

T. C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

**ÇOCUKLARDA İDRAR YOLU ENFEKSİYONUNDA VİTAMİN D
RESEPTÖR GEN POLİMORFİZMİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Şule YILDIRIM

Tez Danışmanı
Doç. Dr. İpek AKİL

Manisa, 2010

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerimden faydalandığım ve tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm tez danışmanım Sayın Doç. Dr. İpek AKİL'e, bilgi ve deneyimleriyle eğitimime katkıda bulunan Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ali ONAĞ'a ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Betül ERSOY'a, Prof. Dr. Erhun KASIRGA'ya, Prof. Dr. Hasan YÜKSEL'e, Doç. Dr. Şenol COŞKUN'a, Doç. Dr. Pelin ERTAN'a, Doç. Dr. Hüseyin GÜLEN'e, Doç. Dr. Muzaffer POLAT'a, Dr. Nermin TANSUĞ'a, Yrd. Doç. Dr. Aykan ÖZGÜVEN'e, her zaman yardım ve desteklerini gördüğüm başta Uzm. Dr. Özge YILMAZ, Uzm. Dr. Bayram ÖZHAN ve Uzm. Dr. Gülseren ŞAHİN olmak üzere tüm uzmanlarıma, asistanlığım boyunca yıpratıcı ve stresli dönemleri birbirimize destek olarak atlattığımız, iyi ve kötü günler geçirdiğimiz ve birlikte çalışmaktan keyif aldığım asistan arkadaşlarıma, hemşire arkadaşlarıma ve diğer pediatri kliniği çalışanlarına, tezimin genetik çalışmalarını fedakarlıkla yürüten Dr. Gülçin İtirli ASLAN'a, tezimin ekspresyon çalışmaları için laboratuvar desteği sağlayan Doç. Dr. Fatma TANELİ'ye ve ekspresyon çalışmaları sırasında büyük emek ve zaman harcayan Sayın Emre TEPEDELEN'e, tezimin istatistikleri için yardımcı olan Uzm. Dr. Beyhan CENGİZ ÖZYURT'a,

En büyük destekçilerim, bugünlerimin mimarları, varlıkları en büyük hazinem olan anneme ve babama, manevi desteğini hep yanımda hissettiği kardeşim Murat'a,

Ne yaparsam yapayım koşulsuz yanımda olan ve bunu hissettiren, sıkıntılılarımı en hafif şekilde atlatmamı sağlayan, hayatımın en doğru kararı, mutluluğumun kaynağı, kelimelerin anlatmaya yetemeyeceği biricik eşim Ahmet YILDIRIM'a,

Ve sevgimizin meyesi, neşe kaynağımız, kızımız Fatma Elif'e,

TEŞEKKÜR EDERİM...

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
KISALTMALAR	IV
I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
1. İdrar yolu enfeksiyonu	3
1.1. Tanım	3
1.2. İYE Epidemiyolojisi	3
1.3. Yineleyen İYE	4
1.4. İdrar Yolu Enfeksiyonlarında Sorumlu Etkenler	4
1.5. İYE Patogenezi	4
1.6. Çocuklarda İdrar Yolu Enfeksiyonuna Yatkınlık	5
2. Vitamin D, Vitamin D Reseptörü, Vitamin D Reseptör Gen Polimorfizmleri	9
2.1. Vitamin D Metabolizması	9
2.2. VDR	9
2.3. VDR Gen Polimorfizmleri	10
3. D Vitamini-İmmün Sistem-İYE İlişkisi	13
III. GEREÇ VE YÖNTEM	16
IV. BULGULAR	34
V. TARTIŞMA	49
VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	56
VII. ÖZET	57
VIII. İNGİLİZCE ÖZET	58
IX. KAYNAKLAR	59

KISALTMALAR

- AMP:** Antimikrobiyal peptit
CAMP: Katelisidin antimikrobiyal peptit
DMSA: Dimerkaptosüksinik asit
İYE: İdrar yolu enfeksiyonu
LPS: Lipopolisakkarit
RFLP: Restriksiyon fragmentleri uzunluk polimorfizmi
SD: Standart sapma
SNP: Skar negatif pyelonefrit
SPP: Skar pozitif pyelonefrit
TLR: Toll-like reseptör
TNP: Tek nükleotid polimorfizmi
UTR: Translasyona uğramayan bölge
VDBP: Vitamin D bağlayıcı protein
VDR: Vitamin D reseptör
VDRE: Vitamin D'ye yanıt veren elemanlar
VUR: Vezikoüreteral reflü
1,25 (OH)₂ D: 1,25-dihidroksi D vitamini

I. GİRİŞ VE AMAÇ

İdrar yolu enfeksiyonu (İYE) çocuklarda sık görülen enfeksiyonlar arasındadır. Çocukluk çağı populasyonunun %10'unu etkilemekte ve önemli morbiditeye yol açmaktadır (1). Semptomatik İYE'ler; mesaneye ve üretraya lokalize alt İYE (sistit, üretrit) ve üreter, toplayıcı sistem ve parankim (pyelonefrit) enfeksiyonu gibi üst İYE olarak sınıflandırılabilir (2). Bu tür bir sınıflandırmanın önemi renal parankim enfeksiyonu durumunda renal skar riski olması, bu nedenle daha yoğun tedavi ve daha uzun süreli takip gerektirmesidir (3).

Üriner sistem hasarında inflamasyon kaskadı bakterinin üroepitelyal hücrelere bağlanmasıyla başlar. Bu hücrelerin aktivasyonu sonucu inflamasyon mediyatörleri salınır ve epitelyal hücrelerde kemokin reseptör ekspresyonu artar. Epitelyal bariyer altında inflamatuvar hücre birikimi, makrofaj aktivasyonu, akut faz reaktan proteinlerinin salınımı ve mesengial hücrelerde proliferasyon başlar (4). Pyelonefriti takiben gelişen renal skarın patogenezi halen tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla beraber vezikoüreteral reflü varlığı, yaş, üropatojen bakterilerin virulansı, üroepitelin inflamatuvar cevabı ve bunu etkileyebilecek inflamatuvar genlere ilişkin genetik polimorfizmlerin renal skar oluşumunda rolü bulunmaktadır.

Gram negatif bakterilerin dış membranında bulunan lipopolisakkaritler (LPS) konakçı cevabını aktive ederken, nitrik oksit ve sitokin üretimini indükler (4). Vasküler endotelial hücreler LPS ve birçok sitokinin kritik hedefleridir. Vasküler endotelin LPS ile aktivasyonu endotelial hücrelerde lökosit adhezyon molekülleri, sitokinler ve kemokinleri içeren çeşitli proinflamatuvar molekülün üretimine sebep olur (5). LPS'ye karşı oluşan inflamatuvar cevap spesifik LPS bağlayan proteinler, CD14 ve Toll-like reseptörler (TLR) arası etkileşim sonucu ortaya çıkar. LPS aracılı immün cevabın aktivasyonunda bütün bu moleküllerin ekspresyonu gereklidir (4). Bu inflamatuvar süreci izleyerek kemotaksis, fagositoz, lizozomal enzimler ve süperoksid salınımı, peroksid ve hidroksil radikallerinin sentezi, tübüler iskemi ve reperfüzyon hasarı gerçekleşir. Bütün bu inflamatuvar kaskat patojenik bakterinin eliminasyonunu sağlayan önemli bir konakçı yanıtıdır ancak bazen paradoksal olarak renal skarla sonuçlanan ve makrofajların temel rol oynadığı doku fibrozisine neden olabilmektedir. Konakçı ve bakteri arasındaki kompleks mekanizmaların

anlaşılması renal skar patogenezindeki bilinmeyen noktaları daha iyi anlamamızı sağlayabilir.

Bazı inflamatuvar moleküllerin gen polimorfizmleri İYE'ye yatkınlıkta ve renal skar oluşumunda önemli olabilmektedir. Daha önceki çalışmalarda farelerde TLR-4 gen polimorfizminin ve insanlarda TGF- β , IL-6 ve IL-8 gen polimorfizmlerinin İYE'ye yatkınlık, enfeksiyonun şiddeti, üroepitelin bakteriye kaşı inflamatuvar cevabı ve postenfeksiyöz renal skar oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir (4, 6-8). Sonuçta gelişen renal skar çocuklarda hipertansiyon ve böbrek fonksiyonlarında kayıpla birlikte renal yetmezliğe yol açmaktadır.

Vitamin D serum kalsiyum ve fosfor homeostazını sağlamanın yanı sıra immün sistem modülasyonunda da etkili bir hormondur. Vitamin D reseptörü (VDR) vitamin D'nin biyolojik işlevlerinde aracılık eden bir nükleer proteindir (9). VDR monositler, aktive B ve T lenfositler tarafından eksprese edilir, monosit ve makrofajları aktive ederken, lenfosit proliferasyonu ve immünglobulin oluşumunu baskılar. VDR gen lokusu insanlarda 12q13.1 bölgesinde bulunmaktadır, 100 kilobaz kadar büyüklüktedir ve çeşitli dokuya spesifik transkriptler oluşturabilen bir genidir (10). VDR geninde 200'den fazla polimorfizm olduğu tahmin edilmektedir. VDR geni içindeki polimorfizmlerden özellikle 4'ü sık rastlanan ve çeşitli metabolik düzenlenmelerle ilişkisi gösterilen polimorfizmlerdir. Bunlar *FokI*, *BsmI*, *ApaI* ve *TaqI* polimorfizmleridir. Bunlardan *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* polimorfizmleri genin 3'translasyona uğramayan bölgesine (UTR=untranslated region) yakın bulunmaktadır. Bunlar poly A bölgesindeki polimorfizm ile bağlantı göstererek mRNA stabilizasyonunu etkilemektedir. *FokI* polimorfizmi translasyonu başlatıcı kodon polimorfizmidir ve D vitaminine yanıt elemanları ile yapılan transkripsiyonel aktivite çalışmaları bu polimorfizmin VDR fonksiyonunu etkilediğini göstermiştir (11). 1,25(OH)₂D₃ proinflamatuvar bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör- κ B (NF- κ B)'nin etkilerini inhibe eder. Mikrodamar endotelial hücrelerinin in vitro vitamin D tedavisi sonucu gram negatif bakteriyel LPS aracılı NF- κ B aktivasyonu ve sitokin salınımının baskılandığı gösterilmiştir (5). Buradan yola çıkılarak mikrobiyal ajanlara kontrolsüz immün yanıt veren ve postenfeksiyöz inflamatuvar yanıt aracılı komplikasyon geliştiren kişilerde 1 α ,25-(OH)₂D₃ sinyalinde disfonksiyon olabileceği öne sürülebilir.

VDR fonksiyonunda bazı VDR alelleriyle sonuçlanan hafif değişikliklerin enfeksiyonlara direnci veya yatkınlığı etkilediği bilinmektedir. Bu araştırmada VDR gen polimorfizmlerinin İYE geçirip geçirmeme, İYE kliniği (alt İYE-pyelonefrit) ve renal skar oluşumunda rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

II. GENEL BİLGİLER

1. İDRAR YOLU ENFEKSİYONU

1.1. Tanım

İYE normal şartlar altında steril olan idrar ve idrar yollarının bakteri, mantar, virus gibi mikroorganizmalarla enfekte olması şeklinde tanımlanmaktadır (3). Bu tanımlama içerisinde enfeksiyonun lokalizasyonu (alt-üst), klinik semptomların olup olmaması (semptomatik, asemptomatik), enfeksiyonun seyri (akut, tekrarlayan) mikroorganizmanın cinsi gibi kriterlerin yer alması önerilmektedir.

1.1.1. Klinik Tanımlamalar

İYE enfeksiyonun lokalizasyonuna göre de sınıflandırılır ve bu sınıflama klinik olarak önemlidir.

a)Sistit

Enfeksiyonun mesane ve üretra gibi alt idrar yollarına lokalize olmasıdır. Ana semptomlar dizüri, sık idrar yapma, sıkışma, suprapubik ağrı gibi lokalize edici semptomlardır (3, 12).

b)Akut pyelonefrit

Ateşle beraber yan ağrısı ana yakınmadır, böbrek parankimi ve toplayıcı sistemin enfeksiyonlarını tanımlamak için kullanılır (3, 12).

1.2. İYE Epidemiyolojisi

İYE çocukluk çağı enfeksiyonları içinde üst solunum yolu enfeksiyonlarından sonra ikinci sırada yer alan bakteriyel enfeksiyondur (12-16). İYE'nin çocuklardaki gerçek insidansını tahmin etmek güçtür. Okul çocuklarında yapılmış geniş çaplı idrar inceleme taramalarında genellikle asemptomatik bakteriüri insidansı kızlarda %0.7-1.95, erkeklerde %0.04-0.2 olarak saptanmıştır (12). Kunin ve arkadaşları kız çocukların yüksek okuldan mezuniyet anına kadar %5'inde bakteriüri gelişeceğini belirtmiştir (17). Semptomatik İYE için yaşam boyu risk kız çocuklarda 3-5 kat daha fazladır (12). İlk İYE insidansı yaşamın ilk bir yılında en yüksektir. İlk bir yılda tanı alan enfeksiyonların çoğunluğu akut pyelonefrittir (3). Nedeni bilinmemekle birlikte ilk aylarda erkek cinsiyette daha sık saptanıp, 3-6.aydan sonra kız cinsiyette sıklık artmaktadır (18, 19). İlk 3 ayda erkek:kız

oranı 2:1'den 5:1'e değişmektedir (20-22). İki yaşın altında ateşli süt çocuklarında cinsiyet ayrımı yapılmaksızın genel görölme sıklığı %3-5 arasında bildirilmiştir (23-25).

Çeşitli epidemiyolojik çalışmalara göre yaşam boyu görölme sıklığı kızlarda %3,3-7,8; erkeklerde %1,1-1,8 olarak bildirilmiştir (26-29).

1.3. Yineleyen İYE

İlk İYE sonrası hastaların %30-40'ında, özellikle de vezikoüreteral reflü (VUR) , üriner obstrüksiyon, mesane divertikülü gibi üriner sistemin anatomik anomalilerinde tekrarlayan İYE görülebilir (30, 31). İYE olan yenidoğanların yaklaşık %25'inde yineleme görölür. Genel olarak kız çocuklarında yineleme riski erkek çocuklarına göre daha fazladır. Yineleyen İYE'lerin de 1/3'ü belirtisiz seyir göstermektedir (26, 27, 32). İşeme disfonksiyonu, mesane instabilitesi, konstipasyon diğer risk faktörleridir (12).

1.4. İdrar Yolu Enfeksiyonlarında Sorumlu Etkenler

İYE'lerde tüm yaş gruplarında en sık saptanan etkenler Gram negatif enterik bakterilerdir. *Escherichia coli* (*E.Coli*) ilk idrar yolu enfeksiyonlarının %80-90'nundan sorumlu olan etkidir (3). Yineleyen enfeksiyonların %70-90'ında *E.coli*'nin etken olduğu bildirilmektedir. Diğer sık rastlanan etkenler arasında *Klebsiella*, *Proteus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterobacter spp* ve *Morganella morganii* yer alır (3, 14, 23, 26, 33-39). *Pseudomonas aureginosa*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* ve *Grup B streptokoklar* da İYE'nin çocuklarda görölün diğer nadir etkenleri arasında yer alır. *Grup B streptokoklar* yenidoğanlarda İYE'nin hemen en sık nedeni iken, *staphylococcus saprophyticus* tipik olarak adölesan kızlarda sık görölür (36).

Fungal enfeksiyonlara daha nadir rastlanmakla birlikte sıklıkla *Candida* türleri etkidir. Hastaların büyük kısmını uzun süre foley kateter takılan, geniş spektrumlu antibiyotik kullanan, diabetes mellituslu olan ve kortikosteroid kullanan hastalar oluşturur (3, 12).

1.5. İYE Patogenezi

Normal şartlar altında üretranın distal ucu hariç üriner sistem sterilidir. Bakterilerin üriner sisteme invazyonunda ve yayılımında iki yol mevcuttur; asendan yol veya hematojen yol. İYE'lerin %99'u asendan yolla meydana gelir. Hematojen yayılım nadir görölmekle birlikte, daha çok sepsis durumunda ve sıklıkla *Staphylococcus aureus* ile oluşur (40, 41).

A.Hematojen Yol

İYE'nin insanlarda hematojen yolla üriner traktusa ve böbreğe ulaşması oldukça nadirdir. Tüm enfeksiyonların %1'inden daha azı hematojen yolla yayılım sonucu ortaya

çıkmaktadır (12). Etken sıklıkla *Staphylococcus aureus*'tur ve oluşan enfeksiyon fokal renal lezyonlara (pyelonefrit, intraparakimal abse, perinefrik abse) yol açar.

B. Periüretal Bakteri Florası ve Asendan Yol

Normal koşullarda üretra, periüretal bölge ve vajen girişindeki flora, üropatojen olarak tanımlanan aerob ve anaerob patojenlerle kolonize olmuştur. Bu bölgede özellikle üretranın distal parçasında *Laktobasiller*, *koagülaz (-) Staphylococcus'lar*, *Cornybacteriumlar* ve %25 oranında aerobik bakteriler bulunmaktadır (3, 12, 42). Bu bakteriler patojenik mikroorganizmalara karşı normal savunmadan sorumludurlar. İYE gelişimindeki ilk basamak bu flora dengesinin bozulması ve gram (-), özellikle *E.coli* ile kolonizasyonun gelişmesidir. Bu durum antibiyotik kullanımı, beslenme durumu, hormonal, metabolik özellikler, kişisel hijyen alışkanlıkları sonucu ortaya çıkabilmektedir (43, 44). İYE gelişiminde ikinci basamak kolonize olan üropatojen bakterilerin transüretal geçiş ile mesaneye ulaşmasıdır. Bakterilerin üretradan mesane içine ulaşmasını etkileyen faktörlerin başında anatomik özellikler gelmektedir. Kız çocuklarda üretranın kısa ve düz oluşu ve ayrıca anüse olan yakınlığı kızlarda İYE'nin daha sık görülmesini açıklayan en önemli nedenlerden birisidir. Erkeklerde prostatik sekresyonlar güçlü bir antibakteriyel etkinlik gösterir. Prostatik sekresyon içindeki ısıya dayanıklı, çinko içeren katyonik proteinler enfeksiyonun engellenmesinde etkindir (3, 12, 43). Üretra ve mesaneye uygulanan girişimler bakteri girişini kolaylaştırmaktadır.

1.6. Çocuklarda İdrar Yolu Enfeksiyonuna Yatkınlık

Bazı çocuklar İYE geçirmeye yatkındır ve sık tekrarlama gösterir. Mikroorganizmaların İYE oluşturabilmesinde patojene ve konağa ait özellikler ve hazırlayıcı faktörler etkilidir

1.6.1. Bakteriye Ait Faktörler

1.6.1.1. Bakteriyel Virulans Faktörleri:

1)Bakteri sayısı: Bakteri sayısı arttıkça enfeksiyonun meydana gelmesi kolaylaşır.

2)Bakteri özellikleri: Normal kolon florasında bulunan üropatojen olmayan *E.Coli*'ye kıyasla üropatojen *E. Coli* bazı spesifik virülans özelliklerine sahiptir;

a) Bakteriel Adezyon (Adezin): Adezyon özellikleri İYE geliştirme potansiyelini belirleyen en önemli özelliklerdir. Adezyon için bakteri yüzeyinde bulunan spesifik reseptörler (adezin veya fimria) ile konak hücre reseptörleri arasında spesifik bir etkileşim olması gerekmektedir. Fimbrialar *E.Coli*'nin üroepitelyal hücreler üzerindeki spesifik glikolipid reseptörlerine bağlanmasını sağlar. Üropatojen *E.Coli*'nin 3 önemli fimbriası vardır; Tip 1 fimbria, Tip 2 fimbria (p fimbria) ve Dr hemaglutin. Tip 1 fimbria mannoz-sensitif hemaglutinasyon gösterir ve mesane epitelyal hücrelerine bağlanır (43). P fimbria

mannoz-dirençli hemaglutinasyon gösterir ve akut pyelonefritle ilişkilidir. Dr hemaglutinin ise sistit gelişimi ile ilişkilidir (45).

b) Hemolizin ve sitotoksik protein: Eritrositler başta olmak üzere polimorfonükleer lökositler ve renal tübüler hücreler içinde toksik olan hemolizin üreten *E.Coli* türleri akut pyelonefrit gelişimi ile ilişkilidir. Benzer şekilde bir sitotoksik protein olan colicin üreten suşlar da artmış virulans gösterir ve pyelonefrite yol açabilir (46-48).

c) Aerobaktin: Üropatojen *E.Coli*'lerde sıklıkla bulunan demir bağlayan bir proteindir. Aerobik metabolizmanın devamı, çoğalma için gereklidir. Akut pyelonefrite neden olan kökenlerde aerobaktin düzeyi asemptomatik bakteriüri yapan kökenlerdekinden daha yüksek bulunmuştur.

d) Kapsüler polisakkarit: Tüm bakteriler için iyi bilinen bir virülans faktörüdür. Kompleman aktivitesi ve fagositoza karşı koruyucu etki gösterir.

e) Endotoksin: Gram negatif bakteri hücre duvarından kaynaklanır, inflamatuvar yanıtı başlatır, ayrıca üriner peristaltizmi azaltarak enfeksiyonun yayılımını kolaylaştırır.

f) Hareketlilik: Hareketli bakteriler idrar akımına rağmen yukarı doğru ilerleyerek üst üriner sisteme kolayca yerleşebilmektedirler.

g) Üreaz: *Proteus* gibi bazı bakterilerin yaptığı İYE ile üreaz üretimi arasında paralellik saptanmıştır.

h) Serotipler: *E.Coli* 3 majör antijen içerir ve bunlar invazivlikle ilişkilidir ve suşun virulansını belirler; O antijen (hücre duvarı dış membranda bulunur), K antijen (kapsül antijeni), H antijen veya flajellar antijen. 150'den fazla O antijen ve 50'den fazla K ve H antijen tanımlanmıştır. Bazı O antijen serogruplarına (1, 2, 4, 6, 7, 8, 16, 18, 25 ve 75) sahip *E.Coli* suşları pyelonefrit gelişimi ile ilişkilidir (49, 50).

i) Bakteriyel genetikler: *E.Coli* virülans faktörlerini kodlayan genlerin çoğu DNA'nın patojenisite adaları (PAIs) olarak bilinen özel parçaları üzerinde kodlanır (51, 52). Bu virülans faktörleri özellikle anatomik ya da fonksiyonel bozukluğu olmayan kişilerde görülen enfeksiyonlarda önemlidir. VUR ya da başka üriner anomalisi olan hastalarda bu faktörlere sahip olmayan bakteriler de enfeksiyon etkeni olabilir.

