

TC.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LOMBER DEJENERATİF DİSK HASTALIĞI İLE  
VİTAMİN D RESEPTÖR VE AGGRECAN GEN  
POLİMORFİZMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ**

**Betül ESER**

**DOKTORA TEZİ**

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Doç. Dr. Tülin ÇORA**

**2. Danışman**

**Prof. Dr. Mustafa SOLAK**

Bu araştırma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 06.TIP.27 proje numarası ile desteklenmiştir.

**KONYA-2009**

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Betül ESER tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Hasan ACAR  
Selçuk Üniversitesi

Danışman: Doç. Dr. Tülin ÇORA  
Selçuk Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Mustafa SOLAK  
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Ali ÜNLÜ  
Selçuk Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Erdal KALKAN  
Selçuk Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Orhan ÇETİN  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Çalışmalarım boyunca desteklerini benden esirgemeyen ve öğrencisi olmaktan onur duyduğum hocalarım Prof. Dr. Mustafa Solak'a, Prof. Dr. Hasan ACAR'a ve Doç. Dr. Tülin ÇORA'ya,

Tez çalışmamın planlanması, olguların seçimi ve diğer tüm çalışma aşamalarında fikirlerini paylaştığı ve bana destek olduğu için eşim Yard. Doç. Dr. Olcay ESER'e,

Doktora eğitimim boyunca her zaman yanımda olan Öğr. Grv. Müjgan Ö. Erdoğan'a, Arş. Grv. S. Handan Yıldız'a,

Hayatımın her döneminde maddi ve manevi olarak bana destek olan, sevgileriyle ve emekleriyle her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 06.TIP.27 proje numarası ile desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR.....</b>	<b>vii</b>
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 İntervertebral Disk.....	1
1.1.1. İntervertebral Disk Kollajenleri.....	3
1.1.2. İntervertebral Disk Proteoglikanları .....	3
1.2. İntervertebral Disk Hernisi ve Sınıflaması.....	3
1.3. Dejeneratif Disk Hastalığı.....	4
1.3.1. Etyolojisi ve Patogenezi .....	5
1.4. DNA Molekülünün Yapısal Değişiklikleri.....	7
1.4.1. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP).....	7
1.4.2. Değişken Sayıda Ardışık Dizi Polimorfizmleri(VNTR).....	8
1.4.3. Mutasyonların ve Polimorfizmlerin Belirlenmesinde PZR'nin Rolü.....	8
1.5. İntervertebral Disk Dejenerasyonu İle İlişkili Aday Gen Polimorfizmleri.....	8
1.5.1. Kollajen Gen Polimorfizmleri.....	9
<i>COL1A1</i> gen polimorfizmi.....	9
<i>COL9A1</i> , <i>COL9A2</i> ve <i>COL9A3</i> gen polimorfizmleri.....	9
<i>COL11A1</i> gen polimorfizmi.....	10
1.5.2. Matriks Metalloproteinaz-3 ( <i>MMP-3</i> ) Gen Polimorfizmi.....	10
1.5.3. Östrojen Reseptör Alfa ( <i>ER-α</i> ) Gen Polimorfizmi.....	10
1.5.4. <i>VDR</i> Gen Polimorfizmi.....	11
<i>VDR</i> geni ve proteini.....	11
<i>VDR</i> proteininin kalsiyum metabolizmasına etkisi.....	11
<i>VDR</i> proteininin Na-SO <sub>4</sub> kotransportuna etkisi.....	12
<i>VDR</i> genine ait polimorfizmler.....	13
1.5.5. <i>Aggrecan</i> Gen Polimorfizmi.....	14
<i>Aggrecan</i> geni ve proteini.....	14
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>17</b>
2.1 Hasta ve Kontrol Grubunun Oluşturulması.....	17

2.2. DNA İzolasyonu.....	17
2.3. <i>VDR</i> Gen Polimorfizm Analizi.....	19
2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	19
FokI enzim kesim bölgesinin analizi.....	19
Jel elektroforezi.....	20
Restriksiyon enzim kesimi.....	20
TaqI enzim kesim bölgesinin analizi.....	20
Jel elektroforezi.....	21
Restriksiyon enzim kesimi.....	21
2.4. <i>Aggrecan</i> Gen Polimorfizm Analizi.....	22
2.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	22
2.4.2. Jel Elektroforezi.....	23
2.5. İstatistik Analizler.....	23
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>24</b>
3.1. <i>VDR</i> Gen Polimorfizmi .....	24
3.1.1 Disk Herniasyon Tipleri ile TaqI ve FokI Polimorfizmleri Arasındaki İlişki.....	26
3.1.2 Disk Dejenerasyon Dereceleri İle TaqI ve FokI Polimorfizmleri Arasındaki İlişki.....	27
3.1.3. Disk Dejenerasyon Seviyeleri ile TaqI ve FokI Polimorfizmleri Arasındaki İlişki.....	28
3.2. <i>Aggrecan</i> Gen Polimorfizmi .....	29
3.2.1 Disk Herniasyon Tipleri ile <i>Aggrecan</i> Gen Polimorfizmleri Arasındaki İlişki.....	31
3.2.2 Disk Dejenerasyon Dereceleri İle <i>Aggrecan</i> Gen Polimorfizmleri Arasındaki İlişki.....	31
3.2.3. Disk Dejenerasyon Seviyeleri ile <i>Aggrecan</i> Gen Polimorfizmleri Arasındaki İlişki.....	32
3.3. <i>VDR</i> ve <i>Aggrecan</i> Gen Polimorfizm Analizlerinin Birlikte Değerlendirilmesi.....	32
3.3.1 Disk Herniasyon Tipleri ile <i>VDR</i> ve <i>Aggrecan</i> Gen Polimorfizmlerinin Beraber Değerlendirilmesi.....	33

3.3.2 Disk Dejenerasyon Dereceleri ile <i>VDR</i> ve <i>Aggrecan</i> Gen Polimorfizmlerinin Beraber Değerlendirilmesi.....	34
3.3.3 Disk Dejenerasyon Seviyeleri ile <i>VDR</i> ve <i>Aggrecan</i> Gen Polimorfizmlerinin Beraber Değerlendirilmesi.....	36
<b>4. TARTIŞMA.....</b>	<b>39</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>44</b>
<b>6. ÖZET.....</b>	<b>46</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>47</b>
<b>8. KAYNAKLAR.....</b>	<b>48</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>56</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>Simge</b>	<b>Açıklama</b>
AGC	Aggrecan
bç	Baz çifti
CS	Kondroidin sülfat
COL1A1	Kollajen tip I alfa 1
COL9A1	Kollajen tip IX alfa 1
COL9A2	Kollajen tip IX alfa 2
COL9A3	Kollajen tip IX alfa 3
COL11A1	Kollajen tip XI alfa 1
DDH	Dejeneratif disk hernisi
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ER- $\alpha$	Östrojen reseptör alfa
EtBr	Ethidium bromide
GAG	Glikozaminoglikan
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
KS	Keratan sülfat
ml	Mililitre
$\mu$ l	Mikrolitre
mM	Milimolar
MMP-3	Matriks Metalloproteinaz-3
MRG	Magnetik rezonans görüntüleme
NaSi-1	Sodyum-sülfat kotransporter proteini
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
$^{\circ}$ C	Santigrad derece
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
VDR	Vitamin D Reseptör
VNTR	Değişken sayıda ardışık tekrar dizileri
%	Yüzde

## 1.GİRİŞ

Dejeneratif disk hernisi (DDH) en sık rastlanan omurga hastalıklarından biri olup genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle oluşan kompleks ve multifaktöriyel bir hastalıktır (Solovieva ve ark 2002, Chan ve ark 2006). Etyolojisinde yaş, sigara, mesleki etmenler, vibrasyon travması, obeziteye neden olan çevresel faktörler yanında çeşitli genler ve bu genlerdeki değişiklikleri içeren genetik faktörler de suçlanmaktadır. Genetik faktörler ile ilgili yapılan pek çok çalışmada DDH ile ilişkili çeşitli genlerdeki değişiklikler saptanmıştır (Ala-Kokko 2002). Özellikle diskin yapısal komponentlerini kodlayan genlerle ilgili çalışmalar disk dejenerasyonu genetiğinin temelini oluşturmaktadır (Kawaguchi ve ark 1999, Videman ve ark 2001).

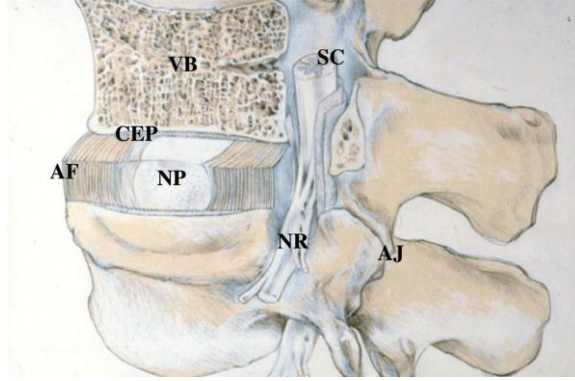
Bu genlerin ürünlerinden olan Vitamin D Reseptör (VDR) ve Aggrecan proteinleri, kemik ve kıkırdak yapının ana bileşenleridir. Aggrecan, intervertebral diskdeki nukleus pulposusun majör proteoglikan komponenti olup diskin hidrasyonunu sağlayarak dejenerasyondan korunmasını sağlar. VDR genine ait değişiklikler sonucu oluşan vitamin D eksikliğinin proteoglikanlarda yapısal defekte neden olarak intervertebral diskin ekstraselüler matriksinin yapısını ve miktarını etkileyeceği ve disk dejenerasyonu oluşumuna katkıda bulunacağı belirtilmiştir (Chan ve ark 2006). Bu nedenle, bu proteinleri kodlayan VDR ve Aggrecan genlerindeki değişiklikler sonucu oluşan polimorfik yapılar DDH etyolojisinde rol oynayabilirler.

Genetik faktörler ele alınmadığında, disk dejenerasyonu oluşumu, çevresel faktörler ve özellikle ilerleyen yaş ile oluşan fizyolojik bir süreçtir. Bu nedenle, bu çalışmada çevresel faktörlerin etkisini en aza indirerek genetik faktörlerin disk dejenerasyonu oluşumuna etkisini daha iyi ortaya koyabilmek için DDH tanısı konan genç (20–30 yaş) hastalarda VDR ve Aggrecan gen polimorfizmleri ile dejeneratif disk hernisi arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

### 1.1. İntervertebral Disk

Spinal kolon; 7 servikal, 12 dorsal, 5 lomber, 5 bileşik sakral ve 4 bileşik koksiks olmak üzere 33 vertebradan oluşmuştur. İnsan vücudunun normal postürünü sağlamak, organlara destek oluşturmak ve medulla spinalisi korumak gibi görevleri vardır. Bir vertebra, önde vertebra cismi ve arkada vertebra kavsinden oluşur. İki

komşu vertebra ve aralarındaki intervertebral disk, fonksiyonel birimi oluşturur (Şekil 1.1).



**Şekil 1.1.** Spinal kolon kesiti (Urban ve Roberts 2003).

(AF: Anulus Fibrozus NP: Nukleus Pulpozus CEP: Kıkırdak Uç Tablası  
VB:Vertebra cismi SC: Spinal Kord NR: Sinir kökü AJ: Apofizial eklem)

İntervertebral diskler, ikinci servikalden birinci sakrala kadar tüm vertebra korpusları arasında bulunan yarı oynar eklem yapısıdır. İnsanda 23 adet intervertebral disk bulunur ve vertebral kolon uzunluğunun %25'ini oluşturur.

Bir intervertebral disk üç bölümden oluşur:

**1. Nukleus Pulpozus:** İntervertebral diskin merkezinde yer alan fibrojelinöz yapıdaki bölümdür. Dikey etkileyen kuvvetleri, yatay kuvvetlere dönüştürerek, anulus fibrozusun her tarafına eşit olarak yayar.

Nukleus pulpozusun suya karşı büyük afinitesi vardır. Kitesinin % 80-90'ını su oluşturur. Kuru ağırlığının ise yaklaşık olarak % 15'i proteoglikanlar, %20'si kollajenler ve kalanı da elastin ve diğer minör komponentlerden oluşmuştur (Goupille 1998). Proteoglikanlar hidrasyonu, kollojen ise esnekliği sağlar.

**2. Anulus Fibrozus:** Diskin periferinde yer alan ince kollajenöz bölgedir. Diskin şeklinin ve bütünlüğünün korunmasını sağlar. Su içeriği nükleustan daha düşük olup % 60-70 kadardır. Kuru ağırlığının yaklaşık olarak % 60'ı kollajen, % 20'si proteoglikandır (Goupille 1998).

**3. Kıkırdak uç tablası:** Hyalin kıkırdak yapıda olup, anulus fibrozusun alt ve üst yüzeylerini kaplayarak, vertebral cisme tutunmasını sağlar. Ayrıca vertebraya binen aksiyel yüklerin dağılmasına yardımcı olur.

### **1.1.1. İntervertebral Disk Kollajenleri**

Normal erişkinlerde intervertebral disk kollajenlerinin tipleri ve yoğunlukları bölgesel farklılıklar gösterir (Gruber ve Hanley 1998). Nükleustaki hücreler başlıca Tip II kollajen, daha az oranda Tip VI (%15–20), Tip IX (%1–2) ve Tip XI (%3) kollajen sentez eder (Goupille ve ark 1998, Nerlich ve ark 1998). Anulus fibrozusta ise başlıca Tip I ve Tip II kollajen, daha az oranda da Tip III ve V (%3), Tip VI (%10) ve Tip IX (%1–2) kollajen bulunur (Goupille ve ark 1998, Nerlich ve ark 1998).

### **1.1.2. İntervertebral Disk Proteoglikanları**

Proteoglikanlar, bir protein çekirdek ve ona bağlanan glikozaminoglikan (GAG) zincirlerinden oluşur (Comper ve Laurent 1978). GAG yapısında yer alan negatif yüklü karboksil ve sülfat grupları pozitif yüklü iyonları çekerek ozmotik basınç oluşturur, dokuya su girmesini ve hacminin artmasını sağlar (Comper ve Laurent 1978).

Nükleus ve uç tabla içerisindeki ana proteoglikan (% 50) aggrecan'dır (Annunen ve ark 1999). Aggrecan'da iki adet glikozaminoglikan zinciri bulunmaktadır. Bunlar; kondroidin sülfat (CS) ve keratan sülfat (KS)' dir. KS/CS oranı nükleusda yüksekken, anulusta bunun tam tersidir. Normal ve dejenere insan intervertebral disk dokularının proteoglikan içeriklerinin incelendiği bir çalışmada, daha kısa ve daha az su tutan dekorin ve biglikan miktarlarının dejenere disk dokusunda arttığı, daha uzun olan kondrotin sülfat zincirlerinin ise azaldığı ya da tamamen yok olduğu saptanmıştır (Inkinen ve ark 1998).

Melrose ve ark (1997) oluşturdukları deneysel disk dejenerasyonu modeli ile sağlam disklerden aldıkları hücreleri karşılaştırdıklarında aggrecan sentezinin anlamlı derecede azaldığını saptamışlardır. Bu da intervertebral diskin hidrodinamik ve viskoelastik özelliklerinin aggrecana bağımlı olduğunu göstermektedir.

## **1.2. İntervertebral Disk Hernisi ve Sınıflaması**

Fizyolojik olarak vertebral kolona binen yük, anulus fibrozusun kanal içine doğru genişlemesine neden olur. Yük kalktığında ise bu genişleme eski haline döner. Dejenerasyon gelişen bir diskte, nükleus pulpozus yarı sıvı özelliğini yitirdiğinden, yükü eşit bir şekilde dağıtamaz. Anulus fibrozus zayıfladığı için hafif travmalarda dahi yırtılabilir ve nükleus pulpozus bu lezyondan dışarıya çıkabilir. İntervertebral

diskin nukleus pulpozusunun vertebral kanal içine yer değiştirmesine disk hernisi denir.

DDH, en sık rastlanan omurga hastalıklarından biridir. İnsanların %70-80'i erişkin yaşlarında en az bir kez bel ağrısı şikâyeti çekmektedir (Lucas 1983). Gelişmiş ülkelerde ise; bel ağrısı görülme oranı %12-35 civarındadır (Maniadakis ve Gray 2000) ve bunların % 10'u kronik hale gelerek lomber disk hastalığını oluşturmaktadır.

Disk hernisine en sık orta yaşlarda rastlanır. Olguların % 70'i 30-50 yaş arasında iken, % 10'u 60 yaşından sonra görülür. Çocukluk yaşlarında çok nadirdir. Erkeklerde kadınlardan daha sık görülür (Heliövaara ve ark 1987, Frymoyer 1992).

Vücut ağırlığının büyük kısmını lomber vertebralar taşır. Bu nedenle disk hernisi lomber bölgede daha sık görülür. Lomber disk hernilerinin % 95'i L4-5 ve L5-S1 seviyelerinde, % 4'ü L3-4 ve geri kalan %1'i ise daha üst seviyelerde görülür (Armstrong 1967 ).

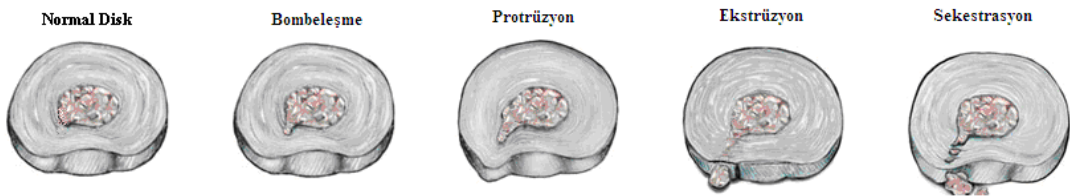
İntervertebral disk hernisi oluş şekline göre sınıflandırılabilir (Şekil 1.2):

**1. Bombeleşme (Bulging):** Anulusun uç tablanın gerisine bir miktar taşıdığı evredir.

**2. Protrüzyon:** Anatomik olarak bütünlüğü bozulmamış nukleus pulpozusun anulus fibrozusu iterek bombeleşmesine neden olmasıdır.

**3. Ekstrüzyon:** Nukleus pulpozus yırtılmış olan anulus fibrozusu aşarak dorsale doğru yer değiştirmiştir.

**4. Sekestrasyon:** Anulus tamamen yırtılmıştır ve dışarı çıkan anulus fibrozus parçasının içerde kalan parça ile ilişkisi tamamen kesilmiştir.



Şekil 1.2. Disk hernisi sınıflaması ([www.svmh.com/spine/causes\\_mechanical.asp](http://www.svmh.com/spine/causes_mechanical.asp))

### 1.3. Dejeneratif Disk Hastalığı

Hücre dışı matriksin bütünlüğü ve dayanıklılığı; matriks komponentlerinin sentezi, gerektiğinde proteinazlar tarafından parçalanarak ortadan kaldırılmaları ve

dokudan uzaklaştırılmaları arasındaki dengeye bağlıdır (Urban ve Roberts 2003). Yapım ve yıkım aktiviteleri arasındaki denge bozulduğunda matriksin biyomekanik özellikleri değişir ve diskin yüklere karşı direnci bozularak disk dejenerasyonu ortaya çıkar.

### 1.3.1. Etiyolojisi ve Patogenezi

DDH etyolojisinde yaş başta olmak üzere sigara, mesleki etmenler, vibrasyon travması, obezite, lomber spinal morfoloji ve genetik yapıdaki değişiklikler gibi pek çok çevresel ve genetik faktörler üzerinde durulmuştur (Ala-Kokko 2002, Pope ve ark 2002, Solovieva ve ark 2002). Bu faktörlerin etkisi ile başlayan dejenerasyon ve erken yaşlanma süreci, mekanik yetersizliğe yol açarak DDH'ya neden olmaktadır (Şekil 1.3).



