

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**CROHN HASTALIĞINDA VİTAMİN D RESEPTÖRÜ VE İNTERLÖKİN
GEN AİLESİ TEK NÜKLEOTİT POLİMORFİZMLERİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SENA AKSU

1600004455

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Elif Damla ARISAN

MAYIS 2019

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**CROHN HASTALIĞINDA VİTAMİN D RESEPTÖRÜ VE İNTERLÖKİN
GEN AİLESİ TEK NÜKLEOTİT POLİMORFİZMLERİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SENA AKSU

1600004455

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 27 Haziran 2019

Tezin Sunulduğu Tarih: 27 Mayıs 2019

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Elif Damla ARISAN

Jüri Üyeleri: Doç Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

Prof. Dr. Tunç AKKOÇ (Marmara Üniversitesi)

MAYIS 2019

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ÖNSÖZ | iv |
| KISALTMALAR | v |
| SEMBOL LİSTESİ | vi |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | vii |
| TABLO LİSTESİ | xi |
| ÖZET..... | xii |
| ABSTRACT | xiii |
| BÖLÜM I GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| BÖLÜM II GENEL BİLGİLER | 2 |
| 2.1. Crohn Hastalığı..... | 2 |
| 2.2. Crohn Hastalığının Dünya Dağılımı..... | 5 |
| 2.3. Crohn Hastalığının Etiyolojisi..... | 5 |
| 2.4. Crohn Hastalık Epidemolojisi | 6 |
| 2.5. Crohn Hastalığı Patogenezi | 7 |
| 2.6. Crohn Hastalığının Genetik Temeli | 7 |
| 2.7. Crohn Hastalığının Prognozunda Genlerin Rolü..... | 8 |
| 2.7.1. Crohn Hastalığında Farmakogenetik | 8 |
| 2.8. Crohn Hastalığı, Vitamin D ve Vitamin D Reseptörü..... | 8 |
| 2.8.1. VDR polimorfizmi (rs2228570) | 10 |
| 2.8.2. VDR polimorfizmi (rs731236) | 11 |
| 2.9. Crohn Hastalığı ve İnterlökinler..... | 12 |
| 2.10. Tezin Dayandığı Bulgular | 16 |
| BÖLÜM III MATERYAL ve YÖNTEM | 18 |
| 3.1. Materyaller ve örnekler | 18 |

| | |
|---|----|
| 3.1.1. Kullanılan Cihazlar | 18 |
| 3.1.2. Kullanılan Kimyasallar | 18 |
| 3.1.3. Deney Grupları | 18 |
| 3.2. Yöntemler | 18 |
| 3.2.1. Kandan DNA izolasyonu | 18 |
| 3.2.2. DNA'ların absorbanlarının ölçülmesi: | 19 |
| 3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)..... | 19 |
| 3.2.4. Restriksiyon enzim kesimi..... | 20 |
| 3.2.5. Agaroz jel hazırlanması | 21 |
| 3.2.6. İstatistiksel analiz:..... | 22 |
| BÖLÜM IV SONUÇLAR | 23 |
| BÖLÜM V TARTIŞMA | 42 |
| KAYNAKLAR | 50 |
| EKLER | 53 |
| ÖZGEÇMİŞ | 57 |

ÖNSÖZ

Tez çalışmamı tamamlama sürecinde en başından itibaren engin bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, her konuda yardımcı olan, üzerimde çok emeği geçen, sonsuz sabrı ve şefkatiyle yanımda olan, her zaman saygı ve sevgi ile hatırlayacağım değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Elif Damla ARISAN'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca akademik alanda sahip oldukları bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan ve desteklerini esirgemeyen çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL, Sayın Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN'a ve Sayın Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA'ya,

Akademik hayatımda bana her zaman destek olan, yanımda olan, her konuda yardımcı olan, desteklerini esirgemeyen sevgili hocalarım Arş. Gör. Özge BERRAK RENCÜZOĞULLARI, Arş. Gör. Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ, Arş. Gör. Halil Önder ÖZBAŞAK, Arş. Gör. Alp AYAN ve Arş. Gör. Sinan MERİÇ'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca özellikle laboratuvar çalışmalarını birlikte gerçekleştirdiğim, her zaman yanımda olduğunu hissettiren ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşım, Aynur Ergün, Osman Orçun Okumuş, Derya Bulut, Merve Karataş, Kadriye Koyuncu'ya teşekkür ederim.

Hayatım boyunca duydukları sevgi ve güveni bana hissettiren, ne olursa olsun desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan, üzerimde çok büyük emekleri olan, sonsuz yardımları, sabırları ve şefkatleri için çok sevgili canım annem Melahat AKSU, canım babam Vedat AKSU, biricik kardeşlerim Esmâ, Enes AKSU'ya ve canım halam Zinnet AKSU'ya en içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın gerçekleşmesi için finansal destek sağlayan ve deneysel süreçte İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarlarına vermiş oldukları destek ve olanaklar için teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs, 2019 Sena AKSU

KISALTMALAR

| | |
|-----------------|--|
| CD | :Crohn Hastalığı |
| UC | :Ülseratif Kolit |
| VDR | :Vitamin D Reseptörü |
| 25OHD | :25-OH Vitamin D |
| 1,25(OH)2D | :1,25-OH ₂ Vitamin D |
| ATG16L1 | :Otofaji İlişkili Gen L1 |
| İBH | :İnflamatuar Bağırsak Hastalığı |
| IL-1RN | :İnterlökin 1 Reseptör Antagonist |
| IL-8 | :İnterlökin 8 |
| IL-6 | :İnterlökin 6 |
| NOD2 | :Nükleotit bağlanma oligomerizasyon domain içeriği 2 |
| IL-23R | :İnterlökin 23R |
| Th-17 | :T-helper-17 |
| cDNA | :Komplementer DNA |
| CO ₂ | :Karbondioksit |
| PZR | :Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| SNP | :Tek Nükleotit Polimorfizm |
| PI3K | :Fosfoinositid 3-kinaz () |
| EDTA | :Etilendiamintetra asetik asit |
| TAE | :Tris asetat EDTA çözeltisi |
| PI | :Propidyum iyodür |
| RT-PCR | :Reverstranskriptazpolimeraz zincir reaksiyonu |
| SDS | :Sodyum dodesil sülfat |
| RE | :Restriksiyon enzimi |
| RT | :Ters Transkriptaz |
| SE | :Sodyum Edta Solüsyonu |
| SES | : Sodyum Edta SDS Solüsyonu |
| TE | :Tris-Edta Solüsyonu |

SEMBOL LİSTESİ

| | |
|------------------|---|
| % | : Yüzde |
| °C | : Santigrat derece |
| µg | : Mikrogram |
| µl | : Mikrolitre |
| µm | : Mikrometre |
| µM | : Mikromolar |
| bç | : Baz çifti |
| cc | : Santimetre küp |
| cm | : Santimetre |
| cm ² | : Santimetre kare |
| IC ₅₀ | : Yarım maksimum inhibitör konsantrasyonu |
| kDa | : Kilo Dalton |
| mA | : Mili amper |
| ml | : Mililitre |
| mm | : Milimetre |
| nm | : Nanometre |
| ng | : Nanogram |
| V | : Volt |
| Rpm | : Dakikada devir |
| U/µl | : Ünite Permikrolitre |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2. 1. Bağırsağın normal sağlıklı bireylerde, Crohn hastası ve ülseratif kolit olanlarda anatomik temsili olarak gösterimi (Alila MedicalMedia/Shutterstock.com) | 3 |
| Şekil 2. 2. Vitamin D reseptör (VDR) gen polimorfizmlerinin yeri ve yapısı..... | 10 |
| Şekil 4. 1. (a) Normal sağlıklı kontrolden (K1) alınan DNA örneğinde, gradient PZR sonucunda Vitamin D reseptörü (VDR) rs2228570 nolu polimorfizminin ekson 2’de C/T değişimi için gösterildi. Bu örnek için 65°C sıcaklığın uygun olduğuna karar verildi. (b) Ekson 9 da görülen VDR için rs731236 nolu polimorfizimde T/C değişimi TaqI enzimi ile kesim sonrasında değerlendirildi. 690 bç PZR ürünü elde edildi. Marker 100 bç. Gradient PZR sıcaklıkları sırası ile : A : 65.0, B : 64.0, C : 62.0, D : 59.3, E : 55.9, F : 53.2, G : 51.1, H : 50.0..... | 23 |
| Şekil 4. 2. (a) VDR rs2228570 Ekson 2 için PZR ürünlerinden kontrol (K2), Crohn Hastaları (C1-3), ülseratif kolit hastaları (U1-2) için elde edilmiştir. (b) PZR ürünleri FokI enzimi ile kesilmiş ve 207, 63 bç’lik ürünler elde edilmiştir. | 24 |
| Şekil 4. 3. (a) VDR rs731236 Ekson 9 polimorfiziminin gösterilmesi için PZR işlemi kontrol (K2), Crohn Hastaları (C1-3), ülseratif kolit hastaları (U1-2) için gerçekleştirildi. (b) a sonucunda görülen PZR ürünlerinin elde edilememesi nedeni ile diğer hastalıklara ait DNA örnekleri PZR işleminin kontrolü için denendi. P1-5 prostat kanseri hastaları. Marker 100 bç. | 25 |
| Şekil 4. 4. (a) İki farklı (K3-4) normal sağlıklı kontrolden alınan DNA örneklerinde, Vitamin D reseptörü (VDR) Ekson 2 rs2228570 nolu polimorfizmi ve VDR Ekson 9 rs731236 için PZR ürünleri elde edildi. Ekson 2 için 270 ve ekson 9 için 690 bç PZR ürünü elde edildi. (b) K5-9 kontrol DNAları kullanılarak VDR Ekson 2 rs2228570 için PZR ürünleri elde edildi. (c) K5-9 kontrol DNAları kullanılarak VDR Ekson 9 rs731236 için PZR ürünleri elde edildi. Marker 100 bç..... | 26 |
| Şekil 4. 5. (a) K10-14 kontrol DNAları kullanılarak VDR Ekson 2 rs2228570 için PZR ürünleri elde edildi. (b) K10-14 kontrol DNAları kullanılarak VDR Ekson 9 rs731236 için PZR ürünleri elde edildi. Marker 100 bç..... | 26 |
| Şekil 4. 6. FokI enzim kesimi K5-14 kontrol DNA örneklerinden elde edilen PZR ürünleri ile gerçekleştirildi. 270 bç: kesilmemiş ürün, 207 ve 63 bç kesilmiş ürün. Marker 100 bç. | 27 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4. 7. (a) Kontrol (K15-19) DNAları kullanılarak VDR Ekson 2 rs2228570 için PZR ürünleri elde edildi. (b) K15-19 FokI enzim ile kesildi. 270 bç: kesilmemiş ürün, 207 ve 63 bç kesilmiş ürün. Marker 100 bç. | 28 |
| Şekil 4. 8. (a) Crohn (C4) ve ülseratif kolit (U3-4) hastalarının DNAları kullanılarak VDR Ekson 9 rs731236 VDR Ekson 2 rs2228570 için PZR ürünleri elde edildi. (b) FokI enzim kesimi C4 ve U3-4 DNA örneklerinden elde edilen PZR ürünleri ile gerçekleştirildi. 270 bç: kesilmemiş ürün, 207 ve 63 bç kesilmiş ürün. Marker 100 bç. | 28 |
| Şekil 4. 9. (a) Crohn (C5-7) hastalarının DNAları kullanılarak VDR Ekson 9 rs731236 VDR Ekson 2 rs2228570 için PZR ürünleri elde edildi. (b) FokI enzim kesimi (C5-7) örneklerinden elde edilen PZR ürünleri ile gerçekleştirildi. Marker 100bç. | 29 |
| Şekil 4. 10. (a) Kontrol (K3-8) DNAlar VDR primeriyle PZR ürünleri elde edildikten sonra Taq enzimiyle allelleri belirlemek için kesim yapılmıştır. Enzim kesimi olmadan önce allel uzunluğu:690 bç, kesim olduktan sonra 504/186 bç. (b) Kontrol (K10,11,13,14) DNAlar VDR primeriyleTaq için PZR yapıldıktan sonra Taq enzimiyle allelleri belirlemek için kesim yapılmıştır. Enzim kesimi olmadan önce allel uzunluğu:690 bç, kesim olduktan sonra 504/186 bç. | 29 |
| Şekil 4. 11. Hasta (C4,C6/U3,U4) DNAları ile VDR Ekson 9 rs731236 için PZR yapıldıktan sonra allelleri belirlemek için Taq enzimiyle kesim yapılmıştır. Enzim kesimi olmadan önce allel uzunluğu: 690 bç, kesim olduktan sonra 504/186 bç. | 30 |
| Şekil 4. 12. (a) ve (b) Kontrol (K15-24) DNAları kullanılarak VDR Ekson 9 rs731236 için PZR ürünleri elde edildi. Marker 100 bç. | 31 |
| Şekil 4. 13. Kontrol (K15-24) DNAları ile VDR Taq PZR yapıldıktan sonra enzim kesimi yapılmıştır. VDR Ekson9 rs731236 polimorfizi belirlenmiş oldu. Enzim kesimi olmadan önce allel uzunluğu:690 bç, kesim olduktan sonra 504/186 bç. | 31 |
| Şekil 4. 14. Kontrol (K25,K30-34) DNAları kullanılarak VDR Ekson 9 rs731236 için PZR ürünleri elde edildi. (K26-29) çeşitli nedenlerden ötürü sonuç vermedi. Marker 100 bç. | 32 |
| Şekil 4. 15. Kontrol (K25/K30-34) DNAları kullanılarak TaqI ile kesim yapıldı. VDR Ekson 9 rs731236 için polimorfizm belirlendi. Marker 100 bç. Enzim kesimi olmadan önce allel uzunluğu:690 bç, kesim olduktan sonra 504/186 bç. | 33 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4. 16. (a) Kontrol (K20-24) DNAları kullanılarak VDR Ekson 2 rs2228570 için PZR ürünleri elde edildi. (b) K(20-24) FokI enzim ile kesildi. 270 bç: kesilmemiş ürün, 207 ve 63 bç kesilmiş ürün. Marker 100 bç..... | 33 |
| Şekil 4. 17. (a) ve (b) IL-1RN rs2234663 için PZR ürünlerinden kontrol (K5-14) için elde edilmiştir. PZR uzunluğu 150-600 bç'dir..... | 34 |
| Şekil 4. 18. (a) ve (b) Crohn (C2-7) hastaları ve ülseratif kolit (U1-4) hastalarının DNA'ları kullanılarak IL-1RN rs2234663 için PZR ürünleri elde edilmiştir. PZR uzunluğu 150-600 bç'dir. | 34 |
| Şekil 4. 19. (a) ve (b) Kontrol (K15-24) gruplarının DNAları kullanılarak IL-1RN rs2234663 için PZR ürünleri elde edilmiştir. PZR uzunluğu 150-600 bç'dir..... | 35 |
| Şekil 4. 20. (a) Kontrol (K3-4 ve K25-28) gruplarının DNAları kullanılarak IL-1RN rs2234663 için PZR ürünleri elde edilmiştir. (b) Kontrol (K29-34) DNAları kullanılarak IL-1RN rs2234663 için PZR ürünleri elde edilmiştir. PZR uzunluğu 150-600 bç..... | 35 |
| Şekil 4. 21. IL8 primeri ile gerçekleştirilen PZR işleminde K1 Kontrol DNA kullanılarak gradient PZR yapıldı. Gradient PCR sonucunda IL8 primeri (-251) rs4073 nolu polimorfizminin A/T değişimi için gösterildi ve IL8 (-845) rs2227532 nolu polimorfizminin T/C değişimi için gösterildi. Bu örnek için 58°C sıcaklığın uygun olduğuna karar verildi. 719 bç PZR ürünü elde edildi. Marker 100 bç. Gradient PZR sıcaklıkları sırası ile : A : 60.0, B : 59.3, C : 58.0, D : 56.2, E : 54.0, F : 52.1, G : 50.6, H : 50.0..... | 36 |
| Şekil 4. 22. Kontrol (K15-19) DNAları kullanılarak IL8 (-251) rs4073 ve IL8 (-845) rs2227532 nolu polimorfizmi için PZR ürünleri elde edilmiştir. İkisi için de 719 bç PZR ürünü elde edildi. Marker 100 bç..... | 37 |
| Şekil 4. 23. (a) ve (b) Hasta (C2-7, U1-4) DNAlarını kullanarak IL8 polimorfizmleri belirlemek için PZR yapıldı. PZR ürünleri 719 bç'dir. Marker 100 bç. | 37 |
| Şekil 4. 24. (a) Kontrol (K15-19) DNAları kullanarak IL8 (-845) rs2227532 polimorfizminin belirlenmesi için AseI Fast Digest ile enzim kesimi yapıldı. Sadece tek bir kontrol DNA'da kesim olmadığı gözlenmiştir. Kesim olmadan önce allel uzunluğu Allel C:719 bç, kesim olduktan sonra allel uzunlukları Allel T:526/193 bç. Marker 100bç. (b) Kontrol (K15-19) DNAları kullanarak IL8 (-251) rs4073 polimorfizminin belirlenmesi için MfeI ile enzim kesimi yapıldı. Ancak kesim olmadığı gözlenmiştir. Enzim Kesimi olmadan önce allel uzunluğu Allel T:719 bç. AllelA:687, 32 bç..... | 38 |

Şekil 4. 25. Hasta (C3-7/U1,U3-4) DNAları kullanarak IL8 (-845) rs2227532 polimorfizminin belirlenmesi için AseI FastDigest ile enzim kesimi yapıldı. PZR ürünlerinin kesim olmadan önce allel C uzunluğu:719 bç, kesim olduktan sonra Allel T:526, 193 bç. Marker 100bç.....39

Şekil 4. 26. (a) Hasta (C3,U1) DNAları kullanarak IL8 (-251) rs4073 polimorfizminin belirlenmesi için MfeI ile enzim kesimi yapıldı. Ancak kesim sonucu çıkmamıştır. Kesim olmadan önce allel T:719 bç, kesim olduktan sonra allel A:687,32 bç. Marker 100bç. (b) Hasta (C4-7,U3-4) DNAları kullanarak IL8 (-251) rs4073 polimorfizminin belirlenmesi için MfeI ile enzim kesimi yapıldı. Ancak kesim olmadığı gözlenmiştir. Enzim Kesimi olmadan önce allel T:719 bç. Allel A:687, 32 bç.....39

Şekil 4. 27. (a) ve (b) Kontrol DNAları kullanılarak IL-6 (-572) rs1800796 nolu polimorfizminin C/G değişimi ve IL-6 (-597) rs1800797 nolu polimorfizminin A/G değişimini belirlemek için PZR ürünleriyle enzim kesimi yapıldı. (a) Kontrol DNAlardan elde edilen PZR ürünleriyle MbiI enzim kesim yapıldı. Alleller = IL-6 (-572 C/G). Kesim olduktan sonraki uzunlukları Allel C= 424, 86 bç, Allel G= 510 bç. (b) Kontrol DNAlardan elde edilen PZR ürünleriyle FokI enzim kesim yapıldı. Alleller = IL-6 (-597 A/G). Kesim olduktan sonraki uzunlukları Allel A = 442, 68 bç Allel G = 510 bç.40

TABLO LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 3. 1. PZR karışımının içeriği..... | 19 |
| Tablo 3. 2. PZR koşulları | 20 |
| Tablo 3. 3. ILRN Primeri ile PZR Koşulları | 20 |
| Tablo 3. 4. IL-8 Primeri ile PZR Koşulları | 20 |
| Tablo 3. 5. FokI enzim kesimi karışım çözeltisinin hazırlanması | 21 |
| Tablo 3. 6. TaqI enzim kesimi karışım çözeltisinin hazırlanması..... | 21 |
| Tablo 3. 7. MfeI enzim kesimi karışım çözeltisinin hazırlanması | 21 |
| Tablo 3. 8. AseI enzim kesimi karışım çözeltisinin hazırlanması..... | 21 |
| Tablo 3. 9. %1'lik Agaroz Jel içeriği | 22 |
| Tablo 4. 1. Kontrol, Crohn hastaları ve ülseratif hastalarından elde edilen örneklerde VDR, IL-8, IL-1RN ve IL-6 için polimorfizmlerin gösterimi. | 41 |
| Tablo 4. 2. Kullanılan kontrol, Crohn Hastaları ve ülseratif kolit hastalarının sayısı | 41 |

ÖZET

Crohn hastalığı, öncelikle sindirim sistemini etkileyen, karmaşık, uzun süreli, kronik bir bağırsak hastalığıdır. Aşırı iltihaplanmaya neden olan anormal bağışıklık yanıtları içerir. İnflamasyon sindirim sisteminin herhangi bir yerinde, ağızdan anüse kadar meydana gelebilir. En çok bağırsak duvarlarını, özellikle ince bağırsağın alt kısımlarını ve kalın bağırsağı etkiler. İnflamasyon olduğu zaman iltihaplı dokular kalınlaşır şişer, sindirim sisteminin iç yüzeyinde açık yara gibi ülserler oluşur. Crohn hastalığının nedeni tam olarak bilinmemektedir. Çevresel faktörler, genetik yatkınlık, immünolojik yetersizlik gibi sebepleri olabilir. Crohn hastalığına bağlı genlerin çoğu bağışıklık sistemi fonksiyonunda rol oynar. Crohn hastalarında görülen düşük Vitamin D düzeyleri dikkati çekmektedir. Bu amaçla VDR geninde görülen polimorfizmlerin inflamatuvar bağırsak hastalığı olan kişilerde araştırılmış ve VDR polimorfizmleri ile tez kapsamında Crohn ve ülseratif kolit hastalarındaki ilişki değerlendirilmiştir. Ayrıca interlökinlerde görülen düzensizliğin tanımlanabilmesine yönelik olarak polimorfizmler sağlıklı kontroller, Crohn hastalığı ve ülseratif kolit hastalarından elde edilen periferik kan örneklerinden elde edilen DNA örneklerinde incelenmiştir.

Kontrol ve Crohn hastalarında ILRN'deki polimorfizmleri ve allelleri açısından istatistiksel olarak farklılık bulunmamıştır. Sağlıklı kontrol, ülseratif kolit ve Crohn hastalarında allel sıklıkları hesaplanmıştır.

VDR genindeki polimorfizmlerin belirlenmesinde FokI ile kesim yapılan ürünler için Crohn hastalığına duyarlılığı, TaqI ile kesim yapıldığında ise ülserleşmiş kolite karşı duyarlı olduğu yapılan analizler sonucu görülmektedir.

IL-8 (845) rs2227532 ve IL-8 (-251) rs4073 polimorfizmi kontrol ve hasta grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Tez kapsamında İBH'lerde VDR ve interlökinpolimorfizmlerinin çalışılmasına dikkat çekilmiş olup, gerekli teknik süreç tanımlanabilmiştir. Ancak gelecek çalışmalarda daha fazla hasta grubunun çalışmaya alınması istatistiksel olarak yeterli sayıda verinin eldesine olanak sağlayacaktır.