1.6.2. Konağa Ait Faktörler

1.6.2.1. Konak İnflamatuvar Yanıtı

İYE'nin şiddet ve sonucunu belirleyen önemli bir belirteç böbrek ve üriner sistemde konak tarafından bakteriye karşı oluşturulan yangısal yanıtıdır (53). Bu yanıt patojen bakterinin üriner sistemden uzaklaştırılması için gerekli iken diğer taraftan bu yanıtın fazla olması durumunda renal skar gelişimi söz konusu olabilmektedir. Üropatojen bakteriler

üroepitel hücrelerine yapıştıktan sonra bu hücreleri uyararak yangısal bir yanıt oluştururlar ve sitokin ve kemokin salınımı başlar. İYE'li çocukların idrarında IL-8 ve IL-6 konsantrasyonları artmış olarak bulunmuştur (54, 55). P fimbriaya sahip *E.Coli* ile olan enfeksiyonlarda idrarda bu mediyatörler artmıştır (56). P fimbriyalı *E.Coli*, epitel hücrelerinden sitokin ve kemokin salımında TLR 4 ara yolunu kullanır (57). IL-8, bir diğer adıyla CXC kemokin, nötrofil ve diğer yangısal hücrelerin enfeksiyon bölgesine göçünü düzenler (58). Bunu yaparken üroepitel hücreleri üzerinde bulunan CXR1 ve CXR2 olarak bilinen iki ayrı reseptöre bağlanır. Enfeksiyon durumunda bu reseptörlerin ekspresyonu artar, daha fazla IL-8 bağlanmasına yol açar ve daha fazla nötrofil migrasyonu olur. Nötrofiller damar dışına çıkar, lamina propria ve epitelyal bariyeri geçerek üriner lümene geçer ve piyüriye neden olur (59). Nötrofiller bakterileri öldürür ve enfeksiyonun temizlenmesine yardım eder. Frendeus ve arkadaşları kemokin reseptör ekspresyonunu araştırmış ve tekrarlayan İYE'si olan çocukların nötrofillerinde hücre yüzeyi CXCR1 ekspresyonu ve CXCR1 spesifik mRNA düzeyini düşük saptamışlardır (60).

Bu sonuçlar akut pyelonefrit yatkınlığında konak moleküler faktörlerin önemli rolü olduğunu düşündürmüştür.

1.6.2.2. Üriner Anatomi

Kızlarda üretranın kısa olması nedeniyle asendan yol ile bakterilerin yayılımı daha kolay olup erkeklere oranla İYE'ye daha yatkındırlar. Bu hipotez akla yatkın gözükse de herhangi yazılı bir kanıt yoktur. Dar üretra çapı da kızlarda yatkınlık için sebep olarak bildirilmiş olmasına rağmen internal üretral çapın bakteriürik ve nonbakteriürik çocuklarda farklı olmadığı gösterilmiştir (61, 62). Bu nedenle normal üretra anatomisinin bakterinin mesaneye iletimindeki rolü net olarak anlaşılmamıştır (12).

1.6.2.3. Prepisyum ve Sünnet

Bir çok data sünnetli erkeklerde İYE riskinde dramatik azalma göstermiştir (63, 64). Yine hayatın ilk sekiz haftasında ateşli İYE geçiren erkek bebeklerin %75'inin sünnetsiz olduğu gösterilmiştir (14). Sünnetsiz çocuklarda İYE sıklığının sünnetli çocuklardan 3-7 kat daha fazla oranda saptandığı bildirilmiştir (65-68). Sünnetin İYE sıklığını azaltmasındaki rolü tam olarak açıklanamasa da prepisyumun enteropatojen bakteriler için bir konak olabileceği, bakterilerin non-keratinize prepisyum mukozasına tutunma yeteneklerinin artması olası hipotezler arasındadır (69-71).

1.6.2.4. İşeme Disfonksiyonu

Normal üriner sistem anatomisi ve üriner sistemin intakt nörojenik kontrolüne sahip çocuklarda anormal işeme paterni işeme disfonksiyonu olarak tanımlanır. İYE ve işeme

disfonksiyonu arasındaki ilişki iyi bilinmektedir (28, 72-76). Bu hastalarda mesanenin tam boşaltılmaması mesanede üropatojen bakterilerin akümülyasyonuna ve proliferasyonuna yol açar ve İYE'ye yatkınlık oluşturur (72, 75).

1.6.2.5. Üriner Obstrüksiyon

İYE'li çocuk popülyasyonunda üriner obstrüksiyon insidansı %10 gibi yüksek oranda saptanmıştır (26). Normal şartlarda virulansı az olan patojenler üriner obstrüksiyon durumunda enfeksiyon etkeni olabilirler (21, 23).

1.6.2.6. Veziköüreteral Reflü

VUR idrarın mesaneden üretere ve bazen renal pelvise, kalikslere ve toplayıcı sisteme geri kaçışıdır. Primer VUR üriner sistemi etkileyen en sık konjenital anomalidir (12). VUR ve renal skar oluşumu arasındaki ilişki iyi bilinmektedir. VUR derecesi arttıkça renal skar insidansı ve şiddeti artar. Tekrarlayan İYE geçirenlerde renal skar insidansı daha da artar (77). VUR'un renal skar oluşturmadaki rolü araştırılırken intrarenal reflü patogenezi öne sürülmüştür (78). Buna göre renal papillanın tipi intrarenal reflüyü etkiler. Basit papillalarda toplayıcı kanallar konveks bir yüzeye açılır ve pelvis içi basınç arttığında toplayıcı kanal ağızları kapanır ve reflü engellenir. Bileşik papillalar ise basit papillaların birleşiminden oluşur, konkav bir sınır ile pelvise açılır, pelvis içi yüksek basınç varlığında idrarın tübüllere geçmesine izin verir. Bir diğer deneysel veriye göre ise steril VUR tek başına skar oluşumunda etkisizdir, bu skarların gelişiminde enfeksiyonun önemli rolü vardır (79, 80). Bu görüş primer VUR'da intrarenal reflünün %5-15 olması ve antibiyotik profilaksisi ile İYE'nin engellendiği durumlarda VUR'da renal skar insidansının ve şiddetinin azalması ile desteklenmektedir (79, 81-83).

1.6.2.7. Kan Grubu

Kan grubu antijenleri eritrosit ve üroepitel hücrelerin yüzeylerinde yer alan karbonhidrat yapısında moleküllerdir. Bu antijenler fimbriyalı bakterilerin üroepiteller üzerinde yer alan karbonhidrat reseptörlerine bağlanmasını etkileyebilir (12). Jantausch ve arkadaşları Lewis (Le)(a-b-) fenotipindeki çocuklarda İYE rölatif riskini 3.2 olarak bildirmiştir (84). Bunun aksine Albarus ve arkadaşları kan grupları ve İYE'ye yatkınlık arasında bir ilişki saptamamıştır (85). Bu konuda daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

1.6.2.8. Böbrek Taşı

Üriner sistemde yer alan taşlar obstrüksiyon yaparak enfeksiyona yatkınlık sağlaması yanı sıra, obstrüksiyon yapmadan, üriner sistem epitelinde yaptığı irritasyon sonucu bakterilerin tutunmasını ve kolonizasyonunu sağlayabilirler. Bakterilerin taşın içine yerleşik olması ve antibiyotiklerin taşın iç kısımlarına ulaşmasının zorluğu nedeniyle taş

varlığında enfeksiyonun eradikasyonu zordur. Taşlar enfeksiyonun tekrarlamasına neden olur (86, 87).

2.VİTAMİN D, VİTAMİN D RESEPTÖRÜ VE VDR GEN POLİMORFİZMLERİ

Vitamin D, normal bir kemik gelişimi ve kalsiyum-fosfor homeostazı için gereklidir. Araştırmalar, vitamin D'nin hormonal sistemlerle yakın ilişkisi olduğunu, hücre farklılaşması, çoğalması üzerinde önemli etkileri olduğunu ortaya koymuştur. D vitamini eksikliği kanser, enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar, hipertansiyon ve diyabet ile ilişkili bulunmuştur. D vitaminin aktif formu olan $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ biyolojik yüksek affiniteli VDR varlığını gerektirir (9). Hücresele reseptörüne bağlanma sonrası biyolojik etkilerine aracılık edecek genlerin transkripsiyonlarını regüle eder.

2.1. Vitamin D Metabolizması

Vitamin D diyetle elde edilir veya deride güneş ışınlarının etkisi ile üretilir. Metabolik aktivasyonunda ilk basamak 25.karbonun primer olarak karaciğerde hidroksilasyonudur. İkinci basamak esas olarak böbreklerde olan 25-hidroksivitamin D'den $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ oluşumudur (9).

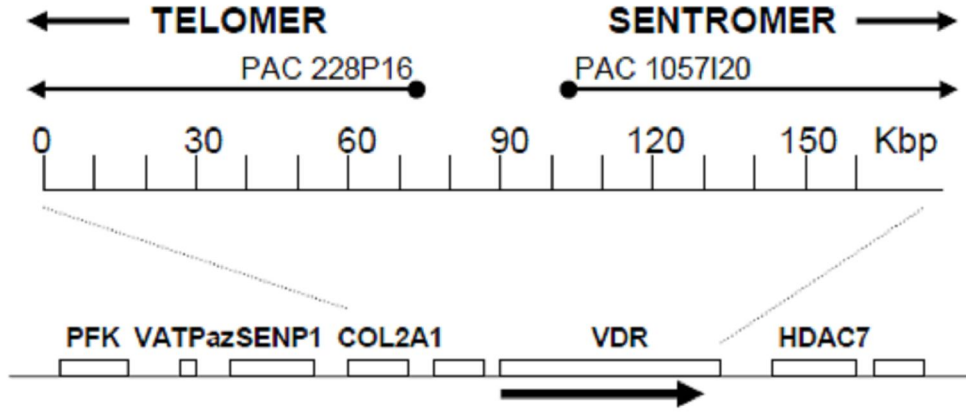
Vitamin D metabolitleri lipofiliktir ve plazmada proteinlere bağlı olarak taşınır. Bu taşıyıcı proteinlerden en önemlisi vitamin D bağlayıcı proteindir (VDBP) (88). VDBP multifonksiyonel, yüksek oranda eksprese edilen, polimorfik bir serum proteindir (89). Dolaşan vitamin D bileşiklerinin %99'dan fazlası proteine bağlıdır. Aktif vitamin D bileşiklerinin biyolojik aktivitesi serbest hormon konsantrasyonu ile ilişkilidir (90-92).

Steroid bir hormon olan $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ reseptörü VDR'ye bağlanır.

2.2. VDR

$1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 'ün çoğu biyolojik aktivitesi yüksek afiniteli reseptör olan VDR varlığını gerektirir (9). Hücre siklusu, apoptoz ve farklılaşmayı içeren pek çok kompleks genlerin transkripsiyonunu bu ligand reseptör kompleksi regüle etmektedir (10). VDR nükleer bir reseptördür. VDR gen lokusu insanlarda 12q13.1 bölgesinde bulunur, 11 eksonu kapsar ve >100 kb uzunluğundadır (şekil 1) (10). VDR, steroid-tiroid-retinoid asit reseptör üst ailesine ait 50-60 kDa'lık bir selüler polipeptittir ve retinoid X reseptörü (RXR) ile heterodimerik bir kompleks oluşturur. Vitamin D_3 aracılı etkiler, ligand-VDR-RXR kompleksinin, vitamin D ilişkili genlerin promoter bölgelerinde bulunan, vitamin D'ye yanıt veren elemanlar (vitamin D responsive elements=VDRE) olarak adlandırılan bölgelere bağlanması ile ortaya çıkar (93). VDR hedef hücrelerdeki nükleer DNA ile ilişkilidir ve bir dizi biyolojik cevaba veya selektif gen transkripsiyonunu baskılamaya aracılık eden spesifik RNA kodlayıcı proteinlerin sentezini başlatır (9).

VDR lokusunun genom organizasyonu ile yapılan analizde, VDR geninin kendisinin oldukça büyük olup (100 kb den fazla), birçok dokuya spesifik transkripsiyon yapma yeteneği olan geniş promotör bölgesinin olduğu ve tip 2 kollajen alfa 1 (COL2A1) geninin hemen altında bulunduğu gösterilmiştir (şekil 1), (94, 95).



Şekil 1. Kromozom 12q13.1 üzerindeki VDR-COL2A1 lokusunun genomik yapısı ve 228P16 ve 1057I20 PAC klonlarının pozisyonunun detaylı fiziksel haritası.

Ok, VDR geninin transkripsiyon yönünü göstermektedir. PFK:fosfofruktokinaz; VATPaz: Vaküolar ATPaz; SENP1= sentrin/SUMO'ya özgü proteaz; HDAC7=histon deasetilaz 7

2.3. VDR Gen Polimorfizmleri

2.3.1. Gen Polimorfizmi

Gen polimorfizmi, aynı genin DNA dizisindeki değişikliklerdir. Bir veya daha fazla bazın diziye katılması (insersiyon), diziden baz eksilmesi (delesyon) veya bir bazın diğeri ile yer değiştirmesi (substitüsyon) sonucu meydana gelebilir. Polimorfizm bir genin popülasyonda %1 veya daha fazla sıklıkla rastlanan çeşidinin (alellerinin) bulunmasını tanımlamak için kullanılır. Bundan daha az rastlanan aleller mutasyon olarak adlandırılır ve polimorfizmlere göre çok daha nadirdir.

Polimorfizmler iki ana grupta incelenmektedir:

1. Tek nükleotid polimorfizmi/ TNP (Single nükleotid polymorphism: SNP)
2. Değişen sayıda DNA dizilerinin tekrarı (Variable number tandem repeat: VNTR)

a-Tek Nükleotid Polimorfizmi (TNP) = SNP

TNP'ler tek bir nükleotidin değişmesi ile meydana gelen ve insan genomunda en çok görülen polimorfizmlerdir. TNP'ler genomda yaklaşık her 1000 bazda bir tane olacak

sıklıkla bulunurlar. TNP'ler, molekülün ekspresyon seviyesini veya protein yapısında meydana getirebileceği değişiklikler yoluyla da fonksiyonunu etkileyebilirler (96).

b-Mikrosatellitler

VNTR'nin en sık incelenen bir alt tipi "kısa tekrar edilen dizi= mikrosatellit" tir. Mikrosatellitler genomda tekli, ikili, üçlü, dördü tekrarlanan ardışık kısa DNA dizileridir (TGTG...TG, CAACAA...CAA, AAATAAAT...AAAT gibi). Mikrosatellitler popülasyonlarda bireyden bireye farklı sayıda nükleotid tekrarları gösterirler ve genom içerisinde rastgele dağılmışlardır (97).

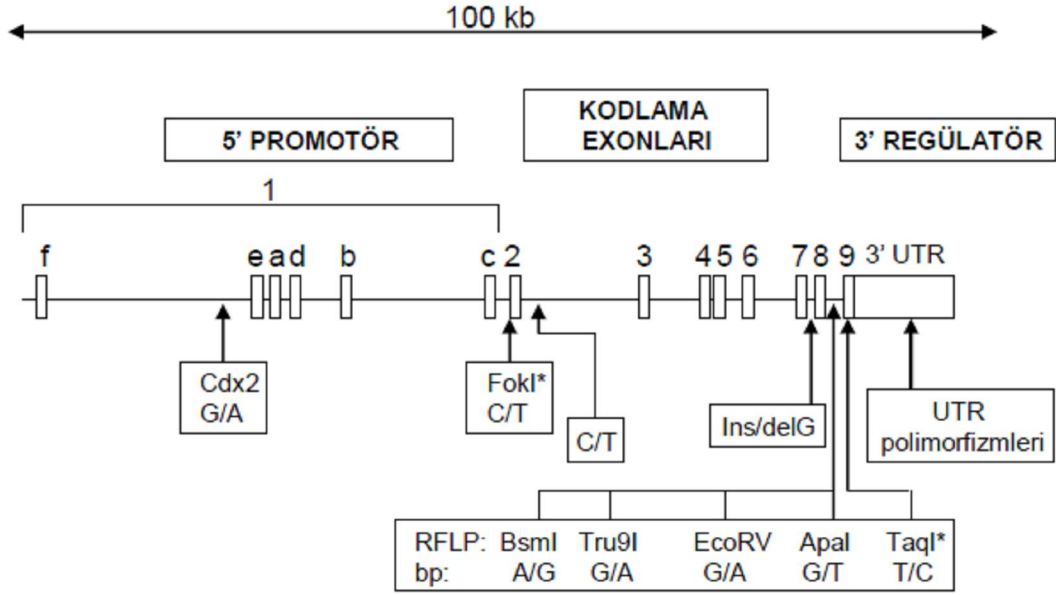
2.3.2. Polimorfizmlerin Önemi

Bir polimorfizmin etkisi, o polimorfizmin yerleşimine bağlıdır. Genin kodlanan bölgesinde meydana gelen farklılıklar protein dizisini etkileyebileceğinden protein yapısı ve fonksiyonu değişebilir. Ayrıca proteinin kodlayan bölgenin dışında, genin sonundaki düzenleyici bölgede veya intronik dizilerde de pek çok nükleotid değişiklikleri görülebilir. Genin promoter bölgesinde transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için uygun DNA motifleri vardır. Bu bölgede meydana gelen polimorfizmler transkripsiyon faktörlerinin bağlanmalarını veya bağlanma etkinliklerini değiştirebilir. Böylece genin transkripsiyon aktivitesi artabilir veya azalabilir. mRNA kopyasının kalıcılığını ve dayanıklılığını ise 3'UTR bölgesi etkiler. Bu bölgedeki polimorfizmler, mRNA kalıcılığını düzenleyen proteinlerin mRNA'ya bağlanmasını ve sentez edilen protein miktarının değişmesine sebep olabilir.

2.3.3. VDR Polimorfizmleri

İnsan popülasyonunda doğal olarak birçok VDR gen polimorfizmi oluşmaktadır, ırklar ve etnik gruplar arasında önemli farklar bulunur (10, 98, 99). Bunların ekspresyonları azalmış kemik yoğunluğu, hiperparatiroidiye yatkınlık, hiperkalsiüri, vitamin D tedavisine direnç, enfeksiyonlara, otoimmün hatalıklara, kansere yatkınlık ile ilişkilidir (11, 100-104). Ekzonik bölgede bulunan ve proteindeki aminoasit dizilimini değiştirmeyen polimorfizmler sinonim polimorfizmler olarak adlandırılır. Bu polimorfizmler enzim kesim bölgesini değiştirebilir ve bu durumda restriksiyon fragmentinin uzunluk polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism=RFLP) adını alırlar. VDR geni içinde farklı restriksiyon enzimleri ile birkaç RFLP saptanmıştır. En sık çalışılanlar ekson 8 ve ekson 9'u ayıran intronda yer alan *BsmI*, *Apal* ve *TaqI*'dir (9). Bir diğer önemli polimorfizm olan *FokI* (başlangıç kodon) polimorfizmi 3 aminoasit daha uzun bir VDR proteini ile sonuçlanır (Şekil 2), (105). İtronik dizideki değişimlerin protein ekspresyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir (106). VDR geninin "*translasyon başlangıç*"

bölgesinde yer alan *FokI* polimorfizmi ise VDR proteininin fonksiyonunu olası değiştirebilen bir yapısal değişiklikle sonuçlanır.



Şekil 2. VDR geninin exon-intron yapısı ve bilinen polimorfizmlerin pozisyonu.
* Bu polimorfizmlerin kodlama dizisinde olduğunu belirtmektedir.

2.3.3.1. *FokI* Polimorfizmi

Genin 2. ekzonunda bulunur. Baz değişikliği başlangıç kodonu (ATG) içindedir ve T→C değişikliği vardır. Çalışmalar diğer VDR polimorfizmleri ile bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium=LD) göstermediğini ortaya koymaktadır. Fonksiyonel bir mutasyondur (107). Bu polimorfizmin F aleli 424, f aleli 427 aminoasit uzunluğunda protein kodlar. Kısa, 424 aminoasitlik proteinin transkripsiyonel aktivite açısından daha aktif olduğu ileri sürülmektedir (107).

2.3.3.2 3' UTR Polimorfizmleri (*BsmI*, *ApaI*, *TaqI*)

BsmI, *ApaI*, *TaqI* polimorfizmleri genin 3' UTR bölgesinde 8. intronda ve 9. ekzonda bulunurlar. Yapılan çalışmalar bu polimorfizmlerin LD gösterdiklerini ortaya koymaktadır (108). Fonksiyonel olmayan polimorfizmlerdir (10). Bu bölgede bulunan polyA polimorfizmi ile *BsmI* polimorfizminin de LD gösterdikleri belirtilmektedir. Bu polimorfizmlerden *BsmI* için BB ve *TaqI* tt genotiplerini taşıyanlarda barsaktan Ca absorpsiyonunun daha az olduğu saptanmıştır (109). Bu bölgedeki polimorfizmler tüberküloza yatkınlık gibi çeşitli enfeksiyon hastalıklarında, tip I diyabetes mellitusda,

osteoporozda, riketsde araştırılmış ve bazı risk genotipleri ve haplotipleri ortaya konmuştur (110-112)

3. D VİTAMİNİ - İMMUN SİSTEM - İYE İLİŞKİSİ

VDR T lenfositler, nötrofiller, antijen sunan hücreler (makrofaj, dendritik hücreler, vb.) gibi immün sistemin çoğu hücresinde bulunur (113). Vitamin D'nin enfeksiyon, otoimmün hastalık, transplantasyon toleransını kontrol etmedeki etkinliği, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün monosit-makrofaj, antijen sunan hücreler, dendritik hücreler ve lenfositler üzerindeki diferansiyasyon etkilerine bağlanabilir (9). Vitamin D_3 'ün immün hücre fonksiyonlarını etkilediği in vitro ortamlarda da gösterilmiştir (114).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR fonksiyonu ile enfeksiyona karşı doğal ve kazanılmış bağışıklık arasında nedensel bir ilişki vardır; vitamin D-eksikliğine bağlı riketsde geçmişte mekanik etkilere bağlanmış ancak şu an vitamin D eksikliğine bağlı olduğu anlaşılmış rekürren enfeksiyonlar sıktır (118) ve kronik böbrek yetmezliğine bağlı $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eksikliğine sıklıkla bozulmuş immün defans eşlik eder (119). VDR fonksiyonunda bazı VDR alelleriye sonuçlanan hafif değişiklikler mikobakteriyel ve viral enfeksiyonlara direnci veya yatkınlığı etkiler (9).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ antijen sunan hücrelerin en potenti olan dendritik hücrelerin maturasyonunu inhibe eder ve T lenfositler üzerine direk etki ederek T hücre proliferasyonunu engeller (93). VDR'lerin, T lenfositlerde yüksek konsantrasyonda mevcut olduğu gösterilmiş, aktive T lenfositlerinin önemli miktarda VDR içerdiği saptanmıştır (113, 117). Antijen ile uyarılmış insan ve mürin T lenfositlerinin proliferasyonları ve sitokin sekresyonları, invitro $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün eklenmesiyle inhibe edilir (93). Bu da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün T hücre aracılı immün yanıtlar üzerinde modülatör etkileri olduğunu göstermektedir.

