cells such as mast cells, eosinophils and T-lymphocytes play significant roles. Especially at night or in the early morning, chronic inflammatory causes significant sensibility in airways and it has symptoms such as recurrent cough, laboured breathing, thoracic occlusion, breathe noisily. These symptoms are common and progress in reversible airway obstruction cured itself or by medicines.

Asthma and allergic phenotypes are known as complex genetic disease related with 5q chromosome. In this area, many candidate genes are associated with asthma and atopic dermatitis. In many societies IL4, IL13, CD14, ADRB2, LTC4S are candidate genes associated with asthma phenotype. Serine inhibitor kazal-type 5 enzyme (SPINK5) encodes serine protease inhibitor which inhibits the enzymes using the active serine enzymes in order to break up peptide bonds inside substrate bounding areas. Genetic studies showed that SPINK5 gene, found in 5q32 chromosome, may have relationship with asthma, netherton syndrome and atopic diseases.

Studies show that Asn368Ser, Asp386Asn, Glu420Lys and Glu825Asp gene polymorphisms of SPINK5 gene may have roles in asthma disease. Thus, it can be considered that G206A and G-1258A gene polymorphism may suggest a role in asthma disease.

In this study, it was aimed to inspect the distribution of G206A and G-1258A gene polymorphisms of SPINK5 gene in adult asthma patients who consulted to Trakya University Faculty of Medicine Chest Diseases Department compared to healthy controls.

The study consists of 66 patients and 74 control groups. G-206A and G-1258A gene polymorphisms have been identified by using the methods of polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism.

In our study, G-206A and G-1258A gene polymorphisms were found significant genetic risk factors in asthma progression.

Key Words: Asthma, SPINK5 gene, polymorphism

KAYNAKLAR

1. Türktas H, Türktas İ, Astım. Bozkır Matbaacılık, Ankara 1998; 49-69.
2. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2009. www.ginasthma.org.
3. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2008. www.ginasthma.org.
4. Zeyrek D. Astım Bronsiale Tanılı Çocuklarda IL-1 β ve IL-1 reseptör antagonisti gen polimorfizmi. (Tez): İzmir: Ege Üniversitesi; 2006.
5. Barış İ, Şahin A, Çöplü L, Emri S, Selçuk Z, Savcı S. Astmaya Karşı 5000 Yıllık Çare Arayışı. In: Kalyoncu A.F, (Editör). Bronş Astması, 2. Baskı. Ankara: Kent Matbaacılık; 1996; s.9-13.
6. WHO Director-General warns that asthma is on the rise "everywhere" Sixty-first World Health Assembly, 19-24 May 2008.
7. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. Lancet 1998; 351:1225-32.
8. Turktas İ, Selçuk Z, Kalyoncu A. Prevalence of Asthma Associated Symptoms in Turkish Children. Turk J Pediatr; 2001; 43:1-11.
9. Uğuz A, Ustunlu H, Yuzbey S, Coşkun M, Yoldaş B, Yegin O. Antalya bölgesinde okul çocuklarındaki astım, rinit ve egzema prevalansı. IX. Ulusal Allerji ve Klinik İmmunoloji Kongresi Özet Kitabı s.34, Antalya, 2000.
10. Kalyoncu A, Karakoca Y, Demir A, Alpar R, Shehu V, Cöplü L, et al. Prevalence of asthma and allergic diseases in Turkish university students in Ankara. Allergol Immunopathol; 1996; 24:152-7.
11. Yıldız F, Ilgazlı A, Ozkarakas O, Celikoğlu M. Epidemiology of asthma among university students in an industrial city Kocaeli-Turkey: preliminary data. ERS Annual Congress Abstract Book p. 199, İsviçre, 1998.
12. T.C.Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Hıfzısıhha Merkezi Müdürlüğü Başkent Üniversitesi Ulusal Hastalık Yüğü ve Maliyet Etkililik Projesi Hastalık Yüğü Final Rapor, Aralık 2004.

