



T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

VİTİLİGO HASTALARINDA *DROSHA*, *DICER* VE *DGCR8* GEN  
POLİMORFİZMLERİNİN VE EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS

SONER AŞIR

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MERSİN  
TEMMUZ-2021

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**VİTİLİGO HASTALARINDA *DROSHA*, *DICER* VE *DGCR8* GEN  
POLİMORFİZMLERİNİN VE EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS**

**SONER AŞIR**

ORCID ID: 0000-0001-8604-0377

**DANIŐMAN**  
**DOÇ. DR. ÖZLEM İZCİ AY**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MERSİN**  
**TEMMUZ- 2021**

## ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim.

## ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific Works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

13 /07/ 2021

İmza / Signature



Öğrenci Adı ve Soyadı / Student Name and Surname

## ÖZET

### VİTİLİGO HASTALARINDA *DROSHA*, *DICER* VE *DGCR8* GEN POLİMORFİZMLERİNİN VE EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Vitiligo, melanositlerin seçici bir şekilde yok edilmesinden kaynaklanan cilt, saç ve oral mukozayı etkileyen otoimmün bir hastalıktır. Vitiligoda melanosit kaybı için birden fazla teori önerilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda vitiligo patogeneğinde otoimmün teoriyi destekleyen güçlü kanıtlar gösterilmiştir. Bu teorilere rağmen hastalığın genetik alt yapısı hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Vitiligo genetiğini aydınlatmak için yapılan çalışmalar son zamanlarda miRNA'lar üzerinde yoğunlaşmıştır. MİRNA'lar hücre büyümesi, farklılaşma, apoptoz ve immün yanıt gibi çeşitli hücresel işlemlerin temel düzenleyicileri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca miRNA biyogeneğinde yer alan gen polimorfizmlerinin de miRNA ekspresyon seviyesinde değişime neden olabileceği ve çeşitli hastalıkların patogeneğine katkı sağladıkları düşünülmektedir. Çalışmamızda miRNA biyogeneğinde yer alan *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8* genlerinin ekspresyon düzeyleri ve polimorfizmleri, hasta (n=55) ve kontrol (n=56) bireylerin kan örneklerinde belirlendi. Seçilen genlerin ekspresyon düzeyleri ve polimorfizmleri, Real Time PCR'da karşılaştırmalı CT yöntemi ve genotipleme yöntemi kullanılarak analiz edildi. Genotip ve allel dağılımları değerlendirmeleri sonucunda, *DICER* geni için grup ile genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki vardır ( $p<0,05$ ). Buna göre; sadece hastaların CT genotip oranı (%35,2) kontrollerin CT oranından (%14,8) daha yüksek gözlemlenmiştir. *DROSHA* ve *DGCR8* genlerindeki polimorfizmlerle vitiligo arasında ilişki gözlenmedi ( $p>0,05$ ). *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8* geninde hasta ve kontrol grupları arasında gen ekspresyonları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ( $p<0,05$ ). *DICER* gen ekspresyon düzeyinin hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla 0,5 kat azaldığı, *DROSHA* geninin ekspresyon düzeyinin hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla 29 kat azaldığı ve *DGCR8* geninde ise hasta grubunun kontrol grubuna kıyasla 1,8 kat azaldığı saptanmıştır. Ayrıca *DROSHA* ve *DGCR8* ekspresyonu arasında interaksiyon gözlenmiştir. Çalışmamızda genlerin polimorfizmi ve ekspresyonu arasındaki ilişkisine de bakıldı. Anlamlı bir ilişki bulunamadı ( $p>0,05$ ). Elde ettiğimiz bu sonuçlar miRNA'ların vitiligo patogeneğinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Çalışmamızın miRNA'ların vitiligo etiyolojisindeki rolünün ortaya çıkartılması amacıyla yapılacak araştırmalar için, tanı ve tedavi için yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Vitiligo, Melanogenez, Ekspresyon, miRNA, Polimorfizm

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF *DROSHA*, *DICER* AND *DGCR8* GENE POLYMORPHISMS AND EXPRESSION LEVELS IN VITILIGO PATIENTS

Vitiligo is an autoimmune disease that affects the skin, hair and oral mucosa caused by the selective destruction of melanocytes. Many theories have been proposed for the melanocyte option in vitiligo. Recent studies have shown strong evidence supporting the autoimmune theory in the pathogenesis of vitiligo. Despite these theories, the genetic background of the disease is still not fully elucidated. Studies to elucidate the genetics of vitiligo have recently focused on miRNAs. MiRNAs are recognized as key regulators of various cellular processes such as cell growth, differentiation, apoptosis, and immune response. In addition, it is thought that gene polymorphisms in miRNA biogenesis may cause changes in miRNA expression level and contribute to the pathogenesis of various diseases. In our study, the expression levels and polymorphisms of *DICER*, *DROSHA* and *DGCR8* genes, which are involved in miRNA biogenesis, were determined in blood samples from patients (n=55) and control (n=56). Expression levels and polymorphisms of selected genes were analyzed in Real Time PCR using comparative CT method and genotyping method. As a result of the genotype and allele distribution evaluations, there was a statistically significant relationship between the group and genotypes for the *DICER* gene ( $p<0.05$ ). According to this; only the CT genotype rate of the patients (35.2%) was higher than the CT rate of the controls (14.8%). No correlation was observed between vitiligo and polymorphisms in *DROSHA* and *DGCR8* genes ( $p>0.05$ ). A statistically significant difference was found between the patient and control groups in terms of gene expressions in *DICER*, *DROSHA* and *DGCR8* genes ( $p<0.05$ ). It was determined that the *DICER* gene expression level decreased 0.5 times in the patient group compared to the control group, the expression level of the *DROSHA* gene decreased 29 times in the patient group compared to the control group, and in the *DGCR8* gene, the patient group decreased 1.8 times compared to the control group. Also, interaction between *DROSHA* and *DGCR8* expression was observed. In our study, the relationship between polymorphism and expression of genes was also examined. No significant relationship was found ( $p>0.05$ ). These results show that miRNAs may play a role in the pathogenesis of vitiligo. It is thought that our study will be a guide for the research, diagnosis and treatment to reveal the role of miRNAs in the etiology of vitiligo.

**Keywords:** Vitiligo, Melanogenesis, Expression, miRNA, Polymorphism

## TEŐEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, değerli bilgi ve birikimini bana aktaran, tezimin planlanması ve sürdürülmesinde verdiği değerli bilgiler ve göstermiŐ olduğu sabırlarından dolayı danıŐman hocam Sayın Doç. Dr. Özlem İZCİ AY' a ; tez çalıŐmalarım boyunca verdiği teorik bilgilerle benden desteğini esirgemeyen, Anabilim Dalı BaŐkanımız, Prof. Dr. M. Emin ERDAL' a teŐekkür ederim.

Tez çalıŐmam için gereken kan örneklerinin temin edilmesini sağlayan Gurbet Doğru zdemir' e ve ailesinden zaman ayırıp yaptığım çalışmalarda benden tecrübesini ve yardımlarını esirgemeyen çok kıymetli abim Kenan evik'e teŐekkür ederim.

Eğitimim boyunca benden maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, göstermiŐ oldukları anlayıŐ, sabır ve emeklerinden dolayı anne ve babama teŐekkür ederim. Varlığını her zaman yanımda hissettiğim, neŐesiyle, sabrıyla ve göstermiŐ olduğu anlayıŐtan dolayı kız arkadaŐıma teŐekkür ediyorum.

**Bu tez alıŐması, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından 2019-3-TP2-3657 kodlu proje olarak desteklenmiŐtir. Katkılarından dolayı teŐekkür ederim**

## İÇİNDEKİLER

---

	<b>Sayfa</b>
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŐEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŐEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR ve SİMGELELER	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Vitiligo Tarihçesi	4
2.2. Epidermiyolojisi	5
2.3. Vitiligo Hastalığının Etiyopatogenezi	7
2.4. Sınıflandırılması	8
2.4.1. Segmental Vitiligo	8
2.4.2. Non-Segmental Vitiligo	9
2.5. Vitiligo Genetiği	10
2.6. Otoimmün Hipotez	13
2.7. Epidermisin Yapısı	15
2.8. Melanositler ve Melaninlerin Yapısı	16
2.8. Melanositler	16
2.8.2. Melanin Yapısı	17
2.9. Melanozomlar ve Melanogenez	18
2.9.1. Melanozomlar	19
2.9.2. Melanozom Oluşumu	20
2.10. Melanin Üretiminin Moleküler Mekanizması (Melanogenez)	22
2.11. MİRNA	24
2.12. MİRNA Biyogenezi	25
2.12.1. Klasik miRNA Biyogenezi	25
2.12.2. Klasik Olmayan miRNA Biyogenezi	27
2.13. Deri Hastalıklarında miRNA	27
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b>	<b>30</b>

---

	<b>Sayfa</b>
3.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması	30
3.2. Kullanılan Araçlar- Gereçler, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	30
3.2.1 Kullanılan Araçlar- Gereçler	30
3.2.2. Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	30
3.2.3. RNA İzolasyonu için Kullanılan Kimyasallar	32
3.3. SNP Analizi	32
3.3.1 Periferik Kandan DNA İzolasyonu	32
3.3.2. DNA İzolasyon Protokolü	32
3.4. Çalışma Gruplarının Polimorfizmler için Genotip Tayini	33
3.4.1. Genotipleme Yapılacak SNP'lerin Seçilmesi	33
3.4.2.Genotipleme için Primer ve Probların Sentezlenmesi	34
3.4.3. Real Time PCR ile Genotipleme Deneyi	36
3.4.4.Genotip Tayini	37
3.5. EKSPRESYON ANALİZİ	39
3.5.1. Periferik Kandan RNA İzolasyonu	39
3.5.1.1. RNA İzolasyon Protokolü	39
3.6 RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Analizi ve cDNA sentezinde kullanılacak RNA kalıp miktarlarının belirlenmesi	39
3.7. Real-Time PCR ile Gen Ekspresyon Analizine Yönelik Primer ve Prob Dizayını	40
3.8. Real Time PCR ile Ekspresyon Analizi	41
3.8.1. cDNA Eldesi	41
3.8.2. PCR Ürünlerinin Saptanması	42
3.8.3. Ekspresyon Çalışması için Veri Analizi	43
3.9. İstatistiksel Analiz	43
3.9.1. Genotip Verilerinin Düzenlenmesi ve İstatistiksel Analizi	43
3.9.2. Ekspresyon Verilerinin Düzenlenmesi ve İstatistiksel Analizi	43
<b>4. BULGULAR</b>	<b>44</b>
4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Yaş ve Cinsiyet Bakımından Değerlendirilmesi	44
4.2. Hasta ve Kontrol Gruplarında <i>DICER</i> , <i>DROSHA</i> ve <i>DGCR8</i> Gen Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi	44
4.3. Hasta ve Kontrol Gruplarında <i>DICER</i> , <i>DROSHA</i> ve <i>DGCR8</i> Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Analizi	45
4.3.1 <i>DICER</i> Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	46
4.3.2. <i>DROSHA</i> Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	47
4.3.3. <i>DGCR8</i> Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	47
4.4. Genotip ve Ekspresyon Ölçümlerinin Birbirleri ile İlişkisi	49

	<b>Sayfa</b>
4.4.1. <i>DICER</i> rs1057035 Ekspresyon Analizi	49
4.4.2. <i>DROSHA</i> rs493760 Ekspresyon Analizi	49
4.4.3. <i>DGCR8</i> rs1640299 Ekspresyon Analizi	50
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	51
KAYNAKLAR	58
EKLER	66
ÖZGEÇMİŐ	68

---



**TABLolar DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
Tablo 3.1. Genotip Tayini Yapılan miRNA Oluşum Yolağındaki SNP'ler	<b>34</b>
Tablo 3.2 <i>DICER</i> rs1057035, <i>DROSHA</i> rs493760, <i>DGCR8</i> rs1640299 polimorfizmleri için dizayn edilen primer ve prob dizileri	<b>35</b>
Tablo 3.3. Genotipleme Deneyinde Kullanılan Real-Time Karışımı (Mix) İçeriğı	<b>37</b>
Tablo 3.4. Genotipleme deneyi için tasarlanan Real Time PCR koşulları	<b>37</b>
Tablo 3.5. Ekspresyon Analizinde Kullanılan <i>DICER</i> , <i>DROSHA</i> , <i>DGCR8</i> ve <i>BETA AKTİN (ACTB)</i> Genlerine Ait Primer-Prob Dizileri	<b>41</b>
Tablo 3.6. cDNA Eldesi için Hazırlanan Karışım Miktarları	<b>42</b>
Tablo 3.7 Gen Ekspresyon Analizi İçin Hazırlanan Karışım	<b>43</b>
Tablo 4.1. Hasta ve Kontrol grubundaki kadın ve erkek bireylerin yaş ortalaması	<b>44</b>
Tablo 4.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Polimorfizmlerin Genotip Dağılımları	<b>44</b>
Tablo 4.3. Kontrol ve Hasta Gruplarına Göre İlgili Genlerin Min-Max, Medyan, Q1-Q3 ve P Değerleri.	<b>45</b>
Tablo 4.4. Polimorfizm Grupları ile <i>DICER</i> Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması	<b>49</b>
Tablo 4.5. Polimorfizm Grupları ile <i>DROSHA</i> Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması	<b>49</b>
Tablo 4.6. Polimorfizm Grupları ile <i>DGCR8</i> Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması	<b>50</b>

## ŐEKİLLER DİZİNİ

---

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. Segmental Vitiligo ve çeşitleri	<b>9</b>
Şekil 2.2. Non segmental Vitiligo ve çeşitleri	<b>10</b>
Şekil 2.3. Vitiligo patogenezinde katkıda bulunan faktörler	<b>11</b>
Şekil 2.4. Vitiligoya eşlik eden otoimmün hastalıklar	<b>13</b>
Şekil 2.5. Melanin, Ömelanin ve Feomelanin kimyasal gösterimleri	<b>17</b>
Şekil 2.6. Epidermis ve yapısında bulunan melanosit ve melaninlerin konumu	<b>19</b>
Şekil 2.7. Derinin melanizasyon seviyesindeki kritik biyolojik süreçler	<b>22</b>
Şekil 2.8. Melanizasyon aşamaları	<b>24</b>
Şekil 2.9. miRNA biyogenezinin klasik yolunun şematik gösterimi	<b>26</b>
Şekil 2.10. miRNA ve ilişkili hastalıklar	<b>28</b>
Şekil 3.1 <i>DICER</i> 'e ait Real Time PCR ile çoğaltılan rs1057035'in (T>C) yer aldığı bölgenin dizisi	<b>34</b>
Şekil 3.2 <i>DROSHA</i> 'ya ait Real Time PCR yöntemi ile çoğaltılan rs493760'ın (T>C) olduğu bölgenin dizisi	<b>34</b>
Şekil 3.3 <i>DGCR8</i> 'e ait Real Time PCR yöntemi ile çoğaltılan rs1640299'un (G>T) olduğu bölgenin dizisi	<b>35</b>
Şekil 3.4. <i>DICER</i> rs1057035 polimorfizmi A-T için Genotipleme Deneyi Sonucunda Elde Edilen Multicomponent Grafiğinde Homozigot TT Genotipi	<b>38</b>
Şekil 3.5. <i>DICER</i> rs1057035 polimorfizmi A-T için Genotipleme Deneyi Sonucunda Elde Edilen Multicomponent Grafiğinde Heterozigot AT Genotipi	<b>39</b>
Şekil 4.1 Gruplara Göre Ekspresyon Düzeylerinin Dağılım Grafiği	<b>46</b>
Şekil 4.2. Hasta ve kontrol grubunda <i>DICER</i> genine ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi	<b>46</b>
Şekil 4.3. Hasta ve kontrol grubunda <i>DROSHA</i> genine ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi	<b>47</b>
Şekil 4.4. Hasta ve kontrol grubunda <i>DGCR8</i> genine ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi	<b>47</b>
Şekil.4.5. Gruplar arası Gen İnteraksiyon Grafiği	<b>48</b>
Şekil 4.6. Real Time PCR'da Endojen Kontrol Olarak Kullanılan $\beta$ Aktin ve <i>DICER</i> Geninin Ekspresyon eğrisi.	<b>48</b>