**Şekil 1.3.** Normal ve dejenere disklere ait Magnetik Rezonans (MR) görüntüleri (Dr. O. Eser arşivinden)

Disk dokusunu oluşturan matriks elemanlarının ve suyun oranlarındaki değişiklik, diskin mikrosirkülasyonunun bozulması ve tekrarlayıcı mikrotravmalar dejenerasyondan sorumludur. Dejenerasyona bağlı ilk morfolojik değişiklikler diskin merkezindeki yarıklar ile başlar. Bu arada biyokimyasal olarak da proteoglikan miktarı (özellikle aggrecan) azalmakta, KS/CS oranı artmaktadır. Tip II kollajen denatüre olurken özellikle Tip I kollajen miktarında artma olmaktadır. Ancak yeni oluşan kollajen fibrilleri arasındaki bağlantılar eskisi gibi sağlam olmamaktadır (Antoniou ve ark 1996).

DDH'nın patogenezi sürecinde etkili olan faktörler şunlardır:

**1. Biyomekanik Etkenler:** Diskin proteoglikan, kollajen ve su içeriği arasındaki denge, yük taşıma için gerekli olan matriks yoğunluğunu ve omurga fleksibilitesini sağlar. Dejenerasyon sürecinde disk in kollajen içeriğinde artma, proteoglikan, su ve kollajen dışı protein içeriğindeki azalma, günlük yaşamda karşılaşılan kompresif yüklerin taşınmasını zorlaştırır ve disk içi basınç artarak nukleus pulpozus herniye olur.

**2. Biyokimyasal Etkenler:** Disk hücreleri matriks makromoleküllerinin ve matriks metalloproteinazlarının (MMP) sentezini yaparak ekstraselüler matriks in yapım ve yıkımını dengede tutar. Matriks turnover nin bozulması matrikste yoğunluk kaybına neden olur ve mekanik streslerin etkisiyle disk dejenerasyonu gelişir (Sztrolovics ve ark 1997, Roberts ve ark 2000, Weiler ve ark 2002).

**3. Disk Dokusunun Beslenmesi İle İlgili Etkenler:** Glukoz ve oksijen molekülleri difüzyon yoluyla diske ulaşır. Asidik pH ve düşük oksijen-glukoz konsantrasyonu, disk hücrelerinin matriks moleküllerini sentezleme yeteneğini azaltır ve disk dejenerasyonuna neden olur (Ishihara ve Urban 1999, Horner ve Urban 2001, Aydın er ve Sivrioğlu 2003).

**4. Genetik Etkenler:** DDH, en sık rastlanan omurga hastalıklarından biri olup genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle oluşan kompleks ve multifaktöriyel bir hastalıktır (Solovieva ve ark 2002, Chan ve ark 2006). Pek çok çalışmada DDH ile ilişkili gen yapı değişiklikleri saptanmıştır (Ala-Kokko 2002) ve bu değişikliklerin DDH gelişimini 6 kez arttırdığı belirtilmektedir (Cheung ve ark 2006).

Disk dejenerasyonu ve herniasyonu açısından ailesel yatkınlığı gösteren pek çok çalışma yapılmıştır (Heikkila ve ark 1989, Varlotta ve ark 1991, Matsui ve ark 1998). Özellikle monozigotik ikizlerde yapılan çalışmalarda genetik yatkınlık açısından benzer sonuçlara ulaşılmıştır (Battie ve ark 1995, Sambrook ve ark 1999, Videman ve ark 2001). Transgenik fareler üzerinde yapılan çalışmalarda yapısal matriks molekülleri (aggrecan, kollajen) ile ilgili genetik değişikliklerin disk herniasyonu ve disk dejenerasyonuna neden olabileceği bildirilmiştir (Kimura ve ark 1996, Watanabe ve ark 1997). Dejeneratif disk herniasyonlu bireyler üzerinde yapılan yapısal matriks molekülleri dışında kalan diğer gen (*VDR* gen vb) polimorfizmi çalışmaları da DDH etyolojisinde bu gen polimorfizmlerinin etkisi

olduğunu ortaya koymuştur (Jones ve ark 1998, Videman ve ark 2001, Kawaguchi ve ark 2002).

#### **1.4. DNA Molekülünün Yapısal Değişiklikleri**

Toplumdaki herhangi iki bireyin genom yapıları yaklaşık %99,9 özdeştir. Buna rağmen kişiler arasında çevresel faktörlerin ve DNA yapısındaki değişikliklerin etkisi fenotipik farklılıkları ortaya koyar. DNA'nın ekzon veya intron bölgelerindeki nükleotid değişimlerinin bir kısmı fenotipi etkilemezken bir kısmı da bireyler arası fenotip farklılıklarına, enfeksiyona ve kansere yatkınlık gibi hastalıklara neden olabilmektedir.

Bir popülasyonda, yaklaşık her 1000 baz çiftinde bir görülen ve %1'den daha sık gözlenen alel değişikliğine polimorfizm denir (Sherry ve ark 1999). Polimorfizm örnekleri çoğu kez DNA'nın kodlanmayan bölgelerinde yer aldığı gibi kimi zaman da hastalıktan sorumlu olan bir genin içinde veya çok yakınında yer alabilir. Bu durumda polimorfizmin kalıtılması bize hastalığın tanısında yardımcı olur. Polimorfik yapılar Mendeliyen kurallara göre kalıtılır. İnsan genomunda yer alan polimorfizmlerin %90'dan fazlası tek nükleotid polimorfizmleri (TNP) geri kalanı ise delesyon ve insersiyonlardır (Collins 1998). Bu polimorfizmler genetik hastalıkların, farmakogenetik analizlerin, popülasyon genetiği ve adli tıp uygulamalarının temelini oluşturmaktadır. TNP'lerin tesbitinde, PZR-RFLP metodu en fazla tercih edilen moleküler analiz yöntemi olmuştur.

##### **1.4.1. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP)**

Restriksiyon enzimleri (RE) özgül olarak DNA'yı belirli bölgelerden kesen enzimlerdir. PZR ile çoğaltılan DNA bölgelerinde yer alan mutasyon ve polimorfizmlerin belirlenmesinde restriksiyon enzimlerinden faydalanılır. PZR ile çoğaltılan DNA bölgelerinin RE ile kesimi işlemine PZR-RFLP denir. PZR-RFLP analizi, DNA'nın izolasyonu, DNA'nın RE ile kesimi, kesilen farklı uzunluklardaki DNA fragmentlerinin (RFLP) jel elektroforezi ve son aşamada da jeldeki DNA parçalarının görüntülenmesi şeklinde gerçekleştirilir. Bu moleküler analiz yöntemi, kolay, hassas ve güvenilir bir yöntemdir.

RFLP'ler; tek nükleotid değişimleri, delesyon veya insersiyon sonucunda meydana gelmektedir. RE tanıma bölgesinin değişmesi, kaybolması veya başka bir

RE enzimine ait tanıma bölgesinin ortaya çıkması sonucu oluşan RFLP fragmentleri tanıya yönelik olarak kullanılabilir.

#### **1.4.2. Değişken Sayıda Ardışık Dizi Polimorfizmleri (VNTR)**

İnsanda genomik DNA'nın yaklaşık % 50'sini tekrarlayan DNA dizileri oluşturur (Lander ve ark 2001). Genom içinde farklı şekillerde tekrar eden bölgeler yer almaktadır. Mikrosatellit ya da STR (Kısa tekrar dizileri), 2- 6 bç'lik dizilerden oluşur. Minisatellit (VNTR) dizileri ise DNA üzerinde ardışık (tandem) tekrarlayan diziler içinde yer alan 10–100 bç'lik dizilerdir. Tekrarlayan DNA dizileri tüm insanlarda aynıdır. Ancak tekrar sayıları kişiden kişiye farklılık gösterdiğinden polimorfik özellik taşır. Tekrar sayılarındaki artma ya da azalmanın nedeni, mayoz bölünme sırasında homolog kromozomlar arasındaki eşit olmayan rekombinasyondur. Ardışık dizi polimorfizmleri tekrar dizilerinin çoklu kopyalarının ard arda iki restriksiyon bölgesi arasındaki DNA'ya insersiyonu ile oluşur. Tekrarlayan dizide oluşan varyasyonlar sonucu ortaya çıkan bu polimorfizmler özellikle adli tıpta ve babalık tayininde kullanılır.

#### **1.4.3. Mutasyonların ve Polimorfizmlerin Belirlenmesinde PZR'nin Rolü**

1985'te Kary Mullis ve ark tarafından bulunan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tekniği, bilim dünyasına sunulduğundan itibaren moleküler genetik çalışmaların temelini oluşturmuştur (Mullis ve ark 1986). Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerini tamamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer (18–20 baz uzunluğunda) kullanılarak; istenen gen bölgesinin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır (Bell 1989).

#### **1.5. İntervertebral Disk Dejenerasyonu İle İlişkili Aday Genler**

Genetik faktörleri oluşturan genlerde çeşitli polimorfik yapılar tespit edilmiştir. Bu genler şunlardır: (Kawaguchi ve ark 2002) (Çizelge 1.1).

1. İntervertebral diskin yapısal komponentlerini oluşturan *Aggrecan* ve *Kollajen* genler.
2. Disk matriksinin yıkımını sağlayan enzimi kodlayan *Matriks Metalloproteinaz-3* geni.
3. Kemik ve kırık yapı ve osteoporozla ilişkili *VDR* ve *Östrojen* genleri.

**Çizelge 1.1.** Disk dejenerasyonu ile ilişkili olabilecek aday genler

<b>Protein</b>	<b>Gen</b>	<b>Lokalizasyon</b>	<b>Mutasyon</b>
Aggrecan	<i>AGC</i>	15q26	VNTR
Vitamin D Reseptör	<i>VDR</i>	12q12-q14	T-C değişimi
Kollajen	<i>COL1A1</i>	17q21.31-q22	G-T değişimi
	<i>COL9A1</i>	6q13	Dur kodonu oluşumu
	<i>COL9A2</i>	1p33-p32.2	G-A değişimi
	<i>COL9A3</i>	20q13.3	A-T değişimi
	<i>COL11A1</i>	1p21	C-T değişimi
Matriks			
Metalloproteinaz-3	<i>MMP-3</i>	11q23	5A/6A polimorfizmi
Östrojen Reseptör Alfa	<i>ER-α</i>	6q25.1	T-C ve G-A değişimi

### 1.5.1. Kollajen Gen Polimorfizmleri

#### ***COL1A1* gen polimorfizmi**

Tip I kollajen, heterotrimer yapıda olup, farklı genler tarafından kodlanan  $\alpha 1$  ve  $\alpha 2$  zincirlerinden oluşmaktadır. *COL1A1* geni tip I kollajenin  $\alpha 1$  zincirini kodlar. Tip I kollajenin  $\alpha 1$  ve  $\alpha 2$  zincirlerini kodlayan genlerle ilgili farklı polimorfizmler tanımlanmıştır (Bodian ve ark 2009). Bu polimorfizmler içinde üzerinde en çok çalışma yapılanı, Grant ve ark (1996) tarafından tanımlanan, *COL1A1* geninin Sp1 transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesini etkileyen Sp1 polimorfizmidir. Bu polimorfizm sonucunda kollajen  $\alpha 1$  zincirinin  $\alpha 2$  zincirine göre daha fazla üretilmesi sonucunda kollajenin yapısındaki  $\alpha 1/\alpha 2$  zincir oranı değişmekte ve kollajenin dayanıklılığı bozulmaktadır (Mann ve ark 2001). Bu polimorfizm pek çok araştırmacı tarafından osteoporoz, düşük kemik yoğunluğu ve artmış kırık riski ile ilişkili bulunmuştur (Grant ve ark 1996, Langdahl ve ark 1998, Uitterlinden ve ark 1998, Keen ve ark 1999, Weichetova ve ark 2000, Mann ve Ralston 2003, Pluijm ve ark 2004). *COL1A1* geni ve disk dejenerasyonu ile ilgili bugüne kadar yapılan tek çalışmada, lomber disk hastalığı tanısı almış genç askerler ile *COL1A1* geni Sp1 polimorfizmi arasında güçlü ilişki tesbit edilmiştir (Tilkeridis ve ark 2005).

#### ***COL9A1*, *COL9A2* ve *COL9A3* gen polimorfizmleri**

Kollajen 9, *COL9A1*, *COL9A2* ve *COL9A3* genleri tarafından kodlanan  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ve  $\alpha 3$  zincirlerinden oluşan heterodimer bir yapıya sahiptir (Pihlajamaa ve ark

1998, Paassilta ve ark 1999). Kollajen 9, tip 2 kollajen ile ilişkili olup dokulardaki kollajen ve nonkollajen proteinler arasında bir köprü görevi görür. Bu kollajen tipinin kıkırdak hastalıklarında rolü olduğu gösterilmiştir (Nakata ve ark 1993, Fassler ve ark 1994, Muragaki ve ark 1996, Paassilta ve ark 1999). Kollajen 9'un yapı ve fonksiyonundaki değişiklikler diskin her üç komponentini de etkileyerek disk dejenerasyonunun gelişimine katkıda bulunmaktadır (Jim ve ark 2005).

### ***COL11A1* gen polimorfizmi**

Tip XI kollajeni proteoglikan moleküller ile diğer kollajenler arasında ilişki kurarak diskin yapısal bütünlüğünü sağlar. Tip XI kollajeni  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ve  $\alpha 3$  zincirlerinden oluşur. Tip XI kollajenini oluşturan  $\alpha 1$  zinciri *COL11A1* geni tarafından kodlanır. Mio ve ark (2007)'nin lomber disk hernili Japonlarda yaptıkları çalışmada Tip XI kollajene ait  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ve  $\alpha 3$  zincirlerini kodlayan genlerin analizi yapılmış olup sadece  $\alpha 1$  zincirini kodlayan *COL11A1* gen polimorfizmi ile disk dejenerasyonu arasında anlamlı ilişki bulunmuştur.

### **1.5.2. Matris Metalloproteinaz-3 (*MMP-3*) Gen Polimorfizmi**

MMP-3 (Stromelysin 1) enzimi, ekstraselüler matrikste yer alan proteoglikan ve kollajen içeriklerinin yıkımını sağlayan ana enzimdir (Haro ve ark 2000). İmmünohistokimyasal çalışmalar dejenere disk dokusunda MMP-3 enziminin ekspresyonunun arttığını göstermiştir (Kanemoto ve ark 1996). Çeşitli hastalıklarla MMP-3 enzimini kodlayan *MMP-3* genine ait tek nükleotid polimorfizmleri ve 5A/6A polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar bildirilmiştir (Ye ve ark 1995, Ye 2000, Reitz ve ark 2008). Bu çalışmalar içinde özellikle genin promoter bölgesinde yer alan 5A/6A polimorfizmi, en çok çalışılan polimorfizm olmuştur. Çünkü bu polimorfik değişikliğin, MMP-3 ekspresyonunu değiştirerek matris remodeling dengesini bozabileceği ve hastalığın hızla ilerlemesine neden olabileceği bildirilmiştir (Ye ve ark 1995). İntervertebral disk dejenerasyonu ile *MMP-3* geninin ilişkisini araştıran tek çalışmada, 5A/6A polimorfizmi incelenmiş olup yaşlı hastalarda 5A aleli ile disk dejenerasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Takahashi ve ark 2001).

### **1.5.3. Östrojen Reseptör Alfa (*ER- $\alpha$* ) Gen Polimorfizmi**

*ER- $\alpha$* , östrojenle ilişkili kemik ve kıkırdak yapıyı ilgilendiren hastalıklarda önemli rol oynar. *ER- $\alpha$*  geninin *VDR* geni ile birlikte düşük kemik yoğunluğu ile

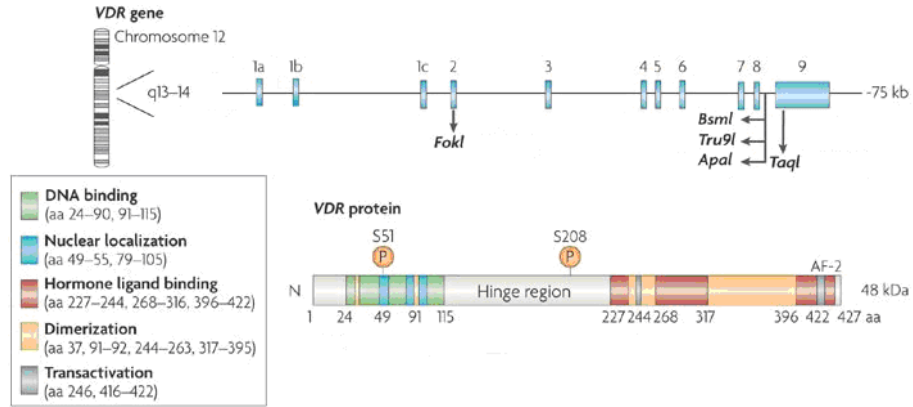
ilişkili olduğu bildirilmiştir (Morrison ve ark 1994, Kobayashi ve ark 1996). ER proteini, ER- $\alpha$  ve ER- $\beta$  izoformlarından oluşur. ER- $\alpha$  sinyal iletiminde önemli bir mediyatördür. DNA ve ligand bağlanması ve transkripsiyonun aktivasyonunda rol oynar (Shupnik ve ark 1998). ER- $\alpha$  geninde birçok polimorfizm tanımlanmıştır (Schubert ve ark 1999, Sasaki ve ark 2003). Disk dejenerasyonu ile ER- $\alpha$  geni arasındaki ilişkiyi araştıran tek çalışmada, PvuII (T397C) ve XbaI (G351A) polimorfizmlerinin lomber disk dejenerasyonu etyolojisinde aday gen olabileceği öne sürülmüştür (Kawaguchi ve ark 2002).

#### 1.5.4. VDR Gen Polimorfizmi

##### VDR geni ve proteini

VDR geni kromozom 12q12-q14'te lokalize, 75 kb uzunluğunda olup 11 ekson ve 10 intron içerir. 48 289 Da kitlesindeki VDR proteinini kodlar (Şekil 1.4).

VDR geninin 2. ve 3. eksonları VDR proteininin DNA bağlayıcı bölgesini, 7.-9. eksonları ise ligand bağlayıcı bölgeyi kodlar (Hughes ve ark 1988). Ekson 4 ve 5, DNA ve ligand bağlayıcı bölgeleri birleştiren hinge bölgesini, ekson 6 hinge bölgesinin kalan kısmı ile hormon bağlayıcı bölgenin ilk bölümünü kodlar (Miyamoto ve ark 1997).



Şekil 1.4. VDR geni ve proteini (Deeb ve ark 2007).

##### VDR proteininin kalsiyum metabolizmasına etkisi

VDR proteini vitamin D hormonunun (1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>) etkisini düzenlemektedir. Bir steroid olan 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> nükleer reseptör aracılığıyla etkisini gösterir. VDR, hormon bağlayıcı bölgesi ile vitamin D'ye bağlanırken DNA bağlayıcı bölgesi ile hedef gende bulunan ve vitamin D cevap elemanı denilen farklı nükleotid sekanslarına bağlanır ve fonksiyonel hale gelir.

