

# Pulmoner ve ekstrapulmoner tüberküloz hastalarında CCL1 rs159294 T/A gen polimorfizminin araştırılması

Fethi Ahmet ÖZDEMİR<sup>1</sup>, Deniz EROL<sup>2</sup>, Hüseyin YÜCE<sup>3</sup>, Vahit KONAR<sup>4</sup>, Ebru KARA ŞENLİ<sup>5</sup>, Funda BÜLÜT<sup>6</sup>, Figen DEVECİ<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bartın,

<sup>2</sup> Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Elazığ,

<sup>3</sup> Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Düzce,

<sup>4</sup> Sinop Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Sinop,

<sup>5</sup> Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Konya,

<sup>6</sup> Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Kırıkkale,

<sup>7</sup> Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Elazığ.

## ÖZET

### **Pulmoner ve ekstrapulmoner tüberküloz hastalarında CCL1 rs159294 T/A gen polimorfizminin araştırılması**

**Giriş:** Bu çalışmada amaç, pulmoner ve ekstrapulmoner tüberküloz hastalarındaki, CCL1 rs159294 T/A polimorfizminin tüberküloza yakalanma riski oluşturup oluşturmadığını ortaya koymaktır.

**Materyal ve Metod:** Çalışmamızda Elazığ ili yöresinde Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Polikliniğine başvuran, tüberküloz teşhisi konulmuş 160 hasta ve 160 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubuna ait kişilerden periferik kan örnekleri alınarak EDTA içeren tüplere 2 cc olacak şekilde konulmuştur. Bu kan örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilerek CCL1 rs159294 T/A polimorfizmi PCR-RFLP analizi yapılarak belirlenmiştir.

**Bulgular:** CCL1 rs159294 T/A polimorfizmi için 160 tüberkülozlu hastanın 98 (%61.3)'ünde TT genotipi, 58 (%36.3)'ünde TA genotipi, 4 (%2.5)'ünde de AA genotipi, 71 pulmoner tüberkülozlu hastanın 50 (%70.4)'sinde TT genotipi, 20 (%28.2)'sinde TA genotipi, 1 (%1.4)'ünde de AA genotipi, 89 ekstrapulmoner tüberkülozlu hastanın 48 (%53.9)'ünde TT genotipi, 38 (%42.7)'ünde TA genotipi, 3 (%3.4)'ünde de AA genotipi tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise 160 sağlıklı bireyin 100 (%62.5)'ünde TT genotipi, 58 (%36.3)'ünde TA genotipi, 2 (%1.3)'sinde de AA genotipi belirlenmiş olup, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanamamıştır.

**Sonuç:** CCL1 rs159294 T/A polimorfizmi, popülasyonumuz da tüberküloz hastalığına yatkınlık oluşturmamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Pulmoner tüberküloz, ekstrapulmoner tüberküloz, CCL1, polimorfizm.

## Yazışma Adresi (Address for Correspondence):

Dr. Fethi Ahmet ÖZDEMİR, Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,  
BARTIN - TÜRKİYE

e-mail: ozdemirfethiahmet23@yahoo.com

**SUMMARY****Investigation of CCL1 rs159294 T/A gene polymorphism in pulmonary and extrapulmonary tuberculosis patients**

Fethi Ahmet ÖZDEMİR<sup>1</sup>, Deniz EROL<sup>2</sup>, Hüseyin YÜCE<sup>3</sup>, Vahit KONAR<sup>4</sup>, Ebru KARA ŞENLİ<sup>5</sup>, Funda BÜLÜT<sup>6</sup>, Figen DEVECİ<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Department of Molecular Biology and Genetic, Faculty of Science, Bartın University, Bartın, Turkey,

<sup>2</sup> Department of Medical Genetic, Faculty of Medicine, Firat University, Elazığ, Turkey,

<sup>3</sup> Department of Medical Genetic, Faculty of Medicine, Duzce University, Duzce, Turkey,

<sup>4</sup> Department of Biology, Faculty of Science and Literature, Sinop University, Sinop, Turkey,

<sup>5</sup> Department of Medical Genetic, Faculty of Meram Medicine, Necmettin Erbakan University, Konya, Turkey,

<sup>6</sup> Department of Medical Genetic, Faculty of Medicine, Kirikkale University, Kirikkale, Turkey,

<sup>7</sup> Department of Chest Diseases, Faculty of Medicine, Firat University, Elazığ, Turkey.

**Introduction:** The purpose of this study is to reveal whether CCL1 rs159294 T/A polymorphism in pulmonary and extrapulmonary tuberculosis patients pose a risk to catch tuberculosis or not.

**Materials and Methods:** In the study, peripheral blood samples from the control group, which includes 160 patients, who consulted to Firat University Faculty of Medicine, Pulmonology Polyclinic in Elazığ province and who were diagnosed with tuberculosis; and 160 healthy individuals, were taken and put into tubes containing EDTA. Each tube contained 2 cc blood samples. DNA isolation was made from these blood samples and CCL1 rs159294 T/A polymorphism was defined with PCR-RFLP analysis.