---

**KISALTMALAR ve SİMGELER**

<b>Kısaltma/Simgesi</b>	<b>Tanım</b>
<i>AGO</i>	<i>Argounate Protein</i>
<i>AGRP</i>	<i>Agouti ilişkili protein</i>
<i>C</i>	<i>Sitozin</i>
<i>Cyr61</i>	<i>Sistein bakımından zengin protein 61</i>
<i>DCT</i>	<i>Dopakrom tautomeraz</i>
<i>DICER</i>	<i>Dcr1 Homoloğu</i>
<i>DNA</i>	<i>Deoksiribonükleik Asit</i>
<i>dbSNP</i>	<i>SNP Bilgi Bankası</i>
<i>DDR1</i>	<i>Diskoidin Domain Reseptör Tirozin Kinaz 1</i>
<i>TGFBR2</i>	<i>Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta Reseptörü 2</i>
<i>DGCR8</i>	<i>Di George Syndrome Critical Region Gene 8</i>
<i>dNTP</i>	<i>Deoksinükleotidtrifosfat</i>
<i>DHI</i>	<i>Dihidroksiindol</i>
<i>DHICA</i>	<i>Dihidroksiindol karboksilik asit</i>
<i>EDTA</i>	<i>Etilendiamintetraasetikasit</i>
<i>GWAS</i>	<i>Genom Boyu İlişkilendirme Çalışması</i>
<i>GEMİN 3</i>	<i>Çekirdek organeli ile ilişkili protein 3</i>
<i>GEMİN 4</i>	<i>Çekirdek organeli ile ilişkili protein 4</i>
<i>G</i>	<i>Guanin</i>
<i>HLA</i>	<i>İnsan Lökosit Antijen</i>
<i>Hsp 70</i>	<i>Isı şok proteini 70</i>
<i>L-DOPA</i>	<i>L-Dihidroksifenilalanine</i>
<i>MITF</i>	<i>Mikroftalmi ile ilişkili transkripsiyon faktörü</i>
<i>MHC I</i>	<i>Major Histocompatibility Kompleks I</i>
<i>miRNA</i>	<i>Mikro RNA</i>
<i>mRNA</i>	<i>Messenger RNA</i>
<i>MRP</i>	<i>Melanogenez ilişkili protein</i>
<i>MSH</i>	<i>Melanosit Uyarıcı Hormon</i>
<i>NADPH</i>	<i>Nükleotid Adenin Dinükleotit Fosfat Hidrojenaz</i>
<i>NALP1</i>	<i>NLR Ailesi Pirin Domaini İçeren Gen 1</i>
<i>NLRP1</i>	<i>NLR ailesi Pirin domain içeren molekül 1</i>
<i>NSV</i>	<i>Non Segmental Vitiligo</i>
<i>nt</i>	<i>Nükleotid</i>
<i>PCR:</i>	<i>Polimeraz Zincir Reaksiyonu</i>

<b>Kısaltma/Simge</b>	<b>Tanım</b>
<i>PDGFRA</i>	<i>Trombosit kökenli büyüme faktör reseptörü alfa-polipeptid</i>
<i>Pmel17</i>	<i>Premelanozomal protein 17rab7</i>
<i>ROS</i>	<i>Reaktif Oksijen Türleri</i>
<i>RISC</i>	<i>RNA İndüklü Susturma Kompleksi</i>
<i>RNA</i>	<i>Ribonukleik Asit</i>
<i>Rpm</i>	<i>Dakikadaki Dönme Sayısı</i>
<i>SV</i>	<i>Segmental Vitiligo</i>
<i>SNP</i>	<i>Tek Nükleotid Polimorfizmi</i>
<i>SDS</i>	<i>Sodyum Dodesil Sülfat</i>
<i>TRBP</i>	<i>RNA bağlayıcı protein</i>
<i>T</i>	<i>Timin</i>
<i>TARBP2</i>	<i>RNA Bağlama Proteini 2</i>
<i>TE</i>	<i>Tris-EDTA</i>
<i>TYR</i>	<i>Tirozinaz</i>
<i>TYRP1</i>	<i>Tirozinaz ilişkili Protein 1</i>
<i>UV:</i>	<i>Ultraviyole</i>
<i>3'-UTR</i>	<i>Translasyonu Yapılan 3' Bölge</i>
<i>5'-UTR</i>	<i>Translasyonu Yapılan 5' Bölge</i>
<i>VCAM-1</i>	<i>Vasküler adezyon molekülü-1</i>
<i>XPO5</i>	<i>Eksportin 5</i>
<i>°C</i>	<i>Santigrat derece</i>
<i>µg</i>	<i>Mikrogram</i>
<i>µl</i>	<i>Mikrolitre</i>
<i>ng</i>	<i>Nanogram</i>

---

## 1. GİRİŞ

Vitiligo, epidermal melanositlerin aşamalı olarak kaybolması nedeniyle, cilt ve mukozada yerleşmiş yamalar oluşmasına neden olan ve dünya nüfusunun yaklaşık %1'ini etkileyen bir cilt hastalığıdır (1). Bu hastalık aslında, görsel olarak ciltte beyazımsı lezyonlar ile belirgin fenotipi nedeniyle binlerce yıldır bilinmektedir (2).

Bu hastalığa sahip bireylerin çoğu sağlık durumlarındadır ve cilt lezyonlarının depigmentasyonundan başka semptomları yoktur. Vitiligo en yıkıcı psikolojik bozukluklardan biridir ve hasta bireylerin psikolojileri, cildin şekil değiştirmesinin toplumsal algılanmasından ve cilt rengindeki düzensizliklerden etkilenir (3). Hastalık cildin herhangi bir yerinde meydana gelebilir, fakat genel olarak cinsel organlar, yüz ve ellerin etrafındaki alanlarda görülür. Sürtünmenin de etkisiyle boyun, dirsek ve ayak bilekleri gibi bölgelerde de vitiligo tetiklenebilir (4).

Hastalık hemen hemen her yaşta ortaya çıkabilir, ancak bilimsel veriler 20 yaşından önce ortaya çıkma ihtimalinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Hastalığın başlangıç belirtileri arasında, kaşıntı ve ciltte beyazımsı maküla gelişimi rapor edilmiştir. Depigmentasyon veya melanin kaybı ile karakterize olan vitiligo, genel olarak ölümcül etkiye sahip değildir. Buna rağmen hastalığın zararlı sonuçları olabilmektedir. Derideki azalan melanositler (melanin hücreleri) cilt epidermisini Ultraviyole (UV) ışığına maruz bırakarak cilt tahrişi ve kanser riskini arttırabilir. Vitiligo ciltte meydana gelen beyaz lekelerin dağılımına göre; genel olarak segmental (SV) veya segmental olmayan ( Non-Segmental Vitiligo NSV) olarak 2 ana başlıkta incelenir. Hastalığın yaygın olarak görülen formu segmental olmayan vitiligodur ve tüm vücut yüzeyini kaplayacak şekilde yayılım gösterebilir. Segmental olmayan formun aksinde segmental vitiligo vücudun sadece bir bölümünde meydana gelir ve vücut yüzeyine yayılımı sınırlıdır. Bunlara ek olarak vitiligonun iki formu da bir arada bulunabilir ve bu durumda hastalığın tedaviye verdiği yanıt genellikle azdır. Vitiligo nadiren de saçın beyazlaşmasına eşlik eden beyaz lekelerin ortaya çıkması ile karakterize olabilmektedir. Özellikle koyu ten rengine sahip bireylerin cilt, yüz ve eller gibi vücudun açıkta kalan bölgelerinde göze hoş görünmeyen görünüm nedeniyle büyük bir psikososyal etkiye sahip olabilir. Hastalığın psikolojik etkileri arasında; düşük özgüven, zayıf vücut imajı ve cinsel ilişkilerde zorluklar ile sonuçlanan kozmetik ve psikolojik olarak yıkıcı etkileri olabilmektedir. Vitiligo hastalığının prevalansı hakkında genel anlamda bir tahminde bulunmak zordur. Yayınlanan çok sayıda makalede dünya çapında % 0,5 ile % 1 oranında bir prevalans tahmininden alıntı yapsa da, bu oran kültürel ve sosyal farklılıklara göre değişebilir. Ancak vitiligo prevalansı üzerine yakın zamanda yapılan bir incelemede % 0,5 ila % 2 arasında bir dünya prevalansına sahip olduğu doğrulanmıştır. Vitiligo, tüm cilt tiplerini etkileyen ve dünya çapında görülen bir hastalıktır. DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından sınıflandırılan vitiligo,

ciltte fonksiyonel melanosit kaybına neden olur ve genellikle diğer otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilir. Vitiligo etiyopatogenezi halen araştırılmaya devam etmekte olup, bu konuda kesin bir hüküm vermek çok zordur (5).

Hastalığın etiyolojisi hala bilinmemekle birlikte; genetik faktörler, otoimmünite, çevresel faktörler veya melanosit eksikliğinin hastalığın gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (6). Yapılan geniş kapsamlı epidemiyolojik çalışmalar, vitiligo hastalarının yaklaşık %15-20'sinin bir veya daha fazla birinci derece akrabalarının da vitiligoya sahip olduğunu göstermiştir. Otoimmün ve kompleks bir hastalık olan vitiligonunun; immünolojik, çevresel, biyokimyasal ve genetik faktörlerin hastalıktaki rollerinin belirlenmesiyle vitiligo patogenezinin açıklanabileceği düşünülmektedir (3,6).

MikroRNA'lar (miRNA'lar) RNA sessizleştirilmesinde kılavuz moleküller olarak işlev gören küçük kodlayıcı olmayan RNAlardır. Protein kodlayan transkriptlerin çoğunu hedef alan miRNA'lar memelilerde hemen hemen tüm gelişimsel ve patolojik işlemlerde yer alır. MiRNA'ların biyogenezi zamansal ve mekansal kontrol altındadır ve bunların düzensizliği birçok insan hastalıkları, özellikle de kanser ile ilişkilidir (7). MikroRNA'lar, mRNA'nın bozunumu veya translasyonun inhibisyonu ile sonuçlanan mRNA'lara hedefleme yoluyla çeşitli hücre fonksiyonlarını düzenleyen küçük kodlayıcı olmayan bir RNA sınıfına aittir. MikroRNA'lar, hedef genlerin haberci RNA'larına bağlanır ve protein translasyonunu inhibe eder. MiRNA'lar gelişim, hücre fizyoloji ve hastalık patolojisi gibi olayların temel düzenleyicileri olarak bilinirler. Günümüzde, mikroRNA'ların farklı patolojik durumlar için umut verici biyobelirteçler ve terapötik hedefler olabileceği düşünülmektedir. Günümüzde, enflamatuvar, kanser veya deri hastalıklarında serum ve doku miRNA düzeyleri arasında bir ilişki olduğuna dair kesin bir kanıt yoktur ve bu veriler tedavi ve tanı optimizasyonu için umut verici bir temel teşkil edebilir ve bu nedenle bu konu daha fazla araştırma gerektirmektedir. Deri hastalıklarının moleküler patogenezindeki bazı yeni sonuçlar, miRNA'ların hücre hasarında ve hücreler arası iletişimde de yer aldığı fikrini desteklemektedir (8,9). Hastalığın oluşum mekanizmasının aydınlatılması gelecekteki çalışmalara yön vererek hastalığın tanı ve tedavisine katkı sağlaması açısından çok önemlidir. Bu verilere dayanarak çalışmamızda, melanositlerden köken alan ve vücudun çeşitli bölgelerinde melanin pigmentinin kaybıyla sonuçlanan vitiligo hastalığının; periferik kan örneklerinden miRNA biyogenez yolağında görevli genlerinin ekspresyon düzeyleri ile polimorfizmleri arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmayı planladık. Elde ettiğimiz verilerin, vitiligo etiyopatogenezinin aydınlatılmasında, literatüre katkı sağlayacağını ve başka çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

Vitiligo, melanositlerin kaybına bağlı olarak gelişen ve deride beyaz lekeler ile karakterize dünya çapında görülen bir cilt hastalığıdır. M.Ö 2.yüzyılda *De Medicine* adlı kitapta vitiligo terimini kullanan ilk kişinin *Celsus* olduğu ayrıca vitiligo isminin kusur, leke anlamına geldiğini ve "vitiliumdan" türetildiği yazılmıştır. Vitiligo genel olarak lezyonları belirgin kenarlı beyaz maküler olarak bilinir. *Vitiligo Global Issues Consensus Conference (GICC)* tarafından temel olarak 2 ana formda incelemeye başlandı; bunlar segmental (SV) ve non segmental (NSV) vitiligodur (2,10).

Bu hastalığın en sık görülen formu olan NSV simetrik olmayan ve iki tarafa dağılmış beyaz lekelerle karakterizedir. NSV'nun iki taraflı dağılıma sahip farklı klinik alt tipleri tanımlanmıştır. NSV' ya göre daha az yaygınlık gösteren SV ise genellikle tek bir bölgede görülür ve genellikle 6 ay ile 2 yıl içerisinde hızla ilerler ve kendiliğinden durma eğilimindedir. Tedaviye diğer tiplere göre daha az yanıt verir. Hasta bireylerde farklı vitiligo tiplerinin olması bireylerde değişen oranda depigmentasyona neden olur (11,12).

Her iki cinsiyette eşit olarak görülen bu hastalıktan kadınlar erkeklere göre daha fazla yakınmaktadırlar. Hastalık yaşamın herhangi bir döneminde görülebilir fakat veriler hastalığın yaklaşık %70 ile %80 oranında 30 yaşından önce görülmeye başladığını ve hasta bireylerin yarısında 20 yaşından önce ortaya çıktığını göstermektedir (13,14).

Hastalık bireylerin cilt yapısına ve ırkına bakmaksızın dünya nüfusunun %0,5 ila %1'ini etkilemektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda vitiligo hastalığının multifaktöriyel ve poligenetik olduğu bildirilmiştir. Hastalığın gelişmesine; güneş ışığına maruz kalma, stres, melatonin reseptör disfonksiyonu, nöral anormallikler, travma, enfeksiyonlar, maligniteler, endokrin hastalıkları, bazı ilaçlar ve sitotoksik bileşikler dahil olmak üzere çok sayıda faktörün katkı sağladığı düşünülmektedir. Vitiligolu bireylerin ve ayrıca hasta yakınlarının; *addison hastalığı, zararlı anemi, otoimmün troid, tip1 diyabet* gibi diğer otoimmün hastalıkları geliştirme riskleri yüksektir ve buda vitiligonun otoimmün bir hastalık olduğu fikrini desteklemektedir (15,16).