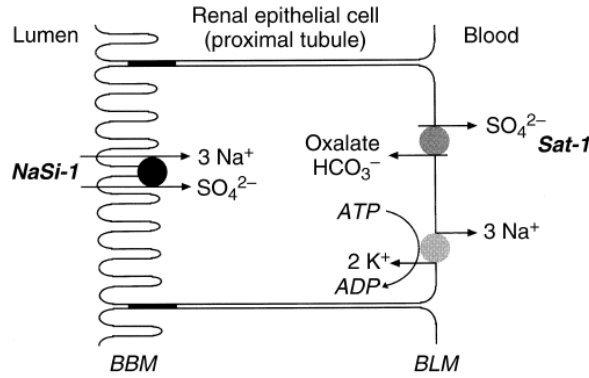
Vitamin D, kalsiyum-fosfor metabolizması ve kemik mineralizasyonunda önemli rol oynar. Vitamin D eksikliği sonucu kemikten kana  $Ca^{+2}$  mobilizasyonu artmakta ve kemik mineralizasyonu bozularak osteoporoz gelişmektedir. Osteoporotik vertebralar kompresif yükleri taşıyamaz ve tüm basınç intervertebral disklere aktarılmış olur. Taşıma kapasitesinin çok üstünde basınca maruz kalan disklerde ise dejenerasyon gelişir.

### **VDR proteininin Na-SO<sub>4</sub> kotransportuna etkisi**

VDR'nin  $Ca^{+2}$  ve 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> metabolizmasında görev yaparak normal kemik mineralizasyonu ve remodelingde rol oynadığı bilinmektedir (Haussler ve ark 1998). Ancak Videman ve ark (2001)'nin ve Uitterlinden ve ark (2002)'nin yaptıkları çalışmalarda VDR'nin sadece kemik yapısıyla değil aynı zamanda nonmineralize konnektif dokunun dejenerasyonu ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (Keen ve ark 1997, Riggs 1997, Videman ve ark 1998). Ayrıca Vitamin D, kemik ve  $Ca^{+2}$  metabolizmasının yanısıra proteoglikan sentezinde glikozaminoglikanların sülfatasyonu için de önemlidir (Fernandes ve ark 1997, Bolt ve ark 2004).

Sülfat, insan plazmasında bulunan önemli anyonlardandır. Sülfat homeostazisi böbrek tarafından düzenlenir. Böbrek glomerulusundan filtre edilen sülfatın büyük kısmı proksimal tübüllerden reabsorbe edilir ve sadece % 5-10'luk kısmı idrarla atılır. Sülfatın tubuler lümeninden kana transselüler transportu sodyum-sülfat kotransporter (NaSi-1) proteinine bağlıdır. (Beck ve Silve 2001, Markovich 2001) (Şekil 1.5). Serum sülfat düzeyleri, renal sülfat mekanizması ve NaSi-1 ekspresyonu üzerinde vitamin D'nin etkili olduğunu destekleyen çalışmalar vardır (Fernandes ve ark 1997, Bolt ve ark 2004). Bu çalışmaların birinde vitamin D eksikliği olan farelerde düşük serum sülfat düzeyleri ve azalmış NaSi-1 ekspresyonu belirlenmiştir (Fernandes ve ark 1997). Vücuttaki vitamin D miktarının sülfat metabolizması üzerindeki etkisini göstermek için VDR knockout farelerde yapılan çalışmada, VDR yokluğunda böbrekteki NaSi-1 ekspresyonunda %72 azalma, idrar sülfat ekskresyonunda %42 artma, serum sülfat konsantrasyonunda %50 azalma ve iskeletteki sülfatlanmış proteoglikan düzeylerinde %45 azalma belirlenmiştir. Bu bulgular vitamin D'nin sülfat homeostazisinde kritik rol oynadığını güçlü şekilde desteklemektedir (Bolt ve ark 2004).

Van der Kraan ve ark (1990), inorganik sülfat değişikliklerinin kıkırdak glikozaminoglikan sentezine olan etkisini araştırdıkları çalışmalarında, kıkırdak proteoglikanlarının sülfatasyonunun inorganik sülfat konsantrasyonuna bağlı olduğunu bildirmişlerdir.



**Şekil 1.5.** Böbrek epitelyum hücresindeki Na-SO<sub>4</sub> kotransportu (Beck ve Silve 2001).

Kemik ve kartilajın en önemli ekstraselüler matriks komponenti olan proteoglikanların normal fonksiyon görebilmesi için sülfatasyon mekanizmasının ve VDR'nin sağlam olması gerekmektedir. Bu yüzden VDR genine ait polimorfizmler sonucu oluşan vitamin D eksikliğinin proteoglikanlarda yapısal defekte neden olarak intervertebral diskin ekstraselüler matriksinin yapısını ve miktarını etkileyeceği ve disk dejenerasyonu oluşumuna katkıda bulunacağı belirtilmiştir (Chan ve ark 2006). Farklı populasyonlarda yapılan çalışmalarda, VDR genine ait ekzon 2'de yer alan FokI ve ekzon 9'da yer alan TaqI polimorfizmlerinin dejeneratif disk hastalığı yatkınlığını arttırdığı öne sürülmüştür (Jones ve ark 1998, Videman ve ark 1998, Videman ve ark 2001, Kawaguchi ve ark 2002, Uitterlinden ve ark 2002, Uitterlinden ve ark 2004, Cheung ve ark 2006).

### **VDR genine ait polimorfizmler**

VDR geninde 25'den fazla farklı polimorfizm bildirilmiştir (Uitterlinden ve ark 2004). DNA ve ligand bağlanma domainlerindeki aminoasit substitüsyonuna yol açan tek nükleotid değişimleri en sık görülen değişikliklerdir (Malloy ve ark 1997). Daha az sıklıkla non-sense mutasyonlar ve gen delesyonları tanımlanmıştır (Hawa ve ark 1996, Cockerill ve ark 1997, Malloy ve ark 1997).

VDR genine ait pek çok alelik varyant tespit edilmiştir. BsmI ve ApaI restriksiyon bölge polimorfizmleri ekzon 8 ve 9'un arasındaki intronda yer alır (Faraco ve ark 1989, Morrison ve ark 1992, Zmuda ve ark 2000).

Ekson 2'deki translasyon başlama bölgesinde yer alan T/C (ATG>ACG) transisyon tipi polimorfizmi FokI restriksiyon enzimi kullanılarak gösterilmiştir (Gross ve ark 1996). Bu polimorfizmi taşıyan C aleline sahip kişilerde oluşan VDR proteininde NH<sub>2</sub> ucundaki 3 aminoasit eksiktir (424 aa). T aleline sahip kişilerde ise 427 aa uzunluğunda normal VDR proteini sentezlenir (Arai ve ark 1997).

Ekson 2'de yer alan T/C değişimi FokI (ATG>ACG) polimorfizmini, ekson 9'da yer alan T/C değişimi TaqI (ATT>ATC) polimorfizmini oluşturur (Zmuda ve ark 2000, Park ve ark 2006). FokI polimorfizmi DNA bağlayıcı bölgenin, TaqI polimorfizmi ise ligand bağlayıcı bölgenin yapısını değiştirerek Vitamin D reseptörünün DNA'ya ve Vitamin D<sub>3</sub> hormonuna bağlanma fonksiyonunu etkilemektedir.

Sonuçta, VDR defekti Na-SO<sub>4</sub> kotransportunu ve Ca<sup>+2</sup> metabolizmasını olumsuz etkileyerek gerek proteoglikan yapıyı gerekse kemik ve kıkırdak yapıyı bozarak disk dejenerasyonuna neden olmaktadır.

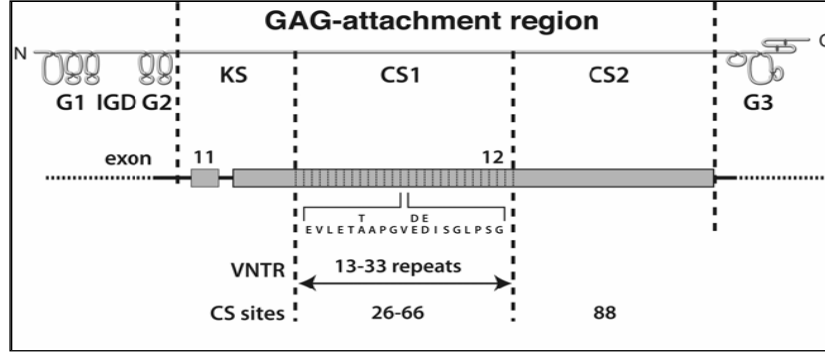
### **1.5.5. Aggrecan Gen Polimorfizmi**

#### ***Aggrecan* geni ve proteini**

İnsan *Aggrecan* geni kromozom 15q26'da lokalizedir (Korenberg ve ark 1993). 71 126 bç uzunluğunda olup 19 ekson ve 18 intron içerir. *Aggrecan* geni yaklaşık 254 379 Da kitesindeki aggrecan proteinini kodlar. Kodlanan bölgeler genin yaklaşık 39,4 kb'lik bölümünü kapsar (Valhmu ve ark 1995).

Aggrecan proteini, kor protein ve üç globuler domain olmak üzere iki tip yapısal element içerir (Doege ve ark 1997). Aggrecan molekülünün farklı yapısal ve fonksiyonel bölgeleri bulunan 220–250 kDa boyutunda geniş bir kor proteini vardır (Baldwin ve ark 1989, Fülöp ve ark 1993). Kor proteininin N terminal bölgesinde iki globuler bölge (G1 ve G2) yer alır.

G1, G2'den lineer interglobular domain (IGD) ile ayrılır (Paulsson ve ark 1987, Fosang ve Hardingham 1989). Burayı uzunca bir GAG bağlanma bölgesi izler. Kor proteinine bağlanan GAG'ler kondroidin sülfat (CS) ve keratan sülfat (KS)'tir. Kor proteininin C terminal bölgesinde ise 3. globüler bölge (G3) vardır (Şekil 1.6).



**Şekil 1.6** Aggrecan geni ve VNTR bölgesi (Roughley ve ark 2006).

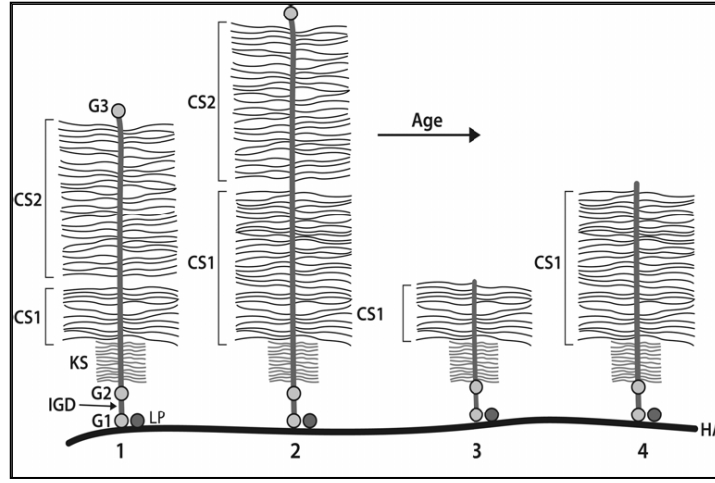
CS domaini CS1 ve CS2 olmak üzere iki kondroidin sülfat bağlanma bölgesi içerir. Bu bağlanma bölgesinin çoğu 4224 bp uzunluğundaki ekson 12 tarafından kodlanır (Doege ve ark 1991). CS1, VNTR dizileri içermektedir.

Eksonların düzeni protein çekirdeğinin spesifik domainleri ile ilişkilidir. İlk iki globular domaini 2–10. eksonlar kodlar (Valhmu ve ark 1995). G1 ve interglobular domain ekson 3–7 tarafından, G2 ise ekson 8–10 tarafından kodlanır. Ekson 11, keratan sülfattan zengin bölgenin 5' ucunu, ekson 12 ise kondroidin sülfattan zengin bölgenin tamamını kodlar. Kalan eksonlar (13–19. eksonlar) ise G3 domainini ve translate edilmeyen bölgenin 3' ucunu kodlamaktadır (Doege ve ark 1991).

CS1'i kodlayan ekson 12'deki VNTR'ların tamamı tanımlanmıştır. Tekrar sayıları 13–33 arasında değişmekte olup her bir alel 57 nükleotidin tekrarlayan sekanslarından oluşur. VNTR'lar iki bitişik kodondan oluşan dört farklı tekrar dizisi göstermektedir: ACC ACT (Tip I), ACC GCT (Tip II), ACT GCT (Tip III) ve ACT ACT (Tip IV) (Doege ve ark 1997).

En kısa aggrecan alellerinin ürünü olan aggrecan proteinlerinde en az CS zinciri vardır. Bu kısa aleller kompresyona direncin azalmasına ve artmış doku dejenerasyonuna neden olur. Her proteolitik dejenerasyon sürecinin metalloproteinazların (özellikle aggrecanazlar) etkisine bağlı olarak oluştuğu ve CS bölgesinin büyük bir parçasının çıkarılmasına neden olduğu düşünülmektedir (Tortorella ve ark 2001). Aggrecan fonksiyonu için CS1 domaininin bu durumu yaşla beraber artmış doku dejenerasyonuna katkıda bulunur. Çünkü yaşla birlikte CS zincirlerinin uzunluğu azalırken KS zincirlerinin ki artar. Bu durumda erken yaşta

oluşan intervertebral disk ve artiküler kıkırdak dejenerasyonu için en kısa alelli kişiler en büyük risk altındadır (Şekil 1.7).



**Şekil 1.7.** Aggrecan proteininin yapısında yaşa bağlı oluşan dejeneratif değişiklikler (Roughley ve ark 2006).

*VDR* ve *Aggrecan* genlerinin disk dejenerasyonu ile ilişkisini araştırmak için farklı populasyonlarda çalışmalar yapılmıştır (Jones ve ark 1998, Videman ve ark 1998, Kawaguchi ve ark 1999, Videman ve ark 2001, Kawaguchi ve ark 2002, Cheung ve ark 2006, Solovieva ve ark 2007). Mevcut çalışmada, Türk toplumunda, DDH tanısı konan genç hastalarda multifaktöriyel ve kompleks bir hastalık olan DDH ile *VDR* ve *Aggrecan* genlerindeki polimorfik yapının ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## **2.GEREÇ VE YÖNTEM**

### **2.1 Hasta ve Kontrol Grubunun Oluşturulması**

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalının ortak çalışması ile gerçekleştirildi. Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji kliniğine bel ağrısı şikayetiyle başvuran 20–30 yaş arası genç hastalardan çevresel faktörler (meslek, ağır fiziksel çalışma, motorlu araç kullanımı, vibrasyonlu araç kullanımı ve sigara) ekarte edilerek lomber Magnetik Rezonans Görüntüleme (MRG)'de lomber DDH tespit edilen 150 dejeneratif disk hernili birey (çalışma grubu) ve lomber MRG'de lomber dejenerasyon tespit edilmeyen ve herhangi bir kalıtsal hastalığı olmayan 150 sağlıklı birey (kontrol grup) alındı. Nöroşirürji kliniğine başvuran hastaların nörolojik muayeneleri yapıldı ve radyolojik tetkikleri tamamlandı. Disk dejenerasyonu ve herniasyonunun analizi için lomber sagittal MRG (Magnetom 1.5 T, Siemens AG, Germany) kullanıldı ve 5 mm kalınlığında kesitler alındı.

Disk dejenerasyon gradelemesi Schneiderman's klasifikasyonuna göre yapıldı (Schneiderman ve ark 1987). Buna göre; Grade 1 normal sinyal yoğunluğu, Grade 2 heterojen azalmış sinyal yoğunluğu, Grade 3 diffüz sinyal kaybı, Grade 4 sinyal yokluğu olarak değerlendirildi. Disk herniasyonu ise MacNab's klasifikasyonuna göre normal disk, protrüzyon tipi disk, ekstrüzyon tipi disk ve sekestrasyon tipi disk olarak sınıflandırıldı (Wiesel ve ark 1996).

### **2.2. DNA İzolasyonu**

Çalışmaya dahil edilen olgulara ait örnekler Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu kararlarına uygun olarak, gönüllü olur formlarının imzalanmasını takiben toplandı. Her olgudan etilendiamintetraasetik asit (EDTA)'li tüplere 2 ml periferik kan alındı. Kan örnekleri DNA izolasyonu yapılmaya kadar +4 °C'de saklandı. E.Z.N.A Blood DNA İzolasyon Kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı.

1. Çalışmaya başlamadan önce su banyosu 45°C'ye ayarlandı. Örnekten 250 µl alınıp 1.5 ml'lik tüplere konuldu. Üzerine 250 µl Buffer BL, 5 µl RNase A ve 20 µl Protease Enzimi eklendi. 10–15 saniye iyice vortekslendi.

2. Tüpler su banyosuna yerleştirildi ve oluşan lizat solüsyonu 45°C'de 20 dakika inkübe edildi (Bu aşamada tüpler 1–2 kez vortekslendi).
3. Su banyosundan alınan tüplerin üzerine 260 µl etanol (%100) ilave edildi ve vortekslendi. Tüp içeriği 2 ml'lik santrifüj tüpüne yerleştirilmiş Hibind DNA spin kolona aktarıldı.
4. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Alttaki tüpler atıldı ve spin kolon yeni bir santrifüj tüpüne yerleştirildi. Üzerine 500 µl HB Buffer ilave edildi.
6. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Alttaki tüp içindeki sıvı döküldü, aynı tüp içine yerleştirilen spin üzerine 650 µl Wash Buffer ilave edildi ve 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Alttaki tüpler atıldı ve spin yeni bir santrifüj tüpüne yerleştirildi. Tekrar 650 µl Wash Buffer ilave edildi.
9. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Tüpler değiştirilmeden bir kere daha 10.000 rpm'de, 1 dakika santrifüj edilerek artıkların tamamen spin kolondan ayrılması sağlandı.
11. Spin kolonlar 1.5 ml'lik tüplere yerleştirildi ve üzerine önceden 70 °C'de ısıtılmış 100 µl Elution Buffer eklendi. 70 °C'de 5 dakika inkübe edildi.
12. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
13. Tüpler değiştirilmeden tekrar 100 µl Elution Buffer eklendi ve 70 °C'de 5 dakika inkübe edildi.
14. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
15. Spin kolonlar atıldı.
16. 1.5 ml'lik tüpler içindeki DNA solüsyonu kullanıma hazır halde etiketlendi.
17. Elde edilen DNA'nın miktar ve saflık tayini için NanoDrop (ND-1000) cihazı ve software'inden yararlanıldı. Hidrasyon solüsyonu içinde çözünmüş olan DNA örneğinin 1,5 µl'si kullanılarak ölçüm yapıldı.
18. İzole edilen DNA'lar aynı gün içinde kullanılacaksa +4 °C'de, daha sonra kullanılacaksa -20 °C'de saklandı.

## 2.3. VDR Gen Polimorfizm Analizi

### 2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

VDR geninin 2. ekzonundaki T>C ve 9. ekzonundaki T>C değişim bölgelerinin analizi için PZR- restriksiyon enzim kesim yöntemi kullanıldı.

FokI enzim kesim bölgesi, 5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT-3' ve 5'-ATGGAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3' primerleri, TaqI enzim kesim bölgesi ise 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG-3' ve 5'-CGGCAGCGGATGTACGTCTGCAG-3' primerleri kullanılarak çoğaltıldı (Hutchinson ve ark 2000).

