

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BRONKOPULMONER DİSPLAZİ İLE İLİŞKİLENDİRİLEN BELİRLİ GENLERDEKİ
POLİMORFİZMLERİN TÜRK POPULASYONU ÜZERİNDE İNCELENMESİ**

AYBERK AKAT

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. DİLEK TURGUT BALIK**

İSTANBUL, 2018

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BRONKOPULMONER DİSPLAZİ İLE İLİŞKİLENDİRİLEN BELİRLİ GENLERDEKİ
POLİMORFİZMLERİN TÜRK POPULASYONU ÜZERİNDE İNCELENMESİ**

Ayberk AKAT tarafından hazırlanan tez çalışması tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Duygu ALTIOK
Giresun Üniversitesi

Prof. Dr. Ersi ABACI KALFOĞLU
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi. Alper YILMAZ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2016-07-04-DOP02 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Akademik eğitim, iş hayatım ve tez çalışmam boyunca engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen ve çok zorlu geçen bu tez çalışması sırasında bana gösterdiği sonsuz sabır ve aşıladığı çalışma azmi için çok kıymetli danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Dilek Turgut Balık'a;

Bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyerek değerli fikirleri ile çalışmama katkıda bulunan tez izleme komitesi üyesi hocalarım Sayın Prof. Dr. Adil Allahverdiyev'e ve Dr. Öğr. Üyesi Duygu Altıok'a;

Tez çalışmasının yürütülmesi için maddi destek sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Başkanlığı'na ve bölümümdeki tüm hocalarıma;

Bu tez çalışmasında kullanılan kan örneklerinin teminini gerçekleştiren ve çalışmamızı destekleyen İstanbul Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi yeni doğan yoğun bakım uzmanı Doç. Dr. Merih Çetinkaya ve çocuk sağlığı ve hastalıkları uzmanı Dr. Seda Yılmaz Semerci'ye;

Çalışmanın deneysel aşamalarında ve istatistiksel analizler konusunda desteklerini ve tecrübelerini esirgemeyen sevgili dostlarım Dr. Öğr. Üye. Ayşegül Erdemir, Dr. Olga Nehir Öztel, Dr. Pınar Hüner Omay ve Arş. Gör. Osman Mutluhan Uğurel'e;

Tez çalışmaları yürütülürken iş hayatımdan da geri kalmamam için bana hep destek olan FlorenCell ekibi, hocam Prof. Dr. Utku Ateş ve arkadaşlarım Hasan Aydın, Serdar Çelik, Ferda Işık ve Büşra Alper'e;

Bana bilimi sevdiren ve bu yolda ilerlemem için bana rol model olan sevgili teyzem Dr. Berna Atik Watson ve Dr. Gordon L. Watson'a;

Hayatımın her döneminde bana destek olan, yol gösteren ve bana olan sonsuz inançları ile her zaman kendime güvenmemi sağlayan sevgili annem Nurtan Hürriyet Arol'a, anneannem Nurcan Atik'e, eşim Seçil Akat'a ve tüm aileme

Çok teşekkür ederim.

NİSAN 2018,

Ayberk Akat

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ÖZET	xv
ABSTRACT.....	xvii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.1.1 Bronkopulmoner Displazi	1
1.1.2 Epidemiyoloji	2
1.1.3 Etyopatogenez	5
1.1.4 Bronkopulmoner Displazi ile İlişkili Kalıtsal Faktörlere Yaklaşımlar	8
1.1.4.1 İkiz Çalışmaları.....	9
1.1.4.2 Ailesel Birikim Çalışmaları	10
1.1.4.3 Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları (GWAS).....	11
1.1.4.4 Hedef Gen SNP Çalışmaları	12
1.1.4.5 Türk Populasyonunda Gerçekleştirilmiş BPD ile İlişkili SNP Çalışmaları.....	18
1.1.5 SNP Analiz Yöntemleri	20
1.1.5.1 Modern Yöntemler ve Yüksek Veri Hacimli Genotipleme	24
1.2 Tezin Amacı	29
1.3 Hipotez	30
BÖLÜM 2	
MATERYAL VE YÖNTEM	31
2.1 Materyal.....	31
2.1.1 Çalışma Populasyonu	31
2.1.2 Hasta ve Kontrol Örneklerinin Toplanması ve Arşivlenmesi	31
2.1.3 Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler.....	32
2.1.4 Kullanılan Cihazlar	32

2.2	Yöntem.....	33
2.2.1	Genomik DNA İzolasyonu	33
2.2.2	DNA Örneklerinin Konsantrasyon ve Saflığının Belirlenmesi	33
2.2.3	Kütle Spektrometrisi (MS) Deney Tasarımı	34
2.2.3.1	Analiz Tasarımı	34
2.2.3.2	Primer ve Probların Tasarımı	35
2.2.3.3	Multipleks PCR	39
2.2.3.4	dNTP Nötralizasyonu.....	39
2.2.3.5	Tek Baz Uzama Reaksiyonu	40
2.2.3.6	Rezin ile Temizleme.....	43
2.2.3.7	Örneklerin SpectroChip II Üzerine Aktarılması	43
2.2.3.8	MALDI-TOF MS Sistemi ile Genotipleme	44
2.2.4	İstatistiksel Analiz	44
2.2.4.1	Hardy-Weinberg Dengesi Analizi	44
2.2.4.2	Olasılıklar Oranı (Odds Ratio, OR) Testi	45
2.2.4.3	Klinik ve Demografik Verilerin SNP'ler ile İlişkilendirilmesi	46
2.2.4.4	Lojistik Regresyon Analizi.....	47
2.2.4.5	Genler Arasındaki Fonksiyonel İlişki Ağının Kurulması	47
 BÖLÜM 3		
SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....		48
3.1	BPD Tanısının Konulması ve Çalışma Populasyonunun Oluşturulması.....	48
3.2	Elde Edilen DNA Örneklerinin Saflık ve Miktar Analizleri	52
3.3	Araştırılacak SNP Bölgelerinin Tayini ve Genom Üzerindeki Konumları... 60	
3.4	Genotipleme Sonuçları	62
3.5	İstatistiksel Analizler	65
3.5.1	Hardy-Weinberg Dengesi Testi Sonuçları.....	65
3.5.2	Araştırılan SNP'lerin BPD ile İlişkilendirilmesi.....	69
3.5.2.1	SNP'lerin Genotip Düzeyinde BPD ile İlişkilendirilmesi.....	69
3.5.2.2	SNP'lerin Allel Düzeyinde BPD ile İlişkilendirilmesi.....	72
3.5.2.3	Araştırılan SNP'ler Arasında BPD ile İlişkili Bulunan Allel ve Genotiplerin Genel Değerlendirmesi.....	76
3.5.2.4	Çalışma Populasyonundaki İkiz ve Üçüzlerde SNP'lerin Değerlendirilmesi.....	80
3.5.3	BPD ile Anlamlı İlişkisi Tespit Edilen Polimorfizmlerin Bulundukları Genlerin ve Genlerin Yolaklarının Birbiryle ve BPD ile İlişkisi	81
3.5.4	BPD Hastalarında SNP Genotiplerinin Bazı Klinik ve Demografik Parametreler ile İlişkilendirilmesi	86
3.5.4.1	Ailede Görülen Kronik Akciğer Öyküsü ile SNP'lerin İlişkilendirilmesi	88
3.5.4.2	Ailede Görülen Zatürre Hastalığı Öyküsü ile SNP'lerin İlişkilendirilmesi	90
3.5.4.3	Ailede Görülen BPD ve RDS (Respiratory Distress Syndrome) Öyküsü ile SNP'lerin İlişkilendirilmesi	91
3.5.4.4	Hastanın Kardeşlerinde Görülen BPD Öyküsü ile SNP'lerin İlişkilendirilmesi	93

3.5.4.5 Ailede Düzenli Sigara Kullanımı ile SNP'lerin İlişkilendirilmesi	94
BÖLÜM 4	
SONUÇ VE ÖNERİLER	96
4.1 Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi.....	96
4.2 Öneriler	99
KAYNAKLAR	101
EK-A	
ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	113
EK-B	
HASTA BİLGİ FORMU	116
EK-C	
ETİK KURUL ONAYI	118
ÖZGEÇMİŞ	119

SİMGE LİSTESİ

°C	Derece Santigrat
A	Absorbans
A	Adenin
C	Sitozin
CO ₂	Karbon Dioksit
Da	Dalton
FiO ₂	Solunum oksijen fraksiyonu
G	Guanin
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nl	Nanolitre
nm	Nanometre
O ₂	Oksijen
OD	Optik dansite
rpm	Dakikadaki dönme sayısı
T	Timin
UV	Ultra viyole
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

KISALTMA LİSTESİ

ACE	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ASOH	Allel spesifik oligonükleotidler ile hibridizasyon
ASPE	Allel spesifik primer uzama
BPD	Bronkopulmoner Displazi
CARD	Kaspaz takviye bölgesi
CAT	Katalaz
CEP	Sentrozomal protein
CHST	Karbohidrat sülfotransferaz
CSMD	CUB ve Sushi çoklu bölgesi
CTNNA3	Katenin alfa 3
CYP2W1	Sitokrom P450 ailesi 2 alt ailesi üyesi
DSC	Desmokollin
ELBW	Aşırı Düşük Ağırlıklı Doğum
ENCODE	DNA Elementleri Ansiklopedisi
FGFR	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
FHIT	Hassas histidin üçlüsü
FP	Floresan polarizasyon
FRET	Floresan rezonans enerji transferi
GalNAc	N-asetilgalaktozamin
GRHL	Grainyhead benzeri transkripsiyon faktörü
GWAS	Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları
HIVEP	İnsan immün yetmezlik virüsü tip 1 geliştirici bağlanma proteini
HTR1A	Hidroksitriptamin reseptörü
HWE	Hardy-Weinberg Dengesi

IFNG	Interferon gamma
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL	İnterlökin
IRAK	İnterlökin 1 reseptörü ile ilişkili kinaz
KLF	Kruppel benzeri faktör
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
MAGI	Membran ile ilişkili guanilat kinaz
MALDI-TOF	Matriks Destekli Lazer Dezorpsiyon/İyonizasyon Uçma Zamanı
MBL	Mannoza bağlanan nektin
MIF	Makrofaj migrasyon inhibitör faktörü
MIR	microRNA
MMP	Matriks metalloproteinaz
MS	Kütle Spektrometresi
MTHFR	Metilentetrahidrofolat redüktaz
NFKB	NF-kappa B kompleksi alt üniteleri
NICHD	Amerikan Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsan Gelişimi Enstitüsü
NIH	Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü
NOS	Nitröz Oksit Sentaz
OR	Olasılıklar Oranı
ORD	Ender Rastlanan Hastalıkları Ofisi
PAMR	Kas rejenerasyonu ile ilişkili peptidaz bölgesi
PBV	Pozitif Basıncılı Ventilasyon
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFT	Pulmoner Fonksiyon Testi
PLXDC	Pleksin bölgesi içeren
PRR	Prolince zengin
RASGRF	Ras proteinine spesifik guanin nükleotidi salıcı faktör
RDS	Respiratuar Distres Sendromu
RFLP	İlk Restriksiyon Fragmanı Uzunluğunda Polimorfizm
RSV	Respiratuar Sinsisyal Virüs
RT-PCR	Gerçek zamanlı PCR
SAP	Shrimp Alkalın Fosfataz
SBE	Tek baz uzama

SFTP	Süpfaktan proteini
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SOD	Süperoksit dismutaz
SPOCK	Osteonektin, CWCV ve kazal benzeri proteoglikan bölgeleri
TIRAP	TIR bölgesini içeren adaptör protein
TLR	Toll benzeri reseptör
TNF	Tümör nekroz faktör
TNK	Tirozin kinaz reseptör
UEP	Bağlanmamış uzama primeri
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VLBW	Çok Düşük Ağırlıklı Doğum
WNT5A	Wnt ailesi üyesi 5A geni
ZNF	Çinko parmak

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Akciğerlerin embriyonik ve fetal dönemdeki gelişme evreleri.....	7
Şekil 1.2 Perinatal dönemde yaş terminolojisi	8
Şekil 1.3 SNP genotiplemede basamaklar ve farklı yaklaşımlar.....	20
Şekil 1.4 SNP genotipleme çalışmalarında allelik ayırım için sıklıkla kullanılan biyokimyasal reaksiyon yöntemleri	21
Şekil 1.5 iPLEX Genotipleme Analizi.....	26
Şekil 1.6 Sequenom MassARRAY MALDI-TOF MS (kütle spektrometrisi) Sistemi	27
Şekil 2.1 Uzama primerlerinin dört aşamalı optimizasyon yöntemine göre gruplandırılması	38
Şekil 3.1 Çalışma grubundaki bebeklerin cinsiyete göre dağılım grafiği.....	46
Şekil 3.2 Çalışma grubu bireylerinin doğum haftaları grafiği.....	47
Şekil 3.3 Çalışma grubunda görülen BPD şiddeti dağılımı grafiği	48
Şekil 3.4 Hasta grubuna dahil edilen bireylerin ek O ₂ alma süreleri	48
Şekil 3.5 rs1103125 polimorfizmi için genotipleme sonucu örneği.....	60
Şekil 3.6 rs755622 için spektrum örneği.....	61
Şekil 3.7 KLF12 ve CHST9 genlerinin fonksiyonel ilişki ağı	77
Şekil 3.8 VEGFA, CHST9, NFKBIA, MBL2 ve KLF12 genlerinin fonksiyonel ilişki ağı	77

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 1.1 BPD Sınıflandırması.....	3
Çizelge 1.2 Doğum ağırlığına göre prematüre bebeklerde BPD sıklığı	4
Çizelge 1.3 Sık kullanılan SNP genotipleme yöntemlerinin özeti.....	23
Çizelge 2.1 Multipleks reaksiyonlardaki SNP'ler	32
Çizelge 2.2 Araştırılan SNP'ler ve genotiplemede kullanılan primer-prob tasarımları	33
Çizelge 2.3 Bazlar arasındaki kütle farkları	35
Çizelge 2.4 Multipleks PCR bileşenleri	36
Çizelge 2.5 SAP reaksiyonu için bileşenler	37
Çizelge 2.6 Tek baz spesifik uzama reaksiyonu bileşenleri	39
Çizelge 2.7 Tek baz spesifik uzama reaksiyonunun döngüleri	40
Çizelge 2.8 Olasılıklar Oranı (OR) Hesaplama	42
Çizelge 3.1 Çalışma popülasyonundaki ikiz ve üçüz bebeklerin dağılımı.....	45
Çizelge 3.2 Hasta ve kontrol grubu DNA konsantrasyonları ve saflık değerleri	47
Çizelge 3.3 Analiz edilen SNP bölgelerinin, rs numaraları, genomdaki pozisyonları ve allel bilgileri	54
Çizelge 3.4 rs1049269 numaralı (SNP3) polimorfizmin bulunduğu DNA dizisi.....	56
Çizelge 3.5 Hardy-Weinberg testi sonuçları.....	60
Çizelge 3.6 Araştırılan SNP'lerin BPD ile genotip düzeyinde ilişkilendirilmesi.....	64
Çizelge 3.7 Araştırılan SNP allellerinin BPD ile ilişkilendirilmesi	67
Çizelge 3.8 Allel ve genotip düzeyinde BPD ile ilişkili bulunan SNP karşılaştırılması	71
Çizelge 3.9 Bu çalışmada BPD ile ilişkisi bulunan polimorfizmlerin literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırılması	79
Çizelge 3.10 Bu çalışmada riskli olarak tanımlanan allel ve genotiplerin, çalışma popülasyonundaki ikiz ve üçüzlerdeki durumu.	81

Çizelge 3.11 Klinik ve demografik tüm değişkenlerin SNP'lerle ilişkilendirilmesi.....	87
Çizelge 3.12 Ailede görülen kronik akciğer hastalığı öyküsü ile bu çalışmada istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunan polimorfizmleri gösteren çapraz tablolar	89
Çizelge 3.13 Ailede görülen zatürre öyküsü ile bu çalışmada istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunan polimorfizmleri gösteren çapraz tablolar	90
Çizelge 3.14 Ailede görülen BPD ve RDS öyküsü ile bu çalışmada istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunan polimorfizmleri gösteren çapraz tablolar.	92
Çizelge 3.15 Hastanın kardeş(ler)inde de görülen BPD öyküsü ile bu çalışmada istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunan polimorfizmleri gösteren çapraz tablolar	94
Çizelge 3.16 Ailede görülen düzenli sigara kullanımı ile bu çalışmada istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunan polimorfizmleri gösteren çapraz tablolar	95

BRONKOPULMONER DİSPLAZİ İLE İLİŞKİLENDİRİLEN BELİRLİ GENLERDEKİ POLİMORFİZMLERİN TÜRK POPULASYONU ÜZERİNDE İNCELENMESİ

Ayberk AKAT

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK

Bronkopulmoner displazi (BPD), preterm infantlarda en sık görülen kronik akciğer hastalıklarından biridir. Merkezlerin kronik akciğer hastalığı ve BPD tanımlarının farklılıklarından dolayı BPD insidansı da merkezlere göre değişkenlik gösterse de çoğu Avrupa ülkesine göre, hamileliğin 30. haftasından önce doğan preterm infantların %30'undan fazlasına BPD teşhisi konmaktadır. BPD geliştirme eğilimi olan preterm infantlar, akciğer gelişiminin geç kanaliküler veya erken sakküler evresinde doğarlar ve sonuçta alveol sayıları matür bebeklere göre daha az olur. Günümüzde enflamasyon ve özellikle prematürite ile birlikte alveol gelişimindeki duraklama, sürfaktan eksikliği ve göğüs duvarının olgunlaşmaması BPD'nin en önemli etiyolojik faktörleri olarak görülmektedirler. BPD, genetik ve çevresel faktörlerin (hiperoksi, invazif mekanik ventilasyon ve sepsis) karşılıklı etkileşimi sonucunda meydana gelmektedir. Literatürde BPD riskine etki eden genetik faktörler ikiz çalışmaları, ailesel birikim, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (genome wide association studies, GWAS) ve hedef genlerde tek nükleotid polimorfizmleri (single nucleotide polymorphism, SNP) gibi farklı yaklaşımlar ile araştırılmaktadır. Bu tez çalışmasında, dünyada farklı populasyonlar üzerinde yapılmış çalışmalarda bronkopulmoner displazi (BPD) ile ilişkilendirilmiş bazı SNP'ler seçilerek, Türk populasyonunda da bu SNP allel ve genotip frekanslarının görülüp görülmediğinin multipleks reaksiyonlar ve MALDI-TOF kütle spektrometrisi yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler ayrıca hastaların klinik ve demografik bilgileri ile de karşılaştırılarak anlamlı bir ilişki kurulmaya çalışılmış ve BPD'nin Türk toplumuna özgü genetik tabanının anlaşılabilmesine katkıda bulunulması amaçlanmıştır. 96'sı BPD hastası, toplam 192 prematüre infanttan toplanan kan örneklerinden genotiplenen 45 SNP bölgesi arasından rs11003125, rs2233406, rs3138053, rs55716084 ve rs62468577 polimorfizmlerinin allel düzeyinde; rs4883955, rs833061 ve rs9953270 polimorfizmlerinin ise hem allel hem de genotip düzeyinde Türk populasyonunda BPD insidansı ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki içerisinde olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte hastalardan toplanan klinik ve demografik verilerin araştırılan

SNP'ler ile olan ilişkileri incelendiğinde ise pek çok polimorfizmin ailede görülen kronik akciğer, zatürre, BPD, RDS ve sigara kullanımı öyküsü ile anlamlı bir ilişki içerisinde olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak bu tez çalışması ile toplumumuz için ilk kez BPD hastalığının genetik altyapısının araştırılması amacıyla çoklu polimorfizm bölgeleri yüksek doğruluk ile genotiplenerek BPD insidansı ile ilişkileri ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Tek nükleotid polimorfizmleri, bronkopulmoner displazi, multipleks PCR, SNP genotipleme

INVESTIGATION OF POLYMORPHISMS ON CERTAIN GENES WHICH ARE ASSOCIATED WITH BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA AMONG TURKISH POPULATION

Ayberk AKAT

Department of Bioengineering
Ph.D. Thesis

Advisor: Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK

Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is one of the most common chronic lung diseases seen in preterm infants. Although BPD incidence varies among different facilities due to differences between facilities for defining chronic lung diseases and BPD, according to most of the European countries more than 30% of preterm infants born before 30th week of pregnancy are diagnosed with BPD. Preterm infants who are predisposed to develop BPD are born in the late canalicular or early saccular stage of lung development, thus the number of alveoli they have stay lower than mature babies. Today, most important etiological factors of BPD are considered as inflammation, discontinuance of alveoli development due to prematurity, lack of surfactant and immaturity of chest wall. BPD occurs by the interaction of genetic and environmental factors (hyperoxia, invasive mechanic ventilation and sepsis) together. Genetic factors causing predisposition to develop BPD are being investigated with different approaches in the literature like twin studies, GWA studies and single nucleotide polymorphism (SNP) studies on target genes. Certain SNP's which are reported in the literature to be associated with BPD incidence in different populations have been designated to be investigated in Turkish population by determining allelic and genotypic frequencies of these SNP's using multiplex reactions and MALDI-TOF mass spectrometry methods and the information obtained has also been compared with clinical and demographical data acquired from patients with the aim of contributing to understand the genetic basis of BPD incidence specifically in Turkish population. Among 45 SNP sites genotyped from blood samples obtained from 192 premature infants, including 96 BPD diagnosed infants, rs11003125, rs2233406, rs3138053, rs55716084 and rs62468577 polymorphisms showed significant relationship at allelic level and rs4883955, rs833061 and rs9953270 polymorphisms showed statistically significant relationship both at allelic and genotypic level with BPD incidence in Turkish population. Furthermore, when

clinical and demographical data obtained from patients were investigated for any relationship with SNP's in prospect, chronic lung disease, pneumonia, BPD, RDS and cigarette consumption stories seen in the patient's family seemed to be in a significant relationship with these SNP's. In conclusion, with the aim of investigating the genetic basis of BPD incidence in Turkish population for the first time in the literature, this study has revealed the relationship between multiple polymorphisms and BPD incidences by using high fidelity genotyping methods.

Keywords: Single nucleotide polymorphisms, bronchopulmonary dysplasia, multiplex PCR, SNP genotyping

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Bronkopulmoner Displazi

Bronkopulmoner displazi (BPD), preterm infantlarda en sık görülen kronik akciğer hastalıklarından biridir [1]. “Klasik BPD” ilk kez 1967 yılında Northway ve ark. [2] tarafından, 31-34 haftalık doğan preterm infantlarda sürfaktan eksikliğinden dolayı ventile edilmeleri esnasında kullanılan yüksek basınç ve oksijen sebebiyle gelişen kronik bir pulmoner sendrom olarak tarif edilmiştir. Ancak 1980’li yıllarda sürfaktan kullanımının başlaması, sonrasında hamileliğin 34. haftasından küçük gebelerde antenatal glukokortikoid tedavisinin yaygınlaşması, modern ventilasyon tekniklerinin kullanılması ve oksijen satürasyonunun sürekli izlenebilir hale gelmesi gibi ilerlemeler, hamileliğin daha erken aşamalarında doğan preterm infantların hayatta kalım oranlarını yükseltmiş olsa da buna bağlı olarak BPD’yi de içeren pulmoner hastalıklarda morbidite oranını arttırmaya başlamıştır. Yeni doğan bakımında gelişen bu değişiklikler sonucunda BPD’nin ortaya çıkış şekli ve tanımı değişmiştir [3]. 30. gebelik haftasından önce doğan, başlangıçta respiratuar distres sendromu (RDS) gözlemlenmeyen veya hafif RDS ve/veya zayıf solunum sebebiyle entübe edilerek düşük basınçlı oksijen yöntemleri ile ventile edilen bazı bebeklerde, zamanla solunum bulgularının ağırlaştığı gözlemlenmiştir. Yeni doğan bebeklerde klasik BPD’nin gelişmesinden sorumlu tutulan en önemli faktörler olan yüksek basınç ve yüksek oksijen ile hiç karşılaşmayan bu bebeklerde gelişen durum “yeni BPD” olarak tanımlanmıştır [3-5]. Günümüzde BPD özellikle, akciğer gelişiminin geç

kanaliküler/erken sakküler döneminde, yani gestasyonun 23-28. haftasında doğan preterm infantlarda görülmektedir [3] ve “klasik BPD’yi” karakterize eden enflamasyon, fibröz ve skarlaşma gibi tanımlar, yerini “akciğer gelişimi eksikliği ve/veya bozulması” kavramlarına bırakmıştır. BPD’nin epidemiyolojisi ve patolojisi değiştikçe ve önceki preterm infantlar yetişkinliğe ulaştıkça BPD üzerine araştırmalar yaşam seyri yaklaşımıyla devam etmektedir. “Yeni BPD”nin yaşam seyri klasik BPD’den bir farklılık göstermemekte, her iki gruptan bireylerde de pulmoner fonksiyon testlerinde (PFT), ekspiratuar akım kısıtlamaları ile birlikte devam eden solunum semptomları ve akciğer fonksiyonlarında azalma görülmektedir. Hayata azalmış akciğer fonksiyonları ile başlayan ve ölçülen PFT değerlerini ömür boyu taşımak zorunda kalacakları rapor edilen [6-8] bu infantlarda, BPD’nin kronik obstrüktif akciğer hastalığına (KOAH) da uygun zemin hazırlayacağına kesin gözüyle bakılmaktadır [8]. Bu durum, BPD hastalığının önüne geçilebilmesi için daha fazla bilimsel araştırma yapılmasına olan ihtiyacı göstermektedir.

2001 yılında Amerikan Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsan Gelişimi Enstitüsü (NICHD), Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) ve Ender Rastlanan Hastalıkları Ofisi (ORD)’nin yayımlamış olduğu kriterlere göre BPD, hafif, orta ve ağır olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca BPD’nin ortaya çıkış yaşı da önemli olduğu için 32. gebelik haftasının altındaki ve üzerindeki infantların da ayrı sınıflandırılması gerektiğini ve toplam 28 günden uzun süre %21’den yüksek konsantrasyonda oksijen gereksinimi olan infantlara değerlendirme yapılması gerektiğini rapor etmişlerdir (Çizelge 1.1) [9].

1.1.2 Epidemiyoloji

Merkezlerin kronik akciğer hastalığı ve BPD tanımlarının farklılıklarından dolayı BPD insidansı da merkezlere göre değişkenlik göstermektedir [10]. Ancak çoğu Avrupa ülkesine göre, gestasyonun 30. haftasından önce doğan preterm infantların %30’undan fazlasına BPD teşhisi konmaktadır [11]. Amerikan Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsan Gelişimi Enstitüsü Yenidoğan Araştırma Grubu’nun çalışmasında ise, 36. haftada oksijen bağımlılığının devam etme kriterine göre 500-1500 gram arası ağırlıkta doğan prematüre bebeklerde sıklığı %3-43 arasında bulmuşlardır [12].

Çizelge 1.1 BPD Sınıflandırması [9]

Gebelik Yaşı	<32 Hafta	≥32 Hafta
Değerlendirme Zamanı	Postmenstrüel yaş 36. haftada veya taburculukta (hangisi önce ise)	Postnatal yaş 56. günde veya taburcu edilirken
Hafif BPD	En az 28 gün ≥%21 O ₂ gereksinimi + Postmentrüel 36. haftada veya taburculuk sırasında (hangisi daha önce ise) ek O ₂ gereksiniminin olmaması	En az 28 gün ≥%21 O ₂ gereksinimi + Postnatal 56. gün veya taburculuk sırasında (hangisi daha önce ise) ek O ₂ gereksiniminin olmaması
Orta BPD	Postmentrüel 36. haftada veya taburculuk sırasında (hangisi daha önce ise) ek oksijen gereksinimi <%30	Postnatal 56. gün veya taburculuk sırasında (hangisi daha önce ise) ek oksijen gereksinimi <%30
Ağır BPD	Postmentrüel 36. haftada veya taburculuk sırasında (hangisi daha önce ise) ≥%30 O ₂ gereksinimi ve/veya PBV/nCPAP gereksinimi	Postnatal 56. gün veya taburculuk sırasında (hangisi daha önce ise) ≥%30 O ₂ gereksinimi ve/veya PBV/nCPAP gereksinimi
nCPAP: Nazal CPAP, PBV: Pozitif basınçlı ventilasyon		

İsrail Neonatal Ağının 2000-2010 yılları arasında doğan preterm infantlar üzerine yaptığı araştırmada, çok düşük ağırlıklı (VLBW; <1500gr) infantlarda %13.7, aşırı düşük ağırlıklı (ELBW; <1000gr) infantlarda (n=12.139) ise %31 oranında BPD teşhisi konduğunu rapor etmiştir [13]. Kanada ve Japonya Neonatal Grubu 2006-2008 yılları arasında doğan VLBW infantlarda %12.3-14.6 sıklığında BPD görüldüğünü [14], Vermont Oxford Grubu ise 2000-2009 yılları arasında doğan preterm infantlarda (n=305.770) yıllık BPD oranının %26.2-30.4 olduğunu rapor etmiştir [15]. Amerikan Ulusal Sağlık Örgütü'ne (NIH) bağlı Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsan Gelişimi (NICHD) merkezlerinin araştırmaları da 1250 gramdan düşük ağırlıklı doğan preterm infantlarda BPD oranlarının benzer şekilde <%10 - >%50 arasında değişkenlik gösterdiğini açıklamaktadır [16-21]. Avrupa'da 2003 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, 32 haftadan önce doğan preterm infantlarda BPD oranı %10.5-21.5 olarak belirlenmiş [19], Güney Kore'de ise VLBW infantlarda BPD oranı %5-50 arasında değişkenlik göstermiştir [20]. Ülkemizde ise BPD'nin görülme sıklığı ile ilgili bir rapor maalesef bulunmamaktadır. Farklı merkezler yapılmış olan çalışmalarda

preterm infantlarda BPD oranının %4.2-36.7 arasında olduğuna dair yayınlar mevcuttur [22-25].

BPD sıklığı, doğum ağırlığına veya gestasyon yaşına göre ters orantılı olarak değişkenlik göstermektedir [26]. 1500 gramın altında ve 30. gestasyon haftasından önce doğan 60.000 bebekte BPD oranı %20 olarak rapor edilmiştir [27]. VLBW bebeklerin yaşama oranı arttıkça, BPD gelişmesi olasılığı olan hastaların sayısı da artmaktadır ve VLBW bebeklerde doğum ağırlığı arttıkça BPD gelişme oranı da azalmaktadır. Gestasyon yaşı ve doğum ağırlığı ile BPD insidansı arasındaki ilişki Çizelge 1.2’de açıklanmıştır [28-30].

Çizelge 1.2 Doğum ağırlığına göre prematüre bebeklerde BPD sıklığı [28-30]

Doğum Ağırlığı (gr)	BPD insidansı	Oksijen Gereksinimi (Postnatal 28. gün)	Oksijen Gereksinimi (Postkonsepsiyonel 36. hafta)
500-750	%52	%90-100	%54
750-1000	%34	%50-70	%33
1000-1200	%15	%30-60	%20
1200-1500	%7	%6-40	%10

BPD erkeklerde ve beyaz ırkta daha sıklıkla görülmektedir [31, 32]. Literatürdeki sürfaktan çalışmalarında BPD oranları %17-57 arasında bildirilmiş ancak sürfaktan kullanılan ve kullanılmayan gruplar arasında farklılık gözlemlenmediği rapor edilmiştir. Modern ventilasyon uygulamalarının gelişmesinin, sürfaktan ve antenatal steroid kullanımının artmasının BPD insidansını düşürdüğü rapor edilse de, literatürdeki yayınların çoğunluğu son 20-30 yılda prematüre bebeklerde hayatta kalma oranının artıyor olmasının, toplamda BPD hastası bebeklerin sayısında bir değişiklik olmamasına neden olduğunu savunmaktadır [15, 26, 33-35]. EPICure çalışmaları sonuçları da 1995-2006 yılları arasında 22-26 haftalık doğan infantlar arasında BPD görülme sıklığının değişmediğini göstererek, toplamda BPD hastası bebeklerin sayısında bir değişiklik olmadığını desteklemiştir [36].

1.1.3 Etyopatogenez

Histolojik olarak akciğer gelişimi ve olgunlaşması, embriyonik, psödoglandüler, kanaliküler, sakküler ve alveolar olmak üzere 5 aşamada gerçekleşir (Şekil 1.1) [37, 38]. Psödoglandüler evre, hamileliğin 5-17 haftaları arasında gerçekleşen, akciğerlerin en erken gelişme aşamasıdır. Bu aşamada kübik epitel hücreleri ile birlikte epitelyal tüpler dallanma morfogeneze başlayarak, psödoglandüler evrenin isminden de anlaşılacağı üzere, ekzokrin bezlerine benzemeye başlarlar. Ancak bu sıvı dolu, ilkel solunum ağacı yapısı, hava alışverişi gerçekleştirebilmek için yeteri kadar olgunlaşmamıştır [39].

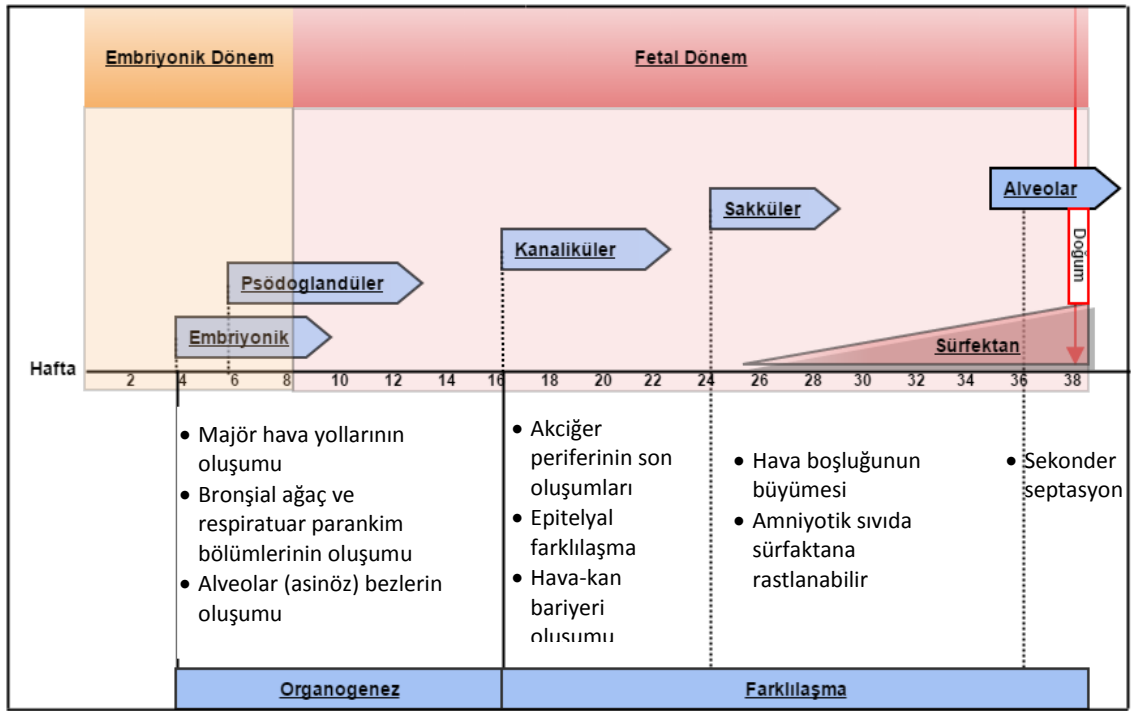
Hamileliğin 16-25 haftaları boyunca fetal akciğerler kanaliküler evrededirler. Psödoglandüler evrenin son haftası ile kanaliküler evrenin ilk haftasının kısmen çakışmasının sebebi, akciğerlerin kraniyal kısmının kaudal kısmından daha hızlı gelişmesidir. Kanaliküler evrede, havayollarının vaskülerizasyonu ve anjiyogenezi ile birlikte solunum ağacı hem çap hem de uzunluk olarak büyür, kapillerlerin sayısında çok büyük bir artış gerçekleşir. Bunu takiben terminal bronşiyoller solunum bronşiyollerine ve alveolar keselere bölünürler ve havayolları epitelyal hücreleri periferik skuamöz hücrelere ve proksimal küboidal hücrelere farklılaşırlar [39].

Sakküler evre hamileliğin 24. haftasında başlar ve geç fetal döneme kadar devam eder. Terminal sakküler evrede, apoptoz ve mezenkimal hücrelerin farklılaşmasının bir sonucu olarak, interstisyum kayda değer şekilde incilir [40, 41]. Ayrıca bu evrede alveolar epitelyal hücreler, üzerinde sürfaktan içeren lamellar cisimler taşıyan Tip 1 erişkin skuamöz pnömositlere ve Tip 2 salgılayıcı yuvarlak pnömositlere farklılaşırlar. Kapillerler de hızla büyüyerek mezenşim içerisindeki keselerin (sakkül) etrafını sarar ve karmaşık bir ağ oluştururlar. Bunlara ek olarak, akciğer dokusunun lenfatik ağı da bu evrede gelişir. Primer septum olarak da adlandırılan sakküllerin kalın duvarları, içerisinde birbirlerine paralel çift sıra kapiller ağı olan konnektif doku çekirdeğinin her iki tarafına sıralanmış epitelyal hücrelerden oluşur. Sakküler evrenin sonuna doğru doğan prematüre infantların fetal akciğerleri hava alışverişini sağlayabilecek duruma gelir. Sürfaktan sentezinin olgunlaşması ve sekresyon miktarı, yeni doğan bir akciğerin çökmeden hava alışverişini sürdürebilmesini belirleyen anahtar faktörlerdir [39].

Akciğer gelişiminin son evresi olan alveolar evre, geç fetal dönemde başlayıp çocukluk dönemine kadar devam eder. Akciğerler gelişimlerini doğumdan sonra 8 yaşına kadar da sürdürürler [42]. Hava alışverişini sağlayacak yüzeylerin çok büyük bir bölümü, alveolarizasyonun gerçekleştiği bu evrede oluşur. Kho ve arkadaşlarının 2009 yılında yapmış olduğu genom ekspresyon profili çalışmalarında, 7-22 haftaları arasında sonlanmış gebeliklerde, gelişen akciğer transkriptomlarının profili incelenmiştir [43]. Bu çalışmada, akciğerlere spesifik 3,223 genin ifadelerinin, histolojik evreler ile uyumlu bir biçimde geçiş gösterebildikleri önerilmiştir. Örneğin, süfaktan geninin ekspresyonunun indüklenmesi, psödoglandüler evrede moleküler bir dönüşümü belirlemektedir.

BPD oluşma eğilimi olan preterm infantlar, akciğer gelişiminin geç kanaliküler veya erken sakküler evresinde doğarlar. Geç kanaliküler evrede primitif alveoller ve alveolar kapiller bariyer gelişir, Tip 1 ve Tip 2 pnömositler farklılaşırlar [44]. Erken sakküler evrede ise pulmoner vaskülerizasyon ve terminal hava yollarının genişlemesi ile birlikte süfaktan üretimi başlar [37, 38]. Sakküler evrede primitif alveoller oluşmaya başlar ve buna bağlı olarak kapiller membran değişmeye başlar. Bu haftalarda doğan infantlarda akciğerlerin bu gelişimi duraklar ve sonuçta alveol sayıları matür bebeklere göre daha az olur. Günümüzde enflamasyon ve özellikle prematürite ile birlikte alveol gelişimindeki duraklama, süfaktan eksikliği ve göğüs duvarının olgunlaşmaması BPD'nin en önemli etiyolojik faktörleri olarak görülmektedirler [45-47]. Gestasyon haftası ve doğum ağırlığı düştükçe, BPD sıklığı hızla yükselmektedir. 26 haftadan önce doğan infantlarda BPD oranı %70'lere kadar çıkabilirken, 34 haftanın üzerinde doğan infantlarda bu oran %1'e inmektedir [48].

BPD, genetik ve çevresel faktörlerin (hiperoksi, invazif mekanik ventilasyon ve sepsis) karşılıklı etkileşimi sonucunda meydana gelmektedir [49-52]. BPD'nin temelinde, süfaktan yetersizliği olsun ya da olmasın, olgunlaşmamış akciğer yatar. BPD'ye yatkınlığın %50-80'inin de genetik eğilime dayandığı düşünülmektedir [53, 54]. Genetik eğilimli olgunlaşmamış akciğer, prenatal ve postnatal enfeksiyon, hiperoksi, ventilasyon ile indüklenmiş barotravma, alveolar distansiyon (valutravma) veya atelektotravma gibi zararlı dış faktörlere maruz kaldığında, çeşitli sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri sinyalleri ve enflamatuvar hücreleri içeren bir enflamasyon zincirini tetikler. Bu durum hücre ölüm yollarını aktive eder.



Şekil 1.1 Akciğerlerin embriyonik ve fetal dönemdeki gelişme evreleri [37, 38]

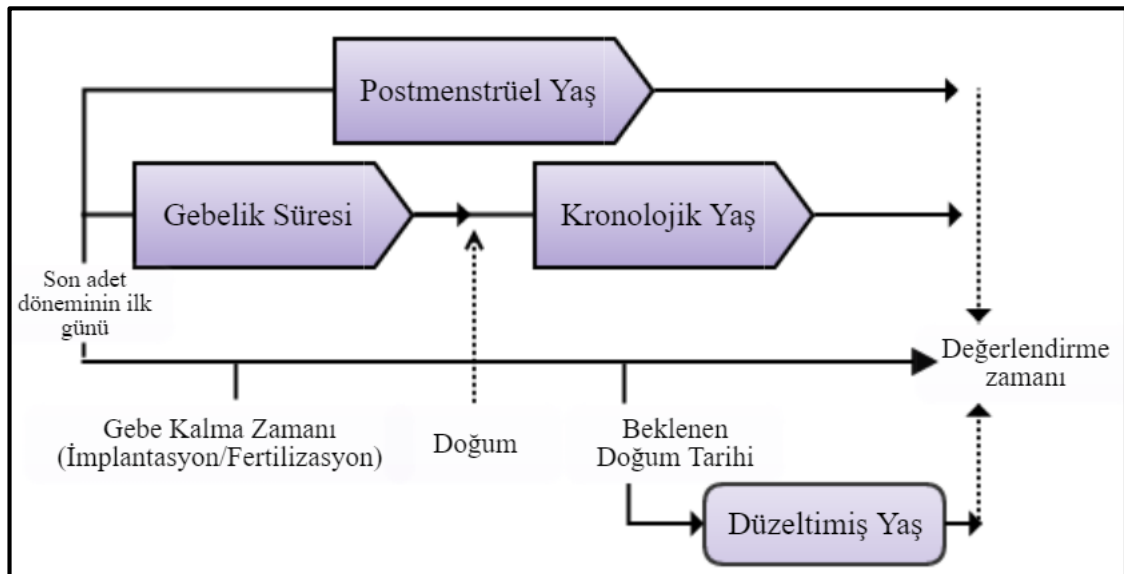
Gelişmekte olan akciğerlerin hasar görmesini takiben normal akciğer yapısı ve tamiri de zarar görür [52]. Klasik BPD, sürfaktan kullanımının olmadığı zamanlarda invazif ventilasyon yöntemlerinin kullanımından dolayı akciğer hasarlarına yol açması sonucu ciddi fibroproliferatif yanıt ile birlikte hava yolları hasarı ve alveolar büyüme bozukluğu ile karakterize edilmekteydi [55]. Sürfaktan kullanımı ile başlayan, olgunlaşmamış akciğerlere daha hassas ventilasyon tekniklerinin uygulandığı dönemdeki akciğerlerin gelişme aşaması, büyük ve az sayıda basit alveoller ile birlikte dismorfik damar düzeni ile karakterize edilmektedir. Bu durum, “Yeni BPD”nin de tanımı olan, gelişmemiş alveolarizasyon ve düzensiz vaskülerizasyona yol açmaktadır [49, 51, 55]. BPD’nin oluşabilmesi için, olgunlaşmamış akciğerlerin bilinen bazı çevresel faktörlere uzun süreli olarak maruz kalması ve sonuçta kalıcı bir enflamasyona sebep olması gerekir [44]. Erken enflamatuvar tepkinin belirteçleri (hücreler, sitokinler), zararlı çevresel faktörlere uzun süre maruz kalındıktan sonra saptanamasalar da enflamatuvar sürecin ve immün yanıtın sinyal yollarının başlangıç basamakları sonunda BPD’li akciğerlerin yapı ve fonksiyonunda kalıcı hasarlara yol açmaktadır [44].

