



**T.C.**  
**KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**İLERİ TEKNOLOJİLER ANABİLİM DALI**

**IRAK POPÜLASYONUNDA IL-4 VE IL-5 GEN POLİMORFİZMİNİN**  
**ASTIMLI HASTALARLA İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

**SALAH MAHDI ALRAWE**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KIRŞEHİR / 2022**



**T.C.**  
**KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**İLERİ TEKNOLOJİLER ANABİLİM DALI**

**IRAK POPÜLASYONUNDA IL-4 VE IL-5 GEN POLİMORFİZMİNİN**  
**ASTIMLI HASTALARLA İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

**SALAH MAHDI ALRAWE**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Belgin ERDEM**

**II. DANIŞMAN**  
**Dr. Öğr.Üyesi Huda Rafea AL-ALWANI**

**KIRŞEHİR / 2022**

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Salah Mahdi ALRAWE



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.



## ÖNSÖZ

Öncelikle yüksek lisans ders ve tez sürecimde sürekli desteği, sabrı, motivasyonu için Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu öğretim üyesi danışman hocam Sayın Prof. Dr. Belgin ERDEM'e büyük bir içtenlikle teşekkür ederim.

Ayrıca bu tez çalışmasında eş danışmanım olan Anbar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, mikrobiyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Dr. Öğr.Üyesi Huda Rafea AL-ALWANI 'a araştırmam boyunca değerli yorumları ve desteği için teşekkür ederim. Son olarak bu tezi araştırma ve yazma sürecim boyunca bana sürekli destek ve teşvik sağlayan aileme çok derin şükranlarımı sunarım.

Temmuz, 2022

SALAH MAHDI ALRAWE

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTIMA LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xii
ABSTRACT .....	xiv
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR .....</b>	<b>3</b>
2.1. Astıma Genel Bakış .....	3
2.2. Astımın Sınıflandırması .....	4
2.3. Astımda Bağışıklık Yanıt .....	4
2.3.1. Mekanizma.....	5
2.3.2. İnflamatuar Aracılar .....	5
2.3.2.1. Histamin .....	6
2.3.2.2. Lökotrienler .....	6
2.3.2.3. Prostaglandin D2 (PGD2).....	6
2.3.2.4. İmmünoglobulin E (IgE).....	6
2.3.3. Astımla İlgili Hücreler .....	7
2.3.3.1. Eozinofiller .....	7
2.3.3.2. Nötrofiller .....	7
2.3.3.3. Dentritik hücreler .....	7
2.3.3.4. Mast hücreleri .....	7
2.3.3.5. T-Lenfositler .....	8
2.3.3.6. Doğuştan Lenfoid Hücreler (ILCs).....	8
2.4. Astımda Sitokinler .....	8
2.4.1. İnterlökin-13 (IL-13) .....	8
2.4.2. İnterlökin -9 (IL-9).....	9
2.4.3. İnterlökin -4 (IL-4).....	9
2.4.4. İnterlökin -5 (IL-5).....	10
2.5. Astımın Genetik Faktörlerle İlişkisi .....	11
2.6. Polimorfizm .....	11
2.6.1. İnterlökin - 4 (IL-4) Polimorfizmi .....	13

2.6.2. Astımlı Hastalarda İnterlökin -4 (IL-4) Polimorfizmi .....	13
2.6.3. İnterlökin - 5 (IL-5) Polimorfizmi .....	14
2.6.4. Astımlı Hastalarda İnterlökin - 5 (IL-5) Polimorfizmi .....	15
2.7. Gen Polimorfizminin Tespiti .....	15
2.7.1. PCR – Dizileme .....	15
2.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Tek Sarmallı Konformasyon Polimorfizmi (PCR-SSCP).....	15
2.7.3. PCR- Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (PCR-RFLP) .....	16
2.8. Astım Teşhisi .....	16
2.8.1. Hastalık öyküsü .....	16
2.8.2. Fiziki Muayene .....	17
2.8.3. Laboratuvar Testleri .....	17
2.8.3.1. Akciğer Fonksiyon Testleri.....	17
2.8.3.1.1. Spirometri.....	17
2.8.3.1.2. Fraksiyonel Ekshalasyon Nitrik Oksit Testi.....	17
2.9. Tedavi .....	18
2.9.1. İnhale Kortikosteroidler .....	18
2.9.2. Alerjen İmmünoterapi .....	18
2.9.3. Anti-IgE Antikorları .....	19
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>19</b>
3.1. Materyal .....	19
3.2. Yöntem .....	20
3.2.1. Hasta ve Kontrol Grupları .....	20
3.2.2. Örnek Toplama .....	21
3.2.3. IL-4 ve IL-5'in Toplam Düzeylerinin Belirlenmesi .....	21
3.2.3.1. Test Prensibi.....	21
3.2.3.2. Serum Örneklerinin Hazırlanması.....	21
3.2.3.3. Reaktif Hazırlama (IL-4).....	22
3.2.3.4. Reaktif Hazırlama (IL-5)	23
3.2.4. DNA Ekstraksiyonu ve Saflaştırma Yöntemi .....	25
3.2.5. Primerlerin Hazırlanması .....	26
3.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Amplifikasyonu .....	26
3.2.6.1. PCR Karışımının Hazırlanması.....	26
3.2.6.2. PCR Termal Döngü Programları.....	27
3.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi .....	27
3.2.8. PCR Ürünleri İçin Kısıtlama Enzimlerinin Eklenmesi .....	27
3.2.8.1. IL-4 C589T'nin PCR Ürünleri İçin Kısıtlama Enzimi AvalI'nin Eklenmesi.....	27

3.2.8.2. IL-5 C-703'ün PCR Ürünleri için Kısıtlama Enzimi AlwNI'nin Eklenmesi.....	28
3.2.8.3. Agaroz Jel Hazırlama.....	28
3.2.8.4. Agaroz Jelde DNA Yükleme ve Çalıştırma.....	
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>29</b>
4.1. Çalışma gruplarının demografik özelliklere göre dağılımı .....	30
4.1.1. Yaş .....	30
4.1.2. Cinsiyet .....	30
4.1.3. Sigara İçme .....	31
4.2. Biyokimyasal Parametreler .....	31
4.2.1. İnterlökin-4 (IL- 4) Düzeyi .....	31
4.2.2. İnterlökin-5 (IL-5) Düzeyi.....	32
4.3. Astımlı Hastalarla İlişkili IL-4 ve IL-5 Genlerinin Genetik Polimorfizmleri	33
4.3.1. IL-4 (rs2243250) Gen Polimorfizmlerinin Genotiplenmesi.....	33
4.3.2. IL- 5 rs2069812 Gen Polimorfizmlerinin Genotiplendirilmesi.....	35
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>38</b>
5.1. Yaş .....	38
5.2. Cinsiyet .....	39
5.3. Sigara Tüketimi .....	40
5.4. Biyokimyasal Parametreler .....	41
5.4.1. İnterlökin-4 (IL-4) Düzeyi.....	41
5.4.2. İnterlökin- 5 (IL-5) Düzeyi.....	42
5.4.3. IL-4 (rs2243250) Gen Polimorfizmlerinin Genotiplenmesi.....	44
5.5. Klinik Özellikler ile IL-4 rs2243250 Genotipleri Arasındaki İlişki .....	45
5.6. IL- 5 rs2069812 Gen Polimorfizmlerinin Genotiplendirilmesi.....	46
5.7. Klinik Özellikler İle IL-5 rs2069812 Genotipleri Arasındaki İlişki.....	46
<b>6. SONUÇLAR.....</b>	<b>48</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>49</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>61</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. İki Alel İçin Tek Nükleotid Polimorfizmi.....	12
Şekil 4.1. Astımlı Hastaların Yaşa Göre Dağılımı .....	29
Şekil 4.2. Cinsiyetin Astımlı Hastalara Etkisi.....	30
Şekil 4.3. Sigara İçmenin Astımlı Hastalara Etkisi .....	30
Şekil 4.4. Astımlı Hasta ve Kontrol Gruplarında IL-4 Düzeyi.....	31
Şekil 4.5. Astımlı Hasta ve Kontrol Gruplarında IL-5 Düzeyi. ....	31
Şekil 4.6. IL4'ün Agaroz Jel Elektroforezi (rs2243250) Belirli Bir Primer Kullanılarak Amplifiye Edilmiş Ürün Modelleri. ....	32
Şekil 4.7. Astımlı Hastalarda ve Kontrol Gruplarında IL-4 (rs2243250) geninin AvaII Enzimi Kullanılarak PCR-RFLP Elektroforezi. ....	33
Şekil 4.8. Şerit 1-7: Astımlı hastaların IL-5 rs2069812 (180 bp) PCR Ürünleri .....	34
Şekil 4.9. AlwNI Enzimi Kullanılarak, Çalışma Gruplarında IL-5 rs2069812 Geninin Allelotiplenmesi. ....	35

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 3.1.</b> Ekipman ve Aparatlar .....	19
<b>Tablo 3.2.</b> Kitler.....	19
<b>Tablo 3.3.</b> Materyaller .....	20
<b>Tablo 3.4.</b> Primerler ve Kısıtlama zimleri (RE).....	20
<b>Tablo 3.5.</b> PCR Reaksiyon Karışımı.....	26
<b>Tablo 3.6.</b> PCR Termal Döngü Programları .....	26



## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
L	: Litre
pg	: Pikogram
µL	: Mikrolitre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
α	: Alfa
β	: Beta
gr	: gram
ng	: Nanogram

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
AHR	: Havayolu aşırı duyarlılığı
AIT	: Alerjen İmmünoterapi
ARMS	: Amplifikasyon refrakter mutasyon sistemi
AS	: Astımlı
ASMC'ler	: Havayolu düz kas hücreleri
BALF	: Bronkoalveolar lavaj sıvısı
BCL-2	: B hücreli lenfoma -2
CD4	: Farklılaşma kümesi 4
CMC	: Kimyasal uyumsuzluk bölünmesi
CSU	: Kronik spontan ürtiker
CysLT	: Sisteinil lökotrien
DGGE	: Denatüre edici gradyan jel elektroforezi
DN	: Diyabetik nefropati
FEV	: Zorunlu ekspiratuar hacim
FVC	: Zorlanmış hayati kapasite
GD	: Graves hastalığı
GWA	: Genom çapında ilişkilendirme
ICS	: İn hale kortikosteroidler
IL-12β	: İnterlökin-12 alt birim beta
IL-4Rα	: İnterlökin -4 reseptörü, Alfa
ILC2	: Doğal lenfoid hücreler
ILL'ler	: Doğal benzeri lenfositler
KOAH	: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
LABA	: Uzun etkili beta agonistleri
LAMA	: Uzun etkili muskarinik antagonistler
LTC4	: Lökotrien C4
LTRA	: Lökotrien reseptör antagonisti
NFAT-1	: Aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü – 1
OCS	: Oral kortikosteroidler
PAH	: Poliaromatik hidrokarbon
PB	: Periferik kan

<b>PC20</b>	: Kışkırtıcı konsantrasyon 20
<b>PGD2</b>	: Prostaglandin D2
<b>ROR<math>\gamma</math>t</b>	: Retinoik asitle ilişkili yetim reseptör gama t
<b>SABA</b>	: Kısa etkili beta-2 agonistleri
<b>SCIT</b>	: Deri Altı İmmünoterapi
<b>SEA</b>	: Stafilokok enterotoksinleri A
<b>SLIT</b>	: Dilaltı İmmünoterapi
<b>SNP'ler</b>	: Tek nükleotid polimorfizmleri
<b>STAT6</b>	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 6 aktivatörü
<b>TBX2</b>	: T-box transkripsiyon faktörü
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Dönüştürücü büyüme faktörü-beta
<b>TGGE</b>	: Sıcaklık gradyan jel elektroforezi
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör nekroz faktörü-alfa
<b>TSLP</b>	: Timik stromal lenfopoietin
<b>VCAM-1</b>	: Vasküler hücre yapışma molekülü -1



## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

## IRAK POPÜLASYONUNDA IL-4 VE IL-5 GEN POLİMORFİZMİNİN ASTIMLI HASTALARLA İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

**Salah Mahdi ALRAWWE**

**Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
İleri Teknolojiler Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Belgin ERDEM**

**II. Danışman: Dr. Öğr.Üyesi Huda Rafea AL-ALWANI**

Bu çalışmada biyokimyasal parametreler olarak interlökin -4 (IL-4) ve interlökin- 5 (IL-5) düzeyi belirlenmiştir. Bu çalışma ile ayrıca astımlı hasta ve kontrol gruplarının kanındaki IL-4 (rs2243250) ve IL-5 rs2069812 genlerinde polimorfizm belirlenmiştir. Bu vaka-kontrol çalışmasında 50 astımlı hastadan ve kontrol grubu olarak 50 kişiden kan örnekleri alınmıştır. Astımlı hastaların yaş gruplarına göre demografik özellikleri sırasıyla (20 - 40 yaş), (41 - 60 yaş) ve (61 - 80 yaş) , sırasıyla (%52, %40, %8) olmuştur (P-değeri =0,000). Erkek hastaların yüzdesi (%60), kadın hastaların yüzdesinden (%40) daha yüksek olmuştur (P = 0.0174). Ayrıca sigara içmeyen hastaların oranı (%70) sigara içen hastalardan (%30) daha yüksek olmuştur (P-değeri =0.0318). Bu çalışmanın sonuçları, tüm biyokimyasal belirteçlerde kontrol ve astımlı gruplar arasında anlamlı farklılıklar (P<0.05) göstermiştir. Kontrol grubunda ortalama İnterlökin- 4 (IL-4) düzeyi (399.25±251.78) pg/ml iken, vaka grubu düzeyi anlamlı olarak (266.61±175.11) pg/ml'ye düşmüştür ( p-değeri=0.003). Ayrıca kontrol grubunda Interlökin-5 (IL-5) düzeyi 326.67±354.04 pg/ml iken, vaka grubu düzeyi anlamlı olarak 174.36±235.98 pg/ml'ye (p-değeri=0.003) düşmüştür. IL-4 ve IL-5 genlerinin polimorfizmi için moleküler araştırmalar, SNP'ler rs2243250 ve rs2069812 için PCR-RFLP tekniği aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. IL-4

(rs2243250) sonuçlarına göre, vaka grubundaki en yüksek genotip CT heterozigot genotipi (%60), ardından homozigot genotipi CC, TT (%20) olmuştur. Kontrol grubundaki en yüksek genotip TT homozigot genotipi (%76), ardından homozigot genotip CC (%24) olmuştur. Analizler, IL-4 (rs2243250) polimorfizminde vaka grubu ve kontrol grubu arasında önemli farklılıklar göstermiştir (CC CT farkı : OR=72.6190., %95 CI 3.9463 ila 1336.3195, P= 0.0039). Yapılan analiz ayrıca vaka ve kontrol grupları arasında, IL-4 (rs2243250) polimorfizminde, IL-4 ve IL-5 düzeyi ile TT genotipi arasında daha yüksek korelasyon düzeyi ile (sırasıyla P = 0,001 ve 0,000) anlamlı farklılıklar göstermiştir (CC TT farkı: OR=0.3158, %95 CI: 0.1061 ila 0.9399, P=0.0383) Ayrıca CT genotipi ve yaş arasında da anlamlı bir ilişki vardır (p=0,009). IL-5 rs2069812 gen polimorfizmi, kontrol grubundaki en yüksek genotipin TT homozigot genotipi (%66), ardından heterozigot genotip TC (%34) olduğunu ortaya koymuştur. Vaka grubunda en yüksek genotip TC heterozigot genotipi (%64) olmuş, bunu da TT homozigot genotipi (%24) ve homozigot CC (%12) izlemiştir. Homozigot TT ile heterozigot TC'nin genotipik sıklığı (OR= 5.1765,95 CI) = 2.1372 ila 12.5379, P= 0.0003) ve homozigos TT ile homozigot varyant CC'nin genotipik frekansı (OR=34.8, yüzde 95 CI=1.8255 ila 664.9429, P= 0.0183) olmuştur. IL- 5 rs2069812 polimorfizminde kontrol grubuna kıyasla hastalarda C allel frekanslarında anlamlı farklılıklar söz konusudur (OR=3.3130, %95 CI = 1.7041 ila 6.4408, P=0.0004). IL-4 düzeyi ile IL-5 düzeyi arasında TT genotipi ile daha yüksek bir korelasyon (sırasıyla P = 0,017 ve 0,004) mevcut olup ayrıca yaş ile CC genotipi arasında da anlamlı bir korelasyon vardır (p=0,000).

Temmuz 2022, 60 Sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Astım, IL-5, IL-4, Polimorfizm, RFLP

## **ABSTRACT**

**M.Sc. THESIS**

# **STUDY THE RELATION OF GENE POLYMORPHISM OF IL-4 AND IL-5 WITH ASTHMATIC PATIENTS IN IRAQI POPULATION**

**Salah Mahdi ALRAWWE**

**Kirsehir Ahi Evran University**

**Graduate School of Sciences and Engineering**

**Department of Advanced Technologies**

**Supervisor: Prof. Dr. Belgin ERDEM**

**II. Supervisor: Assist. Prof. Huda Rafea AL-ALWANI**

In this study, the following biochemical parameters were determined: interleukin- 4 (IL-4) level and interleukin- 5 (IL-5) level. The present study also determined polymorphism in genes IL-4 (rs2243250), and IL-5 rs2069812 in the blood of asthmatic patients and control groups. In this case-control study, blood samples were collected from 50 asthmatic patients and 50 samples as the control group. The demographic characteristics of asthmatic patients for age, the age groups were (20 to 40 years), (41 to 60 years), and (61-80 years) (52, 40, 8%) respectively (P-value =0.000), whereas the percentage of male patients was higher (60%) than the percentage of female patients (40%)(P = 0.0174). Also, the percentage of non-smoking patients(70%) was higher than smoking patients (30%) (P-value =0.0318). The results of the present study showed significant differences (P<0.05) between control and asthmatic groups in all biochemical markers. The mean Interleukin- 4 (IL-4) level in the control group was (399.25±251.78) pg/ml while its level in the case was significantly decreased to (266.61±175.11) pg/ml ( p-value=0.003). Furthermore, the level of Interleukin- 5 (IL-5) in the control group was 326.67±354.04 pg/ml, whereas, its level in the case group significantly decreased to 174.36±235.98 pg/ml ( p-value=0.003). The molecular investigations for the polymorphism of the IL-4 and IL-5 genes have been conducted through the PCR-RFLP technique for the SNPs rs2243250 and rs2069812. The results of IL-4 (rs2243250): The highest genotype in the case group was the CT

heterozygote genotype (60%) followed by the homozygote genotype CC, TT (20%). The highest genotype in the control group was the TT homozygote genotype (76%) followed by the homozygote genotype CC (24 %). Analyses showed significant differences between cases and controls in the IL-4 (rs2243250) polymorphism (CC vs CT: OR=72.6190., 95% CI 3.9463 to 1336.3195, P= 0.0039). The analysis also showed significant differences between cases and controls in the IL-4 (rs2243250) polymorphism (CC vs TT: OR=0.3158, 95% CI: 0.1061 to 0.9399, P=0.0383), higher correlation between IL-4 level and IL-5 level with TT genotype (P = 0.001 and 0.000, respectively) also there is a significant correlation between age and CT genotype and age (p=0.009). The IL-5 rs2069812 gene polymorphism revealed that The highest genotype in control group was TT homozygous genotype (66 %) followed by heterozygous genotype TC (34%) . In cases , the highest genotype was TC heterozygous genotype (64 %) followed by TT homozygous genotype (24%) and homozygous CC (12%).The genotypic frequency of heterozygous TC with homozygous TT (OR= 5.1765,95 % CI= 2.1372 to 12.5379, P= 0.0003). and the genotypic frequency of homozygous variant CC with the homozygous TT (OR=34.8, 95 percent CI=1.8255 to 664.9429, P= 0.0183).There were significant differences in C allele frequencies in patients as compared to the controls in the IL-5 rs2069812 polymorphism (OR=3.3130, 95% CI = 1.7041 to 6.4408 , P=0.0004). A higher correlation between IL-4 level and IL-5 level with TT genotype (P = 0.017 and 0.004, respectively) also there are significant correlation between age and CC genotype and age (p=0.000).

July 2022, 60 Pages

**Keywords:** Asthma, IL-5, IL-4, Polymorphism, RFLP



## 1. GİRİŞ

Astım, nüfusun %1 ile %18'ini ve her ülkeden ve her yaştan insanı etkileyen kronik bir solunum yolu hastalığı olup yaygınlığı artmaya devam etse de bazı ülkelerde astım nedeniyle hastaneye yatışlar ve ölümler azalmıştır (Haahtela ve ark., 2017). Astım halâ bireyler, sağlık sistemleri ve toplum üzerinde kabul edilemez bir yük oluşturmaktadır. En agresif tıbbi tedaviyi almasına rağmen, astım hastalarının yaklaşık %5 ile %10'u şiddetli hastalığa sahiptir ve semptomatiktir (Wenzel, 2006).

Astımın evrimi, ilerlemesi ve alevlenmelerinde, solunum yollarının inflamatuvar yanıtının modifiye ve kontrol edilmesinde immünolojik ajanların, özellikle sitokinlerin rolü kritiktir (Desai ve ark., 2009).

İnterlökin (IL), lökositler veya bağışıklık hücreleri ile etkileşime giren ve anti-inflamatuvar ve immünosupresif özellikler dahil olmak üzere çeşitli işlevlere sahip bir sitokin türüdür. Bağışıklık sisteminin işlevi büyük ölçüde interlökinlere bağlıdır. Th2 sitokinleri [IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 ve IL-13] atopik hastalıkların etiyolojisi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Tang ve ark., 2014). IL-4, IL-5 ve IL-13 dahil olmak üzere tip 2 immün sitokinlerin hava yollarında zararlı inflamatuvar süreçleri uyardığı astımda Th2 yanıtlarının hiperaktivitesi vardır. Çeşitli hayvan modellerinde Th2 üretim yanıtlarında bu iki sitokinin kritik işlevi nedeniyle, astımda T helper 2 (Th2) sitokinleri üzerine yapılan çalışmalar IL-4 ve IL-5 üzerinde yoğunlaşmıştır.

Alerjik yanıtın kontrolünde en önemli sitokinlerden biri interlökin-4 (IL-4) olmakla beraber, immünglobulin izotipinin immünglobulin IgE ekspresyonuna geçişi bu sitokin tarafından tetiklenir (Smolnikova ve ark., 2013). Aynı zamanda bir mast hücre büyüme faktörü olarak işlev görür ve CD-4 hücrelerinden Th2 oluşumu için kritik bir sinyaldir (Hosoyama ve ark., 2011). Bu işlevlerin tümü ve muhtemelen diğerleri, bu sitokini astımın başlangıcında anahtar bir rol haline getirir. IL-4'ün miktarını ve/veya aktivitesini artıran herhangi bir genetik değişikliğin astım üzerinde bir etkisi olduğu tahmin edilmektedir. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), genetik ve hastalığa yatkınlık arasındaki bağlantıyla ilgili araştırmalarda en yaygın olarak araştırılan DNA varyasyon modellerinden biri olmuştur (Kendler ve ark., 2012). IL-4 genindeki -589C/T (rs2243250) polimorfizmi, astım riskiyle ilgili

olarak kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Yapılan birçok çalışma, bu SNP'nin T alelinin, C aleli ile karşılaştırıldığında daha yüksek transkripsiyon faktörü bağlanma afinitesine neden olduğunu ve bunun IL-4 mRNA aşırı ekspresyonu ile sonuçlandığını göstermiştir (Akkad ve ark., 2007; Kousha ve ark., 2020).

IL-5, eozinofilide önemli bir faktör olup, astımda gözlenen doku hasarının bir kısmından sorumlu olabilir (Renauld, 2001). IL-5'in etkilerinin esas olarak dolaşımda olduğu ve eozinofillerin dolaşıma periferik mobilizasyonunu indüklediği görülmektedir (van Rensen, ve ark., 2001). IL-5 geni, astım patogenezinde olası bir aday genidir (Pereira ve ark., 1998). Atopik dermatit ile ilişkili kan eozinofilisinde rol oynadığı öne sürülmüştür (Yamamoto ve ark., 2003). IL-5 genlerindeki polimorfizmler atopik bronşiyal astıma yatkınlığa sebep olabilir ve hastalığın klinik seyrini belirleyebilir (Freidin ve ark., 2003).

Hameed ve ark. (2019) yılında astımlı çocuklarda tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) IL-5 C-703T ve IL-5 düzeyleri ile eozinofil sayısı arasındaki ilişkiyi araştırmak için Irak'ta ilk çalışmayı gerçekleştirmiştir (Hameed ve ark., 2019).

Öte yandan, bu çalışma, spesifik tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) IL-4 C-589T ve IL-5 C-703T ile astım ve astım arasındaki korelasyonu araştırmak ve ayrıca astımlı hastaların serumundaki IL-4 ve IL-5 düzeyleri ve bu interlökinler için genetik polimorfizmler arasındaki ilişkiyi incelemek için hazırlanmıştır.

Bu çalışmanın temel amaçları:

1. Astımlı hastalarda IL-4 ve IL-5 düzeyinin tespit edilmesi,
2. Bu interlökinlerin düzeyinin astım ile ilişkisinin tespit edilmesi,
3. Astımlı hastalarda IL-4 ve IL-5 gen polimorfizmlerinin varlığının tespit edilmesi,
4. Polimorfizmler ve bu interlökinlerin düzeyleri arasındaki ilişkinin incelenmesidir.

