

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**



**ASTİM HASTALIĞINDA IL-18 GEN POLİMORFİZİMİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**NİL OCAK**

**BALIKESİR, EKİM - 2018**

**T.C.**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**



**ASTIM HASTALIĞINDA IL-18 GEN POLİMORFİZİMİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**NİL OCAK**

**Jüri Üyeleri: Dr. Öğr. Üyesi Ayla SOLMAZ AVCIKURT**

**Prof. Dr. Feray KÖÇKAR**

**Prof. Dr. Sezai TÜRKEK**

**Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER**

**Doç. Dr. Hatice YILDIRIM**

**BALIKESİR, EKİM - 2018**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Nil OCAK tarafından hazırlanan "ASTIM HASTALIĞINDA IL-18 GEN POLİMORFİZİMİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 25.10.2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

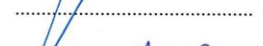
Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Ayla SOLMAZ AVCIKURT



Üye  
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR



Üye  
Prof. Dr. Sezai TÜRKEL



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

**Bu tez çalışması BAP tarafından 2017-060 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

**ASTIM HASTALIĞINDA IL-18 GEN POLİMORFİZİMİNİN  
ARAŞTIRILMASI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
NİL OCAK  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK  
(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ AYL A SOLMAZ AVCIKURT)  
BALIKESİR, KASIM - 2018**

Genetik ve çevresel faktörlerin etkisi ile oluşan astım, solunum yollarında obstrüksiyon ile giden bir hastalıktır. Doğuştan ve edinilmiş bağışıklık sisteminin önemli düzenleyicisi olan IL-18, insanda kromozom 11q22.2-2-q22.3 üzerinde bulunan, altı ekzon, beş introndan oluşan bir sitokindir. Bu çalışmada IL-18 gen promotorunda var olan -607 (rs1946518) A/C, -656 (rs1946519) G/T nükleotid değişimi kapsayan polimorfizmlerin astım hastalığı ile ilişkisi araştırıldı. Çalışmada astım hastalığı tanısı konan 100 hastada (53 erkek, 47 kadın; yaş ortalaması 52.58±12.26), 101 sağlıklı kontrolde (50 erkek, 51 kadın; yaş ortalaması 54.88±10.54) IL-18 promotor -607 (rs1946518) A/C nükleotid değişimi, -656 ve (rs1946519) G/T değişimi polimeraz zincir reaksiyonu ve kısıtlayıcı enzimler kullanılarak incelendi. Hasta ve kontrol grupları -607 bölgesinde genotip dağılımı CC için sırasıyla % 49 ve %64, CA için % 46 ve %34, AA için ise % 5 ve %3 olarak bulundu. -656 bölgesinde ise hasta ve kontrol gruplarında IL-18 bölgesinde genotip dağılımı GG için sırasıyla % 49 ve %55, GT için % 37 ve %41, TT için ise %14 ve %5 olarak bulundu. 607 C allel frekansı hasta grubunda kontrollere göre daha az bulundu.(p=0,054). -607 hasta (n=49 %49,0) ve kontrol grubu (n=64 %63,3) ile karşılaştırıldığında CC genotip oranları arasında anlamlı farklılık saptanmış olup; hasta grupta CC varyant oranı kontrol grubundan düşük bulunmuştur (p=0,040). IL-18 promotor -656 da hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında GG ve GT varyant oranları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi. TT genotip oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmış olup; hasta grupta TT (n=14 %14,0) genotip kontrol grubundan (n=5 %5,0) yüksek bulunmuştur (p=0,028).

**ANAHTAR KELİMELELER:** Astım, IL-18 promotor, polimorfizm, PCR-RFLP, Genotip.

## **ABSTRACT**

**INVESTIGATION OF IL-18 GEN POLYMORPHISM IN ASTHMA  
DISEASE  
MSC THESIS  
NİL OCAK  
BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS  
(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. AYL A SOLMAZ AVCIKURT)  
BALIKESİR, NOVEMBER 2018**

Asthma, caused by genetic and environmental factors, is a disease characterized by obstruction of the respiratory tract. IL-18, an important regulator of innate and acquired immune system, is a cytokine consisting of six exons, five introns, located on chromosome 11q22.2-2-q22.3. In this study, we investigated the association of polymorphisms with ler607 (rs1946518) A/C, -656 (rs1946519) G/T nucleotide changes in the IL-18 gene promoter with asthma. In this study, 100 patients (53 males, 47 females; mean age  $52.58 \pm 12.26$  years) with asthma disease, 101 healthy controls (50 males, 51 females; mean age  $54.88 \pm 10.54$ ). ) IL-18 promoter -607 The change of -656 and (rs1946519) G / T were investigated using polymerase chain reaction and restriction enzymes. The distribution of genotypes in the patient and control groups -607 was 49% and 64%, 46% and 34%, and 5% and 3%, respectively. In the -656 region, the distribution of genotypes in the IL-18 region in the patient and control groups was 49% and 55% for GG, 37% and 41% for GT and 14% and 5% for TT, respectively. -607 C allele frequency was lower in the patient group compared to controls ( $p = 0.054$ ). -607 (n = 49% 49.0) and control group (n = 64% 63.3) compared with the CC genotype ratio was found a significant difference; CC variant ratio was found to be lower in the patient group than the control group ( $p = 0.040$ ). IL-18 promoter -656 compared the patient and control group GG and GT variant rates did not show a statistically significant difference. There was a statistically significant difference between TT genotype ratios; In the patient group, TT (n = 14% 14,0) was higher than the control group (n = 5, 5,0%) ( $p = 0,028$ ).

**KEYWORDS:** Asthma, IL-18 promoter, polymorphism, PCR-RFPL, Genotype.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>v</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Astım Tanımı.....	2
1.2 Astım Epidemiyoloji .....	2
1.3 Astım Mortalite .....	3
1.4 Risk Faktörleri .....	3
1.4.1 Kişisel Risk Etmenleri .....	3
1.4.1.1 Genetik .....	3
1.4.1.2 Cinsiyet.....	4
1.4.1.3 Obezite.....	5
1.4.2 Çevresel Risk Etmenleri .....	5
1.4.2.1 Allerjenler.....	5
1.4.2.2 Sigara .....	5
1.4.2.3 Hava Kirliliği .....	6
1.4.2.4 Enfeksiyonlar .....	6
1.4.3 Patogenez .....	7
1.4.4 Astım'ın Tedavisi .....	8
1.4.5 Astım'ın Tedavi Maliyetleri .....	9
<b>2. İNTERLÖKİN-18 (IL-18)</b> .....	<b>10</b>
2.1 İnterlökin-18 Tanımı .....	10
2.1.1 İnterlökin-18 (IL-18)'in Biyolojik Aktivitesi .....	12
2.1.2 Hastalıklarda İnterlökin-18'in Potansiyel Rolü .....	12
2.1.2.1 Multipl Skleroz .....	12
2.1.2.2 İnflamatuar Bağırsak Hastalığı .....	12
2.1.2.3 Sedef Hastalığı (Psoriasis).....	13
2.1.2.4 Kanser .....	13
2.1.2.5 Metabolik Sendrom .....	13
2.1.3 IL-18 Polimorfizmleri.....	14
2.2 Amaç .....	14
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>16</b>
3.1 Materyaller .....	16
3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	16
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri .....	16
3.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	17
3.2 Yöntemler .....	19
3.2.1 Malzemelerin temizliği ve ortamın sterilizasyonu .....	19
3.2.2 Genotip Belirlenmesi .....	19

3.2.2.1 Kandan Genomik DNA İzolasyonu.....	19
3.2.2.2 PZR Amplifikasyonu (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) .....	20
3.2.2.3 Restriksiyon Endonükleaz Kesim Mekanizması .....	23
3.2.3 DNA'nın Analizi.....	25
3.2.3.1 Spektral Yöntem .....	25
3.2.3.2 Agaroz Jel Elektroforezi .....	25
3.2.3.3 Restriksiyon Endonükleaz İle Kesim .....	26
3.2.4 İstatistiksel Analiz.....	27
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>29</b>
4.1 Hasta ve Sağlıklı Kontrol Grubu Özellikleri .....	29
4.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	32
4.2.1 MgCl <sub>2</sub> Optimizasyonu .....	34
4.3 Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları .....	34
4.3.1 IL-18 Geni -607 C/A Tek Nükleotid Polimorfizmi.....	34
4.3.1.1 -607 A/C Nükleotid İçin H-Weinberg Eşitliği .....	36
4.3.1.2 -607 Nükleotid Varyantlarının Değerlendirilmesi.....	38
4.3.2 IL-18 Geni -656 G/T Tek Nükleotid Polimorfizmi .....	40
4.3.2.1 -656 G/T Nükleotidi için H-Weinberg Eşitliği.....	41
4.3.2.2 -656 Nükleotid Varyantının Değerlendirilmesi .....	43
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>46</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>50</b>
<b>7. EKLER.....</b>	<b>65</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

<b>Şekil 2.1:</b> İnterlökin-18 (IL-18) yapısı.....	10
<b>Şekil 3.1:</b> Cinsiyet dağılımı .....	30
<b>Şekil 3.2:</b> Gruplara göre FEV 1, FEV C ve FEV 1/FEV C ölçümlerinin dağılımı .....	32
<b>Şekil 3.3:</b> -607 promotör gen bölgesinin çoğaltılarak PCR edildikten sonra 100 baz çifti marker kullanılarak elde edilen %1,5'lük agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	34
<b>Şekil 3.4:</b> -607 promotör gen bölgesinin TruI enzimi ile 100 baz çifti marker kullanılarak elde edilen %3'lük jel görüntüsü.....	35
<b>Şekil 3.5:</b> -607 nükleotid varyantlarının dağılımı.....	39
<b>Şekil 3.6:</b> -656 promotör gen bölgesinin PCR ile çoğaltıldıktan sonra edilen ve 100 baz çifti marker kullanılarak elde edilen %1,5'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	40
<b>Şekil 3.7:</b> -656 promotör gen bölgesinin MwoI enzimi ile 100 baz çifti marker kullanılarak elde edilen %3'lük jel görüntüsü.....	40
<b>Şekil 3.8:</b> -656 nükleotid varyantlarının dağılımı.....	44

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 3.1:</b> Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri .....	16
<b>Tablo 3.2:</b> DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler.....	17
<b>Tablo 3.3:</b> PCR için kullanılan çözeltiler .....	17
<b>Tablo 3.4:</b> IL-18 PCR'ı için kullanılan çözeltiler .....	18
<b>Tablo 3.5:</b> Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.....	18
<b>Tablo 3.6:</b> TruII ve MwoI Enzimlerinin Kesim Yerleri .....	24
<b>Tablo 3.7:</b> TruII enzimi ile kesim .....	26
<b>Tablo 3.8:</b> MwoI enzimi ile kesim .....	27
<b>Tablo 4.1:</b> Demografik özelliklerin dağılımı .....	29
<b>Tablo 4.2:</b> Demografik özelliklerin dağılımı .....	31
<b>Tablo 4.3:</b> -607 Forward (Primer Dizisi) .....	33
<b>Tablo 4.4:</b> -607 Reverse (Primer Dizisi) .....	33
<b>Tablo 4.5:</b> -656 Forward (Primer Dizisi) .....	33
<b>Tablo 4.6:</b> -656 Reverse (Primer Dizisi) .....	33
<b>Tablo 4.7:</b> -607 kesim sonucu beklenen bant büyüklükleri .....	35
<b>Tablo 4.8:</b> IL-18 gen promotorunda -607 C/A değişimi .....	36
<b>Tablo 4.9:</b> Hasta grubunda -607 A/C nükleotid için H- Weinberg eşitliği .....	36
<b>Tablo 4.10:</b> Kontrol grubunda -607A/C nükleotid için H-Weinberg eşitliği ...	37
<b>Tablo 4.11:</b> -607 nükleotid varyantlarının değerlendirilmesi. ....	38
<b>Tablo 4.12:</b> -656 kesim sonucu beklenen bant büyüklükleri .....	41
<b>Tablo 4.13:</b> IL-18 gen promotorunda -656 G/T değişimi .....	41
<b>Tablo 4.14:</b> Hasta grubunda -656 G/T nükleotidi için H-Weinberg eşitliği ....	42
<b>Tablo 4.15:</b> Kontrol grubunda -656 G/T nükleotidi için H-Weinberg eşitliği .	42
<b>Tablo 4.16:</b> -656 G/T nükleotid varyantının değerlendirilmesi .....	43
<b>Tablo 4.17:</b> Gruplara göre varyant çiftlerinin değerlendirilmesi .....	45

## SEMBOL LİSTESİ

<b>UV</b>	: Ultra- Viole
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>dNTP</b>	: Deoksiribo-Nükleik Asit
<b>°C</b>	: Celcius
<b>rpm</b>	: Revolution Per inute
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>EDTA</b>	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
<b>Bp</b>	: Baz Çifti
<b>OD</b>	: Optik Densite
<b>TAE</b>	: Tris Acetate EDTA
<b>IgE</b>	: İmmünoglobün E
<b>Th<sub>1</sub></b>	: Yardımcı T hücre 1
<b>Th<sub>2</sub></b>	: Yardımcı T hücre 2
<b>IL-4</b>	: İnterlökin-4
<b>IL-13</b>	: İnterlökin-13
<b>IL-9</b>	: İnterlökin-9
<b>IL-5</b>	: İnterlökin-5
<b>NO<sub>2</sub></b>	: Azotdioksit
<b>O<sub>3</sub></b>	: Ozon
<b>PM</b>	: Partiküler Madde
<b>RSV</b>	: Solunum Sinsityal Virüsü
<b>ICS</b>	: İnhale kortikosteroid
<b>IFN-γ</b>	: İnterferon-gama
<b>GM-CSF</b>	: Granülosit/ Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
<b>TNF</b>	: Tümör Nekroz Faktör
<b>IBD</b>	: İnflamatuar Bağırsak Hastalığı
<b>BKI</b>	: Bazal Kitle İndeksi

## ÖNSÖZ

Bu çalışma konusunun belirlenmesinde ve çalışmanın hazırlanma sürecinin her aşamasında bilgilerini, tecrübelerini ve değerli zamanlarını esirgemeyerek bana her fırsatta yardımcı olan değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Ayla SOLMAZ AVCIKURT'a, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a,

Çalışmamda desteğini ve bana olan güvenini benden esirgemeyen Tuğçe ARIT'e ve beni bu günlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım canım annem Nihal OCAK ve babam Yalçın OCAK'a teşekkürü borç bilirim.

# 1. GİRİŞ

Astım kronik akciğer hastalığı olup, dünyada yaklaşık 100 milyon kişiyi etkilemektedir ve bu rakamın 2025'te 300 milyon olması beklenmektedir [1]. Astım, atopinin ve total serum IgE (immünglobin E) düzeyinin artması ile ilişkili kompleks bir hastalıktır [2]. Allerjik astım önemli bir halk sağlığı problemidir. Dünya nüfusunun neredeyse %20'si bu hastalık ile mücadele etmektedir. Hava kirliliği ve çevresel etkenler nedeniyle görülme sıklığı küresel olarak artmaktadır [3]. Çocuk ve erişkinler için yapılan araştırmalarda, görülme sıklığının dünyada farklı ülkelerde %1-18 arasında değiştiği görülmüştür [4]. Birçok astım hastasında ilk belirtiler okul öncesi dönemde ortaya çıkmakla birlikte, kronik semptomlar genç erişkinlerde ortaya çıkmakta, erken yaşta hırıltı ve bronş aşırı duyarlılık semptomları daha yüksek oranda gözlenmektedir [5].

Astım hastalığında risk etmenleri, kişisel risk etmenleri ve çevresel risk etmenleri olmak üzere 2'ye ayrılır. Kişisel risk etmenleri genetik, cinsiyet ve obezitedir. Çevresel risk etmenleri ise allerjenler, hava kirliliği, sigara maruziyeti ve enfeksiyonlardır. Çevresel faktörlerin allerjik astım patogeneziye katkıda bulunduğu öne sürülmüştür [6]. Astımın psikososyal streslerden, enfeksiyöz ajanlara ve allerjenlere kadar uzanan etyolojik nedenleri vardır [7]. Gen-çevre etkileşimi üzerine yapılan araştırmalar, astımın karmaşık mekanizması hakkında bakış açımızı genişletebilir [8]. Çevresel faktörler genetik yatkınlık ile birlikte, çevresel faktörlere duyarlılık ve antijene spesifik serum IgE'nin eşlik ettiği astımı ortaya çıkartmaktadır. [9].

Astım ve atopi artmış bronş aşırı duyarlılığı ve artmış kan eozinofili sayısı ile yakından bağlantılıdır [10]. Atopi çevremizde bulunan allerjenlerin vücudumuzda alerji oluşturması için eğilimli olma durumudur. Astım, aralıklı, hava yolu obstrüksiyonu ve hava yolu aşırı duyarlılığı ve enflamasyonu ile karakterize kompleks bir hastalıktır. Sebepleri bilinmemekle birlikte, astımın patolojik ifadesi havayollarının enflamasyonu olan bir sendrom olduğu bilinmektedir. Astımı olan

hastalarda solunum yollarındaki enflamasyonun şiddeti astımın şiddeti ile paralellik göstermektedir [11].

## **1.1 Astım Tanımı**

Hava yollarının kronik inflamatuvar bir hastalığı olan astımda, [12] enflamasyonda mast hücreleri, eozinofiller, T-lenfositler başta olmak üzere birçok hücre rol almaktadır. Astım, Th<sub>2</sub> hücre aracılığındaki bozukluk olarak düşünülür. IL-4, IL-13,IL-9 ve IL-5 hava yolu enflamasyonunda rol oynayan ana sitokinler olarak tanımlanmıştır [13]. Enflamasyon, hastalarda sıklıkla gece veya gündüz tekrarlayan ataklar halinde hırıltılı solunum, nefes darlığı, göğüste sıkıntı hissi ve öksürük semptomlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır [14]. Astım, yıllardır allerjene özgü IgE (immünglobün E) ile kuvvetli ilişkili olan bir alerjik hastalık olarak düşünülmüştür [15]. Hava yolu enflamasyonu, astımın karakteristik bir özelliğidir ve hava yolu tıkanıklığı bronş aşırı duyarlılığı ve bazı hastalarda bulunan yaralanma-onarım sürecinin başlatılması (yeniden şekillenme) dahil olmak üzere hastalığın birçok semptomunun ortaya çıkmasında önemli ölçüde katkıda bulunur.