Bilinmeyen etiyolojiye sahip vitiligoda fonksiyonel melanosit kaybına neden olan bu hastalığın mekanizmalarını açıklamak için çok sayıda teori ortaya atılmıştır. Bu teoriler arasında; melanositlerin otoimmün yıkımı, genetik yatkınlık, serbest radikal aracılı melanosit hasarı, nörotransmitter aracılı melanosit hasarı veya bozulmuş melanosit adezyonu gibi teoriler bulunmaktadır. Öne sürülen teoriler arasında otoimmün teori son zamanlarda daha ön plana çıkmıştır ve vitiligo patogenezi anlamak için önerilen en makul teorilerden biri olarak kabul görmektedir. Bilim insanları tarafından ortaya atılan birçok hipotez olmasına rağmen hastalığın patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır (17,18).

Vitiligo için günümüzde bilinen kesin bir tedavi yoktur. Bununla birlikte, bazı ilaçlar azalan pigmentleri eski haline getirebilir. Çoğu hastalıkta olduğu gibi vitiligoda da erken tanı, hastalığı engellemede veya durdurmada yardımcı olabilir. Vitiligo, psikolojik olarak yıkıcı bir hastalıktır. Genel olarak vücudun görünür yerlerinde (eller ve yüzde) ortaya çıkması, benlik algısı ve benlik saygısı üzerinde çok büyük bir etkiye sahiptir. Vitiligolu bireylerin neredeyse tamamına yakını hastalığın giderek daha da kötüleşmesinden kaygılanmakta, utanç duymakta, depresyona girmekte ve bununla beraber sosyal yaşantılarında dışlanmaktadır. Yapılan araştırmalar, vitiligonun egzemaya kıyasla daha fazla zihinsel ve duygusal bir problem oluşturduğunu göstermektedir. Hastalar ayrıca uyku bozukluğu, depresyon, uyum bozukluğu, anksiyete ve distimi gibi çeşitli psikolojik problemler yaşarlar. Ayrıca, hastalara psikolojik danışmanlık desteğinin verilmesi, vitiligo ile başa çıkmalarına ve kendilerini daha iyi hissetmelerine yardımcı olabilir. Bu hastalığın bireyler üzerindeki etkilerini anlamak için 2015 yılında hastalığın Türk toplumu üzerinde yapılan bir çalışmada hastalık tanısı almış bireylere vitiligo ile ilgili bilgi, görüş ve tutumları içeren sorular yöneltilmiştir. Çalışmaya katılan toplam 100 hastanın (58 kadın, 42 erkek) %74'ü hastalığının adını bilmediğini ifade etmiştir. % 90'ı vitiligonun bulaşıcı olmadığını, % 69'u hastalık hakkında yeterli bilgiye sahip olduğunu ve % 48'i hastalık hakkında bir doktordan bilgi aldığını belirtmiştir. Ayrıca hastaların % 22'si kalıtımın, % 84'ü stres ve %37 si aşırı güneşe maruz kalmanın vitiligoya neden olabileceğini ifade etmişlerdir. Hastaların %36' sısı ise vitiligonun ciddi bir hastalık olmadığını ifade etmiştir (5,19)

Yapılan başka bir toplumsal çalışma ise hastaların sosyal yaşantılarında çektikleri zorluklar ile ilgilidir. Çalışmaya katılanlar arasında genç ve daha eğitim seviyesi düşük olan bireyler vitiligonun hijyen eksikliğinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Çalışmaya katılanların %50' sinden fazlası vitiligo hastası bir bireyle evlenmeye olumlu bakmadığı ancak düşük gelirli olan bireylerin evliliği kabul etme olasılığının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Toplumda vitiligo ile ilgili çok sayıda yanlış anlamalar ve olumsuz davranışlar mevcuttur. Vitiligo hastalığı hakkında toplumu bilinçlendirmek ve empati kurma yetisini aşlamak hastaların kendini psikolojik olarak daha iyi ve öz güvenli hissetmelerini sağlayacaktır (20).

## 2.1. VİTİZLİGONUN TARİHÇESİ

MÖ 1000-1500 yılları arasında Hindistan'da yazıldığı düşünülen eski bir metin olan *Atharvaveda Papirüsünde* ve yaklaşık olarak aynı zamanlarda yazıldığı düşünülen *Leviticus'un* kitabında da deri üzerindeki beyaz lekelerin ayrıntılarına yer verilmiştir. 3.500 yıl önceki Mısır ve Hint metinlerinde de yer alan bu psikolojik olarak çöküşe neden olan hastalık bireylerin sosyal yaşamlarında her zaman itici bulunmalarına neden oluyordu (21).

*Hieronymus Mercurialis* 16. yüzyılda cilt hastalıkları üzerine yayınladığı kitabında anormal ten rengi bozukluklarına "*Leuce ve Alphos*" adında bölüm ayırır ve vitiligo kelimesinin latince bir kelime olan "*vitilium*" veya "*vitulum*" (küçük leke) den türetilen bir kelime olduğunu belirtir. 17. yüzyıldan önce ten renginin kökeni ile ortaya atılan teorilerin hepsi dini inanışlara dayandırılmaktaydı. Jean Roland 1618'de siyah ten rengine sahip bir bireyin epidermisini dermisinden ayırmayı başardı ve derinin üst katmanının (epidermis) pigmentli olduğunu ve alt deride pigment olmadığını gözlemledi. Koyu ten rengine güneş ışığının ve sıcaklığın neden olduğunu öne süren Jean Roland bu teori ile ekvatordaki bireylerin koyu ten rengini açıklayabilmiş ancak Avrupalıların neden beyaz deri rengine sahip olduklarını açıklayamamıştır. Bunun ardından açıklanamayan bu çelişkiyi fark eden Gezici Browne, ten renginin spermde taşınan genetik bir özellik olduğunu ileri sürdü. Deri renginin nedeni ve sahip olduğu mekanizmasının aydınlatılması için uzun yıllar boyunca teoriler ortaya atılmaya devam etti. *John Hunter, Marcello Malpighi, Leeuwenhoek, Immanuel Kant* gibi birçok araştırmacı koyu ten rengine sahip Etiyopyalılar üzerinde çalışmasına rağmen, uygun araçlar ve tekniklerden yoksun oldukları için, deri renginin mekanizması hakkında bir fikir sahibi olamadılar. O zamanlarda asıl merak edilen deri renginin mekanizmasından ziyade, deri renginin nasıl kaybolduğuydu (22).

Antik çağ boyunca insanlar, vitiligo ve cüzzam dahil birçok hastalığın nedeninin, bireylerin yaşamlarındaki olumsuz bir eylemin sonucu olduğunu düşünüyorlardı. Levililer'in Eski Ahit Kitabı'nda, "beyaz lekeler" Tanrı tarafından ölümcül bir günah işlediği için bir ceza olarak görülüyordu. Teorileri binlerce yıl öncesine dayanan bu hastalığın dünya çapındaki dağılımı tüm ırkların bir sorunu olduğunu göstermektedir. Tarihiçesi antik çağlara dayanıyor olsa da, vitiligo ile ilişkili kamuoyu yanlış anlaşılması ve sosyal yaşamdan dışlanmanın ortadan kalkmadığı görülmektedir. Hala dünyanın birçok yerinde vitiligonun bir günahın sonucu ortaya çıktığına inanılmakta ve hasta bireyler çevrelerindeki insanlar tarafından dışlanmaktadır. Vitiligo hastalarının, yaşam kalitelerini iyileştirmek için toplumu bu hastalık konusunda eğitmek çok önemlidir (23).

## 2.2 VİTİLİGO EPİDEMİYOLOJİSİ

Vitiligo, melanositlerin seçici bir şekilde yok edilmesinden kaynaklanan, kronik bir cilt hastalığıdır. Vitiligo sadece derideki melanositlerin bir hastalığı değildir. İnsan melanositleri, nöral krestten köken alır ve vücudun çeşitli yerlerinde bulunur. Deri melanositlerinin tutulumu en görünür olanı ve toplumda en sık görülenidir (24).

Vitiligo ile ilgili yapılan genetik epidemiyolojik çalışmaların yayınlanması uzun zaman almıştır. *Hafez ve Das* vitiligo için poligenik ve çok faktörlü bir kalıtım şekli önermiş ve hastalığın kalıtsallığını %46 ila %72 olarak tahmin etmiştir. Daha sonraki araştırmalarda da benzer şekilde

poligenik, çok faktörlü olan bu modeli desteklemekle birlikte, kalıtım oranının yaklaşık %50 kadar olduğu açıklanmıştır (25).

Vitiligo hastalarının iki önemli alt grubu vardır. Birinci grup, 12 yaşında veya daha önce hastalığa yakalananlar ve ikinci grup ise 12 yaşından büyük olanlar olarak ayrılmıştır. Birinci grupta ailelerin büyük çoğunluğunda *canity*, *halo nevüs*, *koebner fenomeni*, segmental hastalık ve atopi öyküsü vardır. İkinci grup ise daha fazla akrofasiyal hastalık ve komorbid tiroid hastalığı öyküsü vardır. Görülme sıklığı yaşamın erken dönemlerinde meydana gelen popülasyonlarda, örneğin Hindistan'ın bazı bölgelerinde, başlangıç yaşı ve komorbiditeler, ortalama başlangıç yaşının 6,9 olduğu ve hastaların yaklaşık dörtte birinde aile öyküsünün kaydedildiği ilk gruba dahil olan ailelerdir. Başlangıç yaşının dağılımı açısından nüfusun ikinci gruba benzer olduğu iki popülasyon, Danimarka ve Yunanistan olarak tanımlanmıştır (26).

Vitiligo ile ilgili bildirilen en geniş kapsamlı epidemiyolojik çalışma 1977 de Danimarka'da yapılmış olan ve Danimarka nüfusunun %0,3 ünün etkilendiği bildirilen çalışmadır. Farklı popülasyonlarda değişen prevalansı nedeni ile hastalığın görülme sıklığındaki oran tam olarak anlaşılmamıştır. Yapılan başka bir epidemiyolojik çalışmada ise, insanların yaklaşık %50' sinin 40 yaşından sonra vitiligoya yakalandığı gösterilmiştir. Ayrıca hasta olan bireylerin yaklaşık yarısının 20 yaşından önce hastalığa yakalandığı bildirilmiş ve 30 yaşından önce hastalığa yakalanma oranının %70-80 olduğu tahmin edilmektedir. Büyük ölçekli başka bir epidemiyolojik çalışmada ise, vitiligo hastalarının yaklaşık % 15-20'sinin bir veya daha fazlasının birinci derece akrabalarının hastalıktan etkilendiği gösterilmiştir. Ayrıca hastaların, birinci derece akrabalarında vitiligo görülme sıklığının %7, hastaların ebeveynlerinde riskin %7.8 olduğunu gösterilmiştir. Hastalık her yaşta ortaya çıkabilir, her iki cinsiyeti de eşit şekilde etkiler ve ortalama başlangıç yaşı farklı coğrafi bölgelerde değişkendir. Yaş ortalaması Brezilya'da 24, İngiltere'de 25 ABD'de ve Hindistan'da 22, yaş olarak değişmektedir (19,27).

Vitiligo, epidermisteki fonksiyonel melanositlerin kaybına bağlı olarak sınırlı maküller ile karakterize edilmiş bir dermatolojik hastalıktır. Beyaz alanlar ve normal cilt arasındaki kontrast göz önüne alındığında, hastalık koyu cilt tiplerinde daha belirgindir ve hem yetişkinlerin hem de çocukların yaşamı üzerinde derin bir etkiye sahiptir. Bu pigmenter hastalık sıklıkla bazı otoimmün hastalıklarla ilişkilidir (28,29). Ayrıca, bu otoimmün hastalıkların sıklığı, hastalarının birinci derece akrabalarında da yüksektir. Bu veriler otoimmüniteye genel yatkınlığın, çeşitli ortak duyarlılık genlerini içeren karmaşık bir özellik olduğu fikrine yol açarken, diğer genler ve bilinmeyen çevresel tetikleyicilere maruz kalma, vitiligo ve diğer spesifik otoimmün hastalıkların oluşumunu belirlemektedir. Genel olarak vitiligo, *Hashimoto tiroiditi*, *Graves hastalığı*, *tip 1 diabetes mellitus*, *alopesi areata*, *pernisyöz anemi*, *romatoid artrit*, *otoimmün poliglandüler sendrom* ve *psoriasis* dahil olmak üzere birçok otoimmün hastalıkla ilişkilendirilmiştir.

Vitiligonun, bazı durumlarda azalmış melanom ve melanom dışı cilt kanseri ile ilişkisi de gösterilmiştir. 90.000'den fazla Almanın katıldığı popülasyona dayalı bir araştırmada, vitiligonun istatistiksel olarak *aktinik keratoz* gelişimi ile bağlantılı olmadığı açıklanmıştır. Ayrıca Avrupa'daki hastalarda (Amsterdam, Hollanda ve Roma, İtalya) yapılan çalışmada vitiligo ile cilt kanserinin ters ilişkili olduğu açıklanmıştır. Benzer bir çalışma yapan Teulings, 1995'ten 2010'a kadar kliniğini ziyaret eden 50 yaş ve üzerindeki tüm vitiligolu hastalar için bir anket oluşturmuştur. Yaptıkları ankete 1307 gönüllü hasta katılım sağlamış ve sonuçlar şaşırtıcı bir şekilde vitiligo tanısı almış hastaların, üç kat daha düşük cilt kanseri riskine sahip olduğunu göstermiştir (28,30).

### 2.3 ETİYOPATOGENEZİ

Epidemiyolojik çalışmalar, vitiligonun mendelyen olmayan, çok faktörlü ve poligenik olduğunu ve bireylere aktarılmasında azda olsa genetiğinde katkısı olduğunu göstermiştir. Vitiligonun altında yatan etiyoloji hala açıklığa kavuşturulmayı beklemektedir. Ortaya atılan hipotezlere göre, bir veya daha fazla çevresel, fizyolojik veya diğer tetikleyiciler, melanositlerin lokalize inaktivasyonuna veya ölümüne neden olabilir ve sonuç olarak melanositlerin yok olmasına neden olabilecek bir otoimmün yanıtı tetikleyebilir. Etiyolojisi ve patogenezi hala bilinmeyen vitiligonun, merak uyandıran ancak kanıtlanmamış verilerle desteklenen hipotezlerin bilim camiasında araştırılması devam edilmektedir. Vitiligonun klinik belirtileri bireylerde benzer olmasına rağmen etiyoloji ve patogenetik mekanizmanın kişiden kişiye değişebileceği öne sürülmüştür (31).

Melanositlerde ölüme veya hasara neyin sebep olduğu henüz net değil, fakat nekroz veya daha büyük olasılıkla apoptozun bu hastalığın patogenezinde büyük rol oynadığı düşünülmektedir. Yapılan immünohistolojik çalışmalar, hasta cilt lezyonlarının melanositlerden yoksun olduğunu göstermektedir. Vitiligo ile sonuçlanan melanosit kaybının nedenini anlamak için çeşitli teoriler ortaya atılmıştır. Hastalığın başlangıcında hem çevresel hemde genetik faktörlerin etkili olduğu ve vitiligonun çok faktörlü bir hastalık olduğu ileri sürülmüştür. İlk ortaya atılan teori 1950'lerde Nöral teori olup, sonrasında bunu genetik, otositotoksik, apoptotik, mikroçevresel, viral, biyokimyasal, oksidatif stres, otoimmün hipotez, hücre adezyon bozuklukları, reaktif oksijen türleri (ROS), melanositoz ve çok değişkenli teoriler gibi teoriler ve düşünceler izlemiştir. Öne sürülen bu hipotezlerden hiçbiri, farklı vitiligo fenotiplerini açıklamak için kendi başlarına yeterli değildir ve bu teorilerin her birinin hastalığa ne gibi bir katkıda bulunduğu hala araştırılmaya devam edilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda hastalığın patogenezinde etkili olduğu düşünülen bu hipotezler arasında otoimmün hipotezinin daha ön plana çıkmasını sağlayan güçlü kanıtlar olduğu gösterilmiştir. Vitiligoda melanositlerin kaybına

neden olarak çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Bu mekanizmalar arasında bağışıklık saldırısı veya hücre dejenerasyonunun neden olabileceği gösterilmiştir (32,33).