1.1.4 Bronkopulmoner Displazi ile İlişkili Kalıtsal Faktörlere Yaklaşımlar

BPD'nin kalıtsal kökeni ile ilgili arayış, bazı faktörler sebebiyle zamanla karmaşık bir hal almıştır. Bu faktörlerden biri, Northway ve arkadaşlarının daha önce de belirtilmiş olduğu üzere, 1967 yılında ilk BPD tanımını yapmalarından [2] bu yana BPD teşhis kriterleri pek çok defa değişmiştir. BPD tanımı 1979'da Tooley tarafından, 30 günlük infantlarda akciğer parankiminde şu radyolojik bozukluklardan en az birini taşımak olarak yeniden tanımlanmıştır:

- 1) ≤ 60 torr oda havası solurken arterial kanda O_2 tansiyonu;
- 2) Arterial kanda 45 torr'dan fazla CO_2 tansiyonu; ve/veya
- 3) O_2 bağımlılığı (0.21 'den fazla FiO_2 ihtiyacı) [56].

1988 yılında ise Shennan, gebelik süresi azaldıkça, 28. günde oksijen ihtiyacının ölçülmesinin giderek daha anlamsız olduğunu gözlemlemiş ve gebelik süresine hiç aldırmadan, düzeltilmiş postnatal 36. haftadaki (Şekil 1.2) oksijen gereksiniminin ölçülmesinin olası akciğer bozukluklarını tahmin edebilmek için daha iyi bir yöntem olacağını rapor etmiştir [57].



Şekil 1.2 Perinatal dönemde yaş terminolojisi [57, 58]

Ancak tüm bu tanımlamalardaki en büyük sorun farklı hekimler tarafından pek çok farklı oksijen gereksinimi kriterlerinin kullanılıyor olmasıdır. Daha önce de bahsedilmiş olduğu üzere, 2001 yılında NICHD, NIH ve ORD'nin yapmış olduğu BPD sınıflandırmasından hemen sonra 2003 yılında Walsh ve arkadaşları [58], 36 haftalık düzeltilmiş yaşta

standardize oksijen satürasyonunun izlenmesi ile BPD'nin fizyolojik tanımını yaparak daha güvenilir bir BPD teşhis yöntemi geliştirmişlerdir. Günümüzde 2001 ve 2003 yıllarında yapılmış olan bu iki BPD tanımı kullanılmaktadır. Zaman içerisinde BPD ile ilgili birden fazla tanımın evrildiği ve günümüzde BPD gelişen infantların (genellikle 22-26 haftalık doğan), 1970'lerde (30-34 haftalık) ve 1990'larda (26-30 haftalık) en yüksek BPD riski görülen infantlardan çok daha prematüre olduğu gerçeği göz önüne alındığında, 1970 veya 1980'lerde BPD olarak tanımlanan infantların günümüzde BPD teşhisi konan infantlardan çok farklı oldukları rahatlıkla söylenebilir [59]. Teknolojinin ilerlemesi ile birlikte, şiddetli akciğer hastalıkları ve BPD gelişmesine rağmen preterm infantların hayatta kalma oranları artmış ve genetik araştırmaları ucuzlamış ve hızlanmıştır; bu sebeplerden dolayı BPD eğilimine katkıda bulunan genetik faktörler son yıllarda pek çok araştırmanın konusu olmuştur [59].

Literatürde BPD riskine etki eden genetik faktörler araştırıldığında, ikiz çalışmaları, ailesel birikim, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (genome wide association studies, GWAS) ve hedef genlerde tek nükleotid polimorfizmleri (single nucleotide polymorphism, SNP) gibi farklı yaklaşımlar ile karşılaşılır.

1.1.4.1 İkiz Çalışmaları

Kompleks insan hastalıklarında genetik faktörler ile çevresel etiyolojilerin birbirleri ile karşılaştırılabilmesi için ikiz çalışmaları çok önemlidir. Bu çalışmaların temelinde, monozigotik ikizlerin genetik bilginin %100'ünü ortak olarak taşıması, dizigotik ikizlerin genetik bilginin %50'sini ortak olarak taşıması ve her ikisinin de ortak intrauterin çevreye maruz kalmaları yatar. Böylece eğer hastalık, monozigotik ikizlerde dizigotik ikizlere göre daha fazla gözlemleniyorsa, hastalığın etiyolojisi altında genetik bileşenlerin yattığı sonucuna varmak mantıklıdır [60]. Ancak DNA dizisindeki değişikliklerden farklı mekanizmalardan dolayı da genetik ekspresyonda kalıtsal farklılıkların oluşabileceği de göz önünde tutulmalıdır. Tam olarak bu konu ile ilgilenen epigenetikçiler, daha önceleri tüm epigenetik sinyallerin zigot oluşumu esnasında silindiğini düşünüyorlardı, ancak yakın zamanda yapılan çalışmalarda epigenetik modifikasyonların ebeveynlerden fetüse geçebildiğine dair kanıtlar rapor edilmektedir [61].

BPD'ye olan genetik yatkınlık üzerine ikizler ile yapılan çalışmalar Parker ve arkadaşlarının 1996'da yapmış oldukları çalışma [62] ile başlamıştır. BPD'yi, postnatal 28.

günde oksijen ihtiyacı olarak tanımlayan Parker ve arkadaşları, 1500 gramdan düşük ağırlıkta doğan ikizler üzerinde yapmış oldukları çalışmada, eğer ilk doğan ikizde BPD gözlemleniyorsa, ikinci ikizde de BPD gözlemlenme riski olasılığını %12,3 olarak hesaplamışlardır. Bu durum her ne kadar genetik faktörlerin mevcut olduğunu önerse de araştırmada zigotluk belirlenmediği için ortak çevresel risk faktörleri göz ardı edilememiş ve örnek sayısı da az olduğu için aynı cinsiyetteki ikiz çiftler ile farklı cinsiyette ikiz çiftler arasında herhangi bir uyum gözlemlenememiştir. Ancak bu çalışma, BPD'nin altında genetik bir etiyoloji olduğunu önererek gelecekte yapılacak çalışmalar için önemli bir kapı açmıştır. Parker ve arkadaşlarının çalışmasını takiben Bhandari ve arkadaşları 2006 yılında [53] BPD'ye olan ailesel ve genetik eğilimleri araştırmak için 1994-2004 yılları arasında, 32 haftadan önce doğmuş, 192 ikiz çift üzerinde çok merkezli bir retrospektif çalışma gerçekleştirmişlerdir. Genetik ve ortak çevresel faktörler göz önüne alındığında bu ikiz çalışmalarından elde edilen veriler BPD'ye yatkınlıkta %65,2 (%95 CI: %53–79, $p < 0.001$) dağılım göstermiştir. Genetik bileşen, monozigotik ve dizigotik ikizler arasındaki korelasyondan tahmin edilmeye çalışılmış ve monozigotik ikizler arasında gözlenen korelasyon, beklenenin anlamlı bir şekilde üzerinde olmuş; BPD'ye yatkınlığın dağılımında genetik faktörlerin %53 (%95 CI: %16–89, $p = 0.004$) oranında sayılabileceği rapor edilmiştir [53]. Bunu takiben 2008 yılında bir başka çalışmada Lavoie ve arkadaşları da [54] 1993-2006 yılları arasında, 30 haftadan önce doğmuş 318 Kanada'lı ikiz çift üzerinde BPD'nin kalıtımını değerlendirmiş ve BPD yatkınlığı dağılımında genetik etkinin %79 gibi yüksek oranlarda olduğunu rapor etmişlerdir. Bu üç ikiz çalışmaları birlikte ele alındığında BPD'ye olan yatkınlıkta genetik faktörlerin çok önemli rol oynadığı görülmektedir.

1.1.4.2 Ailesel Birikim (Drift) Çalışmaları

Bazı ailelerde diğerlerine göre daha fazla görülen hastalıkların altında genellikle genetik bir etiyoloji olduğundan şüphe edilmektedir, ancak bir hastalığın bir ailede daha sık görülmesi yalnızca genetik bir etiyolojiden değil, yaşam tarzı ve çevresel faktörlerinde kalıtımından ötürü gerçekleşebilir. Dolayısıyla ailesel çalışmalarda, bu tip çeşitli kalıtsal elementlerin ayırt edilmesi gerekir. Genom içerisinde birbirlerinden uzakta konumlanmış genetik belirteçler, 2'den fazla aile bireyinin hastalığın fenotipinden etkilendiği durumlarda, tüm aile bireylerinin genotipi değerlendirilir. Spesifik bir

genotipin ailenin tamamında görüldüğü durumlarda bile, ilişkili olduğu fenotip aile içinde değişkenlik gösterebilir (ekspresivite) [60].

Bu kapsamda Pavlovic ve arkadaşlarının [63] 2006 yılında yapmış oldukları bir ailesel birikim çalışmasında, 60 farklı aileden, 30 haftadan önce doğmuş, hafif BPD (n=52, postnatal 28. günde oksijen desteği) ve orta-ağır BPD (n=19, postmenstrüel 36. haftada oksijen desteği) hastaları üzerinde, sürfaktan üretimi ile ilişkili 5 farklı gende allelik geçişi araştırmışlardır. Araştırma sonucunda, sürfaktan ile ilişkili protein B (SP-B), SP-B ile ilişkili mikrosatellit belirteçler ve SP-A, SP-D ve SP-B haplotipleri arasında bir bağlantı olduğunu rapor etmişlerdir. Özellikle SP-B'nin 5'UTR (translasyonu yapılmayan bölge, untranslated region) bölgesindeki B-18 lokusunun (A/C) orta-ağır BPD ile ilişkisi olduğu, bu lokustaki C allelinin beklenenden yaklaşık 3,5 kat fazla iletildiğinin (p=0,02) ölçülmesi ile gösterilmiştir. Haplotip analizleri, SP-B için 10 BPD'ye duyarlılık ve 1 koruyucu haplotipi olduğunu göstermiştir [63]. Ancak bu sonuçların yorumları, yalnızca araştırma grubu içerisindeki 19 orta-ağır BPD vakası üzerinden yapılmıştır. Ayrıca bu yorumlar yalnızca prenatal steroid, postnatal steroid ve sürfaktan kullanımına göre yapılmış ve doğum haftası, doğum ağırlığı gibi BPD ile güçlü bir şekilde ilişkili değişken faktörler göz önüne alınmamıştır [60].

1.1.4.3 Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları

Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında milyonlarca SNP'nin frekans farklılıkları, belirli bir hastalık fenotipini taşıyan populasyonlar ile uygun kontrol populasyonları (hastalık fenotipini taşımayan) arasında karşılaştırılmaktadırlar. Bazı modern analiz platformları 5 milyona kadar SNP'nin frekans farklılıklarını tayin edebilmektedir. Bu tip araştırmalar, tüm genom içindeki ortak varyasyonların araştırılmasına olanak sağlamaktadır. Yalnızca ekzonları değil, tüm genomu değerlendirebilmenin önemi, 2012 yılında Bernstein ve arkadaşlarının gerçekleştirmiş olduğu ENCODE projesinde [64], insan genomunun çoğunun "junk DNA" oluşuna dair genel görüşün aksine insan genomunun %80'inin çeşitli biyokimyasal fonksiyonlar ile ilişkili elementler içerdiği gösterilerek açığa çıkarılmıştır. Son on yılda gerçekleştirilen insan genomu dizileme çalışmaları çeşitli genomik varyasyonların keşfi için bir temel hazırlamıştır [60].

Hadchouel ve arkadaşları, 2002-2009 yılları arasında Fransa'da 28 haftadan önce doğan 418 Kafkas (beyaz ırk)-Fransız ve Afrikalı-Fransız prematüre infant üzerinde bir GWA

çalışması yapmıştır [65]. Hastaların etnik kökenleri ailelerinin coğrafi kökenine göre belirlenmiştir. BPD tanısı, postmenstrüel 36. haftada oksijen desteği ihtiyacının [27] değerlendirilmesi ile konmuş ve %22 oranında BPD vakası olduğu gözlemlenmiştir. Araştırmacılar bazı hastalar (43 BPD hastası ve 162 kontrol) ile bir GWA çalışması yapmış ve SPOCK2 genindeki rs124556 SNP'sinin BPD ile ilişkili olduğunu ($p= 1,66 \times 10^{-7}$) rapor etmişlerdir. Sonuçlar farklı bir benzer çalışmadaki 213 Finlandiyalı prematüre infant ile karşılaştırıldığında da %26 gibi yakın bir BPD vakası oranı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, SPOCK2 geninin rs124556 SNP'sinin C allelinin hem Kafkas-Fransız hastalarda (OR=3.0 (1.4-6.4)) hem de Afrikalı-Fransız hastalarda (OR=5.0 (1.9-12.6)) orta-ağır BPD ile ilişkili olduğunu rapor etmişler ve daha sonra SPOCK2 bölgesinin haritalandırma çalışmalarında da CC genotipi riskini doğrulamışlardır. Aynı araştırma grubunun sıçanlar üzerinde yaptıkları araştırmalarda SPOCK2 genini kodlayan mRNA'ların seviyelerinin alveolar gelişim dönemlerinde arttığı ve hiperoksi ortamda fibroblast ve epitelyal hücrelerde mRNA düzeyinde eksprese edildiği gözlemlenmiştir [65]. BPD ile ilişkili biyolojik önemi olduğu düşünülen SPOCK2 geni üzerindeki iki SNP (rs1245560 ve rs1049269), bu tez çalışmasında da Türk popülasyonu üzerinde araştırılan 45 SNP arasındadır.

BPD insidansı ile polimorfizmlerin ilişkisinin araştırıldığı en güncel genom çapında ilişkilendirme çalışması ise Mahlman ve ark. [66] 2017 yılında gerçekleştirmiş oldukları çalışma olmuştur. Finlandiya'da yapılan bu araştırmada replikasyon çalışmaları ile birlikte toplam 319 BPD hastası ve 798 sağlıklı Fin kökenli preterm infantta 276,306 SNP bölgesi çalışılmıştır. Bu çalışmada, literatürde daha önce BPD ile ilişkisi rapor edilen polimorfizmlerin hiç biri anlamlı bir sonuç vermemiş olsa da yalnızca CRP geni üzerindeki rs11265269 polimorfizmi anlamlı olmaya en yakın sonucu vererek BPD için bir risk faktörü olarak önerilmiştir.

1.1.4.4 Hedef Gen SNP Çalışmaları

Hedef genlerin veya yolakların araştırmak üzere belirlenebilmesi için gereken bilgi, deneysel modeller (hücreler ve hayvanlar) üzerinde yapılan çalışmalardan veya önceki insan çalışmalarının değerlendirilmesi ile elde edilebilir. Benzer şekilde literatürde bulunan, BPD'de de gözlemlenen akciğer gelişim bozuklukları gibi yapısal değişiklikler ile belirli genlerin veya kodladıkları proteinlerin nasıl bir fonksiyonel ilişki içinde olduklarına dair biyolojik temelli teoriler temel alınarak, anlamlı bir ilişki bulabilme ihtimali yüksek

hedef genler ve yollar belirlenebilir. Literatürdeki pek çok çalışmada, akut ve kronik BPD'den sorumlu olduğu düşünülen potansiyel patofizyolojik yollar veya moleküller belirlenmiştir. Araştırmacılar buna göre, BPD gelişme riski ile hedef genlerdeki spesifik dizi değişiklikleri (SNP) arasındaki ilişkiyi değerlendirmektedirler.

Rykman ve arkadaşları [67] A.B.D.'de yaşayan Kafkas kökenli infantlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada, daha önceden rapor edilen, BPD riski artışı ile ilişkilendirilmiş 8 gen ile ilgili değerlendirmeler yapmışlardır. Araştırılan bu 8 gen, sürfaktan proteinleri (SFTPA2, SFTPB, SFTPC, SFTPD), tümör nekroz faktörü (TNF), interferon gamma (IFNG), anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) ve mannoza bağlanan lektin (MBL2), 2000-2009 yılları arasında, 32 haftadan önce doğmuş ve 36. gebelik haftasında oksijen desteğine ihtiyaç olması semptomu ile BPD teşhisi konmuş 134 infant ile BPD olmayan 255 infant kontrol grubu karşılaştırılarak araştırılmıştır. Özellikle kodlayan bölgedeki ve promotör bölgedeki SNP'lere odaklanan çalışmada toplam 34 SNP araştırılmış ancak ACE genindeki SNP hariç hiçbir SNP'de istatistiksel eşiğe ulaşamamıştır. Rykman ve arkadaşlarının bu çalışmasında yalnızca ACE genindeki rs8066114 SNP'si artan BPD riski ile ilişkilendirilmiştir (OR=4.3 (1.3-14.3)). Bu tez çalışmasında da BPD ile ilişkisi olduğu düşünülen ve Türk toplumunda araştırılan 45 SNP arasında IFNG, TNF ve MBL2 genleri üzerindeki bazı SNP'ler de bulunmaktadır.

Makrofajlar ve diğer hücreler tarafından üretilen bir sitokin ve kazanılmış veya kalıtsal immün tepkinin önemli bir düzenleyicisi olan interlekin-18 (IL-18)'in de BPD ile ilişkisi üzerine yakın zamanda iki ayrı çalışma gerçekleştirilmiştir. Bunlardan biri, Floros ve arkadaşlarının [68] 2012 yılında gerçekleştirdiği yüksek örnek sayılı bir çalışmadır ve A.B.D.'de 1989-2008 yılları arasında 35 haftadan önce doğmuş 1091 Kafkas ve Afrikalı-Amerikalı infantın 601 geni üzerindeki toplam 6324 SNP bölgesi araştırılmıştır. Seçilen genler, daha önceki çalışmalardan immün yanıt, enflamasyon, doku tamiri veya akciğer hastalıkları geliştirme ihtimalinde rolü olduğu düşünüldüğü için seçilmişlerdir. Bu çalışmada postnatal 28. günde oksijen desteğine ihtiyaç duyan infantlara BPD teşhisi konulmuş, yani hafif orta ve ağır BPD hastalarının tamamı dahil edilmiştir, ancak daha önce de bahsedildiği gibi orta ve ağır BPD'nin kalıtsal aktarımı ile ilgili çalışmalar olsa da hafif BPD'nin kalıtımı ile ilgili herhangi bir bilgi rapor edilmemiştir [54]. Floros ve arkadaşlarının bu çalışmasında, BPD ile ilişkisi araştırılan SNP'ler arasından yalnızca

rs3771150 (IL-18RAP) ve rs3771171 (IL-18R1) SNP'leri, Afrikalı-Amerikalı hafif/orta/ağır BPD hastaları (n=17) ile BPD hastası olmayan kontrol Afrikalı-Amerikalılar (n=98; $q < 0.05$) ile karşılaştırıldığında anlamlı sonuç göstermiştir. C ve T allelleri olan rs3771150 SNP'sinde T alleli için BPD risk oranı 5.7 (2.5-13.2) olarak; A ve G allelleri olan rs3771171 SNP'sinde G alleli için BPD ile ilişki oranı 5.9 (2.4-13.9) olarak rapor edilmiştir. Ancak bu SNP'lerin BPD ile ilişkisine hafif/orta/ağır BPD hastası Kafkas-Amerikalı infantlarda rastlanmamıştır. Floros ve arkadaşlarının [68] Kafkas ve Afrikalı-Amerikalı infantlarda araştırdığı bu iki SNP (rs3771150, rs3771171) de bu tez çalışmasında Türk populasyonunda değerlendirilecek 45 SNP arasındadır.

IL-8 geni üzerindeki SNP'ler ile BPD'nin ilişkisi üzerine bir diğer çalışma da Krueger ve arkadaşları [69] tarafından, Almanya'da 32 haftadan önce doğan ve postmenstrüel 36. haftada oksijen desteği ihtiyacı duyan 228 infant üzerinde gerçekleştirilmiştir. IL-8 geni üzerindeki 6 farklı SNP genotiplenmiş ve sonuç olarak bu SNP'ler ile BPD arasında bir ilişki bulunamamış, ancak preterm doğumlar arasında kuvvetli bir ilişki bulunmuştur ($p < 0.001$).

Yine Almanya'da gerçekleştirilen bir diğer çalışmada [70] 1996-2005 yılları arasında 29 haftadan önce doğan 155 preterm infanttın (108'i hafif BPD veya BPD yok, 47'si orta/ağır BPD) toplanan DNA örneklerinde 16 farklı gende 37 SNP genotiplenmiştir. Bu genler, sürfaktan, büyüme faktörü, vasküler aktivite, enflamasyon ve bağışıklık aktivitesi ile ilgili IL-8, SFTPC, SFPTD, $TNF\alpha$, $TNF\beta$, IL-4, IL-13, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), dönüştürücü büyüme faktörü beta ($TGF\beta$), $TGF\alpha$, IL-10, SELE, bağ doku büyüme faktörü (CTGF), hücreler arası adhezyon molekülü (ICAM), IL-8 ve toll benzeri reseptör 10 (TLR10) genleri olmuştur. Çoklu karşılaştırmalarda BPD ile ilişki kurulabilen yalnızca 3 gendeki SNP'ler olmuştur. İstatiksel olarak anlamlı bulunan bu 3 SNP'den (rs1799724, rs699947 ve rs11096955), VEGFA üzerindeki rs699947 SNP'si bu tez çalışmasında da Türk populasyonu üzerinde araştırılacak SNP'ler arasındadır.

Sitokin genleri üzerindeki polimorfizmlerin BPD ile ilişkisini araştıran bir diğer araştırma 2018 yılında Chen ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir [71]. IL-18, IL-10, IL-6, TNF ve TGFB1 genleri üzerindeki 14 farklı polimorfizmin Çin populasyonu (Han) üzerinde araştırıldığı bu çalışmada, TNF geni üzerindeki rs361525 polimorfizminin Çin-Han populasyonu için BPD riski oluşturabileceği önerilmiştir.

Bir başka hedef gen SNP çalışmasında Guisti ve arkadaşları [72] İtalya'da 2004-2008 yılları arasında, 28 haftadan önce doğmuş prematüre 152 infant üzerinde araştırma yapmışlardır. 152 prematüre infanttın 43'ünde (%28) BPD gelişmiş (postmenstrüel 36. haftada oksijen desteği ihtiyacı), 108'inde ise BPD gözlemlenmemiş ve kontrol grubu olarak ele alınmıştır. Oksidan stresi ile ilişkili fonksiyonu olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiş 4 hedef gen üzerindeki toplam 10 SNP'yi incelemişlerdir: SOD1 (rs17880135 ve rs204732), SOD2 (rs4880 ve rs5746136), SOD3 (rs8192287, rs2536512 ve rs1700895) ve CAT (rs1001179, rs1049982 ve rs769217). Araştırma sonucunda SOD3 genindeki rs2536512 SNP'sinin BPD riskinin düşmesi ile ilişkisi olduğundan bahsedilmiştir (OR=0.49 (0.21-1.1)). Bununla birlikte SOD2 (rs4880 ve rs5746136) ve SOD3 (rs8192287, rs2536512 ve rs1700895) haplotiplerinin de BPD ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki içerisinde olduğu rapor edilmiştir. Ancak incelenen 10 SNP'de de BPD ile anlamlı bir ilişki kuracak "p" değerine ulaşılammış, süperoksit dismutazların oksidan stresine karşı korumada önemli rolleri olduğu not edilmiştir. Bu çalışmada araştırılan SOD1 (rs17880135, rs204732), SOD2 (rs5746136), SOD3 (rs8192287, rs2536512) ve CAT (rs1001179, rs1049982, rs769217) genleri üzerindeki polimorfizmler, bu tez çalışmasında da Türk popülasyonu üzerinde araştırılmış 45 SNP arasındadır.

VLBW infantlarda BPD'ye yatkınlık ve şiddeti ile ilişkisi araştırılan SNP'ler ile ilgili bir diğer çalışma, 9 fonksiyonel toll benzeri reseptörde (TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, IRAK1, TIRAP, NFKB1 ve NFKBIA) bulunan SNP'ler üzerine, Sampath ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [73]. Bu çalışmada 2006-2009 yılları arasında A.B.D.'de doğmuş, orta (n=66) ve ağır (n=32) BPD hastaları, 214 sağlıklı VLBW infant ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda, BPD'ye yatkınlık ile düşük doğum ağırlığı, erkek cinsiyet, erken doğum, ventilasyon kullanımı ve geç başlayan sepsis ile ilişki kurulmuş ve bununla birlikte, yalnızca TLR5 geni üzerinde bir stop kodonunu kodlayan rs5744168 (TLR5 1174 C>T) SNP'sinin BPD ile OR=2.6 (1.1-6.0), ağır BPD ile OR=3.8 (1.5-9.9) ve Kafkas kökenli infantlarda BPD ile OR=3.6 (1.3-10.1) oranında ilişkili olduğu gösterilmiştir. TLR4 genindeki rs4986790 ve rs4986791 polimorfizmleri Lavoie ve arkadaşları [74] tarafından da 2006-2008 yılları arasında, Kanada'da 30 haftadan önce doğan 269 infant (%65'i Kafkas kökenli, %38'i orta-ağır BPD) üzerinde araştırılmış ve rs4986790 polimorfizminin heterozigot genotipinin BPD hastası olmayan infantlarda anlamlı şekilde daha az

görüldüğü rapor edilmiştir. Ancak bu sonuç, hem Finlandiya’da doğan 434 prematüre (%15’i orta-ağır BPD hastası) infant üzerinde tekrarlandığında hem de daha önce de bahsedilen Sampath ve arkadaşlarının [73] çalışması sonuçları ile örtüşmemiştir.

Prencipe ve arkadaşları [75] ise 24-34 haftalık doğan ve solunum güçlüğü sendromu (respiratory distress syndrome, RDS) gözlemlenen 103 Kafkas-İtalyan infant (25’inde BPD gelişmiş) üzerinde makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF) geni üzerindeki rs755622 (-173 G/C) polimorfizmi ile BPD ilişkisini araştırmışlardır. C alleli GG genotipi ile karşılaştırıldığında OR=0.20 (0.04-0.9) olduğu ve BPD hastalarında sağlıklılara göre daha az gözlemlendiği rapor edilse de örnek sayısının az olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. İmmün yanıt, anjiyogenezi destekleme, VEGF indüklemeye ve hipoksi ortamda upregüle olma özellikleri olan MIG geninde bulunan rs755622 polimorfizmi, bu tez çalışmasında da Türk popülasyonu üzerinde araştırılan 45 SNP arasına girmiştir.

BPD ile ilişkili SNP araştırmalarından bir diğeri de 2003-2006 yılları arasında, Polonya’da 24-32 haftalık, 1500 gramdan düşük ağırlıkta doğan 181 Kafkas kökenli infant (%58’i hafif, %3’ü orta ve %37’si ağır BPD) üzerinde, Kwinta ve arkadaşları [76] tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada VEGF, TGFβ1, 5,10- Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) genlerinde polimorfizmler değerlendirilmiştir. Araştırma sonucunda polimorfik VEGF alleli -460T’nin BPD hastası grupta yüksek ifade edildiği, T allelini taşıyan infantlarda BPD riskinin %9 (%95 CI: %2–14) oranında arttığı ve CC genotipini (-460C) taşıyan infantlarda ise BPD riskinin OR=0.20 (0.05-0.85) oranında azaldığı rapor edilmiştir. Araştırmacılar, VEGF -460CC homozigotlarının -460TT veya -460TC genotipini taşıyan infantlardan daha düşük risk taşımalarını, -460 polimorfizminin VEGF’in promotör aktivitesini arttırması ile açıklamışlardır. Araştırdıkları diğer genlerde herhangi bir allelik frekansa rastlamamışlardır. VEGF polimorfizmleri ile BPD ilişkisi ile ilgili bir başka çalışma da Mailaparambil ve arkadaşları [77] tarafından 1996-2007 yılları arasında Almanya’da doğan preterm infantlar üzerinde yapılmış ve rs699947 SNP’sinin BPD ile ilişkili olduğu (p = 0,0138) rapor edilmiştir. Bu polimorfizm, tez çalışmamızda Türk popülasyonu üzerinde de incelenen polimorfizmler arasındadır.

Matriks metalloproteinaz (MMP) polimorfizmlerinin çalışıldığı Hadchouel ve arkadaşlarının çalışmasında [78], Fransa’da 28 haftadan önce doğmuş 284 infantın (45’i

BPD hastası) MMP2, MMP14 ve MMP16 genlerindeki 9 SNP araştırılmıştır. Araştırmanın sonucunda, hem MMP16 C/T (rs2664352) hem de MMP16 A/G (rs2664349) polimorfizmlerinin BPD riskinin düşmesi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte, MMP16 mRNA'sının ekspresyonunun intraüterin akciğer gelişimi sırasında ve alveolarizasyonu durdurulmuş modellerde düştüğü de not edilmiştir. Her iki polimorfizm de bu tez çalışmasında Türk populasyonunda değerlendirilen SNP'ler arasındadır.

BPD'ye yatkınlık ile ilişkisi iki farklı çalışmada araştırılmış bir diğer gen olan mannoz bağlayan lektin (MBL), bağışıklık sisteminde rol alır ve bir psödogen (MBL1), bir de fonksiyonel gen (MBL2) mevcuttur. Bu araştırmalardan biri Almanya'da Hilgendorff ve arkadaşları [79] tarafından, 32 haftadan önce doğmuş Kafkas-Alman 284 infant (1'i hafif, 32'si orta-ağır BPD) üzerinde yapılmıştır. Araştırmacılar MBL2 geni kodlayan bölgede 3 SNP (rs5030737 (kodon 52), rs1800450 (kodon 54) ve rs1800451 (kodon 57)) ve promotör bölgesindeki bir SNP (rs7096206) üzerine yoğunlaşmışlardır. Çalışma sonucunda, postmenstrüel 36. haftada BPD gelişimi ile rs1800450 ve rs7096206 polimorfizmleri arasında anlamlı bir ilişki olduğunu rapor etmişlerdir. Kodon 54'te bulunan rs1800450 polimorfizminin A allelini taşıyanlarda G allelini taşıyanlara göre daha yüksek BPD yatkınlığı olduğu ve promotör bölgede bulunan rs7096206 polimorfizminde de C allelini taşıyanlarda G alleli taşıyanlara göre daha yüksek BPD riski olduğu gözlemlenmiştir. İtalya'da Capoluongo ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir diğer çalışmada [80] 24-36 hafta arası doğmuş 75 Kafkas kökenli İtalyan infant üzerinde, MBL2 geninin rs11003125 polimorfizmi araştırılmış ve -550 G>C polimorfizminin BPD riskinin düşmesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ($p=0,02$). Ancak bu çalışmadaki 13 BPD hasta sayısı, hastalık riski ile ilgili yorum yapabilmek için yeterli sayılmayabilir. İtalya'daki bu araştırmada incelenen rs11003125 SNP'si ve Almanya'da BPD ile ilişkisi araştırılan rs7096206 SNP'si, bu tezde daha fazla örnek sayısı ile Türk populasyonu üzerinde araştırılan polimorfizmlerden ikisidir.

BPD ile ilişkisi araştırılan bir diğer gen de farklı çalışmalarda kanser, enfeksiyöz ve enflamatuvar hastalıklar ile ilişkilendirilen NFKBIA genidir. NFKBIA'nın promotör varyantlarının bağışıklık yanıtını düzenlediği düşünülmektedir. Salman ve arkadaşları [81] bir *in vitro* çalışmalarında, NFKBIA promotör bölgesindeki rs3138053, rs2233406 ve rs2233409 polimorfizmlerinin, ağır BPD ile ilişkili olduğu ve prematüre doğum ile ilişkili

olmadıkları sonucuna varmışlardır. Bu çalışmada araştırılan üç polimorfizmde yine bu tez çalışmasında Türk populasyonu üzerinde araştırılan polimorfizmlerdendir.

Faktör VII polimorfizmleri de BPD'ile ilişkisi araştırılmış genler arasındadır. Hartel ve arkadaşları [82], 2000-2005 yılları arasında iki farklı Alman merkezinde yürütülen çalışmanın sonuçlarını birleştirerek 765 VLBW infantı (120'si BPD) genotiplemişlerdir. Sonuç olarak Faktör VII-323 del/ins polimorfizminin düşük BPD riski ile ilişkili olduğunu ($p=0,01$) rapor etmişlerdir.

1.1.4.5 Türk Populasyonunda Gerçekleştirilmiş BPD ile İlişkili SNP Çalışmaları

Literatürde Türk populasyonu üzerinde BPD ile ilişkili polimorfizmlerin araştırıldığı bir çalışma olan Ataç ve arkadaşlarının [83] 2010 araştırmasında da Faktör VII'nin yanı sıra Faktör XIII ve TGF β genleri de araştırılmıştır. BPD teşhisi, postnatal 28. günde veya postmenstrüel 36. haftada oksijen desteği ihtiyacı olarak tanımlanmış ve araştırma grubundaki 37 haftadan önce doğmuş infantların 42'sine hafif-orta, 56'sına ağır BPD tanısı konmuş, kontrol grubu olarak da 94 infant araştırmaya dahil edilmiştir. Ancak kontrol grubundaki infantların doğum zamanlarının ve ağırlıklarının deney grubundan farklılık gösterdiğini not etmek gerekmektedir. Hasta ve kontrol grubu arasında karşılaştırılan FXIII Val34Leu, FVII -323 del/ins ve TGF β 1 (915G=T) polimorfizmlerinin hiçbirinde hasta ve kontroller arasında anlamlı bir korelasyona rastlanmamıştır. Hartel ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada [82] FVII -323 del/ins polimorfizminin düşük BPD riskiyle ilişkilendirilmesi ile çelişen bu sonuçların sebebi, kontrol ve hasta grubunun benzer olmamaları, hafif-orta sınıf BPD hasta sayısının fazla olması, bazı geç doğumların ve yüksek doğum ağırlıklı infantların araştırma grubuna eklenmiş olması ile açıklanabilir.

2010 yılında gerçekleştirilen bir diğer çalışmada İnce ve ark. PAI-1 ve AVE genlerindeki iki polimorfizmi, 98 BPD hastası ve 94 kontrolde PCR tabanlı olarak genotiplemiş ancak Türk populasyonunda BPD insidansı ile herhangi bir ilişki kuramamışlardır [84].

Yine 2010 yılında Ege Üniversitesinde Köroğlu ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, toplam 99 preterm infantta MBL2 geni üzerinde bulunan rs1800450 (kodon 54) ve rs1800451 (kodon 57) polimorfizmleri genotiplenmiştir. Bu çalışmada da Türk populasyonunda MBL2 geni üzerindeki polimorfizmler ile BPD insidansı arasında

herhangi bir korelasyonun gözlemlenmediği rapor edilmiştir [85]. Ancak bu çalışmanın sonuçlarına karşın, Çakmak ve arkadaşlarının 2012 yılında gerçekleştirdiği bir çalışmada [86] MBL2 geni üzerindeki aynı polimorfizm ve IL1-RN polimorfizmleri, BPD teşhisi konmuş 71 preterm infant ve kontrol grubunda genotiplendiğinde BPD gelişimi ve neonatal sepsis ile yakın bir ilişki olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmaya göre hem MBL2 hem de IL1-RN polimorfizmlerinin minör allelleri BPD gelişimi için risk allelleri olarak belirlenmiştir (sırasıyla, OR, 23.8, 95%CI: 2.8-200.6, $p<0,009$; OR, 0.066; 95%CI: 0.02-0.2, $p<0,001$) [86].

2014 yılında ise Köroğlu ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir diğer çalışmada BPD insidansı ile VDR geni üzerindeki Fok I, Bsm I, Apa I ve Taq I polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Bu çalışmaya 47 BPD hastası ve 62 sağlıklı preterm infant dahil edilmiş ve VDR Fok 1 polimorfizminin artan BPD insidansı ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (OR = 4.11, 95% CI = 1.08-15.68, $P = 0.038$) [87].

Türk popülasyonunda BPD ile ilişkisi araştırılan son polimorfizm çalışması ise 2015 yılında Pehlevan ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışma olmuştur. Bu çalışmada, 160 preterm infantta Gc globülin geni üzerindeki rs4588 ve rs7041 polimorfizmleri PCR DNA dizileme yöntemi ile genotiplenmiş ve Gc2 varyantının BPD'ye karşı koruyucu bir ilişkisi olduğunu rapor etmişlerdir [88].

Özetle 2006'dan bu yana literatürde yayınlanan polimorfizm çalışmaları genellikle benzer karakteristikler göstermektedirler. Çalışmaların çoğunda 100'den az sayıda BPD hastası dahil edilmiştir. BPD sınıflandırma kriterleri bazı çalışmalarda değişkenlik göstermiştir. Pek çok çalışmada BPD hastası infantlar, kendileri gibi preterm infantlar ile karşılaştırılmak yerine zamanında veya geç doğan infantlarla, hatta bazı durumlarda yetişkinler ile karşılaştırılmışlardır. Bu tip çalışmalarda bulunan ilişkiler, BPD'den çok prematürite ile ilgili katkı sağlayabilir. Son olarak, pek çok farklı gen araştırılmış olsa da, çok az çalışma tek bir geni veya gen setini çalışmıştır. Bu yüzden 2006'dan bu yana yapılan çalışmalar pek çok geni olası hedefler olarak gösterebilir de, BPD'nin etiyolojik kaynağı olan bir gen veya gen yolağı henüz kesin olarak bulunmamıştır [60].

1.1.5 SNP Analiz Yöntemleri

İki insanın genomları birbirleri ile karşılaştırıldığında %99,9 benzerdirler [89]. Ancak insan genomundaki yaklaşık 3,2 milyar baz çiftinin %0,1'i, yani 3,2 milyon baz çifti, diploid genomda kişiden kişiye değişkenlik gösterir. Bu farklılıkların çoğunluğu tek baz değişimi polimorfizmleri veya yaygın kullanılan ismi ile tek nükleotid polimorfizmlerinden (SNP) kaynaklanmaktadır. SNP'lerin çoğunun biyolojik önemi olmasa da bazılarının fonksiyonel önemi mevcuttur ve insanlar arasındaki çeşitliliğin de temelini oluştururlar [90].

Modern SNP genotipleme teknolojilerin büyük çoğunluğu 2000'li yıllarda geliştirilmiştir. Ancak birkaç yöntemin temel konsepti daha eski buluşlara dayanmaktadır. İlk mutasyon analizleri, işaretli oligonükleotid problemlerin homolog restriksiyon enzimleri ile parçalara ayrılmış ve jelde ayrıştırılmış genomun hibridizasyonu temeline dayanan "Southern Hibridizasyon" ile gerçekleştirilmiştir [91]. Southern hibridizasyon tekniği kullanılarak 1978 yılında, β -globin genine spesifik bir restriksiyon enziminin reaksiyon bölgesini değiştiren, ilk restriksiyon fragmanı uzunluğunda polimorfizm (RFLP) bulunmuş ve bu varyasyonun β -talasemi ve orak hücreli anemiye sebep olduğu rapor edilmiş, bu RFLP'nin prenatal tanı için kullanılabileceği önerilmiştir [89]. Birkaç yıl sonra da insan insülin geni yakınında bulunan bir RFLP'nin Tip2-Diyabet ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir [92]. SNP'leri de içine alan RFLP'ler o yıllardan beri hastalıkların gen haritalandırılmasında belirteç olarak kullanılmaktadır.

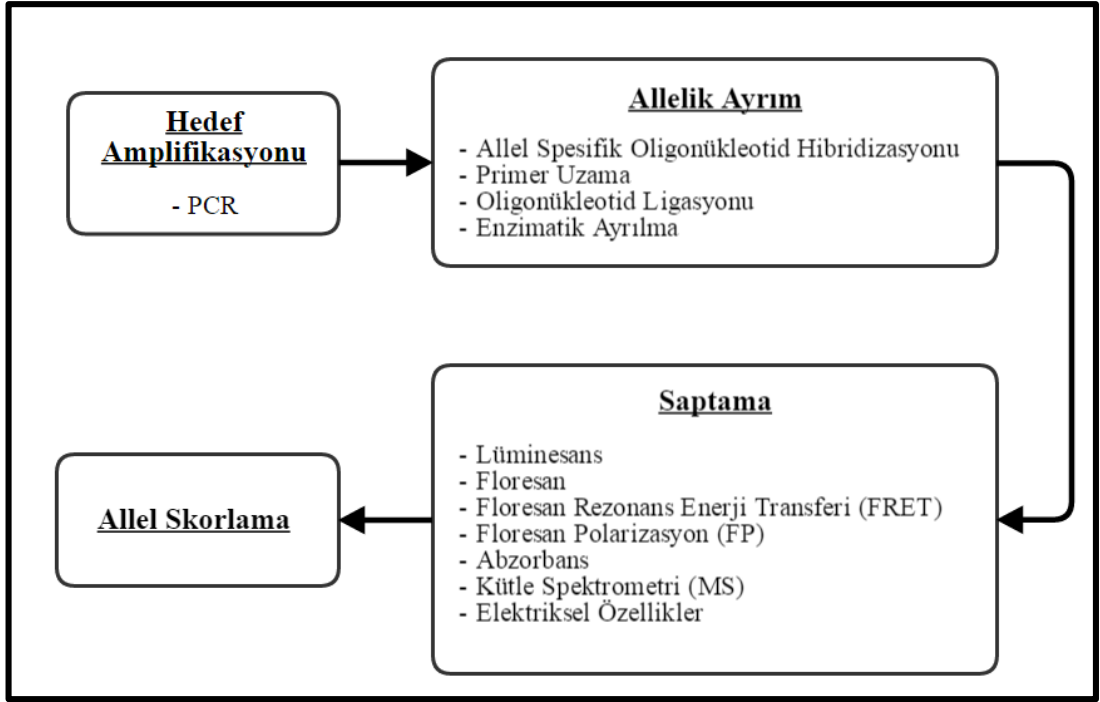
Geçmişte kullanılan bir başka SNP genotipleme yöntemi de allel spesifik oligonükleotid problemler ile hibridizasyon tekniğidir ve ilk kez 1983 yılında β -globin geninin farklı allellerini belirlemek için kullanılmıştır [93, 94]. Bu yaklaşım, hibridizasyonun spesifikliğinden faydalanmaktadır; uygun koşullar altında tek bir baz uyumsuzluğu hibridizasyonun stabilitesini bozmak için yeterlidir. Bu durum, bir yabani tip (wild-type) allele bir de varyant allele spesifik prob kullanarak genotipin değerlendirilebilmesine olanak sağlamaktadır.

Bu hibridizasyon teknikleri hala sıklıkla kullanılıyor olsa da, polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) keşfi [95-97] varyasyon analizleri için gerçekten çığır açan bir buluş olmuştur. DNA polimeraz enziminin katalizlediği bir reaksiyon ile spesifik hedef DNA fragmanlarını çoğaltan PCR, genomun kompleksliğini çok ciddi şekilde azaltır ve dizi varyasyonlarını hassas bir şekilde değerlendirebilecek ileri reaksiyonlara olanak tanır.