## **1.2 Astım Epidemiyoloji**

Astım her yaşta ortaya çıkabilen bir hastalık türüdür. Hastaların %30'unda başlangıç ilk 1 yaşta olup, %80-90'ında ilk belirtiler 4-5 yaştan önce ortaya çıkmaktadır [16]. Erkek çocuklarda görülme oranı, kızlara göre iki katı kadardır. Ülkemizde 27 ilden 46.813 çocuk olgu ile yapılan bir çalışmada astım prevalansı %14,712 aylık yaş grubunda astım prevelansı %2,8 olarak görülmüştür [17]. Gelişmiş toplumlarda ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) yöntemiyle astım prevelansı %4-23 oranında olduğu ortaya çıkmıştır [18].

### **1.3 Astım Mortalite**

Dünyada astım nedeniyle yılda 250.000 kişinin hayatını kaybettiği düşünülmektedir [19]. Görülme sıklığı ve mortalite arasında bir ilişki olmadığı bilinmektedir.

### **1.4 Risk Faktörleri**

Astımda risk faktörleri, kişisel risk faktörleri ve çevresel risk faktörleri olmak üzere iki alt başlıkta incelenmektedir.

#### **1.4.1 Kişisel Risk Etmenleri**

##### **1.4.1.1 Genetik**

Astımın tam nedeni bilinmemekle birlikte kalıtsal olduğu düşünülmektedir. Astım patogenezin de birçok gen rol oynamaktadır. Astım kompleks genetik bir hastalık olup ve çevresel etmenlerin hastalığın ortaya çıkmasında etkisi vardır [20]. Rol oynayan değişiklikler astımda dört temel alanda olmaktadır [21]. İlk olarak allerjene özgü IgE (immünglobulin E) antikorun üretilmesi, ikinci olarak havayolunda aşırı duyarlılık oluşmasıdır. Üçüncü olarak büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler gibi enflamatuvar mediatörlerin salınması son olarak da Th<sub>1</sub> veya Th<sub>2</sub> yönündeki yanıtı belirleyen faktörler şeklindedir [22].

Sitokinler, doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık sistem hücrelerinde immun yanıtta anahtar oyunculardır [23].

Allerji de immün yanıtın oluşumu IL-1, IL-10 ve interferonlar gibi sitokinler sayesinde gerçekleşmektedir [24]. IL-1 ailesi, bazı patojenlere ve diğer zararlı maddelere karşı konak yanıtlarında kritik bir rol oynadığı kanıtlanmış bir dizi sitokin içerir [25]. IL-1 lokal ve sistemik inflamasyonun ana sitokinidir [26]. IL-1 ailesi, iki

pro-inflamatuar sitokinden meydana gelir; IL-1 $\alpha$  ve, IL-1 $\beta$ . Bu sitokinleri kodlayan genler, 2.kromozomun uzun kolunda bulunur (2q13-14) [27]. İnflamasyonda ana sitokini olarak IL-1 son derece önemli bir sitokindir. IL-Ra,( IL-1 reseptör antagonisti) tüm hücreler üzerinde bulunan IL-1 reseptör tipi 1'i (IL-1R1) bloke eder; Bu nedenle sistemik enflamasyon ya IL-1 $\alpha$  ya da IL-1 $\beta$  aracılığıyla ortaya çıkabilir [28].

IL-10, Th<sub>1</sub> ve Th<sub>2</sub> lenfositleri, sitotoksik T hücreleri, B lenfositleri, mast hücreleri, mononükleer fagositik hücreler ve dendritik hücreler de dahil olmak üzere sayısız hücreden salgınır [29]. IL-10, bağışıklık yanıtı inhibe ettiği düşünülür, ancak belirli koşullar altında aktive edici özelliklere de (örneğin makrofajlar üzerinde) sahip olabilir [30]. IL-10 çeşitli iltihap hastalıklarında, potansiyel terapötik etkilere sahiptir. IL-10'un B hücreleri, Th<sub>1</sub>,Th<sub>2</sub> hücreleri, gibi çeşitli hücreler tarafından üretildiği bilinmektedir [31].

İnterferonlar, virüslerin yol açtığı enfeksiyonlara yanıt olarak çeşitli hücreler tarafından salgınan bir protein ailesidir [32]. İnterferonlar, doğal immün sistemin bir parçasıdır ve patojenlere karşı bir proinflamatuar yanıtın tetiklenmesine neden olmaktadır [33]. Hepatit, kanser gibi çeşitli patolojik durumların tedavisinde değişik interferon türleri kullanılmıştır [34]. İnterferonların ana üç sınıfı vardır: Tip I veya non-immün interferonlar esas olarak lökositler tarafından üretilen interferon alfa ve fibroblastlar tarafından üretilen interferon beta'dan oluşur. Tip II veya bağışıklık interferon, çoğunlukla NK hücreleri ve T hücreleri tarafından üretilen interferon gama; ve tip III, lambda interferondan oluşur [35].

#### **1.4.1.2 Cinsiyet**

Erkek çocuklarda, kız çocuklarına göre astım görülme sıklığı daha fazladır. Bu oranın erkek çocuklarda 2 kat attığı tespit edilmiştir [36]. Yaş ilerledikçe erişkinlerde bu durumun bayanlarda daha fazla olduğunu görülmektedir.



### **1.4.1.3 Obezite**

Obezite astım hastalığı için risk etmeni olarak gösterilmiştir. Obez bireylerde astım insidansı %50 artmaktadır [37]. Vücut ağırlığı yüksek olan hastalarda obezite ile astım arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir ancak bu ilişkinin moleküler mekanizmaları henüz aydınlatılmamıştır [38].

## **1.4.2 Çevresel Risk Etmenleri**

### **1.4.2.1 Allerjenler**

Astımda çevresel risk etmenleri olan allerjenler, iç ortam ve dış ortam allerjenleri olmak üzere iki başlıkta incelenmektedir [39]. İç ortam allerjenleri; hamamböceği, ev tozu akarları ve evcil hayvanlardır. Dış ortam allerjenleri ise polen ve mantarlardan oluşmaktadır.

### **1.4.2.2 Sigara**

Sigara dumanının astım hastalığını tetiklediği, hastalığın şiddetini arttırdığı, solunum fonksiyonlarının azalmasına sebep olduğu bilinmektedir. Tütün dumanı, özellikle sigara içen ebeveynlerin astımlı çocuklarında önem arz eder. Solunan duman, tütün kullanıcısı tarafından teneffüs edilir, alerjik duyarlılığın artmasına sebep olur ve solunum mukozasını tahriş etmektedir. Gebelik sırasında ebeveynin sigara içmesi, ileride doğacak çocuğun hem büyüme ve gelişmesini olumsuz etkileyecek hem çocuğun yaşamının ilk yıllarında astım hastalığına yakalanmasına hazırlık sağlayacaktır [40].

### 1.4.2.3 Hava Kirliliği

Hava kirliliği kentlerde yaşayan astım hastalarını olumsuz etkilemektedir. NO<sub>2</sub> (azot dioksit) gazı, trafik ve sanayi tarafından üretilen ağırlıklı olarak ozon (O<sub>3</sub>),ve çeşitli partiküler maddeler (PM) astım hastalığında önemlidir [41]. Özellikle çocukluk çağı astımında hava kirliliği önemli bir predizpozisyon etkindir ve NO<sub>2</sub>'in solunan havada konsantrasyonunun artmasıyla birlikte öksürük ve astım semptomları artar [42]. Bu kirli hava, hava yollarında iltihaba, aşırı duyarlılığa ve oksidatif strese neden olmaktadır ve uzun süreli hava kirliliğine maruz kalma, normal akciğer gelişimini bozmaktadır [43]. Hava kirliliği enflamasyona ve oksidatif strese, astım şiddetinin artmasına ve muhtemel astım gelişiminde rol oynayan mekanizmalara neden olması nedeniyle hastalığın seyri ve tedavisini olumsuz etkilemektedir [44].

### 1.4.2.4 Enfeksiyonlar

Virüslerden kaynaklanan solunum yolu enfeksiyonları ve *Chlamydia* ve *Mycoplasma* türleri astım patogeneğinde rol oynar [45]. Bu ajanların epidemiyolojik açıdan en az 3 yolla astım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. İlk olarak bebeklik döneminde bazı virüslerin astım fenotipinin başlangıcından potansiyel olarak sorumlu olduğu için dahil edilmiştir. Bu konuda en inandırıcı bir şekilde ortaya koyan virüsler, rinovirüs ve solunum sinsityal virüsü (RSV) olmuştur [46].

İkinci olarak viral enfeksiyonlar astımlı kişilerde, alerjik duyarlılık, allerjen maruziyeti ve hava akışı obstrüksiyonunun akut ataklarının indüksiyonunda kofaktör gibi davranmaktadır [47]. Son olarak enfeksiyonların, astım da dahil olmak üzere alerjik solunum yolu hastalıklarının gelişimini önleme potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. Hijyen hipotezinin ilerlemesinden sonra bu alandaki ilgi artmış ve aile büyüklüğünün artması ile artan sayıda enfeksiyon geçirilmesinin astım gelişimini azaltacağı şeklinde görüşler bulunmaktadır [48].

### 1.4.3 Patogenez

Astım çeşitli inflamatuvar hücrelerin ve birçok mediatörün rol oynadığı karakteristik, fizyopatolojik değişikliklerle seyreden inflamatuvar hava yolu hastalığıdır [49]. Astım fizyopatolojisi üçe ayrılır. İlk olarak kronik enflamasyon, ikinci olarak bronşiyal hiperraktivite ve son olarakta hava yolu obstrüksiyonudur [50].

İnsan mast hücrelerinin astım fizyopatolojisine katkıda bulunduğu konusunda güçlü kanıtlar vardır. Mast hücreleri şiddetli astımda düz kaslara çok fazla nüfuz ederek inflamatuvar mediatörleri salgılayarak hava yolu semptomlarını ortaya çıkartırlar [51]. Astım patolojisinde özellikle en şiddetli vakalarda, mukus hücreli hiperplazi ve inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ile karakterizedir ve bunların arasında CD4+ T hücreleri, eozinofiller ve mast hücreleri baskındır [52]. Mast hücreleri, T hücreleri ve eozinofiller, astımlı hastalarda bronşiyal düz kas lifleri içinde lokalizedir; bu durum normal kişilerde veya eozinofilik bronşiti olanlarda, astım fenotipinin belirlenmesinde önemli bir faktördür [53].

Astım, kalıcı havayolu obstrüksiyonu, hava yolu aşırı duyarlılığı ve çok hücreli enflamasyonu içerebilen kompleks bir sendromdur ve mast hücrelerinin, makrofajların, dendritik hücrelerin, nötrofillerin, eozinofillerin ve T lenfositlerin solunum yollarına ilerlemesi ile inflamatuvar bir yanıt oluşur [54]. Yardımcı T hücreleri (Th<sub>2</sub>) bağışıklık aktivasyonunda önemli bir role sahiptir. Bu da enflamasyona ve geç astıma neden olabilir. Önceden oluşturulmuş hücre dışı proteinlerin depolanması, düz kas hipertrofisi ve artmış goblet hücresi üretimiyle hava yolunun yeniden şekillenmesine neden olur ve bir kısmının serbest bırakılmasına yol açar [55].

#### 1.4.4 Astım'ın Tedavisi

Astım tedavisine yönelik güncel terapilerin çoğu insanda etkili olduğu, astımın klinik bulgularının uygun tedaviyle kontrol altına alınabileceği bilinmektedir. Belirli astım endotiplerinin tanımlanması, havayolu enflamasyonunun, allerjenlere ve viral enfeksiyonlara, epitel ve immün yanıtların genişlemesi ile birleşince, astım tedavisinde endotip spesifik tedavilerin geliştirilmesi ve uygulanması için yeni fırsatlar oluşmuştur [56]. Bulgular, semptomların astım için bilgilendirici şekilde sınıflandırılmasını, akciğer fonksiyonu ile ilaçlara cevap vermesini, bireylere özgü patofizyolojiyle özel terapiye izin verir [57]. Astım tedavisinin yönetiminin amacı, tedavinin yan etkileri olmaksızın kontrolü sağlamak ve sürdürmektir [58].

Serum periostin, eozinofilik enflamasyonun dolaylı bir ölçüsü olan biyolojik belirteçtir ve havayolu epitelyum hücreleri ve IL-4 ve IL-13 ile uyarılan akciğer fibroblastları tarafından salgılanan bir hücre dışı matriks proteindir [59]. Periostin, epitelyum tabakası altında hava yollarının kalınlaşmasına ve yeniden yapılanmasına katkıda bulunur [60]. Periostinin astımda özellikle eozinofilik formda önemli rol oynadığı varsayılmıştır [61]. İnsanlarda periostinin Th<sub>2</sub>/eozinofilik enflamasyonu uzattığı ve havayolunun yeniden yapılandırmasını şiddetlendirdiği bulunmuştur [62]. Periostinin etkilerini hedeflemek, astımın altında yatan moleküler mekanizmaları aydınlatmaya yardımcı olabilir ve astım tedavisinde etkili terapötik ajanlar geliştirilmesi için umut verici bir yöntem olabilir [63].

Omalizumab, seçici IgE'ye bağlanan ve IgE'nin yüksek afiniteli reseptörüne bağlanmasını ve IgE'yi azaltmasını önleyen hümanize monoklonal antikordur [64]. Hücre degranülasyonunda azalmaya ve aynı zamanda IgE aracılı yanıtlara katılan hücrelerin yeni inflamatuvar mediatörleri sentezlemesine neden olmaktadır [65]. Ayrıca, omalizumab'ın başlangıcından sonraki üç ay içinde, IgE için yüksek afiniteli reseptörlerin sayısında bir azalma görülmüştür; bu durum allerjen maruziyetine yanıtın hafiflemesine katkıda bulunur [66].

İnhale kortikosteroidler (ICS), astımda uzun yıllardır kullanılmaktadır. Kortikosteroidlerin astımın ölüm riskini azaltması tek başarısı değildir [67]. Bu ilaçlar iyi etkileri koruyarak, kötü etkileri azaltarak etki ederler [68].

#### **1.4.5 Astım'ın Tedavi Maliyetleri**

Astım, sosyal ve ekonomik etkiye sahip kronik bir hastalıktır. Son dönemlerde astımın yükselen ve sürekli artış gösteren bir görülme sıklığı mevcuttur. Bununla birlikte maliyet açısından önemli etkilere sahiptir.

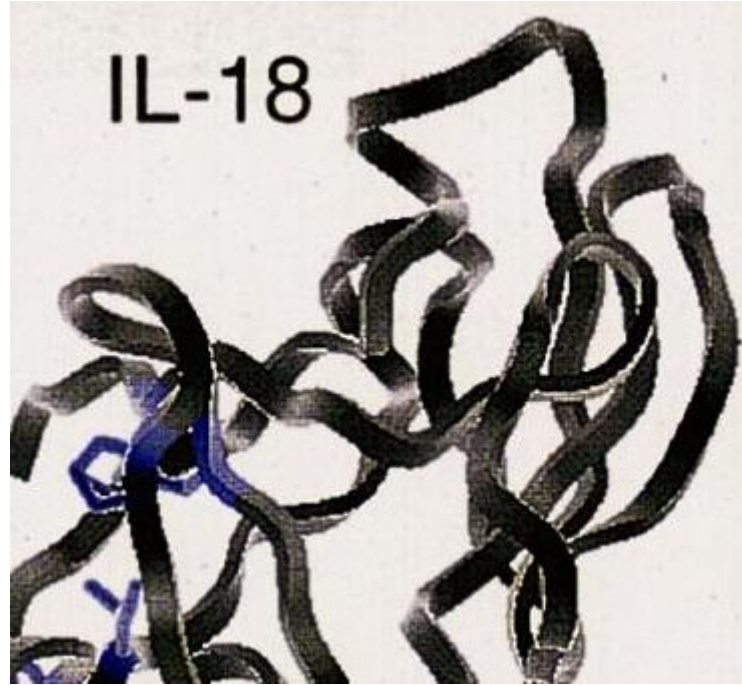
Astım hem doğrudan hem de dolaylı maliyet açısından önemli etkiye sahiptir. Avrupa'da, hastalığın maliyeti yılda 19 milyon Euro (€)'dur [64].

Astımın yılda kişi başına maliyeti 2002-2007 yılları arasında 3,259 dolar olarak hesaplanmıştır [69]. Astım kaynaklı kayıp iş günü değeri, her bir işçi için yaklaşık 301 dolar ve her bir öğrenci için 93 dolardır [70]. Dünya'da 2007 yılına ait verilere bakıldığında toplam maliyet ile 56 milyar dolar (\$) olmuştur [71].

## 2. İNTERLÖKİN-18 (IL-18)

### 2.1 İnterlökin-18 Tanımı

IL-18, Th<sub>1</sub> hücre farklılaşması ve enflamasyonu için güçlü bir sitokindir [72]. 15 aminoasit kalıntısı içeren, 192 aminoasitten oluşan pro-IL-18 olarak üretilir [73]. Aktive edilmiş monositler/makrofajlar tarafından baskın olarak salgılanan IL-18, otoimmün, enflamatuar ve enfeksiyöz hastalıklarda önemli bir rol oynayan, doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde rol oynayan bir pleiotropik sitokindir [74]. IL-18 başlangıçta IFN- $\gamma$  üretimini uyarabilme kabiliyeti nedeniyle IFN- $\gamma$  indükleyici faktör olarak (IGIF) olarak isimlendirilmiştir [75]. IL-18 geni, farede kromozom 9'da, insanlarda kromozom 11'de bulunur [76]. İnsan IL-18 geni kromozom 11q22.2-2-q22.3 üzerinde bulunur ve altı ekson, beş introndan oluşur [77]. IFN- $\gamma$  indükleyici faktör olarak bilinen IL-18,IL-1 ailesinin bir sitokinidir [78]. IL-18'in atopik hastalık etiolojisinde yer aldığı ve hem Th<sub>1</sub> hem de Th<sub>2</sub> farklılaşmasının önemli bir belirleyicisi olduğu ileri sürülmüştür [79].