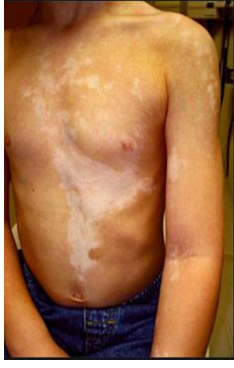
## 2.4 SINIFLANDIRMA

Dünya nüfusunun %0.5'ini etkileyen ve fenotipik olarak, melanositlerin (pigment üreten hücreler) kaybı ile sonuçlanan ve dermatolojik bakım açısından büyük zorluklar ortaya çıkaran vitiligo edinilmiş bir cilt hastalığıdır. Vitiligo sadece derideki melanositlerin etkilendiği bir hastalık değildir. (34,35).

Vitiligonun ayırt edici klinik özelliği cilt ve kıl foliküllerinin depigmentasyonudur. Bu ise beyaz lezyonlar, simetrik maküller ve yamalar ile sonuçlanır. Bunlar zamanla sayı ve boyut olarak artar ve sıklıkla yüz ve ekstremiteler gibi görünür alanlarda yaygın bir şekilde görülür. Vitiligonun sınıflandırılması 2012 yılında yapılan uluslararası *Global Issues Consensus Conference'da* geniş bir şekilde görüşülmüş ve klinik gerekçelere dayanarak vitiligonun iki ana formda ve bu formların alt tiplerinde toplanması kararlaştırılmıştır. Bu formlar genel olarak segmental vitiligo (SV) ve segmental olmayan vitiligo (NSV) olarak sınıflandırılmıştır (36,37).

### 2.4.1. Segmental vitiligo

Segmental vitiligo genel olarak hızlı ilerler ancak sınırlı bir seyir gösterir, depigmentasyon segment içinde 6-24 aylık bir süre boyunca hızla yayılım gösterir ve sonra durur; yayılmanın daha fazla ilerlemesi çok nadiren görülür. Depigmentasyon alanları genellikle bir yıl içinde stabilize olur. Foliküler melanosit rezervuarının yıkıldığına dair histolojik kanıtlarla birlikte, saç foliküllerinin (*lökotrichia*) erken katılımı da vardır. Sınırlı, segmental dağılımına ek olarak SV, NSV ile karşılaştırıldığında bazı ayırt edici özelliklere sahiptir. SV tipik olarak NSV'den daha erken başlangıç yaşına sahiptir. SV genel olarak yaşamın erken dönemlerinde başlar. SV paterninin etiyolojisi genel olarak belirsizdir. Nadiren, birden fazla segmental lezyon aynı anda meydana gelir (Şekil 2.1-A). SV Unisegmental ve Bisegmental olarak ayrılır. Unisegmental: vitiligonun en yaygın formu olan, genellikle vücudun orta hattına bakan ve vücudun bir tarafında ortaya çıkan bir veya daha fazla beyaz makülden oluşur. Hızlı başlangıcının yanı sıra vücut kıllarının da tutulumu vardır. (Şekil 2.1-B) Bisegmental: Daha nadir görülen ve her lezyonun iki taraflı (bilateral) olarak yayılmış, depigmente makülleri olan bisegmental vitiligo, iki veya daha fazla segmenti etkileyebilir (Şekil 2.1-C) (11,27,37).



A) Segmental vitiligo [38]



B) Unisegmental vitiligo [39]



C) Bisegmental vitiligo [40]

Şekil 2.1. Segmental vitiligo ve çeşitleri A: Segmental vitiligo B: Unisegmental vitiligo C: Bisegmental vitiligo

#### 2.4.2. Non-Segmentel vitiligo

NSV klinik olarak, genellikle simetrik dağılıma eğilimli vücudun her iki tarafını da etkileyen ve boyutları birkaç santimetreye kadar değişebilen depigmente maküllerin ortaya çıkması ile karakterizedir. NSV, SV' nun aksine vücut kılları genellikle korunur ve pigmentli kalır. Fakat hastalığın seyri ilerledikçe saç depigmentasyonu meydana gelebilir. Kafa derisi ve diğer kıl olan alanların tutulumu, lokalize gri veya beyaz kıl lekeleri ile kendini gösterebilir. (Şekil 2.2-A)

NSV nun klinik olarak tanımlanmış bazı alt tipleri vardır.

- Genelleştirilmiş veya yaygın vitiligo: Vitiligonun en yaygın olan bu formunda ortaya çıkan maküller genellikle simetriktir ve vücudun birden çok bölümünü etkileyen asemptomatik, sınırlı ve süt beyazı maküller ile karakterizedir. Hastalık vücudun herhangi bir yerinde başlayabilir, ancak parmaklar, eller ve yüz genellikle ilk etkilenen bölgelerdir. (Şekil 2.2-B)
- Evrensel (Universal): Vücut alanını en geniş ölçüde etkileyen (vücut yüzeyinin% 80-90'ı) ve bireylerin ilerleyen yaşlarında en sık görülen şeklidir. Genelleştirilmiş veya yaygın biçim genellikle ondan önce gelir. Şekil (2.2-C)
- Akrofasiyal vitiligo: Etkilenen bölgeler genellikle yüz, baş, eller ve ayaklarla sınırlıdır. Bu formun ayırt edici özelliği, parmakların ve yüz açıklıklarının depigmentasyonu ve yaygın bir genital tutulumudur. Daha sonra diğer vücut bölgelerini içerebilir ve tipik genelleştirilmiş vitiligo ile sonuçlanır. (Şekil 2.2-D)

- d) Mukozal: Genel olarak oral ve genital mukozayı etkiler. Ayrıca, akrofasiyal, yaygın veya evrensel formları olan hastalarda mukoza alanları da etkilenebilir; sadece bir mukozal bölgeyi içerdiğinde, belirsiz olarak sınıflandırılır.
- e) Karışık: Segmental ve segmental olmayan vitiligonun beraber görüldüğü durumlarda ortaya çıkar.
- f) Nadir formlar: Bu nadir görülen formlar vitiligo punctata, vitiligo minör ve folikülerdir. Bu türler de sınıflandırılmayan olarak kabul edilir (2,6)



A) Segmental olmayan vitiligo [41]



B) Evrensel (universal) vitiligo [42]



C) Akrofasiyal vitiligo [43]



D: Mukozal vitiligo [44]

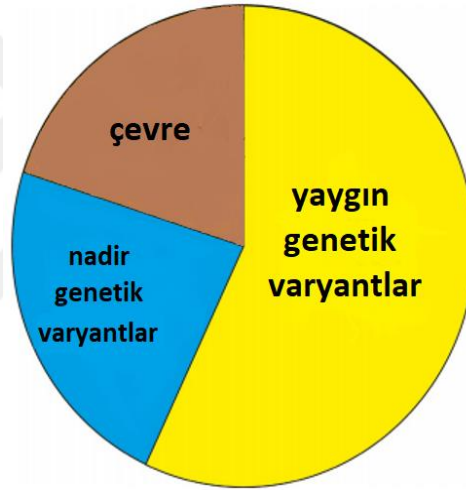
Şekil 2.2. Non segmental vitiligo çeşitleri A: Non segmental vitiligo B: Evrensel (universal) vitiligo Şekil C: Akrofasiyal vitiligo D: Mukozal vitiligo

## 2.5 VİTİLİGO GENETİĞİ

Günümüz verilerine göre, insan hastalıklarının birçoğuna bulunduğu çevre veya sahip olduğu genetik yapının katkı sağladığı bilinmektedir. İnsanların sahip olduğu genetik faktörlerin hastalıkların patogenezinine nasıl katkı sağladığını anlamak hayati önem taşımaktadır. Bu nedenle hastalığın patogenezinde rol oynayan genlerin veya diğer genetik varyantların belirlenmesi ve

hastalıkla ilişkisinin belirlenmesi için ilgili çalışmalar ve analizlerinin yapılması çok önemlidir. Vitiligonun gelişiminde genetik faktörlerin önemini yapılan birçok çalışmalardan elde edilen veriler doğrulamıştır fakat bu genetik faktörlerin oldukça karmaşık olduğu açıklanmıştır. Vitiligo ile ilişkili genetik faktörleri belirlemeye yönelik en erken çalışma, 1960'ların ortalarında, ABO ve diğer kan grubu antijenleri daha sonra polimorfik kan proteinlerini test edilerek başlanmıştır ve daha sonra bilimin ilerlemesiyle bu çalışmalara yenileri eklenmiştir (25,45).

Bugüne kadar yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler vitiligoda melanositlerin kaybına tek varyantın neden olmadığını ve bunun aksine hastalığın ortaya çıkmasında poligenetik ve çok faktörlü varyantların rol oynadığı belirtilmiştir. Apoptotik, çevresel, otositotoksik, biyokimyasal, oksidatif stres, nörojenik, hücre adezyon bozuklukları, reaktif oksijen türleri (ROS) gibi kompleks mekanizmaların arasındaki etkileşimlerin hastalığın çıkmasına neden olma olasılığı yüksektir (Şekil 2.3) (46).



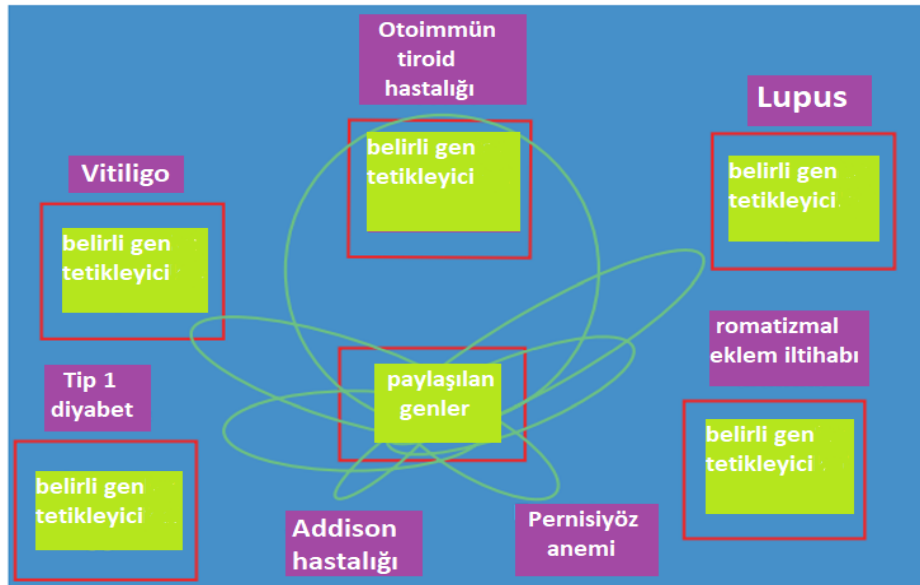
Şekil 2.3. Hastalığın patogenezinde katkıda bulunan faktörler: Çevre (turuncu, %20), yaygın genetik varyantlar (sarı, %57) ve nadir genetik varyantlar (mavi, %23) olarak gösterilmiştir.

[46]

Geçmişte yapılan epidemiyolojik çalışmalar vitiligo hastalığının büyük çoğunluğunun spontan olarak meydana geldiği gösterse de günümüzdeki geniş kapsamlı epidermiyolojik çalışmalar, hastalığa yakalanan bireylerin birinci derece akrabalarında da bu hastalığın görüldüğünü ve diğer yakın akrabalarında da hastalığın görülme olasılıklarının olduğu belirtilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar hastalığın patogenezinde kalıtımın da rolünün olduğuna dair kanıt sunmaktadır. Vitiligolu bireylerle ve aile öyküsü olan birinci derece akraba olanların hastalığa yakalanma riskinin artmakta ve genel popülasyona kıyasla daha fazla hastalık riskine sahip oldukları belirtilmiştir. Avrupa popülasyonunda yapılan bir çalışmada hasta bireylerin

birinci derece yakın akrabaları için vitiligo riskinin Avrupa popülasyonu için %7,1, Hint-Pakistanlılarda %6,1 ve daha uzak akrabalar için bu oranlar daha da düşük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Avrupa popülasyonu için ortalama vitiligo başlangıç yaşı 24,1 iken şaşırtıcı bir şekilde vitiligolu akrabası olan bireylerde hastalığın ortaya çıkma yaşı 21.5 dir. Vitiligo patogenezindeki genetik faktörlerin rolünü anlamak için yapılan kapsamlı çalışmalarda hastalıkla ilişkili olan *NLR family pyrin domain containing 1 (NLRP1)* ve *HLA-A'* gibi gen/lokuslar tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, kromozom 17p üzerindeki *NLRP1*'e ek olarak, 7p13 – q21, 8p12, 9q22, 11p15, 13q33, 19p13 ve 22q11 kromozomları üzerinde hastalık ile ilişkisi olan lokuslar tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmalarda vitiligoya neden olabilecek en önemli genetik riskleri arasında *major histocompatibility complex (MHC) class I, Human Leukocyte Antigen A (HLA-A)* daki polimorfizmleri olarak gösterilmiştir ve bu polimorfizmlerin, bireylerde vitiligo aile öyküsüne bakılmaksızın vitiligo riskini arttırdığını göstermektedir. Bu genetik polimorfizmlerin büyük olasılıkla bireyleri, otoimmün düzensizliğe yatkın hale getirdiği ve melanosit anormallikleri, diğer genetik olmayan faktörlerle birlikte melanositlerin patolojik olarak öldürülmesini başlattığı düşünülmektedir. Genom boyu ilişki çalışmaları (*Genome Wide Association Study/ GWAS*) genomda yüz binlerce veya milyonlarca tek nükleotid polimorfizmlerinde (SNP'ler) allel veya genotip frekanslarını karşılaştırır. Vitiligo da dahil olmak üzere çok sayıda karmaşık ve kompleks hastalıklarda bulunan varyantlar GWAS ile tanımlanmaktadır. Ek olarak GWAS, yaygın hastalıklara yatkınlık genlerini ve varyantlarını tespit eder. Günümüzde, GWAS çalışmaları sonunda vitiligo için birçok duyarlılık lokusu tespit edilmiştir ve bu lokusların birçoğu için, karşılık gelen temel genler ve genetik varyantlar tanımlanmıştır. Diğer birçok hastalıklarda olduğu gibi, bu genetik varyantların da karmaşık görüldüğü açıklanmıştır. Genetik faktörlerle ilgili yapılan, genom çapında ilişki çalışmaları (GWAS) vitiligo için risk oluşturan yaklaşık 50 genetik lokus tespit edilmiştir. Tanımlanan vitiligo duyarlılık genlerinin yaklaşık 85'inin apoptoz ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinden sorumlu proteinleri kodlaması ve yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, vitiligonun otoimmün bir hastalık olduğunu göstermiştir. Ek olarak, bu genlerin hemen hemen yarısı, vitiligo ile ilişkili diğer otoimmün hastalıkların bağımsız genetik çalışmalarıyla da tanımlanmıştır ve bu genlerin otoimmüniteye yatkınlıktaki rollerini desteklemektedir. Genetik faktörlerden kaynaklanan spesifik mekanizmaların çoğu hala araştırılıyor olsa da vitiligo'nun bağışıklık sisteminin işlevi ve programlanması, melanosit otoimmün hedefinin yönleri ve bağışıklığın düzensizliği arasında karmaşık bir etiyolojiye sahip otoimmün hastalık olduğu açıktır. Bu veriler vitiligonun, genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimlerinin sonucu olduğunu göstermektedir. Ayrıca *otoimmün tiroid hastalığı, romatoid artrit, yetişkin başlangıçlı otoimmün diabetes mellitus, pernisiyöz anemi, sistemik lupus eritematozus, addison hastalığı* ve belki de diğer otoimmün hastalıkların hem vitiligo hastalarında hem birinci derece akrabalarında hem de

vitiligo öyküsüne bakılmaksızın, artan sıklıkta görülmektedir (Şekil 2.4). Otoimmün hastalıklar, bu hastalıkların hepsi veya bir kısmı için riski artıran bazı duyarlılık genlerini ve ayrıca hastalığa özgü duyarlılık genlerini ve olası çevresel tetikleyicileri paylaşmaktadır. Birlikte ele alındığında bu bulgular, spesifik genlerdeki patolojik varyantların vitiligoya ve bazı otoimmün hastalıklara yatkınlık oluşturduğunu göstermektedir. Bunun sonucu olarak, genetik faktörler bireyleri yalnızca vitiligo gelişimine duyarlı hale getirmeyip, açıklanan bu otoimmün hastalıklardan bazılarında da duyarlılık sağlayabilmektedir (6,46).