#### FokI enzim kesim bölgesinin analizi

FokI enzim kesim bölgesi için PZR reaksiyonlarının koşulları son hacim 50 µl olacak şekilde aşağıda belirtildiği gibidir:

- 5 µl 10X Tamponu
- 3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 0,2 µl dNTP (25 mM) (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
- 2 µl Primer (10 pmol)
- 0.5 µl Taq Polimeraz Enzimi
- 34.3 µl Steril dH<sub>2</sub>O
- 5 µl DNA

PZR işlemini gerçekleştirmek için, otomatik ısı döngü cihazı (Eppendorf Mastercycler personal Thermal Cyler) aşağıda belirtilen sıcaklık ve sürelerle göre ayarlandı:

Başlangıç denatürasyonu ;	94 °C' de 3 dk	1 döngü
Denatürasyon aşaması;	94 °C' de 30 sn	33 döngü
Hibridizasyon aşaması;	60 °C' de 30 sn	
Sentez (Uzama) aşaması;	72 °C' de 30 sn	
Son sentez aşaması;	72 °C' de 3 dk	1 döngü

## **Jel elektroforezi**

PZR reaksiyonları sonucu oluşan ürünleri analiz etmek için % 2'lik agaroz (Amresco, Amerika) jel kullanıldı. % 2'lik agaroz jel, 50 ml 0.5XTBE içinde 1 g agaroz kaynatılarak hazırlandı ve içine 2,5 µl (0,25 M) Ethidium bromide (EtBr) ilave edildi. Jel tanka dökülerek donması beklendi. 10 µl PZR ürünü ve 2 µl bromfenol blue pipetajla karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel 150 voltta 15 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elde edilen bantları değerlendirmek için 50 bp büyüklüğündeki markerdan yararlanıldı. Jel UV transillüminatör altında değerlendirildi. Değerlendirme sonucu 265 bp büyüklüğündeki DNA bandı gözlemlendi.

## **Restriksiyon enzim kesimi**

PZR ürünü olan hedef DNA bölgesinin FokI enzimi ile kesimi yapıldı. Kesim işlemi için;

- 1,5 µl Restriksiyon Enzimi (FokI)
- 2,5 µl Restriksiyon Enzim Tamponu
- 10 µl PZR Ürünü
- 8,5 µl Steril dH<sub>2</sub>O

İçeren karışım hazırlandı ve 37 °C'de 16 saat bekletildi. Enzim kesimi işleminden sonra % 3'lük agaroz jel hazırlandı ve FokI enzim kesim ürünleri jele yüklenerek 120 voltta 40–45 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elde edilen bantları değerlendirmek için 50 bp büyüklüğündeki marker kullanıldı.

Değerlendirme sonucunda 265, 196 ve 69 bp büyüklüğünde bantlar gözlemlendi. Genotipleme yapılırken; sadece 265 bp büyüklüğünde bant görüldüğünde VDR genine ait FokI polimorfizmi için FF homozigot, 265–196 ve 69 bp büyüklüğündeki bantlar birlikte görüldüğünde Ff heterozigot, 196 ve 69 bp büyüklüğündeki bantlar birlikte görüldüğünde ise ff homozigot şeklinde değerlendirildi.

## **TaqI enzim kesim bölgesinin analizi**

TaqI enzim kesim bölgesi için kullanılan PZR reaksiyonlarının koşulları son hacim 50 µl olacak şekilde aşağıda belirtildiği gibidir:

- 5 µl 10X Tamponu
- 3 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM

- 0,2 µl dNTP (25 mM) (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
- 2 µl Primer (10 pmol)
- 0.5 µl Taq DNA Polimeraz
- 34.3 µl Steril dH<sub>2</sub>O
- 5 µl DNA

PZR işlemini gerçekleştirmek için, otomatik ısı döngü cihazı (Eppendorf Mastercycler personal Thermal Cycler) aşağıda belirtilen sıcaklık ve sürelerle göre ayarlandı:

Başlangıç denatürasyonu ;	94 °C' de 3 dk	1 döngü
Denatürasyon aşaması;	94 °C' de 30 sn	33 döngü
Hibridizasyon aşaması;	60 °C' de 30 sn	
Sentez (Uzama) aşaması;	72 °C' de 30 sn	
Son sentez aşaması;	72 °C' de 3 dk	1 döngü

### **Jel elektroforezi**

PZR reaksiyonları sonucu oluşan ürünleri analiz etmek için % 2'lik agaroz (Amresco, Amerika) jel kullanıldı. % 2'lik agaroz jel, 50 ml 0.5XTBE içinde 1g agaroz kaynatılarak hazırlandı ve içine 2,5 µl (0,25 M) EtBr ilave edildi. Jel tanka dökülerek donması beklendi. 10 µl PZR ürünü ve 2 µl bromfenol blue pipetajla karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel 150 voltta 20 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elde edilen bantları değerlendirmek için 100 bp büyüklüğündeki marker kullanıldı. Jel UV transillüminatör altında değerlendirildi ve 347 bp büyüklüğündeki DNA bandı gözlemlendi.

### **Restriksiyon enzim kesimi**

PZR ürünü olan hedef DNA bölgesinin TaqI enzimi ile kesimi yapıldı. Kesim işlemi için;

- 1 µl Restriksiyon Enzimi (TaqI)
- 2,7 µl Restriksiyon Enzim Tamponu
- 10 µl PZR Ürünü

- 7 µl Steril dH<sub>2</sub>O

İçeren karışım hazırlandı ve 65 °C’de 16 saat bekletildi. Enzim kesim işleminden sonra % 3’ lük agaroz jel hazırlandı ve TaqI enzim kesim ürünleri jele yüklenerek 120 voltta 40–45 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elde edilen bantları değerlendirmek için 100 bp büyüklüğündeki marker kullanıldı. Değerlendirme sonucunda 347, 293 ve 54 bp büyüklüğünde bantlar gözlemlendi.

Genotipleme yapılırken; sadece 347 bp büyüklüğünde bant görüldüğünde VDR geni TaqI polimorfizmi için TT homozigot, 347–293–54 bp büyüklüğündeki bantlar birlikte görüldüğünde Tt heterozigot, 293 ve 54 bp büyüklüğündeki bantlar birlikte görüldüğünde ise tt homozigot şeklinde değerlendirildi.

## **2.4. Aggrecan Gen Polimorfizm Analizi**

### **2.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

*Aggrecan* gen polimorfizmini belirlemek için PZR-Agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanıldı. Bunun için *Aggrecan* geninin 12. ekzonunda yer alan hedef VNTR bölgelerini çoğaltmak için: 5’-TAGAGGGCTCTGCCTCTGGAGTTG-3’ ve 5’-AGGTCCCCTACCGCAGAGGTAGAA-3’ primerleri kullanıldı (Kawaguchi ve ark 1999).

PZR reaksiyonlarının koşulları son hacim 50 µl olacak şekilde aşağıda belirtildiği gibidir:

- 5 µl 10X Tamponu
- 3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 1 µl dNTP (25 mM) (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
- 0.5 µl Taq DNA polimeraz
- 2,5 µl Dimetilsülfoksit (DMSO) (% 5)
- 3 µl Primer (10 pmol)
- 5 µl DNA
- 30 µl Steril dH<sub>2</sub>O

PZR işlemini gerçekleştirmek için, otomatik ısı döngü cihazı (Eppendorf Mastercycler Personal Thermal Cyclers) aşağıda belirtilen sıcaklık ve sürelerle göre ayarlandı.

Başlangıç denatürasyonu ;	95 °C' de 5 dk	1 döngü
Denatürasyon aşaması;	95 °C' de 30 sn	32 döngü
Hibridizasyon aşaması;	66 °C' de 90 sn	
Sentez (Uzama) aşaması;	68 °C' de 2 dk	
Son sentez aşaması;	72 °C' de 5 dk	1 döngü

#### 2.4.2. Jel Elektroforezi

PZR reaksiyonları sonucu oluşan DNA'ları yürütmek için % 1,5'lik agaroz (Amresco, Amerika) jel kullanıldı. % 1,5'lik agaroz jel 150 ml 0.5XTBE içinde 2,25 g agaroz kaynatılarak hazırlandı ve içine 10 µl (0,25 M) EtBr ilave edildi. Jel tanka dökülerek donması beklendi. 10 µl PZR ürünü ve 2 µl bromfenol blue pipetajla karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel 220 voltta 35 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Jel UV transillüminatör altında incelendi. Elde edilen bantların büyüklükleri arasında 57 bç kadar bir fark olduğundan bantları değerlendirmek için 1 kb büyüklüğündeki markırla birlikte GeneTools (SYNGENE) software programı da kullanıldı.

#### 2.5. İstatistik Analizler

Hasta ve kontrol grubuna ait özellikler ile *Aggrecan* ve *VDR* genlerine ait polimorfizmlerin analizi sonucu elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi, SPSS 13.0 programı kullanılarak Ki-kare analizi ve Fischer Exact Test ile yapıldı. Anlamlılık seviyesi olarak 0,05 değeri alındı.

### 3. BULGULAR

Bu çalışmada 150 dejeneratif disk hernili ve 150 sağlam bireyden elde edilen genomik DNA'lar kullanıldı. Hasta grubu disk dejenerasyonunun seviyesi ve derecesi ile disk herniasyonunun tipi açısından sınıflandırıldı.

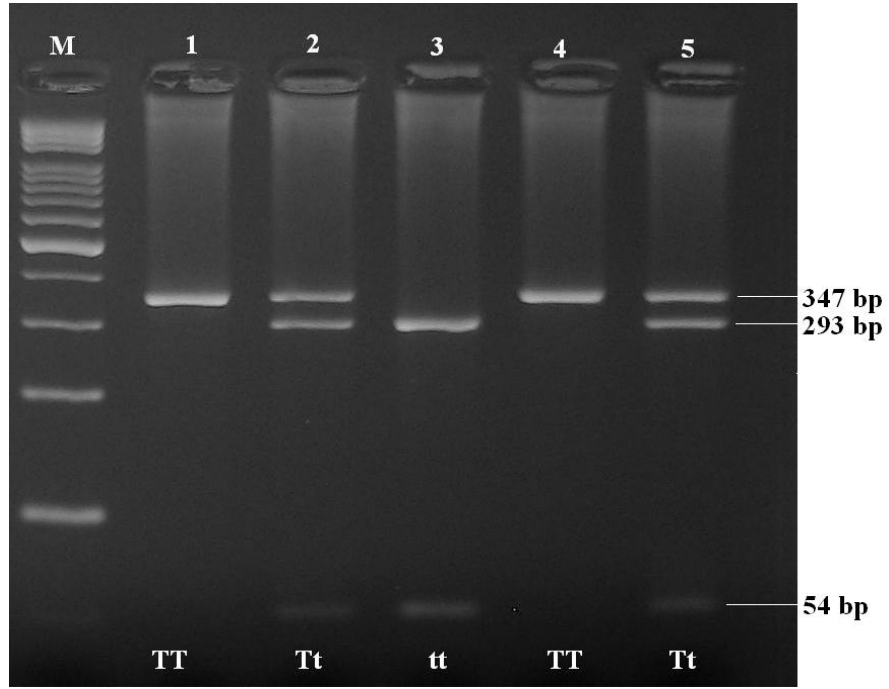
#### 3.1. VDR Gen Polimorfizmi

Çalışmanın bu bölümünde TaqI ve FokI enzimleri kullanılarak VDR Genine ait polimorfizmlerin analizi yapıldı (Şekil 3.1 ve 3.2).

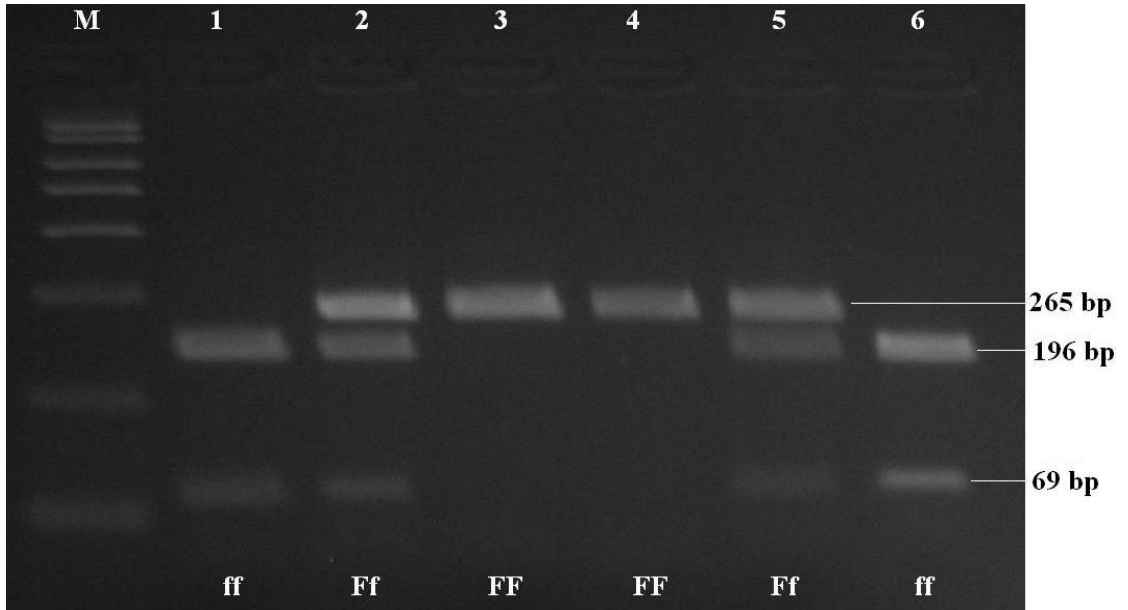
Hasta ve kontrol gruplarına ait FokI ve TaqI genotiplerinin sıklığı çizelge 3.1'de verilmiştir. Yapılan PZR ve TaqI restriksiyon enzim kesimi sonucu hasta grubunun; 65'inin (%43,3) TT, 67'sinin (%44,6) Tt ve 18'inin (%12) tt genotipine sahip olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise 67 (%44,7) TT, 66 (%44) Tt ve 17 (%11,3) tt genotipi tespit edildi. Tüm olgularda ise; TT %44, Tt %44 ve tt % 12 oranında bulundu. T ve t alel frekansları tüm olgular değerlendirildiğinde sırasıyla 0.66 ve 0.34 olarak hesaplandı. Hasta ve kontrol grubunda ayrı ayrı ele alındığında ise T ve t alel frekansları sırasıyla 0,66; 0,34 ve 0,67; 0,33 olarak bulundu (Çizelge 3.2). Hasta ve kontrol grubu arasında T ve t alel frekansları açısından önemli bir fark görülmedi ( $p=0,88$ ).

Hasta ve kontrol grubu ile TaqI polimorfizmine ait tüm genotipler arasında yapılan karşılaştırmada anlamlı bir fark bulunmadı ( $p=0,84$ ). TT, Tt ve tt genotipli dejeneratif disk hernili hastalar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında fark görülmedi (sırasıyla p değerleri 0,66; 0,73; 0,86).

Hasta ve kontrol grubunda yapılan PZR ve FokI restriksiyon enzim kesimi sonucu hasta grubunun 83'ünde (%55,3) FF, 51'inde (% 34) Ff ve 16'sında (%10,7) ff genotipi tespit edildi. Kontrol grubunun ise 62'sinin (%41,3) FF, 77'sinin (%51,3) Ff ve 11'inin (%7,3) ff genotipine sahip olduğu görüldü. Tüm olgularda ise; FF %48, Ff %43 ve ff %9 oranında bulundu. F ve f alel frekansları tüm olgular değerlendirildiğinde sırasıyla 0,70 ve 0,30 olarak hesaplandı. Hasta ve kontrol grubunda ayrı ayrı ele alındığında ise, F ve f alel frekansları sırasıyla 0,72; 0,28 ve 0,67; 0,33 olarak bulundu (Çizelge 3.2). Hasta ve kontrol grubu arasında F ve f alel frekansları açısından önemli bir fark görülmedi ( $p=0,44$ ).



**Şekil 3.1.** *VDR* geni TaqI polimorfizmine ait PZR-RFLP jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bp marker. 1–5 örnekler).



**Şekil 3.2.** *VDR* Geni FokI polimorfizmine ait PZR-RFLP jel elektroforez görüntüsü (M: 50 bp marker, 1–6 örnekler).

Hasta ve kontrol grubu ile FokI polimorfizmine ait tüm genotipler arasında yapılan karşılaştırmada anlamlı ilişki bulundu ( $p=0,01$ ). Ancak FF genotipli dejeneratif disk hernili hastalar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında fark görülmedi ( $p=0,08$ ). Hasta grubu ile kontrol grubu arasında Ff genotipi açısından istatistiksel

olarak anlamlı fark bulundu ( $p=0,02$ ). ff genotipli dejeneratif disk hernili hastalar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında ise anlamlı fark görülmedi ( $p=0,33$ ).

Sonuç olarak, hasta ve kontrol grupları ile TaqI ve FokI genotiplerinin karşılaştırması sonucu Ff genotipi açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Hasta ve kontrol grubu açısından VDR gen polimorfizmlerinin genotip dağılımı.

Polimorfizm	Genotip	Hasta	Kontrol	P Değeri
Taq I	TT	65	67	0,660
	Tt	67	66	0,732
	tt	18	17	0,866
FokI	FF	83	62	0,081
	Ff	51	77	0,022
	ff	16	11	0,336

**Çizelge 3.2.** Hasta ve kontrol gruplarına ait VDR gen polimorfizmi alel frekansları.

Polimorfizm	Alel	Hasta	Kontrol	P Değeri
TaqI	T	0,66	0,67	0,881
	t	0,34	0,33	
FokI	F	0,72	0,67	0,443
	f	0,28	0,33	

### 3.1.1 Disk Herniasyon Tipleri ile TaqI ve FokI Polimorfizmleri Arasındaki İlişki

Çalışmamızın hasta grubunu oluşturan olgular MR görüntüleme yöntemi kullanılarak disk herniasyonunun varlığı ve tipi açısından MacNab's sınıflifikasyonuna göre normal disk, hafif form (protrüzyon tipi disk) ve ağır form (ekstrüzyon ve sekestrasyon tipi disk) olarak sınıflandırıldı (Çizelge 3.3).

Disk herniasyon tipleri ile TaqI genotipleri arasında yapılan karşılaştırmada anlamlı bir fark bulundu ( $p<0,001$ ). Ayrıca TT ve Tt genotipleri ile her bir disk herniasyon tipinin karşılaştırılması sonucu disk herniasyonunun protrüzyon tipi ile anlamlı bir ilişki bulundu ( $p<0,001$ ). tt genotipi ile disk herniasyon tipleri arasında yapılan karşılaştırma da ise disk herniasyonunun ekstrüzyon ve sekestrasyon tipleri ile tt genotipi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edildi ( $p=0,023$ ).

Disk herniasyon tipleri ile tüm FokI genotipleri arasında yapılan karşılaştırmada anlamlı fark bulundu ( $p<0,001$ ). FF ve Ff genotipleri ile disk herniasyon tiplerinin karşılaştırılması sonucu protrüzyon tipi disk herniasyonu ile

anlamli iliŒki bulundu ( $p<0,001$ ). ff genotipi ile disk herniasyon tipleri arasında yapilan karŒılaŒtırmada ise ekstrüzyon ve sekestrasyon tipi disk herniasyonu ile ff genotipi arasında anlamli bir iliŒki bulundu ( $p=0,008$ ).

**Çizelge 3.3.** VDR gen polimorfizmi genotipleri ile disk herniasyon tipleri arasındaki iliŒki

Polimorfizm	Genotip	Disk Herniasyon Tipi			P değeri
		Normal	Protrüde	Ekstrüde/Sekestre	
Taq I	TT	27	45	6	<0,001
	Tt	11	48	29	<0,001
	tt	4	9	16	0,023
FokI	FF	35	60	8	<0,001
	Ff	6	33	30	<0,001
	ff	1	9	13	0,008

Sonuç olarak; disk herniasyon tipleri ile TaqI ve FokI genotiplerinin karŒılaŒtırılması sonucu TT, Tt, FF ve Ff genotipine sahip bireylerde protrüzyon tipi disk herniasyonu ile tt ve ff genotipine sahip bireylerde de ekstrüzyon ve sekestrasyon tipi disk herniasyonu ile anlamli iliŒki tespit edilmiŒtir.