**Results:** For CCL1 rs159294 T/A polymorphism, TT genotype was found in 98 (61.3%) patients, TA genotype was found in 58 (36.3%) patients, AA genotype was found in 4 (2.5%) patients among 160 patients with tuberculosis; and TT genotype was found in 50 (70.4%) patients, TA genotype in 20 (28.2%) patients, AA genotype was found in 1 (1.4%) patient among 71 patients with pulmonary tuberculosis; TT genotype was found in 48 (53.9%) patients TA genotype was found in 38 (42.7%) patients and AA genotype was found in 3 (3.4%) patients among 89 extrapulmonary tuberculosis patients. And in control group, among 160 healthy individuals, TT genotype was found in 100 (62.5%) individuals, TA genotype was found in 58 (36.3%) individuals, AA genotype was found in 2 (1.3%) individuals and no statistically significant difference was found.

**Conclusion:** CCL1 rs159294 T/A polymorphism do not form an inclination to tuberculosis in our population.

**Key Words:** Pulmonary tuberculosis, extrapulmonary tuberculosis, CCL1, polymorphism.

Tuberk Toraks 2013; 61(3): 200-208 • doi: 10.5578/TL.5481

**GİRİŞ**

Tüberküloz, bütün dünyada halk sağlığını tehdit eden tehlikeli bir hastalıktır. Tedavisi mümkün olmakla birlikte hastaların uzun süre ilaç kullanmaları gerekmektedir. Gen polimorfizmleri popülasyonda yaygın olarak görülüp, etnik ve coğrafi farklılıklar göstermektedir. Birçok durumda, hücre metabolizması için önemli olan yollarda (DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, sinyal iletimi vb.) rol alan genlerin kritik pozisyonlarında yer alır. Bazı durumlarda genin kodladığı proteinin fonksiyonu ya da enzim aktivitesi bu değişikliklerden önemli ölçüde etkilenir. Hücre metabolizması için kritik önem taşıyan proteinlerin fonksiyonunun bozulması, çeşitli hastalıklara yol açmakta veya bazı hastalıklar için riski artırmaktadır (1).

Son 50 yılda yapılan çalışmalar konağın genetik faktörlerinin tüberküloza yakınlıkta etkili olduğunu göstermektedir (2,3). İnterferon-gama (IFN- $\gamma$ ) genleri tahrip edilmiş farelerde tüberküloz hastalığına yakınlığın olduğu bilinmektedir (4).

Tüberküloz *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı oluşan immün yanıt ve patolojik değişikliklerden oluşan hastalık olarak kabul edilir. *M. tuberculosis*'e karşı birçok T-lenfosit alt grubunu içeren immün yanıt oluşmaktadır, fakat T hücreleri tarafından IFN- $\gamma$  üretimi hastalığın kontrolünde temel faktör olarak görülmektedir (5,6).

Aday genlerdeki varyasyonlar ve farklılıklar tüberküloz yakınlığında önemli bir özelliktir (7). Kemokinler, küçük sitokinlerin bir ailesidir. Bu genler lökositlerin deği-

şik tiplerinin direkt olarak göçmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu genler CXC ve CC olarak adlandırılan iki büyük alt ailede sınıflandırılır ayrıca C ve CX<sub>3</sub>C diye adlandırılan iki de küçük alt ailesi vardır. Bu ailenin insanda 40'tan fazla üyesi tanımlanmıştır. CXC ve CC genleri sırasıyla insanda 4q12.21 ve 17q11.2 kromozomlarında kümelenmiştir. Benzer bir şekilde farede de 5. ve 11. kromozomlara yerleşmiştir (8).

CC ligand 1 (CCL1) ve CCL8 genleri karşılıklı olarak tip 2 hücreleri, Tc2 hücrelerini, T yardımcı hücreleri baskılamaktadır. CCL1 geni monosit üretmekte ve bu sinyal, diğer CCL genlerini teşvik etmektedir (9).

CCL genleri immün dengede önemli bir rol oynamaktadır. Bunlar lökositlerin aktivasyonunda, hareketinde, olgunlaşmalarında görev alır (10).

Birkaç kemokin, lenfositlerin güçlendirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bununla ilgili kanıtlar gittikçe artmaktadır. Ayrıca kemokinler allerji, astım gibi solunum yolları hastalıklarında, kan oluşumunda, damar oluşumunda yaraların onarılmasında, embriyogenez ve organ gelişiminde, kardiyovasküler hastalıklarda, tümör metastazında, HIV enfeksiyonunda, kemokinler ve onların reseptörlerinin önemli rolleri vardır (11).

Tüberküloz granülomasının karakteristik özelliği çok çekirdekli dev hücrelerdir (Multinükleer giant cell, MGC); fakat bunların fonksiyonları hala iyi anlaşılamamıştır. CXCL8 salgısı *M. tuberculosis*'in MGC ve monositleri artırmaktadır. *M. tuberculosis* monosit ve CCL2 salgısını artırmaktadır. CCL3 salgısı ile bütün hücre tipleri *M. tuberculosis*'e yanıt vermektedir. Gen ekspresyon artışıyla monositlerin kemokin salgısı birleşmektedir. Özetle MGC granüloma hücre güçlenmesine katkıda bulunacaktır, fakat bu patojene maruz kalmaya bağlı olmayabilir (12).

