



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

İNFLAMATUVAR BAĞIRSAK HASTALIKLARININ
PATOGENEZİNDE MİTOKONDRIYAL DNA(mt DNA)
NİKOTİNAMİD ADENİN DİNÜKLEOTİD DEHİDROJENAZ 5 (ND-5)
GEN DİZİ DEĞİŞİKLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. ÇİNARE SEFEROVA

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL, 2015



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

İNFLAMATUVAR BAĞIRSAK HASTALIKLARININ
PATOGENEZİNDE MİTOKONDRIYAL DNA(mt DNA)
NİKOTİNAMİD ADENİN DİNÜKLEOTİD DEHİDROJENAZ 5 (ND-5)
GEN DİZİ DEĞİŞİKLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. ÇİNARE SEFEROVA

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. HAKAN AKIN

ETİK KURUL PROTOKOL NO:09.2014.0019,TARİH:07.03.2014

İSTANBUL, 2015

ÖNSÖZ

Öncelikle 4 yıllık İç Hastalıkları Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, asistanlık hayatımda manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli hocam, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. İ. Çetin Özener'e; asistanlığımın ilk başından itibaren bana kendimi yabancı hissettirmeyen, hem bilimsel anlamda, hem de her konudaki tavsiye ve destekleri ile her zaman yanımda olan Gastroenteroloji Bilim Dalı başkanımız Prof. Dr. O. Cavit Özdoğan'a; bitmek bilmeyen enerjisiyle her zaman bize yol gösteren, iş-toplumsal ve bireysel ahlak yönünden örnek aldığım, değerli hocam Prof. Dr. Neşe İmeryüz'e, ilk defa yer aldığım tez sürecinde yol göstericim olan, bilimselliği ile örnek bir akademisyen olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli tez hocam Doç. Dr. Hakan Akın'a, ayrıca, bu çalışmada en büyük desteği ve emeği geçen, zor zamanlarımızda yanımda olan Yrd. Doç. Dr. Fatih Eren hocamıza ve ekibine derin teşekkürlerimi arz ederim.

Dört yıllık İç Hastalıkları uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalıştığım, gerektiğinde yardımlarını esirgemeyen kıdemli, eş kıdemli ve çömez asistan arkadaşlarıma ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde en büyük ve yeri doldurulamaz payı olan, maddi ve manevi sıkıntıları olmasına rağmen eğitimim için elinden geleni karşılıksız olarak yapan, doğruluktan, dürüstlükten ve çalışmaktan ödün vermemeyi öğreten sevgili anneme ve babama teşekkürümü borç bilirim.

Temmuz 2015

Dr. Çinare Seferova

PROJE ÖZETİ

İnflamatuvar Bağırsak Hastalıklarından (İBH) Ülseratif Kolit (ÜK) ve Crohn Hastalığı (CH), mukozada düşük Adenozin Trifosfat (ATP) ile karakterize bir hastalık grubudur. ATP miktarındaki bu düşüş mitokondri fonksiyon bozukluğuyla ilişkilidir. Bu yüzden İBH'ların genetik patogenezinde önemli rol oynayabilecek faktörlerden biri, diğer inflamatuvar hastalıklarda da olduğu gibi mitokondridir. Mitokondriyal enerji metabolizmasını etkileyen SLC22A5 ve UCP2 genlerine ait nükleotit varyantlarının Ülseratif Kolit mukozasında oksidatif kompleks aktivitesinin azalması ve böylece mukozal ATP seviyesinin düşüklüğü ile ilişkili olduğu ortaya çıkarılmıştır. Son yıllarda önemli bir gelişme olarak mitokondriyal DNA polimorfizmlerinin mitokondriyal oksidatif fosforilasyon aktivitesini önemli ölçüde etkilediği, deneysel kolitteki inflamasyonun azalmasıyla ilişkili olduğu ve artmış mitokondriyal enerji metabolizmasının bağırsak kriptlerindeki hücrel koruyucu etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Bu çalışmadaki amacımız ilk defa mtDNA ND5 geni dizi değişikliklerinin incelenerek İBH ile olası yatkınlık ve risk ilişkilerini araştırmaktır.

Çalışmaya 99 ÜK, 101 CH olan hasta ve 89 kontrol birey alındı, kanlarından mitokondriyal DNA izole edildi. Amerikan Ulusalmerkezli Biyoteknoloji Enstitüsü (NCBI) gen bankasında minör allel frakansı > %10 olan polimorfizmler ND5 geninde mtDNA 13466-14225 nükleotid arası olduğu saptanmış ve bu çalışmada araştırılmasına karar verildi. Tüm dizi değişikliklerinin bulunduğu bölge tespit edilip, bu bölgenin amplifikasyonu için özel primerler tasarlandı. Hedef bölgenin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile amplifikasyonu optimize edildikten sonra hedef bölgenin çift yönlü "Sanger" dizileme analizi yapıldı ve bölgedeki tüm dizi değişiklikleri özel bilgisayar yazılımı ile tayin edildi.

MtDNA 13780 A/G polimorfizmi Crohn hastalarında anlamlı bulunmuştur ve hastalıkla ilişkili değerlendirmede istatistiksel olarak

anamlılık düzeyine ulaşmıştır ($p= 0,0380$; Odds ratio= 0. 1321, 95% Cİ: 0,01618 to 1.078). Diğer bir istatistiksel olarak anlamlı bulunan mt DNA 14070 A/G polimorfizmidir. Bu genetik polimorfizm hem ÜK hem de CH 'da koruyucu etkiye ulaşacak istatistiksel değere sahiptir. ÜK 'de $p< 0.04$, CH 'da $p<0.02$ bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: İBH, Ülseratif Kolit, mitokondri, ND5 gen polimorfizmi, ROS (reaktif oksijen metabolitleri), Kompleks I (NADH dehidrogenaz),OXPHOS hastalıkları.

ABSTRACT

Ulcerative colitis (UC) and Crohn's Disease constitute the Inflammatory Bowel Disease (IBD) group which are characterized by at low adenosine triphosphate (ATP) in mucous membranes. The reduction in the amount of ATP is associated with the disorder of mitochondrial function. So one of the factors that may play an important role in the pathogenesis of IBD genetics is the mitochondria, as in other inflammatory diseases. The nucleotide variants affecting mitochondrial energy metabolism in UCP 2 and SLC22A5 genes have been shown to be associated with the reduction of oxidative complex activity and with the impairment of the mucosal ATP levels in Ulcerative Colitis mucosa.

It has been shown that mitochondrial DNA polymorphisms has significant influence in mitochondrial oxidative phosphorylation activity. MtDNA polymorphisms were associated with inflammation reduction in experimental colitis and elevated mitochondrial energy metabolism which was found to have a cell protective effect of the crypts in intestine. Our aim in this study is to investigate the possible relationship between IBD and mtDNA ND5 nucleotide variations.

99 patients with Ulcerative Colitis, 101 patients with Crohn Disease and 89 control subjects were included to the study. Genomic DNA is isolated from all study subjects. Nucleotide variations between mtDNA 13466-14225 nucleotides are detected by Sanger Sequencing method.

MtDNA ND5 gene 13780 A/G polymorphism was significantly associated with Crohn's disease ($p = 0.0380$; odds ratio = 0.1321, 95% CI: 0.01618 to 1.078). mtDNA 14070 A/G polymorphism was detected as a protective for Ulcerative Colitis and Crohn Disease (respectively, $p < 0.04$, CH: $p < 0.02$)

Keywords: İBD, Ulcerative Colitis, mitochondria, ND5 gene polymorphism, ROS (reactive oxygen metabolites), Complex I (NADH dehydrogenase), OXPHOS diseases

Simgeler ve Kısaltmalar:

İBH	İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları
ÜK	Ülseratif Kolit
CH	Crohn Hastalığı
ATP	Adenozin Trifosfat
ND5	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Dehidrojenaz 5
MtDNA	Mitokondriyal Deoksiribonükleik Asit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ROS	Reactive Oxygen Species
OXPHOS	Oxidative Phosphorylation
İL 10	İnterleukin 10
CARD 4	Caspase Recruitment Domain-Containing Protein-4
NOD1	Nucleotide-binding Oligomerization Domain protein 1
HLA	Human Leucocyte Antigen
TLR	Toll-Like Receptors
NF-KB1	Nuclear factor NF-kappa-B1
OCTN1	Organic Cation Transporter, Novel, type 1

ATG16L1	Autophagy related 16-like 1.
PTPN22	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22
NK2	Natural Killer 2
SNP	Single nucleotide polymorphism
PH	Parkinson Hastalığı

İÇİNDEKİLER:

ÖNSÖZ	I
PROJE ÖZETİ.....	II
ABSTRACT.....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	V

1.GİRİŞ, AMAÇ, PROJENİN ÖNEMİ

1.1. PROJE GİRİŞİ.....	1
1.2. PROJE AMACI.....	2
1.3. PROJE ÖNEMİ.....	3
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İBH Epidemiyolojisi.....	4
2.2. İBH Etiyolojisi	5
2.2.1. Çevresel Faktörler.....	5
2.2.2. Genetik Faktörler.....	7
2.3. İBH 'nın Patogenezi.....	10
2.3.1. Mitokondriyal DNA mutasyonlarının İBH patogenezinde yeri.....	12
3.MİTOKONDİRİ VE MİTOKONDİRİYAL HASTALIKLAR.....	16
3.1.Mitokondri Yapısı.....	17
3.2.Mitokondriyal Genetik.....	22
3.3.Mitokondriyal Sendromlar.....	24
4.ARAŞTIRMANIN MATERYAL VE YÖNTEMİ.....	26
4.1.Etik Kurul.....	26
4.2.Çalışma Populasyonu.....	26
4.3.Amplifiye Edilecek Hedef Gen Bölgesinin Seçimi.....	27

4.4.Genomik DNA İzolasyonu.....	27
5.BULGULAR.....	31
5.1 İstatistik Analiz.....	37
6.TARTIŞMA VE SONUC.....	42
7. KAYNAKLAR.....	46

1. GİRİŞ

1.1.PROJE GİRİŞİ:

İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları (İBH), ince ve kalın bağırsağın çeşitli bölge ve katmanlarını tutabilen, kronik inflamasyonla seyreden ancak etiopatogenezi henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamış multifaktöriyel, kronik inflamatuvar bir hastalık grubudur. Genetik yatkınlık, çevresel ve konakçı faktörleri, bağışıklık sisteminin disregülasyonu, bozuk intestinal epitel fonksiyonu, epigenetik faktörler, mikrobiyal ajanlar şu anlanmakta olan etkenler arasındadır. Patogeneziine yönelik çeşitli araştırmalar hızla devam etmektedir. Klasik olarak Ülseratif Kolit (ÜK) ve Crohn Hastalığı (CH) ve her ikisinin arasında yer alan sınıflandırılmamış kolit (eski adı; indeterminate kolit) İBH ortak başlığı altında yer almaktadırlar. İBH'nın başlıca özellikleri: genetik yatkınlık, alevlenme-gerileme dönemleri (1), ekstraintestinal belirtiler ve uzun süreli hastalıkta görülen kanser riskidir. İBH klinik, endoskopik ve histolojik özellikleri ile güncel kılavuzlara göre teşhis edilir. Ülseratif kolitteki inflamatuvar cevap genellikle mukoza ve submukozaya sınırlıdır, kolonu tutar, ancak Crohn hastalığındaki inflamasyon, mukozadan serozaya kadar tüm duvar boyuncaga gastrointestinal kanalın herhangi bir yerinde görülebilir.

Bu gün için İBH 'nın etiopatogenezi ile ilgili olarak geliştirilen en geçerli açıklama; İBH'nın genetik olarak duyarlı bireylerde, birden fazla iç ve dış etkenin katkısı ile normal bağırsak florasına abartılı bir immun yanıt sonucunda ortaya çıktığıdır(2). Bu genetik faktörler arasında mitokondriyal DNA'da gelişen polimorfizmler de son dönemlerde İBH etiopatogenezinde rol aldığı ortaya konulmuştur. Mitokondri hücrede bulunan ikinci büyük organel olup, enerji üretim merkezi olarak kabul ediliyor. Hücre içindeki yaşama işlevleri için gereken enerjinin %95 sağlar. 1960'lı yıllarda mitokondriyal genetik sistemin (mitokondriyal DNA = mtDNA) ve özel ribozomlarının keşfedilmesiyle mitokondrinin hem hücresel fonksiyonları hem de genetik olaylardaki rolü ayrıntıları ile irdelenmeye başlanmıştır. Diğer organellerin aksine mitokondri kendi DNA'sına sahiptir. Kendine has genomu

nedeniyle inflamatuvar hastalıklar, apoptozis ve yaşlanma üzerine etkilerinin olduğu yapılan seri araştırmalarda ortaya konulmuştur(3). Mitokondride glükoz,yağ asidi gibi yüksek enerjili moleküller CO₂ ve H₂O'ya dönüştürülerek metabolize olur, sonucunda enerji kaynağı olarak kullanılan ATP sentez olunur.İnflamatuvar Bağırsak Hastalıklarından ÜK, mukozada düşük ATP ile karakterize bir hastalıktır. ATP miktarındaki bu düşüş mitokondri fonksiyon bozukluğuyla ilişkilidir (4).Bu yüzden İBH patogenezinde önemli rol oynayabilecek faktörlerden biri diğer inflamatuvar hastalıklarda da olduğu gibi mitokondridir. Mitokondriyal enerji metabolizmasını etkileyen SLC22A5 ve UCP2 genlerine ait nükleotit varyantlarınınÜK hastalarının kolon mukozasında oksidatif kompleks aktivitesinin azalması ve böylece mukozal ATP seviyesinin düşüklüğü ile ilişkili olduğu ortaya çıkarılmıştır(5). Son yıllarda önemli bir gelişme olarak mitokondrial DNA polimorfizmlerinin mitokondrial oksidatif fosforilasyon aktivitesini önemli ölçüde etkilediği tespit edilmiştir.Deneysel kolit modelinde inflamasyonun azalmasıyla ilişkili olduğu ve artmış mitokondriyal enerji metabolizmasının bağırsak kriptlerinde hücrel koruyucu etkiye sahip olduğu saptanmıştır(6).

1.2. PROJE AMACI

Ülseratif Kolit başta olmak üzere İnflamatuvar Bağırsak Hastalıklarında ATP üretiminin patogenezinde önemli rol oynadığı bildirilmektedir. ATP üretiminden başlıca sorumlu organel mitokondri olup DNA'sındaki dizi değişikliklerinin enerji üretimi (oksidatif fosforilasyon) ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Son yıllarda yapılan deneysel hayvan çalışmalarında mtDNA dizi değişikliklerinin İBH ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Deneysel hayvan modelinde koruyucu etkisi olan ND3 genindeki polimorfizmleri insanda farklı gen bölgesine denk düşmekte ve insanda homolog olan gen bölgesi araştırıldığında minör alel frekansının %5'in altında olduğu görülmüştür. Ayrıca İBH düşük ATP ile karakterize hastalıklar olduğundan oksidatif fosforilasyon için en gerekli kompleks olan ND kompleksinin incelenmesi gerekli görülmüştür. ND5 geni

en büyük mitokondriyal gen bölgesidir ve bununla beraber artmış mutasyon duyarlılığı vardır. Ayrıca ND5 dizi değişiklikleri birçok inflamatuvar hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Fakat İBH hasta popülasyonuna ait çalışma yoktur.

Bu çalışmadaki amacımız dünyada ilk defa, İBH popülasyonunda mtDNA ND5 geni dizi değişikliklerinin incelenerek İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı ile olası yakınlık ve risk ilişkilerini araştırmaktır.

1.3 PROJE ÖNEMİ

Mitokondriyal ND5 genindeki mutasyonlar oksidatif fosforilasyon hastalıklarının yaygın nedenidir. ND5 geni mtDNA'daki en büyük gen olmakla beraber bu genin mutasyon için duyarlılığı yüksektir(7).

İBH, bugün için bile bilinmezliğini koruyan, genetik-immün-infeksiyöz faktörlerin tetiklediği bir kronik hastalıktır. Patogenezin ortaya konulması ya da buna yardımcı olacak faktörlerin açığa çıkarılması hastalığın tanısı, tedavisiveya gereksiz tedavinin engellenmesi, takibi, koruyucu hekimlik, ve çıkabilecek komplikasyonların önüne geçilmesi açısından çok önemlidir.

İBH çok heterojen belirtilerin yanında klinik süreçte farklı davranışlar sergilemektedir. Ülseratif Kolit, ilk kez 19. yüzyıl sonlarında, infeksiöz kolitten ayırt edilerek, Crohn Hastalığı ise 1932'de Crohn BC. tarafından transmural bir hastalık olarak tanımlandı. Son yıllarda Güney Amerika, Asya ve Afrika'da İBH insidens ve prevalansının arttığı bildirilmektedir. Hastalık tablosunun kronik süreçte devam etmesi, klinik davranışlarda farklılaşma, zamanla eklenen komplikasyonlar hem hastaların değerlendirilmesini hem de maddi hem de manevi açıdan büyük sıkıntılar oluşturmaktadır. ABD'de 1,4 milyondan fazla İBH'sı mevcut(8). Bu durum hastane, ilaç ve ameliyat giderleri yanında, iş veriminin düşmesi nedeniyle, ülke ekonomisine büyük bir yük bindirir. İlk tanımlanmasından bugüne kadar geçen sürede tanı ve tedavilerde büyük aşamalar sağlansa da, gelecekte beklenen ise hastalığı önleyici çareleri elde etmek ve iyileştirici tedavi şansını sağlayacak tedavi silahlarına sahip olmaktır.