B lenfositlerinde, VDR sergilenmesi tam olarak gösterilemediği için, B hücre fonksiyonları üzerinde etkisi olmadığı düşünülmektedir (118).

Vitamin D_3 miyeloid serinin diferansiyasyonunda rol oynar. Birçok yayın immatür monositlerin olgun makrofajlara dönüşmesini Vitamin D_3 'ün sağladığını göstermektedir (119). Bu hormon; fagositoz, bakteri öldürme ve kemotaksis gibi makrofaj aktivitelerini de artırır (114) ve monosit benzeri diğer hücrelerden TGF- β üretimini artırmaktadır. TGF- β immün hücrelerde hücre tipine, çevreye, diferansiyasyon ve aktivasyon durumuna göre inhibitör ve stimülatör olabilir (120). Vitamin D_3 , siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p

21'in gen transkripsiyonunu indükler ve böylece monositlerden direk olgun makrofajlara diferansiasyonu sağlar (121). 1,25(OH)₂D₃ ayrıca antibakteriyel, antitümöral ve antiviral etkilerinde kritik rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olan C/EBP β (CCAAT/enhancer-binding protein-beta)'yı indükler. C/EBP β 'nın indüksiyonu, monositlerin makrofajlara farklılaşmasında, bakteriyel enfeksiyonlara karşı korunmada ve tümör gelişiminin engellenmesinde rol oynar (122).

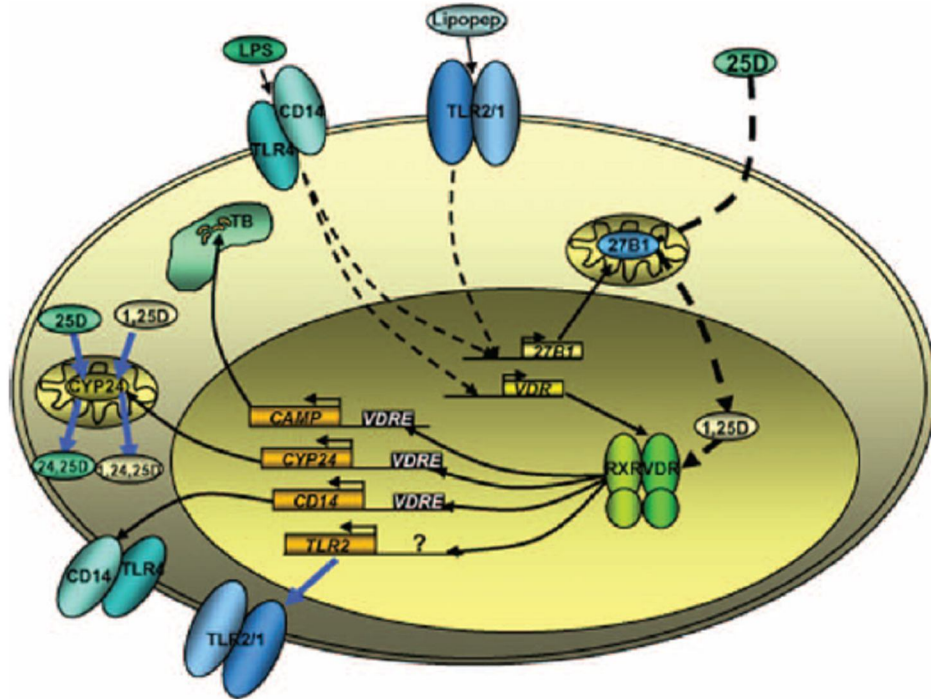
1,25(OH)₂D₃, hücre içi patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitede önemli rol oynayan TLR'lerin koreseptörü olarak görev gören CD14'ün ekspresyonunu da indükler (123). Ekstrarenal 1 α -hidroksilaz (CYP27B1) aktive makrofajlar ve dendritik hücrelerce ekspres edilir ve primer olarak immün yanıtlarla özellikle de gama interferon ve TLR paternini tanıyıcı reseptör agonistlerince düzenlenir. Bu durum immün sistemi dolaşan 25-hidroksi vitamin D düzeylerine cevaplı hale dönüştürür (124). Liu ve arkadaşları mikro-dizi çalışmalarında bakteriyel lipopeptidlerle uyarılan insan makrofaj TLR1/2 heterodimerlerinin hem CYP21B hem VDR ekspresyonunu indüklediğini göstermiştir (Şekil 3). Bu çalışma immün cevabın dolaşımdaki 25-hidroksi-vitamin D düzeylerine bağımlı olduğunu açıkça göstermiştir (125). Benzer şekilde TLR4/CD14 reseptör kompleksinin lipopolisakkaritlerce uyarılması da CYP27B1 ekspresyonunu indükler (124). CD14, TLR-4 ile birlikte, makrofajlarca, bakteriyel LPS'ye yönelik immün yanıtın indüklenmesinde önemli rol oynamaktadır (125). TLR'nin LPS ile uyarılması, katelisin antimikrobiyal peptid (cathelicidin antimicrobial peptid=CAMP) ve defensin β 2 gibi antimikrobiyal peptidlerin (AMP) ekspresyonunu uyarır (126). AMP'ler bakteriyel, fungal ve viral atağa karşı doğal bağışıklığın öncüleridir ve direk olarak patojen membranlarının bütünlüğünü bozarak etki ederler (124). Enfeksiyonlara karşı primer savunmada rol oynayan, CAMP ve defensin β 2 genlerinin promoter bölgeleri, VDRE bölgeleri içermektedir (127). TLR ailesinin görevi ökaryotlarda olmayan patojenlerin üzerindeki moleküler yapıları tanımadır. Patojenlerin üzerindeki bu moleküler yapılar patojen ilişkili moleküler paternler (PAMPs=pathogen associated molecular patterns) denir. TLR'nin PAMPs'ları tanıması, kemokin ve sitokinleri indükleyerek hem doğal hem kazanılmış bağışıklığın tetiklenmesine yol açar (128). Bu veriler insan makrofajlarında TLR aracılı antimikrobiyal yolların aktivasyonunun VDR ve 1,25(OH)₂D₃ aracılı olduğunu açıkça vurgulamaktadır.

1,25(OH)₂D₃, LPS ile birlikte veya tek başına, nötrofillerde de CAMP sergilenmesini indüklemektedir (117). CAMP, antibiyotiğe dirençli patojenlere karşı savunmada temel rol

oynamaktadır ve hayvan modellerinde de sepsise karşı direnci arttırdığı gösterilmiştir (129).

Katelisidin idrarda düşük seviyelerde bulunur ancak İYE'li çocukların idrarında katelisidin konsantrasyonları yüksektir. Enfeksiyonsuz dokuda tübüler epitel tarafından sürekli olarak sentezlenir ve depolanmadan tübüler lümene salınır. Katelisidin-yoksun (genetik olarak knock-out) hayvanlarda normallere göre daha yüksek oranda asendan enfeksiyon görülür (130). AMP ekspresyonunun 1,25(OH)₂D₃ ile indüklenmesi ve 1,25(OH)₂D₃ ile TLR sinyali arasındaki ilişki vitamin D doymun durumun birçok bakteriyel ve viral patojene karşı geniş koruma sağlayacağı konusunda potansiyel moleküler temeli oluşturmaktadır (124).

VDR geni birçok hastalık için aday lokustur. Vitamin D sentezleme yeteneğindeki varyasyonlar, VDR gen polimorfizmleri enfeksiyonlara yatkınlıkta etkili faktör olabilir. Bu araştırmada VDR gen polimorfizmlerinin İYE geçirip geçirmeme, İYE kliniği (alt İYE-pyelonefrit) ve renal skar oluşumunda rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma konusu tıp literatüründe bu konudaki ilk araştırma olması açısından önem taşımaktadır.



Şekil 3. TLR ve vitamin D sinyali arasındaki etkileşimin şematize representasyonu. Mavi oklar monosit/makrofajlarda olmayan, keratinositlerde akti olan yolları belirtmektedir.

27B1=CYP27B1; lipopep=triasil lipopeptid

III. GEREÇ VE YÖNTEM

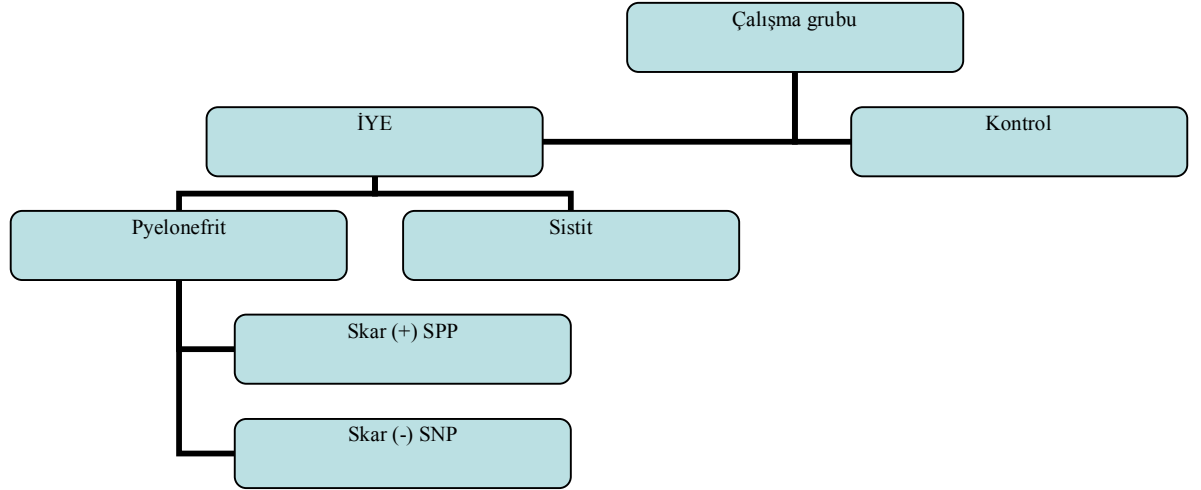
Çalışma Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurul komitesinden izin alınarak Çocuk Nefrolojisi polikliniğinde 2008-2010 yılları arasında yapıldı. İdrar yolu enfeksiyonu tanısı alan 92 çocuk ve kontrol grubu olarak da daha önce idrar yolu enfeksiyonu geçirme öyküsü ve ciddi sistemik hastalığı olmayan 105 çocuk çalışmaya alındı. Olguların ebeveynlerine çalışma hakkında yazılı bilgi veren “Bilgilendirme formları” verildi ve yazılı izinlerinin olduğu “Onam formları” okutularak imzalatıldı. Her hastaya çalışmaya başlarken araştırma formları doldurulup, hastanın adı-soyadı, cinsiyeti, adres ve telefon numaraları gibi kimlik bilgileri kaydedildi.

Dışlama Kriterleri

Nörojenik mesane, renal anomaliler (VUR, hidroureter, vb.), mesane ve üretra anomalileri, santral sinir sistemi malformasyonları (myelosele, meningomyelosele, tethered kord, vb.) olan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

Çalışma Grubu

Pyelonefrit tanısı ateş yüksekliği ve/veya kostovertebral açığı hassasiyeti varlığı, yaşa göre uygun yöntemlerle alınmış idrar kültüründe anlamlı bakteriyüri (orta akım idrar örneğinde tek bir bakteri türünden $>10^5$ CFU/ml üreme veya bebeklerde kateterle alınmış örneklerde 50,000 CFU/ml üreme) saptanması ve enfeksiyon bulgularını takiben ilk hafta içinde çekilen DMSA sintigrafisinde hipoaktivite gösterilmesi ile konuldu. Sistit tanısı dizüri, sık idrar yapma, sıkışma, suprapubik ağrı gibi lokalize edici semptomları olan çocuklarda anlamlı bakteriyüri varlığı ile konuldu. Pyelonefrit grubundaki hastalara antibakteriyel profilaksi başlandı ve 6 ay sonra kontrol DMSA sintigrafileri çekildi. Kontrol DMSA’da aynı bölgede hipoaktif alan sebat eden hastalar skar pozitif pyelonefrit (SPP) grubunu, hipoaktif alan düzelen hastalar ise skar negatif pyelonefrit (SNP) grubunu oluşturdu (Şekil 4). Kontrol grubu olarak da daha önce idrar yolu enfeksiyonu geçirme öyküsü ve sistemik hastalığı olmayan 105 çocuk çalışmaya alındı.



Şekil 4. Çalışma grubunun belirlenmesi

Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Hastalardan EDTA'lı tüpe 2 cc kan alındı. Kontrol grubundan da başka tetkikler için kan alınırken 2 cc EDTA'lı tüpe kan ayrıldı. Kanlar -80°C'de saklandı, tüm örneklerin toplanması sonrası kanlar VDR gen polimorfizmleri çalışılmak üzere uygun koşullarda Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına nakledildi. Ekspresyon çalışması için 24 çocuğun idrar örnekleri taze idrar olarak hemen alındı, Celal Bayar Üniversitesi Biyokimya laboratuvarında cDNA elde edilerek VDR gen ekspresyonları çalışılmak üzere uygun koşullarda Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına nakledildi. Çalışmaya alınan çocukların EDTA'lı tüpe alınan periferik kan lenfositlerinden DNA izole edildi. VDR gen polimorfizmlerinden *Apal*, *BsmI*, *TaqI* ve *FokI* sistit, pyelonefrit (skar negatif ve skar pozitif) ve kontrol grubu olgularında çalışıldı. Polimorfizmler Ege Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında çalışıldı.

Kandan DNA İzolasyonu

Gerekli Alet ve Kimyasallar Listesi

- İnvisorb spin blood kit (İNVİTEK)
- Filtreli tüpler
- Receiver tüpleri
- Eppendorf tüpler
- Proteinaz K
- Lysis buffer A
- Binding buffer B6

- Wash buffer I
- Wash buffer II
- Elution buffer D
- Etanol(%95–99)
- Otomatik pipetler (1–10 µl ve 10–100 µl, Eppendorf)
- Steril sarı ve beyaz pipet uçları (Brand)
- 1.5 ml'lik Eppendorf tüpleri (Axygen)
- Eppendorf tüp taşıyıcıları
- Vorteks (Heidolph Reaks Top)
- Santrifüj (Sigma 1–15)
- Su banyosu (Nüve BM 302)
- Steril eldiven

DNA izolasyonları Invitek Blood DNA Isolation Kit yardımıyla belirtilen protokole uygun olarak toplanan EDTA'lı kanlardan gerçekleştirildi;

1. 200 µl kan EDTA'lı tüplerden 1,5'luk ependorf tüplerinin içine aktarılır.
2. Üzerine 200 µl Lysis Buffer eklenir.
3. 20 µl proteinaz K konulur ve 10-15 saniye vortekslenir.
4. Tüpler 10 dk 56°C'de 350- 400 rpm'de sallanma durumunda inkübasyona bırakılır. (Bu arada her hasta için 200 µl olacak şekilde elution buffer ependorf tüplere konulup 56°C'ye bırakılır; elution buffer'ın ılık olması gerekmektedir).
5. İnkübasyondan sonra her birine 400µl binding buffer eklenir.
6. Her biri 10 saniye vortexlenir.
7. Karışmış olan kanlar sarı 2'lik filtreli tüplere aktarılır (~830 µl), 1 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.
8. 12000 rpm'de 2 dk santrifüj edilir
9. Filtreler diğer 2'lik sarı tüplere aktarılır.
10. Yeni filtreleri aktardığımız sarı tüplerin her birine 500 µl Wash buffer I eklenir.
11. 12000 rpm'de 1 dk santrifüj edilir.
12. Filtrenin altındaki kan dökülür, filtreler aynı tüplere tekrardan konur.
13. 800µl Wash buffer 2 aynı ependorflara eklenir.
14. 12000 rpm'de 1 dk santrifüj edilir.
15. Filtrenin altındaki kan dökülür, filtreler aynı tüplere tekrardan konur.

16. 13500 rpm'de 4 dk santrifüj edilir.
17. Filtreler beyaz 1,5' luk ependorflara aktarılır.
18. 200 µl elution buffer her bir filtreli tübe konur.
19. 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edilir.
20. Filtreler atılır.
21. Elde edilen DNA'lar kendilerine ait DNA saklama kutularına konulur ve -20° C ' de saklanır.

DNA Amplifikasyonu

Gerekli Alet ve Kimyasallar Listesi

- Termal Cycler (GeneAmp PCR System 9700)
- Mikropipetler (1–10 µl ve 10–100 µl)
- Steril sarı ve beyaz pipet ucu (Brand)
- 0.5-1.5 ml' lik Ependorf tüpleri (Axygen)
- 0,2 µl lik PCR tüpleri (Axygen)
- Otoklav (Hirayama)
- Ependorf taşıyıcıları
- Buz kalıbı
- Steril eldiven
- Deiyonize su
- DNA Taq polimeraz ve tampon (MBI- Fermentase)
- 100 mM Tris HCL (pH: 8.8-25° de)
- 500 mM KCL
- %0.8 Nonidet P40
 - dNTP karışımı (MBI- Fermentase)

20 mM dATP

20 mM dGTP

20 mM dCTP

20 mM dTTP

Primerler:

FokI polimorfizmi için kullanılan primer dizisi (Thermo Electron Corporation)

Forward: 5'-CCCTGGCACTGACTCTGCTC-3',

Reverse: 5'-GGAAACACCTTGCTTCTTCTCC-3'.

*Primer dizilerinden 100 pMol olacak şekilde stok hazırlanır. PCR işlemi sırasında 5 pMol'de hazırlanan dilusyondan 1µl. kullanılır.

TaqI polimorfizmi için kullanılan primer dizisi (Thermo Electron Corporation)

Forward: 5'-CCTGTGCCTTCTTCTCTATCC-3'

Reverse: 5'-TCATGCTGCACTCAGGCT-3'

*Primer dizilerinden 100 pMol olacak şekilde stok hazırlanır. PCR işlemi sırasında 5 pMol'de hazırlanan dilusyondan 1µl. kullanılır.

BsmI polimorfizmi için kullanılan primer dizisi (Thermo Electron Corporation)

Forward: 5'-AGTGTGCAGGCGATTCGTAG-3',

Reverse: 5'-ATAGGCAGAACCATCTCTCAG-3'.

*Primer dizilerinden 100 pMol olacak şekilde stok hazırlanır. PCR işlemi sırasında 5 pMol'de hazırlanan dilusyondan 1µl. kullanılır.

ApaI polimorfizmi için kullanılan primer dizisi (Thermo Electron Corporation)

Forward: 5'-AGCATGGACAGGGAGCAA-3'

Reverse: 5'-GGATAGAGAAGAAGGCACAGG-3'

*Primer dizilerinden 100 pMol olacak şekilde stok hazırlanır. PCR işlemi sırasında 5 pMol'de hazırlanan dilusyondan 1µl. kullanılır.

Reaksiyon Karışımı

Her bir örnek için hazırlanan total PCR reaksiyon karışımı 25 mikrolitredir(µl) 'dir. H₂O, 10X buffer, MgCl₂ (25mM), dNTP (4x25 µ mol), primerler ve Taq polimerazdan oluşan karışım her bir reaksiyon tüpüne dağıtıldı ve en son DNA örnekleri eklendi.

FokI polimorfizmi için:

H₂O → 16.5 µl

Buffer → 2.5 µl

MgCl₂ → 1.5'µl

dNTP → 1 µl

Primer F → 1,5µl

R → 1,5 µl

Taq polimeraz → 0.3 µl

DNA → 100 ng

TaqI polimorfizmi için:

H ₂ O	→	13.75 µl
Buffer	→	2.5 µl
MgCl ₂	→	2'µl
dNTP	→	1 µl
Primer F	→	1,25µl
R	→	1,25 µl
Taq polimeraz	→	0.3 µl
DNA	→	100 ng

BsmI polimorfizmi için:

H ₂ O	→	11.75 µl
Buffer	→	2.5 µl
MgCl ₂	→	1.875'µl
dNTP	→	1 µl
Primer R	→	1,25µl
F	→	1,25 µl
Taq polimeraz	→	0.3 µl
DNA	→	100 ng

ApaI polimorfizmi için:

H ₂ O	→	14.75 µl
Buffer	→	2.5 µl
MgCl ₂	→	1.5 µl
dNTP	→	1µl
Primer R	→	1,25µl
F	→	1,25 µl
Taq polimeraz	→	0.3 µl
DNA	→	100 ng

* İlgili bölgeler PCR aletinde çoğaltıldı (Şekil 5).



Şekil 5. PCR aleti (Gene Amp PCR System 9700).

İzlenen PCR Programı

***FokI* polimorfizmi için;**

Denatürasyon 94⁰ c 5 dakika 1 döngü

Denatürasyon 94⁰ c 30 saniye

Bağlanma 56⁰ c 30 saniye

Uzama 72⁰ c 45 saniye

} 35 döngü

Final Uzama 72⁰ c 5 dakika 1 döngü

Amplifikasyon ürünleri PCR programı bittikten sonra +4⁰ C' de saklandı.

***TaqI* polimorfizmi için;**

Denatürasyon 94⁰ c 2 dakika 1 döngü

Denatürasyon 94⁰ c 45 saniye

Bağlanma 56⁰ c 45 saniye

Uzama 72⁰ c 45 saniye

} 25 döngü

Final Uzama 72⁰ c 10 dakika 1 döngü

Amplifikasyon ürünleri PCR programı bittikten sonra +4⁰ C' de saklandı.