### 3.1.2 Disk Dejenerasyon Dereceleri İle TaqI ve FokI Polimorfizmleri Arasındaki İliŒki

MR görüntüleme yöntemi kullanılarak disk dejenerasyonu açısından değerlendirilen ve hasta grubunu oluŒturan olgular disk dejenerasyon derecesi açısından Grade I–II (hafif form) ve Grade III-IV (ağır form) olarak iki gruba ayrıldı (Çizelge 3.4).

Disk dejenerasyon dereceleri ile TaqI genotipleri arasında yapilan karŒılaŒtırmada anlamli fark bulundu ( $p<0,001$ ). TaqI genotiplerinin herbiri ile dejenerasyon dereceleri arasında yapilan karŒılaŒtırmada TT genotipi ile Grade I-II dejenerasyon arasında anlamli iliŒki bulundu ( $p<0,001$ ). Tt ve tt genotipleri ile Grade I-II ve Grade III-IV grupları arasında yapilan karŒılaŒtırmada ise Tt genotipi ile gruplar arasında anlamli iliŒki bulunmazken ( $p=0,446$ ), tt genotipi ile Grade III-IV dejenerasyon grubu arasında anlamli iliŒki tespit edildi ( $p=0,048$ ).

FokI genotipleri ile dejenerasyon dereceleri arasında yapilan karŒılaŒtırmada da anlamli iliŒki bulundu ( $p<0,001$ ). FF, Ff ve ff genotiplerinin her birinin disk dejenerasyon dereceleri ile yapilan karŒılaŒtırmasında FF genotipi ile Grade I-II

arasında ( $p<0,001$ ), Ff ve ff genotipleri ile de Grade III-IV arasında anlamlı ilişki tespit edildi (sırasıyla p değerleri 0,004 ve 0,041).

**Çizelge 3.4.** VDR gen polimorfizmi genotipleri ile disk dejenerasyon dereceleri arasındaki ilişki

Polimorfizm	Genotip	Disk Dejenerasyon Dereceleri		P değeri
		Grade I-II	Grade III-IV	
Taq I	TT	61	27	<0,001
	Tt	51	59	0,446
	tt	10	21	0,048
FokI	FF	85	33	<0,001
	Ff	28	54	0,004
	ff	9	20	0,041

Sonuç olarak; TT ve FF genotipine sahip bireyler ile disk dejenerasyonunun hafif formları (Grade I-II); tt, ff ve Ff genotipleri ile disk dejenerasyonunun ağır formları (Grade III-IV) arasında anlamlı ilişki bulundu.

### 3.1.3. Disk Dejenerasyon Seviyeleri ile TaqI ve FokI Polimorfizimleri Arasındaki İlişki

Hasta grubunun MR görüntüleri değerlendirilerek disk dejenerasyon seviyelerine göre bir seviye, iki seviye, üç seviye ve üstü dejenerasyon olmak üzere üç grup oluşturuldu (Çizelge 3.5).

Dejenerasyon gösteren disk seviyeleri ile TaqI genotipleri arasında yapılan karşılaştırmada anlamlı fark görüldü ( $p=0,016$ ). TaqI genotipleri ile gruplar arasında yapılan karşılaştırma da ise TT genotipine sahip olgularda bir seviye dejenerasyon yönünden anlamlı ilişki bulundu ( $p=0,008$ ). Tt ve tt genotipleri açısından yapılan dejenerasyon seviyeleri ile ilgili karşılaştırmada Tt genotipine sahip olgularda iki seviye dejenerasyon açısından anlamlı ilişki görülürken ( $p=0,004$ ), tt genotipine sahip olgularda dejenerasyon seviyesi ile herhangi bir ilişki tespit edilmedi ( $p=0,387$ ).

Dejenere disk seviyeleri ile FokI genotipleri arasında yapılan karşılaştırmada anlamlı fark tespit edildi ( $p<0,001$ ). Her bir FokI genotipi ile gruplar arasında yapılan karşılaştırmada FF genotipine sahip bireylerde iki seviye dejenerasyon ile anlamlı ilişki bulunurken ( $p<0,001$ ), Ff ve ff genotipine sahip bireylerle disk dejenerasyon

seviyeleri arasında anlamlı ilişki tespit edilmedi (sırasıyla p değerleri 0,138 ve 0,808).

Sonuç olarak; TT genotipi ile bir seviye dejenerasyon, Tt ve FF genotipi ile iki seviye dejenerasyon arasında ilişki bulunurken tt, ff ve Ff genotipleri ile disk dejenerasyon seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

**Çizelge 3.5.** VDR gen polimorfizmi genotipleri ile disk dejenerasyon seviyeleri arasındaki ilişki

Polimorfizm	Genotip	Disk Dejenerasyon Seviyeleri			P değeri
		1 seviye	2 seviye	≥3 seviye	
Taq I	TT	29	26	10	0,008
	Tt	18	35	14	0,004
	tt	4	6	8	0,387
FokI	FF	34	39	8	<0,001
	Ff	13	24	15	0,138
	ff	4	4	9	0,808

### 3.2. Aggrecan Gen Polimorfizmi

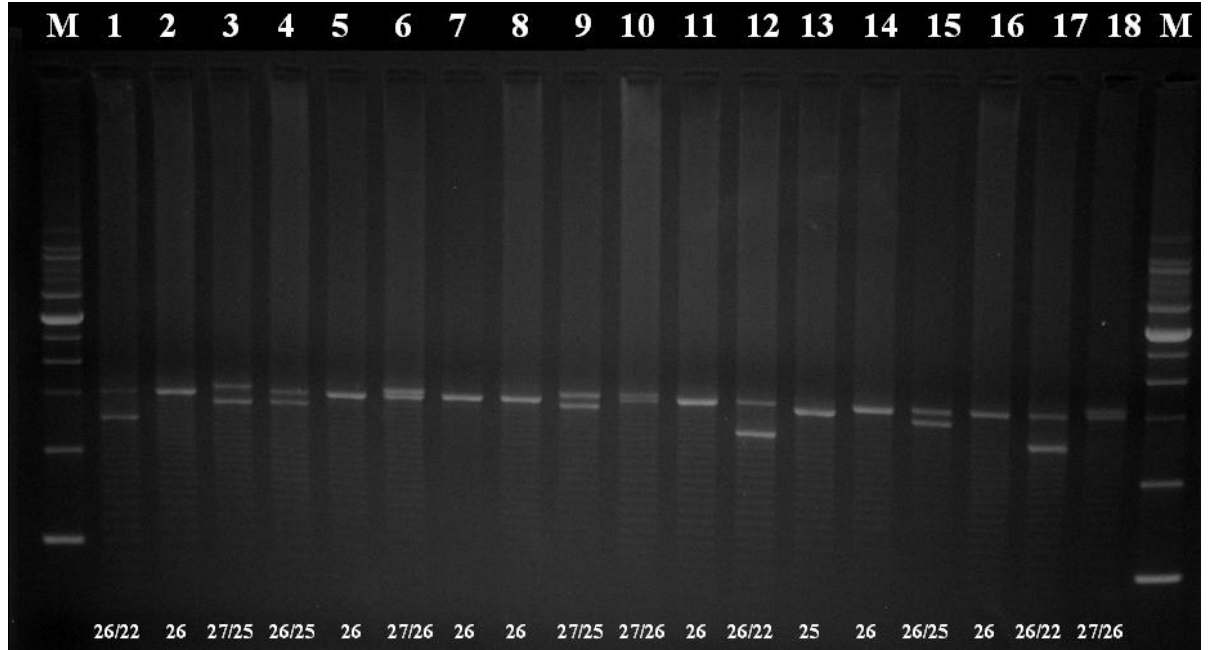
Çalışmanın bu bölümünde *Aggrecan* genine ait VNTR polimorfizmlerinin 13 alel açısından analizi yapıldı (Şekil 3.3). Hasta ve kontrol gruplarında 11 farklı VNTR aleline rastlanmış olup kısa alellerden A18 ve A20'ye rastlanmamıştır.

Çalışma grubuna dahil edilen olgulara ait alellerin dağılımı ve frekansları şöyledir: A13 % 0,7; A19 % 0,9; A21 % 2,5; A22 % 8,3; A25 % 9,5; A26 %18,7; A27 % 27; A28 % 21,8; A29 % 10,5; A32 % 0,2 ve A33 % 0,2 (Çizelge 3.6). Tüm olgular arasında sırasıyla A27 (%27), A28 (%21,8) ve A26 (%18,7) en sık rastlanan alel tipleriydi.

*Aggrecan* genine ait aleller A13–26 kısa, A27 normal ve A28–33 uzun aleller olmak üzere üç gruba ayrıldı (Doerge ve ark 1997). Kısa, normal ve uzun aleller açısından hasta ve kontrol grupları arasında yapılan karşılaştırmada önemli bir fark görülmedi ( $p=0,341$ ). Alel gruplarının kendi içinde yapılan karşılaştırmada kısa alellere sahip hasta ve kontrol grupları arasında herhangi bir fark yoktu ( $p=0,606$ ). Normal uzunluktaki alele sahip hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılmasında anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,212$ ). Benzer şekilde, uzun alellere sahip hasta ve kontrol grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi ( $p=0,327$ ) (Çizelge 3.7).

**Çizelge 3.6.** Hasta ve kontrol grubu açısından *Aggrecan* genine ait alellerin dağılımı ve frekansları

Alleller	Hasta	Kontrol	Toplam	Frekans (%)
A13 (775 bp)	4	0	4	0,7
A19 (1117 bp)	2	0	2	0,3
A21 (1231 bp)	13	2	15	2,5
A22 (1288 bp)	26	24	50	8,3
A25 (1459 bp)	28	29	57	9,5
A26 (1516 bp)	43	69	112	18,7
A27 (1573 bp)	90	74	163	27
A28 (1630 bp)	63	68	131	21,8
A29 (1687 bp)	30	33	63	10,5
A32 (1858 bp)	1	0	1	0,2
A33 (1915 bp)	0	1	1	0,2



**Şekil 3.3.** *Aggrecan* gen polimorfizmine ait PZR-Agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: 1 kb marker, 1–18 örnekler).

**Çizelge 3.7.** *Aggreccan* genine ait aleller ile hasta ve kontrol grubu arasındaki ilişki

Alel	Hasta	Kontrol	P Değeri
A13–26	116	124	0,606
A27	90	74	0,212
A28–33	94	103	0,327

### 3.2.1 Disk Herniasyon Tipleri ile *Aggreccan* Gen Polimorfizmleri Arasındaki İlişki

Disk herniasyon tipleri ile *Aggreccan* genine ait kısa, normal ve uzun alel grupları arasında yapılan karşılaştırmada herhangi bir fark yoktu ( $p=0,212$ ). Disk herniasyon tipleri ile alel gruplarının kendi içinde yapılan karşılaştırmada; kısa alellere sahip hasta ve kontrol grupları arasında protrüzyon tipi disk açısından anlamlı ilişki tespit edildi ( $p<0,001$ ). Benzer şekilde, normal uzunlukta alele sahip hasta ve kontrol grubunda da protrüzyon tipi disk hernisi lehine anlamlı bir ilişki görüldü ( $p<0,001$ ). Disk herniasyon tipi açısından uzun alellere sahip hasta ve kontrol gruplarında da yine protrüzyon tipi disk hernisi açısından anlamlı fark tespit edildi ( $p= 0,001$ ) (Çizelge 3.8).

**Çizelge 3.8.** *Aggreccan* genine ait aleller ile disk herniasyon tipleri arasındaki ilişki

Alel	Disk Herniasyon Tipi			P değeri
	Normal	Protrüde	Ekstrüde/Sekestre	
A13–26	27	78	45	<0,001
A27	34	62	25	<0,001
A28–32	23	53	32	0,001

### 3.2.2 Disk Dejenerasyon Dereceleri İle *Aggreccan* Gen Polimorfizmleri Arasındaki İlişki

Disk dejenerasyon dereceleri ile *Aggreccan* genine ait kısa, normal ve uzun alel grupları arasında yapılan karşılaştırmada anlamlı fark görüldü ( $p=0,005$ ). Disk dejenerasyon dereceleri açısından alel gruplarının kendi içinde yapılan değerlendirmede; kısa alellere sahip hasta ve kontrol grupları arasında Grade III-IV dejenerasyon açısından anlamlı bir ilişki tespit edildi ( $p=0,044$ ). Normal uzunlukta alele sahip hasta ve kontrol grubunda Grade I-II dejenerasyon lehine anlamlı ilişki görüldü ( $p=0,043$ ). Disk dejenerasyon dereceleri açısından uzun alellere sahip hasta

ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasında da Grade I-II dejenerasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ( $p=0,044$ ) (Çizelge 3.9).

**Çizelge 3.9.** *Aggrecan* genine ait aleller ile disk dejenerasyon dereceleri arasındaki ilişki

Alel	Disk Dejenerasyon Dereceleri		P değeri
	Grade I-II	Grade III-IV	
A13–26	76	103	0,044
A27	76	53	0,043
A28–32	83	59	0,044

### 3.2.3. Disk Dejenerasyon Seviyeleri ile *Aggrecan* Gen Polimorfizmleri Arasındaki İlişki

Disk dejenerasyon seviyeleri ile *Aggrecan* genine ait kısa, normal ve uzun alel grupları arasında yapılan karşılaştırmada anlamlı fark görüldü ( $p=0,034$ ). Disk dejenerasyon seviyeleri açısından alel gruplarının kendi içinde yapılan değerlendirmede; kısa alellere sahip hasta ve kontrol grupları arasında iki seviye disk dejenerasyonu açısından anlamlı ilişki tespit edildi ( $p=0,018$ ). Normal uzunlukta alele sahip hasta ve kontrol grubunda da iki seviye disk dejenerasyonu açısından anlamlı ilişki görüldü ( $p<0,001$ ). Disk dejenerasyon seviyeleri açısından uzun alellere sahip hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasında anlamlı bir fark tespit edilmedi ( $p=0,204$ ) (Çizelge 3.10).

**Çizelge 3.10.** *Aggrecan* genine ait aleller ile disk dejenerasyon seviyeleri arasındaki ilişki

Alel	Disk Dejenerasyon Seviyeleri			P değeri
	1 seviye	2 Seviye	$\geq 3$ seviye	
A13–26	32	53	31	0,018
A27	38	43	10	$<0,001$
A28–32	33	38	24	0,204

### 3.3. VDR ve *Aggrecan* Gen Polimorfizm Analizlerinin Birlikte Değerlendirilmesi

Çalışmanın bu bölümünde *VDR* ve *Aggrecan* genlerine ait polimorfizmlerin birlikte disk herniasyon tipleri, disk dejenerasyon dereceleri ve dejenerasyon seviyeleri üzerine etkisi incelendi.

### 3.3.1 Disk Herniasyon Tipleri ile *VDR* ve *Aggrecan* Gen Polimorfizmlerinin Beraber Değerlendirilmesi

Disk herniasyon tipleri ile *VDR* geni FokI polimorfizmi genotipleri ve *Aggrecan* genine ait kısa, normal ve uzun alel grupları arasında yapılan karşılaştırmada anlamlı ilişki bulundu ( $p<0,001$ ). Kısa alel grupları ve FokI genotiplerinin kendi içinde yapılan karşılaştırmada kısa alel-FF genotipi ile protrüzyon tipi disk açısından anlamlı ilişki bulundu ( $p<0,001$ ). Kısa alel-Ff genotipi ile ekstrüzyon/sekestrasyon tipi disk arasında anlamlı ilişki bulundu ( $p<0,001$ ). Benzer şekilde kısa alel-ff genotipi ile ekstrüzyon/sekestrasyon tipi disk arasında anlamlı ilişki tespit edildi ( $p=0,016$ ). Normal uzunluktaki alel grupları ve FokI genotiplerinin kendi içinde yapılan karşılaştırmada normal alel-FF genotipi ile protrüzyon tipi disk açısından anlamlı ilişki bulundu ( $p<0,001$ ). Benzer şekilde normal alel-Ff genotipi ile protrüzyon tipi disk açısından anlamlı ilişki bulundu ( $p=0,004$ ). Normal alel-ff genotipine sahip bireyler ile disk herniasyon tipleri arasında anlamlı ilişki tespit edilmedi ( $p=0,102$ ). Uzun alel grupları ve FokI genotiplerinin kendi içinde yapılan karşılaştırmada uzun alel-FF genotipi ile protrüzyon tipi disk açısından anlamlı ilişki bulundu ( $p<0,001$ ). Benzer şekilde uzun alel-Ff genotipi ile protrüzyon tipi disk açısından anlamlı ilişki tespit edildi ( $p<0,001$ ). Uzun alel-ff genotipine sahip bireyler ile disk herniasyon tipleri arasında anlamlı ilişki bulunmadı ( $p=0,808$ ) (Çizelge 3.11).

**Çizelge 3.11.** *VDR* geni FokI ve *Aggrecan* gen polimorfizmleri ile disk herniasyon tipleri arasındaki ilişki

Genotipler	Disk Herniasyon Tipi			P değeri
	Normal	Protrüde	Ekstrüde/Sekestre	
Kısa alel-FF	21	41	4	<0,001
Kısa alel-Ff	1	25	27	<0,001
Kısa alel-ff	1	6	11	0,016
Normal alel-FF	29	39	9	<0,001
Normal alel-Ff	4	20	11	0,004
Normal alel-ff	0	1	5	0,102
Uzun alel-FF	17	32	2	<0,001
Uzun alel-Ff	4	22	22	<0,001
Uzun alel-ff	0	9	8	0,808

Disk herniasyon tipleri ile *VDR* geni TaqI polimorfizmi genotipleri ve *Aggrecan* genine ait kısa, normal ve uzun alel grupları arasında yapılan

karşılaştırmada anlamlı ilişki bulundu ( $p<0,001$ ). Kısa alel grupları ve TaqI genotiplerinin kendi içinde yapılan karşılaştırmada kısa alel-TT genotipi ile protrüzyon tipi disk açısından anlamlı ilişki bulundu ( $p=0,001$ ). Kısa alel-Tt genotipi ile protrüzyon tipi disk arasında anlamlı ilişki bulundu ( $p<0,001$ ). Kısa alel-tt genotipine sahip bireyler ile disk herniasyon tipleri arasında anlamlı ilişki tespit edilmedi ( $p=0,062$ ). Normal uzunluktaki alel grupları ve TaqI genotiplerinin kendi içinde yapılan karşılaştırmada normal alel-TT genotipi ile protrüzyon tipi disk açısından anlamlı ilişki bulundu ( $p<0,001$ ). Benzer şekilde normal alel-Tt genotipi ile protrüzyon tipi disk açısından anlamlı ilişki bulundu ( $p<0,001$ ). Normal alel-tt genotipine sahip bireyler ile disk herniasyon tipleri arasında anlamlı ilişki tespit edilmedi ( $p=0,247$ ). Uzun alel grupları ve TaqI genotiplerinin kendi içinde yapılan karşılaştırmada uzun alel-TT genotipi ile protrüzyon tipi disk açısından anlamlı ilişki bulundu ( $p<0,001$ ). Benzer şekilde uzun alel-Tt genotipi ile protrüzyon tipi disk açısından anlamlı ilişki tespit edildi ( $p=0,001$ ). Uzun alel-tt genotipi ile ekstrüzyon/sekestrasyon tipi disk arasında anlamlı ilişki bulundu ( $p=0,033$ ) (Çizelge 3.12).