Mitokondrinin İBH mukozal inflamasyonunda merkezi rol oyandığına dair önemli bulguların bildirilmesinden sonra bunların tıp pratiğine uygulanabilmesi açısından ND5 geni moleküler belirteçlerin saptanması önemli bir yol gösterici olacaktır. Ayrıca filogenetik analizler açısından ise ilk kez Türk popülasyonuna ait özgün bir kaynak olacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

ÜK ve CH, İBH başlığı altında değerlendirilen, temel olarak gastrointestinal sistemietkileyen hastalıklardır. ÜK, rektumdan itibaren proksimale doğru değişik uzunluklarda, ama arada sağlam kısım bırakmaksızın kolon mukozasını tutan, remisyon ve alevlenmelerle seyreden kronik inflamatuvar bağırsak hastalığıdır. CH ise ağızdan anüse kadar tüm sindirim kanalını segmenter tarzda ve transmural olarak tutan bir hastalıktır. Remisyon ve alevlenmelerle seyrederler. Her iki hastalık sadece sindirim kanalını değil, ama aynı zamanda barsak dışı organ sistemlerini tutabilen sistemik hastalıklardır.

2.1 İBH EPİDEMİYOLOJİSİ

Batı dünyası hastalığı olarak düşünülen İBH kuzey yarıkürede, Kafkasyada yaşayanlarda ve Askenezi yahudilerinde daha sık görülmektedir. ÜK ve CH bimodal yaş dağılımı gösterir: İlk piki 15-30 yaş arası, ikinci küçük pik ise 50-70 yaş arasında görülür. Vakaların %10'u 18 yaş altı bireylerden oluşur. ÜK ve CH her iki cinsten gençerişkinde ve Kuzey Avrupa'da güneye, Batı coğrafyada Doğu'ya, Askanazi Musevilerinde diğerlerine, beyaz ırkta siyah ırka oranla daha sık görülmektedir. Ortalama yıllık insidans 3-15/100.000'dir. Sıklığı 1950'den beri giderek artmaktadır. Son 10 yıla kadar Doğu Avrupa, Güney Amerika, Asya ve Pasifik bölgesini içine alan bölgelerde daha düşük

yaygınlık rapor edilmiştir. Yeni çalışmalar, Batı Avrupa ve Kuzey Amerika ülkelerinde ÜK insidansında yavaşça azalma veya stabil seyir görülürken, önceden düşük insidanslı bölgelerde İBH epidemiyolojisinin değiştiğini göstermektedir. Bu değişiklikler hastalığın bilinirliğinin ve tanısal yöntemlerin artmasına bağlı olabilir. Bu nedenle hastalığın ağırlığını, çevresel faktörlerle ilişki mekanizmasını ve yeni risk faktörlerini tanımlamak için ek epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç vardır (9,10).

Türkiye’de 1998-2001 yıllarında hastane bazlı yapılan bir çalışmada ÜK insidansı düşük olarak rapor edilmekle birlikte (0.59/100000-0.69/100000) (11), 2009 yılında yayınlanan çok merkezli bir çalışmada ise ÜK ve CH insidansı daha yüksek olarak bildirilmiştir(sırasıyla 4,4/100000 –2,2/100000) (12). 2012 yılında ise İBH insidansı ÜK için 2.6/100000 ve CH için 1.4/100000 olarak bildirilmiştir(13).

2.2. İBH ETİYOLOJİSİ

İBH’nın etyoloji ve patogenezi hala açıklık kazanmamakla birlikte, bugün için genetik, çevresel, immünoregülatuar faktörler ve mikrobiyal aşırı çoğalma suçlanmaktadır(14).

2.2.1.ÇEVRESEL FAKTÖRLER

Prenatal olaylar, anne sütü ile beslenme, çocukluk çağı enfeksiyonları, mikrobiyal ajanlar, sigara içimi, oral kontraseptifler, rafine şeker,marqarin, hijyen, meslek, eğitim, iklim, stres, psikolojik faktörler, appendektomi (15), tonsillektomi, kan transfüzyonu, hayvanlarla temas, fiziksel aktivite ve diğer çevresel faktörler hastalığın patogenezinde yer alan nedenler arasındadır(16). Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) hastalığın alevlenmesine yol açabilirler. Diğer taraftan NSAİİ’lerin, prostanooidlerin azalması, lökosit adheransı ve migrasyonunun arttırılması ile bağırsak bariyerini değiştirerek etkili oldukları düşünülmektedir(17).

Sigara içenlerde ÜK görülme sıklığının içmeyenlere göre daha az olduğu bildirilmektedir. Sigarayı bırakanlarda ise hastalık alevlenebilir. İçilen sigara

sayısının artışı ile orantılı olarak ÜK gelişme riski azalır. En fazla risk altında olanlar sigara içerken bırakanlardır. Ülseratif kolitli hastaların 40 mg/gün nikotin içeren sakız çiğnemelerinin hastalığın remisyona girmesinde etkili olduğu saptanmıştır. Nikotinin bu etkisi IL-10 üretimini engelleyerek, Th2 hücre yolunu baskılamasına ve kolondaki mukus yapısını değiştirmesine bağlı olduğu gösterilmiştir. Crohn hastalığında ise tam tersi bir durum vardır. Hatta son dönemlerde erkek ve bayan sigara kullanıcılarını da kendi aralarında karşılaştırılan yeni bir çalışmada immun parametrelerden Th1/Th2/Th17 sitokinleri ve regulator T hücreler incelenerek değerlendirilmiş. Sonucda bayanlarda daha keskin gidişli ve daha erken başlangıçlı görüldüğü, pro ve antiinflamatuvar parametreler arasındaki disbalansın yine bayanlarda daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Sigara içimi CH'da risk artırıcı bir etki göstermektedir. Nikotinin vasküler prostasiklin yapımını baskılayarak Crohn hastalığında en erken görülen lezyon olan mikrotrombüs oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir(18-23). Oral kontraseptif kullanımı CH için risk faktörüdür. CH'nin seyri sırasında multifokal, mikrovasküler gastrointestinal infarktlar izlenebilir ve oral kontraseptifler buna katkıda bulunabilir ya da bunların neden olduğu geçici iskemi mukozal bütünlüğü bozarak, luminal antijenlerin absorpsiyonuna neden olabilir.

Yapılan çalışmalarda 20 yaş öncesinde iltihabi nedenlerden dolayı appendektomi geçirenlerde ÜK gelişme riskinin azaldığı, iltihabi olmayan nedenlerden dolayı appendektomi geçirenlerde ise riskin azalmadığı saptanmıştır. Barsak florasının yapısı da İBH'nin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Geniş spektrumlu antibiyotikler ve probiyotikler hastaların belirli bir grubunda yararlı olmaktadır(24-26).

Kronik enfeksiyon hastalığına benzerliği nedeniyle enfeksiyöz ajanların İBH'nin etiyolojisinde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Bakteriler doğrudan doğruya etkili olabileceği gibi salgıladıkları toksik faktörler, enzimler ya da sitokinler aracılığıyla etki edebilirler. Bazı çalışmalarda ÜK ve basilli dizanteri arasında ilişki kurulmuş ve %7 vakada dışkıda shigella üretilmiştir. Benzer şekilde E.coli, Campylobacter, Mycobacterium paratuberculosis, Listeria

monositogenes, Chlamidya, parazitler, Helikobacter pylori, Yersinia ve Salmonella da saptanmıştır. Mycobacteriumlar özellikle CH'de ilgi çeken ajanlar olmuşlardır. Anaerob bakteriler, E. Histolytica gibi parazitler ve başta Kızamık, Kabakulak, Ebşteyn barr, Sitomegalovirus olmak üzere özellikle bazı virüslerin etiyolojide rol oynayabileceği düşünülmektedir(27). Belki de bağırsakta hasar yapan ancak kültürde üretilmeyen bir mikroorganizmanın varlığı söz konusu olabilir(28-30).

2.2.2.GENETİK FAKTÖRLER

Bazı klinik çalışmalar genetik faktörlerin İBH gelişme riskini arttırdığını göstermektedir. İBH'da genetik yatkınlık varsayımını destekleyen faktörler; hastalığın aile içi dağılımı(31), tek yumurta ikizlerinde görülmesi(32), eşlerde az rastlanması, değişik risk gruplarında özellikle beyaz ırk ve Musevi Yahudilerinde(33) artmış prevalansı ve bazı genetik hastalıklarla birlikte görülmesidir (Turner sendromu, Hermansky Pudlak sendromu, Glikojen depo hastalıkları). Genetik geçişte tek bir genin bozukluğu ile kendini gösteren Mendel Modeli burada geçerli değildir. İBH için en önemli risk faktörü pozitif aile hikayesidir. İBH'li hastaların %15'inin birinci derece akrabaları da etkilenmiştir ve birinci derece akrabalarında İBH gelişme riski 4-20 kat daha fazladır. Her iki ebeveyn İBH hastası olan çocuklarda 3. dekatta hastalık gelişme ihtimali %33 tür(34-39). Ekiz kardeşlerin birinde İBH varsa diğerinde İBH gelişme ihtimali % 30 dur(37).

Bunun dışında CARD4/NOD1, HLA, epitelyal bariyerdeki mukozal immunité elemanı TLR-4 (Toll-Like Receptor), proinflamatuvar sitokinlerin sentezini aktive eden NF-KB1(nuklear faktör)konağın İBH gelişiminde etkili olan diğer faktörlerdir. Ancak bu katkı Crohn Hastalığında ülseratif kolite göre daha fazladır. CH için IBD1 lokusunun tanımlanmasından sonra hastalık ile ilişkili olarak bildirilmiş diğer lokuslar IBD5 (OCTN1&2), ATG16L1 ve IL23R'dir. Ayrıca Th1 yanıtının baskılanmasından sorumlu olan PTPN22 ve NK2 transkripsiyon faktör ilişkili lokus 3 (NKX2-3) ve Tümör nekroz edici faktör

süper ailesi 15'de (TNFSF15) yeni hedef lokuslar olarak öne sürülmektedir(3,40-42).

CH ile ilişkili genlerden bazıları (ATG16L1, IRGM, NOD₂) disfonksione mitokondrilerin otofajiye uğramasını regule etmekte. Bu genlerde olan mutasyonlar kronik inflamasyona neden olmakta(43-48). Otofaji doğuştan mevcut olan homeostaz yoludur. İL 17 ve İL 23 reseptör yolunu düzenleyen Adaptif immun regülasyongenleri de İBH riski ile ilişkilidir(49,50). Bu genlere hem ÜK hem de CH ile ilişkili olanlardan: IL23R, IL12B, STAT3, JAK2, TYK2, yalnızca CH ile ilişkili olanlara ise IL-27, TNFSF15 dahildir. Bu genlerden bazıları (STAT3, JAK2, and TYK2) İL 10 immunoregulator yolu ile bağlantılıdır. İL 10 yolu kendiliğinde İBH hastalıkları ile sıkı bağlantılıdır. Bir araştırma sonucunda çocuklarında erken başlangıçlı İBH olan, bir- biri ile akrabalık ilişkisi olmayan 2 ailede İL 10 mutasyonu homozigot-resesif formda 9 çocukdan 4' de tespit edilmiştir(51). Çocukların birinde refrakter erken başlangıçlı İBH görülmüş, tedavisi hemato-poetik kök hücre nakli ile başarılı olmuştur(52-54). Bilinen epitel baryer fonksiyonunu regule eden genler varki (OCTN2, ECM1, CDH1, HNF4A, LAMB1, and GNA12) bunlardaki mutasyonlar ÜK 'le ilişkili olduğu bulunmuştur (55,56) Katlanmamış protein yanıtını ve Panet hücre biyolojisini kontrol eden genler (Xbp-1; Nod2)CH ile ilişkili bulunmuştur(57)

Genetik faktörlerin etkisi Crohn hastalığında Ülseratif kolite göre daha fazladır(58).Özellikle, Crohn hastalığında kromozom 16'da, her iki hastalıkta kromozom 3,6,7 ve 12'de yatkınlık lokusu bulunması, bazı kişilerde HLA genleri ve sitokin genlerinde (TNFalfa, IL-1RA) polimorfizm saptanması genetik faktörlerin önemini ortaya koymaktadır(59).HLA-DRB1/dQw5 Crohn hastalığına, HLA-DR2 Ülseratif kolite yatkınlıkta önemli faktörlerdir. 16. kromozomun perisentromik bölgesinde IBD1 lokusunda İBH'den sorumlu bir gen tanımlanmıştır. Bu genin, makrofajlarda NOD2 ya da CARD15(nucleotide-binding oligomerization domain 2-caspase-recruitment domain 15) olarak adlandırılan birsitoplazmik proteini kodladığı bulunmuştur.NOD2 homozigot pozitif kişilerde CH riskinin 20kat arttığı gösterilmiştir. Bu proteinin başlıca etkileri, makrofajların üzerinde eksprese

olmaktadır ve bakteriyel lipopolisakkaridler için sitozolik bir taşıyıcı reseptör gibi davranır. Hücre içi endotoksinlere bağlanarak nükleer faktör kappa-B'nin aktivasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca makrofajların apoptozisini arttırmaktadır ve inflamatuvar sitokinlerin üretilmesine yol açmaktadır. Bakteriyel lipopolisakkaridlere yetersiz immun yanıt oluşmasında kromozom 16'daki NOD2 geninde oluşan mutasyon önemli rol oynamaktadır. NOD2'deki mutasyonlar Crohn hastalarının %15-30'unda görülür(60-62)

Ayrıca ÜK hastalarında saptanan MDR-1 genindeki ekspresyonunun ilaç direncine neden olduğu bulunmuştur (63).

İBH'da subklinik göstergeler olarak en iyi bilinenler; ÜK'te p-ANCA (perinuklear antinötrofil sitoplazmik antikorlar), CH 'da ise artmış intestinal geçirgenliktir. Subklinik göstergeler, tam bir genotipin belirlenemediği durumlarda anormal genotipin saptanmasına yardımcı olan göstergelerdir. Ancak bu göstergelerin bulunması mutlaka hastalığın ortaya çıkacağını göstermez. Böyle bir anormalliğin saptanması ya hastalığa aid genetik yatkınlığı gösterir, ya da erken dönemde saptanacak ve belki de hiç ilerlemeyecek bir hastalığın subklinik döneminin belirlenmesinde yarar sağlayabilir. P-ANCA ülseratif kolitte % 50- 80, crohn hastalığında % 2- 20 pozitif bulunmaktadır. Bugünkü bilgilerimize göre p-ANCA 'nın hastalığın birbaşa patogeneğinde doğrudan etkisi yoktur. Ancak p-ANCA hastalığın immunolojik kökenini açıklamak ve aile bireylerini taramak için iyi bir göstergedir, genetik yatkınlığı ortaya koyar, HLA grupları ile de ilişkisi vardır. Genetik yatkınlığı araştıran bir çalışmada Crohn hastalarının sağlıklı aile fertlerinde normal popülyasyona göre ASCA (Anti Saccharomyces Cerevisae Antibody) pozitifliği daha yüksek bulunmuştur. Yine yalnızca CH bulunan ailelerde ÜK ve CH 'nın birlikte bulunduğu ailelere göre ASCA pozitifliği anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Saccaromyces Cerevisae mayasının bazı oligomannosid monotoplarına karşı oluşan bu antikorlar normal populasyon ve ÜK'li hastalarla karşılaştırıldığında CH'da daha yüksek düzeyde bulunmaktadır(64-67).

Genetik faktörlerin rolü konusunda İBH ile ilişkili genetik sendromlar da akla gelmektedir. Bunlara Turner sendromu, Hermansky- Pudlak sendromu, Glikojen depo hastalığı tip 1 B: Von Gierke hastalığı dahildir.

Turner sendromu: X kromosomu yokluğunda ve ya anormal işlevsel X kromosomu varlığında görülmektedir. Her 5000 canlı doğuma 1adet anormallik denk gelir. Yapılan bir çalışmada 135 Turner sendromluhasta vakasında 4 (% 3) hastada İBH (2 ÜK, 2 CH) rastlanmış olup, normal popülasyona kıyasla çok daha fazla görülmüştür(68-70).

Hermanski-Pudlak sendromu (HPS): otosomal resesif geçişlidir. Otokutanoz albinizm, kanama diyatezleri ile kendini gösteren trombosit aggregasyon bozukluğu ve pulmoner fibrozisle karakterizedir. Bu sendromda 10 q 23 kromosomunda genetik defekt olma ihtimali çok yüksektir. Bir çalışmada 49 HPS tanılı hastadan 8 'de (%16) İBH rastlanmış, bu hastaların 4/8 de o gende defekt izlenmiştir.