Şekil 2.1: İnterlökin-18 (IL-18) yapısı [80].

İnterlökin-18, T yardımcı hücreleri tarafından interlökin-12 aracılı interferon- $\gamma$  üretiminin indüksiyonu için bir yardımcı uyaran faktördür ve çoğu periferik CD4+ T hücresi reseptör interlökin-18R alfa'yı ifade eder [81]. IL-18 IFN- $\gamma$  üretiminin uyarılması, doğal katil (NK) hücre sitotoksitesinin arttırılması ve Th<sub>1</sub> hücre farklılaşmasının uyarılması gibi IL-12 ile biyolojik özellikleri paylaşır [72]. IL-18'in sinyalizasyon aktivasyon durumu, IL-18 ile onun tuzak reseptörü, IL-18 bağlayıcı protein arasındaki bir dengeyle düzenlenir [82]. İnsanlarda alternatif bağlanma ile oluşturulan dört izoform, IL-18 bağlanma proteini vardır [83].

Alerjik hastalıkta IL-18'in rolü spesifik immünolojik mekanizmaların aracılık ettiği aşırı duyarlı bir durumdur. Klasik alerjik hastalıklarda immünoglobulin (IgE) aracılık eder, ancak diğer hücre aracılı süreçler de ortaya çıkabilir [84].

IL-18, IL-1 $\beta$  gibi, tipik bir sinyal peptidinden yoksun bir öncü formda sentezlenir ve pro-IL-18, hücre içi sistein proteinaz IL-1 $\beta$  dönüştürücü enzim (ICE) tarafından olgun ve biyoaktif IL-18'e işlenir [85]. IL-18, osteoblastlar tarafından üretilir ve T hücreleri üzerine etki eder ve GM-CSF (granülosit / makrofaj-koloni uyarıcı faktör) osteoklast öncüllerine etki eder ve osteoklast benzeri çok çekirdekli hücre oluşumunu engeller [86]. IL-18 sinyaline spesifik primer ve yardımcı reseptörleri sırasıyla IL-18R $\alpha$  ve IL-18R $\beta$ ' ye sahiptir [87].

IL-18 düzeyleri çeşitli hastalıklarda artmıştır, bazı vakalarda hastalığın patolojik nedenlerinden biri olarak görülmüştür [88]. IL-18, IL-18 reseptör protein ve IL-18BP (IL-18 bağlayıcı protein), çok benzer yapıdadırlar ancak her ikisinin dizisi birbirinden farklıdır ve farklı bir gen tarafından kodlanmıştır [89].

İnterlökin-18 (IL-18), IL-1F ailesinin bir başka temsilcisidir [90]. IL-18'in etkisi, IL-1R'ye yapısal ve fonksiyonel benzerlik gösteren IL-18R $\alpha$  reseptörü aracılığıyla gerçekleşir. IL-18'in etkin sinyal iletiminde sadece IL-18R $\alpha$  değil aynı zamanda IL-18R $\beta$  fonksiyon görür [91]. Biyoaktif IL-18, hücre proliferasyonunu ve Fas ligandı ekspresyonunu arttırmak gibi immün düzenleyici etkilere sahiptir [92].

IL-18'in pleiotropik etkileri, özellikle IFN- $\gamma$ 'nın indüklenmesi, istilacı patojenlere karşı bağışıklık için gereklidir aynı zamanda IL-18'in uygunsuz üretilmesi potansiyel olarak enflamasyona yol açabilir [93].

### **2.1.1 Interlökin-18 (IL-18)'in Biyolojik Aktivitesi**

IL-1 süper ailesinin bir üyesi olan IL-18, hücre içi proteaz kaspaz-1 tarafından aktive edilir ve monosit, nötrofil kemotaksi, T yardımcı hücre farklılaşması, T yardımcı 1 (Th<sub>1</sub>) veya T yardımcı 2 (Th<sub>2</sub>) hücreleri, TNF- $\alpha$  ve IL-1 aktivasyonu ve patogenezinde rol oynar [94]. Diğer nonkaspaz-1 mekanizmaları, örneğin proteinaz 3 mekanizması biyolojik olarak aktif IL-18 üretebilir [95]. Serbest bırakıldıktan sonra IL-18, IL-18BP veya çözünür IL-18 reseptörü (IL-18R) ile bağlanarak biyolojik aktivitesini oluşturur [77].

### **2.1.2 Hastalıklarda İnterlökin-18'in Potansiyel Rolü**

#### **2.1.2.1 Multipl Skleroz**

IL-18'in multipl skleroz patogenezindeki rolü hastaların, klinik bulguları ile ilişkili olan dolaşım ve beyin omurilik sıvısında yüksek IL-18 seviyelerinin varlığı ile ilişkilendirilmiştir [96].

#### **2.1.2.2 İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı**

İnflamatuvar bağırsak hastalığı'nın (IBD) patogenezi tam olarak anlaşılmamıştır, ancak hastalığın genetik olarak duyarlı bir konakçıdaki luminal antijenlere abartılı bir mukozal bağışıklık tepkisi sonucu olduğu yaygın olarak kabul edilen görüştür [97]. Serum ve / veya mukozal IL-18 bağlanma proteini seviyeleri, inflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastalarda yükselmektedir [98]. Tümör nekroz faktörü, IL-1, IL-12, IL-16 ve IL-18 gibi inflamatuvar sitokinleri kodlayan genler, ve



bu genlerin protein ürünleri inflamatuvar bağırsak hastalığı için belirteç olabilirler [99].

### **2.1.2.3 Sedef Hastalığı (Psoriasis)**

Psoriasis, epidermal kökenli T hücrelerinin kalıcı uyarılması sonucu ortaya çıkan kronik inflamatuvar bir durumdur [100]. IL-18 geninin promotorunda -137 tek bir nükleotid polimorfizminin sedef hastalığı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [101]. Sedef hastalığı sürecinde, IL-18 ekspresyonunda devam eden değişiklikleri düzenlemek için farklı ilaç tedavileri hakkında çok az bilgi mevcuttur [102].

### **2.1.2.4 Kanser**

Bazı kanserlerde IL-18 aktivitesini sınırlayan bir başka potansiyel mekanizma, doğal inhibitörü IL-18BP'nin artmış ekspresyonuyla ilgilidir [103]. IL-18 pleiotropik, pro-inflamatuvar bir sitokindir tümör göçü, istilası ve metastazda kritik rol oynar ve tümör gelişimi ve ilerlemesi üzerinde çift etkiye sahiptir [104]. İnterlökinlerin birçok kanser patogenezinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir [105].

### **2.1.2.5 Metabolik Sendrom**

Serum IL-18 seviyesinin insülin direnci, metabolik sendrom ve tip 2 diyabet ile pozitif ilişkili olduğu, gösterilmiştir [106]. IL-18'in metabolik sendrom olan kişilerde serumda yükseldiği ve sendromu oluşturan semptomlarla serum seviyesinin paralellik gösterdiği gösterilmiştir [107].

### 2.1.3 IL-18 Polimorfizmleri

IL-18 polimorfizmlerinden +183 A/G polimorfizmi, promotor -137 C/G, -607 A/C, -656 G/T polimorfizmleri mevcuttur. [108-111]. Çalışmamızda -607 A/C, -656 G/T polimorfizmlerini inceledi.

## 2.2 Amaç

Bu çalışmada amacımız IL-18 geni promotor -607 A/C ve -656 G/T değişiminin astım hastalığı ile ilişkisini tespit etmektir.

Polimorfizm çalışmaları bireysel tıp ve farmakogenetik alanları için temel teşkil eder. Bireyler arasında farklılık, tedavideki farklılığı beraberinde getirir. IL-18 savunma sisteminde son derece önemli bir sitokindir. Astım patolojisinde önemine dair yayınlar vardır. IL-18'in promotor polimorfizmleri, astımda merak konusudur.

Günümüzde astım tedavisi kontrol odaklı olup, hedef astım ataklarının azaltılması ve kontrolünü sağlamaktır. Astım kontrolünün iki bileşeni; semptomların kontrolü ve gelecek risklerin önlenmesidir. Semptomların kontrolü normal günlük aktivite düzeyini sağlamaktır. Bunun yanı sıra astım atakları, persistan hava akımı kısıtlanması ve ilaç yan etkileri gibi riskleri azaltmaktır. Astım tedavisinde astım semptomlarının nedenini tamamen ortadan kaldıracak etkenlere ihtiyaç vardır. Güncel tedaviler tamamen semptoma yöneliktir. Bu çalışmada IL-18 promotor polimorfizmlerinin astım hastalığının patogenezinde önemli olduğunu düşündüğümüz IL-18 sitokinin fonksiyonu üzerine etkisini araştırmayı amaçladık. IL-18 ile astım hastalığı arasındaki ilişkiyi tanımlayacak çalışmalara literatürde çok az rastlanmaktadır. Astım patogenezinde Th<sub>1</sub> ve Th<sub>2</sub> farklılaşmasında son derece önemli olan IL-18 sitokinin promotor değişiklikleri genin ekspresyonunu değiştirecektir. IL-18 çeşitli erken inflamatuvar yanıtlarda düzenleyici rol oynar. İnterlökinlerin genetik polimorfizmleri hem lokal serum seviyelerini etkilemekte hemde enflamasyon yanıtını değiştirmektedir Bu durum IL18 in astım tedavisinde bir hedef molekül olabileceğini düşündürmektedir. IL-18 tedavisinin, bağışıklık

yetersizliği olan bireylerde bile, hücre içi ve ekstraselüler patojenlerden kaynaklanan enfeksiyonlara karşı alternatif ve yararlı bir tedavi aracı olarak görülebileceğini ve astım hastalığı ile ilişkisi araştırılacaktır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

#### 3.1 Materyaller

##### 3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalar da kullanılan malzemeler; Sigma, Fermantas ve Biolabs'tan temin edilmiştir.

##### 3.1.2 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

**Tablo 3.1:** Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri

KULLANILAN GEREÇ	MODELİ
Santrifüj	Mikro 200R
Otoklav	Hirayama HV 85
Buzdolabı ve derin dondurucu	Beko, Türkiye-Uğur, Türkiye
Vorteks	Biosan Ombi-Spin
Laminar flow kabin	Logic Labconco
Etüv	Memmert in 55
Pipetler	Thermo Scientific
pH metre	Hanna Instrument
Hassas Terazı	Denver Instrument
PCR cihazı	Techne
Mikrodalga fırın	Beko, Türkiye
Manyetik karıştırıcı	Ika C-mag

### 3.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Çalışmanın deneysel kısımlarında aşağıda belirtilen çözeltiler hazırlanmıştır.

**Tablo 3.2:** DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

<b>Nüklei Lizis Buffer</b> 10mM Tris Base, 400mM NaCl, 2mM EDTA (pH=8,2)	100µl Tris Baz, 4ml NaCl ve 40µl Na <sub>2</sub> EDTA 5860µl distile suda çözülür. 121°C'de 20 dakika (1,02 atm basınçta) otoklavda steril edilir. +4°C'de saklanır.
<b>Sature Amonyum Asetat (NH<sub>4</sub>Ac)</b>	74g NH <sub>4</sub> Ac, destile su ile 100ml'ye tamamlanır. Magnetik karıştırıcıda yaklaşık 40°C'de çözülür. Filtrasyon ile steril edilir. +4 °C'de saklanır.
<b>Proteinaz K 10mg/ml</b>	0,01g Proteinaz K 1ml distile suda çözülür.-20°C'de saklanır.

**Tablo 3.3:** PCR için kullanılan çözeltiler

<b>dNTP karışımı</b> 10 mM	Her bir nükleotitten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10µl alınır ve steril su eklenerek 100µl'ye tamamlanır.
<b>Primer Forward Sulandırılması</b> 100pmol/µl için 1193,60µl Primer Forward	50pmol/µl için 2387,2µl steril distile su ile primer forward karıştırılır. Oluşan karışım 2 ependorfta eşit olarak saklanır.
<b>Primer Reverse Sulandırılması</b> 100pmol/µl için 986,40µl Primer Reverse	50pmol/µl için 1972,8µl steril distile su ile primer reverse karıştırılır. Oluşan karışım 2 ependorfta eşit olarak saklanır.

**Tablo 3.4:** IL-18 PCR'ı için kullanılan çözeltiler

<b>dNTP karışımı</b> 10 mM	Her bir nükleotitten(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)10µl alınır ve steril distile su eklenerek 100µl'ye tamamlanır.
<b>Primer Forward Sulandırılması</b> 100pmol/µl için 171µlPrimer Forward	50 pmol/µl için 342µl steril distile su ile primer forward karıştırılır. Oluşan karışım 2 ependorfta eşit olarak saklanır.
<b>Primer Reverse Sulandırılması</b> 100pmol/µl için 298µlPrimer Reverse	50 pmol/µl için 596µl steril distile su ile primer reverse karıştırılır. Oluşan karışım 2 ependorfta eşit olarak saklanır.

**Tablo 3.5:** Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

<b>5X/L TAE tamponu</b> pH:8,00	242g Tris Baz, 57,1ml Asetik asit, (%100 Asetik asit), 100ml 0,5M EDTA (pH:8,00) tartılır. Üzeri distile su ile 1litreyetamamlanır.
<b>DNA ladder</b> 100µl DNA ladder	100 µL DNA ladder (10µl),6X DNA loading dye (10µl) 40µl distile suda çözülür.
<b>%1.5'luk agaroz jel</b>	0,75 gram agaroz tartılır 50ml TAE'de çözülür.40-45°C'ye soğuduktan sonra 2,5 etidyum bromür eklenerek tanka dökülür.

## **3.2 Yöntemler**

### **3.2.1 Malzemelerin temizliği ve ortamın sterilizasyonu**

Isıya dayanıklı pipet uçları, cam malzemeler 121°C' de 20 dakika (1,02 atm basınçta) otoklavda steril edildi. Otoklavdan alınan cam malzemelerin kuruması için etüv de 180°C' de 90 dakika bekletildi.

Çalışmaya başlamadan önce tüm malzemeler ve çalışılacak yüzey %70 etil alkol ile steril edildi.

### **3.2.2 Genotip Belirlenmesi**

#### **3.2.2.1 Kandan Genomik DNA İzolasyonu**

Bu çalışma İnvitrogen Pure Genomic DNA Mini Kit (ABD)adlı üretici firma tarafından belirtilen protokole göre uygulandı.

- Kuru blok ısıtıcı 55°C'ye getirildi.
- 1,5ml'lik ependorflara 20µl Proteinaz K kondu.
- Hemogram tüplerinden alınan 200µl kan eklendi.
- Üzerine 20µl RNase A kondu ve kısaca vortekslendi.
- Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
- Üzerine 200µl Lizis Buffer konuldu ve 10 saniye vortekslendi.
- 55°C' de 10 dakika inkübe edildi.
- Oluşan lizata 200µl %100'lük etanol ilave edildi ve vortekslendi.
- Oluşan lizat kolon tüplere aktarıldı.
- Lizat tüpü 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

- Alttaki koleksiyon tüpü atıldı ve yerine yenisi konuldu.
- Kolon tüpün içine 500µl Wash Buffer 1 eklendi.
- 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Alttaki koleksiyon tüpü atıldı ve yerine yenisi konuldu.
- Kolon tüpün içine 500µl Wash Buffer 2 eklendi.
- Maksimum devirde 3 dakika santrifüj edildi ve altındaki koleksiyon tüpleri atıldı.
- Kolon tüpler 1,5ml'lik tüpe yerleştirildi.
- 100µl Elution Buffer konuldu ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
- Maksimum devirde santrifüj edildi.
- Kolon tüpler atıldı, altında kalan sıvı DNA. Amplifikasyon işlemi yapıncaya kadar DNA örnekleri -20°C'de saklandı.

### **3.2.2.2 PZR Amplifikasyonu (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)**

#### **3.2.2.2.1 Primer Dizaynı**

IL-18 -656 ve -607 promotor bölgesi primer tasarımı için [www.restrictionmapper.or](http://www.restrictionmapper.or) ve [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) adresleri kullanıldı. Tasarlanan primerlerin  $T_m$  sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ayrıca saç tokası yapısı oluşturmamasına aynı zamanda nükleotidlerin dağılımının eşit olmasına iyice dikkat edildi. Tasarlanan primerler databanklarda (Genbank +EMBL+ DDBJ+PDB dizileri) bulunan DNA dizileri blast yapılarak promotorda -607 ve -656 bölgesine en yakın benzerliği gösterdiği bulundu.



### 3.2.2.2.2 PZR (Polimerez Zincir Reaksiyonu)

-607 promotor da gözlenen polimorfizmin, PCR çalışması için kullanılan rs1946518 primer ürünleriyle birlikte son hacim 50 $\mu$ l olacak şekilde aşağıdaki bileşenler konuldu.

Steril distile su	32,5 $\mu$ l
dNTP	1 $\mu$ l
Buffer	5 $\mu$ l
Primer Forward (100 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Primer Reverse (100 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4 $\mu$ l
Kalıp DNA	5 $\mu$ l
Taq DNA polimeraz	0,5 $\mu$ l

Yukarıda verilen bileşenler konularak kısaca karıştırıldı. Tüpler PCR cihazına yerleştirildi. Uygun program seçilerek reaksiyon başlatıldı.

94 °C	5 Dakika	
94 °C	1 Dakika	} 35 Döngü
60,5 °C	1 Dakika	
		21

72 °C	1 Dakika
72°C	10 Dakika
+4°C	∞

PCR sonuçları %1,5'luk agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

-656 promotor da gözlenen polimorfizmin, PCR çalışması için kullanılan rs1946519 primer ürünleriyle birlikte son hacim 50µl olacak şekilde aşağıdaki bileşenler konuldu.

Steril distile su	33,7µl
dNTP	1µl
Buffer	5µl
Primer Forward (100 pmol/µl)	1µl
Primer Reverse (100 pmol/µl)	1µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	3µl
Kalıp DNA	5µl
Taq DNA polimeraz	0,3µl

Yukarıda verilen bileşenler konularak kısaca karıştırıldı. Tüpler PCR cihazına yerleştirildi. Uygun program seçilerek reaksiyon başlatıldı.