Şekil 2.4. Vitiligoya eşlik eden otoimmün hastalıklar [6]

## 2.6 OTOİMMÜN HİPOTEZ

Vitiligo patogenezinde rol aldığı düşünülen genlerin büyük çoğunluğunun; bağışıklık sisteminin düzenlenmesinden sorumlu proteinleri kodlaması ve vitiligo hastalarında bazı otoimmün hastalıkların görülmesi vitiligonun otoimmün bir hastalık olduğunu düşündürmektedir. Vitiligo için ortaya atılan en makul olarak varsayılan hipotez otoimmün teoridir. Bu teori çoklu duyarlılık genlerinin ve bilinmeyen çevresel faktörlerin, melanositlerde otoimmün yıkıma yol açtığını savunur. Stres, enfeksiyonlar, güneş ışığına maruz kalma, travma, endokrin hastalıkları ve melatonin reseptör disfonksiyonu gibi faktörlerin hastalığın gelişimine katkı sağladığı düşünülmektedir. Hastalığın patogenezi için ortaya atılan otoimmün teori, melanositlere karşı antikörlerin varlığı, diğer otoimmün hastalıklarla ilişki, immün lokuslardaki polimorfizmlerle ilişki, sitokin ekspresyonu ve T hücreleri perilezyonel infiltratların varlığı ile desteklenmekte ve giderek önem kazanmaktadır. Bunlardan bağışıklık aktivasyonunda ve bağışıklık homeostazının düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan *Heat Shock Protein* (HSP)'ler

hücrel apoptozu ve proteinlerin yanlış katlanması önlemek için doğal proteinleri bağlar. Ayrıca HSP70 ve diğer stres proteinleri, T hücre yanıtlarını ve dendritik hücrelerini aktive eder. Bu da melanositler için sitotoksik olan antimelanosit T lenfositlerinin deride toplanmasına yol açabilir. Farelerle yapılan deneylerde otoimmün diyabet gelişimine katkıda bulunan HSP70'in diğer otoimmün hastalıklarda da önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca HSP70 ekspresyonu olmayan farelerde, vitiligonun gelişmediği bildirilmiştir. Ek olarak vitiligo hastalarının derisinde HSP70'in aşırı ekspresyonu edildiği gösterilmiştir. Yani HSP70'in aşırı ekspresyonu vitiligonun ilerlemesini hızlandırabilir. Bu bilgiler, T hücresi aracılı melanosit yıkımında HSP70'in kritik bir rolü olduğunu desteklemektedir. Düzenleyici T hücreleri (Tregler), otoreaktif T hücrelerinin sayısının artmasını ve aktivasyonunu baskılar. Ayrıca negatif bir düzenleme ile immün sistemin düzenlenmesini sağlar. Treglerin fonksiyonlarındaki bir düzensizliğin; cildin ilerleyen depigmentasyonuna neden olabileceği ve vitiligonun gelişimine katkı sağlayan anti-melanom sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonuna neden olduğu açıklanmıştır. Ayrıca yapılan birkaç çalışmada, vitiligolu bireylerin derisinden izole edilen CD8 + T hücrelerinin melanosit spesifik otoantijenleri tanıdığını, bunların melanositler için sitotoksik olduğunu ve melanosit apoptozunu indüklediği görülmüştür. Bu bulgulara bakılarak sitotoksik T hücrelerinin vitiligo etiyojisi için çok önemli olduğu görülmektedir. Ayrıca vitiligolu hastaların, CD8 + T hücrelerinde önemli bir artış ve yaygın aktivasyon olduğu rapor edilmiştir. Otoreaktif CD8 + T hücrelerinin aktivasyonu, indüksiyonu ve vitiligo otoantijenlerine toleransı açıklanamamıştır. Ancak diğer otoimmün hastalıklarda olduğu gibi, düzenleyici T hücrelerinin (Tregler) fonksiyonunda bazı kusurların olduğu tahmin edilmektedir. Bunlara ek olarak hücre içinde meydana gelen oksidatif stres, hücreye özgü sitotoksik bağışıklık tepkilerinin oluşturulmasını ve doğuştan gelen bir bağışıklık sürecinin aktivasyonunu başlatabilir ve bu da ciltte depigmentasyon ile sonuçlanabilir. Ayrıca hastalığın patogeneze katkı sağladığı düşünülen oksidatif stresin rolünü anlamak için de bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada hasta bireylerin hem lezyonlu hemde lezyonsuz derisinde artan reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerinin olması hastalığın patogenezinde oksidatif stresin rolünü desteklemektedir. Stresli melanositler çeşitli mekanizmalarla immün yanıtı başlatabilir. Çok sayıda genin vitiligo için risk oluşturduğu ve hem doğuştan gelen hemde adaptif bağışıklığı etkileyerek vitiligodaki otoimmüniteye katkıları tanımlanmış ve ayrıca melanosit spesifik genler *melanokortin 1 reseptör* ve  *tirozinaz* dahil immün olmayan genlerdeki polimorfizmlerin de hastalık patogenezindeki rolleri tanımlanmıştır. Bunlar T hücreleri tarafından tanınan antijenler olarak iş görür ve hücreler içinde stres oluşumuna neden olabilen melanin üretiminde de rol oynarlar. Vitiligolu bireylerin ve yakınlarının *tip 1 diyabet*, *addison hastalığı* ve *otoimmün tiroid* gibi diğer otoimmün hastalıklara yakalanma riskleri oldukça yüksek olması vitiligonun otoimmün bir hastalık olduğu fikrini güçlendirmektedir. Bağışıklık sistemi içinde bir düzenleyici fonksiyon eksikliği, bağışıklık bileşenlerinin ve hedef hücrelerin endojen ve eksojen faktörlere değişen

tepkiselliği, yüksek bağışıklık aktivitesinin hücrelerin otoimmün yıkımıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Son olarak otoimmüniteyi tetikleyen mekanizmaların, melanositlerden salınan içsel veya dışsal olarak uyarılan ve stres sinyallerini algılayan doğuştan gelen bağışıklık sisteminin aktivasyonu ile başladığı düşünülmektedir (17,47,48).

## 2.7. EPİDERMİSİN YAPISI

İnsan vücudunun en büyük ve önemli parçası olan deri vücut ağırlığının yaklaşık %15'ini oluşturur ve vücudun birincil savunma yapısıdır. İnsan derisi temelde epidermis ve dermis olarak iki farklı doku katmanından oluşsa da dermisin altında hipodermis olarak adlandırılan gevşek bir yağ doku daha vardır. Epidermis; mantar, toksin, mikrop, virüs ve alerjen girişini engelleyerek en aza indirir. Deri ayrıca su, iyon ve metabolit kaybını da engeller. Deri bütünlüğünün bozulması, alerjik ve tahriş edici kontakt dermatit bakterileri, atopik dermatit, dermatofitler ve virüslerin neden olduğu enfeksiyonlar gibi çeşitli hastalıkların gelişimine katkıda bulunur. Epidermisin en derin kısmından deri yüzeyine doğru başlayan bu tabakalar *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* ve *stratum corneum*'dur. Dermis ise, epidermisi besleyen ve hipodermise bağlayan sert destekleyici fibroelastik bir yapıya sahiptir. Dermis ise iki tabakadan oluşur. Yüzeysel olan papiller tabaka ve daha derin olan retiküler tabakadır. Papiller tabaka, epidermisin hemen altında bulunur ve ince bir dermis tabakasıdır. Dermis ter bezlerini saç köklerini, kan damarlarını, yağ bezlerini, sinirleri ve duyu reseptörlerini barındırır. Dermisin kalınlığı cinsiyete göre ve vücudun farklı bölgelerinde değişiklik gösterir. Epidermis, keratinositlerden, melanositlerden ve mekanik uyarana duyarlı (Merkel) hücrelerinden oluşur. Keratinositler, cildin temel hücre tipidir. Epidermisin yapısını oluşturan keratinositler çevre ile doğrudan temas halinde olan kornifiye hücre katmanlarını oluşturur. Bazı özel keratinosit türleri, cildin koruyucu işlevlerine katkıda bulunan saç, tırnak ve bezlerin yapı taşlarıdır (49,50,51).

Epidermisteki ana hücre tipi olan keratinositler, cildi çevresel tehlikelere karşı korumak için kendi kendini yenileyebilen bir epitel bariyer oluşturur. Keratinositlerin sürekli yenilenmesi; epidermisin yapısını, enfeksiyonların deride yol açtığı hasarı ve biyolojik aktivitesini düzenleyerek, çevresel etkilere yanıt vermeyi sağlar. Cildin lokal hasara karşı toleransında, enflamasyonda, epidermisten hiperkeratotik epidermise geçişte ve yara iyileşmesinde çok önemlidir. Dışsal veya içsel uyarınları takiben melanositler ve keratinositler birbirleriyle yoğun bir şekilde etkileşime girer. İnsanların saç köklerinde, kemiklerinde, beyinde, kalbinde, gözlerinde, iç kulağında, ve derisinde bulunan melanositler melanin üreten hücrelerdir. Ayrıca melanositler kardiyovasküler sistem koklea, merkezi sinir ve adipoz doku gibi vücudun diğer dokularında da bulunur. Epidermisin bazal tabakasında bulunan melanositler ise, keratinositleri

melanin üretimi yoluyla UVB ışınlaşmasının DNA'ya zarar veren etkilerine karşı koruyan dendritik benzeri pigment üreten hücrelerdir. Melaninin fotoreseptör koruması, cilt ve saçtaki ışık absorpsiyonu, termoregülasyon ve cilt renginde görev alır. Ciltteki melaninler pigmentleri keratinositlere aktarılırlar. Deride bulunan melanositler keratinositlerle çevrilidir ve yaklaşık olarak 36 keratinosit bir melanositi çevrelemiştir. İnsan cilt pigmentasyonunda keratinositlerdeki melanozomların sayısı farklılık gösterir. Melanin yoğunluğunun yüksek olması, daha koyu cilt rengi ile orantılıdır. Koyu tenli bireylerde; melanozomlar daha büyük, uzun ve çok sayıda olma eğilimindedir ve bu da keratinositlerde daha uzun bir bozulma süresine neden olur. Melanositlerin bu özellikleri doğumda genetik olarak miras alınır. Çeşitli stres maruziyetine yanıt olarak, melanositler üzerinde parakrin etkisiyle bazı faktörde rol oynayan keratinositlerin, melanin üretimi üzerinde uyarıcı veya inhibe edici etkileri olabilmektedir. (52,53,54).

## **2.8. MELANOSİTLER VE MELANİNLERİN YAPISI**

### **2.8.1. MELANOSİTLER**

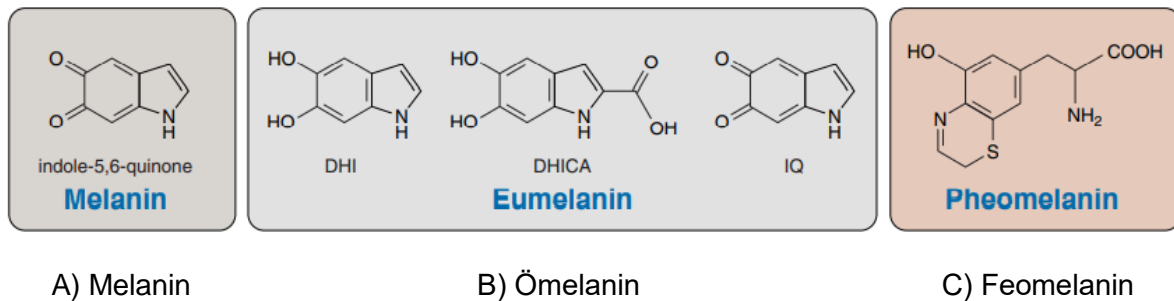
Embriyonik dönem nöral krest hücre kaynaklı dendritik hücreleri olan melanositler, cilt pigmentasyonun yanı sıra, UV ışınlarına karşı güçlü bir savunma sağlar. Anatomik olarak melanositler, deride (epidermisin bazal tabakası), gözde (retina pigment epitelyumu, uveal yol), saç matriksinde, kulakta (*stria vascularis*), mukoza zarlarında ve merkezi sinir sisteminde (*leptomeninges*) nispeten küçük popülasyonlar olarak bulunur. Deride, epidermisin bazal tabakasına ek olarak bazen dermiste melanositler de bulunur ve nadiren yılda iki defadan az bölünür. Temel görevleri, keratinositlere melanin pigmenti üretmektir. Melanin, UV radyasyonunu absorbe eden ve dağıtan karmaşık bir makromoleküldür. Ciltteki epidermal melanositler, önemli ölçüde genotoksik strese dayanabilir ve UV radyasyonunun neden olduğu DNA hasarına karşı savunma sisteminin parçasıdır (55,56).

İnsan derisinde yaklaşık olarak 3 milyar kutanöz melanosite karşılık gelen ve epidermisin milimetrekaresi başına yaklaşık 1500 melanosit vardır. Melanositlerin çoğalmaları ve pigment üretimi, p53'e bağlı bir şekilde alfa-melanosit uyarıcı hormon ( $\alpha$ MSH) salgılayan keratinositlere UV radyasyonunun neden olduğu DNA hasarı tarafından uyarılır. Yapılan son çalışmalar, melanositlerin deri boyunca düzenli aralıklarla konumlandığını göstermektedir. Melanositler, dendritik süreçler yoluyla çevredeki keratinositlerle yakın temas halindedir. Bu yakın ilişki, melanositlerin melanin üretme ve keratinositlere iletme gibi birincil işlevlerini yerine getirmelerine izin verir, böylece cilt pigmentasyonu ve saç ve tüy rengini sağlar. Melanositlerde melanin sentezi, melanozom adı verilen oldukça özelleşmiş, zara bağlı hücre içi organellerde gerçekleşir. Melanin sentezi, hidrojen peroksit ve kinon ara ürünlerinin oluşmasına neden olur.