Von Gierke hastalığı: erken hipoglisemi, gelişme geriliği, hepatomegali, neutropeni, ikincili G6P-DH görülmekte. Bu hastalarda CH 'na benzer granulomatoz tarzda kolit gelişir ve tedavisinde G-csF(granulosit kolonostimuledici faktör) verilmesinde yanıt alınır, hatta fistüllerin tedavisinde başarılı bulunmuştur(71-73).

Sonuçta genetik, mikrobiyal ve çevresel faktörler (örn. sigara) arasındaki karmaşıkilişki intestinal epitelyal bariyer ve mukozal immun sistemde bozukluğa neden olur. Bu durum, mukozal immun sistemin sürekli olarak uyarılmasına bağlı olarak kronik aktif inflamasyon ve doku hasarına yol açar.

2.3.İBH PATOGENEZİ

İBH' da hastalık mekanizmasını tetikleyen olaylar çok değişken ve nonspesifiktir. İnfeksiyöz ajanlar ve luminal toksinler genetik olarak hassas bir kişide mukozal bariyeri geçerek inflamasyonu başlatırlar. Altta yatan neden

ne olursa olsun ortaya çıkan kolonik hasarda organın yanıtı hemen hemen aynı şekilde olmaktadır. Çeşitli derecelerde mukoza ülserasyon ve erozyonu, kolon bezlerinin distorsiyonu, goblet hücrelerinin azalması, mukoza ve submukoza ödemi ile mukoza ve submukozda inflamatuvar hücre infiltrasyonu nonspesifik inflamatuvar kolitin akut dönemde görülen ortak bulgularıdır(74). Bağırsak epitelinin iltihabi olayları başlatmaktaki rolü; bir taraftan antijen sunan hücre olarak antijeni major histokompatibilite kompleksi (MHC) aracılığıyla T hücrelerine sunmak, diğer taraftan da antijenler aracılığıyla uyarılan sitokin, kemokin ve diğer proinflamatuvar maddelerin meydana getirdiği inflamasyonu yaymaktır. İBH'da barsak epitel hücresi antijen sunan hücre olarak görev yaptığında normal insanlardakinin aksine T hücre toleransı yerine T hücre aktivasyonu meydana gelmektedir. Bu bozukluk bazı HLA-2 haplotipleri ile ilişkilidir (75,76). Sonuc olarak T lenfosit alt gruplarında aberran bir aktivasyon oluşur. Aktive olmuş fagositik hücreler, lenfositler ve terminal kompleman fragmanları hücre nekrozuna yol açar. Matriks proteini hasar görür ve ödem gelişir. IFN-gama, villöz atrofi ve kript hiperplazisi yapar. LTB4: trombosit aktive edici faktör ve bakteriyel ürünlerin uyarısı ile nötrofil ve makrofaj kaynaklı reaktif oksijen metabolitleri (ROS) oluşumuna neden olur; protein karbonhidrat, hiyalüronik asid ve müsini degrade eder ve lipid peroksidasyonu yaparlar(77-80). Reaktif oksijen metabolitlerinin damar duvarına direk toksik etkisi vardır ve vasküler hasar özellikle CH'da ön plandadır. Ayrıca makrofaj ve nötrofillerde yapılan nitrik oksit de (NO) doku hasarında önem taşır. Bakteri lipopolisakkaritleri, prostaglandin ve prostasiklinler, IL-1, TNF-alfa, IFN-gama,NO" yu indükler. NO ise mitokondri fonksiyonlarını durdurur, DNA sentezini inhibe eder (81).Diğer taraftan sitokinler ve değıştirici büyüme faktörleri, mezenkim hücresi proliferasyonunu ve kollajen sentezini artırır, dolayısıyla fibrozise yol açar(82). İBH'daki defektlerden biri ve belki de en önemlisi bağırsak epitelinin geçirgenliğinin artması ve normalde bu bariyeri geçemeyen antijenlerin ve proinflamatuvar moleküllerin barsak epitelini geçebilmesidir. Müsin yapısındaki değışiklikler de bu olaya katkıda bulunur.

İBH' da enterik inflamasyon ve toksinler ile nonspesifik intestinal inflamasyon oluşur. Mukozal permeabilite artışı ile toksik bakteriyel ürünler emilir ve lokal doku hasarını başlatırlar. Çoğu zaman bu hasar inflamatuvar cevapla önlenir ve mukozal hasar iyileşir. Ancak genetik yatkınlığı olan kişilerde supresyon olmaz ve inflamatuvar yanıt artar. İmmun zincir aktive olur, sürekli lümen bileşenlerine maruz kalan mukozada olay süregenleşir; kronik inflamasyon, doku hasarı ve fibrozis oluşur.

2.3.1.MİTOKONDRIYAL DNA MUTASYONLARININ İBH 'DA YERİ

Hastalığın genetik patogenezinde önemli rol oynayabilecek bir diğer faktör mitokondri olabilir. Birçok çalışma Ülseratif Kolit patogenezini oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile bağlantılı bulmuştur(4).

Ülseratif Kolit hastalarında epitelin yapısal değişikliklerinden ve mukozal inflamasyon başlangıcından önce kolonik epitel hücrelerinde mitokondri anormallikleri görülür(83).

Mitokondrinin fazla ROS (reaktif oksijen metabolitleri) üretmesi inflamasyonun aktivasyonuna neden olur(4).Mitokondri 4 enzim kompleksinden oluşan Elektron Taşıma Sistemi (ETS) içerir. ETS mitokondri membranında bulunan protein komplekslerinden oluşur. Donör moleküllerden elektron alınır ve bu komplekslere taşınır. Kompleks I (NADH dehidrogenaz) elektronları Krebs döngüsünde üretilen NADH" den, kompleksII ise elektronları süksinattan alır. NADH ve FADH₂"nin yükseltgenmesiyle hidrojen ortama bırakılır. Hidrojen, 1 elektron ve 1 protondan oluşur. Hidrojen elektron ve proton olarak ayrılır ve elektronunu ETS" ye aktarır. İki kompleks de elektronları ubikinon aracılığıyla kompleks 3"e (cyt c oksidoredüktaz, cyt b-c1) aktarırlar. Buradan da sitokrom c (cyt c) ile kompleks IV"e aktarılır. Burada O₂, H₂O"ya indirgenir. Oluşan proton gradyanı ATP sentaz tarafından ADP"yi ATP" ye çevirmek için kullanılır(83).

Kısmen indirgenmiş oksijen molekülleri reaktif mitokondriden dışarı sızarak diğer moleküllerle hızlıca reaksiyona girerler. ROS hücresel oksidatif

fosforilasyon sürecinde oluşur ve fizyolojik nötrleme kapasitesini aşarak oksidatif strese neden olur. ROS" un fazla üretimi protein, lipid, nükleik asit ve matriks bileşenlerine zarar verir, inflamasyon ile ilişkili doku hasarına neden olur (40). Doku hasarı, hücrel stres ve enfeksiyon doğal immün sistem tarafından patern tanıma reseptörleri ile algılanırlar. Bu reseptörlerin aktiflenmesiyle savunma ve tamir mekanizmaları başlar (41,42).Eğer hücrel hasar ya da doku hasarı genişse bu reseptörler akut inflamatuvar yanıtı tetikler. Bu durumların büyük çoğunluğunda zararlı uyarı ortadan kaldırılır ve hasar onarılır; fakat bazı durumlarda doku ve hücrel stresin kaynağı çözülemez. Hasarlı hücrelerin ölümünün devam etmesi, immün sistemin hasarı tamir etmeye çalışmasına rağmen dokuda progresif yıkıma neden olur. Bu dokunun eş zamanlı yıkımı ve iyileşmesi kronik inflamasyon ile karakterizedir ve artrit, diyabet, Parkinson,İBH gibi birçok dejeneratif hastalıkta gözlenir(3).

Ülseratif Kolit hastalarının bağırsak mukozal epitellerinde mitokondriyal anormalliklerin yanı sıra mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun azaldığı bundan dolayı mukozal ATP miktarlarının düşük olduğu bilinmektedir(6).

Mitokondrinin enerji üretimi dışında otoimmünitede de rolü vardır. Bu görevini apoptozda rol almasıyla gerçekleştirir. Çünkü apoptoz, self reaktif lökosit oluşumunu engeller. Aynı zamanda bazı mitokondriyal proteinler de otoimmünitenin engellenmesinden sorumludur. Bu bilgilere göre mitokondriyal gen polimorfizmlerinin otoimmün ve kronik inflamatuvar hastalıklarla ilişkili olduğu düşünülebilir (5,84).

İnsan nuklear DNA 'sı 46 kromozom içinde yer alan yaklaşık 3 milyar baz çiftinden oluşur,ama mtDNA"sı kodlayan ve kodlanmayan bölgeleri içeren 16,569 nükleotit baz çiftinden oluşan çift sarmallı halkasal bir DNA"dır. Kodlayan bölge elektron taşıma ile ilgili 13 polipeptit kodlar. mtDNA"dan kodlanan tüm bu 13 polipeptit, solunum enzim kompleksleri (Elektron taşınması için kompleks I, II, III, IV ve oksidatif fosforilasyon için kompleks V) için gereklidir(85).Kompleks I"ın yapısına 46 alt birim katılır. Bu alt birimlerden 7 tanesi (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 ve ND6; ND=NADH dehidrogenaz) mtDNA tarafından geri kalanları ise nükleer DNA tarafından

kodlanmaktadır. Kompleks II'nin alt birimlerinin hepsi nükleer gen tarafından kodlanmaktadır. Kompleks III 11 polipeptit alt birimden oluşur. Bunların içinde sitokrom b mitokondriyal DNA tarafından kodlanır. Bunun dışında kalanlar nükleer DNA tarafından kodlanır. Kompleks IV, mitokondriyal solunum zincirinin son enzimi, 13 alt birimden oluşur. Bunların 3'ü (COX I, COX II ve COX III; COX= sitokrom c oksidaz) mitokondriyal DNA tarafından kodlanır. Kompleks V, ATP sentaz, 16 alt birimden oluşur, bunlardan iki tanesi (ATPaz6 ve ATPaz8; ATPaz =ATP sentaz) mtDNA tarafından kodlanır (86).

Genetik düzeyde yapılan araştırmalarda Ülseratif kolit ile ilişkili hücrel ATP üretimini etkileyen iki gen polimorfizmi bulunmuştur. Bunlar mitokondriyal enerji metabolizmasını etkileyen SLC22A5 ve UCP2 nükleer genleridir. Bu genlerdeki polimorfizme sahip Ülseratif kolit hastalarında mukozada oksidatif kompleks aktivitesinin azaldığı böylece mukozal ATP seviyesini düşüğü belirlenmiştir. Böylece mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun ve oksidatif fosforilasyon aktivitesinin Ülseratif kolit patofizyolojik mekanizmasında rol oynadığı kanıtlanmıştır (5,87)

Ülseratif kolitte kolonik mukoza yapısal olarak incelendiğinde hem enfekte hem de enfekte olmayan bölgelerde anormal mitokondriler görülmüştür (88). Mitokondri normal fonksiyonu için gerekli major mitokondri iç zar proteini prohibitin ve birkaç mitokondri proteini hem enfekte hem de enfekte olmayan kolonik mukozada azalmıştır (89). Bu gözlemler mitokondriyal anormalliklerin ÜK patogenezinde önemli faktörler olduğunu gösterir(4). Ayrıca ülseratif kolit hastalarının bağırsak dokularında mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun azaldığı bundan dolayı mukozal ATP miktarlarının düşük olduğu bilinmektedir.

Daha önce fareler üzerinde yapılmış bir çalışmada mitokondriyal DNA ND3 ve mt-tRNA-Arg gen polimorfizmlerinin mitokondriyal oksidatif fosforilasyon aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı böylece artmış mukozal ATP seviyesinin deneysel kolitteki inflamasyonun azalmasıyla ilişkili olduğu görülmüştür. Bu çalışmada, mitokondriyal enerji metabolizmasındaki artış, bağırsak kriptlerinde bariyer koruyucu hücrel programların aktive olmasıyla ilişkili bulunmuştur(6). ETS elemanlarını kodlayan mtDNA'nın çoğunluğunu ND

genleri oluşturmaktadır. Bu yüzden çalışmamızda oksidatif fosforilasyon için önemli olan mtDNA genlerinden olan ND genlerinin incelenmesi gerekli görülmüştür.

2012 yılında aterosklerotik lezyonların mtDNA mutasyonlarıyla ilişkisi hakkında yapılan bir araştırmada, ND5 geni üzerinde olan G13513A mutasyonunun heteroplazmi seviyesi aterosklerotik dokuda sağlam aortik intimayla karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuştur. Bu sonuçtan yola çıkarak ND5 genindeki bu mutasyonun aterosklerotik lezyonlara karşı koruyucu rol üstlendiği saptanmıştır (90).

Koczan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmaya göre mt-ND5 geni üzerinde bulunan nt13708 G/A tek nükleotit polimorfizminin Multipl Skleroz (MS) ile ilişkili olduğu bulunmuştur. nt13708A varyantının MS hastalığı için artmış risk taşıdığı belirlenmiştir(91).

2003 yılında Van der Walt ve arkadaşları tarafından mtDNA polimorfizmleri ve parkinson hastalığı ile ilgili yapılan bir çalışmada ise ND5 geni üzerindeki koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir(92). Oksidatif kompleksi incelemek için 2013 yılında yapılan bir araştırmada CS fare türünden bir-birlerinden farklı mitokondriyal gen polimorfizmleri olan fareler seçilmiştir. Yapılan araştırmanın sonucunda , mitokondriyal DNA varyasyonlarının mitokondriyal oksidatif fosforilasyon aktivitesini önemli ölçüde etkilediği saptanmıştır. Ayrıca bu araştırmada, mukozal ATP artışının deneysel kolitteki inflamasyonun azalmasıyla ilişkili olduğu ve artmış mitokondriyal enerji metabolizmasının bağırsak kriptlerindeki hücresel koruyucu baryerin aktivasyonu ile ilişkili olduğu sonuçlarına varılmıştır. Böylece bu transgenik hayvan deneyi çalışmasında, mitokodriyal DNA varyasyonlarının İBH 'ye koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir(6).

Bu çalışmadan yola çıkarak farelerde kolitten koruyucu etkisi olan ND3 genindeki 9461 T/C polimorfizmi insanda farklı gen bölgesine denk düşmüştür ve insanda homolog olan gen bölgesi araştırıldığında minör allel frekansının % 5 altında olduğu görülmüştür. Ayrıca İBH' ler düşük ATP ile karakterize hastalıklar olduğundan oksidatif fosforilasyon için en gerekli

kompleks olan ND kompleksinin incelenmesi gerekli olduğu gör÷lmüştür. ND 5 geni en büyük mitokondriyal gen bölgesidir ve bununla beraber artmış mutasyon duyarlılığı vardır. Bu sebeple ND 5 genindeki mutasyonlar OXPHOS hastalıkları için yaygın bir sebeptir(7). ND5 geninin İBH ile ilişkisi hala kanıtlanmamış olmasına rağmen daha önceki araştırmalarda ND5 geninin bazı inflamatuvar hastalıkların patogenezinde rol oynadığı saptanmıştır(5).

3.MİTOKONDİRİ VE MİTOKONDİRİYAL HASTALIKLAR

Mitokondriyal hastalıklar bir hücrede oksidatif fosforilasyonda ve adenozin trifosfat (ATP) üretiminde bozukluk olduğunda ortaya çıkmaktadır. Genelde kronik ve ilerleyici seyirli olup, her yaşta, her organ tutulumu, her belirti ve bulgu ile gör÷lebilirler ancak kas ve santral sinir sistemi gibi yüksek enerji ihtiyacı olan organlar daha fazla etkilenmektedir. Çesitli sistem ve organların değışik kombinasyonlarda birlikte tutulumu ile de seyredebilirler.

Hem mitokondriyal deoksiribon÷kleik asit (mtDNA) hem de nükleer DNA (nDNA) mutasyonu sonucu oluşabilen hastalıklardır. Nükleer DNA mutasyonları mendelian kalıtımla aktarılırken, mtDNA mutasyonları maternal kalıtımla aktarılır veya sporadik olarak gelişebilir. Mitokondriyal hastalığın 1960'ların baslarında ilk kez tanımlanmasından sonra hastalık hakkındaki bilgiler hızla artmaya başlamış, her geçen gün yeni genler tanımlanmasına rağmen genotip ve fenotip korelasyonu tam olarak yapılamamıştır. Bazı klinik bulgular bazı hastalıklar için karakteristik olsa da hiçbir zaman bir genetik defekt için spesifik olmamaktadır.