94 °C	5 Dakika	
94 °C	1 Dakika	35 Döngü
52,5 °C	1 Dakika	
72 °C	1 Dakika	
72°C	10 Dakika	
+4°C	∞	

PCR sonuçları %1,5'luk agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

### 3.2.2.3 Restriksiyon Endonükleaz Kesim Mekanizması

Restriksiyon endonükleaz enzimleri, DNA dizilerini spesifik olarak tanıyan bu dizilimlere uygun yerleri ve DNA'yı kesen enzim gruplarına palindromik diziler de denir. Restriksiyon endonükleazların biyolojik amacı, bakteriyel savunmada oynadıkları roldür. Ayrıca bakteriyi virüslerle birlikte yabancı DNA'lardan korumakla görevlidirler. Mikroorganizmalar kendi restriksiyon endonükleazlar sayesinde kendi DNA'larını kesmemesi için de çeşitli modifikasyonlara uğramışlardır.

Restriksiyon endonükleaz'ların isimlendirilmesinde önce enzimin elde edildiği bakteri cinsinin ilk harfi ile sonrasında bakteri türünün ilk iki harfi daha sonrada soya ait bir harf ile ilk izolasyondan başlayarak Romen rakamı ile enzimin izolasyon sırası gösterilir.

Restriksiyon endonükleazlar, DNA haritası çıkartılmasında, ve populasyon polimorfizminin analizinde, DNA molekülünün yeniden inşa edilmesinde, problemlerin hazırlanmasında, mutant organizmaların meydana getirilmesinde, DNA'nın modifikasyon statülerinin analizinde gözlenmektedir.

Restriksiyon endonükleazların modifikasyon sistemlerinin tipleri vardır. Bunlar tip I sistemler, tip II sistemler ve tip III sistemleridir.

Tip I sistemler; en karmaşık sistemlerdir. R (restriksiyon), M (modifikasyon) ve S (spesifite) olmak üzere 3 proteinden oluşmaktadır. Bu sistem hem DNA'yı keser hemde metillemektedir. Ayrıca her iki reaksiyonda ATP gerektirir ve kesim noktası

tanıma yerinden oldukça uzakta olmaktadır. Tanıma bölgelerinden en azından 1000 baz çifti uzaklıktaki farklı bölgeleri kesmektedir. Tanıma bölgesi asimetriktir ayrıca 6-8 nükleotidlik bir boşlukta ayrılan iki kısımdan meydana gelmektedir. İlk olarak 3-4 nükleotit içeren ve 4-5 nükleotit içeren şekilde iki kısımdan oluşmaktadır.

Tip II sistemler; çok basit ve yaygın olarak kullanılan sistemlerdir. Ayrı proteinler olarak kodlanır ve birbirlerinden bağımsız olarak etkileşim gösterirler. Birden çok altbirimden oluşmuştur. Kendi etkinlikleriyle sürekli olarak yarışır ve her iki protein aynı tanıma bölgesini tanımaktadır. Kesim genellikle tanıma dizisinin içinde ya da ona yakın yerlerde oluşmaktadır. Bu sistemler genellikle laboratuvarlarda gen klonlanması ve DNA analizinde kullanılmaktadır.

Tip III sistemler; R (restriksiyon) ve M (modifikasyon) proteinleri ile kompleks bir yapı oluşturmaktadır. DNA'yı tanıma yerinden 20-30 baz uzakta kesmektedirler. Mekanizmalardan farklı olarak metilasyon sadece bir iplik üzerinde meydana gelir. Ve aynı yeri metilleyerek kendi kendine yarışmaktadır.

Çalışmamızda yukarıda anlatıldığı gibi restriksiyon endonükleazlardan tip II sistemleri kullanılmıştır.

**Tablo 3.6:** TruI ve MwoI enzimlerinin kesim yerleri

TruI	5' T↓TAA3' 3'AAT↑T5'
MwoI	5'GCNNNN↓NNGC3' 3'CGNN↑NNNNNCG5'

### **3.2.3 DNA'nın Analizi**

#### **3.2.3.1 Spektral Yöntem**

Ultraviyole ışığının en mutajenik olduğu dalga boyu 260 nanometredir. Hem DNA hem RNA bu dalga boyunu emer. Bu dalga boyundaki emme derecesi nükleik asitlerin bir ölçüsüdür. DNA miktarı spektrofotometrede 260nm'de ölçülür. 1 optik densite (OD) çift iplikli DNA molekülü için 50µg/ml'ye karşılık gelmektedir. DNA saflığını belirlemek amacıyla DNA'ların 260 ve 280nm dalga boyunda ölçümü yapıldı. A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> oranından DNA saflığı belirlendi. Saf DNA'larda bu oran 1,75-1,8 olmalıdır. Çalışmamda DNA miktarlarının belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{Sulandırma oranı} \times 50 \quad (3.1)$$

#### **3.2.3.2 Agaroz Jel Elektrofrezisi**

0,75 gram hassas terazide tartılan agaroz erlenmayerin içine döküldü. 50ml 1X/LTAE (Tris-Acetate-EDTA) tamponu erlenmayerin içine ilave edildi. Mikrodalga fırında yaklaşık 2 dakika ısıtıldı. Tampon içerisindeki agaroz eridikten sonra mikrodalga fırından alındı. 40-45°C'ye kadar soğutuldu. Jelin içersine 2,5µl etidyum bromür eklendi ve çalkalayarak karışması sağlandı. Döküm aygıtı içine jel tepsi yerleştirildi. Kalıp oluşturmak için bir jel tepsinin açık kenarlarına band konuldu. Kuyuları oluşturmak için jel kalıp içine uygun bir tarak yerleştirildi. Jel kalıp içine erimiş agaroz döküldü. Jel kalınlığı yaklaşık 3-5mm olacak şekilde yerleştirildi. Oda sıcaklığında 30-35 dakika jelin polimerleşmesi beklendi. Taraklar çıkarılarak tanka yerleştirildi. Tankın içine 0,5X/L TAE jeli kapatacak

şekilde döküldü. Kuyucuklara marker ve DNA'lar yüklendi. 100V elektrik akımı verilerek, 30 dakika DNA'lar yürütüldü. UV ışık altında jel görüntüleme sisteminde görüntülendi ve bilgisayara kayıt edildi.

Genomik DNA'lar %1,5'lik jelde 100bp marker kullanılarak yürütüldü. Yükleme için 5µl genomik DNA ve 1µl yükleme boyası(6X DNA Loading Dye) kullanıldı.

### 3.2.3.3 Restriksiyon Endonükleaz İle Kesim

**Tablo 3.7:** TruI enzimi ile kesim

	PCR Ürünü
Su	18µl
10X Buffer R	2µl
DNA	10µl (0,2 µg)
TruI Enzim	1µl (10 U/µl)

Yukarıdaki Tablo 3. 7'de gösterildiği gibi malzemeler konuldu. Sonrasında hafifçe karıştırılıp, spin yapıldı. 65°C'de termal blokta 1 gece inkübe edildi. İnkübe olduktan sonra 80°C'de 20 dakika inaktive edildi. TruI Restriksiyon Endonükleaz ile kesilen DNA'lar %3'lük agaroz jelde 100bp marker kullanılarak yürütüldü.

**Tablo 3.8:** MwoI enzimi ile kesim

	PCR Ürünü
Su	17µl
10X FastDigest Green Buffer	2µl
DNA	10µl (0,2 µg)
FastDigest Enzim	1µl (10 U/µl)
Total Hacim	30µl

Yukarıda Tablo 3. 8’de gösterildiği gibi total hacim 30µl olacak şekilde konuldu. Sonrasında hafifçe karıştırıldı. 37°C’de termal blokta 25 dakika inkübe edildi. İnkübe olduktan sonra 65°C’de 5 dakika inaktive edildi. MwoI Restriksiyon Endonüklezla kesilen DNA’lar %3’lük agaroz jelde 100bp marker kullanılarak yürütüldü.

### 3.2.4 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için NCSS ( Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysyille, Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tamamlayıcı istatistiksel metotların (Ortalama, Standart Sapma, Medyan, Frekans. Oran, Minimum, Maksimum) yanı sıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren değişkenlerin iki grup karşılaştırılmasında Student t Test kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Pearson Ki-Kare testi, Fisher-Freeman-Halton testi ve Fisher’s Exact test kullanıldı. Genotip -607 ve -656

dağılımları Hardy-Weinberg eşitliği ile değerlendirildi. Anlamlılık en az  $p < 0,05$  düzeyinde değerlendirildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1 Hasta ve Sağlıklı Kontrol Grubu Özellikleri

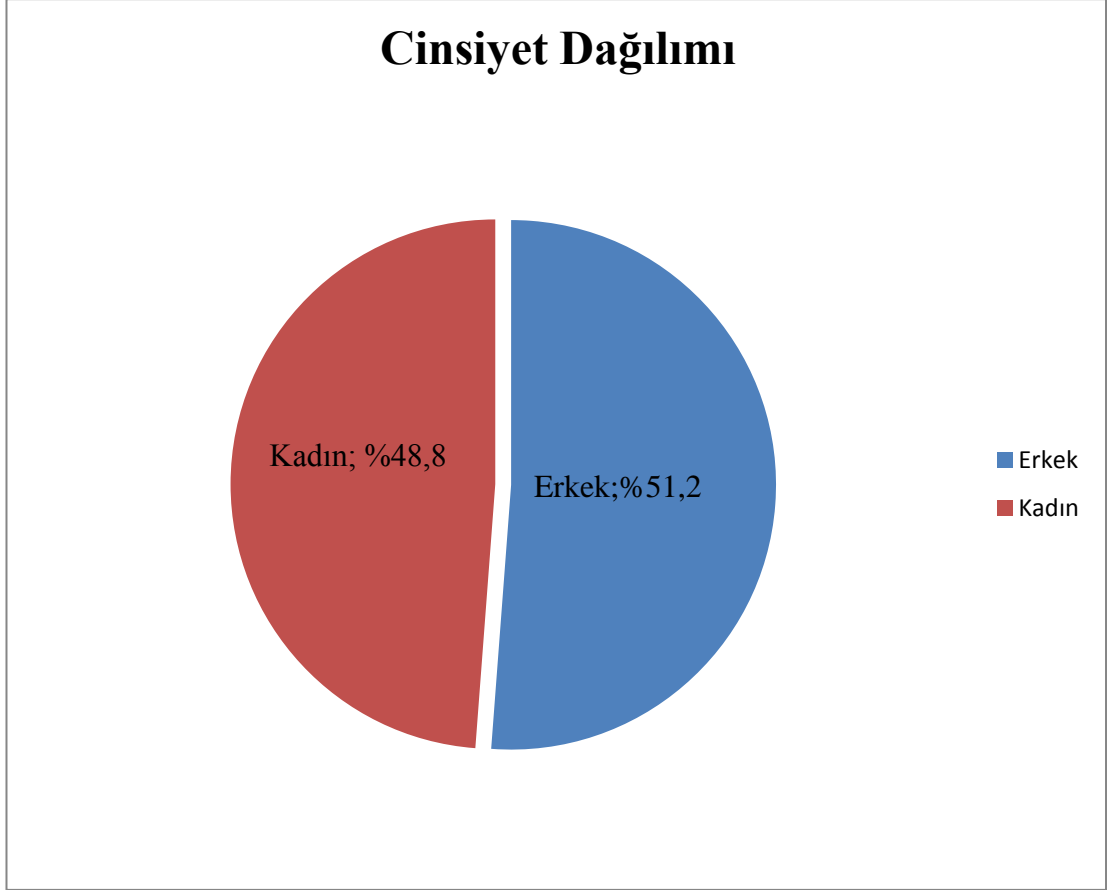
Çalışma için Balıkesir Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı. Çalışmaya 100 astım hastası ve herhangi bir kronik hastalığı olmayan 101 kontrol eklendi. Kontrol grubunda kronik arter hastalığı, karaciğer yada böbrek hastalığı, aktif enfeksiyon, astım, majör depresyon, neoplastik hastalık gibi herhangi bir kronik hastalığı yoktu. Çalışmamızda kullanılan kan örnekleri Balıkesir Üniversitesi Araştırma Hastanesi Göğüs Hastalıkları Polikliniğinden temin edildi. Tüm hasta ve kontrol grubundan genomik DNA izole edilerek çalışma başlatıldı. Kontrol grubu ve hasta grubuna ait aşağıdaki tabloda cinsiyet ve yaş ortalamaları Tablo 4. 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1:** Demografik özelliklerin dağılımı

Demografik özellikler		n (%)
Yaş (yıl)	Min-Mak (Medyan)	20-76 (55)
	Ort±Ss	53,74±11,46
Cinsiyet	Erkek	103(51,2)
	Kadın	98 (48,8)
BKI (km/m <sup>2</sup> )	Min-Mak (Medyan)	18-51 (27)
	Ort±Ss	28,25±6,30
Sigara içme durumu	Yok	164 (81,6)
	Var	37 (18,4)
Sigara sayısı (n=37)	Min-Mak (Medyan)	3-60 (10)
	Ort±Ss	18,35±16,18

Olguların %51,2'si (n=103) erkek, %48,8'i (n=98) kadındır ve yaşları 20 ile 76 arasında değişmekte olup, ortalama 53,74±11,46 yıldır.

## Cinsiyet Dağılımı



Şekil 4.1: Cinsiyet dağılımı

BKI (Vücut Kitle İndeksi) ölçümleri 18 ile 51 kg/m<sup>2</sup> arasında değişmekte olup, ortalama 28,25±6,30 kg/m<sup>2</sup>'dir.

Olguların %18,4'ü (n=37) sigara içmektedir. İçilen sigara sayıları 3 ile 60 arasında değişmekte olup, ortalama 18,35±16,18 olarak bulunmuştur.

**Tablo 4.2:** Demografik özelliklerin dağılımı

		Hasta grubu (n=100)	Kontrol grubu (n=101)	p
Yaş (yıl)	Min-Mak (Medyan)	20-76 (54)	26-75 (57)	<sup>a</sup> 0,155
	Ort±Ss	52,58±12,26	54,88±10,54	
Cinsiyet; n(%)	Erkek	53 (53,0)	50 (49,5)	<sup>b</sup> 0,620
	Kadın	47 (47,0)	51 (50,5)	
BKI(kg/m <sup>2</sup> )	Min-max (medyan)	20-51 (30)	18-39 (25)	<sup>a</sup> 0,001**
	Ort±Ss	31,22±6,66	25,31±4,21	
Sigara içme durumu; n(%)	Yok	67 (67,0)	97 (96,0)	<sup>b</sup> 0,001**
	Var	33 (33,0)	4 (4,0)	
FEV 1 (Birinci saniye zorlu ekspirasyon volümü)	Min-max (medyan)	23-131 (81)	68-116 (89)	<sup>a</sup> 0,001**
	Ort±Ss	79,27±21,76	91,16±10,45	
FEV C (Zorlu vital kapasite)	Min-max (medyan)	31,119 (86)	65-136 (90)	<sup>a</sup> 0,001**
	Ort±Ss	84,05±18,57	91,00±12,32	
FEV 1/FEV C	Min-max (medyan)	42-129 (78,5)	66-109 (90)	<sup>a</sup> 0,001**
	Ort±Ss	78,34±11,05	88,88±7,11	

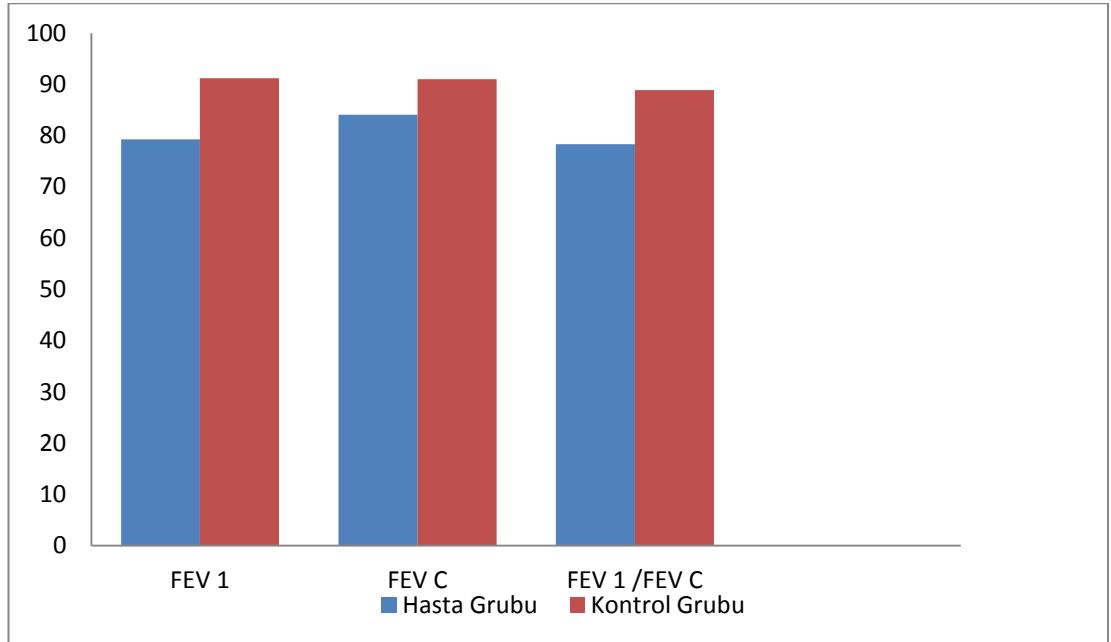
<sup>a</sup> Student t Test <sup>b</sup> Pearson Chi-Square Test \*\* p<0,01

Gruplara göre yaş ve cinsiyet dağılımı istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir (p>0,05).

Hasta grubu olguların BKI ölçümleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ( $p=0,001$ ;  $p<0,01$ ).

Gruplara göre sigara içme oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmış olup; hasta grupta sigara içme oranı kontrol grubundan yüksek bulunmuştur ( $p=0,001$ ;  $p<0,01$ ).

Hasta grubu olguların FEV 1 ölçümleri ( $p=0,001$ ), FEV C ölçümleri ( $p=0,002$ ) ve FEV 1/ FEV C oranları ( $p=0,001$ ) kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ( $p<0,01$ ).