**Çizelge 3.12.** VDR geni TaqI ve Aggrecan gen polimorfizmleri ile disk herniasyon tipleri arasındaki ilişki

Genotipler	Disk Herniasyon Tipi			P değeri
	Normal	Protrüde	Ekstrüde/Sekestre	
Kısa alel-TT	17	29	7	0,001
Kısa alel-Tt	6	37	23	<0,001
Kısa alel-tt	4	9	14	0,062
Normal alel-TT	20	29	1	<0,001
Normal alel-Tt	10	28	17	<0,001
Normal alel-tt	2	6	7	0,247
Uzun alel-TT	15	34	4	<0,001
Uzun alel-Tt	6	28	17	0,001
Uzun alel-tt	0	3	11	0,033

### 3.3.2 Disk Dejenerasyon Dereceleri İle VDR ve Aggrecan Gen Polimorfizmlerinin Beraber Değerlendirilmesi

Disk dejenerasyon dereceleri ile VDR geni FokI polimorfizmi genotipleri ve Aggrecan genine ait kısa, normal ve uzun alel grupları arasında yapılan karşılaştırmada anlamlı ilişki bulundu (sırasıyla  $p<0,001$ ,  $p<0,001$ ,  $p=0,001$ ). Kısa alel grupları ve FokI genotiplerinin kendi içinde yapılan karşılaştırmada kısa alel-FF

genotipi ile Grade I-II dejenerasyon arasında anlamlı ilişki bulundu ( $p=0,001$ ). Kısa alel-Ff genotipi ile Grade III-IV dejenerasyon açısından anlamlı ilişki bulundu ( $p=0,001$ ). Kısa alel-ff genotipi ile disk dejenerasyon dereceleri arasında ilişki tespit edilmedi ( $p=0,072$ ). Normal uzunluktaki alel grupları ve FokI genotiplerinin kendi içinde yapılan karşılaştırmada normal alel-FF genotipi ile Grade I-II dejenerasyon arasında anlamlı ilişki bulundu ( $p<0,001$ ). Normal alel-Ff genotipi ile Grade III-IV dejenerasyon açısından anlamlı ilişki bulundu ( $p=0,037$ ). Normal alel-ff genotipi ile disk dejenerasyon dereceleri arasında ilişki tespit edilmedi ( $p=0,102$ ). Uzun alel grupları ve FokI genotiplerinin kendi içinde yapılan karşılaştırmada uzun alel-FF genotipi ile Grade I-II dejenerasyon arasında anlamlı ilişki bulundu ( $p<0,001$ ). Uzun alel-Ff genotipi ile disk dejenerasyon dereceleri arasında ilişki bulunmadı ( $p=0,500$ ). Benzer şekilde uzun alel-ff genotipi ile disk dejenerasyon dereceleri arasında ilişki tespit edilmedi ( $p=0,297$ ) (Çizelge 3.13).

**Çizelge 3.13.** *VDR* geni FokI ve *Aggrecan* gen polimorfizmleri ile disk dejenerasyon dereceleri arasındaki ilişki

Genotipler	Disk Dejenerasyon Dereceleri		P değeri
	Grade I-II	Grade III-IV	
Kısa alel-FF	53	24	0,001
Kısa alel-Ff	20	48	0,001
Kısa alel-ff	8	17	0,072
Normal alel-FF	64	18	<0,001
Normal alel-Ff	13	26	0,037
Normal alel-ff	1	5	0,102
Uzun alel-FF	46	15	<0,001
Uzun alel-Ff	25	30	0,500
Uzun alel-ff	9	14	0,297

Disk dejenerasyon dereceleri ile *VDR* geni TaqI polimorfizmi genotipleri ve *Aggrecan* genine ait kısa alel grupları arasında yapılan karşılaştırmada ilişki bulunmazken normal ve uzun alel grupları arasında anlamlı ilişki bulundu (sırasıyla  $p=0,068$ ;  $p=0,002$ ;  $p=0,004$ ). Kısa alel grupları ve TaqI genotiplerinin kendi içinde yapılan karşılaştırmada kısa alel-TT, kısa alel-Tt ve kısa alel-tt genotipleri ile disk dejenerasyon dereceleri arasında ilişki bulunmadı (sırasıyla  $p=0,152$ ;  $p=0,124$ ;  $p=0,209$ ). Normal uzunluktaki alel grupları ve TaqI genotiplerinin kendi içinde yapılan karşılaştırmada normal alel-TT genotipi ile Grade I-II dejenerasyon arasında anlamlı ilişki bulundu ( $p<0,001$ ). Normal alel-Tt ve normal alel-tt genotipleri ile disk dejenerasyon dereceleri arasında ilişki bulunmadı (sırasıyla  $p=0,696$ ;  $p=0,796$ ). Uzun

alel grupları ve TaqI genotiplerinin kendi içinde yapılan karşılaştırmada uzun alel-TT genotipi ile Grade I-II dejenerasyon arasında anlamlı ilişki bulundu ( $p=0,002$ ). Uzun alel-Tt genotipi ile disk dejenerasyon dereceleri arasında ilişki bulunmadı ( $p=0,522$ ). Uzun alel-tt genotipi ile Grade III-IV dejenerasyon arasında anlamlı ilişki bulundu ( $p=0,046$ ) (Çizelge 3.14).

**Çizelge 3.14.** *VDR* geni TaqI ve *Aggrecan* gen polimorfizmleri ile disk dejenerasyon dereceleri arasındaki ilişki

Genotipler	Disk Dejenerasyon Dereceleri		P değeri
	Grade I-II	Grade III-IV	
Kısa alel-TT	35	24	0,152
Kısa alel-Tt	40	55	0,124
Kısa alel-tt	12	19	0,209
Normal alel-TT	43	11	<0,001
Normal alel-Tt	28	31	0,696
Normal alel-tt	8	7	0,796
Uzun alel-TT	44	19	0,002
Uzun alel-Tt	33	28	0,522
Uzun alel-tt	4	12	0,046

### 3.3.3. Disk Dejenerasyon Seviyeleri ile *VDR* ve *Aggrecan* Gen Polimorfizmlerinin Beraber Değerlendirilmesi

Disk dejenerasyon seviyeleri ile *VDR* geni FokI polimorfizmi genotipleri ve *Aggrecan* genine ait normal alel grupları arasında yapılan karşılaştırmada ilişki bulunmazken kısa ve uzun alel grupları arasında anlamlı ilişki bulundu (sırasıyla  $p=0,148$ ;  $p=0,002$ ;  $p=0,007$ ). Kısa alel grupları ve FokI genotiplerinin kendi içinde yapılan karşılaştırmada kısa alel-FF genotipi ile iki seviye dejenerasyon arasında ilişki bulundu ( $p=0,001$ ). Kısa alel-Ff ve kısa alel-ff genotipleri ile disk dejenerasyon seviyeleri arasında anlamlı ilişki tespit edilmedi (sırasıyla  $p=0,341$ ;  $p=0,135$ ). Normal uzunluktaki alel grupları ve FokI genotiplerinin kendi içinde yapılan karşılaştırmada normal alel-FF genotipi ile bir seviye dejenerasyon arasında ilişki bulundu ( $p<0,001$ ). Normal alel-Ff ve normal alel-ff genotipleri ile disk dejenerasyon seviyeleri arasında ilişki bulunmadı (sırasıyla  $p=0,054$ ;  $p=0,655$ ). Uzun alel grupları ve FokI genotiplerinin kendi içinde yapılan karşılaştırmada uzun alel-FF genotipi ile bir seviye dejenerasyon arasında ilişki bulundu ( $p<0,001$ ). Uzun alel-Ff genotipi ile disk dejenerasyon seviyeleri arasında ilişki bulunmadı ( $p=0,293$ ). Uzun alel-ff genotipi ile üç ve üstü seviye dejenerasyon arasında ilişki tespit edildi ( $p=0,039$ ) (Çizelge 3.15).

**Çizelge 3.15.** *VDR* geni FokI ve *Aggrecan* gen polimorfizmleri ile disk dejenerasyon seviyeleri arasındaki ilişki

<b>Disk Dejenerasyon Seviyeleri</b>				
<b>Genotipler</b>	<b>1 seviye</b>	<b>2 Seviye</b>	<b>≥3 seviye</b>	<b>P değeri</b>
Kısa alel-FF	19	28	6	0,001
Kısa alel-Ff	9	16	15	0,341
Kısa alel-ff	4	2	8	0,135
Normal alel-FF	28	27	4	<0,001
Normal alel-Ff	6	14	5	0,054
Normal alel-ff	3	2	0	0,655
Uzun alel-FF	19	19	7	<0,001
Uzun alel-Ff	10	16	9	0,293
Uzun alel-ff	1	3	8	0,039

**Çizelge 3.16.** *VDR* geni TaqI ve *Aggrecan* gen polimorfizmleri ile disk dejenerasyon seviyeleri arasındaki ilişki

<b>Disk Dejenerasyon Seviyeleri</b>				
<b>Genotipler</b>	<b>1 seviye</b>	<b>2 Seviye</b>	<b>≥3 seviye</b>	<b>P değeri</b>
Kısa alel-TT	22	14	8	0,035
Kısa alel-Tt	8	33	13	<0,001
Kısa alel-tt	3	5	7	0,449
Normal alel-TT	18	21	3	0,001
Normal alel-Tt	17	19	3	0,003
Normal alel-tt	2	3	4	0,717
Uzun alel-TT	18	17	9	0,190
Uzun alel-Tt	12	18	10	0,273
Uzun alel-tt	3	3	5	0,763

Disk dejenerasyon seviyeleri ile *VDR* geni TaqI polimorfizmi genotipleri ve *Aggrecan* genine ait kısa ve normal alel grupları arasında yapılan karşılaştırmada ilişki bulunurken uzun alel grupları arasında anlamlı ilişki bulunmadı (sırasıyla  $p=0,001$ ;  $p=0,023$ ;  $p=0,432$ ). Kısa alel grupları ve TaqI genotiplerinin kendi içinde yapılan karşılaştırmada kısa alel-TT genotipi ile bir seviye dejenerasyon arasında ilişki bulundu ( $p=0,035$ ). Kısa alel-Tt genotipi ile iki seviye dejenerasyon arasında ilişki bulundu ( $p<0,001$ ). Kısa alel-tt genotipi ile disk dejenerasyon seviyeleri arasında ilişki bulunmadı ( $p=0,449$ ). Normal alel grupları ve TaqI genotiplerinin kendi içinde yapılan karşılaştırmada normal alel-TT genotipi ile iki seviye dejenerasyon arasında ilişki bulundu ( $p=0,001$ ). Benzer şekilde normal alel-Tt

genotipi ile iki seviye dejenerasyon arasında ilişki tespit edildi ( $p=0,003$ ). Normal alel-tt genotipi ile disk dejenerasyon seviyeleri arasında ilişki bulunmadı ( $p=0,717$ ). Uzun alel grupları ve TaqI genotiplerinin kendi içinde yapılan karşılaştırmada uzun alel-TT genotipi ile disk dejenerasyon seviyeleri arasında ilişki bulunmadı ( $p=0,190$ ). Benzer şekilde uzun alel-Tt ve uzun alel-tt genotipleri ile disk dejenerasyon seviyeleri arasında ilişki tespit edilmedi (sırasıyla  $p=0,273$ ;  $p=0,763$ ) (izelge 3.16).

#### 4. TARTIŞMA

Dejeneratif disk hernisi (DDH) en sık rastlanan omurga hastalıklarından biridir. Etyolojisi tam olarak bilinmemesine rağmen son yıllarda yapılan çalışmalar bu hastalığın genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle oluşan kompleks ve multifaktöriyel bir hastalık olduğunu ortaya koymuştur. Epidemiyolojik çalışmalar disk dejenerasyonu etyolojisinde yaş, yaşam biçimi, sigara, mesleki etmenler, vibrasyon travması, obezite etkenleri gibi çevresel faktörler yanında, genetik faktörlerin de majör rol oynadığını göstermiştir (Battie ve ark 2006). Pek çok çalışmada DDH ile ilişkili çeşitli gen polimorfizmleri saptanmıştır ve bu polimorfizmlerin DDH gelişimini 6 kez arttırdığı belirtilmektedir (Ala-Kokko 2002, Cheung 2006).

İntervertebral diskin yapısal komponentlerini ve kemik-kıkırdak yapısını ilgilendiren genomik araştırmaları, disk dejenerasyonunun genetiği ile ilgili çalışmaların temelini oluşturmaktadır (Kawaguchi ve ark 1999, Videman ve ark 2001). İntervertebral disk matriksinin majör elemanları olan agrecan ve kollajen ile ilgili genler disk dejenerasyonu çalışmalarında en fazla ilgi çeken genlerdir. Bunun yanında disk matriksinin yıkımını sağlayan *MMP-3* geninin de özellikle yaşlılarda dejenerasyona neden olduğu ortaya konulmuştur (Takahashi ve ark 2001).

Kemik yapı ve osteoporozla ilişkili olduğu bilinen *Östrojen* genine ait PvuII ve XbaI polimorfizmlerinin disk dejenerasyonu ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Kawaguchi ve ark 2002).

Disk dejenerasyonu ile ilişkili olabilecek genlerden biri de *VDR* geni'dir. Normal kemik mineralizasyonu ile ilişkili olan *VDR*'nin aynı zamanda nonmineralize konnektif dokunun dejenerasyonu ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (Jones ve ark 1998, Videman ve ark 1998, Videman ve ark 2001, Kawaguchi ve ark 2002, Uitterlinden ve ark 2002, Uitterlinden ve ark 2004, Cheung ve ark 2006). Steroid hormon reseptörü olan *VDR*, Vitamin D'nin hormon formu olan 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> ile bağlanarak fonksiyon görür. Oluşan reseptör-hormon kompleksi nukleus içerisine girer ve DNA bağlayıcı bölgesi ile DNA'ya bağlanarak gen transkripsiyonunu başlatır. FokI polimorfizmi DNA bağlayıcı bölgenin, TaqI polimorfizmi ise ligand bağlayıcı bölgenin yapısını değiştirerek *VDR*'nin DNA'ya ve Vitamin D<sub>3</sub> hormonuna bağlanma fonksiyonunu etkilemektedir. Sonuçta, *VDR*

defekti Na-SO<sub>4</sub> kotransportunu ve Ca<sup>+2</sup> metabolizmasını olumsuz etkileyerek gerek proteoglikan yapıyı gerekse kemik ve kıkırdak yapıyı bozarak disk dejenerasyonuna neden olmaktadır. *VDR* geninin disk dejenerasyonu ile ilişkisini araştırmak amacıyla farklı populasyonlarda çalışmalar yapılmıştır (Jones ve ark 1998, Videman ve ark 1998, Videman ve ark 2001, Kawaguchi ve ark 2002, Cheung ve ark 2006). Mevcut çalışma Türk toplumunda disk dejenerasyonu ile *VDR* ve *Aggrecan* genlerindeki polimorfik yapıyı inceleyen ilk çalışmadır.

Çalışmamızda genç yaştaki (20–30 yaş) 150 dejeneratif disk hernili birey ve 150 sağlıklı bireyden oluşan olgu gruplarında *VDR* genine ait FokI ve TaqI polimorfizmleri incelenmiştir.

Elde ettiğimiz verilere göre hasta ve kontrol grubunda, sırasıyla, TaqI polimorfizmi için genotipler; TT %43, %45; Tt %45, %44; tt %12, %11; FokI polimorfizmi için de FF %55, %41; Ff %34, %51 ve ff %11, %7 olarak gözlemlendi. Bu bulgular disk dejenerasyonlu Finli bireylerde yapılan *VDR* gen polimorfizmi ile ilgili iki çalışma (Videman ve ark 1998, Nojonen-Hietala ve ark 2003) sonuçlarından farklı bir dağılım göstermektedir.

Çalışmamızda yer alan hasta ve kontrol gruplarının FokI ve TaqI polimorfizmlerine ait alel frekansları ayrı ayrı değerlendirildiğinde Bid ve ark'nın (2005) sağlıklı Hint toplumunda tespit ettikleri TaqI ve FokI polimorfizmlerine ait alel frekansları ile uyumludur. Hasta ve kontrol grubuna ait tüm olgular değerlendirildiğinde ise F alel frekansı 0,70 olarak tespit edilmiştir. Bu bulgu, Fin (Videman ve ark 1998) toplumundaki bulgular ile farklılık göstermektedir. T aleli bakımından tüm olgular değerlendirildiğinde ise T alel frekansı 0.66 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç, Japon (Kawaguchi ve ark 2002) ve Güney Çin (Cheung ve ark 2006) toplumunda bildirilen T alel frekansı değerlerinden farklı olup Avustralya (Jones ve ark 1998) ve Fin (Videman ve ark 1998) populasyonlarındaki değerler ile uyumludur.

Videman ve ark (2001) tarafından Finli monozygotik ikizler üzerinde yapılan çalışmada TaqI ve FokI polimorfizmi genotipleri ile disk herniasyon bulguları karşılaştırılmış, ancak genotipler ile disk herniasyonu arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. Kawaguchi ve ark'nın (2002) genç Japonlar üzerinde yaptığı TaqI polimorfizmi ile ilgili çalışmada tt genotipine rastlanmamış olup Tt genotipi ile disk

herniasyonu arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise TaqI polimorfizminin TT ve Tt genotipleri ile disk herniasyonunun hafif formu olan protrüzyon tipi disk hernisi arasında; tt genotipi ile de disk herniasyonunun ağır formları olan ekstrüzyon ve sekestrasyon tipi disk hernisi arasında ilişki bulunmuştur.

Videman ve ark'nın (2001) Finli ikizler üzerinde yaptıkları TaqI polimorfizmi genotipleri ve disk dejenerasyon dereceleri açısından anlamlı ilişki bildirilmiştir. Jones ve ark'nın (1998) Avustralya popülasyonu üzerinde yaptıkları çalışmada, disk dejenerasyonu ile tt genotipi arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. Genç Japon popülasyonunda yapılan çalışmada TaqI polimorfizminin Tt genotipi ile disk dejenerasyonunun derecesi arasında ilişki bildirilmiştir (Kawaguchi ve ark 2002). Cheung ve ark'nın (2006) Güney Çin popülasyonunda yaptığı TaqI polimorfizmi ile ilgili çalışmada Tt ve tt genotipleri ile disk dejenerasyonu arasında ilişki bulunmuştur. Mevcut çalışmamızda da tt genotipi ile disk dejenerasyonu arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir.

Videman ve ark (1998) Finli monozygotik ikizlerde yaptığı diğer bir çalışmada disk dejenerasyonu ile TaqI ve FokI polimorfizmlerini karşılaştırmış ve anlamlı bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Fin toplumunda yapılan TaqI ve FokI polimorfizmleri ile dejeneratif lomber spinal stenozun ilişkisinin araştırıldığı çalışmada (Nojonen-Hietala ve ark 2003), genotipler ile disk dejenerasyonu arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bel ağrılı yaşlı Japon kadınlarında yapılan bir çalışmada (Oishi ve ark 2003) ise TaqI polimorfizmi ile disk dejenerasyonu arasında herhangi bir ilişki tespit edilmemiştir. Mevcut çalışmamızda ise Ff, ff ve tt genotipi ile ağır disk dejenerasyonu arasında ilişki bulunurken, Tt genotipi ile dejenerasyon derecesi arasında ilişki tespit edilmemiştir.