Siyah ırktan olanlar tüberküloza daha duyarlıdır. Bazı bireyler daha güçlü olup makrofaj popülasyonuna sahip olduklarından tüberküloza dirençlidirler, bu da insanlar arasındaki genetik polimorfizm olduğunun kanıtı olabilir (13).

Bu çalışmamızda pulmoner ve ekstrapulmoner tüberküloz hastalarında; CCL1 rs159294 T/A polimorfizminin popülasyonumuzda tüberküloz için bir risk faktörü olup olmayacağını araştırmayı, araştırma sonucunda elde edilecek genotip ve allel frekanslarının pulmoner ve ekstrapulmoner tüberküloz hastalarıyla kontrol grubu arasında karşılaştırılması amaçlanmıştır. Böylece gruplar arasında allel ve genotip frekanslarındaki farklılıklar incelenecek, bu gen polimorfizminin incelenen hastalık üzerinde etkili olup olmadığı araştırılacaktır. Çalışmamız popülasyonumuzda tüberküloz hastalığının

da CCL1 rs159294 T/A polimorfizminin, allel ve genotip frekanslarının saptanması ve tüberküloz hastalığına karşı yatkinliğin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Çalışmamızın gelecekte tüberküloz hastalığıyla ilgili yapılacak çalışmalar için bir temel oluşturacağını ve yol gösterici olacağını ümit etmekteyiz.

## MATERYAL ve METOD

### Hastaların Seçimi

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulu tarafından 13.09.2009 tarih ve 148 sayılı yazı ile onaylanan çalışmada, Eylül 2009-Mayıs 2011 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Polikliniğinde pulmoner ve ekstrapulmoner tüberküloz tanısıyla takip ve tedavileri yapılan hastalardan; kendilerinin, birinci derece yakınlarının, hastane otoriteleri ve hekimlerinin rızasıyla kan örnekleri alındı. Kontrol grubunu ise, pulmoner ve ekstrapulmoner tüberküloz başta olmak üzere herhangi bir organik ve kronik hastalığı olmayan, gönüllü sağlıklı bireylerden oluşturuldu. Hasta ve kontrol grubunun benzer coğrafi bölgelerden olmasına dikkat edildi. Çalışmamız 160 sağlıklı kontrol grubu ile 160 pulmoner ve ekstrapulmoner tüberküloz hastasından oluşmaktadır. Tüberküloz hastalarının dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir.

### Örneklerin Alınması, Saklanması ve Analizlere Hazırlanması

Kanlar hastaların antekübital veninden daha önceden hazırlanmış 0.3 mL'lik, EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) içeren tüplere 2 cc olacak şekilde alındı. Kanlar, kan alınma işlemleri bittikten sonra DNA saflaştırması yapılmaya kadar -20°C'de bekletildi. Kanlar birkaç defa alt-üst edilerek homojen hale getirilip 24'erli gruplar oluşturularak çalışıldı.

### Kandan DNA İzolasyonu

DNA saflaştırılması Promega firmasından alınan ticari Wizard Genomic DNA Purification Kiti ile gerçekleştirildi.

**Tablo 1. Tüberkülozlu hastaların dağılımı.**

Tüberkülozlu hasta	Sayı
Toplam tüberkülozlu hasta	160
Toplam pulmoner tüberkülozlu hasta	71
Toplam ekstrapulmoner tüberkülozlu hasta	89
Lenfadenit	73
Plevra	8
Kemik	5
Deri	3

**Tablo 2. CCL1 ait primer dizileri.**

CCL1 sense primer: 5'-CCC AAA ATA TCT GTG GCT GA-3'
CCL1 antisense primer: 5'-ATC CCA GCA GAA GCT TTG AA-3'

di (Kat. No.: A1125, Madison, WI, USA). Bu kit 300 µL kandan DNA izolasyonu için dizayn edilmiştir. Çalışma esnasında kitin genel kurallarına uymak koşuluyla bazı modifikasyonlar yapıldı.

#### Oligonükleotidler (Primerler)

CCL1 genindeki rs159294 T/A polimorfizminin değerlendirilmesi için "www.ensembl.org web" adresi kullanılarak genlerin tam dizilerine ulaşıldı ve primer dizayn edildi. Primerler "http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\_www.cgi" programı kullanılarak dizayn edildi. Polimorfizmin değerlendirilmesinde RFLP yöntemi kullanılırken özellikle seçilen enzimin star aktiviteye sahip olmaması tercih edildi. CCL1 rs159294 polimorfizminin doğrulanması için DNA dizileme yapıldı. Bu amaçla ilgili polimorfizm için wild, heterozigot ve polimorfik olduğu RFLP yöntemiyle tespit edilen örnekler polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı.

PCR deneylerinde kullanılacak olan oligonükleotidler, insan DNA'sı üzerindeki ilgili gen bölgesinin amplifikasyonunu gerçekleştirmek için kullanıldı. Satın alınan primerlerin nükleotid sekansı ve orijini Tablo 2'de belirtilmiştir.

#### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bu çalışmada hasta ve kontrollerden elde edilen DNA örnekleri PCR ile çoğaltıldı. PCR koşulları Zhang ve arkadaşları tarafından tariflenen protokole göre belirlendi (14). PCR optimizasyonundan sonra protokol laboratuvar şartlarımıza göre yeniden oluşturuldu.