ABSTRACT

Crohn's disease is a complex, long-term, chronic bowel disease that primarily affects the digestive system. It contains abnormal immune responses that cause excessive inflammation. Inflammation can occur anywhere in the digestive tract, from the mouth to the anus. It affects mostly the intestinal walls, especially the lower parts of the small intestine and the large intestine. When inflammation occurs, the inflamed tissues become thick, swollen, ulcers such as open wounds occur on the inner surface of the digestive tract. The etiology of Crohn's disease is unknown. Environmental factors, genetic predisposition, immunological deficiency are the most probably underlying reasons. The genes that are linked to Crohn's disease play a role in immune system function. Low vitamin D levels seen in Crohn's patients are noteworthy. For this purpose, polymorphisms in vitamin D receptor (VDR) gene were investigated in patients with inflammatory bowel disease and the relationship between VDR polymorphisms and Crohn's and ulcerative colitis patients were evaluated. In addition, polymorphisms were examined in DNA samples obtained from peripheral blood samples obtained from healthy controls, Crohn's disease and ulcerative colitis patients in order to identify the disorder seen in interleukins. There was no statistically significant difference in ILRN and alleles in control and Crohn's patients. Allele frequency was calculated in healthy control, ulcerative colitis and Crohn's patients. In the determination of polymorphisms in the VDR gene, sensitivity to Crohn's disease for FokI-cut products and sensitivity to ulcerated colitis when cut with TaqI is observed.

The IL-8 (845) rs2227532 and IL-8 (-251) rs4073 polymorphism did not show a significant difference between the control and patient groups.

Within the scope of the thesis, attention was drawn to the study of VDR and interleukin polymorphisms in IBDs and necessary technical process could be defined. However, recruitment of more patient groups in the future studies will allow obtaining sufficient statistical data.

BÖLÜM I GİRİŞ VE AMAÇ

Crohn hastalığı ve ülseratif kolit inflamatuvar bağırsak hastalıklarının (İBH) birer çeşididir. Crohn hastalığı ağızda başlar anüse kadar olan sindirim ile ilgili bölgede görülebilir. Özellikle ince bağırsakta kronik olarak daha sık görülür. Ülseratif kolit kalın bağırsakta görülür. Crohn hastalığının nedeni henüz tam olarak bilinmemektedir. Çevresel etkiler, genetik yatkınlık, immünolojik yetersizlik gibi faktörler neden olarak görülmektedir. Crohn hastalığı ve vitamin D reseptöründeki polimorfizmler arasındaki ilişki henüz bilinmemektedir. Vitamin D reseptöründeki polimorfizmlerin Crohn hastalığı üzerindeki etkileri henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu tezde amaç, İBHler arasından seçilen Crohn hastalarından ve ülseratif kolit hastalarından alınan kan örneklerinden izole edilen DNA örnekleri ve VDR ve interlökin hedef genlerindeki allellerde görülen polimorfizmler incelenmiştir.

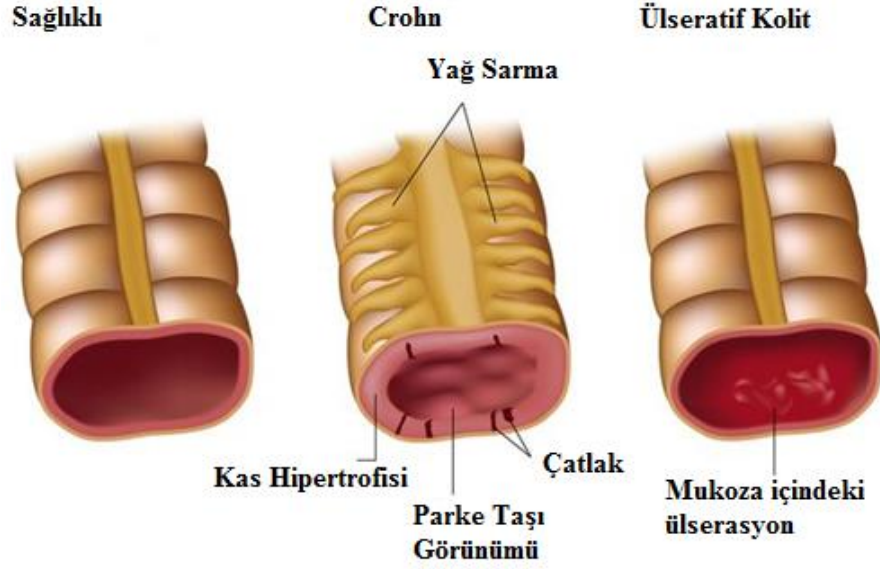
VDR'de 4 farklı polimorfik bölge bulunmaktadır. FokI, BsmI, ApaI ve TaqI kesim enzimleri ile bu bölgeler ayırt edilmektedir. Bunlardan FokI ve TaqI ile hedef polimorfizmlerin sağlıklı kontrol, ülseratif kolit ve Crohn hastalığında frekansları belirlenmiştir. VDR geninde FokI ve TaqI polimorfizmleri PCR/RLFP yöntemiyle analiz edildi. Ayrıca inflamasyon ile ilişkili olarak interlökin polimorfizmleri de tez kapsamında incelendi.

VDR genindeki farklı polimorfizmler FokI, BsmI, ApaI ve TaqI enzimleri ile belirlenir. Ekzon 2 ve ekzon 9'daki polimorfizmlerinin sırasıyla FokI ve TaqI enzimleri PCR/RLFP yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. IL-1RN, IL-8, IL-6'daki polimorfizmlerinin kontrol, Crohn ve ülseratif kolit hastalarındaki allellerini belirlemek için PCR/RLFP yöntemiyle analiz edilmiştir.

BÖLÜM II GENEL BİLGİLER

2.1. Crohn Hastalığı

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları gastrointestinal kanalın nedeni bilinmeyen, özellikle bağırsaklarda iltihap oluşan ve bağırsağın yapısında hasara neden olan kronik bir inflamatuvar hastalıktır. Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı olarak iki alt tipi en yaygındır. Crohn ve ülseratif kolit (semptomlar, yapısal zarar, tedavi) ortak özellikleri paylaştığı için tarihsel olarak birlikte çalışılmış olsa da iki ayrı patofizyolojik durumu temsil eder. Crohn hastalığı nedeni bilinmeyen inflamasyon görülen bir bağırsak hastalığıdır. İnflamasyon sindirim sisteminin herhangi bir yerinde ağızdan anüse kadar oluşabilir. İltihaplı dokular kalınlaşır, şişer ve sindirim sisteminin iç yüzeyinde açık yaralar ülserler oluşabilir. Gastrointestinal sistemin kronik inflamatuvar hastalığı olarak karakterize edilir. En yaygın olarak bağırsakta görülür [1-5]. Ülseratif kolit, sindirim sistemini etkileyen kronik bir inflamatuvar hastalıktır. Kalın bağırsağın kolon ve rektumun iç yüzeyinde anormal inflamasyonu ile karakterize edilir. Görülme sıklığı dünya çapında artmaktadır [6]. Ülseratifkolit'de inflamasyon devam eder ve kolonun mukozal tabakasıyla sınırlıdır. Crohn hastalığında ise bağırsağın herhangi bir yerini etkileyen segmentaltransmural lezyonla karakterizedir [1-3].



Şekil 2. 1. Bağırsağın normal sağlıklı bireylerde, Crohn hastası ve ülseratif kolit olanlarda anatomik temsili olarak gösterimi (Alila MedicalMedia/Shutterstock.com)

Crohn hastalığı ilk olarak İtalyan Fizikçi Giovanni Battista Morgagni tarafından 1769 yılında kronik ishal (diyare) ile teşhis edildiğinde tanımlandı. 1898 ve 1904 yıllarında benzer vakalar John Berg ve Antoni Lesniowski tarafından bildirildi. 1920-1930'lu yıllar boyunca genç yetişkinler abdominal kramplar, ishal, ateş, ciddi derecede kilo kaybı gibi semptomlardan muzdarip oldukları gibi aynı duruma sahip oldukları düşünülmüştür. 1923 yılında New York'taki Mt. Sinai Hastanesindeki cerrahlar aynı zamanda benzer semptomları olan hastaları belirlemiştir. 1923 yılında Dr. Burrill B. Crohn sebebi bilinmeyen halsizlik durumunu inceleyerek iki hasta arasında bir bağlantı gördü. Sonuç olarak, 1932 yılında Dr. Burrill B. Crohn ve arkadaşları 'Bölgesel Hastalık: patolojik ve kronik durum' olarak bu hastalığın özelliğini bir makalede tanımladı. Burrill Crohn'dan sonra hastalığın ismi Crohn Hastalığı olarak anılmaya başlandı. 1932 yılında bu isim kabul edildi [2].

Crohn hastalığı, ağız, özafagus, ince ve kalın bağırsakta görülmekle birlikte, en yaygın ileumu da kapsayan bir sindirim hastalığıdır. Aynı zamanda otoimmün hastalık olarak karakterize edilir. Çünkü vücudun kendisine saldırdığı ve inflamasyona neden olmaktadır. Yumuşak formda, bağırsağın iç yüzeyinde aftöz ülserler denilen erozyonlara neden olur. Şiddetli, ağır vakalarda bağırsak duvarında, bağırsak tıkanıklığına ve deliklerenyol açabilen, daha derin ve büyük ülserlerin oluşmasına neden olur. Bağırsak duvarında bir delik ortaya çıkarsa komşu organlarda enfeksiyon meydana gelebilir. Crohn hastalığında perforasyonun görülmesine bağlı

olarak isim alabilir. Eğer semptomlar kalın bağırsakta meydana geliyorsa Crohn veya Granulomatous Colitis olarak isimlendirilir. Eğer ince bağırsakta meydana gelirse *Crohn enteriti*, ileumda meydana gelirse *Crohn ileitis* olarak adlandırılır. Şiddetli vakalar, ince ve kalın bağırsağın her ikisinde meydana gelirse *Crohn enterokolit* veya İleokolit olarak bilinir [2].

Crohn hastalığının nedeni tam olarak bilinmemektedir. Ancak nedeni olabilecek birçok faktör vardır. Bunlar genetik duyarlılık, çevresel faktörler, immün dengesizlik. Bu faktörlerle Crohn ve ülseratif kolit arasındaki ilişkiyi kuvvetlendirmek için çeşitli kanıtlara ihtiyaç vardır [7]. Crohn hastalığına bağlı genlerin çoğu bağışıklık sistemi fonksiyonunda rol oynar. Bu genlerden üretilen proteinler immün sistemi teşvik eder ve sindirim sistemindeki bakterilere uygun şekilde tepki verir. Proteinlerin çoğu hücrelerin bakteri ve virüsleri kuşatıp yok etmek için kullanılan otofajide rol oynar. Eğer bu genlerde varyasyon meydana gelirse otofajiyi bozabilir ve bağışıklık sistemi fonksiyonunu değiştirebilir. Diğer genetik ve çevresel faktörlerle birlikte bu değişiklikler inflamasyona neden olabilir. Bu durum Crohn hastalığının karakteristik özelliklerinden biri olan sindirim sorunlarına neden olabilir.

Anormal immün yanıt, epitelyal bariyer bütünlüğünün bozulmasına yol ačan kronik inflamasyonla sonuçlanır. Böylece mikrobiyataile birlikte dengesiz bir immün yanıt döngüsü ortaya çıkar [8]. Bağırsak mikrobiyatası, antibiyotiklere maruz kalma, sigara içme, diyet, cinsiyet, yař gibi çevresel ve yaşam tarzı faktörleri Crohn hastalığının gelişimine katkı sağlayabilir [9].

Kronik nüksetici bağırsak bozuklukları; Crohn ve ülseratif kolit yaygın görülen enflamatuvar bağırsak hastalığı alt tipleridir. İltihaplanma şekli ve bölgesel tutulum farklılık gösterir [8]. Ülseratifkolitdeki yangı mekanizması sürekli ve kolondaki mukozal tabakayla sınırlıdır, oysa Crohn hastalığı gastrointestinal sistemin herhangi bir bölümünü etkileyebilen segmentaltransmural lezyonlarla karakterizedir. Biriken kanıtlar, bu enflamatuvar durumların genetik yatkınlıklarla birlikte görülen işlevsel olmayan antimikrobiyal yanıtlardan kaynaklandığını gösterir. Bu nedenle, kompleks konakçı-mikrop etkileşimlerinin ve alttaki sinyalleme basamaklarının tanımlanması, İBH patogenezinin ortaya çıkarılmasında özel önem taşımaktadır.

Crohn hastalarında vitamin D seviyelerinin az olduğu gösterilmiştir. Vitamin D miktarlarının azlığı hastalığın kötü prognozuna neden olur. Araştırmalar, inflamatuvar bağırsak hastalığı olan bireylerde D vitamini eksikliğine sık rastlandığını göstermektedir. D vitamininin etkinliği sadece kalsiyum homeostazisini düzenleyerek kemik gelişiminde sınırlı olmayıp, aynı zamanda proapoptotik, antienflamatuvar ve immün-modülatuar özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir.

Ancak ülseratif kolit ve Crohn hastalığının epidemiyolojisi ve patogenezi tam anlamıyla henüz bilinmiyor.

2.2. Crohn Hastalığının Dünya Dağılımı

Crohn hastalığı dünyada en yaygın olarak Kuzey Amerika ve Avrupa'da görülür. En az yaygın olarak Asya ve Afro-Amerikan gruplarında görülür. Kuzey Amerika ve Avrupa'da yaklaşık olarak 500.000 insanda etkilidir. 100.000 insanda kişi başına 27 ile 48 vaka arasında hastalığın görülme sıklığı meydana gelmektedir [2]. Avrupa popülasyonunda 100.000'de 26-200'ü etkileyen gastrointestinal sistemin kronik inflamasyon hastalığıdır [10]. Kuzey Amerika ve Avrupa'da yaygınlık oranları CD'da 100.000'de 8-214, UC için 100.000'de 21-246 arasında değişmektedir. [11] Kadın ve erkekler arasında yaygınlık açısından bir fark yoktur. Crohn hastalığından etkilenen kardeşleri olan bireylerin hastalığa yakalanma riski daha yüksektir. Çevresel faktörlerden kaynaklanan kanıtlar vardır. Bu nedenle batı endüstrileşmiş ülkelerde vakalar daha fazla sayıdadır. Crohn hastalığı semptomları tipik olarak genç ve yirmili yaşlarda başlar. Gittikçe hafifler ve uygun terapiyle kaybolur. 50 ve 70'li yaşlar arasında sıklık insidansı vardır[2] .

2.3. Crohn Hastalığının Etiyolojisi

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının kesin nedeni hala tam olarak bilinmemektedir. İnflamasyonun başlaması ve sürdürülmesinde mukozal immün sistemin önemli rolü olduğunu desteklediğine dair kanıtlar vardır. Son yıllarda çalışmalarda, bağırsakta immünolojik reaksiyonları olumsuz yönde etkileyen bakteriyel mikroflora türevli antijenler tanımlanmıştır. [12] Crohn ve ülseratif kolitin etiyolojisi ve patogenezi hala tam olarak bilinmemektedir. Crohn hastalığı ve ülseratif kolit birçok patojenikfaktör ile ilişkilidir. Crohn ve ülseratif kolitin her ikisi de esas olarak genetik yatkınlık, çevresel tetikleyiciler, kalitatif ve kantitatif olarak anormal bağırsak mikrobiyatası, immunolojik dengesizlik arasındaki kompleks etkileşimden ortaya

çıkacağı fikri giderek artan kanıtlar sağlamıştır [5, 7]. Bu gerçekleşmeye ve çevresel, genetik, mikrobiyal ve immün faktörler görüldüğü gibi tanımlanmasına rağmen İBHpatogenezinin tam olarak anlaşılmasına hala erişilememiştir ve tedavi optimal olmaktan uzaktır [5]. Ülseratif kolit ve Crohn hastalığının nedeni olarak birçok teori vardır. Birçok kişi, bazı yiyecekler, bakteriler, virüsler, sigara dumanı gibi immün sistem yanıtını etkileyebilen çevresel faktörlerin neden olduğuna inanmaktadır. Bilim adamları inflamasyon bağırsak hastalıklarını otoimmün problem olarak bağladılar. Sağlıklı bir insanda immün sistem vücuda giren zararlı mikroplara karşı vücudu korur. İmmün sistemin tetiklenmesi üzerine immün hücreleri enfeksiyonun olduğu yerde kümeleşir ve tehditi ortadan kaldırmak için inflamasyon yanıt meydana gelir. Bu mikroplar vücudumuzda doğal olandır. Zararlı olandan ziyade yararlı olanlar immün sistem yanıtı tetiklemez. Crohn hastalarında ise immün sistem bu doğal luminal bakterilerine hücum ederek normal floranın bozulmasına yol açar. Bu nedenle bu durum otoimmün hastalık olarak karakterize edilir [2] .

2.4. Crohn Hastalık Epidemolojisi

İltihaplı bağırsak hastalığına yakalanma sıklığı; kişi, yer, zaman, sosyo-ekonomik etken, çevresel faktörler gibi değişkenlere göre farklılık gösterir. Crohn ve ülseratif kolitin dünyadaki dağılımı benzerdir. Kuzeybatı Avrupa, Kuzey Amerika, özellikle İskandinavya ve İngiltere’de daha sık görülür. Güneydoğu Avrupa, Güney Afrika ve Avustralya’da daha az görüldüğü bilinmektedir. Kentsel kesimde kırsal kesime göre daha sık rastlandığı bilinmektedir.[13] Crohn hastalığı insidansı kadınlarda, Ülseratif Kolit insidansı erkeklerde daha yüksektir. Sosyo ekonomik durumu iyi olanlarda, kapalı ortamlarda çalışanlarda görülme sıklığı artmaktadır.[14] Epidemiyolojik, genetik ve immünolojik verilere bakıldığında inflamatuvar bağırsak hastalıkları, kalıtsallık ve çevresel faktörlerin hastalığına neden olan etkileşime girdiği çok faktörlü etiyojinin heterojen bozuklukları olduğu sonucuna varılabilir [15].

Bütün dünyada görülmesine rağmen Crohn hastalığı, İskandinav ülkelerinde, Birleşik Devletlerde, Britanya’da, Orta Avrupa’ya nazaran daha az görülmektedir. Asya ve Afrika’da ise nadir olarak görülür. Yani beyaz ırkta daha çok karşılaşılmaktadır. Batı Avrupa’da Crohn hastalığı artış göstermektedir.

Çocukluk döneminden ileri yaşlara kadar herhangi bir yaşta ortaya çıkabilir. Kadınlarda, çok az farkla da olsa erkeklerden biraz daha fazladır.

2.5. Crohn Hastalığı Patogenezi

Crohn hastalığının patogenezinde genetik faktörlerin rolü için erken epidemiyolojik kanıtlar incelenmiştir. Kafkas ve Yahudi etnik bireyleri arasında Crohn hastalığının yüksek oranda görülmesi, çift yumurta ikizleri tek yumurta ikizleri ile karşılaştırıldığında Crohn hastalığı gelişen her iki ikizde de Crohn hastalığının ailesel toplam ve yüksek uyum oranlarını gösteren çalışmalar dikkat çekicidir. Crohn hastalığının spesifik duyarlılık genlerinin araştırılması, hastalığın gelişiminde bağırsak mikroflorası ve çevresel faktörlerin etkisi, çeşitli genlerin ilişkisi, basit Mendel kalıtım örneklerinin yoksunluğu gibi faktörleri içeren kompleks genetikten dolayı zordur. 30 dan fazla farklı genomik lokuslar, bir dizi homeostatik mekanizmaya dahil olan genleri kodlar ve Crohn hastalığı etyopatogenezi ve prognozuna dahil olduğu ileri sürülmüştür [15].

Crohn hastalığında genelde karın bölgesinde (özellikle sağ alt tarafında) ağrı ve ishal görülür. Tutulan bölgeye göre değişik belirtiler ortaya çıkmakla beraber kusma, kabızlık, kilo kaybı, yorgunluk, karında şişlik görülebilir. Karın bölgesinde iltihap olursa hastada ateş yükselmesi olabilir. Kalınlaşma olduğundan bağırsak tıkanıklığı meydana gelebilir. Kalın bağırsak etkilendiğinde dışkıda kan görülebilir. Anüs bölgesi etkilendiğinde ise doku yaralanması görülebilecektir.

Bu hastalıkta diğer bazı organlarda etkilenebilir. Ciltte ağrı yapan kırmızı renkli şişlikler, gözde iltihaplanma, ağızda aft tarzı beyaz renkte yaralar, eklem ağrıları oluşabilir. Crohn hastalarında eklem ağrılarıyla beraber diz şişmiş olabilir. Hastalığın aktif olduğu dönemde halsizlik, iş gücünde düşme ortaya çıkar.

2.6. Crohn Hastalığının Genetik Temeli

İmmun regülasyonun bozulmasıyla hastalığın gelişiminin birleşmesi için hastaların genetik yatkınlığa sahip olması muhtemeldir. Şimdiye kadar birçok gen crohn hastalığının tanısı ile ilişkilidir. Bu genler doğuştan patern tanıma reseptörlerle, epitel bariyer homeostazi, otofaji ve lenfosit farklılaşmasında epitel bariyer bütünlüğünü sürdürme için ilişkilidir [15].

İBH için en güçlü risk faktörü aynı hastalık ile akrabalıktır. Crohn hastalığı ile hastaların birinci derece akrabaları genel popülasyondaki benzer yaş gruplarındaki insanlara göre 12-15 kat daha büyük gelişme riskine sahiptir. Ailesel kümelenme ortak çevresel risk faktörlerinden de kaynaklanabilir [15].

2.7. Crohn Hastalığının Prognozunda Genlerin Rolü

Bu, hastaları ilgilendiren önemli bir konudur. Şimdiye kadar çoğu genler crohn hastalığının seyrini belirlediler. Crohn hastalığının genetik profilini sınıflandırma yapmak için sayısız denemeler yapıldı. İlginç bir şekilde Card15 sadece duyarlı bir gen olarak değil fakat aynı zamanda crohn hastalığı için hastalık modifiye edici gen olarak görünmektedir. CARD15 mutasyonlarının klinik önemi ile ilgili yayınlanmış birçok çalışmalardan, hastalığın lokasyonu ile ilgili birçok veriler sağlandı. Bunların çoğu, kolonik lokasyonun yokluğu ile bazı bağlantıları gösterirken, ileal hastalık alanı ile CARD15 mutasyonlarının önemli ilişkisini destekler.

2.7.1. Crohn Hastalığında Farmakogenetik

Farmakogenetik CD terapötik ve prognozunda önemlidir. Genler ilaçların etkinliğini ve yan etkilerini etkilemekte ve absorpsiyon, eliminasyon, transport ile ilgili karmaşık etkileşimi yansıtmaktadır. Gelecekteki çalışmaların tek tip fenotipli hastalar ile geniş ve ileriye dönük olmasına ve fonksiyonel verilerle genetik ilişkilerin bağlantılarına ihtiyaç vardır.

İkiz çalışmaları, sağlıklı kadında kemik mineral yoğunluğu ile vitamin D reseptör genin (VDR) polimorfizmlerini ilişkilendirmiştir ve ek olarak VDR kalsiyum metabolizması ve kemik hücre fonksiyonunun önemli bir düzenleyicisidir ve bağırsaktan kalsiyum emilimini etkiler. VDR polimorfizmi aynı zamanda CD'na duyarlılığı belirtilmiştir [15].