Bu ara ürünler, uygun olmayan şekilde işlenirse, epidermal melanositlerin hücresel bileşenlerine zarar verebilir. Melanosit patolojisinin zararlı etkileri melanom, *okülokütanöz albinizm*, *vitiligo*, *piebaldizm*, *Waardenburg sendromu* ve *Vogt Koyanagi Harada sendromu* gibi birçok melanositik bozuklukta gösterilmiştir. Bahsedilen tüm bozukluklar arasında melanom, melanositlerin en çok çalışılan biyolojik anormalliğidir. Malign melanom (MM), aktive edilmiş veya genetik olarak değiştirilmiş epidermal melanositlerden kaynaklanan bir tümördür. Melanositlerin kötü huylu dönüşümü, genetik ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık etkileşimlerin sonucudur (57,58).

## 2.8.2. MELANİN YAPISI

Genel olarak melanin olarak adlandırılan yapı, aslında melanositler tarafından sentezlenen bir grup redoks biyopolimerik pigmenttir. Melanin; tirozinden sentezlenen, yüksek moleküler kütleli, son derece yoğun ve çözünmez bir kromofordur. Memeli melanini iki pigmentten, ömelanin ve feomelaninden oluşur. Ömelanin yüksek oranda çapraz bağlı, koyu kahverengiden siyaha, çözünmeyen azotlu bir pigmenttir. Ayrıca ömelanin 5,6-dihidroksiindol (DHI) ve veya 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit (DHICA) birimlerinden oluşur ve son derece heterojen bir polimerdir. Melaninler üç grupta sınıflandırılırlar. Bunlar melanin, ömelanin ve feomelanin olarak ayrılmaktadır (Şekil 2.5) (55).



Şekil 2.5. Melanin, Eumelanin ve Feomelanin' in kimyasal gösterimleri [55]

Bu pigmentler esas olarak cilt pigmentasyonundan sorumludur. Feomelanin esas olarak kükürt içeren benzotiyazin ve benzotiyazol türevlerinden oluşur. L-sistein, sülfürün başlıca kaynağıdır. Feomelanin ise dopaquinone'un glutatyon veya sistein ile birleşerek sisteinil - dopa oluşturduğu tirozinden türetilen sarı-kırmızı alkali çözünür bir kromofordur. Hücre içinde bulunan sistein seviyeleri, ömelanogenezin mi yoksa feomelanogenezin mi uyarılacağına rol oynar. Feomelanin, tüylerin ve saçların renginden, özellikle de kumral veya 'kırmızı' tonlarından

sorumludur. Doğada meydana gelen melaninlerin çoğu ömelanin veya feomelanin olarak sınıflandırılmasına rağmen oldukça karışık melaninlerdir. Karışık melaninler, çeşitli oranlarda pigmentlerde hem ömelanin hem de feomelanin içerir. Melanin memelilerde ve kuşlarda, melanozom adı verilen organellerde sentezlenir ve daha sonra bu melaninler, melanozom transferi adı verilen işlemle komşu keratinositlere aktarılır. Melanozomların bozulması, keratinositler içinde bulunan lizozomal asit hidrolazın etkisiyle meydana gelir. Bozulmuş melanozomlar daha sonra *stratum corneum*'da atılır. İnsanlarda cilt ve saç pigmentasyonu, içerdikleri melaninlerin kimyasal yapısının yanı sıra melanozomların boyutuna, sayısına ve dağılımına bağlıdır. Koyu bireylerdeki melanozomlar, normal melanozomlardan daha büyüktür ve gruplar halinde değil, tekli birimler halinde paketlenmiştir. Daha büyük melanozomlar, keratinositlerde melanozom bozunmasını geciktirici bir etkiye sahiptir, bu nedenle daha yüksek cilt pigmentasyonuna katkıda bulunur. Melanin pigmenti olan ömelanin ve feomelaninin miktarı, DNA hasarına ve tümör gelişimine duyarlılığın belirlenmesinde de önemlidir. Yapılan epidemiyolojik araştırmalar, açık tenli bireylerin, koyu tenli bireylere göre UVR kaynaklı hasara ve tümör oluşumuna daha yatkın olduğunu göstermektedir. Melanin aynı zamanda, serbest radikal temizleyici ve güçlü bir antioksidandır. Anormal melanin kaybı ve depigmentasyon insanlarda ciddi bir yüz estetiği ve dermatolojik problem olabilir. Bunun aksine, bu pigmentlerin artmış melanin sentezi ve birikimi, *acanthosis nigricans*, *servikal poikiloderma*, *melazma*, *periorbital hiperpigmentasyon*, *lentiginler*, *parkinson hastalığı* ve cilt kanseri riski dahil olmak üzere birçok cilt rahatsızlığı tipinde ortaya çıkar (55,58,59).

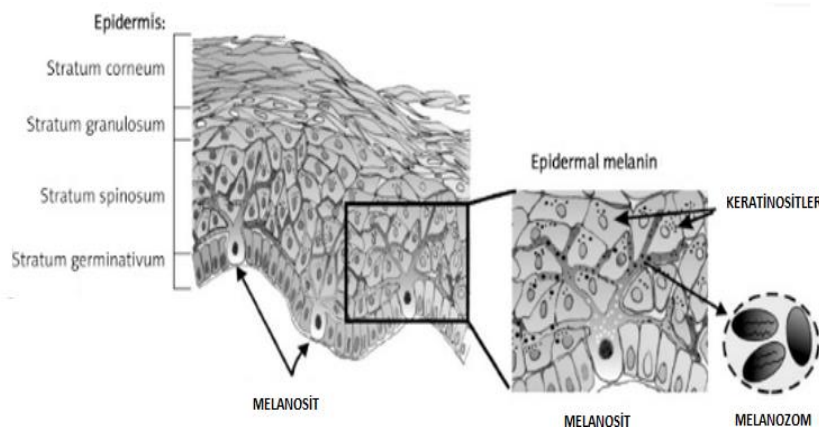
## 2.9. MELANOZOMLAR VE MELANOGENEZ

Saç, cilt ve göz renginin birincil belirleyicisi olan ve önemli bir insan fenotipik özelliğini tanımlamanın yanı sıra melaninler; UV ışığı absorpsiyonu ve saçılması, serbest radikal temizleme, birleşik oksidasyon-azaltma reaksiyonları ve iyon depolama gibi vücut için yararlı olan birçok özelliğe sahiptir. Melanositler, enflamatuvar immün, endokrin ve merkezi sinir sistemleri ile etkileşime girer ve aktivitesi UV radyasyon ve ilaçlar gibi dış faktörlerle düzenlenir (60,61).

Deri pigmentasyonu temelde keratinositlerde melanin granüllerinin birikmesinden kaynaklanır. Melanin sentezi (melanogenez), melanositlerde melanozomların oluşumu ile başlar. Temelde iki ana melanin pigment türü sentezlenir, bunlar; feomelanin ve ömelanindir ve bunların kombinasyonu cilt rengine yol açar. İnsan cilt ve saçlarında görülebilen birçok renk varyasyonu göz önüne alınırsa, karışık melaninlerin bileşiminin birçok farklı şekilde düzenlenmesi beklenebilir. Ek olarak sadece üretilen melanin miktarı önemli değil, aynı zamanda dokudaki nihai dağılımı da görünür rengi ciddi bir şekilde etkilemektedir. Melaninin dokudaki dağılımı pigmentin UV ışınlarına karşı koruma gibi işlevlerini önemli derecede etkilemektedir (62,63).

Bununla birlikte, deride melanin yoğunluğunun değişmesi, özellikle melazma, çiller veya lentiginler gibi hiperpigmenter durumlarda önemli estetik sorunlara neden olabilir. Ancak vitiligo gibi depigmente edici koşullar da hastaların yaşam kalitesi üzerinde önemli derecede olumsuz etkiye sahiptir. Melanosit, bazal tabaka hücreleri arasında bulunur ve dendritik süreçler yoluyla epidermal melanin biriminde yaklaşık 30-40 keratinosit ile iletişim kurar (64) (Şekil 2.6).

Melanosit, melaninleri UV radyasyonundan korumak için keratinositlere taşınan melanozomlardan sentezler. Deride melanin üretimi ve dağıtımından sorumlu olan epidermal birimler bulunur, bu süreç melanogenez olarak adlandırılır. Bu birimler, kapalı bir parakrin sistemle düzenlenen ve keratinositlerle çevrili bir melanositten oluşur. Farklı aşamaları olan melanogenez, karmaşık bir süreçtir (65).



Şekil 2.6. Epidermis ve yapısında bulunan melanosit ve melaninlerin konumu [64]

### 2.9.1. MELANOZOMLAR

Dokulara renk ve ışık koruması sağlayan pigment granülleri olan melanozomlar, melanin pigmentlerinin sentezi, depolanması ve taşınması için hücresel bölgedir. Melanosit sitoplazmasında, melanin melanozomlarının sentezinden ve depolanmasından sorumlu olan zara bağlı hücre organelleri vardır. Melanozomlar pigment hücrelerini melanogenez sırasında oluşan yüksek reaktif kinon bileşiklerine karşı korurlar. Memeli deri melanositlerinde, gözdeki koroidal melanositlerde ve retina pigment epitel (RPE) hücrelerinde ve alt omurgalılarda melanoforlarda sentezlenirler (66).

Melanozomlar içindeki sekestrasyon, sitozol ve diğer membranöz organellerin bileşenlerini, melanin sentezi sırasında oksidatif saldırıdan korur ve depolama (göz pigment

hücrelerinde) veya hücre transferi (epidermal melanositlerden deri ve saçtaki keratinositlere) için melaninleri yoğunlaştırır (67).

Melanozomlar, matris iskeletinin oluşumunu belirleyen iç proteinlerinde biriktikten sonra premelanozomlara dönüşen endozomal veziküllerden oluşur. Melanogenez enzimleri daha sonra premelanozomlara (olgun melanozomlara) dönüşür. Olgun melanozomlar, perinükleer bölgeden melanositlerin dendritik bölgelerine ve daha sonra foto-korumayı ve cilt rengini belirledikleri çevreleyen keratinositlere taşınır. Ömelanin (ömelanozomlar) sentezleyen melanozomlar eliptik bir şekle, bir fibril (ipliksi) matrise sahiptir ve matris liflerinde birikir. Feomelanin sentezleyen melanozomlar ise (feomelanozomlar) küresel şekildedir. Hem ömelanozomlar hem de feomelanozomlar bir melanositte bulunabilir. Ayrıca insanlarda cilt ve saç pigmentasyonu, içerdikleri melaninlerin kimyasal yapısının yanı sıra melanozomların boyutuna, sayısına ve dağılımına bağlıdır. Koyu bireylerdeki melanozomlar, normal emsallerinden daha büyüktür. Daha büyük melanozomlar, keratinositlerde melanozom bozunmasını geciktirici bir etkiye sahiptir, bu nedenle cilt pigmentasyonunun korunmasına önemli katkı sağlar. Açık tenli insanlarda, melanozomların lizozomal enzimler tarafından tamamen parçalanması sonucu epiderminin üst katmanlarının keratinositlerinde sözde melanin kalıntıları oluşur. Bunun ışık koruması üzerinde olumsuz bir etkisi vardır ve karsinogenez riskini artırabilir. (55,68).

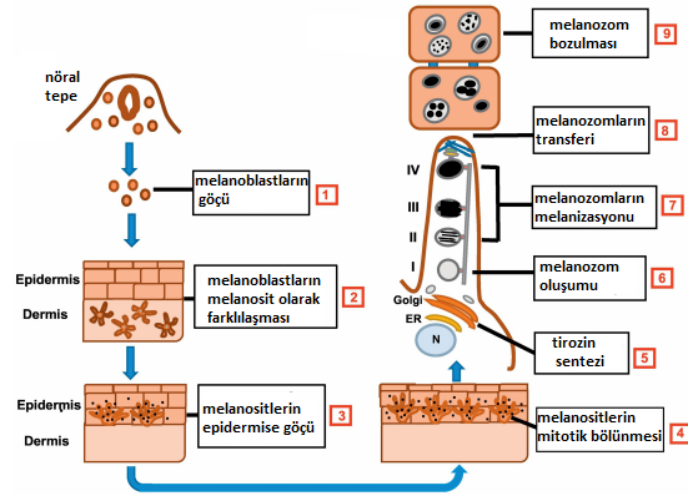
### **2.9.2. MELANOZOM OLUŞUMU**

Melanozomların biyogenezi, birden fazla aşamada gerçekleşen bir süreçtir. Melanozomlar, endoplazmik retikulumda tirozinaz sentezini içerir, burada veziküller halinde paketlenir ve golgi ağına taşınır. Golgi'de, daha fazla ayıklama ve işleme gerçekleştirilir ve golgi'den melanin tomurcuğunun oluşumunda rol oynayan tirozinaz ve enzimleri içeren veziküller yapılır. Melanozomlar gelişiminde dört morfolojik aşamadan geçer (68,69).

Melanozomlar birinci aşamada, melanogenezde yer alan ana enzim olan tirozinaz (TYR) aktivitesinden yoksun ve iç yapısal bileşenleri olmayan küresel vakuollerdir. Golgi yakınındaki perinükleer bölgede toplanan yeni oluşan melanozomlar melanogenez için gerekli tüm enzimatik ve yapısal proteinleri içerir. Ayrıca önemli bir melanozomal yapısal protein olan Pmel17'nin mevcudiyeti ve doğru işlenmesi birinci aşamadaki melanozomlarının ikinci aşama olan uzun fibriller organelere dönüşmesinde rol oynar. Bununla birlikte, golgi veziküllerinde TYR, saptanabilir ve ikinci aşamada melanomilere aktarılır. İkinci aşamadaki melanozomlar yapılandırılmış fibril matrisine sahiptir ve tirozinaz mevcuttur. Ancak pigment sentezi yoktur. Melanin üretimi üçüncü aşamada pigmentin protein fibrilleri üzerinde biriktiği zaman gerçekleşir ve pigment sentezi başlar ve melanin iç fibriller üzerinde homojen olarak biriktirilir. Son olarak dördüncü aşamada pigment tüm melanozomu doldurur ve bu melanozomlar eliptik veya

elipsoidaldir, minimum TYR aktivitesine sahiptir. Melanize olan melanozomlarda tirozinaz aktivitesi kaybolur ve hücre iskelet sisteminin elemanları tarafından çevreleyen keratinositlere taşınır. Melanozomlar olgunlaştıkça, motor proteinler (kinesinler) tarafından mikrotübüller boyunca perinükleer alandan melanosit dendritlerinin uçlarına taşınırlar. Melanozom yüzeyinde bir GTPaz olan Rab27a, adaptör proteini melanofilini dahil eder ve bu da aktin motor proteini miyozin-Va'yı melanozoma alır. Myosin-Va daha sonra melanozomları dağıtan melanosit dendritlerinin ucundaki periferik aktin ağı ile birleşir. Melanofilin yoluyla miyozin-Va ve melanozom arasındaki bu dinamik etkileşim, melanozomların melanosit dendritlerinin uçlarındaki aktin filamentleri ile birleşmesini sağlar. Derideki görünür pigmentasyon için kritik olan aşama, bu melanozomların melanosit dendritlerinden çevreleyen keratinositlere aktarılmasıdır Bu işlem sırasında herhangi bir sorun meydana gelirse, melanin keratinositlerde birikmez ve cilt azalmış bir renge sahip olur. Cildin melanizasyon seviyesi yani ciltte görünür pigmentasyon bir dizi kritik biyolojik süreçle ilgilidir (Şekil 2.7). Bu biyolojik süreçler aşağıdaki gibidir:

- (1) melanoblastların nöral krestten cilde göçü,
- (2) melanoblastların dermiste melanositlere farklılaşması,
- (3) melanositlerin dermisten epidermisen bazal tabakasına hareketi,
- (4) melanositlerde melanozom üretimi,
- (5) melanositlerdeki melanozomların melanizasyonu,
- (6) melanozomların melanosit dendritlerinin uçlarına taşınması,
- (7) melanozomların melanositlerden keratinositlere transferi,
- (8) keratinositler içindeki melanozomların bozulması olarak tanımlanmaktadır (69).