Dideoksi dizileme yöntemi daha önceden Sanger ve arkadaşları [98] tarafından bulunmuş olsa da direkt dizileme ile mutasyonların belirlenmesi ve genotipleme ancak PCR'ın keşfinden sonra mümkün olmuştur [99]. PCR yönteminin icadından kısa bir süre sonra restriksiyon bölgesi varyasyonları ve ligasyon aracılı genotipleme daha spesifik ve daha pratik bir hal almıştır. Basitliği, hassasiyeti, spesifikliği ve güvenilirliği ile PCR, bugün dahi genotipleme tekniklerinin büyük bölümüne dâhildir.

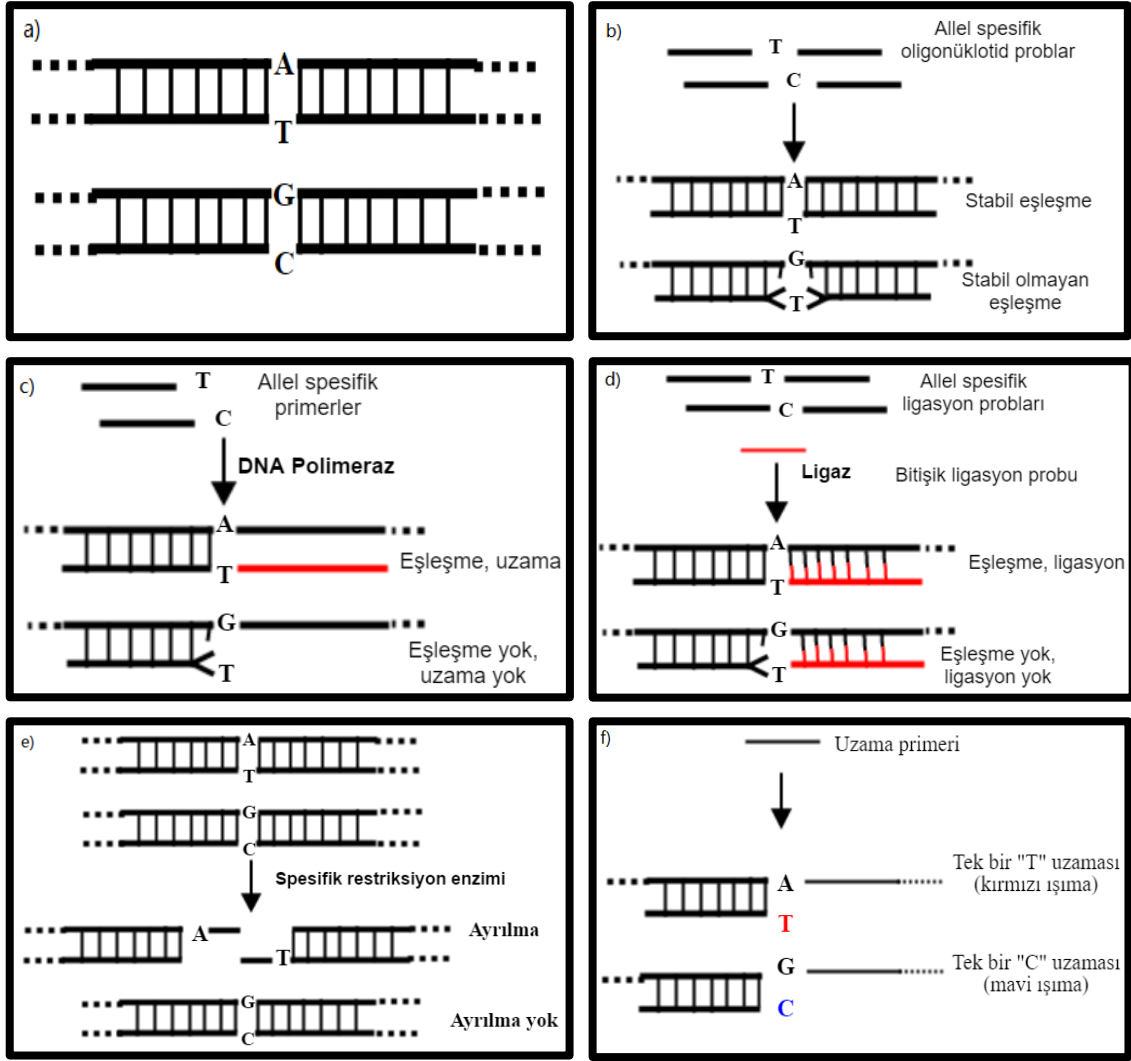
1990 yılında Syvänen ve arkadaşları mini-dizileme olarak da adlandırılan primer uzama (primer extension) tekniğini tanıtmışlardır [100]. Primer uzama yönteminde DNA polimeraz enzimi, kalıp DNA dizisine komplementer nükleotidler ile birlikte SNP bölgesinin 5' ucuna hemen bağlanacak primerin uzamasını katalizler. Allel spesifik primer uzama yönteminde, SNP'ye spesifik olan primer, allelin ne olduğuna bağlı olarak uzar veya uzamaz [101]. Syvänen ve arkadaşlarının orijinal yaklaşımında, ilgilenilen SNP'yi içeren fragman, 5' biyotinlenmiş primer kullanılarak PCR ile amplifiye edilmiş, biyotinlenmiş DNA parçası streptavidin matrikse immobilize edilerek tek iplik olarak saklanmış ve saflaştırılmıştır. Bu durum, glikoprotein avidin ile biotin ligandı arasındaki etkileşimden kaynaklanmaktadır. Daha sonra SNP alleli, SNP bölgesine 5' yönüne doğru bağlanarak kalıba komplementer tek bir işaretlenmiş ddNTP (dideoksi nükleotid) ekleyecek bir primer kullanarak immobilize edilmiş amplikondan tanımlanır [100]. Bu temel fikir, farklı saptama ve saflaştırma yaklaşımları ile SNaPshot (Applied Biosystems) [102], MassArray MALDI-TOF (Sequenom) [103, 104] ve SNP stream (Orchid Biosciences) [105] gibi pek çok modern teknikte de halen kullanılmaktadır.

Günümüzde SNP genotiplemede kullanılan 100'ü aşkın farklı yaklaşım mevcuttur. Bunların büyük çoğunluğu, gerekli spesifite ve hassasiyet için halen PCR amplifikasyonuna ihtiyaç duymaktadır. Sonraki adımlar ise allelik ayırım (allelic discrimination), saptama ve allel skorlama olarak ayrılabilirler (Şekil 1.3). Bununla birlikte, analiz formatlarına göre de iki kategoriye ayrılırlar: Bir solüsyon içerisinde gerçekleşen reaksiyonlar "homojen reaksiyon" olarak; bir cam slayt, çip (microarray) veya mikro boncuk (micro-bead) üzerinde gerçekleşen reaksiyonlar ise "katı destekli reaksiyon" olarak isimlendirilir [106-108].



Şekil 1.3 SNP genotiplemede basamaklar ve farklı yaklaşımlar [100-108]

Allelik ayırım için en sık kullanılan yaklaşımlar allel spesifik hibridizasyon, primer uzama, oligonükleotid ligasyonu ve enzimatik ayrılma yöntemleridir (Şekil 1.4). Bu allelik ayırım basamağını, pek çok farklı yöntemin kullanılabileceği, allel ayırım ürünlerinin saptanması basamağı izler. Ürünlerin saptanması, lüminesans, floresan, floresan rezonans enerji transferi (FRET), floresan polarizasyon (FP), ürünlerin ışımasının absorbanansı veya elektriksel özellikleri kullanılarak gerçekleştirilebilir [109]. Allelleri, ürünlerin kütlesine göre ayırımı yapan bir diğer teknik olan kütle spektrometrisi yöntemi de sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [106, 110]. Son basamak olan allel skotlama da günümüzdeki genotipleme çalışmalarının yüksek veri hacmi gereksinimi için gerekli bir şarttır. PCR analizlerini multipleks olarak gerçekleştirmek yüksek genotipleme verisi hacmi sağlar ve genotipleme maliyetlerini düşürür. Farklı genotipleme platformları değerlendirilirken multipleks imkanı önemli bir husustur. Ancak bazı çalışmalarda, PCR reaksiyonunda 20'den fazla ampikon içeren multipleks PCR yapmanın zor olduğu not edilmiştir. SNP genotiplemede daha yüksek veri hacminin sağlanabilmesi için atılan önemli bir adım, katı destekli bir reaksiyona olanak sağlayan oligonükleotid mikroçiplerinin uyarlanmasıdır [111-113].



Şekil 1.4 SNP genotiplendirme çalışmalarında allelik ayırım için sıklıkla kullanılan biyokimyasal reaksiyon yöntemleri. a) Örnek bir A/G SNP'si; b) Allel spesifik oligonükleotid prob ile hibridizasyon; c) Allel spesifik primer ile uzama; d) Allel spesifik ligasyon; e) Restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi; f) Floresan saptama ile tek nükleotid uzama [100-108]

Bu yöntemle önceden belirlenen yüzbinlerce dizi, küçük bir alanda analiz edilebilir ve çok yüksek veri hacimlerine ulaşılabilir. Mikroçip temelli genotiplendirme platformlarının tipik özelliği, yüksek sayıda SNP'lerin bir veya az sayıda örnek üzerinde aynı anda genotiplenebilmesidir. Mikroçip ile analiz yöntemi için pek çok farklı allel ayırım tekniği kullanılabilir, ancak aralarında en sık kullanılanı "primer uzama" [114] ve allel spesifik hibridizasyon [115] yöntemleridir. Bu yöntemlerde saptama basamağı, çipin belirli noktalarında ışık yayan ışığın tespitine dayanır.

1.1.5.1 Modern Yöntemler ve Yüksek Veri Hacimli Genotipleme

Son yıllarda yüksek veri hacimli genotipleme teknolojileri hızla gelişmiş ve gelecekte de benzer şekilde gelişmeye devam edeceği düşünülmektedir. Günümüzde kullanılabilen birkaç yüksek veri SNP genotipleme yöntemi vardır ve kapasiteleri günde birkaç milyon genotipleme yapabilme hızındadır. Çizelge 1.3'te genel olarak kullanılan orta-yüksek veri hacimli yöntemlerin önemli özellikleri listelenmiştir. Bu çizelgede, çok çeşitli allel ayırım ve saptama yaklaşımları kullanabilen pek çok SNP genotipleme yöntemlerinden yalnızca en sık kullanılan yöntemlere değinilmiştir.

Ticari olarak ulaşılabilir ve sıklıkla kullanılan SNP genotipleme yöntemlerinden biri, "Applied Biosystems" firmasının "SNaPshot" yöntemidir. SNaPshot, PCR amplifikasyonunu takiben tek baz uzama mantığına dayanır. Uzama reaksiyonunu durduran, farklı etiketlenmiş ddNTP'ler ile allelik ayırım gerçekleştirilir. Jel elektroforez/ayırılma veya kapiller içerisinde multipleks reaksiyonu saptayabilmek için, uzama primerleri farklı uzunluklarda nötral kuyruk dizileri içerecek şekilde tasarlanır ve böylece belirli bir büyüklükte yalnızca bir ürün görülür [102].

Bir diğer yöntem ise "Pyrosequencing" olarak isimlendirilen ve hedef DNA dizisine komplementer bir dNTP eklendiğinde ışıma yapan bir enzim kaskadı kullanarak 20-30 baz çifti (bp) uzunluğunda diziler oluşturan RT-PCR (Real Time PCR, gerçek zamanlı PCR) yöntemidir. Nükleotidler, dizide belirtilen sıra ile eklenirler ve bu sırada nükleotidler çift oluşturdıklarında ATP sülfürlaz enzimi ile ATP'ye dönüşen pirofosfatlar salınır. Daha sonra lusiferaz enzimi, oluşan bu ATP'yi kullanarak saptanabilir ışıma üretir ve bu ışımadan faydalanılarak genotip belirlenebilir. Apiraz enzimi ise bağlanmamış nükleotidlerin degrade olmalarını sağlar [117].

"Taqman 5' ekzonükleaz analizi de SNP genotipleme için kullanılan bir diğer yöntemdir ve allel spesifik oligonükleotid hibridizasyonu temeline dayanır. Her ikisi de farklı floresan boyalı, yabani tip allele komplementer bir prob ve varyant allele komplementer bir diğer prob 5' ucuna bağlanır, 3' ucuna ise bir sönmüleyici (quenching) molekül bağlanır. RT-PCR'ın bağlanma basamağında bu problemler kalıp diziye hibridize olur. Uzama basamağında ise PCR primerleri uzar ve sonuç olarak, Taq polimerazın 5' nükleaz aktivitesi ile eşleşen prob mükemmel şekilde ayrılır veya eşleşmeyen prob fragmentasyon olmadan uzaklaşır. Eğer sönmüleyici molekül floresan boyaya yakın ise

(aynı prob içerisinde), floresan rezonans enerji transferi (FRET) ile floresanı sönümler, ancak eğer floresan boya ayrılmış ise boyanın ışıması artar. Bu şekilde iki farklı boyanın sinyal yoğunlukları ölçülerek genotipleme gerçekleştirilir [118].

Çizelge 1.3 Sık kullanılan SNP genotipleme yöntemlerinin özeti [106, 111, 115, 116]

Yöntem	Allel ayırım ve saptama yöntemi	Avantajları	Dezavantajları	Aynı anda saptanabilecek örnek sayısı
MassArray MALDI-TOF (Sequenom)	Primer uzama; MS	İşaretleme yok, göreceli olarak yüksek multipleksleme	Yüksek cihaz maliyeti, uzun protokol	12-plex analiz, 384 örnek (MassEXTEND); 29-plex analiz, 384 örnek (iPLEX)
SNapShot (Applied Biosystems)	SBE; floresan	Kapiller ve jel elektroforez dizileyciler ile uyumlu	Zor saflaştırma basamağı	10-plex analiz, 96 örnek
Pyrosequencing (Pyrosequencing AB)	Sentez ile dizileme; lüminometrik analiz	SNP'yi çevreleyen kısa bir dizi verir, gerçek zamanlı skorlama	Pahalı ve uzun protokol, düşük multipleksleme seviyesi	1 SNP, 96 örnek
TaqMan (Applied Biosystems)	ASOH ve enzimatik ayrılma; RT-PCR esnasında FRET	Hazır temin edilebilen analiz formatı, basit iş akışı, kapalı tüp sistemi	Pahalı floresan problemleri, düşük multipleksleme seviyesi	1 SNP, 96 veya 384 örnek
GeneReader NGS (Qiagen)	PCR, ASOH; floresan	Yüksek veri hacmi, universal PCR	Gereksinime göre uyarlama yok, maliyet	42 örnek, 1 SNP
Invader Assay (Third Wave Technologies)	İnvazif enzimatik ayrılma; FRET, FP veya MS	PCR yapılmaz, potansiyel kullanım alanı geniş	Çok fazla DNA'ya ihtiyaç duyar, düşük multipleksleme seviyesi	1 SNP, 384 örnek

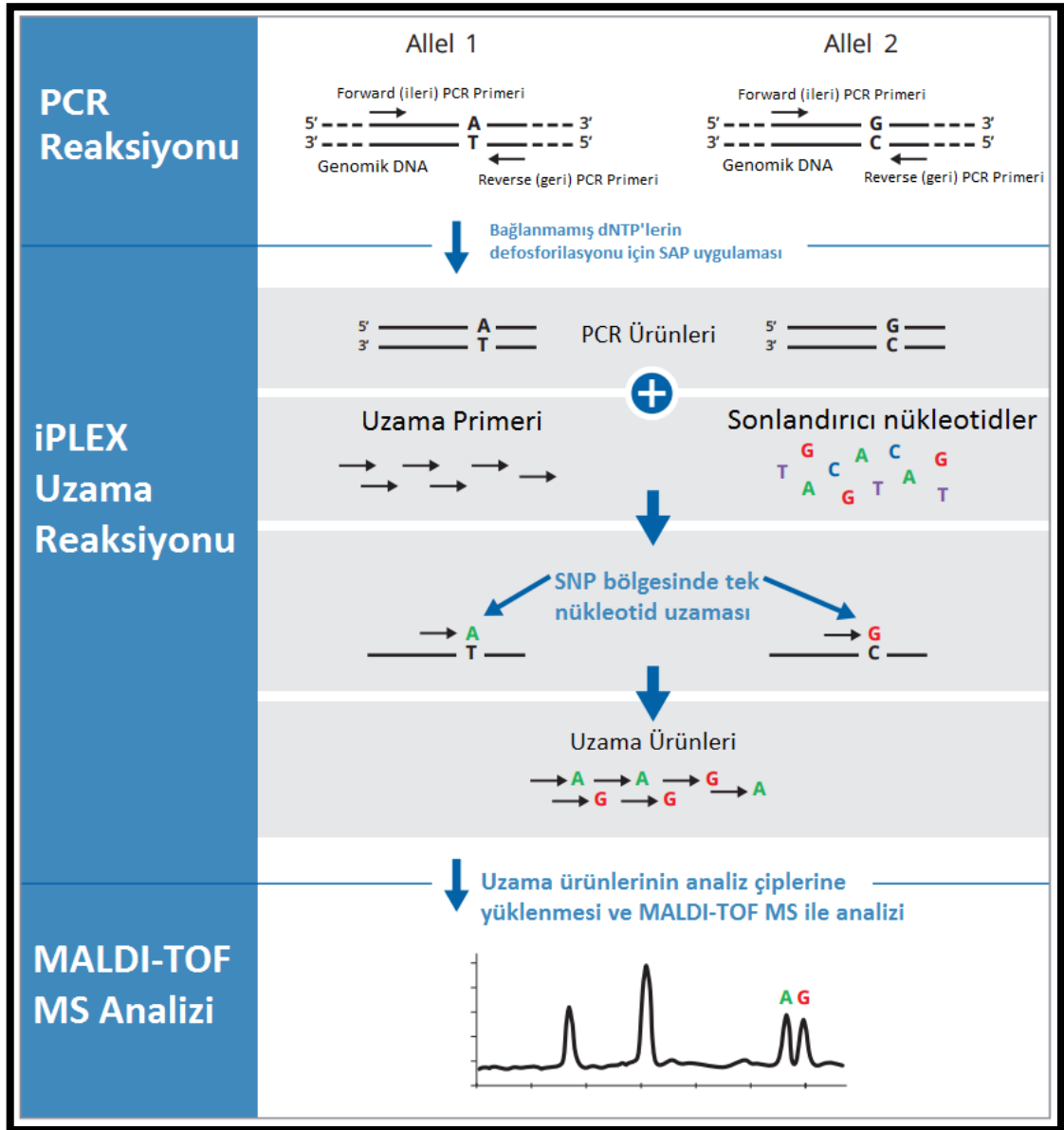
Çizelge 1.3 Sık kullanılan SNP genotipleme yöntemlerinin özeti (devam)

Yöntem	Allel ayırım ve saptama yöntemi	Avantajları	Dezavantajları	Aynı anda saptanabilecek örnek sayısı
GeneChip 100K/500K (Affymetrix)	PCR, Allel spesifik oligonuklotid hibridizasyonu; floresan	Yüksek veri hacmi, universal PCR	Gereksinime göre uyarlama yok, yüksek maliyet	1 örnekte ~100.000 / ~500.000 SNP
GoldenGate (Illumina)	Allel spesifik oligonuklotid hibridizasyonu, PCR; floresan	Üniversal PCR, yüksek veri hacmine rağmen özel ayarlanmış SNP'ler	Yüksek cihaz maliyeti	1536 SNP, 96 örnek
Infinium (Illumina)	Tüm genom amplifikasyonu; ASPE (Infinium I), SBE (Infinium II); floresan	PCR yapılmaz, yüksek veri hacmi	Gereksinime göre uyarlama yok, yüksek maliyet	1 örnekte ~300.000 / ~500.000 SNP

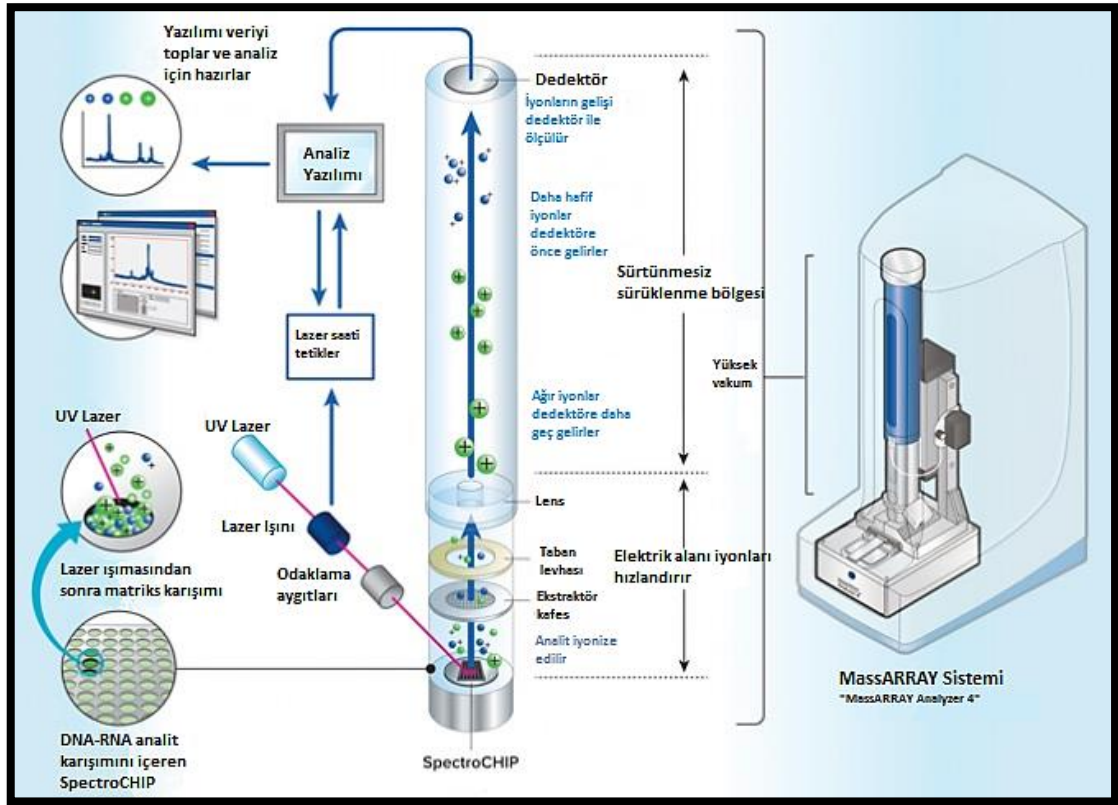
Son olarak bu tez çalışmasında da SNP genotipleme yöntemi olarak seçilmiş olan, iPLEX yöntemi ile Sequenom MassArray MALDI-TOF sistemi, hedef bölgenin PCR ile amplifikasyonunu takiben primer uzama yöntemini temel alır. İlk MassArray yönteminde, MassEXTEND olarak isimlendirilen primer, SNP bölgesinin 5' ucuna doğru bağlanır ve dizi, genotipe göre bir ddNTP veya dNTP'ler ile uzatılır. Bir ddNTP uzama gerçekleştiğinde uzama reaksiyonu durur, ancak dNTP'ler ile uzar ise sonlanan ddNTP'ler ile komplementer olana kadar uzama devam eder [103, 104]. Daha güncel bir MassArray analizi olan iPLEX yönteminde ise tüm reaksiyonlar tek baz uzamasından (SBE) sonra sonlanır. Alleller arasındaki kütle farkı, kütleleri değişikliğe uğratılmış ddNTP'ler

kullanılarak ölçülür. Her iki reaksiyonda da allel ayrımı, “Matriks destekli lazer dezorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı (MALDI-TOF) kütle spektrometrisi yardımıyla uzayan ürünün kütlelerinin ölçülmesi prensibine dayanır. Uzama ürünleri, DNA dezorpsiyonu ve iyonizasyonuna yardımcı olan bir matriks içeren çip üzerine konumlandırılır. DNA moleküllerinin iyonizasyonu lazer ışını ile tetiklenir ve elektrik alanı içerisinde DNA molekülünün detektöre ulaşma süresi uzayan oligonükleotidin kütlelerine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Böylelikle SNP genotipleme, primer uzama olayının izlenmesi ile gerçekleştirilmiş olur (Şekil 1.5) [103, 104].

MALDI-TOF yöntemi oligonükleotidlerin yanı sıra protein, peptid ve oligosakkaritler gibi biyomoleküllerin de kütle analizleri için sıklıkla kullanılmaktadır. Sequenom MassArray Sistemi de MALDI-TOF kütle spektrometrisi yöntemini temel alır ancak, spesifik olarak nükleik asitlerin analizi ile genomik çalışmalar yapabilmek için uyarlanmış, hassas ve yüksek veri hacimli genetik analizlere olanak sağlayan bir sistemdir (Şekil 1.6). Spesifik olmayan arka plan sinyallerini ortadan kaldırarak yüksek hassasiyette sonuçlar verebilmektedir. Diğer SNP genotipleme sistemlerine göre daha kısa süre içerisinde ve daha yüksek kesinlikte veri elde edilebilmektedir. Tüm bu sebeplerin yanı sıra, bu teknolojinin ülkemizde bulunabilir olması ve diğer genotipleme sistemlerine göre nispeten daha düşük maliyetli olması, bu tez çalışmasında iPLEX genotipleme yöntemi ile Sequenom MassArray MALDI-TOF kütle spektrometrisi sisteminin tercih edilmesini sağlamıştır.



Şekil 1.5 iPLEX Genotipleme Analizi (SAP: Shrimp alkaline phosphatase, shrimp alkaline phosphatase) [119]



Şekil 1.6 Sequenom MassARRAY MALDI-TOF MS Sistemi [120]

1.2 Tezin Amacı

İki insan genomu birbiri ile karşılaştırıldığında %99,9 benzerlik gösterir, ancak aradaki %0,1'lik fark, yaklaşık 3,2 milyon baz çiftinin insandan insana değişkenlik göstermesi anlamına gelmektedir. Bu farklılıkların büyük bölümünü tek nükleotid polimorfizmleri oluşturmaktadır. Bu polimorfizmlerin bazıları biyolojik olarak fonksiyonel önemi olan bölgelerde oluştuğunda ise çeşitli hastalıklara karşı yatkınlığı oluşturabilmekte veya arttırabilmektedir. Bununla birlikte, etnik veya coğrafi gruplar arasındaki popülasyon farklarından dolayı bazı SNP'ler belirli popülasyonlara özgü olabilmektedir. Bu sebeple farklı toplumların polimorfizm profillerinin birbirinden ayrı değerlendirilmesi gerekmektedir [89, 90].

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilmek istenen amaç, dünyada farklı popülasyonlar üzerinde yapılmış çalışmalarda bronkopulmoner displazi ile ilişkilendirilmiş SNP'ler taranarak, Türk popülasyonunda da bu SNP allel ve genotip frekanslarının görülüp görülmediğinin multipleks reaksiyonlar ve MALDI-TOF kütle spektrometrisi yöntemi ile belirlenmesidir. Elde edilen veriler ayrıca hastaların klinik ve demografik bilgileri ile de

karşılaştırılarak ve BPD ile ilişkisi kurulacak olası polimorfizmlerin üzerlerinde bulundukları genlerin hangi yolları etkileyerek hastalığın patogenezeine katkıda bulunduğu araştırılarak BPD'nin Türk toplumuna özgü genetik tabanının anlaşılabilmesine katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Bu tez çalışmasında;

- Bronkopulmoner displazi ile ilişkisi olan, Türk toplumuna özgü SNP allel ve genotip frekanslarının belirlenmesi,
- Elde edilen verilerin BPD hastalığı için risk tahmininde kullanılabilmesi,
- BPD ile ilişkisi tespit edilen bu polimorfizmlerin üzerlerinde bulundukları genlerin birbirleri ve diğer genler ile ilişkilerinin araştırılarak etkileyebilecekleri yolların belirlenebilmesi,
- Etkilenen gen ve yolların hastalığın patogenezeine nasıl bir etkide bulunduklarının anlaşılabilmesine katkı sağlanabileceği öngörülmektedir.

BÖLÜM 2

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışma Populasyonu

Bu tez çalışmasına dahil edilen populasyonunun tamamı, Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi, yeni doğan yoğun bakım biriminde, 32 haftadan önce doğmuş infantlardan oluşmaktadır. Çalışma populasyonunun kontrol grubu, postmenstrüel 36. haftada veya taburcu edilirken (hangisi daha önce ise), ek O₂ almadan, oda havasında en az 30 dakika SpO₂'sini $\geq$ %90 tutabilmekte olan, yani BPD olmayan, 100 adet prematüre infanttan oluşmaktadır. Çalışma populasyonunun hasta grubu ise ek oksijen almadan/oda havasında en az 30 dakika SpO₂'sini $\geq$ %90 tutamıyorlarsa hafif/orta BPD tanısı konmuş; her türlü pozitif basınçla (HFNC, nCPAP, MV) $\geq$ %30 O₂ almaları gerekmekte ise ağır BPD tanısı konulmuş 96 adet prematüre infanttan oluşmaktadır. Toplanan kan örnekleri Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi etik kurulunun KAEK/2016.12.31 numaralı izni ile toplanmıştır.

2.1.2 Hasta ve Kontrol Örneklerinin Toplanması ve Arşivlenmesi

İstanbul Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde 32 haftadan önce doğan ve yeni doğan yoğun bakım biriminde BPD tanısı konulan (hasta grubu) veya konulmayan (kontrol grubu) hastaların tamamından alınan periferik kan örnekleri EDTA'lı tüplere toplanmıştır. Bu kan örnekleri toplanmadan önce hastaların aileleri çalışma ile ilgili aydınlatılmış ve asgari bilgilendirilmiş olur formu (EK-A) ile hastaların ailelerinden onam alınmıştır. Örnek toplanan hastaların ailelerinden, BPD ile ilişkili

olabileceği düşünölen diğör klinik ve demografik verilerin değörlendirilebilmesi amacıyla, bir hasta bilgi formu doldurmaları istenmiştir (Ek-B).

2.1.3 Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler

Hasta ve kontrol gruplarından toplanmış olan tam kan örneklerinden DNA izolasyonu, Qiagen firmasının “QIAamp DNA Mini Kit” DNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için kullanılan dNTP’ler (100 mM) Applied Biosystems’den, HotStarTaq Plus DNA polimeraz (5 U/μl) , 10 x PCR tampon çözeltisi ve MgCl₂ (25 mM) QIAGEN’den ve tüm aşamalardaki ultrasaf distile su Invitrogen’den temin edilmiştir. PCR ürünlerinin bağlanmamış dNTP’lerden arındırılması amacıyla gerçekleştirilen reaksiyonda kullanılan shrimp alkaline fosfataz enzimi (1.7 U/μl) ve enzimin tampon çözeltisi; tek baz spesifik uzama reaksiyonunda kullanılan iPLEX enzim, 10 x iPLEX tampon çözeltisi, iPLEX Extension Mix ve örnekleri kütle spektroskopisi ile analize hazır hale getirmek için reçine uygulama aşamasında kullanılan SpectroCLEAN reçine Sequenom Inc.’den temin edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonunda ve genotiplleme analizinde kullanılan primerler Sequenom Inc. tarafından sentezlenmiştir.

2.1.4 Kullanılan Cihazlar

Termal Çalkalayıcı - BIOSAN

Mini santrifüj ve vorteks - BIOSAN

Santrifüj - Beckman Coulter

Mikrosantrifüj - Beckman Coulter

Mikro hacim UV-Vis spektrofotometre – Biotek Epoch 2

Termal döngüleyici - BIO-RAD

Döner çalkalayıcı - Scientific Industries

Emniyet kabini - Nüve

MassArray Nanodispenser - Sequenom Inc.

MassArray Analyser - Sequenom Inc.

2.2 Yöntem

Bu tez çalışmasında kullanılan yöntemler, aksi belirtilmediği sürece iPLEX® Gold Application Guide (2009) [121] ve iPLEX® Gold SNP Genotyping Training Protocol (2009) [122] dokümanları referans alınarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.1 Genomik DNA İzolasyonu

Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen tam kan örneklerinden DNA izolasyonu, Qiagen firmasının “QIAamp DNA Mini Kit (Katalog No: 51306)” DNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Üretici firmanın yayınlamış olduğu kit protokolü [123] takip edilerek DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu protokole göre öncelikle 1,5 ml’lik PCR tüpleri numaralandırılarak içlerine 20’şer µl Proteinaz K solüsyonu eklenmiştir. Proteinaz K solüsyonu üzerine 200 µl tam kan örneği tüpler içerisine konmuştur. Daha sonra tam kan örneklerinin lizasyonu amacıyla üzerlerine 200’er µl AL tamponu eklenmiştir. Homojen bir lizis amacıyla 15 saniye vortekslenen tüpler daha sonra 56°C su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben örnekler üzerine 200’er µl etanol (%96) eklenmiş ve yeniden vortekslenmiştir. Sonrasında kan örnekleri içerisindeki DNA’nın bağlanması amacıyla, PCR tüpleri içerisindeki tüm içerik QIAamp Spin Kolonlarına aktarılmıştır. Spin kolonlarına DNA’ların bağlanması amacıyla ilk santrifüj 8000 rpm’de 60 saniye süreyle gerçekleştirilmiş ve spin kolondan akarak geçen elüsyon atılmıştır. Spin kolona bağlanan DNA örnekleri üzerine önce 500 µl AW1 yıkama tamponu eklenip 8000 rpm’de 60 saniye santrifüjlenerek, sonra 500 µl AW2 yıkama tamponu eklenip 13000 rpm’de 3 dakika santrifüjlenerek yıkanmıştır. Her iki yıkama basamağında da kolondan akan elüsyon atılmış ve toplama tüpü değiştirilmiştir. Yıkama basamaklarından sonra spin kolonlar ayrı bir temiz 1,5 ml’lik PCR tüpüne alınmış ve spin kolona bağlanan DNA’ların kolondan ayrılabilmesi için üzerlerine 200’er µl AE tamponu (elüsyon tamponu) eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından tüpler 8000 rpm’de 60 saniye santrifüjlenerek DNA örnekleri izole edilmiştir.

2.2.2 DNA Örneklerinin Konsantrasyon ve Saflığının Belirlenmesi

İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıkları, 260 nm ve 280 nm dalga boylarında UV-spektrofotometrik ölçümler ile belirlenmiştir. Uygun saflıkta izole edilmiş bir DNA örneğinin, 260nm ve 280nm’de ölçülen absorbans değerlerinin oranının 1,7-2,0

arasında olması gerekmektedir ($A_{260}/A_{280}=1.7-2.0$) [124]. Elde edilen DNA konsantrasyonu ise 260 nm'deki bir optik dansite (OD) ünitesinin 50 µg/ml çift iplikli DNA'ya eşit kabul edilmesiyle, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{DNA miktarı} = \text{OD ünitesi} \times \text{sulandırma faktörü} \times 50 \text{ µg/ml} \quad (2.1)$$

İzole edilen her bir DNA'nın saflık derecesi ve miktarı Mikro Hacim UV-Vis Spektrofotometre kullanılarak kontrol edilmiştir. Her bir genomik DNA örneğinin 1 µl'si cihaza yüklenerek DNA miktarı ve saflığı belirlenmiştir.

2.2.3 Kütle Spektrometrisi (MS) Deney Tasarımı

Aksi belirtilmedikçe tüm MS deney tasarımları Sequenom iPLEX Gold uygulama kitapçığında belirtilen protokollere göre gerçekleştirilmiştir [121].

2.2.3.1 Analiz Tasarımı

200 örnekte toplam 45 SNP bölgesinin genotiplemesi amacıyla "Sequenom Assay Designer" yazılımı aracılığıyla analiz tasarımı gerçekleştirilmiştir. Multipleks reaksiyonlar için bir kuyuda çalışılabilecek SNP sayısı "plex" olarak isimlendirilmiştir. Çalışma için belirlenmiş olan 45 SNP bölgesi için tasarlanmış olan primerlerde, multipleks reaksiyonu engelleyebilecek bir dimer oluşumu olmadığı için ve yine bu hedef SNP bölgelerinde birbirleri ile çakışan diziler mevcut olmadığı için reaksiyonlar her örnek için bir plexte çalışılmıştır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Multipleks reaksiyonlardaki SNP'ler

Multipleks Reaksiyon	SNP'ler			
Plex 1	rs833061	rs1966265	rs72791417	rs11003125
	rs12701220	rs1541364	rs7096206	rs10162694
	rs2278034	rs3771150	rs2233406	rs1001179
	rs755622	rs1126214	rs78975256	rs11226613
	rs71627250	rs650950	rs699947	rs1440306
	rs55716084	rs4883955	rs62468577	
	rs1049269	rs1245560	rs1912816	
	rs6988306	rs8192287	rs769217	
Plex 2	rs1474256	rs204732	rs17880135	rs17551536
	rs2233409	rs1049982	rs4634985	
	rs3771171	rs2536512	rs349423	
	rs9877396	rs3138053	rs2664349	
	rs2664352	rs9953270	rs5746136	

2.2.3.2 Primer ve Probların Tasarımı

Multipleks PCR'da kullanılacak primerler "Sequenom Assay Designer" yazılımı ile tasarlanmıştır. Bu çalışmada genotiplenmiş olan 45 SNP'nin referans SNP numaraları, PCR amplifikasyonu sonucu oluşması beklenen ve polimorfik bölgeyi içeren ampikon uzunluğu, multipleks PCR'da kullanılan forward (ileri) ve reverse (geri) primerler ve tek baz uzama reaksiyonu için kullanılan uzama problemlerinin tasarımı Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 Araştırılan SNP'ler ve genotiplemede kullanılan primer-prob tasarımları

SNP numarası	Forward Primerler	Reverse Primerler	Uzama Probu	Amplikon Uzunluğu
rs833061	ACGTTGGATGAGTGAG GACGTGTGTGTCTG	ACGTTGGATGTTGGAA TCCTGGAGTGACCC	TCTCCCCGCTCCAAC	119
rs12701220	ACGTTGGATGTGCAGC TTTAAGCCATCCGC	ACGTTGGATGCACCCC ACCACCCCGAGAA	CCTGCAAAGTGCTCG	91
rs2278034	ACGTTGGATGACCCCA CTGTCCCCAAAAAC	ACGTTGGATGCCTGGT GTCCCTAACTCATC	ACAGAACAGCAGCC T	113
rs755622	ACGTTGGATGCGATTT CTAGCCGCCAAGTG	ACGTTGGATGTCCAGC AACCGCCGCTAAG	GCCAAGTGAGAAC AG	86
rs71627250	ACGTTGGATGCCTGTG TCCTAAGTTTTGAG	ACGTTGGATGGGAGAT TGTTAAGTAGAACC	GACCCAGTTGCCAAT TC	91
rs55716084	ACGTTGGATGACAGAC TTGCTGCCTATATG	ACGTTGGATGGAGAAC TTTCCATGTCAACC	AGCTGACCTTTAACT GA	104
rs1049269	ACGTTGGATGGGAGCT GCTGTTTTGTCTAC	ACGTTGGATGCCTTGC CTGTTTCCGAAGC	CCACACTGCCTTTTCG CCC	103
rs6988306	ACGTTGGATGTCTGGT GCAGATGTTCCAAA	ACGTTGGATGGGAATC AGGCTCACTACATC	cccCAACCTGTACTGC CC	110
rs1966265	ACGTTGGATGGTCCCT GAGAGCTGTGAGAA	ACGTTGGATGAGAGG CCTCCAGGGACAAGA	agaGCACACTCAGCA GGA	119
rs1541364	ACGTTGGATGCTCACT TCCCTAGGGGTTAG	ACGTTGGATGGGGAA GGAAGTGTGAAGTTG	ttccGCCTGTCCAAGT TCC	114
rs3771150	ACGTTGGATGATGTCA ACATGACCCTTAGC	ACGTTGGATGGCAAAG TGCAGGCTATTATC	cattACCCTTAGCCCC GGT	95
rs1126214	ACGTTGGATGCCTGTA AGCTCCCCAAATTC	ACGTTGGATGACATTG AGGGAAAAGTTCA	GTGAGTTTTTCTTGC TCTG	99
rs650950	ACGTTGGATGACATCC TGGATTCTGTTTAC	ACGTTGGATGGAAGT ATGGTTCAGCTTGG	gaAGCTTGGCATTTT CCAAA	114
rs4883955	ACGTTGGATGTGCAGA TGTCAGTTACCAAC	ACGTTGGATGTTTTCTA AAGGCTGACTTG	gaacGGCTGACTTGA GAACA	98
rs1245560	ACGTTGGATGTTTGCT TATGTTCTTGGGTG	ACGTTGGATGTTTGTG TGAGGCACCTCG	GGGCCTCTGGGATG AAAAAG	117
rs8192287	ACGTTGGATGTACTTA TGAGTGCGGCTAGT	ACGTTGGATGCCACCG TGAAGATCCAATGA	ccccCATTACTCGCCC AGTGA	96
rs72791417	ACGTTGGATGGTGTGT GGCATACACACAAT	ACGTTGGATGCTTCTC ATTCTGCTTGCTTG	cccgCTGCTTGCTTGG CCTTT	119
rs7096206	ACGTTGGATGCTGCTG GAAGACTATAAAC	ACGTTGGATGCCTAAG CTAACAGGCATAAG	GGAAGACTATAAAC ATGCTTTC	108
rs2233406	ACGTTGGATGGCAAG GTGTTAATGTTTGTAG	ACGTTGGATGGTAGGT CAGATAGCATAAACG	ggatTGTGGATACCTT GCAATA	120
rs78975256	ACGTTGGATGTATAGC AGATGTAGCAGCAC	ACGTTGGATGACCATC TCTAAACAATACCC	AAACAATACCCTTTC TAAACTTC	105
rs699947	ACGTTGGATGTTCCCA TTCTCAGTCCATGC	ACGTTGGATGAGTCAG TCTGATTATCCACC	ccggCTGATTATCCAC CCAGATC	107
rs62468577	ACGTTGGATGTAAATG TGATAGGGATGTGC	ACGTTGGATGCTCAGA CTCCAGAATAGATG	ggagCCAGAATAGAT GGGACTAC	115

Çizelge 2.2 Araştırılan SNP'ler ve genotiplemede kullanılan primer-prob tasarımları
(devam)

rs1912816	ACGTTGGATGCATCAT ACCCCATGTAAAAA	ACGTTGGATGGCCAAA TGATTTTTCCTTT	TGATTTTTCCTTAAT TTGAAGAT	120
rs769217	ACGTTGGATGCATATA CCTGTGAACTGTCC	ACGTTGGATGTTAGGC CTACCCTGATTGTC	aagcGTGGCCAACTA CCAGCGTGA	112
rs11003125	ACGTTGGATGCTGGAG TTTGCTTCCCCTTG	ACGTTGGATGGTATTT AGCACTCTGCCAGG	tctcTTGCTTCCCCTTG GTGTTTTA	120
rs10162694	ACGTTGGATGGGTGCC CACAAGGATATTTG	ACGTTGGATGCAATTT ACTCTTATCAGATGG	ATCAGATGGATAAAA AATGAAAAATT	98
rs1001179	ACGTTGGATGCTGAAG GATGCTGATAACCG	ACGTTGGATGCAGCAA TTGGAGAGCCTCG	cttAGCCCCGCCCTGG GTTGCGCTAT	108
rs11226613	ACGTTGGATGCTCATA GTGAAGAATTTCTC	ACGTTGGATGTGAAAT GGGCCCAGGAGAG	agcAAAGTAACACAA CCTTTAGAGAA	118
rs1440306	ACGTTGGATGCATAAG ATGAAAATGTGCAG	ACGTTGGATGAAGCAA ACGGAATTGCTGCC	ccctaCAATGCACTGC CTGCGGACAAC	112
rs1474256	ACGTTGGATGTGGGG AAAGATGCTCTGCAA	ACGTTGGATGAGGAA GCATTGCCTCCAC	GGAACAGGGATGGG G	120
rs2233409	ACGTTGGATGCTGCAC CCTGTAATCCTGTC	ACGTTGGATGCGACGA CCCCAATTCAAATC	aTCCCTCTGCAAGTG A	102
rs3771171	ACGTTGGATGAGAGAC AGGGTAGCAGATAG	ACGTTGGATGCTTTAC TCTCATAGTGATCAG	TGTCCAGAGTGGAT A	105
rs9877396	ACGTTGGATGCCAGA GAGATATTGATCC	ACGTTGGATGCATTCT CATTGCTTGGGTGG	tGCTGGGAAGGATGT TT	101
rs5746136	ACGTTGGATGCAGAAG TATCACTGCAGAGG	ACGTTGGATGCACTTT CCCAAGGGAAACAC	TCACTGCAGAGGATT ACT	99
rs204732	ACGTTGGATGTCTCCC CACATAAATGGTCC	ACGTTGGATGATCTGA GTCTAGTCCACAGC	CTGCTGTGAAGTTTT TGAG	107
rs1049982	ACGTTGGATGTGGAGA CCCACGAGCCGAG	ACGTTGGATGAGTGCT GCATCTGGTCGCT	gggtTGCGGTTTGCTG TGC	118
rs2536512	ACGTTGGATGTGGCAG GAGGTCATGCAG	ACGTTGGATGACCCGG GGCTGCGCGGCGTC	gggaAGGCGGCGTGG AGCG	118
rs3138053	ACGTTGGATGGTGTTT ATAAGTAGCTATTCTG	ACGTTGGATGTCACGA TCCTTTTCTGCGG	TTTATGCTATCTGAC CTACA	89
rs9953270	ACGTTGGATGGCCTGT TCAGTTCATTGTAT	ACGTTGGATGCTCAAT ACAAGTCTTTGCTG	GACTGCTTGGGTATC ATCTTG	108
rs17551536	ACGTTGGATGGTCTTG AGAGCAAACGAGTC	ACGTTGGATGCATAGT GTGCAGCATATGG	ggatAAAGGAGTTGG CCTAAT	97
rs17880135	ACGTTGGATGGGAGA GGAAAAGCTAAATTGG	ACGTTGGATGGGTTGT TTTAACCACTTAC	tcTTTAACCACTTACT GTGAAC	120
rs4634985	ACGTTGGATGAAGTGC TGGGATTACAGTTG	ACGTTGGATGCTGAGG AAGGGATTCTAAT	GTTGTTAAAAACCAC ACTGTTG	116
rs349423	ACGTTGGATGCAGCTT GGAATTGTTCTGTC	ACGTTGGATGAAATGC TCTGGGAAGCTCCG	GGAATTGTTCTGTCT ATAAACTA	105
rs2664349	ACGTTGGATGTGTTGC AGTCTGCAGATAGG	ACGTTGGATGGACTAT GCTTATCTCGAGAC	agggTCTCGAGACAG AACTTTTA	106

Amplifikasyon primerleri, multipleks PCR ürünü olarak polimorfik bölgeyi içeren ve 80-120 baz çifti uzunluğunda ampikon oluşturacak şekilde ve oluşacak ampikonun da 400 baz çiftinden uzun olmasından kaçınılacak şekilde tasarlanmıştır. Amplifikasyon primerinin 5' ucuna 10-mer uzunluğunda, 5'-ACGTTGGATG-3' dizisini içeren genel bir etiket eklenmiştir. Bunlara ek olarak amplifikasyon primerleri tasarımı, PCR esnasında primer bağlanması ile ilgili sorunların önüne geçmek ve verimli bir reaksiyon oluşturabilmek için primer dimeri oluşturmayacak şekilde gerçekleştirilmiş ve "Sequenom Assay Designer" yazılımı ile kontrol edilmiştir.