## 2.GENEL KISIMLAR

### 2.1. Astıma Genel Bakış

Astım, genetik yatkınlık ile çevresel faktörlerin etkileşiminden kaynaklanan karmaşık ve sabit bir inflamatuvar hastalıktır (Grotenboer ve ark., 2013). Hırıltı, öksürük, nefes darlığı ve bronş tıkanıklığına neden olan solunum sisteminin en yaygın atopik bozukluklarından biridir (Makoui ve ark., 2020). Her yaştan, etnik gruptan ve ülkeden yaklaşık 300 milyon insanı etkileyen dünya çapında bir sağlık sorunudur. Astım nedeniyle her yıl yaklaşık 250.000 kişinin erken yaşta öldüğü değerlendirilmektedir (Bousquet ve ark., 2010). Astımın ana nedenleri henüz tam olarak net olmamakla beraber, daha ileri çalışmalar, genetik faktörlerin çevresel faktörlerle etkileşimleri yoluyla astım tetikleyicilerinde kritik bir rol oynadığını önermektedir (Subbarao ve ark., 2009; Sykes ve ark., 2008). Astımın nedenlerine atıfta bulunularak, astımla ilişkili çevresel faktörler kolayca belirlenebilir ve bunlardan kaçınılabılır. Bununla birlikte, bu faktörlerin büyük çoğunluğu, kronik genetik yatkınlık yaratan faktörler olmadığı sürece etkilerini göstermemektedir (Subbarao ve ark., 2009). Bu nedenle astımla ilişkili genetik faktörlerin araştırılması, astıma en yatkın bireylerin belirlenmesinde temel taşı olabilir (Smolnikova ve ark., 2013). Bu yüzden, birçok çalışma, pro- ve anti-inflamatuvar genlerin genetik varyasyonları ile astıma yatkınlık arasındaki ilişkiyi incelemiştir (Malerba ve ark., 2005; Noutsios ve ark., 2014).

Çevre ve genler astıma yatkınlığı etkilemekte olup, bu genlerin önemi, terapötik müdahale yollarını belirleyebilir. Alt tiplerde astım risk faktörlerinin saptanması faydalı olabilir. Astımın tanımlanması ve toplam serum IgE düzeyi yükselmesi gibi ara fenotiplerin olup olmadığının belirlenmesinin yanı sıra inflamatuvar yanıtla ilişkili faktörleri kodlayan genlerdeki varyasyonu hastalıkla bağlantılı olmakla beraber astıma bağlı astım veya solunum fizyolojik değişiklikleri riskini artırmıştır (Akhabir ve ark., 2015).

Astım ikiye ayrılır. Çocuklukta veya ergenlikte gelişen astım sıklıkla alerjiler ve/veya alerjik hastalıklar (alerjik rinit ve atopik dermatit gibi) ile bağlantılıdır. Erişkin başlangıçlı astım yetişkinlikte gelişir, genellikle alerjenlerle ilgisi yoktur ve nazal polipli kronik rinosinüzit eşlik edebilir (Pavord ve ark., 2018). Astım, çeşitli çevresel faktörlerle bağlantılıdır. Çocukluk çağı astımı durumunda, bu çevresel faktörler solunum virüslerini, özellikle gergedan ve RSV

virüslerini, sigara dumanına maruz kalma, solunan kimyasallar, küf ve ortam hava kirliliğinin yanı sıra annede çeşitli beslenme eksikliklerini içermektedir (Bergroth ve ark., 2020; Dick ve ark., 2014; Jartti ve ark., 2019). Sigara, obezite, alerjik bozukluklar, inflamatuvar üst solunum yolu hastalıkları, mesleki maruziyet ajanları, ev içi nem ve küf, dış ortam kirleticileri, psikososyal değişkenler ve depresyon gibi etkenlerin tümü yetişkin astım riski ile bağlantılıdır (Siroux ve ark., 2019; Toppila-Salmi ve ark., 2019).

## **2.2. Astımın Sınıflandırması**

Genel olarak bronşiyal astım, alerjik astım (Th2 ağırlıklı) ve alerjik olmayan astım (Th2 ağırlıklı olmayan) olarak sınıflandırılabilir. Th2 ağırlıklı form, alerjik ve alerjik olmayan bronş tıkanıklığı ayırımına ek olarak eozinofil hücrelerinin bronş duvarına infiltrasyonuna neden olur ve işyerlerinde mesleki astım ile ilişkili semptomların değerlendirilmesi (işe bağlı astım) yapılmalıdır. Ayrıca, aspirin intoleransı (aspirinle alevlenen solunum yolu hastalığı) veya egzersize bağlı semptomlar (egzersiz kaynaklı astım) hakkında bilgi verilmelidir. Ek olarak, astımın sınıflandırılması, klinik semptomların ve alerji testi bulgularının dikkatli bir şekilde yorumlanmasını gerektirmektedir (Schneider ve ark., 2013).

## **2.3. Astımda Bağışıklık Yanıt**

Astımlı hava yollarında, inflamatuvar yanıt, solunum epitelini ile bağışıklık sistemi arasındaki karmaşık bir etkileşimdir. Biyoaktif araçların hava yolu epitelini tarafından sentezi, inflamatuvar hücreleri akciğerlere çekerek, aktive ederek ve toplayarak kalıcı bir inflamatuvar yanıtı tetikler. Sızan hücreler tarafından çeşitli biyokimyasal araçların salınması, inflamatuvar yanıtı artırır. Kronik inflamasyonun efektörleri, T-yardımcı hücreler tarafından salınan lenfokinler veya immünomodülatör sitokinler gibi bu hücreler tarafından salınan inflamatuvar mediatörler, inflamatuvar yanıtı destekleyen ve güçlendiren proinflamatuvar sitokinler ve lökositler için kemoatraktan olarak hareket eden kemokinlerdir. Bronkospazm, epitele zarar veren, hava yolu hücrelerini aktive eden ve daha fazla lökosit toplayan lökositler ve epitel hücreleri tarafından üretilen ürünler tarafından indüklenmekle beraber kalıcı bir inflamatuvar döngü ile sonuçlanır. Mast hücreleri, şiddetli alerjene maruz kalma durumlarında IL-4 ve IL-5 gibi erken bir proinflamatuvar mediatör kaynağı sağlayabilir (Arora ve ark., 2019).

### **2.3.1. Mekanizma**

Astım alevlenmesi, erken evre ve geç evre olmak üzere iki evreye ayrılabilir. Plazma hücreleri tarafından duyarlı hale getirilen ve salgılanan IgE antikoru erken evreye başlar. Bu antikoru

belirli çevresel faktörlere tepki verir. IgE antikorları daha sonra mast hücrelerine ve bazofillere yüksek afinite ile bağlanır. Mast hücreleri sitokinleri serbest bırakır ve sonunda kirlenici veya risk faktörü yutulduğunda degranüle olur. Histamin, prostaglandinler ve lökotrienlerin tümü mast hücreleri tarafından salınır. Bu hücreler daha sonra düz kasları kasarak hava yolunu daraltır (Liu ve ark., 1991). Th2 lenfositleri, interlökinlerin (IL-4, IL-5, IL-13) üretiminde ve ayrıca hücre iletişimine yardımcı olan ve iltihabı sürdüren GM- BOS'un şiddetinde çok önemli bir rol oynar. Sonraki birkaç saat içinde, eozinofillerin, bazofillerin, nötrofillerin ve helper ve hafıza T hücrelerinin tümünün akciğerlere yerleştiği, bronkokonstriksiyon gerçekleştiren ve iltihaplanmaya neden olan geç faz meydana gelir. Mast hücreleri ayrıca geç faz reaktanlarının iltihaplı bölgelere getirilmesinde önemli bir rol oynar (Stewart ve ark., 1995).

Duruma bağlı olarak, tedaviyi hedeflemek ve hem bronkokonstriksiyonu hem de iltihabı hafifletmek için bu mekanizmaların her ikisini de anlamak gerekir. Daha dar bir hava yolu nedeniyle, zamanla daha kalın bir hava yoluna sahip olanlar daha uzun bir hastalık süresine sahiptir (Doeing ve ark., 2013). Hava yolu aşırı duyarlılığı astımın çok önemli bir özelliği olmakla beraber; bu durum, genellikle farklı uyaranlara abartılı bir bronkokonstriktör yanıtıdır. Hava yolu aşırı duyarlılığına yol açan çeşitli mekanizmalar vardır. Bazı açıklamalar, mast hücrelerinden artan histamin veya artmış hava yolu düz kas kütlelerinden kaynaklanmaktadır (Doeing ve ark., 2013).

### **2.3.2. İnflamatuar Aracılar**

Astım, alerjik bozuklukların patofizyolojisinde yer alan bir dizi aracıyla ilişkilendirilmiştir. Histamin, lökotrienler ve kininler; hava yolu düz kasını kasılan, mikrovasküler sızıntıyı artıran, hava yolu mukus salgısını artıran ve diğer inflammatuar hücreleri çeken inflammatuar araçılardır (Arora ve ark., 2019).

#### **2.3.2.1. Histamin**

Astımın patogeneze bağlanan ilk aracı histamindir. Hava yollarındaki mast hücreleri ve bazofiller histamin üretir ve serbest bırakır. Mukus salgılanması ve bronkokonstriksiyona histamin neden olur. Histamin, bir kemoatraktan olarak hareket ederek eozinofilleri çeker ve aktive eder (Arora ve ark., 2019).

#### **2.3.2.2. Lökotrienler**

Mast hücreleri, eozinofiller, bazofiller ve makrofajların tümü, araşidonik asitten türetilen güçlü inflamatuvar lipid aracılarının bir sınıfı olan sisteinil lökotrienler (CysLT'ler) üretir. Lökotrien C(4) (LTC(4)), lökotrien D(4) (LTD(4)) ve lökotrien E(4) (LTE(4)), inflamatuvar hastalıkların patofizyolojisinde G-protein-bağlı reseptörler üst familyasına ait hücre yüzeyi reseptörleri ile spesifik etkileşimler yoluyla kontraktıl ve inflamatuvar süreçleri tetikleyen güçlü biyolojik araçlardır (Singh ve ark., 2010). Bronkokonstriksiyon, artmış vasküler geçirgenlik, eozinofil aktivasyonu ve artmış mukus sekresyonu bu proteinlerin aracılık eder (Hallstrand ve ark., 2010). CysLT reseptörü ekspresyonu, hem insan hem de hayvan modellerinin akciğerlerinde bulunmuştur. LTD4, mast hücre proliferasyonu ve sitokinlerin üretimi için gereklidir (Hall ve ark., 2014).

### **2.3.2.3. Prostaglandin D2 (PGD2)**

Prostaglandin D2 (PGD2), alerjen tehdidi üzerine mast hücreleri tarafından üretilen araşidonik asit yolunun ana siklooksijenaz metabolitidir. PGD2 bronkokonstriksiyona, vazodilatasyona, vasküler geçirgenliğin artmasına ve eozinofillerin toplanmasına neden olur (Arima ve ark., 2011). Astımlı hastalar alerjenlere maruz kaldıklarında, bronkoalveolar lavaj sıvılarında yüksek düzeylerde PGD2 bulunmuştur. Bu durum, sağlıklı insanların aksine insan astımlı hastalarda bronkokonstriksiyona neden olur. Bunun sonucunda da insan alerjik astımında rol oynayabileceğini göstermektedir (Bloemen ve ark., 2007).

### **2.3.2.4. İmmünoglobulin E (IgE)**

Serumdaki IgE konsantrasyonu, kısmen plazma hücrelerine farklılaşan az sayıda B-hücrelerine bağlı olarak beş antikor sınıfından en düşük olanıdır ve sentezine ve ayrıca reseptörlerine sıkıca bağlandığı dokularda hızlı emilimine ayrılmıştır (Burton ve ark., 2011). IgE'nin temel amacı, Tip I aşırı duyarlılık reaksiyonlarına katılmaktır. Atopik bozukluklar, görünüşte güvenli çevresel antijenlere karşı yüksek düzeylerde alerjene özgü serum IgE ile önemli ölçüde bağlantılıdır. Duyarlı bir kişi bir alerjenle temasa geçtiğinde, reseptörler çapraz bağlanır ve mast hücrelerinin degranüle olmasına ve güçlü araçları serbest bırakmasına neden olur (Hofmann ve ark., 2010).

## **2.3.3. Astımla İlgili Hücreler**

### **2.3.3.1. Eozinofiller**

Eozinofiller, astım da dahil olmak üzere çeşitli alerjik reaksiyonlarla ilişkili olmakla beraber, akciğerlerde birikimleri hem insanlarda hem de hayvan modellerinde astımın ayırt edici özelliğidir (Deckers ve ark., 2013).

### **2.3.3.2. Nötrofiller**

Nötrofiller, bir yaralanma veya alerjene maruz kalma bölgesine ulaşan ilk inflamatuvar hücreler arasındadır. Nötrofiller, IL-8 ve GM-CSF tarafından kullanılır (Monteseirín, 2009). Granüllerinden IL-8, TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$  üreterek ek nötrofillerin alınmasına katkıda bulunurlar (Monteseirín, 2009; Bogaert ve ark., 2011). Metalloproteazlar ve elastaz artmış vasküler geçirgenliğe, mukus hipersekresyonuna ve bronkokonstriksiyona katkıda bulunan nötrofiller tarafından üretilir (Monteseirín, 2009).

### **2.3.3.3. Dendritik Hücreler**

Pulmoner dendritik hücreler doğrudan dış ortama maruz kalır. Bu antijen sunan hücreler, tanıma reseptörlerine bağlandıktan sonra (IL-25, IL-33, GM-CSF gibi araçlar tarafından) doğrudan alerjenler veya enfeksiyöz patojenler tarafından tetiklenir veya hava yolu epitel hücreleri tarafından dolaylı olarak uyarılır. Alerjen sunan bölgelerde, dendritik hücreler eozinofilleri çekebilir (Salazar, 2013). Atopik astımda sık görülen T hücre farklılaşması ve Th2 yanıtı da dendritik hücrelerden etkilenir (Maazi ve ark., 2013).

### **2.3.3.4. Mast Hücreler**

Mast hücreleri, tip I aşırı duyarlılığın gelişiminde çok önemli bir rol oynar. Mast hücreleri, başta kan damarları, subepitelyal hücreler ve sinirler, bağırsak mukozası ve üst ve alt solunum yolları olmak üzere vücutta bulunan kemik iliği kaynaklı hücrelerdir. Astımın alevlenmesi, degranüle edilmiş mast hücrelerinin sayısındaki artışla ilişkilendirilmiştir (Carroll ve ark., 2002). Mast hücreleri, biyolojik olarak aktif araçlarla dolu zara bağlı granüller içermekte olup, IgE çapraz bağlama veya tirozin kinaz bağlanmasından sonra, mast hücreleri histamin, sisteinil lökotrienler, prostaglandinler, sitokinler ve trombosit aktive edici faktörün ana kaynağıdır (Barnes, 2011) ve süreç mast hücrelerinin degranülasyonu olarak adlandırılır (Arora ve ark., 2019).

### **2.3.3.5. T-Lenfositler**

T-Lenfositler (özellikle Th1, Th2, Th9 ve Th17), çeşitli sitokinler salgılayarak astımlı inflamatuvar yanıt koordinasyonunda önemli bir rol oynar. Geleneksel olarak, IL-4, IL-5 ve IL-13'ün karakteristik yükseltilmiş düzeyleri ile Th2 hücrelerinin baskın olduğu düşünülmüştür. Bazı astımlılar, IL-18 ve interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) etkisi altında büyüeyebilen ve daha sonra daha fazla IFN- $\gamma$  üretebilen yüksek oranda TH1 hücrelerine sahiptir (Arora ve ark., 2019). Astımlı hastalarda, IL-17'yi eksprese eden Th17 hücreleri de olağandışı bir rol oynar (Cosmi ve ark., 2011). Atopi hücreli kişilerde, IL-9'u serbest bırakan ve büyük olasılıkla mast hücrelerini aktive ederek alerji yanıtlarını artıran Th9 düzeyleri daha yüksektir (Lloyd ve ark., 2013).

### **2.3.3.6. Doğuştan Lenfoid Hücreler (ILCs)**

Doğuştan gelen lenfoid hücreler (ILC'ler), astım etiyojisinde ortaya çıkan araçlardır. Sitokine bağımlı doğuştan gelen bağışıklıkta, iltihaplanmada, doku yeniden şekillenmesinde ve doku onarımında rol oynarlar (Spits ve ark., 2013). ILC'ler, paylaşılan bir lenfoid progenitör oluşumu ve transkripsiyon faktörlerinin ve sitokinlerin salgılanması gibi CD4<sup>+</sup> T-hücreleri ile bazı özelliklere sahiptir (Hepworth ve ark., 2014). Genel olarak üç ILC grubu var olmakla beraber, bunlar transkripsiyon faktörü T-beta'yı eksprese eden ve IFN- $\gamma$  ve IL-12 (Th1 hücreleri gibi) salgılayan ILC1; GATA-3 transkripsiyon faktörünü ifade eden ve IL-5, IL-9 ve IL-13 (Th2 hücreleri gibi) üreten ILC2; ve ROR $\gamma$ t'u ifade eden ve IL-17 ve IL-22 salgılayan ILC-3'tür (Th17 hücreleri gibi) (Hepworth ve ark., 2014; Montaldo ve ark., 2014; Chang ve ark., 2013).

## **2.4. Astımda Sitokinler**

### **2.4.1. İnterlökin-13 (IL-13)**

İnterlökin-13 (IL-13), eozinofilleri ve immünoglobulin E (IgE) aracılı olayları içeren klasik efektör yollardan ziyade, epitelyal ve düz kas hücreleri üzerindeki aktiviteleri aracılığıyla alerjik yanıtta çok önemli bir rol oynuyor gibi görünmektedir (Wills-Karp, 2004). Astımda bir efektör molekül olarak önemi ayrıca, IL-13'ün kendisinin uygulanmasının, astımda karakterize edilen, farelerde eozinofilik inflamasyon, mukus hiper üretimi ve hava yolu aşırı duyarlılığı gibi birçok hava yolu yanıtını özetlemek için yeterli olduğunun bulunmasıyla kanıtlanmıştır (Wills-Karp, 2004). Bu bulgular, IL-13'ün, diğer Th2 sitokinlerinden bağımsız olarak, efektör fazda alerjik inflamasyonun önemli yönlerini üretmek için hem gerekli hem de yeterli olduğunu



göstermektedir. IL-13 genindeki genetik polimorfizmler ile astım arasındaki güçlü ilişkiler, IL-13'ün astımdaki önemini desteklemiştir (Shirakawa ve ark., 2000).

#### **2.4.2. İnterlökin -9 (IL-9)**

İnterlökin-9 (IL-9), astım etiolojisinde rol oynadığı görülen bir başka Th2 türevi sitokindir (Hauber ve ark., 2004). Genetik araştırmalar, IL-9'un hava yolu aşırı duyarlılığında bir rolü olabileceğini öne sürmüştür (Nicolaidis ve ark., 1997). Ayrıca astımlı bronş biyopsi örneklerinde IL-9 ekspresyonunun daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Shimbara ve ark., 2000). IL-9, goblet hücre hiperplazisi ve mast hücre oluşumundaki işlevine rağmen eozinofiller, T hücre büyümesi veya immünoglobulin yanıtı üzerinde çok az etkiye sahiptir veya hiç etkisi yoktur (Townsend ve ark., 2000).

#### **2.4.3. İnterlökin -4 (IL-4)**

Alerjik yanıtın düzenlenmesinde en önemli sitokinlerden biri interlökin-4'tür IL-4 (Gaidan ve ark., 2018). IL-4, aktive edilmiş T hücreleri, mast hücreleri ve bazofiller tarafından üretilir ve T hücrelerinde IgE üretimi ve Th2 fenotip farklılaşmasının yanı sıra astım gibi atopik hastalıkların gelişiminde rol oynar (Tang ve ark., 2014). Bu interlökin, B lenfositlerdeki antikörlerin izotip değişimini IgG ve IgE sınıflarına yönlendirerek alerjik reaksiyonları düzenleyen bağışıklık sisteminin önemli bir bileşenidir (Kousha ve ark., 2020). Kandaki IgE düzeyleri alerjik reaksiyonlarda yükselir ve yüksek düzeyde IL-4 mRNA düzeyine benzerler. Aynı zamanda, T helper (Th) 2 hücrelerinin ve mast hücrelerinin daha kolay farklılaşmasını sağlayan bir büyüme faktörü olarak da çalışır. IL-4'ün bu özellikleri, astım etiolojisinde sitokinlerin önemini vurgulamaktadır (Kousha ve ark., 2020).

Astım dahil alerjik hastalıklar, belirgin eozinofil infiltrasyonu olan inflamasyon ile karakterize edilir (Kay, 2001; Cohn ve ark., 2004). Naif Th0 hücrelerinin, IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13 salınması, ancak interferon (IFN- $\gamma$ ) gama salmayan Th2 hücrelerine farklılaşması, IL-4'ün alerjik enflamasyon gelişiminde önemli bir biyolojik etkisidir (O'Garra ve ark., 2000; Murphy ve ark., 2002). IL-4 eksikliği olan farelerin kullanıldığı çalışmalarda vahşi tip farelere kıyasla IL-4 eksikliği olan farelerde antijen kaynaklı alerjik enflamasyon önemli ölçüde azalmış olup, bu durum da IL-4'ün alerjik enflamasyon gelişimi için gerekli olduğunu göstermektedir (Brusselle ve ark., 1994). Bu çalışmalar, antijene özgü Th2 hücrelerinin erken farklılaşması ve/veya proliferasyonu için IL-4'ün gerekli olduğunu, ancak efektör faz sırasında alerjik hava yolu

enflamasyonunun üretimi için gerekli olmadığını göstermektedir. Atopi ve astım, IL-4 geni ve IL-4 reseptör genindeki genetik varyasyonlarla da bağlantılıdır (Michel ve ark., 2010).

#### **2.4.4. İnterlökin -5 (IL-5)**

T helper-2 (Th2) lenfositleri ve grup 2 doğuştan gelen lenfoid hücreler (ILC2), IL-5'in ana hücre kaynaklarıdır (Yanagibashi ve ark., 2017). Th2 hücreleri, solunan alerjenleri ve dendritik hücreleri içeren karmaşık bir aktivasyon sürecinden sonra IL-5 üretir ve salgılar. IL-5 geni, farelerde 11. kromozomda ve insanlarda 5. kromozomda, IL-3, IL-4'ü kodlayan genlerin yakınında bulunur (Lambrecht ve ark., 2019).

İnsan IL-5 reseptörü, benzersiz bir alfa alt birimi ve bir beta alt biriminden oluşan bir heterodimerdir. Alfa (R) alt birimi eozinofiller, mast hücreleri ve bazofillerde bulunurken beta alt birimi daha yaygın olarak bulunur (Klion ve ark., 2009). IL-5 R-alt biriminin ekspresyonu, alerji bozukluklarının gelişiminde rol oynayabilir (Gevaert ve ark., 2009). IL-5 R genindeki polimorfizmler, özellikle atopik popülasyonlarda astım için genetik risk faktörlerinden biri olabilir (Cheong ve ark., 2005).

IL-5, eozinofilide önemli bir faktör olduğundan, astımda gözlenen doku hasarının bir kısmından sorumlu olabilir (Renauld, 2001). IL-5'in etkileri, eozinofil farklılaşması, aktivasyonu ve hayatta kalmasında önemli bir rol oynar. Bu sitokin bronşiyal mukozada Th2 hücreleri, mast hücreleri ve bazofiller tarafından üretilir ve kan yoluyla kemik iliğine dolaşır, burada eotaksinler (CCL11) gibi kemokinlerin etkisi altında bronş duvarlarına doğru hareket eden eozinofil progenitörlerini destekler (Kita, 2011). Eozinofiller ilk olarak 1800'lerin sonlarında keşfedilmiş olup, eozinofilinin uzun süredir astım ve atopik hastalıklar dahil olmak üzere çok çeşitli koşullarla bağlantılı olduğu bilinmektedir (Kouro ve ark., 2009). Astım dahil eozinofilik hastalıkları olan kişilerin periferik kanında eozinofil sayılarının daha yüksek olduğu bulunmuştur. Şiddetli astımı olan kişilerin alt gruplarında, hava yollarının eozinofilik enflamasyonu, hastalığın şiddetini karakterize eder ve eozinofil sayısı ile astım alevlenmelerinin sıklığı arasında bir bağlantı söz konusudur (Garcia ve ark., 2013; Price ve ark., 2015). IL-5 genlerindeki polimorfizmler atopik bronşiyal astıma yatkınlığa sebep olabilir ve hastalığın klinik seyrini belirleyebilir (Freidin ve ark., 2003).

#### **2.5. Astımın Genetik Faktörlerle İlişkisi**

Astım, tek bir gendeki tek bir mutasyondan kaynaklanmaz ve bu nedenle durum, Huntington hastalığı (otozomal dominant) veya orak hücre hastalığı (otozomal resesif) gibi geleneksel

monogenik hastalıkların yaptığı gibi nesiller boyunca geçmez. Astım poligenik, çok faktörlü bir hastalıktır, yani çeşitli faktörlerin neden olduğu bir hastalıktır (Palmer ve ark., 2000; Thomsen, 2015). Astım yüzden fazla farklı gen ile bağlantılı olup liste sürekli olarak artmaktadır (Bosse ve ark., 2007).