***BsmI* polimorfizmi için;**

Denatürasyon 94⁰ c 2 dakika 1 döngü

Denatürasyon 94⁰ c 45 saniye

Bağlanma 56⁰ c 45 saniye

Uzama 72⁰ c 45 saniye

} 30 döngü

Final Uzama 72⁰ c 10 dakika 1 döngü

Amplifikasyon ürünleri PCR programı bittikten sonra +4⁰ c' de saklandı.

***ApaI* polimorfizmi için;**

Denatürasyon 94⁰ C 2 dakika 1 döngü

Denatürasyon 94⁰ C 30 saniye

Bağlanma 57⁰ C 30 saniye

Uzama 72⁰ C 30 saniye

} 30 döngü

Final Uzama 72⁰ C 10 dakika 1 döngü

Amplifikasyon ürünleri PCR programı bittikten sonra +4⁰ c' de saklandı.

Agaroz Jel Elektroforezi

Gerekli Alet ve Kimyasallar Listesi

- Yatay elektroforez
- Güç kaynağı
- Mikrodalga fırın
- Erlen mayer
- Mezürler (50 ml, 100 ml, 500 ml)
- Pipetler (2 ml, 1.5 ml, 10 ml)
- Pens ve çeşitli boyutta cam şişeler
- Agaroz (Sigma, A5093 Lot 51K01131)
- Etidyum bromür (Sigma)
- Orange G (Biological Industries Lot 204804)
- DNA markır (Fermentas, O'Range Ruler 100bp DNA Ladder)
- Deiyonize su
- Görüntüleme cihazı
- Hassas tartı
- pH metre

Ortam Tamponlarının Hazırlanması

10x TBE Çözeltisinin Hazırlanması (500ml.)

Trizma-Base 54.5gram tartıldı (Merck Lot No: K30010187-220) ve 27.8gram Borik Asit tartıldı (Sigma Lot No: 20K0161). EDTA 0.5M.'lık (Sigma lot No. 91K0133) çözeltisinden 20ml. alındı ve 500ml.'ye tamamlandı. Çözelti +4°C'de saklandı.

10x TBE'den 0,5x TBE Çözeltisinin Hazırlanması (1000 ml)

Su 950ml ve 50ml 10x TBE karıştırılmak suretiyle hazırlandı. Çözelti +4°C'de saklandı.

Yükleme Tamponları

Agaroz jel elektroforezi için

0,1 gr Orange G

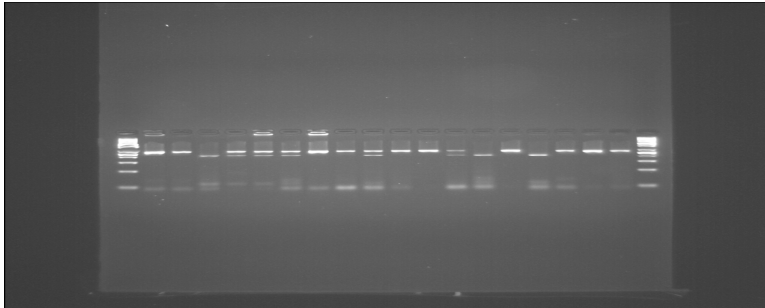
45 ml 1XTBE

55 ml Gliserol * +4 derecede saklanır.

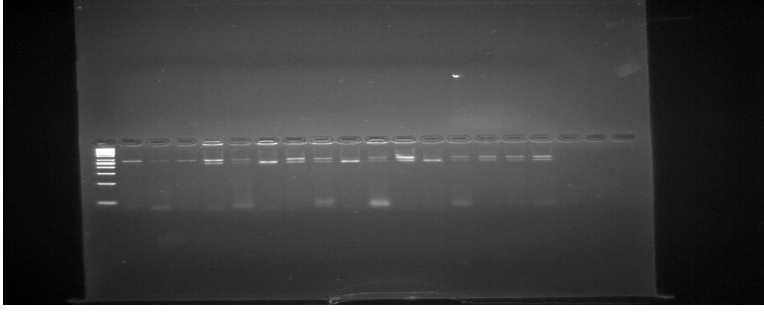
Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünleri amplifikasyonun kontrolü %3'lik agaroz jelde yapıldı. 100 ml'lik erlen içerisine 3 gr agaroz ve 100 ml 0,5XTBE kondu ve karışım berraklaşmaya kadar mikrodalga fırında eritildi. Berraklaştıktan sonra 15 µl etidyum bromür eklenip karıştırıldı ve hazırlanan tabağa döküldü. Jel donduktan sonra üzerine 0,5XTBE tampon ilave edilip tarak çıkarıldı ve 0,5XTBE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Bir parça parafilm üzerinde 4 µl yükleme tamponu ve 6 µl PCR ürünü karıştırılıp jeldeki kuyucuklara yüklendi. 100 voltta 3 cm yürütüldükten sonra jel görüntüleme sisteminde (VilberLourmat, Marne La Valle'e, France) incelendi (Sambrook et al., 1989; Westermeier, 1997)

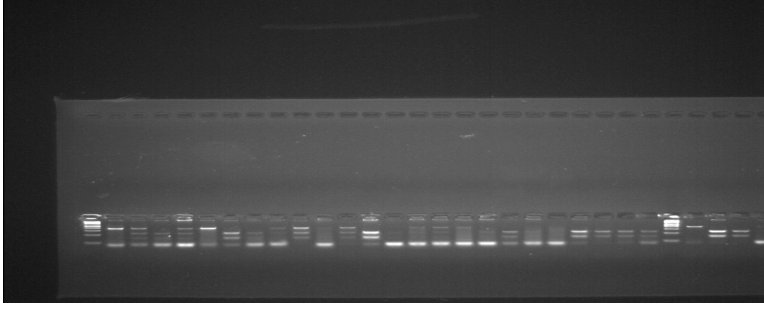
Çoğaltılan bölgelere ilişkin PCR görüntüleri Şekil 6, 7, 8, 9'da verilmiştir.



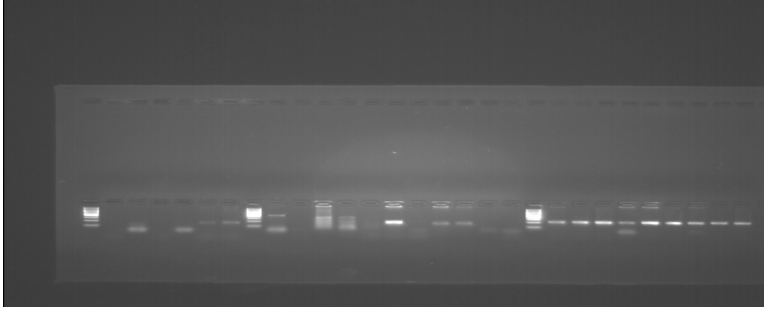
Şekil 6. VDR geni *FokI* polimorfizmi için PCR görüntüsü



Şekil 7. VDR geni *Apal* polimorfizmi için PCR görüntüsü



Şekil 8. VDR geni *BsmI* polimorfizmi için PCR görüntüsü



Şekil 9. VDR geni *TaqI* polimorfizmi için PCR görüntüsü

DNA'nın Enzimatik Kesim İşlemi

Gerekli Alet ve Kimyasallar Listesi

- Etüv
- *Mva1269I* (*BsmI*) enzimi ve 10x buffer R (Fermentas ER0962)
- *Apal* enzimi 5000 u (10 u/µl) ve 10x buffer tango (Fermentas ER1415)
- *TaqI* enzimi 3000 u (10 u/µl) ve 10x buffer *TaqI* (Fermentas ER0671)
- *BseGI* (*FokI*) 2500 u (10 u/µl) ve 10x buffer Tango (Fermentas ER0871)
- Distile su

PCR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinden amplifikasyonun oluşum kontrolü yapıldıktan sonra enzimatik kesim işlemi yapıldı. **VDR geni *BsmI*** polimorfizmi için çoğaltılan bölge PCR ürünü 191 baz çifti(bç)'dir. ***Mva1269I*** enzimi ile PCR ürünü spesifik bölgeden kesildiğinde 115 bç ve 76 bç uzunluğunda PCR ürünü elde edilir. **VDR geni**

Apal polimorfizmi için çoğaltılan bölge PCR ürünü 236 bç'dir. *Apal* enzimi ile PCR ürünü spesifik bölgeden kesildiğinde 173 bç ve 63 bç uzunluğunda PCR ürünü elde edilir. **VDR geni** *TaqI* polimorfizmi için çoğaltılan bölge PCR ürünü 246 bç'dir. *TaqI* enzimi ile PCR ürünü spesifik bölgeden kesildiğinde 181 bç ve 65 bç uzunluğunda PCR ürünü elde edilir. **VDR geni** *FokI* polimorfizmi için çoğaltılan bölge PCR ürünü 265 bç'dir. **BseGI** enzimi ile PCR ürünü spesifik bölgeden kesildiğinde 196 bç ve 69 bç uzunluğunda PCR ürünü elde edilir.

Kesim Koşulları:

BsmI enzim kesimi:

PCR ürünü	10 µl	}	37 ⁰ C de 3,5 saat inkübasyon
Buffer	2 µl		
Enzim	1 µl		
H ₂ O	3 µl		

Apal enzim kesimi:

PCR ürünü	8 µl	}	37 ⁰ C de 2 saat inkübasyon
Buffer	0,8 µl		
Enzim	0,8 µl		
H ₂ O	4 µl		

TaqI enzim kesimi:

PCR ürünü	9 µl	}	65 ⁰ C de 2 saat inkübasyon
Buffer	2 µl		
Enzim	2 µl		
H ₂ O	4 µl		

FokI enzim kesimi:

PCR ürünü	9 µl	}	55 ⁰ C de 3 saat inkübasyon
Buffer	2 µl		
Enzim	1 µl		
H ₂ O	3 µl		

DNA Dizi Analizi:

Enzimle kesilen örneklerin doğruluğunu kontrol edebilmek için DNA dizi analizi işlemleri ABI Prism 3100 cihazı kullanılarak BigDye Terminator V1.1 kiti ile gerçekleştirildi. Yöntemin basamakları aşağıda belirtildiği gibidir:

1. Elde edilen PCR ürünlerinin Invitex PCR Rapid ile kit protokolüne uygun olarak pürifikasyonu gerçekleştirildi:

- PCR ürününün üzerine 130 µl Buffer P eklenir
- Filtreli tüpe aktarılır
- 1 dakika inkübe edilir
- 30 saniye 10000 devirde santrifüj edilir
- Üzerine 700 µl Wash Buffer ilave edilir
- 30 saniye 10000 devirde santrifüj edilir
- Tüpler boşaltılıp 3 dakika maksimum devirde santrifüj edilir
- Filtrenin altındaki tüpler atılır ve yeni son ürünün birikeceği tüplere alınır
- 25 µl Elution Buffer filtrelerin üzerine ilave edilir
- 3 dakika inkübasyondan sonra 1 dakika 10000 devirde santrifüj edilir
- Filtreler atılır, pürifiye ürün alttaki tüpte toplanır

2. BigDye Terminator V1.1 ile cyclesequencing gerçekleştirildi. Bu işlem için standart PCR konsantrasyonları: 8 µl BigDye terminator, 0.5 µl primer, 4 µl PCR ürünü ve 7.5 µl ddH₂O. PCR işlemi 96°C' de 10 saniye, 50°C' de 5 sn, 60°C' de 4 dakika (25 siklus) koşullarında gerçekleştirildi.

3. Elde edilen PCR ürünleri sekans öncesi son kez pürifiye edildi.

- Bu aşamada PCR ürünleri 1,5 ml' lik eppendorf tüplere alınır, üzerine 50 µl %100 etanol ve 2 ml sodyum asetat koyulur

- Örnekler -20 °C' de 15 dakika bekletilir
- Tüpler 13500 rpm' de 20 dakika santrifüj edilir
- Pelete dokunmadan üzeri atılır
- Her tüpe 250 ul %70 etanol eklenir
- Tüpler 13500 rpm' de 5 dakika santrifüj edilir
- Tüpler ters çevrilip kurumaya bırakılır
- Kuruyan tüplere 20 ul formamide ilave edilir

4. Elde edilen ürünlerin 10 ul' si genetik analizöre yüklendi

5. Yürütülen örneklere ait diziler www.genome.ucsc.edu ve www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/ sitelerinden elde edilen normal dizilerle karşılaştırılarak sonuçlar yorumlandı.

Ekspresyon Analizi

Total RNA İzolasyonu

Gen ekspresyonunu değerlendirmek amacıyla 24 pyelonefrit hastasının idrar örneklerinden total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA izolasyonu için High Pure RNA Isolation Kit'i (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) kullanıldı.

1. Alınan örnekler bekletilmeden en yüksek devirde 8 dakika santrifüj edildi.
2. Çökmüş olan pellet üzerinde kalan idrar döküldü
3. Üzerine 200 µl PBS eklenerek en yüksek devirde 8 dakika santrifüj edildi.
4. Pellet üzerinde kalan kısım döküldü. Tekrar 200 µl PBS eklenerek pellet kaldırıldı ve karışım karışım 1,5 ml' lik eppendorf tüplere aktarıldı.
5. Eppendorf tüpteki hücreler 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrasında ortam dökülüp üzerine 400 µl Lizis bağlama tamponu eklenip pipetaj yapıldı.
7. En yüksek devirde 2 dk santrifüjde döndürülüp süpernatant yeni eppendorf tüplerine alındı.
8. Sonra üzerine 200 µl alkol eklendi.
9. Bu karışım pipetle iyice resüspanse edildikten sonra filtreli tüpe aktarıldı.
10. 13,000 rpm' de 30 saniye santrifüj edildikten sonra, filtrenin altına geçen süpernatant atıldı.
11. 90 µl DNAz inkübasyon tamponu + 10 µl DNAz'dan oluşan karışım hazırlandı, sonra tamamı filtreli tüpe aktarıldı ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
12. İnkübasyon sonrasında, DNA parçalanır, filtrede sadece total RNA kalır.
13. İnkübasyonu tamamlanmış hücrelerin üzerine 500 µl Yıkama Tamponu I eklenip, 8000 rpm' de 15 saniye santrifüj yapıp, süpernatant atıldı.
14. 500 µl Yıkama Tamponu II eklenip, 8000 rpm' de 15 saniye santrifüj yapıp, süpernatant atıldı.
15. Hücrelerin üzerine 300 µl Yıkama Tamponu II eklenip, 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı.
16. Filtre, yeni bir Eppendorf tüpe aktarıldı. 50 µl elüsyon tamponu eklenip, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.

17. Santrifüj sonrası 1,5 ml tüpte kalan total RNA' dır.

Revers Transkriptaz RT-PCR

cDNA Sentezi

Total RNA'ları elde edilen idrar örneklerinden 1-5 µg/ml olacak şekilde Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) kullanılarak cDNA sentezleri 2 aşamada gerçekleştirildi. RNAz ve DNAz içermeyen PCR tüplerindeki total revers transkriptaz reaksiyon volümü 20µl olacak şekilde işleme başlandı.

1.Basamak

Total RNA'sı izole edilen örneklerden;

2 µl H₂O

1 µl Anchored oligo (dT)₁₈

10 µl total RNA kullanılarak 65°C'de 10 dakika ependorf tüpler PCR cihazında inkübe edildi.

2.Basamak

İnkübasyon sonrasında PCR cihazından alınan örnekler buz üzerine yerleştirildi ve;

4 µl Transcriptor RT Reaction Buffer (5X)

0.5 µl Protector RNase Inhibitor (40U/ µl)

2 µl Deoxynucleotide Mix (10mM)

1 µl DTT

1.1 µl Transcriptor Reverse Transcriptase eklendi.

Örnekler 30dakika 55°C'de PCR cihazında inkübe edildi.

Elde edilen cDNA örnekleri VDR gen ekspresyonları çalışılana dek -20°C'ye kaldırıldı.

Real-time Online Revers Transkriptaz RT-PCR ve Taqman Protokolü

Real-time Online RT-PCR gen ekspresyon ürününü kantite etme amacıyla kullanılan moleküler bir metottur. PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngülerini sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler), hassas ölçüm aletleri ile birleştirilmesi sonucu gerçek zamanlı PCR yöntemi geliştirildi. Bu yöntem sayesinde, DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnek son derece düşük kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir. Gerçek zamanlı PCR / RT-PCR' da ürünlerin analizi reaksiyon esnasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, PCR ürününün mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır.

Real-time Online PCR / RT-PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde diziye özgün problemlerden yararlanılmaktadır. Böylece sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon

riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir.

Gen Ekspresyon Analizlerinde Kullanılan Primer ve Problar

İlgili Primer ve problar web tabanlı ProbeFinder Software' i (www.universalprobelibrary.com) kullanılarak dizayn edildi (Tablo 1).

Tablo 1. VDR ve GAPDH Primer/Prob Sekansları 5'-3'

VDR prob	FAM -cct gcc ggc tca aac gct gtg- TAMRA
VDR ileri primer	ctc atc tgt cag aat gaa ctc ctt
VDR geri primer	tca cca agg aca acc gac g
GAPDH prob	FAM-caa gct tcc cgt tct cag cc-TAMRA
GAPDH ileri primer	gaa ggt gaa ggt cgg agt c
GAPDH geri primer	gaa gat ggt gat ggg att tc

TaqMan PCR Protokolü

PCR, Denatürasyon, Amplifikasyon ve Soğutma aşamalarını içermektedir.

Gen Ekspresyonun Değerlendirilmesi

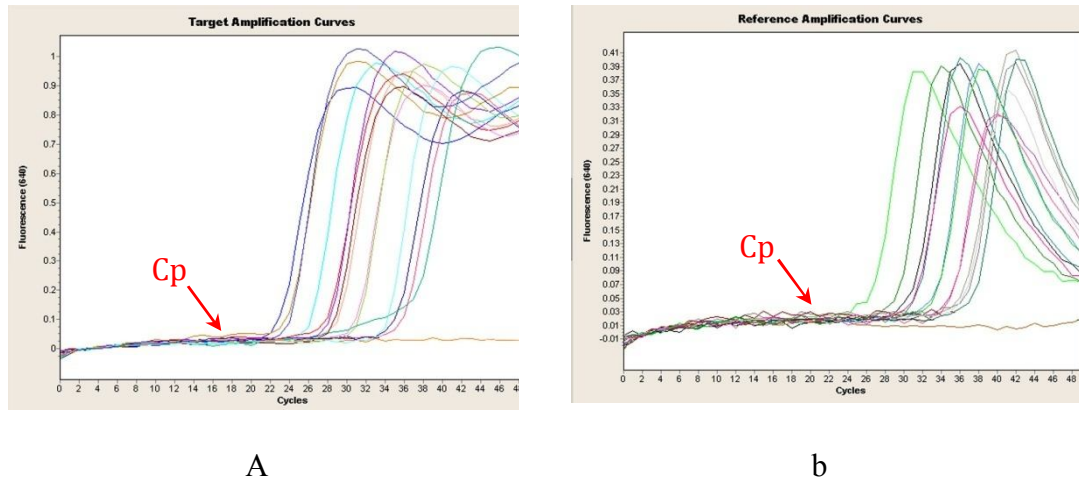
Gerçek zamanlı RT-PCR' da ürünlerin analizi reaksiyon esnasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Gerçek zamanlı PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problardan yararlanılmaktadır. Böylece sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir. LightCycler, gerçek zamanlı (real-time) bir PCR cihazıdır. Bu cihazda, amplifikasyon ürünlerinin artışı eş zamanlı olarak takip edilebilmektedir. Oldukça hızlı ısıtma ve soğutma kapasitesi sayesinde, 30-40 PCR döngüsü, 30 - 40 dakika içinde yapılabilmektedir. Sistemde, erime eğrisi analizi sayesinde, diziye özgül hibridizasyon problemlerinin tek zincirli DNA' ya hibridizasyonu izlenebilmektedir. Araştırılan gen bölgesi, o bölgeye özgül iki primer ile amplifiye edildikten sonra, oluşan ampikon, bir sonraki döngünün annealing aşamasında özgül hibridizasyon problemleri ile tespit edilmektedir. Oligo

1, 3' ucundan fluorescein (donör boya) ile oligo 2 ise, 5' ucundan LCRed640 (alıcı boya) ile işaretlendi. Annealing aşamasında iki oligonükleotid, DNA fragmanına baş-kuyruk pozisyonunda bağlanmaktadır. Oligonükleotidler bu pozisyonda hibridize olduklarında iki floresan boya birbirine çok yaklaşmış olmaktadır. Floresan ile işaretli 1. oligo, LC cihazının ışık kaynağından yayılan 470 nm' deki mavi ışık ile uyarılmakta ve uzun dalga boyunda (530 nm) yeşil floresan ışık yaymaktadır. İki probun birbirine çok yakın buldukları annealing aşamasında 530 nm' de yayılan enerji, ikinci hibridizasyon probuna aktarılarak onu uyarmakta ve farklı bir dalga boyunda (640 nm) kırmızı floresan ışık yayılmasına neden olmaktadır. İki prob arasındaki bu enerji transferi, Floresan Rezonans Enerji Transferi yani FRET olarak tanımlanmaktadır. PCR' dan sonra herhangi ek bir manuel işleme ihtiyaç yoktur ve buna bağlı olarak, kontaminasyon riski de en aza indirgenir.