Bu tez çalışmasında genotipleme yöntemi olarak seçilmiş olan MALDI-TOF kütle spektrometrisi yönteminde, PCR amplifikasyonu ile elde edilen ürüne uzama problemleri (uzama primerleri) hibridizasyonu gerçekleştirilir. Bu sayede kalıp diziyeye uyumlu şekilde tek bazlık bir uzama sağlanır ve MassARRAY® Typer 4.0 yazılımı, uzayan bu bazın kütlelerinin ölçülmesiyle ortamda bulunan alleli belirlemiş olur. Bazlar arası kütle farkları Çizelge 2.3'te açıklanmıştır.

Çizelge 2.3 Bazlar arasındaki kütle farkları [121]

Terminatör	A	C	G	T
A	0	-24	16	55,9
C	24	0	40	79,9
G	-16	-40	0	39,9
T	-55,9	-79,9	39,9	0

Tek baz uzama reaksiyonunu gerçekleştirmek için ihtiyaç duyulan uzama problemleri, probun 3' ucu SNP bölgesinin hemen yanında 15-30 nükleotid uzunluğunda olacak şekilde tasarlanmış ve Tm değerleri yaklaşık $\geq 60^{\circ}\text{C}$ olacak şekilde sentezlenmiştir. Bu uzama problemleri ile gerçekleştirilecek PCR amplifikasyonlarının verimli olabilmesi amacıyla uzama problemleri ve oluşacak ürünlerin kütleleri arasında minimum 30 Da'luk bir fark bulunmaktadır ve analit kütleleri de 4500-9000 Da arasında olacak şekilde seçilmiştir. Bu uzama problemlerinin tasarımı ve tek baz uzama reaksiyonu sonucunda oluşacak ürünün kütlelerinin hesabı Sequenom'un Assay Designer yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.3 Multipleks PCR

İzole edilmiş olan genomik DNA'daki hedef SNP bölgesinin amplifikasyonu için, tasarlanmış olan forward ve reverse primerler kullanılarak multipleks PCR gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.4). Polimeraz zincir reaksiyonunun ön denatürasyon basamağı olarak 95°C'de 2 dakika inkübasyonu takiben, amplifikasyon basamağı toplam 44 döngü olacak şekilde, denatürasyon 95°C'de 30 saniye, bağlanma 56°C'de 30 saniye ve uzama 72°C'de 1 dakika olarak gerçekleştirilmiş, son uzama basamağı olarak da 72°C'de 5 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir [121, 122].

Çizelge 2.4 Multipleks PCR bileşenleri (*reaksiyona göre farklılık gösteren değer)

PCR Bileşenleri	5 µl'deki Konsantrasyon	Bir Reaksiyondaki Bileşen Hacimleri (µl)
dH ₂ O	*	1,8
10X PCR Tamponu (20 mM MgCl ₂)	1x (2 mM MgCl ₂)	0,5
MgCl ₂ (25mM)	2 mM	0,4
dNTP Karışımı (her birinden 25 mM)	500 µM	0,1
Primer Karışımı (0,5 µM)	0,1 µM	1
Roche PCR Enzimi (5 U/µl)	1 U/reaksiyon	0,2
Toplam hacim 4 µl olacak şekilde PCR karışımı hazırlandıktan sonra,		
DNA (10 ng/µl)	2 ng/µl	1
Toplam Hacim	*	5

2.2.3.4 dNTP Nötralizasyonu

PCR amplifikasyonunu takiben bağlanmayarak ortamda serbest halde bulunan dNTP'lerin nötralizasyonu amacıyla defosforilasyon uygulanmıştır. SAP reaksiyonu olarak isimlendirilen bu yöntem için shrimp alkalen fosfotaz (Shrimp alkaline phosphotase: SAP) enzimi kullanılmıştır. SAP enzimi, nükleotidlerin fosfat gruplarını 5' ucundan uzaklaştırır ve böylece dNTP'leri defosforilize ederek amplifikasyon ürününden

bağlanmamış dNTP'leri uzaklaştırmış olur. SAP reaksiyonu Çizelge 2.5'te listelenmiş bileşenler ile hazırlanmıştır [121, 122].

Çizelge 2.5 SAP reaksiyonu için bileşenler (*reaksiyona göre optimize edilen değer)

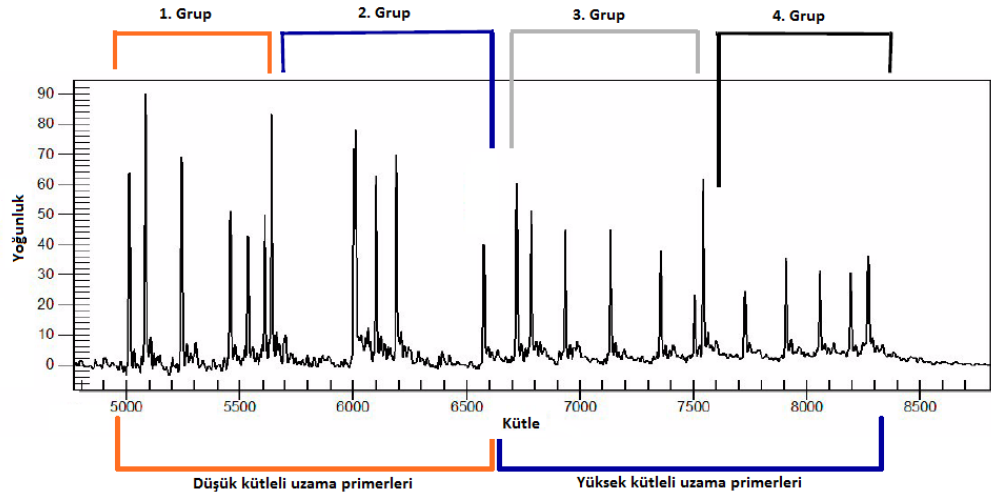
Reaksiyon bileşenleri	2 µl SAP karışımı içerisindeki bileşenler (µl)	7 µl son hacimdeki bileşenler (PCR ürünü + SAP)
dH ₂ O	1,53	*
10X TS Tamponu	0,17	0,24 X
SAP enzimi	0,3	0,5 U
Toplam Hacim	2	7 µl

Reaksiyonu gerçekleştirmek için mültepleks PCR'ı takiben her bir kuyucuktaki PCR ürünleri üzerine 2 µl SAP enzimi/tampon çözeltisi karışımı eklenmiştir. Ardından örnek tablası 1000 rpm hızda santrifüj edilmiş ve 37°C'de 40 dakika inkübe edilerek SAP reaksiyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben reaksiyonu durdurmak için 85°C'de 5 dakika daha inkübasyon ile enzim inaktive edilmiştir.

2.2.3.5 Tek Baz Uzama Reaksiyonu

Tek baz spesifik uzama reaksiyonlarında analitin kütlesi ile reaksiyon sonucunda elde edilen pik yoğunluğu birbiri ile ters orantılıdır. Bu yüzden reaksiyondaki sinyal-gürültü oranının stabilitesini sağlamak için kullanılan uzama problemlerinin konsantrasyonlarının optimize edilmesi gerekir. Kullanılan en yüksek kütleyle sahip primerin (8445,5 Da) oluşturduğu pik yoğunluğunun daha düşük kütleyle sahip primerlerin ortalamasından %25 daha az olduğu bilinmektedir. Bir başka deyişle, primerlerin kütlelerinin artmasıyla ters orantılı olarak sinyal-gürültü oranı azalma eğilimindedir. Reaksiyon içerisinde uzama primerlerinin konsantrasyonları optimize edilmez ise oluşacak sinyal, pik gürültüsünden ötürü ayırt edilemez ve dolayısıyla analit piklerinin sağlıklı gözlemlenemeyerek hatalı genotipleme sonucu ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca pik uzunluklarında görülebilecek olası beklenmeyen değişimler, sentezle elde edilen oligonükleotidlerin kalitesinden veya MALDI'nin düşük desorpsiyon/iyonizasyon davranışından da kaynaklanabilir. Bu tip olası sorunların önüne geçebilmek için uzama primerleri konsantrasyonları, düşük kütleli

primerlerden yüksek kütleli primerlere doğru dört aşamalı olarak optimize edilmiştir (Şekil 2.1) [121, 122].



Şekil 2.1 Uzama primerlerinin dört aşamalı optimizasyon yöntemine göre gruplandırılması [121]

Bu dört grup, konsantrasyonlar düşükten yükseğe doğru sırasıyla 7.0 μM , 9.3 μM , 11.6 μM ve 14 μM olarak ayarlanmış ve karışım üzerine uygun miktarda dH₂O eklenerek elde edilen karışım reaksiyonda kullanılmıştır.

Uzama problemlerinin konsantrasyonlarının optimizasyonunu takiben bu problemleri içeren reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Bu uzama problemleri karışımı ile daha önce SAP reaksiyonu aracılığıyla bağlanmamış dNTP'lerin nötraliz edilmiş olduğu PCR ürünleri, hedef SNP bölgesinin hibridizasyonu ile tek nükleotid (kütle-modifiye) uzama reaksiyonuna sokulmuştur. Tek baz uzama reaksiyonu bileşenleri uzama problemleri, tampon çözelti, enzim, kütle modifikasyonlu ddNTP'ler ve PCR ürününden oluşmaktadır (Çizelge 2.6).

Çizelge 2.6 Tek baz spesifik uzama reaksiyonu bileşenleri (*reaksiyona göre optimize edilen değer)

Reaksiyon Bileşenleri	9 µl son reaksiyon hacmindeki konsantrasyon	2 µl uzama primerleri karışımındaki bileşen miktarları (µl)
dH ₂ O	*	0,619
10X iPLEX Tamponu	0,222 X	0,200
iPLEX Terminasyon Karışımı	1 X	0,200
iPLEX Uzama Primerleri Karışımı 7/9,3/11,6/14 µM	0,84/1,04/1,57	0,940
iPLEX Enzimi	1 X	0,041
Hacim (µl)	*	2
+		
SAP+PCR	*	7
Toplam Hacim (µl)	*	9

Tek baz spesifik uzama reaksiyonu vasıtasıyla, analiz edilen allele ve deney tasarımına bağlı olarak, primerin tek bir kütle modifikasyonlu nükleotid ile sonlanması sağlanır. Tek baz uzama reaksiyonu içerisinde iki ayrı döngü içeren ve toplam 200 kısa döngüden oluşan bir programdır. 94°C’de 30 saniyelik bir ön denatürasyonu takiben, örnekler 94°C’de 5 saniye denatürasyon, 52°C’de 5 saniye bağlanma ve 80°C’de 5 saniye uzama basamaklarından geçer. Daha sonra bağlanma ve uzama basamakları 4 defa daha tekrarlanır (toplam 5 defa) ve sonra döngü yeniden 94°C’de 5 saniye denatürasyon basamağına döner. Denatürasyon basamağı ile başlayan bu ikinci döngüde de örnekler yine 5 döngülük bir bağlanma-uzama döngüsüne girer. 1 denatürasyon basamağını takip eden 5 döngü uzama ve bağlanma basamakları toplam 40 defa döngüye girer. Bu 40 döngünün her birinin içerisindeki 5 uzama-bağlanma döngüleri toplam 200 döngü

oluşturmaktadır. 40 büyük döngünün sonunda örnekler 72°C’de 3 dakikalık bir son uzama basamağına girer ve 4°C’ye soğutularak reaksiyon sonlanır. Tek baz spesifik uzama reaksiyonunun döngüleri Çizelge 2.7’de açıklanmıştır [121, 122].

Çizelge 2.7 Tek baz spesifik uzama reaksiyonunun döngüleri

Basamaklar	İşlem	Sıcaklık ve Süre
1	Ön denatürasyon	94°C’de 30 saniye
2	Denatürasyon	94°C’de 5 saniye
3	Bağlanma	52°C’de 5 saniye
4	Uzama	80°C’de 5 saniye
5	Son Uzama	72°C’de 3 dakika

2.2.3.6 Reçine ile İyonlardan Arındırma

Tek baz uzama reaksiyonundan sonra oluşan ürünlerin analizinden önce arka plan kirliliğini en düşük seviyeye çekebilmek için ürünler içerisinde kalan Na⁺, K⁺, ve Mg⁺ gibi iyonların ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla reaksiyon ürünleri, 25 µl ddH₂O ve 6 mg katyonik değişim sağlayan reçine ile seyreltildikten sonra 35 dakika oda sıcaklığında bir çalkalayıcı üzerinde inkübe edilir ve ardından 3200 x g’de 5 dakika santrifüj edilir [121, 122].

2.2.3.7 Örneklerin SpectroChip II Üzerine Aktarımı

Ürünlere reçine uygulaması yapıldıktan sonra ortalama 15nl modifiye PCR ürünü oligonükleotidler, nanodispenser yardımıyla 384-element SpectroCHIP® II üzerindeki matriks noktalarına aktarılmıştır. Nano hacimlerde gerçekleştirilen bu transfer, nanodispenserin delikli iğnelerindeki kapiler etkisi yardımıyla gerçekleştirilebilmiştir. Böylelikle çip üzerine aktarılan oligonükleotidler MALDI-TOF matriksine (3-hidroksipikolinik asit) dahil edilmiştir [121].

2.2.3.8 MALDI-TOF MS Sistemi ile Genotipleme

Nanodispenser yardımıyla 384-element SpectroCHIP® II üzerine aktarılan PCR ürünleri, kütle spektrometrisi ile MALDI-TOF analizi için MassARRAY® Analyser 4 cihazına yüklenmiştir. MassARRAY® Analyser 4'ün ürünler üzerine yapmış olduğu lazer atışları ile allellere spesifik elde edilen pikler MassARRAY® TYPER 4.0 genotipleme yazılımı ile analiz edilmiştir.

2.2.4 İstatistiksel Analiz

Genotipleme sonucu MassARRAY® TYPER 4.0 yazılımı ile elde edilen verilerin istatistiksel analizi için SPSS (Statistical Packages of Social Sciences, SPSS for Windows, Version 20.0, Chicago, IC, USA) paket programı kullanılmıştır. Kategorik değişkenlerin birbiri ile karşılaştırılmasında Pearson Chi-Square ve Fisher Exact testleri kullanılmıştır. Bir risk etkenine sahip olanların, olmayanlara göre kaç kat daha fazla olduğunu göstermek için odds ratio kullanılmıştır. Grup cevap değişkeninin açıklayıcı değişkenlerle sebep–sonuç ilişkisini belirlemek için Multiple lojistik regresyon testi (Back Ward) kullanılmıştır. Değişkenler %95 güven düzeyinde incelenmiş olup tüm istatistiksel analizlerde $p \leq 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

2.2.4.1 Hardy-Weinberg Dengesi Analizi

1908 yılında G. H. Hardy ve Wilhelm Weinberg, bugün Hardy-Weinberg yasası olarak bilinen, genetik varyasyon ve populasyon dengesini hesaplamak için kullanılabilen bir denklem fikrini, birbirlerinden bağımsız olarak ortaya atmışlardır [125, 126]. Hardy-Weinberg yasası yaşam bilimleri, populasyon genetiği, epidemiyoloji, biyoinformatik ve biyoistatistik alanları için temel alınan önemli bir ilkedir. Bu yasa, bir otozomal biallelik belirteç için AA, AB ve BB genotip frekansları belirli göreceli oranlarda ortaya çıkacak ve mutasyon, doğal seleksiyon ve göç gibi faktörlerin olmadığı ve rastgele çiftleşen bir populasyonda genotip frekansları nesilden nesile değişmeyerek sabit kalacaktır (Hardy-Weinberg Dengesi, HWE) [127]. Hardy-Weinberg yasası; A alleli frekansı p ise ve B allelinin frekansı q ise, AA genotipi frekansının p^2 , BB genotipi frekansının q^2 ve AB genotipi frekansının $2pq$ olacağını öngörmektedir. Ayrıca bu genotip frekanslarının toplamı her zaman 1'e eşit olacaktır (Denklem 2.2).

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \quad (2.2)$$

İnsanlarda da birçok SNP'nin allel ve genotip frekansları jenerasyondan jenerasyona sabit kalmakta, bir başka deyişle Hardy-Weinberg dengesinde (HWE) bulunmaktadır [125, 126]. Bu tez çalışmasında da çalışma grubundaki bireylerin genotip sayıları Hardy-Weinberg dengesi bakımından test edilmiş ve allel frekansları Denklem 2.2'de belirtilen şekilde hesaplanmıştır. Elde edilen değerler ile beklenen değerler arasındaki farkı test etmek için, elde edilen genotipleme verilerine Hardy-Weinberg dengesinin analizi amacıyla ki-kare testi uygulanmıştır. Araştırılan SNP'lerin HWE dengesinden sapma gösterdiği p değeri $\leq 0,05$ olduğunda kabul edilmiştir.

2.2.4.2 Olasılıklar Oranı (Odds Ratio, OR) Testi

Olasılıklar oranı (OR) etki ve sonuç arasındaki ilişkiyi değerlendirmeye yarayan bir yöntemdir. OR, belirli bir etkinin mevcut olmadığı durumda ortaya çıkan sonuç ile bu etki altında oluşan sonucu karşılaştırarak, söz konusu sonucun oluşma ihtimalini temsil eder. Bu yüzden bir araştırmada OR, ilgilenilen sonucun (hastalık veya düzensizlik) göreceli ihtimali ile ilgilenilen sonucun belirli etkilere maruz kaldığında (tıbbi öykü, sağlık durumu veya bir polimorfizm) oluşacak sonucu karşılaştırmada kullanılır. Aynı zamanda OR, bir etkiye maruz kalmanın, belirli bir sonuç için risk faktörü olup olmadığının değerlendirilmesinde ve değişken risk faktörlerinin sonuca etkilerinin büyüklüğünün hesaplanmasında da kullanılır [128]. Elde edilen OR değerine göre etki ile sonuç arasındaki ilişki Denklem 2.3'te belirtildiği şekilde yorumlanır.

Bu tez çalışmasında da bronkopulmoner displazi ile araştırılan SNP'ler arasındaki ilişki, allel ve genotiplere göre elde edilen OR değerleri hesaplanarak saptanmıştır. Bu amaçla kontrol grubunda yaygın olarak görüldüğü tespit edilen allel referans olarak alınmış ve SNP allelleri ile bronkopulmoner displazinin ilişkilendirilmesi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.8). Risk faktörü olduğu düşünülen allelerin, referans alınan allelere göre OR değerleri %95'lik güven aralığı ile hesaplanmış ve hesaplanan değer 1'den büyükse, söz konusu SNP bronkopulmoner displazi ile ilişkilendirilmiştir (2.3).

Çizelge 2.8 Olasılıklar Oranı (OR) Hesaplama

	Allel 1	Allel 2
Hasta	A	B
Kontrol	C	D

$$OR = (A/B) / (C/D)$$

OR=1 Etkinin sonuç ihtimalleri üzerinde etkisi yok

OR>1 Etkinin, sonucun oluşma ihtimalini arttırıcı ilişkisi mevcut

OR<1 Etkinin, sonucun oluşma ihtimalini düşürücü ilişkisi mevcut (2.3)

SNP genotiplerinin bronkopulmoner displazi ile ilişkilendirilmesi amacıyla kontrol grubunda yaygın olarak görüldüğü tespit edilen homozigot genotip referans olarak alınmıştır. Homozigot karşılaştırma modeli (Örn: AA ve CC) ve dominant model (Örn: CC+AC ile AA) kullanılarak OR değerleri ve güven aralığı (%95) hesaplanmıştır. Hesaplanan değer 1'den büyük ise bronkopulmoner displazi oluşumu ile ilişkilendirilmiştir.

2.2.4.3 Klinik ve Demografik Verilerin SNP'ler ile ilişkilendirilmesi

Ki-kare testi (χ^2) gözlenen bir frekans (G) ile beklenen frekans (B) arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını ve dolayısıyla öngörülen hipotezin doğru olup olmadığını hesaplamaya yarayan bir yöntemdir [129]. Bu tez çalışmasında χ^2 testi dört gözlü düzen ile gerçekleştirilmiş, iki değişken sınıflandırılarak ikili çapraz tablo haline getirilmiştir. χ^2 testinde genellikle beklenen frekansların küçük olması istenir. Oluşturulan dört gözlü düzende, herhangi bir gözde beklenen frekans 5'ten küçük ise χ^2 testi yerine Fisher kesin ki-kare testi uygulanması gerekmektedir.

Fisher kesin ki-kare testi ve χ^2 testi kullanılarak bronkopulmoner displazi ile ailede erken doğum, kronik akciğer hastalığı, zatürre, tüberküloz öyküleri, ebeveynlerin sigara/alkol kullanımı gibi klinik ve demografik değişkenler arasındaki ilişki saptanmıştır.

2.2.4.4 Lojistik Regresyon Analizi

Lojistik regresyon analizi iki değişkenli (1 ve 0) sonuçları biyolojik olarak kabul edilebilir bir şekilde modellemeye yarayan bir istatistiksel yöntemdir. Örneğin bir veya daha fazla metabolik belirtinin, hastaların morbidite (1) ve hayatta kalım (0) oranları ile ilişkisi lojistik regresyon analizi ile hesaplanabilir [130]. Bu çalışmada da olası bronkopulmoner displazi risk faktörleri olan SNP genotipleri ile klinik ve demografik verilerin istatistiksel olarak anlamı lojistik regresyon analizi ile hesaplanmıştır.

2.2.5 Genler Arasındaki Fonksiyonel İlişki Ağının Kurulması

BPD ile anlamlı bir ilişkisi bulunan polimorfizmlerin üzerlerinde bulundukları genlerin birbiri ve diğer genler ile olan fonksiyonel ilişkilerinin ağının oluşturulabilmesi için Princeton Üniversitesinin Troyanskaya Laboratuvarının geliştirmiş olduğu PathwayNet isimli araç kullanılmıştır [131-133]. Fonksiyonel ilişkileri kurulmak istenen genler PathwayNet aracı [131] üzerinden seçilmiş ve oluşan ağ üzerinden genler arası ilişki “Gen Ontoloji Konsorsiyum” [132] ve “Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi, Kanehisa Laboratuvarı” veri tabanı kullanılarak analiz edilmiştir [133].

BÖLÜM 3

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 Bronkopulmoner Displazi (BPD) Tanısının Konulması ve Çalışma Populasyonunun Oluşturulması

İstanbul Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesinde doğum yapan bireylerin bebeklerine BPD tanısı, yeni doğan yoğun bakım uzmanı Doç. Dr. Merih Çetinkaya ve çocuk sağlığı ve hastalıkları uzmanı Dr. Seda Yılmaz Semerci tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasına dahil edilen populasyonunun tamamı, Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi, yeni doğan yoğun bakım biriminde, 32 haftadan önce (prematüre) doğmuş infantlardan oluşmaktadır. Çalışma populasyonunun kontrol grubu, postmenstrüel 36. haftada veya taburcu edilirken (hangisi daha önce ise), ek O₂ almadan, oda havasında en az 30 dakika SpO₂'sini $\geq$ %90 tutabilmekte olan, yani BPD olmayan, prematüre infantlardan oluşmaktadır. Çalışma populasyonunun hasta grubu ise ek oksijen almadan/oda havasında en az 30 dakika SpO₂'sini $\geq$ %90 tutamıyorlar ise hafif/orta BPD tanısı konmuş; her türlü pozitif basınçla (HFNC, nCPAP, MV) $\geq$ %30 O₂ almaları gerekmekte olan, ağır BPD tanısı konulmuş prematüre infantlardan oluşmaktadır. Yaklaşık 5 aylık bir süre içerisinde, toplam 97 BPD teşhisi konulan hastadan ve 103 sağlıklı preterm infanttan (kontrol grubu) kan örnekleri toplanmış ve toplanan örnekler Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Rekombinant DNA Teknolojileri Laboratuvarında, -20°C kan örnekleri saklama dolabında muhafaza edilmiştir. Toplanan kan örnekleri Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi etik kurulunun KAEK/2016.12.31 numaralı izni ile toplanmıştır.

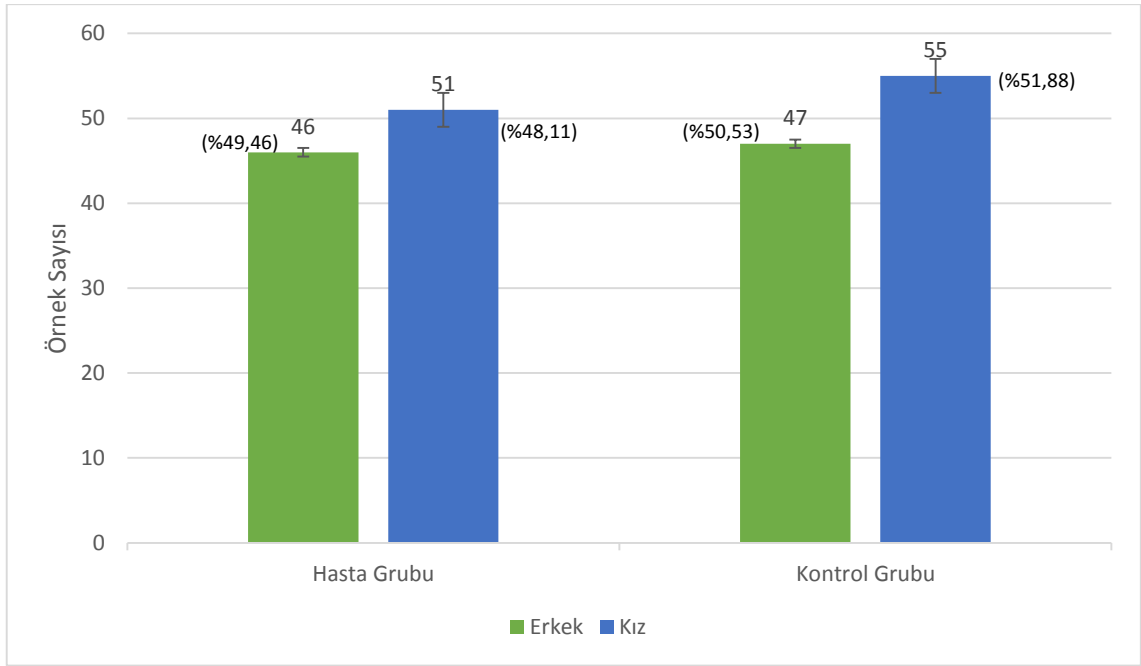
Kan örneği toplanmış hasta ve kontroller arasında 7 çift ikiz (6 çift monozigot, 1 çift dizigot) ve 2 adet üçüz bebek bulunmaktadır. 6 çift tek yumurta ikizlerinin 2 çifti kontrol grubunda, 3 çifti hasta grubunda ve 1 çift ise bir kardeş hasta bir kardeş kontrol grubunda olmak üzere gruplanmışlardır. Çift yumurta ikizi olan kardeşlerin ise biri hasta diğeri ise kontrol grubundadır. 2 adet üçüz kardeşlerin birincisinde 2 kardeş kontrol 3. kardeş ise hasta grubundadır. Diğer üçüz kardeşlerin ise tamamı hasta grubunda bulunmaktadır. Kan örneği toplanarak araştırmaya dahil edilmiş olan ikiz ve üçüz bebeklerin BPD bakımından durumları ve örnek numaraları Tablo 3.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışma popülasyonundaki ikiz ve üçüz bebeklerin dağılımı

İkizler		Üçüzler	
Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol
	K78 – K89	H41	K68 – K69
	K87 – K86	H66 – H67 – H73	
H29	K53		
*H52	*K79		
H15 – H16			
H43 – H44			
H71 – H72			

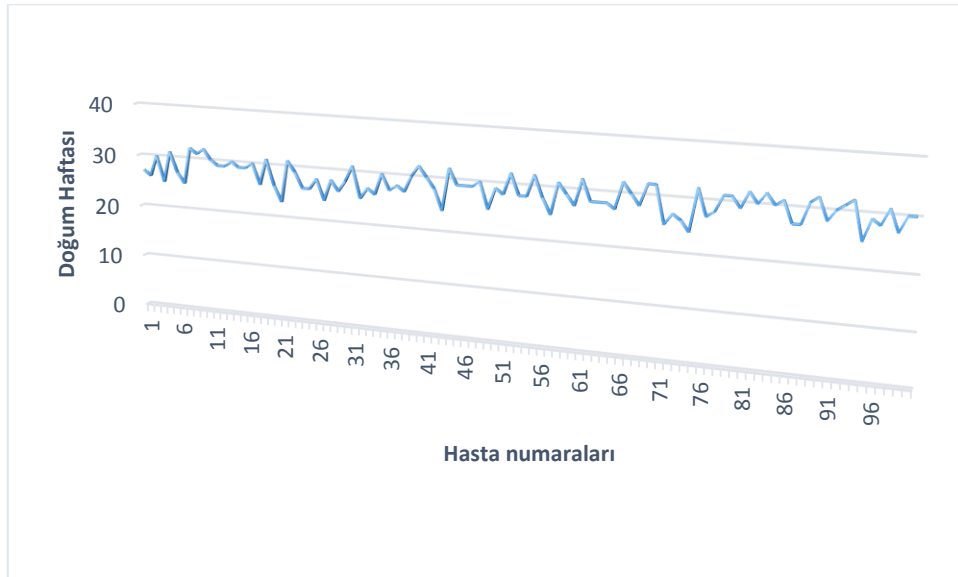
*: Dizigot ikizler

Çalışma popülasyonuna katılan bebeklerin cinsiyet dağılımı incelendiğinde, toplam 106 kız ve 93 erkek bebek olduğu görülmüştür. Çalışmaya dahil edilen 106 kız bebeğin 55’i kontrol 51’i ise hasta grubuna; 93 erkek bebeğin ise 47’si kontrol grubuna, 46’sı hasta grubuna dahil edilmiştir. Çalışma grubundaki bebeklerin cinsiyete göre yüzde dağılımları Şekil 3.1’de açıklanmıştır.



Şekil 3.1 Çalışma grubundaki bebeklerin cinsiyete göre dağılım grafiği

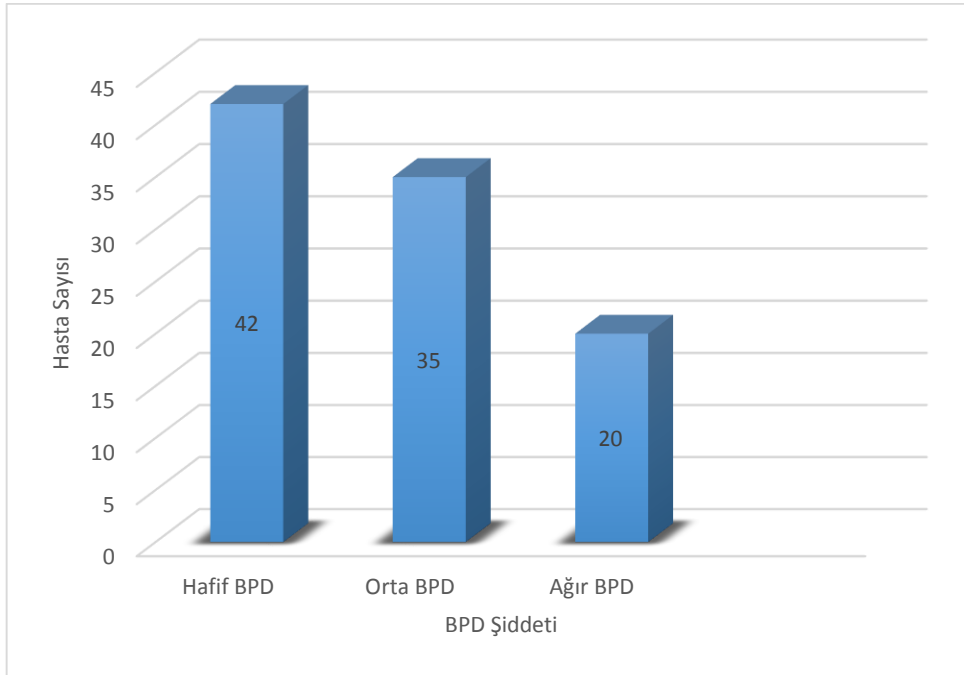
Çalışma grubuna dahil edilen BPD hastalarının tamamı daha önce de bahsedildiği gibi 32 haftadan önce doğmuş preterm infantlardan oluşturulmuştur. Çalışma popülasyonu bireylerinin doğum haftaları Şekil 3.2’de ki grafikte gösterilmiştir. Çalışma popülasyonunun tamamının ortalama doğum haftası 28,7 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.2 Çalışma grubu bireylerinin doğum haftaları grafiği

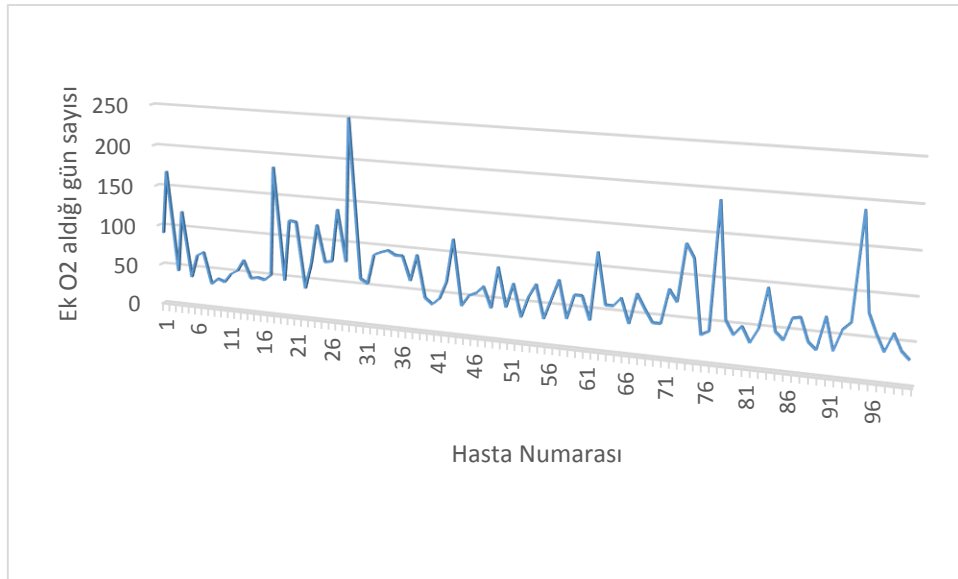
Çalışma grubunda yer alan infantlara, daha önce de bahsedildiği üzere hafif, orta veya ağır BPD olarak teşhis konulmuştur. Şekil 3.3’deki grafikte çalışma grubuna dahil edilen

infantların BPD şiddetine göre sınıflandırıldığı bir grafik oluşturulmuştur. BPD hastalarının 42'sine hafif, 35'ine orta ve 20'sine ise ağır BPD olarak teşhis konulmuştur.



Şekil 3.3 Çalışma grubunda görülen BPD şiddeti dağılımı grafiği

Hasta grubundaki infantlara yeni doğan yoğun bakım ünitesinde verilen ek O₂ süreleri ise Şekil 3.4'de gösterilmiştir. Ortalama olarak hasta grubuna dahil edilen infantlar 68,35 gün boyunca ek O₂ almışlardır.



Şekil 3.4 Hasta grubuna dahil edilen bireylerin ek O₂ alma süreleri (gün)

Kan örnekleri toplanan hasta ve kontrol gruplarından, etiyolojik, ailesel ve çevresel faktörlerin istatistiksel olarak anlamlandırılabilmesi için birer hasta bilgi formu toplanmıştır.