Şekil 4.2: Gruplara göre FEV 1, FEV C ve FEV 1/FEV C ölçümlerinin dağılımı

## 4.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bölüm 3.2.2.2.2’de anlatıldığı gibi izole edilen genomik DNA’lar -656 ve -607 forward ve reverse primerleri kullanılarak yapıldı.

**Tablo 4.3: -607 Forward (Primer Dizisi)**

Dizi	Moleküler Ağırlık	Uzunluk	TM
5'-GTCCTGAA... TTATAAAG-3'	6340 g/mol	21	49°C

**Tablo 4.4: -607 Reverse (Primer Dizisi)**

Dizi	Moleküler Ağırlık	Uzunluk	TM
5'-CTATTCCT...TGATAGCA-3'	6116 g/mol	20	48°C

**Tablo 4.5: -656 Forward (Primer Dizisi)**

Dizi	Moleküler ağırlık	Uzunluk	TM
5'-CCGGCAAG... CTGTTGCAG3'	7410g/mol	24	57°C

**Tablo 4.6:-656 Reverse (Primer Dizisi)**

Dizi	Moleküler ağırlık	Uzunluk	TM
5'-CTATTCCT...GACTGACC-3'	9212 g/mol	30	60°C

#### 4.2.1 MgCl<sub>2</sub> Optimizasyonu

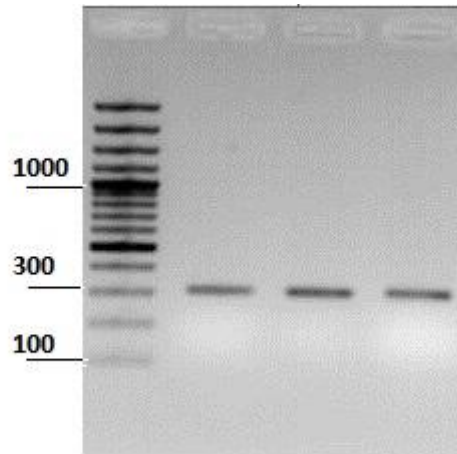
Genomik DNA'lardan yapılan PCR işleminde farklı MgCl<sub>2</sub> oranları kullanıldı. MgCl<sub>2</sub> olarak 1 mM, 2 mM, 4 mM ve 6 mM olarak dört farklı şekilde yapıldı. %1,5' luk agaroz jel elektroforezinde yürütüldü.

#### 4.3 Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları

Tek nükleotid polimorfizmlerinin moleküler yöntemlerle araştırılmasında PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) yöntemi kullanıldı.

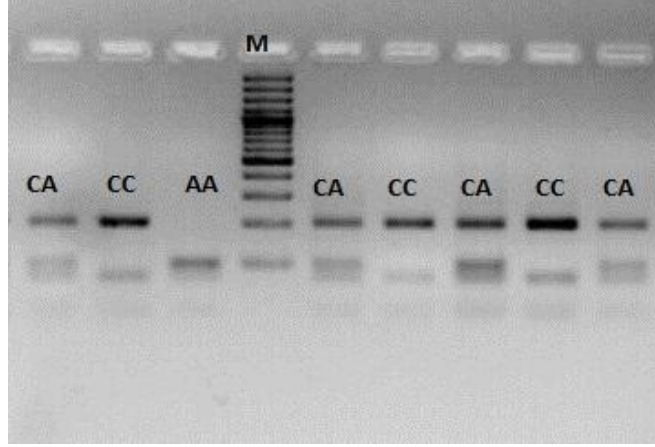
##### 4.3.1 IL-18 Geni -607 C/A Tek Nükleotid Polimorfizmi

IL-18 geni promotor -607 C/A tek nükleotid polimorfizm varlığını araştırmak amacıyla PCR-RFLP yöntemi kullanıldı. Hasta ve kontrol grubundan oluşan DNA'lar kullanılarak polimorfizmden sorumlu olan gen bölgesi çoğaltıldı. Çoğaltılması sonucu oluşan 303bp'lik bölgenin %1,5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 3. 1'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.3:** -607 promotor gen bölgesinin çoğaltılarak PCR edildikten sonra 100 baz çifti marker kullanılarak elde edilen %1,5'luk agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

Sonrasında çoğaltılan bölgenin TruI restriksiyon endonüklez enzimi ile kesilerek polimorfizm varlığına bakıldı. Kesim sonucu C allel durumunda 199bç, 75bç ve 33bç'lik kesim parçaları oluşmakta idi. Kesim sonucu A allel durumunda ise 101bç, 98bç, 75bç ve 29 baz çifti oluşmaktaydı. Kesilen ürünlerin % 3'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4. 4'de gösterilmektedir.



**Şekil 4.4:** -607 promotor gen bölgesinin TruI enzimi ile 100 baz çifti marker kullanılarak elde edilen %3'lük jel görüntüsü.

**Tablo 4.7:** -607 kesim sonucu beklenen bant büyüklükleri

Beklenen Bant Büyüklükleri			
Genotip	AA	CC	CA
Bant Büyüklükleri	101 bç. 98 bç. 75 bç. 29 bç.	199 bç. 75 bç. 29 bç.	199 bç. 101 bç. 98 bç. 75 bç. 29 bç.

**Tablo 4.8:** IL-18 gen promotorunda -607 C/A değişimi

```
CTTTATAACCTCATTCAGGACTTCCCCTTCCTCCCAAGCTCAATATGGTGTC
AAAGATAGTTGATACAGGCCATTAAGATTTACTTTTCAGTGGAACAGGAGT
CCATTTTCATAAACTTCTTTATCTGCTGTATCAGATGCAAGCCACACGGA
TACCATCATTAGAATTTTATcTAATAATTTTACACTTTCTGCAACAGAAAG
TAAGCTTGGGGAGAGGGATACCAAATTCAGGTAAGAGGGCAAATATTTA
CTTGCAGTTTCCAGTGTTAACTTTCTATTCTGGAATGATAGCAA
```

IL-18 gen promotorunda -607'deki sitozinin polimorfizm sonucu adenine dönüşecektir.

#### 4.3.1.1 -607 A/C Nükleotid İçin H-Weinberg Eşitliği

G.H. Hardy ve Wilhelm Weinberg'e göre ideal koşullarda allel frekanslarından genotip frekansları hesaplanabilir,

C ve A gibi iki allel için Hardy-Weinberg binomial dağılımı:

$$(4.1)$$

$P = C$  frekansı ve  $q = A$  frekansı,  $p + q = 1$

- $P^2 CC$
- $2pq CA$
- $q^2 AA$

**Tablo 4.9:** Hasta grubunda -607 A/C nükleotid için H- Weinberg eşitliği.

Hasta Grubu	Gözlenen Frekans		Beklenen Frekans	
	n	%	n	%
CC	49	49,0	52	52,0
CA	46	46,0	40	40,0
AA	5	5,0	8	8,0



Allel frekansları; C alleli için 0,72 A alleli için ise 0,28 oranında saptanmıştır. Beklenen ve gözlenen frekanslara göre hesaplanan Ki-kare değerimiz,  $\chi^2=2,20$  olarak saptanmış olup, Ki-kare değerinden küçük bulunmuştur. Populasyon Hardy-Weinberg dengesindedir ( $p=0,05$ ).

**Tablo 4.10:** Kontrol grubunda -607A/C nükleotid için H-Weinberg eşitliği.

Kontrol Grubu	Gözlenen Frekans		Beklenen Frekans	
	n	%	n	%
CC	64	63,3	65	64,3
CA	34	33,7	32	31,7
AA	3	3,0	4	4,0

Allel frekansları C alleli için 0,80 A alleli için ise 0,20 oranında saptanmıştır. Beklenen ve gözlenen frekanslara göre Ki-kare değerimiz,  $\chi^2=0,39$  olarak saptanmış olup, tablo Ki-kare değerinden küçük bulunmuştur. Populasyon Hardy-Weinberg dengesindedir ( $p>0,05$ ).

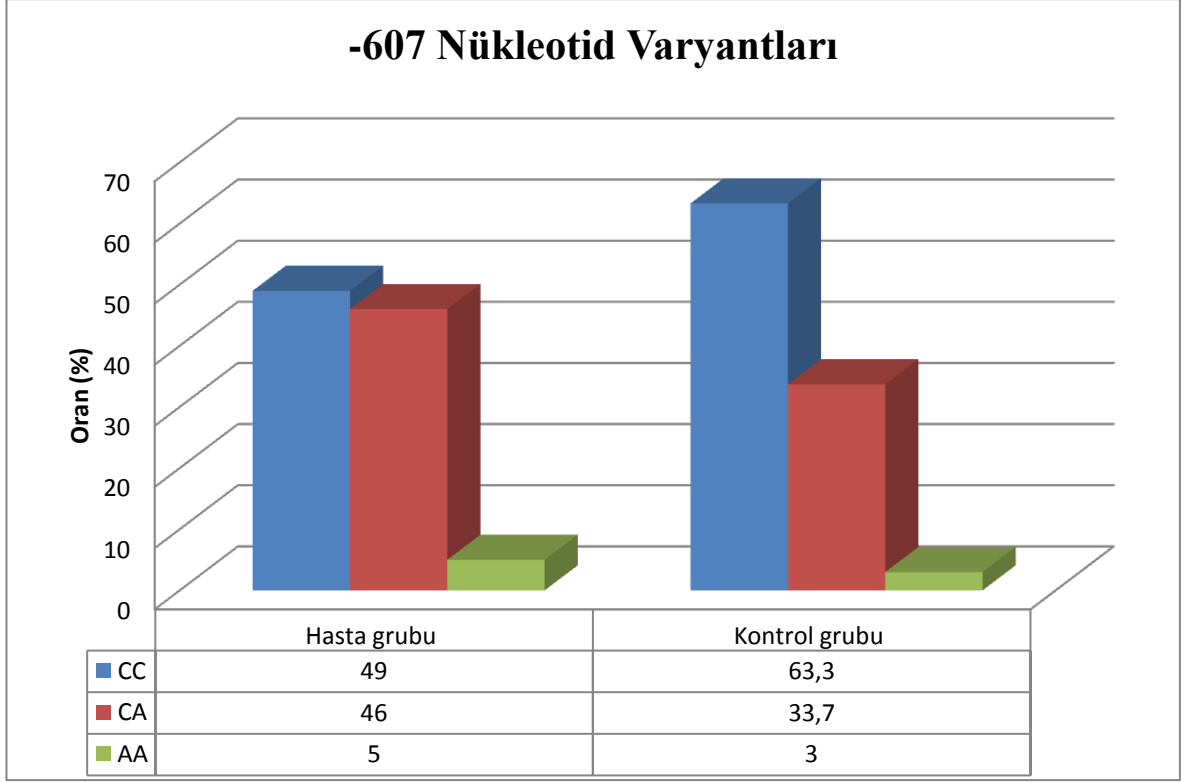
### 4.3.1.2 -607 Nükleotid Varyantlarının Değerlendirilmesi

**Tablo 4.11:** -607 nükleotid varyantlarının değerlendirilmesi.

-607 nükleotid		Hasta grubu (n=100)	Kontrol grubu (n=101)	p	
CC		49 (49,0)	64 (63,3)		
CA		46 (46,0)	34 (33,7)		
AA		5 (5,0)	3 (3,0)		
Varyant	CC	Yok	51 (51,0)	37 (36,6)	<sup>b</sup> 0,040*
		Var	49 (49,0)	64 (66,3)	
	CA	Yok	54 (54,0)	67 (66,3)	<sup>b</sup> 0,074
		Var	46 (46,0)	34 (33,7)	
	AA	Yok	95 (95,0)	98 (97,0)	<sup>d</sup> 0,498
		Var	5 (5,0)	3 (3,0)	
Allel	C	144 (72,0)	162 (80,2)	<sup>b</sup> 0,054	
	A	56 (28,0)	40 (19,8)		

<sup>b</sup>Pearson Chi-Square Test    <sup>d</sup>Fisher's Exact Test    \*p<0,05

Hasta grubu olguların %49,0'unda (n=49)CC, %46,0'sında (n=46) CA ve %5,0'inde (n=5) AA varyantı gözlenmiştir. Kontrol grubu olguların %63,3'ünde (n=64) CC, %33,7'sinde (n=34) CA ve %3,0'ünde (n=3) AA varyantı gözlenmiştir.



**Şekil 4.5:-607 nükleotid varyantlarının dağılımı**

Gruplara göre CC varyant oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmış olup; hasta grupta CC varyant oranı kontrol grubundan düşük bulunmuştur ( $p=0,040$ ;  $p<0,05$ ).

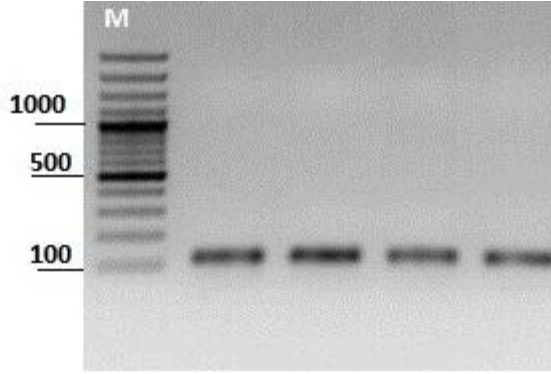
Gruplara göre CA varyant oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmazken; hasta grupta CA varyant oranının kontrol grubundan yüksek olması dikkat çekicidir ( $p=0,074$ ;  $p>0,05$ ).

Gruplara göre AA varyant oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p>0,05$ ).

Hasta grupta A alleli oranının kontrol grubundan yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber, anlamlılığa yakın bulunmuştur ( $p=0,054$ ;  $p>0,05$ ).

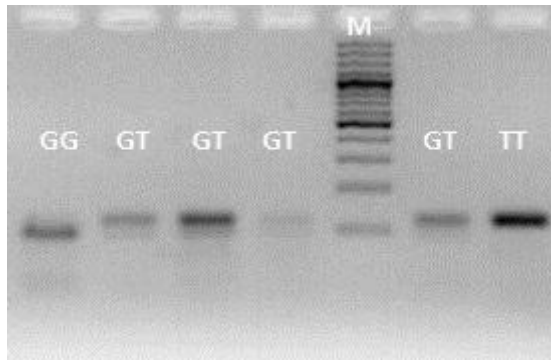
### 4.3.2 IL-18 Geni -656 G/T Tek Nükleotid Polimorfizmi

IL-18 geni promotor -656 G/T tek nükleotid polimorfizm varlığını araştırmak amacıyla PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemi kullanıldı. Hasta ve kontrol grubundan oluşan DNA'lar kullanılarak polimorfizmden sorumlu olan gen bölgesi çoğaltıldı. Çoğaltılması sonucu oluşan 125 bç'lik bölgenin %1,5'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4. 6'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.6:** -656 promotor gen bölgesinin PCR ile çoğaltıldıktan sonra edilen ve 100 baz çifti marker kullanılarak elde edilen %1,5'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Sonrasında çoğaltılan bölgenin MwoI restriksiyon endonüklez enzimi ile kesilerek polimorfizm varlığına bakıldı. Kesim sonucu 92 bç ve 33 bç'lik RFLP oluşmakta idi. Kesilen ürünlerin % 3'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4. 7'de gösterilmektedir.



**Şekil 4.7:** -656 promotor gen bölgesinin MwoI enzimi ile 100 baz çifti marker kullanılarak elde edilen %3'lük jel görüntüsü.

**Tablo 4.12:** -656 kesim sonucu beklenen bant büyüklükleri.

Beklenen Bant Büyüklükleri			
Genotip	TT	GG	GT
Bant Büyüklükleri	125 bç.	92 bç.	125 bç.
		33bç.	92 bç.
			33 bç.

**Tablo 4.13:** IL-18 gen promotorunda -656 G/T değişimi.

```
CACTTTCTGCAACAGAAAGTAAGCTTGCGGAGAGGGgTACCAAATTCG
GTAAGAGGGCAAATATTTACTTGCAAGTTCCAGTGTTAAACTTTCTATT
CCTGGAATGATAGCAAAGACTGACC
```

IL-18 gen promotorunda meydana gelen polimorfizm sonucu -656'de guanin timine dönüşecektir.

#### 4.3.2.1 -656 G/T nükleotidi için H-Weinberg Eşitliği

G.H. Hardy ve Wilhelm Weinberg'e göre ideal koşullarda allel frekanslarında genotip frekansları hesaplanabilir,

G ve T gibi iki allel için Hardy-Weinberg binomial dağılımı:

$$(4.2)$$

P=G frekansı ve q=T frekansı,  $p + q=1$

- $P^2$  GG
- $2pq$  GT

- $q^2$  TT

**Tablo 4.14:** Hasta grubunda -656 G/T nükleotidi için H-Weinberg eşitliği.

Hasta Grubu	Gözlenen Frekans		Beklenen Frekans	
	n	%	n	%
GG	49	49,0	46	46,0
GT	37	37,0	44	44,0
TT	14	14,0	10	10,0

Allel frekansları G alleli için 0,68 T alleli için 0,32 oranında saptanmıştır. Beklenen ve gözlenen frekanslara göre hesaplanan Ki-kare değerimiz  $x^2=2,91$  olarak saptanmış olup, tablo Ki-kare değerinden küçük bulunmuştur. Populasyon Hardy-Weinberg dengesindedir ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.15:** Kontrol grubunda -656 G/T nükleotidi için H-Weinberg eşitliği.

Kontrol Grubu	Gözlenen Frekans		Beklenen Frekans	
	n	%	n	%
GG	55	54,5	57	56,4
GT	41	40,5	38	37,6
TT	5	5,0	6	6,0

Allel frekansları G alleli için 0,75 T alleli için 0,25 oranında saptanmıştır. Beklenen ve gözlenen frekanslara göre hesaplanan Ki-kare değerimiz,  $x^2=0,47$  olarak saptanmış olup, tablo Ki-kare değerinden küçük bulunmuştur. Populasyon Hardy-Weinberg dengesindedir ( $p>0,05$ ).