13. Kurt E, Metintaş S, Basyiğit I, Bulut I, Coşkun E, Dabak S, et al. Prevalence and risk factors of allergies in Turkey (PARFAIT): result of a multicentre Cross-sectional study in adults. *Eur Respir J* 2009; 33: 724-33.
14. Viegi G, Annesi I, Matteelli G. Epidemiology of Asthma. *Eur Respir Mon* 2003; 23: 1–25.
15. Pratt PC. Bronchial Asthma. In: Saldana MJ (Eds). *Pathology of Pulmonary Disease Philadelphia: JB Lippincolt* 1994; 29: 309-306.
16. Roche WL. The pathology of bronchial asthma. In: Hasleton PS (Eds). *Spencer's Pathology of the lung 5th eds. New York: Mc Graw-Hill Health Profession Division* 1996; 22: 695-706.
17. Travis WD, Colby TV, Koss MN, Rosado-de- Christensen ML, Müller NL, et al. *Obstructive pulmonary diseases. 1st ed. Washington DC AFIP boks* 2002; 10: 457-471.
18. Jeffery PK. Pathology of asthma. *Br. Med. Bull.* 1992; 48 (1): 23-29.
19. Chetta A, Foresi A, Del Donno M, Bertorelli G, Pesci A, Olivieri D. Airways remodelling is a distinctive feature of asthma and is related to severity of disease. *Chest* 1997; 111:852-857.
20. Chu HW, Halliday JL, Martin RJ, Leung DY, Szeffler SJ, Wenzel SE. Collagen deposition in large airways may not differentiate severe asthma from milder forms of the disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1936-1944.
21. Gizycki MI, Adellroth E, Rogers AV, O'Byrne PM, Jeffery PK. Myofibroblast involvement in the allergen –induced late response in mild asthma. *Am J Respir Mol Biol* 1997; 16: 664- 673.
22. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2007. www.ginaasthma.org.
23. Ober C. Perspectives on the past decade of asthma genetics. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116 (2):274-278.
24. Holgate ST. Genetic and environmental interaction in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:1139-1146.
25. Sackesen C, Karaaslan C, Keskin O, Tokol N, Civelek E, Soyer OU, et al. The effect of polymorphisms at the CD14 promoter and the TLR4 gene an asthma phenotypes in Turkish children with asthma. *Allergy* 2005; 60: 1485-1492.
26. Strachan DP. High fever, hygiene and household size. *BMJ* 1989; 299:1259-1260.
27. Yıldırım N. Patogeneze genel bakış. Gemicioğlu B. (Edt.) *Tanımdan Tedaviye Astım. İstanbul: Turgut Yayıncılık*, 2005; 55-75.
28. Kopelman GH, Meijer GG, Bleecker ER, Postma DS. Genetics of asthma. Clark TJH, Godfrey S, Lee TH, Thomson NC (Eds) *Asthma. Arnold, London*, 2000. p.146-174.

29. Lassalle P, Gosset P, Delneste Y. Modulation of Adhesion Molecule Expression on Endothelial Cells During The Late Asthmatic reaction: Role of Macrophage-Derived Tumour Necrosis Factor Alpha. *Clin Exp Immunol* 1993; 94:105-10.
30. Guler N, Kirerleri E, Ones U, Tamay Z, Salmayenli N, Darendeliler F. Leptin: does it have any role in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:254-9.
31. Expert Panel Report 2. Guidelines for the diagnosis and management of asthma. National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health. Bethesda, Maryland, USA. Publication no. 97-4051, July 1997.
32. Mathison DA. Asthma in adults. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW (Eds). *Allergy* (volume 2). 5th ed. St Louis, Missouri: Mosby Year Book Inc, 1998; 901-926.
33. Sherill D, Stein R, Kurzius-Spencer, Martinez F. On early sensitization to allergens and development of respiratory symptoms. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:905-911
34. Björkstén B. The environmental influence on childhood asthma. *Allergy* 1999; 54:17-23
35. Mygling N, Dahl R, Pederson S, Pederson KT. *Allergens: Characteristics and determination*. Second edition Blackwell Science limited in *Essential allergy*. 1996; 81-99.
36. Bavbek S. Astım epidemiyolojisi ve risk faktörleri, Anlar Y.F, Kalaycı Ö. Astımda immunopatolojik mekanizmalar. *T Klin Allerji Astım* 2000; 2: 57-72.
37. Lundback B. Epidemiology of rhinitis and asthma. *Clin Exp Allergy* 1998; 28 (2): 3-10.
38. Svanes C, Jarvis D, Chinn S, Burney P. Childhood environment and adult atopy results from the European Community Respiratory Health Survey. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 415-20.
39. Çımrın AH. Meslek Astımı- Türkiye Gerçeği. *Toraks Dergisi* 2000; 1: 87-89.
40. Özlü T, Metintas M, Karadağ M, Kaya A. *Solunum Sistemi ve Hastalıkları*. Cilt 1. İstanbul Tıp Kitabevi 2010. ISBN-978-9944-211-87-1; 583-660.
41. Blanc PD, Toren K. How much adult asthma can be attributed to occupational factors? *Am J Med* 2002; 44: 585-590.
42. Nicholson PJ, Cullinan P, Taylor AJ, Burge PS, Boyle C. Evidence based guidelines for the prevention, identification, management of occupational asthma. *Occup Environ Med* 2005; 62: 290-299.
43. Sastre J, Vandenplas O, Park HS. Pathogenesis of occupational asthma. *Eur Respir J* 2003; 22: 364-373.