3.2 Elde Edilen DNA Örneklerinin Safılık ve Miktar Analizleri

Çalışmada kullanılacak olan kontrol ve hasta örneklerinden izole edilen genomik DNA örnekleri, hasta grubu “H” harfi ile (H1, H2, H3...) ve kontrol grubu ise “K” harfi ile (K1, K2, K3...) şeklinde numaralandırılarak kodlanmıştır. Örneklerin DNA konsantrasyonları (ng/μl) ve absorbans değerleri Epoch 2 Microplate spektrofotometre ve Take3 μ-plate kullanılarak 260 nm ve 280 nm dalga boylarında UV-spektrofotometrik ölçümler ile belirlenmiştir (Çizelge 3.2). 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerde absorbans değerleri oranı 1.7 - 2.0 arasında olan örnekler saflık bakımından uygun bulunarak çalışmaya dahil edilmiştir (124). Elde edilen DNA’ların saflık ve konsantrasyon bilgileri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Hasta ve kontrol grubu DNA konsantrasyonları ve saflık değerleri

Örnek Adı	A₂₆₀	A₂₈₀	A₂₆₀/A₂₈₀	DNA Konsantrasyonu (ng/μl)
K1	0,0215	0,011	1,95	21,5
K2	0,013	0,0065	2,00	13
K3	0,016	0,008	2,00	16
K4	0,016	0,008	2,00	16
K5	0,004	0,002	2,00	4
K6	0,0175	0,0088	1,99	17,5
K7	0,007	0,004	1,75	7
K8	0,012	0,007	1,71	12
K9	0,029	0,016	1,81	29
K10	0,0065	0,0035	1,86	6,5
K11	0,021	0,011	1,91	21
K12	0,023	0,012	1,92	23
K13	0,0215	0,0115	1,87	21,5
K14	0,029	0,015	1,93	29
K15	0,0445	0,024	1,85	44,5
K16	0,029	0,016	1,81	29
K17	0,009	0,0051	1,76	9
K18	0,0715	0,0375	1,91	71,5
K19	0,0135	0,007	1,93	13,5
K20	0,0345	0,0175	1,97	34,5
K21	0,0195	0,01	1,95	19,5
K22	0,035	0,0185	1,89	35
K23	0,0175	0,009	1,94	17,5
K24	0,0135	0,0075	1,80	13,5
K25	0,016	0,0085	1,88	16
K26	0,0595	0,0315	1,89	59,5
K27	0,0135	0,0069	1,96	13,5
K28	0,029	0,015	1,93	29
K29	0,0225	0,0115	1,96	22,5

Çizelge 3.2 Hasta ve kontrol grubu DNA konsantrasyonları ve saflık değerleri (devam)

Örnek Adı	A₂₆₀	A₂₈₀	A₂₆₀/A₂₈₀	DNA Konsantrasyonu (ng/μl)
K30	0,0045	0,0025	1,80	4,5
K31	0,0325	0,017	1,91	32,5
K32	0,0205	0,012	1,71	20,5
K33	0,033	0,0185	1,78	33
K34	0,0325	0,017	1,91	32,5
K35	0,0135	0,007	1,93	13,5
K36	0,0145	0,0075	1,93	14,5
K37	0,0125	0,0065	1,92	12,5
K38	0,007	0,0035	2,00	7
K39	0,038	0,0205	1,85	38
K40	0,046	0,0265	1,74	46
K41	0,028	0,0155	1,81	28
K42	0,016	0,0085	1,88	16
K43	0,0065	0,0033	1,97	6,5
K44	0,0175	0,0095	1,84	17,5
K45	0,0105	0,006	1,75	10,5
K46	0,023	0,0135	1,70	23
K47	0,014	0,008	1,75	14
K48	0,0175	0,01	1,75	17,5
K49	0,026	0,0145	1,79	26
K50	0,0305	0,0179	1,70	30,5
K51	0,0255	0,013	1,96	25,5
K52	0,016	0,0085	1,88	16
K53	0,0215	0,0115	1,87	21,5
K54	0,0315	0,016	1,97	31,5
K55	0,036	0,019	1,89	36
K56	0,024	0,0135	1,78	24
K57	0,009	0,0055	1,64	9
K58	0,0215	0,0115	1,87	21,5

Çizelge 3.2 Hasta ve kontrol grubu DNA konsantrasyonları ve saflık değerleri (devam)

Örnek Adı	A₂₆₀	A₂₈₀	A₂₆₀/A₂₈₀	DNA Konsantrasyonu (ng/μl)
K59	0,063	0,034	1,85	63
K60	0,0295	0,017	1,74	29,5
K61	0,045	0,0225	2,00	45
K62	0,044	0,022	2,00	44
K63	0,0525	0,027	1,94	52,5
K64	0,0295	0,017	1,74	29,5
K65	0,0225	0,012	1,88	22,5
K66	0,021	0,0115	1,83	21
K67	0,009	0,005	1,80	9
K68	0,031	0,017	1,82	31
K69	0,034	0,0185	1,84	34
K70	0,0355	0,0185	1,92	35,5
K71	0,017	0,009	1,89	17
K72	0,055	0,0295	1,86	55
K73	0,0195	0,0105	1,86	19,5
K74	0,032	0,017	1,88	32
K75	0,008	0,004	2,00	8
K76	0,0195	0,01	1,95	19,5
K77	0,04	0,021	1,90	40
K78	0,022	0,011	2,00	22
K79	0,03	0,0155	1,94	30
K80	0,018	0,009	2,00	18
K81	0,015	0,008	1,88	15
K82	0,038	0,0195	1,95	38
K83	0,011	0,0055	2,00	11
K84	0,006	0,0035	1,71	6
K85	0,012	0,0065	1,85	12
K86	0,015	0,008	1,88	15
K87	0,0125	0,0065	1,92	12,5

Çizelge 3.2 Hasta ve kontrol grubu DNA konsantrasyonları ve saflık değerleri (devam)

Örnek Adı	A₂₆₀	A₂₈₀	A₂₆₀/A₂₈₀	DNA Konsantrasyonu (ng/μl)
K88	0,025	0,014	1,79	25
K89	0,025	0,014	1,79	25
K90	0,0095	0,0055	1,73	9,5
K91	0,0145	0,0075	1,93	14,5
K92	0,062	0,032	1,94	62
K93	0,0165	0,0085	1,94	16,5
K94	0,0105	0,0053	1,98	10,5
K95	0,0215	0,0115	1,87	21,5
K96	0,0235	0,013	1,81	23,5
H1	0,009	0,005	1,80	9
H2	0,004	0,0022	1,82	4
H3	0,0015	0,0008	1,88	1,5
H4	0,002	0,001	2,00	2
H5	0,004	0,002	2,00	4
H6	0,0195	0,01	1,95	19,5
H7	0,007	0,0035	2,00	7
H8	0,0055	0,0028	1,96	5,5
H9	0,01	0,0055	1,82	10
H10	0,0055	0,0029	1,90	5,5
H11	0,007	0,004	1,75	7
H12	0,004	0,0022	1,82	4
H13	0,026	0,0135	1,93	26
H14	0,012	0,006	2,00	12
H15	0,008	0,004	2,00	8
H16	0,019	0,011	1,73	19
H17	0,0115	0,0065	1,77	11,5
H18	0,0085	0,005	1,70	8,5
H19	0,015	0,0075	2,00	15
H20	0,0145	0,0085	1,71	14,5

Çizelge 3.2 Hasta ve kontrol grubu DNA konsantrasyonları ve saflık değerleri (devam)

Örnek Adı	A₂₆₀	A₂₈₀	A₂₆₀/A₂₈₀	DNA Konsantrasyonu (ng/μl)
H21	0,012	0,007	1,71	12
H22	0,0095	0,0055	1,73	9,5
H23	0,006	0,0035	1,71	6
H24	0,0055	0,0028	1,96	5,5
H28	0,0095	0,005	1,90	9,5
H29	0,012	0,0065	1,85	12
H30	0,028	0,015	1,87	28
H31	0,039	0,023	1,70	39
H32	0,0115	0,0065	1,77	11,5
H33	0,0185	0,01	1,85	18,5
H34	0,015	0,0085	1,76	15
H35	0,037	0,019	1,95	37
H36	0,021	0,012	1,75	21
H37	0,027	0,014	1,93	27
H38	0,013	0,0075	1,73	13
H39	0,014	0,008	1,75	14
H40	0,0265	0,0155	1,71	26,5
H41	0,029	0,0165	1,76	29
H42	0,04	0,022	1,82	40
H43	0,0065	0,0035	1,86	6,5
H44	0,012	0,0065	1,85	12
H45	0,016	0,0085	1,88	16
H46	0,015	0,008	1,88	15
H47	0,009	0,005	1,80	9
H48	0,0115	0,006	1,92	11,5
H49	0,006	0,003	2,00	6
H50	0,016	0,009	1,78	16
H51	0,0355	0,0205	1,73	35,5
H52	0,036	0,0195	1,85	36

Çizelge 3.2 Hasta ve kontrol grubu DNA konsantrasyonları ve saflık değerleri (devam)

Örnek Adı	A₂₆₀	A₂₈₀	A₂₆₀/A₂₈₀	DNA Konsantrasyonu (ng/μl)
H53	0,024	0,0125	1,92	24
H54	0,018	0,0095	1,89	18
H55	0,0105	0,006	1,75	10,5
H56	0,0205	0,012	1,71	20,5
H57	0,028	0,016	1,75	28
H58	0,0275	0,016	1,72	27,5
H59	0,009	0,0045	2,00	9
H60	0,0235	0,0125	1,88	23,5
H61	0,0195	0,0105	1,86	19,5
H62	0,016	0,008	2,00	16
H63	0,01	0,0055	1,82	10
H64	0,016	0,0094	1,70	16
H65	0,017	0,01	1,70	17
H66	0,025	0,0135	1,85	25
H67	0,0235	0,0125	1,88	23,5
H68	0,033	0,018	1,83	33
H69	0,014	0,0075	1,87	14
H70	0,008	0,0045	1,78	8
H71	0,025	0,014	1,79	25
H72	0,0335	0,0175	1,91	33,5
H73	0,0095	0,0055	1,73	9,5
H74	0,014	0,008	1,75	14
H75	0,0115	0,006	1,92	11,5
H76	0,024	0,014	1,71	24
H77	0,0145	0,0075	1,93	14,5
H78	0,058	0,0305	1,90	58
H79	0,0235	0,013	1,81	23,5
H80	0,039	0,0215	1,81	39
H81	0,0895	0,0475	1,88	89,5

Çizelge 3.2 Hasta ve kontrol grubu DNA konsantrasyonları ve saflık değerleri (devam)

Örnek Adı	A₂₆₀	A₂₈₀	A₂₆₀/A₂₈₀	DNA Konsantrasyonu (ng/μl)
H82	0,0155	0,0085	1,82	15,5
H83	0,008	0,0045	1,78	8
H84	0,029	0,0145	2,00	29
H85	0,0365	0,0185	1,97	36,5
H86	0,043	0,022	1,95	43
H87	0,039	0,021	1,86	39
H88	0,0055	0,003	1,83	5,5
H89	0,023	0,0135	1,70	23
H90	0,0645	0,0345	1,87	64,5
H91	0,032	0,0165	1,94	32
H92	0,0035	0,0018	1,94	3,5
H93	0,0045	0,0015	3,00	4,5
H94	0,0105	0,006	1,75	10,5
H95	0,018	0,01	1,80	18
H96	0,01	0,005	2,00	10

3.3 Araştırılacak SNP Bölgelerinin Tayini ve Genom Üzerindeki Konumları

Bu tez çalışmasında araştırılan SNP bölgeleri, literatür araştırmaları sonucunda BPD hastalığı ile farklı toplumlarda ilişkisi olduğu çeşitli araştırma makalelerinde, genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında yayınlanmış SNP bölgeleri arasından ve NCBI SNP veri tabanı kullanılarak seçilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Analiz edilen SNP bölgelerinin, rs numaraları, genomdaki pozisyonları ve allel bilgileri

SNP no	rs numarası	Fiziksel Pozisyonu	Kromozom Lokasyonu	Genin Sembolü	Alleller	Kaynak
SNP1	rs1001179	34,438,684	11p13	CAT	C/T	[72]
SNP2	rs10162694	35,054,340	15p7	ZNF770	A/C	[134]
SNP3	rs1049269	72,060,243	10q22.1	SPOCK2	G/A	[65]
SNP4	rs1049982	34,438,994	11p13	CAT	T/C	[72]
SNP5	rs11003125	52,772,254	10q21.1	MBL2	C/G	[79]
SNP6	rs11226613	105,101,791	11q22.3	CARD17	A/T	[134]
SNP7	rs1126214	31,059,582	18q12.1	DSC3	C/T	[134]
SNP8	rs1245560	72,077,662	10q22.1	SPOCK2	C/A	[65]
SNP9	rs12701220	983,092	7p22.3	CYP2W1	C/T	[134]
SNP10	rs1440306	116,954,105	4q26	NDST4	G/T	[134]
SNP11	rs1474256	79,171,505	15q25.1	RASGRF1	C/T	[134]
SNP12	rs1541364	137,567,007	5q31.2	SPOCK1	A/G	[134]
SNP13	rs17551536	12,112,224	2p24.3	MIR3681	A/G	[134]
SNP14	rs17880135	31,669,690	21q22.11	SOD1	G/T	[72]
SNP15	rs1912816	113,861,151	8q23.3	CSMD3	G/A	[134]
SNP16	rs1966265	177,089,630	5q35.2	FGFR4	G/A	[135]
SNP17	rs204732	31,720,530	21q22.11	SOD1	G/A	[72]
SNP18	rs2233406	35,405,593	14q13.2	NFKBIA	A/G	[136]
SNP19	rs2233409	35,405,064	14q13.2	NFKBIA	A/G	[137]
SNP20	rs2278034	195,870,036	3q29	TNK2	C/T	[134]
SNP21	rs2536512	24,799,693	4p15.2	SOD3	A/G	[72]
SNP22	rs2664349	88,077,054	8q21.3	MMP16	A/G	[78]

Çizelge 3.3 Analiz edilen SNP bölgelerinin, rs numaraları, genomdaki pozisyonları ve allel bilgileri (devam)

SNP no	RS numarası	Fiziksel Pozisyonu	Kromozom Lokasyonu	Genin Sembolü	Alleller	Kaynak
SNP23	rs2664352	88,081,070	8q21.3	<i>MMP16</i>	C/T	[78]
SNP24	rs3138053	35,405,648	14q13.2	<i>NFKBIA</i>	C/T	[137]
SNP25	rs349423	41,831,453	1p34.2	<i>HIVEP3</i>	C/T	[134]
SNP26	rs3771150	102,444,391	2q12.1	<i>IL-18RAP</i>	A/G	[68]
SNP27	rs3771171	102,369,490	2q12.1	<i>IL-18R1</i>	C/T	[68]
SNP28	rs4634985	20,145,851	10p12.31	<i>PLXDC2</i>	T/C	[134]
SNP29	rs4883955	73,859,670	13q22.1	<i>KLF12</i>	G/T	[134]
SNP30	rs55716084	243,127,340	1q43	<i>CEP170</i>	A/G	[134]
SNP31	rs5746136	159,682,052	6q25.3	<i>SOD2</i>	C/T	[72]
SNP32	rs62468577	78523355	7q21.11	<i>MAGI2</i>	T/C	[134]
SNP33	rs650950	35517721	11p13	<i>PAMR1</i>	C/T	[134]
SNP34	rs6988306	101,583,982	8q22.3	<i>GRHL2</i>	C/T	[134]
SNP35	rs699947	43,768,652	6p21.1	<i>VEGFA</i>	A/C	[70]
SNP36	rs7096206	52,771,925	10q21.1	<i>MBL2</i>	C/G	[80]
SNP37	rs71627250	63,088,872	5q12.3	<i>HTR1A</i>	C/T	[134]
SNP38	rs72791417	65,983,896	10q21.3	<i>CTNNA3</i>	A/T	[134]
SNP39	rs755622	23,894,205	22q11.23	<i>MIF</i>	C/G	[76]
SNP40	rs769217	34,461,361	11p13	<i>CAT</i>	C/T	[72]
SNP41	rs78975256	120,880,342	5q23.1	<i>PRR16</i>	C/T	[134]
SNP42	rs8192287	24,794,946	4p15.2	<i>SOD3</i>	G/T	[72]
SNP43	rs833061	43,769,749	6p21.1	<i>VEGFA</i>	C/T	[70]
SNP44	rs9877396	61,141,532	3p14.2	<i>FHIT</i>	C/T	[134]
SNP45	rs9953270	27,107,407	18q11.2	<i>CHST9</i>	C/T	[134]

Bronkopulmoner displazi ile ilişkili SNP'lerin araştırılması ilgili literatürde pek çok araştırma ve bir GWAS bulunmaktadır. Literatür taramaları sonucu, bu tez çalışmasında araştırılmak üzere seçilen 45 SNP bölgesinin, genomdaki konumları ve allel bilgileri Çizelge 3.4'te verilmiştir. Seçilen bu 45 polimorfizm bölgesinin genom üzerindeki pozisyonu, NCBI SNP veri tabanı kullanılarak doğrulanmıştır. Bölüm 2.3.2.2'de açıklanan

yönteme göre tasarlanan ve polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan ileri (forward) primerler, geri (reverse) primerler ve tek baz uzama problemlerinin genom üzerindeki pozisyonları manuel olarak belirlenerek tasarlanan primer ve uzama problemlerinin diziler üzerindeki konumları doğrulanmıştır. Örnek olarak, SNP29 (rs4883955) polimorfizmine spesifik olarak tasarlanan primerler ve uzama probu dizileri, genom üzerinde bu SNP'nin bulunduğu lokasyon merkezde olmak üzere yaklaşık 100 bç'lik bölgeler gösterilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 rs1049269 numaralı (SNP3) polimorfizmin bulunduğu DNA dizisi. Tasarlanmış olan forward primer kırmızı, reverse primer yeşil ve uzama probu dizisi mavi ile gösterilmiştir.

SNP3 (rs1049269) polimorfizmini içeren DNA dizisi	Uzunluk
5'TCCACAG GGAGCTGCTGTTTTGTCTAC CTTTGAGGGGACC AGTCTCAGT[A/G]GGGCGAAAGGCAGTGTGGGG GCTTCGGA AACAGGCAAGGCTGGACCCCTG3'	50 bç [A/G] 50bç

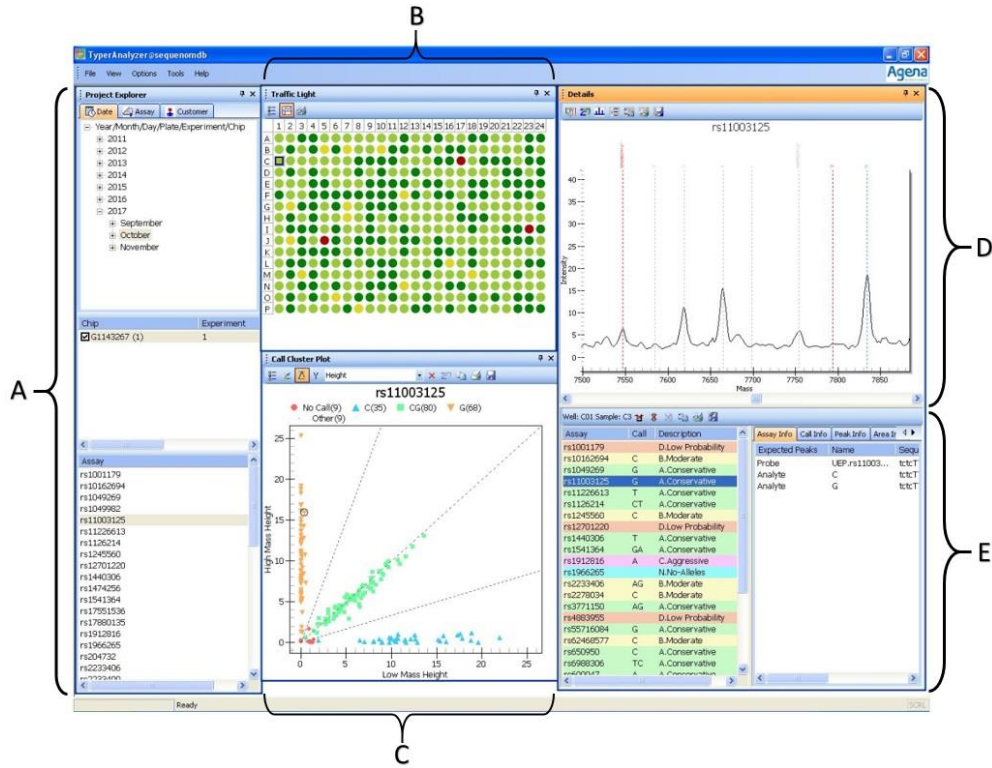
Multiplex PCR'da kullanılmak üzere tasarlanmış amplifikasyon primerlerinin 5' uçlarına 10-mer etiketinin (5'-ACGTTGGATG-3') eklenmesi gerektiği daha önce Bölüm 2.2.3.2'de açıklanmıştır. Bununla birlikte, kütle spektroskopisi ile gerçekleştirilen analizlerde, spektrumda herhangi bir karışıklık olmasını engellemek amacıyla, uzama problemlerinin kütleleri amplifikasyonda kullanılan primerlerin kütlelerinden farklı olacak şekilde tasarlanmıştır. Bunun için, Çizelge 3.4'te kırmızı ile işaretlenmiş olan forward primerinin 5' ucuna bir 10-mer etiketi (ACGTTGGATG) eklenmiş ve primer dizisi 5' ACGTTGGATG**GGAGCTGCTGTTTTGTCTAC** 3' olarak tasarlanmıştır. Benzer şekilde reverse primeri tasarlanırken de 5' ucuna bir 10-mer etiketi (ACGTTGGATG) eklenmiş ve yeşil ile gösterilen dizinin komplementeri olacak şekilde tasarlanarak, 5' ACGTTGGATG**GCTTCGCTGTTCCGAAGC** 3' primeri elde edilmiştir. Son olarak, Çizelge 3.4'te mavi renk ile gösterilen uzama probu tasarlanırken, probun 3' ucu polimorfizm bölgesinin hemen yanında olacak şekilde tasarlanmıştır.

3.4 Genotipleme Sonuçları

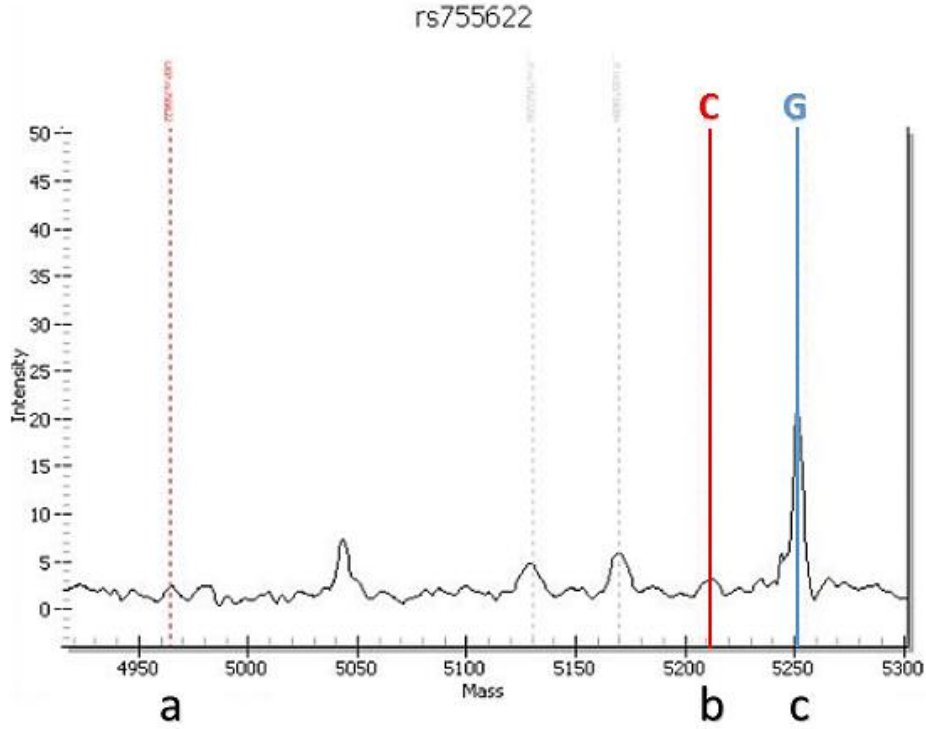
Elde edilen PCR ürünü, Bölüm 2.2.3.7'de anlatılan yönteme göre nanodispenser cihazı kullanılarak 384-element SpectroCHIP® II üzerine aktarılmış ve genotipleme analizi için

MALDI-TOF MS cihazının kendi yazılımı olan MassARRAY TYPER 4.0 kullanılmıştır. Şekil 3.5’de 384 örneğin çalışılmış olduğu bir sette rs1103125 polimorfizmi için elde edilen genotipleme sonucu gösterilmektedir.

Şekil 3.5’de “A” ile gösterilen araç (Project Explorer) ile elde edilen genotipleme sonuçlarının incelenmesi ve belirlenmiş olan assay ile doğru çipin seçilme işlemi gerçekleştirilebilmektedir. “B” ile gösterilen araç (Traffic Lights) ise analiz sonucunda plakalardan 384-element çipe aktarılan örneklerin sonuçlarının başarı yüzdesini değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır. Traffic Lights aracında belirtilen noktaların her biri 384-element çipteki kuyucuklara düşen DNA örneklerini temsil etmektedir. Elde edilen verilerin kalitesi, iyiden kötüye doğru sırasıyla yeşil, sarı ve kırmızı renkleri ile gösterilmiştir. “C” ile belirtilmiş olan araçta ise (Cluster Plot), düşük, yüksek ve orta düzeyde kütleli allellerin dağılımları noktalar ile gösterilmektedir. Analite ait olan sinyalleri içeren veriler, genotip ve kütle dağılımını açıklayan spektrumlar da “D” ile gösterilen araçta (Spectrum) belirtilmiştir. Son olarak “E” ile gösterilen araç ise SNP’lere ait genotip verilerinin detaylarını içermektedir.



Şekil 3.5 rs1103125 polimorfizmi için genotipleme sonucu örneği. A: Project Explorer, B: Traffic Lights, C: Cluster plot, D: Spektrum, E: Genotipleme sonucu.



Şekil 3.6 rs755622 için spektrum örneği. a: Bağlanmamış uzama primeri (UEP), b: C allelini belirten pik, c: G allelini belirten pik.

Şekil 3.6’da rs755622 numaralı polimorfizme ait örnek bir spektrum görüntüsü verilmiştir. Bu polimorfizm için tasarlanmış olan uzama primerinin 4964,3 Da ağırlığında olduğu bilinmektedir. iPLEX reaksiyonu sonrasında diziye eklenecek olan allellerin C veya G olacağı bilgisi, assay tasarımı yapılırken belirlenmiştir. C veya G allellerinin eklenmesi ile birlikte sırasıyla 5210,8 veya 5250,5 Da ağırlığında dizilerin elde edileceği de tasarım esnasında belirlenmiştir. Böylelikle, Şekil 3.3’te gösterilmiş olan a, b ve c çizgileri, bu polimorfizm için analiz edilmesi gereken değerler olarak belirlenmiştir. “a” piki, 4964,3 Da ağırlığındaki bağlanmamış uzama primerini (UEP: Unexpended Primers) göstermektedir. “b” piki ise C allelinin eklenmesinden sonra oluşacak 5210,8 Da ağırlığındaki diziye göstermektedir. Kırmızı ile işaretlenmiş olan “b” çizgisinde herhangi bir pik oluşumu gözlenmediğinden C allelinin var olmadığı anlaşılmaktadır. Son olarak mavi ile işaretlenmiş olan “c” pikinde ise G allelinin diziye eklenmesi sonucu oluşacak 5250,5 Da ağırlığındaki dizi için bir pik görülmektedir ve bu örnek için rs755622 polimorfizminin G alleli genotipini taşıdığını göstermektedir. Spektrumda görülen diğer düşük yoğunluktaki pikler ise diğer SNP’lere ait bağlanmamış uzama primerlerinin ve allellerinin oluşturduğu sinyallerdir.

3.5 İstatistiksel Analizler

3.5.1 Hardy-Weinberg Dengesi Testi Sonuçları

Bu tez çalışmasında da olduğu gibi, genetik ilişkilendirme çalışmalarında belirli bir fenotipik karakterin ilişkilendirme çalışmaları yapılmadan önce çalışmaya alınan populasyonun Hardy-Weinberg Dengesi test edilmelidir. Çünkü geniş ve rastgele eşleşen populasyonların genotip frekansları ile allel frekanslarının belirli bir denge içerisinde olması gerekmektedir [125]. Bu sebeple, çalışmamıza dahil edilen hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerin sayılarının Hardy-Weinberg dengesi test edilmiştir ve allel frekansları hesaplanmıştır. Çalışma grubundaki her SNP için gerçekleştirilen Hardy-Weinberg dengesi testlerinin değerlendirilmesinde ki-kare testi uygulanmıştır. Bu tez çalışmasında araştırılan 45 SNP için yapılan Hardy-Weinberg dengesi testleri sonuçları Çizelge 3.5'te gösterilmiştir. Çizelge üzerinde koyu renk ile işaretlenen 7 SNP'deki hasta veya kontrol grubunda gözlenen değerler ile beklenen değerlerin birbirine uygun olmadığı, yani Hardy-Weinberg dengesinde olmadığı görülmüştür (rs1049269, rs1966265, rs3771171, rs650950, rs72791417, rs769217, rs8192287) ($p < 0,05$). Kalan 38 SNP için ise hem hasta hem de kontrol grupları için gözlenen değerler ile beklenen değerlerin birbirine uygun olduğu ve Hardy-Weinberg dengesinde oldukları tespit edilmiştir ($p > 0,05$). Sonuç olarak bu aşamadan sonra gerçekleştirilecek istatistiksel analizlerde Hardy-Weinberg dengesine uymayan polimorfizmlerde populasyonun dengeli bir dağılım göstermediği anlaşıldığı için ileri analizler gerçekleştirilmemiştir.

Çizelge 3.5 Hardy-Weinberg testi sonuçları

SNP	rs Numarası	Genotip	Gözlenen (%)	Beklenen	Ki kare	p-değeri
SNP1	rs1001179	CC	55 (%79,71)	54,8	0,053	0,818
		CT	13 (%18,84)	13,4		
		TT	1 (%1,44)	0,8		
SNP2	rs10162694	CC	170 (%100)	170	1	1
		CX	0	0		
		XX	0	0		
SNP3	rs1049269	GG	68 (%36,36)	59	7,213	0,007
		GA	74 (%39,57)	92,1		
		AA	45 (%24,06)	36		
SNP4	rs1049982	TT	47 (%28,48)	46,9	0,0004	0,983
		TC	82 (%49,69)	82,1		
		CC	36 (%21,81)	35,9		
SNP5	rs11003125	GG	69 (%37,70)	64,3	2,046	0,152
		GC	79 (%43,16)	88,3		
		CC	35 (%19,12)	30,3		
SNP6	rs11226613	TT	104 (%56,52)	100,5	1,768	0,183
		TA	64 (%34,78)	71		
		AA	16 (%8,70)	12,5		
SNP7	rs1126214	CC	75 (%42,13)	72,4	0,726	0,393
		CT	77 (%43,26)	82,3		
		TT	26 (%14,61)	23,4		
SNP8	rs1245560	CC	51 (%29,48)	45,8	2,518	0,112
		CA	76 (%43,93)	86,4		
		AA	46 (%26,59)	40,8		
SNP9	rs12701220	TT	100 (%89,29)	99,4	1,158	0,281
		TC	11 (%9,82)	12,2		
		CC	1 (%0,89)	0,4		
SNP10	rs1440306	TT	80 (%45,98)	81,4	0,253	0,627
		TG	78 (%44,83)	75,2		
		GG	16 (%9,20)	17,4		
SNP11	rs1474256	CC	74 (%40,44)	75,4	0,215	0,642
		CT	87 (%47,54)	84,1		
		TT	22 (%12,02)	23,4		
SNP12	rs1541364	GG	56 (%30,43)	58,2	0,441	0,506
		GA	95 (%51,63)	90,6		
		AA	33 (17,93)	35,2		
SNP13	rs17551536	AA	125 (%65,79)	128,1	2,319	0,127
		AG	62 (%32,63)	55,8		
		GG	3 (%1,58)	6,1		
SNP14	rs17880135	TT	171 (%92,93)	171,2	0,246	0,619
		TG	13 (%7,07)	12,5		
		GG	0 (%)	0,2		
SNP15	rs1912816	AA	69	64,7	2,558	0,109
		AG	57	65,7		
		GG	21	16,7		

Çizelge 3.5 Hardy-Weinberg testi sonuçları (devam)

SNP	rs Numarası	Genotip	Gözlenen (%)	Beklenen	Ki kare	p-değeri
SNP16	rs1966265	GG	64 (%71,11)	60,8	5,178	0,022
		GA	20 (%22,22)	26,3		
		AA	6 (%6,67)	2,8		
SNP17	rs204732	GG	140 (%76,50)	139,0	0,420	0,516
		GA	39 (%21,31)	41,0		
		AA	4 (%2,19)	3,0		
SNP18	rs2233406	AA	82 (%47,13)	82,1	0,0006	0,980
		AG	75 (%43,10)	74,9		
		GG	17 (%9,77)	17,1		
SNP19	rs2233409	AA	103 (%55,38)	105,4	0,876	0,349
		AG	74 (%39,78)	69,2		
		GG	9 (%4,84)	11,4		
SNP20	rs2278034	TT	62 (%35,63)	56,3	3,074	0,079
		TC	74 (%42,53)	85,3		
		CC	38 (%21,84)	32,3		
SNP21	rs2536512	AA	109 (%75,69)	110,3	0,907	0,340
		AG	34 (%23,61)	31,5		
		GG	1 (%0,69)	2,3		
SNP22	rs2664349	GG	87 (%45,79)	88,3	0,178	0,672
		GA	85 (%44,74)	82,5		
		AA	18 (%9,47)	19,3		
SNP23	rs2664352	TT	56 (%29,63)	55,0	0,077	0,780
		TC	92 (%48,68)	93,9		
		CC	41 (%21,69)	40,0		
SNP24	rs3138053	CC	85 (%46,45)	83,3	0,310	0,577
		CT	77 (%42,08)	80,3		
		TT	21 (%11,48)	19,3		
SNP25	rs349423	CC	184 (%98,40)	184,0	0,012	0,911
		CX	3 (%1,60)	3,0		
		XX	0 (%0)	0,0		
SNP26	rs3771150	AA	95 (&52,49)	99,2	2,642	0,104
		AG	78 (%43,09)	69,6		
		GG	8 (%4,42)	12,2		
SNP27	rs3771171	CC	84 (%43,98)	99,0	28,915	<0,0001
		CT	107 (%56,02)	77,0		
		TT	0 (%0)	15,0		
SNP28	rs4634985	TT	54 (%39,42)	57,8	2,053	0,151
		TC	70 (%51,09)	62,4		
		CC	13 (%9,49)	16,8		
SNP29	rs4883955	GG	86 (49,03)	84,1	0,441	0,506
		GT	70 (%40,23)	73,7		
		TT	18 (%10,34)	16,1		
SNP30	rs55716084	GG	179 (96,76)	179,0	0,050	0,822
		GA	6 (%3,24)	5,9		
		AA	0 (%0)	0,0		

Çizelge 3.5 Hardy-Weinberg testi sonuçları (devam)

SNP	rs Numarası	Genotip	Gözlenen (%)	Beklenen	Ki kare	p-değeri
SNP31	rs5746136	CC	79 (%41,80)	76,8	0,468	0,493
		CT	83 (%43,92)	87,3		
		TT	27 (%14,29)	24,8		
SNP32	rs62468577	CC	110 (%68,75)	110,6	0,098	0,753
		CT	46 (%28,75)	44,9		
		TT	4 (%2,50)	4,6		
SNP33	rs650950	TT	72 (%39,13)	65,2	4,373	0,036
		TC	75 (%40,76)	88,7		
		CC	37 (%20,11)	30,2		
SNP34	rs6988306	CC	132 (%70,97)	129,2	2,237	0,134
		CT	46 (%24,73)	51,7		
		TT	8 (%4,30)	5,2		
SNP35	rs699947	AA	50 (%28,25)	51,0	0,089	0,765
		AC	90 (%50,85)	88,0		
		CC	37 (%20,90)	38,0		
SNP36	rs7096206	CC	119 (%65,38)	119,5	0,067	0,794
		CG	57 (%31,32)	55,9		
		GG	6 (%3,30)	6,5		
SNP37	rs71627250	CC	179 (%95,72)	179,1	0,089	0,765
		CT	8 (%4,28)	7,8		
		TT	0 (%0)	0,1		
SNP38	rs72791417	AA	136 (%76,84)	131,4	8,437	0,003
		AT	33 (%18,64)	42,2		
		TT	8 (%4,52)	3,4		
SNP39	rs755622	GG	187 (%100)	187,0	1	1
		GX	0 (%0)	0,0		
		XX	0 (%0)	0,0		
SNP40	rs769217	CC	90 (%48,39)	84,0	3,977	0,046
		CT	70 (%37,63)	82,0		
		TT	26 (%13,98)	20,0		
SNP41	rs78975256	TT	179 (%100)	179,0	1	1
		TX	0 (%0)	0,0		
		XX	0 (%0)	0,0		
SNP42	rs8192287	GG	154 (%84,15)	149,7	13,675	0,0002
		GT	23 (%12,57)	31,7		
		TT	6 (%3,28)	1,7		
SNP43	rs833061	CC	46 (%27,71)	44,0	0,371	0,542
		CT	79 (%47,59)	82,9		
		TT	41 (%24,70)	39,0		
SNP44	rs9877396	TT	73 (%53,28)	75,9	1,745	0,186
		TC	58 (%42,34)	52,1		
		CC	6 (%24,70)	8,9		
SNP45	rs9953270	CC	66 (%35,87)	68,8	0,746	0,387
		CT	93 (%50,54)	87,4		
		TT	25 (%13,59)	27,8		

3.5.2 Araştırılan SNP'lerin BPD ile İlişkilendirilmesi

3.5.2.1 SNP'lerin Genotip Düzeyinde BPD ile İlişkilendirilmesi

Bu çalışmada BPD ile ilişkisi araştırılan 45 polimorfizm bölgesine ait genotipleme sonuçları başarıyla elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre OR (odds ratio) testi kontrol grubunda yaygın olarak görülen genotipin referans alınması ile gerçekleştirilmiştir. Hesaplanan OR değerleri ve güven aralıkları dominant model ve homozigot karşılaştırma modeli temel alınarak elde edilmiştir. Tüm hesaplamalarda kontrol grubunda yaygın olarak görünen homozigot genotip referans alınarak OR testi gerçekleştirilmiştir. $OR > 1$ ve $p \leq 0,05$ koşullarını sağlayan genotipler, BPD hastalığı ile ilişkili olarak kabul edilmiştir. Tüm sonuçlar Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Yapılan analizler sonucunda elde edilmiş olan genotipleme verileri incelendiği zaman rs4883955 polimorfizminin (SNP29) TT genotipinin, bu çalışmaya katılan hasta bireylerde kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde daha yaygın görülmekte olduğu saptanmıştır [OR=5,487 (1,48-20,33), $p=0,01$].

Son olarak genotip düzeyinde BPD ile bir ilişkisi olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulunan SNP rs9953270 (SNP45) polimorfizmi olmuştur. CC genotipinin hasta bireylerde kontrollere göre anlamlı şekilde yaygın görüldüğü not edilmiştir [OR=2,711 (1,02-7,15), $p=0,04$].

Çizelge 3.6 Araştırılan SNP'lerin BPD ile genotip düzeyinde ilişkilendirilmesi

	SNP ID	Birey Sayısı	Geno tip	Hasta	Kontrol	OR (%95 GA)	p değeri
SNP1	rs1001179	Hasta: 37 Kontrol: 32	CC	29 (0,783)	26 (0,812)	Referans	
			CT	7 (0,189)	6 (0,187)	1,045 (0,29-3,38)	0,993
			TT	1 (0,027)	0 (0)	Inf (0-Inf)	1
			CT+TT	8 (0,216)	6 (0,187)	1,195 (0,35-3,76)	0,818
SNP2	rs10162694	Hasta: 87 Kontrol: 83	CC	87 (1)	83 (1)	Referans	
			CA	0 (0)	0 (0)	0 (0-Inf)	1
			AA	0 (0)	0 (0)	0 (0-Inf)	1
			CA+AA	0 (0)	0 (0)	0 (0-Inf)	1
SNP4	rs1049982	Hasta: 88 Kontrol: 77	CC	26 (0,295)	21 (0,272)	Referans	
			TC	43 (0,488)	39 (0,506)	0,890 (0,43-1,82)	0,752
			TT	19 (0,215)	17 (0,220)	0,902 (0,37-2,15)	0,817
			TC+TT	62 (0,704)	56 (0,727)	0,894 (0,45-1,76)	0,747
SNP5	rs11003125	Hasta: 92 Kontrol: 91	GG	31 (0,336)	38 (0,417)	Referans	
			CG	41 (0,445)	38 (0,417)	1,322 (0,69-2,52)	0,397
			CC	20 (0,217)	15 (0,164)	1,634 (0,71-2,57)	0,24
			CG+CC	61 (0,663)	53 (0,582)	1,410 (0,77-2,57)	0,26
SNP6	rs11226613	Hasta: 94 Kontrol: 90	TT	56 (0,595)	48 (0,533)	Referans	
			AT	32 (0,340)	32 (0,355)	0,857 (0,45-1,59)	0,628
			AA	6 (0,063)	10 (0,111)	0,514 (0,17-1,51)	0,228
			AT+AA	38 (0,404)	42 (0,466)	0,775 (0,43-1,39)	0,394
SNP7	rs1126214	Hasta: 89 Kontrol: 89	TT	41 (0,460)	34 (0,382)	Referans	
			CT	35 (0,393)	42 (0,471)	0,691 (0,36-1,30)	0,256
			CC	13 (0,146)	13 (0,146)	0,829 (0,33-2,02)	0,681
			CT+CC	48 (0,539)	55 (0,617)	0,723 (0,39-1,31)	0,28
SNP8	rs1245560	Hasta: 86 Kontrol: 87	AA	32 (0,372)	19 (0,218)	Referans	
			CA	32 (0,372)	44 (0,505)	0,431 (0,20-0,89)	0,023
			CC	22 (0,255)	24 (0,275)	0,544 (0,24-1,22)	0,14
			CA+CC	54 (0,627)	68 (0,781)	0,471 (0,24-0,92)	0,028
SNP9	rs12701220	Hasta: 55 Kontrol: 57	TT	51 (0,927)	49 (0,859)	Referans	
			CT	4 (0,072)	7 (0,122)	0,549 (0,15-1,99)	0,362
			CC	0 (0)	1 (0,017)	0 (0-38,2)	0,5
			CT+CC	4 (0,072)	8 (0,140)	0,480 (0,13-1,69)	0,255
SNP10	rs1440306	Hasta: 85 Kontrol: 89	TT	36 (0,423)	44 (0,494)	Referans	
			GT	44 (0,517)	34 (0,382)	1,581 (0,84-2,96)	0,152
			GG	5 (0,058)	11 (0,123)	0,555(0,17-1,74)	0,314
			GT+GG	49 (0,576)	45 (0,505)	1,330 (0,73-2,42)	0,349
SNP11	rs1474256	Hasta: 93 Kontrol: 90	CC	40 (0,430)	34 (0,377)	Referans	
			TC	44 (0,473)	43 (0,477)	0,869 (0,46-1,61)	0,659
			TT	9 (0,096)	13 (0,144)	0,588 (0,22-1,54)	0,281
			TC+TT	53 (0,569)	56 (0,622)	0,804 (0,44-1,45)	0,471
SNP12	rs1541364	Hasta: 94 Kontrol: 90	AA	27 (0,287)	29 (0,322)	Referans	
			GA	50 (0,531)	45 (0,5)	1,193 (0,61-2,31)	0,6
			GG	17 (0,180)	16 (0,177)	1,141 (0,48-2,69)	0,763
			GA+GG	67 (0,712)	61 (0,677)	1,179 (0,62-2,71)	0,606
SNP13	rs17551536	Hasta: 96 Kontrol: 94	AA	66 (0,687)	59 (0,627)	Referans	
			AG	29 (0,302)	33 (0,351)	0,785 (0,42-1,44)	0,438
			GG	1 (0,010)	2 (0,021)	0,446 (0,03-5,05)	0,513
			AG+GG	30 (0,312)	35 (0,372)	0,766 (0,42-1,39)	0,385
SNP14	rs17880135	Hasta: 92 Kontrol: 92	TT	85 (0,923)	86 (0,934)	Referans	
			GT	7 (0,076)	6 (0,065)	1,180 (0,38-3,65)	0,77
			GG	0 (0)	0 (0)	0 (0-Inf)	1
			GT+GG	7 (0,076)	6 (0,065)	1,180 (0,38-3,65)	0,77
SNP15	rs1912816	Hasta: 82 Kontrol: 65	AA	39 (0,475)	30 (0,461)	Referans	
			GA	31 (0,378)	26 (0,400)	0,917 (0,45-1,85)	0,81
			GG	12 (0,146)	9 (0,138)	1,025(0,38-2,75)	0,959
			GA+GG	43 (0,524)	35 (0,538)	0,945 (0,49-1,81)	0,86

Çizelge 3.6 Araştırılan SNP'lerin BPD ile genotip düzeyinde ilişkilendirilmesi (devam)