#### PCR İçeriği:

10X PZR Buffer	3 µL
MgCl (25 mM)	3 µL
dNTP (2.5 mM)	3 µL
Primer R (20 pmol)	1 µL
Primer F (20 pmol)	1 µL
DNA	5 µL
Taq DNA Polimeraz	0.2 µL

Toplam volüm 30 µL'ye distile suyla tamamlandı.

#### CCL1 rs159294 T/A PCR Programı

95°C 5 dakika Denatürasyon periyodu

95°C 30 saniye  
58.4°C 30 saniye  
72°C 40 saniye

↑  
36 siklus  
↓

72°C 7 dakika Ekstansiyon periyodu

PCR işlemi gerçekleştirildikten sonra %3'lük agaroz jelde PCR ürünleri koşturuldu. CCL1 rs159294 için 239 bp ürün elde edildi. Elde edilen CCL1 ürünleri Bfal (FspBI), (Fermentas) restriksiyon enzimiyle kesildi.

#### Bfal (FspBI) Restriksiyon Enzim Muamelesi

10X Reaksiyon Buffer 2.5 µL

PCR ürünü 10 µL

Su 3 µL

Enzim [Bfal (FspBI)] 0.8 µL

37°C'de 16 saat inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra ürünler %3'lük agaroz jelde koşturularak hastaların ve kontrollerin polimorfizm sonuçları verildi (14).

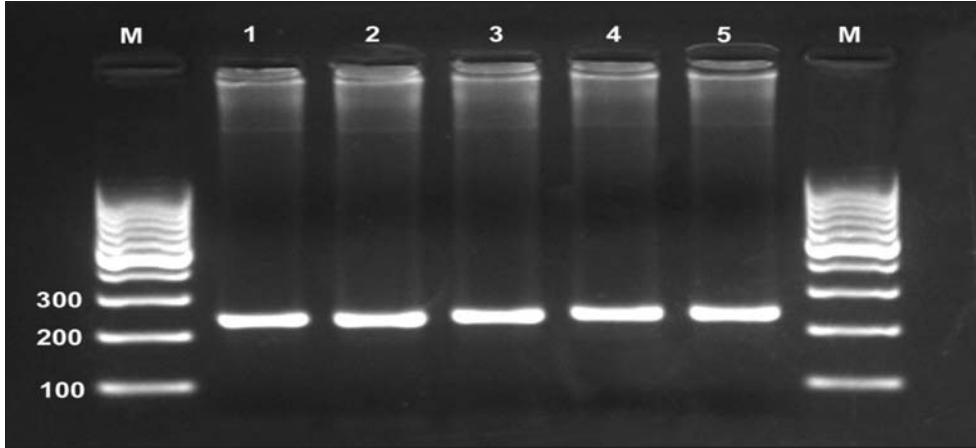
#### İstatistiksel Analizler

Bütün istatistiksel testler SPSS® for Windows computing program, Version 16 (SPSS Inc. Chicago IL USA) ile gerçekleştirildi. Genetik dağılımın Hardy-Weinberg dengesine uyumu ki-kare testiyle analiz edildi. Hastalar ve kontroller arasındaki genotipik dağılımların farklılıkları ki-kare testiyle değerlendirildi. Kontrol ve hastalar arasındaki allelik dağılım farklılıkları Fisher's Exact testle değerlendirildi. p değerinin < 0.05 olması istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

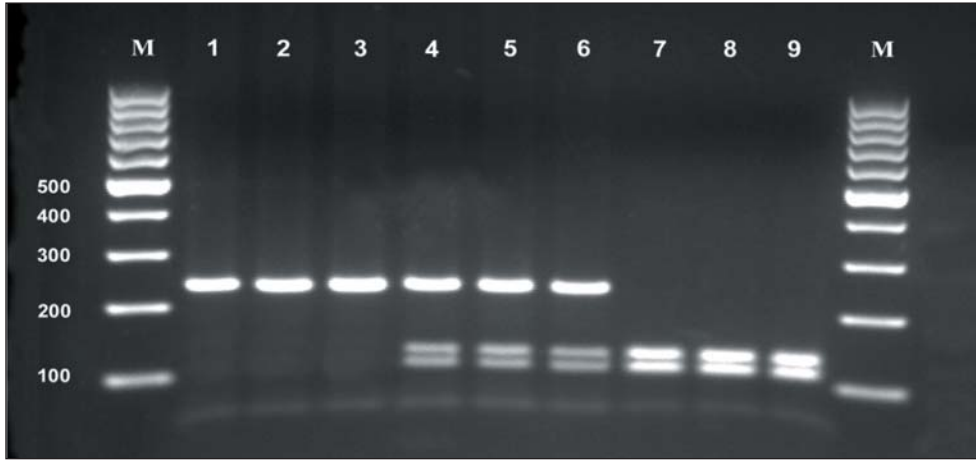
#### BULGULAR

Bu çalışmada 160 tüberkülozlu hasta ile 160 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubundan kan örnekleri alınarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Hastaların cinsiyet dağılımının 61 (%38.1) kadın, 99 (%61.9) erkek olduğu, yaş ortalamalarının ise 37.4 ± 14.6 yıl olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubunun cinsiyet dağılımının 82 (%51.2) kadın, 78 (%48.8) erkek olduğu, yaş ortalamalarının ise 39.3 ± 13.8 yıl olduğu saptanmıştır. İzolasyon sonrası CCL1 primerleri kullanılarak PCR kurulmuştur. DNA'sı elde edilen hasta ve kontrol gruplarının PCR'leri kurularak çoğaltma yapılmıştır. Sonra ürünler %3'lük agaroz jelde koşturularak değerlendirilmiştir. Hasta ve kontrol örneklerinde CCL1 rs159294 T/A polimorfizmi için 239 bp'lik ilk PCR ürünleri oluşturulmuştur (Şekil 1).