Bununla birlikte, bir genin tek bir araştırmada astımla bağlantılı olması, gen ile durum arasında nedensel bir ilişki olduğu anlamına gelmez. Önceki çalışmalardan elde edilen sonuçların tekrarlanmaması, astımın birçok genetik araştırmasında kilit bir konudur. Özellikle, birçok çalışmada tanımlanan genlerin yalnızca küçük bir azınlığı astımla ilişkilendirilmiş olup, çoğu araştırmacı, replikasyonun bir genin uygunluğunun en önemli özelliklerinden biri olduğunu düşünmektedir (Bosse ve ark., 2007). Bununla birlikte bazı genler, yalnızca çocuklukta başlayan astım, atopik astım, ev tozu akarlarına duyarlı astım veya mesleki astım gibi astımlıların bir alt kümesinde gerekli olabilir ve bu nedenle çeşitli popülasyonlar arasında replikasyon beklenmeyebilir (Thomsen, 2015). Ayrıca, belirli genler yalnızca belirli ortamlarda, örneğin bir kediyle büyüyen çocuklarda veya ilk yıllarında pasif içiciliğe maruz kalmış çocuklarda ifade edilir (Ramadas ve ark., 2007; Sadeghnejad ve ark., 2008).

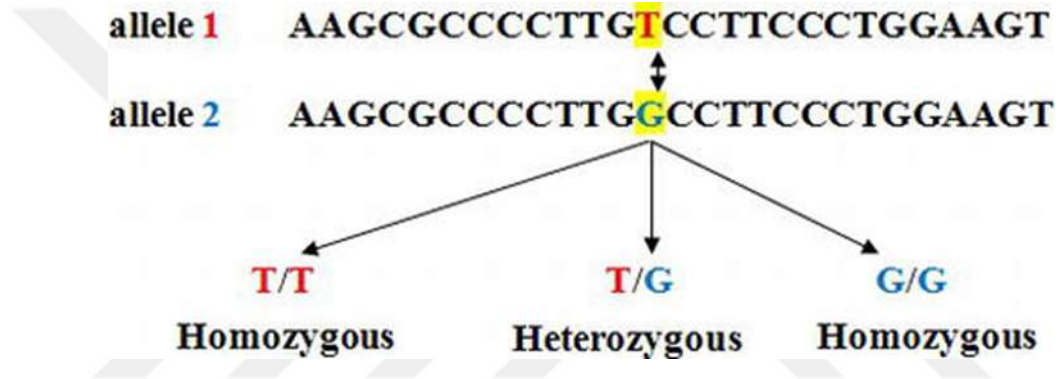
## **2.6. Polimorfizm**

Bir polimorfizm, genel popülasyonda %1'den fazla bir sıklıkla meydana gelen DNA dizisindeki bir değişikliktir. Polimorfizm, tek nükleotid polimorfizmi (SNP) olarak bilinen tek bir nükleotid değişikliği veya uzunluk polimorfizmi olarak bilinen mini uydular veya mikro uydular gibi tekrar eden DNA dizilerindeki bir varyasyon olarak tanımlanabilir. Çoğu durumda, genetik polimorfizm doğrudan hastalığa neden olmasa da bir risk faktörü olarak hareket edebilir (David ve ark., 2019).

Bir genin homolog bir kromozom üzerinde belirli bir lokustaki farklı formlarından birine alel denir. Genel popülasyonda farklı polimorfizm türleri (aleller) mutasyonlardan daha sık görülür (Crawford ve ark., 2005). 1978'de, kalıtsal bir hastalığı tanımlamak için kullanılan  $\beta$  globin geninde ilk insan genetik polimorfizmi keşfedilmiştir. İki yıl sonra, yani 1980'de bulunan kısa DNA farklılıkları, tüm insan genomuna yayılmıştır. Bunu tanımlamak için kısıtlama parçası uzunluk polimorfizmleri (RFLP'ler) yaklaşımı kullanılmıştır. 1985 yılında, DNA polimorfizmleri hakkında daha zor ve ilgi çekici bilgiler yayınlanmıştır. DNA düzeyinde, polimorfizm, tek baz çifti değişikliklerinden çoklu birleşik çiftlere ve sık dizilere kadar çok çeşitli varyantları kapsamaktadır (Teama, 2018). Genetik mutasyon, en ünlü genetik değişiklik

türlerinden biridir. Popülasyonun %1'inden daha azında meydana gelen düzen varyantları, genetik mutasyonlar olarak adlandırılırken, polimorfizmler daha yaygın varyantları tanımlamak için kullanılır. SNP'ler (tek nükleotid polimorfizmleri) en yaygın halka açık kalıtsal varyantlardır (%1'den az) (Kruglyak ve ark., 2001; Stenson ve ark., 2009).

Güney benekli kısıtlama fragman uzunluk polimorfizmleri (RFLP'ler), polimeraz zincir reaksiyonları (PCR'ler), DNA mikrodizi yongaları ile hibridizasyon yöntemleri (güney ve kuzey lekeleme) ve tam genom dizilimi (WGS) gibi farklı teknikler çeşitli DNA polimorfizm türlerini incelemek için kullanılabilir (Teama, 2018). Tek nükleotid polimorfizmleri (belirgin SNP), tek bir DNA sıralı yapı taşı birimi (A, T, C veya G) olan tek bir nükleotiddeki değişikliklerdir Şekil (2.1).



Şekil 2.1. İki Alel İçin Tek Nükleotid Polimorfizmi

Tek nükleotid polimorfizmleri, bir kişinin DNA'sında doğal olarak oluşan tüm genetik polimorfizmlerin en yaygın olanıdır (Palmer ve ark., 2005). SNP'lerin çoğunda, her biri bir baz ikamesini temsil eden iki allel bulunur. Bir bireyin her aleli farklı bir SNP'ye sahip olabilir. SNP, genel popülasyonda daha sık meydana gelirse, "majör" bir alel olarak adlandırılır. Buna karşılık, bir SNP'nin frekansı popülasyonda yaygın değilse, "minör" bir alel olarak adlandırılır. İnsanlar her kromozomun iki kopyasına (diploid) sahip olduklarından, majör veya minör aleller için homozigot veya majör ve minör aleller için heterozigot gibi çeşitli genotiplere sahip olabilirler (Crawford ve ark., 2005). SNP'ler bir gen içinde veya bir genin yakınındaki transkripsiyon bölgesinde meydana geldiğinde, genin işlevini değiştirerek hastalık üzerinde daha büyük bir etkiye sahip olabilirler. Öte yandan SNP'lerin bireyin sağlığı üzerinde çok az etkisi vardır. Araştırmacılara göre, SNP'ler bir kişinin belirli ilaçlara tepkisinin tahmin edilmesinde yardımcı olabilir. Ayrıca akrabalarda hastalığa neden olan genetik değişkenleri izlemek için kullanılırlar (Yousefi ve ark., 2018; Balding ve ark., 2007).

## 2.6.1. İnterlökin-4 (IL-4) Polimorfizmi

İnterlökin-4 (IL-4) geni yaklaşık 10 kb uzunluğunda olup dört ekzon içermektedir (Smolnikova ve ark., 2013). IL-4 geninin promotör bölgesindeki birkaç tek nükleotid polimorfizmi (SNP), çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Fang ve ark., 2016). Başlatıcı (promoter), belirli bir genin transkripsiyonunu başlatan bir DNA bölümüdür. Transkripsiyon faktörleri bu alana bağlanır ve RNA polimerazın transkripsiyonun başlayabileceği şekilde konumlandırılmasına izin verir. Başlatıcı bölge proteinleri kodlamasa da, bu bölgedeki varyasyonların gen ekspresyonunu etkilemesi muhtemeldir (Gaidan ve ark., 2018).

Genin promotör bölgesinde birçok tek nükleotid polimorfizmi (SNP) keşfedilmiştir (C-590T, C-285T ve A-81G). C-590 aleli ile karşılaştırıldığında, alelik varyant T-590, daha yüksek başlatıcı aktivitesi ve gelişmiş IL-4 üretimi ile ilgilidir. C-590T geçişi ile ilişkili IL4 geninin üç ana çevrilmemiş bölgesindeki (3'-UTR) bir polimorfizmin bronşiyal astım şiddeti için öngörücü etkileri olduğu keşfedilmiştir (Smolnikova ve ark., 2013).

Farklı popülasyonlarda, 33C>T (rs2070874) ve 590 C>T (rs2243250) SNP'leri toplam IgE düzeyleri, astım ve diğer alerji fenotipleriyle ilişkilendirilmiştir (Kabesch, M. ve diğ., 2003). Kronik obstrüktif akciğer hastalığı 1098 T>G (rs2243248) polimorfizmi ile bağlantılı olup bu gendeki üç polimorfizm tarafından üretilen bir haplotip ile de bağlantılıdır (Trajkov ve ark., 2008).

### **2.6.2. Astımlı Hastalarda İnterlökin -4 (IL-4) Polimorfizmi**

IL-4 genindeki -589C/T (rs2243250) polimorfizmi, astım duyarlılığında kapsamlı bir şekilde incelenmiştir ve transkripsiyon başlatma noktasının yukarısında tanımlanmıştır (Nie ve ark., 2013). Bu SNP'nin T alelinin, C aleline kıyasla transkripsiyon faktörü bağlanmasının afinitesini arttırdığı ve bunun IL-4 mRNA aşırı ekspresyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Akkad ve ark., 2007). Sonuç olarak, IL-4 geninin 589C/T SNP'sinin IL-4 ekspresyonunu ve dolayısıyla astım duyarlılığını etkilemesi biyolojik bir nedendir. Birkaç vaka kontrol replikasyon çalışması, IL-4 geni -589C/T polimorfizmi ile astım riski arasındaki bağlantıyı ortaya çıkarmaya çalışmıştır. Ancak bu farklı araştırmalar, bazı farklılıklar nedeniyle uyumsuz raporları ortaya çıkarmıştır. Deneklerin ırklarındaki farklılıklar, hasta tanı kriterlerindeki farklılıklar ve küçük örneklem büyüklüklerinin tümü, bu tür düzensiz sonuçlara katkıda bulunan faktörler olabilir (Lilly, 2005).

IL-4'ün (IL-4) (C-590T) tek nükleotid polimorfizmleri, Japonya (Noguchi ve ark., 2001), Tayvan (Chiang ve ark., 2007), Cezayir (Dahmani ve ark., 2016), Çin (Zhang ve ark., 2016) ve

İran (Kamali-Sarvestani ve ark., 2007) dahil olmak üzere dünyanın her yerindeki ülkelerde astımla ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, daha önce Çin'de (Cui ve ark., 2003) ve Brezilya'da (de Faria ve ark., 2008) anlamlı olmayan bir bağlantı bildirilmiştir. Bu çelişkili sonuçlar, çalışma popülasyonunun etnik ve ırksal çeşitliliğinden kaynaklanıyor olabilir. SNP IL-4 C-590T, aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörünün -1 (NFAT-1) bağlanma bölgesine (-603 ile -588) çok yakın bir yerde bulunur (Li-Weber ve ark., 2003).

### **2.6.3. İnterlökin - 5 (IL-5) Polimorfizmi**

İnterlökin- 5 (IL-5) genlerindeki tek nükleotid polimorfizmleri tarif edilmiştir. Ailesel eozinofilinin genetik araştırmasında, IL-5 geninin (C-703T) ilk ATG kodonunun 703 nükleotid yukarı akışında bir C'den T'ye geçiş keşfedilmiştir (Rioux ve ark., 1998). IL-5 geni, IL-4 ve IL-13 genlerinin yanında bir sitokin gen kümesinde kromozom 5 üzerinde bulunur (Boulay ve ark.,1992). Ayrıca, IL-5 geni, IL-4 ve IL-13, kromozom 5q31 üzerinde 120 kilobaz üzerine yayılmış uzun menzilli düzenleyici elemanlar tarafından koordineli olarak düzenlenebilir. Bu gen, hem B hücrelerinin hem de eozinofillerin büyüme ve farklılaşma faktörü olarak kullandığı bir sitokin üretir (Hameed ve ark., 2019).

### **2.6.4. Astımlı Hastalarda İnterlökin-5 (IL-5) Polimorfizmi**

Daha önce yapılan bir çalışma, çocuklarda IL-5-746C/T ve IL-5C703T polimorfizmleri ile astım riski arasındaki bağlantıyı araştırmıştır (Yamamoto ve ark., 2003; Kabesch ve ark., 2007). Bununla birlikte, bulgular çelişkili ve sonuçsuzdur. Çünkü daha önce IL-5-746C/T ve IL-5C703T polimorfizmleri ile astım riski arasındaki bağlantıyı inceleyen hiçbir meta-analiz yapılmamıştır. Bu ilişkiyi araştırmak için Irak Kerbela Üniversitesi'nden Hameed, ve ark., (2019) tarafından bir meta-çalışma yapılmıştır. Meta-analizin sonuçları, IL-5 C-746T polimorfizmi ile astım arasında doğrudan bir ilişki olmadığını göstermiş ve IL-5 geninin C-703T polimorfizminin çocuklarda astım riskine sebep olabileceğini ortaya koymuştur (Hameed. ve ark., 2019).

## **2.7. Gen Polimorfizminin Tespiti**

### **2.7.1. PCR – Dizileme**

Doğrudan dizileme, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ampliconlarındaki mutasyonları saptamak için altın standart yaklaşımdır. Ne yazık ki, bu süreç özellikle büyük ölçekli uygulamalarda maliyetli, zaman alıcı ve zahmetlidir (Gulija ve ark., 2011). Nükleik asit temelli

yaklaşımlar çoğunlukla incelenen insanlar arasındaki fenotipik farklılıklara erişmek ve araştırmak için kullanılmaktadır. Bu süreçte genomik DNA izole edilir, spesifik bir genetik lokus hedeflenir ve PCR yapılır. Bu nedenle, denatüre gradyan jel elektroforezi (DGGE), sıcaklık gradyan jel elektroforezi (TGGE), kimyasal uyumsuzluk klivaj (CMC) yöntemi ve amplifikasyon refrakter mutasyon sistemi (ARMS) gibi birkaç PCR sonrası genotipleme tekniği, nükleik asit dizilerindeki varyasyonları tanımlamak için mevcuttur (Hashim ve ark., 2019).

### **2.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Tek Sarmallı Konformasyon Polimorfizmi (PCR-SSCP)**

Polimeraz zincir reaksiyonu-tek sarmallı konformasyon polimorfizmi (PCR-SSCP) tekniği PCR ampliconları içindeki olası nokta mutasyonlarını belirlemek için uygulanmıştır. PCR-SSCP'nin ana konsepti, çift sarmallı formların ısı yoluyla tek sarmallı formlara ilk ayrılmasına (eritilmesine) dayanmaktadır. Ayrılmış durumdaki moleküller, nükleik asit dizilerine dayalı olarak üç boyutlu bir şekle katlanma eğilimindedir (Hashim ve ark., 2019). PCR-SSCP'de oluşabilecek istenmeyen düşük çözünürlüklerden kaçınmak için birçok optimizasyon işlemi yapılmalıdır. PCR-SSCP'nin optimizasyonu, PCR-SSCP'nin çözünürlüğünü iyileştirmek için poliakrilamid jel konsantrasyonu (%8–14), sıcaklık (4–20°C) ve yapılması gereken voltaj (5–10 V/cm) gibi bir dizi çalışma ile gerçekleştirilir (Zhu ve ark., 2006).

### **2.7.3. PCR- Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (PCR-RFLP)**

Bu yöntemde, bir PCR ampliconu, DNA'yı tanıma bölgesi olarak adlandırılan belirli bir kısıtlama bölgesinde kesen ve çeşitli boyutlarda çok sayıda DNA fragmanı ile sonuçlanan spesifik bir kısıtlama enzimi (RE) ile işlenir. Sindirilen ampliconlar daha sonra bir jel üzerine yerleştirilir ve bir elektrik alanına maruz bırakılır. Bunun sonucunda, farklı büyüklükteki bantlar jel boyunca farklı mesafelerde hareket edecektir (Panneerchelvam ve ark., 2003). PCR-RFLP'nin basitliği en güçlü özelliğidir. PCR-RFLP, fazla moleküler biyoloji bilgisi gerektirmeden yürütülebilir. Kullanım kolaylığı ve basitliğine rağmen, PCR-RFLP, kısıtlama enziminin tanıma bölgesi ile sınırlı olmakla beraber ve başka bir RE ile çift sindirim kullanılmadığı sürece diğer diziler göz ardı edilir. Bu nedenle, PCR-RFLP'nin ana sınırlamaları, spesifik RE gereksinimi ve aynı anda birkaç SNP'nin hedeflenmesi durumunda tam varyasyonu tanımlamanın zorluğudur. Bu zorluk, iki enzimin tek bir reaksiyon karışımında birleştirilmesiyle kısmen çözülebilir (Shirasawa ve ark., 2016).

Örnek işleme süresi RE ve elektroforez ile in vitro amplikon sindirimi olmak üzere iki aşamaya ayrılır. Kullanılan RE türüne bağlı olarak değişen RE sindirimi için değişken inkübasyon süreleri gereklidir. Bununla birlikte, Hinfl gibi bazı enzimler için inkübasyon süresi 30 dakikadır, oysa pratik olarak tüm enzimler hedef tanıma dizilerini sindirmek için 60 dakikalık bir inkübasyon süresi gerektirmektedir (Fitarelli-Kiehl ve ark., 2016). Halihazırda tasarlanmış amplikonlar, tanıma dizileri ve sindirilmiş parçaların beklenen boyutları nedeniyle, PCR-RFLP verilerinin yorumlanması, PCR-SSCP sonuçlarından daha kolaydır (Gasser ve ark., 2006).

## **2.8. Astım Teşhisi**

### **2.8.1. Hastalık Öyküsü**

Astımlı hastalarda pozitif bir aile öyküsü astım veya diğer atopik hastalıkların yanı sıra kişisel atopik bozukluk, özellikle alerjik rinit öyküsü olabilir. Öykü boyunca, toz akarları, hayvan tüyleri, küfler, polenler, egzersiz, tütün dumanı veya soğuk hava gibi olası astım tetikleyicileri aranmalıdır (Kaplan ve ark., 2009).

Astımı kronik obstrüktif akciğer hastalığından (KOAH) ayırt etmek yaygın bir klinik zorluktur. Astım, genellikle tetikleyicilere maruz kalmanın ardından gelişen çeşitli semptomların yanı sıra (tipik olarak gece 2 ile 6 arasında ortaya çıkan) gece semptomları ile bağlantılıdır (Hodder, 2007).

Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri almayan ve akciğer grafisi normal olan hastalarda astım, kronik öksürüğün üç ana nedeninden biridir (diğerleri rinosinüzit ve gastroözofageal reflü hastalığıdır). Astıma bağlı öksürük sıklıkla geceleri ortaya çıkar, bu nedenle gündüz muayeneleri normal olabilir (Corrao ve ark., 1979).

### **2.8.2. Fiziki Muayene**

Astım semptomları çok değişken olduğundan, astımdan şüphelenilen bir hastanın fiziki muayenesi genellikle önemsizdir. Fiziksel bulgular genellikle sadece hasta semptomlar yaşarken görülür. Sonuç olarak, fiziksel kanıtların olmaması astım tanısını ortadan kaldırmaz. Oskültasyonda hırıltı, hava akımı sınırlamasının varlığını doğrulayan en yaygın anormal fiziksel bulgudur (Kim ve ark., 2011). Doktorlar ayrıca alerjik rinit veya dermatit gibi eş zamanlı atopik durumların belirtileri için üst solunum yollarını ve cildi incelemelidir (Kaplan ve ark., 2009).

### **2.8.3. Laboratuvar Testleri**



### **2.8.3.1. Akciğer Fonksiyon Testleri**

#### **2.8.3.1.1. Spirometri**

Spirometri en tipik olarak solunum fonksiyon laboratuvarlarında yapılır, ancak birinci basamak muayenehanelerinde de yapılabilir (Tuomisto ve ark., 2008). Obstrüksiyon taraması, kullanımı laboratuvar tabanlı spirometri ekipmanından daha uygun olan portatif el tipi spirometrelerle yapılabilir (Ryttila ve ark., 2008).

Spirometri, zorlu vital kapasiteyi (FVC, solunabilecek en büyük hava hacmi) ve zorlu ekspiratuar hacmi (FEV1) ölçerek FEV1/FVC oranını hesaplar. Hastadan mümkün olduğu kadar fazla hava soluması, dudaklarını spirometrenin ağızlığı üzerine kapatması ve havayı mümkün olduğunca çabuk ve tam olarak dışarı üflemesi istenir (Kaplan ve ark., 2009). FEV1/FVC oranı, genel popülasyonda normalde 0,80'den ve muhtemelen çocuklarda 0,90'dan fazladır (Bateman ve ark., 2008). Bunlardan daha düşük herhangi bir değer, hava akımı tıkanıklığı olduğunu göstermektedir (Bateman ve ark., 2008).

#### **2.8.3.1.2. Fraksiyonel Ekshalasyon Nitrik Oksit Testi**

Gaz molekülü fraksiyonel ekshale edilen nitrik oksit (FeNO), bir inflamatuvar sürece yanıt olarak oluşturulmakla beraber astımı diğer akciğer hastalıklarından ayırt etmeye yardımcı olabilir (Schneider ve ark., 2013). Bir nefes testi bu parçacığı tespit ederek doktorun daha iyi bakım sağlamasına yardımcı olabilir. Nitrik oksit (NO), bağışıklık sistemi için hayati önem taşıyan vasküler ve bronşiyal tonu düzenler (Dweik ve ark., 2011). FeNO, astım türlerinin KOAH'tan ve astıma ek olarak eozinofilik bronşit gibi benzer semptomları olan diğer hastalıklardan ayırt edilmesinde faydalıdır (Miskoff ve ark., 2019).

### **2.9. Tedavi**

#### **2.9.1. İnhale Kortikosteroidler**

İnhale kortikosteroidlerin (ICS) kullanımı, vaka düzeyi hafif de olsa daha şiddetli de olsa, astımı olan kişiler için bakım standardıdır (Papi ve ark., 2018). Bu kimyasallar, immünosupresanlar olarak hareket etmenin yanı sıra epitel hücreleri, nöronlar ve düz kaslar gibi solunum yollarındaki yapısal hücrelere de fayda sağlayabilir (Lommatzsch, 2012). Ayrıca, son kanıtlar astımlı gebe kadınlarda ICS tedavisinin optimize edilmesinin yenidoğanlarda astım insidansını önemli ölçüde azaltabileceğini düşündürmektedir (Morten ve ark., 2018).

#### **2.9.2. Alerjen İmmünoterapi (AIT)**

AIT, alerjik hava yolu bozukluklarında ilk kez 1911'de Leonard Noon tarafından tanımlanmış olan en erken immün modülasyon türüdür (Durham ve ark., 2011). Dendritik hücre fonksiyonu restore edilir, Th2'den Th1 yanıtlarına immün sapma teşvik edilir, T düzenleyici hücreler (Treg'ler) indüklenir ve bloke edici antikorlar (IgA veya IgG4 gibi) üreten B düzenleyici hücreler (Breg'ler), çeşitli adjuvan türleri ile kombinasyon halinde düzenli olarak yüksek dozlarda alerjen uygulandığında teşvik edilir (Shamji ve ark., 2017). İlacın kesilmesinden sonra bile, bu yollar alerjik hava yolu yanıtlarında sürekli bir azalmaya neden olur (Shamji ve ark., 2017). Şu anda subkutan (SCIT), sublingual (SLIT), intralenfatik, epikutanöz veya oral AIT dahil olmak üzere çeşitli AIT yolları araştırılmaktadır (Pfaar ve ark., 2019).