SNP17	rs204732	Hasta: 91 Kontrol: 92	GG GA AA GA+AA	69(0,758) 20 (0,219) 2 (0,021) 22 (0,241)	71 (0,771) 19 (0,206) 2 (0,021) 21 (0,228)	Referans 1,083 (0,53-2,20) 1,028 (0,14-7,51) 1,077 (0,54-2,13)	0,825 0,977 0,829
SNP18	rs2233406	Hasta: 88 Kontrol: 86	GG AG AA AG+AA	40 (0,454) 36 (0,409) 12 (0,136) 48 (0,545)	42 (0,488) 39 (0,453) 5 (0,058) 44 (0,511)	Referans 0,969 (0,53-1,85) 2,52 (0,83-7,97) 1,145 (0,64-2,12)	0,98 0,09 0,59
SNP19	rs2233409	Hasta: 93 Kontrol: 93	GG AG AA AG+AA	50 (0,537) 38 (0,408) 5 (0,053) 43 (0,462)	53 (0,569) 36 (0,387) 4 (0,043) 40 (0,430)	Referans 1,118 (0,61-2,03) 1,325 (0,33-5,21) 1,139 (0,63-2,03)	0,71 0,68 0,65
SNP20	rs2278034	Hasta: 106 Kontrol: 68	TT CT CC CT+CC	31 (0,292) 44 (0,415) 31 (0,292) 75 (0,707)	31 (0,455) 30 (0,441) 7 (0,102) 37 (0,544)	Referans 1,466 (0,74-2,89) 4,428 (0,49-2,02) 2,027 (0,67-2,24)	0,27 1 0,5
SNP21	rs2536512	Hasta: 72 Kontrol: 72	AA GA GG GA+GG	57 (0,791) 15 (0,208) 0 (0) 15 (0,208)	52 (0,722) 19 (0,263) 1 (0,013) 20 (0,277)	Referans 0,720 (0,33-1,56) 0 (0,01-7,63) 0,684 (0,31-1,47)	0,4 0,46 0,33
SNP22	rs2664349	Hasta: 96 Kontrol: 94	AA GA GG GA+GG	49 (0,510) 39 (0,406) 8 (0,083) 47 (0,489)	38 (0,404) 46 (0,489) 10 (0,106) 56 (0,595)	Referans 0,657 (0,36-1,99) 0,620 (0,22-1,72) 0,650 (0,36-1,15)	0,17 0,35 0,14
SNP23	rs2664352	Hasta: 96 Kontrol: 93	TT TC CC TC+CC	27 (0,281) 47 (0,489) 22 (0,229) 69 (0,718)	29 (0,311) 45 (0,483) 19 (0,204) 64 (0,688)	Referans 1,121 (0,55-2,18) 1,243 (0,55-2,78) 1,157 (0,61-2,16)	0,73 0,59 0,64
SNP24	rs3138053	Hasta: 92 Kontrol: 91	TT CT CC CT+CC	41 (0,445) 37 (0,402) 14 (0,152) 51 (0,554)	44 (0,483) 40 (0,439) 7 (0,076) 47 (0,516)	Referans 0,992 (0,53-1,84) 2,146 (0,78-5,84) 1,164 (0,65-2,08)	0,98 0,13 0,6
SNP25	rs349423	Hasta: 96 Kontrol: 91	CC CT TT CT+TT	93 (0,968) 3 (0,031) 0 (0) 3 (0,031)	91 (1) 0 (0) 0 (0) 0 (0)	Referans 0 (0-2,4) 0 (0-Inf) 0 (0-2,4)	0,2 1 0,2
SNP26	rs3771150	Hasta: 90 Kontrol: 91	GG AG AA AG+AA	46 (0,511) 39 (0,433) 5 (0,055) 44 (0,488)	49 (0,538) 39 (0,428) 3 (0,032) 42 (0,461)	Referans 1,065 (0,58-1,93) 1,775 (0,40-7,85) 1,115 (0,62-2,00)	0,83 0,44 0,71
SNP28	rs4634985	Hasta: 65 Kontrol: 72	CC TC TT TC+TT	29 (0,446) 30 (0,461) 6 (0,092) 36 (0,553)	25 (0,347) 40 (0,555) 7 (0,097) 47 (0,652)	Referans 0,646 (0,31-1,32) 0,738 (0,21-2,48) 0,660 (0,33-1,31)	0,23 0,62 0,23
SNP29	rs4883955	Hasta: 87 Kontrol: 87	GG GT TT GT+TT	41 (0,471) 31 (0,356) 15 (0,172) 46 (0,528)	45 (0,517) 39 (0,448) 3 (0,034) 42 (0,482)	Referans 0,872 (0,46-1,64) 5,487 (1,48-20,33) 1,202 (0,66-2,17)	0,67 0,01 0,54
SNP30	rs55716084	Hasta: 94 Kontrol: 91	GG GA AA GA+AA	89 (0,946) 5 (0,053) 0 (0) 5 (0,053)	90 (0,989) 1 (0,010) 0 (0) 1 (0,010)	Referans 5,056 (0,57-44,14) 0 (0-Inf) 5,056 (0,57-44,14)	0,14 0,99 0,14
SNP31	rs5746136	Hasta: 96 Kontrol: 93	CC CT TT CT+TT	45 (0,468) 34 (0,354) 17 (0,177) 51 (0,531)	34 (0,365) 49 (0,526) 10 (0,107) 59 (0,634)	Referans 0,524 (0,28-0,97) 1,284 (0,52-3,15) 0,653 (0,36-1,16)	0,04 0,58 0,15
SNP32	rs62468577	Hasta: 84 Kontrol: 76	CC TC TT TC+TT	54 (0,642) 26 (0,309) 4 (0,047) 30 (0,357)	56 (0,736) 20 (0,263) 0 (0) 20 (0,263)	Referans 1,348 (0,67-2,69) 9,33 (0,49-177,44) 1,555 (0,78-3,06)	0,39 0,13 0,2

Çizelge 3.6 Araştırılan SNP'lerin BPD ile genotip düzeyinde ilişkilendirilmesi (devam)

SNP34	rs6988306	Hasta: 94 Kontrol: 92	CC TC TT TC+TT	70 (0,744) 20 (0,212) 4 (0,042) 24 (0,255)	62 (0,673) 26 (0,282) 4 (0,043) 30 (0,326)	Referans 0,681 (0,34-1,33) 0,885 (0,21-3,69) 0,708 (0,37-1,33)	0,26 0,86 0,28
SNP35	rs699947	Hasta: 89 Kontrol: 88	CC CA AA CA+AA	27 (0,303) 46 (0,516) 16 (0,179) 62 (0,696)	23 (0,261) 44 (0,5) 21 (0,238) 65 (0,738)	Referans 0,890 (0,44-1,78) 0,649 (0,27-1,52) 0,812 (0,42-1,56)	0,74 0,32 0,53
SNP36	rs7096206	Hasta: 92 Kontrol: 90	CC CG GG CG+GG	64 (0,695) 28 (0,304) 0 (0) 28 (0,304)	55 (0,611) 29 (0,322) 6 (0,066) 35 (0,388)	Referans 0,829 (0,44-1,56) 0 (0-1,20) 0,687 (0,37-1,27)	0,56 0,06 0,23
SNP37	rs71627250	Hasta: 94 Kontrol: 93	CC CT TT CT+TT	91 (0,968) 3 (0,031) 0 (0) 3 (0,031)	88 (0,946) 5 (0,053) 0 (0) 5 (0,053)	Referans 0,580 (0,13-2,50) 0,967 (0,01-49,28) 0,580 (0,13-2,50)	0,46 0,98 0,46
SNP39	rs755622	Hasta: 93 Kontrol: 94	GG GA AA GA+AA	93 (1) 0 (0) 0 (0) 0 (0)	94 (1) 0 (0) 0 (0) 0 (0)	Referans 0 (0-Inf) 0 (0-Inf) 0 (0-Inf)	1 1 1
SNP41	rs78975256	Hasta: 89 Kontrol: 90	TT TA AA TA+AA	89 (1) 0 (0) 0 (0) 0 (0)	90 (1) 0 (0) 0 (0) 0 (0)	Referans 0 (0-Inf) 0 (0-Inf) 0 (0-Inf)	1 1 1
SNP43	rs833061	Hasta: 88 Kontrol: 78	CC TC TT TC+TT	21 (0,238) 42 (0,477) 25 (0,284) 67 (0,761)	25 (0,320) 37 (0,474) 16 (0,205) 53 (0,679)	Referans 1,351(0,65 -2,80) 1,86 (0,79-4,37) 1,504 (0,76-2,99)	0,41 0,15 0,24
SNP44	rs9877396	Hasta: 75 Kontrol: 62	TT TC CC TC+CC	39 (0,52) 33 (0,44) 3 (0,04) 36 (0,48)	34 (0,548) 25 (0,403) 3 (0,048) 28 (0,451)	Referans 1,150 (0,57-2,30) 0,871 (0,16-4,60) 1,120 (0,57-2,20)	0,69 0,87 0,74
SNP45	rs9953270	Hasta: 91 Kontrol: 93	TT CT CC CT+CC	29 (0,318) 45 (0,494) 17 (0,186) 62 (0,681)	37 (0,397) 48 (0,516) 8 (0,086) 56 (0,602)	Referans 1,196 (0,63-2,25) 2,711 (1,02-7,15) 1,412 (0,77-2,58)	0,57 0,04 0,26

3.5.2.2 SNP'lerin Allel Düzeyinde BPD ile İlişkilendirilmesi

Analizi gerçekleştirilen SNP'lerin BPD ile allel düzeyinde ilişkilendirilmesi amacıyla, minör allelin (2. allel) hasta ve kontrol gruplarındaki frekansı ile yaygın allelin (1. allel) hasta ve kontrol gruplarındaki frekansı karşılaştırılarak, Bölüm 2.2.4.2'de açıklandığı şekilde olasılıklar oranı (OR), %95 güven aralığı ve p değerleri hesabı yapılmıştır (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7 Araştırılan SNP allellerinin BPD ile ilişkilendirilmesi

SNP				1. Allelin Frekansı		2. Allelin Frekansı		Minör Allelin Yaygın Allele Göre	
No	SNP ID	1. Allel	2. Allel	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol	OR (%95 GA)	p değeri
SNP1	rs1001179	C	T	0,878	0,906	0,121	0,093	1,338 (0,83-1,19)	1
SNP2	rs10162694	C	A	1	1	0	0	1 (0,01-92,42)	1
SNP4	rs1049982	C	T	0,539	0,526	0,460	0,474	0,946 (0,79-1,12)	0,53
SNP5	rs11003125	G	C	0,559	0,626	0,440	0,374	1,318 (1,10-1,57)	0,0023
SNP6	rs11226613	T	A	0,765	0,711	0,234	0,289	0,752 (0,61-0,92)	0,006
SNP7	rs1126214	T	C	0,657	0,618	0,343	0,382	0,843 (0,7-1)	0,06
SNP8	rs1245560	A	C	0,558	0,471	0,442	0,529	0,706 (0,59-0,84)	0,0001
SNP9	rs12701220	T	C	0,963	0,921	0,036	0,079	0,440 (0,29-0,66)	0,0001
SNP10	rs1440306	T	G	0,682	0,685	0,318	0,314	1,014 (0,83-1,22)	0,88
SNP11	rs1474256	C	T	0,666	0,617	0,333	0,383	0,804 (0,66-0,96)	0,01
SNP12	rs1541364	A	G	0,553	0,572	0,447	0,428	1,080 (0,9-1,29)	0,38
SNP13	rs17551536	A	G	0,838	0,803	0,161	0,197	0,786 (0,62-0,99)	0,04
SNP14	rs17880135	T	G	0,962	0,967	0,038	0,033	1,173 (0,74-1,92)	0,46
SNP15	rs1912816	A	G	0,665	0,662	0,335	0,338	0,986 (0,81-1,18)	0,88
SNP17	rs204732	G	A	0,868	0,875	0,132	0,125	1,063 (0,81-1,37)	0,68
SNP18	rs2233406	G	A	0,659	0,715	0,341	0,285	1,298 (1,07-1,57)	0,006
SNP19	rs2233409	G	A	0,742	0,763	0,258	0,237	1,123 (0,91-1,37)	0,25
SNP20	rs2278034	T	C	0,5	0,676	0,5	0,324	2,091 (0,57-1,74)	1
SNP21	rs2536512	A	G	0,896	0,854	0,104	0,146	0,681 (0,52-0,89)	0,0057
SNP22	rs2664349	A	G	0,714	0,649	0,286	0,351	0,742 (0,61-0,89)	0,0018
SNP23	rs2664352	T	C	0,526	0,554	0,474	0,446	1,118 (0,93-1,32)	0,22
SNP24	rs3138053	T	C	0,647	0,703	0,353	0,297	1,295 (1,07-1,65)	0,006
SNP25	rs349423	C	T	0,984	1	0,016	0	1 (0,001-1,2)	0,06
SNP26	rs3771150	G	A	0,728	0,753	0,272	0,247	1,139 (0,93-1,39)	0,2
SNP28	rs4634985	C	T	0,677	0,625	0,323	0,375	0,795 (0,66-0,95)	0,01
SNP29	rs4883955	G	T	0,649	0,741	0,351	0,259	1,547 (1,27-1,87)	<0,0001
SNP30	rs55716084	G	A	0,973	0,995	0,027	0,005	4,945 (3,73-6,72)	<0,0001
SNP31	rs5746136	C	T	0,646	0,629	0,354	0,371	0,93 (0,77-1,11)	0,45
SNP32	rs62468577	C	T	0,798	0,868	0,202	0,132	1,675 (1,32-2,13)	<0,0001
SNP34	rs6988306	C	T	0,851	0,815	0,149	0,185	0,772 (0,61-0,98)	0,03
SNP35	rs699947	C	A	0,562	0,511	0,438	0,489	0,816 (0,68-0,97)	0,02
SNP36	rs7096206	C	G	0,848	0,772	0,152	0,228	0,609 (0,48-0,76)	<0,0001
SNP37	rs71627250	C	T	0,984	0,973	0,016	0,027	0,587 (0,3-1,08)	0,08
SNP39	rs755622	G	A	1	1	0	0	1 (0,01-92,42)	1
SNP41	rs78975256	T	A	1	1	0	0	1 (0,01-92,42)	1
SNP43	rs833061	C	T	0,484	0,607	0,516	0,393	1,648 (1,38-1,97)	<0,0001
SNP44	rs9877396	T	C	0,74	0,75	0,26	0,25	1,054 (0,86-1,28)	0,6
SNP45	rs9953270	T	C	0,566	0,656	0,434	0,344	1,462 (1,22-1,75)	<0,0001

Bu çalışmada BPD ile ilişkisi araştırılan SNP'lerden allel düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı görünen bir diğer polimorfizm de rs11003125 (SNP5) polimorfizmidir. Yapılan çalışmada bu polimorfizm için G allelinin kontrol grubunda anlamlı bir şekilde daha fazla ve C allelinin anlamlı bir şekilde hasta grubunda daha fazla olduğu görülmüştür (OR=1,318 (1,10-1,57), p=0,0023). Bu sonuç, MBL2 geni üzerinde bulunan rs11003125 polimorfizminin C allelinin BPD için bir risk alleli olabileceğini göstermektedir. Bu polimorfizm ile ilgili literatürde yapılmış çalışmalarda Hilgendorff ve ark. [79],

Capoluongo ve ark. [80], Cakmak ve ark. [86] bu çalışmadakine benzer şekilde rs11003125 polimorfizminin prenatal infantlarda BPD gelişimi, düşük doğum ağırlığı ve artan neonatal sepsis riski ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir.

BPD ile allel düzeyinde ilişkili bulunan bir diğer SNP ise NFKBIA geninin promotor bölgesi üzerinde bulunan rs2233406 ve rs3138053 polimorfizmleridir (SNP18 ve SNP24). rs2233406 polimorfizminin G alleli bu çalışmaya katılan kontrol grubunda anlamlı bir şekilde hastalara göre yaygın ve A alleli anlamlı bir şekilde hasta grubunda kontrollere göre yaygın olarak görüldüğü anlaşılmıştır. rs3138053 polimorfizmi için de benzer şekilde T alleli kontrol grubunda anlamlı bir şekilde hastalara göre yaygın ve C alleli anlamlı bir şekilde hasta grubunda kontrollere göre yaygın olarak bulunduğu görülmüştür. Bu sonuç rs2233406 polimorfizminin A allelinin ve rs3138053 polimorfizminin C allelinin BPD için birer risk allelleri olabileceğini göstermektedir.

Salman ve ark. [81] yapmış oldukları çalışmada da, bu sonuçları destekleyecek şekilde rs2233406 ve rs3138053 polimorfizmlerinin minör varyantlarının NFKBIA promotor fonksiyonlarını, total NFKBIA geni ekspresyonunu, I κ B α proteinini ekspresyonunu ve toll benzeri reseptörlerin aracılık ettiği enflamatuar tepkiyi etkilediğini rapor etmişlerdir ($p=0,026$, OR=0,13 (%95GA 0,022–0,78). NFKBIA geni ve I κ B α transkripsiyon faktörü, hücrel transkripsiyonel tepki ağının merkezindedirler ve I κ B α 'nın enflamatuar tepkiyi düzenlemedeki hayati rolü literatürde çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Bu yüzden NFKBIA'nın promotor bölgesindeki bir genetik varyasyonun RSV (Respiratuar Sinsiyal Virüs) bronşiyolit ve şiddetli BPD oluşması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [81, 137, 138].

Bu çalışmada araştırılan bir diğer polimorfizm, KLF12 geninin intron bölgesinde bulunan rs4883955'in (SNP29) G ve T allellerinin çalışma populasyonundaki frekansları araştırıldığında da G allelinin kontrol grubunda daha yaygın ve T allelinin ise hasta grubunda daha yaygın olarak görüldüğü tespit edilmiştir (OR=1,547 (1,27-1,87), $p<0,0001$). Bu sonuçlar rs4883955 polimorfizmi için T allelinin BPD için bir risk alleli olabileceğini işaret etmektedir. Ancak Wang ve ark. [134] yapmış oldukları genom çapındaki ilişkilendirme çalışmasında rs4883955 polimorfizmi, araştırılan polimorfizmler arasında anlamlı olmaya en yakın SNP'ler arasında olsa da bu polimorfizmi BPD ile ilişkilendirecek bir sonuç rapor edilmemiştir.

BPD ile allel düzeyinde ilişkili bulunan bir diğer polimorfizm de rs55716084 (SNP30) olarak tespit edilmiştir. CEP170 geninin intron bölgesinde pozisyonlanan bu polimorfizmin BPD ile ilişkisi çalışmaya katılan populasyonda araştırıldığında, G allelinin kontrol grubunda daha yaygın, A allelinin ise hasta grubunda daha yaygın olarak görüldüğü tespit edilmiştir (OR=4,945 (3,73-6,72), $p<0,0001$). Bu durum, rs55716084 polimorfizmi için A allelinin BPD için bir risk alleli olabileceğini göstermektedir. Ancak Wang ve ark. [134] yapmış oldukları genom çapındaki ilişkilendirme çalışmasında rs55716084 polimorfizmi, p değeri nispeten düşük SNP'ler arasında olsa da bu polimorfizmi BPD ile ilişkilendirecek bir sonuç elde edememişlerdir.

MAGI2 geninin intron bölgesinde bulunan ve bu çalışmada BPD ile ilişkisi araştırılan bir diğer polimorfizm rs62468577 (SNP32) allel düzeyinde hasta ve kontrol gruplarına karşılaştırıldığında, C allelinin anlamı bir şekilde kontrol grubunda daha yaygın ve T allelinin ise anlamlı bir şekilde hasta grubunda daha yaygın görüldüğü saptanmıştır (OR=1,675 (1,32-2,13), $p<0,0001$). Bu sonuç, rs62468577 polimorfizminin T allelinin BPD için bir risk alleli olabileceğini öne sürmektedir. Bu polimorfizm, Wang ve ark. [134] yapmış oldukları genom çapındaki ilişkilendirme çalışmasında da araştırılmış ancak BPD ile bir ilişkisi olmadığı yönünde sonuçlar rapor edilmiştir.

BPD ile allel düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunan bir diğer polimorfizm de VEGFA geninin 5' yönündeki -460T>C polimorfizmi olmuştur. VEGF geni, pluripotent bir büyüme ve geçirgenlik faktörüdür ve endotelial hücre fonksiyonu üzerinde büyük etkisi vardır. VEGF'in ayrıca akciğer gelişimi üzerinde hayati önemi ve erişkinlik döneminde de bazı akciğer süreçlerini idame ettirici görevleri vardır. VEGF geninin özellikle akciğerlerdeki ekspresyonunun çok yüksek olarak gözlemlenmesi, akciğerlerin gelişimindeki ve yapısal bütünlüğünün korunmasındaki önemini yansıtmaktadır. VEGF proteininin fizyolojik fonksiyonlarına ek olarak akut akciğer yaralanması, pulmoner hipertansiyon ve amfizem gibi bazı akut ve kronik akciğer hastalıklarında rol oynadığı literatürde rapor edilmiştir [139]. BPD hastalığının bir akciğer gelişimi bozukluğu olduğu ve yeni damar oluşumu ve bronşial dallanmanın akciğer gelişimindeki önemi ele alındığında; VEGFA geninin koagülasyon, fibrinoliz, endotelial farklılaşma, enflamatuar reaksiyonlar ve anjiyogenez süreçleri üzerindeki kritik görevleri BPD hastalığı ile ilişkisinde önem kazanmaktadır. VEGFA geni ekspresyonunun

durmasının mikrovasküler yapının oluşmasında bozukluklara yol açtığı da literatürde rapor edilmiştir [140, 141]. rs833061 numaralı (SNP43) bu SNP, bu çalışmaya katılan bireyler üzerinde allel düzeyinde karşılaştırıldığında, C allelinin kontrol grubunda daha yaygın, T allelinin ise hasta grubunda anlamlı bir şekilde daha yaygın olduğu saptanmıştır (OR=1,648 (1,38-1,97), $p<0,0001$). Benzer bir çalışmada Kwinta ve ark. [76] büyüme faktörlerini kodlayan bazı genlerdeki (VEGF, TGF-1 ve IGF-1) polimorfizmlerin BPD ile ilişkisini araştırmıştır. 90 hasta ve 90 kontrol grubundan oluşan populasyon üzerinde BPD ile ilişkisini araştırmış oldukları 8 farklı polimorfizmden yalnızca rs833061 polimorfizminin BPD ile anlamlı bir ilişkisini rapor etmişler ve TT veya TC genotiplerini (yani T allelini taşıyan genotipleri) taşıyan bireylerde daha yüksek BPD insidansı olduğunu rapor etmişlerdir. Kwinta ve ark. rs833061 polimorfizmi ile ilgili elde ettikleri sonuç ile bu çalışmada elde edilen sonuç ile tam olarak örtüşmektedir. Elde edilen veriler rs833061 polimorfizminin T allelinin BPD için bir risk alleli olabileceğini işaret etmektedir.

Bu çalışmada araştırılan SNP'lerin hasta ve kontrol grupları arasında allel düzeyinde karşılaştırılması ile elde edilen son anlamlı sonuç, CHST9 geninin intron bölgesi üzerinde bulunan rs9953270 numaralı (SNP45) polimorfizmde görülmüştür. Karşılaştırmalı istatistiksel sonuçlar incelendiğinde T allelinin kontrol grubunda anlamlı şekilde daha yaygın, C allelinin ise hasta grubunda anlamlı bir şekilde daha yaygın olduğu saptanmıştır. Bu sonuç rs9953270 polimorfizminin C allelinin BPD için bir risk alleli olabileceğini göstermektedir. Ancak Wang ve ark. [134] yapmış oldukları genom çapındaki ilişkilendirme çalışmalarında bu polimorfizmi BPD ile ilişkilendirecek istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

3.5.2.3 Araştırılan SNP'ler Arasında BPD ile İlişkili Bulunan Allel ve Genotiplerin Genel Değerlendirmesi

Bu çalışmada araştırılmış olan 45 SNP'nin hasta ve kontrol grupları arasında allel ve genotip düzeyinde karşılaştırılması ile elde edilen sonuçlara göre istatistiksel olarak birer risk alleli olabileceği önerilen SNP'ler ve risk alleli Çizelge 3.8'de listelenmiştir.

Allel düzeyinde karşılaştırıldığında Türk populasyonu için BPD ile ilişkisi olduğu tespit edilen bu polimorfizmlerden SNP29 ve SNP45 numaralı polimorfizmler incelendiğinde, bu polimorfizmlere genotip düzeyinde gerçekleştirilen analizlerde de aynı alleli taşıyan

genotipe sahip bireylerde BPD hastalığının istatistiksel olarak anlamlı şekilde yaygın görüldüğü saptanmıştır.

Çizelge 3.8 Allel ve genotip düzeyinde BPD ile ilişkili bulunan SNP'lerin karşılaştırılması

SNP no	rs No	Gen Adı	Risk Alleli	Risk Genotipi
SNP5	rs11003125	MBL2	C	-
SNP18	rs2233406	NFKBIA	A	-
SNP24	rs3138053	NFKBIA	C	-
SNP29	rs4883955	KLF12	T	TT
SNP30	rs55716084	CEP170	A	-
SNP32	rs62468577	MAGI2	T	-
SNP43	rs833061	VEGFA	T	-
SNP45	rs9953270	CHST9	C	CC

Bu tez çalışmasında genotip ve allel düzeyinde gerçekleştirilen analizlerin her ikisinde de BPD için olası bir risk faktörü olarak tanımlanan ve Çizelge 3.8’de açıklanan risk allel ve genotipleri KLF12 geni üzerinde bulunan rs4883955 polimorfizmi ve CHST9 geni üzerinde bulunan rs9953270 polimorfizmi olmuştur.

Daha önce literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde KLF12 geninin anoikis (etraflarındaki ekstra selüler matriksten kopan hücrelerin programlı ölümü) sürecini kontrol eden genlerden biri olduğu ve tümör baskılayıcı bir gen olduğu yönünde rapor edilen çalışmalar mevcuttur. KLF12 ‘nin hücre döngüsünde G1/S geçişini indüklediği ve böylece hücrelerin anoikis sürecine geçmeye duyarlı bir hale geçtikleri rapor edilmiştir. Heymann ve ark. KLF12 geninin susturulmasının akciğer kanseri hücrelerinin hayatta kalmasını ve tümör formasyonunu arttırdığını deneysel fare metastaz modelleri üzerinde göstermişlerdir [142]. Buna ek olarak akciğer kanseri hastalarda KLF12 geninin ekspresyonunun azalmasının hayatta kalma oranını da azalttığı tespit edilmiştir. Genellikle tümör baskılayıcı genlerin hücre döngüsünü engelleyici şekilde görev gördüğü düşünülse de daha önce yapılan çalışmalarda hücre döngüsünü durdurmanın anoikis direncine sebep olabileceği fibrokistik eptelyal hücre hatlarında (MCF10A) gösterilmiştir [143]. KLF12 geninin ekspresyonunun azalmasının akciğer kanseri hücrelerinin hayatta kalmasını arttırması ve akciğer kanseri hastalardaki hayatta kalım oranını azaltması

bilgisi, bu çalışmada araştırılan BPD hastası yeni doğanlarda KLF12 geni üzerinde görülen rs4883955 polimorfizminin de bu genin ekspresyonunu bozarak anoikis ile gerçekleşen hücre ölümlerinin düzenlenememesine ve dolayısıyla akciğer gelişim bozukluklarının ortaya çıkmasına yol açtığı fikrini akla getirmektedir.

Bu tez çalışmasında hem genotipi hem de allel düzeyinde Türk populasyonunda görülen BPD hastalığı ile anlamlı bir ilişkisi olduğu tespit edilen son polimorfizmi de CHST9 geni üzerindeki rs9953270 polimorfizmi olmuştur. Bu gen tarafından kodlanan protein sülfotransferaz 2 ailesindendir ve golgi membranında konumlanarak N-glikanlar ve O-glikanlarda bulunan N-asetilgalaktozamin (GalNAc) kalıntılarında sülfatın 4 numaralı pozisyona transferini kataliz eder. Karbonhidratlar üzerindeki sülfat grupları glikoproteinlere, glikolipidlere ve proteoglikanlara yüksek spesifiklikte fonksiyonlar kazandırır ve hücrel etkileşimde, sinyal aktarımında ve embriyonik gelişimde oldukça kritik öneme sahiptirler. BPD hastalığı için genom çapında gerçekleştirilen ilişkilendirme çalışmalarında CHST9 geni ile herhangi bir anlamlı ilişki yayınlamamış olsa da akciğer fibrozisi kaynaklı pulmoner hipertansiyon hastalarında CHST9 geni ekspresyonunun hasta olmayanlara göre 2,32 kat arttığına dair yayınlar mevcuttur [144]. CHST9 geni ile ilişkili literatürdeki bilgiler sınırlıdır.

Bu çalışmada allel veya genotipi düzeyinde BPD ile Türk populasyonunda anlamlı ilişkisi tespit edilen polimorfizmlerin, literatürdeki diğer çalışmalarda araştırıldıkları popülasyonların ve elde edilen sonuçların bir özeti Çizelge 3.9'da verilmiştir. Bu tez çalışmasında BPD ile anlamlı ilişkisi bulunan polimorfizmler arasından NFKBIA geni üzerinde bulunan rs2233406 ve VEGFA geni üzerinde bulunan rs833061 polimorfizmleri, literatürdeki benzer çalışmalarda da bu çalışmanın sonuçları ile birbirlerini destekleyici şekilde anlamlı bir ilişki olduğu yönünde rapor edilmiştir [76, 81]. Ancak bu çalışmada BPD ile Türk populasyonunda anlamlı ilişkisi tespit edilen diğer polimorfizmler (rs11003125, rs3138053, rs4883955, rs55716084, rs62468577 ve rs9953270), literatürdeki benzer çalışmalarda BPD ile ilişkileri olmadıkları yönünde rapor edilmişlerdir. rs11003125 polimorfizmi Capoluongo ve arkadaşlarının çalışmasında Kafkas popülasyonunda BPD'ye karşı koruyucu bir etkisi olduğu yönünde rapor edilmiştir [80].

Çizelge 3.9 Bu çalışmada BPD ile ilişkisi bulunan polimorfizmlerin literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırılması

rs No	Gen Adı	Literatürde bu polimorfizmin çalışıldığı popülasyon(lar)	Çalışmanın yapıldığı ülke	Çalışmada rapor edilen BPD insidansı ile ilişkisi	Kaynak
rs11003125	MBL2	Caucasian popülasyonu	İtalya	+ 	[80]
rs2233406	NFKBIA	Kanada popülasyonu	Kanada	+ 	[81]
rs3138053	NFKBIA	Kanada popülasyonu	Kanada	-	[81]
rs4883955	KLF12	Afrikalı Amerikalı, İspanyol, Asya/Pasifik, Caucasian, heterojen popülasyon	Kaliforniya, ABD	-	[134]
rs55716084	CEP170	Afrikalı Amerikalı, İspanyol, Asya/Pasifik, Caucasian, heterojen popülasyon	Kaliforniya, ABD	-	[134]
rs62468577	MAGI2	Afrikalı Amerikalı, İspanyol, Asya/Pasifik, Caucasian, heterojen popülasyon	Kaliforniya, ABD	-	[134]
rs833061	VEGFA	Polonya popülasyonu	Polonya	+ 	[76]
rs9953270	CHST9	Afrikalı Amerikalı, İspanyol, Asya/Pasifik, Caucasian, heterojen popülasyon	Kaliforniya, ABD	-	[134]

rs3138053 polimorfizmi ise Salman ve arkadaşlarının çalışmasında Kanada popülasyonunda BPD ile ilişkili bulunmamıştır. rs4883955, rs55716084, rs62468577 ve rs9953270 polimorfizmleri Wang ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği genom çapında

ilişkilendirme çalışmasında heterojen bir popülasyonda BPD ile anlamlı bir ilişkileri olmadıkları yönünde rapor edilmişlerdir.

3.5.2.4 Çalışma Populasyonundaki İkiz ve Üçüzlerde SNP'lerin Değerlendirilmesi

Çalışma ve kontrol grubu için kan örnekleri toplanan infantlar arasında bulunan ikiz ve üçüzler rastlantısal olarak bu çalışmaya dahil edilmişler ve normal çalışma grubu içerisinde değerlendirilmişlerdir. Daha önce Bölüm 3.1'de açıklanan, çalışma populasyonu içerisinde bulunan ikiz ve üçüzlerin genotiplendirme verileri, Çizelge 3.8'de açıklanan riskli allel ve genotipleri taşıyıp taşımadıkları açısından da araştırılmışlardır. Çalışma populasyonundaki ikiz ve üçüzlerin, araştırılan SNP'ler için taşıdıkları genotipler Çizelge 3.10'da açıklanmıştır. Ancak bu veriler ile olasılıklar oranı (OR) hesaplandığında hasta ve kontrol grupları arasında herhangi bir SNP için anlamlı bir sonuç bulunamamıştır ($p>0,05$). İleri çalışmalarda bu ikiz veya üçüz infantların sayılarının arttırılarak tekrar değerlendirilmeleri önerilmektedir.

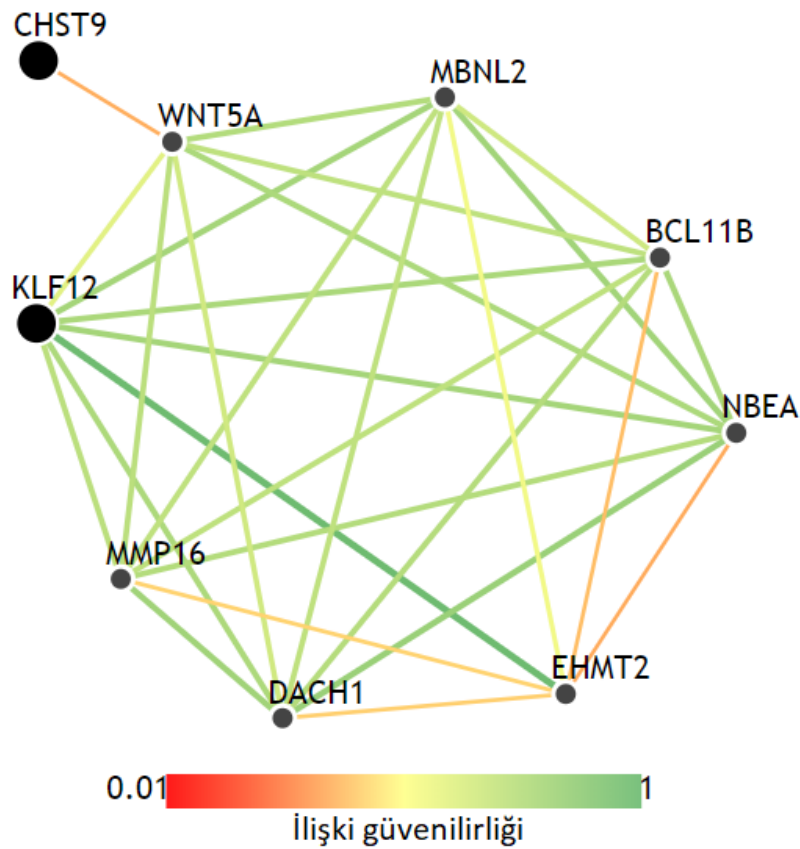
Çizelge 3.10 Bu çalışmada riskli olarak tanımlanan allel ve genotiplerin, çalışma popülasyonundaki ikiz ve üçüzlerdeki durumu. Yeşil ile gösterilenler kontrol, kırmızı ile gösterilenler hasta bireylerdir. Bu çalışmada riskli olarak tanımlanan allel ve genotipler de kırmızı ile işaretlenmiştir.

	İkizler													
SNP no	K78/K89		K86/K87		H15/H16		H43/H44		H71/H72		H29/K53		H52/K79	
SNP5	CG	CG	CC	CC	CG	CG	CG	CG	CC	CC	GG	GG	GG	GG
SNP18	GG	GG	AG	AG	GG	GG	AA	AA	GG	GG	AG	AG	AG	GG
SNP24	TT	TT	CT	CT	TT	TT	CC	CC	TT	TT	CT	CT	CT	TT
SNP29	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GG	GG	GT	GT	GG	GT	GT	GG
SNP30	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
SNP32	CC	CC	CC	CC	CC	CC	TC	TC	CC	CC	TC	CC	TC	CC
SNP43		TT	TT	TT	TT	TT	TC	TC	TC	TC	TC	TC	TC	TT
SNP45	CT	CT	TT	TT	CT	CT	CT	CT	TT	TT	TT	CT	CT	CT
	Üçüzler													
	H66/H67/H73				H41/K68/K69									
SNP5	CC	CG	CG	GG	CG	GG								
SNP18	AG	AG	AG	AG	GG	AG								
SNP24	CT	CT	CT	CT	TT	CT								
SNP29	GG	GG	GG	GG	GG	GG								
SNP30	GG	GG	GG	GG	GG	GG								
SNP32	TC	TC	CC	CC	CC	CC								
SNP43	TC	CC	TC	TC	TC	TC								
SNP45	TT	CT	TT	TT	TT	TT								

3.5.3 BPD ile Anlamlı İlişkisi Tespit Edilen Polimorfizmlerin Bulundukları Genlerin ve Bu Genlerin Yolaklarının Birbiriyle ve BPD ile İlişkisi

Bu çalışmada BPD ile hem allel hem de genotip düzeyinde anlamlı bir ilişkisi olduğu bulunan rs4883955 (SNP29) ve rs9953270 (SNP45) polimorfizmleri, üzerinde bulundukları genlerin (sırasıyla KLF12 ve CHST9) birbirleri ile olan ilişkileri bakımından da incelenmiştir. Bu genlerin fonksiyonel ilişkileri göz önüne alındığında Şekil 3.7’de

gösterilen ağ oluşturulabilmiştir. Bu fonksiyonel ilişki ağı incelendiğinde, KLF12-CHST9 genleri arasında ise dolaylı olarak WNT5A geni üzerinden bir fonksiyonel ilişkileri olduğu görülmüştür. Literatürde yapılan araştırmalar incelendiğinde VEGFA ve WNT5A genleri arasında, hücre migrasyonunda, endotelyal ve epitelyal hücre proliferasyonunda, hücre proliferasyonunun regülasyonunda, hücre morfogenezinde, kemotakside, hücre ölümlerinde, protein modifikasyon proseslerinin regülasyonunda, fosforun metabolik proseslerinde ve damarlanma düzeninin gelişiminde bilinen fonksiyonel ilişkileri olduğu görülmüştür [131-133]. Bununla birlikte, VEGFA ve WNT5A genlerinin fonksiyonel bir ilişki içerisinde dahil oldukları biyolojik süreçler incelendiğinde, hem epitelyal hem de endotelyal hücrelerin proliferasyonunda, proliferasyonun regülasyonunda ve migrasyon süreçlerinde birlikte çalışarak bu biyolojik süreçlere destek verdikleri anlaşılmıştır [131-133]. Dolayısıyla bu genler üzerinde bulunan ve genin ekspresyonunu etkileyecek bir polimorfizmin, bu yolları da etkileyerek epitelyal ve endotelyal hücrelerin proliferasyon ve migrasyon süreçlerini değiştirebileceği ve akciğer gelişim evrelerinde bozukluklara yol açabileceği önerilebilir.

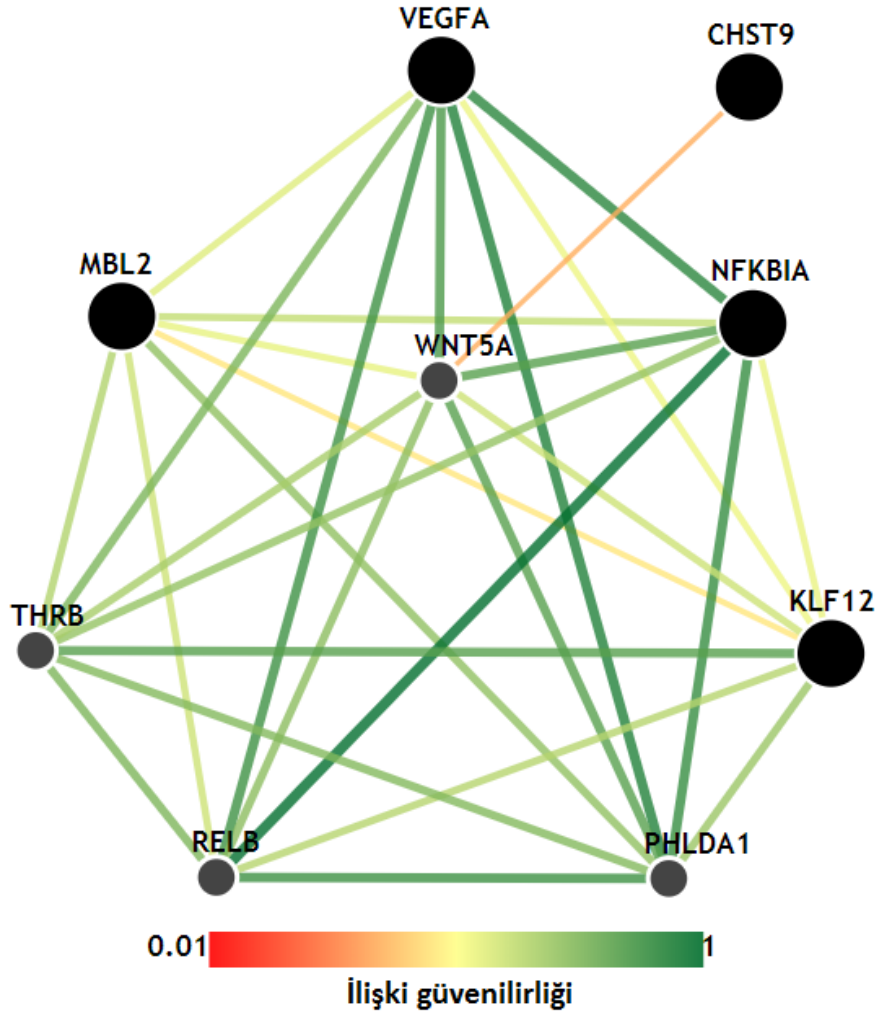


Şekil 3.7 KLF12 ve CHST9 genlerinin fonksiyonel ilişki ağı [131-133]

KLF12 geni ile WNT5A genleri arasında ise RNA polimeraz 2'nin promotor bölgesinin transkripsiyonunda ve RNA metabolik süreçlerinin regülasyonunda fonksiyonel bir ilişki içinde oldukları görülmüştür. Bununla birlikte KLF12 ve WNT5A genleri arasında nitrojen bileşiklerin metabolik süreçlerinin regülasyonunda fonksiyonel bir ilişki olduğu görülmüştür [131-133]. Endojen olarak nitrik oksit sentazın (NOS) 3 izoformu olarak üretilen nitrik oksitin (NO) birden çok biyolojik süreçte fonksiyonu mevcuttur [145]. Özellikle havayolu epiteli fonksiyonlarında önemli role sahiptir [146]. NO'nun BPD'de dahil bazı enflamatuvar solunum hastalıklarında önemli rol oynadığı rapor edilmektedir. Literatürde BPD ile ilgili yapılmış hem hayvan modeli çalışmalarında hem de insan çalışmalarında nitröz oksit sentaz (NOS) ekspresyonunun ve nitrik oksit (NO) metabolitlerinin (NO₂Y) BPD hastalarında hem miktar olarak hem de dağılım olarak değişime uğradığı yönünde yayınlar mevcuttur [146-151]. Bu yayınlarda BPD hastalarında epitelyal indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) miktarında anlamlı bir artış olduğu, normal NO metabolizmasında da bir alterasyon olduğu ve NO'nun üretimindeki bu değişikliklerin sitotoksik metabolitleri ortaya çıkararak hücre sinyal yollarını bozabileceği ve BPD patolojisine katkı sağlayabileceği rapor edilmiştir [147]. Daha önce de bahsedildiği gibi bu çalışmada hem allel hem de genotip düzeyinde Türk populasyonunda BPD insidansı ile KLF12 geni üzerinde bulunan rs4883955 polimorfizmi ve CHST9 geni üzerinde bulunan rs9953270 polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Bu polimorfizmlerin üzerlerinde bulundukları genin ekspresyonuna etkileri olması durumunda, WNT5A geni ile fonksiyonel bir ilişki içerisinde etkide bulundukları nitrojen bileşiklerin metabolik süreçlerinin regülasyonun da bu durumdan etkilenebileceği ve bu şekilde rs4883955 ve rs9953270 polimorfizmleri dolaylı olarak nitrojen metabolizmasını etkileyerek BPD patolojisinde de önemli bir rol üstlenebileceği önerisinde bulunulabilir.

Bu tez çalışmasında yalnızca allel düzeyinde BPD ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunan polimorfizmlerin üzerlerinde bulundukları, VEGFA, CHST9, NFKBIA, MBL2 ve KLF12 genleri arasındaki fonksiyonel ilişki ağı oluşturulduğunda ise Şekil 3.8'de gösterilen ağ elde edilmiştir. Bu ağ incelendiğinde WNT5A geninin, bu tez çalışmasında allel düzeyinde BPD ile anlamlı bir ilişkisi bulunan polimorfizmlerin üzerlerinde bulunduğu VEGFA, CHST9, NFKBIA, MBL2 ve KLF12 genlerinin hepsi ile fonksiyonel bir

ilişki içerisinde bulunması dikkat çekmektedir. Daha önce de bahsedildiği gibi VEGFA ile WNT5A genleri arasında hücre migrasyonunda, endotelial ve epitelyal hücre proliferasyonunda, hücre proliferasyonunun regülasyonunda, hücre morfogenezinde, kemotakside, hücre ölümlerinde, protein modifikasyon proseslerinin regülasyonunda, fosforun metabolik proseslerinde ve damarlanma düzeninin gelişimi gibi önemli süreçlerde fonksiyonel bir ilişkileri bulunmaktadır [131-133].