1988'de ise ilk patojenik mtDNA mutasyonu bildirilmiştir(93,94). 1990'lar mitokondriyal genom için önemli bir dönem olmuştur. Genetik ve biyokimyasal çalışmalarla mitokondriyal hastalığın etiyopatogenezinin aydınlatılmasında önemli gelişmeler kaydedilmiştir(95). Tek patojenik mtDNA mutasyonunun değıerlendirildiğı ilk populasyon temelli çalışmada sıklıkla mitokondriyal miyopati, ensefalopati, laktik asidoz, inme benzeri ataklarda

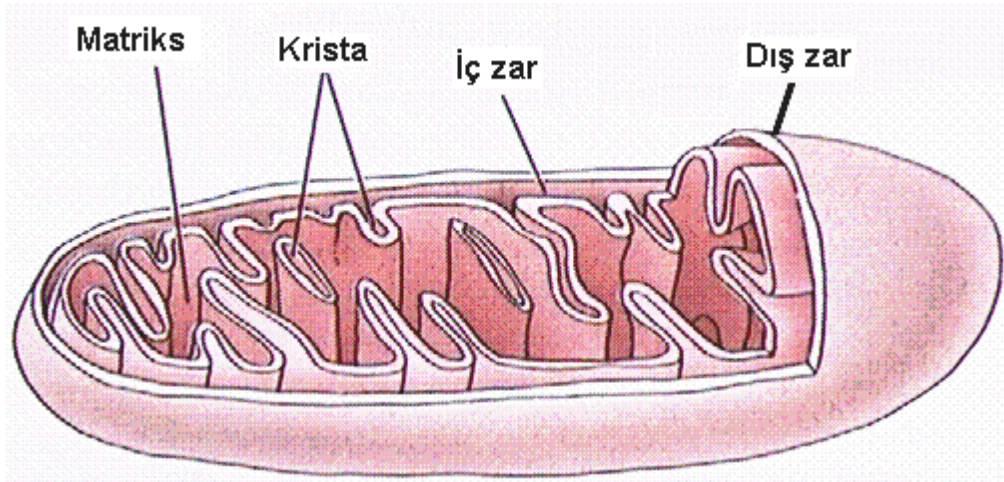
(MELAS) gorulen transfer ribonukleik asit (tRNA) A3243G mutasyonu prevelansı 100000 eriskinde 16.3 olarak bulunmuştur (96,97).

3.1.MİTOKONDİRİ YAPISI

Mitokondriler okaryotik hucrelerin enerji uretimi görevini ustlenen ve kendiDNA'sına sahip hucre içi organellerdir. İnsanda matur eritrositler dışında tüm

ökaryotik hücrelerde bulunurlar. 1-7 mikrometre uzunluğunda, çubuk seklinde veya 2-3 mikrometre çapında küresel yapılardır. Dış membran, iç membran, krista, matriks ve membranlar arası boşluktan oluşmaktadır (Şekil 1) /98,99/

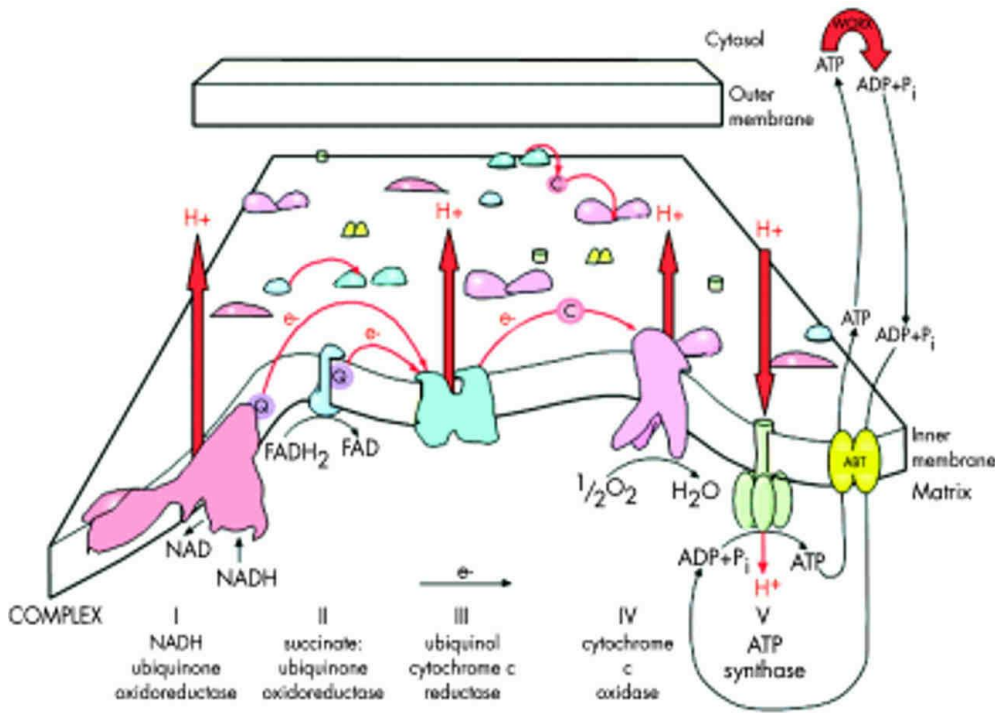
Şekil 1.Mitokondrinin ultrastrüktürel görüntüsü(98,99).



Dış membran porin adı verilen kanal proteinini icerir; büyüklüğü 5000 dalton ve daha küçük molekullerin, iyon ve metabolitlerin serbest difuzyonunu sağlar. Nukleer genom tarafından kodlanan proteinler dış membrandan TOM/TIM protein kompleksi yardımıyla geçerler. İç membran krista adı verilen katlanmalar ile yüzeyini artırır. İç membranın selektif geçirgen olması nedeniyle protein ve metabolitlerin matrikse taşınması için spesifik mekanizmalar mevcuttur. İç membranda bulunan taşıyıcı proteinler membrana geçirgenlik özelliği kazandırır. Bazı moleküller aktif transport ile matrikse geçmektedir, protein taşınması da enerji bağımlıdır(100). İç membranda lipid içeriğinde bir fosfolipid olan kardiolipin yoğun olarak

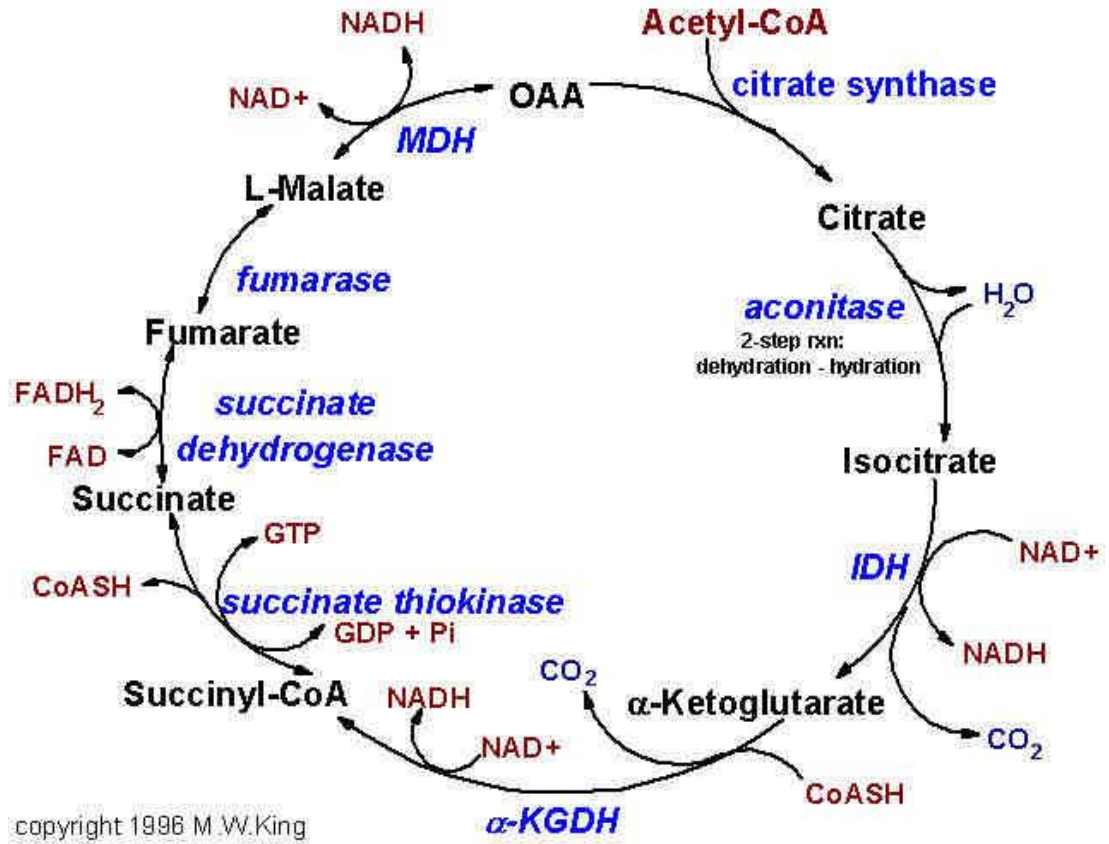
bulunur. Mitokondriler ve hücre sitozolu arasında sürekli madde alışverişi olmaktadır(101).Mitokondriler apoptoziste ve hücresel homeostazda görev alır(102).Hücrelerin enerji üretim merkezleridir. Oksidatif fosforilasyon veya respiratuar zincir (Şekil 2), yağ asidi β -oksidasyonu, trikarboksilik asit (TCA) dongusu (Krebs dongusu) (Şekil 3) gibi temel metabolik olaylar mitokondride gerçekleşir. Üre siklusunda, aminoasit, kolesterol, yağ, steroid ve nukleotidlerin metabolizmasında da görev alırlar (98,101,103).

Şekil 2 Respiratuar enzim zinciri (101)



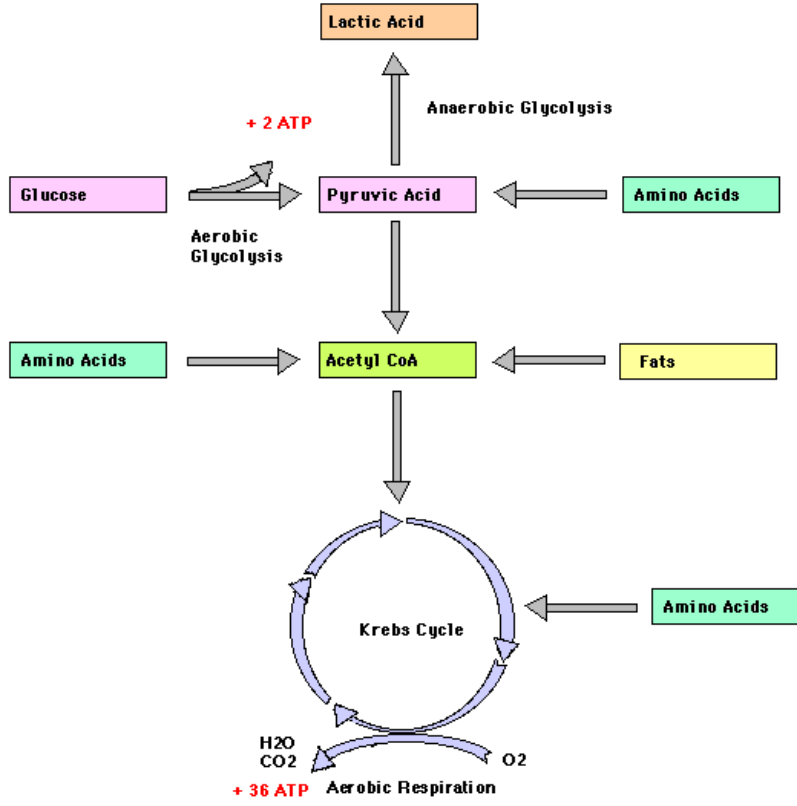
İnsan hücresinde çok sayıda mitokondri bulunmaktadır. Mitokondri sayısı 1000-100000 arasında değişmektedir ve dokudan dokuya farklılık göstermektedir(104).Sinir hucreleri, iskelet kas hucreleri ve kalp kas hucrelerinde yuksek sayida mitokondri mevcuttur . Mitokondri ve krista sayısı hucrenin metabolik aktivitesi ile doğru orantılıdır. Mitokondriler hücrede mikrotubüllere bağlı olarak hareket ederler ve enerji ihtiyacı olan bölgeye yerleşirler. ATP uretiminde son basamak olan respiratuar zincir mitokondri iç membranında yer almaktadır (Şekil 2). Beş enzim kompleksinden oluşmaktadır ve her bir kompleks birçok altünite içermektedir.

Şekil 3. Trikarboksilik asid (TCA) dongusu (102)



Mitokondriyal matriks icinde piruvat, aminoasit ve yağ asitlerinin metabolizması sonucu oluşan asetil koenzim A (asetil CoA) Krebs döngüsüne girerek okside olur (Şekil 4). Karbondioksit (CO_2), indirgenmiş flavin adenin dinukleotid ($FADH_2$) ve nikotinamid adenin dinukleotid ($NADH$) oluşur (102).

Şekil 4 Piruvat, aminoasit ve yağ asitlerinin metabolizasyonu sonucu asetil CoA oluşumu ve Krebs döngüsüne giriş (102)



i.

Yüksek enerjili elektronlar FADH₂ ve NADH tarafından taşınarak mitokondri iç membranındaki proteinler vasıtasıyla moleküler oksijene ulaştırılır ve H₂O oluşur. Karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması sırasında oluşan bu indirgenmiş kofaktörler (NADH ve FADH₂) mitokondrinin içmembranında yer alan kompleks I (NADH:ubikinon oksidoreduktaz) ve kompleks II'ye (suksinat:ubikinon oksidoreduktaz, suksinat dehidrogenaz) elektron sağlarlar. Respiratuar zincirdeki enzim komplekslerinin altüniteleri nDNA ve mtDNA tarafından kodlanmaktadır.

Kompleks I yedisi mtDNA tarafından kodlanan 45 altüniteden oluşmaktadır. Kompleks II ise dört altüniteden oluşmaktadır ve tümü nDNA tarafından kodlanmaktadır. Suksinatın fumarata oksidasyonunda katalizör görevi görür.

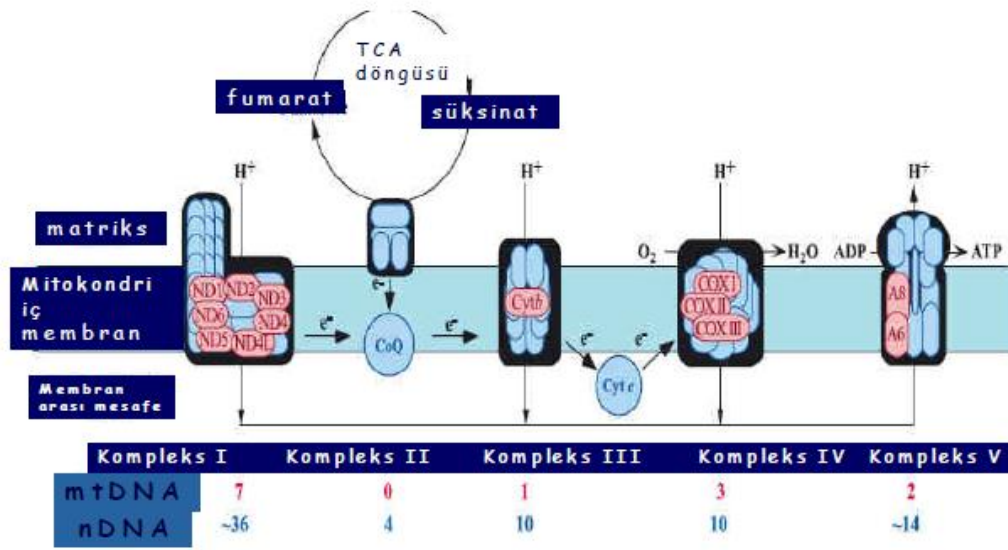
Elektrokimyasal fark doğrultusunda ve iki hareketli elektron taşıyıcı olan ubikinon (ubikuinol, koenzim Q10) (CoQ10) ve sitokrom c ile elektronlar

Kompleks III (ubikinon: sitokrom c oksidoreduktaz) ve IV'e (sitokrom c oksidaz, COX) ulaştırılır (şekil 5). Kompleks III ubikinondan sitokrom c'ye elektron transferini sağlar. Biri (sitokrom b) nDNA, diğerleri mtDNA tarafından kodlanan 11 altüniteden oluşur. Kompleks IV respiratuar zincirin en son parçası olup, sitokrom c'nin moleküler oksijeni indirgemesinde katalizör görevi görür. 13 altüniteden oluşmaktadır ve 10 altünitesi nDNA tarafından kodlanmaktadır. Kompleks V (ATP sentetaz) ise 16 altüniteden oluşur ve ikisi mtDNA tarafından kodlanmaktadır (Tablo 1),(101,103,105).