### **2.9.3. Anti-IgE Antikorları**

Alerjik astımlı hastalarda, alerjene özgü immünoglobulin E (IgE), alerjen kaynaklı alevlenmelerin birincil nedenidir. Mast hücrelerinden IgE'nin uzaklaştırılması, alerjen kaynaklı IgE çapraz bağlanmasını en aza indirebilir ve sonuç olarak astım kontrolünü iyileştirebilir (Holgate ve ark., 2005).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan ekipman, malzeme ve kitler Tablo 3.1, 3.2, 3.3'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.1. Ekipman ve Aparatlar**

<b>Ekipman ve Aparatlar</b>	<b>Şirket</b>	<b>Menşei</b>
Santrifüj	Hermle	Almanya
Vorteks Mikser	FANEM	Brezilya
Benmari	DAIHAN Scientific Ltd.	G. Kore
Mikropipetler (farklı boyutlarda)	Eppendorf	Almanya
Dondurucu	Hicool	Çin
Dijital Ölçek	BIONEER	G. Kore
PCR Termal Döngüleyici	BIONEER	G. Kore
Jel Elektroforez Aparatı	BIONEER	G. Kore
Jel Dekuminasyon	ATTO	Japonya
Exispin	BIONEER	G. Kore
HumaOkuyucu HS (ELISA)	HUMAN	Almanya
Tek kullanımlık pipet uçları	AFCO	Ürdün
EDTA tüpü	AFCO	Ürdün
Jel tüpü	AFCO	Ürdün
Mikro-tüpler (Eppendorf) 1.5 ml)	AFCO	Ürdün
Düz tüpler	AFCO	Ürdün

**Tablo 3.2. Kitler**

gSYNCTM DNA Ekstraksiyon Kiti	Geneaid Biotech Ltd.	Tayvan
İnsan İnterlökin 4 ELISA Kiti	Bioassay Technology Laboratory BT LAB	Çin
İnsan İnterlökin 5 ELISA Kiti	Bioassay Technology Laboratory BT LAB	Çin

**Tablo 3.3. Materyaller**

10X TBE Tamponu	BIONEER	G. Kore
Mutlak Etanol	HAYMAN	İngiltere
Agaroz Tozu	BIO BASIC	Kanada
Etidyum bromür	Promega	ABD

**Tablo 3.4. Primerler ve Kısıtlama Enzimleri (RE)**

F 5'- TAAACTTGGGAGAACATGGT- 3'	BIONEER	G. Kore
R 5'- TGGGGAAAGATAGAGTAATA- 3'		
F 5'- C A G-GGA-GAG-CCA-ATC- AGT- 3'	BIONEER	G. Kore
R 5'-ATG-ATG-TCC-AGA-CTC-CAG-GAT-CT-3'		
AvaII	SibEnzyme	Rusya
AiwNI	SibEnzyme	Rusya

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Hasta ve Kontrol Grupları

Çalışmaya Irak'ın batısındaki Anbar Valiliği'ndeki Anbar ve Ramadi Genel Eğitim Hastanesi ve Rawah Genel Hastanesi Göğüs, Solunum ve Astım Hastalıkları Danışma Kliniğine yönlendirilen bir grup astımlı hasta arasından rastgele seçilen 50 astımlı hasta dahil edilmiştir. Tanı, konsültan sağlık personeli tarafından uluslararası kriterler kullanılarak konulmuştur. Vakala ve kontrol grubundakilerin tümü 18 ile 67 yaşları arasındaydı. Kontrol grubu, anamnez özgeçmişlerine göre rastgele seçilen 50 sağlıklı bireyden oluşmuştur. Bu deneklerde bronşiyal astım veya diğer alerji bozuklukları öyküsü ve hava yolu hiperreaktivitesine ilişkin herhangi bir rapor edilmiş gösterge söz konusu olmamakla beraber ilaç da almamışlardır. Çalışma Anbar Etik Kurulu ve Ramadi Genel Eğitim Hastanesi tarafından yürütülmüştür.

4/8/2021 tarih ve 120/2021 sayılı kararla onaylanmıştır.

### 3.2.2. Örnek Toplama

Anbar ve Ramadi Genel Hastanesi ve Rawah Genel Hastanesi Göğüs, Solunum ve Astım Hastalıkları Danışma Kliniğine sevk edilen astımlı hastalardan toplam (50) periferik kan örneği alınmış, benzer şekilde, 20/9/2021 ile 20/11/2021 arasındaki dönemde kontrol grubundaki sağlıklı deneklerden (50) periferik kan örneği toplanmıştır. İncelenen her denekten beş mililitre venöz kan alınmış ve aseptik koşullar altında iki kısma ayrılmıştır: DNA ekstraksiyonu için

steril etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere iki mililitre tam kan toplanmış ve daha fazla PCR amplifikasyonu için  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmış ve geri kalan, 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmeden önce oda sıcaklığında 30 ila 60 dakika kendiliğinden pıhtılaşma için bir jel tüp içinde bırakılmıştır. Toplam IL-4 ve IL-5 düzeylerinin belirlenmesi için serum örnekleri düz tüplerde  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de dondurulmuştur.

### **3.2.3. IL-4 ve IL-5'in Toplam Düzeylerinin Belirlenmesi**

Çalışmaya katılan deneklerin serumları, İnsan IL- 4 ELISA Kiti (BT LAB/Çin) ve İnsan IL-5 ELISA Kiti (BT LAB/Çin) kullanılarak ELISA ile toplam IL-4 ve IL-5 düzeylerini belirlemek için kullanılmıştır.

#### **3.2.3.1. Test Prensipleri**

Bu kit, Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testidir (ELISA). Plaka, bir İnsan IL-4 antikoru (İnsan IL-5 antikoru) ile önceden kaplanmıştır. Numunede bulunan IL-4 (IL-5) eklenir ve oyuklar üzerinde kaplanmış antikorlara bağlanır. Biotinlenmiş İnsan IL-4 (IL-5) antikoru daha sonra eklenir ve numunedeki IL-4(IL-5)'e bağlanır. Streptavidin-HRP daha sonra eklenir ve biyotinlenmiş IL-4 (IL-5) antikoruna bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP bir yıkama adımı sırasında yıkanarak uzaklaştırılır. Daha sonra substrat çözeltisi eklenir ve İnsan IL-4 (IL-5) miktarıyla orantılı olarak renk gelişir. Reaksiyon, asidik bir durdurma çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırılır ve absorbans 450 nm'de ölçüldü.

#### **3.2.3.2. Serum Örneklerinin Hazırlanması**

$-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan serum örnekleri, teste başlamadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.

#### **3.2.3.3. Reaktif Hazırlama (IL-4)**

- i. Tüm reaktifler kullanımdan önce oda sıcaklığına getirildi.
- ii. Standart 120  $\mu\text{L}$  standart (1280 ng/L), 120  $\mu\text{L}$  standart seyreltici ile sulandırılarak 640 ng/L'lik standart bir stok çözeltisi oluşturuldu
- iii. Seyreltmeler yapılmadan önce standart, hafif çalkalama ile 15 dakika boyunca nazikçe oturmaya bırakıldı.

- iv. 320 ng/L, 160 ng/L, 80 ng/L ve 40 ng/L çözeltiler üretmek için standart seyreltici ile standart stok çözeltisi (640 ng/L) 1:2 oranında seyreltme ile çift standart noktalar hazırlandı.
- v. Standart seyreltici sıfır standart olarak görev yapmıştır (0 ng/ml).

Standart çözeltilerin seyreltilmesi aşağıdaki verildiği şekilde önerilmiştir.:

640 ng/L	Standart No.5	120µl Orijinal Standart + 120µl Standart Seyreltici			
320 ng/L	Standart No.4	120µl Standart No.5 + 120µl Standart Seyreltici			
160 ng/L	Standart No.3	120µl Standart No.4 + 120µl Standart Seyreltici			
80 ng/L	Standart No.2	120µl Standart No.3 + 120µl Standart Seyreltici			
40 ng/L	Standart No.1	120µl Standart No.2 + 120µl Standart Seyreltici			
Standart konsantrasyon	Standart No.5	Standart No.4	Standart No.3	Standart No.2	Standart No.1
1280 ng/L	640 ng/L	320 ng/L	160 ng/L	80 ng/L	40 ng/L

#### • Yıkama Tamponu

20 ml yıkama çözeltisi distile su içinde seyreltilerek 500 ml 1x yıkama tamponu elde edilmiş olup karışım, kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırıldı.

#### • Test Prosedürü

1. Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve örnekler talimatlara göre yapılmıştır. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirilmiş olup, test oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.
2. Test için gerekli şerit sayısı belirlendi. Şeritler kullanılmak üzere çerçevelere yerleştirildi. Kullanılmayan şeritler 2-8°C'de tutuldu.
3. Standart kuyucuğa 50 µl standart eklendi. Standart çözelti bir antibiyotik antikor içerdiğinden, antikor standart düzeye eklenmemiştir.
4. Örnek kuyucuklarına 40 µl örnek eklendi, sonra örnek kuyularına 10 µl anti-IL-4 antikor eklendi, daha sonra örnek kuyularına ve standart kuyucuklara 50 µl

streptavidin-HRP eklendi (boş kontrol kuyucuğu değil). İyice karıştırıldı. Panel bir sızdırmazlık maddesi ile kaplanmıştır. İnkübasyon, 37 °C'de 60 dakika boyunca gerçekleştirildi.

5. Tampon çıkarıldı ve plaka, yıkama çözeltisinde beş kez yıkandı. Her yıkama için kuyucuklar, 30 saniye ile 1 dakika süreyle en az 0.35 mL yıkama tamponunda ıslatıldı. Daha sonra plaka kağıt havlular kullanılarak kurutuldu.
6. Her kuyucuğa 50 µL stop çözeltisi eklenerek mavi rengin hemen sararması sağlandı.
7. Durdurma çözeltisinin eklenmesinden sonraki 10 dakika içinde, her bir kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri), 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu kullanılarak belirlendi.

### 3.2.3.4.Reaktif Hazırlama (IL-5)

Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi.

- **Standart**

120 uL standart (960 ng/L), 480ng/L standart stok oluşturmak için 120 µL standart seyreltici ile sulandırıldı. Standartın 15 dakika oturmasına izin verildi. Seyreltmeleri yapmadan önce hafifçe çalkalandı. Çift standart noktalar, 240 ng/L, 120 ng/L, 60 ng/L ve 30ng/L çözeltiler üretmek için standart seyreltme ile standart stok çözeltisi (480 ng/L) 1:2 seyreltmeyle hazırlandı. Standart seyreltici, sıfır standart (0 ng/ml) olarak görev yaptı. Standart çözeltilerin seyreltilmesi aşağıdaki verildiği şekilde önerilmiştir:

480 ng/L	Standart No.5	120µl Orijinal Standart + 120µl Standart Seyreltici			
240 ng/L	Standart No.4	120µl Standart No.5 + 120µl Standart Seyreltici			
120 ng/L	Standart No.3	120µl Standart No.4 + 120µl Standart Seyreltici			
60 ng/L	Standart No.2	120µl Standart No.3 + 120µl Standart Seyreltici			
30 ng/L	Standart No.1	120µl Standart No.2 + 120µl Standart Seyreltici			
Standart konsantrasyon	Standart No.5	Standart No.4	Standart No.3	Standart No.2	Standart No.1
960 ng/L	480 ng/L	240 ng/L	120 ng/L	60 ng/L	30 ng/L

- **Yıkama Tamponu**

20 ml konsantre yıkama çözeltisi, damıtılmış suda 25 kez seyreltildi ve 500 ml 1x Yıkama Tamponu elde edildi. Ve kristaller merkezde olduğu için kristaller tamamen eriyene kadar nazikçe karıştırıldı.

- **Test Prosedürü**

1. Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve örnekler talimatlara göre yapılmıştır. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirilmiş olup, test oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir
2. Test için gerekli şerit sayısı belirlendi. Şeritler kullanılmak üzere çerçevelere yerleştirildi. Kullanılmayan şeritler 2 ile 8°C'de tutuldu.
3. Standart kuyucuğa 50 µl standart eklendi. Standart çözelti bir antibiyotik antikoru içerdiğinden, antikor standart düzeye eklenmemiştir.
4. Örnek kuyucuklarına 40 µl örnek eklendi, sonra örnek kuyularına 10 µl anti-IL-5 antikoru eklendi, daha sonra örnek kuyucuklarına ve standart kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP eklendi (boş kontrol kuyucuğu değil). İyi karıştırıldı. Panel bir sızdırmazlık maddesi ile kaplanmıştır. İnkübasyon, 37 °C'de 60 dakika boyunca gerçekleştirildi.
5. Tampon çıkarıldı ve plaka, yıkama çözeltisinde beş kez yıkandı. Her yıkama için kuyucuklar, 30 saniye ila 1 dakika süreyle en az 0.35 mL yıkama tamponunda ıslatıldı. Daha sonra plaka kağıt havlular kullanılarak kurutuldu.
6. Her bir kuyucuğa 50 µl substrat çözeltisi A ve sonra her kuyucuğa 50 µl substrat çözeltisi B ilave edildi. Plaka, karanlıkta 37°C'de 10 dakika inkübe edildi, sonra yeni bir dolgu macunu ile kaplandı.
7. Her kuyucuğa 50 µL stop çözeltisi eklenerek mavi rengin hemen sararması sağlandı.
8. Durdurma çözeltisinin eklenmesinden sonraki 10 dakika içinde, her bir kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri), 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu kullanılarak belirlendi.

### **3.2.4.DNA Ekstraksiyonu ve Saflaştırma Yöntemi**

Genomik DNA Ekstraksiyonu, gSYNCTM DNA Ekstraksiyon Kiti kullanılarak yapılmıştır.

- **Örnek hazırlama**



200 µl'ye kadar tam kan, 1.5 mL'lik bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Hacim PBS ile 200 µl'ye ayarlandı. 20 µl proteinaz K eklendi ve pipetle karıştırıldı. Daha sonra 60 °C'de 5 dakika inkübe edildi.

- **Hücre Lizizi**

200 µl GSB Buffer eklendi ve kuvvetlice çalkalanarak karıştırıldı. Daha sonra 60 °C'de 5 dakika inkübe edildi, Tüp 2 dakikada bir alt üst edildi.

- **DNA bağlanması**

Lizat örneğine 200 µl mutlak etanol eklendi ve hemen 10 saniye kuvvetlice çalkalanarak karıştırıldı. GS kolonu 2 ml'lik bir toplama tüpüne yerleştirildi. Karışımın tamamı GS kolonuna aktarıldı. Daha sonra 14-16000 x g hızında 1 dakika santrifüj edildi. İçerdiği 2 ml'lik toplama tüpü akış yoluyla atıldı ve ardından GS kolonu 2 mL'lik yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.

- **Yıkama**

GS kolonuna 400 µl W1 tamponu eklendi. Santrifüj, 30 saniye boyunca 14-16000 x g'de gerçekleştirildi. GS kolonu 2 mL toplama tüpüne geri yerleştirildi. GS kolonuna 600 µL Yıkama Tamponu eklendi. 30 saniye boyunca 14-16000 x g'de santrifüjleme yapıldı ve akıntı atıldı. GS kolonu 2 ml'lik bir toplama tüpüne geri yerleştirildi. Kolon matrisini kurutmak için 14-16000 x g'de 3 dakika santrifüjleme yapıldı.

- **Elüsyon**

Kurutulmuş GS kolonunu transfer etmek için temiz bir 1.5 ml mikrosantrifüj tüpü kullanıldı. Kolon matrisine 35 µl önceden ısıtılmış elüsyon tamponu, TE tamponu eklenmiştir. Elüsyon Tamponunun ve TE tamponunun tamamen emilmesini sağlamak için 3 dakika açık bırakıldı. 30 saniye boyunca 14-16000 x g'de santrifüjleme yapıldı ve son olarak saflaştırılmış DNA ekstrakte edildi.

### **3.2.5 Primerlerin Hazırlanması**

Oligonükleotid primerleri yapılırken üreticinin talimatları izlendi. İlk olarak liyofilize ürün 150 µl steril su içinde eritilerek, vorteksenerek ve kısaca döndürülerek her bir primerin stok çözeltisi yapıldı ve daha sonra -20°C'de saklandı. İkinci olarak, her bir primer için 10 µL stok primer çözeltisi 90 µl serbest nükleaz suyu ile iyice karıştırıldıktan sonra çalışan bir primer

çözültüsü (10 µL) yapıldı ve polimeraz zincir reaksiyonu amplifikasyonu (PCR) için kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

IL – 4 C-589 T (rs 2243250)	F 5'- TAAACTTGGGAGAACATGGT- 3' R 5'- TGGGGAAAGATAGAGTAATA- 3'
IL- 5 C-703 T ( rs2069812)	F 5'- C A G-GGA-GAG-CCA-ATC- AGT- 3' R 5'-ATG-ATG-TCC-AGA-CTC-CAG-GAT-CT-3'

### 3.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Amplifikasyonu

#### 3.2.6.1. PCR Karışımının Hazırlanması

(5 µl) Master mix içeren tüpe her bir ileri ve geri primerden (1µl) eklenmiştir. Daha sonra her DNA örneğinden (6 µl) eklendi. Daha sonra toplam hacmi (25 µl) tamamlamak için (12 µl) Serbest nükleaz suyu ilave edildi. Karışımın karıştırılması işlemi (Exispin) cihazı ile yapılmıştır.

**Tablo 3.5.** PCR Reaksiyon Karışımı

Master mix	5 µl
Kalıp DNA	6 µl
İleri Primer	1 µl
Geri Primer	1 µl
Serbest nükleaz suyu	12 µl
Toplam hacim	25 µl

#### 3.2.6.2. PCR Termal Döngü Programları

Reaksiyon aşağıdaki koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3.6.** PCR Termal Döngü Programları

Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	95°C	5 dk	1 döngü
Denatürasyon	95°C	45 sn	25 – 35 döngü
Tavlama	50°C	45 sn	
Uzatma	72°C	45 sn	
Son Uzatma	72°C	7 dk	1 döngü

### **3.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi**

DNA saflaştırması ve PCR saptamasından sonra, % 2 agaroz konsantrasyonu ile elektroforez gerçekleştirildi. Bu agaroz jeli, 900 ml distile suya 100 ml 10X TBE Tamponu eklenerek hazırlanan 100 ml TBE tamponunda 2 gr agaroz tozunun çözülmesiyle hazırlanmıştır. Karışım fırına yerleştirildi ve kaynayıp berrak hale gelene kadar bırakıldı, ardından 58°C'ye soğutuldu. Etidyum bromür 2 µl eklendi. Jel tepsinin uçları kenarlarla kapatılmıştır. DNA örneklerini yüklemek için kullanılan kuyucukları yapmak için tarak tepsinin bir ucuna sabitlendi. Agaroz dikkatlice tepsiye döküldü ve oda sıcaklığında 30 dakika katılaşmaya bırakıldı. Daha sonra tarak ve bordürler tepside nazikçe çıkarıldı. Her kuyucuğa 10µl'lik PCR ürünü pipetlendi ve moleküler markör olarak kullanılmak üzere ilk kuyucuğa 5µl (100 bp ladder yada markör) eklendi. 1 saat boyunca elektrik akımı 70 volta ayarlandı. Daha sonra örnek analizi için Jel dekümantasyon cihazı kullanılır.

### **3.2.8. PCR ürünleri için Kısıtlama Enzimlerinin Eklenmesi**

#### **3.2.8.1. IL-4 C589T'nin PCR Ürünleri İçin Kısıtlama Enzimi AvaII'nin Eklenmesi**

IL-4 C589T'nin PCR ürünleri, aşağıdakiler yoluyla kısıtlama enzimi sindirimine tabi tutuldu:

1. Her PCR ürünü örneğine sindirim enziminin (AvaIII, sibenzyme) (1 µl) eklendi
2. Karışımın (Exispin) cihazı ile karıştırıldı.
3. PCR, 60 dakika boyunca 37°C'de gerçekleştirildi.

#### **3.2.8.2. IL-5 C-703'ün PCR Ürünleri için Kısıtlama Enzimi AlwNI'nin Eklenmesi**

IL-5 C-703 T'nin PCR ürünleri, aşağıdakiler yoluyla kısıtlama enzimi sindirimine tabi tutuldu:

1. Her PCR ürünü örneğine sindirim enziminin (AlwNI, sibenzyme) (1 µl) eklendi.
2. Karışımın Exispin) cihazı ile karıştırıldı.
3. PCR, 37°C'de 90 dakika boyunca gerçekleştirildi.

#### **3.2.8.3. Agaroz Jel Hazırlama**

900 ml Distile suya 100 ml 10X TBE Tamponu eklenerek hazırlanan 100 ml TBE tamponunda 2 gr agaroz tozu çözülerek agaroz jel hazırlanmıştır. Karışım fırına yerleştirildi ve kaynayıp berraklaşmaya kadar bekletildi, ardından 58°C'ye soğutuldu. Etidyum bromür eklendi. Jel

tepsisinin uçları kenarlarla kapatıldı. DNA örneklerini yüklemek için kullanılan kuyuları yapmak için tarak tepsinin bir ucuna sabitlendi.

#### **3.2.8.4. AgaroZ Jelde DNA Yükleme ve Çalıştırma**

(7µl) PCR ürünü her kuyucuğa pipetlendi, 1 saat boyunca elektrik akımı 70 volta ayarlandı. Daha sonra örnek analizi için Jel dekümentasyon cihazı kullanıldı.:



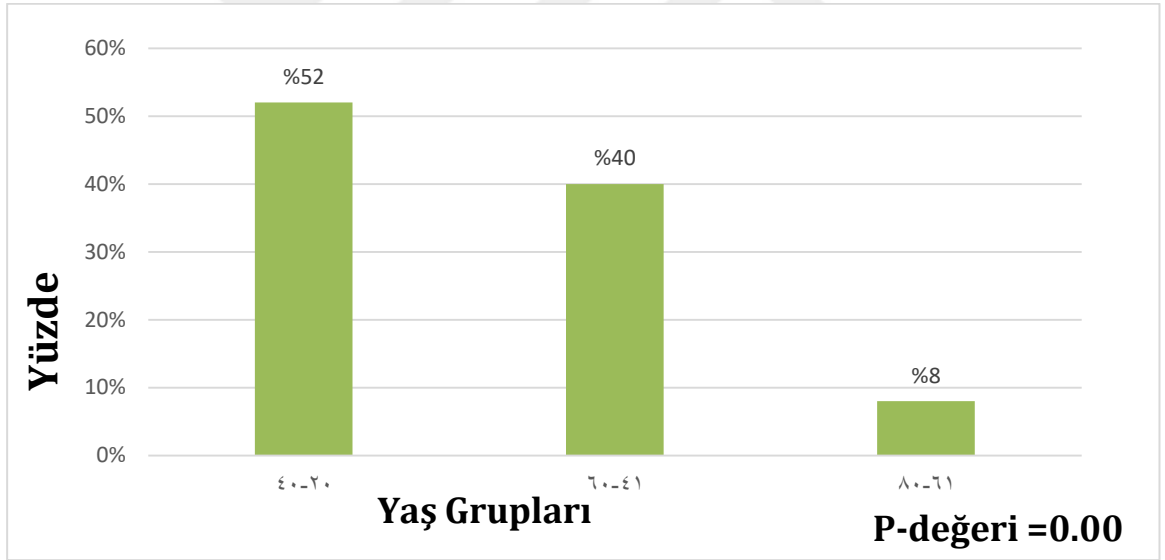
## 4. BULGULAR

### 4.1. Çalışma Gruplarının Demografik Özelliklere Göre Dağılımı

Bu çalışmada, bazı demografik özellikler, belirtildiği gibi kontrol ve vaka gruplarıyla doğrudan görüşmelerle yanıtlanan anketlerin analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir.

#### 4.1.1. Yaş

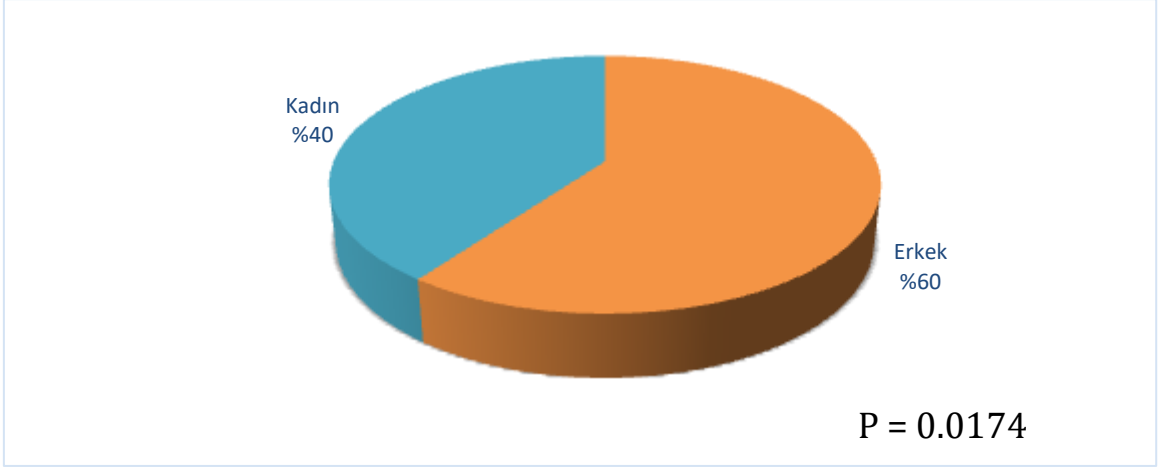
Bu çalışmada, astım hastalarının yaş grupları yüzdesi gruplar arasında anlamlı bir farklılık gösterilmiş olup (P-değeri =0.000), Şekil (4.1)'de gösterildiği gibi, (%52) ile (20-40 yaş) grubunda daha sık iken, bunu (%40) ile (41-60 yaş) grubu takip etmiş, (%8) ile daha yaşlı olan (61-80 yaş) grubunda astımlı hastalığa yakalanma şansı daha az olarak gerçekleşmiştir.



Şekil 4.1. Astımlı Hastaların Yaşa Göre Dağılımı

#### 4.1.2. Cinsiyet

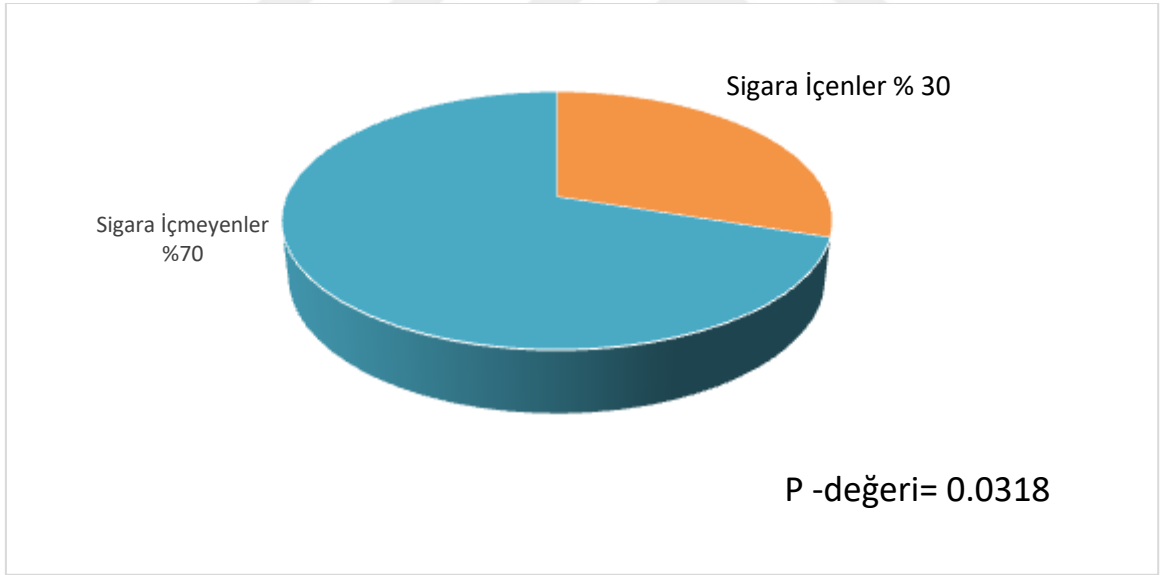
Şekil (4.2)'de gösterildiği gibi erkek hastaların yüzdesi (%60), kadın hastaların oranından (%40) daha yüksek olmuş, kontrol grubuna göre aralarında anlamlı farklılıklar söz konusudur (P-değeri = 0.0174).