İki µl cDNA, Light Cycler PCR Master Mix' ten 7µl kullanılarak, PCR ile amplifiye edilir. PCR sırasında, mRNA primerler ile amplifiye edildi. Taqman sisteminde, 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Probu 5' ucunda rapörtör florokrom (6-karboksiflorescein=6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (6-karboksi-tetrametil-rodamin=TAMRA) bulunmaktadır. Prob tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanmaktadır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece rapörtör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik aside bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA Polimeraz enzimi 5'→3' ekzonükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece rapörtör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusa üretilen ampikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır. Kalıp DNA'ya hibridizasyondan sonra yansıtılan flüoresan Light Cycler cihazı ile ölçülür. Aynı bir PCR' da yapılan aynı cDNA preperasyonu kullanılarak, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) cDNA' sını house keeping gen olarak kullanılır. Bunun ürünü RNA kontrolü ve rölatif kantitasyon için kullanılır. Her bir örneğin kantitasyonu, örneğin flüoresan rezonans enerjisi Light Cycler Kantitasyon Software'ı (LCQuant, Roche Diagnostics) kullanılarak ölçülür. İncelenecek örnekte, genlerin mRNA miktarının ölçülmesi için rölatif kantitasyon kullanılır. Amplifiye edilen DNA' nın kantitasyon analizi, kantitasyon software (Relative Quantification software Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) ile hesaplanmaktadır. PCR sırasında elde edilen ampikonlar, doğrudan LightCycler

cihazında, logaritmik artışa geçtikleri döngü sayısına göre değerlendirilmektedir. Bunun için önce konsantrasyonları bilinen GAPDH'ın 7 farklı standardı ile ($10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3$ ve 10^2) bir standart amplifikasyon eğrisi oluşturulur. Çalışılan örnekteki geçiş noktasına (Cp) göre cDNA'nın rölatif miktarı kantitasyon yazılımı tarafından belirlenmektedir (Şekil 10). Hedef gen kopya sayısının logaritmasının referans (housekeeping) gen kopyası logaritmasına oranı ilgili genin ekspresyonunun rölatif oranı (RR) ifade etmektedir.

$$RR = \frac{\text{Log (Hedef gen kopya sayısı)}}{\text{Log (Referans gen kopya sayısı)}}$$



Şekil 10. (a) Hedef gen, (b) Housekeeping gen geçiş noktası

İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS 16.0 programına aktarıldı ve istatistikleri bu programda yapıldı. Ortalamalar \pm standart sapma (SD) olarak belirlendi. Tüm grupların tanımlayıcı ve sıklık analizleri yapıldı. Grupların karşılaştırılmasında ki-kare testi ve Mann-Whitney testi kullanıldı. Çoklu değişken analizler için binary logistic regresyon modeli kullanıldı.

VDR polimorfizmleri ve idrar yolu enfeksiyonu arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için ki-kare testi kullanıldı. Verilen VDR genotipi için İYE risk analizinde ki-kare testi kullanılarak Odds ratio(OR) ve %95 güven aralığı(CI) hesaplandı.

Alel sıklığı populyasyondaki test alel sayısının total alel sayısına bölünmesi ile hesaplandı, gruplar arasındaki fark ki-kare testi ile hesaplandı.

$P < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

IV. BULGULAR

Çalışmaya alınan 92 İYE'li çocuğun 76'sı (%82,4) kız, 16'sı (%17,6) erkek olup, yaş ortalaması $7.3 \pm 3,6$ yıl (6 ay-15 yaş) idi. Kızların yaş ortalaması $7,5 \pm 3,2$; erkeklerin yaş ortalaması $6,2 \pm 4,9$ olup her iki cinsiyet için yaş ortalamaları arasında anlamlı fark yoktu ($p= 0,16$).

Kontrol grubunda 105 çocuk vardı. 69 (%65,7) kız, 36 (%34,3) erkek çocuğun, yaş ortalaması $14,1 \pm 2,2$ yıldı.

İYE'li çocuklar ilk başvuru bulgularına göre öncelikle sistit veya pyelonefrit olarak gruplandırılmıştı. Sistit grubunda 30 hasta vardı; yaş ortalaması $8,4 \pm 3,3$ yıldı. Pyelonefrit grubunda 62 hasta vardı, yaş ortalaması $6,7 \pm 3,6$ yıl idi.

Pyelonefritli hastalar 6 aylık izlem sonrasında çekilen DMSA sintigrafilerine göre SNP veya SPP olarak iki grupta incelendi, bu gruplarda sırasıyla 14 ve 48 hasta vardı. Yaş ve cinsiyet dağılımları Tablo 2'de görülmektedir.

Tablo 2. İYE grubunun alt gruplarında yaş ve cinsiyet dağılımı

	SPP (n=14) (%15,2)	SNP (n=48) (%52,2)	Sistit (n=30) (%32,6)
Yaş \pm SD	$8,8 \pm 2,9$	$6,1 \pm 3,6$	$8,4 \pm 3,3$
Cinsiyet			
Kız	11(%78,6)	40(%83,3)	25(%83,3)
Erkek	3(%21,4)	8(%16,7)	5 (%16,7)

İdrar kültürlerinde en sık izole edilen etken *E.coli* idi.

Tüm çalışma grubunda (İYE grubu ve kontrol grubu) bakılan vitamin D reseptör polimorfizmlerinin (*BsmI*, *FoqI*, *ApaI*, *TaqI*) genotip sıklığı Tablo 3, 4, 5 ve 6'da verildi. Restriksiyon bölgesinin varlığı küçük harfle, yokluğu büyük harfle gösterildi: *BsmI* bölgesi için "b" ve "B", *FokI* bölgesi için "f" ve "F", *ApaI* bölgesi için "a" ve "A", *TaqI* bölgesi için "t" ve "T" gibi. bb, FF, AA, TT wild tip; Bb, Ff, Aa, Tt heterozigot; BB, ff, aa, tt ise homozigot olarak tanımlandı. Diğerlerinden farklı olarak VDR ekspresyonu BB genotipinde düşüktür, BB homozigot olarak adlandırmaktadır.

VDR Gen Polimorfizmlerinin İYE ve Kontrol Grubunda Dağılımı

BsmI Gen Polimorfizmi

BsmI polimorfizm genotip dağılımı (bb, Bb, BB) İYE ve kontrol grubu arasında benzerdi, iki grup arasında istatistiksel farklılık bulunmadı ($p=0,30$), (Tablo 3). Ancak Bb genotipinde İYE riski hafif yüksekti (OR=1,46). Yine BB genotipi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da İYE için koruyucu etkili olarak bulundu (OR=0,88).

Tablo 3. Hasta ve kontrol grubunda *BsmI* gen polimorfizmi genotipinin dağılımı ve İYE riski ile ilişkisi

			Kontrol n=105	İYE n=92	p*	OR	% 95 CI		p
							alt	üst	
<i>BsmI</i> gen polimorfizmi	bb	n	31	23	0,30	1,00	-	-	-
		%	29,5	25,0					
	Bb	n	48	52		1,46	0,74	2,84	0,26
		%	45,7	56,5					
	BB	n	26	17		0,88	0,39	1,99	0,76
		%	24,8	18,5					

*ki-kare testine göre

FokI gen polimorfizmi

FokI polimorfizmi açısından İYE geçiren çocuklar ve kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptandı ($p=0,00$), (Tablo 5). Ff genotipinde İYE riskinde 3,44 kat artış saptandı ($p=0,00$). ff genotipinde de İYE geçirme riski 3,94 kat artmaktaydı ($p=0,00$), (OR=3,94; %95 CI 1,71-9,09).

Tablo 4. Hasta ve kontrol grubunda *FokI* gen polimorfizmi genotipinin dağılımı ve İYE riski ile ilişkisi

			Kontrol n=105	İYE n=92	p*	OR	% 95 CI		p
							alt	üst	
<i>FokI</i> gen polimorfizmi	FF	n	37	12	0,00	1,00	-	-	-
		%	35,2	13,0					
	Ff	n	43	48		3,44	1,59	7,43	0,00
		%	41,0	52,2					
	ff	n	25	32		3,94	1,71	9,09	0,00
		%	23,8	34,8					

*ki-kare testine göre

TaqI Gen Polimorfizmi

TaqI genotipinin (TT, Tt, tt) İYE ve kontrol grubu arasında karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında istatistiksel farklılık bulunmadı ($p=0,43$), (Tablo 4). Ancak hem Tt genotipinde hem de tt genotipinde İYE riskinde hafif bir artış vardı (OR sırasıyla 1,48 ve 1,31).

Tablo 5. Hasta ve kontrol grubunda *TaqI* gen polimorfizmi genotipinin dağılımı ve İYE riski ile ilişkisi

			Kontrol n=105	İYE n=92	p*	OR	% 95 CI		p
							alt	üst	
TaqI gen polimorfizmi	TT	n	47	33	0,43	1,00	-	-	-
		%	44,8	35,9					
	Tt	n	45	47		1,48	0,81	2,72	0,19
		%	42,9	51,1					
	tt	n	13	12		1,31	0,53	3,24	0,55
		%	12,4	13,0					

*ki-kare testine göre

ApaI gen polimorfizmi

ApaI polimorfizminin Aa ve aa genotipleri kontrol grubunda artmış bulunarak İYE için koruyucu etkili olarak bulundu ($p=0,00$), (Tablo 6).

Tablo 6. Hasta ve kontrol grubunda *ApaI* gen polimorfizmi genotipinin dağılımı ve İYE riski ile ilişkisi

			Kontrol n=105	İYE n=92	p*	OR	% 95 CI		p
							alt	üst	
ApaI gen polimorfizmi	AA	n	22	52	0,00	1,00	-	-	-
		%	21,0	56,5					
	Aa	n	71	37		0,22	0,11	0,41	0,00
		%	62,6	40,2					
	aa	n	12	3		0,10	0,02	0,41	0,00
		%	11,4	3,3					

*ki-kare testine göre

VDR Gen Polimorfizmlerinin İYE Alt Gruplarında Değerlendirilmesi

BsmI Polimorfizmi

BsmI polimorfizmi açısından SPP, SNP ve sistit grupları arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmazken ($p=0,16$), (Tablo 7), her grubun kontrol grubu ile karşılaştırılması yapıldığında sistit grubu ve kontrol grubu arasında anlamlı fark vardı (Tablo 10), ($p=0,01$).

Tablo 7. *BsmI* polimorfizmi genotip dağılımının İYE alt grupları arasında dağılımı

			İYE			p*
			SPP n=14	SNP n=48	Sistit n=30	
<i>BsmI</i> gen polimorfizmi	bb	n	3	14	6	0,16
		%	21,4	29,2	20,0	
	Bb	n	7	23	22	
		%	50,0	49,9	73,3	
	BB	n	4	11	2	
		%	28,6	22,9	6,7	

*ki-kare testine göre

Kontrol grubu ve SPP grubunun *BsmI* polimorfizmi açısından karşılaştırılmasında istatistiksel farklılık olmadığı halde ($p=0,81$), Bb ve BB genotipinde SPP riskinde sırasıyla 1,5 ve 1,59 kat artış mevcuttu (sırasıyla OR= 1,50 ve 1,59), (Tablo 8).

Tablo 8. *BsmI* polimorfizmi genotip dağılımının SPP ve kontrol grupları arasındaki ilişkisi

			Kontrol n=105	SPP n=14	p*	OR	% 95 CI		p
							alt	Üst	
<i>BsmI</i> gen polimorfizmi	bb	n	31	3	0,81	1,00	-	-	-
		%	29,5	21,4					
	Bb	n	48	7					
		%	45,7	50,0					
	BB	n	26	4					
		%	24,8	28,6					

*ki-kare testine göre

Kontrol grubu ve SNP grubunun *BsmI* polimorfizimi açısından karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0,96$), (Tablo 9).

Tablo 9. *BsmI* polimorfizmi genotip dağılımının SNP ve kontrol grupları arasındaki ilişkisi

			Kontrol n=105	SNP n=48	p*	OR	% 95 CI		P
							alt	üst	
<i>BsmI</i> gen polimorfizmi	bb	n	31	14	0,96	1,00	-	-	-
		%	29,5	29,2					
	Bb	n	48	23		0,93	0,36	2,41	0,89
		%	45,7	47,9					
	BB	n	26	11		1,06	0,47	2,36	0,88
		%	24,8	22,9					

*ki-kare testine göre

BsmI polimorfizminin kontrol grubu ve sistit grubu arasında karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu bulundu ($p=0,01$). Bb genotipi sistit riskini 2,36 kat artırıyordu (Tablo 10).

Tablo 10. *BsmI* polimorfizmi genotip dağılımının sistit ve kontrol grupları arasındaki ilişkisi

			Kontrol n=105	Sistit n=30	p*	OR	% 95 CI		p
							Alt	üst	
<i>BsmI</i> gen polimorfizmi	bb	n	31	6	0,01	1,00	-	-	-
		%	29,5	20,0					
	Bb	n	48	22		2,36	0,86	6,49	0,08
		%	45,7	73,3					
	BB	n	26	2		0,39	0,07	2,13	0,27
		%	24,8	6,7					

*ki-kare testine göre

***FokI* gen polimorfizmi**

FokI polimorfizmi açısından SPP, SNP ve sistit grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,71$), (Tablo 11).

Tablo 11. *FokI* polimorfizmi genotip dağılımının İYE alt grupları arasında dağılımı

			İYE			p
			SPP n=14	SNP n=48	Sistit n=30	0,71
<i>FokI</i> gen polimorfizmi	FF	n	3	7	2	
		%	21,4	14,6	6,7	
	Ff	N	7	24	17	
		%	50,0	50,0	56,7	
	ff	n	4	17	11	
		%	28,6	35,4	36,7	

*ki-kare testine göre

SPP ile kontrol grubu arasında *FokI* polimorfizmi açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0,59$), ancak Ff genotipinde SPP riski 2 kat, ff genotipinde ise 1,97 kat artmış olarak bulundu (Tablo 12).

Tablo 12. *FokI* polimorfizmi genotip dağılımının SPP ve kontrol grupları arasındaki ilişkisi

		Kontrol n=105	SPP n=14	p*	OR	% 95 CI		p	
						alt	üst		
<i>FokI</i> gen polimorfizmi	FF	n	37	3	0,59	1,00	-	-	-
		%	35,2	21,4					
	Ff	n	43	7					
		%	41,0	50,0					
	ff	n	25	4					
		%	23,8	28,6					

*ki-kare testine göre

SNP grubu ile kontrol grubu arasında *FokI* polimorfizmi açısından istatistiksel anlamlı fark vardı ($p=0,01$). Ff genotipinde SNP riski 2,95 kat, ff genotipinde ise 3,59 kat artmıştı ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlıydı (Tablo 13).

Tablo 13. *FokI* polimorfizmi genotip dağılımının SNP ve kontrol grupları arasındaki ilişkisi

			Kontrol n=105	SNP n=14	p*	OR	% 95 CI		p
							alt	üst	
<i>FokI</i> gen polimorfizmi	FF	n	37	3	0,01	1,00	-	-	-
		%	35,2	21,4					
	Ff	n	43	7		2,95	1,14	7,62	0,02
		%	41,0	50,0					
	ff	n	25	4		3,59	1,30	9,92	0,01
		%	23,8	28,6					

*ki-kare testine göre

Sistit grubu ve kontrol grubu arasında da *FokI* polimorfizmi açısından anlamlı farklılık saptandı ($p=0,00$). Ff genotipinin sistit riskini 7,31 kat arttırdığı görüldü ($p=0,00$). ff genotipinde ise sistit riski 8,14 kat artmış bulundu ($p=0,00$), (Tablo 14).

Tablo 14. *FokI* polimorfizmi genotip dağılımının sistit ve kontrol grupları arasındaki ilişkisi

			Kontrol n=105	Sistit n=14	p*	OR	% 95 CI		p
							alt	üst	
<i>FokI</i> gen polimorfizmi	FF	n	37	3	0,00	1,00	-	-	-
		%	35,2	21,4					
	Ff	n	43	7		7,31	1,58	33,76	0,00
		%	41,0	50,0					
	ff	n	25	4		8,14	1,66	39,90	0,00
		%	23,8	28,6					

*ki-kare testine göre

***Apal* Gen Polimorfizmi**

Apal polimorfizmi SPP, SNP ve sistit grupları arasında farklı bulunmadı ($p=0,96$), (Tablo 15). Ancak *Apal* polimorfizmi açısından kontrol grubunun her üç gruba karşılaştırılmasında istatistiksel farklılık olduğu bulundu (sırasıyla $p=0,01$; $p=0,00$; $p=0,00$). *Apal* polimorfizminin İYE geçirme riski açısından koruyucu faktör olduğu saptandı. Çünkü wild tip olan “aa” polimorfizmi kontrol grubunda tüm İYE grubu ve alt gruplarda daha yüksek orandaydı.

Tablo 15. *Apal* polimorfizmi genotipinin İYE alt grupları arasında dağılımı

			İYE			P
			SPP n=14	SNP n=48	Sistit n=30	0,96
<i>Apal</i> gen polimorfizmi	AA	n	8	27	17	
		%	57,1	56,2	56,7	
	Aa	n	6	19	12	
		%	42,9	39,6	40,0	
	aa	n	0	2	1	
		%	0	4,2	3,3	

*ki-kare testine göre

Apal polimorfizmi Aa ve aa genotipleri SPP açısından koruyucu olarak saptandı (p sırasıyla 0,00 ve 0,04), (Tablo 16).

Tablo 16. *Apal* polimorfizmi genotip dağılımının SPP ve kontrol grupları arasındaki ilişkisi

			Kontrol n=105	SPP n=14	P*	OR	% 95 CI		p
							alt	üst	
<i>Apal</i> gen polimorfizmi	AA	n	22	8	0,01	1,00	-	-	-
		%	21,0	57,1					
	Aa	n	71	6		0,23	0,07	0,74	0,00
		%	62,6	42,9					
	aa	n	12	0		0,73	0,59	0,91	0,04
		%	11,4	0					

*ki-kare testine göre

Benzer şekilde *Apal* polimorfizmi Aa ve aa genotipleri SNP ve sistit açısından da anlamlı olarak koruyucu saptandı (p=0,00), (Tablo 17 ve 18).

Tablo 17. *Apal* polimorfizmi genotip dağılımının SNP ve kontrol grupları arasındaki ilişkisi

			Kontrol n=105	SNP n=48	p*	OR	% 95 CI		p
							alt	üst	
<i>Apal</i> gen polimorfizmi	AA	n	22	27	0,00	1,00	-	-	-
		%	21,0	56,2					
	Aa	n	71	29		0,21	0,10	0,46	
		%	62,6	39,6					
	aa	n	12	2		0,13	0,27	0,67	
		%	11,4	4,2					

*ki-kare testine göre

Tablo 18. *Apal* polimorfizmi genotip dağılımının sistit ve kontrol grupları arasındaki ilişkisi

			Kontrol n=105	Sistit n=30	p*	OR	% 95 CI		p
							alt	üst	
<i>Apal</i> gen polimorfizmi	AA	n	22	17	0,00	1,00	-	-	-
		%	21,0	56,7					
	Aa	n	71	12		0,21	0,09	0,52	
		%	62,6	40,0					
	aa	n	12	1		0,10	0,01	0,91	
		%	11,4	3,3					

*ki-kare testine göre

TaqI Gen Polimorfizmi

TaqI polimorfizmi açısından SPP, SNP ve sistit grupları arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0,93$), (Tablo 19).

Tablo 19. *TaqI* polimorfizmi genotipinin İYE alt grupları arasında dağılımı

			İYE			p
			SPP n=14	SNP n=48	Sistit n=30	0,93
<i>TaqI</i> gen polimorfizmi	TT	n	6	16	11	
		%	42,9	33,3	36,7	
	Tt	N	6	25	16	
		%	42,9	52,1	53,3	
	tt	n	2	7	3	
		%	14,3	14,6	10,0	

*ki-kare testine göre

TaqI polimorfizmi açısından İYE alt gruplarından sistit, SPP ve SNP gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 20, 21, 22).

Tablo 20. *TaqI* polimorfizmi genotip dağılımının SPP ve kontrol grupları arasındaki ilişkisi

			Kontrol n=105	SPP n=14	p*	OR	% 95 CI		p
							alt	üst	
<i>TaqI</i> gen polimorfizmi	TT	n	47	6	0,977	1,00	-	-	-
		%	44,8	42,9					
	Tt	n	45	6					
		%	42,9	42,9					
	tt	n	13	2					
		%	12,4	14,3					
						1,04	0,31	3,47	0,94
						1,20	0,21	6,69	0,83

*ki-kare testine göre

Ancak Tt genotipi SNP ve sistit grubunda hafif artmıştı, tt genotipi ise SNP grubunda hafif artmıştı, bu farklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecek düzeyde değildi (OR sırasıyla 1,63; 1,51; 1,58), (Tablo 21, 22).

Tablo 21. *TaqI* polimorfizmi genotip dağılımının SNP ve kontrol grupları arasındaki ilişkisi

			Kontrol n=105	SNP n=48	p*	OR	% 95 CI		p
							alt	üst	
<i>TaqI</i> gen polimorfizmi	TT	n	47	16	0,41	1,00	-	-	-
		%	44,8	33,3					
	Tt	n	45	25		0,63	0,21	1,86	0,40
		%	42,9	52,1					
	tt	n	13	7		1,03	0,36	2,92	0,95
		%	12,4	14,6					

*ki-kare testine göre

Tablo 22. *TaqI* polimorfizmi genotip dağılımının sistit ve kontrol grupları arasındaki ilişkisi

			Kontrol n=105	Sistit n=30	p*	OR	% 95 CI		p
							alt	üst	
<i>TaqI</i> gen polimorfizmi	TT	n	47	11	0,596	1,00	-	-	-
		%	44,8	36,7					
	Tt	n	45	16		1,51	0,63	3,62	0,34
		%	42,9	53,3					
	tt	n	13	3		0,98	0,23	4,06	0,98
		%	12,4	10,0					

*ki-kare testine göre

VDR gen polimorfizmleri açısından bulunan farklılıkların İYE ve kontrol grubu arasında yaş veya cinsiyetten etkilenip etkilenmediğini belirlemek için çoklu değişken analiz yapıldı, polimorfizmlerdeki farklılığın grup değişiminden etkilendiği, yaş ve cinsiyet değişkeninden etkilenmediği görüldü.

VDR Geni Alel Sıklıklarının Kontrol ve İYE Grubunda Dağılımı

Hasta ve kontrol grubunda alel sıklıkları değerlendirildiğinde “f” alel frekans dağılımı hasta grubunda anlamlı olarak yüksekti ($p=0,00$). *Apal* polimorfizminde “a” alel frekans dağılımı ise kontrol grubunda anlamlı olarak yüksekti ($p=0,00$), (Tablo 23).