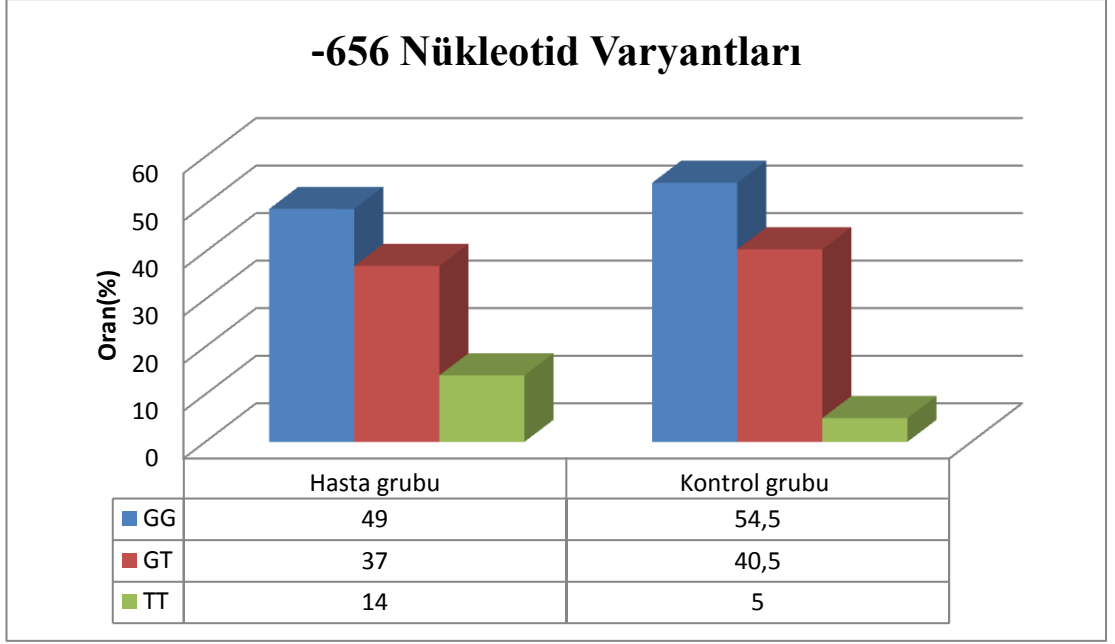
### 4.3.2.2 -656 Nükleotid Varyantının Değerlendirilmesi

**Tablo 4.16:** -656 G/T nükleotid varyantının değerlendirilmesi.

-656 nükleotid		Hasta grubu (n=100)%	Kontrol grubu (n=101) %	p	
GG		49 (49,0)	55 (54,5)		
GT		37 (37,0)	41 (40,5)		
TT		14 (14,0)	5 (5,0)		
Varyant	GG	Yok	51 (51,0)	46 (45,5)	<sup>b</sup> 0,439
		Var	49 (49,0)	55 (54,5)	
	GT	Yok	63 (63,0)	60 (59,4)	<sup>b</sup> 0,601
		Var	37 (37,0)	41 (40,6)	
	TT	Yok	86 (86,0)	96 (95,0)	<sup>b</sup> 0,028*
		Var	14 (14,0)	5 (5,0)	
Allel	G	135 (67,5)	151 (74,8)	<sup>b</sup> 0,109	
	T	65 (32,5)	51 (25,2)		

<sup>b</sup> Pearson Chi-Square Test \*p<0,05

Hasta grubu olguların %49,0'unda (n=49) GG, %37,0'sinde (n=37) GT ve %14,0'ünde (n=14) TT varyantı gözlenmiştir. Kontrol grubu olguların %54,5'inde (n=55)GG, %40,5'inde (n=41) GT ve %5,0'inde (n=5) TT varyantı gözlenmiştir.



**Şekil 4.8:**-656 nükleotid varyantlarının dağılımı.

Gruplara göre GG ve GT varyant oranları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ( $p>0,05$ ).

Gruplara göre TT varyant oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmış olup; hasta grupta TT varyant oranı kontrol grubundan yüksek bulunmuştur ( $p=0,028$ ;  $p<0,05$ ).

Gruplara göre allel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p>0,05$ ).



**Tablo 4.17:** Gruplara göre varyant çiftlerinin değerlendirilmesi.

		Hasta grubu (n=100)	Kontrol grubu (n=101)	p
CC/GG	Yok	76 (76,0)	66 (65,3)	<sup>b</sup> 0,097
	Var	24 (24,0)	35 (34,7)	
CC/GT	Yok	83 (83,0)	76 (75,2)	<sup>b</sup> 0,176
	Var	17 (17,0)	25 (24,8)	
CC/TT	Yok	92 (92,0)	97 (96,0)	<sup>b</sup> 0,227
	Var	8 (8,0)	4 (4,0)	
CA/GG	Yok	77 (77,0)	84 (83,2)	<sup>b</sup> 0,273
	Var	23 (23,0)	17 (16,8)	
CA/GT	Yok	81 (81,0)	85 (84,2)	<sup>b</sup> 0,555
	Var	19 (19,0)	16 (15,8)	
CA/TT	Yok	96 (96,0)	100 (99,0)	<sup>d</sup> 0,212
	Var	4 (4,0)	1 (1,0)	
AA/GG	Yok	98 (98,0)	98 (97,0)	<sup>d</sup> 1,000
	Var	2 (2,0)	3 (3,0)	
AA/GT	Yok	99 (99,0)	101 (100)	<sup>d</sup> 0,498
	Var	1 (1,0)	0 (0)	
AA/TT	Yok	98 (98,0)	101 (100)	<sup>d</sup> 0,246
	Var	2 (2,0)	0 (0)	

<sup>b</sup> Pearson Chi-Square Test      <sup>d</sup> Fisher's Exact Test

Gruplara göre CC/GG varyant oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmazken; hasta grupta CC/GG varyant oranının kontrol grubundan düşük olması dikkat çekicidir ( $p=0,097$ ;  $p>0,05$ ).

Gruplara göre CC/GT ve CC/TT varyant oranları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ( $p>0,05$ ).

Gruplara göre CA/GG, CA/GT ve CA/TT varyant oranları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ( $p>0,05$ ).

Gruplara göre AA/GG, AA/GT ve AA/TT varyant oranları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ( $p>0,05$ ).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Astım kronik akciğer hastalığı olup, IgE seviyesinin artması sonucu meydana gelen genetik bir hastalıktır. Dünyada ve ülkemizde birçok kişiyi etkilemektedir. Astım hastalığının nedeni çevresel faktörler olabileceği gibi genetik faktörler de hastalığın oluşmasını etkilemektedir. Bizim çalışmamızda hasta grubu 100 ve kontrol grubu 101 kişiden oluşmaktadır. Hasta grubunun yaş ortalaması  $52,58 \pm 12,26$  kontrol grubunun yaş ortalaması  $54,88 \pm 10,54$  olarak bulundu. Sigara içme alışkanlığı açısından değerlendirildiğinde hasta grubu %33 sigara içme oranına sahipti. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu oran anlamlı idi. ( $p:0,001$ ) Bazal kitle indeksi (BKI) açısından değerlendirildiğinde kontrol grubuna ( $25,31 \pm 4,21$ ) göre hasta grubunun ( $31,22 \pm 6,66$ ) BKI değerleri istatistiksel açıdan anlamlı farklı bulundu. Astım hastalığının patogenezinde obezite ve sigara alışkanlığı olduğu literatürde belirtilmiştir.

Biz bu çalışmada Astım hastalığında IL-18'in promotor bölgesinde -607 ve -656 bölgesinde meydana gelen polimorfizmi araştırdık. IL-18 başlangıçta IFN- $\gamma$  üretimini indüklemeye ve Th<sub>1</sub> hücre farklılaşmasını sağlayabilen güçlü bir sitokindir. Bizim çalışmamızda IL-18 promotor -607 da hasta ( $n=49$  %49,0) ve kontrol grubu ( $n=64$  %63,3) karşılaştırıldığında CC genotip oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmış olup; hasta grupta CC varyant oranı kontrol grubundan düşük bulunmuştur ( $p=0,040$ ;  $p<0,05$ ). CA genotip oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmazken; hasta grupta CA genotip oranının kontrol grubundan yüksek olması dikkat çekicidir ( $p=0,074$ ;  $p>0,05$ ). AA genotip oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p>0,05$ ). Hasta grupta A alleli oranının kontrol grubundan yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber, anlamlılığa yakın bulunmuştur ( $p=0,054$ ;  $p>0,05$ ). IL-18 promotor -656 da hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında GG ve GT varyant oranları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi. ( $p>0,05$ ). TT genotip oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmış olup; hasta grupta TT ( $n=14$  %14,0) genotip kontrol grubundan ( $n=5$  %5,0) yüksek bulunmuştur ( $p=0,028$ ;

$p < 0,05$ ). Gruplara göre allel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ). Bu çalışmada IL-18 promotorda -607 ve -656 bölgeleri haplotip çalışmasında hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında CC/GG haplotipte istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmazken; hasta grupta CC/GG varyant oranının kontrol grubundan düşük olması dikkat çekicidir ( $p = 0,097$ ;  $p > 0,05$ ). Gruplara göre CC/GT hasta grubunda ( $n = 76$  %76,0) kontrol grubunda ise ( $n = 66$  %65,3) ve CC/TT hasta grubunda ( $n = 92$  %92) kontrol grubunda ise ( $n = 97$  %96,0) varyant oranları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ( $p > 0,05$ ). Gruplara göre CA/GG, hasta grubunda ( $n = 77$  %77) kontrol grubunda ise ( $n = 97$  %96,0) CA/GT hasta grubunda ( $n = 92$  %92) kontrol grubunda ise ( $n = 97$  %96,0) ve CA/TT hasta grubunda ( $n = 96$  %96) kontrol grubunda ise ( $n = 100$  %99,0) varyant oranları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ( $p > 0,05$ ). Gruplara göre AA/GG, AA/GT ve AA/TT varyant oranları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ( $p > 0,05$ ).

Sadeghi ve diğ. [109] yapmış olduğu çalışmada vezikoüreteral reflü hastalığında IL-18 gen promotor -137 G/T genotip sıklığı ve GC ve GC/CC genotiplerin görüldüğü bireylerde hastalığın daha az görüldüğü bulunmuştur. IL-18 gen promotor -137 G/C için genotip sıklığı %41,093, kontrol grubunda %56,3 ve GC/CC genotipi için %45,97 ve kontrol grubunda %61,82' dir. Zhou ve diğ. [110] yapmış olduğu çalışmada sarkoidoz hastalığında -607 C/A ve -656 G/T polimorfizminin bu hastalık ile ilişkisi saptanmıştır. En yaygın haplotiplerden biri olan -607 C/-656 G haplotipinin promotor aktivitesi, diğer yaygın haplotip -607A/-656T'ninkinden anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Klinik fenotipler arasında hasta özellikleri ve kontroller açısından bakıldığında bir ilişki bulunamamıştır. Abdolahi ve diğ. [111] 105 hasta ve 148 sağlıklı kontrol ile yapmış oldukları çalışmada İran'da tiroit kanseri ile IL-18 -656 polimorfizmi arasındaki ilişkiye bakılmıştır. TT genotipinin Tiroid kanseri riskini anlamlı derecede artırdığı gözlemlenmiştir. IL-18 gen -607 C/A pozisyonundaki polimorfizm ile bir ilişki bulunamamıştır.

Elneam ve diğ. [112] tarafından 62 diabetik nefropati hastası ile 52 diabetik mellitus hastasını karşılaştırdıkları çalışmada, -607 C/A ve -656 G/T allellerinin diabetik nefropati ve diabetik mellitus arasında anlamlı bir farklılığa sahip olmadığı ancak IL-18 gen promotor -137 G/C polimorfizme bakıldığında diabetes mellituslu

hastalarda anlamlı olarak daha az diabetik nefropatili hastalarda C alleli anlamlı olarak daha az görülmüştür. Farjadfar ve diğ. [113] yapmış olduğu çalışma 73 akciğer kanseri hastası ve kontrol grubu arasında IL-18 -607 genotip dağılımlarında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Ayrıca -607 CA ve AA genotipleri olan hastalar 2,60 kat ve 3,15 kat akciğer kanseri riskinde artışa sahip olduğu tespit edilmiştir.

Hazza ve diğ. [114] yapmış olduğu çalışmada IL-18 gen promotor -607 C/A polimorfizmi aftöz stomatit duyarlılığı ile ilişkili bulunmazken, Behçet hastalığı olan hastalarda promotor -137 G/C polimorfizmi GG genotipi arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. Sadeghi-bojd ve diğ. [109] yapmış olduğu çalışmada Vezikoüreteral reflü hastalığında -607 C/A polimorfizmi arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır. Taheri ve diğ. [115] yapmış olduğu çalışmada meme kanseri olan hastalar ile IL-18 -607 (rs1946518) polimorfizmine ilişkin kontrol denekleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Nielsen ve diğ. [116] yapmış olduğu çalışmada tip 1 diyabet hastalığında IL-18 -607 C/A polimorfizminin Avrupalılarda değil, Asyalılarda tip 1 diyabet hastalığına yatkınlığı arttırabileceği bulunmuştur. Fouad ve diğ. [117] yapmış olduğu çalışmada IL-18 geni promotor -607 C/A polimorfizminde CC genotipinin lupus nefriti, artrit ve immunolojik bozukluklar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulmuşlardır. IL-18 gen promotor -607 C/A pozisyonundaki promotor polimorfizmleri sistemik lupus eritematozus akut alevlenmesine katkısı vardır. Sistemik lupus eritematozus hastalarında IL-18 'in üretiminin arttığı bulunmuştur. Song ve diğ. [118] yapmış olduğu çalışmada romatoid artrit hastalığında IL-18 -607 C aleli arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Kara ve diğ.[119] yapmış olduğu çalışmaya 109'u spontan şifa ile sonuçlanan, 162'sinde kronik hepatit, 84'ü karaciğer sirozu, 30'u hepaselüler kanser geliştiği gözlenen 271 hepatit B virüsü enfeksiyonu olan hasta dahil edilmiştir. Hasta grubu 280 sağlıklı kontrol ile karşılaştırıldığında -607 AA genotipin sağlıklı kontrollerde anlamlı bir şekilde fazla görülmüştür. Moravej ve diğ. [120] yapmış olduğu çalışmada Viseral leismaniasis hastalığında IL-18 gen - 656 pozisyonunda T allelinin Viseral leismaniasis'e direnç için genetik bir faktör olarak değerlendirilmesi söylenilmiştir.

Sonuç olarak IL-18 promotor -607 A/C ve -656 G/T nükleotid değişimlerinin astım hastalığı ile ilişkisi olup olmadığına dair yaptığımız bu tez çalışmasında -607 hasta grubunda CC varyantı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı yüksek bulundu. -656 G/T değişiminde GG, GT ve TT varyantları arasında hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı. Çalışma astım hastalarında serum IL-18 seviyeleri bakılarak genişletilebilir. Astım hastalığı multifaktöriyel bir hastalık olduğu için hasta sayısı çok daha fazla arttırılarak çalışma genişletilebilir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Cruz A. A., "Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach", *World Health Organization*,(2007).
- [2] Burrows, B., Martinez, F. D., Halonen, M., Barbee, R. A.,& Cline, M. G., "Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens", *New England Journal of Medicine*, 320(5), 271-277, (1989).
- [3] Li, Y., & Hua, S., "Mechanisms of pathogenesis in allergic asthma:Role of interleukin-23", *Respirology*, 19(5), 663-669, (2014).
- [4] Reddel, H. K., & Levy, M. L., "The GINA asthma strategy report: what's new for primary care?", *NPJ primary care respiratory medicine*, 25, 15050, (2015).
- [5] Stern, D. A., Morgan, W. J., Halonen, M., Wright, A. L., & Martinez, F. D., "Wheezing and bronchial hyper-responsiveness in early childhood as predictors of newly diagnosed asthma in early adulthood: a longitudinal birth-cohort study", *The Lancet*, 372(9643), 1058-1064, (2008).
- [6] Mukherjee, A. B., & Zhang, Z., "Allergic asthma: influence of genetic and environmental factors", *Journal of Biological Chemistry*, 286(38), 32883-32889, (2011).
- [7] Apter, A. J., "Advances in adult asthma diagnosis and treatment in 2014", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(1), 46-53, (2015).
- [8] Miller, R. L., & Ho, S. M., "Pulmonary Perspective", *Am Journal Respir Crit Care Med*, 177, 567-573, (2008).

- [9] Jenerowicz, D., Silny, W., Danczak-Pazdrowska, A., Polanska, A., Osmola-Mankowska, A., & Olek-Hrab, K., "Environmental factors and allergic diseases", *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19(3), (2012).
- [10] Lee, J. U., Kim, J. D., & Park, C. S., "Gene-environment interactions in asthma: genetic and epigenetic effects", *Yonsei Medical journal*, 56(4), 877-886, (2015).
- [11] Drazen, J. M., Arm, J. P., & Austen, K. F., "Sorting out the cytokines of asthma", *The Journal of experimental medicine*, 183(1), 1-5, (1996).
- [12] Kaufman G., "Asthma: Pathophysiology, diagnosis and management", *Nursing Standard*, 26, 48-56, (2011).
- [13] Chini, L., Monteferrario, E., Graziani, S., & Moschese, V., "Novel treatments of asthma and allergic diseases", *Paediatric respiratory reviews*, 15(4), 355-362, (2014).
- [14] Levy, M. L., Fletcher, M., Price, D. B., Hausend, T., Halbert, R. J., & Yawn, B. P., "International Primary Care Respiratory Group (IPCRG) Guidelines: diagnosis of respiratory diseases in primary care", *Primary Care Respiratory Journal*, 15(1), 20, (2006).
- [15] Fajt, M. L., & Wenzel, S. E., "Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: the next steps toward personalized care", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(2), 299-310, (2015).
- [16] Tomac N, Saraclar Y., "Astım epidemiyolojisi", *Klinik Çocuk Forumu Pediatrik Allerji Özel Sayısı*, 3, 6-16, (2003).