Şekil 3.8 VEGFA, CHST9, NFKBIA, MBL2 ve KLF12 genlerinin fonksiyonel ilişki ağı [131-133]

NFKBIA ve VEGFA genleri arasında ise bazı kanser yollarında ve protein metabolik süreçlerinin pozitif regülasyonu ile ilgili fonksiyonel bir ilişkileri gözlemlenirken, NFKBIA ile WNT5A genleri arasındaki ilişkiye bakıldığında ise RNA metabolik süreçlerin regülasyonu, hücre farklılaşma mekanizmalarının regülasyonu, protein lokalizasyonun

düzenlenmesinin yanı sıra yine nitrojen bileşiklerin metabolik süreçlerinin regülasyonu ile ilgili bir fonksiyonel ilişki ile karşılaşılmaktadır [131-133].

MBL2 geninin diğer genler ile ilişkileri incelendiğinde VEGFA ve WNT5A genleri ile uyarıcılara olan yanıtın regülasyonu ile ilgili bir fonksiyonel ilişkisi ve WNT5A geni ile bakterilere karşı yanıtın oluşturulması ile ilgili bir fonksiyonel ilişkileri oldukları saptanmıştır [131-133].

Son olarak KLF12 geninin incelenen diğer genler ile ilişkisine bakıldığında, daha önce de bahsedilmiş olan WNT5A geni ile nitrojen bileşiklerin metabolik süreçlerinin regülasyonundaki ilişkilerinin yanı sıra NFKBIA geni ile de nitrojen bileşiklerin metabolik süreçlerinin regülasyonunda ve RNA metabolik süreçlerinin regülasyonunda bir fonksiyonel ilişki içerisinde bulundukları görülmüştür [131-133].

Bu çalışmada allel düzeyinde BPD ile anlamlı bir ilişkisi olduğu saptanan polimorfizmlerin üzerlerinde bulundukları genlerin tamamının da WNT5A geni ile fonksiyonel bir ilişki içerisinde olması ve bu ilişkilerin genellikle nitrojen bileşiklerin metabolik süreçlerinin ve RNA metabolik süreçlerinin regülasyonunun etrafında toplanmış olması proje hipotezini güçlendirmektedir. Literatürdeki bazı çalışmalar da bu düşüncüyü destekleyici sonuçlar rapor etmişlerdir. Li ve arkadaşlarının 2002 yılında yapmış oldukları çalışmada fare modellerinde WNT5A geninin akciğer morfogeneğinde ve akciğerlerin olgunlaşmasında kritik rol oynadığını [152]; Villosis ve arkadaşları ise 2007’de preterm infantlardan almış oldukları akciğer enflamatuar hücrelerinde WNT5A’nın ekspresyonunun enflamatuar hücrelerin fonksiyonuna ve akciğerlerin yapısal gelişimine etkisi olduğunu rapor etmişlerdir [153].

Elde edilen bu verilerin ışığında BPD hastalarında özellikle WNT5A geninin ekspresyonundaki değişimlerin ve bu değişimlerin nitrojen metabolizmasını etkileyip etkilemediğinin ileri çalışmalarda araştırılması önerilmektedir.

3.5.4 BPD Hastalarında SNP Genotiplerinin Bazı Klinik ve Demografik Parametrelerle İlişkilendirilmesi

Hastalardan kan örnekleri toplanması esnasında ailelerinden alınan hasta bilgi formu (EK-B) aracılığıyla elde edilen klinik ve demografik veriler, genotipleme analizleri gerçekleştirilen 45 SNP ile ki-kare ve Fisher kesinlik testleri kullanılarak karşılaştırılmış, tablolar oluşturulmuş ve aralarındaki olası bir ilişki tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla hasta bilgi formu ile hasta ailelerine şu sorular sorulmuştur;

- Ailede başka bir erken doğum vakası oldu mu?
- Ailede kronik akciğer hastalığı olan var mı? Var ise, bu sebeple hayatını kaybeden kimse oldu mu?
- Ailede zatürre geçiren kimse oldu mu?
- Ailede tüberküloz hastası kimse var mı?
- Ailede BPD veya RDS öyküsü var mı?
- Hastanın kardeşleri var mı? Var ise kardeşinde de BPD gözlemleniyor mu?
- Hastanın ebeveynleri düzenli sigara kullanıyor mu?
- Hastanın ebeveynlerinin düzenli kullandıkları ilaçlar var mı?

Hastalardan toplanan bu klinik ve demografik verilerin tamamının SNP'lerle ilişkileri bakımından karşılaştırmaları Çizelge 3.11'de açıklanmıştır. Bu soruların cevapları ile elde edilen klinik ve demografik veriler ile ilişkilendirilen SNP'ler için oluşturulan çapraz tablolar ise devam eden bölümlerde, ayrı başlıklarda açıklanmıştır. Türk populasyonu için klinik ve demografik verilerin BPD ile ilişkilendirilmiş polimorfizmler ile olan ilişkisi bilginiz dahilinde literatürde ilk kez bu tez çalışmasında araştırılmıştır.

Çizelge 3.11 Klinik ve demografik tüm değişkenlerin SNP'lerle ilişkilendirilmesi [anlamlı bulunan ($p \leq 0,05$) SNP'ler **koyu renkli** olarak gösterilmiştir].

SNP		Araştırılan demografik ve klinik verilerin p değerleri							
SNP No	SNP ID	Ailede erken doğum öyküsü	Ailede kronik akciğer hastalığı öyküsü	Ailede kronik akciğer hastalığı sebebi ile ölen	Ailede zatürre öyküsü	Ailede tüberküloz öyküsü	Ailede BPD veya RDS öyküsü	Hastanın (varsa) kardeş(ler)i nde BPD görölme öyküsü	Ailede düzenli sigara kullanımı öyküsü
1	rs1001179	0,596	0,406	0,776	0,598	0,778	0,341	0,593	0,443
4	rs1049982	0,348	0,247	0,656	0,435	0,427	0,565	0,267	0,548
5	rs11003125	0,219	0,265	0,324	0,390	0,546	0,304	0,029	0,590
6	rs11226613	0,289	0,107	0,606	0,517	0,363	0,004	0,181	0,234
7	rs1126214	0,132	0,159	0,529	0,353	0,277	0,446	0,224	0,553
8	rs1245560	0,373	0,047	0,394	0,660	0,606	0,495	0,029	0,078
9	rs12701220	0,145	0,744	0,909	0,327	0,909	0,487	0,360	0,129
10	rs1440306	0,114	0,248	0,492	0,295	0,492	0,346	0,321	0,272
11	rs1474256	0,446	0,126	0,435	0,375	0,316	0,488	0,316	0,479
12	rs1541364	0,456	0,038	0,333	0,010	0,333	0,441	0,493	0,068
13	rs17551536	0,591	0,113	0,708	0,168	0,501	0,240	0,571	0,345
14	rs17880135	0,575	0,397	0,912	0,379	0,912	0,412	0,402	0,513
15	rs1912816	0,146	0,169	0,419	0,622	0,581	0,295	0,503	0,246
17	rs204732	0,390	0,501	0,746	0,735	0,746	0,272	0,526	0,221
18	rs2233406	0,511	0,235	0,470	0,143	0,530	0,180	0,401	0,347
19	rs2233409	0,215	0,379	0,571	0,577	0,429	0,164	0,115	0,485
21	rs2536512	0,259	0,644	0,807	0,673	0,648	0,674	0,117	0,583
22	rs2664349	0,129	0,464	0,556	0,606	0,695	0,642	0,318	0,189
23	rs2664352	0,268	0,020	0,694	0,514	0,090	0,439	0,468	0,367
24	rs3138053	0,486	0,217	0,456	0,238	0,544	0,042	0,146	0,199
25	rs349423	Const.	Const.	Const.	Const.	Const.	Const.	Const.	Const.
26	rs3771150	0,146	0,249	0,507	0,511	0,493	0,520	0,219	0,275
28	rs4634985	0,597	0,254	Const.	0,406	0,311	0,047	0,186	0,344
29	rs4883955	0,576	0,508	0,538	0,442	0,462	0,400	0,270	0,413
30	rs55716084	0,711	0,593	0,944	0,014	0,890	0,537	Const.	0,517
31	rs5746136	0,252	0,451	0,486	0,473	0,739	0,212	0,327	0,484
32	rs62468577	0,507	0,176	0,656	0,730	0,656		0,626	0,222
34	rs6988306	0,261	0,444	0,239	0,675	0,424	0,052	0,084	0,249
35	rs699947	0,513	0,609	0,706	0,239	0,706	0,245	0,586	0,028
36	rs7096206	0,115	0,318	0,696	0,355	0,304	0,356	0,396	0,585
37	rs71627250	0,534	0,642	0,972	0,890	0,056	0,264	0,368	0,637
43	rs833061	0,112	0,055	0,731	0,291	0,468	0,238	0,039	0,009
44	rs9877396	0,466	0,610	Const.	0,716	0,716	0,559	0,471	0,103
45	rs9953270	0,466	0,249	0,681	0,381	0,461	0,402	0,497	0,119

3.5.4.1 Ailede Görülen Kronik Akciğer Hastalığı Öyküsü ile SNP'lerin İlişkilendirilmesi

Bu çalışmada BPD ilişkisi araştırılan SNP'lerden rs1245560 (SNP8), rs1541364 (SNP12) ve rs2664352 (SNP23) polimorfizmleri ile ailede görülen kronik akciğer öyküsü arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı ilişkiler tespit edilmiştir. (sırasıyla $p=0,047$, $p=0,038$, $P=0,020$). Çizelge 3.12'de açıklandığı üzere, SNP8 için ailesinde kronik akciğer hastalığı görülen 16 hastanın 13'ünde CA+CC (%81,3) genotipi, 3'ünde ise AA (%18,8) genotipi gözlemlenirken; ailesinde kronik akciğer hastalığı gözlemlenmeyen 50 bireyden 23'ünde AA (%46) genotipi, 27'sinde ise CA+CC (%54) genotipi gözlemlendiği belirlenmiştir. Ailede görülen kronik akciğer öyküsü ile anlamlı bir ilişkisi saptanan bir diğer SNP ise rs1541364 (SNP12) olmuştur. AA genotipi, ailesinde kronik akciğer hastalığı görülen 14 hastanın 8'inde (%57,1) görülürken, ailesinde kronik akciğer hastalığı gözlemlenmeyen 55 hastanın 15'inde (%27,3) görülmüş; GA+GG genotipi ise ailesinde kronik akciğer hastalığı görülen 14 hastanın 6'sında (%42,9) görülürken, ailesinde kronik akciğer hastalığı gözlemlenmeyen 55 hastanın 40'ında (%72,7) görülmüştür. Ailede görülen kronik akciğer öyküsü ile anlamlı ilişkisi saptanan son SNP ise rs2664352 (SNP23) olmuştur. Ailesinde kronik akciğer hastalığı görülen 15 hastanın yalnızca 1'inde (%6,7) TT genotipi, 14'ünde (%93,3) ise TC+CC genotipi gözlemlenmiştir. Buna karşılık ailesinde kronik akciğer hastalığı gözlemlenmeyen 57 hastanın 21'inde (%36,8) TT genotipi, 36'sında (%63,2) ise TC+CC genotipi gözlemlenmiştir.

Son olarak, bu çalışmada hem genotip hem de allel düzeyinde yapılan analizlerde BPD hastalığı ile anlamlı bir ilişkisi olduğu saptanan rs833061 (SNP43) polimorfizminin ailede görülen kronik akciğer öyküsü ile ilişkisi araştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmaya çok yakın olduğu görülmüştür ($p=0,055$). Bu polimorfizm için ailesinde kronik akciğer hastalığı görülen 15 hastanın 7'sinde (%46,7) CC genotipi, 8'inde (%53,3) ise TC+TT genotipi gözlemlenmiştir. Ailesinde kronik akciğer öyküsü bulunmayan 52 hastanın ise 11'inde (%21,2) CC genotipi, 41'inde (%78,8) ise TC+TT genotipi gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.12 Ailede görülen kronik akciğer hastalığı öyküsü ile bu çalışmada istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunan polimorfizmleri gösteren çapraz tablolar

		SNP ID / No:	rs1245560 / SNP8		Toplam	p değeri	
		Genotip:	AA	CA+CC			
Ailede görülen kronik akciğer hastalığı öyküsü	Yok	Hasta sayısı	23	27	50	0,047	
		Yok grubundaki yüzdesi	%46	%54	%100		
	Var	Hasta sayısı	3	13	16		
		Var grubundaki yüzdesi	%18,8	%81,3	%100		
	Toplam	Hasta sayısı	26	40	66		
		Toplamdaki yüzdesi	%39,4	%60,6	%100		
			SNP ID / No:	rs1541364 / SNP12		Toplam	p değeri
			Genotip:	AA	GA+GG		
	Yok	Hasta sayısı	15	40	55	0,038	
		Yok grubundaki yüzdesi	%27,3	%72,7	%100		
	Var	Hasta sayısı	8	6	14		
		Var grubundaki yüzdesi	%57,1	%42,9	%100		
	Toplam	Hasta sayısı	23	46	69		
		Toplamdaki yüzdesi	%33,3	%66,7	%100		
			SNP ID / No:	rs2664352 / SNP23		Toplam	p değeri
			Genotip:	TT	TC+CC		
	Yok	Hasta sayısı	21	36	57	0,020	
		Yok grubundaki yüzdesi	%36,8	%63,2	%100		
	Var	Hasta sayısı	1	14	15		
		Var grubundaki yüzdesi	%6,7	%93,3	%100		
Toplam	Hasta sayısı	22	50	72			
	Toplamdaki yüzdesi	%30,6	%69,4	%100			
		SNP ID / No:	rs833061 / SNP43		Toplam	p değeri	
		Genotip:	CC	TC+TT			
Yok	Hasta sayısı	11	41	52	0,055		
	Yok grubundaki yüzdesi	%21,2	%78,8	%100			
Var	Hasta sayısı	7	8	15			
	Var grubundaki yüzdesi	%46,7	%53,3	%100			
Toplam	Hasta sayısı	18	49	67			
	Toplamdaki yüzdesi	%26,9	%73,1	%100			

3.5.4.2 Ailede Görülen Zatürre Hastalığı Öyküsü ile SNP'lerin İlişkilendirilmesi

Bu çalışmada elde edilen klinik ve demografik verilerin BPD ile ilişkilendirme çalışmalarında saptanan bir diğer ilişki de ailede görülen zatürre öyküsü ile rs1541364 (SNP12) ve rs55716084 (SNP30) polimorfizmleri arasında olmuştur (sırasıyla $p=0,010$, $p=0,014$).

Çizelge 3.13'te açıklandığı üzere ailesinde zatürre öyküsü görülen 4 hastanın 4'ünde de rs1541364 polimorfizminin AA genotipi gözlemlenirken, ailesinde zatürre öyküsü görülmeyen 65 hastanın 19'unda (%29,2) AA genotipi, 46'sında (%70,8) GA+GG genotipi gözlemlenmiştir.

Ayrıca ailesinde zatürre öyküsü görülen 4 hastanın 2'sinde (%50) rs55716084 polimorfizminin GG genotipi, diğer 2'sinde (%50) ise GA+AA genotipi gözlemlenirken; ailesinde zatürre öyküsü görülmeyen 67 hastanın 65'inde (%97) GG genotipi ve sadece 2'sinde (%3) GA+GG genotipleri gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.13 Ailede görülen zatürre öyküsü ile bu çalışmada istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunan polimorfizmleri gösteren çapraz tablolar

		SNP ID / No:	rs1541364 / SNP12		Toplam	p değeri	
		Genotip:	AA	GA+GG			
Ailede görülen zatürree öyküsü	Yok	Hasta sayısı	19	46	65	0,010	
		Yok grubundaki yüzdesi	%29,2	%70,8	%100		
	Var	Hasta sayısı	4	0	4		
		Var grubundaki yüzdesi	%100	%0	%100		
	Toplam	Hasta sayısı	23	46	69		
		Toplamdaki yüzdesi	%33,3	%66,7	%100		
			SNP ID / No:	rs55716084/SNP30		Toplam	p değeri
			Genotip:	GG	GA+AA		
	Yok	Hasta sayısı	65	2	67	0,014	
		Yok grubundaki yüzdesi	%97	%3	%100		
	Var	Hasta sayısı	2	2	4		
		Var grubundaki yüzdesi	%50	%50	%100		
	Toplam	Hasta sayısı	67	4	71		
		Toplamdaki yüzdesi	%94,4	%5,6	%100		

3.5.4.3 Ailede Görülen BPD ve RDS (Respiratory Distress Syndrome) Öyküsü ile SNP'lerin İlişkilendirilmesi

Bu çalışmada araştırılan polimorfizmler ile klinik ve demografik veriler arasında bulunan istatistiksel olarak anlamlı ilişkilerden bir diğeri de ailenin başka fertlerinde (kardeşler hariç tutularak, birinci ve ikinci derece yakın akrabalar dahil edilmiştir) de görülen BPD ve RDS öyküsü olmuş; rs11226613, rs3138053 ve rs4634985 kimlik numaralı polimorfizmler ile ilişkilendirilmiştir (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,042$ ve $p=0,047$). Çizelge 3.14'te de açıklandığı üzere rs11226613 (SNP6) polimorfizmi için ailenin diğer fertlerinde BPD ve RDS öyküsü görülmeyen 61 hastanın 33'ünde (%54,1) TT genotipi gözlemlenmişken 28'inde (%45,9) AT/AA görülmüş ancak ailenin diğer fertlerinde de BPD ve RDS öyküsü görülen 10 hastanın tamamında TT genotipi gözlemlenmiştir.

Benzer şekilde ailenin diğer fertlerinde BPD ve RDS öyküsü görülmeyen 59 hastanın 24'ünde (%40,7) rs3138053 (SNP24) polimorfizminin TT genotipi gözlemlenirken 35'inde (%59,3) CT/CC genotipi gözlemlenmiştir. Ancak ailenin diğer fertlerinde de BPD ve RDS öyküsü görülen 9 hastanın yalnızca 2'sinde (%22,2) CT/CC genotipi gözlenirken 7'sinde (%77,8) TT genotipi saptanmıştır.

Bununla birlikte, ailenin diğer bireylerinde BPD ve RDS öyküsü görülmeyen 43 hastanın 21'inde (%43,8) rs4634985 (SNP28) polimorfizminin CC genotipi görülürken 22'sinde (%56,3) TC/TT genotipi gözlemlenmiş ancak ailenin diğer bireylerinde de BPD ve RDS öyküsü görülen 5 hastanın tamamında TC/TT genotipine rastlanmıştır.

Son olarak, ailede görülen BPD ve RDS öyküsü ile rs6988306 polimorfizmi (SNP34) arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlılığa çok yakın bir ilişki tespit edilmiştir ($p=0,052$). Ailenin diğer bireylerinde BPD ve RDS öyküsü görülmeyen 61 hastanın 49'unda (%80,3) CC genotipi, 12'sinde (%19,7) ise TC/TT genotipi gözlemlenmiş ancak ailenin diğer bireylerinde de BPD ve RDS öyküsü görüldüğü 10 hastanın 5'inde (%50) TC/TT genotipi, diğer 5'inde (%50) ise CC genotipi görülmüştür.

Çizelge 3.14 Ailede görülen BPD ve RDS öyküsü ile bu çalışmada istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunan polimorfizmleri gösteren çapraz tablolar

SNP ID / No:		rs11226613 / SNP6		Toplam	p değeri
Genotip:		TT	AT / AA		
Ailede görülen (kardeş hariç) BPD ve RDS öyküsü	Yok	Hasta sayısı	33	28	61
		Yok grubundaki yüzdesi	%54,1	%45,9	%100
	Var	Hasta sayısı	10	0	10
		Var grubundaki yüzdesi	%100	%0	%100
	Toplam	Hasta sayısı	43	28	71
		Toplamdaki yüzdesi	%60,6	%39,4	%100
	SNP ID / No:		rs3138053 / SNP24		Toplam
	Genotip:		TT	CT / CC	
	Yok	Hasta sayısı	24	35	59
		Yok grubundaki yüzdesi	%40,7	%59,3	%100
	Var	Hasta sayısı	7	2	9
		Var grubundaki yüzdesi	%77,8	%22,2	%100
	Toplam	Hasta sayısı	31	37	68
		Toplamdaki yüzdesi	%45,6	%54,4	%100
	SNP ID / No:		rs4634985 / SNP28		Toplam
	Genotip:		CC	TC / TT	
	Yok	Hasta sayısı	21	22	43
		Yok grubundaki yüzdesi	%48,8	%51,2	%100
	Var	Hasta sayısı	0	5	5
		Var grubundaki yüzdesi	%0	%100	%100
	Toplam	Hasta sayısı	21	27	48
		Toplamdaki yüzdesi	%43,8	%56,3	%100
	SNP ID / No:		rs6988306 / SNP34		Toplam
	Genotip:		CC	TC / TT	
	Yok	Hasta sayısı	49	12	61
		Yok grubundaki yüzdesi	%80,3	%19,7	%100
	Var	Hasta sayısı	5	5	10
		Var grubundaki yüzdesi	%50	%50	%100
	Toplam	Hasta sayısı	54	17	71
		Toplamdaki yüzdesi	%76,1	%23,9	%100

3.5.4.4 Hastanın Kardeş(ler)inde de Görülen BPD Öyküsü ile SNP'lerin İlişkilendirilmesi

Bu çalışmada araştırılan SNP'ler ile hastanın kardeş(ler)inde de BPD görülme durumu arasındaki ilişki araştırıldığında rs11003125 (SNP5), rs1245560 (SNP8) ve rs833061 (SNP43) numaralı 3 SNP'nin istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gösterdiği saptanmıştır (sırasıyla $p=0,029$, $p=0,029$ ve $p=0,039$). rs11003125 (SNP5) polimorfizminin GG ve CG/CC genotipleri kardeşlerinde BPD görülmeyen 24 hastanın içerisinde eşit dağılmış ancak hastanın kardeşinde de BPD görülen 14 hastanın 12'sinde (%85,7) CG/CC genotipi gözlemlenirken yalnızca 2'sinde (%14,3) GG genotipi görülmüştür.

Buna ek olarak, rs1245560 (SNP8) polimorfizminin AA genotipi, kardeşinde de BPD görülen 13 hastanın 7 'sinde (%53,8) görülürken kardeşlerinde BPD görülmeyen 23 hastanın yalnızca 4'ünde görülmüştür (%17,4). Buna karşılık CA/CC genotipi ise kardeşlerinde BPD görülmeyen 23 hastanın 19'unda (%82,6) görülürken kardeşlerinde de BPD görülen 13 hastanın 6'sında (%46,2) gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada hastanın kardeşlerinde de görülen BPD durumu ile ilişkisi tespit edilen son SNP ise rs833061 (SNP43) polimorfizmi olmuştur. Bu polimorfizmin TC/TT genotipi, kardeşlerinde de BPD görülen 13 hastanın 12'inde (%92,3) de görülürken, kardeşlerinde BPD görülmeyen 22 hastanın 13'ünde (%59,1) gözlemlenmiştir. CC genotipi ise kardeşlerinde de BPD görülen 13 hastanın yalnızca 1'inde (%7,7) görülürken, kardeşlerinde BPD görülmeyen 22 hastanın 9'unda (%40,9) saptanmıştır (Çizelge 3.15).

Çizelge 3.15 Hastanın kardeş(ler)inde de görülen BPD öyküsü ile bu çalışmada istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunan polimorfizmleri gösteren çapraz tablolar

Hastanın kardeşlerinde de görülen BPD öyküsü	SNP ID / No:		rs11003125 / SNP5		Toplam	p değeri
	Genotip:		GG	CG/CC		
	Yok	Hasta sayısı	12	12	24	0,029
		Yok grubundaki yüzdesi	%50	%50	%100	
	Var	Hasta sayısı	2	12	14	
		Var grubundaki yüzdesi	%14,3	%85,7	%100	
	Toplam	Hasta sayısı	14	24	38	
		Toplamdaki yüzdesi	%36,8	%63,2	%100	
	SNP ID / No:		rs1245560 / SNP8		Toplam	p değeri
	Genotip:		AA	CA/CC		
	Yok	Hasta sayısı	4	19	23	0,029
		Yok grubundaki yüzdesi	%17,4	%82,6	%100	
	Var	Hasta sayısı	7	6	13	
		Var grubundaki yüzdesi	%53,8	%46,2	%100	
	Toplam	Hasta sayısı	11	25	36	
		Toplamdaki yüzdesi	%30,6	%69,4	%100	
	SNP ID / No:		rs833061 / SNP43		Toplam	p değeri
	Genotip:		CC	TC/TT		
	Yok	Hasta sayısı	9	13	22	0,039
		Yok grubundaki yüzdesi	%40,9	%59,1	%100	
	Var	Hasta sayısı	1	12	13	
		Var grubundaki yüzdesi	%7,7	%92,3	%100	
	Toplam	Hasta sayısı	10	25	35	
		Toplamdaki yüzdesi	%28,6	%71,4	%100	

3.5.4.5 Ailede Düzenli Sigara Kullanımı ile SNP'lerin İlişkilendirilmesi

Bu çalışmada araştırılan polimorfizmleri ile hastalardan elde edilen demografik veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunan son başlık, hastanın anne veya babasının düzenli sigara kullanması durumu ile rs699947 (SNP35) ve rs833061 (SNP43) polimorfizmleri arasındaki ilişki olmuştur (sırasıyla p=0,028 ve p=0,009).

Çizelge 3.16'da açıklandığı üzere, rs699947 (SNP35) polimorfizminin CC genotipi ailesi sigara kullanan 27 hastanın 4'ünde (%14,8) görülürken CA/AA genotipi 23'ünde (%85,2)

gözlemlenmiştir. Buna karşılık ailesi hiç sigara kullanmamış 41 hastanın 16'sında (%39) CC genotipi görülürken 25'inde (%61) CA/AA genotipi saptanmıştır.

Benzer şekilde rs833061 (SNP43) polimorfizmi incelendiğinde ise ailesi düzenli sigara kullanan 27 hastanın 12'sinde (%44,4) CC genotipi, 15'inde (%55,6) ise TC/TT genotipi gözlemlenmiştir. Ailesi hiç sigara kullanmamış 40 hastanın durumuna bakıldığında ise 34'ünün (%85) TC/TT genotipinde ve yalnızca 6'sının (%15) CC genotipinde oldukları saptanmıştır.

Çizelge 3.16 Ailede görülen düzenli sigara kullanımı ile bu çalışmada istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunan polimorfizmleri gösteren çapraz tablolar

		SNP ID / No:	rs699947 / SNP35		Toplam	p değeri
		Genotip:	CC	CA/AA		
Ailede düzenli sigara kullanımı durumu	Yok	Hasta sayısı	16	25	41	0,028
		Yok grubundaki yüzdesi	%39	%61	%100	
	Var	Hasta sayısı	4	23	27	
		Var grubundaki yüzdesi	%14,8	%85,2	%100	
	Toplam	Hasta sayısı	20	48	68	
		Toplamdaki yüzdesi	%29,4	%70,6	%100	
	SNP ID / No:		rs833061 / SNP43		Toplam	p değeri
	Genotip:		CC	TC/TT		
	Yok	Hasta sayısı	6	34	40	0,009
		Yok grubundaki yüzdesi	%15	%85	%100	
	Var	Hasta sayısı	12	15	27	
		Var grubundaki yüzdesi	%44,4	%55,6	%100	
	Toplam	Hasta sayısı	18	49	67	
		Toplamdaki yüzdesi	%26,9	%73,1	%100	

4.1 Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi

Bronkopulmoner displazi (BPD), preterm infantlarda en sık görülen kronik akciğer hastalıklarından biridir [1]. Hamileliğin 30. haftasından önce doğan preterm infantların %30'undan fazlasına BPD teşhisi konmaktadır [11].

BPD oluşma eğilimi olan preterm infantlar, akciğer gelişiminin geç kanaliküler veya erken sakküler evresinde doğarlar. Geç kanaliküler evrede primitif alveoller ve alveolar kapiller bariyer gelişir, Tip 1 ve Tip 2 pnömositler farklılaşırlar [44]. Erken sakküler evrede ise pulmoner vaskülerizasyon ve terminal hava yollarının genişlemesi ile birlikte sürfaktan üretimi başlar [37, 38]. Sakküler evrede primitif alveoller oluşmaya başlar ve buna ağılı olarak kapiller membran değişmeye başlar. Bu haftalarda doğan infantlarda akciğerlerin bu gelişimi duraklar ve sonuçta alveol sayıları matür bebeklere göre daha az olur. Günümüzde enflamasyon ve özellikle prematürite ile birlikte alveol gelişimindeki duraklama, sürfaktan eksikliği ve göğüs duvarının olgunlaşmaması BPD'nin en önemli etiyolojik faktörleri olarak görülmektedirler [45-47].

BPD, genetik ve çevresel faktörlerin (hiperoksi, invazif mekanik ventilasyon ve sepsis) karşılıklı etkileşimi sonucunda meydana gelmektedir [49-52]. BPD'ye yatkınlığın %50-80'inin de genetik eğilime dayandığı düşünülmektedir [53, 54]. Genetik eğilimli olgunlaşmamış akciğer, prenatal ve postnatal enfeksiyon, hiperoksi, ventilasyon ile indüklenmiş barotavma, alveolar distansiyon (valutravma) veya atelektotravma gibi

zararlı dış faktörlere maruz kaldığında, çeşitli sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri sinyalleri ve enflamatuar hücreleri içeren bir enflamasyon zincirini tetikler. Bu durum hücre ölüm yollarını aktive eder. Bu durum, “Yeni BPD”nin de tanımı olan, gelişmemiş alveolarizasyon ve düzensiz vaskülerizasyona yol açmaktadır [49, 51, 55].

Literatürdeki pek çok çalışmada, akut ve kronik BPD’den sorumlu olduğu düşünülen potansiyel patofizyolojik yollar veya moleküller belirlenmiştir. Araştırmacılar buna göre, BPD gelişme riski ile hedef genlerdeki spesifik dizi değişiklikleri (SNP) arasındaki ilişkiyi değerlendirmektedirler. 2006’dan bu yana literatürde yayınlanan polimorfizm çalışmaları genellikle benzer karakteristikler göstermektedirler. Çalışmaların çoğunda 100’den az sayıda BPD hastası dahil edilmiştir. Pek çok çalışmada BPD hastası infantlar, kendileri gibi preterm infantlar ile karşılaştırılmak yerine, zamanında veya geç doğan infantlarla, hatta bazı durumlarda yetişkinler ile karşılaştırılmışlardır. Bu tip çalışmalarda bulunan ilişkiler, BPD’den çok prematürite ile ilgili katkı sağlayabilir. Ayrıca pek çok farklı gen araştırılmış olsa da, çok az çalışma tek bir geni veya gen setini çalışmıştır. Bu yüzden 2006’dan bu yana yapılan çalışmalar pek çok geni olası hedefler olarak gösterebilir de, BPD’nin etiyolojik kaynağı olan bir gen veya gen yolağı henüz kesin olarak bulunmamıştır [60].

Bu tez çalışmasında, dünyada farklı populasyonlar üzerinde yapılmış çalışmalarda bronkopulmoner displazi (BPD) ile ilişkilendirilmiş SNP’lerin seçilmiş ve Türk populasyonunda da bu SNP allel ve genotip frekanslarının görülüp görülmediği multipleks reaksiyonlar ve MALDI-TOF kütle spektrometrisi yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler ayrıca hastaların klinik ve demografik bilgileri ile de karşılaştırılarak anlamlı bir ilişki kurulmaya çalışılmış ve BPD’nin Türk toplumuna özgü genetik tabanının anlaşılabilmesine katkıda bulunulması amaçlanmıştır. Bu amaçla literatür taramaları sonucunda BPD insidansı ile ilişkisi olma ihtimali yüksek görülen 45 SNP (Çizelge 3.3’te listelenmiştir) bölgesi, 96 BPD hastası ve 96 sağlıklı prematüre infantta genotiplenmiş ve BPD ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki araştırılmıştır. Çizelge 3.8’de de açıklandığı üzere araştırılan SNP’lerden 8’inin (rs11003125, rs2233406, rs3138053, rs4883955, rs55716084, rs62468577, rs833061 ve rs9953270) Türk populasyonu için allel düzeyinde BPD insidansı ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki içerisinde olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte araştırılan SNP’ler genotip düzeyinde incelendiğinde, allel düzeyinde de

risk taşıdığı saptanan 2 SNP’de (rs4883955 ve rs9953270) genotip düzeyinde de Türk popülasyonu için BPD insidansı ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Hem allel hem de genotip düzeyinde BPD ile anlamlı bir ilişkisi olduğu görülen bu SNP’ler sırasıyla KLF12 ve CHST9 genleri üzerinde bulunmaktadır. KLF12 geni hücre siklusunda G1/S geçişini destekleyerek hücrelerin anoikis sürecine başlayama hassaslaştırmaktadır. KLF12 geninin susturulmasının akciğer kanseri hücrelerinin hayatta kalma oranını arttırdığı deneysel fare modellerinde gösterilmiştir. Ayrıca KLF12 geninin ekspresyonunun düşmesi akciğer kanseri hastalarında hayatta kalma oranını da azaltmaktadır [142].

Biyoinformatik araçlar kullanılarak bu genlerin birbiri ile fonksiyonel ilişkileri ve görev aldıkları metabolik yollar incelendiğinde, CHST9 geni tarafından kodlanan proteinin golgi membranında konumlanarak N-glikanlar ve O-glikanlarda bulunan N-asetilgalaktozamin (GalNAc) kalıntılarındaki sülfatın 4 numaralı pozisyona transferini kataliz ettiği görülmüştür. Karbonhidratlar üzerindeki sülfat grupları glikoproteinlere, glikolipidlere ve proteoglikanlara yüksek spesifiklikte fonksiyonlar kazandırmakta ve hücreler arası etkileşimde, sinyal aktarımında ve embriyonik gelişimde oldukça kritik fonksiyon görmektedirler. Bununla birlikte KLF12 geni ise nitrojen bileşiklerinin metabolik süreçlerinin regülasyonunda görev almaktadır [131-134].

Elde edilen verilerin ışığında, bu genler üzerinde bulunan ve genin ekspresyonunu etkileyecek bir polimorfizmin, bu yolları da etkileyerek epitelial ve endotelial hücrelerin proliferasyon ve migrasyon süreçlerini değiştirebileceği ve akciğer gelişim evrelerinde bozukluklara yol açabileceği önerilebilir. Bununla birlikte, NO’nun BPD’de dahil bazı inflamatuvar solunum hastalıklarında önemli rol oynadığını literatürde rapor eden yayınlar mevcuttur. Bu yayınlarda BPD hastalarında epitelial indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) miktarında anlamlı bir artış olduğu, normal NO metabolizmasında da bir alterasyon olduğu ve NO’nun üretimindeki bu değişikliklerin sitotoksik metabolitleri ortaya çıkararak hücre sinyal yollarını bozabileceği, sürfaktan aktivasyonuna yol açabileceği ve BPD patolojisine katkı sağlayabileceği rapor edilmiştir. Buna ek olarak, ileride BPD gelişen preterm infantların hayatlarının ilk aylarında plazmalarındaki 3-nitrotirosin miktarında artış görüldüğü de rapor edilmiştir [145-151].

Daha önce de bahsedildiği gibi bu çalışmada hem allel hem de genotip düzeyinde Türk populasyonunda BPD insidansı ile KLF12 geni üzerinde bulunan rs4883955 polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişkisi bulunmuştur. Bu polimorfizmin KLF12 geninin ekspresyonuna bir etkisi olması durumunda, KLF12'nin WNT5A geni ile fonksiyonel bir ilişki içerisinde etkide bulunduğu nitrojen bileşiklerin metabolik süreçlerinin regülasyonun da bu durumdan etkilenebileceği [131-133] ve bu şekilde rs4883955 polimorfizmi dolaylı olarak nitrojen metabolizmasını etkileyerek BPD patolojisinde de önemli bir rol üstlenebileceği önerisinde bulunulabilir.

Bu çalışmada Türk populasyonunda BPD ile allel ve/veya genotip düzeyinde anlamlı ilişkisi bulunan polimorfizmlerin üzerlerinde bulundukları genlerden MBL2, VEGFA, NFKBIA, KLF12 ve CHST9'un tamamının WNT5A geni ile fonksiyonel bir ilişki içerisinde bulundukları sonucu, BPD hastalarında WNT5A geninin ekspresyonunun kontrol grupları ile karşılaştırılarak araştırılması gerektiğini işaret etmektedir. Literatürdeki bazı çalışmalarda da WNT5A geninin akciğer morfogenezinde ve akciğerlerin olgunlaşmasında kritik rol oynadığının rapor edilmesi [152, 153], SNP ilişkili gen ifade yollarının takip edilerek hastalık ile ilişkilendirebileceği hipotezini güçlendirmektedir.

4.2 Öneriler

Bu tez çalışması ile elde edilen sonuçların, ileri çalışmalar ile detaylandırılması için önerilen konular şu şekilde sıralanabilir;

1. Çalışmada Türk populasyonunda görülen BPD insidansı ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilen polimorfizmlerin, örnek sayısının arttırılarak bu polimorfizmlerin BPD ile olan ilişkilerinin daha güçlü bir şekilde teyit edilmesi,
2. BPD hastası ikiz ve üçüz bireylerin sayılarının arttırılarak, kontrol grubu ile karşılaştırmalı analizlerinin daha büyük çalışma populasyonlarında tekrar edilmesi,
3. Bu çalışmada istatistiksel olarak BPD insidansı ile ilişkisi olduğu tespit edilen polimorfizmlerin, üzerlerinde bulundukları genlerin ekspresyonuna etkisi olup olmadıklarının anlaşılabilmesi için, hasta ve kontrol gruplarında bu genlerin ekspresyonu analizlerinin gerçekleştirilmesi,
4. Bu çalışmada BPD ile anlamlı ilişkisi olduğu tespit edilen polimorfizmlerin üzerlerinde bulundukları genlerin fonksiyonel ilişki ağlarının WNT5A geninin etrafında

toplanmış olması sebebiyle, özellikle WNT5A geninin ekspresyonunun ve nitrojen metabolizmasına olan etkilerinin ileri çalışmalar ile hem bu tez çalışmasındaki çalışma populasyonunda tekrarlanması hem de yeni çalışma populasyonları üzerinde araştırılması,

5. Araştırılan klinik ve demografik verilerden BPD ile ilişkisi tespit edilen polimorfizmlerin BPD ile fonksiyonel ilişkisinin araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Baraldi, E., Carraro, S. ve Filippone, M., (2009). "Bronchopulmonary dysplasia: definitions and long-term respiratory outcome", *Early Human Development*, 85(10 Suppl):S1–S3.
- [2] Northway, W.H., Jr Rosan, R.C. ve Porter, D.Y., (1967). "Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease Bronchopulmonary dysplasia", *The New England Journal of Medicine*, 276(7):357–368.
- [3] Jobe, A.H. ve Bancalari, E., (2001). "Bronchopulmonary dysplasia", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163(7): 1723-1729.
- [4] Bancalari, E., Claure, N. ve Sosenko, I.R., (2003). "Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition", *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 8: 63-71.
- [5] Rojas, M.A., Gonzalez, A., Bancalari, E., Claure, N., Poole, C. ve Silva-Neto, G., (1995). "Changing trends in the epidemiology and pathogenesis of neonatal chronic lung disease", *Journal of Pediatrics*, 126: 605-10.
- [6] Gough, A., Linden, M., Spence, D., Patterson, C.C., Halliday, H.L. ve McGarvey, L.P., (2014). "Impaired lung function and health status in adult survivors of bronchopulmonary dysplasia", *European Respiratory Society*, 43(3):808–816.
- [7] Gibson, A.M., Reddington, C., McBride, L., Callanan, C., Robertson, C. ve Doyle, L.W., (2014). "Lung function in adult survivors of very low birth weight, with and without bronchopulmonary dysplasia", *Pediatric Pulmonology*.
- [8] Stern, D.A., Morgan, W.J., Wright, A.L., Guerra, S. ve Martinez, F.D., (2007). "Poor airway function in early infancy and lung function by age 22 years: a non-selective longitudinal cohort study", *The Lancet*, 370(9589):758–764.
- [9] Jobe, A.H. ve Bancalari, E. (2001). "Bronchopulmonary dysplasia", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163: 1723-9.
- [10] Avery, M.E., Tooley, W.H., Keller, J.B., Hurd, S.S., Bryan, M.H., Cotton, R.B., Epstein, M.F., Fitzhardinge, P.M., Hansen, C.B. ve Hansen, T.N., (1987). "Is chronic lung disease in low birth weight infants preventable? A survey of eight centers", *Pediatrics*, 79: 26-30.

- [11] Gortner, L. Ve Misselwitz, B., (2011). "Rates of bronchopulmonary dysplasia in very preterm neonates in Europe: results from the MOSAIC cohort", *Neonatology*, 99:112–117.
- [12] Lemons, J.A., Bauer, C.R., Oh, W., Korones, S.B., Papile, L.A., Stoll, B.J., (2001). "Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, January 1995 through December 1996", *NICHD Neonatal Research Network, Pediatrics*, 2001; 107: 1.
- [13] Klinger, G., Sokolover, N., Boyko V., Sirota, L., Lerner-Geca, L. ve Reichman, B. (2013). "Perinatal risk factors for bronchopulmonary dysplasia in a national cohort of very-low-birthweight infants", *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 208:115.e111–e115.
- [14] Isayama, T., Lee, S.K., Mpri, R., Kusuda, S., Fujimura, M., Ye, X.Y. ve Shah P.S. (2012). "Comparison of mortality and morbidity of very low birth weight infants between Canada and Japan", *Pediatrics* 130:e957–e965.
- [15] Horbar, J.D., Carpenter, J.H., Badger, G.J., Kenny, M.J., Soll, R.F., Morrow, K.A. ve Buzas, J.S. (2012). "Mortality and neonatal morbidity among infants 501 to 1500 grams from 2000 to 2009", *Pediatrics* 129:1019–1026.
- [16] Walsh, M., Laptook, A., Kazzi, S.N., Engle, W.A., Yao, Q., Rasmussen, M., Buchter, S., Heldt, G., Rhine, W., Higgins, R. ve Poole, K., (2007). "A cluster-randomized trial of benchmarking and multimodal quality improvement to improve rates of survival free of bronchopulmonary dysplasia for infants with birth weights of less than 1250 grams", *Pediatrics*, 119:876–890.
- [17] Payne, N.R., LaCorte, M., Karna, P., Chen, S., Finkelstein, M., Goldsmith, J.P. ve Carpenter, J.H., (2006). "Reduction of bronchopulmonary dysplasia after participation in the breathsavers group of the Vermont Oxford Network neonatal intensive care quality improvement collaborative", *Pediatrics* 118: S73–S77.
- [18] Payne, N.R., LaCorte, M., Sun, S., Karna, P., Lewis-Hunstiger, M. ve Goldsmith, J.P., (2006). "Evaluation and development of potentially better practices to reduce bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight infants", *Pediatrics* 118: S65–S72.
- [19] Zeitlin, J., Draper, E.S., Kollée, L., Milligan, D., Boerch, K., Agostino, R., Gortner, L., Van Reempts, P., Chabernaude, J.L., Gadzinowski, J., Bréart, G. ve Papiernik, E., (2008). "Differences in rates and short-term outcome of live births before 32 weeks of gestation in Europe in 2003: results from the MOSAIC Cohort", *Pediatrics* 121:e936–944.
- [20] Choi, C.W., Kim, B.I., Kim, E.K., Song, E.S. ve Lee, J.J., (2012). "Incidence of bronchopulmonary dysplasia in Korea", *Journal of Korean Medical Science*, 27:914.
- [21] Rojas, M.X., Rojas, M.A., Lozano, J.M., Rondón, M.A. ve Charry, L.P., (2012). "Regional variation on rates of bronchopulmonary dysplasia and associated risk factors", *International Scholarly Research Notices Pediatrics*, 2012:1–9.