44. Selcuk ZT, Caglar T, Enunlu T, Topal T. The prevalence of allergic diseases in primary school children in Edirne, Turkey. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 262-9.
45. Alper Z, Sapan N, Ercan I, Canitez Y, Bilgel N. Risk factors for wheezing in primary school children in Bursa, Turkey. *Am J Rhinol* 2006; 20: 53-63.
46. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999; 354:541-5.
47. Kunzli N, Kaiser R, Medina S, Studnicka M, Clonel O, Filliger P, et al. Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment. *Lancet* 2000; 356(9232):795-801.
48. Wahlgren DR, Hovell MF, Meltzer SB, Hofstetter CR, Zakarian JM. Reduction of environmental tobacco smoke exposure in asthmatic children. A 2-year follow-up. *Chest* 1997; 111: 81-8.
49. Stein MD, Weinstock MC, Herman DS, Anderson BJ. Respiratory Symptom Relief Related to Reduction in Cigarette Use. *J Gen Intern Med* 2005; 20:889-94.
50. Levy ML, Fletcher M, Price DB, Husten T, Halbert RJ, Yawn BP. International Primary Care Respiratory Group (IPCRG) Guidelines: diagnosis of respiratory diseases in primary care. *Prim Care Respir J* 2006; 15: 20-34.
51. Yssel H, Abbal C, Pene J, Bousquet J. The role of IgE in asthma. *Clin Exp Allergy* 1998; 28 Suppl 5: 104-9.
52. Türk toraks derneği astım ve alerji çalışma grubu. Tanım ve genel bakış. *Astım Tanı ve Tedavi Rehberi*. 2009; (ek:10):6-9
53. Killian KJ, Watson R, Otis J, St Amand TA, O'Byrne PM. Symptom perception during acute bronchoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:490-6.
54. Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2006. www.ginasthma.org.
55. Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the diagnosis and management of asthma-full Report 2007, *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 94-138.
56. Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood. *Lancet*. 2006 Aug 26; 368(9537): 733-43.
57. Tanım ve Genel bakış. Haluk Türkteş (Edt.). *Küresel astım önleme ve tedavi girişimi*. İstanbul. 2007; 2-13.
58. Jongepier H, Koppelman G, Nolte I, Bleecker E, Meyers D, Meerman G, et al. Polymorphisms in SPINK5 are not associated with asthma a Dutch Population Mechanisms of asthma and allergic inflammation Vol. 2005; 115, No.3 pp.486-491.