- [17] Kaya, Y., Ergüven, M., Tekin, E., Özdemir, M., & Hamzah, Ö. Y., "Bölgemizde çocuklarda bronşial astım tedavisinde alternatif tedavi yöntemleri kullanımı", *Çocuk Dergisi*, 9(2), 84-89, (2009).
- [18] Beasley, R., "Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC", *The Lancet*, 351(9111), 1225-1232, (1998).
- [19] To, T., Simatovic, J., Zhu, J., Feldman, L., Dell, S. D., Loughheed, M. D., & Gershon, A., "Asthma deaths in a large provincial health system. A 10-year population-based study", *Annals of the American Thoracic Society*, 11(8), 1210-1217, (2014).
- [20] Plomin, R, Owen MJ, McGuffin P., "The genetic basis of complex human Behaviors", *Science*, 264, 1733-39, (1994).
- [21] Fleming, D. M., & Crombie, D. L., "Prevalence of asthma and hay fever in England and Wales", *British Medical Journal*, 294(6567), 279-283, (1987).
- [22] Eibensteiner, P., Spitzauer, S., Steinberger, P., Kraft, D., & Valenta, R., "Immunoglobulin E antibodies of atopic individuals exhibit a broad usage of VH-gene families", *Immunology*, 101(1), 112-119, (2000).
- [23] Potvin, S., Stip, E., Sepehry, A. A., Gendron, A., Bah, R., & Kouassi, E., "Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review", *Biological Psychiatry*, 63(8), 801-808, (2008).
- [24] Luo, Y., Deng, Y., Tao, Z., Chen, S., Xiao, B., Ren, J., & Deng, M., "Regulatory effect of microRNA-135a on the Th1/Th2 imbalance in a murine model of allergic rhinitis" *Experimental and Therapeutic Medicine*, 8(4), 1105-1110, (2014).
- [25] Palomo, J., Dietrich, D., Martin, P., Palmer, G., & Gabay, C., "The interleukin (IL)-1 cytokine family–Balance between agonists and antagonists in inflammatory disease", *Cytokine*, 76(1), 25-37, (2015).



- [26] Garlanda, C., Dinarello, C. A., & Mantovani, A., "The interleukin-1 family: back to the future", *Immunity*, 39(6), 1003-1018, (2013).
- [27] Steinkasserer, A., Spurr, N. K., Cox, S., Jeggo, P., & Sim, R. B., "The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14–q21, in the region of the IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  loci", *Genomics*, 13(3), 654-657, (1992).
- [28] Dinarello, C. A., & van der Meer, J. W., "Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans", *In Seminars in immunology*, 25(6), 469-484, (2013)
- [29] Steinke, J. W., & Borish, L., "3. Cytokines and chemokines", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(2), 441-445, (2006).
- [30] Hos, D., Bucher, F., Regenfuss, B., Dreisow, M. L., Bock, F., Heindl, L. M., & Cursiefen, C., "IL-10 indirectly regulates corneal lymphangiogenesis and resolution of inflammation via macrophages", *The American Journal of Pathology*, 186(1), 159-171, (2016).
- [31] Tian, G., Li, J. L., Wang, D. G., & Zhou, D., "Targeting IL-10 in auto-immune diseases", *Cell Biochemistry and Biophysics*, 70(1), 37-49, (2014).
- [32] Bandurska, K., Król, I., & Myga-Nowak, M., "Interferons: between structure and function", *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 68, 428-440, (2014).
- [33] Mogensen, T.H., "Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses", *Clin. Microbiol. Rev.*, 22(2), 240-273, (2009).
- [34] Ghosh, D., Ghosh, D., & Parida, P., "Physiological Proteins in Therapeutics: A Current Review on Interferons", *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 16(12), 947-952, (2016).

- [35] Meyer, O., "Interferons and autoimmune disorders", *Joint Bone Spine*, 76(5), 464-473, (2009).
- [36] Horwood, L. J., Fergusson, D. M., & Shannon, F. T., "Social and familial factors in the development of early childhood asthma", *Pediatrics*, 75(5), 859-868, (1985).
- [37] Novosad, S., Khan, S., Wolfe, B., & Khan, A., "Role of obesity in asthma control, the obesity-asthma phenotype", *Journal of Allergy*, 1-9, (2013).
- [38] Beuther D.A., Sutherland E.R., "Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies", *Am Journal Respir Crit Care Med*, 175, 661-6, (2007).
- [39] Bayram, A., Oymak, S., Gülmez, İ., Demir, R., & Büyükoğlan, H., "Astımda Atopi ve Alerjik Rinit Sıklığı", *Erciyes Medical Journal/Erciyes Tıp Dergisi*, 32(1), (2010).
- [40] Zhong, N. S., "New insights into risk factors of asthma", *Respirology*, 1(3), 159-166, (1996).
- [41] Guarnieri, M., & Balmes, J. R., "Outdoor air pollution and asthma", *The Lancet*, 383(9928), 1581-1592, (2014).
- [42] Patel, M. M., & Miller, R. L., "Air pollution and childhood asthma: recent advances and future directions", *Current Opinion in Pediatrics*, 21(2), 235, (2009).
- [43] Milligan, K. L., Matsui, E., & Sharma, H., "Asthma in urban children: epidemiology, environmental risk factors, and the public health domain", *Current Allergy And Asthma Reports*, 16(4), 33, (2016).

- [44] Le Moual, N., Jacquemin, B., Varraso, R., Dumas, O., Kauffmann, F., & Nadif, R., "Environment and asthma in adults", *La Presse Médicale*, 42(9), 317-333, (2013).
- [45] Kelly, J. T., Busse WW., "Host immune responses to rhinovirus: mechanisms in asthma", *Journal Allergy Clin Immunol*, 122, 671-82, (2008).
- [46] Lemanske, R. F., & Busse, W. W., "Asthma: clinical expression and molecular mechanisms", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), 95-102, (2010).
- [47] Green, R. M., Custovic, A., Sanderson, G., Hunter, J., Johnston, S. L., & Woodcock, A., "Synergism between allergens and viruses and risk of hospital admission with asthma: case-control study", *British Medical Journal*, 324(7340), 763, (2002).
- [48] Liu, A. H., Leung DY., "Renaissance of the hygiene hypothesis", *Journal Allergy Clin Immunol*, 117, 1063-6, (2006).
- [49] Reddel, H. K., Bateman, E. D., Becker, A., Boulet, L. P., Cruz, A. A., Drazen, J. M., & Lemanske, R. F., "A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control", *European Respiratory Journal*, 46(3), 622-639, (2015).
- [50] Bochner, B. S., Udem, B. J., & Lichtenstein, L. M., "Immunological aspects of allergic asthma", *Annual Review of Immunology*, 12(1), 295-335, (1994).
- [51] Nakagome, K., & Nagata, M., "Pathogenesis of airway inflammation in bronchial asthma", *Auris Nasus Larynx*, 38(5), 555-563, (2011).
- [52] Hogg, J.C., "Pathology of asthma", *Journal Allergy Clin Immunol*, 92, 1-5, (1993).
- [53] Bradding, P., Walls, A. F., & Holgate, S. T., "The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(6), 1277-1284, (2006).

- [54] Linzer, J. F., "Review of asthma: Pathophysiology and current treatment options", *Clinical Pediatric Emergency Medicine*, 8(2), 87-95, (2007).
- [55] Holgate, S. T., Davies, D. E., Lackie, P. M., Wilson, S. J., Puddicombe, S. M., & Lordan, J. L., "Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105(2), 193-204, (2000).
- [56] Kau, A. L., & Korenblat, P. E., "Anti-interleukin 4 and 13 for asthma treatment in the era of endotypes", *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 14(6), 570, (2014).
- [57] Wenzel, S. E., "Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches", *Nature Medicine*, 18(5), 716, (2012).
- [58] Bateman, E. D., Boushey, H. A., Bousquet, J., Busse, W. W., Clark, T. J., Pauwels, R. A., & Pedersen, S. E., "Can guideline-defined asthma control be achieved? The Gaining Optimal Asthma Control study", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 170(8), 836-844, (2004).
- [59] Ito, Y., Al Mubarak, R., Roberts, N., Correll, K., Janssen, W., Finigan, J., & Chu, H. W., "IL-13 induces periostin and eotaxin expression in human primary alveolar epithelial cells: Comparison with paired airway epithelial cells", *PloS One*, 13(4), (2018).
- [60] Apter, A. J., "Advances in adult asthma diagnosis and treatment in 2013", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(1), 49-56, (2014).
- [61] Grigoras, A., Lozneau, L., Grigoras, C. C., Giusca, S. E., Caruntu, I. D., & Amalinei, C., "Periostin in bronchial asthma—a brief update", *Archive of Clinical Cases*, 4(1), (2017).
- [62] Kanemitsu, Y., Matsumoto, H., & Mishima, M., "Factors contributing to an accelerated decline in pulmonary function in asthma", *Allergology International*, 63(2), 181-188, (2014).

- [63] Li, W., Gao, P., Zhi, Y., Xu, W., Wu, Y., Yin, J., & Zhang, J., "Periostin: its role in asthma and its potential as a diagnostic or therapeutic target", *Respiratory Research*, 16(1), 57, (2015).
- [64] Domínguez-Ortega, J., Phillips-Anglés, E., Barranco, P., & Quirce, S., "Cost-effectiveness of asthma therapy: a comprehensive review", *Journal of Asthma*, 52(6), 529-537, (2015).
- [65] Holgate, S., Casale, T., Wenzel, S., Bousquet, J., Deniz, Y., & Reisner, C., "The anti-inflammatory effects of omalizumab confirm the central role of IgE in allergic inflammation", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(3), 459-465, (2005).
- [66] Nopp, A., Johansson, S. G. O., Ankerst, J., Palmqvist, M., & Öman, H., "CD-sens and clinical changes during withdrawal of Xolair after 6 years of treatment", *Allergy*, 62(10), 1175-1181, (2007).
- [67] Suissa, S., Ernst, P., Benayoun, S., Baltzan, M., & Cai, B., "Low-dose inhaled corticosteroids and the prevention of death from asthma", *New England Journal of Medicine*, 343(5), 332-336, (2000).
- [68] Charriot, J., Vachier, I., Halimi, L., Gamez, A. S., Boissin, C., Salama, M., & Bourdin, A., "Future treatment for asthma", *European Respiratory Review*, 25(139), 77-92, (2016).
- [69] Mogasale, V., & Vos, T., "Cost-effectiveness of asthma clinic approach in the management of chronic asthma in Australia", *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 37(3), 205-210, (2013).
- [70] Ojeda, P., & de Burgoa Sanz, V., "Costs associated with workdays lost and utilization of health care resources because of asthma in daily clinical practice in Spain", *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, 23(4), 234-241, (2013).

- [71] Barnett, S. B. L., & Nurmagambetov, T. A., "Costs of asthma in the United States: 2002-2007", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(1), 145-152, (2011).
- [72] Akira, S., "The role of IL-18 in innate immunity", *Current Opinion in Immunology*, 12(1), 59-63, (2000).
- [73] Wojdasiewicz, P., Poniatowski, L. A., & Szukiewicz, D., "The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis", *Mediators of Inflammation*, (2014).
- [74] Kretowski, A., Mironczuk, K., Karpinska, A., Bojaryn, U., Kinalski, M., Puchalski, Z., & Kinalska, I., "Interleukin-18 Promotor polymorphisms in type 1 diabetes", *Diabetes*, 51(11), 3347-3349, (2002).
- [75] Okamura, H., Tsutsui, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., & Akita, K., "Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T cells", *Nature*, 378(6552), 88, (1995).
- [76] Nolan, K. F., Greaves, D. R., & Waldmann, H., "The Human Interleukin 18 Gene IL18 Maps to 11q22. 2-q22. 3, Closely Linked to the DRD2 Gene Locus and Distinct from Mapped IDDM Loci", *Genomics*, 51(1), 161-163, (1998).
- [77] Volin, M. V., & Koch, A. E., "Interleukin-18: a mediator of inflammation and angiogenesis in rheumatoid arthritis", *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31(10), 745-751, (2011).
- [78] Cai, L. P., Zhou, L. J., Lu, S. Y., Liang, Y. E., Chen, X. Y., Liu, L., & Lin, J., "Association of IL-18 Promotor gene polymorphisms with rheumatoid arthritis: a meta-analysis", *Molecular Biology Reports*, 41(12), 8211-8217, (2014).
- [79] Imboden, M., Nicod, L., Nieters, A., Glaes, E., Matyas, G., Bircher, A. J., & Sapaldia Team., "The common G-allele of interleukin-18 single-nucleotide

polymorphism is a genetic risk factor for atopic asthma. The SAPALDIA Cohort Study”, *Clinical & Experimental Allergy*, 36(2), 211-218, (2006).

- [80] Kim, S. H., Eisenstein, M., Reznikov, L., Fantuzzi, G., Novick, D., Rubinstein, M., & Dinarello, C. A., “Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(3), 1190-1195, (2000).
- [81] Lippitz, B. E., ”Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review”, *The Lancet Oncology*, 14(6), 218-228, (2013).
- [82] Dinarello, C., Novick, D., Kim, S., & Kaplanski, G., ”Interleukin-18 and IL-18 binding protein”, *Frontiers in Immunology*, 4, 289, (2013).
- [83] Nakamura, K., Asano, Y., Taniguchi, T., Minatsuki, S., Inaba, T., Maki, H., & Takahashi, T., ”Serum levels of interleukin-18-binding protein isoform a: Clinical association with inflammation and pulmonary hypertension in systemic sclerosis”, *The Journal of Dermatology*, 43(8), 912-918, (2016).
- [84] Sanders, N. L., & Mishra, A., “Role of interleukin-18 in the pathophysiology of allergic diseases”, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 32, 31-39, (2016).
- [85] Gu, Y., Kuida, K., Tsutsui, H., Ku, G., Hsiao, K., Fleming, M. A., & Kurimoto, M., ”Activation of interferon- $\gamma$  inducing factor mediated by interleukin-1 $\beta$  converting enzyme”, *Science*, 275(5297), 206-209, (1997).
- [86] Horwood, N. J., Udagawa, N., Elliott, J., Grail, D., Okamura, H., Kurimoto, M., & Gillespie, M. T., ”Interleukin 18 inhibits osteoclast formation via T cell production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor”, *The Journal of Clinical Investigation*, 101(3), 595-603, (1998).
- [87] Krumm, B., Xiang, Y., & Deng, J., ”Structural biology of the IL-1 superfamily: Key cytokines in the regulation of immune and inflammatory responses”, *Protein Science*, 23(5), 526-538, (2014).

- [88] Bossu, P., Neumann, D., Del Giudice, E., Ciaramella, A., Gloaguen, I., Fantuzzi, G., & Caselli, G., "IL-18 cDNA vaccination protects mice from spontaneous lupus-like autoimmune disease", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 14181-14186, (2003).
- [89] Subramaniam, S., Stansberg, C., & Cunningham, C., "The interleukin 1 receptor family", *Developmental & Comparative Immunology*, 28(5), 415-428, (2004).
- [90] Dinarello, C. A., "Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors", *In Seminars in Immunology*, 25(6), 389-393, (2013).
- [91] Born, T. L., Thomassen, E., Bird, T. A., & Sims, J. E., "Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling", *Journal of Biological Chemistry*, 273(45), 29445-29450, (1998).
- [92] Furuya, D., Yagihashi, A., Komatsu, M., Masashi, N., Tsuji, N., Kobayashi, D., & Watanabe, N., "Serum interleukin-18 concentrations in patients with inflammatory bowel disease", *Journal of Immunotherapy*, 25, 65-67, (2002).
- [93] Sedimbi, S. K., Hägglöf, T., & Karlsson, M. C., "IL-18 in inflammatory and autoimmune disease", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(24), 4795-4808, (2013).
- [94] Lima-Júnior, R. C. P., Freitas, H. C., Wong, D. V. T., Wanderley, C. W. S., Nunes, L. G., Leite, L. L., & Teixeira, M. M., "Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice", *British Journal of Pharmacology*, 171(9), 2335-2350, (2014).
- [95] Sugawara, S., Uehara, A., Nochi, T., Yamaguchi, T., Ueda, H., Sugiyama, A., & Takada, H., "Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells", *The Journal of Immunology*, 167(11), 6568-6575, (2001).



- [96] Arend, W. P., Palmer, G., & Gabay, C., "IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines", *Immunological Reviews*, 223(1), 20-38, (2008).
- [97] Xavier, R. J., & Podolsky, D. K., "Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease", *Nature*, 448(7152), 427, (2007).
- [98] Kanai, T., Kamada, N., & Hisamatsu, T., "Clinical strategies for the blockade of IL-18 in inflammatory bowel diseases", *Current Drug Targets*, 14(12), 1392-1399, (2013).
- [99] Aleya, W. B., Sfar, I., Habibi, I., Mouelhi, L., Aouadi, H., Makhoul, M., & Gorgi, Y., "Interleukin-18 gene polymorphisms in tunisian patients with inflammatory bowel disease", *Digestion*, 83(4), 269-274, (2011).
- [100] Homey, B., Dieu-Nosjean, M. C., Wiesenborn, A., Massacrier, C., Pin, J. J., Oldham, E., & Deng, G., "Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$ /CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis", *The Journal of Immunology*, 164(12), 6621-6632, (2000).
- [101] Kato, T., Tsunemi, Y., Saeki, H., Shibata, S., Sekiya, T., Nakamura, K., & Sugaya, M., "Interferon-18 gene polymorphism-137 G/C is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris but not with atopic dermatitis in Japanese patients", *Journal of Dermatological Science*, 53(2), 162-163, (2009).
- [102] Rasmy, H., Mikhael, N., & Ismail, S., "Interleukin-18 expression and the response to treatment in patients with psoriasis", *Archives of Medical Science: AMS*, 7(4), 713, (2011).
- [103] Fabbi, M., Carbotti, G., & Ferrini, S., "Context-dependent role of IL-18 in cancer biology and counter-regulation by IL-18BP", *Journal of Leukocyte Biology*, 97(4), 665-675, (2015).