PCR ile amplifiye edilen gen ürünleri CCL1 için Bfal (FspBI) restriksiyon endonükleaz enzimi ile muamele



Şekil 1. CCL1 için kesim öncesi ilk PCR ürün örnekleri, M: 100 bp'lik DNA boyut markarı.



Şekil 2. CCL1 rs159294 T/A polimorfizmi için PCR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun 1, 2, 3: 239 bp (AA homozigot polimorfik örnekler), Sütun 4, 5, 6: 239 bp + 130 bp + 109 bp (TA heterozigot örnekler), Sütun 7, 8, 9: 130 bp + 109 bp (TT yabancı tip örnekler) M: 100 bp'lik DNA boyut markarı.

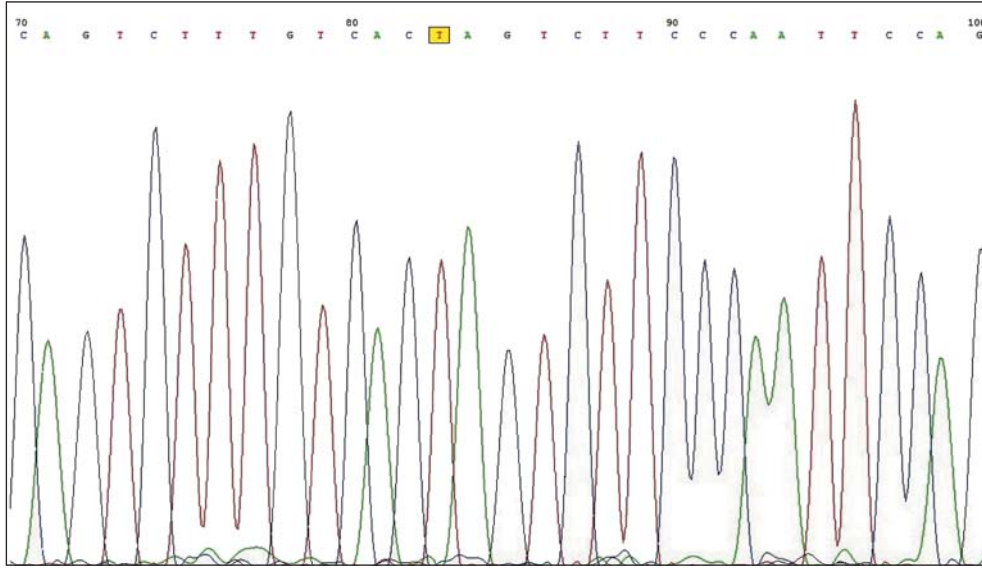
edilmiştir. İlgili polimorfizmin belirlenmesi için %3'lük agaroz jelde koşturularak CCL1 için yabancı tip (TT), heterozigot (TA), homozigot polimorfik (AA), olguları tespit edilmiştir (Şekil 2).

CCL1 genindeki rs159294 polimorfizmi için TT, AA ve TA genotiplerine ait DNA dizileme görüntüleri Şekil 3-5'te görülmektedir.

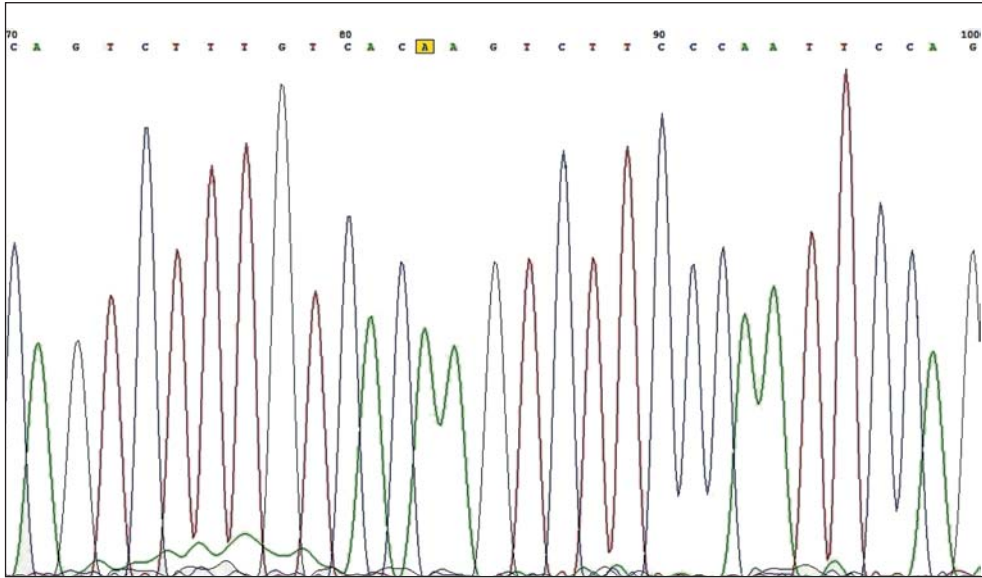
Hasta ve kontrol grubu ile yaptığımız çalışma sonucunda CCL1 geni için 160 tüberkülozlu hastanın 98 (%61.3)'ünde TT genotipi, 58 (%36.3)'ünde TA genotipi, 4 (%2.5)'ünde de AA genotipi, 71 pulmoner tüberkülozlu hastanın 50 (%70.4)'sinde TT genotipi, 20 (%28.2)'sinde TA genotipi, 1 (%1.4)'ünde de AA genotipi, 89 ekstrapulmoner tüberkülozlu hastanın 48 (%53.9)'ünde TT genotipi, 38 (%42.7)'ünde TA genotipi, 3 (%3.4)'ünde de AA genotipi tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise 160 sağlıklı bireyin 100 (%62.5)'ünde TT genotipi, 58 (%36.25)'ünde TA genotipi, 2 (%1.3)'sinde