Elektron transferinden sağlanan enerji kompleks I, III ve IV tarafından mitokondriyal matriksten membranlar arası boşluğa proton (H⁺) pompalamak için kullanılır. Matrikstekki protonlar membranlar arası boşluğa gönderilir ve böylece bir proton gradienti oluşur. Membranlar arası boşlukta toplanan protonlar beşinci protein kompleksi olan ATP sentetaz tarafından matrikse geçirilirken ATP oluşur(101,103).ADP ve inorganik fosforun ATP sentaz ile ATP'ye dönüştürölmesi ile sonuçlanır (şekil 5)(101). Bu olay oksidatif fosforilasyon olarak adlandırılır(103).Oluşan ATP, sitozolde bulunan ADP ile adenin nukleotid translokator (ANT) yardımıyla değiştirilir. Sonrasında ATP sitozolde gerekli yerlerde kullanılır.

Tablo 1Respiratuar zincir komplekslerinin mtDNA ve nDNA tarafından kodlanan altüniteleri

	Komplex 1	Komplex 2	Komplex 3	Komplex 4	Komplex 5
mtDNA	7	0	1	3	2
nDNA	~ 36	4	10	10	~ 14



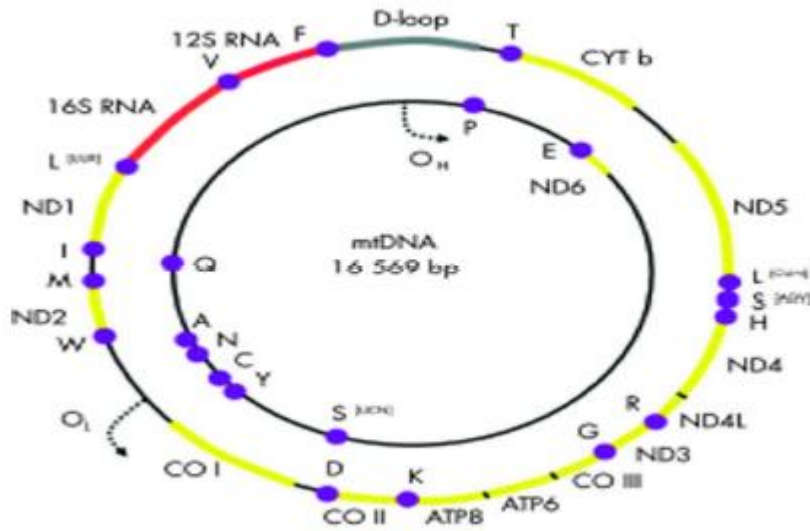
Şekil 5 Respiratuar zincir, mtDNA tarafından kodlanan alt üniteler kırmızı, nDNA tarafından kodlanan alt üniteleri mavi olarak gösterildiği respiratuar zincirde elektronlar hareket ederken kompleks I, III ve IV aracılığı ile matriksten membranlar arası mesafeye proton pompalanması ve protonun Kompleks V ile matrikse geri pompalanması sonucu ATP oluşumu(101)

3.2. MİTOKONDRIYAL GENETİK

Mitokondriyal proteinler mtDNA ve nDNA tarafından kodlanır (103,106). Mitokondriyal DNA: 16.569 kilobaz büyüklüğünde, dairesel, çift zincirli DNA'dır (Şekil6,103). Mitokondri başına 2-10 kopya mtDNA düşmektedir. Maternal kalıtımla geçer(107,108). Spermin sitoplazma içermemesi ve mitokondrilerin fertilizasyona katılmayan kuyruk kısmında toplanması nedeniyle zigottaki mitokondriler sadece ovuma aittir. Anne tüm çocuklarına mtDNA'sını aktarırken, sadece kız çocuklar bunu ikinci kusağa aktarır(108,109). MtDNA sürekli bölünmektedir. MtDNA'nın bölünme zamanlaması nDNA'dan bağımsızdır. Ancak mtDNA'nın replikasyonu ve transkripsiyonu için gerekli enzimler nDNA tarafından sentezlendiğinden,

mtDNA tam bir otonomiye sahip değildir. Bölünemeyen hücrelerde de mitokondriyal replikasyon mevcuttur(110). Mitokondriler hücre bölünmesi sırasında rasgele dağılım gösterir ve mitoz bölünme sırasında yavru hücrelere eşit dağıtılmaz (108,111).

MtDNA 37 gen içermektedir. İntron içermez. MtDNA'da kodlanmayan tek bölge yaklaşık 100 baz çifti uzunluğundaki D-loop bölgesidir. MtDNA insanda oksidatif fosforilasyon için kritik olan proteinlerin kodlanmasından sorumludur. MtDNA, toplamda 13 respiratuar zincir polipeptidini, 2 ribozomal RNA (rRNA) ve 22 tane tRNA kodlamaktadır(109,112,113,114).



Şekil 6 Mitokondriyal DNA(103)

MtDNA polimorfiktir, bir başka deyişle aynı etnik grupta kişiler arasında mtDNA diziliminde birçok farklılık vardır (109,115). MtDNA'nın fonksiyon bozukluğu potansiyeli daha fazladır. Mutasyonlar nDNA'ya göre 7-10 kat daha fazla görülür ve yaşlanmayla artar (116,117). Mutasyonun fazla görülmesinin nedenleri arasında;

1. MtDNA'nın koruyucu histonlarının olmaması,
2. Ortamda oksijen radikallerinin yoğun olması,

3. Ortamda birçok metabolitin mevcut olması,
4. Koruyucu ve onarım mekanizmalarının yetersiz olması sayılabilir (118).

Bir kişide milyonlarca mitokondri ve bir hücrede binlerce mtDNA bulunmaktadır. Genelde bunların hepsi benzerdir (homoplazmi). Ancak bazı hücrelerde/mitokondrilerde mutasyonlar ortaya çıkabilir; normal ve mutant DNA çeşitli oranlarda bulunabilir (heteroplazmi)(119). Heteroplazmik mtDNA'lar yavru hücrelere düzensiz dağılım göstererek geçer (mitotik segregasyon). Sonuç olarak tekrar- tekrar bölünen hücreler, saf mutant veya saf normal mtDNA'lar içeren genotipe dönüşebilirler(110,120). Hastalığın ortaya çıkmasını belirleyen mutant formun yüzdesidir(eşik değeri) . MtDNA delesyonları için eşik değerinin yaklaşık %60, tRNA mutasyonları için ise %90'ın üzerinde olduğuna inanılmaktadır (121,122). İskelet kası, sinir, kalp ve karaciğer için eşik değeri düşüktür. Mutant DNA yüzdesi ile hastalığın şiddeti arasında bir korelasyon mevcuttur(107,123). Heteroplazmi düzeyindeki değişikliğe göre belirtilerin başlangıç zamanı, ilerleyici seyir göstermesi ve de hastalık şiddeti değişmektedir (103,109,124,125).

3.3.MİTOKONDRIYAL SENDROMLAR

1.Leberin Hereditör Optik Nöropatisi (LHON):

- Periferik nöropati, hipotoni,epilepsi,demens,gelişimsel gerilik.
- ATP az ve ya nukleer kompleks 2 mutasyonu

2. NARP:

3. MELAS: Miyoklonik epilepsi ve Ragged-red fiber hastalığı

4. MERRF:Mitokondrial ensefalopati:

- Mitokondriyal ensefalomiyopati,
- Laktik asidoz,
- Strok ve hemiparezi

5. Kearns –Sayre Sendromu (KSS):

- Progressif eksternal oftalmopleji,retinopati
- Ataksi
- Klap ileti defektleri

6. Leigh Sendromu (Subakut Nekrotizan Ensefalopati):

- Optik sinirinatrofisine bağılı yetişkin körlüğü(merkezi görme kaybı olur),
- Düşük penetrans gösterir,
- Mt (DNA) tarafından kodlanan retinal elektron transport zincirindeki NADH dehidrojenaz ve ya sitokromdaki missens mutasyonlar sonucu gelişir

7. Pearson kemik iliğı pankreas sendromu:

- Genellikle fetal olan bir çocukluk hastalığıdır,
- Pankreatik /hepatik atrofi

8. Wolfram Sendromu (DIDMOAD):

9. Alpers Sendromu:

10. Mitokondriyal Deplesyon Sendromu:

11. Mitokondriyal Norogastrointestinal Ensefalomyopati (MNGIE):

12. Siklik kusma sendromu:

- Solunum yetmezliğı
- Tekrarlayan laktik asidoz
- Migren ve ani ölüm

4.ARAŞTIRMANIN MATERYAL VE YÖNTEMİ

4.1.Etik Kurul

Çalışma protokolü Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Protokol no: 09.2014.0019, Tarih: 07.03.2014) ve çalışmaya katılan tüm bireylerden aydınlatılmış onam alındı.

4.2. Çalışma Popülasyonu

Çalışmaya, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'na ve Marmara Üniversitesi Gastroenteroloji Enstitüsü'ne başvurarak klinik, endoskopik, patolojik ve radyolojik kriterlere göre Ülseratif kolit tanısı almış 99, Crohn tanısı almış 101 hasta alınmıştır. Kontrol grubu 89 kişilik sağlıklı gönüllülerden oluşturulmuştur. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri tablo 2.'de gösterilmiştir. Hasta ve kontrol grubuna bilgilendirilmiş onam formu okutulup imzalandıktan sonra çalışma grubu bireylerinden her bir EDTA'lı tüpe 2'şer ml olmak üzere toplam 6 ml venöz kan alındı.

Tablo 2. Grupların demografik özellikleri

	Ülseratif kolit (n=99)	Crohn Disease (n=101)	Kontrol (n=89)
Yaş Ortalaması	46,13±13.273	38,23±12,181	37,69±12,447
Cins (Kadın/Erkek)	38/61	41/60	36/53

4.3. Amplifiye Edilecek Hedef Gen bölgesinin Seçimi

Öncelikle National Center for Biotechnology Information (NCBI) web sitesinden ilgili gen olan “mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 5 [Homo sapiens (human)]” taranmıştır. ND5 geni içinde tüm dünyadan rapor edilen polimorfizmler listesi taranarak valide edilmiş, minör allel frekansı %10’un üzerindeki seçilmiştir. Bu polimorfizmlerin tamamının saptanması için 13466-14225 nükleotitleri arasındaki gen bölgesi amplifiye edilmiştir.

4.4. Genomik DNA İzolasyonu

Toplanan kanlardan “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche, Mannheim, Germany) ile üretici firmanın talimatnamesine göre genomik DNA izolasyonu yapılmıştır.

1. 1.5 ml nükleaz free mikrosantrifüj tüp içine 200 µL kan örneği, üzerine sırasıyla 200 µL Binding Buffer ve 40 µL Proteinaz K eklenerek tüp iyice vortekslendi, 70 °C’de 10 dakika inkübe edildi.

2. Karışıma 100 µL Isopropanol eklenerek vortekslendi.

3. Kit içinde bulunan bir toplama tüpünün içine filtreli tüp yerleştirildi ve filtreli tüp içine karışım pipetlendi.

4. Çiftli tüp sistemi (toplama tüpü ve filtreli tüp) 1 dk 8000 g’de santrifüj edildi.

5. Santrifüj işleminden sonra; filtreli tüp toplama tüpünden uzaklaştırıldı ve yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.

6. Filtreli tüp üzerine 500 µL inhibitör removal buffer eklendi ve 1 dakika 8000 g’de santrifüj edilerek kontaminantlar uzaklaştırıldı.

7. Filtreli tüp, toplama tüpünden uzaklaştırılarak yeni toplama tüpüne yerleştirildi.

8. Üzerine 500 µL yıkama tamponu eklendi ve 1 dakika 8000 g’de santrifüj edilerek kontaminantlar uzaklaştırıldı. Bu işlem toplamda 2 kez tekrar edildi.

9. Toplama tüpündeki akışkan sıvı uzaklaştırılarak tüp sistemi 1dk full hızda santrifüj edildi ve filtreli tüp koleksiyon tüpünden uzaklaştırıldı.

10. DNA elüsyonu için; 1.5 ml lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne filtreli tüp yerleştirildi ve 200 µL önceden ısıtılmış elüsyon buffer eklenerek 1dk 8000 g'de santrifüj edildi.

11. Elde edilen DNA örnekleri real-time PZR yapıncaya kadar - 20°C'de saklandı.

Hedef gen bölgesinin amplifikasyonu için yapılan PZR sonrası örneklerle ait elde edilen amplikonların %2'lik standart agaoroz jelde 130 Voltta 45 dakikalık yürütme sonucunda spesifik PZR bantları elde edildiği ultraviyole ışık altında tespit edilmiştir.

Spesifik ve optimize edilmiş amplikon eldesi sonrası dizileme analizi için **Agencourt® AMPure® XP** kitinin şartnamesine göre PZR pürifikasyon işlemi yapıldı. Bu şekilde PZR reaksiyonu karışımı içindeki primer dimerleri, dNTP gibi fazla PZR bileşenleri uzaklaştırılarak dizileme analizini baskılayan ve kalitesini bozan faktörler elimine edildi. Aşağıda dizileme için gerekli tüm aşamalar özetlenmiştir.

- 1- PZR örneklerinin purifikasyonu için **Agencourt AMPureXP** kit (Protokol no: 0003870001) kullanıldı.
- 2- 96'lık bir platein belirlenen kuyucuklarına 10µl PZR örneği konuldu.
- 3- AMPure pürifikasyon kitinin şişesi alt üst edilip karıştırılarak dibe çöken manyetik beadlerin kaldırılması sağlandı.
- 4- Kuyucuklarda bulunan PZR örneklerinin üzerine 18µl AMPure konup ve 10 kez pipetaj yapılarak PZR örneği ile bead solüsyonunun iyice karıştırılması sağlandı.
- 5- Bu şekilde oda sıcaklığında 5dk bekletildi. Böylece bead ile PZR ürünün birleşmesi sağlandı.
- 6- 96'lık plate, **Agencourt SPRIPlate® magnetic plate** üzerine yerleştirilerek ve 2dk bekletildi..Bu aşamada beادلere bağlanan PZR ürünleri, magnetik ortam nedeni ile solüsyon içerisinde koyu renkli yuvarlar halkalar gözlemlendi.

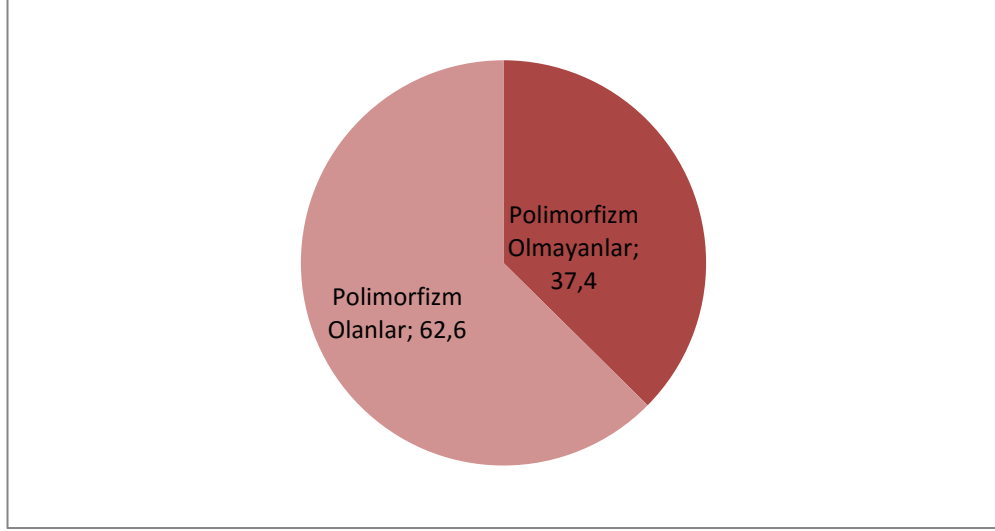
- 7- Pipet 30µl'ye ayarlandı ve halkaların tam ortasından solüsyon çekildi.
- 8- Kuyucuklara taze hazırlanmış %70lik ethanol'den 200µl konup 30sn beklendi. Bu aşamada plate **Agencourt SPRIPlate® magnetic plate** üzerinde idi.
- 9- Süre sonunda halkaların ortasından alkol dikkatlice çekilip atıldı Bu işlem 2 kez yapıldı.
- 10-Manyetik plate üzerinden 96lık plate alındı ve kuyucuklara 40µl steril su konuldu (TRISAcetate, pH 8.0, or TE).
- 11-96'lık plate, **Agencourt SPRIPlate® magnetic plate** üzerine yerleştirildi ve 1dk bekletildi.
- 12-Oluşan halkaların tam ortasından Purifiye edilmiş PZR ürünü çekilerek, yeni bir plate ya da PZR tüpüne aktarıldı.
- 13-Purifiye edilen PZR ürünlerinin miktarlarına bakılmak üzere agaroz jele yürütüldü.
- 14-Miktar tespiti yapıldıktan PZR miksi için **DTCS GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit**'te yazan miktarlara göre miktar hesabı yapıldı.
- 15-PZR miksi için **DTCS GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit** kullanıldı.
- 16-Purifiye PZR ürünü pzs karışımına katıldı.
- 17-Kit içerisinde çıkan pozitif örnek Puc18'de her çalışmaya katıldı.
- 18-2,5 saat PZR reaksiyonu sonunda PZR ürünleri **SPRI CleanSEQ® MAGNETIC BEADS** kiti ile purifiye edildi.
- 19-10µl hacmindeki PZR ürünleri, PZR tüplerinden 96'lık plate alındı.
- 20-Clean SEQ şişesi alt üst edilip karıştırılarak dibe çöken manyetik beadlerin kaldırılması sağlandı.
- 21-Kuyucuklarda bulunan PZR örneklerinin üzerine 10µl CleanSEQ konuldu ve 7 kez pipetaj yapılarak PZR örneği ile bead solüsyonunun iyice karıştırılması sağlandı.
- 22-Ardından üzerlerine 42µl %85lik ethanol konuldu ve 7 kez pipetaj yapıldı.