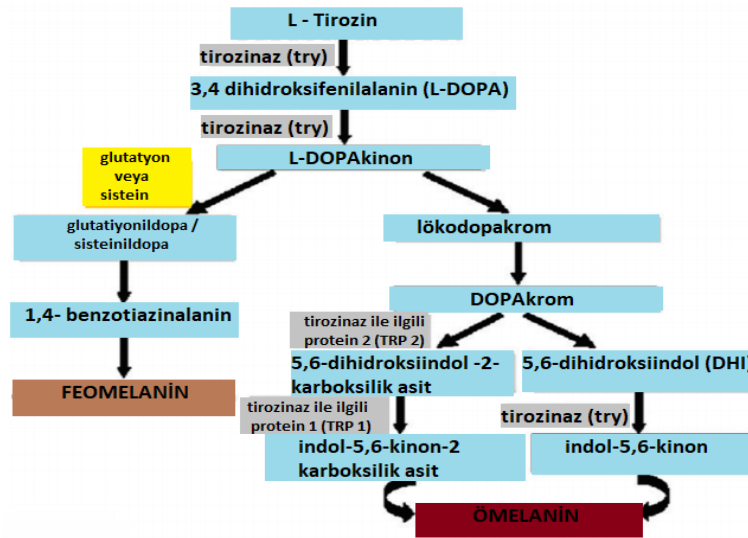
Şekil 2.7. Derinin melanizasyon seviyesindeki kritik biyolojik süreçler [69]

Bu işlemlerin herhangi birindeki meydana gelen aksaklık, deride melanin pigmentasyonunun artmasına veya azalmasına neden olabilir. Melanozomlar keratinositlere aktarıldıktan sonra, keratinositlerde tek başlarına veya bir zarla çevrili gruplar halinde lokalize olurlar. Bu olay genetik kontrol altındadır. Keratinositler farklılaştıkça ve epidermiste *stratum spinosum* ve *stratum granulosum* üzerinden *stratum corneum*'a doğru yukarı doğru hareket ettikçe, melanozomları onlarla birlikte taşır ve bu da melaninin epidermis boyunca keratinositlerde mevcut olmasına neden olur. Bu süreçte melanozomlar bozulmaya başlar. Bu bozulmanın meydana gelme derecesi ciltteki melanin pigmentasyonunun seviyesini etkiler (65,69,70).

## 2.10. MELANİN ÜRETİMİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASI (MELANOGENEZ)

Melaninler, melanogenez adı verilen çok aşamalı bir oksidasyon ve polimerizasyon sürecinde melanozomlarda sentezlenir. Bu dönüşümleri katalize eden enzimler; tirozinaz (TYR), tirozin hidroksilaz izoform I (THI) izoform I, tirozinaz ile ilgili protein 1 (TRP1) ve tirozinaz ile ilgili protein 2 (TRP2), ve DOPAkrom tautomeraz (DCT) 'dır. Tirozinaz, melanin sentezinde son derece önemli olan ve hız sınırlayıcı bir enzim olarak görev yapan, dinükleer bakır iyonları ile çok işlevli, bakır içeren bir metaloenzimdir. TYR genlerindeki mutasyonlar deri, saç ve gözlerde melanin üretiminin azalması ile karakterize bir grup otozomal resesif bozukluk olan okülökütanöz albinizme neden olur. Ek olarak, TYR deri kanserine bağlı ölümlerin çoğuna neden olan kötü huylu bir melanosit tümörü olan melanom riski ile önemli ölçüde ilişkilidir (59,71)

Melanogenez, L-tirozinin, tirozinaz ile ilk olarak THI varlığında 3,4-dihidroksi-L-fenilalanine oksitlendiği DOPAquinone'a dönüşümü ile başlar. L-tirozinin mikromolar konsantrasyonları durumunda, bu amino asidin oksidasyonunu katalize eden enzim THI iken, daha yüksek (milimolar) konsantrasyonlarda, L-tirozin TYR için bir substrattır. L-tirozinin DOPAquinone'a dönüşümü, eumelanin ve feomelanin sentezinde yaygın bir adımdır. L-tirozin tiyol bileşikler olan sistein veya glutatyon yokluğunda, yüksek derecede reaktif DOPAKinona siklizasyona uğrar ve daha sonra başka bir DOPAKinon molekülü tarafından turuncu-kırmızı DOPACHrom'e oksitlenir. DOPACHrom, enzimatik olmayan dekarboksilasyonla ve DOPACHrom tautomeraze (DCT, TRP2) veya metal katyonlar ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ) varlığında 5,6-dihidroksiindole (DHI) dönüştürülür. 5,6-asit dihidroksiindol-2-karboksilik aside (DHICA) tautomerize edilebilir, bu nedenle ömelanin içindeki DHICA / DHI oranı DOPACHrom tautomerazın aktivitesine veya metal katyonların varlığına bağlıdır. TYR'nin etkisi altındaki DHI, indol-5,6-kinona oksitlenir ve TYR veya TRP1'in etkisi altındaki DHICA, indol-5,6-kinon-2-karboksilik aside oksitlenir. Elde edilen indol ve kinon monomerlerinin polimerizasyonu, ömelanin oluşumuna yol açar. Ömelanin yapısını oluşturan alt birimler ayrıca 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin (L-DOPA) ve L-tirozin içerebilir, ancak bu monomerlerin oranı düşüktür. Tiyol bileşiklerinin varlığında ise, DOPAquinone'a bağlanırlar ve biyosentetik yolu feomelanine doğru yönlendirirler. Molekül içi siklizasyon, tiyol bileşiklerinin eklenmesinden sonra daha yavaş gerçekleşir. Melanozom içindeki sistein konsantrasyonu  $0.13 \mu\text{M}$ 'nin üzerinde olduğunda, sisteini DOPAKinona bağlandığı ve daha sonra başka bir DOPAKinon molekülü ile reaksiyon sırasında oksitlenen sisteinil DOPA izomerlerinin oluştuğu gösterilmiştir. Elde edilen sisteinil-dopakinonlar molekül içi dehidrasyona ve orto-kinonoiminlere siklizasyona uğrar. Kısmi dekarboksilasyonun bir sonucu olarak orto-kinonoiminler benzotiyazin türevlerini oluşturur: BT ve BTCA, daha sonra ODHBT ve BZ'ye dönüştürülebilir. Ortaya çıkan ara maddelerin polimerizasyonunun bir sonucu olarak, feomelanin oluşur. Feomelanogenez sürecinde, glutatyon (GSH) ayrıca DOPAKinona bağlanabilir ve daha sonra sisteinil DOPA'ya hidrolize edilen glutatyon DOPA oluşur (Şekil 2.8) (72).



Şekil 2.8. Melanozom içinde meydana gelen ve ömelanin veya feomelanin üretimine yol açan melanogenez yolunu gösteren şema [72]

TYR ayrıca, dopaminin oksidasyonunun dopaquinonlar ürettiği nöromelanin üretim sürecini de katalize etmektedir. Bununla birlikte, aşırı dopaquinon üretimi nöronal hasara ve hücre ölümüne neden olur. Bu da, tirozinazın insan beyinde nöromelanin oluşumunda önemli bir rol oynayabileceğini ve *parkinson* hastalığı ve *huntington* hastalığı ile ilişkili nörodejenerasyondan sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Melanogenez ürünlerinin anormal birikimi kansere (melanom), yaşlılık lekelerine, çillere ve diğer dermatolojik sorunlara neden olabilir. Cilt pigmenti ajanları olarak melanogenez uyarıcıları vitiligo oluşumunda çok önemlidir. Bu nedenle, ilaca benzer özelliklere sahip yeni melanogenez aktivatörlerinin geliştirilmesine çok ihtiyaç vardır (55,73).

## 2.11.miRNA

Metazonlarda ve bitkilerde gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenleyicileri olan miRNA' lar ortalama 18-25 nükleotid uzunluğundaki RNA'lardan oluşan geniş bir aileden oluşur. Bitkilerden hayvanlara kadar değişen organizmaların genomları içinde kodlanırlar. Translasyonel seviyede memeli genomundaki protein kodlayan genlerin %60'ından fazlasının ekspresyonunu düzenledikleri ve çoklu hastalıklar dahil çoğu biyolojik süreçte temel roller oynadıkları tahmin edilmektedir (74-76).

Gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenleyicileri olan miRNA'lar, aynı anda birden fazla transkripti hedefleyerek, proliferasyon ve hücre döngüsü ilerlemesi, farklılaşma, immün yanıt ve apoptoz gibi ana hücrel süreçlerden sorumlu protein kodlayan genlerin yarısından fazlasının ekspresyonunu kontrol eder (77).

miRNA'lar çoğunlukla kodlayıcı genlerin intronlarında bulunur ve genellikle konakçı genleriyle birlikte ifade edilir. Ayrıca hedef mRNA'ya bağlanan miRNA'nın mRNA bozunma faktörlerini tetiklediğini ve sonuç olarak mRNA'nın ifade seviyelerinde düşüşe yol açtığı bilinmektedir (78).

miRNA'lar, tamamlayıcı baz eşleştirmesi yoluyla mRNA'ları hedefler. Genel olarak mRNA'lardaki 3'untranslated regions (3'UTR) bölgeye ve kısmen 5'untranslated regions (5'UTR) bölgeye bağlanarak transkripsiyon ve translasyon sonrası gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynarlar (79). miRNA bağlanma bölgeleri, 5'UTR ve kodlama sekansı dahil olmak üzere diğer mRNA bölgelerinde ve ayrıca promoter bölgelerinde tespit edilmiştir. miRNA'ların 5'UTR'ye ve kodlama bölgelerine bağlanması, gen ekspresyonu üzerinde susturucu etkilere sahipken promoter bölge ile miRNA etkileşiminin transkripsiyonu indüklediği bildirilmiştir. Hem nükleer hem de sitoplazmik adımları gerektiren miRNA'ların biyogenezi uzun bir süreç yoluyla gerçekleşmektedir. (80,81)

## 2.12. miRNA BİYOGENEZİ

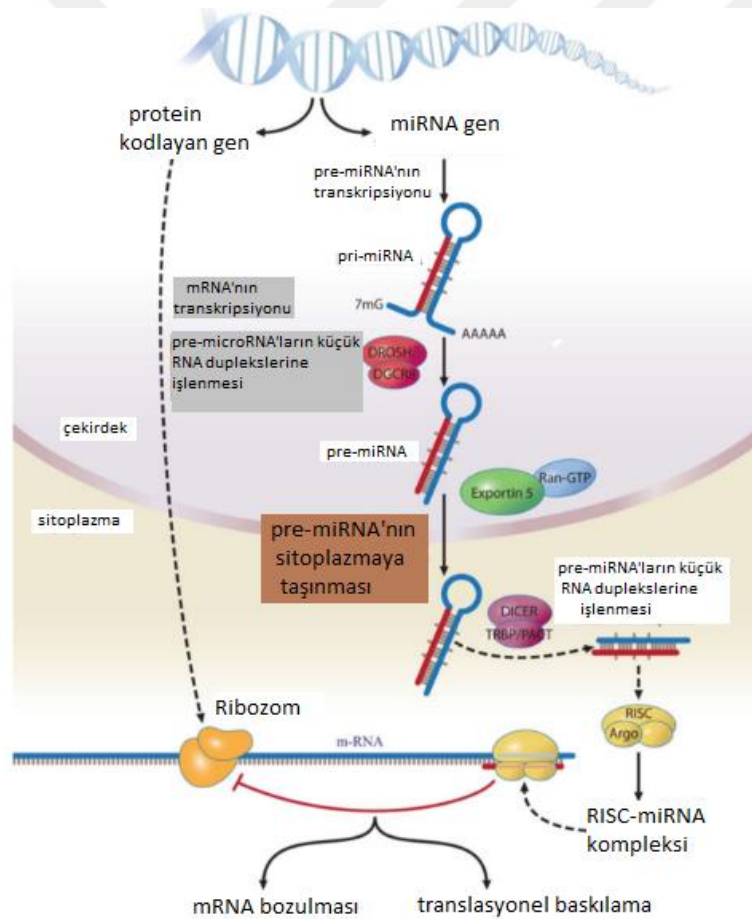
Tek bir miRNA, yüzlerce mRNA'yı hedefleyebilir ve genellikle fonksiyonel bir etkileşim yolunda yer alan birçok genin ifadesini etkileyebilir (82). Kardiyovasküler, kanser ve metabolik hastalıklar dahil sayısız fizyolojik süreç ve patolojinin sonucu, büyük ölçüde miRNA'lara dayanır (83).

miRNA iki farklı mekanizmadan birinde mRNA'yı inhibe edebilir. Hedef mRNA'nın bölünmesi ve degradasyonu yoluyla veya protein çevirisini baskılayarak inhibe eder. miRNA biyogenezi, RNA polimeraz II / III transkriptlerinin transkripsiyonel olarak işlenmesi ile başlar. Tanımlanmış tüm miRNA'ların yaklaşık yarısı introniktir, geri kalanı egzoniktir ve kendi promotörleri tarafından düzenlenirler. miRNA'nın biyogenezi, kanonik ve kanonik olmayan yollar olarak sınıflandırılmıştır (80,84).

### 2.12.1 Kanonik miRNA Yolağı

Kanonik yolda, miRNA'lar işlevsel bir miRNA kompleksine dönüşmeden önce birkaç işleme aşamasından geçmelidir. Başlangıçta miRNA'lar, cap başlıklı ve poliadenile edilmiş birincil miRNA'lar (pri-miRNA'lar) olarak RNA polimeraz II (Pol II) tarafından kopyalanır (85,86). Çekirdekte, pri-miRNA'lar bir saç tokası (hair pin) yapısı oluşturur. RNA bağlayıcı protein (RBP) ve *DiGeorge sendromu kromozom bölgesi 8 (DGCR8)* daha sonra pri-miRNA'yı firketenin gövdesindeki karakteristik bir 3' hidroksil grubu (OH), 2 nükleotid (nt) ve bir 5'fosfat (P) yapısından tanıyarak ve nükleer RNase III enzimi ile *DROSHA*'yı ona doğru yönlendirir. RBP ve *DGCR8* ile kompleks halinde olan RNase III enzimi *DROSHA* tarafından öncü miRNA (pre-miRNA) olarak adlandırılan bir ~70- nükleotidlik (nt) firkete molekülünü üretir (86,87,88). Pre-miRNA RAS ile

ilişkili nükleer protein-guanozin-5'-trifosfat-ase (Ran-GTPaz) bağımlı bir şekilde Exportin-5 (XPO-5) tarafından çekirdekten sitoplazmaya aktarılır. Sitoplazmaya translokasyondan sonra pre-miRNA, trans-aktivasyona duyarlı RNA bağlayıcı proteine (TRBP) bağlanan RNase III enzimi *DICER* tarafından işlenir. Bu protein kompleksinde, TRBP pre-miRNA'yı bağlar ve *DICER* fırkete ilmeğini keserek 3-ucunda tipik 2 nt çıkıntı ile yaklaşık 21-23 nt'lik bir miRNA dubleksiyile sonuçlanır. Bu dubleks RNA molekülünün bir ipliği, argonaute içeren ve miRNA tabanlı susturmanın yürütülmesinde önemli bir rol oynayan RISC adı verilen daha büyük bir protein kompleksine dahil edilir ve miRNA'nın şu andaki işlevi, susturma kompleksini hedef mRNA'daki tamamlayıcı dizilere yönlendirmektir. MiRNA yüklü RISC (miRISC), hedef mRNA'ların 3'UTR içindeki ters tamamlayıcı sekanslara bağlanır. Tüm ago'lar, trinükleotid tekrar içeren gen 6A – 6C (TNRC6A – TNRC6C) ve karbon katabolit baskılayıcı 4 negatif gibi faktörleri toplayarak hedef mRNA'larını susturur (Şekil 2.9) (76,87,88).