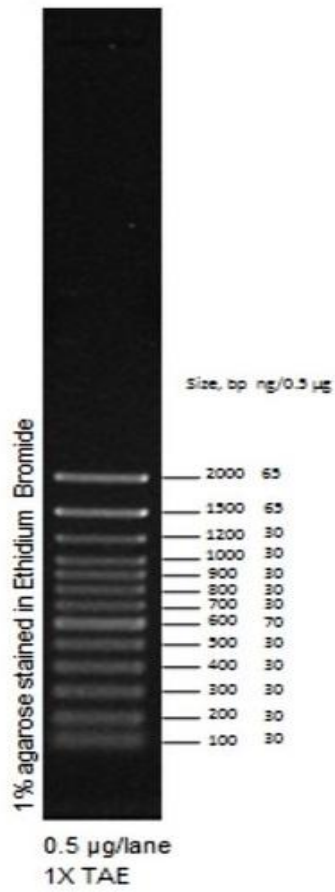
- [104] Kuppala, M. B., Syed, S. B., Bandaru, S., Varre, S., Akka, J., & Mundulru, H. P., "Immunotherapeutic approach for better management of cancer-role of IL-18", *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(11), 5353-5361, (2012).
- [105] Chung, J. H., Lee, Y. C., Eun, Y. G., Kim, S. K., Chon, S., Oh, S. J., & Hong, I. K., "Single Nucleotide Polymorphism of Interleukin-18 and Interleukin-18 Receptor and the Risk of Papillary Thyroid Cancer", *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 123(10), 598-603, (2015).
- [106] Sun, L., Hu, F. B., Yu, Z., Li, H., Liu, H., Wang, X., & Liu, Y., "Lean body mass, interleukin 18, and metabolic syndrome in apparently healthy Chinese", *PloS one*, 6(3), 18104, (2011).
- [107] Trøseid, M., Seljeflot, I., & Arnesen, H., "The role of interleukin-18 in the metabolic syndrome", *Cardiovascular Diabetology*, 9(1), 11, (2010).
- [108] Opstad, T. B., Pettersen, A. Å., Arnesen, H., & Seljeflot, I., "Circulating levels of IL-18 are significantly influenced by the IL-18+ 183 A/G polymorphism in coronary artery disease patients with diabetes type 2 and the metabolic syndrome: an observational study", *Cardiovascular Diabetology*, 10(1), 110, (2011).
- [109] Sadeghi-Bojd, S., Kordi-Tamandani, D. M., & Hashemi, M., "Effect of pro-inflammatory cytokine (IFN- $\gamma$ + 874, IL-18-137 G/C,-607 C/A) genes in relation to risk of vesico-ureteral reflux", *Renal Failure*, 36(1), 1-4, (2014).
- [110] Zhou, Y., Yamaguchi, E., Hizawa, N., & Nishimura, M., "Roles of functional polymorphisms in the interleukin-18 gene PROMOTOR in sarcoidosis", *Sarcoidosis, Vasculitis, and Diffuse Lung Diseases: Official Journal of WASOG*, 22(2), 105-113, (2005).
- [111] Abdolahi, F., Dabbaghmanesh, M. H., Haghshenas, M. R., Ghaderi, A., & Erfani, N., "A gene-disease association study of IL18 in thyroid cancer: genotype and haplotype analyses", *Endocrine*, 50(3), 698-707, (2015).

- [112] Elneam, A. I. A., Mansour, N. M., Zaki, N. A., & Taher, M. A., "Serum Interleukin-18 and Its Gene Haplotypes Profile as Predictors in Patients with Diabetic Nephropathy", *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 4(3), 324, (2016).
- [113] Farjadfar, A., Mojtahedi, Z., Ghayumi, M. A., Erfani, N., Haghshenas, M. R., & Ghaderi, A., "Interleukin-18 PROMOTOR polymorphism is associated with lung cancer: a case-control study", *Acta Oncologica*, 48(7), 971-976, (2009).
- [114] Hazzaa, H. H., Rashwan, W. A., & Attia, E. A., "IL-18 gene polymorphisms in aphthous stomatitis vs. Behçet's disease in a cohort of Egyptian patients", *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 43(10), 746-753, (2014).
- [115] Taheri, M., Hashemi, M., Eskandari-Nasab, E., Fazaeli, A., Arababi, F., Bahrani-Zeidabadi, M., & Bahari, G., "Association of -607 C/A polymorphism of IL-18 gene (rs1946518) with breast cancer risk in Zahedan, Southeast Iran", *Prague Med Rep*, 113(3), 217-222, (2012).
- [116] Nielsen, C., Hansen, D., Husby, S., Jacobsen, B. B., & Lillevang, S. T., "Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes", *Tissue Antigens*, 62(6), 492-497, (2003).
- [117] Fouad, N. A., Baraka, E. A., & Hassan, W. A., "Interleukin-18 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: relation to disease status", *The Egyptian Journal of Immunology*, 21(1), 1-12, (2014).
- [118] Song, G. G., Bae, S. C., Kim, J. H., & Lee, Y. H., "Interleukin-4, interleukin-4 receptor, and interleukin-18 polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis", *Immunological Investigations*, 42(6), 455-469, (2013).
- [119] Karra, V. K., Gumma, P. K., Chowdhury, S. J., Ruttala, R., Polipalli, S. K., Chakravarti, A., & Kar, P., "IL-18 polymorphisms in hepatitis B virus related liver disease", *Cytokine*, 73(2), 277-282, (2015).

[120] Moravej, A., Rasouli, M., Asefi, S., Kalani, M., & Mansoori, Y., "Association of interleukin-18 gene variants with susceptibility to visceral leishmaniasis in Iranian population", *Molecular Biology Reports*, 40(6), 4009-4014, (2013).

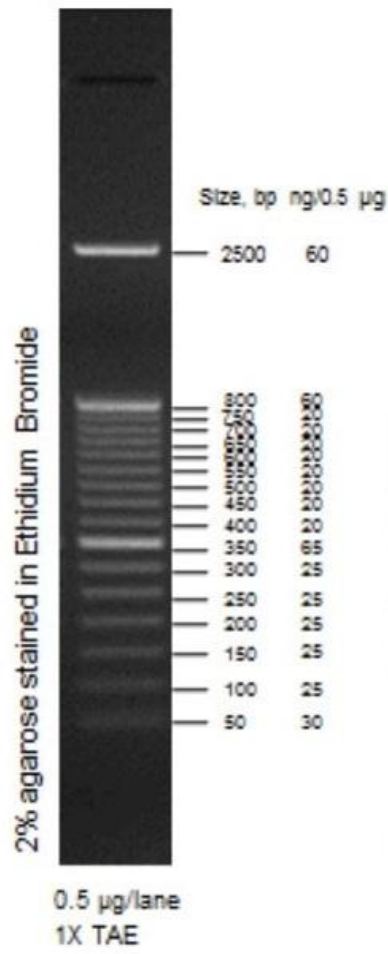
## 7. EKLER

**EK A** (100 Bp DNA Ladder)



**EK A.1:** GeneRuler 100 bp DNA ladder

**EK A.1 (50 Bp DNA Ladder)**



**EKA.2:** GeneRuler 50 bp DNA ladder

## EK B (Asgari Bilgilendirilmiş Hasta Gönüllü Olur Formu)

### ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

(Hasta gönüllü grubu için)

Sizi BAÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları A.D.'de yürütülen “ ASTİM HASTALIĞINDA IL-18 GEN POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI ” başlıklı **araştırmaya** davet ediyoruz.

Araştırmaya katılmak tamamen **gönüllülük** esasına dayanmaktadır. Çalışmaya **katılmama** veya katıldıktan sonra herhangi bir anda çalışmadan **çıkma** hakkında sahipsiniz. Her iki durumda da bir ceza veya hakkınız olan yararların kaybı kesinlikle söz konusu olmayacaktır. Araştırma konusuyla ilgili ve sizin araştırmaya katılmaya devam etme isteğinizi etkileyebilecek yeni bilgiler edinildiğinde zamanında bilgilendirileceksiniz.

Bu araştırmaya katıldığınız için maruz kalacağınız risk yoktur.

Bu çalışma için gerekli tüm masraflar araştırmacılar tarafından karşılanacaktır. Çalışma için sizden herhangi bir ücret talep edilmeyecektir.

Bu çalışmadan elde edilen bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacak ve araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi kimlik bilgileriniz kesinlikle gizli tutulacaktır.

Araştırma, kendi haklarınız veya araştırmayla ilgili herhangi bir istenmeyen durum hakkında daha fazla bilgi temin edebileniz için Dr Ayla SOLMAZ AVCIKURT ile günün 24 saatinde erişime geçebilirsiniz. (Telefon No: 0532 551 40 79)

Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın niçin yapıldığını, nasıl yapılacağını ve bu araştırmanın gönüllü katılımcılara getireceği olası faydaları, riskleri ve rahatsızlıklarını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. İsterseniz bu bilgileri aileniz, yakınlarınız ve/veya doktorunuzla tartışınız. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa, ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz. Katılmayı kabul ettiğiniz takdirde, gerekli yerleri siz, doktorunuz ve kuruluş görevlisi bir tamk tarafından doldurup imzalanmış bu formun bir kopyası saklamanız için size verilecektir.

Bu çalışmanın amacı Astım Hastalığında IL-18 Gen Polimorfizmini araştırmaktır. Çalışmada kullanılacak yöntem aşağıda açıklanmıştır.

Buna göre; biyokimya laboratuvarına rutin tahlilleriniz için verdiğiniz kan örneklerinden 1 ml çalışmamız için alınacaktır.

Siz bu araştırmanın **hasta gönüllü grubu** içinde yer alacaksınız. Sizden elde edilecek bilgiler veya veriler, çalışmada oluşturulacak farklı gruplardan elde edilecek bilgi veya verilerle karşılaştırılarak bir sonuca ulaşılacaktır.

Ben,.....[gönüllünün adı, soyadı (kendi el yazısı ile)] Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Katılmam istenen çalışmanın kapsamını ve amacını, gönüllü olarak üzerime düşen sorumlulukları tamamen anladım. **Çalışma hakkında soru sorma ve tartışma imkanı buldum ve tatmin edici yanıtlar aldım. Bana, çalışmanın muhtemel riskleri ve faydaları sözlü olarak da anlatıldı.** Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi ve araştırmadan ayrıldığım zaman mevcut tedavimin olumsuz yönde etkilenmeyeceğini biliyorum.

## EK B.1 (Asgari Bilgilendirilmiş Hasta Gönüllü Olur Formu Devamı)

### ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

(sağlıklı gönüllü grubu için)

Bu koşullarda;

- 1) Söz konusu Klinik Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı (çocuğumun/vasimin bu çalışmaya katılmasını) kabul ediyorum.
- 2) Gerek duyulursa kişisel bilgilerime mevzuatta belirtilen kişi/kurum kuruluşların erişebilmesine,
- 3) Çalışmada elde edilen bilgilerin (kimlik bilgilerim gizli kalmak koşulu ile) yayın için kullanılma, arşivleme ve eğer gerek duyulursa bilimsel katkı amacı ile ülkemiz dışına aktarılmasına olur veriyorum.

Gönüllünün(Kendi el yazısı ile)

Adı-Soyadı:

İmzası:

Adresi:

(varsa Telefon No, Faks No):

Tarih (gün/ay/yıl): .../.../....

Açıklamaları Yapan Araştırmacının (Doktorun)

Adı-Soyadı:

İmzası:

Tarih (gün/ay/yıl):.../.../.....

Onay Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin

Adı-Soyadı:

İmzası:

Görevi:

Tarih (gün/ay/yıl):...../...../.....



## EK C (Asgari Bilgilendirilmiş Sağlıklı Gönüllü Olur Formu)

### ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

(Sağlıklı gönüllü grubu için)

Sizi BAÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları A.D.'de yürütülen " ASTİM HASTALIĞINDA IL-18 GEN POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI " başlıklı **araştırmaya** davet ediyoruz.

Araştırmaya katılmak tamamen **gönüllülük** esasına dayanmaktadır. Çalışmaya **katılmama** veya katıldıktan sonra herhangi bir anda çalışmadan **çıkma** hakkında sahibsiniz. Her iki durumda da bir ceza veya hakkınız olan yararların kaybı kesinlikle söz konusu olmayacaktır. Araştırma konusuyla ilgili ve sizin araştırmaya katılmaya devam etme isteğinizi etkileyebilecek yeni bilgiler edinildiğinde zamanında bilgilendirileceksiniz.

Bu araştırmaya katıldığınız için maruz kalacağınız risk yoktur.

Bu çalışma için gerekli tüm masraflar araştırmacılar tarafından karşılanacaktır. Çalışma için sizden herhangi bir ücret talep edilmeyecektir.

Bu çalışmadan elde edilen bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacak ve araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi kimlik bilgileriniz kesinlikle gizli tutulacaktır.

Araştırma, kendi haklarınız veya araştırmayla ilgili herhangi bir istenmeyen durum hakkında daha fazla bilgi temin edebileniz için Dr Ayla SOLMAZ AVCIKURT ile günün 24 saatinde erişime geçebilirsiniz. (Telefon No: 0532 551 40 79)

Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın niçin yapıldığını, nasıl yapılacağını ve bu araştırmanın gönüllü katılımcılara getireceği olası faydaları, riskleri ve rahatsızlıklarını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. İsterseniz bu bilgileri aileniz, yakınlarınız ve/veya doktorunuzla tartışınız. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa, ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz. Katılmayı kabul ettiğiniz takdirde, gerekli yerleri siz, doktorunuz ve kuruluş görevlisi bir tanık tarafından doldurup imzalanmış bu formun bir kopyası saklamanız için size verilecektir.

Bu çalışmanın amacı Astım Hastalığında IL-18 Gen Polimorfizmini araştırmaktır. Çalışmada kullanılacak yöntem aşağıda açıklanmıştır.

Buna göre; biyokimya laboratuvarına rutin tahlilleriniz için verdiğiniz kan örneklerinden 1 ml çalışmamız için alınacaktır.

Siz bu araştırmanın **sağlıklı gönüllü grubu** içinde yer alacaksınız. Sizden elde edilecek bilgiler veya veriler, çalışmada oluşturulacak farklı gruplardan elde edilecek bilgi veya verilerle karşılaştırılarak bir sonuca ulaşılacaktır.

Ben,.....[gönüllünün adı, soyadı (kendi el yazısı ile)] Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Katılmam istenen çalışmanın kapsamını ve amacını, gönüllü olarak üzerime düşen sorumlulukları tamamen anladım. **Çalışma hakkında soru sorma ve tartışma imkanı buldum ve tatmin edici yanıtlar aldım. Bana, çalışmanın muhtemel riskleri ve faydaları sözlü olarak da anlatıldı.** Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi ve araştırmadan ayrıldığım zaman mevcut tedavimin olumsuz yönde etkilenmeyeceğini biliyorum.

## EK C.1 (Asgari Bilgilendirilmiş Sağlıklı Gönüllü Olur Formu)

### ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

(sağlıklı gönüllü grubu için)

Bu koşullarda;

- 1) Söz konusu Klinik Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı (çocuğumun/vasimim bu çalışmaya katılmasını) kabul ediyorum.
- 2) Gerek duyulursa kişisel bilgilerime mevzuatta belirtilen kişi/kurum kuruluşların erişebilmesine,
- 3) Çalışmada elde edilen bilgilerin (kimlik bilgilerim gizli kalmak koşulu ile) yayın için kullanılma, arşivleme ve eğer gerek duyulursa bilimsel katkı amacı ile ülkemiz dışına aktarılmasına olur veriyorum.

Gönüllünün(Kendi el yazısı ile)

Adı-Soyadı:

İmzası:

Adresi:

(varsa Telefon No, Faks No):

Tarih (gün/ay/yıl): .... / .... / ....

Açıklamaları Yapan Araştırmacının (Doktorun)

Adı-Soyadı:

İmzası:

Tarih (gün/ay/yıl):... / ... / .....

Onay Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin

Adı-Soyadı:

İmzası:

Görevi:

Tarih (gün/ay/yıl):..... / ..... / .....

## EK D (Etik Kurulu Karar Formu)

### BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	BALIKESİR ÜNİV. TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ	Çağış Yerleşkesi, Uşak yolu üzeri, 10145 BALIKESİR
	TELEFON	0266 612 14 61/1122
	FAKS	0266 612 14 59
	E-POSTA	etik.bautip@gmail.com

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		"Astım Hastalığında Il-18 Gen Polimorfizminin Araştırılması"	
BAŞVURU BİLGİLERİ	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd.Doç.Dr.Ayla SOLMAZ AVCIKURT	
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi	
	DESTEKLEYİCİ		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER		TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Açıklama	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	<input checked="" type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	<input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>	
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>	
DİĞER:	<input type="checkbox"/>		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2017/139	Tarih: 29/11/2017	
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve dosyadaki eksikliklerin giderilmesi şartıyla bir sonraki toplantıda görüşülmesine etik kurul üye tam sayısının oybirliği ile karar verilmiştir. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza
Doç. Dr. Fuat EREL	Göğüs Hastalıkları	Balıkesir Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Gülten ERKEN	Fizyoloji	Balıkesir Üniversitesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr. Elif AKSÖZ	Tıbbi Farmakoloji	Balıkesir Üniversitesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr. F. Bahar SUNAY	Histoloji ve Embriyoloji	Balıkesir Üniversitesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr. Eyüp AVCI	Kardiyoloji	Balıkesir Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	MAZARETLİ
Uzm.Dr. Mehmet ÇALIŞKAN	Halk Sağlığı	Balıkesir KEAS Organize Sanayii	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	MAZARETLİ
Av. Erman ARDA	Avukat	Serbest	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Ecz. Hüsnü KUNDAKÇI	Eczacı	BAÜ Sağlık Uyg. ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Serhat ALDEMİR			E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

\*:Toplantıda Bulunma

#### Etik Kurul Başkanı:

Unvanı, Adı Soyadı: Doç.Dr. Fuat EREL

İmza:

**EK D.1 (Etik Kurul Karar Formu Devamı)**



**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı**



Sayı : 94025189-050.03-  
Konu : Etik Kurul Karar Formu

Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayla SOLMAZ AVCIKURT  
Öğretim Üyesi

İlgi : 20.11.2017 başvuru tarihli dilekçeleriniz

"Menengiometlarda AGR2 gen Expresyonunun, Tümörün Biyolojik Davranış, Klinik Özellikler ve Davranış Paternine Etkisinin Histopatolojik Özelliklerle Karşılaştırılması" ile "Astım Hastalığında IL-18 Gen Polimorfizminin Araştırılması" başlıklı çalışmalarınız hakkında Etik Kurulumuzun bilimsel ve etik yönden oluşturduğu görüşler ektteki karar formlarında belirtilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

**e-imzalıdır**  
Doç. Dr. Fuat EREL  
Başkan

Ek :  
Karar Formları