2.8. Crohn Hastalığı, Vitamin D ve Vitamin D Reseptörü

Vitamin D bir pro-hormondur. Steroid hormon olarak işlev gören yağda çözünen vitamindir. Doğal ve adaptif bağışıklık sisteminde rol oynar. Kemik oluşumu ve yoğunluğuna da etkisi vardır. İki ana form içerir. Ergokalsiferol olarak isimlendirilen Vitamin D2 ve kolekalsiferol da denen vitamin D3. Güneş ışığından gelen ultraviyole radyasyon insan derisinde Vitamin D2 ve D3'ün endojen üretiminden sorumludur. Aynı zamanda balık yağı ve çeşitli sebzeler gibi spesifik besin kaynaklarında da düşük konsantrasyonda gözlemlenir. Sırasıyla karaciğer ve böbrekte metabolize edilir. İnaktif Vitamin D, karaciğerde 25(OH)D'ye dönüştürülür. 25(OH)D, böbrekte (1,25(OH)2D)'ye dönüştürülerek aktif hale gelir. 25(OH)D, D vitamininin ana dolaşım şekli ve D vitamini durumunun dolaşımdaki biyobelirteci olarak kullanılır. (1,25(OH)2D) 1,25-dihidroksivitamin ve kalsiyum homeostazını kontrol eden

paratiroid hormon aynı anda metabolit formuna dönüşür [9, 16]. D vitamini düzeyleri Endokrin Derneği'nin önerisine göre, eksik ise <20 ng/ml olan 25(OH)D, yetersiz ise 20-30 ng/ml arası değerler olan 25(OH)D, yeterli ise ≥ 30 ng/ml olan 25(OH)D olarak tanımlanır. [17]

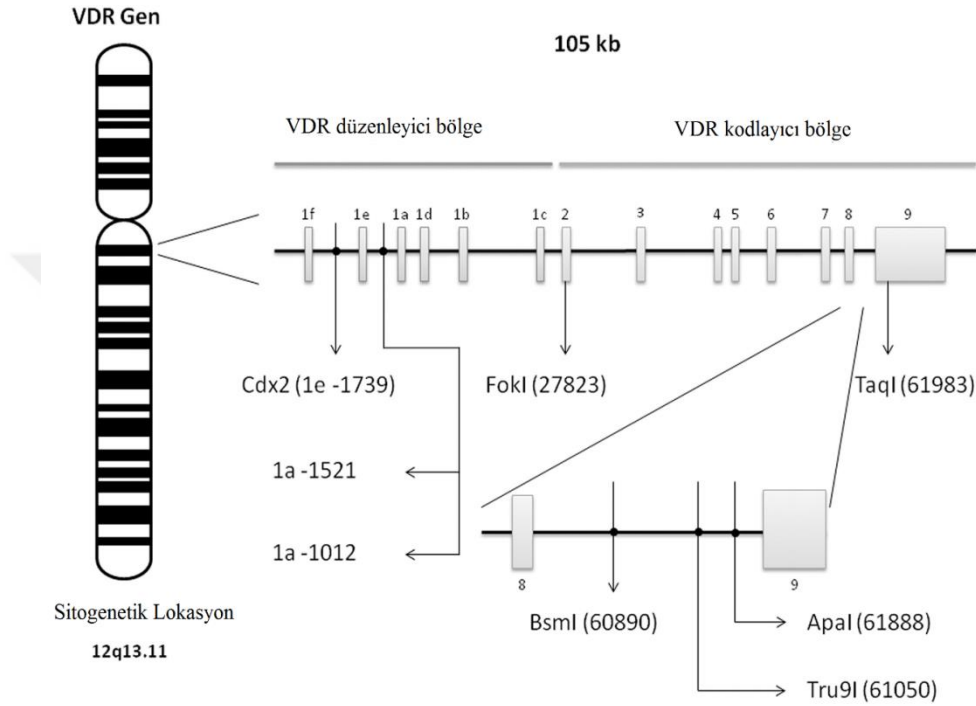
Vitamin D reseptörü (VDR), bir steroid hormon reseptör süperaillesinin üyesidir. VDR birçok doku ve hücrede eksprese olur. Karaciğer, adipoz doku, pankreatik β hücreleri, vasküler düz kas hücrelerinden eksprese olur. Bu nedenle D vitamini sadece kemik büyümesinde değil aynı zamanda kanser, Tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıkta rol oynar [17]. İnflamatuvar bağırsak hastalığı için güçlü bir pozisyonel aday duyarlılık genini temsil eder [18]. VDR geni 75 kb uzunluğunda ve kromozom 12'de haritalanmıştır. VDR proteini transkripsiyon düzenleyici faktörler grubuna girer ve kalsiyum ve kemik metabolizmasını kontrol eden vitamin D hormonunun (1,25-dihidroksi vitamin D3) etkisini düzenleyen reseptördür. VDR, vitamin D'nin aktif formu olan 1,25-dihidroksi vitamin D ile bağlanarak bağışıklık yanıtı ve inflamasyonun düzenlenmesinde çok önemli rol oynar. VDR proteininin ligand bağlayıcı ve DNA bağlayıcı bölgeleri bulunmaktadır. Ligand bağlayıcı bölgesine vitamin D bağlanır. DNA bağlayıcı bölgesine hedef gende bulunan vitamin D cevap elemanına bağlanır [7]. Vitamin D aynı zamanda NOD2/CARD15 ve ATG16L1 genlerinin ifadelerini yükseltir.

PreD3 Vitamini güneş ışığının etkisiyle deride 7-dehidrokolesterolden (ProD3 vitamini) sentezlenir. Bu enzimatik bir işlem değildir. PreD3 vitamininden Vitamin D3 sentezi ısıya duyarlı izomerisasyon ile gerçekleşir. Vitamin D'nin hedef dokudaki reseptörlerinde etkili olabilmesi için, ilk olarak karaciğerde 25hidroksilaz enzimiyle 25(OH)D'ye metabolize olur, sonra böbrekte 1- α hidroksilaz enzimiyle (1,25(OH)2D)'ye dönüştürülür. [19, 20]

D Vitamininin biyolojik aktivitesine VDR aracılık eder. 1,25(OH)2D3 VDR'ye bağlanarak VDR'nin RXR (retinoid X reseptörü) ile heterodimerizasyonunu indükler. D vitamini düzenlenmiş genlerin transkripsiyonuna yol açar. Bu kompleks, D vitaminine cevap veren genlerin promotorundaki (VDRE) D vitamini yanıt elemanına bağlanır. Histonların asetillenmesi ve kromatinin açılması, çekirdek transkripsiyonel makinenin girmesine ve gen transkripsiyonunu arttırmaya izin verir. Transkripsiyonel işlem için önemli olan diğer proteinler VDR-RXR-VDRE

kompleksine bağlanır ve süreç için aktivatör kazanır. Sonuçta hedef gene bağlı olarak transkripsiyon oluşabilir veya baskılanabilir.[16, 21]

Teorik olarak, VDR'nin biyolojik aktivitelerinin çoğu kendi gen polimorfizmlerinin kontrolü altındadır. VDR geninin en önemli fonksiyonel alanı olarak FokI, BsmI, ApaI ve TaqI tanımlandı. Sayısız ilişkili çalışmalarda çeşitli otoimmün hastalıklarda VDR'nin bu 4 polimorfik alanı belirlendi.



Şekil 2. 2. Vitamin D reseptör (VDR) gen polimorfizmlerinin yeri ve yapısı.

Sonuç olarak, Vitamin D ve VDR sinyali İBH'nin bağışık, genetik, çevresel, mikrobiyal yönlerine katkı sağlar. İBH'nin patolojisi anlamak ve tedavilerin gelişimi için önemli bir proteindir. VDR transkripsiyon faktörüdür ve bağırsak inflamasyonu ve disbiyozise katkıda bulunan hedef genlerin ekspresyonunu ve sinyalini düzenler. VDR genindeki genetik varyasyon ve hedefleri inflamasyon ile ilişkilidir. VDR sinyalleri bağışıklık sistemi ve bağırsakta, mukozal homeostazi teşvik eder ve inflamasyon hastalıklara karşı korur. Dokuya spesifik VDR rolleri İBH'de bir teşhis-prognostik gösterge sunar. Mevcut araştırmalar Vitamin D ve VDR'nin İBD için potansiyel terapötik hedef olabileceğini göstermektedir [22].

2.8.1. VDR polimorfizmi (rs2228570)

VDR geninin 2. eksonunda bulunan polimorfizmdir. C/T polimorfik geçiş bölgesi VDR başlangıç kodonunda bulunur. Aminoasit dizisi ve kodlanan reseptör proteininin

fonksiyonunu etkiler. VDR transkripsiyon faktör 2 B (TFIIB) ile bağlanır ve bunun sonucunun farklı etkisi ile farklı protein varyantları ilişkilidir. VDR-FokI polimorfik alanı diğer VDR-SNP'ler ile bağlantı dengesinde değildir. Bağımsız polimorfik bir alandır. VDR rs2228570 genotip ve allellerin dağılımı genetik kökenden farklı olabilir [23]. Başlangıç kodonu olan ATG'de bulunan C/T değişimi sonucunda ATG ACG'ye dönüşür. Bunun sonucunda translasyon 2. başlangıç kodonunda (ATG'den) başlar. Bu durumda 424 aminoasit uzunluğunda VDR proteini sentezlenir. T/C değişimi olmadığında translasyon birinci ATG'den başlar ve 427 aminoasit uzunluğunda VDR proteini sentezlenir. Başlangıç kodonu metiyonin aminoasitini şifreler. FokI rs2228570 polimorfizmi sonucunda metiyonin aminoasiti treonine çevrilir. Bu VDR'nin etkinliğini etkileyebilir. Bu polimorfizmi FokI restriksiyon enzimiyle belirlenir.

rs2228570 polimorfizmi allelleri A>C/A>G/A>T'dir. Allel A (minör) ile ilişkisi, düşük VDR aktivasyonu ve düşük VDR seviyeleri görülürken, AA alleli daha yüksek kemik kütlesi ve daha iyi kemik yapısı, A allelinin varlığı, transkripsiyon aktivatörü olarak daha az etkili VDR proteinin üretilmesine yol açar. VDR proteini hedef genleri üretmez. Meme kanseri gelişme riskini ve Asya toplumlarında böbrek taşı riskini artırır. AA allelinde oral kanserleri için sağkalım oranı daha kötüdür. Allel G (majör) ile ilişkisi, G alleli farklı büyüklükteki protein ile sonuçlanır. Bu VDR geninde SNP değiştirdiği bilinen tek proteindir. GG allelinde Çin ve Kore popülasyonlarında agresif diş eti hastalığı riskine dair literatürde yayınlar mevcuttur. A alleli koruyucu ilen fitiklaşmış disk veya osteokondrozun (kemik büyümesinin düzenlenmesi) gelişme riskinde iki kat artış oluşur. G alleli 424 aminoasit proteini kodlamaktadır. A alleli ise 427 aminoasit proteini kodlar. Kısa ve uzun protein formları vitamin D bağımlı genleri uyarmak için farklı yeteneklerle ilişkilidir [24, 25].

2.8.2. VDR polimorfizmi (rs731236)

VDR geninin 9. eksonunda bulunan polimorfizmdir. Kromozom 12' de haritalanmıştır. Bu polimorfizmi belirlemek için TaqI restriksiyon enzimi kullanılır. ATT kodonunu T/C değişimi sonucunda ATC'ye dönüşür. Bu iki amino asit izolösini kodlar. Bu nedenle sessiz polimorfizm de denir.

rs731236 polimorfizm allelleri A>G'dir. Allel A (major) ile ilişkisi, AA alleli uyarılmış immün hücrelerinde artmış VDR seviyeleri, AA alleli, Parkinson

hastalarında %31 daha düşük risk ile tanımlanmaktadır. Ek olarak, Asya popülasyonunda bu allelin varlığı yüksek böbrek taşı ile ilişkilidir. Kadınlarda azalmış meme kanseri oranı ile kalsiyum tüketimi ilişkilidir. A alleli diş eti hastalığı riskini azaltır. Allel G (minör) ile ilişkisi, GG alleli, diş eti hastalığı riskini artırır. G alleli uyarılmış immün hücrelerinde azalmış VDR seviyeleri, Parkinson hastalığı riski daha yüksek, Asyalılarda azalmış böbrek taşı riski, kalsiyum tüketimi kadınlarda meme kanseri oranındaki artış ile ilişkilidir [24]. VDR genindeki eş anlamlı SNP rs731236, yüksek Crohn hastalığı riski ile ilişkilendirilmiştir. [26]

Birkaç çalışmada Crohn hastalığı ile VDR gen polimorfizm ve 25hidroksi Vitamin D seviyeleri ilişkisi eş zamanlı olarak incelenmiştir [7].

Crohn hastalığında kommensal bağırsak florasına karşı tolerans kırılır. Vitamin D dengeli bir immün yanıtta yardımcı regülatör olarak görev görebilir. İnsanlarda D vitamininin ana kaynağı güneş ışığına maruz kaldığında deri biyosentezidir. Crohn hastaları sağlıklı bireylere göre daha düşük D vitamini içerir. Bu durum zamana, konuma, enleme göre değişebilir. Enleme bağlı olarak Crohn hastalığı prevalansı artmaktadır. Daha az güneş ışığına maruz kalma Crohn hastalığında daha düşük D vitamini seviyelerinin olabileceği çeşitli araştırmalarda görülmektedir [27].

2.9. Crohn Hastalığı ve İnterlökinler

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları bağırsak mukozasının tekrarlayan inflamasyonu ile kronik nüks olarak karakterizedir. Lüminal antijenlere karşı düzensiz immün yanıtından kaynaklanır. [28] Sitokinler ve reseptörleri İBH patogenezinde anahtar rol oynar. Sitokinler İBH'da iltihaplanmaya aracılık ederler. İmmün sistemde birçok fonksiyonu olduğu düşünülmektedir. [28-31] Sitokinler normal bağırsak homeostazını korumak için mukozaya ile ilişkili bağışıklık sisteminin vazgeçilmez sinyalleridir. Onların profillerinin inflamasyon başlangıcı lehine dengesizliği, inflamasyon bağırsak hastalığında gözlemlendiği gibi hastalık durumlarına neden olabilir. Kolon mukozasındaki proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin dengesi normal bağırsak homeostazı için önemlidir. Proinflamatuvar sitokinlerin rolü CD ve UC hastalıklarının başlatılması ve ilerlemesi ile ilişkilidir. Bunlar IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-23, IFN or TNF. IL-4, IL-10 ve IL-13 gibi antiinflamatuvar sitokinlerdir. IL-4, IL-10, IL-13 gibi antiinflamatuvar etkisi olan sitokinler İBH patogenezinde katkıda bulunur ve iltihaplama sürecini azaltarak

proinflamasyon sitokinlerin üretimini azaltır. [32] Proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu hem UC hem de CD iltihaplı bölgelerde artmıştır. Bu araçlar doku hasarının uyarılmasında doğrudan ilişkilidir ve inflamasyon süreci arttırırlar. [28] CD, Th1 aracılı hastalıkların prototipi olarak tanımlanır. Bunun nedeni ise primer inflamasyon araçlarının IL12, IFN β ve TNF gibi Th1 sitokinleri olmasıdır. UC ise Th2 tip durum olarak görülür. Çünkü IL-5 ve IL-13 Th2 ilişkili sitokininin bağırsak ekspresyonu artmasından dolayı Th2 durumu olarak görülür. [29, 32] Sitokinler immün hücreleri tarafından üretilen küçük peptid proteinlerdir. Antijen spesifik efektör hücrelerin çoğalmasını uyarır, hücreler arası iletişimi uyarır, otokrin, parakrin, endokrin yollarda lokal ve sistemik inflamasyon araçlarıdır. [29]. Sitokinler bağışıklık ve inflamasyon yanıtının oluşumuyla ilgili hücreler arası araçlardır. Dokudaki gen ifade düzeylerinde farklı yanıtlara sebep olarak bağırsak inflamasyonda yer alan sinyal yollarına ışık tutar [33]. Doğuştan gelen immün yanıt İBH'de rol oynar. Aktive olmuş dentritik hücreler ve makrofajlar çeşitli sitokinleri salgırlar. Bu sitokinler UC ve CD'da inflamasyon yanıtı aktif olarak düzenlerler. Antijen sunan hücreler tarafından salgılanan sitokinler, T hücrelerini tetikler ve farklılaşmasını sağlar. T hücresi adaptif immün yanıtı aktive eder. [29] İnterlökin sistemik inflamasyon ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde rol oynayan bir sitokindir. İnflamasyon bağırsak hastalıklarını karakterize eden sitokin yanıtlar, başlangıç, evrim, inflamasyonlu biçimlerin çözülmesini düzenleyen önemli patofizyolojik elementlerdir. Sitokin cevapların ilk basamağı, hastalığa egemen olan T-hücre farklılaşmasının düzenlenmesidir. Crohn hastalığında majör sitokinler Th-1 hücre Th17 CD+4 T-hücre farklılaşmasından kaynaklanır. Bu farklılaşmanın türlerinin oluşturduğu interferon gama ve IL17/IL22 oluşmaktadır [34].

Sitokin genlerindeki polimorfizmler sitokin oluşumunu engelleyerek anormal proinflamatuvar reaksiyonlar, antiinflamatuvar kontrol mekanizmalarının disfonksiyonuna neden olur. Bunun sonucunda da hastalıkların prognozunda önemli rol oynayabilmektedir. IL-1 β , TNF α , IL-8, IL-18 gibi proinflamatuvar kemokin ve sitokinlerdeki artışın, tümör ve kronik inflamatuvar hastalıklarla ilgili olduğu yapılan çeşitli araştırmalar sonucu belirtilmektedir. [35]

IL-1 kronik ve akut inflamasyonda rol oynar. Kromozomun 2q13'de lokalizedir. IL-1 ailesi IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra sitokinleri içerir. Bu sitokinler doğuştan gelen bağışıklık sisteminde rol oynar ve adaptif bağışıklık sistemi fonksiyonlarını düzenler.

IL-1 α ve IL-1 β proinflatuar sitokindir. Çeşitli insan hastalıklarında, enfeksiyon hastalıklarında rol oynar. Hücre sağ kalımı ve çoğalması gibi birçok fonksiyona sahiptir. IL-1Ra IL-1 α ve IL-1 β reseptörlerine bağlanarak bunların reseptörlerine bağlanmasını engeller. Böylelikle sinyal oluşumunu bloke eder. IL-1Ra, IL-1 α ve IL-1 β 'nin güçlü endojen rekabetçi inhibitörüdür. Antiinflatuar etkiler uygular. IL-1 aracılı inflamasyonda düzenleyici protein olarak rol oynar. [35, 36]

IL-1 ailesinin sitokinleri otoimmün inflamasyon hastalıklarda önemli rol oynar. IL-1 α ve IL-1 β olmak üzere yapısal olarak farklı iki formu vardır. IL-1'in doğal oluşumlu antagonisti endojen IL-1Ra'dır. IL-1Ra (İnterlökin 1 reseptör antagonisti) bağırsakta normal bağışıklık homeostazinin düzenler. IL-1 ve IL-1Ra'nın artışı ile kolonun aktivitesi arasında bir paralellik vardır. İBH olmayan inflamasyon kontrollerde ve kolonun etkili olmadığı yerlerde bu oran sabittir.

CD patogeneğinde IL-1 önemli rol oynar UC'e benzer şekilde. IL-1 ve IL-1Ra oranı CD aktivitesi ile aynı doğrultudadır. Son yıllarda faj görüntüleme teknolojisi kullanılarak, CD mononükleer hücrelerinin proinflatuar tepkilerini (IL-1, IL-6, TNF α) uyaran ve CD hastalığı alanına spesifik olarak bağlanan CD hastalarının kan mononükleer hücrelerinden kısa peptid(TCP-353) tanımlandı. Bu yenilik CD'nin tedavisi ile ilgili tanısal, patojenik, terapotik öneme sahip olabilir.

IL-1RN geni yapılan çeşitli analizlerle CD'da inflamasyonla ilişkilendirilmiştir. IL-1RN geni IL-1 sitokin ailesinin protein üyesini kodlar. Bu protein IL-1 α ve IL-1 β aktivitesini inhibe eder. Bağışıklık inflamasyon yanıtlarıyla ilişkiyi modüle eder. [37]

Dentritik hücreler ve makrofajlar antijen sunan hücrelerdir ve İBH'nda iltihaplı mukozada bulunur. Kommensal mikrobiyata ve Toll like reseptör (TLR) sinyallerinin bileşenlerine yanıt olarak meydana gelen aktivasyonun ardından bu hücreler büyük miktarda proinflatuar sitokinler üretirler. Bunlar IL-1, IL-6, IL-18 ve TNF'dir. Bağırsak mukozasında IL-1 reseptör antagonistinin IL-1'e oranındaki önemli azalma, CD ve UC hastalığı olanlarda İBH'da IL-1 aktivasyonunun arttığını gösteren kontrol deneklerine nazaran bulundu. [30]

IL-8 küçük, bazik, heparin bağlanma proteinidir. Sistein aminoasit ve sistein kemokin ailesinin üyesidir. Periferal kandan dokuya nötrofillerin göçünü ve aktivasyonuna aracılık eder. IL-8'in doku seviyesi, normal kolona nazaran aktif UC'de yüksek olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla bulundu. Serum

konsantrasyonu da UC'in histolojik ve endoskopik şiddeti ile ilişkiliydi. Bu nedenle IL-8 hastalık aktivitesi ile yakından ilişkili olması güvenilir bir biyobelirteç olarak görünmektedir. Ancak kolitin başlaması ve sürdürülmesindeki patojenik rolü daha fazla araştırılmalıdır. [32]

Tablo 2. 1. Sitokinlerin hastalığa bağlı immünolojik ve patolojik etkileri [32].

| | Crohn Hastalığı | Ülseratif Kolit |
|------|--|---|
| IL-1 | | İnflamasyon İndüksiyonu |
| IL-8 | (Muhtemelen) Patogenezde görülmemiş | Nötrofillerin göçü ve aktivasyonuna aracılık eder |

IL8, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin çok önemli bir efektör molekülüdür. Makrofaj, monosit, nötrofil, fibroblast, keratinosit, epitel hücreleri, endotel hücreleri gibi çeşitli hücreler tarafından salgılanır [33, 38]. IL-8 kemokin süper ailesinin üyesidir. Nötrofiller için kemoatraktan ve aktivatördür. Çeşitli inflamasyon hastalıklarının patogenezinde rol oynar. Nötrofil, fibroblast, monosit, lenfositlerin göçü ve kemotaksisinde rol oynar. İnflamasyonlu bölgelerde nötrofillerin göçü ve aktivasyonu ile kronik inflamatuvar hastalık olan periodontitisin patogenezinde yaşamsal rol oynar. IL-8(-845) polimorfizm allelleri T/C'dir. IL-8(-251) polimorfizm allelleri T/A'dır. Kromozomun 4q13-q21 lokasyonunda bulunur. [38-45] IL-8 proteini sağlıklı kontrol gruplara nazaran Crohn hastalığı ve inflamasyonlu kontrol grupların makroskopik olarak enfekte olmuş türlerinde önemli ölçüde artmıştır. IL-8 aynı zamanda inflamatuvar Crohn hastalığı örneklerinde de artmıştır, fakat ülseratif kolit hastalarında artmamıştır. Crohn hastalığı ve ülseratif kolitte makroskopik inflamasyonla mukozadaki IL-8 arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir [46]. IL-8(-251)A/T promotorundaki SNP'ler çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. Mide kanseri, meme kanseri, prostat kanseri, bronşiyolit, maküler dejenerasyon gibi. [47] İnflamasyonda IL-8'in rolü ile tutarlı olarak IL-8(-251) promotorundaki fonksiyonel SNP, kanser, periodontit, Helicobacter pylori gastrit dahil inflamatuvar şartlarında gösterilmiştir. [45]

Ayrıca IL-18 rs1946518 A> C, rs187238 G> C ve rs360718 A> C polimorfizmlerinin özellikle Asyalılar ve Afrikalılar arasında Crohn hastalığında duyarlılığa katkıda bulunduğunu göstermektedir. rs1946518 A> C, rs187238 G> C ve rs360718 A> C polimorfizmlerinin Crohn hastaları için araştırılması önemli bir bulgu sağlama potansiyelindedir.