- 23-96lık plate, manyetik plate üzerine konulup ve 3dk bekletildi
- 24-Süre sonunda oluşan halkaların tam ortasından solüsyon alınıp atıldı.
- 25-100µl %85lik ethanol konulup ve 30sn bekletildi. Süre sonunda oluşan halkaların tam ortasından solüsyon alınıp atıldı.
- 26-96lık plate manyetik plate üzerinden alındı.
- 27-Daha önceden -20⁰C'den çıkarılıp oda sıcaklığına getirilen Sample Loading Solution (SLS)'den 40µl konulup ve 7 kez pipetaj yapıldı.

Bu aşamalar sonrası örneklerimiz dizileme analizine hazır hale getirildi.

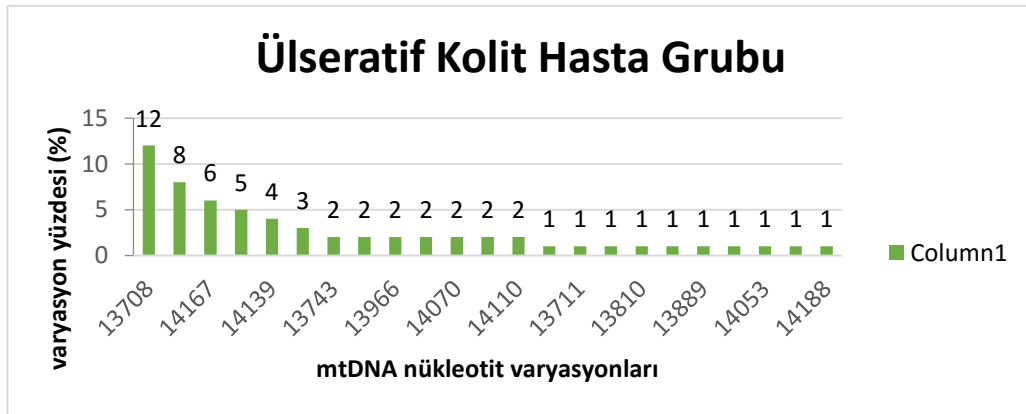
5.BULGULAR

- ❖ Ülseratif kolitli hastaların %62,6 (62/99)'sında polimorfizm saptanmıştır (Şekil 7)



Şekil 7: Ülseratif kolit hastalarında polimorfizm olanların ve polimorfizm olmayanlara yüzde ile ifadesi

Ülseratif kolit hastalarının %12'sinde mtDNA nt13708G>A, %8'inde 13617 T>C ve %6'sında 14167C>T gen polimorfizmleri saptanmıştır (Şekil 8). Toplamda ise 23 farklı nükleotit varyasyonu gözlemlenmiştir (Tablo 3).



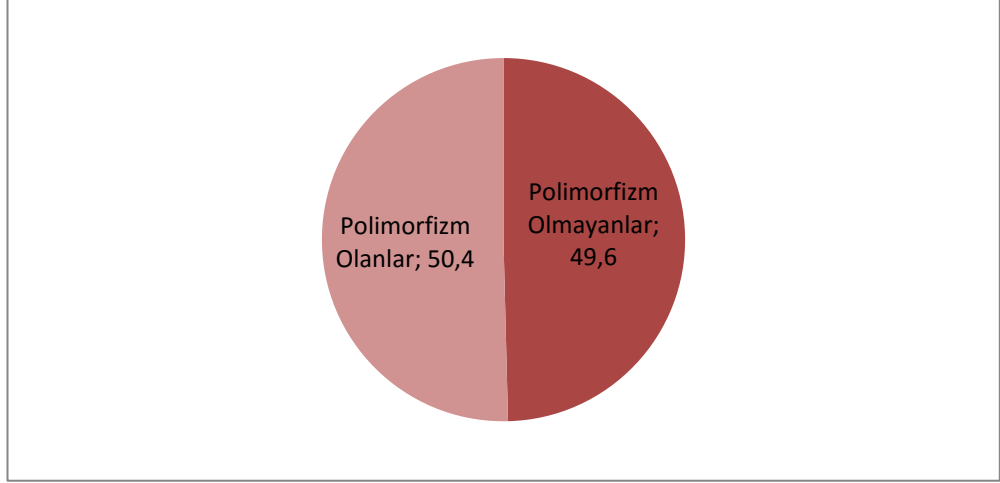
Şekil 8: Ülseratif kolit hastalarında saptanan polimorfizmlerin yüzdesi

	Nükleotit Pozisyonu	Lokus	Nükleotit Varyasyon	Kodon Numarası	Kodon Pozisyonu	Amino Asit Varyasyonu
1	13708	MT-ND5	G-A	458	1	non-syn:A-T
2	13617	MT-ND5	T-C	427	3	syn:I-I
3	14167	MT-ND6	C-T	169	3	syn:E-E
4	13780	MT-ND5	A-G	482	1	non-syn:I-V
5	14139	MT-ND5	A-G	601	3	syn:L-L
6	13879	MT-ND5	T-C	515	1	non-syn:S-P
7	13743	MT-ND5	T-C	469	3	syn:T-T
8	13934	MT-ND5	C-T	533	2	non-syn:T-M
9	13966	MT-ND5	A-G	544	1	non-syn:T-A
10	13967	MT-ND5	C-T	544	2	non-syn:T-M
11	14070	MT-ND5	A-G	578	3	syn:S-S
12	14182	MT-ND6	T-C	164	3	syn:V-V
13	14110	MT-ND5	T-C	592	1	non-syn:F-L
14	13680	MT-ND5	C-T	448	3	syn:P-P
15	13711	MT-ND5	G-A	459	1	non-syn:A-T
16	13734	MT-ND5	T-C	466	3	syn:F-F
17	13810	MT-ND5	G-A	492	1	non-syn:A-T
18	13888	MT-ND5	T-C	518	1	non-syn:C-R
19	13889	MT-ND5	G-A	518	2	non-syn:C-Y
20	13933	MT-ND5	A-G	533	1	non-syn:T-A
21	14053	MT-ND5	A-G	573	1	non-syn:T-A
22	14161	MT-ND6	A-G	171	3	syn:A-A
23	14188	MT-ND6	A-G	162	3	syn:V-V

Tablo3. Ülseratif Kolit Hasta Grubunda Saptanan Nükleotit Varyasyonları

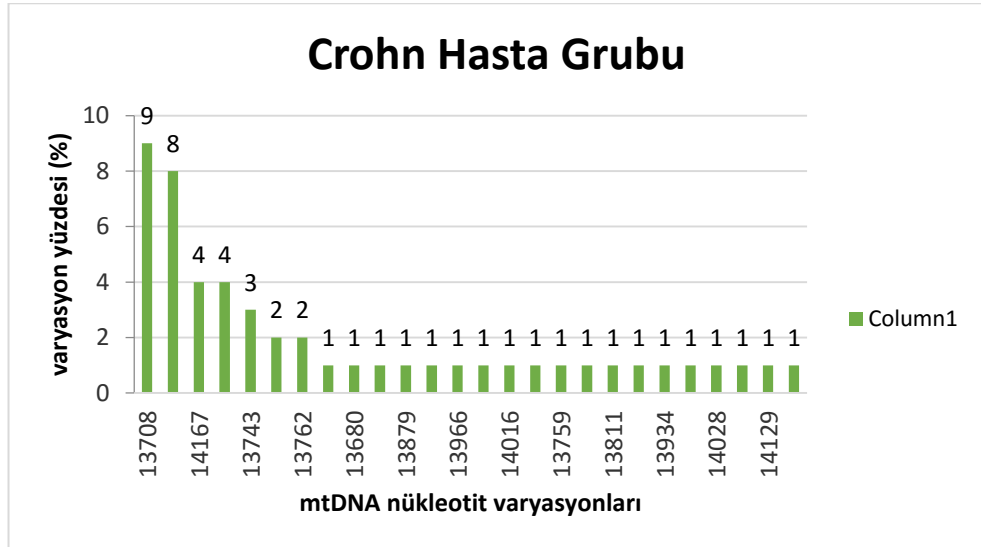
Not: Gölgeleştirilmiş satırlardaki varyasyonlar sadece ülseratif kolit hasta grubunda saptanmıştır.

- ❖ Crohn hastalarının %50,4 (51/101)'ünde polimorfizm saptanmıştır. (Şekil 9)



Şekil 9: Crohn hastalarında polimorfizm olanların ve olmayanlara yüzde ile ifadesi

- ❖ Crohn hastalarının %9'ünde mtDNA nt13708G>A, %8'inde 13780 A>G ve %4'ünde 14167C>T gen polimorfizmleri saptanmıştır (Şekil 10). Toplamda ise 26 farklı nükleotit varyasyonu gözlemlenmiştir (Tablo 4).



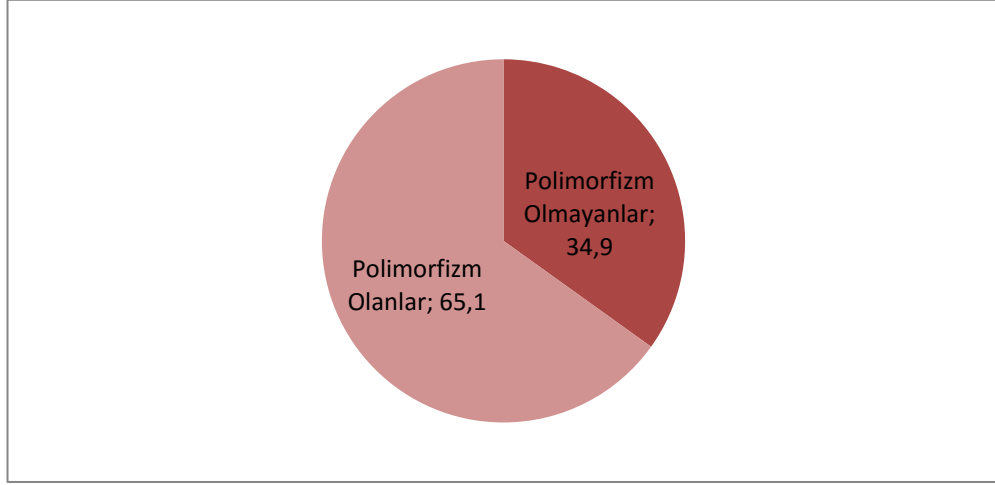
Şekil 10: Crohn hastalarında saptanan polimorfizmlerin yüzdesi

Tablo 4. Crohn Hasta Grubunda Saptanan Nükleotit Varyasyonları

	Nükleotit Pozisyonu	Lokus	Nükleotit Varyasyonu	Kodon Numarası	Kodon Pozisyonu	Amino Asit Varyasyonu
1	13708	MT-ND5	G-A	458	1	non-syn:A-T
2	13780	MT-ND5	A-G	482	1	non-syn:I-V
3	14167	MT-ND6	C-T	169	3	syn:E-E
4	14139	MT-ND5	A-G	601	3	syn:L-L
5	13743	MT-ND5	T-C	469	3	syn:T-T
6	13734	MT-ND5	T-C	466	3	syn:F-F
7	13762	MT-ND5	T-G	476	1	non-syn:S-A
8	13617	MT-ND5	T-C	427	3	syn:I-I
9	13680	MT-ND5	C-T	448	3	syn:P-P
10	13681	MT-ND5	A-G	449	1	non-syn:T-A
11	13879	MT-ND5	T-C	515	1	non-syn:S-P
12	13889	MT-ND5	G-A	518	2	non-syn:C-Y
13	13966	MT-ND5	A-G	544	1	non-syn:T-A
14	14007	MT-ND5	A-G	557	3	syn:W-W
15	14016	MT-ND5	G-A	560	3	syn:K-K
16	14070	MT-ND5	A-G	578	3	syn:S-S
17	13759	MT-ND5	G-A	475	1	non-syn:A-T
18	13781	MT-ND5	T-C	482	2	non-syn:I-T
19	13811	MT-ND5	C-G	492	2	non-syn:A-G
20	13928	MT-ND5	G-C	531	2	non-syn:S-T
21	13934	MT-ND5	C-T	533	2	non-syn:T-M
22	13953	MT-ND5	T-C	539	3	syn:Y-Y
23	14028	MT-ND5	A-G	564	3	syn:K-K
24	14094	MT-ND5	T-C	586	3	syn:L-L
25	14129	MT-ND5	C-T	598	2	non-syn:T-I
26	14182	MT-ND6	T-C	164	3	syn:V-V

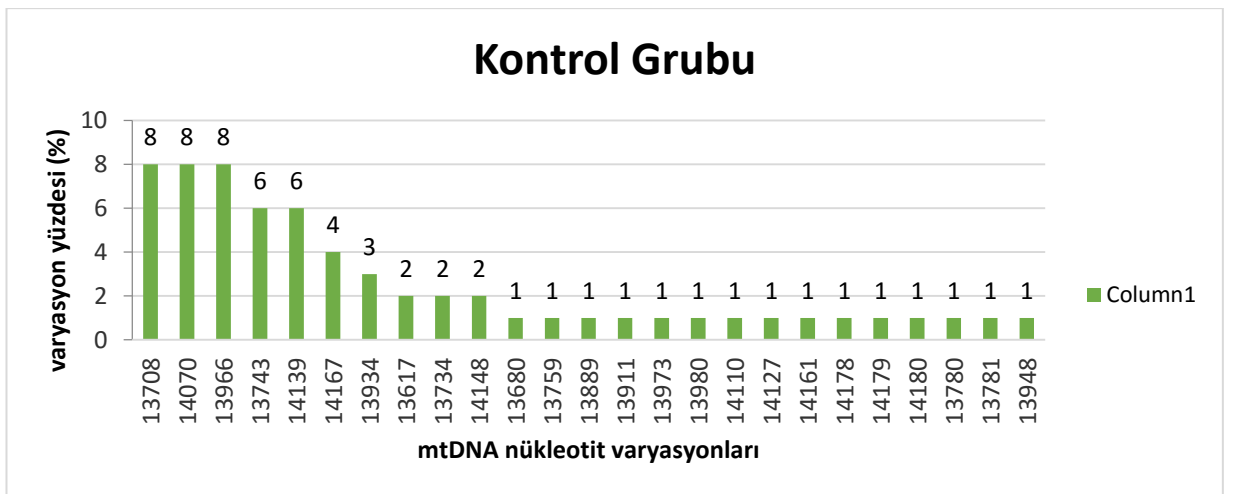
Not: Gölgeleştirilmiş satırlardaki varyasyonlar sadece Crohn hasta grubunda saptanmıştır.

- ❖ Kontrol bireylerin %65,1 (58/89)'inde polimorfizm saptanmıştır(Şekil 11).



Şekil 11: Kontrol bireylerde polimorfizm olanların ve polimorfizm olmayanlara yüzde ile ifadesi

- ❖ Kontrol grubu hastalarının %8'sinde mtDNA nt13708G>A, %8'inde 14070 A>G ve %8'inde 13966 A>G gen polimorfizmleri saptanmıştır (Şekil 12).Toplamda ise 25 farklı nükleotit varyasyonu gözlemlenmiştir (Tablo5).



Şekil 12: Kontrol bireylerde saptanan polimorfizmlerin yüzdesi

Tablo 5. Kontrol Grubunda Saptanan Nükleotit Varyasyonları

	Nükleotit Pozisyonu	Lokus	Nükleotit Varyasyonu	Kodon Numarası	Kodon Pozisyonu	Amino Asit Varyasyonu
1	13708	MT-ND5	G-A	458	1	non-syn:A-T
2	14070	MT-ND5	A-G	578	3	syn:S-S
3	13966	MT-ND5	A-G	544	1	non-syn:T-A
4	13743	MT-ND5	T-C	469	3	syn:T-T
5	14139	MT-ND5	A-G	601	3	syn:L-L
6	14167	MT-ND6	C-T	169	3	syn:E-E
7	13934	MT-ND5	C-T	533	2	non-syn:T-M
8	13617	MT-ND5	T-C	427	3	syn:I-I
9	13734	MT-ND5	T-C	466	3	syn:F-F
10	14148	MT-ND5	A-G	604	3	syn:Term-Term
11	13680	MT-ND5	C-T	448	3	syn:P-P
12	13759	MT-ND5	G-A	475	1	non-syn:A-T
13	13889	MT-ND5	G-A	518	2	non-syn:C-Y
14	13911	MT-ND5	A-G	525	3	syn:M-M
15	13973	MT-ND5	A-T	546	2	non-syn:Q-L
16	13980	MT-ND5	G-C	548	3	syn:L-L
17	14110	MT-ND5	T-C	592	1	non-syn:F-L
18	14127	MT-ND5	A-G	597	3	syn:L-L
19	14161	MT-ND6	A-G	171	3	syn:A-A
20	14178	MT-ND6	T-C	166	1	non-syn:I-V
21	14179	MT-ND6	A-G	165	3	syn:Y-Y
22	14180	MT-ND6	T-C	165	2	non-syn:Y-C
23	13780	MT-ND5	A-G	482	1	non-syn:I-V
24	13781	MT-ND5	T-C	482	2	non-syn:I-T
25	13948	MT-ND5	C-T	538	1	non-syn:P-S

Not: Gölgelendirilmiş satırlardaki varyasyonlar sadece kontrol grubunda saptanmıştır.