de AA genotipi belirlenmiştir (Tablo 3). CCL1 rs159294 polimorfizminde genotip frekansları ki-kare testi kullanılarak, hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanamamıştır ( $p > 0.05$ ). Kontrol grubunun genotip dağılımı Hardy Weinberg dengesi içinde olmayıp ( $p < 0.05$ ), hastaların genotip dağılımlarının Hardy Weinberg dengesi içinde olduğu belirlenmiştir ( $p > 0.05$ ).

CCL1 için, toplam, pulmoner ve ekstrapulmoner tüberkülozlu hastalarda T allel frekansları sırasıyla; 0.19, 0.15, 0.25 olarak saptanmış; kontrol grubunda ise T allel frekansı 0.21 olarak belirlenmiştir. A allel frekansları ise toplam, pulmoner ve ekstrapulmoner tüberkülozlu hastalarda sırasıyla; 0.81, 0.85, 0.75, kontrol grubunda ise 0.79 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4). Allel frekansları ki-kare testi kullanılarak, hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmüştür ( $p > 0.05$ ).



Şekil 3. CCL1 genindeki rs159294 polimorfizmi için TT genotipine ait DNA dizileme görüntüsü.



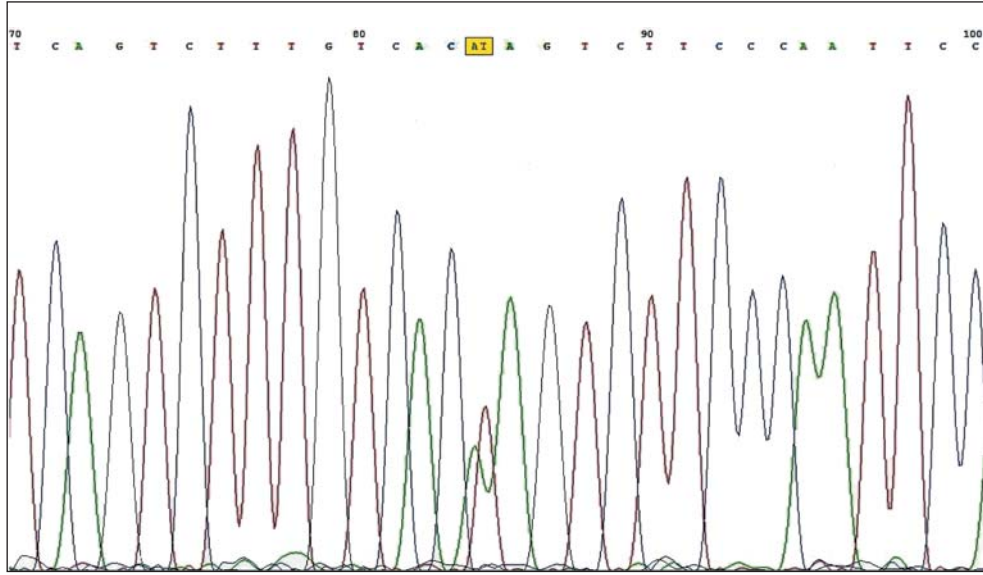
Şekil 4. CCL1 genindeki rs159294 polimorfizmi için AA genotipine ait DNA dizileme görüntüsü.

### TARTIŞMA

*M. tuberculosis*'in vücuda girişi ile makrofajlar immün yanıtın oluşturulmasında önemli rol oynamaktadır. Makrofajlar *M. tuberculosis* konağa girdiği andan itibaren onları fagosite edip, basili bir kapsülle çevrelemektedir. Kemokinler makrofajların hareketinde görev alan bağışıklık sistemi elemanlarıdır. Kemokinler glikoprotein yapıda olup, tüberküloz enfeksiyonunda rol oynamaktadır. İnsan makrofajları, *M. tuberculosis* ile karşılaşmaları durumunda birçok kemokin üretmektedir (15). Kemokinler, inflamasyon yerleri ve santral sinir sistemindeki hücrelerin hareketinde hayati öneme sa-

hiplerdir. Kemokin genleri kromozomun 17q11.2-q12 üzerindedir.