Promotor bölgelerindeki fonksiyonel polimorfizmler transkripsiyon faktörlerinin afinitesini değiştirir. Bu yüzden kanser gelişiminin riski ile ilişkili olan inflamatuvar sitokinlerin mRNA ekspresyon seviyelerini değiştirir.

Önceki çalışmalarda IL-RN VNTR polimorfizminin kronik veya agresif olarak periodontite duyarlılığı ile ilişkisini araştırmak için meta analizler yapılmıştır. IL-RN VNTR polimorfizmi genel olarak popülasyonda kronik periodontitisin yüksek riski ile ilişkilendirildi. Bu meta analiz IL-RN VNTR polimorfizminin kronik periodontitis görülme riskinin artmasına, agresif periodontitiste azalmış riske neden olabileceğini göstermiştir [48].

2.10. Tezin Dayandığı Bulgular

Sonuç olarak Crohn hastalığı kronik bağırsak inflamasyon ve lezyonun bir otoimmün hastalık olarak karakterize edilir. Dünyadaki her yaşta ve etnik kökene sahip insanları etkileyebilir. Son zamandaki genom çapında yapılan çalışmalar, çeşitli varyantların ve Crohn hastalığına duyarlılığın önemli genetik ilişkilerini göstermiştir. Teşhis etkinliğini arttırmak ve spesifik immün sistem yollarını hedef alan ilaçlar geliştirmek için Crohn hastalığının patolojisinin ve altında yatan genetik etkileşimlerin anlaşılması çok önemlidir. [2].

Son yıllarda İBH'nin patogenezinin anlaşılmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bağırsak inflamasyonunun hücrel ve moleküler araçların keşfedilmesi, İBH hastalarına yarar sağlayan yeni terapilerin gelişmesine yol açmıştır. Çevresel, genetik, mikrobiyal faktörler bağışıklık sistemiyle etkileşime girer ve Crohn ve ülseratif kolitte tipik kronik bağırsak inflamasyondan sorumlu düzensiz immün yanıtla sonuçlanır [5]. Bugüne kadar genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, bir dizi gen ve mikroorganizma tanıma sisteminin, lenfosit aktivasyonu, sitokin sinyalleşmesi ve bağırsak epitelinin savunulması gibi patojenik mekanizmaları belirten yaklaşık 80 farklı Crohn hastalığına duyarlılık lokusu belirlenmesine yardımcı olmuştur. Bu nedenle, genetik ilişkilendirme çalışmaları,

Crohn hastalığı oluşumunda doğuştan gelen ve adaptifimmüntenin rolünü vurgulayan, hastalık için immünotogenez için önemli bir temel sağlar [2].



BÖLÜM III MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyaller ve örnekler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Ekler bölümünde Tablo 1’de sunulmuştur.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışma sürecinde kullanılan kimyasal maddeler Ekler bölümünde Tablo 2’te sunulmuştur.

3.1.3. Deney Grupları

Crohn hastası, ülseratif kolit ve kontrol DNA’lar üzerinde çalışılmıştır. Tüm örneklerden DNA izolasyonu yapılmıştır. 09.2017.-456 nolu Marmara Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul raporu ile Sayın Prof.Dr Tunç Akkoç ile işbirliği ile deney gruplarında araştırma yapılmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Kandan DNA izolasyonu

DNA izolasyonuna başlamadan önce izolasyon sırasında kullanılacak malzemeler, aletler ve çalışılacak ortam %70 Etanol ile silinmiştir. Kırmızı kan hücrelerini özütlemek üzere kullanılacak olan tampon çözeltiden 900 µl 1,5 ml steril mikrofüj tüpü içine konup üzerine çalışılacak olan kişinin kanından 300 µl eklenmiş ve 10 dakika beklenmiştir. Steril 1,5 ml mikrofüj tüpü içine 300 µl izopropanol konulmuştur. 10 dakika sonunda mikrofüjtüpü 13000rpm’de 20 saniye santrifüj edilmiş ve beyaz renkli pellet gözlemlenmiştir. Mikrofüj tüpü dibinde 10-20 µl kalana kadar kırmızı renkli üst sıvı atılıp pellet yok olana kadar 2500 devirde karıştırılmış, üzerine Hücre Lizis Etme Solüsyonundan 300 µl Protein Çökertme Solüsyonundan 100 µl eklenip 20 saniye 2500 devirde karıştırılmıştır, 13000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Şeffaf üst sıvı önceden hazırlanmış olan 300 µl izopropanol içeren mikrofüj tüpü aktarılıp genomik DNA iplikleri gözlemlenmiştir. Gözlemlenen DNA 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilip üst sıvı dökülüp üzerine 300 µl % 70 etanol eklenmiştir. Mikrofüj tüpü 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilip üst sıvı dökülüp mikrofüj tüpü ters olarak

zemin üzerine yere hafif eğimli olarak yerleştirilmiştir. 15 dakika sonra 100 µl DNA Tris-EDTA eklenip bir gece oda sıcaklığında beklenmiştir. Ertesi gün DNA +4 C de saklanır.

3.2.2. DNA'ların absorbanlarının ölçülmesi:

DNA'ları içinde çözdürdüğümüz Tris-EDTA'dan (TE) 1 µl alınıp nanodrop cihazına konur ve sıfırlanır. Absorbansı ölçülecek DNA'lardan 1µl konur ve 260-280 nm dalga boyunda absorban değerleri ölçülür.

3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin VDR polimorfizmine göre sahip oldukları alleleri belirlemek için yapılan PZR çalışmasında PZR karışımının içeriğini oluşturan nükleazfreewater, 2X mastermix, ForwardPrimer, ReversePrimer, çalışılacak kişinin genomik DNA'sından PZR karışımına eklenen miktarları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir. Her bir mikrofüj tüpü için 1 µl TaqI veya FokI enzimi konur. 12.5 µl mastermix her bir kuyucuk için hazırlanmış olur. PZR işlemi Tablo 3.1'e göre gerçekleştirilir.

Tablo 3. 1. PZR karışımının içeriği

| | Reaksiyon başına |
|-----------------------------------|------------------|
| Nükleaz serbest dH ₂ O | 9.5 µl |
| 2X Mastermix | 12.5 µl |
| ForwardPrimer | 1 µl |
| ReversePrimer | 1 µl |
| DNA | 1 µl |
| Toplam | 25 µl |

Her örnek için yukarıdaki tabloda gösterilen miktarlarda hazırlanan PZR tüpleri aşağıdaki programda PZR aleti içinde yürütülmüş ve program sonunda her kişinin VDR polimorfizmini gösteren gen bölgesi çoğaltılmıştır (Tablo 3.2.).

Tablo 3. 2. PZR koşulları

| | | |
|--|----------|-------|
| Denatürasyon sıcaklığı (başlangıç) | 94 °C | 5 dk |
| Denatürasyon sıcaklığı (35 siklus boyunca) | 94 °C | 30 sn |
| Annealing (Bağlanma) | 62-65 °C | 30 sn |
| Extention (Uzama) | 72 °C | 45 sn |
| Son uzama | 72 °C | 10 dk |
| | 4 °C | ∞ |

Farklı polimorfizmler için her bir primerin çalışma sıcaklıkları farklıdır. Bundan dolayı bağlanma sıcaklıkları gradient PZR yöntemiyle bulunur. ILRN (RNVNT) primerinin bağlanma sıcaklığı 50°C'dir (Tablo 3.3).

Tablo 3. 3. ILRN Primeri ile PZR Koşulları

| | | |
|--|-------|-------|
| Denatürasyon sıcaklığı (başlangıç) | 94 °C | 5 dk |
| Denatürasyon sıcaklığı (35 siklus boyunca) | 94 °C | 30 sn |
| Annealing (Bağlanma) | 50 °C | 30 sn |
| Extention (Uzama) | 72 °C | 45 sn |
| Son uzama | 72 °C | 10 dk |
| | 4 °C | ∞ |

Tablo 3. 4. IL-8 Primeri ile PZR Koşulları

| | | |
|---|-------|-------|
| Denatürasyon sıcaklığı (başlangıç) | 94 °C | 5 dk |
| Denatürasyon sıcaklığı (35siklus boyunca) | 94 °C | 30 sn |
| Annealing (Bağlanma) | 58 °C | 30 sn |
| Extention (Uzama) | 72 °C | 45 sn |
| Son uzama | 72 °C | 10 dk |
| | 4 °C | ∞ |

3.2.4. Restriksiyon enzim kesimi

PZR ile çoğaltılan gen bölgelerinde mutasyonun olduğu bölgeler restriksiyon enzimle kesilir. PZR karışımının içeriğini oluşturan nükleazfreewater, 10X Tango enzim tamponu, FokI 10 U/μl, PZR ürünlerinin karışımına eklenen miktarları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 3.5). Her bir enzim kesimi için hangi enzim ile kesim yapılacaksa kullanılan ürünler ve miktarlar farklıdır. Çalışılan diğer enzimler için de çözelti miktarları aşağıdaki tablolarda verilmiştir. PZR ürünlerinin ortalama miktarlarına göre değişiklik gösterebilir. Her bir enzimin kesim için çalışma sıcaklıkları farklıdır.

Tablo 3. 5. FokI enzim kesimi karışım çözeltisinin hazırlanması

| | Her bir reaksiyon için |
|-------------------------------------|------------------------|
| Nükleaz içermeyen dH ₂ O | 16,8µl |
| 10X Tango enzim tamponu | 3 µl |
| FokI 10 U/µl | 0,2µl |
| PZR ürünleri | 10 µl |
| Toplam | 30 µl |

Tablo 3. 6. TaqI enzim kesimi karışım çözeltisinin hazırlanması

| | Her bir reaksiyon için | |
|-------------------------------------|------------------------|-------|
| Nükleaz içermeyen dH ₂ O | 16,8µl | 17µl |
| Cut Smart enzim tamponu / 10X TaqI | 3 µl | 2µl |
| TaqI (NEB) RE /TaqI | 0,2µl | 1 µl |
| PZR ürünleri | 10 µl | 10 µl |
| Toplam | 30 µl | 30 µl |

Tablo 3. 7. MfeI enzim kesimi karışım çözeltisinin hazırlanması

| | Her bir reaksiyon için |
|-------------------------------------|------------------------|
| Nükleaz içermeyen dH ₂ O | 10µl |
| 10X enzim tamponu G | 2µl |
| MfeI | 1 µl |
| PZR ürünleri | 7µl |
| Toplam | 20 µl |

Tablo 3. 8. AseI enzim kesimi karışım çözeltisinin hazırlanması

| | Her bir reaksiyon için |
|-------------------------------------|------------------------|
| Nükleaz içermeyen dH ₂ O | 17µl |
| 10X fastdigest enzim tamponu | 2µl |
| Enzim fastdigest | 1 µl |
| PZR ürünleri | 10µl |
| Toplam | 30 µl |

3.2.5. Agaroz jel hazırlanması

PZR sonuçlarını görüntülemek için PZR ürünleri agaroz jelde yürütülür. 100ml TAE tampona 1 gr agaroz konur. Ağzı pamukla kapatılarak mikrodalgada ısıtılır. Az soğutulduktan sonra 3µl etidyum bromür konarak karıştırılır. Jel kasetine tarak geçirilerek hazırlanan jel kasete dökülmüştür. 1X TAE ile doldurulmuş tank içine donan jel konup tarak çıkartılmıştır. İlk kuyucuğa 3 µl 100 bp DNA marker konur. Diğer kuyucuklara PZR ürünleri 1 µl 6X DNA loadingle karıştırılarak konur. 85 voltta 45-50 dk yürütülür. Jel görüntüleme cihazında sonuçlar bakılır. Elde edilen

görüntülerdeki bantların uzunlukları DNA markerı ile karşılaştırılıp VDR polimorfizmine ait allelleri belirlenmiştir. Agaroz jelin hazırlanması istenilen yüzdelik orana göre değişir.

Tablo 3. 9. %1'lik Agaroz Jel içeriği

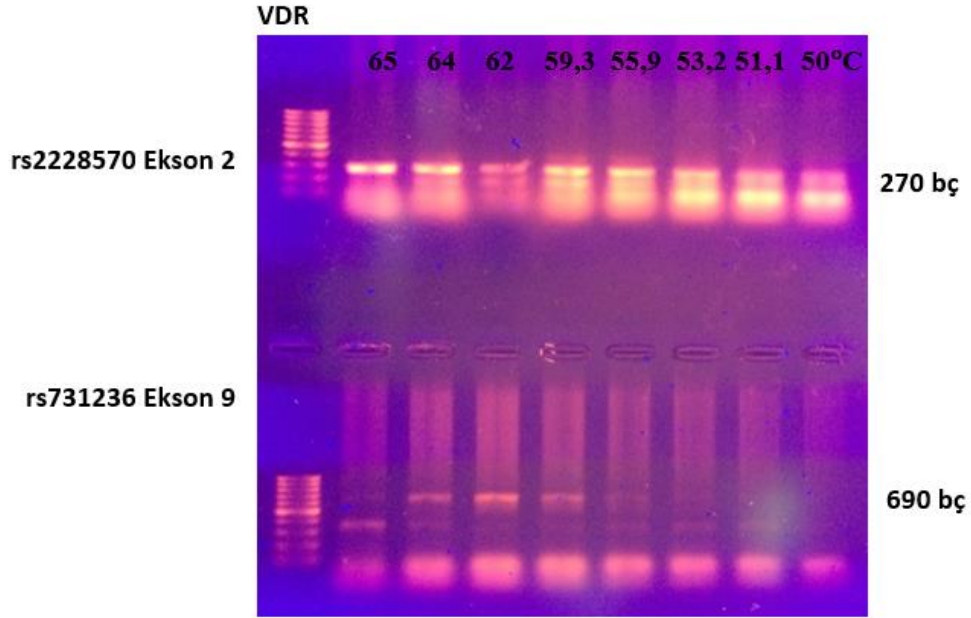
| | Jel |
|-----------------------|------------|
| Agaroz | 1 gr |
| 1X TAE | 100 ml |
| Etidyum Bromür | 3 µl |

3.2.6. İstatistiksel analiz:

Tez kapsamında ifade edilen polimorfizmler seçilen örneklerde Crohn hastalığı, ülseratif kolit ve sağlıklı bireylerin bulunduğu kontrol grubu ayrılmış, her grup içinde değerlendirilmiştir. Proje kapsamın SNP ile Crohn hastalığı arasındaki genetik ilişki GRAPHPAD programı aracılığı ile irdelenmiştir.

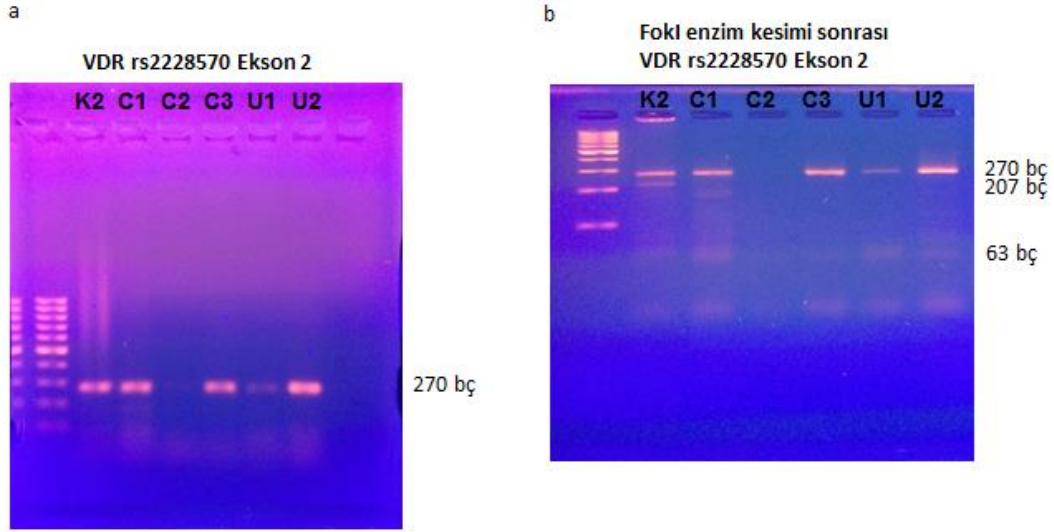
BÖLÜM IV SONUÇLAR

Vitamin D reseptörü (VDR) ile ilgili rs2228570 ve rs731236 polimorfizmlerinin kontrol, Crohn hastası ve ülseratif kolit hastalarında gösterilebilmesi amacı ile DNA izolasyonları tüm örneklerden gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.1. de yer aldığı üzere kontrol DNAsında VDR polimorfizminin gösterilebilmesine yönelik gradient PZR yöntemi ile PZR ürünleri elde edildi. VDR rs2228570 için 65°C, rs731236 için ise 62°C PZR siklusunda kullanılmak üzere (annealing) seçildi.



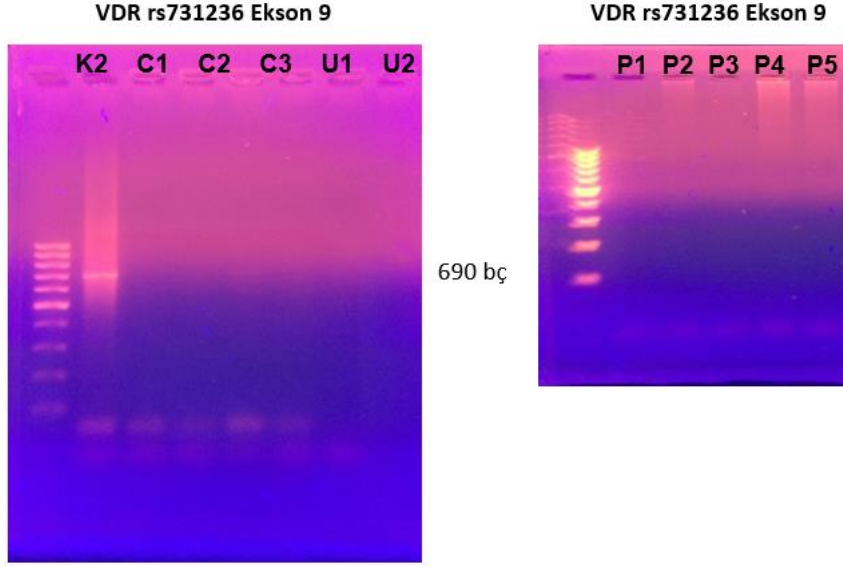
Şekil 4. 1. (a) Normal sağlıklı kontrolden (K1) alınan DNA örneğinde, gradient PZR sonucunda Vitamin D reseptörü (VDR) rs2228570 nolu polimorfizminin ekson 2’de C/T değişimi için gösterildi. Bu örnek için 65°C sıcaklığın uygun olduğuna karar verildi. (b) Ekson 9 da görülen VDR için rs731236 nolu polimorfizimde T/C değişimi TaqI enzimi ile kesim sonrasında değerlendirildi. 690 bç PZR ürünü elde edildi. Marker 100 bç. Gradient PZR sıcaklıkları sırası ile : A : 65.0, B : 64.0, C : 62.0, D : 59.3, E : 55.9, F : 53.2, G : 51.1, H : 50.0

Daha sonra örneklerde FokI enzimi ile kesim işlemi gerçekleştirildi (Şekil 4.2b). Bu aşamada, 270 bç uzunluğunda olan VDR rs2228570 PZR ürünü kesildi, 207 ve 63 bç'lik ürünler elde edildi.



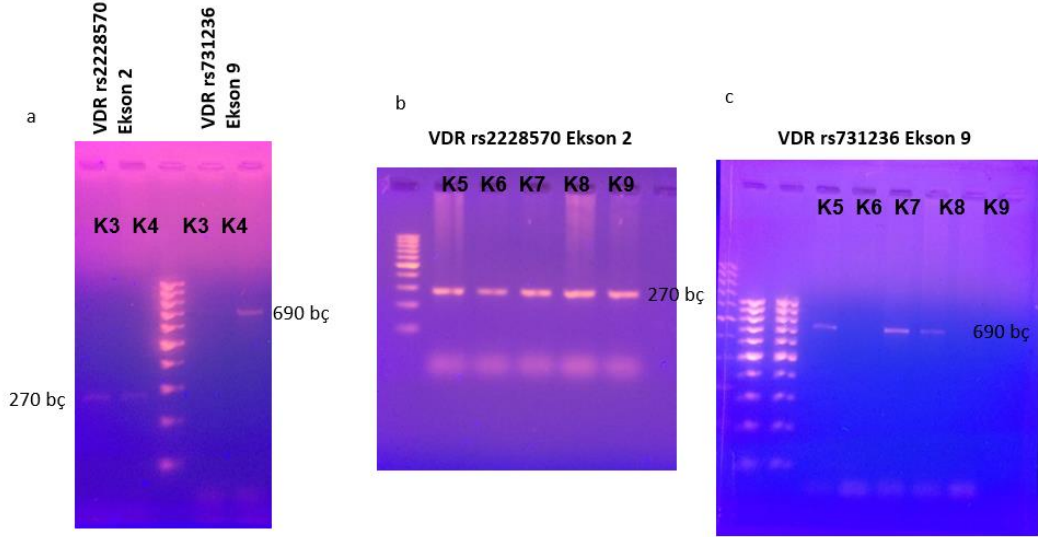
Şekil 4. 2. (a) VDR rs2228570 Ekson 2 için PZR ürünlerinden kontrol (K2), Crohn Hastaları (C1-3), ülseratif kolit hastaları (U1-2) için elde edilmiştir. (b) PZR ürünleri FokI enzimi ile kesilmiş ve 207, 63 bç'lik ürünler elde edilmiştir.

Farklı kontrol ve hasta örneklerinde VDR rs731236 PZR ürünü elde edilmesi amacı ile PZR işlemi gerçekleştirildi (Şekil 4.3.) PZR ürünü elde edilme sürecinde yaşanan zorluklar nedeni ile farklı bir hasta grubunun DNA örnekleri deney optimizasyonu için PZR işlemine tabi tutuldu. Prostat kanserli hastalarda da benzer şekilde rs731236 için PZR ürünü elde edilemedi.

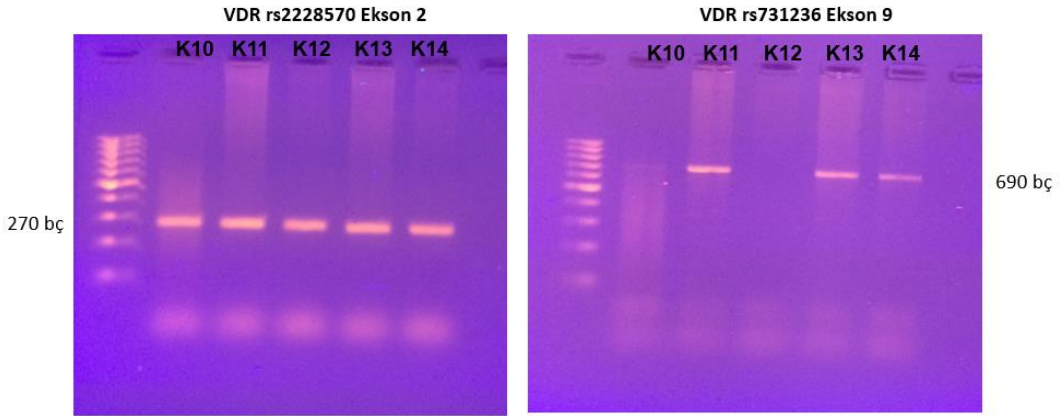


Şekil 4. 3. (a) VDR rs731236 Ekson 9 polimorfiziminin gösterilmesi için PZR işlemi kontrol (K2), Crohn Hastaları (C1-3), ülseratif kolit hastaları (U1-2) için gerçekleştirildi. (b) a sonucunda görülen PZR ürünlerinin elde edilememesi nedeni ile diğer hastalıklara ait DNA örnekleri PZR işleminin kontrolü için denendi. P1-5 prostat kanseri hastaları. Marker 100 bç.