**Şekil 4.2.** Cinsiyetin Astımlı Hastalara Etkisi

#### 4.1.3. Sigara İçme

Bu çalışmada, Şekil (4.3)'te gösterildiği gibi, sigara içmeyenlerin yüzdesi (%70), sigara içenlerin yüzdesinden (%30) daha yüksek olmuş, aralarında kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar söz konusudur (P-değeri =0.0318).



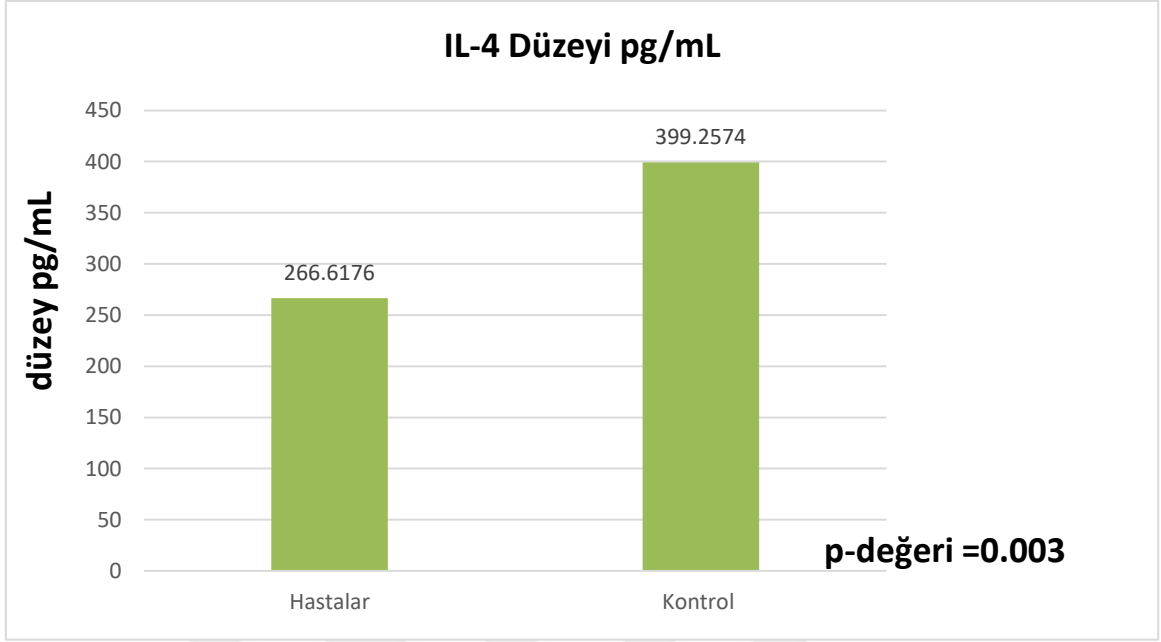
**Şekil 4.3.** Sigara İçmenin Astımlı Hastalara Etkisi

## 4.2. Biyokimyasal Parametreler

### 4.2.1. İnterlökin-4 (IL-4) Düzeyi

Bu çalışmanın sonuçları, kontrol ve astımlı hasta grubu arasında anlamlı farklılıklar ( $P < 0.05$ ) göstermiş olup, (Şekil 4.4)'te gösterildiği gibi, kontrol grubunda IL-4 düzeyi

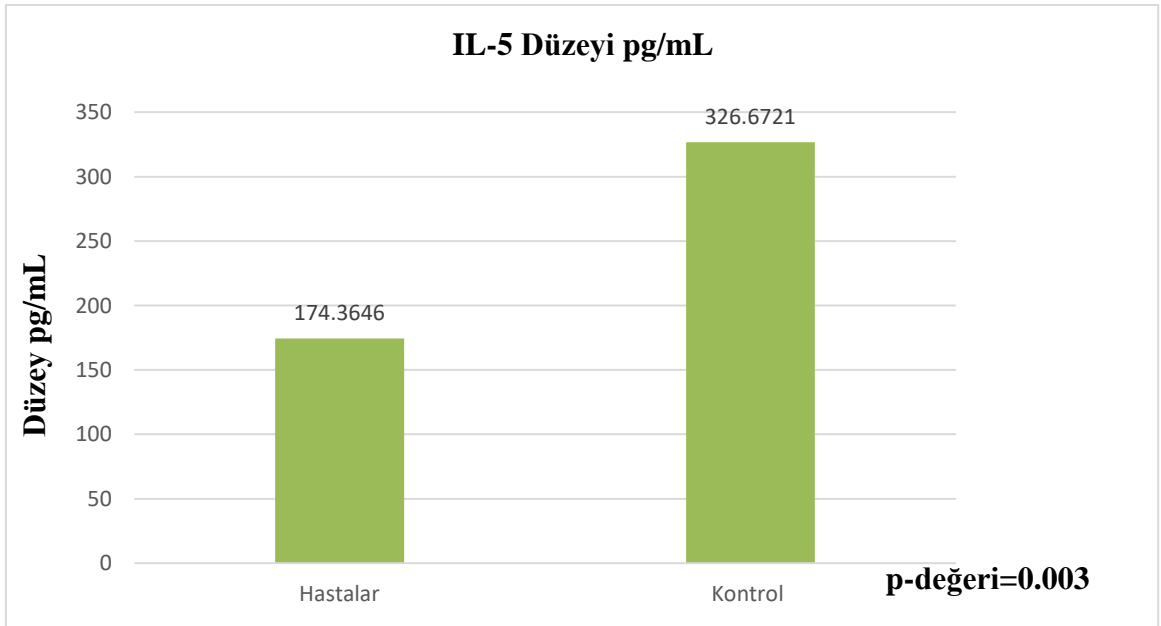
(399.2574±251.78106) pg/ml iken, vaka grubunda anlamlı bir şekilde (266.6176±175.1101) pg/ml'ye düşmüştür.



Şekil 4.4. Astımlı Hasta ve Kontrol Gruplarında IL-4 Düzeyi

#### 4.2.2. İnterlökin -5 (IL-5) Düzeyi

Bu çalışma, (Şekil 4.5'te gösterildiği gibi, kontrol grubundaki Interlökin 5 düzeyinin 326.6721±354.04007pg/ml olduğunu, vaka grubunda ise düzeyinin anlamlı olarak 174.3646±235.98401 pg/ml'ye düştüğünü göstermiştir.



Şekil 4.5. Astımlı Hasta ve Kontrol Gruplarında IL-5 Düzeyi

### 4.3. Astımlı Hastalarla İlişkili IL-4 ve IL-5 Genlerinin Genetik Polimorfizmleri

#### 4.3.1. IL-4 (rs2243250) Gen Polimorfizmlerinin Genotiplenmesi

Gen Polimorfizmlerinin Genotiplenmesi IL-4 (rs2243250), spesifik primerler kullanılarak DNA amplifiye edildi ve ideal koşullarda aparat (ısı döngüleyici) ile tamamlanmış olup, sonuçlar Şekil (4.6)'da gösterildiği gibi bir agaroz jelde interlökin 4 (rs2243250) geninin hedef dizisinin bir bandının (195 bp) varlığını göstermiştir.

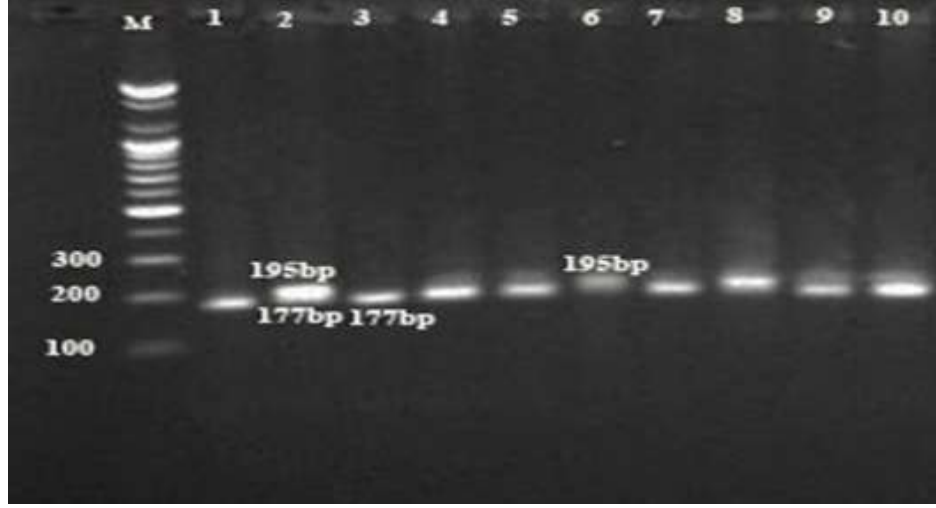


**Şekil 4.6.** IL4'ün Agaroz Jel Elektroforezi (rs2243250) belirli bir primer kullanılarak amplifiye edilmiş ürün modelleri.

DNA markörü (100bp) M harfi ile gösterilmiştir. Astımlı hastaların ve kontrol gruplarının IL-4 (rs2243250) (195 bp) PCR sonuçları şerit 1-9 olarak adlandırılmıştır.

IL-4 (rs2243250) hedef dizilerinin PCR ürünleri, AvaII (5' GGWCC) tarafından sindirilmiştir. PCR-RFLP sonuçları, Şekil (4-7)'de gösterildiği gibi üç farklı genotipin varlığını ortaya koymuştur. İlk homozigot (TT) tahmin edilen 195 bp'yi, ikincisi (CT) 195, 177 ve 18 bp'yi ve üçüncüsü (CC) 177 ve 18 bp'yi göstermiştir.





**Şekil 4.7.** Astımlı Hastalarda ve Kontrol Gruplarında IL-4 (rs2243250) Geninin AvaII Enzimi Kullanılarak PCR-RFLP Elektroforezi

Şerit 6, 195 bp'lik bir bant ile (TT) alelini işaret etmektedir.

M: DNA markörü (100 bp), 2,4,5,7,8,9 ve 10. şeritler (CT) alelini, 3 band (195, 177 ve 18 bp) temsil etmektedir. 1 ve 3. şerit (CC) aleli, 2 bant (177 ve 18 bp) anlamına gelmektedir. 18 bp bandı görünür değildir.

- **IL-4 (rs2243250) Alel Frekansına Sahip Polimorfizmler**

Hasta ve kontrol gruplarında (rs2243250) gen polimorfizmi araştırılmıştır. Tablo (4.1), çalışma gruplarında IL-4 (rs2243250) genindeki polimorfizmlerin dağılımını göstermektedir. Vaka grubunda CT heterozigot genotipi (%60) iken bunu CC ve TT genotipleri (%20) izlemektedir. Kontrol grubunda en sık görülen genotip TT genotipi (%76) iken bunu CC genotipi (%24) izlemiştir. IL-4 (rs2243250) polimorfizmi anlamlı farklılıklar göstermiştir (CC ve CT: OR=72.6190, %95 CI 3.9463 ila 1336.3195, P= 0.0039). IL-4 (rs2243250) polimorfizminde, CC ve TT çalışma grupları arasında anlamlı bir fark oluşmuştur: OR=0.3158, %95 CI: 0.1061 ila 0.9399, P=0.0383). IL-4 rs2243250 polimorfizminde, çalışma grupları arasında T alelinin sıklıklarında anlamlı bir değişiklik söz konusudur (OR=3.3158, 95 %CI = 0.1727 ila 0.5775, P=0.0002).

**Tablo 4.1.** Alel Frekansı ile (rs2243250) Polimorfizmlerinin Genotip Dağılımı

Genotip rs2243250	Hastalar Sayısı (%)	Kontrol Sayısı (%)	P-değeri	O.R	CI (%95)
CC <sup>a</sup>	10 (%20)	12 (%24)			
CT	30 (%60)	0 (%0)	0.0039	72.6190	3.9463 ila 1336.3195
TT	10 (%20)	38 (%76)	0.0383	0.3158	0.1061 ila 0.9399
Toplam sayı	50 (%100)	50 (%100)			
Alel	Frekans	Frekans			

<b>C</b>	0.5	0.24			
<b>T</b>	0.5	0.76	0.0002	0.3158	0.1727 - 0.5775
<b>P≤0.05;OR=(%95CI);referans</b>					

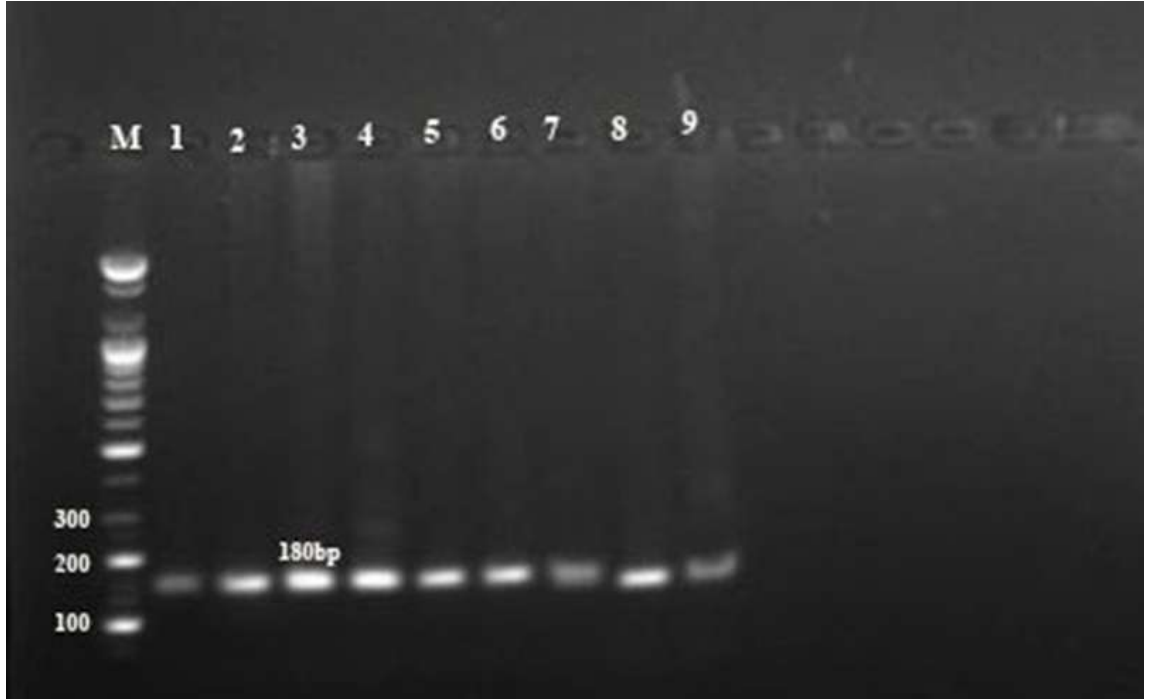
Tablo (4.2) astımlı hastalarda IL-4b rs2243250 genotiplerine göre klinik özelliklerin karşılaştırmasını göstermektedir. Çalışma, TT genotipi ile IL-4 düzeyi ve IL-5 düzeyi arasında daha yüksek bir korelasyon olduğunu göstermiştir (sırasıyla P = 0,001 ve 0,000) ayrıca CT genotipi ve yaş arasında anlamlı bir korelasyon söz konusudur. (p=0,009)

**Tablo 4.2.** Astımlı Hastalarda IL-4 rs2243250 Genotiplerine Göre Klinik Özelliklerin Karşılaştırılması

Parametreler	IL-4 rs2243250 genotipleri			P-değeri
	CC: 10 (%20)	CT: 30 (%60)	TT: 10 (%20)	
IL-4 düzeyleri (pg/ml), ortalama±SD	195.83±17.032	238.30±93.372	446.19±296.062	0.001
IL-5 düzeyleri (pg/ml), ortalama±SD	88.7±11.503	122.04±122.830	417.00±414.436	0.000
Yaş ortalama±SD	39.10±11.827	41.23±12.848	35.80±20.324	0.009

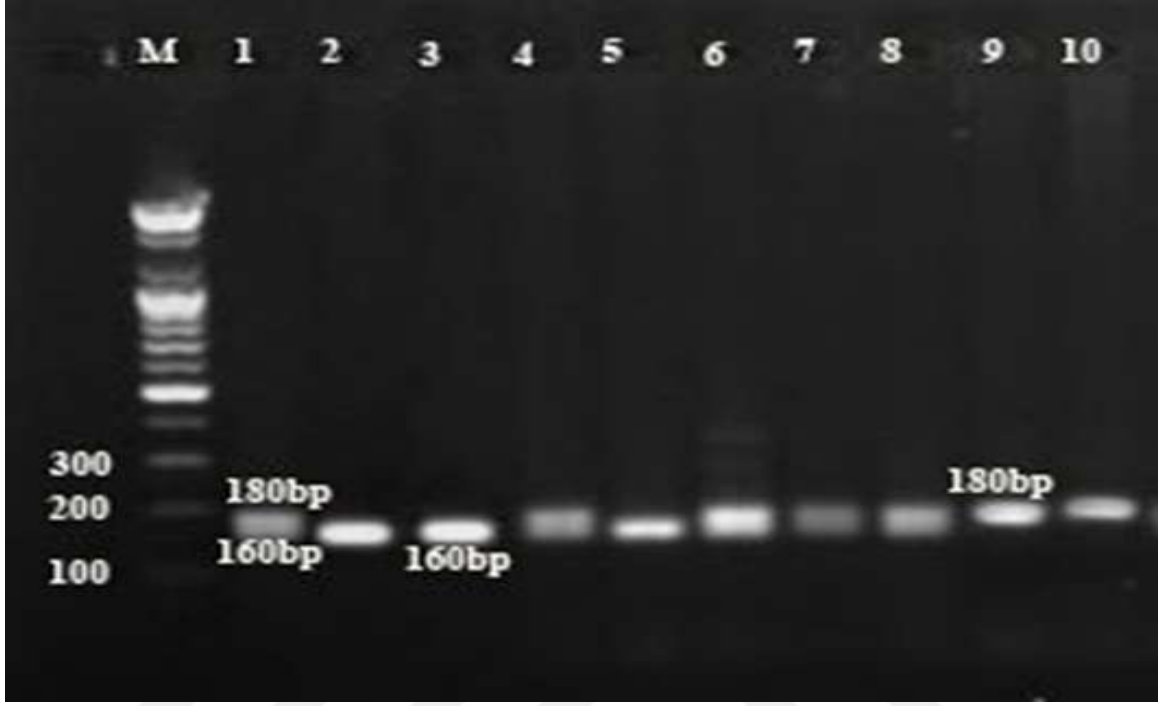
#### 4.3.2. IL- 5 rs2069812 Gen Polimorfizmlerinin Genotiplendirilmesi

Sonuçlar, IL- 5 rs2069812 geninin hedef dizisini içeren bir agaroz jelde tek bir bandın (180 bp) varlığını doğrulamıştır (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8.** Şerit 1-7: Astımlı Hastaların IL-5 rs2069812 (180 bp) PCR Ürünleri ve Şerit 8-9: Kontrol grupları. M: DNA boyutu markörü (100bp)

IL-5 rs2069812 PCR ürünleri, IL-5gen'deki rs2069812 SNP'yi saptamak için AlwNI (5' CAGNNN^CTG 3') ile sindirilmiştir (Şekil 4.9). Genotipler, Polimorfizmlerin yokluğuna veya varlığına göre 3 gruba dağıtılmıştır: TT homozigot 180bp, TC heterozigotu 180, 160 ve 20 bp ve CC homozigot 160 ve 20bp göstermiştir.



**Şekil 4.9.** AlwNI Enzimi Kullanılarak, Çalışma Gruplarında IL-5 rs2069812 Geninin Allelotiplenmesi

M, DNA markörü (100 bp) anlamına gelmektedir. Homozigot alel (TT), 180 bp'lik bir moleküler boyuta sahip tek bir banda sahip iken; heterozigot alel (TC), moleküler boyutları 180, 160 ve 20 bp olan üç banda sahip olmuştur. Homozigot alel (CC), Şeritler 2, 3 ve 5'te 160ve 20 bp'lik iki banda sahip olmuştur. Not: 20 bp bandı görünür değildir.

#### • Alel Frekanslı IL-5 rs2069812 Polimorfizmlerinin Genotip Dağılımı

Tablo (4.3) çalışma gruplarında IL-5 rs2069812 gen polimorfizminin dağılımını göstermektedir. Kontrol grubunda TT homozigot genotipi (%66) ile en yaygın genotip iken, bunu TC heterozigot genotipi (%34) izlemiştir. Vaka grubunda en sık görülen genotip TC heterozigot genotipi (%64) olmuş, bunu TT homozigot genotipi (%24) ve homozigot CC (%12) izlemiştir.

Heterozigot TC ve Homozigot TT genotipik sıklığı (OR= 5.1765, %95 CI= 2.1372 ila 12.5379, P=0.0003) ve TT ile karşılaştırıldığında CC genotipik sıklığı (OR=34.8, %95 CI=1.8255 ila 664.9429, P= 0.0183) olmuştur. IL-5 rs2069812 polimorfizminde, çalışma grupları arasında C

allelinin sıklıklarında anlamlı bir değişiklik söz konusudur (OR=3.3130, 95 %CI = 1.7041 ila 6.4408, P=0.0004).

**Tablo 4.3.** Çalışma Gruplarında rs2069812 Polimorfizmlerinin Genotip Frekansları

Genotip rs2069812	Hastalar Sayısı (%)	Kontrol Sayısı (%)	P-değeri	O.R	CI (%95)
TT <sup>a</sup>	12 (%24)	33 (%66)			
TC	32 (%64)	17 (%34)	0.0003	5.1765	2.1372 ila 12.5379
CC	6 (%12)	0 (%0)	0.0183	34.8400	1.8255 ila 664.9429
Toplam sayı	50 (%100)	50 (%100)			
<b>Alele</b>	Frekans	Frekans			
T	0.56	0.83			
C	0.44	0.17	0.0004	3.3130	1.7041-6.4408
P≤0.05;OR=(95%CI);a referans					

Tablo (4.4) astımlı hastalarda IL-5 rs2069812 genotiplerine göre klinik özelliklerin karşılaştırmasını göstermektedir. Çalışma, TT genotipi ile IL-4 düzeyi ve IL-5 düzeyi arasında daha yüksek bir korelasyon olduğunu göstermiş olup (sırasıyla P = 0,017 ve 0,004) ayrıca TC genotipi ve yaş arasında anlamlı bir korelasyon söz konusudur (p=0,000)

**Tablo 4.4.** Astımlı Hastalarda IL-5 rs2069812 Genotiplerine Göre Klinik Özelliklerin Karşılaştırılması

Parametre	IL-5 rs2069812 Genotipleri			P- Değeri
	CC: 6 (%12)	TC: 32 (%64)	TT: 12 (%24)	
IL-4 Düzeyleri (pg/ml), ortalama±SD	245.86±132.037	246.57±106.799	456.14±364.511	0.017
IL5- Düzeyleri (pg/ml), ortalama ±SD	179.55±181.699	119.22±98.419	458.07±544.928	0.004
Yaş Ortalama ±SD	50.50±10.833	39.13±12.981	21.33±2.875	0.000

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Yaş

Daha önce yapılan bir çalışmanın sonucu astım insidansının erkekler ve kadınlar için 1000 kişi/yıl başına sırasıyla 10.58 ve 15.03 olduğunu göstermiştir. Astım insidansı ilerleyen yaşla birlikte, özellikle erkeklerde artmıştır (Park ve ark., 2019). Çocuklar arasında prevalans erkeklerde kadınlara göre daha yüksektir (Bouman ve ark., 2005). Sürükleyici bir şekilde, ergenlikten sonra kızlar arasında astım sıklığı ve şiddeti artmakta olup, kadınlar arasında 20 yaşına kadar daha sık görülmekle beraber, menopozdan sonra erkekler ve kadınlar arasındaki astım görülme farkı azalmaktadır (Kynyk ve ark., 2011). Bu nedenle, Amerika Birleşik Devletleri'nde astıma bağlı ölümlerin %65'i kadınlar arasında meydana gelmektedir (Matteis ve ark., 2014).