Disk dejenerasyon seviyeleri açısından Japon toplumunda yapılan TaqI polimorfizmi ile ilgili çalışmada (Kawaguchi ve ark 2002), üçten fazla seviyede disk dejenerasyonu ile Tt genotipi arasında ilişki bulunmuştur. Mevcut çalışmamızda ise Tt genotipi ile iki seviye dejenerasyon arasında ilişki tespit edilmiştir.

Dejeneratif disk hernisi etyolojisinde yer alan aday genlerden biri de *Aggrecan* genidir. *Aggrecan*, intervertebral diskin en önemli fonksiyonel proteoglikan bileşenidir. *Aggrecan* proteininin kondroidin sülfat bağlanma bölgesini

kodlayan ekson 12’de yer alan VNTR polimorfizmi, kondroidin sülfat zincirlerinin uzunluğunu belirler. Bu polimorfizm ile ilgili şimdiye kadar 13–33 tekrardan oluşan 14 farklı alel bildirilmiştir (Doege ve ark 1997, Kirk ve ark 2003).

Farklı toplumlarda yapılan *Aggrecan* genindeki polimorfizm çalışmalarında tespit edilen alel tipleri ve sayıları farklılık göstermektedir. Fin toplumunda yapılan iki ayrı çalışmanın birinde 6 diğerinde 9 farklı alel tespit edilmiştir (Noponen-Hietala ve ark 2003, Solovieva ve ark 2007). Japon toplumunda 8 (Kawaguchi ve ark 1999), Kanada toplumunda (Roughley ve ark 2006) ise 13 farklı alel bildirilirken bizim çalışma grubumuzda 11 farklı alel tespit edilmiştir. Aleller içinde sırasıyla en fazla A27 (%27), A28 (%21,8) ve A26 (%18,7) gözlenmiştir. Bu üç alel Doege ve ark (1997), Kawaguchi ve ark (1999) ve Roughley ve ark (2006)’nın çalışmalarında da en sık bildirilen alellerdir. Solovieva ve ark (2007)’nin Fin toplumundaki çalışmalarında ise en sık A26 olduğu bildirilmiştir. Noponen-Hietala ve ark (2003)’nin aynı toplumda yaptığı çalışmada ise A26’ya hiç rastlanmamış olup A27 ve A28 en sık rastlanan aleller olarak bildirilmiştir.

Dejeneratif disk hernisinde *Aggrecan* gen polimorfizmi ile ilgili ilk çalışma genç Japonlarda Kawaguchi ve ark (1999) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada disk herniasyon tipleri ve sayıları ile VNTR alelleri arasında herhangi bir ilişki olmadığı rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise, kısa, normal ve uzun alel grupları ile disk herniasyon tiplerinin karşılaştırılması sonucu tüm gruplarla protrüzyon tipi disk herniasyonu açısından anlamlı ilişki bulunmuştur.

Kawaguchi ve ark (1999), kısa tekrarlı aleller ile üçten fazla seviyede ve ciddi dejenerasyon arasında önemli ilişki tespit etmişlerdir. Mevcut çalışmada ise iki seviye dejenerasyon ile kısa ve normal uzunlukta alel grupları arasında ilişki tespit edilmiştir. Ayrıca mevcut çalışmada alel gruplarıyla disk dejenerasyon dereceleri arasındaki karşılaştırmada, kısa aleller ile ağır form dejenerasyon arasında anlamlı bir ilişki tespit edilerek Kawaguchi ve ark (1999)’nin çalışmasına benzer sonuçlar elde edilmiştir. Diğer taraftan, Rougley ve ark (2006)’nin çalışmasında ise, alel büyüklükleri ile disk dejenerasyonu arasında bir ilişki tespit edilmemiştir. Fin toplumunda yapılan iki ayrı çalışmada kısa tekrarlı alel frekansları oldukça düşük oranda bulunmuş olup disk dejenerasyonu ile kısa tekrarlı aleller arasında herhangi bir ilişkiye rastlanmamıştır (Noponen-Hietala ve ark 2003, Solovieva ve ark 2007). Ayrıca Solovieva ve ark (2007)’nin çalışmasında gerek bizim gerekse Kawaguchi ve

ark (1999)'nın çalışmasının aksine 26 tekrarlı alellerin dejenerasyon riskini arttırdığı, daha kısa olan 25 tekrarlı alellerin ise dejenerasyondan koruduğu rapor edilmiştir. Kämäräinen ve ark (2006)'nın el osteoartritli bireyler üzerinde yaptıkları çalışmalarında ise 27 tekrarlı alelin koruyucu olduğu, 27 tekrardan daha kısa ve daha uzun olan alellerin hastalık riskini ve ciddiyetini arttırdığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise kısa alele sahip bireylerde ağır form dejenerasyon, normal ve uzun alellere sahip bireylerde ise hafif form dejenerasyon daha fazla tespit edilmiştir.

Yapılan literatür araştırmasında *VDR* ve *Aggrecan* gen polimorfizmlerinin birlikte değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda ise disk herniasyon tipleri, disk dejenerasyon dereceleri ve dejenerasyon seviyeleri açısından *VDR* ve *Aggrecan* gen polimorfizmlerinin fenotip üzerine tek tek ya da birlikte yaptıkları etki açısından fark görülmemiştir. Ancak genlerdeki polimorfik değişiklikler, ekspresyon seviyesini etkileyebileceği için disk dokusundaki *VDR* ve *Aggrecan* proteinlerinin de incelenmesi daha anlamlı sonuçların ortaya konmasına yardımcı olabilir. Böylelikle polimorfizm analizleri ve genlerin fonksiyonlarına yönelik çalışmaların birlikte değerlendirilmesi bu genlerin disk dejenerasyonu oluşumu üzerine olan etkilerinin ortaya konmasına katkı sağlayabilir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada multifaktöriyel bir hastalık olan dejeneratif disk hernisi ile *VDR* geni TaqI, FokI ve *Aggrecan* geni VNTR polimorfizmlerinin ilişkisi araştırılmıştır.

Çalışmamızın verileri doğrultusunda:

1. Disk herniasyon tipleri ile *VDR* genine ait TaqI ve FokI genotiplerinin karşılaştırılması sonucu; TT, Tt, FF ve Ff genotipine sahip bireylerde hafif form (protrüzyon tipi) disk herniasyonu ile tt ve ff genotipine sahip bireylerde de ağır form (ekstrüzyon ve sekestrasyon tipi) disk herniasyonu ile anlamlı ilişki tespit edildi.
2. Disk herniasyon tipleri ile *Aggrecan* genine ait alel gruplarının karşılaştırılması sonucu; kısa, normal ve uzun alellere sahip hasta ve kontrol grupları arasında protrüzyon tipi disk açısından anlamlı ilişki tespit edildi.
3. Disk dejenerasyon dereceleri ile *VDR* genine ait genotipler arasında yapılan karşılaştırmada; TT ve FF genotipine sahip bireyler ile disk dejenerasyonunun hafif formları (Grade I-II); tt, ff ve Ff genotipleri ile disk dejenerasyonunun ağır formları (Grade III-IV) arasında anlamlı ilişki bulundu. Tt genotipi ile disk dejenerasyon dereceleri arasında anlamlı ilişki bulunmadı.
4. Disk dejenerasyon dereceleri ile *Aggrecan* genine ait alel grupları arasında yapılan karşılaştırmada; kısa alel grupları ile Grade III-IV dejenerasyon, normal ve uzun alel grupları ile Grade I-II dejenerasyon açısından anlamlı ilişki tespit edildi.
5. Disk dejenerasyon seviyeleri ile *VDR* genine ait genotipler arasında yapılan karşılaştırmada; TT genotipi ile bir seviye dejenerasyon, Tt ve FF genotipi ile iki seviye dejenerasyon arasında ilişki bulunurken tt, ff ve Ff genotipleri ile disk dejenerasyon seviyeleri arasında anlamlı ilişki bulunmadı.
6. Disk dejenerasyon seviyeleri ile *Aggrecan* genine ait alel grupları arasında yapılan karşılaştırmada; kısa ve normal alel grupları ile iki seviye disk dejenerasyonu arasında anlamlı ilişki tespit edilirken uzun alel grupları ile herhangi bir ilişkiye rastlanmadı.

7. Disk herniasyon tipleri, disk dejenerasyon dereceleri ve dejenerasyon seviyeleri açısından *VDR* ve *Aggrecan* gen polimorfizmlerinin fenotip üzerine tek tek ya da birlikte yaptıkları etki açısından fark görülmedi.
8. *VDR* ve *Aggrecan* gen polimorfizmlerine ait alel frekansları dağılımı açısından fark olmadığı görüldü.

Çalışma sonuçlarımız olgu grubumuzdaki DDH'lı bireylerde disk dejenerasyonu ve disk herniasyonu ile *VDR* geni TaqI, FokI ve *Aggrecan* geni polimorfizmlerinin ilişkili olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda yer alan olgu sayısının azlığı nedeniyle, disk dejenerasyonunun patofizyolojisine gen polimorfizmlerinin katkısının belirlenmesi için fonksiyonel çalışmalar ile birlikte Türk toplumunda daha geniş olgu serileriyle vaka-kontrol çalışmaları yapılmalıdır.

## 6. ÖZET

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### **Lomber Dejeneratif Disk Hastalığı İle Vitamin D Reseptör ve Aggrecan Gen Polimorfizmleri Arasındaki İlişkinin İncelenmesi**

**Betül ESER**

**Tıbbi Genetik Anabilim Dalı**

**Doktora Tezi / Konya, 2009**

Bu çalışmada, dejeneratif disk hernili genç (20–30 yaş) hastalarda *VDR* ve *Aggrecan* gen polimorfizmleri ile Dejeneratif Disk Hernisi (DDH) arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

DDH, en sık rastlanan omurga hastalıklarından biridir. Hastalığın etyolojisinde yaş, sigara, mesleki etmenler, vibrasyon travması, obezite gibi çevresel faktörler yanında genetik faktörler de suçlanmaktadır.

*VDR* ve *Aggrecan* proteinleri kemik ve kıkırdak yapının ana bileşenleridir. *VDR* geninde yer alan FokI ve TaqI polimorfizmleri ve *Aggrecan* geninde yer alan VNTR polimorfizmleri intervertebral diskin ekstraselüler matriksinin yapısını ve miktarını etkileyebilir ve disk dejenerasyonu oluşumuna katkıda bulunabilir.

Çalışmamızda DDH'lı hasta grubunun MR görüntüleme yöntemi ile disk dejenerasyonunun seviyesi ve derecesi ile disk herniasyonunun tipi açısından sınıflandırılmasını takiben 150 DDH'lı hasta ve 150 sağlıklı bireyde *VDR* ve *Aggrecan* gen polimorfizmleri incelendi.

*VDR* genine ait TT, Tt, FF ve Ff genotipine sahip bireylerde hafif form (protrüzyon tipi), tt ve ff genotipine sahip bireylerde de ağır form (ekstrüzyon ve sekestrasyon tipi) disk herniasyonu ile anlamlı ilişki bulundu. TT ve FF genotipine sahip bireyler ile disk dejenerasyonunun hafif formları (Grade I-II); tt, ff ve Ff genotipleri ile disk dejenerasyonunun ağır formları (Grade III-IV) arasında anlamlı ilişki tespit edildi. TT genotipi ile bir seviye dejenerasyon, Tt ve FF genotipi ile iki seviye dejenerasyon arasında ilişki bulunurken tt, ff ve Ff genotipleri ile disk dejenerasyon seviyeleri arasında ilişki bulunmadı. *Aggrecan* genine ait kısa, normal ve uzun alel grupları ile protrüzyon tipi disk açısından anlamlı ilişki bulundu. *Aggrecan* genine ait kısa alel grupları ile Grade III-IV dejenerasyon, normal ve uzun alel grupları ile Grade I-II dejenerasyon açısından anlamlı ilişki tespit edildi. *Aggrecan* genine ait kısa ve normal alel grupları ile iki seviye disk dejenerasyonu arasında anlamlı ilişki tespit edilirken uzun alel grupları ile ilişkiye rastlanmadı. Disk herniasyon tipleri, disk dejenerasyon dereceleri ve dejenerasyon seviyeleri açısından *VDR* ve *Aggrecan* gen polimorfizmlerinin fenotip üzerine tek tek ya da birlikte yaptıkları etki açısından fark görülmedi. Çalışma sonuçlarımız DDH'lı bireylerde disk dejenerasyonu ve disk herniasyonu ile *VDR* geni TaqI, FokI ve *Aggrecan* geni polimorfizmlerinin ilişkili olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Aggrecan; dejeneratif disk hernisi; polimorfizm; VDR

## 7. SUMMARY

T.C.  
Selcuk University  
Health Science Institute

### **Investigation of Assosiation BetweenThe Polymorphisms of Vitamin D Receptor and Aggrecan Genes with Lumbar Degenerative Disc Disease**

**Betül ESER**

**Department of Medical Genetic**

**Doctor of Philosopy Thesis / Konya, 2009**

The aim of this study is to investigate if there is any association between the polymorphisms of *VDR* and *Aggrecan* genes and degenerative disc hernia in young patients with Degenerative Disc Hernia (DDH).

Degenerative disc hernia is one of most common spine disorders. Some environmental factors, such as age, smoking, occupational factors, vibrational trauma, obesity, as well as genetic factors have been implicated in the etiology of DDH.

Aggrecan and VDR proteins are the main components of bone and cartilage. The VNTR polymorphisms in the *Aggrecan* gene and the Single Nucleotide polymorphisms in the *VDR* gene named TaqI and FokI may influence the structure and quantity of the extracellular matrix of the intervertebral disc, and contribute to the development of disc degeneration.

In our study, VDR and Aggrecan polymorphisms were investigated in a total of 150 patients with DDH and 150 healthy individuals following the classification of the disc degeneration regarding the level, degree and the type of the disc hernia.

An association were found in the ones having *VDR* gene TT, Tt, FF and Ff genotypes with the moderate form of disc herniation (protrusion type), whereas the patients having tt and ff genotypes with severe form (ekstrüzyon ve sekestrasyon tipi) of the disease. Also, an association were observed between TT and FF genotypes in *VDR* gene and the moderate (mild) forms of the disease (Grades I-II); and tt, ff and Ff genotypes and severe forms of disc degeneration (Grades III-IV). In addition, while there was an association between TT genotype and Level 1 degeneration, and Tt and FF genotypes and Level 2 degeneration; no association was found between tt, ff and Ff genotypes and any of the disc degeneration levels. There was also an association between short, normal and long allele groups in *Aggrecan* gene and protrusion type in terms of disc. Additionally, an association were found between short alele groups in *Aggrecan* gene and Grade III-IV degeneration, as well as normal and long allele groups and Grade I-II degeneration. On the other hand, while an association was determined between the short and normal allele groups of *Aggrecan* gene and Level 2 disc degeneration, no association was found with long allele group. However, no significant difference was seen in the effect of *VDR* and *Aggrecan* gene polymorphisms on phenotypes either individually or in combination regarding disc herniation types, disc degeneration degrees and levels of degeneration. The findings of this study revealed that TaqI, FokI polymorphisms in *VDR* gene and *Aggrecan* gene polymorphisms are associated with disc degeneration and disc herniation in patients with DDH.

**Key Words:** Aggrecan; degenerative disc hernia; polymorphism; VDR

## 8. KAYNAKLAR

1. Ala-Kokko L. Genetic risk factors for lumbar disc disease. *Ann Med.* 2002;34(1):42-7.
2. Annunen S, Paasilta P, Lohiniva J, Perälä M, Pihlajamaa T, Karppinen J, Tervonen O, Kröger H, Lähde S, Vanharanta H, Ryhänen L, Göring HH, Ott J, Prockop DJ, Ala-Kokko L. An allele of COL9A2 associated with intervertebral disc disease. *Science.* 1999;285(5426):409-12.
3. Antoniou J, Steffen T, Nelson F, Winterbottom N, Hollander AP, Poole RA, Aebi M, Alini M. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. *J Clin Invest.* 1996;98(4):996-1003.
4. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, Tonai T, Nishisho T, Mori S, Takeda E. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res.* 1997;12(6):915-21.
5. Armstrong JR: Lumbar Disk Lesions. Edinburg, E. S. Livingstone Ltd; 1967.
6. Aydın S, Sivrioğlu K, Lomber disk hastalıklarında genetik. *Türkiye Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Dergisi.* 2003;49(4):22-28.
7. Baldwin CT, Reginato AM, Prockop DJ. A new epidermal growth factor-like domain in the human core protein for the large cartilage-specific proteoglycan. Evidence for alternative splicing of the domain. *J Biol Chem.* 1989;264(27):15747-50.
8. Battié MC, Videman T, Gibbons LE, Fisher LD, Manninen H, Gill K. 1995 Volvo Award in clinical sciences. Determinants of lumbar disc degeneration. A study relating lifetime exposures and magnetic resonance imaging findings in identical twins. *Spine.* 1995;20(24):2601-12.
9. Battié MC, Videman T. Lumbar disc degeneration: epidemiology and genetics. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88(2):3-9.
10. Beck L, Silve C. Molecular aspects of renal tubular handling and regulation of inorganic sulfate. *Kidney Int.* 2001;59(3):835-45.
11. Bell J. The Polymerase Chain Reaction. *Immunology Today* 1989;10:351-55.
12. Bid HK, Mishra DK, Mittal RD. Vitamin-D receptor (VDR) gene (Fok-I, Taq-I and Apa-I) polymorphisms in healthy individuals from north Indian population. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2005;6(2):147-52.
13. Bodian DL, Chan TF, Poon A, Schwarze U, Yang K, Byers PH, Kwok PY, Klein TE. Mutation and polymorphism spectrum in osteogenesis imperfecta type II: implications for genotype-phenotype relationships. *Hum Mol Genet.* 2009;18(3):463-71.
14. Bolt MJ, Liu W, Qiao G, Kong J, Zheng W, Krausz T, Cs-Szabo G, Sitrin MD, Li YC. Critical role of vitamin D in sulfate homeostasis: regulation of the sodium-sulfate cotransporter by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;287(4):744-9.
15. Chan D, Song Y, Sham P, Cheung KM. Genetics of disc degeneration. *Eur Spine J.* 2006;3:317-25.
16. Cheung KM, Chan D, Karppinen J, Chen Y, Jim JJ, Yip SP, Ott J, Wong KK, Sham P, Luk KD, Cheah KS, Leong JC, Song YQ. Association of the Taq I allele in vitamin D receptor with degenerative disc disease and disc bulge in a Chinese population. *Spine.* 2006;31(10):1143-8.