Şekil 4.4-5'te gösterildiği üzere farklı kontrol DNAları sağlıklı kişilerden alındı ve PZR optimizasyon işlemlerine devam edildi. Hem Ekson2 hem de Ekson 9 için VDR PZR ürünleri 12 farklı sağlıklı gönüllüden alınan DNA izolasyonu örneklerinde elde edildi. Pozitif sonuçlar herbir örnekleme için 270 ve 690 bç PZR ürünü ile gösterilmiştir.

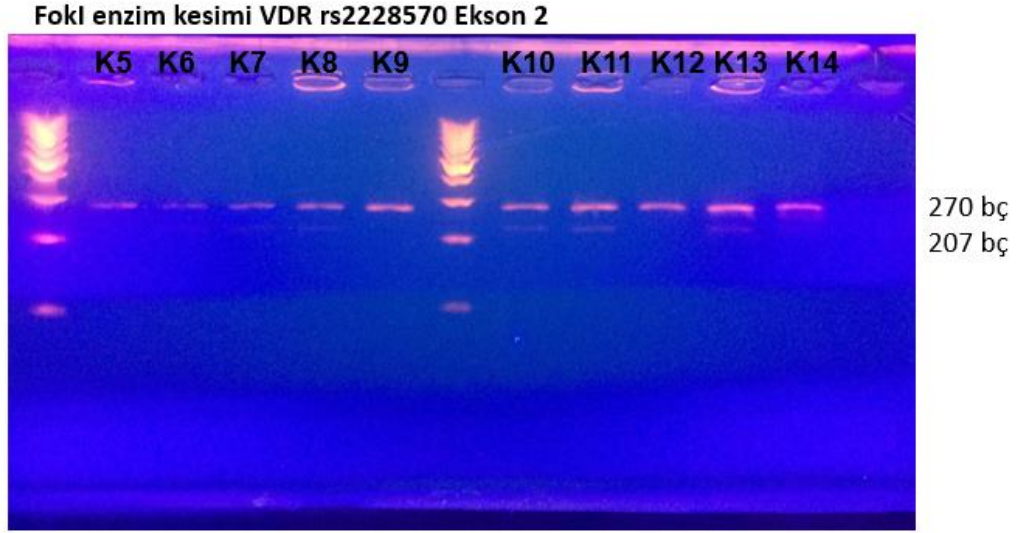


Şekil 4. 4. (a) İki farklı (K3-4) normal sağlıklı kontrolden alınan DNA örneklerinde, Vitamin D reseptörü (VDR) Ekson 2 rs2228570 nolu polimorfizmi ve VDR Ekson 9 rs731236 için PZR ürünleri elde edildi. Ekson 2 için 270 ve ekson 9 için 690 bç PZR ürünü elde edildi. (b) K5-9 kontrol DNAları kullanılarak VDR Ekson 2 rs2228570 için PZR ürünleri elde edildi. (c) K5-9 kontrol DNAları kullanılarak VDR Ekson 9 rs731236 için PZR ürünleri elde edildi. Marker 100 bç.



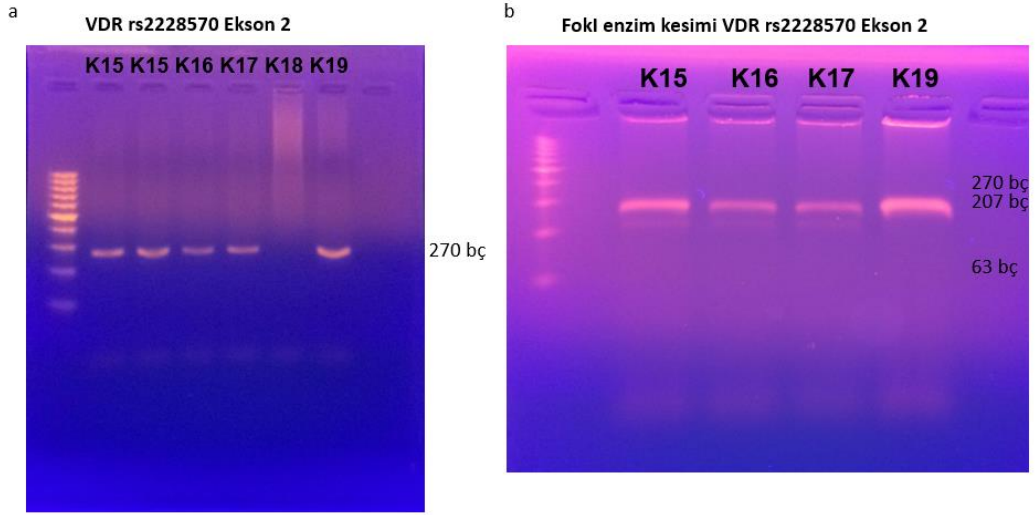
Şekil 4. 5. (a) K10-14 kontrol DNAları kullanılarak VDR Ekson 2 rs2228570 için PZR ürünleri elde edildi. (b) K10-14 kontrol DNAları kullanılarak VDR Ekson 9 rs731236 için PZR ürünleri elde edildi. Marker 100 bç.

Şekil 4.6'da PZR optimizasyonu pozitif olarak değerlendirilen kontrol sağlıklı gönüllülerden elde edilen DNAlar ile gerçekleştirilen PZR ürünleri FokI enzimi ile kesildi.



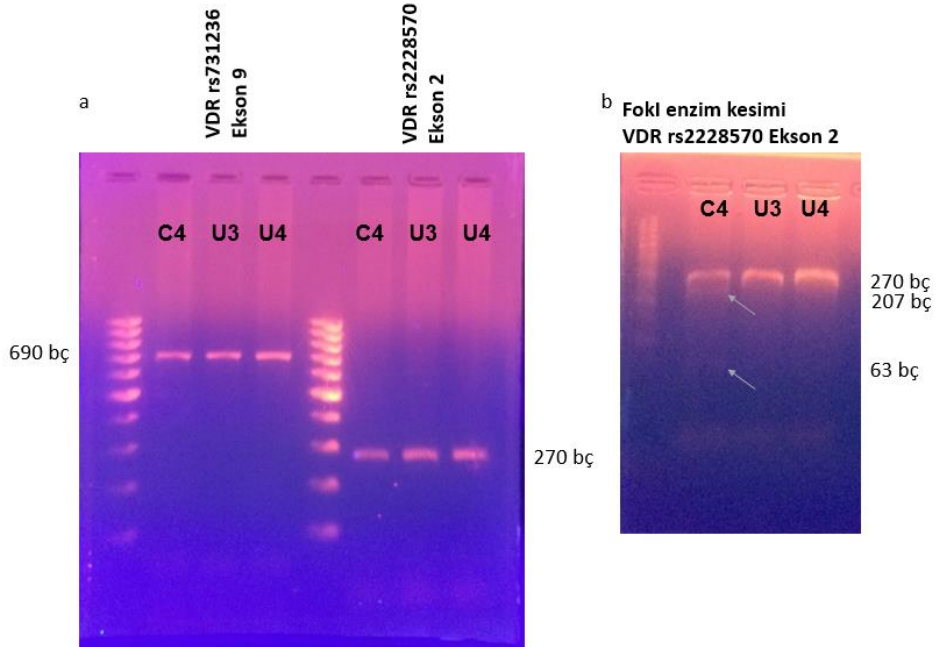
Şekil 4. 6. FokI enzim kesimi K5-14 kontrol DNA örneklerinden elde edilen PZR ürünleri ile gerçekleştirildi. 270 bç: kesilmemiş ürün, 207 ve 63 bç kesilmiş ürün. Marker 100 bç.

Kontrol örneklerinin sayısı arttırıldı. VDR rs2228570 Ekson 2 için PZR ürünü ve FokI enzimi ile kesim işlemi gerçekleştirildi (Şekil 4.7.). Böylece 19 farklı sağlıklı kontrolden elde edilen DNA örneklerinde VDR rs2228570 polimorfizmi belirlenmiş oldu.

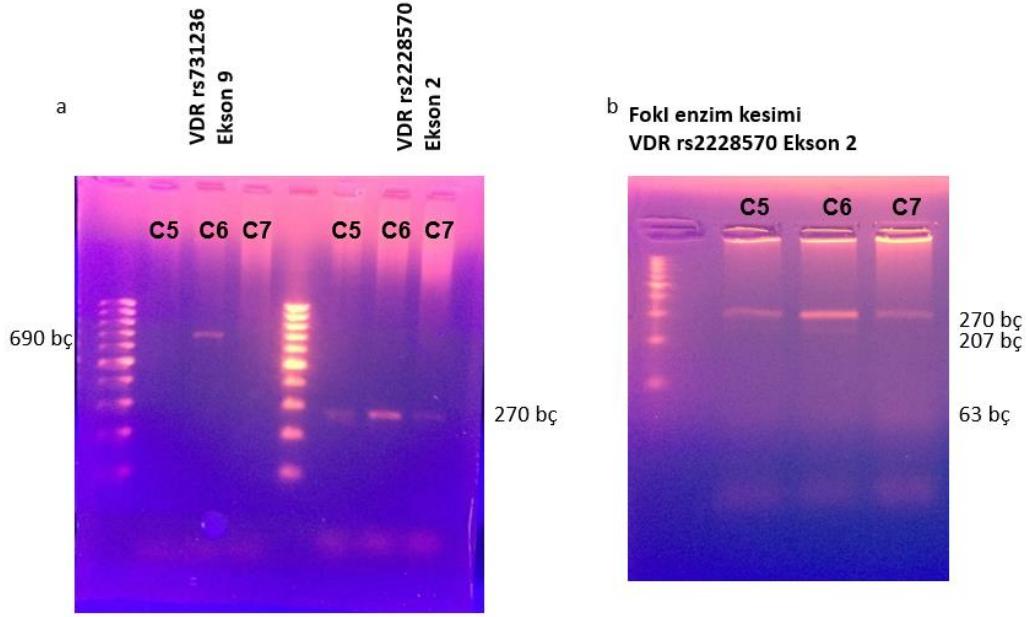


Şekil 4. 7. (a) Kontrol (K15-19) DNAları kullanılarak VDR Ekson 2 rs2228570 için PZR ürünleri elde edildi. (b) K15-19 FokI enzim ile kesildi. 270 bç: kesilmemiş ürün, 207 ve 63 bç kesilmiş ürün. Marker 100 bç.

Şekil 4.8-9.'de Crohn ve ülseratif kolit hastalarında benzer işlemler tekrar edildi. Böylece 7 farklı Crohn ve 4 farklı ülseratif kolit hastasında VDR rs2228570 polimorfizmi belirlenmiş oldu.

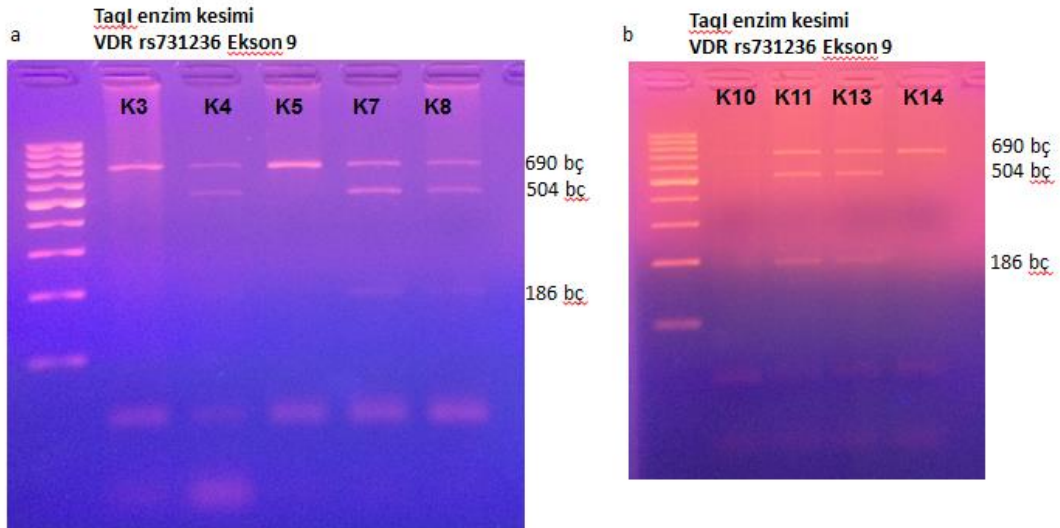


Şekil 4. 8. (a) Crohn (C4) ve ülseratif kolit (U3-4) hastalarının DNAları kullanılarak VDR Ekson 9 rs731236 VDR Ekson 2 rs2228570 için PZR ürünleri elde edildi. (b) FokI enzim kesimi C4 ve U3-4 DNA örneklerinden elde edilen PZR ürünleri ile gerçekleştirildi. 270 bç: kesilmemiş ürün, 207 ve 63 bç kesilmiş ürün. Marker 100 bç.



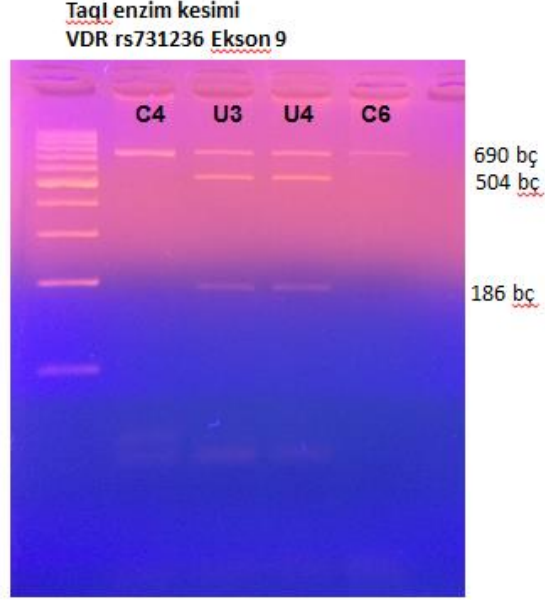
Şekil 4. 9. (a) Crohn (C5-7) hastalarının DNAları kullanılarak VDR Ekson 9 rs731236 VDR Ekson 2 rs2228570 için PZR ürünleri elde edildi. (b) FokI enzim kesimi (C5-7) örneklerinden elde edilen PZR ürünleri ile gerçekleştirildi. Marker 100bç.

Şekil 4.10'da Kontrol DNA grubuna benzer işlemler devam edildi. Kontrol DNAları kullanılarak PZR ürünleri elde edilmiştir. PZR ürünleri ile Taq enzimiyle kesim yapılmıştır. Taq VDR rs731236 ekson 9 için polimorfizmleri belirlenmiş oldu.



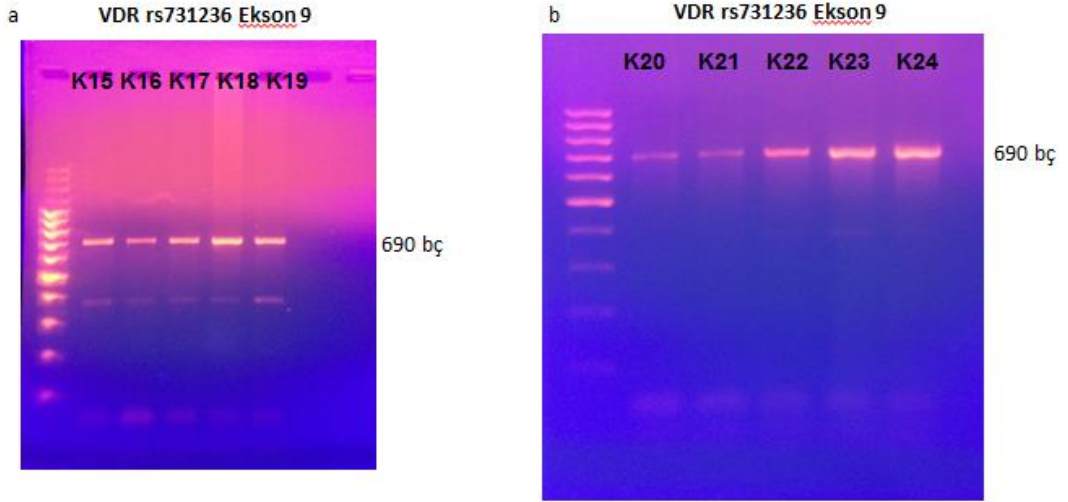
Şekil 4. 10. (a) Kontrol (K3-8) DNAlar VDR primeriyle PZR ürünleri elde edildikten sonra Taq enzimiyle allelleri belirlemek için kesim yapılmıştır. Enzim kesimi olmadan önce allel uzunluğu:690 bç, kesim olduktan sonra 504/186 bç. (b) Kontrol (K10,11,13,14) DNAlar VDR primeriyle Taq için PZR yapıldıktan sonra Taq enzimiyle allelleri belirlemek için kesim yapılmıştır. Enzim kesimi olmadan önce allel uzunluğu:690 bç, kesim olduktan sonra 504/186 bç.

Şekil 4.11’de Crohn ve Ülseratif kolit hastalarının VDR Ekson 9 rs731236 için polimorfizmleri belirlenmiş oldu. Ancak Crohn hastalarında kesim gerçekleşmemiştir. Ülseratif kolit hastalarında kesim gerçekleşmiştir.



Şekil 4. 11. Hasta (C4,C6/U3,U4) DNAları ile VDR Ekson 9 rs731236 için PZR yapıldıktan sonra allelleri belirlemek için Taq enzimiyle kesim yapılmıştır. Enzim kesimi olmadan önce allel uzunluğu: 690 bç, kesim olduktan sonra 504/186 bç.

Şekil 4.12’de Kontrol DNA grubuna benzer işlemler devam edildi. Kontrol DNAları kullanılarak PCR ürünleri elde edilmiştir. Taq VDR rs731236 ekson 9 için PCR ürünleri elde edildi. PCR uzunluğu 690 bç olarak belirlendi.



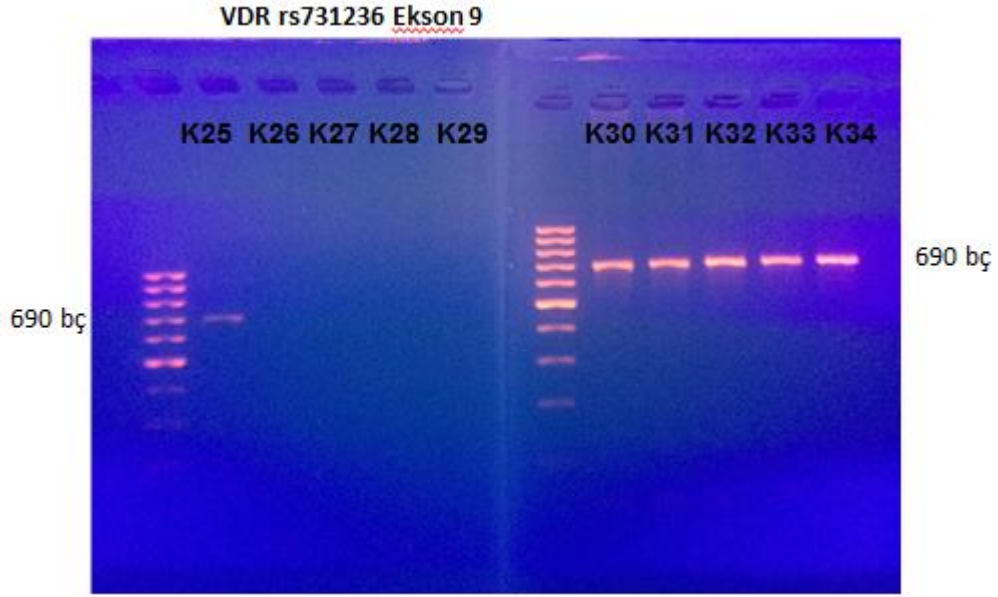
Şekil 4. 12. (a) ve (b) Kontrol (K15-24) DNAları kullanılarak VDR Ekson 9 rs731236 için PZR ürünleri elde edildi. Marker 100 bç.

Kontrol DNAları kullanılarak elde edilen PZR ürünleri ile TaqI enzimiyle kesim yapılmıştır(Şekil 4.13). Taq VDR rs731236 ekson 9 için polimorfizmleri belirlenmiş oldu.



Şekil 4. 13. Kontrol (K15-24) DNAları ile VDR Taq PZR yapıldıktan sonra enzim kesimi yapılmıştır. VDR Ekson9 rs731236 polimorfizi belirlenmiş oldu. Enzim kesimi olmadan önce allel uzunluğu:690 bç, kesim olduktan sonra 504/186 bç.

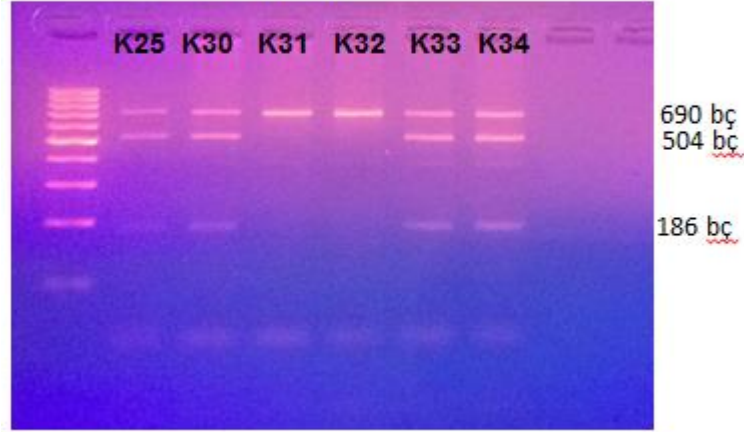
Şekil 4.14’de Kontrol DNAların sayısı artırıldı. Kontrol DNA grubuna benzer işlemler devam edildi. Kontrol DNAları kullanılarak PZR ürünleri elde edilmiştir. Taq VDR rs731236 ekson 9 için polimorfizmleri belirlenmiş oldu. Bazı kontrol DNAlarında PZR sonuç vermemiştir. Bundan dolayı bu Kontrol DNAları ile kesim yapılamamıştır.



Şekil 4. 14. Kontrol (K25,K30-34) DNAları kullanılarak VDR Ekson 9 rs731236 için PZR ürünleri elde edildi. (K26-29) çeşitli nedenlerden ötürü sonuç vermedi. Marker 100 bç.

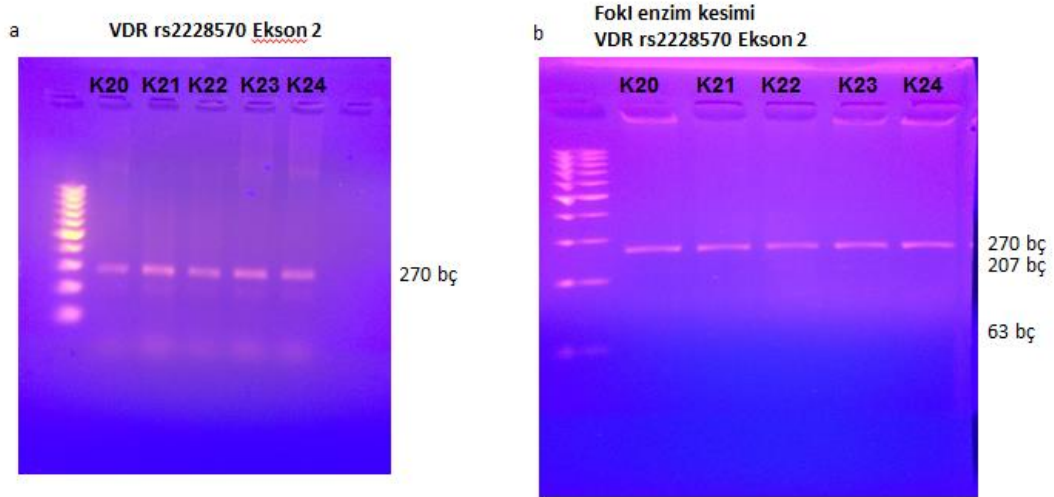
Şekil 4.15’de Kontrol DNAları kullanılarak elde edilen PZR ürünleri ile TaqI enzimiyle kesim yapılmıştır. Taq VDR rs731236 ekson 9 için polimorfizmleri belirlenmiş oldu.