Astım, farklı yaşlardaki kadın ve erkeklerde farklı prevalans ve şiddete sahip heterojen bir hastalıktır. Erkeklerin çocukken astım geliştirme olasılığı kızlara göre daha fazladır. Yetişkin kadınlarda astım insidansı ve şiddeti daha yüksektir (Chowdhury ve ark.,2021). Astım prevalansı, dünya çapında 339 milyondan fazla insanın astımdan muzdarip olduğu bazı bölgelerde %1'den %18'e kadar değişiklik göstermektedir. Astımda anlamlı bir cinsiyet farkı söz konusudur. 13 yaşın altındaki erkek çocuklarda astım daha sık görülürken, gelişmiş ülkelerde yetişkin kadınlarda bu oranlar erkeklere göre daha yüksektir. Gelişmiş ülkelerde, daha yüksek sağlık hizmeti kullanımı, çeşitli yaş kategorilerinde daha sık görülme ile doğrudan ilişkilidir (2-13 yaş arası erkek çocuklarda ve 23-64 yaş arası kadınlarda daha yüksektir) (Schatz ve ark., 2003).

Çalışmamız 18-67 yaş grubunu hedeflemiş olup, astımdan en çok etkilenen yaş grubu %52 ile (20-41) yaş grubu olurken, en az etkilenen grup 67 yaş ve üzeri olup en yaşlı grup olmuştur. Özellikle erkeklerde astım insidansının yaşla birlikte arttığını gösteren Park ve ark. (2019) çalışmasıyla çelişmektedir. Bu farklılığın nedeninin, daha yaşlı hastaların hastaneye yatırılma olasılıklarının daha yüksek olması ve genç meslektaşlarına göre daha yüksek ölüm oranlarına sahip olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Başta Covid-19 virüsü olmak üzere

kafa karıştırıcı ve kafa karıştırıcı hastalıkların rolüne ek olarak, ölüme yol açan şiddetli ve çok sistemli bir grup solunum yolu semptomlarının ortaya çıkmasına neden olmuştur.

Sonuçlardaki farklılığın bir başka olası nedeni, bilişsel bozukluk ve yaşa bağlı dispne gibi çeşitli faktörlerin yaşlılarda tanıya gecikmeye katkıda bulunması nedeniyle, yaşlılarda astım tanısını sürecini izlemenin zorluğudur.

## 5.2. Cinsiyet

Brezilya'da kadınların ölüm oranı 100.000 kişi başına 0,241 iken, erkeklerin ölüm oranı 100.000 kişi başına 0,193'tür. Yetişkinlikte, epidemiyolojik çalışmalar, kadınların astımdan muzdarip olma olasılığının erkeklerden daha yüksek olduğunu göstermiştir (MacSali ve ark.,2009). Yapılan birkaç araştırma cinsiyet hormonları ve astım arasındaki bağlantıyı araştırmıştır (Barr ve ark., 2004). İnsanlarda, bir dizi akciğer bozukluğunun risk, insidans ve etiyolojisinde cinsiyete bağlı farklılıklar vardır (Matteis ve ark., 2014). İnsanlarda, bir dizi akciğer bozukluğunun risk, insidans ve etiyolojisinde cinsiyete bağlı farklılıklar vardır (Matteis ve ark., 2014). Cinsiyet hormonları, astım prevalansındaki cinsiyet farklılıklarının çocukluktan yetişkinliğe geçişinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu değişiklikler ergenlik döneminde meydana gelmekte ve yetişkin kadınlarda yetişkin erkeklere göre daha yüksek astım prevalansı ile sonuçlanmaktadır (Chowdhury ve ark.,2021).

Hem erkeklerde hem de kadınlarda zaman içinde astım insidansı, gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde cinsiyet hormonlarının yanı sıra sosyoekonomik değişkenlerin, komorbiditelerin ve sağlık hizmetlerinin karmaşık bir kombinasyonunun rolünü ortaya koymaktadır. Bu özelliklerin tümü, gen ekspresyonu ve epigenetik değişiklikler dahil olmak üzere astımlı erkek ve kadınlar arasındaki genetik farklılıklardan etkilenmektedir (Han ve ark., 2020). Astımı olan kadınlar yaşamları boyunca erkeklere göre daha şiddetli bir astım formu geliştirirler (Wang ve ark., 2020). Kadınlarda astım alevlenmeleri östrojen düzeylerindeki değişikliklerden kaynaklanır. Östrojen bir anti-inflamatuar etkiye sahip olduğundan, TNF üretimini, IFN ekspresyonunu ve NK hücre aktivitesini inhibe eder (Baldaçara ve ark., 2017).

Astımlı 50 hastayla yaptığımız çalışma, cinsiyet ve astım arasında anlamlı bir ilişki olduğunu belgelenmiştir ( $p = 0.0174$ ). Erkek hastaların oranı %60 iken, kadın hastaların oranı %40 idi. Mevcut çalışma, her ikisinin çalışmaları ile uyumlu değildi (MacSali ve ark. 2009; Chowdhury ve ark. 2021). Farklılığın kaynağının, cinsiyetler arasında astımın farklı prevalansında cinsiyet hormonlarının rolünden kaynaklandığına inanıyoruz. Çünkü bu değişiklikler ergenlik

döneminde meydana gelmekte ve yetişkin kadınlarda astım prevalansının yetişkin erkeklere kıyasla daha yüksek olmasına yol açmaktadır (Chowdhury ve diğerleri, 2021). Ancak, özellikle çalışmamızda hedeflenen Anbar Valiliği en büyük çimento fabrikalarına, kimyasal gübre fabrikasına ve cam fabrikasına sahip olduğundan, endüstriyel dumanlara ve toz gibi çevresel etkenler cinsiyet farklılıklarını göz ardı edilmesine neden olmuştur. Oysa, fabrikalarda çalışanlarının çoğunluğunun cinsiyeti erkek grubu olarak tespit edilmiştir.

### **5.3. Sigara Tüketimi**

Tütün dumanının güçlü bir astım tetikleyicisi olduğu gösterilmiştir (Comhair ve ark., 2011). Tütün, yiyecek ve obezite, astım hastalığına yol açan yaygın çevresel değişkenlerdir. Tütün dumanı, mazot, un/fırın ürünleri ve saç ürünlerine alerji, temizlik ürünleri, ozon sağlık kullanımı, ahşap veya ahşap bileşen tozu (erkeklerde artan risk), inorganik toz (kadınlarda artan semptom riski), ahşap bileşen tozu veya odun ise diğer çevresel etmenler arasında yer almaktadır (Chowdhury ve ark., 2021).

Sigara içme prevalansı ülkeye, kültüre ve sosyoekonomik duruma göre değişmektedir. İlginç bir şekilde, kadınların erkeklerden daha şiddetli astımı olmasına rağmen, dünya üzerinde orantılı olarak erkekler kadınlardan daha fazla sigara içmektedir (Ritchie, 2022). Sigara, hamilelik sırasında da dahil olmak üzere astımı olan kadınlarda astımı olmayanlara göre daha yaygın olmakla beraber, hamilelik sırasında tütün dumanı ve elektronik sigara kullanımı, çocuğun astım geliştirmesi ve erken yetişkinlik döneminde daha şiddetli astım geliştirmesi ve yenidoğanın hastaneye kabulü riskini artırabilir (Thacher ve ark., 2018; Li ve ark., 2018; Izadi ve ark., 2021). Bu bağlamda çalışmamız yukarıda bahsedilen çalışmalarla uyumludur. Mevcut çalışmamızda sigara ve astım arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı. ( $p=0.0318$ ).

Bu nedenle sigara içmeye devam eden astım hastalarında sigarayı bırakmaya özendirilmesi ve bunun için gerekli stratejilerin geliştirilmesi için çaba sarf edilmelidir.

## 5.4. Biyokimyasal Parametreler

### 5.4.1. İnterlökin-4 (IL-4) Düzeyi

Astımlı çocukların serum IL-4 düzeyleri sağlıklı kontrol gruplarına göre önemli ölçüde daha yüksek, kandaki IFN- $\gamma$  düzeyleri sağlıklı kontrol gruplarına göre oldukça düşük olmuştur ( $p = 0.04$ ). Poliaromatik hidrokarbon (PAH) düzeylerinin astımlı çocuklarda daha yüksek olduğu gösterilmiş ve yapılan hayvan çalışması, PAH'ın astımda görülen inflamatuvar yanıtta en azından kısmen aracılık eden IL-4 üretimi üzerindeki etkisini desteklemektedir (Al-Daghri ve ark., 2014).

Diğer sonuçlar, IL-4 gen ekspresyonu ile serum IL-4 arasında bir miktar korelasyon olduğunu göstermiştir. Tüm sonuçlar, serum IgE ve IL-4 konsantrasyonunun astımlılarda astımlı olmayan kontrol grubundakilere göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bir gen ürünü olarak serumda IL-4 gen ekspresyonu ile IL-4 glikoprotein arasında bir korelasyon vardır. Astım atakları sırasında hastaların %70'inde IL-13 mRNA ekspresyonu kontrol grubundakilere göre artış göstermiştir. Sonuç olarak, bu çalışma astımlı hastalarda Th2 sitokinlerinin (IL-13 ve IL-4) gen ekspresyonunun Th1/Th2 dengesizliğinde anahtar bir rol oynadığına dair ek kanıt sağlasa da IL-13'ün rolü daha önemlidir (Tavakol ve ark., 2007).

Astımın patogenezi, son yıllarda hem yurtiçinde hem de yurtdışında araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Sitokin ağ dengesizliğinin astımda kritik bir rol oynadığı yaygın olarak kabul edilmektedir (Movahedi ve ark., 2008). Astım hastalarının PB'sinde IL-4 ve IL-6 düzeylerinin daha yüksek, IL-12 düzeyinin ise daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bağışıklık sisteminin başlıca Th2 sitokini IL-4, Th2 inflamasyonu sırasında fibrozda anahtar rol oynayan inflamatuvar reaksiyonların güçlü bir uyarıcısıdır (Munitz ve ark., 2008). Daha önce yapılan bir çalışmaya göre, IL-4 astımın akut ve plato evrelerinde yüksek oranda eksprese edilir, bu durum da immünolojik disfonksiyonun astımın oluşumunda ve ilerlemesinde rol oynadığını göstermektedir (Kwon ve ark., 2008).

IL-4'ü hastalığa bağlayan çalışmaların çoğu skleroderma, astım ve tüberküloza odaklanmıştır. Sadece astımda IL-42 proteininin ekspresyonu, ayak bileği uzunluğundaki IL-4 izoformu ile karşılaştırılmıştır (Luzina ve ark., 2012). Yapılan birkaç araştırma, astım hastalarında ve kontrol gruplarında tam uzunluktaki IL-4 mRNA ekspresyonunun miktarlarını karışık sonuçlarla değerlendirmiştir (Glare ve ark., 1999). Daha sonra, stimülasyona yanıt olarak IL-42 ve tam uzunlukta IL-4 mRNA'larının ekspresyonunda astımlı hastalar arasında önemli bir



heterojenlik olmasına ve sağlıklı kontroller arasında fark olmamasına rağmen, farklılıkları açıklayan T hücresi stimülasyonunun olasılığı düşünülmüştür. Bu bulgular, transkripsiyon sonrası düzenlemenin tam uzunluktaki IL-4 ve IL-42 protein düzeylerinin ilgili mRNA'lardan daha güvenilir astım belirteçleri olmasına katkıda bulunma olasılığına ilişkin sonraki araştırmalara ilham vermiştir. Bu, bir hastalıkla ilgili olarak IL -42 proteininin varlığını kesin olarak gösteren ilk çalışma olmuştur. Bu çalışma, IL -42'nin,, özellikle astım hastalarından alınan T hücrelerinde doğal olarak bir protein olarak üretildiğini, ancak sağlıklı kişilerin T hücrelerinde üretilmediğini; IL-42 üretiminin kinetiğinin, tam uzunluktaki IL-4'ünkinden farklı olduğunu; ve karşılık gelen mRNA'larından ziyade her iki proteini de ölçmenin daha faydalı bilgiler sağlayabileceğini göstermiştir (Luzina ve ark., 2012).

Artan mukus üretimi ve B hücrelerinden IgE sentezi, IL-4 tarafından indüklenir. IL-4, eozinofilleri, bazofilleri, monositleri ve T-lenfositleri kan damarlarına çeken vasküler hücre yapışma molekülü 1'in (VCAM-1) görüntülenmesine yardımcı olur. IL-4, B-hücresi lenfoma-2 (BCL-2) tükenmesini veya Fas ligandının (FasL) Fas (cd32) reseptörüne bağlanmasını engelleyerek apoptozu inhibe ederek akut alerjik reaksiyona neden olur. Artan bir IL-4 düzeyi astımlı hastalar üzerinde önemli bir olumsuz etkiye sahip olduğundan, IL-4 miktarının düşürülmesi astım fenotipini önemli ölçüde azaltacaktır. Astımlı hastalarda serumda ve mukus akıntısında IL-4 düzeyleri görülür. Hafif astımlılar IL-4 ile nebulize edildiğinde şiddetli astım geliştirmişlerdir (Steinke ve ark., 2001). Vücutta IL-4 ve IL-13 genellikle daha düşük konsantrasyonlarda bulunur. Vücut homeostatik konsantrasyonundan saptığında, daha büyük konsantrasyonlarda ifade edilirler (McCormick ve ark., 2015).

#### **5.4.2. İnterlökin-5 (IL-5) Düzeyi**

Hem atopik hem de atopik olmayan astımda, IL-5, hava yolu inflamasyonuna aracılık eden temel bir sitokin olarak önerilmiştir (Virchow ve ark., 1996; Hogan ve ark., 1997). Bu fikir, mevcut araştırmadaki normal kontrol grubundakilere kıyasla atopik ve atopik olmayan astımlılarda artan IL-5 düzeyleri ile desteklenmektedir. Atopik ve atopik olmayan astımlılar arasında serum IL-5 düzeylerinde anlamlı bir fark olmamıştır (Alexander ve ark., 1994). Akut astımda IL-5 düzeylerinin yükseldiği kanıtlanırken, bu durum, hastaların büyük çoğunluğunu oluşturan daha az şiddetli astımlılarda düzeylerin yükseldiği ilk kez gösterilmiş olup Serum IL-5 düzeylerinin orta derecede kalıcı astımlılarda hafif kalıcı astımlılara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Sistemik IL-5 düzeylerinin daha önce yapılan bir araştırmada akut şiddetli astımlılarda arttığı gösterilmiş, ancak oral glukokortikoidlerle tedaviden sonra dramatik olarak

düşmüştür. Serum IL-5 düzeyleri ise normal kontrol grubundakilerden daha yüksek kalmıştır (El-Radhi ve ark., 2000).

Atopik astımlılar ve atopik olmayan astımlılar, normal kontrol grubundakilerden önemli ölçüde daha yüksek medyan serum IL-5 düzeylerine sahip olmuştur. Bununla birlikte, atopik ve atopik olmayan astımlılar arasında medyan serum IL-5 düzeylerinde önemli bir fark olmamıştır. Orta derecede kalıcı astımda ortalama serum IL-5 düzeyi, hafif düzeyde kalıcı olmayan astımlılardan anlamlı derecede yüksek olmuştur ( $p= 0.13$ ). Düzenli inhale steroid alan astımlılar, inhale steroid kullanmayanlardan (10.2 pg/ml) önemli ölçüde farklı olmayan medyan kan IL-5 düzeylerine sahip olmuştur (Joseph ve ark., 2004).

Astım patofizyolojisi, T yardımcı (Th) hücreleri tarafından salınan sitokinlerin dengesizliği, Th2 tipi sitokinlerde (IL-5, IL-4 ve IL-13) artış ve Th1 sitokinlerinde azalma ile ilişkilendirilmiştir. Sitokin IL-4, alerjik inflamasyonun gelişiminde önemli bir role sahiptir. Astımlı hastalarda, immünoglobulin E üretimi için önemli bir kofaktör olan IL-4 ve eozinofillerin son farklılaşmasından, aktivasyonundan ve iyileşmesinden sorumlu olan IL-5'in serum düzeyleri daha yüksektir (Lama ve ark., 2011).

Daha yüksek düzeylerde IL-4 üretimi ile astımda Th2 sitokinlerinin artmış bir ekspresyonu var gibi görünmektedir (Lama ve ark., 2011; Corry ve ark., 1999). Astımlı çocuklardan alınan dolaşımdaki PBMC'lerde daha yüksek IL-4 mRNA ekspresyonu, artan serum IL-4 ekspresyonu ile eşleşmiştir. Astımlı katılımcıların ürettiği balgamın hücresel bileşeninde Olivenstein ve ark. (1999), artan sayıda eozinofil ve IL-4 ve IL-5 mRNA pozitif hücreleri bulmuştur. IL-5, eozinofil farklılaşması, gelişimi, aktivasyonu, hayatta kalması ve hava yollarında bulunması için en kritik biyolojik faktördür (Fulkerson ve ark., 2013; Varricchi ve ark., 2016). Sonuç olarak, bu sitokin, eozinofillerin apoptozunu destekleme eğiliminden dolayı tipik olarak kortikosteroidlerle tedavi edilen eozinofilik astımın patofizyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır (Zhang ve ark., 2000). Akut eozinofilik astım ise, bronşiyal mukustaki IL-5'in aşırı bolluğu nedeniyle her iki tip kortikosteroide karşı dirençlidir ve bu sayede bu ilaçların eozinofiller üzerindeki proapoptotik etkilerinin üstesinden gelebilir (Dunican ve ark., 2017). IL-5, eozinofilik astımdan sorumlu en önemli patojenik aracı olduğundan, anti-astım biyolojik tedavisi için kritik bir terapötik hedefdir (Pelaia ve ark., 2019).

### 5.4.3. IL-4 (rs2243250) Gen Polimorfizmlerinin Genotiplenmesi

Yapılan birkaç vaka kontrol replikasyon çalışması, IL-4 geni rs2243250 polimorfizmi ile astım riski arasındaki bağlantıyı ortaya çıkarmaya çalışmıştır. Ancak bu dağınık araştırmalar, bazı farklılıklar nedeniyle uyumsuz raporlar ortaya çıkarmıştır. Deneklerin ırk farklılıkları, hasta tanı kriterlerindeki çeşitlilik ve küçük örneklem boyutlarının tümü, bu tür düzensiz sonuçlara sebep olan faktörler olabilir (Lilly, 2005). Astımda, tip 2 immün sitokinlerin IL-4, IL -5 ve IL-13'ün hava yollarında zararlı inflamatuvar süreçleri uyardığı T yardımcı 2 yanıtlarının hiperaktivitesi vardır. Antijen tehdidinden önce IL-4 gen plazmitlerinin lokal enjeksiyonunun farelerde hava yolu aşırı duyarlılığını ve eozinofil oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (Fu ve ark., 2006). IL-4 genindeki (rs2243250) polimorfizmi, astım riski ile ilgili olarak kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. T alelinin, C alelinin aksine transkripsiyon faktörü bağlanma afinitesini arttırdığı ve bunun IL-4 mRNA aşırı ekspresyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Carr ve ark., 2018).

Sonuç olarak, IL-4 geninin rs2243250 SNP'sinin IL-4 ekspresyonunu ve dolayısıyla astım duyarlılığını etkilemesi biyolojik bir nedendir. Daha önce yapılan bir meta-analiz çalışması, IL-4 geni SNP ile astım riski arasındaki bağlantıyı ortaya koymaya çalışılmıştır. Wang, E. ve diğ. (2020)'a göre, IL-4 geni SNP'nin T aleli astım riskini arttırmıştır. Genel olarak, T aleli olan kişilerde astım riski (%24) CC homozigot modeline sahip olanlara göre daha yüksek olmuştur. Bu Kafkas polimorfizminin ilişkisi alt grup analizi ile keşfedilmiştir (Wang ve ark.,2013). Ayrıca 2013 yılında Nie ve ark. (2013), 7345 vaka ve 7819 kontrolün yer aldığı 40 makaleyi içeren bir meta-analiz yayınlamıştır. Bu meta-analizde TT'ye karşı CC ve CT'ye karşı CC modellerinin yüksek astım riskiyle önemli ölçüde ilişkili olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan, Zhang ve ark., (2015), 3427 vaka ve 4247 kontrolün yer aldığı 17 vaka kontrol çalışmasına dayanarak, IL-4 rs2243250 polimorfizminin çocuklarda astım riskinin artmasıyla ilişkili olduğunu bulmuştur. Yakın zamanda yapılan bir meta-analizde IL-4 geni rs2243250 polimorfizminin hem çocuklarda hem de yetişkinlerde tüm etnik gruplarda bir duyarlılık riski olduğu bulunmuştur. Yapılan bir literatür taraması, 9572 vaka ve 9881 kontrolü içeren 49 makaleyi ortaya koymuştur. IL-4 geni rs2243250 polimorfizminin (baskın, çekinik, alelik ve TT'ye karşı CC, ancak CT'ye karşı TT modelinde olmamakla beraber) modellerde astım riskini arttırdığı bulunmuştur (Kousha ve ark., 2020).

Hem astım hem de alerjik rinit, T-2979G'de olduğu gibi SNP rs2243250 ile anlamlı bir şekilde bağlantılı olmuştur (astım için P=0,001 ve alerjik rinit için P=0,001). Astım ve alerjik rinit

gruplarında en yaygın genotipler SNP rs2243250 için TT ve SNP rs2227284 için GG olmuştur. rs2070874, Pakistan popülasyonunda incelenen iki atopik solunum yolu hastalığından herhangi biriyle bağlantılı olmamasına rağmen, rs2243250'nin astım ve alerjik rinit ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Micheal ve ark., 2013).

### **5.5. Klinik Özellikler ile IL- 4 rs2243250 Genotipleri Arasındaki İlişki**

Yeni yapılan bir meta-analiz, diğerlerini reddederken, önceki bir meta-analizin bazı bulgularını doğrulamıştır. Tüm genetik modellerde, IL-4 geni rs2243250 polimorfizmi astım riskini artırmıştır. Ayrıca, yaşa göre bir alt grup çalışmasına göre, IL-4 geni rs2243250 polimorfizmi, çocuklarda ve yetişkinlerde astım riski ile büyük ölçüde ilişkili olmuştur (Kousha ve ark., 2020). rs2243250 TT genotipine sahip olanlar, CC ve TC genotiplerine sahip olanlardan önemli ölçüde daha düşük serum IL-4 konsantrasyonlarına sahipken, rs2227282 CC genotipine sahip hastalar, GC veya GG genotiplerine sahip olanlardan daha yüksek serum IL-4 düzeylerine sahip olmuştur. Bulgularımız, düşük serum IL-4 düzeylerine bağlı IL-4 polimorfizmlerinin Çin popülasyonunda astım (AS) gelişiminde önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Liu ve ark., 2016). AS grubunun IL-4 serum konsantrasyonları kontrol grubununkinden çok daha yüksek olmakla beraber bu fark istatistiksel olarak anlamlı olmuştur. IL-4 düzeyleri, rs2243250'ye geldiğinde, TT genotipli AS hastalarında CC ve TC genotiplerine sahip olanlardan önemli ölçüde daha düşük olmuştur. Ayrıca, rs2227282 GG genotipine sahip hastalar, GC ve CC genotiplerine sahip hastalardan daha düşük miktarlara sahip olmuştur. Kontrol grubundaki serum IL-4 düzeyleri ise rs2243250 veya rs2227282 genotiplerinden etkilenmemiştir (Liu ve ark., 2016).

Astım ve alerjik rinit gruplarında en yaygın genotipler SNP rs2243250 için TT ve SNP rs2227284 için GG olmuştur. rs2070874, Pakistan popülasyonunda incelenen iki atopik solunum yolu hastalığından herhangi biriyle bağlantılı olmamasına rağmen, rs2243250'nin astım ve alerjik rinit ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Micheal ve ark., 2013). Yeni yapılan bir meta-analiz, diğerlerini reddederken, önceki bir meta-analizin bazı bulgularını doğrulamıştır. Ayrıca, IL-4 geni rs2243250 genotipleri, yaşa göre alt grup analizine göre çocuklarda ve yetişkinlerde astım riski ile önemli ölçüde ilişkili olmuştur. Ek olarak, etnik kökene dayalı alt grup analizi, Asyalılar, Amerikalılar ve Avrupalılar arasında önemli bir bağlantı bulmuştur. rs2243250 TT, CT ve CC (vahşi tip) genotipleri, diyabetik nefropati (DN) hastalarında sırasıyla %3,2, %29,4 ve %67,4 ve kontrol gruplarında %2,7, %34,4 ve %62,9 oranlarında bulunmuştur. Cinsiyet, yaş, diyabet süresi ve glikasyonlu hemoglobin için

düzenleme yapıldıktan sonra, lojistik regresyon analizimiz rs2243250 ile DN riski arasında hiçbir bağlantı olmadığını ortaya çıkarmıştır. Sloven T2DM hastaları alt grubumuzda, IL-4 rs2243250 DN ile bağlantılı değildir (Završnik ve ark., 2018).