59. Liu Q, Xia Y, Zhang W, Li J, Wang P, Li H, et al. A functional polymorphism in the SPINK5 gene is with asthma in a Chinese Han Population. *BMC Medical Genetics* 2009; 1471-2350-10-59.
60. Murray NE. Type I Restriction Systems: Sophisticated Molecular Machines. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 412-34.
61. Pingoud A, Jeltsch A. Recognition and Cleavage of DNA by Type II Restriction Endonucleases. *Eur J Biochem* 1997; 246:1-22.
62. Ay A. Hipertansiyonlu Hastalarda Anjiyotensinojen M235T/T174M Gen Polimorfizminin Araştırılması (Tez). Edirne: Trakya Üniversitesi;2007.
63. Ho LI, Harn HJ, Chen CJ, Tsai NM. Polymorphism of the B₂-Adrenoceptor in COPD in Chise subjects, *Chest*, 2001; 120,1493-9
64. Kato A, Fukai K, Oiso N, Hosomi N, Murakami T, Ishii M. Association of SPINK5 gene polymorphisms with atopic dermatitis in the Japanese population. *Br J Dermatol* 2003, 148: 665-669.
65. Kabesch M, Carr D, Weiland SK, Mutius E. Association between polymorphisms in serine protease inhibitor, kazal type 5 and asthma phenotypes in a large German population sample. *Clin Exp Allergy* 2004, 34:340-345.
66. Folster-Holst R, Stoll M, Koch WA, Hampe J, Christophers E, Schreiber S. Lack of association of SPINK5 polymorphisms with nonsyndromic atopic dermatitis in the population of Northern Germany. *Br J Dermatol* 2005, 152:1365-1367.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER	Sayfa
Şekil 1: Astımda hava yollarındaki inflamatuvar cevap ve yeniden yapılanma	5
Şekil 2: Astımın Ortaya Çıkmasındaki Faktörler	8
Şekil 3. Kromozom 5q32	12
Şekil 4: PZR döngüsü	17
Şekil 5: Hasta ve kontrol DNA örneklerinin %0.8 lik agaroz jelde yürütülmesi ve UV ışık altında görüntülenmesi	21
Şekil 6: G-206A polimorfizmini gösteren EtBr ile boyanan % 3'lük agaroz jel görüntüsü	22
Şekil 7: G-1258A polimorfizmini gösteren EtBr ile boyanan % 3'lük agaroz jel görüntüsü	23
Şekil 8: G-206A bölgesinin cinsiyetlere göre genotip dağılımı	24
Şekil 9: G-1258A bölgesinin cinsiyetlere göre genotip dağılımı	25

TABLolar	Sayfa
Tablo 1: Astımın stabil dönemde semptomlar ve fonksiyonel parametrelere göre sınıflaması	11
Tablo 2: SPINK5 geninde G-206A ve G-1258A polimorfizmlerinin gözlemlendiği promotör bölgesini çoğaltmada kullanılan primerler	17
Tablo 3: PZR İçin Hazırlanan Karışımlar	18
Tablo 4: PZR İçin Gerekli Koşullar	18
Tablo 5: G-206A ve G1258A için kontrol ve hasta gruplarının klinik bulguları	21
Tablo 6: G-206A genotiplerinin hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı	23
Tablo 7: G-1258A genotiplerinin hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı	24
Tablo 8: Cinsiyete göre grupların dağılımı	25
Tablo 9: Yaşa göre grupların dağılımı	26
Tablo 10: Yaş, Göğüs ağrısı ve baş-burun şikayeti olan hastalar arasında yapılan lojistik regresyon analizi	26

ÖZGEÇMİŞ

Orhan ERKAN

Doğum Tarihi: 24.12.1988

EĞİTİM:

1994-1999 İstanbul, Abdurrahmangazi İlkokulu

1999-2002 Yalova, Zübeyde Hanım Ortaokulu

2002-2005 Yalova, Yalova Lisesi

2006-2010 Kahramanmaraş, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fizik Bölümü Lisans

2010- 2013 Edirne, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Yüksek Lisansı

YAYINLAR:

Ulusal Kongre ve Sempozyum Bildirileri:

- 1. Erkan O**, Karlıkaya C, Sipahi T, Çetinsu V. Astım Hastalarında SPINK5 G206A Gen Polimorfizminin araştırılması. 24. Ulusal Biyofizik Kongresi 25-28 Eylül 2012 Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul.
- Ünlü A, **Erkan O**, Yükçü F, Sipahi T. Kazal Tip 5 Serin Proteaz İnhibitörünün Modellenmesi. 24. Ulusal Biyofizik Kongresi 25-28 Eylül 2012 Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul.
- Gülyaşar T, **Erkan O**, Çakına S, Karlıkaya C, Sipahi T. Astım Hastalarında Eser Element Serum Düzeyleri. 24. Ulusal Biyofizik Kongresi 25-28 Eylül 2012 Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul.
- Yükçü F, **Erkan O**, Ünlü A, Karlıkaya C, Sipahi T. Astım Hastalarında Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnsersiyon/Delesyon Gen polimorfizminin Araştırılması. 24. Ulusal Biyofizik Kongresi 25-28 Eylül 2012 Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul
- Yamasan B, Bakay D, Ünlü A, **Erkan O**, Karlıkaya C, Sipahi T. Astım Hastalarında Endotelial Nitrik Oksit Sentaz İntron 4 VNTR Gen polimorfizminin araştırılması. 24. Ulusal Biyofizik Kongresi 25-28 Eylül 2012 Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul.

EKLER

T.C. TRAKYAÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMA DEĞERLENDİRME KOMİSYONU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU		TUBADK 2011/140			
	PROTOKOL ADI		Astım Hastalarında SPINK 5 Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi			
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI		Yrd. Doç. Dr. Tammam SİPAHİ			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ					
	DESTEKLEYİCİ					
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER		<input checked="" type="checkbox"/> Tek Merkez	<input type="checkbox"/> Çok Merkez		
		<input type="checkbox"/> Ulusal	<input type="checkbox"/> Uluslararası			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 13/ 13			Tarih: 22.06.2011		
	Üniversitemiz Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Tammam SİPAHİ'nin sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Orhan ERKAN'ın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmaya ilişkin giderlerin T.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP) tarafından karşılanması koşuluyla gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun yetersizliği ile karar verilmiştir.					
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI		Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TUBADK Yönergesi				
ÜYELER						
Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ Başkan	Tıbbi Farmakoloji	T.Ü.T.F. Farmakoloji A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hasan ÜMİT Başkan Yardımcısı	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	İznilidir
Doç. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Üye	Çocuk Sağ. ve Hast.	T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyostatistik	T.Ü.T.F. Biyostatistik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Biyoloji	T.Ü.T.F. Tıbbi Biyoloji A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Tunç KUTOĞLU Üye	Anatomi	T.Ü.T.F. Anatomi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	İznilidir
Doç. Dr. Erhan TABAKOĞLU Üye	Göğüs Hastalıkları	T.Ü.T.F. Göğüs Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Figen KULOĞLU Üye	Enfeksiyon Hastalıkları	T.Ü.T.F. Enfeksiyon Hastalıkları A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ömer Nuri PAMUK Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yener YÖRÜK Üye	Göğüs Cerrahisi	T.Ü.T.F. Göğüs Cerrahisi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Recep YAĞIZ Üye	Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları	T.Ü.T.F. K.B.B. Hast. A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ümit Nusret BAŞARAN Üye	Çocuk Cerrahisi	T.Ü.T.F. Çocuk Cerrahisi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	İznilidir
Yrd. Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Avukat Gülden ATILLA ÖZTÜRK Üye		T.Ü. Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Murat DİKMENLİ
Dekan



T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı

SAYI : B.30.2.TRK.0.73.00.00/4243-14309
KONU :

EDİRNE

28 FEB 2011

Sayın Yrd. Doç. Dr. Tammam SİPAHİ
Trakya Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı
EDİRNE

Yöneticiliğini yapmış olduğunuz yüksek lisans öğrencisi Orhan ERKAN'ın "Astım Hastalarında SPINK5 Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması" başlıklı yüksek lisans projesinin, 12 (on iki) ay süre ve 6.970,00 TL ile desteklenmesine, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 12.07.2011 tarih ve 2011/05 sayılı toplantısında mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi'nin 12. maddesi uyarınca düzenlenen ve ekte sunulan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Sözleşmesi'nin tarafınızca imzalanarak 1 (bir) hafta içinde Rektörlüğe iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Beyhan KARAMANLIOĞLU
Rektör Yardımcısı ve
Komisyon Başkanı

EK: 1 adet protokol sözleşmesi