Tablo 23. Hasta ve kontrol grubunda VDR geni alel frekans dağılımı

Alel sıklığı	Alel	Kontrol (n=105) n (%)	İYE (n=92) n (%)	p
<i>BsmI</i>	B	100 47,7	86 46,8	0,86
	b	110 52,3	98 53,2	
<i>FokI</i>	F	117 55,7	72 39,1	0,00
	f	93 44,3	112 60,9	
<i>Apal</i>	A	115 54,8	141 76,6	0,00
	a	95 45,2	43 23,4	
<i>TaqI</i>	T	139 66,2	113 61,4	0,32
	t	71 33,8	71 38,6	

VDR Ekspresyon Sonuçları

Çalışmaya katılan 24 hastanın idrar örneklerinde VDR ekspresyonu bakıldı. Hastaların hepsi pyelonefrit geçiren hastalardı. 9 hasta SPP grubunda, 15 hasta SNP grubunda idi. Hastalarda VDR polimorfizmleri genotip sıklıkları ile idrar VDR ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Tablo 24, 25, 26, 27), (Şekil 11).

Tablo 24. *BsmI* polimorfizmi ve VDR ekspresyonu arasındaki ilişki

<i>BsmI</i>	N	VDR Ortalama RR	SD	%95 CI		P
				alt	üst	
bb	5	0,5792	0,4728	-0,0078	1,1663	0,38
Bb	11	0,1449	0,7091	-0,3314	0,6213	
BB	8	0,3914	0,4613	0,0056	0,7771	

Tablo 25. *FokI* polimorfizmi ve VDR ekspresyonu arasındaki ilişki

<i>FokI</i>	N	VDR Ortalama RR	SD	%95 CI		p
				alt	üst	
FF	3	0,2182	1,0782	-2,4601	2,8967	0,93
Ff	16	0,3141	0,5700	0,0104	0,6179	
ff	5	0,3880	0,4669	-0,1916	0,9678	

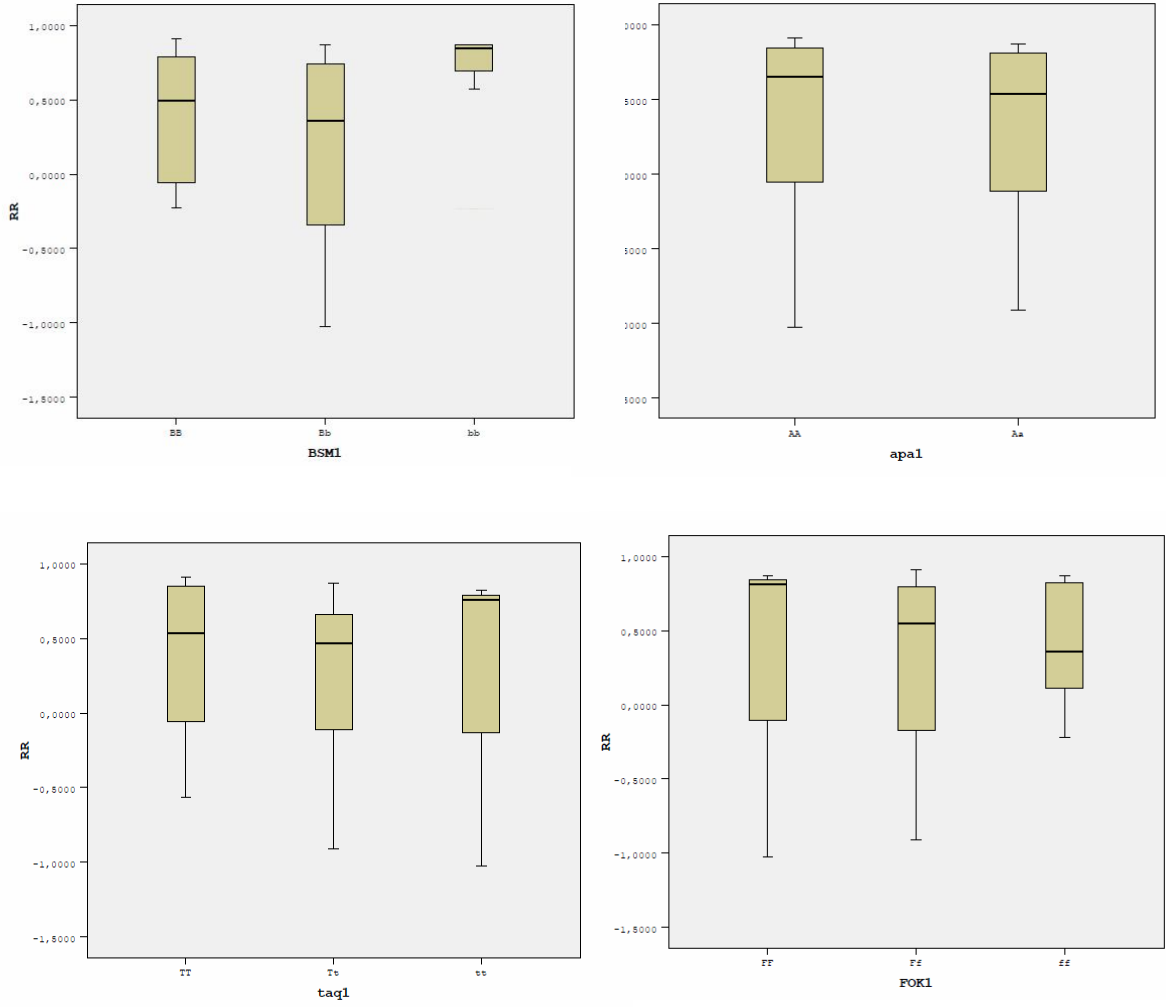
Tablo 26. *ApaI* polimorfizmi ve VDR ekspresyonu arasındaki ilişki

<i>ApaI</i>	N	VDR Ortalama RR	SD	%95 CI		p
				alt	üst	
AA	11	0,3490	0,6298	-0,0740	0,7721	0,81
Aa	13	0,2909	0,5873	-0,6393	0,6458	

Tablo 27. *TaqI* polimorfizmi ve VDR ekspresyonu arasındaki ilişki

	n	VDR Ortalama RR	SD	%95 CI		p
				alt	üst	
TT	11	0,3848	0,5374	0,0237	0,7459	0,86
Tt	10	0,2833	0,5695	-0,1241	0,6907	
tt	3	0,1852	1,0496	-2,4222	2,7926	

Hastalarda VDR polimorfizmleri genotip sıklıkları ile idrar VDR ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmazken, genotiplere göre idrarda VDR ekspresyon değerleri ortalamalarına bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hemen tüm polimorfizmler için mutant alelleri taşıyan genotiplerde VDR ekspresyon düzeyi ortalamalarının düşük olduğu görüldü (Şekil 11).

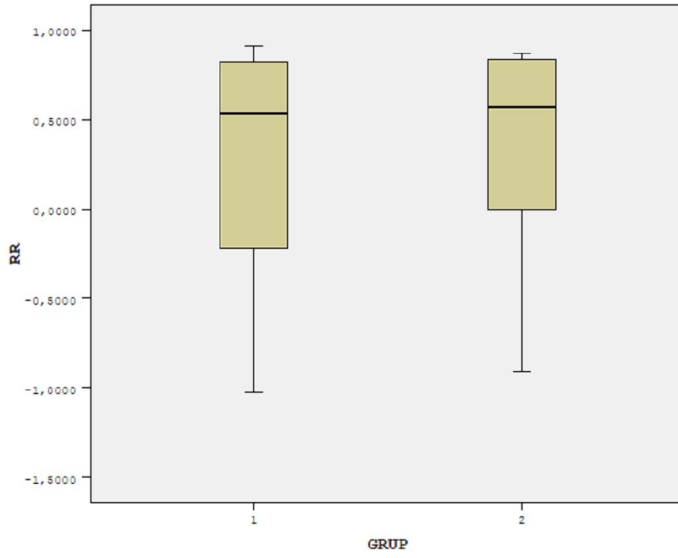


Şekil 11. VDR polimorfizmleri genotip dağılımları ve VDR ekspresyonu ilişkisi

VDR ekspresyonu çalışılan hastalar SPP ve SNP olarak gruplandırıldığında her iki grup arasında VDR ekspresyonu açısından anlamlı fark yoktu ($p=0,57$), (Tablo 28), (şekil 12).

Tablo 28. VDR ekspresyonu İYE grupları arasındaki ilişki

	n	VDR Ortalama RR	SD	%95 CI		p
				Alt	üst	
SPP	9	0,2266	0,6957	-0,3081	0,7613	0,57
SNP	15	0,3721	0,5434	0,0712	0,6731	



Şekil 12. SPP ve SNP grupları arasında VDR ekspresyon ilişkisi

Grup 1=skar pozitif pyelonefrit, grup 2=skar negatif pyelonefrit

V. TARTIŞMA

İYE çocuklarda sık görülen bir enfeksiyon hastalığıdır. DMSA çalışmaları febril İYE’de çocukların %55-75’inde renal parankimin etkilendiğini göstermiştir. Bu çocukların yaklaşık %20-40’ı kalıcı renal hücre hasarı yani renal skar geliştirir (4). Açıkça gösterilmiştir ki İYE’li çocuklarda dikkatli radyolojik inceleme, uygun tedavi ve izlem İYE komplikasyonlarının insidansını dramatik olarak azaltmaktadır. Araştırmacılar için gelecekteki hedef İYE ve renal skar geliştirme riski yüksek olan çocukların belirlenmesi için erken belirteçlerin ve genetik faktörlerin belirlenmesi olmalıdır.

Bu tez çalışmasında İYE’li çocuklarda ve sağlıklı kontrol grubunda VDR gen polimorfizmleri ve bir kısım İYE’li çocuğun idrar örneklerinde VDR ekspresyonu araştırılmıştır.

Epidemiyolojik çalışmalar vitamin D eksikliğinin kanser, otoimmün ve enfeksiyöz hastalıkların artışı ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Vitamin D eksikliği ve enfeksiyon hastalıkları arasındaki ilişki, solar radyasyonun tüberküloz hastalarında yararlı olduğunun fark edildiği 19.yüzyıla yani yaklaşık 100 yıl öncesine dayanır (124).

Vitamin D terimi vitamin D₂ ve vitamin D₃’ü kapsar. Biyolojik olarak aktif vitamin D büyük oranda CYP2R1 ve CYP27A1’in katalize ettiği hepatik 25-hidroksilasyon ile üretilir. Oluşan 25-hidroksi-vitamin D uzun yarı ömre sahiptir ve dolaşımdaki majör vitamin D metabolitidir (124). Konsantrasyonu vitamin D’nin aktif formu olan 1,25(OH)₂D₃ ‘ten 1000 kat fazladır (89). 25-hidroksi vitamin D CYP27B1’in katalizlediği 1α hidroksilasyon ile 1,25-dihidroksivitamin D’ye dönüşür. 1α hidroksilasyonun majör yeri böbreklerse de bileşiğin fizyolojik aktivitelerinin önemli bir bölümünden sorumlu bir kısmı da periferik dokularda oluşur. Vitamin D başlangıçta kalsiyum homeostazında etkili bir ajan olarak düşünülse de, bugün vitamin D’nin immün sistem regülasyonu dahil birçok etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır (124). Deri yeterli UVB ışınına (290-320 nm) maruz kaldığında endojen vitamin D üretimi için hormonal kaskat aktive olur. Güneş ışığı ayrıca VDR ekspresyonunu da indükler (89). Vitamin D’nin aktif metaboliti olan 1,25(OH)₂ D₃ önemli bir immünomodülatuvar hormondur, makrofajları aktiveleştirerek fagositozu artırır ve immün cevabı etkiler (131). 1,25(OH)₂ D₃ potent immunomodülatuvar etkilerini VDR aracılığıyla yapar (92).

İmmün sistemin enfeksiyon hastalıklarına yatkınlık/direnç kontrolünde, genetik faktörlerin rolünün anlaşılması koruyucu ve tedavi edici önlemlerin geliştirilmesi açısından önemlidir (89). Serum vitamin D seviyesi ve latent tüberküloz enfeksiyonu veya hastalık gelişim riski arasındaki ilişki Avustralya’da yaşayan Afrikalı göçmenlerde gösterilmiştir (132). Vitamin D’nin potansiyel koruyucu etkileri en fazla tüberküloz enfeksiyonuna karşı dikkati çekse de başka bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı da yararlı olduğu konusunda bilgiler birikmektedir. Küçük ancak izlemeye değer bir çalışmada antiosteoporotik olarak vitamin D tedavisi alan yaşlı kadınlarda tedavi almayan kontrol grubuna göre *Helicobacter pylori* enfeksiyon oranı anlamlı olarak düşük bulunmuştur (133). Yine çok sayıda çalışmada, birçoğunun viral olduğu alt ve üst solunum yolu enfeksiyonlarında vitamin D’nin potansiyel koruyucu rolünden bahsedilmektedir (134-136). Hindistan’da yapılan bir çalışmada subklinik vitamin D eksikliği şiddetli alt solunum yolu enfeksiyonu ile ilişkili bulunmuştur (137). Yine Etiyopya’daki çocuklarda klinik vitamin D eksikliğinin pnömoni riskinde 13 kat artışa neden olduğu gösterilmiştir (138). Bir Fin çalışmasında genç askeri birliklerde 40 nM (16 ng/ml) altındaki serum 25-hidroksi vitamin D değerleri ile akut solunum enfeksiyonları (sinüzit, tonsilit, otit, bronşit, pnömoni, faranjit, larenjit) arasında ilişki saptanmıştır (139).

Vitamin D fiziyojisi ve enfeksiyon hastalıkları arasındaki ilişki VDR’yi kodlayan gen polimorfizmleri ile ilgili genetik çalışmalarla da desteklenmiştir (Tablo 29), (140).

Tablo 29. VDR polimorfizmleri ve enfeksiyöz hastalıklar arasındaki genetik ilişki

Yazarlar / Yıl	Çalışma bölgesi	Fenotip	Test edilen TNPler	İlişki
Bellamy R. et al., 1999 (141)	Gambia	Pulmoner TB, kronik hepatit B	<i>TaqI</i>	<i>TaqI</i> tt genotipi TB (p=0.01) ve kronik hepatit B enfeksiyonu (p=0.01) için koruyucu faktör
Wilkinson R.J. et al., 2000 (142)	United Kingdom (Gujarati Asians)	TB	<i>TaqI</i> , <i>BsmI</i> <i>FokI</i>	<i>TaqI</i> TT/Tt genotipi+ vitamin D3 (VD) eksikliği TB için risk faktörü (OR=2.8, 95% CI=1.2-6.5). <i>FokI</i> ff genotipi+VD eksikliği TB için risk faktörü (OR=5.1, 95% CI=1.4-18.4).
Selvaraj P. et al., 2000 (143)	Hindistan	Pulmoner TB	<i>TaqI</i>	Kadınlarda <i>TaqI</i> TT genotipi koruyucu faktör, tt genotipi risk faktörü (p<0.02 her ikisi için)
Liu W. et al., 2003 (144)	Çin Cumhuriyeti	Pulmoner TB	<i>FokI</i>	<i>FokI</i> ff genotipi pulmoner TB ile ilişkili (OR=3.66, 95%CI=1.48-9.07)
Barber Y et al., 2001 (145)	İspanya (Avrupa orijinliler)	HIV/AIDS progresyonu	<i>BsmI</i>	<i>BsmI</i> BB genotipi hastalığın hızlı progresyonu ile ilişkili (OR=2.4, 95%CI=1.3-4.7).
Roy S et al., 1999 (146)	Hindistan	Tüberküloid lepra, lepromatöz lepra	<i>TaqI</i>	<i>TaqI</i> tt genotipi tüberküloid lepra ile (OR=3.22, 95%CI=1.47-7.13), <i>TaqI</i> TT genotipi lepromatöz lepra ile ilişkili (OR=1.67, 95%CI=1.02-2.75).

Birçok VDR polimorfizmi vardır, bunlardan *FokI* polimorfizmi translasyon başlangıç kodonunda 3 kodon kaymaya neden olurken, *ApaI*, *TaqI* ve *BsmI* 3'UTR bölgesindedir. Genetik çalışmalar VDR polimorfizmlerini çeşitli sayıda enfeksiyon hastalığı ile ilişkilendirmiştir. Peru'da yapılmış bir çalışmada *TaqI* ve *BsmI* RFLP'lerinin pulmoner tüberküloz ile ilişkili olduğunu göstermiştir (147). 2005 yılında Lewis ve arkadaşlarının yapmış olduğu metaanalizde tüberküloz riskinin *FokI* ff genotipinde FF'e göre arttığı bulunmuştur (131). Gujarat Asyalılarında *FokI* RFLP ff genotipi 25-hidroksi vitamin D eksikliği olan hastalarda pulmoner tüberküloz yaygınlığı ile ilişkili saptanmıştır (142).

Çocuklarda yapılmış bir analizde ff genotipi alt solunum yolu enfeksiyonu (özellikle viral bronşiolit) için FF genotipine göre 7 kat farklı saptanmıştır (148). VDR polimorfizmleri HIV enfeksiyonu ile de ilişkili bulunmuştur (145, 149).

Bu tez çalışmasında ise İYE'li çocuklarda araştırılan VDR polimorfizmlerinden *FokI* kontrol grubundan farklı bulunmuş; "f" alel sıklığı hasta grubunda anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Ff ve ff genotiplerinin İYE için risk faktörü olduğu görülmüştür. Sistit ve pyelonefrit riskinin *FokI* Ff ve ff genotiplerinde FF'e göre belirgin arttığı görülmüştür. Ayrıca istatistiksel olarak anlamlı olmasa da skar pozitif piyonefritli hastalarda Ff ve ff genotiplerinde yaklaşık 2 kat artış saptanmıştır. Bu sonuç İYE'ye yatkınlık yanı sıra renal skar gelişimi açısından da bu polimorfizmin önemli olabileceğini düşündürmüştür. Ancak SPP grubunda hasta sayısının az olması nedeni ile bu hipotezin daha geniş sayıda hasta grupları ile yapılacak araştırmalarla desteklenmesi gerektiği düşünülmüştür.

2015 Afrika'lı olgunun dahil edildiği bir vaka-kontrol çalışmasında, tüberküloz hastalarında *TaqI* polimorfizmi için homozigot olma oranı (genotip tt) düşük seviyede bulunmuştur (141). VDR polimorfizmleri ayrıca bir başka mikobakteriyel ajanın yol açtığı lepra ile de ilişkili bulunmuştur (150). Bengal'li hastalarda VDR polimorfizmi tt genotipi tüberküloid lepra ile ilişkili iken TT genotipi lepromatöz lepra ile ilişkili saptanmıştır (146). Bu tez çalışmasında *TaqI* polimorfizm genotipleri ile İYE arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Ancak hem Tt hem tt genotipinde İYE riski istatistiksel olarak olmasa da hafif yüksek bulunmuştur.

İnsan mesanesi VDR ligandları için potansiyel hedeftir ve iyi bilinen VDR ligand-sensitif doku olan prostata benzer VDR ekspresyonuna sahiptir (151). Bu tez çalışmasında *BsmI* polimorfizmi Bb genotip ile sistit riski arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Bb ve BB genotiplerinde SPP riskinde de hafif artış görülmüştür. *FokI* polimorfizminde olduğu gibi renal skar oluşumu açısından daha geniş sayıda skar pozitif pyelonefritli hasta gruplarında

araştırmalara ihtiyaç vardır. Yine Bb genotipi tüm İYE grubu ele alındığında İYE riskinde hafif artış olduğu dikkati çekmiştir.

Yapılan alışmalarda *Apal* polimorfizmi ile enfeksiyona yatkınlık arasında dikkat çekici bir ilişki saptanmamıştır. Bu çalışmada ise Aa genotipi hem tüm İYE grubunda hem de her İYE alt grubu ayrı değerlendirildiğinde anlamlı olarak koruyucu bulunmuştur. “a” alel sıklığı da kontrol grubunda anlamlı olarak yüksek saptanmıştır.

İYE’li hastalardan pyelonefrit grubunda VDR polimorfizm genotipleri ile idrarda VDR ekspresyonu arasındaki ilişki incelenmiştir. VDR gen polimorfizmi ile VDR geni ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. Ayrıca skar pozitif ve skar negatif pyelonefrit gruplarında da hastaların VDR ekspresyonu ile anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Ancak genotiplere göre idrarda VDR ekspresyon değerleri ortalamalarına bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hemen tüm polimorfizmler için mutant alelleri taşıyan genotiplerde VDR ekspresyon düzeyi ortalamalarının düşük olduğu göze çarpmaktadır. VDR ekspresyon değer aralığı çok geniş olduğu için ya da standart sapmalar fazla olduğu için yorum yapmak zor olmakla birlikte daha çok olgu sayısını içeren çalışmalarla idrarda VDR polimorfizmleri ile VDR ekspresyonu ilişkisinin daha kesin olarak ortaya konulabileceğini dşnlmştir.