Thuong ve arkadaşlarının latent, pulmoner ve menenjit tüberkülozlu 273 hasta ve 188 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunu kullanarak yaptıkları bir çalışmada; CCL1 geni içerisindeki rs10491110, rs3091324, rs2072069, rs159319, rs3138031, rs159290, rs159291 ve rs159294 tek nükleotid polimorfizmlerinin tüberküloz ile ilgili olup olmadığını araştırmışlar ve bizim çalışığımız polimorfizm olan rs159294 T/A polimorfizminin istatistiksel olarak tüberküloza yakınlık oluşturduğunu tespit etmişlerdir (16). Çalışmaları so-



Şekil 5. CCL1 genindeki rs159294 polimorfizmi için TA genotipine ait DNA dizileme görüntüsü.

Tablo 3. CCL1 rs159294 polimorfizmine ait hasta ve kontrol gruplarının genotip frekansları.

Gruplar	TT	TA	AA	p	H-Wes
Kontrol (n= 160)	100 (%62.5)	58 (%36.3)	2 (%1.3)		0.042
Toplam tüberkülozlu hasta (n= 160)	98 (%61.3)	58 (%36.3)	4 (%2.5)	0.709	0.175
Pulmoner tüberküloz (n= 71)	50 (%70.4)	20 (%28.2)	1 (%1.4)	0.488	0.52
Ekstrapulmoner tüberküloz (n= 89)	48 (%53.9)	38 (%42.7)	3 (%3.4)	0.272	0.164

Tablo 4. CCL1 rs159294 polimorfizmine ait hasta ve kontrol gruplarının allel frekansları.

Gruplar	T allel frekansı	A allel frekansı	p
Kontrol	0.21	0.79	
Toplam tüberkülozlu hasta	0.19	0.81	0.693
Pulmoner tüberküloz	0.15	0.85	0.195
Ekstrapulmoner tüberküloz	0.25	0.75	0.291

nucunda T allel frekansını toplam tüberkülozlu hastalarda 0.82, pulmoner tüberkülozlu hastalarda 0.79, A allel frekansını toplam tüberkülozlu hastalarda 0.19, pulmoner tüberkülozlu hastalarda 0.21 olarak belirlemiştir. Çalışmamız sonucunda T allel frekansını toplam tüberkülozlu hastalarda 0.19, pulmoner tüberkülozlu hastalarda 0.15, A allel frekansını toplam tüberkülozlu hastalarda 0.81, pulmoner tüberkülozlu hastalarda 0.85 olarak tespit ettik. Thuong ve arkadaşlarının allel frekansları, bizim allel frekanslarımız ile karşılaştırıldığında, T allel frekanslarının bizim belirlediğimiz T allel frekanslarına göre oldukça yüksek, A allel fre-

kanslarının bizim belirlediğimiz A allel frekanslarına göre de oldukça düşük olduğunu görmekteyiz. A alleli polimorfik allel olup, çalıştığımız popülasyonda yaygın olarak görülmektedir. Thuong ve arkadaşlarının çalıştıkları popülasyonda polimorfik A allel sıklığının oldukça düşük olduğunu görmekteyiz. Allel sıklığındaki bu farklılık istatistik sonuçlarını etkilemektedir.

Biz çalışmamızda CCL1 genindeki rs159294 T/A polimorfizminin tüberküloza yakalanmada istatistiksel olarak bir risk oluşturmadığını belirledik. Bunun nedeni CCL1 genindeki rs159294 T/A polimorfizm sıklığının, popülasyonlarda farklılık gösteriyor olması olabilir. Ni-

tekim yapılan çalışmayla kendi çalışmamızdaki allel frekanslarını karşılaştırdığımızda atasal allel olan T'nin hem toplam tüberkülozlu hastalarımızda hem de pulmoner tüberkülozlu hastalarımızda, yapılan çalışmaya göre daha düşük oranlarda olduğunu görmekteyiz. Farklı toplumlarda, farklı etnik kökene sahip popülasyonlardaki polimorfizmlerin, aynı hastalık için bir risk faktörü oluşturmadığı da bilinmektedir. Aynı polimorfizmin, farklı etnik kökene sahip popülasyonlarda aynı hastalığa karşı bir risk faktörü oluşturmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Thuong ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 273 hasta, 188 sağlıklı birey kullanmışlar ve CCL1 genindeki rs159294 T/A polimorfizminin tüberküloza yakalanmada istatistiksel olarak bir risk oluşturduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamız 160 tüberkülozlu hasta ve 160 kontrol grubu ile yapılmış olup, hasta ve sağlıklı bireylerin sayısı birbirine eşittir. Çalışmamızı hasta bireylerin sayısını artırarak ya da kontrol grubundaki birey sayısını azaltarak yapmamız durumunda daha farklı bir sonuçla karşılaşabiliriz. Hasta sayısının artırılması da çalışmanın sonucunu değiştirebilir.