TaqI enzim kesimi
VDR rs731236 Ekson 9



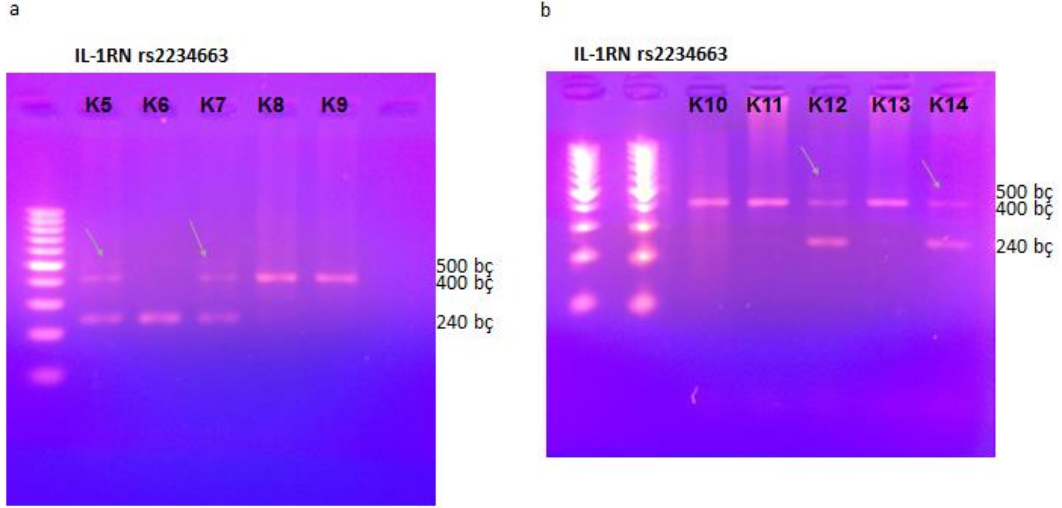
Şekil 4. 15. Kontrol (K25/K30-34) DNAları kullanılarak TaqI ile kesim yapıldı. VDR Ekson 9 rs731236 için polimorfizm belirlendi. Marker 100 bç. Enzim kesimi olmadan önce allel uzunluğu:690 bç, kesim olduktan sonra 504/186 bç.

Kontrol örneklerinin sayısı artırıldı. VDR rs2228570 Ekson 2 için PZR ürünü ve FokI enzimi ile kesim işlemi gerçekleştirildi (Şekil 4.16.). Kontrol DNAları kullanılarak PZR ürünleri elde edilmiştir. FokI VDR Ekson 2 rs2228570 için polimorfizmleri belirlenmiş oldu.



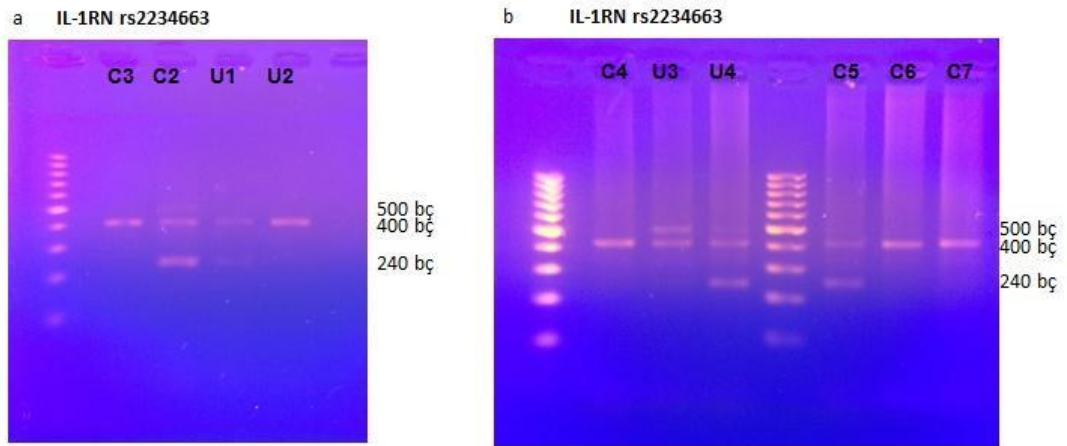
Şekil 4. 16. (a) Kontrol (K20-24) DNAları kullanılarak VDR Ekson 2 rs2228570 için PZR ürünleri elde edildi. (b) K(20-24) FokI enzim ile kesildi. 270 bç: kesilmemiş ürün, 207 ve 63 bç kesilmiş ürün. Marker 100 bç.

Şekil 4.17 ve 4.19-20'de Kontrol DNAları kullanarak IL-1RN rs2234663 nolupolimorfizmi için PZR ürünleri elde edildi. PZR ürünü elde edilme sürecinde yaşanan zorluklar nedeni ile farklı primerleri DNA örnekleriyle deney optimizasyonu için PZR işleme tabi tutuldu. IL-1RN rs2234663 için her bir örneklem için 150-600 bç PZR ürünleri elde edilmiştir.

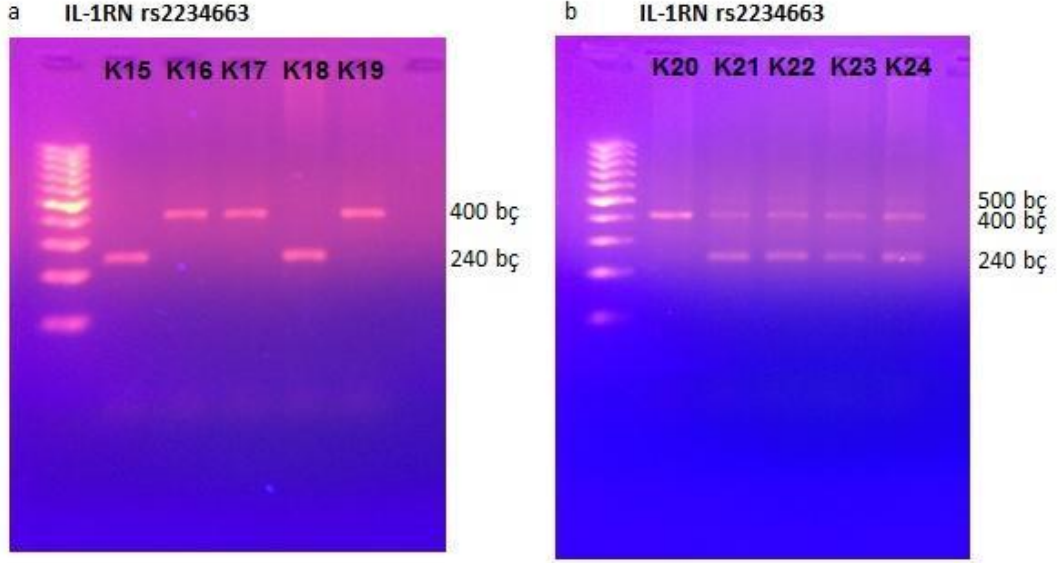


Şekil 4. 17. (a) ve (b) IL-1RN rs2234663 için PZR ürünlerinden kontrol (K5-14) için elde edilmiştir. PZR uzunluğu 150-600 bç'dir.

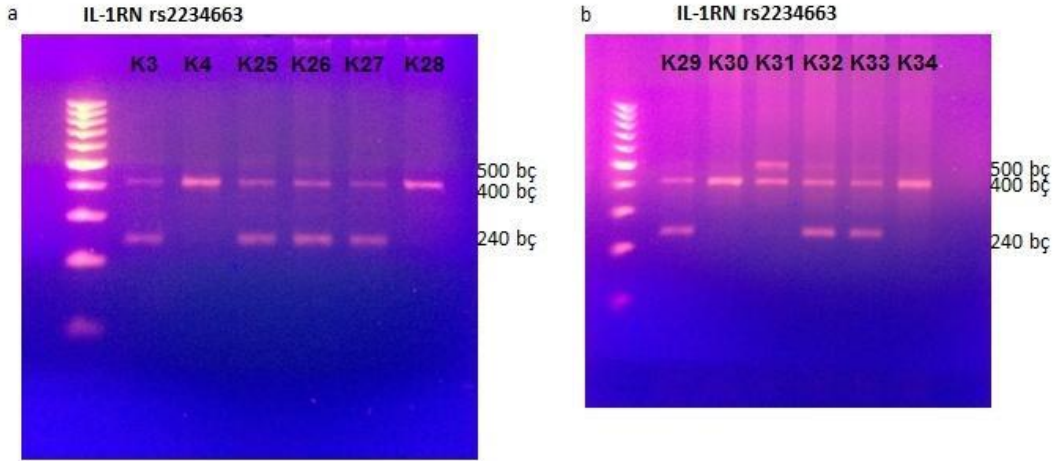
Şekil 4.18'de Crohn ve ülseratif kolit hastarının DNAları kullanılarak IL-1RN rs2234663 için PZR ürünleri elde edilmiştir. PZR ürünlerinin uzunlukları 150 ile 600 bç arasında değişiklik göstermektedir.



Şekil 4. 18. (a) ve (b) Crohn (C2-7) hastaları ve ülseratif kolit (U1-4) hastalarının DNA'ları kullanılarak IL-1RN rs2234663 için PZR ürünleri elde edilmiştir. PZR uzunluğu 150-600 bç'dir.



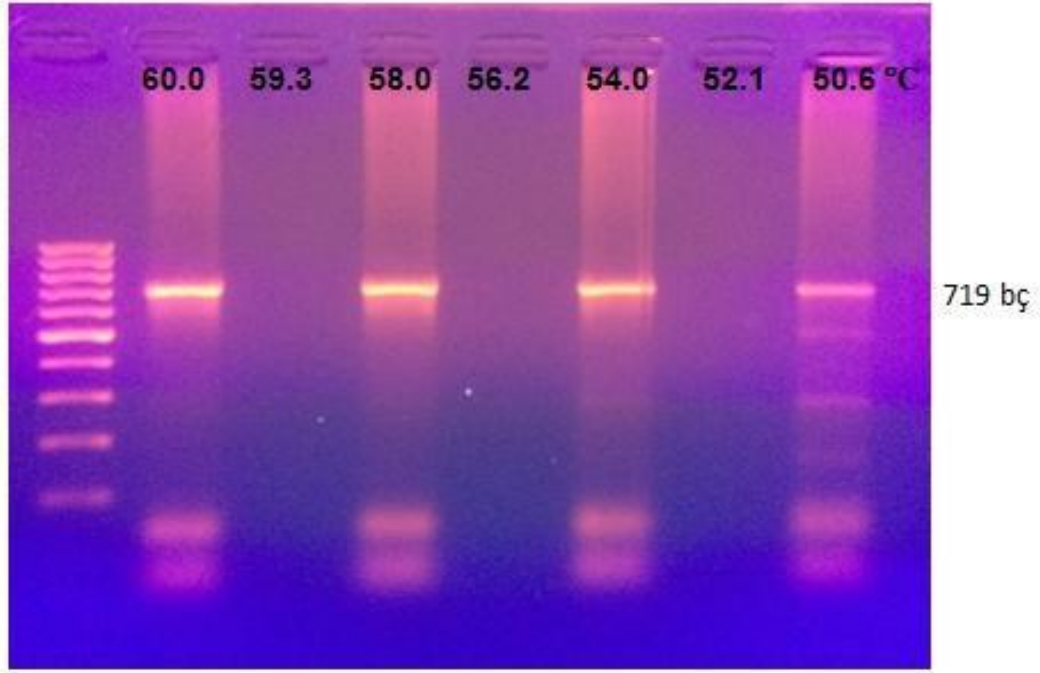
Şekil 4. 19. (a) ve (b) Kontrol (K15-24) gruplarının DNAları kullanılarak IL-1RN rs2234663 için PZR ürünleri elde edilmiştir. PZR uzunluğu 150-600 bç'dir.



Şekil 4. 20. (a) Kontrol (K3-4 ve K25-28) gruplarının DNAları kullanılarak IL-1RN rs2234663 için PZR ürünleri elde edilmiştir. (b) Kontrol (K29-34) DNAları kullanılarak IL-1RN rs2234663 için PZR ürünleri elde edilmiştir. PZR uzunluğu 150-600 bç

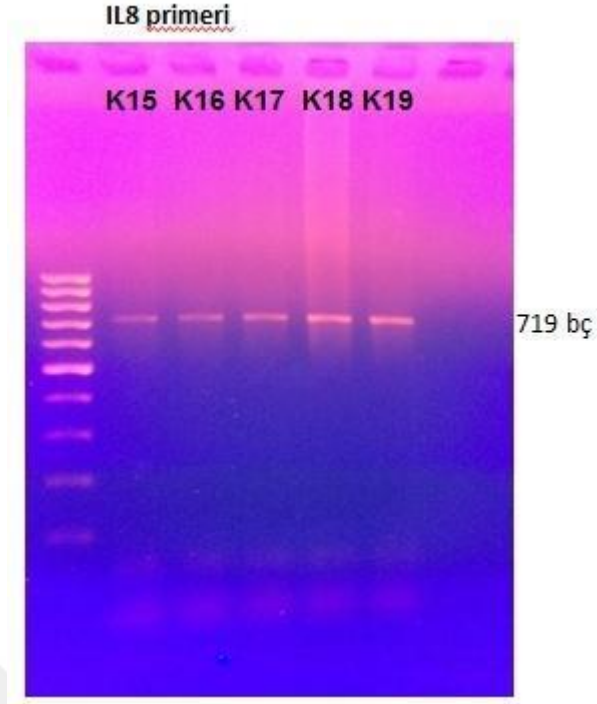
İnterlökin (IL8) ile ilgili rs4073 ve rs2227532 polimorfizmlerinin kontrol, Crohn hastası ve ülseratif kolit hastalarında gösterilebilmesi amacı kontrol DNA ile gradient PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.21. de yer aldığı üzere kontrol DNAsında IL8 polimorfizminin gösterilebilmesine yönelik gradient PZR yöntemi ile PZR ürünleri elde edildi. IL8 rs4073 ve rs2227532 için 58°C PZR siklusunda kullanılmak üzere (annealing) seçildi.

IL8 primeri rs4073 ve rs2227532

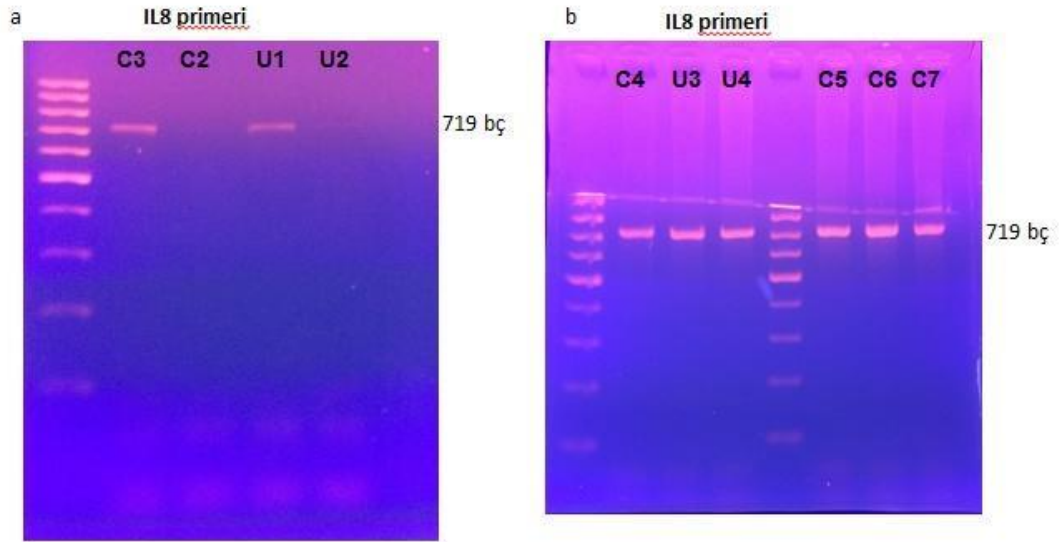


Şekil 4. 21. IL8 primeri ile gerçekleştirilen PZR işleminde K1 Kontrol DNA kullanılarak gradient PZR yapıldı. Gradient PCR sonucunda IL8 primeri (-251) rs4073 nolu polimorfizminin A/T değişimi için gösterildi ve IL8 (-845) rs2227532 nolupolimorfizminin T/C değişimi için gösterildi. Bu örnek için 58°C sıcaklığın uygun olduğuna karar verildi. 719 bç PZR ürünü elde edildi. Marker 100 bç. Gradient PZR sıcaklıkları sırası ile : A : 60.0, B : 59.3, C : 58.0, D : 56.2, E : 54.0,F : 52.1, G : 50.6, H : 50.0.

Farklı kontrol ve hasta örneklerinde IL8 rs4073 ve rs2227532 PCR ürünü elde edilmesi amacı ile PZR işlemi gerçekleştirildi (Şekil 4.22-4.23)

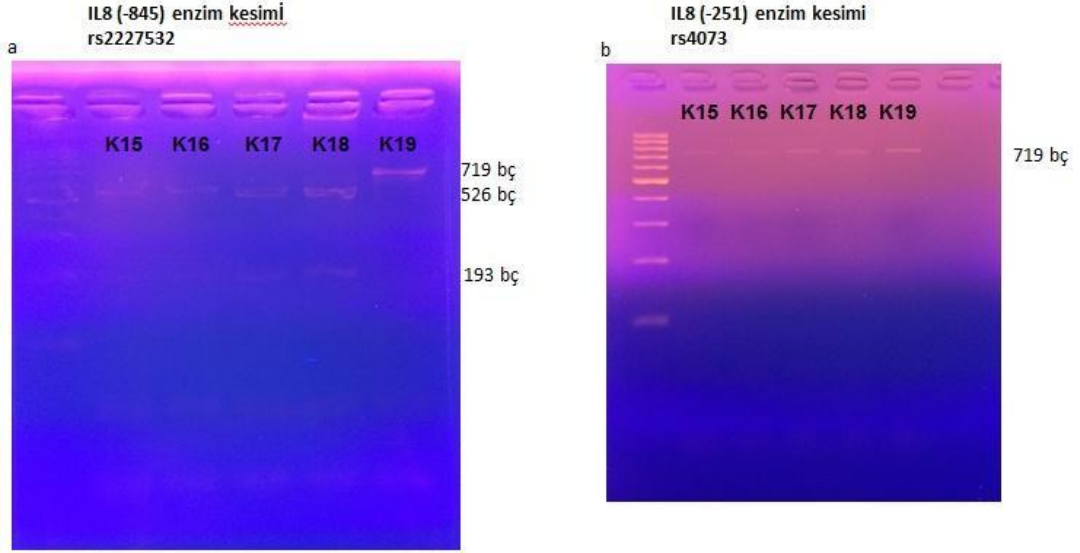


Şekil 4. 22. Kontrol (K15-19) DNAları kullanılarak IL8 (-251) rs4073 ve IL8 (-845) rs2227532 nolu polimorfizmi için PZR ürünleri elde edilmiştir. İkisi için de 719 bç PZR ürünü elde edildi. Marker 100 bç.



Şekil 4. 23. (a) ve (b) Hasta (C2-7, U1-4) DNAlarını kullanarak IL8 polimorfizmleri belirlemek için PZR yapıldı. PZR ürünleri 719 bç'dir. Marker 100 bç.

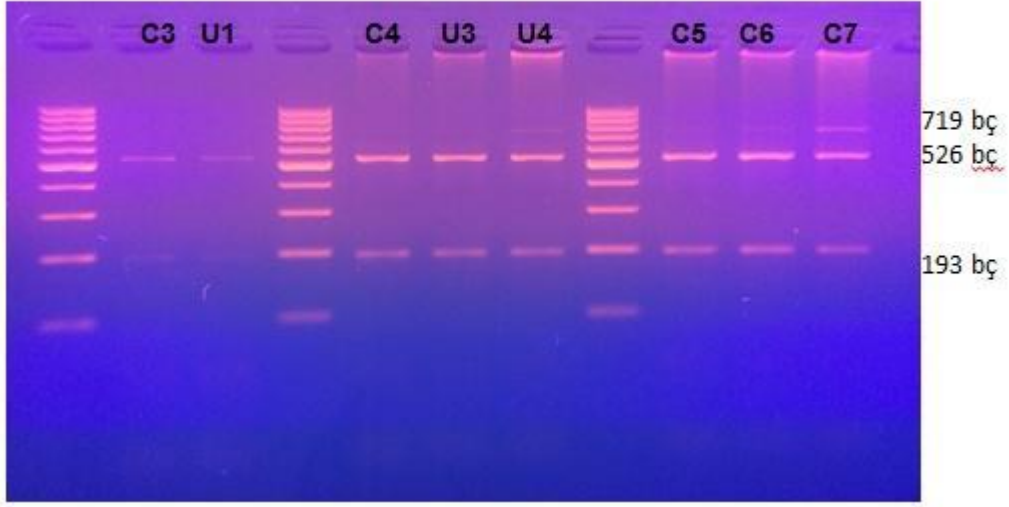
Şekil 4.24.(a)'da Kontrol DNAları kullanılarak elde edilen PZR ürünleri ile IL8(-845) için AseI ile kesim yapılmıştır. IL8 (-845) rs2227532 için polimorfizmleri belirlenmiş oldu. Şekil 4.24.(b)'de IL8 (-251) için MfeI ile kesim yapılmıştır. IL8(-251)rs4073 için polimorfizmleri belirlenmiş oldu.



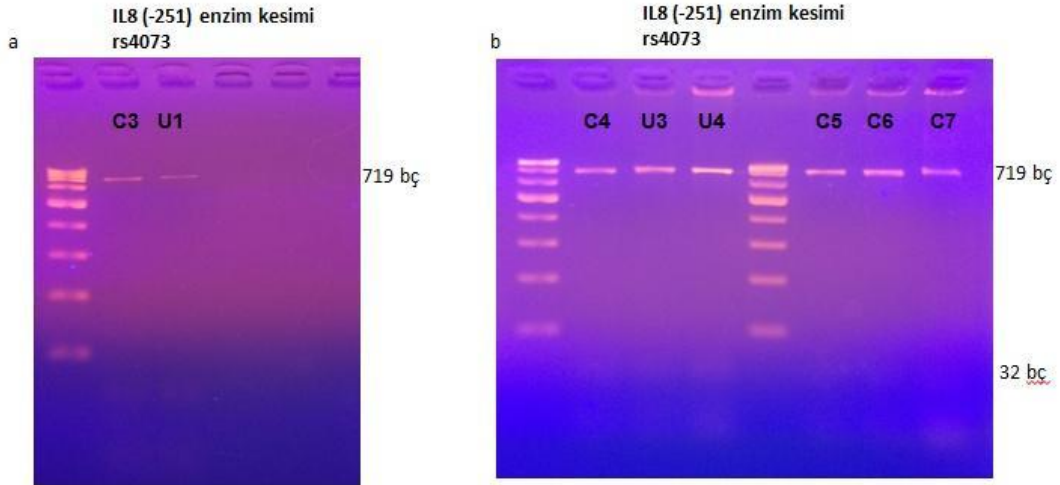
Şekil 4. 24. (a) Kontrol (K15-19) DNAları kullanarak IL8 (-845) rs2227532 polimorfizminin belirlenmesi için AseI Fast Digest ile enzim kesimi yapıldı. Sadece tek bir kontrol DNA'da kesim olmadığı gözlenmiştir. Kesim olmadan önce allel uzunluğu Allel C:719 bç, kesim olduktan sonra allel uzunlukları Allel T:526/193 bç. Marker 100bç. (b) Kontrol (K15-19) DNAları kullanarak IL8 (-251) rs4073 polimorfizminin belirlenmesi için MfeI ile enzim kesimi yapıldı. Ancak kesim olmadığı gözlenmiştir. Enzim Kesimi olmadan önce allel uzunluğu Allel T:719 bç. AllelA:687, 32 bç

Crohn ve ülseratif kolit hasta DNAları kullanılarak elde edilen PZR ürünleri ile IL8 (-845) rs2227532 için AseI ile kesim yapılmıştır. IL8 (-845) rs2227532 için polimorfizmleri belirlenmiş oldu(Şekil 4.25.). Crohn ve ülseratif kolit hasta DNAları kullanılarak elde edilen PZR ürünleri ile IL8 (-251) rs4073 için MfeI ile kesim yapılmıştır. IL8 (-251) rs4073 için polimorfizmleri belirlenmiş oldu(Şekil 4.26.). Böylece toplamda IL8 polimorfizmleri 8 hasta DNAları ve 5 kontrol DNAlarında belirlenmiş oldu.