Pediyatrik popülasyonda İYE skar oluşumuna, tekrarlayan enfeksiyonlara ve kalıcı renal fonksiyon bozukluğuna ilerleyebilir. İdrar yollarına gelen mikroorganizmalar başlangıçtaki yapışmadan Tamm-Horsfall gibi sürekli salgılanan proteinlerce korunur. Tamm-Horsfall proteinleri *Escherichia coli*’nin epitelyal adezyonunu önleyerek anti-infektif rol oynar. roepitele yaklaşan organizmalar laktoferrinle karşılaşır, laktoferrin hem lokal demir konsantrasyonlarını tktir hem de mikrobiyal membrana bağlanarak membran hasarı oluşturur (130). AMP’ler tüm doğada yaygın olarak bulunur ve bazı bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve çok hücreli hayvanlarda saptanmıştır. AMPler mikroorganizmanın zararına hızlı ve ölümcül bir şekilde etki eder. AMP’ler profesyonel fagositik hücrelerce ve mikroorganizma ile karşılaşmakta olan tüm epitel hücrelerince üretilir. Bazıları sürekli eksprese olurken, bazıları sadece oganizma hasar grdğinde veya mikroorganizma ile karşılaştığında eksprese olur. İnsanda en iyi çalışılmış AMPler defensinler ve katelisidindir. Laktoferrin ve lipokalin de antimikrobiyal proteinlerdir, demir ve esansiyel mikrobiyal besinlerin sağlanmasını kısıtlarlar. Katelisidin bir gen ile temsil edilir, tüm epitelyal yüzeylerde eksprese olur. Genellikle ekspresyonu lokal hasar veya enfeksiyon ile uyarılır. α -defensinler (HNP 1-4) nötrofillerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. β -defensinler (HBD1-4) roepitel boyunca yaygın olarak

bulunur. Tüm defansinler ve katelisinidin insan üriner sisteminde eksprese olur (130). Defansinlerin böbreği korumadaki rolü ile ilgili en güçlü delil defansin geninin silindiği farede idrar sterilitésinin sağlam kontrolündeki kadar sağlanamaması ve bu farelerin %30'unda mesane idrarında *Staphylococcus* suşlarının bulunmasıdır (152). Hem HBD1 defansin hem de katelisinidin sürekli olarak salgılanır ve üroepitelin hemen yakınındaki sıvı tabakanın bakterisidal özelliklerine katkıda bulunurlar. Bakteriler bu defansı aşabilirse indüklenebilir AMP'ler, HBD2 defansin ve daha fazla katelisinidin uyarılır. Üroepitel çok miktarda katesidilin sentez ve sekresyon kapasitesine sahiptir. Katelisinidin ve HBD2 indüksiyonu ile koordine olarak ve AMP'lerin kemoatraktan özelliklerine bağlı olarak lokal lökositler açığa çıkar. Bölgeye gelen monositler sitokinleri sentezleyerek epitel hücrelerince daha fazla AMP ekspresyonuna yol açar. Eđer mikroorganizmalar bu erken defansları geçebilirse üroepitel bakteri yapışmasına ve hasara duyarlı hale gelebilir. TLR-aracılı yollarla ve henüz karakterize olmamış reseptörlerle bakteriyel yapışma ve invazyon aynı zamanda hücresel hasar, IL-8 gibi sitokinlerin ve lipokalin gibi AMP'lerin üretimini ve sekresyonunu uyarır. IL-8 hızlı bir şekilde nötrofil göçüne yol açarak, antienfektif etki sağlarken lokal epitel hasarına da yol açar. Selüler hasarın indüklediği lipokalin mikrobiyal sideroforları sekestre ederek antimikrobiyal defans sağlar. Defansın bu basamakları da başarısız olursa yoğun nötrofil göçü daha agresif bir hal alır ve olay normal mikroanatominin bozulması ile sonuçlanır. Eđer bu hücresel cevap oluşamazsa sistemik enfeksiyon oluşur (130).

Yapılmış araştırmalarda çeşitli epitel hücrelerdeki AMP genlerinin çeşitli besinler ve vitaminlerle indüklenebileceği gösterilmiştir. Örneğin katelisinidin vitamin D ve kısa-zincirli yağ asitleri ile indüklenebilir (127, 153-156).

Katelisinidini kodlayan gen ekspresyonu vitamin D bağımlıdır ve VDR bölgesine sahiptir (153).

Akut enfeksiyon sırasında üroepitelin diğer bir defans mekanizması kemokinlerin ve sitokinlerin lokal üretimidir. Proinflamatuvar sitokinlerin salınımı (IL-1, IL-6 ve IL-8), inflamatuvar hücrelerin çağırılması ve ikinci bir sitokin patlaması ile sonuçlanır. Bakteriürisi olan çocuklarda IL-1, TNF- α , IL-6 ve IL-8 idrar konsantrasyonları artmıştır. IL-6 gen polimorfizmleri İYE'ye yakınlıkla ilişkili bulunmuştur (4).

Sonuç olarak VDR ve İYE arasındaki ilişkide katelisinidin gibi bazı konak antimikrobiyal protein üretiminin stimülasyonu etkili olan mekanizmalar arasındadır. Bu çalışmada da VDR gen polimorfizmlerinin İYE riski ile ilişkili olduğunun saptanması bu görüşü desteklemiştir.

İdrar yolu enfeksiyonunda ortaya çıkan inflamatuvar yanıt iki yönlü etkiye sahiptir. Bu inflamatuvar yanıt bir yandan patojen bakterinin eradikasyonu için gerekirken aynı zamanda doku zedelenmesi ve kalıcı skara yol açabilir (4). Vitamin D adaptif immün cevabın inflamatuvar kolu üzerinde baskılayıcı etkilere sahiptir. *Mycobacterium tuberculosis* ile karşılaşan makrofajlarda vitamin D proinflamatuvar sitokinler IFN- γ ve TNF- α üretimini azaltırken aynı zamanda katelisidin üretimini uyarır (130). İnflamasyonun geri-dönüşsüz hasara yol açabileceği böbrek gibi bir organda non-inflamatuvar antimikrobiyal defansın önemli olduğu öne sürülmüştür (130). LPS'ler gram-negatif bakterilerin dış zarında bulunur. Konak cevabını aktive ederler, hem in vivo hem in vitro nitrit oksit ve sitokin üretimini indüklerler. LPS'ye in vivo cevap sepsis ile ilişkili multi organ yetmezliğe ve diğer komplikasyonlara yol açar. LPS'ye inflamatuvar cevap spesifik LPS-bağlayıcı protein, CD14 reseptör ve TLR-4 etkileşimi ile yönetilir. LPS ile uyarılmış immün ve konak cevabın aktivasyonunda tüm bu moleküllere gerek vardır (4). Mikrodamar endotelial hücrelerinin in vitro vitamin D tedavisi sonucu gram negatif bakteriyel LPS aracılı NF- κ B aktivasyonu ve sitokin salınımını baskılandığı gösterilmiştir. 1,25(OH) $_2$ D $_3$ proinflamatuvar bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör- κ B (NF- κ B)'nin etkilerini inhibe eder. Mikrobiyal ajanlara kontrolsüz immün yanıt veren ve postenfeksiyöz inflamatuvar yanıt aracılı komplikasyon geliştiren kişilerde 1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$ sinyalinde disfonksiyon olabileceği öne sürülebilir (5).

Gen polimorfizmleri ve renal skar ilişkisi kısa bir süredir çalışılmakta olsa da renal skar/İYE olan hastalarda genetik çeşitliliğin olduğu kesin bir geçektir. TLR-4, TGF- β , IL-8 polimorfizmleri renal skar oluşumu ile ilişkili bulunmuştur (4, 6-8). Her ne kadar VUR gibi bazı anatomik anomaliler İYE'nin tekrarlaması ve renal skar riskini arttırıyor olsa da birçok hastada bu risk faktörleri bulunmamaktadır. Bu nedenle gelecekte yüksek riskli çocukların belirlenmesinde genetik analizler değerli klinik bilgiler sağlayabilecektir. VDR ve renal skar oluşumu arasındaki ilişkide TLR4'ün down-regülasyonu, T hücre proliferasyonunun veya TNF- α sentezinin supresyonu etkili olan mekanizmalar arasındadır. Bu çalışmanın sonuçları da İYE'ya yatkınlık yanı sıra renal skar gelişimi açısından da bu polimorfizmin önemli olabileceğini düşündürmüştür.

Özet olarak VDR polimorfizmleri ve İYE arasındaki gözlenen ilişkiler vitamin D'nin enfeksiyonlara karşı immün cevabı module ettiği bilgisi ile uyumludur. Bu bulguların klinik yararı veya halk sağlığı açısından öneminin kesin olarak şekillendirilmesinden önce bu sonuçların daha büyük örnek büyüklüğü ile doğrulanması gereklidir. İYE'ye konak cevabında, dolaşan vitamin D metabolitleri ve VDR etkileşiminin detaylandırılmasının

yararlı olacağı düşünölmüştür. Ayrıca VDR polimorfizmleri bu araştırılan dördünün dışında birçok TNP'ler içermektedir, güvenilir genotipleri belirlemek için aile-merkezli geniş çalışmalar gereklidir.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. VDR geni *BsmI* polimorfizmi açısından Bb genotipinde sistit riskinde istatistiksel anlamlı artış vardı. İstatistiksel anlamlı olmasa da Bb genotipinde İYE riski hafif yüksekti; BB ve Bb genotiplerinde renal skar riski biraz artmıştı.
2. *FokI* polimorfizmi değerlendirilmesinde; Ff ve ff genotiplerinde İYE riskinde istatistiksel anlamlı artış saptandı. Ff ve ff genotipleri renal skar riskini yaklaşık 2 kat artırmaktaydı. Yine Ff ve ff genotiplerinde skar negatif piyelonefrit ve sistit riskinde istatistiksel anlamlı belirgin artış bulundu.
3. *ApaI* polimorfizminin İYE için koruyucu bir faktör olduğu görüldü. Aa ve aa genotipleri hem piyelonefrit hem sistit için anlamlı olarak koruyucu idi.
4. *TaqI* polimorfizmi İYE ve kontrol grubunda benzer bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmasa da Tt ve tt genotiplerinde İYE riski hafif artmıştı.
5. “f” alel sıklığı İYE grubunda anlamlı yüksekti.
6. “a” alel frekans dağılımı kontrol grubunda anlamlı olarak daha fazlaydı.
7. VDR polimorfizmleri genotip sıklıkları ile idrar VDR ekspresyonu arasında anlamlı ilişki yoktu. Ancak mutant alelleri taşıyan genotiplerde VDR ekspresyon düzeyi ortalamaları düşüktü.

Sonuç olarak; bu çalışmada çocuklarda sık görülen ve önemli morbiditeye yol açan idrar yolu enfeksiyonuna yatkınlıkta ve renal skar gelişiminde VDR gen polimorfizmlerinin etkili faktörler arasında olduğu gösterilmiştir. Daha önce Türk popülasyonunda ve literatürde İYE’li çocuklarda VDR geninin polimorfizmleriyle ilgili yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. İmmün sistem modülasyonunda etkileri giderek daha iyi belirlenen VDR geninin renal enfeksiyonda etkisinin belirlenmesi tedavi ve koruyucu hekimlik alanlarında yeni yaklaşımlar ortaya koyabilir.

ÖZET

ÇOCUKLARDA İDRAR YOLU ENFEKSİYONUNDA VİTAMİN D RESEPTÖR GEN POLİMORFİZMİ

İdrar yolu enfeksiyonu (İYE) çocuklarda sık görülen enfeksiyonlar arasındadır. Akut enfeksiyon sırasında patojen bakteriye karşı konak savunmanın önemli bir parçası olan inflamatuvar cevap paradoksik olarak doku fibrozuna yol açarak konağa zararlı hal alabilir. Vitamin D'nin immün sistem regülasyonu dahil birçok etkiye sahip olduğu ve Vitamin D eksikliği ile enfeksiyon hastalıkları arasında ilişki olduğu bilinmektedir. Vitamin D potent immunomodülatuar etkilerini VDR aracılığıyla yapar. Bazı VDR alelleriye sonuçlanan hafif değişikliklerin enfeksiyonlara direnci veya yatkınlığı etkilediği bilinmektedir. Bu çalışmada çocuklarda sık görülen ve önemli morbidite nedeni olan İYE'de ve buna bağlı renal skar gelişiminde VDR gen polimorfizminin araştırılması amaçlanmıştır.

İYE tanısı alan 92 çocuk ve kontrol grubu olarak da daha önce İYE geçirme öyküsü olmayan 105 çocuk çalışmaya alındı. VDR gen polimorfizmlerinden *FokI*, *BsmI*, *ApaI* ve *TaqI* hasta ve kontrol grubu olgularında çalışıldı. 24 hastanın idrar örneğinde VDR ekspresyonu çalışıldı.

BsmI polimorfizm genotip dağılımı İYE geçirenler ile kontrol grubu arasında benzerdi. *FokI* polimorfizmi açısından İYE geçiren ve kontrol grup arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p=0,00$). *ff* genotipinde İYE geçirme riski istatistiksel anlamlı fazlaydı ($p=0,00$) ve İYE riski 3,94 kat artmaktaydı (OR=3,94; %95 CI 1,71-9,09). *ApaI* polimorfizmi ise kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti, koruyucu faktör olarak değerlendirildi ($p=0,00$). *TaqI* genotipinin İYE geçirenler ile kontrol grubu karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı ancak hem *Tt* genotipinde hem de *tt* genotipinde İYE riskinde hafif bir artış vardı. Hastalarda VDR polimorfizmleri genotip sıklıkları ile idrar VDR ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

Bu çalışmanın sonuçları İYE'ye yatkınlık ve renal skar gelişimi açısından VDR gen polimorfizminin önemli olabileceğini düşündürmüştür. VDR polimorfizmleri ve İYE arasındaki gözlenen ilişkiler vitamin D'nin enfeksiyonlara karşı immün cevabı module ettiği bilgisi ile uyumludur. Bu bulguların kesin olarak şekillendirilmesinden önce bu sonuçların daha büyük örnek büyüklüğü ile doğrulanmasının uygun olacağı düşünülmüştür.

Anahtar Sözcükler: İdrar yolu enfeksiyonu, renal skar, vitamin D reseptör gen polimorfizmi, VDR ekspresyonu

ABSTRACT

VITAMIN D RECEPTOR GENE POLYMORPHISM IN CHILDREN WITH URINARY TRACT INFECTION

Urinary tract infection (UTI) is among common infectious diseases in children. During acute infection inflammatory response to the pathogenic bacteria, one of the important part of host defense, paradoxically can cause tissue fibrosis and finally become harmful to host. It is known that vitamin D has a lot of action including immune system modulation and there is a relation between vitamin D deficiency and infectious diseases. Vitamin D performs its potent immunomodulator effects through VDR. It is known that small alterations leading to some VDR alleles effect resistance or susceptibility to infections. In this study it is aimed to examine VDR gene polymorphisms in UTI, which is common and cause of important morbidity in children, and in renal scar formation due to this.

92 patients diagnosed as UTI and 105 children without history of UTI before as a control group were evaluated. The VDR gene *BsmI*, *FokI*, *ApaI* ve *TaqI* polymorphisms were evaluated in both patients and control groups. In urine samples of 24 patients VDR expression was studied.

BsmI polymorphism genotype distribution was similar between patient and control groups. There was a significant difference between patient and control groups in *FokI* polymorphism ($p=0,00$). In ff genotype risk of UTI was significantly increased ($p=0,00$) and the risk was 3,94 times higher (OR=3,94; %95 CI 1,71-9,09). *ApaI* polymorphism was significantly increased in control group ($p=0,00$) and evaluated as a protective factor. In comparison of *TaqI* genotype between patient and control groups there was no statistically significant difference but in both Tt and tt genotypes there was minimal increased risk of UTI. There was no significant association between VDR polymorphism genotype frequencies and urine VDR expressions in patients.

Results of this study suggest that VDR gene polymorphism can be important for susceptibility to UTI and renal scar formation. Associations between VDR polymorphisms and UTI is in accordance with the knowledge of vitamin D modulates immune response against infections. Before designing these results firmly, it is thought to confirm these results in a larger sample will be appropriate.

Key Words: Urinary tract infection, renal scar, vitamin D receptor gene polymorphism, VDR expression

KAYNAKLAR

1. Craig JC. Urinary tract infection: new perspectives on a common disease. *Curr Opin Infect Dis.* 2001; 14: 309-313.
2. Zorc JJ, Kiddoo DA, Shaw KN. Diagnosis and management of pediatric urinary tract infections. *Clin Microb Reviews.* 2005; 18: 417-422.
3. Hansson S, Jodal U. Urinary tract infection. In: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P, editors. *Pediatric Nephrology.* 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p.1007-1027.
4. Jahnukainen T, Chen M, Celsi G. Mechanisms of renal damage owing to infection. *Pediatr Nephrol.* 2005; 20:1043-1053.
5. Equils O, Naiki Y, Shapiro AM, Michelsen K, Lu D, Adams J, Jordan S. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits lipopolysaccharide-induced immune activation in human endothelial cells. *Clin Exp Immunol.* 2006; 143(1): 58-64.
6. Haraoka M, Hang L, Frendeus B, Godaly G, Burdick M, Strieter R, Svanborg C. Neutrophil recruitment and resistance to urinary tract infections. *J Infect Dis.* 1999; 180: 1220–1229.
7. Cotton SA, Gbadegesin RA, Williams S, Brenchley PEC, Webb NJA. Role of TGF- β in renal parenchymal scarring following childhood urinary tract infection. *Kidney Int.* 2002; 61: 61–67.
8. Artifoni L, Negrisol S, Montini G, Zucchetta P, Molinari PP, Cassar W, Destro R, Anglani F, Rigamonti W, Zacchello G, Murer L. Interleukin-8 and CXCR1 receptor functional polymorphisms and susceptibility to acute pyelonephritis. *J Urol.* 2007; 177: 1102-6.
9. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289: F8-28.
10. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms (review). *Gene.* 2004; 338: 143-156.
11. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Van Leeuwen JP, Pols HA. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to vitamin D-related disease states. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004; 89: 187-193.

12. Jantausch B, Kher K. Urinary tract infection. In: Kher KK, Schnaper HW, Makker SP, editors. *Clinical Pediatric Nephrology*. 2th edition. India: Informa UK Ltd; 2007. p.553-572.
13. Stamm WE, Norrby R. Urinary tract infections:disease panorama and challenges. *J Infect Dis Suppl*. 2001; 39:183-186.
14. Ginsburg CM, McCracken GH Jr. Urinary tract infections in young infants. *Pediatrics*. 1982; 69: 409-412.
15. Bagga A. Urinary tract infections:evaluation and treatment. *Indian J Pediatr*. 2001; 68: 40-45.
16. Mak RH, Kuo HJ. Pathogenesis of urinary tract infection: an update. *Current Opinion in Pediatrics*. 2006; 18(2):148-152.
17. Kunin CM. The natural history of recurrent bacteriuria in schoolgirls. *N Engl J Med*. 1970; 282:1443.
18. Zelikovic I, Adelman RD, Nancarrow P. Urinary tract infection in children an update. *West J Med*. 1992; 157: 554-561.
19. Kanellopoulos TA, Salakos C, Spiliopoulou I, Ellina A, Nikolakopoulou NM, Papanastasiou DA. First urinary tract infection in neonates, infants and young children: a comparative study. *Pediatr Nephrol*. 2006; 21: 1131-1137.
20. Bergstrom T, Lanson H, Lincoln K, Winberg J. Studies of urinary tract infections in infancy and childhood. XII. Eighty consecutive patients with neonatal infections. *J Pediatr*. 1972; 80: 858-66.
21. Drew JH, Acton CM. Radiological findings in newborn infants with urinary infection. *Arch Dis Child*. 1976; 51: 628-30.
22. Wettergren B, Jodal U, Jonasson G. Epidemiology of bacteriuria during the first year of life. *Acta Paediatr Scand*. 1985; 74: 925-33.
23. Hobermann A, Wald ER. Urinary tract infections in young febrile children. *Pediatr Infect Dis J*. 1997; 16: 11-17.
24. Jakobsson B, Esbjörner E, Hansson S. Minimum incidence and diagnostic rate of first urinary tract infection. *Pediatrics*. 1999; 104:222-226.
25. Roberts KB, Charney E, Sweren RJ, Ahonkhai VI, Bergman DA, Coulter MP, Fendrick GM, Lachman BS, Lawless MR, Pantell RH, et al. Urinary tract infection in infant with unexplained fever: a collaborative study. *J Pediatr*. 1983; 103: 864-867.

26. Winberg J, Andersen HJ, Bergstöm T, Jacobson B, Larson H, Lincoln K. Epidemiology of symptomatic urinary tract infection in childhood. *Acta Paediatr Scand.* 1974; 252: 1-20.
27. Hellström A, Hanson E, Hansson S, Hjälmås K, Jodal U. Association between urinary symptoms at 7 years old and previous urinary tract infection. *Arch Dis Child.* 1991; 66: 232-4.
28. Marild S, Jodal U. Incidence rate of first time symptomatic urinary tract infection in children under 6 years of age. *Arch Dis Child.* 1991; 66: 232-236.
29. Reddy PP, Redman JF. The management of childhood urinary tract infections. *J Ark Med Soc.* 2002; 99: 156-158.
30. Rushton HG. Urinary tract infections in children: epidemiology, evaluation and management. *Pediatr Clin N Am.* 1997; 44: 1133-1136.
31. Bratslavsky G, Feustel PJ, Aslan AR, Koagn BA. Recurrence risk in infants with urinary tract infections and a negative radiographic evaluation. *J Urol.* 2004; 172: 1610-1613.
32. Stull TL, LiPuma JJ. Epidemiology and natural history of urinary tract infections in children. *Med Clin N Am.* 1991; 75: 287-297.
33. Lin DS, Huang SH, Lin CC, Tung YC, Huang TT, Chiu NC, Koa HA, Hung HY, Hsu CH, Hsieh WS, Yang DI, Huang FY. Urinary tract infection in febrile infants younger than eight weeks of age. *Pediatrics.* 2000; 105: 20-24.
34. Sastre JB, Aparicio AR, Cotallo GD, Colomer BF, Hernandez MC; Grupo de Hospitales Castrillo. Urinary tract infection in the newborn: clinical and radio imaging studies. *Pediatr Nephrol.* 2007; 22: 1735-1741.
35. Gökçe İ, Alpay H, Bıyıklı N, Özdemir N. Urinary tract pathogens and their antimicrobial resistance patterns in Turkish children. *Pediatr Nephrol.* 2006; 21: 1327-1328.
36. Abrahamsson K, Hansson S, Jodal U, Lincoln K. *Staphylococcus saprophyticus* urinary tract infections in children. *Eur J Paediatr.* 1993; 152: 69-71.
37. Friedman S, Reif S, Assia A, Levy I. Clinical and laboratory characteristics of non-E coli urinary tract infections. *Arch Dis Child.* 2006; 91: 845-846.
38. Hoberman A, Wald ER. Treatment of urinary tract infection. *Pediatr Infect Dis J.* 1999; 18: 1020-1.