17. Cockerill FJ, Hawa NS, Yousaf N, Hewison M, O'Riordan JL, Farrow SM. Mutations in the vitamin D receptor gene in three kindreds associated with hereditary vitamin D resistant rickets. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3156-60.
18. Collins, FS, Brooks, LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res.* 1998;8(12):1229-31.
19. Comper WD, Laurent TC. Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol Rev.* 1978;58(1):255-315.
20. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(9):684-700.
21. Doege KJ, Sasaki M, Kimura T, Yamada Y. Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. *J Biol Chem.* 1991;266(2):894-902.
22. Doege KJ, Coulter SN, Meek LM, Maslen K, Wood JG. A human-specific polymorphism in the coding region of the aggrecan gene. Variable number of tandem repeats produce a range of core protein sizes in the general population. *J Biol Chem.* 1997;272(21):13974-9.
23. Faraco JH, Morrison NA, Baker A, Shine J, Frossard PM. A polymorphism at the human vitamin D receptor gene locus. *Nucleic Acids Res.* 1989;17:2150.
24. Fässler R, Schnegelsberg PN, Dausman J, Shinya T, Muragaki Y, McCarthy MT, Olsen BR, Jaenisch R. Mice lacking alpha 1 (IX) collagen develop noninflammatory degenerative joint disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(11):5070-4.
25. Fernandes I, Hampson G, Cahours X, Morin P, Coureau C, Couette S, Prie D, Biber J, Murer H, Friedlander G, Silve C. Abnormal sulfate metabolism in vitamin D-deficient rats. *J Clin Invest.* 1997;100(9):2196-203.
26. Fosang AJ, Hardingham TE. Isolation of the N-terminal globular protein domains from cartilage proteoglycans. Identification of G2 domain and its lack of interaction with hyaluronate and link protein. *Biochem J.* 1989;261(3):801-9.
27. Frymoyer JW. Lumbar disk disease: epidemiology. *Instr Course Lect.* 1992;41:217-23.
28. Fülöp C, Walcz E, Valyon M, Glant TT. Expression of alternatively spliced epidermal growth factor-like domains in aggrecans of different species. Evidence for a novel module. *J Biol Chem.* 1993;268(23):17377-83.
29. Goupille P, Jayson MI, Valat JP, Freemont AJ. Matrix metalloproteinases: the clue to intervertebral disc degeneration? *Spine.* 1998;23(14):1612-26.
30. Grant SF, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat Genet.* 1996;14(2):203-5.
31. Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Feldman D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res.* 1996;11(12):1835-40.
32. Gruber HE, Hanley EN Jr. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc. Comparison of surgical specimens with normal controls. *Spine.* 1998;23(7):751-7.
33. Haro H, Crawford HC, Fingleton B, MacDougall JR, Shinomiya K, Spengler DM, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase-3-dependent generation of a macrophage chemoattractant in a model of herniated disc resorption. *J Clin Invest.* 2000;105(2):133-41.

34. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res.* 1998;13(3):325-49.
35. Hawa NS, Cockerill FJ, Vadher S, Hewison M, Rut AR, Pike JW, O'Riordan JL, Farrow SM. Identification of a novel mutation in hereditary vitamin D-resistant rickets causing exon skipping. *Clin Endocrinol* 1996;45:85-92.
36. Heikkilä JK, Koskenvuo M, Heliövaara M, Kurppa K, Riihimäki H, Heikkilä K, Rita H, Videman T. Genetic and environmental factors in sciatica. Evidence from a nationwide panel of 9365 adult twin pairs. *Ann Med.* 1989;21(5):393-8.
37. Heliövaara M, Impivaara O, Sievers K, Melkas T, Knekt P, Korpi J, Aromaa A. Lumbar disc syndrome in Finland. *J Epidemiol Community Health.* 1987 Sep;41(3):251-8.
38. Horner HA, Urban JP. 2001 Volvo Award Winner in Basic Science Studies: Effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc. *Spine.* 2001;26(23):2543-9.
39. Hughes MR, Malloy PJ, Kieback DG, Kesterson RA, Pike JW, Feldman D, O'Malley BW. Point mutations in the human vitamin D receptor gene associated with hypocalcemic rickets. *Science.* 1988;242(4886):1702-5.
40. Hutchinson PE, Osborne JE, Lear JT, Smith AG, Bowers PW, Morris PN, Jones PW, York C, Strange RC, Fryer AA. Vitamin D receptor polymorphisms are associated with altered prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* 2000;6(2):498-504.
41. Inkinen RI, Lammi MJ, Lehmonen S, Puustjärvi K, Kääpä E, Tammi MI. Relative increase of biglycan and decorin and altered chondroitin sulfate epitopes in the degenerating human intervertebral disc. *J Rheumatol.* 1998;25(3):506-14.
42. Ishihara H, Urban JP. Effects of low oxygen concentrations and metabolic inhibitors on proteoglycan and protein synthesis rates in the intervertebral disc. *J Orthop Res.* 1999;17(6):829-35.
43. Jim JJ, Noponen-Hietala N, Cheung KM, Ott J, Karppinen J, Sahraravand A, Luk KD, Yip SP, Sham PC, Song YQ, Leong JC, Cheah KS, Ala-Kokko L, Chan D. The TRP2 allele of COL9A2 is an age-dependent risk factor for the development and severity of intervertebral disc degeneration. *Spine.* 2005;30(24):2735-42.
44. Jones G, White C, Sambrook P, Eisman J. Allelic variation in the vitamin D receptor, lifestyle factors and lumbar spinal degenerative disease. *Ann Rheum Dis.* 1998;57(2):94-9.
45. Kämäräinen OP, Solovieva S, Vehmas T, Luoma K, Leino-Arjas P, Riihimäki H, Ala-Kokko L, Männikkö M. Aggrecan core protein of a certain length is protective against hand osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(10):1075-80.
46. Kanemoto M, Hukuda S, Komiya Y, Katsuura A, Nishioka J. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 human intervertebral discs. *Spine.* 1996;21(1):1-8.
47. Kawaguchi Y, Osada R, Kanamori M, Ishihara H, Ohmori K, Matsui H, Kimura T. Association between an aggrecan gene polymorphism and lumbar disc degeneration. *Spine.* 1999;24(23):2456-60.
48. Kawaguchi Y, Kanamori M, Ishihara H, Ohmori K, Matsui H, Kimura T. The association of lumbar disc disease with vitamin-D receptor gene polymorphism. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84-A(11):2022-8.

49. Keen RW, Hart DJ, Lanchbury JS, Spector TD. Association of early osteoarthritis of the knee with a Taq I polymorphism of the vitamin D receptor gene. *Arthritis Rheum.* 1997;40(8):1444-9.
50. Keen RW, Woodford-Richens KL, Grant SF, Ralston SH, Lanchbury JS, Spector TD. Association of polymorphism at the type I collagen (COL1A1) locus with reduced bone mineral density, increased fracture risk, and increased collagen turnover. *Arthritis Rheum.* 1999;42(2):285-90.
51. Kimura T, Nakata K, Tsumaki N, Miyamoto S, Matsui Y, Ebara S, Ochi T. Progressive degeneration of articular cartilage and intervertebral discs. An experimental study in transgenic mice bearing a type IX collagen mutation. *Int Orthop.* 1996;20(3):177-81.
52. Kirk KM, Doege KJ, Hecht J, Bellamy N, Martin NG. Osteoarthritis of the hands, hips and knees in an Australian twin sample--evidence of association with the aggrecan VNTR polymorphism. *Twin Res.* 2003;6(1):62-6.
53. Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Shiraki M, Orimo H. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res.* 1996;11(3):306-11.
54. Korenberg JR, Chen XN, Doege K, Grover J, Roughley PJ. Assignment of the human aggrecan gene (AGC1) to 15q26 using fluorescence in situ hybridization analysis. *Genomics.* 1993;16(2):546-8.
55. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, et al. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409(6822):860-921.
56. Langdahl BL, Ralston SH, Grant SF, Eriksen EF. An Sp1 binding site polymorphism in the COL1A1 gene predicts osteoporotic fractures in both men and women. *J Bone Miner Res.* 1998;13:1384-9.
57. Lewin B. *Genes VIII.* 1st ed. New Jersey, Pearson Education, Inc; 2004; p. 53-54.
58. Lucas PR: Low back pain. *Surg Clin North Am.* 1983;63:515-28.
59. Malloy PJ, Pike JW, Feldman D. Hereditary 1,25-dihydroxy vitamin D-resistant rickets. In: Feldman D, Glorieux FH, Pike JW editors. *Vitamin D.* San Diego: Academic Press, Inc; 1997. p. 765-87.
60. Malloy PJ, Eccleshall TR, Gross C, Van Maldergem L, Bouillon R, Feldman D. Hereditary vitamin D resistant rickets caused by a novel mutation in the vitamin D receptor that results in decreased affinity for hormone and cellular hyporesponsiveness. *J Clin Invest.* 1997;99(2):297-304.
61. Maniadakis N, Gray A. The economic burden of back pain in the UK. *Pain.* 2000;84(1):95-103.
62. Mann V, Hobson EE, Li B, Stewart TL, Grant SF, Robins SP, Aspden RM, Ralston SH. A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J Clin Invest.* 2001;107(7):899-907.
63. Mann V, Ralston SH. Meta-analysis of COL1A1 Sp1 polymorphism in relation to bone mineral density and osteoporotic fracture. *Bone.* 2003;32(6):711-7.
64. Markovich D. Physiological roles and regulation of mammalian sulfate transporters. *Physiol Rev.* 2001;81(4):1499-533.
65. Matsui H, Kanamori M, Ishihara H, Yudoh K, Naruse Y, Tsuji H. Familial predisposition for lumbar degenerative disc disease. A case-control study. *Spine.* 1998;23(9):1029-34.

- 66.Melrose J, Ghosh P, Taylor TK, Latham J, Moore R. Topographical variation in the catabolism of aggrecan in an ovine annular lesion model of experimental disc degeneration. *J Spinal Disord.* 1997;10(1):55-67.
- 67.Mio F, Chiba K, Hirose Y, Kawaguchi Y, Mikami Y, Oya T, Mori M, Kamata M, Matsumoto M, Ozaki K, Tanaka T, Takahashi A, Kubo T, Kimura T, Toyama Y, Ikegawa S. A functional polymorphism in COL11A1, which encodes the alpha 1 chain of type XI collagen, is associated with susceptibility to lumbar disc herniation. *Am J Hum Genet.* 2007;81(6):1271-7.
- 68.Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, Inoue Y, Morita K, Takeda E, Pike JW. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol.* 1997;11(8):1165-79.
- 69.Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6665-9.
- 70.Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature.* 1994;367(6460):284-7.
- 71.Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro:polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73
- 72.Muragaki Y, Mariman EC, van Beersum SE, Perälä M, van Mourik JB, Warman ML, Olsen BR, Hamel BC. A mutation in the gene encoding the alpha 2 chain of the fibril-associated collagen IX, COL9A2, causes multiple epiphyseal dysplasia (EDM2).*Nat Genet.* 1996;12(1):103-5.
- 73.Nakata K, Ono K, Miyazaki J, Olsen BR, Muragaki Y, Adachi E, Yamamura K, Kimura T. Osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia in transgenic mice expressing alpha 1(IX) collagen chains with a central deletion. *Proc Natl Acad Sci USA.*1993;90(7):2870-4.
- 74.Nerlich AG, Boos N, Wiest I, Aebi M. Immunolocalization of major interstitial collagen types in human lumbar intervertebral discs of various ages. *Virchows Arch.* 1998;432(1):67-76.
- 75.Nojonen-Hietala N, Kyllönen E, Männikkö M, Ilkko E, Karppinen J, Ott J, Ala-Kokko L, Sequence variations in the collagen IX and XI genes are associated with degenerative lumbar spinal stenosis. *Ann Rheum Dis* 2003;62;1208-1214.
- 76.Oishi Y, Shimizu K, Katoh T, Nakao H, Yamaura M, Furuko T, Narusawa K, Nakamura T. Lack of association between lumbar disc degeneration and osteophyte formation in elderly japanese women with back pain. *Bone.* 2003;32(4):405-11.
- 77.Öztop F. İntervertebral disk nedir? Ne değildir? In: Özer AF editor. *Lomber Disk Hastalığı.* 2nd ed. İstanbul: Logos Yayıncılık; 2001. p. 18-28.
- 78.Paassilta P, Pihlajamaa T, Annunen S, Brewton RG, Wood BM, Johnson CC, Liu J, Gong Y, Warman ML, Prockop DJ, Mayne R, Ala-Kokko L. Complete sequence of the 23-kilobase human COL9A3 gene. Detection of Gly-X-Y triplet deletions that represent neutral variants. *J Biol Chem.* 1999;274(32):22469-75.
- 79.Paassilta P, Lohiniva J, Annunen S, Bonaventure J, Le Merrer M, Pai L, Ala-Kokko L. COL9A3: A third locus for multiple epiphyseal dysplasia. *Am J Hum Genet.* 1999;64(4):1036-44.
- 80.Park K, Woo M, Nam J, Kim JC. Start codon polymorphisms in the vitamin D receptor and colorectal cancer risk. *Cancer Lett.* 2006;237(2):199-206.
- 81.Paulsson M, Yurchenco PD, Ruben GC, Engel J, Timpl R. Structure of low density heparan sulfate proteoglycan isolated from a mouse tumor basement membrane. *J Mol Biol.* 1987;197(2):297-313.

82. Pihlajamaa T, Vuoristo MM, Annunen S, Perälä M, Prockop DJ, Ala-Kokko L. Human COL9A1 and COL9A2 genes. Two genes of 90 and 15 kb code for similar polypeptides of the same collagen molecule. *Matrix Biol.* 1998;17(3):237-41.
83. Pluijm SM, van Essen HW, Bravenboer N, Uitterlinden AG, Smit JH, Pols HA, Lips P. Collagen type I alpha1 Sp1 polymorphism, osteoporosis, and intervertebral disc degeneration in older men and women. *Ann Rheum Dis.* 2004;63(1):71-7.
84. Pope MH, Goh KL, Magnusson ML. Spine ergonomics. *Annu Rev Biomed Eng.* 2002;4:49-68.
85. Reitz C, van Rooij FJ, Soares HD, de Maat MP, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM. Matrix metalloproteinase 3 haplotypes and plasma amyloid beta levels: The Rotterdam Study. *Neurobiol Aging.* 2008. [Epub ahead of print]
86. Riggs BL. Vitamin D-receptor genotypes and bone density. *N Engl J Med.* 1997;337(2):125-6.
87. Roberts S, Caterson B, Menage J, Evans EH, Jaffray DC, Eisenstein SM. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc. *Spine.* 2000;25(23):3005-13.
88. Roughley P, Martens D, Rantakokko J, Alini M, Mwale F, Antoniou J. The involvement of aggrecan polymorphism in degeneration of human intervertebral disc and articular cartilage. *Eur Cell Mater.* 2006;11:1-7.
89. Salinas Valley Memorial Healthcare System. Regional spine center. Available from [www.svmh.com/spine/causes\\_mechanical.asp](http://www.svmh.com/spine/causes_mechanical.asp).
90. Sambrook PN, MacGregor AJ, Spector TD. Genetic influences on cervical and lumbar disc degeneration: a magnetic resonance imaging study in twins. *Arthritis Rheum.* 1999;42(2):366-72.
91. Sasaki M, Tanaka Y, Sakuragi N, Dahiya R. Six polymorphisms on estrogen receptor 1 gene in Japanese, American and German populations. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003;59(5-6):389-93.
92. Schneiderman G, Flannigan B, Kingston S, Thomas J, Dillin WH, Watkins RG. Magnetic resonance imaging in the diagnosis of disc degeneration: Correlation with discography. *Spine* 1987;12:276-81.
93. Schubert EL, Lee MK, Newman B, King MC. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the estrogen receptor gene and breast cancer susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999;71(1-2):21-7.
94. Sherry ST, Ward M, Sirotkin K. dbSNP-database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome Res.* 1999 Aug;9(8):677-9.
95. Shupnik MA, Pitt LK, Soh AY, Anderson A, Lopes MB, Laws ER Jr: Selective expression of estrogen receptor alpha and beta isoforms in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998,83:3965-3972.
96. Solovieva S, Lohiniva J, Leino-Arjas P, Raininko R, Luoma K, Ala-Kokko L, Riihimäki H. COL9A3 gene polymorphism and obesity in intervertebral disc degeneration of the lumbar spine: evidence of gene-environment interaction. *Spine.* 2002;27(23):2691-6.
97. Solovieva S, Noponen N, Männikkö M, Leino-Arjas P, Luoma K, Raininko R, Ala-Kokko L, Riihimäki H. Association between the aggrecan gene variable number of tandem repeats polymorphism and intervertebral disc degeneration. *Spine.* 2007;32(16):1700-5.
98. Sztrolovics R, Alini M, Roughley PJ, Mort JS. Aggrecan degradation in human intervertebral disc and articular cartilage. *Biochem J.* 1997;326 (Pt1):235-41.

99. Takahashi M, Haro H, Wakabayashi Y, Kawaguchi T, Komori H, Shinomiya K. The association of degeneration of the intervertebral disc with 5a/6a polymorphism in the promoter of the human matrix metalloproteinase-3 gene. *J Bone Joint Surg Br.* 2001;83(4):491-5.
100. Tilkeridis C, Bei T, Garantziotis S, Stratakis CA. Association of a COL1A1 polymorphism with lumbar disc disease in young military recruits. *J Med Genet.* 2005;42(7):e44.
101. Tortorella MD, Malfait AM, Deccico C, Arner E. The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001;9(6):539-52.
102. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, Yue F, McGuigan FE, Grant SF, Hofman A, van Leeuwen JP, Pols HA, Ralston SH. Relation of alleles of the collagen type I alpha 1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 1998;338(15):1016-21.
103. Uitterlinden AG, Fang Y, Bergink AP, van Meurs JB, van Leeuwen HP, Pols HA. The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in bone biology. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;197(1-2):15-21.
104. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene.* 2004;338(2):143-56.
105. Urban JP, Roberts S. Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(3):120-30.
106. Valhmu WB, Palmer GD, Rivers PA, Ebara S, Cheng JF, Fischer S, Ratcliffe A. Structure of the human aggrecan gene: exon-intron organization and association with the protein domains. *Biochem J.* 1995;309 (Pt 2):535-42.
107. Van der Kraan PM, Vitters EL, de Vries BJ, van den Berg WB. High susceptibility of human articular cartilage glycosaminoglycan synthesis to changes in inorganic sulfate availability. *J Orthop Res.* 1990;8(4):565-71.
108. Varlotta GP, Brown MD, Kelsey JL, Golden AL. Familial predisposition for herniation of a lumbar disc in patients who are less than twenty-one years old. *J Bone Joint Surg Am.* 1991;73(1):124-8.
109. Videman T, Leppävuori J, Kaprio J, Battié MC, Gibbons LE, Peltonen L, Koskenvuo M. Intragenic polymorphisms of the vitamin D receptor gene associated with intervertebral disc degeneration. *Spine.* 1998;23(23):2477-85.
110. Videman T, Gibbons LE, Battié MC, Maravilla K, Vanninen E, Leppävuori J, Kaprio J, Peltonen L. The relative roles of intragenic polymorphisms of the vitamin d receptor gene in lumbar spine degeneration and bone density. *Spine.* 2001;26(3):7-12.
111. Watanabe H, Nakata K, Kimata K, Nakanishi I, Yamada Y. Dwarfism and age-associated spinal degeneration of heterozygote cmd mice defective in aggrecan. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(13):6943-7.
112. Weichetova M, Stepan JJ, Michalska D, Haas T, Pols HA, Uitterlinden AG. COL1A1 polymorphism contributes to bone mineral density to assess prevalent wrist fractures. *Bone* 2000;26:287-90.
113. Weiler C, Nerlich AG, Zipperer J, Bachmeier BE, Boos N. 2002 SSE Award Competition in Basic Science: expression of major matrix metalloproteinases is associated with intervertebral disc degradation and resorption. *Eur Spine J.* 2002;11(4):308-20.
114. Wiesel SW, Weinstein JN, Herkowitz H, Dvorak J, Bell G. *The Lumbar Spine.* 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996:271-81.

115. Ye S, Watts GF, Mandalia S, Humphries SE, Henney AM. Preliminary report: genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Br Heart J.* 1995;73(3):209-15.
116. Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol.* 2000;19(7):623-9
117. Zmuda JM, Cauley JA, Ferrell RE. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. *Epidemiol Rev.* 2000;22(2):203-17.

## 9.ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Konya’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Konya’da tamamladı. 1996 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi’nden mezun oldu. 2004–2005 bahar döneminde Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde başladığı Tıbbi Genetik Doktora eğitimine, 2007–2008 güz döneminden itibaren Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda devam etti.