Kronik akciğer hastalıklarının şiddetlenmesi önemli bir ölüm nedenidir. Hastadaki tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) bu kronik rahatsızlığın şiddetlenmesine katkıda bulunabilir. Takabatake ve arkadaşları Japonya'da 276 erkek kronik akciğer rahatsızlığı bulunan hastalarda CCL11, CCL1 ve CCL5 geni üzerindeki 4 SNP'nin kronik akciğer hastalıkları üzerine etkisini araştırmışlar ve çalışma sonucunda CCL1 gen polimorfizminin hastalığın şiddetlenmesiyle ilgili olduğunu bulmuşlardır (17).

Yukarıda bahsettiğimiz çalışmalarda, CCL1 gen polimorfizmlerinin çalışılan farklı hastalıklarla ilişkili olduğu görülmektedir. Çalışmamızda, CCL1 geninde farklı bir polimorfizmin tüberküloz hastalığıyla ilişkili olup olmadığını araştırdık. CCL1 rs159294 T/A polimorfizminin, istatistiksel olarak tüberküloz hastalığıyla anlamlı bir ilişkisinin olmadığını tespit ettik. Literatür bulgularıyla çalışmamızın sonucunun farklı olmasının nedeni, aynı polimorfizmin çalışılmamış olması, çalışılan polimorfizmin farklı bir hastalık üzerinde etkili olup olmadığını araştırılmış olması olabilir. Ayrıca, aynı polimorfizm, aynı hastalık üzerinde, etnik kökenleri farklı olan popülasyonlarda bazen hastalıkla istatistiksel olarak ilişkili iken, bazen de ilişkili olmayabilir. Bu durum çalışılan hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin sayılarındaki farklılık ya da polimorfik allelin görülme sıklığıyla açıklanabilir. Çalışmamızda CCL1 geni için, kontrol grubunun genotip dağılımının istatistiksel olarak Hardy-Weinberg dengesi içinde olmaması istatistik so-

nuçlarını etkilemiş olabilir. Thuong ve arkadaşları mikroarray hibridizasyon, real time PCR tekniklerini kullanarak çalışmışlardır. Biz ise RFLP tekniğini kullandık, kullanılan tekniğin farklı olması çalışma sonucunu etkileyebilir.

Sonuç olarak; çalışmamızdan elde edilen veriler doğrultusunda, aynı polimorfizmler, farklı toplumlarda, tüberküloz hastalarında, daha fazla tüberküloz hastası ve kontrol grubu ile çalışılarak, pulmoner ve ekstrapulmoner tüberküloz hasta sayısı ve ekstrapulmoner tüberküloz hastalarının dağılımları birbirine çok yakın tutularak, verilerimizin daha fazla araştırmayla destekleneceği inancındayız.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI

Bildirilmemiştir.

### KAYNAKLAR

1. Deligezer U, Akışık EE, Dalay N. The application of the lightcycler fluorescence PCR in polymorphism analysis, Investigation of the Mthfr C677T polymorphism in childhood and adult patients with myeloid leukemia. *Türk Onkoloji Dergisi* 2004; 19: 4.
2. Casanova J, Abel LL. Genetic dissection of immunity to mycobacteria the human model. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 581-620.
3. Cooke GS, Hill AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 77-967.
4. Crevel R, Ottenhoff TH, Meer JW. Innate immunity to mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 294-309.
5. Bottasso O, Bay ML, Basedovsky H. The immuno endocrine component in the pathogenesis of tuberculosis. *Scand J Immunol* 2007; 66: 166-75.
6. Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Esquifino AI, Peruma SR, Miller SC. Melatonin immune function and aging. *Immun Ageing* 2005; 29: 17-29.
7. Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B. *Moleküler Biyoloji*. Ankara: Nobel Yayıncılık, 2007: 48.
8. Nomiyama H, Mera A, Ohneda O, Miura R, Suda T, Yashie O. Organization of the chemokine genes in the human and mouse major clusters of CC and CXC Chemokines diversification between the two species. *Genes and Immunity* 2001; 2: 110-3.
9. Sironi M, Martinez FO, Ambrosio DD. Different regulation of chemokine production by Fcγ receptor engagement in human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 2006; 80: 342-9.
10. Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D. Chemokines roles in leukocyte development, trafficking, effector function. *Biogen Inc* 2003; 45: 168-77.
11. Le Y, Hou Y, Iribarren P, Wong JM. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Molecular Immunology* 2004; 1: 95-104.



12. Zhu XW, Friedland SJ. Multinucleate giant cells and the control of chemokine secretion in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Immunology* 2006; 120: 10-20.
13. Özbal Y. Tuberculosis immunology. *Erciyes Medical Journal* 2006; 28: 25-34.
14. Zhang ZH, Chen F, Zhang XL, Jin Y, Bai J, Fu SB. PTPN22 allel polymorphisms in 15 chinese populations. *Int J Immunogenet* 2008; 35: 433-40.
15. Widdison S, Watson M, Piercy J, Howard C, Coffey TJ. Granulocyte chemotactic properties of *M. tuberculosis* versus *M. bovis* infected bovine alveolar macrophages. *Molecular Immunology* 2007; 45: 740-9.
16. Thuong NTT, Dunstan S, Chau TTH, Thorsson V, Simmons CP, Quyen NTH, et al. Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles. *PLOS Pathogens* 2008; 4: 1-13.
17. Takabatake N, Shibata Y, Abe S, Wada T, Machiya J, Igarashi A, et al. A single nucleotide polymorphism in the CCL1 gene predicts acute exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 875-85.