39. Majd M, Rushton HG, Jantusch B, Wiedermann BL. Relationship among vesicoureteral reflux, P-fimbriated *Escherichia Coli* and acute pyelonephritis in children with febrile urinary tract infection. *J Pediatr*. 1991; 19: 578-85.
40. Wippermann CF, Schofer O, Beetz R, Schumacher R, Schweden F, Riedmiller H, Büttner J. Renal abscess in childhood: diagnostic and therapeutic progress. *Pediatr Infect Dis J*. 1991; 10: 446-50.
41. Dougherty FE, Gottlieb RP, Gross GW, Denison MR. Neonatal renal abscess caused by *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Infect Dis J*. 1991; 10: 463-6.
42. Bollgren I, Winberg J. The periurethral aerobic bacterial flora in healthy boys and girls. *Acta Paediatrica Scand*. 1976; 65: 81-87.
43. Schilling JD, Mulvey MA, Hultgren SJ. Structure and function of *Escherichia Coli* type I pili: new insight in the pathogenesis of urinary tract infections. *J Infect Dis*. 2001; 183 Suppl 1: S36-40.
44. Akil İ, Yılmaz Ö, Kasırga E, Egemen A. Influence of functional food products on urinary tract infection. *Turkish Journal of Public Health*. 2007; 5(1): 31-35.
45. Kallenius G, Mollby R, Svenson SB, Helin I, Hultberg H, Cedergren B, Winberg J. Occurrence of P-fimbriated *Escherichia Coli* in urinary tract infections. *Lancet*. 1981; 19-26: 2(8260-61): 1369-72.
46. Vaisanen-Rhen V, Elo J, Vaisanen E, Siitonen A, Orskov I, Orskov F, Svenson SB, Mäkelä PH, Korhonen TK. P-fimbriated clones among uropathogenic *Escherichia Coli* strains. *Infect Immun*. 1984; 43:149-55.
47. O'Hanley P, Low D, Romero I, Lark D, Vosti K, Falkow S, Schoolnik G. Gal-Gal binding and hemolysin phenotypes and genotypes associated with uropathogenic *Escherichia Coli*. *N Eng J Med*. 1985; 313: 414-20.
48. O'Brien GJ, Chambers ST, Peddie B, Mahanty HK. The association between colicinogenicity and pathogenesis among uropathogenic isolates of *Escherichia Coli*. *Microb Pathog*. 1996; 20: 185-90.
49. Orskov I, Orskov F, Birch-Andersen A, Kanamori M, Svanborg-Eden C. O, K, H and fimbrial antigens in *Escherichia Coli* serotypes associated with pyelonephritis and cystitis. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1982; 33:18-25.
50. Lomberg H, Hellström M, Jodal U, Leffler H, Lincoln K, Svanborg-Eden C. Virulence-associated traits in *Escherichia Coli* causing first and recurrent episodes of urinary tract infection in children with or without vesicoureteral reflux. *J Infect Dis*. 1984; 150: 561-9.

51. Hacker J, Bender L, Ott M, Wingender J, Lund B, Marre R, Goebel W. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysin occur in vivo and in vitro in various extraintestinal *Escherichia Coli* isolates. *Microb Pathog.* 1990; 8: 213-25.
52. Middendorf B, Blum-Oehler G, Dobrindt U, Mühldorfer I, Salge S, Hacker J. The pathogenicity islands(PAIs) of the uropathogenic *Escherichia Coli* strain 536:island probing of PAI II₅₃₆. *J Infect Dis.* 2001; 183: 17-20.
53. Svanborg C, Bergsten G, Fischer H, Frendeus B, Godaly G, Gustafsson E, Hang L, Hedlund M, Karpman D, Lundstedt AC, Samuelsson P, Svensson M, Wullt B. The 'innate' host response protects and damages the infected urinary tract. *Ann Med.*2001; 33: 563-70.
54. Jantusch B, O' Donnell R, Wiedermann BL. Urinary interleukin-6 and interleukin-8 in children with urinary tract infection. *Pediatr Nephrol.* 2000; 15: 236-240.
55. Benson M, Jodal U, Agace W, Hellström M, Marild S, Roberg S, Sjöström M, Wettergren B, Jönsson S, Svanborg C. Interleukin (IL)-6 and IL-8 in children with febrile urinary tract infection and asymptomatic bacteriuria. *J Infect Dis.* 1996; 174: 1080-1084.
56. Wullt B, Bergsten G, Samuelsson M, Gebretsadik N, Hull R, Svanborg C. The role of P fimbriae for colonization and host response induction in the human urinary tract. *J Infect Dis.* 2001; 183 Suppl 1: S43-46.
57. Frendeus B, Wachtler C, Hedlund M, Fischer H, Samuelsson P, Svensson M, Svanborg C. *Escherichia coli* P fimbria utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation. *Mol Microbiol.* 2001; 40: 37-51.
58. Luster AD. Chemokines-Chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 1998; 338: 436-45.
59. Svanborg C, Frendeus B, Godaly G, Hang L, Hedlund M, Wachtler C. Toll-like receptor signaling and chemokine receptor expression influence the severity of urinary tract infection. *J Infect Dis.* 2001; 183: S61-5.
60. Frendeus B, Godaly G, Hang L, Karpman D, Lundstedt AC, Svanborg C. Interleukin 8 receptor deficiency confers susceptibility to acute experimental pyelonephritis and may have a human counterpart. *J Exp Med.* 2000; 192: 881-890.
61. Graham JB, King LR, Kropp KA,Uehling DT. The significance of distal urethral narrowing in young girls. *J Urol.* 1967; 97: 1045-9.

62. Immergut MA, Wahman GE. The urethral caliber of female children with urinary tract infection. *J Urol.* 1968; 99:189-90.
63. Wiswell TE, Roscelli JD. Corroborative evidence for the decreased incidence of urinary tract infections in circumcised male infants. *Pediatrics.* 1986; 78: 96-100.
64. Wiswell TE, Smith FR, Bass JW. Decreased incidence of urinary tract infections in circumcised male infants. *Pediatrics.* 1985; 75: 901-903.
65. Newman TB, Bernzweig JA, Takayama JI, Finch SA, Wasserman RC, Pantell RH. Urine testing and urinary tract infection in febrile infants seen in office settings. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2002; 156: 44-54.
66. Schoen EJ, Colby CJ, Ray GT. Newborn circumcision decreases incidence and costs of urinary tract infections during the first year of life. *Pediatrics.* 2000; 105: 789-93.
67. Herzog LW. Urinary tract infections and circumcision: a case control study. *Am J Dis Child.* 1989; 143: 348-50.
68. To T, Agha M, Dick PT, Feldman W. Cohort study on circumcision of newborn boys and subsequent risk of urinary tract infection. *Lancet* 1998; 352: 1813-6.
69. Wiswell TE, Miller GM, Gelston HM Jr, Jones SK, Clemmings AF. Effect of circumcision status on periurethral bacterial flora during the first year of life. *J. Pediatr.* 1988; 113: 442-6.
70. Wiswell TE. John K. Lattimer Lecture. Prepuce presence portends prevalence of potentially perilous periurethral pathogens. *J Urol.* 1992; 148: 739-42.
71. Fussell EN, Kaack MB, Cherry R, Roberts JA. Adherence of bacteria to human foreskin. *J Urol.* 1998; 140: 997-1001.
72. Loening-Baucke V. Urinary incontinence and urinary tract infection and their resolution with treatment of chronic constipation of childhood. *Pediatrics.* 1997; 100: 228-32.
73. McKenna PH, Herndon CD. Voiding dysfunction associated with incontinence, vesicoureteral reflux and recurrent urinary tract infections. *Curr Opin Urol.* 2000; 10: 559-606.
74. Koff SA, Wagner TT, Jayanthi VR. The relationship among dysfunctional elimination syndromes, primary vesicoureteral reflux and urinary tract infections in children. *J Urol.* 1998; 160: 1019-22.
75. Hellerstein S, Linebarger JS. Voiding dysfunction in pediatric patients. *Clin Pediatr(Phila).* 2003; 42: 43-9.

76. Honkinen O, Lehtonen OP, Ruuskanen O, Huovinen P, Mertsola J. Cohort study of bacterial species causing urinary tract infection and urinary tract abnormalities in children. *BMJ*. 1999; 318: 770-1.
77. Jodal U. The natural history of bacteriuria in childhood. *Infect Dis Clin North Am*. 1987; 1: 713-4.
78. Hodson J, Maling TM, McManamon PJ, Lewis et al. Reflux nephropathy: *Kidney Int Suppl*. 1975; 4: S50-8.
79. Rolleston GL, Maling TM, Hodson CJ. Intrarenal reflux and the scarred kidney. *Arch Dis Child*. 1974; 49: 531-9.
80. Rolleston GL, Shannon FT, Utley WL. Follow-up of vesicoureteric-reflux in the newborn. *Kidney Int Suppl*. 1975; 4: S59-64.
81. Craig JC, Irwig LM, Christie J, Lam A, Onikul E, Knight JF, Sureshkumar P, Roy LP. Variation in the diagnosis of vesicoureteric reflux using micturating cystourethrography. *Pediatr Nephrol*. 1997; 4: 455-9.
82. Lenaghan D, Whitaker JG, Jensen F, Stephens FD. The natural history of reflux and long-term effects of reflux on the kidney. *J Urol*. 1976; 115: 728-30.
83. Poulsen EU, Johannesen NL, Nielsen JB, Jorgensen M, Andersen AJ. Vesicoureteral-reflux. II. The long term outcome of kidney function in non-surgical treatment. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. 1989; 125: 29-34.
84. Jantusch B, Criss VR, O'Donnell R, Wiederman BL, Majd M, Rushton HG, Shirey RS, Luban NL. Association of Lewis blood group phenotypes with urinary tract infection in children. *J Pediatr*. 1994; 124: 863-8.
85. Albarus MH, Salzano FM, Goldraich NP. Genetic markers and acute febrile urinary tract infection in the 1st year of life. *Pediatr Nephrol*. 1997; 11: 691-694.
86. Milliner DS. Urolithiasis. In: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P, editors. *Pediatric Nephrology*. 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p.1091-1112.
87. Alon US, Srivastava T. Urolithiasis. In: Kher KK, Schnaper HW, Makker SP, editors. *Clinical Pediatric Nephrology*. 2th edition. India: Informa UK Ltd; 2007. p.539-552.
88. Cooke NE, Haddad JG. Vitamin D binding protein(gc-globulin). *Endocr Rev*. 1989; 10: 294-307.

89. Leandro ACSS, Rocha MA, Cardoso CSA, Bonecini-Almeida MG. Genetic polymorphisms in vitamin D receptor, vitamin D-binding protein, Toll-like receptor 2, nitric oxide synthase 2, and interferon- γ genes and its association with susceptibility to tuberculosis. *Braz J Med Biol Res.* 2009; 42: 312-322.
90. Bikle DD, Gee E. Free, and not total, 1,25-dihydroxyvitamin D regulates 25-hydroxyvitamin D metabolism by keratinocytes. *Endocrinology.* 1989; 124: 649-654.
91. Brown AJ, Finch J, Grieff M, Ritter C, Kubodera N, Nishii Y, Slatopolsky E. The mechanism for the disparate actions of calcitriol and 22-oxacalcitriol in the intestine. *Endocrinology.* 1993; 133: 1158-64.
92. Dusso AS, Negrea L, Gunawardhana S, Lopez-Hilker S, Finch J, Mori T, Nishii Y, Slatopolsky E, Brown AJ. On the mechanisms for the selective action of vitamin D analogs. *Endocrinology.* 1991; 128: 1687-92.
93. van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005; 97: 93-101.
94. Huang MC, Seyer JM, Thompson JP, Spinella DG, Cheah KS, Kang AH: Genomic organization of the human procollagen alpha 1 (II) collagen gene. *Eur. J Biochem.* 1991; 195: 593-600.
95. Takahashi E, Hori T, Sutherland GR. Mapping of the human type II collagen gene (COL2A1) proximal to fra(12) (q13.1) by nonisotopic in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1990; 54: 84-85.
96. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson and Thompson Genetics in Medicine.* 2001. 6th edition. Chapter 12, 221- 222.
97. Schlötterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma.* 2000; 109: 365-371.
98. Koshiyama H, Sone T, Nakao K. Vitamin-D-receptor-gene polymorphism and bone loss. *Lancet.* 1995; 34: 990-1.
99. Morrison NA, Qi Jc, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature.* 1994; 367: 284-287.
100. Eisman JA. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev.* 1999; 20: 788-804.
101. Carling T, Kindmark A, Hellman P, Lundgren E, Ljunghall S, Rastad J, Akerström G, Melhus H. Vitamin D receptor genotypes in primary hyperparathyroidism. *Nat Med.* 1995; 1: 1309-1311.

102. Gomez Alonso J, Naves Diaz ML, Diaz-Corte C, Fernandez Martin JL, Cannata Andia JB. Vitamin D receptor gene (VDR) polymorphisms: effect on bone mass, bone loss and parathyroid hormone regulation. *Nephrol Dial Transplant.* 1998; 13: 73-77.
103. Kontula K, Valimaki S, Kainulainen K, Viitanen AM, Keski-Oja J. Vitamin D receptor polymorphism and treatment of psoriasis with calcipotriol. *Br J Dermatol.* 1997; 136: 977–978.
104. Özkaya O, Söylemezoğlu O, Mısırlıoğlu M, Gönen S, Buyan N, Hsanoğlu E. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and the risk of calcium nephrolithiasis in children. *Eur Urol.* 2003; 44(1): 150-4.
105. Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Feldman D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res.* 1996; 11(12): 1850-1855.
106. Mocharla H, Butch AW, Pappas AA, Flick JT, Weinstein RS, De Togni P, Jilka RL, Roberson PK, Parfitt AM, Manolagas SC. Quantification of vitamin D receptor mRNA by competitive polymerase chain reaction in PBMC: lack of correspondence with common allelic variants. *Bone Miner Res.* 1997; 12(5): 726-733.
107. Gross C, Krishnan AV, Malloy PJ, Eccleshall TR, Zhao XY, Feldman D. The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of *FokI* variants, *J Bone Miner Res.* 1998; 13(11): 1691-99.
108. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(15): 6665-9.
109. Gennari L, Becherini L, Masi L, Gonnelli S, Cepollaro C, Martini S, Mansani R, Brandi ML. Vitamin D receptor genotypes and intestinal calcium absorption in postmenopausal women. *Calcif Tissue Int.* 1997; 61(6): 460-3.
110. Baroncelli GI, Bereket A, El Kholy M, Audi L, Cesur Y, Ozkan B, Rashad M, Fernández-Cancio M, Weisman Y, Saggese G, Hochberg Z. Rickets in the Middle East: role of environment and genetic predisposition. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(5): 1743-50.

111. Selvaraj P, Vidyarani M., Alagarasu K., Prabhu Anand S., Narayanan P.R., Regulatory Role of Promoter and 3' UTR Variants of Vitamin D Receptor Gene on Cytokine Response in Pulmonary Tuberculosis. *J Clin Immunol.* 2008; 28: 306-13.
112. Babb C, Van der Merwe L, Beyers N, Pfeiffer C, Walzl G, Duncan K, Van Helden P, Hoal EG. Vitamin D receptor gene polymorphisms and sputum conversion time in pulmonary tuberculosis patients. *Tuberculosis (Edinb).* 2007; 87(4): 295-302.
113. Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science.* 1983; 221: 1181-3.
114. Canning MO, Grotenhuis K, de Wit H, Ruwhof C, Drexhage HA. 1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)(2)D(3)) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. *Eur J Endocrinol.* 2001; 145(3): 351-357.
115. Hayes CE, Nashold FE, Spach KM, Pedersen LB. The immunological functions of the vitamin D endocrine system. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2003; 49: 277-300.
116. Asaka M, Iida H, Izumino K, Sasayama S. Depressed natural killer cell activity in uremia. Evidence for immunosuppressive factor in uremic sera. *Nephron.* 1988; 49: 291-295.
117. Hewison M, Zehnder D, Chakraverty R, Adams JS. Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 alpha-hydroxylase. *Mol Cell Endocrinol.* 2004; 215: 31-8.
118. Veldman CM, Cantorna MT, DeLuca HF. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 374: 334-8.
119. Manolagas SC, Hustmyer FG, Yu XP. Immunomodulating properties of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Kidney Int Suppl.* 1990; 29: 9-16.
120. Lyakh LA, Sanford M, Chekol S, Young HA, Roberts AB. TGF-beta and vitamin D3 utilize distinct pathways to suppress IL-12 production and modulate rapid differentiation of human monocytes into CD83+ dendritic cells. *J Immunol.* 2005; 174(4): 2061-2070.
121. Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev.* 1996; 10: 142-153.

122. Ji Y, Studzinski GP. Retinoblastoma protein and CCAAT/enhancer-binding protein beta are required for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced monocytic differentiation of HL60 cells. *Cancer Res.* 2004; 64: 370-7.
123. Heilborn JD, Nilsson M F, Kratz G, Weber G, Sørensen O, Borregaard N, Stahle-Backdahl M. The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J Invest Dermatol.* 2003; 120: 379-89.
124. White JH. Vitamin D signaling, infectious diseases, and regulation of innate immunity. *Infect Immun.* 2008; 76(9): 3837-3843.
125. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zügel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom BR, Modlin RL. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 2006; 311: 1770-3.
126. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001; 1: 135-45.
127. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, Tavera-Mendoza L, Lin R, Hanrahan JW, Mader S, White JH. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol.* 2004; 173: 2909-12.
128. Adams JS. Vitamin D as a defensin. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2006; 6(4): 344-346.
129. Saiman L, Tabibi S, Starner TD, San Gabriel P, Winokur PL, Jia HP, McCray PB Jr, Tack BF. Cathelicidin peptides inhibit multiply antibiotic-resistant pathogens from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 2838-44.
130. Zasloff M. Antimicrobial peptides, innate immunity, and the normally sterile urinary tract. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2810–2816.
131. Lewis SJ, Baker I, Smith GD. Meta-analysis of vitamin D receptor polymorphisms and pulmonary tuberculosis risk. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005; 9(10): 1174–1177.

132. Gibney KB, MacGregor L, Leder K, Torresi J, Marshall C, Ebeling PR, Biggs BA. Vitamin D deficiency is associated with tuberculosis and latent tuberculosis infection in immigrants from sub-Saharan Africa. *Clin Infect Dis*. 2008; 46: 443-446.
133. Kawarau A, Takeda E, Tanida N, Nakagawa K, Yamamoto H, Sawada K, Okano T. Inhibitory effect of long term 1-alpha-hydroxyvitamin D3 administration on *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Biochem Nutr*. 2006; 38:103–106.
134. Brook I. Microbiology and antimicrobial management of sinusitis. *J Laryngol Otol*. 2005; 119: 251–258.
135. Montone KT. Infectious diseases of the head and neck: a review. *Am J Clin Pathol*. 2007; 128: 35–67.
136. Wolf J, Daley AJ. Microbiological aspects of bacterial lower respiratory tract illness in children: atypical pathogens. *Paediatr Respir Rev*. 2007; 8: 212–220.
137. Wayse V, Yousafzai A, Mogale K, Filteau S. Association of subclinical vitamin D deficiency with severe acute lower respiratory infection in Indian children under 5 y. *Eur J Clin Nutr*. 2004; 58: 563–567.
138. Muhe L, Lulseged S, Mason KE, Simoes EAF. Case-control study of the role of nutritional rickets in the risk of developing pneumonia in Ethiopian children. *Lancet*. 1997; 349: 1801–1804.
139. Laaksi I, Ruohola J-P, Tuohimaa P, Auvinen A, Haataja R, Pihlajamaki H, Ylikomi T. An association of serum vitamin D concentrations <40 nmol/L with acute respiratory tract infection in young Finnish men. *Am J Clin Nutr*. 2007; 86: 714–717.
140. Poon AH, Laprice C, Lemire M, Montpetit A, Sinnett D, Schurr E, Hudson TJ. Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 170(9):967-73.
141. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, Mc Adam KP, Thursz M, Whittle HC, Hill AV. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis*. 1999; 179(3): 721-4.
142. Wilkinson RJ, Llewelyn M, Toossi Z, Patel P, Pasvol G, Lalvani A, Wright D, Latif M, Davidson RN. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet*. 2000; 355(9204): 618-21.

143. Selvaraj P, Narayanan PR, Reetha AM. Association of vitamin D receptor genotypes with the susceptibility to pulmonary tuberculosis in female patients & resistance in female contacts. *Indian J Med Res.* 2000; 111: 172-9.
144. Liu W, Zhang CY, Wu XM, Tian L, Li CZ, Zhao QM, Zhang PH, Yang SM, Yang H, Zhang XT, Cao WC. A case-control study on the vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2003; 24(5): 389-92.
145. Barber Y, Rubio C, Fernández E, Rubio M, Fibla J. Host genetic background at CCR5 chemokine receptor and vitamin D receptor loci and human immunodeficiency virus (HIV) type 1 disease progression among HIV-seropositive injection drug users. *J Infect Dis.* 2001; 184(10): 1279-88.
146. Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis.* 1999; 179(1): 187-91.
147. Roth DE, Soto G, Arenas F, Bautista CT, Ortiz J, Rodriguez R, Cabrera L, Gilman RH. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and response to treatment of pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis.* 2004; 190: 920–927.
148. Roth DE, Jones AB, Prosser C, Robinson JL, Vohra S. Vitamin D receptor polymorphisms and the risk of acute lower respiratory tract infection in early childhood. *J Infect Dis.* 2008; 197: 676–680.
149. De la Torre MS, Torres C, Nieto G, Vergara S, Carrero AS, Macia J, Pineda JA, Caruz A, Fibla J. Vitamin D receptor gene haplotypes and susceptibility to HIV-1 infection in injection drug users. *J Infect Dis.* 2008; 197: 405–410.
150. Fitness J, Tosh K, Hill AVS. Genetics of susceptibility to leprosy. *Genes Immun.* 2002; 3: 441–453.
151. Mittal RD, Manchanda PK, Bhat S, Bid HK. Association of vitamin-D receptor (Fok-I) gene polymorphism with bladder cancer in an Indian population. *BJU Int.* 2007; 99(4): 933-7.
152. Morrison G, Kilanowski F, Davidson D, Dorin J. Characterization of the mouse beta defensin 1, *Defb1*, mutant mouse model. *Infect Immun.* 2002; 70: 3053–3060.
153. Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *FASEB J.* 2005; 19: 1067–1077.

- 154.** Schaubert J, Dorschner RA, Coda AB, Buchau AS, Liu PT, Kiken D, Helfrich YR, Kang S, Elalieh HZ, Steinmeyer A, Zugel U, Bikle DD, Modlin RL, Gallo RL: Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest.* 2007; 117: 803–811.
- 155.** Raqib R, Sarker P, Bergman P, Ara G, Lindh M, Sack DA, Nasirul Islam KM, Gudmundsson GH, Andersson J, Agerberth B: Improved outcome in shigellosis associated with butyrate induction of an endogenous peptide antibiotic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 9178–9183.
- 156.** Schaubert J, Svanholm C, Termen S, Iffland K, Menzel T, Scheppach W, Melcher R, Agerberth B, Luhrs H, Gudmundsson GH. Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: Relevance of signalling pathways. *Gut.* 2007; 52: 735–741.