5.1. İSTATİSTİK ANALİZ

	Ülseratif Kolit (n=99)	Crohn Disease (n=101)	Kontrol (n=89)	p değeri
13708AA	12 (%12)	9 (%9)	7(%8)	>0.05
13708GG	87(%88)	92(%91)	82(%82)	

Tablo 6 mtDNA 13708 G/A gen polimorfizmi yüzdesi

13708 homoplazmik AA genotipi tüm gruplarda benzer frekanslarda saptanmış olup herhangi bir grupta ilişkili saptanmamıştır (Chi-square: 1.078, Degrees of Freedom: 2, p= 0.5835)(Tablo 6)

	Crohn Disease (n=101)	Kontrol (n=89)	p değeri
13780GG+AG	8(%7, 9)	1(%1, 1)	P<0,05
13780AA	93(%92)	88(%98)	

Tablo 7 Mt DNA 13780 A/G gen poliformizmi yüzdesi

13780 G dominant (GG+AG) genotip modeline göre Crohn hasta grubunda 13780G polimorfizmi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (P= 0.0380; Odds ratio= 7.570, 95% Confidence Interval: 0.9273 to 61.799)(Tablo 7)

	Crohn Disease (n=202)	Kontrol (n=178)	p değeri
13780G	15(%7,4)	2(%1,12)	P<0,05
13780A	187(%92)	176(%98,8)	

Tablo 8 Crohn ve Kontrol hasta grubunda mtDNA 13780 G allel taşıyıcılığı yüzdesi

13780 G allel taşıyıcılığı Crohn hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (P= 0.0026; Odds ratio= 7.059 95% Confidence Interval: 1.591 to 31.323) (Tablo 8).

	Ülseratif Kolit (n=99)	Kontrol (n=89)	p değeri
13780GG	5(%5)	1(%1,12)	P>0,05
13780AA	94(%94,9)	88(%98,8)	

Tablo 9 ÜK ve Kontrol hasta grubunda mt DNA 13780GG genotip yüzdesi.

13780 homoplazmik GG genotipi tüm gruplarda benzer frekanslarda saptanmış olup herhangi bir grupla ilişkili saptanmamıştır (p= 0.21)(Tablo 9).

	Ülseratif Kolit (n=99)	Kontrol (n=89)	p değeri
13617CC	8(%8)	2(%2,2)	P>0,05
13617TT	91(%91,9)	87(%97,7)	

Tablo 10 ÜK ve Kontrol hasta grubunda mt DNA 13617CC genotip yüzdesi.

13617CC genotipi ülseratif kolit hasta grubunda kontrol grubuna göre benzer frekanslarda saptanmış olup anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p= 0.10)(Tablo 10)

	Crohn Disease (n=101)	Kontrol (n=89)	p değeri
13617CC	1(%0,9)	1(%1,1)	P>0,05
13617TT	100(%99)	88(%98.8)	

Tablo 11 CH ve Kontrol hasta grubunda mt DNA 13617 CC genotip yüzdesi.

13617CC genotipi crohn hasta grubunda kontrol grubuna göre benzer frekanslarda saptanmış olup anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p= 0.60)(Tablo 11)

	Crohn Disease (n=101)	Kontrol (n=89)	p değeri
14070GG	1(%8)	8(%8.9)	P<0,05
14070AA	100(%99)	81(%91)	

Tablo 12 CH ve Kontrol hasta grubunda mt DNA 14070 GG genotip yüzdesi.

14070 GG genotipi kontrol grubunda Crohn hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (p=0,0134, Odds ratio= 0.1013 95% Confidence Interval: 0.01240 to 0.8268) (Tablo 12)

	Crohn Disease (n=202)	Kontrol (n=178)	p değeri
14070G	2(%0,9)	16(%8.9)	P<0,05
14070A	200(%99)	162(%91)	

Tablo 13 CH ve Kontrol hasta grubunda mt DNA 14070 G allel taşıyıcılık yüzdesi.

14070 G allel taşıyıcılığı kontrol grubunda Crohn hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksek ($P= 0.0003$; Odds ratio= 0.2088 95% Confidence Interval: 0.06841 to 0.6370)(Tablo 13).

	Ülseratif Kolit (n=99)	Kontrol (n=89)	p değeri
14070GG	2(%2)	8(%8.9)	P<0,05
14070GAA	97(%97,9)	81(%91)	

Tablo 14 ÜK ve Kontrol hasta grubunda mt DNA 14070 GG genotip yüzdesi.

14070 GG genotipi kontrol grubunda ülseratif hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p=0,0487$, Odds ratio= 0.2088 95% Confidence Interval: 0.04310 to 1.011)(Tablo 14).

	Ülseratif Kolit (n=198)	Kontrol (n=178)	p değeri
14070G	4(%2)	16(%8.9)	P<0,05
14070A	194(%97.9)	162(%91)	

Tablo 15 ÜK ve Kontrol hasta grubunda mt DNA 14070 G allel taşıyıcılık yüzdesi.

14070 G allel taşıyıcılığı kontrol grubunda ülseratif kolit hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (P= 0.0045; ; Odds ratio= 0.2088 95% Confidence Interval: 0.06841 to 0.6370)(Tablo 15).

6. SONUC VE TARTIŞMA

Öncelikle çalışmamızda literatürde frekansları bilinmeyen bir çok polimorfizm ortaya çıkmıştır. Çalışmamızda her üç grupta en yüksek bulunan genotip frekansı ND5 geninde mtDNA 13708 G/A polimorfizmi oldu, ÜK hastalarında %12, CH 'da %9, Kontrol grubu hastalarında ise %8 bulunmuştur. Ama istatistiksel olarak karşılaştırmada anlamlılık tespit edilmemiştir (p:0.5835).

Crohn hastalarında 2.yüksek sıklıkda görülen polimorfizm ND 5 geninde mt DNA 13780 A/G (%8) poliformizmdir. ÜK hastalarında mtDNA 13780 A/G polimorfizmi %5, Kontrol grubunda ise %1 oranında tespit edilmiştir. mt DNA 13780 A/G polimorfizmi Crohn hastalarında anlamlı bulunmuştur ve hastalıkla ilişkili değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlılık düzeyine ulaşmıştır (p= 0.0380; Odds ratio= 0.1321 95% CI: 0.01618 to 1.078).

ÜK hastalarında diğer fazla rastlanmış olan polimorfizm mt DNA 13617 T/C polimorfizmi olup,%8 oranındadır, ama her üç grup için p değeri anlamlı çıkmamıştır (ÜK' de p: 0.1, CH ' için p:0.6) .

Diğer bir istatistiksel olarak anlamlı bulunan mt DNA 14070 A/G polimorfizmidir. Bu genetik polimorfizm hem ÜK hem de CH 'da koruyucu etkiye ulaşacak istatistiksel değere sahiptir. ÜK 'de p< 0.04, CH 'da p<0.02 bulunmuştur.

Hasta gruplarında elde edilen polimorfizm frekansları hastalıkların alt grupları ile yapılacak istatistiksel analizler için yeterli sayıya ulaşmadığı için bu parametrelerle değerlendirme yapılamamıştır.

Çalışmamızda İBH'da patogeneizde önem taşıyan 2 polimorfizm tespit ettik, biri CH 'na yatkınlık yaparken, diğer polimorfizm ise İBH oluşumuna karşı koruyucu etkiye sahip olduğu ortaya çıktı.

Bizden önce İBH patogenezinde mitokondrial genomun rolunu gösteren birkaç deneysel hayvan çalışmaları literatürde mevcut. Bunlardan biri Florian

Bar ve arkadaşları tarafından oksidatif kompleksi incelemek için 2013 yılında yapılan bir araştırmada CS fare türünden birbirlerinden farklı mitokondriyal gen polimorfizimleri olan fareler seçilmiştir. Bu çalışmada nükleer genomu aynı, ama mitokondriyal genomda değişiklikleri olan sıçan türü modelleri wild tip genoma sahibisıçanlarla karşılaştırılmıştır(6). Bunlar arasında 2 sıçan türünde(BL6.NZB, BL6.NOD) kimyasalla indüklenmiş kolite karşın bağırsak mukozasında inflamasyondan korunma izlendi. Mitokondriyal DNA dizilimleri karşılaştırıldığında BL6.NOD sıçan türünde mt DNA: 9348, 9461,9821 baz çiftlerinde toplam 3 adet polimorfizm, BL6.NZB türünde ise 85 baz çiftinde polimorfizm izlendi. Bu polimorfizmler mt ND3 ve mt tRNA^{ARG}genlerinde izlendi. Bu polimorfizimleri olan sıçanların bağırsak kript hücrelerinde ATP düzeyi (adenozin difosfat) wild tip sıçanlara ve BL6.AKR türlerine kıyasla karşılaştırmada 2 kat artış görüldü, sıçanları kolitten korumuş oldu. ETS'de kompleks I, IV ve V in aktivitesi artmış bulundu, kompleks II'de ise böyle aktivite artışı izlenmedi. Ayrıca bu araştırmada, mukozal ATP artışının deneysel kolitteki inflamasyonun azalmasıyla ilişkili olduğu ve artmış mitokondriyal enerji metabolizmasının bağırsak kriptlerindeki hücrel koruyucu bariyerin aktivasyonu ile ilişkili olduğu sonuçlarına varılmıştır. Böylece bu transgenik hayvan deneyi çalışmasında, mitokondriyal DNA varyasyonlarının İBH'ye koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir.Mitokondrinin inflamasyonda önemli rol oynadığı ve inflamatuvar hastalıkların patagonezine katkı sağladığı daha önceki araştırmalarda da saptanmıştır(126).İnflamasyon sonucu Reaktif Oksijen Türevlerinin ("ROS") artışı mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun patogenezele ilişkisinin en büyük göstergesidir. Birçok çalışma ülseratif kolitin patogenezinin oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile bağlantılı bulmuştur(88). Genetik düzeyde yapılan araştırmalarda ülseratif kolit ile ilişkili hücrel ATP üretimini etkileyen iki gen polimorfizmi bulunmuştur. Bunlar mitokondriyal enerji metabolizmasını etkileyen SLC22A5 ve UCP2 nükleer genleridir. Bu genlerdeki polimorfizme sahip ülseratif kolit hastalarında mukozada oksidatif kompleks aktivitesinin azaldığı böylece mukozal ATP seviyesini düşüğü belirlenmiştir. Böylece

mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun ve oksidatif fosforilasyon aktivitesinin ülseratif kolit patofizyolojik mekanizmasında rol oynadığı kanıtlanmıştır(5,87).

Elektron transport zinciri kompleks I 'deki ND(Nikotin Adenin Dinukleotid Dehidrojenaz) alt birimlerindeki mutasyonların oksidatif fosforilasyon hastalıklarında önemli rol oynadığı rapor edilmiştir(7,127). ND5 proteini kompleks I' in yapısına katılan 46 alt birimden biridir. ND5 proteini kompleksin periferinde yer alan hidrofobik bir polipeptittir. Yapılan bir araştırmada oksidatif fosforilasyon bozukluğunun neden olduğu hastalıklara sahip 116 hastada buna neden olabilecek mtDNA'daki heteroplazmik mutasyonları açığa çıkarmak için tüm mtDNA analiz edilmiştir. Analiz sonucu toplam mutasyonların %27'sini ND5 genindeki mutasyonlar(n=4) oluşturmuştur. ND5 geni kompleks I' deki en büyük ve en fazla mutasyon içeren gendir. Fakat genin diğer mitokondriyal genlere göre daha fazla mutasyon içermesi genin büyüklüğüyle açıklanamaz; çünkü yapılan bu çalışmada en büyük ikinci gen COXI ve üçüncü gen ND4'te herhangi bir mutasyon bulunamamıştır(7). Çalışmalar kompleks I aktivitesinde ve bunun sonucu olarak solunumda ND5 sentezinin hız sınırlayıcı basamak olduğunu göstermiştir(128). ND5 geninde az miktarda mutasyonun bile kompleks I' de kusura neden olduğu buna dayanarak açıklanabilir(7).

Mitokondri, inflamasyon ve metabolizma arasındaki ilişki büyük ilgi çekmekte, bu yolun malfonksiyone olması bir çok kronik inflamatuvar hastalıklara alt yapı oluşturduğu düşünülür. DM tip 2 'de anneden gelen mt DNA 'da olan defektlere bağlı gelişebileceğini gösteren deliller var(129). Böyleki, disfonksiyone mitokondriler aşırı ROS üretiyor. Bu ise NLRP₃(nod like reseptör 3) inflamasyonu aktive eder, inflamatuvar sitokinlerin üretimine (il1 b ve il 18) neden olur(3).

SLE (sistemik lupus eritematozis) hastalığının patogenezinde mitokondrial disfonksiyone bağlı ATP sentezinin azaldığı, sonucunda daha kötü prognozlu hastalık seyrine(dirençli lupus nefriti) neden olduğunu gösteren çalışmalar vardır (85).

MtDNA alterasyonu ve inflamatuvar artritler arasındaki ilişkini gösteren çalışmalardan birinde RA hastalarının sinovial mayesinde ve plazmasında ekstrasellüler mtDNA artışı izlenmiştir(130) ve oksidatif olaylar sonucu bozulan mt DNA'nın farelerde artrit neden olduğunu gösteren çalışmada da mevcuttur(131).

Parkinson hastalığında(PH) mtDNA polimorfizmlerinin hem hastalığın oluşmasındaki hem de koruyucu yöndeki patogenezisinde rol aldığını gösteren çalışmalar vardır. Van der WALT ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada 9055 A ve 10398G allel'de SNP(single nucleotid polimorfizmi) , PH 'dan koruyucu etkiye sahiptir(132).Tam tersine 4336T/Cve 4336C allelinde olan SNP(single nucleotide polymorphism) PH 'ya eğilim yaratmakta(133).

Sonuc olarak, İBH patogenezinde mtDNA'daki polimorfizmlerinin etkisine yönelik yeni-yeni çalışmaların yapılması çok faydalı sonuçlar ortaya çıkaracağını düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

- 1 Nikolaus. S and. Schreiber. S. Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2007; 133: 1670-89.
2. Claudio Fiocchi. Inflammatory bowel disease: Etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205.
3. TSCHOPP, Jürg. Mitochondria: Sovereign of inflammation? *European Journal of immunology*, 2011, 41.5: 1196-1202.
4. Sifroni, K. G., Damiani, C. R., Stoffel, ve ark. Mitochondrial respiratory chain in the colonic mucosal of patients with ulcerative colitis. *Molecular and cellular biochemistry*, 2010, 342: 111-115
5. Yu, X., Wieczorek, S., Franke, A., ve ark. Association of UCP2 _866 G/A polymorphism with chronic inflammatory diseases. *Genes and Immunity*, 2009, 10: 601–605
6. Bar, F., Bochmann, W., Widok, A., Medem, K., Pagel, R., Hirose, M. Mitochondrial gene polymorphisms that protect mice from colitis. *Gastroenterology*, 2013, 145: 1055-1063
7. Blok, M. J., Spruijt, L., de Coo, I. F. M., ve ark. Mutations in the ND5 subunit of complex I of the mitochondrial DNA are a frequent cause of oxidative phosphorylation disease. *Journal of medical genetics*, 2007, 44.4, e74-e74.
8. Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126:1504.
9. Lakatos PL. *Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: Up or down?* *World J Gastroenterology* 2006; **12**(38): 6102-6108.
10. Loftus EV. *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences.* *Gastroenterology* 2004 ; **6**(26): 1506-1517.
11. Tezel A, Dokmeci G, Eskiocak M, Umit H, Soylu A R. *Epidemiological features of ulcerative colitis in Trakya Turkey.* *J Int Med Res.* 2003; 31: 141-148.
12. Tozun N, Atug O, Imeryuz N, Hamzaoglu H O, Tiftikci A, Parlak E, Dagli U et al. Members of the Turkish IBD Study Group. *Clinical characteristics of inflammatory bowel disease in Turkey: A Multicenter epidemiologic survey.* *Journal of Clinical Gastroenterology* 2009; 43 (1): 51-57.