- [22] Çakmak, F., Aygün, C., Tanyeri, B., Beden, Ü., Küçüködük, Ş., Çetinoğlu, E. ve Aksakal, E., (2007). "Yenidoğan yoğun bakım ünitesinde izlenen çok düşük ağırlıklı bebeklerde morbidite ve mortalite", *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 24:81-89.
- [23] Gülcan, H., Üzümlü, İ., Aslan, S. ve Yoloğlu, S., (2004). "İnönü Üniversitesi yenidoğan yoğun bakım ünitesi-sinde izlenen çok düşük doğum ağırlıklı preterm olgularımızın değerlendirilmesi", *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 11:19-23.
- [24] Kul, M., Saldır, M., Gülgün, M. ve Alpay, F., (2005). "Retrospective evaluation of low birth weight newborns followed up with the diagnosis of respiratory distress syndrome in the newborn intensive care unit", *Gülhane Medical Journal*, 47:290-293.
- [25] Yurttutan, S., Korkmaz, A., Yiğit, Ş., Yurdakök, M. Ve Tekinalp, G., (2011). "Bronkopulmoner displazili bebeklerin kısa ve uzun süreli izlemi: on yıllık deneyim", *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 54:1-15.
- [26] Tansuğ, N., (2004). "Bronkopulmoner Displazi", Yurdakök M, Erdem G (Editörler), *Neonatoloji*. 2.Baskı. Alp Ofset I. p. 495-9.
- [27] Walsh, M.C., Yao, Q., Gettner, P., Hale, E., Collins, M., Hensman, A., Everette, R., Peters, N., Miller, N., Muran, G., Auten, K., Newman, N., Rowan, G., Grisby, C., Arnell, K., Miller, L., Ball, B. ve McDavid, G., (2004). "Impact of a physiologic definition on bronchopulmonary dysplasia rates", *Pediatrics*, 114: 1305-11.
- [28] Kinsella, J.P., Greenough, A. ve Abman, S.A., (2006). "Bronchopulmonary dysplasia", *Lancet*; 367: 1421-31.
- [29] Bhandari, A. ve Panitch, H.B., (2006). "Pulmonary outcomes in bronchopulmonary dysplasia", *Seminars in Perinatology*; 30: 219-26.
- [30] Ehrenkranz, R.A., Walsh, M.C., Vohr, B.R., Jobe, A.H., Wright, L.L., Fanaroff, A.A., Wraga, L.A. ve Poole, K., (2005). "Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia", *Pediatrics*, 116: 1353-60.
- [31] Kaempf, J.W., Campbell, B., Brown, A., Bowers, K., Gallegos, R. ve Goldsmith, J.P., (2008). "PCO₂ and room air saturation values in premature infants at risk for bronchopulmonary dysplasia", *Journal of Perinatology*, 28:48-54.
- [32] Klinger, G., Sirota, L., Lusky, A., Reichman, B., (2006). "Bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight infants is associated with prolonged hospital stay", *Journal of Perinatology*, 26:640-644.
- [33] Nievas, F.F. ve Chernick, V., (2002). "Bronchopulmonary dysplasia (chronic lung disease of infancy): an update for the pediatrician", *Clinical Pediatrics*, 41: 77-85.
- [34] American Academy of Pediatrics and Canadian Paediatric Society, (2002). "Postnatal corticosteroids to treat or prevent chronic lung disease in preterm infants", *Pediatrics*, 109: 330-8.

- [35] Botet, F., Figueras-Aloy, J., Miracle-Echegoyen, X., Rodríguez-Miguélez, J.M., Salvia-Roiges, M.D., Carbonell-Estrany, X., (2012). "Trends in survival among extremely-low-birth-weight infants (less than 1000 g) without significant bronchopulmonary dysplasia", *BMC Pediatrics*, 12:63–70.
- [36] Costeloe, K.L., Hennessy, E.M., Haider, S., Stacey, F., Marlow N. ve Draper, E.S., (2012). "Short term outcomes after extreme preterm birth in England: comparison of two birth cohorts in 1995 and 2006 (the EPICure studies)", *BMJ*, 345:e7976.
- [37] Kotecha, S., (2000). "Lung growth: implications for the newborn infant", *Archives of Disease in Childhood Fetal Neonatal Edition*, 82(1):F69–74.
- [38] Maeda, Y., Dave, V. ve Whitsett, J.A., (2007). "Transcriptional control of lung morphogenesis", *Physiological Reviews* 87(1): 219–44.
- [39] Warburton, D., El-Hashash, A., Carraro, G., Tiozzo, C., Sala, F., Rogers, O., De Langhe, S., Kemp, P.J., Riccardi, D., Torday, J., Bellusci, S., Shi, W., Lubkin, S.R. ve Jesudason, E., (2010). "Lung Organogenesis", *Current Topics in Developmental Biology*, 90: 73–158.
- [40] Hashimoto, S., Nakano, H., Singh, G. ve Katyal, S., (2002). "Expression of sprout and sproutin in developing rat lung", *Mechanisms of Development*, 119 (Ek-1):S303–S309.
- [41] Lu, M.M., Li, S., Yang, H. ve Morrissey, E.E., (2002). "Foxp4: A novel member of the Foxp subfamily of winged-helix genes co-expressed with Foxp1 and Foxp2 in pulmonary and gut tissues", *Mechanisms of Development*, 119 (Ek-1):S197–S202.
- [42] Berger, J. ve Bhandari, V., (2014). "Animal models of bronchopulmonary dysplasia. The term mouse models", *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 307(12):L936–47.
- [43] Kho, A.T., Bhattacharya, S., Mecham, B.H., Hong, J., Kohane, I.S. ve Mariani, T.J., (2009). "Expression profiles of the mouse lung identify a molecular signature of time-to-birth", *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 40:47–57.
- [44] Balany, J. ve Bhandari, V., (2015). "Understanding the impact of infection, inflammation, and their persistence in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia", *Frontiers in Medicine*, 2:90.
- [45] Koç, E., (2004). "Yeni Bronkopulmoner Displazi" *T Klin J Ped*, 2: 396-402.
- [46] Gardner, S.L., Carter, B.S., Hines, E. ve Hernandez J.H., (2011). "Neonatal Intensive Care", Seventh Edition, Mosby Elsevier, USA.
- [47] Eber, E. ve Zach, M.S., (2001). "Long term sequelae of bronchopulmonary dysplasia (chronic lung disease of infancy)", *Thorax*, 56:317-23.
- [48] Özkan, H., Köksal, N., Çetinkaya, M. ve Canitez, Y., (2008). "Bronkopulmoner Displazide Risk Faktörleri", *Güncel Pediatri*, 6: 66-71.
- [49] Bhandari, A. ve Bhandari, V., (2011). "New bronchopulmonary dysplasia: a clinical review", *Clinical Pulmonary Medicine*, 18(3):137–43.

- [50] Baraldi, E. ve Filippone, M., (2007). "Chronic lung disease after premature birth", *The New England Journal of Medicine*, 357(19):1946–55.
- [51] Bhandari, A. ve Bhandari, V., (2009). "Pitfalls, problems, and progress in bronchopulmonary dysplasia", *Pediatrics* 123(6):1562–73.
- [52] Bhandari, V., (2014). "Postnatal inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia", *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 100(3):189–201.
- [53] Bhandari, V., Bizzarro, M.J., Shetty, A., Zhong, X., Page, G.P., Zhang, H., Ment, L.R. ve Gruen, J.R., (2006). "Familial and genetic susceptibility to major neonatal morbidities in preterm twins", *Pediatrics*, 117(6):1901–6.
- [54] Lavoie, P.M., Pham, C. ve Jang, K.L., (2008). "Heritability of bronchopulmonary dysplasia, defined according to the consensus statement of the national institutes of health", *Pediatrics*, 122(3):479–85.
- [55] de Paepe, M.E., (2016). "Pathology of bronchopulmonary dysplasia" Derleyen: Bhandari V, *Bronchopulmonary Dysplasia, Respiratory Medicine*, İsviçre: Springer p. 149–64.
- [56] Tooley, W.H., (1979). "Epidemiology of bronchopulmonary dysplasia", *Journal of Pediatrics*, 95(5 Pt 2):851–858.
- [57] Shennan, A.T., Dunn, M.S., Ohlsson, A., Lennox, K. ve Hoskins, E.M., (1988). "Abnormal pulmonary outcomes in premature infants: prediction from oxygen requirement in the neonatal period", *Pediatrics*, 82(4):527–532.
- [58] Walsh, M.C., Wilson-Costello, D., Zadell, A., Newman, N. ve Fanaroff, A., (2003). "Safety, reliability, and validity of a physiologic definition of bronchopulmonary dysplasia", *Journal of Perinatology*, 23(6):451–456.
- [59] Lal, C.V. ve Ambalavanan, N., (2015). "Genetic Predisposition to Bronchopulmonary Dysplasia", *Seminars in Perinatology*, 39(8): 584–591.
- [60] Shaw, G.M. ve O'Brodovich, H.M., (2013). "Progress in understanding the genetics of Bronchopulmonary Dysplasia, *Seminars in Perinatology*, 37(2): 85–93.
- [61] Czyz, W., Morahan, J.M., Ebers, G.C. ve Ramagopalan, S.V., (2012). "Genetic, environmental and stochastic factors in monozygotic twin discordance with a focus on epigenetic differences", *BMC Medicine*, 10:93.
- [62] Parker, R.A., Lindstrom, D.P. ve Cotton, R.B., (1996). "Evidence from twin study implies possible genetic susceptibility to bronchopulmonary dysplasia", *Seminars in Perinatology*, 20:206–209.
- [63] Pavlovic, J., Papagaroufalos, C., Xanthou, M., Liu, W., Fan, R., Thomas, N.J., Apostolidou, I., Papathoma, E., Megaloyianni, E., DiAngelo, S. ve Floros, J., (2006). "Genetic variants of surfactant proteins A, B, C, and D in bronchopulmonary dysplasia", *Disease Markers*, 2006; 22:277–291.
- [64] Bernstein, B.E., Birney, E., Dunham, I., Green, E.D., Gunter, C. ve Snyder, M., (2012). "An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome", *Nature*, 489:57–74.

- [65] Hadchouel, A., Durrmeyer, X., Bouzigon, E., Incitti, R., Huusko, J., Jarreau, P.H., Lenclen, R., Demenais, F., Franco-Montoya, M.L., Layouni, I., Patkai, J., Bourbon, J., Hallman, M., Danan, C. ve Delacourt, C., (2011). "Identification of SPOCK2 as a susceptibility gene for bronchopulmonary dysplasia", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184:1164–1170.
- [66] Mahlman M., Karjalainen M.K., Huusko J.M., Andersson S., Kari M.A., Tammela O.K.T., Sankilampi U., Lehtonen L., Marttila R.H., Bassler D., Poets C.F., Lacaze-Masmonteil T., Danan C., Delacourt C., Palotie A., Muglia L.J., Lavoie P.M., Hadchouel A., Rämet M. ve Hallman M., (2017). "Genome-wide association study of bronchopulmonary dysplasia: a potential role for variants near the CRP gene", *Nature Scientific Reports*, 7: 9271.
- [67] Ryckman, K.K., Dagle, J.M., Kelsey, K., Momany, A.M. ve Murray, J.C., (2012). "Genetic associations of surfactant protein D and angiotensin-converting enzyme with lung disease in preterm neonates", *Journal of Perinatology*, 32:349–355.
- [68] Floros, J., Londono, D., Gordon, D., Silveyra, P., Diangelo, S.L., Viscardi, R.M., Worthen, G.S., Shenberger, J., Wang, G., Lin, Z. ve Thomas, N.J., (2012). "IL-18R1 and IL-18RAP SNPs may be associated with bronchopulmonary dysplasia in African-American infants", *Pediatric Research*, 71:107–114.
- [69] Krueger, M., Heinzmann, A., Mailaparambil, B., Hartel, C. ve Gopel, W., (2011). "Polymorphisms of interleukin 18 in the genetics of preterm birth and bronchopulmonary dysplasia", *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition*, 96:F299–F300.
- [70] Mailaparambil, B., Krueger, M., Heizmann, U., Schlegel, K., Heinze, J. ve Heinzmann, A., (2010). "Genetic and epidemiological risk factors in the development of bronchopulmonary dysplasia", *Disease Markers*. 29:1–9.
- [71] Chen H. ve Zheng W., (2018). "Association of cytokine gene polymorphisms with bronchopulmonary dysplasia in Han Chinese newborns", *Pediatric Pulmonology*, Ocak; 53(1):50-56.
- [72] Giusti, B., Vestri, A., Poggi, C., Magi, A., Pasquini, E., Abbate, R. ve Dani, C., (2012). "Genetic polymorphisms of antioxidant enzymes as risk factors for oxidative stress-associated complications in preterm infants", *Free Radic Res*. 2012; 46:1130–1139.
- [73] Sampath, V., Garland, J.S., Le, M., Patel, A.L., Konduri, G.G., Cohen, J.D., Simpson, P.M. ve Hines, R.N., (2012). "A TLR5 (g.1174C > T) variant that encodes a stop codon (R392X) is associated with bronchopulmonary dysplasia", *Pediatric Pulmonology*, 47:460–468.
- [74] Lavoie, P.M., Ladd, M., Hirschfeld, A.F., Huusko, J., Mahlman, M., Speert, D.P., Hallman, M., Lacaze-Masmonteil, T. ve Turvey, S.E., (2012). "Influence of common non-synonymous Toll-like receptor 4 polymorphisms on bronchopulmonary dysplasia and prematurity in human infants", *PLoS One*, 7:e31351.

- [75] Prencipe, G., Auriti, C., Inglese, R., Devito, R., Ronchetti, M.P., Seganti, G., Rava, L., Orzalesi, M. ve De, B.F., (2011). "A polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor promoter is associated with bronchopulmonary dysplasia", *Pediatric Research*, 69:142–147.
- [76] Kwinta, P., Bik-Multanowski, M., Mitkowska, Z., Tomasik, T., Legutko, M. ve Pietrzyk, J.J., (2008). "Genetic risk factors of bronchopulmonary dysplasia", *Pediatric Research*, 64:682–688.
- [77] Mailaparambil, B., Krueger, M., Heizmann, U., Schlegel, K., Heinze, J. ve Heinzmann A., (2010). "Genetic and epidemiological risk factors in the development of bronchopulmonary dysplasia", *Disease Markers*, 29 1–9,
- [78] Hadchouel, A., Decobert, F., Franco-Montoya, M.L., Halphen, I., Jarreau, P.H., Boucherat, O., Martin, E., Benachi, A., Amselem, S., Bourbon, J., Danan C. Ve Delacourt C., (2008). "Matrix metalloproteinase gene polymorphisms and bronchopulmonary dysplasia: identification of MMP16 as a new player in lung development", *PLoS One*, 3:e3188.
- [79] Hilgendorff, A., Heidinger, K., Pfeiffer, A., Bohnert, A., König, I.R., Ziegler, A., Merz, C., Frey, G., Chakraborty, T., Gortner, L., Bein, G., (2007). "Association of polymorphisms in the mannose-binding lectin gene and pulmonary morbidity in preterm infants", *Genes & Immunity*, 8:671–677.
- [80] Capoluongo, E., Vento, G., Rocchetti, S., Giardina, E., Concolino, P., Sinibaldi, C., Santonocito, C., Vendettuoli, V., Tana, M., Tirone, C., Zuppi, C., Romagnoli, C., Novelli, G., Giardina, B. ve Ameglio, F., (2007). "Mannose-binding lectin polymorphisms and pulmonary outcome in premature neonates: a pilot study", *Intensive Care Medicine*, 33:1787–1794.
- [81] Salman, A, Hirschfeld, A.F., Mayer, M.L., Fortuno, E.S., Corbett, N., Kaplan, M., Wang, S., Schneiderman, J., Fjell, C.D., Yan, J., Akhabir, L., Aminuddin, F., Marr, N., Lacaze-Masmonteil, T., Hegele, R.G., Becker, A., Chan-Yeung, M., Hancock, R.E.W., Kollmann, T.R., Daley, D., Sandford, A.J., Lavoie, P.M. ve Turvey S.E., (2013). "Functional Genetic Variation in NFKBIA and Susceptibility to Childhood Asthma, Bronchiolitis, and Bronchopulmonary Dysplasia", *The Journal of Immunology*, 190:3949-3958.
- [82] Hartel, C., König, I., Koster, S., Kattner, E., Kuhls, E., Kuster, H., Moller, J., Müller, D., Kribs, A., Segerer, H., Wieg, C., Herting, E. ve Göpel, W., (2006). "Genetic polymorphisms of hemostasis genes and primary outcome of very low birth weight infants", *Journal of Pediatrics*, 118:683–689.
- [83] Atac, F.B., Ince, D.A., Verdi, H., Gokmen, Z., Yazici, A.C., Gulcan, H., Tarcan, A., Taneri, A., Sezgin, E. ve Ozbek, N., (2010). "Lack of association between FXIII-Val34Leu, FVII-323 del/ins, and transforming growth factor beta1 (915G/T) gene polymorphisms and bronchopulmonary dysplasia: a single center study", *DNA and Cell Biology*, 29:13–18.
- [84] Ince, D.A., Atac, F.B., Ozkiraz, S., Dilmen, U., Gulcan, H., Tarcan, A., Ozbek, N., (2010). "The role of plasminogen activator inhibitor-1 and angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms in bronchopulmonary dysplasia", *Genetic Test Molecular Biomarkers*, 14(5):643-7.

- [85] Koroglu, O.A., Onay, H., Erdemir, G., Yalaz, M., Cakmak, B., Akisu, M., Ozkinay, F., Kultursay, N., (2010). "Mannose-binding lectin gene polymorphism and early neonatal outcome in preterm infants", *Neonatology*, 98(4):305-12.
- [86] Cakmak B.C., Calkavur S., Ozkinay F., Koroglu O.A., Onay H., Itirli G., Karaca E., Yalaz M., Akisu M. ve Kultursay N., (2012). "Association between bronchopulmonary dysplasia and MBL2 and IL1-RN polymorphisms", *Pediatrics International*, 54(6):863-8.
- [87] Koroglu, O.A., Onay, H., Cakmak, B., Bilgin, B., Yalaz, M., Tunc, S., Ozkinay, F., Kultursay, N., (2014). "Association of vitamin D receptor gene polymorphisms and bronchopulmonary dysplasia", *Pediatric Research*, 76(2):171-6.
- [88] Pehlevan O.S., Karatekin, G., Koksall, V., Benzer, D., Gursoy, T., Yavuz, T., Ovali. F., (2015). "Association of vitamin D binding protein polymorphisms with bronchopulmonary dysplasia: a case-control study of gc globulin and bronchopulmonary dysplasia", *Journal of Perinatology*, 35(9):763-7.
- [89] Cooper, D.N., Smith, B.A., Cooke, H.J., Niemann, S., ve Schmidtke, J., (1985). "An estimate of unique DNA sequence heterozygosity in the human genome", *Human Genetics*, 69: 201-205.
- [90] Collins, F.S., Guyer, M.S., ve Charkravarti, A., (1997). "Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation", *Science*, 278:1580-1581.
- [91] Southern, E.M., (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis", *Journal of Molecular Biology*, 98:503-17.
- [92] Owerbach, D. ve Nerup, J., (1982). "Restriction fragment length polymorphism of the insulin gene in diabetes mellitus", *Diabetes*, 31:275-7.
- [93] Conner, B.J., Reyes, A.A., Morin, C., Itakura, K., Teplitz, R.L. ve Wallace, R.B., (1983). "Detection of sickle cell beta S-globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80:278-82.
- [94] Orkin, S.H., Markham, A.F. ve Kazazian, H.H., (1983). "Direct detection of the common Mediterranean betathalassemia gene with synthetic DNA probes. An alternative approach for prenatal diagnosis", *The Journal of Clinical Investigation*, 71:775-9.
- [95] Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. ve Arnheim, N., (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia", *Science*, 230:1350-4.
- [96] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. ve Erlich, H., (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction", *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 Pt 1:263-73.
- [97] Mullis, K.B. ve Faloona, F.A., (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction", *Methods in Enzymology*, 155:335-50.

- [98] Sanger, F., Nicklen, S. ve Coulson, A.R., (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74:5463-7.
- [99] Wong, C., Dowling, C.E., Saiki, R.K., Higuchi, R.G., Erlich, H.A. ve Kazazian, H.H., (1987). "Characterization of beta-thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA", *Nature*, 330:384-6.
- [100] Syvänen, A.C., Aalto-Setälä, K., Harju, L., Kontula, K. ve Söderlund, H., (1990). "A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein", *E. Genomics*, 8:684-92.
- [101] Tost, J. ve Gut, I.G., (2005). "Genotyping single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry in clinical applications", *Clinical Biochemistry*, 38:335-50.
- [102] Makridakis, N.M. ve Reichardt, J.K., (2001). "Multiplex automated primer extension analysis: simultaneous genotyping of several polymorphisms", *Biotechniques*, 31:1374-80.
- [103] Nakai, K., Habano, W., Fujita, T., Nakai, K., Schnackenberg, J., Kawazoe, K., Suwabe, A. ve Itoh, C., (2002). "Highly multiplexed genotyping of coronary artery disease-associated SNPs using MALDI-TOF mass spectrometry", *Human Mutation*, 20:133-8.
- [104] Storm, N., Darnhofer-Patel, B., van den Boom, D. ve Rodi, C.P., (2003). "MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping", *Methods in Molecular Biology*, 212:241-62.
- [105] Bell, P.A., Chaturvedi, S., Gelfand, C.A., Huang, C.Y., Kochersperger, M., Kopla, R., Modica, F., Pohl, M., Varde, S., Zhao, R., Zhao, X., Boyce-Jacino, M.T. ve Yassen, A., (2002). "SNPstream UHT: ultra-high throughput SNP genotyping for pharmacogenomics and drug discovery", *Biotechniques*, Suppl:70-2, 74, 76-7.
- [106] Syvänen, A.C., (2001). "Assessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms", *Nature Reviews Genetics*, 2:930-42.
- [107] Kwok, P.Y., (2001). "Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms", *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2:235-58.
- [108] Tsuchihashi, Z. ve Dracopoli, N.C., (2002). "Progress in high throughput SNP genotyping methods", *Pharmacogenomics Journal*, 2:103-10.
- [109] Rautanen, A., (2007). *Genotyping For Genetic Association Studies: Methods And Applications*, Doktora Tezi, Helsinki Üniversitesi, Finlandiya Genom Merkezi ve Medikal Genetik Bölümü, Finlandiya.
- [110] Chen, X. ve Sullivan, P.F., (2003). "Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput", *Pharmacogenomics Journal*, 3:77-96.
- [111] Syvänen, A.C., (2005). "Toward genome-wide SNP genotyping", *Nature Genetics*, 37 Suppl:S5-10.

- [112] Chee, M., Yang, R., Hubbell, E., Berno, A., Huang, X.C., Stern, D., Winkler, J., Lockhart, D.J., Morris, M.S. ve Fodor, S.P., (1996). "Accessing genetic information with high-density DNA arrays", *Science*, 274:610-4.
- [113] Yershov, G., Barsky, V., Belgovskiy, A., Kirillov, E., Kreindlin, E., Ivanov, I., Parinov, S., Guschin, D., Drobishev, A., Dubiley, S. ve Mirzabekov, A., (1996). "DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93:4913-8.
- [114] Shumaker, J.M., Metspalu, A. ve Caskey, C.T., (1996). "Mutation detection by solid phase primer extension", *Human Mutations*, 7:346-54.
- [115] Pati, N., Schowinsky, V., Kokanovic, O., Magnuson, V. ve Ghosh, S., (2004). "A comparison between SNaPshot, pyrosequencing, and biplex invader SNP genotyping methods: accuracy, cost, and throughput", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 60:1-12.
- [116] Hirschhorn, J.N., ve Daly, M.J., (2005). "Genome-wide association studies for common diseases and complex traits", *Nature Reviews Genetics*, 6:95-108.
- [117] Alderborn, A., Kristofferson, A. ve Hammerling, U., (2000). "Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing", *Genome Research*, 10:1249-58.
- [118] Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R. ve Gelfand, D.H., (1991). "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88:7276-80.
- [119] "Overview of iPLEX Genotyping Assay Chemistry", http://agenabio.com/wp-content/uploads/2015/07/51-20061R1.0-iPLEX-Application-Note_WEB.pdf, 03.01.2017
- [120] "MassArray Analyzer 4", http://www.genehk.com/news/news_20140319_1.php, 03.01.2017
- [121] Sequenom, (2009). iPLEX Gold Application Guide, ed^eds.
- [122] Sequenom, (2009). iPLEX® Gold SNP Genotyping Training Protocol, ed^eds.
- [123] Qiagen, (2016). QIAamp DNA Mini and Blood Mini HandBook, Fifth Edition.
- [124] Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T., (1989). *Molecular cloning: Cold spring harbor laboratory press New York*.
- [125] Hardy, G.H., (1908). "Mendelian proportions in a mixed population", *Science*, 28: 49-50.
- [126] Weinberg, W., (1908). "Über den nachweis der vererbung beim menschen", *Jahresh. Wuerth. Ver. vaterl. Natkd.* 64: 369–382
- [127] Graffelman, J. ve Weir, B.S., (2016). "Testing for Hardy–Weinberg equilibrium at biallelic genetic markers on the X chromosome", *Heredity*, 116, 558–568
- [128] Szumilas, M. (2010). "Explaining Odds Ratios", *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 19:3, 227-229.

- [129] Griffiths, A.J.F., Miller, J.H. ve Suzuki D.T., (2000). "An Introduction to Genetic Analysis", 7. baskı, New York: W. H. Freeman.
- [130] Bewick, V., Cheek, L. Ve Ball, J., (2005). "Statistics review 14: Logistic regression", *Critical Care Medicine*, 9(1): 112–118.
- [131] Princeton University, Troyanskaya Laboratory, <http://pathwaynet.princeton.edu/>, 25 Aralık 2017.
- [132] The Open Biological and Biomedical Ontology, Gene Ontology Consortium, <http://www.geneontology.org/>, 27 Aralık 2017.
- [133] Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Kanehisa Laboratories, <http://www.genome.jp/kegg/>, 25 Aralık 2017.
- [134] Wang H., Julien K.R., Stevenson D.K., Hoffmann T.J., Witte J.S., Lazzeroni L.C., Krasnow M.A., Quaintance C.C., Oehlert J.W., Jelliffe-Pawłowski L.L., Gould J.B., Shaw G.M. ve O’Brodivich H.M., (2013). "A Genome-Wide Association Study (GWAS) for Bronchopulmonary Dysplasia", *Pediatrics* 2013;132:290–297.
- [135] Rezvani M, Wilde J., Vitt P., Mailaparambil B., Grychtol R., Krueger M. ve Heinzmann A., (2013). "Association of a FGFR-4 Gene Polymorphism with Bronchopulmonary Dysplasia and Neonatal Respiratory Distress", *Disease Markers*, 35: 6, 633–640.
- [136] Ali S., Hirschfeld A.F., Mayer M.L., Fortuno E.S., Corbett N., Kaplan M., Wang S., Schneiderman J., Fjell C.D., Yan J., Akhabir L., Aminuddin F., Marr N., Lacaze-Masmontiel T., Hegele R.G., Becker A., Chan-Yeung M., Hancock R.E.W., Collman T.R., Daley D., Sandford A.J., Lavoie P.M. ve Turvey S.R., (2016). "Functional Genetic Variation in NFKBIA and Susceptibility to Childhood Asthma, Bronchiolitis and Bronchopulmonary Dysplasia", *The Journal of Immunology*, 190:3949-3958.
- [137] Beg A.A., Sha W.C., Bronson R.T. ve Baltimore D., (1995). "Constitutive NFkappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice", *Genes and Development*, 9: 2736–2746.
- [138] Courtois G., Smahi A., Reichenbach J., Doñffinger R., Cancrini C., Bonnet M., Puel A., Chable-Bessia C., Yamaoka S. ve Feinberg J., (2003). "A hypermorphic IkappaBalpa mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency", *Journal of Clinical Investigation*, 112: 1108–1115.
- [139] Voelkel N.F., Vandivier R.W. ve Tudor R.M. (2006). "Vascular endothelial growth factor in the lung", *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 290(2): L209-21.
- [140] Lassus P., Ristimäki A., Ylikorkala O., Viinikka L. Ve Andersson S. (1999). "Vascular endothelial growth factor in human preterm lung, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 159, 1429–1433.
- [141] Asikainen T.M., Waleh N.S., Schneider B.K., Clyman R.I. ve White C.W. (2006). "Enhancement of angiogenic effectors through hypoxia-inducible factor

in preterm primate lung in vivo”, American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 291, 588–595.

- [142] Godin-Heymann N., Brabetz S., Murillo M.M., Saponaro M., Santos C.R., Lobley A., East P., Chakravarty P., Matthews N., Kelly G., Jordan S., Castellano E. Ve Downward J., (2016). “Tumour-suppression function of KLF12 through regulation of anoikis”, *Oncogene*, 35, 3324–3334.
- [143] Collins N.L., Reginato M.J., Paulus J.K., Sgroi D.C., Labaer J. ve Brugge J.S. (2005). “G1/S cell cycle arrest provides anoikis resistance through Erk-mediated Bim suppression”, *Molecular Cell Biology Journal*, 25: 5282–5291.
- [144] Mura M., Anraku M., Yun Z., McRae K., Liu M., Waddell T.K., Singer L.G., Granton J.T., Keshavjee S., ve Perrot M. (2012). “Gene Expression Profiling in the Lungs of Patients With Pulmonary Hypertension Associated With Pulmonary Fibrosis”, *Chest*, 141, 3.
- [145] Murad F. (1996). “Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate”, The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards, *JAMA*. 276:1189–1192.
- [146] Barnes P.J. (1995). “Nitric oxide and airway disease”, *Annals of Medicine*, 27:389–393.
- [147] Davis C.W., Gonzales L.W., Ballard R.A., Ballard P. L., Guo C. Ve Gow A.J. (2008). “Expression of Nitric Oxide Synthases and Endogenous NO Metabolism in Bronchopulmonary Dysplasia”, *Pediatric Pulmonology*, 43(7): 703–709.
- [148] Auten R.L., Mason S.N., Whorton M.H., Lampe W.R., Foster W.M., Goldberg R.N., Li B., Stamler J.S. ve Auten K.M. (2007). “Inhaled ethyl nitrite prevents hyperoxia-impaired postnatal alveolar development in newborn rats”, *American Journal of Respiratory and Critical Care*, 176:291–299.
- [149] Ballard R.A., Truog W.E., Cnaan A., Martin R.J., Ballard P.L., Merrill J.D., Walsh M.C., Durand D.J., Mayock D.E., Eichenwald E.C., Null D.R., Hudak M.L., Puri A.R., Golombek S.G., Courtney S.E., Stewart D.L., Welty S.E., Phibbs R.H., Hibbs A.M., Luan X., Wadlinger S.R., Asselin J.M. ve Coburn C.E. (2006). “Inhaled nitric oxide in preterm infants undergoing mechanical ventilation”, *The New England Journal of Medicine*, 355:343–353.
- [150] Perrone S., Tataranno M.L. ve Buonocore G. (2012). “Oxidative Stress and Bronchopulmonary Dysplasia”, *Journal of Clinical Neonatology*, 1(3): 109–114.
- [151] Banks B.A., Ischiropoulos H., McClelland M., Ballard P.L. ve Ballard R.A. (1998). “Plasma 3-nitrotyrosine is elevated in premature infants who develop bronchopulmonary dysplasia”, *Pediatrics*, 101(5):870-4.
- [152] Li, C., Xiao, J., Hormi, K., Borok, Z., Minoo, P., (2002). “Wnt5a participates in distal lung morphogenesis”, *Developmental Biology*, 1;248(1):68-81.
- [153] Villosis M.F., Li, C., Durand M., Ramanathan, R., Kwong K.Y.C., Minoo, P., (2007). “131 Wnt5a: A Potential Link Between Inflammation and Morphogenesis in Bronchopulmonary Dysplasia”, *Journal of Investigative Medicine* 2007;55:S98.

ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

1. “Bronkopulmoner Displazi ile ilişkilendirilen Belirli Genlerdeki Polimorfizmlerin Türk Populasyonu Üzerinde İncelenmesi” adlı çalışmamız bir araştırma olup,
2. Araştırmanın amacı; sizin çocuğunuz ve diğer kronik akciğer hastalıklı çocuklar için hastalık riskinin erken belirlenmesinde kullanılabilecek, kronik akciğer hastalığı ile ilişkili belirli gen bölgelerinin Türk toplumunda araştırılmasıdır.
3. Araştırmada çocuğunuza normalde uygulanması gereken dışında ek tetkik ve tedavi uygulanmayacaktır.
4. Araştırma sırasında çocuğunuzdan zaten tetkik ve tedavisi için alınacak olan kan örneklerinden arta kalan kan örnekleri kullanılacak ve bu örneklerden genetik materyal izolasyonu yapılarak kronik akciğer hastalığı ile ilgili olabilecek bölgeler incelenecektir.
5. Gönüllünün çalışmaya katılmayı kabul etmesi durumunda alacağı ek bir sorumluluk bulunmamaktadır.
6. Araştırmanın hasta üzerinde deneysel kısmı bulunmamaktadır.
7. Çocuğunuzun bu araştırma nedeni ile herhangi bir riske veya rahatsızlığa maruz kalması öngörülmemektedir.
8. Araştırmadan beklenen yararlarla ilgili olarak çocuğunuz açısından hedeflenen herhangi bir klinik yarar bulunmamaktadır.
9. İlgili mevzuat gereğince gerekiyorsa, gönüllüye tazminat verilecek veya tedavi sağlanacaktır.

- 10.** Gönüllülere araştırma dahilinde herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.
- 11.** Çocuğunuzun araştırmaya katılımı tamamen sizin isteğimize ve onayınıza bağılı olup ve istediğiniz zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkınızı kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan çekilebilirsiniz.
- 12.** İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Kurum ve diğeri ilgili sağık otoritelerinin çocuğunuzun orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimlerinin bulunabilmektedir, ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır ve sadece bu yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun tarafınızdan imzalanmasıyla gönüllü veya yasal temsilcisinin söz konusu erişime izin vermiş olacaktır.
- 13.** İlgili mevzuat gereğince gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanamayacak; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliğinin gizli kalacaktır.
- 14.** Araştırma konusuyla ilgili ve çocuğunuzun araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde çocuğunuzun yasal temsilcisi olarak sizlere zamanında bilgilendirme yapılacaktır.
- 15.** Sizlerin araştırma hakkında, kendi haklarınız hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir advers olay (yan etki) hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçebileceği kişiler ile bunlara günün 24 saatinde erişebileceği telefon numaraları bu formun sonunda açıkça belirtilmiştir.
- 16.** Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı; 200 (iki yüz) adet Yenidoğan bebektir.
- 17.** Gönüllülerden elde edilecek olan genetik materyal örnekleri SNP (single nucleotide polymorphism) taraması için kullanılacaktır.
- 18.** BGOF, gönüllü veya kanuni temsilcisinin yasal haklarını ortadan kaldıracak bir hüküm veya ifade içeremez ayrıca araştırmacıyı, kurumu, destekleyici veya bunların temsilcilerini kendi ihmallerinden kaynaklanan herhangi bir yükümlölükten kurtaracak hüküm veya ifade taşıyamaz.
- 19.** Biyolojik materyallerin analizleri sadece yurtiçinde hastanemiz ve Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü bünyesinde yapılacaktır.
- 20.** *“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. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi biliyorum.”

“Alınan kan örneklerinin ileride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.”

“Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.”

Yasal Temsilcinin (Anne, Baba) Adı Soyadı

Araştırmacının Adı Soyadı:

İmzası:

İmzası:

Tarih:

Tarih:

HASTA BİLGİ FORMU

İşlem esnasında ve sonrasında
gerekli olabileceği düşünülen
bilgileri içeren aşağıdaki soruları
lütfen dikkatlice okuyarak
cevaplayınız

Adı Soyadı:	Doğum Tarihi:
Cep Telefonu:	Ev Telefonu:
Adres:	
Tanı Yöntemi:	Bölüm:
Protokol no:	Tarih:

Ailede başka erken doğum vakası var mı?	Evet ☐	Hayır ☐	
Ailede kronik akciğer hastalığı olan var mı?	Evet ☐	Hayır ☐	Cevabınız evet ise, hasta ile yakınlığı:
Ailede kronik akciğer hastalığı nedeniyle ölen var mı?	Evet ☐	Hayır ☐	Cevabınız evet ise, hasta ile yakınlığı:
Ailede zatürre olan var mı?	Evet ☐	Hayır ☐	Cevabınız evet ise, hasta ile yakınlığı:
Ailede tüberküloz hastası var mı?	Evet ☐	Hayır ☐	Cevabınız evet ise, hasta ile yakınlığı:
Ailede Bronkopulmoner Displazi (BPD) veya solunum sıkıntısı sendromu öyküsü var mı?	Evet ☐	Hayır ☐	Cevabınız evet ise, hasta ile yakınlığı:
Hastanın kardeşi/kardeşleri var mı?	Evet ☐	Hayır ☐	Cevabınız evet ise, kardeşlerin yaşları:
(Yukarıdaki sorunun cevabı evet ise cevaplayınız) Hastanın kardeşlerinde Bronkopulmoner Displazi (BPD) veya	Evet ☐	Hayır ☐	Cevabınız evet ise, hastalığın türü:

solunum sıkıntısı sendromu veya benzer akciğer hastalıkları var mı?			
Hastanın ebeveynleri alkol kullanıyor mu?	Evet ☐	Hayır ☐	Cevabınız evet ise; Sıklığı: Süresi (Yıl):
Hastanın ebeveynleri sigara kullanıyor mu?	Evet ☐	Hayır ☐	Cevabınız evet ise; Sıklığı: Süresi (Yıl):
Hastanın ebeveynlerinin düzenli olarak kullandığı bir ilaç var mı?	Evet ☐	Hayır ☐	Cevabınız evet ise; Sıklığı: Süresi (Yıl):

ETİK KURUL ONAYI

İSTANBUL S.B.Ü. KANUNİ SULTAN SÜLEYMAN
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ - İSTANBUL
S.B.Ü. KANUNİ SULTAN SÜLEYMAN EĞİTİM VE
ARAŞTIRMA HASTANESİ EVRAK BİRİMİ
19.07.2016 10:02 80929720-000-5014


T.C.
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
İstanbul Çekmece Bölgesi Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
S.B.Ü. Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi Baştabipliği
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı: 2016/12

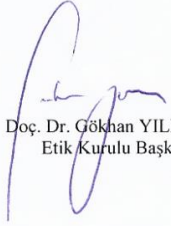
Konu No: KAEK/2016.12.31

17.06.2016

Syn Prof.Dr.Dilek Turgut BALIK

Kurulumuz çoğunluğunun katılımı ile klinik araştırmalar etik kurulu toplantısı yapılmış olup; Yürütücüsü olduğunuz "Bronkopulmoner Displazi ile ilişkili Belirli Genlerdeki polimorfizmlerin Türk Popülasyonu Üzerinde İncelenmesi" konulu araştırma dosyası klinik araştırmalar etik kurulunca görüşülüp oy birliği ile uygun olduğuna karar verilmiştir.

Gereği bilgilerinize sunulur.


Doç. Dr. Gökhan YILDIRIM
Etik Kurulu Başkanı

Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Turgut Özal cad.no:1 HALKALI/KÜÇÜKÇEKMECE Tel (0212)404 15 00 Fax: (0212)571 59 51

Etik Kurul

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ayberk AKAT
Doğum Tarihi ve Yeri : 17.03.1986, İstanbul
Yabancı Dil : İngilizce, Almanca
E-posta : akatayberk@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul / Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2011
Lisans	Biyoloji	Trakya Üniversitesi	2009
Lise	Fen/Matematik	FMV Özel Ayazağa Işık Lisesi	2004

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma / Kurum	Görev
2016 -	İstanbul Bilim Üniversitesi, Tıp Fakültesi	İdari Personel
2016 -	Şişli Florence Nightingale Hastanesi / Kordon Kanı Bankacılığı, Hücre ve Doku Merkezi (FlorenCell)	Kalite Kontrol Birimi Sorumlusu
2013 - 2016	Liv Hospital Ulus / Rejeneratif Tıp, Kök Hücre Üretim Merkezi (LivMedCell)	Kalite Kontrol Laboratuvarı Sorumlusu

YAYINLARI

Makale

1. Cayir E., Erdemir A., Ozkan E., Topuzoğullari M., Bolat Z.B., **Akat A.**, Turgut-Balık D., "Cloning of Intron-Removed Enolase Gene and Expression, Purification, Kinetic Characterization of the Enzyme from *Theileria annulata*", Molecular Biotechnology, vol.56, pp.689-696, 201
2. N. Erçelen, B. Öztürk, H. Cömert, M. Diken, M. Gültomruk, H. Coşkun, **A. Akat**, (2014), "Allelic Frequencies of Mutations in Blood Coagulation Factor Genes (Factor V, Factor II) and Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) in 201 Turkish Patients with Venous Thrombosis Complications", Molecular and Genetic Medicine , "8:1", 1-5 pp., DOI: 10.4172/1747-0862.1000093
3. **Akat A.**, Aktaş M., Dumanlı N., Turgut-Balık D., (2014), "Isolation, cloning and sequence analysis of enolase enzyme encoding gene from *Theileria annulata* for assessment of important residues of this enzyme". Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 20 (2): 243-248, DOI: 10.9775/kvfd.2013.9932

Bildiri

1. Cayir E., Erdemir A., Ozkan E., Topuzoğullari M., Bolat Z.B., **Akat A.**, Turgut-Balık D., "Expression and purification of enolase enzyme from *Theileria annulata*", BAU-Drug Design Congress, İstanbul, Türkiye, 17-19 Nisan 2014, pp.105-105
2. Cayir E., **Akat A.**, Erdemir A., Ozkan E., Turgut-Balık D., "Removal of an intron from *Theileria annulata* enolase gene by PCR site directed mutagenesis", II. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 22-25 Ekim 2012, ss.132-132
3. **Akat A.**, Aktaş M., Dumanlı N., Turgut-Balık D., "Isolation, Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of Enolase Gene from *Theileria annulata*". 36th FEBS Congress, Biochemistry for Tomorrow's Medicine, Torino, Italy, 2011
4. Erdemir A., **Akat A.**, Cicek M., Turgut-Balık D., "*Theileria annulata*'nın laktat dehidrogenaz geninin klonlanması sırasında transformasyon verimliliğini arttırmak amacıyla yapılan optimizasyon çalışmaları", I. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 26-29 Ekim 2010, ss.65-65

Kitap

1. Karaöz E., Günel G. ve **Akat A.**, 2017. "Üroonkolojide Kök Hücre Yaklaşımları", Üroonkoloji Kitabı (2. Baskı), Editörler: Haluk Özen, Levent Türkeri, Yaşar Bedük, Çağ Çal. Üroonkoloji Derneği Yayınları, sayfa: 113-133, Ankara, 2017.
2. Karaoz E., **Akat A.**; "Kordon Kanı Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler", Hematologlar İçin Kordon Kanı Uygulamaları ve Bankacılığı, Türk Hematoloji Derneği. Şubat 2016 / Cilt:6 / Sayı:1, ISSN: 2146-6408

3. Turgut-Balık D., **Akat A.**, 2012. “Mutasyonlar”, Moleküler Biyoloji, Editör: Prof. Dr. Mehmet Karataş. 1. Basım. Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi Yayınları, ISBN: 9786058801271. Sayfa: 87-99. Ankara, 2012.

Ödüller

1. 36th FEBS Congress, Biochemistry for Tomorrow's Medicine, Lingotto Conference Center, Torino, İtalya, Haziran 25-30, 2011, Kongre Katılım Bursu