IL8 (-845) enzim kesimi
rs2227532



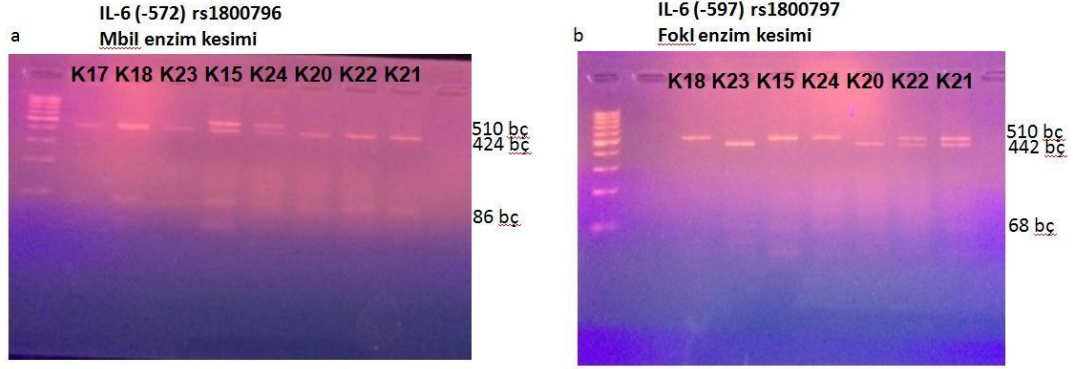
Şekil 4. 25. Hasta (C3-7/U1,U3-4) DNAları kullanarak IL8 (-845) rs2227532 polimorfizminin belirlenmesi için AseI FastDigest ile enzim kesimi yapıldı. PZR ürünlerinin kesim olmadan önce allel C uzunluğu:719 bç, kesim olduktan sonra Allel T:526, 193 bç. Marker 100bç.



Şekil 4. 26. (a) Hasta (C3,U1) DNAları kullanarak IL8 (-251) rs4073 polimorfizminin belirlenmesi için MfeI ile enzim kesimi yapıldı. Ancak kesim sonucu çıkmamıştır. Kesim olmadan önce allel T:719 bç, kesim olduktan sonra allel A:687,32 bç. Marker 100bç. (b) Hasta (C4-7,U3-4) DNAları kullanarak IL8 (-251) rs4073 polimorfizminin belirlenmesi için MfeI ile enzim kesimi yapıldı. Ancak kesim olmadığı gözlenmiştir. Enzim Kesimi olmadan önce allel T:719 bç. Allel A:687, 32 bç.

Şekil 4.27.'de yer aldığı üzere kontrol DNAsında IL-6 polimorfizminin gösterilebilmesine yönelik elde edilen PZR ürünleri ile kesim yapılmıştır. IL-6 (-572) rs1800796 nolupolimorfizminin C/G değişimi ve IL-6 (-597) rs1800797 nolupolimorfizminin A/G değişimini belirlemek için PCR ürünleriyle enzim kesimi

yapıldı. IL-6 (-572) rs1800796 nolu polimorfizmi için MbiI enzimiyle, IL-6 (-597) rs1800797 nolu polimorfizmi için FokI enzimiyle alleleri belirlemek için kesim yapılmıştır.



Şekil 4. 27. (a) ve (b) Kontrol DNAları kullanılarak IL-6 (-572) rs1800796 nolu polimorfizminin C/G değişimi ve IL-6 (-597) rs1800797 nolu polimorfizminin A/G değişimini belirlemek için PZR ürünleriyle enzim kesimi yapıldı. (a) Kontrol DNAlardan elde edilen PZR ürünleriyle MbiI enzim kesim yapıldı. Alleller = IL-6 (-572 C/G). Kesim olduktan sonraki uzunlukları Allel C= 424, 86 bp, Allel G= 510 bp. (b) Kontrol DNAlardan elde edilen PZR ürünleriyle FokI enzim kesim yapıldı. Alleller = IL-6 (-597 A/G). Kesim olduktan sonraki uzunlukları Allel A = 442, 68 bp, Allel G = 510 bp.

Tablo 4. 1. Kontrol, Crohn hastaları ve ülseratif hastalarından elde edilen örneklerde VDR, IL-8, IL-1RN ve IL-6 için polimorfizmlerin gösterimi.

| | VDR | | IL-8 | | IL-1RN | IL-6 | |
|------------------------|-----------|----------|--------|-----------|---|-----------|------------|
| | rs2228570 | rs731236 | rs4073 | rs2227532 | rs2234663 | rs1800796 | rs1800797 |
| Alleller | C/T | T/C | A/T | T/C | Allel1(4*),Allel2(2*),Allel3(5*),Allel4(3*),Allel5(6*),Allel6(1*) | C/G | A/G |
| Kontrol | 9 | 15 | -/TT | 4/TT, CC | Allel1(4*),Allel2(2*), 32 kişi | 8/CC,GC | 3/GG,AA,GA |
| Crohn hastası | 1 | - | -/TT | 5/TT,CTT | Allel1(4*),Allel2(2*), 6 kişi | | |
| Ülseratif kolit | - | 2 | -/TT | 3/TT | Allel1(4*),Allel2(2*), Allel3(5*) 4 kişi | | |

Tablo 4. 2. Kullanılan kontrol, Crohn Hastaları ve ülseratif kolit hastalarının sayısı

| | Cinsiyet | | Toplam |
|------------------------|----------|-------|--------|
| | Kadın | Erkek | |
| Kontrol | 4 | 11 | 34 |
| Crohn hastası | 4 | 3 | 7 |
| Ülseratif kolit | 3 | 1 | 4 |

BÖLÜM V TARTIŞMA

Crohn hastalarında vitamin D seviyelerinin az olduğu ve bu durumda hastalığın kötü seyrine neden olduğu çeşitli meta analizlerde gösterilmiştir. Araştırmalar, inflamatuvar bağırsak hastalığı olan bireylerde D vitamini eksikliğine sık rastlandığını göstermektedir. D vitamininin etkinliği sadece kalsiyum homeostazisini düzenleyerek kemik gelişiminde sınırlı olmayıp, aynı zamanda proapoptotik, antiinflamatuvar ve immün-modülatuar özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir. VDR ve vitamin D eksikliği veya yetersizliği durumunda immün ve inflamasyon yanıtları CD hastalığı patogenezine yol açabilir [9]. VDR gen polimorfizmi popülasyona göre farklılık gösteren, birçok hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu çalışmamızda VDR geni TaqI rs731236 ekson9, FokI rs2228570 ekson2 polimorfizmlerini Crohn ve ülseratif kolit hastalarında belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. VDR gen polimorfizm üzerinde yapılan çalışmalar, analiz edilen hasta grupları ve popülasyonlarda farklı sonuçlar vermiştir [49].

İnflamasyon bağırsak hastalıkları ve osteoporozun her ikisinde etiyolojisi karmaşıktır. İnflamasyon bağırsak hastalığının patogenezinde ve azalmış kemik kütlesinde VDR geni yer alır [49]. Crohn hastalığı olan hastalarda osteoporoz önemli bir hastalık nedenidir. Azalan kemik mineral yoğunluğunun patogenezi çok faktörlüdür. Örneğin VDR polimorfizmleri ve osteoporozlu hastalar arasında görülen yüksek ilişki, hastalıkların patogenezi ve hedef polimorfizmlerin tanımlanmasının anlamlı olduğunu göstermektedir. Literatürdeki bir başka çalışmada ise Crohn hastalarında kemik mineral yoğunluğu ve VDR polimorfizmleri ilişkili gösterilmiştir. Ayrıca bu hasta gruplarında, IL-6 ve COL1A1'in polimorfik bölgelerinin hastalıkla ilişkisi araştırılmıştır. Vücut kütle indeksi, yaş, sigara, steroid kullanımı için çalışma grubu analiz edildiğinde SNP testinin dağılımında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Ülseratif kolite nazaran Crohn hastalığı hastalarında düşük kemik mineral yoğunluğu sıkça görülmektedir. Osteoporoz patogenezi için belirlenen gen hedeflerinin yine İBH ile ilişkili olabileceği ifade edilmektedir. İkizlerde gerçekleştirilen çalışmalarda, kemik mineral yoğunluğunun %60-%80'inin genetik olarak belirlenebileceğini ifade edilmektedir. İkiz bireylerde gerçekleştirilen çalışmalarda bu bulguların her zaman tekrar sonuçları tutarlı olmamakla birlikte,

VDR polimorfizmi ile sağlıklı kadınlarda kemik mineral yoğunluğunu ilişkilendirmiştir. Yapılan birkaç çalışma için gerçekleştirilen meta analizler, VDR polimorfizmi ve kemik yoğunluğu ilişkilendirmesini zayıf etki düzeyinde olduğunu göstermektedir. VDR kemik hücre fonksiyonu ve kalsiyum metabolizmasının önemli bir düzenleyicisi olmakla beraber, VDR polimorfizminin bağırsaktan kalsiyum emilimini etkilediği bulunmuştur. Aynı zamanda Crohn hastalığına duyarlılığı da gösterilmiştir [50].

Stelios Pavlidis ve arkadaşlarının yapmış olduğu analizlere göre CD ve UC örneklerinin başlangıçta ve tedaviden sonra birlikte kümelenildiği, İBH içindeki bir süreklilik kavramını destekler. Sonuç olarak, büyük bir sağlık sorunu, fenotipik olarak aynı hastalığa sahip görünen hastalarda, farklı tedavilerin yüksek değişkenlik gösterdiği etkendir. [51]

Pro-inflamatuarsitokin IL-6 osteoporoz patogeneğinde de ilişkili olarak gösterilmekte olan bir başka moleküler hedefdir. IL-6 osteoklast fonksiyonunu etkiler ve kemik rezorpsiyonunu uyarır. Bazı çalışmalar inflamatuvar bağırsak hastalığı olanlarda ve sağlıklı kadınlarda kemik mineral yoğunluğu ile IL-6 gen polimorfizmi arasında bağlantı bulmuştur [50]. İBH hastalarında serum vitamin D konsantrasyonun sağlıklı kontrollere nazaran düşmediği ortaya konmuştur. Crohn hastalarında daha ileri osteopeni ve osteoporoz olduğu çeşitli çalışma gruplarında gösterilmektedir. Ülseratif kolit hastalarında kontrol ve Crohn hastalarına nazaran daha yüksek oranda TT genotipi görülmektedir. Bununla beraber hem Crohn hastalarında ve hem de lseratif kolit hastalarında femur boynu ve omurgada kemik mineral yoğunluğu azaldığı gözlenmiştir. Ancak istatikselsel olarak vitamin D konsantrasyonu ve çalışılan gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır [49].

VDR polimorfizmlerinde görülen fenotipler ve kemik mineral yoğunluğu arasında fark görülmemesine karşın IL-6 genotipleri arasında kemik mineral yoğunluğunda anlamlı bir fark literatüde gösterilmiştir [50]. AleksandraSzymczak-Tomczak ve ark. göre VDR TaqI enzim kesimi ile gösterilen polimorfizmi kemik mineral yoğunluğu ile ilişkili olabilir. TT genotipininülseratif kolit hastalarında kemik mineral yoğunluğu üzerinde koruyucu etkisi olduğunu ifade edilmektedir [49].

Xue LN ve ark. 2013'te yaptığı çalışmada, Asyalı hastalardan oluşan çalışma grubunda FokI'ınffgenotipiülseratif kolit riskinin artışı ile ilişkili olarak

değerlendirilmektedir. TaqI genotipi Avrupalı gruplarda yüksek Crohn hastalığı riski ile birlikte anlamlı düzeyde korelasyon göstermektedir. Birden fazla çalışmada yer alan verilerin incelendiği meta analizde, Asyalılar için VDR FokI polimorfizminin ülseratif kolite duyarlılığa neden olduğu ifade edilmektedir. TaqI genotipi taşıyan Avrupalılar için Crohn hastalığı görülme oranında yüksek korelasyon tespit edilmiş olup, Apa a allelinin tüm taşıyıcıları için Crohn hastalığı için önemli düşüş olduğunu ortaya koymaktadır. Erkekler için yine TaqI genotipi hem Crohn hastalığı hem de ülseratif kolit ile ilişkili olarak değerlendirilmiştir [52]. Wanget ark. IBH ve VDR polimorfizmleri arasında herhangi bir korelasyon bildirmedi. Çalışılan hastaların onların arasında etnik farklılıklarına ilişkin genetik profilindeki farklılıklara özel dikkat gösterildi. IBH çalışılan grupların ve kontrol arasında allel frekanslarının dağılımındaki farklılıklar VDR polimorfizmi ve hastalığın oluşumu arasındaki ilişkinin önemli olmadığı gösterildi. Bununla birlikte alt grup analizleri TaqI için Kafkasyalılarda UC riski ile ilişkisinin önemli olduğunu göstermiştir. Daha önceki bireysel çalışmalarla birlikte bulgular, ApaI polimorfizminin Crohn hastalığı riskini arttırabileceğini, TaqI polimorfizminin özellikle Kafkasyalılarda ülseratif kolit riskini azaltabileceğini ortaya koymuştur. IBH riski ve VDR FokI polimorfizmi arasındaki ilişkide allellerde homozigotluk ve heterozigot olma durumunda veya baskın, çekinik kalıtımda istatistiksel anlamlı önemli bir fark bulunmamıştır [49, 53]. Andre Y.O.M ark. yaptığı çalışmada ise birçok analizde serum vitamin D seviyeleri kontrole nazaran Crohn hastalarında önemli bir düşüş görülmektedir. VDR rs731236, SCUBE3 ve PHF-11 genlerindeki SNP'ler ile ilişkili olup, bu ilişki hem Crohn hastalarında hemde sağlıklı kontrol gruplarında vitamin D düzeyleri ile önemli ölçüde korelasyon göstermektedir. VDR rs731236 varyantı da Crohn hastalarında serum vitamin D seviyeleri ile ilişkili olarak gösterilmektedir [9].

Toplam 11 hasta ve 33 kontrolde VDR geni ekson 9 ve ekson 2 de görülen polimorfizminin allelleri belirlenmesi için TaqI ve FokI enzimleri PZR ürünlerinde kesim yapılmıştır. FokI enzimi yapılan kesim sonucunda ile FokI rs2228570 ekson2 polimorfizminin allelleri belirlenmiştir. 1 kontrol, 4 Crohn hastası ve 1 ülseratif kolit hastasında kesim bölgesinin olduğu 207/63 bç gözlenmiştir. 8 kontrol grubunda ise kesim bölgesinin olduğu 207 bç olup, 63 bç'nin olmadığı gözlenmiştir. Geriye kalan diğer hasta ve kontrol gruplarının PZR ürünü çıkmadığı için kesim yapılamamıştır.

TaqI enzimi yapılan kesim sonucunda ile TaqI rs731236 ekzon9 polimorfizminin allelleri belirlenmiştir. 15 kontrol, 2 ülseratif kolit hastasında kesim bölgesinin olduğu 504/186 bç gözlenmiştir. 5 Crohn hastasında PZR ürünü çıkmadığı için kesim yapılamamıştır. 2 Crohn hastasında da kesim olmadığı gözlenmiştir. Geriye kalan diğer kontrol gruplarının PZR ürünü çıkmadığı için kesim yapılamamıştır.

Literatürde çeşitli gruplar VDR gen polimorfizminin inflamatuvar bağırsak hastalıkları, osteoporoz, prostat ve meme kanseri, insülin bağımlı diyabet gibi çeşitli hastalıklara yatkınlığı üzerine birçok çalışma yapılmış ve kendi populasyonları için genetik yatkınlıkları araştırmıştır. Başka bir çalışmada da cinsiyet farklılığının önemli olması nedeniyle kadın ve erkek olarak iki grupta değerlendirme yapmışlardır. Polimorfizm frekanslarının cinsiyete bağlı olarak değişmediğini saptamışlardır.

TaqI polimorfizmi ekzon 9 da görülen VDR için rs731236 nolupolimorfizimde T den C'ye değişimine bakılmıştır. Başka literatürde yapılan çalışmada ise TaqI polimorfizmi VDR' in ekzon 8'in 352 kodonunda A dan C'ye baz değişimi olup, aminoasit kodlama değişikliği meydana getirmemektedir. İkisi de izolösini kodlamaktadır [18]. Bir VDR-lusiferaz reporter gen yapısı kullanılarak, 't' allelinin *in vitro* olarak artan mRNA üretiminin seviyeleri ile ilişkili olabildiği gösterilmiştir [18]. J D Simmons ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, genel olarak TaqI genotipi Crohn hastalığı ile anlamlı olarak ilişkili ve TaqI 't' allel sıklığı Crohn hastalığı hastalarında artmıştı. TaqI 't' alleli için homojenlik (genotip 'tt') Crohn hastalığı olan hastalarda kontrollerden anlamlı olarak daha yaygındı. Fakat Ülseratif Kolit için böyle bir ilişki yoktu. FokI polimorfizmi için genotip frekansları kontrol ve hasta grupları arasında benzerdi. Üç grupta kadın ve erkek oranında farklılıklar olmasına rağmen genotip ve cinsiyet arasında ilişki bulunamamıştır. [18]

İnflamasyon hastalıklarının patogenezi bilinmemektedir. Fakat mukozal immün yanıtın anormal düzenlemesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. VDR'nin ifade düzeyi veya fonksiyonunu değiştirebilecek herhangi bir mutasyonun, IBH geliştirme olasılığını etkileyebileceği varsayılmıştır [18]. Farklı bir çalışmada gerçekleştirilen meta analize göre, TaqI (tt) genotipi Avrupalılar için Crohn hastalığı riskinde artış ile korelasyon göstermektedir. Asyalılar için ise VDR FokI polimorfizminin ülseratif kolite duyarlılığını göstermektedir. Önceki

çalışmalarda ifade edildiği üzere VDR FokI'inffgenotipiülseratif kolit ile yüksek korelasyon göstermekteidi. Erkek bireylerde bu korelasyon ttgenotipi için hem Crohn hastalarını hem de ülseratif kolit hastalarını kapsamaktadır [52].

Sonuç olarak Crohn hastalığı olanlarda vitamin D seviyelerinin normal, sağlıklı popülasyonlara göre anlamlı derecede düşük olduğu ve yaşa göre değişiklik gösterdiği açıktır. Vitamin D seviyeleri mevsim ile ilişkilidir ve gün ışığı uzun olan aylarda daha yüksek seviyededir [9].

CD ile ilişkili düşük kemik mineral yoğunluğu için çoklu etioloji önerilmiştir. CD hastalarında UK hastalarına nazaran daha düşük kemik mineral yoğunluğu vardır. [54]

Bazı çalışmalarda CD hastalarında düşük 25(OH)D seviyeleri raporlanmıştır. Dolaşımda 1,25(OH)2D seviyelerinin yükseldiği tanımlanmıştır. M. T. Abreu ve arkadaşları, CD hastalarında normal dolaşımda aktif Vitamin D 1,25(OH)2D seviyelerinin olup olmadığını sordular. Yetişkin CD hastalarında ÜK hastalarına nazaran 1,25(OH)2D'in serum konsantrasyon seviyeleri anlamlı derecede artmıştır. Artmış 1,25(OH)2D seviyeleri bağırsaktan kalsiyum emilimini arttırır. Hiperkalsemi ile sonuçlanabilir. Ancak yapmış oldukları çalışmada hastalarının hiçbirinde hiperkalsemi gözlenmedi ve serum kalsiyum ile 1,25(OH)2D seviyeleri arasında ilişki bulunamadı. M. T. Abreu ve arkadaşları, serum kalsiyumdaki yükselmenin idrar kalsiyum atılımının artışıyla dengeleneceği hipotezinde bulundular. Verilere CD'da kalsiyum atılımı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermektedir. Vitamin D'nin dolaşımdaki konsantrasyonları kemik metabolizması ve normal kalsiyum homeostazi için önemlidir. Aktif hormonun yüksek seviyeleri kemik mineral yoğunluğunda eşlik eden bir düşüş ile kemik rezorpsiyonunun artmasına neden olabilir. Bu nedenle CD hastalarında kemik mineral yoğunluğu ile 1,25(OH)2D arasında ilişkiyi araştırmışlardır. Verilerine göre CD hastalarında 1,25(OH)2D seviyeleri ile kemik mineral yoğunluğu arasında anlamlı derecede negatif bir ilişki olduğunu göstermiştir. M. T. Abreu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarına göre yüksek 1,25(OH)2D, bir CD marker olarak işlev görebilir [54].

Gisbert-Ferrándiz L ve arkadaşları, CD hastaları ve VDR ekspresyon seviyelerindeki farklılıkları ve hastalığın seyri ile olan ilişkilerini analiz etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda risk alleli için homozigot olan CD hastalarının PBMC'lerde düşük VDR

proteini seviyelerini sunduğu bulunmuştur. Bunun IL-1 β mRNA yukarı regülasyonu ve lenfositik adezyon moleküllerinin aktivasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur [26]. Özdoğan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, Lomber Dejeneratif Disk Hastalığının gelişimi ile VDR geni rs2227580 polimorfizminin ilişkisini incelemişlerdir. VDR rs2227580 AG genotipine sahip bireyler önemli ölçüde azalmış LDDH riskine sahipken, GG genotipine sahip olanlar önemli ölçüde artmış LDDH riskine sahiptir. AG genotipi LDDH riskinde azalma, GG genotipi LDDH riskinde artış göstermektedir [25].

Pugazhendhi ve ark. Crohn hastalığı ve bağırsak veremi patogenezi arasındaki benzerliği araştırmışlardır. IL-8 ve uyarılmış protein 10 ekspresyonu Crohn hastalığı ve bağırsak vereminde görülen ülserleşmiş mukozada belirgin şekilde artmıştır. Crohn hastalarında, sağlıklı gönüllülere nazaran IL-1 β , IL-6, IL-8'in periferik beyaz kan hücrelerinde gen ekspresyonu artmıştır [33]. IL-1 β , IL-6, IL-8 Crohn hastalığında inflamasyonlu durumu yönlendiren başlıca sitokinler olarak tanımlanmaktadır [55].