### **5.6. IL- 5 rs2069812 Gen Polimorfizmlerinin Genotiplendirilmesi**

IL5, eozinofilide kritik bir unsur olduğundan, astımda görülen doku hasarının bir kısmından sorumlu olabilir (Renauld, 2001). Yapılan başka bir çalışma, IL-5 C-703T polimorfizminin TT genotipi ile astımlı çocuklar arasında bir bağlantı bulmuştur. Ayrıca, TT genotipi, daha yüksek kan IL-5 düzeyleri ve daha yüksek bir mutlak eozinofil sayısı ile bağlantılı olmuştur. IL-5 C-703T'nin CT genotipi yüksek toplam serum IgE ile bağlantılıyken, IL-5 C-703T polimorfizmi çocuklarda astımla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, IL-5 C-703T polimorfizmi, eozinofil sayısının yanı sıra IL-5 düzeylerini de etkilemektedir. Iraklı astımlı çocuklarda, IL-5 C703T'nin TT genotipinin hafif astım için bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir (Hameed ve ark., 2019). Benzer bir sonuç, IL-5 genlerindeki polimorfizmlerin atopik bronşiyal astım duyarlılığına sebep olduğunu ve hastalığın klinik ilerlemesini tahmin edebileceğini iddia eden Ruslarda da bulunmuştur (Freidin ve ark., 2003) Ancak bulguları, IL-5 geninin C-703 varyantı ile atopik bronşiyal astım arasında bir bağlantıya işaret etmektedir. 30 astımlı ve 30 astımlı olmayan katılımcıyı içeren bir çalışmada Pereira ve ark. (1998), IL-5 C703T gen kodlama bölgesinin, promotörünün ve reseptörünün mutasyonlarının, astıma kalıtsal bir eğilimin yaygın nedenleri olma ihtimalinin düşük olduğunu belirtmiştir (Pereira ve ark., 1998).

Yapılan çalışmalara göre, IL-5 T-746C polimorfizmi, Koreli çocuklarda ve Çinli popülasyonda astım şiddetinin spirometrik indeksleri ile bağlantılı, fakat astım varlığı ile bağlantılı olmamıştır (Hong ve ark.,2005). Allel C-703 IL5 ile bronşiyal astım (BA) arasında anlamlı bir bağlantı söz konusu olmuştur ( $p = 0.007$ ). Bu bulgular, IL-4 ve IL-5 gen polimorfizmlerinin atopik astıma yakınlıkta bir rol oynadığını ve hastalığın klinik sonucunu etkileyebileceğini işaret etmektedir (Freidin ve ark., 2003). C-703T (geçiş), IL-5 promotör bölgesinde konumlandırıldığından, genin ekspresyonunu ve sonuç olarak interlökin-5 düzeyini değiştirme potansiyeline sahiptir. Bu sitokinin, daha sonra hava yolu inflamasyonunun uzamasına ve gelişmesine katılan eozinofilleri uyarma yeteneği, BA patofizyolojisindeki önemini tanımlamıştır (Pelaia ve ark., 2019). C-703 aleli ile BA arasında bir bağlantının bulunması göz önüne alındığında, genin bu versiyonunun T-703 alelinden daha yüksek bir düzeyde eksprese edildiğine ve bunun da BA'ya yakın hale gelen interlökin-5 üretiminin artmasına neden olduğuna inanmak mantıklıdır (Freidin ve ark., 2003). IL-5 ortak polimorfizmlerinin BA ile bağlantılı olduğuna dair daha

önce bir kanıt söz konusu olmamıştır. 30 BA hastası ve 30 sağlıklı insandan oluşan bir gruptaki IL-5 ve IL5RA genlerinin dizileri, hiçbir varyant göstermemiş ve bu durum, bu genlerdeki polimorfizmlerin BA fenotipine katkıda bulunma olasılığının düşük olduğu sonucuna yol açmıştır (Wang ve ark., 2013).

IL-5'in C-703 alleli ile BA arasındaki bağlantı göz önüne alındığında, şiddetli astımı olan hastalarda, hastalığın hafif formlarına sahip olanlara kıyasla TT IL-5 genotipinin yüksek prevalansı kafa karıştırıcı görünmektedir: bir alelin hastalığa sebep olurken, diğer alelin, şiddetli bir aşamaya ilerlemesine neden olduğunu anlamak zordur. CC IL-4 genotipine sahip dört kişi de incelenen örneklerde TT IL-5 genotipine sahip olmuştur (yaklaşık yüzde 67). Sonuç olarak, TT IL-5 genotipi ile şiddetli BA arasındaki bağlantının tesadüfi olması mümkündür. C-703T IL-5 gen polimorfizmi bir BA (alel C) ile ilişkilidir (Freidin ve ark., 2003).

### **5.7. Klinik Özellikler İle IL-5 rs2069812 Genotipleri Arasındaki İlişki**

Astımlı hava yolunda IL-5, T helper tip 2 (Th2) yanıtlarının aktivasyonunda rol oynayan kritik bir sitokindir. TT genotipine sahip astımlılarla karşılaştırıldığında, TC/CC genotipine sahip olanlar, stafilokok enterotoksinleri A'ya (SEA) karşı serum spesifik IgE'nin önemli ölçüde daha fazla meydana geldiğini, daha yüksek toplam IgE düzeyleri (ve daha düşük provokatif konsantrasyon (PC20) metakolin düzeyleri) göstermiştir. Bu bulgular, IL-5 promotör polimorfizminin, SEA'ya serum toplam ve spesifik IgE yanıtlarını artırdığını ve yetişkinlerde astımlı hava yolu aşırı duyarlılığını potansiyel olarak artırdığını işaret etmektedir (Losol ve ark., 2013).

Remisyonda Graves hastalığı (GD) olan hastalarda IL5746T varyantının prevalansı daha yüksektir olması azalmış IL-5 düzeyleriyle bağlantılı olabilir ( $P = 0.029$ ,  $OR = 2.00$ ) (Inoue, ve ark., 2011). Astımlı çocuklar, IL-5 C-703T polimorfizminin TT genotipiyle bağlantılı olmuştur ( $P: 0.033$ ). Ayrıca, TT genotipi, daha yüksek kan IL-5 düzeyleri ve daha yüksek bir mutlak eozinofil sayısı ile bağlantılı olmuştur (sırasıyla  $P = 0.008$  ve  $0.021$ ). IL-5 C-703T'nin CT genotipi ise yüksek toplam kan IgE düzeyi ile bağlantılı olmuştur ( $P 0.001$ ) (Hameed ve ark., 2019). IL-5 C-703T polimorfizmi çocuklarda astımla bağlantılıdır. Ayrıca, IL-5 C-703T polimorfizmi, IL-5 düzeylerinin yanı sıra eozinofil sayısını da etkilemektedir. Iraklı astımlı çocuklarda, IL-5 C703T'nin TT genotipinin hafif astım için bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir (Hameed ve ark., 2019).

Daha önce yapılan bir çalışmada, kan eozinofilisi ile IL-5 arasında güçlü bir ilişkiden söz edilmiştir (Agache ve ark., 2016). Yapılan diğer çalışmalar astımlı hastalarda artmış bir IL-5 ekspresyonunun olduğu ve bu ekspresyonun eozinofili otoregüle edebileceği ve eozinofil sayılarını artırabileceği sonucuna varmıştır (Kouro ve ark., 2009). Diğer araştırmacılar, IL-5'in biyolojik etkilerinin en iyi şekilde eozinofiller tarafından karakterize edildiğini bulmuşlardır (Takatsu ve ark., 2008). Bunun nedeni, IL-5'in eozinofillerin olgunlaşmasından, aktivasyonundan, çoğalmasından ve hayatta kalmasından sorumlu olanın anahtar sitokin olmasıdır (Pelaia ve ark., 2017).



## 6. SONUÇLAR

1. Astım hastalığı ile yaş, cinsiyet ve sigara kullanımını arasında pozitif bir ilişki söz konusu olmuştur.
2. IL-4 ve IL-5 düzeyleri, astımlı hastalığın prognozu için belirteçler olarak kullanılabilir.
3. IL-4 (rs2243250)'deki yaygın varyantlar ile astım riski arasında ilişkiler söz konusu olup, mutant heterozigot genotipler (CT) astım riski açısından anlamlı derecede daha yüksek ve T alel sıklığı astımlı hasta ile anlamlı olarak ilişkili olmuştur.
4. IL-5 (rs2069812) ile ilgili olarak, T aleli astımlı hasta, CT ve astım hasta prevalans ile ilişkili CC genotipleri için potansiyel riske sahip olabilir.
5. (IL-4) (rs2243250) ve IL-5 (rs2069812) genotipleri arasında IL-4, IL-5 düzeyleri ve yaş ile pozitif bir ilişki söz konusu olmuştur.

### Öneriler

PCR-RFLP, basitliğine ve kullanım kolaylığına rağmen, bilinmeyen mutasyonları tespit etme yeteneğine sahip değildir. Öte yandan, PCR-SSCP'nin karmaşıklığına sıklıkla keşfedilmemiş mutasyonları tespit etme yeteneği eşlik etmektedir. Sonuç olarak, PCR-RFLP'nin basitliği ile PCR-SSCP'nin yüksek hassasiyetini birleştiren güvenilir, verimli ve uygun maliyetli bir yaklaşıma acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Bu genetik belirteçler Irak popülasyonunda önemli bir astım riski kaynağı olabilir ve çok sayıda örnekle daha fazla araştırılma yapılması gereklidir. SNP'ler ve bunların astımın gelişimi ve ortaya çıkmasındaki olası rolü hakkında daha fazla çalışma önerilmektedir. Astım hastalığında genetik yatkınlığı belirlemek için, diğer etnik kökenlerden daha büyük örneklerle araştırmalar yapılarak, diğer genlerin katkısını ve astımlı hastalarda önleyici ve/veya tedavi edici müdahaleleri anlamamıza yardımcı olacaktır.



## KAYNAKLAR

- Agache, I., Strasser, D. S., Klenk, A., Agache, C., Farine, H., Ciobanu, C., 2016, Serum IL-5 and IL-13 consistently serve as the best predictors for the blood eosinophilia phenotype in adult asthmatics. *Allergy*;71:1192-202.
- Akhabir, L. and Sandford, A. J., 2011, Genome wide association studies for discovery of genes involved in asthma. *Respirology*, 16(3), 396-406.
- Akkad, D. A., Arning, L., Ibrahim, S. M., & Epplen, J. T., 2007, Sex specifically associated promoter polymorphism in multiple sclerosis affects interleukin 4 expression levels. *Genes & Immunity*, 8(8), 703-706.
- Al-Daghri, N. M., Abd-Alrahman, S., Draz, H., Alkharfy, K., Mohammed, A. K., Clerici, M. S, and Alokail, M. S., 2014, Increased IL-4 mRNA expression and poly-aromatic hydrocarbon concentrations from children with asthma. *BMC pediatrics*, 14, 17.
- Alexander, A. G., Barkans, J., Moqbel, R., Barnes, N. C., Kay, A. B., & Corrigan, C. J., 1994, Serum interleukin 5 concentrations in atopic and non-atopic patients with glucocorticoid-dependent chronic severe asthma. *Thorax*, 49(12), 1231-1233.
- Arima, M. and Fukuda, T., 2011, Prostaglandin D<sub>2</sub> and T(H)<sub>2</sub> inflammation in the pathogenesis of bronchial asthma. *The Korean journal of internal medicine*, 26(1), 8–18.
- Arora, P. Ansari, S.H. 2019. Role of Various Mediators in Inflammation of Asthmatic Airways. *Asthma - Biological Evidences*.
- Baldaçara, R. P. D. C. and Silva, I., 2017, Association between asthma and female sex hormones. *Sao Paulo Medical Journal*, 135, 04-14.
- Balding, D.J., Bishop, M. and Cannings, C. eds., 2008. *Handbook of statistical genetics*. John Wiley & Sons, 7, 832-832.
- Barnes, P. J., 2011, Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunological reviews*, 242(1), 31–50.
- Barr, R. G., Wentowski, C. C., Grodstein, F., Somers, S. C., Stampfer, M. J., Schwartz, J. and Camargo, C. A., 2004, Prospective study of postmenopausal hormone use and newly diagnosed asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Archives of Internal Medicine*, 164(4), 379-386.
- Bateman, E. D., Hurd, S. S., Barnes, P. J., Bousquet, J., Drazen, J. M., FitzGerald, M. and Zar, H. J., 2008, Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *European Respiratory Journal*, 31(1), 143-178.
- Bergroth, E., Aakula, M., Elenius, V., Remes, S., Piippo-Savolainen, E., Korppi, M., Piedra, P. A., Bochkov, Y. A., Gern, J. E., Camargo, C. A., Jartti, T., & Jartti, T.Ö. 2020, Rhinovirus Type in Severe Bronchiolitis and the Development of Asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice*, 8(2), 588-595.
- Bloemen, K. Verstraelen, S. Van Den Heuvel, R. Witters, H. Nelissen, I. Schoeters, G. 2007. The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunol Lett*. 113(1):6-18.
- Bogaert, P., Naessens, T., De Koker, S., Hennuy, B., Hacha, J., Smet, M., Cataldo, D., Di Valentin, E., Piette, J., Tournoy, K. G. and Grooten, J., 2011, Inflammatory signatures for eosinophilic vs. neutrophilic allergic pulmonary inflammation reveal critical regulatory checkpoints. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 300(5), L679–L690.

- Bosse, Y., Hudson, T.J. 2007. Toward a comprehensive set of asthma susceptibility genes. *Annu Rev Med.* 58: 17184.
- Boulay, J.L. and Paul, W.E. 1992. The interleukin-4 family of lymphokines. *Curr Opin Immunol* ; 4:294-8.
- Bouman, A., Heineman, M. J. and Faas, M. M., 2005, Sex hormones and the immune response in humans. *Human reproduction update*, 11(4), 411-423.
- Bousquet, J., Mantzouranis, E., Cruz, A.A, Aït-Khaled, N., Baena-Cagnani, C.E, Bleecker E.R, 2010, Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: Document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 126:926-38.
- Brusselle, G. G., Kips, J. C., Tavernier, J. H., van der Heyden, J. G., Cuvelier, C. A., Pauwels, R. A. and Bluethmann, H., 1994, Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 24(1), 73–80.
- Burton, O.T. and Oettgen, H.C. 2011. Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases. *Immunol Rev.* 242(1):128-43.
- Carr, T. F., Zeki, A. A. and Kraft, M., 2018, Eosinophilic and noneosinophilic asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 197(1), 22-37.
- Carroll, N. G., Mutavdzic, S. and James, A. L., 2002, Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects. *The European respiratory journal*, 19(5), 879–885.
- Chang, Y. J., DeKruyff, R. H. and Umetsu, D. T., 2013, The role of type 2 innate lymphoid cells in asthma. *Journal of leukocyte biology*, 94(5), 933–940.
- Cheong, H.S., Kim, L.H., Park, B.L., Choi, Y.H., Park, H.S., Hong, S.J., 2005, Association analysis of interleukin 5 receptor alpha subunit (IL5RA) polymorphisms and asthma. *J Hum Genet.* 50:628-34
- Chiang, C. H., Tang, Y. C., Lin, M. W. and Chung, M. Y., 2007, Association between the IL-4 promoter polymorphisms and asthma or severity of hyperresponsiveness in Taiwanese. *Respirology*, 12(1), 42-48.
- Chowdhury, N. U., Guntur, V. P., Newcomb, D. C. and Wechsler, M. E., 2021, Sex and gender in asthma. *European Respiratory Review*, 30(162).
- Cohn, L., Elias, J. A. and Chupp, G. L., 2004, Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annual review of immunology*, 22, 789–815.
- Comhair, S. A., Gaston, B. M., Ricci, K. S., Hammel, J., Dweik, R. A., Teague, W. G. and National Heart Lung Blood Institute Severe Asthma Research Program (SARP), 2011, Detrimental effects of environmental tobacco smoke in relation to asthma severity. *PLoS one*, 6(5), e18574.
- Corrao, W. M., Braman, S. S. and Irwin, R. S., 1979, Chronic cough as the sole presenting manifestation of bronchial asthma. *New England Journal of Medicine*, 300(12), 633-637.
- Corry, D. B. and Kheradmand, F., 1999, Induction and regulation of the IgE response. *Nature*, 402(6760), 18-23.
- Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S. and Annunziato, F., 2011, Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*, 66(8), 989–998.
- Crawford, D. C., Nickerson, D. A., 2005, Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu. Rev. Med.*, 56, 303-320.
- Cui, T., Wu, J., Pan, S. and Xie, J., 2003, Polymorphisms in the IL-4 and IL-4R [α] genes and allergic asthma.

- Dahmani, D. I., Sifi, K., Salem, I., Chakir, J., Hanachi, S., Bachtarzi, M. Z., ... & Rouabhia, M., 2016, The C-589T IL-4 single nucleotide polymorphism as a genetic factor for atopic asthma, eczema and allergic rhinitis in an eastern Algerian population. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 37(1), 213-23.
- David, J. and Dabbs, M.D.(2019, *Molecular Anatomic Pathology : Principles, Techniques, and Application to Immunohistologic Diagnosis*. ScienceDirect.
- de Faria, I.C., de Faria, E.J. and Toro, A.A., 2008, Association of TGF-1, CD14, IL-4, IL-4R and ADAM33 gene polymorphisms with asthma severity in children and adolescents. *J Pediatr (Rio J)*. 84(3): 203-10.
- Deckers, J., Branco Madeira, F. and Hammad, H., 2013, Innate immune cells in asthma. *Trends in immunology*, 34(11), 540–547. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.08.004>
- Desai, D. and Brightling, C., 2009, Cytokine and anti-cytokine therapy in asthma: ready for the clinic? *Clin Exp Immunol*. 158(1):10–9.
- Dick, S., Friend, A., Dynes, K., AlKandari, F., Doust, E., Cowie, H., Ayres, J. G. and Turner, S. W., 2014, A systematic review of associations between environmental exposures and development of asthma in children aged up to 9 years. *BMJ Open*, 4(11), e006554.
- Doeing, D.C. and Solway, J., 2013. Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. *Journal of applied physiology*, 114(7), pp.834-843.
- Duncan, E. M., and Fahy, J. V., 2017, Asthma and corticosteroids: time for a more precise approach to treatment. *Eur. Respir. J*. 49:1701167.
- Durham, S. R. and Nelson, H., 2011, Allergen immunotherapy: a centenary celebration. *World Allergy Organization Journal*, 4(6), 104-106.
- Dweik, R. A., Boggs, P. B., Erzurum, S. C., Irvin, C. G., Leigh, M. W., Lundberg, J. O., Olin, A. C., Plummer, A. L., Taylor, D. R. and American Thoracic Society Committee on Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications, 2011, An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 184(5), 602–615.
- El-Radhi, A. S., Hogg, C. L., Bungre, J. K., Bush, A. and Corrigan, C. J., 2000, Effect of oral glucocorticoid treatment on serum inflammatory markers in acute asthma. *Archives of disease in childhood*, 83(2), 158-162.
- Fang, X., Zhu, Z., Yang, S., 2016, Association of IL-4 and IL4 receptor gene polymorphisms with the risk, immunotherapeutic effects and prognosis of advanced renal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Med*. 9(6):11449-57.
- Fitarelli-Kiehl, M., Macedo, G. S., Schlatter, R. P., Koehler-Santos, P., Matte, U., Ashton-Prolla, P. and Giacomazzi, J., 2016, Comparison of multiple genotyping methods for the identification of the cancer predisposing founder mutation p.R337H in TP53. *Genetics and molecular biology*, 39(2), 203–209.
- Freidin, M. B., Kobyakova, O. S., Ogorodova, L. M., & Puzyrev, V. P., 2003, Association of polymorphisms in the human IL4 and IL5 genes with atopic bronchial asthma and severity of the disease. *Comparative and functional genomics*, 4(3), 346-350.
- Fu, C. L., Ye, Y. L., Lee, Y. L. and Chiang, B. L., 2006, Effects of overexpression of IL-10, IL-12, TGF- $\beta$  and IL-4 on allergen induced change in bronchial responsiveness. *Respiratory research*, 7(1), 1-14.
- Fulkerson, P. C., and Rothenberg, M. E., 2013, Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov*. 12, 117–129.
- Gaidan, A. M., Abbas, A. A., Hassan, M.A., Hashim, H. M., 2018, Interleukin-4 single nucleotide polymorphism C590T polymorphisms in relation to asthma. *Iraqi JMS*. Vol. 16(1): 51-56.

- Garcia, G., Magnan, A., Chiron, R., Contin-Bordes, C., Berger, P., Taillé, C., Devouassoux, G., de Blay, F., Couderc, L. J., Didier, A., O'Callaghan, D. S., Girodet, P. O., Bourdeix, I., Le Gros, V. and Humbert, M., 2013, A proof-of-concept, randomized, controlled trial of omalizumab in patients with severe, difficult-to-control, nonatopic asthma. *Chest*, 144(2), 411–419.
- Gasser, R. B., Hu, M., Chilton, N. B., Campbell, B. E., Jex, A. J., Otranto, D., Cafarchia, C., Beveridge, I. and Zhu, X., 2006, Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nature protocols*, 1(6), 3121–3128.
- Gevaert, P., Hellman, C., Lundblad, L., Lundahl, J., Holtappels, G., van Cauwenberge, P., 2009, Differential expression of the interleukin 5 receptor alpha isoforms in blood and tissue eosinophils of nasal polyp patients. *Allergy*. 64:725-32
- Glare, E. M., Divjak, M., Rolland, J. M. and Walters, E. H., 1999, Asthmatic airway biopsy specimens are more likely to express the IL-4 alternative splice variant IL-4 $\delta$ 2. *Journal of allergy and clinical immunology*, 104(5), 978-982.
- Grotenboer, N. S., Ketelaar, M. E., Koppelman, G. H. and Nawijn, M. C. 2013, Decoding asthma: translating genetic variation in IL33 and IL1RL1 into disease pathophysiology. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 131, no. 3, pp. 856–865.
- Gulija, T. K., Ivancic Jelecki, J., Šantak, M. and Forcic, D., 2011, Comparative analysis of CE-SSCP to standard RFLP-CE-FLA method in quantification of known viral variants within an RNA virus quasispecies. *Electrophoresis*, 32(14), 1852-1859.
- Haahtela, T., Herse, F., Karjalainen, J., Klaukka, T., Linna, M., Leskelä, R.-L., Selroos, O. and Reissell, E., 2017, The Finnish experience to save asthma costs by improving care in1987-2013. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(2), 408-414.e2.
- Hall, S. and Agrawal, D. K., 2014, Key mediators in the immunopathogenesis of allergic asthma. *International immunopharmacology*, 23(1), 316–329.
- Hallstrand, T. S. and Henderson, W. R., 2010, An update on the role of leukotrienes in asthma. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 10(1), 60–66.
- Hameed, R. M., Ahmed, M. M. and Abood, H. A. A. N., 2019, Specific IL-5 SNP is associated with high serum IL-5 levels and higher eosinophil counts among Iraqi asthmatic children. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*, 3(3), 156.
- Han, Y. Y., Forno, E. and Celedón, J. C., 2020, Sex steroid hormones and asthma in a nationwide study of US adults. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 201(2), 158-166.
- Hashim, H. O. and Al-Shuhaib, M. B. S., 2019, Exploring the potential and limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP detection: A review. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 6(4), 137-144.
- Hauber, H. P., Bergeron, C. and Hamid, Q., 2004, IL-9 in allergic inflammation. *International archives of allergy and immunology*, 134(1), 79–87.
- Hepworth, M. R. and Sonnenberg, G. F., 2014, Regulation of the adaptive immune system by innate lymphoid cells. *Current opinion in immunology*, 27, 75–82.
- Hodder, R., 2007, Clinical differences between asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Can Pharm J.*, 140, 2-16.
- Hofmann, A.M. and Abraham, S.N., 2010. New roles for mast cells in pathogen defense and allergic disease. *Discov Med.* 9(45):79-83.
- Hogan, S. P., Koskinen, A., and Foster, P. S., 1997, Interleukin-5 and eosinophils induce airway damage and bronchial hyperreactivity during allergic airway inflammation in BALB/c mice. *Immunology and cell biology*, 75(3), 284-288.
- Holgate, S., Casale, T., Wenzel, S., Bousquet, J., Deniz, Y. and Reisner, C., 2005, The anti-inflammatory effects of omalizumab confirm the central role of IgE in allergic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(3), 459-465.