13. Göktürk S, Karaca Ç. [The epidemiology of inflammatory bowel disease]. Türkiye Klinikleri, J Gastroenterohepatol-Special Topics 2012; 5(3):11-6.
14. Hanauer S B. *Inflammatory bowel disease: Epidemiology, pathogenesis and therapeutic opportunities* .İnflammatory Bowel Dis. 2006; **12**(5): 3-9.
15. Tekin A, Vatansev C. *Gastrointestinal görüntülemeye bir yenilik: Kapsül endoskopi*. Selçuk Tıp Derg. 2007; **23**: 39-43.
16. Kirsner JB. Overview of etiology, pathogenesis and epidemiology of inflammatory bowel disease. In: Haubrich WS, Schaffner F, Berk JE, Eds. Bockus Gastroenterology. Vol:2 5 th Ed., Philadelphia: WB Saunders Company, 1995:1293-317.
17. Tözün N, Hamzaoğlu Över H. İltihabi barsak hastalıklarında etyolojik faktörler. Güncel Gastroenteroloji 1997;1/2:287-294.
18. Harvey RG, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's disease. Lancet 1980;1:51
19. Seo M, Okada M, Tsuneyoshi. An index of disease activity in patients with ulcerative colitis. A J G 1992;87(8):971-5.
20. Baykal Y, Naharcı Mİ. İnflamatuvar barsak hastalığı. Sendrom 2005; **17**(4):61-84.
21. Wakefield AJ, Sawyer AM, Hudson M. Smoking, the oral contraceptive pill, and Crohn's disease. Dig Dis Sci 1991;36(8):1147-1150.
22. Cosnes J, Beaugerie L, Carbonnel F. Smoking cessation and the course of Crohn's disease; an intervention study. Gastroenterology 2001;120:1093-1099.
23. Odes HS, Fich A, Reif S. Effects of current cigarette smoking on clinical course of Crohn's disease and ulcerative colitis. Dig Dis Sci 2001;46:1717-1721.
24. Koutrobakis IE, Ulachonikolis IG. Appendectomy and the development of ulcerative colitis; results of ameta-analysis of published case-control studies. Am J Gastroenterol 2000;95(1):171-176.

25. Ohkusa T, Sato N. Antibacterial and antimicrobial treatment for inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:340-51.
26. Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 39:237-8.
27. Koutroubakis I E, Vlachonikolis I G, and Kouroumalis E A. *Inflammatory Bowel Diseases Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of Ulcerative Colitis: A critical review.* *Inflammatory Bowel Dis.* 2002; **8**(4): 277–286.
28. Hermon-Tylor J. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis is a cause of Crohn's disease. *Gut* 2001;49:755-757.
29. Chamberlin W, Graham DY, Hulten K. Review article: Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis as one cause of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:337-346.
30. Lavy A, Broide E, Reif S. Measles is more prevalent in Crohn's disease patients. A multicenter Israeli study. *Dig Liver Dis* 2001;33:472-476.
31. Satsangi J, Parkers M, Jewell D P and Bell JI. *Genetics of inflammatory boweldisease.* *Clinical Science* 1998; **94**: 473-478.
32. Heyman M B, Kirschner B S, Gold EJ, Ferry G. Baldassano R, Cohen S A, Winter H S et al. *Erken Baslangıçlı İnflamatuvar Barsak Hastalığı Olan Çocuklar:Pediatric IBH konsorsiyumu kayıtlarının incelenmesi.* *The Journal of Pediatrics Turkish Edition* 2005;**1**(1). (*J Pediatr* 2005; 146: 35-40).
33. Yang H, McElree C, Roth M P, Shanahan F, Targan S R, and Rotter JI. *Familialempirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non- Jews.* *Gut* 1993; **34** (4): 517-524.
34. Laharie D, Debeugny S, Peeters M, et al. Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. *Gastroenterology* 2001; 120:816.
35. Roth MP, Petersen GM, McElree C, et al. Familial empiric risk estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology* 1989; 96:1016.
36. Monsén U, Broström O, Nordenvall B, et al. Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22:214.

37. Fielding JF. The relative risk of inflammatory bowel disease among parents and siblings of Crohn's disease patients. *J Clin Gastroenterol* 1986; 8:655.
38. Yang H, McElree C, Roth MP, et al. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* 1993; 34:517.
39. Satsangi J, Grootcholten C, Holt H, Jewell DP. Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 38:738.
40. Hitchon, C. A., ve El-Gabalawy, H. S. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 2004, 6: 265-278.
41. Schroder, K., Tschopp, J., The inflammasomes. *Cell*, 2010, 140.6: 821–832
42. Davis, B. K., Wen, H., Ting, J. P.-Y., The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annual review of immunology*, 2011, 29: 707-735.
43. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007; 39:596.
44. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007; 39:207.
45. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 2007; 39:830.
46. McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, et al. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat Genet* 2008; 40:1107.
47. Cooney R, Baker J, Brain O, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med* 2010; 16:90.
48. Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* 2010; 11:55.
49. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006; 314:1461.

50. Franke A, Balschun T, Sina C, et al. Genome-wide association study for ulcerative colitis identifies risk loci at 7q22 and 22q13 (IL17REL). *Nat Genet* 2010; 42:292.
51. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* 2009; 361:2033.
52. Rivas MA, Beaudoin M, Gardet A, et al. Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2011; 43:1066.
53. McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, et al. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat Genet* 2008; 40:1107.
54. Cooney R, Baker J, Brain O, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med* 2010; 16:90.
55. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* 2011; 43:246.
56. UK IBD Genetics Consortium, Barrett JC, Lee JC, et al. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet* 2009; 41:1330.
57. Kaser A, Lee AH, Franke A, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 2008; 134:743.
58. Duerr H. R. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Clinics of North America* 2002;31:63-76.
59. Jean-Pierre Hugot, Judy H Cho: Update on genetics of inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Gastroenterology* 2002;18:410-415.
60. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:867-874.
61. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C. Mapping of susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996;379:821-823.
62. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-606

63. Messick J, Hanauer S B, Kornbluth A, Plevy S E, Sandborn W J. *Progress in IBD Therapy: Achieving Current and Future Therapeutic Goals* Current Medical Evidence 2010; **3**(9): 4-11
64. Giaffar MH, Clark KA, Holdsworth CD. ASCA in patients with Crohn's disease and their possible pathogenic importance. *Gut* 1992; **33**: 1071-75
65. Koutroubakis IE, Petinaki E, Mouzas IA, Vlachonicolis IG, Anagnostopoulou E, Castanas E, Maniatis AN, Kouroumalis EA. Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in Greek patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001; **96**: 2:449-54
66. Banks P. The utility of ANCA and ASCA in IBD. *Infl Bowel Dis* 1999; **5**: 61-64
67. Vasilias EA, Plevy SE, Landers CJ, Binder SW, Fergusson DM, Yang H, Rotter JI, Vidrich A, Targan SR. Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patient with Crohn's disease define a clinical subgroup. *Gastroenterology* 1996; **110**: 6:1810-19
68. Price WH. A high incidence of chronic inflammatory bowel disease in patients with Turner's syndrome. *J Med Genet* 1979; **16**: 263.
69. Weinrieb IJ, Fineman RM, Spiro HM. Turner syndrome and inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1976; **294**: 1221.
70. Hayward PA, Satsangi J, Jewell DP. Inflammatory bowel disease and the X chromosome. *QJM* 1996; **89**: 713.
71. Visser G, Rake JP, Fernandes J, et al. Neutropenia, neutrophil dysfunction, and inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib: results of the European Study on Glycogen Storage Disease type I. *J Pediatr* 2000; **137**: 187.
72. Roe TF, Coates TD, Thomas DW, et al. Brief report: treatment of chronic inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib with colony-stimulating factors. *N Engl J Med* 1992; **326**: 1666.
73. Vaughan D, Drumm B. Treatment of fistulas with granulocyte colony-stimulating factor in a patient with Crohn's disease. *N Engl J Med* 1999; **340**: 239.
74. Lakatos L., Pandur T., David G., Balogh Z., Kuronya P., Tollas A., & Lakatos P. L. Association of extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary with disease phenotype:

results of a 25-year follow-up study. *World Journal of Gastroenterology*, 2003, 9.10: 2300-2307.

75. Elson, C. H., Sartor, R. B., Tennyson, G. S., Riddell, R. H. *Experimental models of inflammatory bowel disease. Gastroenterology*, 1995, 109.4: 1344-67.

76. Toyoda, H., Wang, S. J., Yang, H. Distinct association of HLA Class II genes with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 1993, 104:741-48.

77. Yang, H., Rotter, J. I, Toyoda, H., ve ark. Ulcerative colitis a genetically heterogenous group defined by genetic (HLA classII) and subclinical (antineutrophil cytoplasmic antibodies) markers. *Journal of Clinical Investigation*, 1993, 92.2: 1080.

78. Grisham, M. B. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *The Lancet*, 1994, 344.8926: 859-861.

79. Rachmilewitz, D., Karmeli, F., Okon, E. Sulfhydryl blocker – induced rat colonic inflammation is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase. *Gastroenterology*, 1995, 109.1: 98-106.

80. Lundberg, J. O. N., Hellström, P. M., Lundberg, J. M., Aving K. Greatly increased luminal nitric oxide in ulcerative colitis. *The Lancet*, 1994, 344.8938: 1673-74

81. Sartor, R. Balfour. Cytokines in intestinal inflammation: Pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology*, 1994, 106.2 : 533-39.

82. Bai, A. P., Ouyang, Q. Probiotics and inflammatory bowel diseases. *Postgraduate medical journal*, 2006, 82.968: 376-382

83. Santhanam, S., Rajamanickam, S., Motamarri, A., ve ark. Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in the colonic mucosa in ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases*, 2012, 18: 2158-2168

84. Pinkoski, M., J., Waterhouse, N., J., Green, D., R. Mitochondria, apoptosis and autoimmunity. *Current Directions in Autoimmunity*, 2006, 9: 55–73.

85. Lee, H. T., Lin, C. S., Chen, W. S., Liao, H. T., Tsai, C. Y., & Wei, Y. H. Leukocyte mitochondrial DNA alteration in systemic lupus erythematosus and its relevance to the susceptibility to lupus nephritis. *International journal of molecular sciences*, 2012, 13.7: 8853-8868.

86. Shoubridge, E. A. Nuclear genetic defects of oxidative phosphoryation. *Human molecular genetics*, 2001, 10.20: 2277-2284.
87. Waller, S., Tremelling, M., Bredin, F. ve ark. Evidence for association of OCTN genes and IBD5 with ulcerative colitis. *Gut*. 2006; 55: 809–814
88. Delpre, G., Avidor, I., Steinherz, R., ve ark. Ultrastructural abnormalities in endoscopically and histologically normal and involved colon in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 1989; 84: 1038–1046.
89. Hsieh, S. Y., Shih, T. C., Yeh, C. Y., ve ark. Comparative proteomic studies on the pathogenesis of human ulcerative colitis. *Proteomics*. 2006;6: 5322–5331.
90. Sobenin, Igor A., Sazonova, M. A., Postnov, A. Y., ve ark. Mitochondrial mutations are associated with atherosclerotic lesions in the human aorta. *Journal of Immunology Research*, 2012
91. Yu, X., Koczan, D., Sulonen, A. M., ve ark. mtDNA nt13708A variant increases the risk of multiple sclerosis. *PLoS ONE*, 2008, 3.2: e1530
92. Van der Walt, J. M., Nicodemus, K. K., Martin, E. R., Scott, W. K., Nance, M. A., Watts, R. L., ve ark. Mitochondrial polymorphism significantly reduces the risk of Parkinson disease. *The American Journal of Human Genetics*, 2003, 72.4: 804-811.
93. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988;331:717-719.
94. Wallace DC, Singh G, Lott MT, ve ark. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988;242:1427-1430.
95. Schon EA, Bonilla E, DiMauro S. Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J Bioenerg Biomembr* 1997;29:131-149.
96. Majamaa K, Moilanen JS, Uimonen S, ve ark. Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke like episodes: prevalence of the mutation in an adult population. *Am J Hum Genet* 1998;63:447-454.
97. Chinnery PF, Turnbull DM. Epidemiology and treatment of mitochondrial disorders. *Am J Med Genet* 2001;106:94-101.
98. Junqueira LC, Carneiro J, Kelly RO. Mitochondria. In: Junqueira LC, Carneiro J, Kelly RO eds. *Basic Histology*. Chapter 2. 8th edition. Appleton and Lange. Connecticut. 199:27-29.

99. Palade GE. An electron microscope study of mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* 1953;1:188-211.
100. Herrmann JM, Neupert W. Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol* 2000;3:210-214.
101. Mayes PA. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. In: Murray RK, Granner DK., Mayes PA., Rodwell VW eds. *Harper's biochemistry*. 24th edition. Section II. Appleton and Lange. Connecticut. 1996;123-134.
102. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132-1136.
103. Chinnery PF, Schon EA. Mitochondria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:1188-1199.
104. Tyler DD. Biogenesis of mitochondria. In: Tyler DD ed. *The Mitochondrion in health and disease*. VCH Publishers. New York. 1992:443-476.
105. DiMauro S. Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 2004;1658:80-88.
106. De Vivo DC, DiMauro S. Mitochondrial diseases. In: Kenneth F. Swaiman ed. *Pediatric Neurology. Principles and practice*. Volume II. Chapter 69. 2nd edition. St Louis, Missouri. 1994:1335-1356.
107. Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:6715-6719.
108. Munnich A. Disorders of Mitochondrial Energy Metabolism. In: Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH eds. *Inborn metabolic diseases, Diagnosis and Treatment*. 4th edition. Springer Medizin Verlag, Heidelberg. 2006:161-217
109. Schapira HVA. Mitochondrial disease. *Lancet* 2006;368:70-82.
110. Birky CW. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms and models. *Annu Rev Genet* 2001;35:125-148.
111. Bogenhanen D, Clayton DA. Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* 1977;11:719-727.

112. Anderson S, Bankier AT, Barrel BG, ve ark. Sequence and organization of human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290:457-465.
113. Zevianni M, Antozzi C. Defects of mitochondrial DNA. *Br Pathol* 1992;2:121.
114. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 2005;6:389-402.
115. Wallace DC, Brown MD, Lott MT. Mitochondrial DNA variation in humanevolution and disease. *Gene* 1999;238:211-230.
116. Menkes JH. Metabolic diseases of the nervous system. In: Menkes JH, SarnatBH ed. *Child neurology*. Chapter 1. Sixth edition. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. 2000:135-147.
117. Chaturvedi S, Bala K, Thakur R, Suri V. Mitochondrial encephalopathies: advances in understanding. *Med Sci Monit* 2005;11:238-246.
118. Johns RD. Mitochondrial DNA and disease. *New Engl J Med* 1995;333:638-644.
119. Holt IJ, Harding AE, Petty RK, ve ark. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet* 1990;46:428-433.
120. Birky CW. Relaxed and stringent genomes: why cytoplasmic genes don't obey Mendel's laws. *J Heredity* 1994;85:355-365.
121. Schapira AHV, Cock HR. Mitochondrial myopathies and encephalomyopathies. *Eur J Clin Invest* 1999;29:886-898.
122. McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM. The neurology of mitochondrialDNA disease. *Lancet Neurology* 2002;1:343-351.
123. Chinnery PF, Howell N, Lightowlers RN, Turnbull DM. MELAS and MERF. The relationship between maternal mutation load and the frequency of clinically affected offspring. *Brain* 1998;121:1889-1894.
124. Oldfords A, Tulinius M. Mitochondrial encephalomyopathies. *J NeuropatholExp Neurol* 2003;62:217-227.
125. Thornburn DR, Dahl HHM. Mitochondrial disorders: Genetics, counselling, prenatal diagnosis and reproductive options. *Am J Med Genet* 2001;106:102- 114.
126. Hajizadeh, S., DeGroot J, TeKoppele, J. M., Tarkowsk A., Collins, L. V. Extracellularmitochondrial DNA andoxidativelydamaged DNA in synovialfluid

of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritisresearch&therapy*, 2003, 5.5: 234-240

127.Chinnery, P., F., Brown, D., T., Andrews, R., M., ve ark. The mitochondrial ND6 gene is a hot spot for mutations that cause Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2001, 124.1: 209–218.

128.Chomyn, A. Mitochondrial genetic control of assembly and function of complex I in mammalian cells. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 2001, 33.3: 251-257.

129.Luft, R., The development of mitochondrial medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994. 91: 8731–8738.

130.Hajizadeh S, DeGroot J, TeKoppele JM, Tarkowski A, Collins LV: Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2003, 5:R234-R240.

131. Collins LV, Hajizadeh S, Holme E, Jonsson IM, Tarkowski A: Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *J Leukoc Biol* 2004,75:995-1000.

132.Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. Van der Walt JM¹, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Haines JL, Koller WC, Lyons K. *Am J Hum Genet*. 2003 Apr;72(4):804-11. Epub 2003 Feb 28.

133.J Neurol Sci. 2005 Sep 15;236(1-2):49-54. Mitochondrial DNA polymorphisms and risk of Parkinson's disease in Spanish population. Huerta C¹, Castro MG, Coto E, Blázquez M, Ribacoba R, Guisasola LM, Salvador C, Martínez C, Lahoz CH, Alvarez V.