Živković ve ark. IL-1 β , IL-1RA'nın doğal inhibitörünü kodlayan gendeki VNTR polimorfizmindeki allel 2'nin *kronik otitis medya* ile ilişkisini araştırmışlardır. IL-1 β TaqI polimorfizminin kontrol ve hasta grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak IL-1RA VNTR polimorfizminin hem genotip hem allel frekansları açısından hasta ve kontrol grupları arasında önemli bir fark gözlenmiştir. IL-1RA allel 2'nin kronik otitis medya ile olumlu ilişkisinin olduğu bulundu. IL-1RA allel frekans sıklığı kolesteatom açısından anlamlı olarak farklı görülmüştür. IL-1RA VNTR polimorfizminin allel 2 taşıyıcıları kronik otitis medya için düşük orana sahip olduğu görülmüştür [56].

Wędrychowicz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, inflamatuvar yanıtlar boyunca immünmodülasyonun doğasını belirlemede anahtar rol oynadığı için immünolojik araçlar olarak sitokinlere odaklanıldı. Bağışıklık ile ilgili farklı hastalıklarda klinik değerlendirmede yardımcı olabilirler. Sitokinler immünolojik araçların salgılanması ve sentezi ile ilgilidir. Lökotrin, prostaglandin, reaktif oksijen metabolitleri gibi. Bunlar immün reaksiyonların ciddiyeti ilişkilidir. Sitokinler, kolonda inflamasyonun devam etmesine neden olan komplikasyonlara ve tekrarlamasına neden olan immünolojik reaksiyonlarda da rol alabilir. [12]

Çalışmalarında, tekrarlayan aktif ülseratif kolit hastalığı olan çocuklarda yüksek serum IL-1RA konsantrasyonu ve düşük IL-1RA/IL-1 β oranı bulundu. Serum IL-1RA ve IL-1 β konsantrasyonları tekrarlayan inaktif ülseratif kolitte tekrarlamayana göre daha yüksekti.[12]

Sajadi ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptıkları çalışmada IL-8 (-845)T/C ve IL-8(+781)C/T polimorfizmleri ve periodontitis ile ilişkisini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. IL-8 kronik inflamasyon süreç ve akut inflamasyon yanıtların uyarılması ve güçlendirilmesinde rol oynamıştır. IL-8'in yüksek ekspresyonu nötrofillerin diş eti çatlaklarına geçişini kolaylaştırır. Bu yüzden nötrofillerin göçü inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde rol oynayabilir. Sonuçları, IL-8 (-845) allellerin dağılımı ile periodontit hastalığı riski arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir. IL-8(-845) C allelinin varlığı da hastalık riskini artırıyor. [39]

Oliveira ve ark. gastrik kanser riski ve mRNA ekspresyon seviyelerinde TNF α , IL-8, IL-10 sitokin genlerinin fonksiyonel polimorfizmin etkilerini araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucu TNF α (-857 C/T), IL-8(-845) T/C, IL-10 (-592 C/A) fonksiyonel polimorfizmlerin gastrik kanser ve kronik gastritis gelişiminin artan riski ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Polimorfik C alleli taşıyanlarda anlamlı bir şekilde yüksek IL-8 gen ekspresyon seviyesi gözlenmiştir. IL-8(-845) T/C polimorfizmi, IL-8 mRNA ekspresyon seviyesinde C allelinin etkisi ve gastrik kansere karşı duyarlılığı arasında ilişki gözlenmiştir. IL-8(-251) A/T gastrik hastalığına karşı duyarlılığını arttırmadığı, A allelinin de gen ekspresyon düzeylerinde herhangi bir etkisi görülmemiştir. Ancak farklı çalışmalarda IL-8(-251) A/T polimorfizmi çeşitli hastalıkların kötü prognozu ve artmış riski ile en sık ilişkili olduğu görülmüştür. Ancak farklı çalışmalarda IL-8(-251) A alleli ile IL-8'in yüksek ekspresyonu arasında ilişki hala tartışmalıdır [40].

Çalışma kapsamında ele alınan kişilerden elde edilen allel frekansları Şekil 24. (a)'da IL8 (-845) rs2227532 için alleler K15=TT, K16=TT, K17=TT, K18=TT, K19=CC ve (b)'de IL8 (-251) rs4073 için alleler TT olarak bulunmuştur. Kontrol grubu (K) TT fenotipi $\frac{4}{5}$ olarak görülürken ŞIL8 (-845) rs2227532 için allelerCrohn hastalarında C3=TT, U1=TT, C4=TT, U3=TT, Ülseratif kolit hastalarında U4=CTT, ve bir başka Crohn grubunda C5= CTT, C6= CTT, C7= CTT olarak saptanmıştır. Crohn hastalarında %50 oranında TT fenotipi korunurken, hastaların %50'sinde

heterozigot CTT görülmüştür. Benzer olarak sınırlı sayıda olan ülseratif kolit hastalarında %50 TT, %CTT 1er kişilik hasta gruplarında görülmüştür (Şekil 25).

Şekil 26.'da IL8 (-251) rs4073 için alleler C3=TT, U1=TT, C4=TT, U3=TT, U4=TT, C5= TT, C6= TT, C7= TT. Şekil 27. (a)'da IL-6 (-572) rs1800796 için alleler sırasıyla CC, CC, CC, GC, GC, CC, CC, CC. Şekil 27. (b)'de IL-6 (-597) rs1800797 için alleller sırasıyla GG, AA, GG, GG, AA, GA, GA olarak tanımlanmıştır. Hasta sayısının sınırlı olması dikkate alındığında istatistiksel anlamlı bir fark hasta grupları arasında görülmemiştir.

Sonuç olarak yapılan çalışmada, VDR rs2228570 polimorfizmi Crohn hastalığına duyarlı olduğu, VDR genindeki polimorfizmleri TaqI ülserleşmiş kolite karşı duyarlı olduğu yapılan analizler sonucu görülmektedir.

IL-8 (845) rs2227532 ve IL-8 (-251) rs4073 polimorfizmi kontrol ve hasta grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

İleride yapılacak çalışmalarda geniş hasta grupları ile çalışılması önemlidir. Allelik frekansların hesaplanabilmesi, hastalığın etiyolojisindeki yerinin sağlanması açısından önemlidir. İBH'lerde bu anlamda meta analiz çalışmaları ile hastaların erken dönemde tanımlanması, izlenmesi mümkün olabilecektir.

Genetik analizler ve mikrobiyom çalışmaları İBH'de VDR ve Vitamin D ile ilgili eski konuya yeni bilgiler getirdi. Gelecekteki çalışmalar ve klinik uygulamalarda, bağırsakta VDR ve Vitamin D ile ilgili yeni keşfedilen bilgiler, işlevleri göz önünde bulundurulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Fujita, N., et al., *Differential involvement of Atg16L1 in Crohn disease and canonical autophagy: analysis of the organization of the Atg16L1 complex in fibroblasts*. J Biol Chem, 2009. **284**(47): p. 32602-9.
2. Naser, S.A., et al., *Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(5): p. 412-24.
3. Mazor, Y., et al., *Prediction of disease complication occurrence in Crohn's disease using phenotype and genotype parameters at diagnosis*. J Crohns Colitis, 2011. **5**(6): p. 592-7.
4. Cleynen, I., et al., *Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study*. Lancet, 2016. **387**(10014): p. 156-67.
5. de Souza, H.S. and C. Fiocchi, *Immunopathogenesis of IBD: current state of the art*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016. **13**(1): p. 13-27.
6. Ungaro, R., et al., *Ulcerative colitis*. Lancet, 2017. **389**(10080): p. 1756-1770.
7. Xia, S.L., et al., *Association of vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D levels with Crohn's disease in Chinese patients*. J Gastroenterol Hepatol, 2016. **31**(4): p. 795-801.
8. Daryani, N.E., et al., *Significance of IL-1RA Polymorphism in Iranian Patients with Inflammatory Bowel Disease*. Dig Dis Sci, 2015. **60**(5): p. 1389-95.
9. Carvalho, A.Y., et al., *The role of Vitamin D level and related single nucleotide polymorphisms in Crohn's disease*. Nutrients, 2013. **5**(10): p. 3898-909.
10. Liu, J.Z. and C.A. Anderson, *Genetic studies of Crohn's disease: past, present and future*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2014. **28**(3): p. 373-86.
11. Ellinghaus, D., et al., *The genetics of Crohn's disease and ulcerative colitis--status quo and beyond*. Scand J Gastroenterol, 2015. **50**(1): p. 13-23.
12. Wedrychowicz, A., et al., *Prognostic value of assessment of stool and serum IL-1beta, IL-1ra and IL-6 concentrations in children with active and inactive ulcerative colitis*. Arch Med Sci, 2018. **14**(1): p. 107-114.
13. Türker, P. and S.D. Günaldı, *Crohn Hastalığı ve Tıbbi Beslenme*. Güncel Gastroenteroloji,(20), 2016: p. 3,267-273.
14. URAN, B.Ö. and Y. Yıldırım, *Yeni Bir Uzmanlık Alanı: İnflamatuvar Barsak Hastalıkları Hemşireliği*. İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi, 2016. **1**(2): p. 27-33.
15. Tsianos, E.V., K.H. Katsanos, and V.E. Tsianos, *Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(2): p. 105-18.
16. Reis, G.V., et al., *Vitamin D receptor polymorphisms and the polycystic ovary syndrome: A systematic review*. J Obstet Gynaecol Res, 2017. **43**(3): p. 436-446.
17. Sun, H., et al., *Serum vitamin D deficiency and vitamin D receptor gene polymorphism are associated with increased risk of cardiovascular disease in a Chinese rural population*. Nutr Res, 2019. **61**: p. 13-21.
18. Simmons, J.D., et al., *Vitamin D receptor gene polymorphism: association with Crohn's disease susceptibility*. Gut, 2000. **47**(2): p. 211-4.
19. Bikle, D.D., *Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications*. Chem Biol, 2014. **21**(3): p. 319-29.
20. Özkan, B. and H. Döneray, *D vitamininin iskelet sistemi dışı etkileri*. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 2011. **54**(2).
21. Lim, W.C., S.B. Hanauer, and Y.C. Li, *Mechanisms of disease: vitamin D and inflammatory bowel disease*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2005. **2**(7): p. 308-15.

22. Bakke, D. and J. Sun, *Ancient Nuclear Receptor VDR With New Functions: Microbiome and Inflammation*. *Inflamm Bowel Dis*, 2018. **24**(6): p. 1149-1154.
23. Cauci, S., et al., *Low back pain and FokI (rs2228570) polymorphism of vitamin D receptor in athletes*. *BMC Sports Sci Med Rehabil*, 2017. **9**: p. 4.
24. Jakubowska-Pietkiewicz, E., et al., *Vitamin D receptor gene variability as a factor influencing bone mineral density in pediatric patients*. *Mol Biol Rep*, 2012. **39**(5): p. 6243-50.
25. Ozdogan, S., et al., *Association of rs2228570 Polymorphism of Vitamin D Receptor Gene with Lumbar Degenerative Disc Disease*. *Turk Neurosurg*, 2019. **29**(2): p. 159-163.
26. Gisbert-Ferrandiz, L., et al., *A Single Nucleotide Polymorphism in the Vitamin D Receptor Gene Is Associated With Decreased Levels of the Protein and a Penetrating Pattern in Crohn's Disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2018. **24**(7): p. 1462-1470.
27. Jorgensen, S.P., et al., *Active Crohn's disease is associated with low vitamin D levels*. *J Crohns Colitis*, 2013. **7**(10): p. e407-13.
28. Gologan, S., et al., *Inflammatory gene expression profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis: a comparative analysis using a reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification protocol*. *J Crohns Colitis*, 2013. **7**(8): p. 622-30.
29. Sanchez-Munoz, F., A. Dominguez-Lopez, and J.K. Yamamoto-Furusho, *Role of cytokines in inflammatory bowel disease*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(27): p. 4280-8.
30. Neurath, M.F., *Cytokines in inflammatory bowel disease*. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(5): p. 329-42.
31. Gok, I., et al., *Analysis of Cytokine Gene Polymorphism Allelic Variation in the Turkish Population with Inflammatory Bowel Disease*. *Biomedical Research*, 2014. **25**(4): p. 551-559.
32. Muzes, G., et al., *Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases*. *World J Gastroenterol*, 2012. **18**(41): p. 5848-61.
33. Pugazhendhi, S., et al., *Cytokine gene expression in intestinal tuberculosis and Crohn's disease*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2013. **17**(5): p. 662-8.
34. Strober, W. and I.J. Fuss, *Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases*. *Gastroenterology*, 2011. **140**(6): p. 1756-1767.
35. Borekci, G., et al., *[Investigation of IL-1 beta, IL-1 receptor antagonist and IL-8 gene polymorphisms in patients with chronic hepatitis B and C]*. *Mikrobiyol Bul*, 2014. **48**(2): p. 271-82.
36. Mesa, F., et al., *Polymorphism IL-1RN rs419598 reduces the susceptibility to generalized periodontitis in a population of European descent*. *PLoS One*, 2017. **12**(10): p. e0186366.
37. Dobre, M., et al., *Differential Intestinal Mucosa Transcriptomic Biomarkers for Crohn's Disease and Ulcerative Colitis*. *J Immunol Res*, 2018. **2018**: p. 9208274.
38. Dan, H., et al., *Association of interleukin-8 gene polymorphisms and haplotypes with oral lichen planus in a Chinese population*. *Inflammation*, 2010. **33**(2): p. 76-81.
39. Sajadi, M., et al., *Study of association between interleukin-8 - 845 T/C and + 781 C/T polymorphisms with periodontitis disease among population from Western Iran*. *Mol Biol Rep*, 2018. **45**(5): p. 1263-1268.
40. de Oliveira, J.G., et al., *Influence of functional polymorphisms in TNF-alpha, IL-8, and IL-10 cytokine genes on mRNA expression levels and risk of gastric cancer*. *Tumour Biol*, 2015. **36**(12): p. 9159-70.

41. Li, J., et al., *Regulation of IL-8 and IL-1beta expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(16): p. 1715-25.
42. Li, K., et al., *Genetic polymorphisms of interleukin 8 and risk of ulcerative colitis in the Chinese population*. Clin Chim Acta, 2009. **405**(1-2): p. 30-4.
43. Sarlos, P., et al., *Genetic update on inflammatory factors in ulcerative colitis: Review of the current literature*. World J Gastrointest Pathophysiol, 2014. **5**(3): p. 304-21.
44. Magyari, L., et al., *Interleukin and interleukin receptor gene polymorphisms in inflammatory bowel diseases susceptibility*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(12): p. 3208-22.
45. Bishu, S., et al., *The -251 A/T Polymorphism in the IL8 Promoter is a Risk Factor for Acute Pancreatitis*. Pancreas, 2018. **47**(1): p. 87-91.
46. Daig, R., et al., *Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease*. Gut, 1996. **38**(2): p. 216-22.
47. Yang, Z.J., et al., *Interleukin-8 -251A/T polymorphism and periodontitis susceptibility: a meta-analysis*. Genet Mol Res, 2016. **15**(4).
48. Ding, C., et al., *Interleukin-1 receptor antagonist polymorphism (rs2234663) and periodontitis susceptibility: a meta-analysis*. Arch Oral Biol, 2012. **57**(6): p. 585-93.
49. Szymczak-Tomczak, A., et al., *Vitamin D receptor (VDR) TaqI polymorphism, vitamin D and bone mineral density in patients with inflammatory bowel diseases*. Adv Clin Exp Med, 2019.
50. Todhunter, C.E., et al., *Influence of IL-6, COL1A1, and VDR gene polymorphisms on bone mineral density in Crohn's disease*. Gut, 2005. **54**(11): p. 1579-84.
51. Pavlidis, S., et al., *I_MDS: an inflammatory bowel disease molecular activity score to classify patients with differing disease-driving pathways and therapeutic response to anti-TNF treatment*. PLoS Comput Biol, 2019. **15**(4): p. e1006951.
52. Xue, L.N., et al., *Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease: a meta-analysis*. Inflamm Bowel Dis, 2013. **19**(1): p. 54-60.
53. Wang, L., et al., *Polymorphisms of the vitamin D receptor gene and the risk of inflammatory bowel disease: a meta-analysis*. Genet Mol Res, 2014. **13**(2): p. 2598-610.
54. Abreu, M.T., et al., *Measurement of vitamin D levels in inflammatory bowel disease patients reveals a subset of Crohn's disease patients with elevated 1,25-dihydroxyvitamin D and low bone mineral density*. Gut, 2004. **53**(8): p. 1129-36.
55. Cooper, A.M. and S.A. Khader, *The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis*. Immunol Rev, 2008. **226**: p. 191-204.
56. Zivkovic, M., et al., *The Allele 2 of the VNTR Polymorphism in the Gene That Encodes a Natural Inhibitor of IL-1beta, IL-1RA Is Favorably Associated With Chronic Otitis Media*. Clin Exp Otorhinolaryngol, 2018. **11**(2): p. 118-123.

EKLER

Ek 1. Kullanılan cihazların listesi

| ADI | ÜRÜN KODU | MARKA/FİRMA ADI |
|----------------------------|--------------------|------------------------|
| UV-Transluminatör | GelDOC | BioRad |
| Santrifüj | 5417R | Eppendorf |
| Santrifüj (Büyük) | 5810R | Eppendorf |
| Spin mini spinplus | SN0708 | LabNet |
| Yatay elektroforez sistemi | Gel XL ultra V-2 | BioRad |
| Hassas Tartı | LE6202S | Sartorius/Sartonet |
| Analitik Terazı | Extend | Sartorius/Sartonet |
| Mikropipet (0,5µl-10µl) | EH52836 | Thermo |
| Mikropipet (20µl-200µl) | EH46925 | Thermo |
| Mikropipet (200µl-1000µl) | T27274 | Thermo |
| Otoklav | OTO32 | Nüve/İndem |
| Su Banyosu | BM302 | Nüve/İndem |
| Manyetik Karıştırıcı | SB162 | Stuart/ProLab |
| Distile Su Cihazı | TANKPE030 | Millipore Direct Q-5UV |
| pH Metre | S20KS | SEM/MettlerToledo |
| Derin Dondurucu | 2041D | Arçelik |
| Buzdolabı (Nofrost) | 4263TMB | Arçelik |
| Vorteks | SA8 | Stuart/ProLab |
| Dry heat sterilizatör | FN120 | Nüve |
| Spektrofotometre | Ultraspec 2100 pro | Biosciences |
| Güç Kaynağı | PowerPac/Basic | BioRad |
| Dikey akışlı hava kabini | Nüve LN90 | İndem |
| Çeker Ocak | Karaçelik | BO-GA |
| İnkübatör | Heracell | Thermo |
| Konsantratör Plus | Eppendorf | İncekaralar |

| | | |
|-------------------------------|--|-------------------------|
| Dondurucu (-80°C) | Ultra LowTemperatureFreezer, U725 innova | New BrunswickScientific |
| Elektroforez Aletleri | Muhtelif | BioRad |
| Mikrodalga | | Arçelik |
| Isıtıcı(Kuru banyo inkübatör) | Type CH-100 | BiosanLtd |
| Nanodrop(Spektrofotometre) | Implen Nanofotometre | BO-GA |
| PZR Cihazı(mini) | Bio-RedMycycler | Gen-Era |



Ek 2. Kullanılan kimyasalların listesi

| ADI | ÜRÜN KODU | FİRMA ADI |
|---------------------|---------------|------------------|
| Etanol | CAS 64-17-5 | ALKO MED |
| Saf Etanol | 32221 | SIGMA-ALDRICH |
| İzopropanol | K44518295 321 | MERCK |
| EDTA | A2937 | Appllichem |
| Agaroz | A9539 | SIGMA-ALDRICH |
| Tris Baz | 648310 | CALBIOCHEM |
| Asetik Asid | 27225 | SIGMA-ALDRICH |
| EthidiumBromide | E1510 | SIGMA-ALDRICH |
| Tris-HCl | 648317 | CALBIOCHEM |
| 1 kb Marker | SM1163 | Fermentas |
| 6X yükleme Tamponu | R0631 | Fermentas |
| Amonyum Asetat | 1,110115,1000 | MERCK |
| Fenol Kloroform | A2279,0250 | Appllichem |
| 100 bp DNA Marker | SM0241 | ThermoScientific |
| ExPrimeTaq PCR Kiti | G-4000 | GenetBio |
| Kloroform | UN1888 | Appllichem |
| Tris-EDTA | | |
| 2X Mastermix | K0171 | ThermoScientific |
| Nükleaz Serbest Su | | |
| Sodyum Klorür | A2941 | Appllichem |

Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı

1. Lizis Buffer:

$\text{NH}_4\text{Cl} = 0,829 \text{ gr}$

$\text{KHCO}_3 = 0,1 \text{ gr}$

$0,5\text{M EDTA} = 20 \mu\text{l}$

Karışım manyetik karıştırıcıda karıştırılır. HCl ile pH = 7,4'e ayarlanır. Distile suyla 100ml'ye tamamlanır. Eğer daha az miktarda karışım hazırlanacak ise kimyasalların miktarları da değişir. Solüsyon hazırlandıktan sonra otoklava atılır.

2. 0.5M EDTA (pH = 8):

0.5 M EDTA = 18,61 gr

0.5 M EDTA hazırlamak için, EDTA ile distile su manyetik karıştırıcıda karıştırılır. NaOH ile pH=8'e ayarlanır. 100ml distile suyla tamamlanır. EDTA hazırlandıktan sonra Lizis Tamponu hazırlanır, Ondan sonra otoklavlanır.

3. Sodyum EDTA Solüsyonu (pH = 8):

NaCl: 0,439 gr

0.5M EDTA: 5 ml

SE solüsyonu için 0.5M EDTA ile tuzun karışımı 100ml distile suyla tamamlanır.

4. %10 Sodyum Dodosil Sülfat (SDS) (pH =7,2)

10 gr SDS pH 7,2 olacak şekilde 100 ml distile suya tamamlanarak %10 SDS hazırlanır. SDS deterjan olduğu için otoklavlanmaz.

5. Sodyum EDTA SDS Solüsyonu (SES) (pH = 8)

SE solüsyonu = 90 ml

%10 SDS =10 ml

Toplamda 100 ml'ye tamamlanır. SES solüsyonunda SDS olduğu için otoklavlanmaz.

6. 7,5M NH₄Ac (40ml)

NH₄Ac = 22,8 gr

Distile su =40 ml

7. Tris-EDTA Solüsyonu (TE) (pH = 8)

1M Tris (pH=8) =1ml

0,5M EDTA (pH = 8) =0,2ml

Distile suyla karışım 100 ml'ye tamamlanır.

8. TAE Hazırlama

50X TAE Solüsyonundan 1X TAE dilüsyonu hazırlarken, 20ml 50X TAE solüsyonu 1000ml distile suya tamamlanır.

ÖZGEÇMİŞ

Sena AKSU

Eposta: senaaksu-117@hotmail.com

Telefon: 05356401619

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi : 1991

İŞ TECRÜBESİ

2014-Esenyurt Belediyesi (Sağlık İşleri Müdürlüğü)

EĞİTİM BİLGİLERİ

2013-Marmara Üniversitesi Biyoloji Bölümü (Lisans)

2014-Abant İzzet Baysal Üniversitesi'nde Pedagojik Formasyon eğitimi (MEB formasyon)

İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Tezli Yüksek Lisans Programı

SEMİNER ve KURSLAR

Kök Hücre Sempozyumu, Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, Biyogüvenlik ve GDO'lu Ürünler Konferansı, II. Kök Hücre Temelli Tedavilerde Güncel Yaklaşımlar, İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitim Katılım Sertifikası

BİLGİSAYAR BİLGİSİ

Office, Word, Excel Logo Gold, Powerpoint, Wordpad