- Hong, S. J., Lee, S. Y., Kim, H. B., Kim, J. H., Kim, B. S., Choi, S. O. and Hong, T. J., 2005, IL-5 and thromboxane A2 receptor gene polymorphisms are associated with decreased pulmonary function in Korean children with atopic asthma. *Journal of allergy and clinical immunology*, 115(4), 758-763.
- Hosoyama, T., Aslam, M.I., Abraham, J., 2011, IL-4R Drives dedifferentiation, mitogenesis, and metastasis in rhabdomyosarcoma. *Clin Cancer Res.* 17(9): 2757-66.
- Inoue, N., Watanabe, M., Morita, M., Tatusmi, K., Hidaka, Y., Akamizu, T. and Iwatani, Y., 2011, Association of functional polymorphisms in promoter regions of IL5, IL6 and IL13 genes with development and prognosis of autoimmune thyroid diseases. *Clinical & Experimental Immunology*, 163: 318-323
- Izadi, N., Baraghoshi, D., Curran-Everett, D., Zeiger, R. S., Szeffler, S. J. and Covar, R. A., 2021, Factors associated with persistence of severe asthma from late adolescence to early adulthood. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 204(7), 776-787.
- Jartti, T., Smits, H. H., Bønnelykke, K., Bircan, O., Elenius, V., Konradsen, J. R., Maggina, P., Makrinioti, H., Stokholm, J., Hedlin, G., Papadopoulos, N., Ruszczynski, M., Ryczaj, K., Schaub, B., Schwarze, J., Skevaki, C., Stenberg-Hammar, K., Feleszko, W. and EAACI Task Force on Clinical Practice Recommendations on Preschool Wheeze, E. T. F. on C. P. R. on P., 2019, Bronchiolitis needs a revisit: Distinguishing between virus entities and their treatments. *Allergy*, 74(1), 40–52.
- Joseph, J., Benedict, S., Safa, W. and Joseph, M., 2004, Serum interleukin-5 levels are elevated in mild and moderate persistent asthma irrespective of regular inhaled glucocorticoid therapy. *BMC pulmonary medicine*, 4(1), 1-6.
- Kabesch, M., Tzotcheva, I., Carr, D., Höfl er, C., Weiland, S.K., Fritzsche, C., von Mutius, E., Martinez, F.D., 2003, A complete screening of the IL4 gene: novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood. *J Allergy Clin Immunol.* 112:893-8
- Kamali-Sarvestani, E., Ghayomi, M. A. and Nekoe, A., 2007, Association of TNF-alpha-308 G/A and IL-4-589 C/T gene promoter polymorphisms with asthma susceptibility in the south of Iran. *Journal Of Investigational Allergology And Clinical Immunology*, 17(6), 361.
- Kaplan, A. G., Balter, M. S., Bell, A. D., Kim, H. and McIvor, R. A., 2009, Diagnosis of asthma in adults. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 181(10), E210–E220.
- Kay, A. B., 2001, Allergy and allergic diseases. First of two parts. *The New England journal of medicine*, 344(1), 30–37.
- Kendler, K.S., Chen, X., Dick, D., Maes, H., Gillespie, N., Neale, M.C., Riley, B. 2012 . Recent advances in the genetic epidemiology and molecular genetics of substance use disorders. *Nat Neurosci.* 15(2):181.
- Kim, H. and Mazza, J., 2011, Asthma. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 7 Suppl 1(Suppl 1), S2.
- Kita, H., 2011, Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunological reviews*, 242(1), 161–177.
- Klion, A.D., Wilson, T.M., Brown, M., Maric, I., Metcalfe, D.D., Nutman, T.B., 2009, Surface and soluble IL-5 receptor alpha expression in patients with eosinophilia and mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol.* 123:S251
- Kouro, T. and Takatsu, K., 2009, IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *International immunology*, 21(12), 1303–1309.
- Kousha, A., Gorabi, A. M., Forouzes, M., Hosseini, M., Alexander, M., Imani, D. and Mikaeili, H., 2020, Interleukin 4 gene polymorphism (– 589C/T) and the risk of asthma:

- a meta-analysis and met-regression based on 55 studies. *BMC immunology*, 21(1), 1-16.
- Kruglyak, L. and Nickerson, D. A., 2001, Variation is the spice of life. *Nature genetics*, 27(3), 234-236.
- Kwon, N. H., Kim, J. S., Lee, J. Y., Oh, M. J. and Choi, D. C., 2008, DNA methylation and the expression of IL-4 and IFN- $\gamma$  promoter genes in patients with bronchial asthma. *Journal of clinical immunology*, 28(2), 139-146.
- Kynnyk, J. A., Mastronarde, J. G. and McCallister, J. W., 2011, Asthma, the sex difference. *Current opinion in pulmonary medicine*, 17(1), 6-11.
- Lama, M., Chatterjee, M., Nayak, C. R. and Chaudhuri, T. K., 2011, Increased interleukin-4 and decreased interferon- $\gamma$  levels in serum of children with asthma. *Cytokine*, 55(3), 335-338.
- Li, G., Saad, S., Oliver, B. G. and Chen, H., 2018, Heat or burn? Impacts of intrauterine tobacco smoke and e-cigarette vapor exposure on the offspring's health outcome. *Toxics*, 6(3), 43.
- Lilly, C. M., 2005, Diversity of asthma: evolving concepts of pathophysiology and lessons from genetics. *Journal of allergy and clinical immunology*, 115(4), S526-S531.
- Liu, M.C., Hubbard, W.C, Proud, D, Stealey, B.A, Galli, S.J, Kagey-Sobotka, A, Bleecker E.R, Lichtenstein, L.M., 1991. Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics. Cellular, mediator, and permeability changes. *Am Rev Respir Dis.* ;144(1):51-8.
- Liu, X. L., Ren, J. K., & Su, Y. L., 2016, Association between IL-4 gene polymorphisms, IL-4 serum levels, and ankylosing spondylitis. *Genet Mol Res*, 17(15), 4.
- Li-Weber, M., Krammer, P.H., 2003, Regulation of IL4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives, *Nat Rev Immunol.* 13(7): 534-43.
- Lloyd, C. M. and Saglani, S., 2013, T cells in asthma: influences of genetics, environment, and T-cell plasticity. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 131(5), 1267–1275.
- Lommatzsch, M., 2012, Airway hyperresponsiveness: new insights into the pathogenesis. In *Seminars in respiratory and critical care medicine*. Thieme Medical Publishers, 33, 579-587.
- Losol, P., Kim, S. H., Hwang, E. K., Shin, Y. S. and Park, H. S., 2013, IL-5 promoter polymorphism enhances IgE responses to staphylococcal superantigens in adult asthmatics. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 5(2), 106-109.
- Luzina, I. G., Lockett, V., Lavania, S., Pickering, E. M., Kang, P. H., Bashkatova, Y. N., Andreev, S. M., Atamas, S. P., 2012, Natural production and functional effects of alternatively spliced interleukin-4 protein in asthma. *Cytokine* 58, 20–26.
- Maazi, H., Lam, J., Lombardi, V., Akbari, O., 2013, Role of plasmacytoid dendritic cell subsets in allergic asthma. *Allergy*.68:695-701
- MacSali, F., Real, F. G., Omenaas, E. R., Bjorge, L., Janson, C., Franklin, K. and Svanes, C., 2009, Oral contraception, body mass index, and asthma: a cross-sectional Nordic-Baltic population survey. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(2), 391-397.
- Makoui, M. H., Imani, D., Motallebnezhad, M., Azimi, M., Razi, B. 2020, Vitamin D receptor gene polymorphism and susceptibility to asthma: meta-analysis based on 17 case-control studies. *Ann Allergy Asthma Immunol.*124(1):57–69.
- Malerba, G., Pignatti, P.F., 2005, A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. *J Appl Genet.* 46(1):93–104.
- Matteis, M., Polverino, F., Spaziano, G., Roviezzo, F., Santoriello, C., Sullo, N. and D'Agostino, B., 2014, Effects of sex hormones on bronchial reactivity during the menstrual cycle. *BMC pulmonary medicine*, 14(1), 1-8.

- McCormick, S. M., Heller, N. M., 2015, Commentary: IL-4 and IL-13 receptors and signaling. *Cytokine*, 75(1), 38-50.
- Micheal, S., Minhas, K., Ishaque, M., Ahmed, F. and Ahmed, A., 2013, IL4 gene polymorphisms and their association with atopic asthma and allergic rhinitis in Pakistani patients, 23(2):107-11.
- Michel, S., Liang, L., Depner, M., Klopp, N., Ruether, A., Kumar, A. and Kabesch, M., 2010, Unifying candidate gene and GWAS Approaches in Asthma. *PloS one*, 5(11), e13894.
- Miskoff, J. A., Dewan, A. and Chaudhri, M., 2019, Fractional Exhaled Nitric Oxide Testing: Diagnostic Utility in Asthma, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, or Asthma-chronic Obstructive Pulmonary Disease Overlap Syndrome. *Cureus*, 11(6), e4864.
- Montaldo, E., Vacca, P., Moretta, L. and Mingari, M. C., 2014, Development of human natural killer cells and other innate lymphoid cells. *Seminars in immunology*, 26(2), 107–113.
- Monteseirín, J., 2009, Neutrophils and asthma. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 19(5), 340–354.
- Morten, M., Collison, A., Murphy, V. E., Barker, D., Oldmeadow, C., Attia, J. and Mattes, J., 2018, Managing Asthma in Pregnancy (MAP) trial: FENO levels and childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 142(6), 1765-1772.
- Movahedi, M., Mahdavian, S. A., Rezaei, N., Moradi, B., Dorkhosh, S. and Amirzargar, A. A., 2008, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-2, IL-12, and IFN- $\gamma$  cytokine gene polymorphisms in asthma. *Journal of Asthma*, 45(9), 790-794.
- Munitz, A., Brandt, E. B., Mingler, M., Finkelman, F. D. and Rothenberg, M. E., 2008, Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor  $\alpha$ 1 and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(20), 7240-7245.
- Murphy, K. M. and Reiner, S. L., 2002, The lineage decisions of helper T cells. *Nature reviews. Immunology*, 2(12), 933–944.
- Nicolaidis, N. C., Holroyd, K. J., Ewart, S. L., Eleff, S. M., Kiser, M. B., Dragwa, C. R., Sullivan, C. D., Grasso, L., Zhang, L. Y., Messler, C. J., Zhou, T., Kleeberger, S. R., Buetow, K. H. and Levitt, R. C., 1997, Interleukin 9: a candidate gene for asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24), 13175–13180.
- Nie, W., Zhu, Z., Pan, X., & Xiu, Q., 2013, The interleukin-4- 589C/T polymorphism and the risk of asthma: a meta-analysis including 7345 cases and 7819 controls. *Gene*, 520(1), 22-29.
- Noguchi, E., Nukaga-Nishio, Y., Jian, Z., Yokouchi, Y., Kamioka, M., Yamakawa-Kobayashi, K. and Arinami, T., 2001, Haplotypes of the 5' region of the IL-4 gene and SNPs in the intergene sequence between the IL-4 and IL-13 genes are associated with atopic asthma. *Human immunology*, 62(11), 1251-1257.
- Noutsios, G.T., Floros, J., 2014. Childhood asthma: causes, risks, and protective factors; a role of innate immunity. *Swiss Med Wkly*;144(5152).
- O'Garra, A. and Arai, N., 2000, The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends in cell biology*, 10(12), 542–550.
- Olivenstein, R., Taha, R., Minshall, E. M. and Hamid, Q. A., 1999, IL-4 and IL-5 mRNA expression in induced sputum of asthmatic subjects: comparison with bronchial wash. *Journal of allergy and clinical immunology*, 103(2), 238-245.
- Palmer, L.J. and Cardon, L.R., 2005b, Shaking the tree: mapping complex disease genes with linkage disequilibrium. *The Lancet*, 366(9492), pp.1223-1234.
- Palmer, L.J. and Cookson, W.O.C.M., 2000a, Atopy and asthma. In: Bishop T, Sham P, eds. *Analysis of multifactorial disease*. Oxford: BIOS; pp. 21537.
- Panneerchelvam, S. and Norazmi, M. N., 2003, Forensic DNA profiling and database. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 10(2), 20.

- Papi, A., Brightling C, Pedersen SE, Reddel HK. Asthma. *Lancet*. 2018 Feb;391(10122): 783–800.
- Park, S., Jung, S. Y. and Kwon, J. W., 2019, Sex differences in the association between asthma incidence and modifiable risk factors in Korean middle-aged and older adults: NHIS-HEALS 10-year cohort. *BMC pulmonary medicine*, 19(1), 248.
- Pavord, I. D., Beasley, R., Agusti, A., Anderson, G. P., Bel, E., Brusselle, G. and Bush, A., 2018, After asthma: redefining airways diseases. *The Lancet*, 391(10118), 350-400.
- Pelaia, C., Paoletti, G., Puggioni, F., Racca, F., Pelaia, G., Canonica, G. W. and Heffler, E., 2019, Interleukin-5 in the pathophysiology of severe asthma. *Frontiers in physiology*, 1514.
- Pelaia, C., Vatrella, A., Busceti, M. T., Gallelli, L., Terracciano, R., Savino, R. and Pelaia, G., 2017, Severe eosinophilic asthma: from the pathogenic role of interleukin-5 to the therapeutic action of mepolizumab. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 3137.
- Pereira, E., Goldblatt, J., Rye, P., Sanderson, C., Le Souëf, P. 1998. Mutation analysis of interleukin-5 in an asthmatic cohort. *Hum Mutat*. 11:51-4
- Pfaar, O., Agache, I., de Blay, F., Bonini, S., Chaker, A. M., Durham, S. R. and Akdis, C. A., 2019, Perspectives in allergen immunotherapy: 2019 and beyond. *Allergy*, 74, 3-25.
- Price, D. B., Rigazio, A., Campbell, J. D., Bleecker, E. R., Corrigan, C. J., Thomas, M., Wenzel, S. E., Wilson, A. M., Small, M. B., Gopalan, G., Ashton, V. L., Burden, A., Hillyer, E. V., Kerkhof, M. and Pavord, I. D., 2015, Blood eosinophil count and prospective annual asthma disease burden: a UK cohort study. *The Lancet. Respiratory medicine*, 3(11), 849–858.
- Ramadas, R.A., Sadeghnejad, A., Karmaus, W., Arshad, S.H., Matthews. S., Huebne, M., 2007, Interleukin-1R antagonist gene and pre-natal smoke exposure are associated with childhood asthma. *Eur Respir J*. 29: 5028.
- Renauld, J.C., 2001, New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol*. 54:577-89.
- Rioux, J. D., Stone, V. A., Daly, M. J., Cargill, M., Green, T., Nguyen, H. and Lin, A. Y, 1998, Familial eosinophilia maps to the cytokine gene cluster on human chromosomal region 5q31-q33. *The American Journal of Human Genetics*, 63(4), 1086-1094.
- Ritchie, H., 2022, Who smokes more, men or women? Accessed February 18, 2022. <https://ourworldindata.org/who-smokes-more-men-or-women>
- Ryttilä, P., Helin, T. and Kinnula, V., 2008, The use of microspirometry in detecting lowered FEV1 values in current or former cigarette smokers. *Primary care respiratory journal : journal of the General Practice Airways Group*, 17(4), 232–237.
- Sadeghnejad, A., Karmaus, W., Arshad, S.H., Kurukulaaratchy, R., Huebner, M., Ewart, S., 2008, IL13 gene polymorphisms modify the effect of exposure to tobacco smoke on persistent wheeze and asthma in childhood, a longitudinal study. *Respir Res*.
- Salazar, F., Ghaemmaghami, A.M., 2013, Allergen recognition by innate immune cells: Critical role of dendritic and epithelial cells. *Frontiers in Immunology*;4:356
- Schatz, M. and Camargo Jr, C. A., 2003, The relationship of sex to asthma prevalence, health care utilization, and medications in a large managed care organization. *Annals of allergy, asthma & immunology*, 91(6), 553-558.
- Schneider, A., Schwarzbach, J., Faderl, B., Welker, L., Karsch-Völk, M. and Jörres, R. A., 2013, FENO measurement and sputum analysis for diagnosing asthma in clinical practice. *Respiratory medicine*, 107(2), 209–216.
- Shamji, M. H. and Durham, S. R., 2017, Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(6), 1485-1498.



- Shimbara, A., Christodoulopoulos, P., Soussi-Gounni, A., Olivenstein, R., Nakamura, Y., Levitt, R. C., Nicolaides, N. C., Holroyd, K. J., Tscicopoulos, A., Lafitte, J. J., Wallaert, B. and Hamid, Q. A., 2000, IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: increased expression in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 105(1 Pt 1), 108–115.
- Shirakawa, I., Deichmann, K. A., Izuhara, I., Mao, I., Adra, C. N. and Hopkin, J. M., 2000, Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling. *Immunology today*, 21(2), 60–64.
- Shirasawa, K., Hirakawa, H. and Isobe, S., 2016, Analytical workflow of double-digest restriction site-associated DNA sequencing based on empirical and in silico optimization in tomato. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 23(2), 145–153.
- Singh, R. K., Gupta, S., Dastidar, S. and Ray, A., 2010, Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics. *Pharmacology*, 85(6), 336–349.
- Siroux, V., Boudier, A., Nadif, R., Lupinek, C., Valenta, R. and Bousquet, J., 2019, Association between asthma, rhinitis, and conjunctivitis multimorbidities with molecular IgE sensitization in adults. *Allergy*, 74(4), 824–827
- Smolnikova, M. V., Smirnova, S. V., Freidin, M. B. and Tyutina, O. S., 2013, Immunological parameters and gene polymorphisms (C-590T IL4, C-597A IL10) in severe bronchial asthma in children from the Krasnoyarsk region, West Siberia. *International Journal of Circumpolar Health*, 72(1), 21159.
- Smolnikova, M.V., Smirnova, S.V., Freidin, M.B., Tyutina, O.S., 2013, Immunological parameters and gene polymorphisms (C-590T IL4, C-597A IL10) in severe bronchial asthma in children from the Krasnoyarsk region, West Siberia. *Int J Circumpolar Health*, 72(1), 21159.
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R. M., McKenzie, A. N., Mebius, R. E., Powrie, F. and Vivier, E., 2013, Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nature reviews. Immunology*, 13(2), 145–149.
- Steinke, J. W. and Borish, L., 2001, Th2 cytokines and asthma—Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respiratory research*, 2(2), 1-5.
- Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Howells, K., Phillips, A. D., Thomas, N. S. and Cooper, D. N., 2009, The human gene mutation database: 2008 update. *Genome medicine*, 1(1), 1-6.
- Stewart, A.G., Tomlinson, P.R, Fernandes, D.J, Wilson, J.W, Harris, T. 1995 .Tumor necrosis factor alpha modulates mitogenic responses of human cultured airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol*.
- Subbarao, P., Mandhane, P.J., Sears, M.R. 2009, Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. *Cmaj*. 181(9):E181–E190.
- Sykes, A., Johnston, S.L., 2008, Etiology of asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*.122(4):685–8.
- Takatsu, K. and Nakajima, H., 2008, IL-5 and eosinophilia. *Curr Opin Immunol*;20:288-94. Back to cited text no. 20
- Tang, L., Lin, H.G. and Chen, B.F, 2014, Association of IL-4 promoter polymorphisms with asthma: a meta-analysis. *Genet. Mol. Res*. 13 (1): 1383-1394.
- Tavakol, A. J., Hosseini, F. S., Khoshnavazi, R., Ghayour, K. E., Ghassemi, G. R., Farid, H. R. and Razavi, A., 2007, Association Of The Expression Of Il-4 And Il-13 Genes, Il-4 And Ige Serum Levels With Allergic Asthma.

- Teama, S., 2018, DNA polymorphisms: DNA-based molecular markers and their application in medicine. *Genetic Diversity and Disease Susceptibility*, 25.
- Thacher, J. D., Gehring, U., Gruziova, O., Standl, M., Pershagen, G., Bauer, C. P. and Bergström, A., 2018, Maternal smoking during pregnancy and early childhood and development of asthma and rhinoconjunctivitis—a MeDALL project. *Environmental health perspectives*, 126(4), 047005.
- Thomsen, S. F., 2015, Genetics of asthma: an introduction for the clinician, *European Clinical Respiratory Journal*, 2:1, 24643,
- Toppila-Salmi, S., Chanoine, S., Karjalainen, J., Pekkanen, J., Bousquet, J. and Siroux, V., 2019, Risk of adult-onset asthma increases with the number of allergic multimorbidities and decreases with age. *Allergy*, 74(12), 2406–2416.
- Townsend, J. M., Fallon, G. P., Matthews, J. D., Smith, P., Jolin, E. H. and McKenzie, N. A., 2000, IL-9-deficient mice establish fundamental roles for IL-9 in pulmonary mastocytosis and goblet cell hyperplasia but not T cell development. *Immunity*, 13(4), 573–583.
- Trajkov, D., Mirkovska, S. J., Arsov, T., Petlichkovski, A., Strezova, A., EFINSKA, M. O. and Spiroski, M., 2008, Association of cytokine gene polymorphisms with bronchial asthma in Macedonians.
- Tuomisto, L., Jarvinen, V., Laitinen, J., Erhola, M., Kaila, M. and Brander, P., 2008, Asthma Programme in Finland: the quality of primary care spirometry is good. *Primary care respiratory journal : journal of the General Practice Airways Group*, 17(4), 226–231.
- van Rensen, E.L., Stirling, R.G., Scheerens, J., Staplesm, K., Sterk, P.J., Barnes, P.J., 2001. Evidence for systemic rather than pulmonary effects of interleukin-5 administration in asthma. *Thora*×2001;56:935-40
- Varricchi, G., and Canonica, G. W., 2016, The role of interleukin-5 in asthma. *Expert. Rev. Clin. Immunol.* 12, 903–905.
- Virchow Jr, J. C., Kroegel, C., Walker, C. and Matthys, H., 1996, Inflammatory determinants of asthma severity: mediator and cellular changes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with severe asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 98(5), S27-S40.
- Wang, E., Wechsler, M. E., Tran, T. N., Heaney, L. G., Jones, R. C., Menzies-Gow, A. N. and Price, D. B., 2020, Characterization of severe asthma worldwide: data from the international severe asthma registry. *Chest*, 157(4), 790-804.
- Wang, Z. D., Lian, D., Shen, J. L., Sun, R., Xu, W., Xin, Z. and Jin, S. D., 2013, Association between the interleukin-4, interleukin-13 polymorphisms and asthma: a meta-analysis. *Molecular biology reports*, 40(2), 1365-1376.
- Wenzel, S. E., 2006, Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet (London, England)*, 368(9537), 804–813.
- Wills-Karp, M., 2004, Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunological reviews*, 202, 175–190.
- Yamamoto, N., Sugiura, H., Tanaka, K., Uehara, M., 2003, Heterogeneity of interleukin 5 genetic background in atopic dermatitis patients: Significant difference between those with blood eosinophilia and normal eosinophil levels. *J Dermatol Sci* 2003;33:121-6
- Yanagibashi, T., Satoh, M., Nagai, Y., Koike, M. and Takatsu, K., 2017, Allergic diseases: From bench to clinic - Contribution of the discovery of interleukin-5. *Cytokine*, 98, 59–70.
- Yousefi, S., Abbassi-Dalooi, T., Kraaijenbrink, T., Vermaat, M., Mei, H., van't Hof, P., van Iterson, M., Zhernakova, D.V., Claringbould, A., Franke, L. and M't Hart, L., 2018, A SNP panel for identification of DNA and RNA specimens. *BMC genomics*, 19(1), pp.1-12.

- Završnik, M., Letonja, J., Makuc, J., Šeruga, M., Cilenšek, I. and Petrovič, D., 2018, Interleukin-4 (IL4) -590C/T (rs2243250) gene polymorphism is not associated with diabetic nephropathy (DN) in Caucasians with type 2 diabetes mellitus (T2DM). *Bosnian journal of basic medical sciences*, 18(4), 347–351.
- Zhang, J. H., Zhou, G. H., Wei, T. T. and Chang, Z. S., 2016, Association between the interleukin 4 gene-590C> T promoter polymorphism and asthma in Xinjiang Uighur children. *Genet Mol Res*, 15(3).
- Zhang, S., Li, Y. and Liu, Y., 2015, Interleukin-4-589C/T polymorphism is associated with increased pediatric asthma risk: a meta-analysis. *Inflammation*, 38(3), 1207-1212.
- Zhang, X., Moilanen, C. E., and Kankaanranta, H., 2000, Enhancement of human eosinophil apoptosis by fluticasone propionate, budesonide, and beclomethasone. *Eur. J. Pharmacol.* 406, 325–332.
- Zhu, X., Niu, N., Liu, Y., Du, T., Chen, D., Wang, X. and Liu, Y., 2006, Improvement of the sensitivity and resolution of PCR-SSCP analysis with optimized primer concentrations in PCR products. *Journal of genetics*, 85(3), 233-235.
- Lambrecht, B. N., Hammad, H. and Fahy, J. V., 2019, The cytokines of asthma. *Immunity*, 50(4), 975-991.

The Republic of Iraq  
Ministry of Health and Environment  
Directorate of Health of Anbar  
Center of the Training and Human  
Development



جمهورية العراق  
وزارة الصحة والبيئة  
دائيرة صحة الانبار  
مركز التدريب والتنمية البشرية

No :  
Date : / / 2021

العدد : ١٢٠  
التاريخ : ٢٠٢١ / ٤ / ٨

إلى / مستشفى الرمادي التعليمي

م / تسهيل مهمة

تحية طيبة...

اشارة الى الطلب المقدم من قبل الدكتور (صلاح هادي عبدالغفور) طالب الدراسات العليا / ماجستير في جامعة ابي اثيران كيرشهير التركية . نود اعلامكم بأنه لامانع لدينا من تسهيل مهمته لغرض جمع العينات من مستشفاكم / شعبة المختبرات واكمال متطلبات بحثه الموسوم

(Study the relation of gene polymorphism of IL-4 and IL-5 With asthma disease in Iraqi population)

للتفضل بالإطلاع شاكرين تعاونكم معنا خدمة للصالح العام

الدكتور  
صلاح هادي عبدالغفور  
مدير أنشطة التدريب والتنمية البشرية

أ. هادي هادي  
٨-٤-٢٠٢١

صحة كيرشهير  
اجراءات صحية  
٢٠٢١ / ٤ / ٨

الدكتور

د. هادي هادي هادي  
مدير مركز التدريب والتنمية البشرية  
٢٠٢١ / ٤ / ٨

الدكتور  
محمود جاسم محمد  
وكيل مدير مركز التدريب والتنمية البشرية

2021.04.08

نسخة منه الى:  
مركز التدريب والتنمية البشرية / صادر مستشفيات  
مستشفى رابو العام / لنفس الغرض اعلاه مع الاحترام.

## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Salah Mahdi ALRAWE
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	<input type="checkbox"/> T.C. <input checked="" type="checkbox"/> Diğer:



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Anbar üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biology
Mezuniyet Yılı	1999

Yüksek Lisans	
Üniversite	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	İleri Teknolojiler
Programı	
Mezuniyet Tarihi	2020-Halen