Şekil 2.9. miRNA biyogenezinin klasik yolunun şematik gösterimi [9]

### 2.12.2 Kanonik olmayan miRNA Yolağı

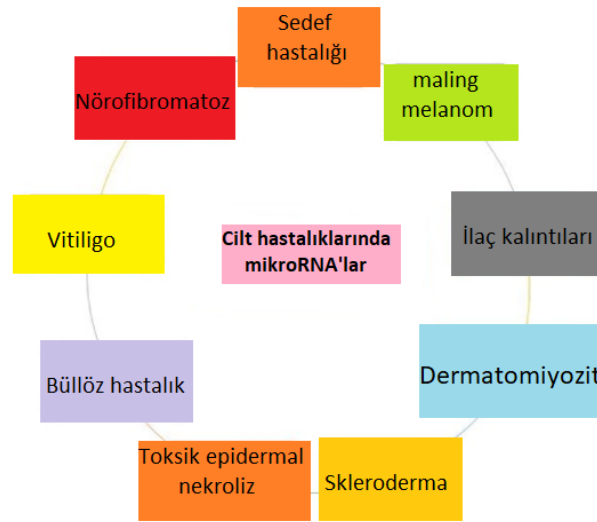
Son zamanlarda klasik biyogenez yolundan farklı olarak ve kanonik olmayan miRNA olarak adlandırılan farklı bir biyogenez yolu tarafından üretilen bazı miRNA'lar tanımlanmıştır. Bazı kanonik olmayan pri-miRNA'lar kodlayıcı genlerin intronlarında kodlanır ve mirtronlar olarak adlandırılır. İlk mirtronlar *Drosophila*'da tanımlanmıştır. Tanımlanan bu mirtron yolağının daha sonra omurgalılarda korunduğu açıklanmıştır. *DROSHA* etkinliğinden bağımsız olan mirton biyogenezi pre-miRNA'ların firkete oluşturma yeteneğine sahip kısa intronların çıkarılmasına dayanır ve hem ekleme hemde parçalama-çıkarma aktivitesine sahiptir. Kanonik miRNA'lar gibi mirtron'dan türetilmiş pre-miRNA'lar *XPO-5* tarafından bağlanır. Bu noktada, mirtronlar tipik miRNA işleme yolunu izler ve *exportin-5* tarafından sitoplazmaya taşınır, *DICER* tarafından bölünür ve olgun iplikler ago proteinlerine yüklenir. Yakın zamanda *DROSHA*'ya bağımlı ancak *DICER*'den bağımsız yeni bir kanonik olmayan yol ortaya bulunmuştur. Bu yol, ago2'ye ve özellikle miRNA öncesi bölünme olayı için gerekli olan benzersiz endonükleaz aktivitesine dayanır. Bu zamana kadar, sadece tek bir miRNA olan miR-451'in bu mekanizmayı kullandığı gösterilmiştir, ancak ago2'ye bağlı yolun araştırılması gerekmektedir. Saç tokası yapısı *DICER* tarafından bölünemeyecek kadar kısa olan pre-miR-451, miRNA olgunlaşması için ago2 nin parçalama aktivitesini gerektirir. Gövde-halka yapısının uzunluğu, gövdede kusurlu baz eşleşmesi ve distal gövdede düşük GC içeriği, pre-miR-451'in ago2 aracılı işlenmesini ve ardından RISC yüklemesini belirler. Ayrıca bazı küçük nükleolar RNA'ların (snoRNA'lar) kanonik olmayan miRNA'lar için bir kaynak olduğuna dair artan kanıtlar vardır. İlginç bir şekilde, *DICER* ve *DGCR8* gibi kanonik miRNA biyogenez yolunun bileşenleri snoRNA'dan türetilmiş miRNA'ların işlenmesinde ve snoRNA'ların stabilitesinde rol oynar. Diğer proteinlerle birlikte *DGCR8*, işlendikten sonra snoRNA'ları indirgeyebilir ve böylece snoRNA'dan türetilmiş miRNA'ların işlenmesini etkiler. Kanonik miRNA'lar gibi, snoRNA'dan türetilen miRNA'lar yaklaşık 21 nt uzunluğundadır, ago1 ago4'e bağlanır ve miRNA benzeri bir şekilde hedef mRNA'ları bastırır (85,87,89).

### 2.13 DERİ HASTALIKLARINDA miRNA

Deri, insan vücudunun en büyük ve önemli birincil savunma yapısıdır İnsan derisi, epidermis ve dermis üzere iki farklı doku katmanından oluşur. Bu katmanların her ikisi de bariyer olarak görev yapan ve farklı hücrelerden topluluklarından meydana gelmektedir. Deri, vücudu bir sürü çevresel darbelerden koruyan birincil bariyeri temsil eder. Cilt patojen istilasına ve aşırı su kaybına karşı korur, duyu sağlar, D vitamini üretimini kolaylaştırır, yalıtım sağlar ve vücut ısısını düzenler. Cilt çeşitli çevresel tehlikelere maruz kalır. Cildin en dıştaki katmanının her dakika yaklaşık 30.000 hücresinin öldüğü bilinmektedir (50,90).

Derinin sürekli olarak olumsuz etkilenmesi, cildin yaşlanması ve başarısızlığı belirginleşir, bu da esas olarak derinin bozulmasına neden olur ve beraberinde önemli hastalıkların gelişmesine neden olur. Bu hastalıkların altında yatan temel nedenler belirsizliğini korumaya devam ediyor. Hastalığın patogenezi ve moleküler mekanizması hastalığa umut verici tedaviler geliştirmek için araştırılmaya devam ediyor. Çeşitli doku ve hücreler dahil olmak üzere, çoğu biyolojik sürecin düzenlenmesinde rol oynayan hem transkripsiyonu bastırmak hem de hedef mRNA'nın işlevini bozarak gen ekspresyonunu aşağıya regüle eden ve endojen olarak ekspres edilen küçük (19-25 nükleotid) kodlamayan RNA molekülleri bunlardan biridir (91).

miRNA'lar hastalıklara katkıda bulunan genlerin ve biyobelirteçlerin kritik düzenleyicileri olarak kabul edilmektedir. Doğal olarak oluşan miRNA'lar hücre farklılaşması, proliferasyonu ve hayatta kalmasının temel düzenleyicileri olarak görev alırken, anormal ve değiştirilmiş miRNA ekspresyonu; sedef hastalığı, şizofreni, Alzheimer, Parkinson, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi çeşitli patolojik ve bağışıklık ile ilgili bozukluklarla ilişkilendirilmiştir (Şekil 2.10). Son yıllarda, miRNA'ların dahil edildiği hastalıkların sayısı önemli oranda artmıştır. Bu nedenle, hasta bireylerin serum, tükürük, plazma veya idrar gibi vücut sıvılarında miRNA'lara rastlanılır. Hücre dışı sıvısı olan serumda miRNA seviyeleri daha belirgindir ve esas olarak tümörlerde ve çeşitli insan hastalıklarında biyobelirteç haline gelmişlerdir (49.85).



Şekil 2.10. Deri hastalıklarında miRNA [49]

Bu hastalıklardan birisi de dünyada insanların yaklaşık olarak % 05-1'inin etkilendiği, ciltte beyaz yamaların meydana geldiği ve bireylerin hem fiziksel hem de psikolojik olarak

olumsuz etkilendiği vitiligodur. miRNA ve vitiligo hastalığı arasındaki ilişkiyi açıklamak için bazı çalışmalar yapılmıştır ve yapılmaya devam edilmektedir. Vitiligoya sahip farelerin serumlarından yapılan bir araştırmada: NSV'li 10 hasta ve 20 sağlıklı kontrolün serum miRNA ekspresyon profilleri karşılaştırılmıştır ve çalışma sonucunda 12 miRNA ifadesinin 3 katından fazla kat deęiŐimine sahip olduğu farklı ifade edilmiş miRNA'lar olduğu tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada sağlıklı bireylerdeki miRNA'lara kıyasla segmental olmayan vitiligolu (NSV) hastaların lezyon alanlarında farklı Şekilde eksprese edilen 13 miRNA olduğunu bulunmuştur. Bunlar arasında, NSV hastalarının deri lezyonlarında miRNA-1, miRNA-133b ve miRNA-135a dahil olmak üzere 9 miRNA ekspresyon seviyeleri önemli ölçüde artarken, miRNA-211 ekspresyon seviyesi azaldığı bildirilmiştir. Hasta ve kontrol bireylerinin kan örneklerinden yapılan miRNA mikrodizi analizi sonuçları NSV hastalarının (periferik kan mononükleer hücrelerinde) PBMC'lerinde dört miRNA'nın önemli bir Şekilde farklı ekspresyon gösterdiğini ve miRNA-224-3p, miRNA-2682-3p ve miRNA-4712-3p ekspresyonunun yukarı doğru düzenlendiğini ve miRNA-3940-5p ekspresyonunun önemli ölçüde aŐaęı düzenlendiği gösterilmiştir. Bu çalışmaların yanı sıra bir cilt hastalığı olan vitiligonun patojenitesinde rol oynadığı düşünölen ve araştırılmaya devam edilen bazı önemli miRNA'lar vardır. Bunlar; miRNA-155-5p, miRNA-211-5p, miRNA-25-5p, miRNA-423-5p, miRNA-202-3p, miRNA-3940-5p, miRNA-9-5p dir. Bildirilen miRNA'ların farklı ifadesi, vitiligo patogenezinin anlamamız için bir fırsat sağlar. Teknolojideki yenilikler ve miRNA alanındaki araştırmalar toplu olarak miRNA'ların cilt hücrelerinin iŐleyiŐindeki, en önemlisi ciltle ilgili hastalıklardaki rolünü göstermektedir. miRNA hücre çoğalması, gen ekspresyonundaki deęiŐikliklere bağlı göç, bağışıklık yanıtı veya tümör oluşumu gibi farklı aktivitelerini etkiler. Deri bozukluklarının moleküler patogenezinin iliŐkin bazı yeni sonuçlar, mikroRNA'ların hücre hasarı ve hücreler arası iletişimde de rol oynadığı fikrini desteklemektedir. Bu nedenle hastalık patogenezinin, tanısının ve tedavisinin açıklanmasında anahtar rol oynayan miRNA'ların tanımlanması, hastalıklardaki rolleri ve hedef genleri nasıl düzenlediklerinin aydınlatılması birçok hastalık için hayati öneme sahiptir (92).

Son yıllarda, miRNA'ların araŐtırıldıęı hastalıkların sayısı önemli oranda artmıştır. Çeşitli cilt bozukluğu ve cilt hastalıkları olan bireylerin; serum, tükürük, plazma veya idrar gibi vücudun hücre dışı sıvılarında miRNA'ların bulunduğu bilinmektedir. Biz alıŐmamızda, vitiligo patogenezinin potansiyel düzenleyicileri olan miRNA'ların biyogenezinde görev alan genlerin ekspresyon düzeyleri ile bu genlerdeki polimorfizmlerin arasındaki ilişkiyi araştırmayı planladık. Ayrıca bu çalışma ile elde ettiğimiz sonuçlarımızın; vitiligo etiyopatogenezinin aydınlatılmasında, literatüre ve yapılacak olan diğer çalışmalara katkıda bulunacağı düşünöndeeyiz.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması

Vitiligo hastalığında *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8* Gen Polimorfizmlerinin rs1057035, rs1640299, rs1640299 ve Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması isimli çalışmamız Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş ve 04/09/2019 tarihli ve 2019/380 sayılı kurul kararı ile uygun bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan materyaller, daha önce BAP tarafından desteklenen (2015-TP3-1204 nolu proje) ve etik kurul onayı alınan (09.07.2015 tarih ve 2015/234 sayılı karar) kan örneklerinden planlanmıştır. Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Dermatoloji Polikliniğinde vitiligo tanısı almış toplam 55 gönüllü hasta çalışmanın hasta grubunu oluşturmaktadır. Kontrol grubunu ise herhangi bir dermatolojik hastalığı olmayan toplam 56 gönüllü birey oluşturmaktadır. Hem kontrol hem de hasta grubuna ait bireylere araştırmayı kabul ettiğine dair bilgilendirilmiş onam formu imzalatılmıştır.

Çalışma için; -80°C'de bekleyen kan örneklerinin çözülmesi sağlanmış, tüm laboratuvar analizleri Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2. Kullanılan Araçlar- Gereçler, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

##### 3.2.1 Kullanılan Araçlar- Gereçler

- ✓ Buzdolabı (Hotpoint Ariston, Korea)
- ✓ Derin Dondurucu (Arçelik 2031D, TR)
- ✓ Santrifüj (Nüve NF-400, TR)
- ✓ Hassas Terazı (ACJ 120-4M, Kern)
- ✓ Vorteks (VELP Scientifica, Italy)
- ✓ Real-Time PCR (ABI 7500, Applied Biosystems, USA)
- ✓ PCR (Veriti, Applied Biosystems, USA)
- ✓ Etüv (Nüve EN-500, TR)
- ✓ Otoklav
- ✓ Nanodrop
- ✓ Mikrosantrifüj (Nüve EN-500, TR)
- ✓ Mikropipet Seti (Eppendorf)

##### 3.2.2. Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

- ✓ 5 X Hot Firepol® Probe QPCR Mix Plus (ROX) (08-14-00020, Solis Biodyne)
- ✓ 5x Reaksiyon tamponu RT-PCR

- ✓ dNTPs Mix 10mM (100 ul) (SNP010-10, SNP Biyoteknoloji, Türkiye)
- ✓ Etanol (SNP010-10, SNP Biyoteknoloji, Türkiye)
- ✓ İzopropanol (I9516, Sigma, ABD)
- ✓ Kloroform:İzoamilalkol (24:1) (I9516, Sigma, ABD)
- ✓ Microamp Real Time PCR Plate kaplama Filmi (4311971, Applied Biosystems, ABD)
- ✓ Microamp Real Time PCR Plate tutucu (N8010560, Applied Biosystem, ABD)
- ✓ Mikrosantrifüj tüpü (N8010560, Applied Biosystem, ABD)
- ✓ PCR tüpü (14-222-262, Axygen, ABD)
- ✓ Pipet ucu 0,5-10 µl'lik (14-222-262, Axygen, ABD)
- ✓ Pipet ucu 1-200 µl'lik (14-222-262, Axygen, ABD)
- ✓ Pipet ucu 1-1000 µl'lik (14-222-262, Axygen, ABD)
- ✓ Polipropilen Real Time PCR Plate (N8010560, Applied Biosystems, ABD)
- ✓ RevertAid Reverse Transcriptase, 5x Reaksiyon tamponu RT-PCR ile birlikte (200U/µl) (EP0442, Thermo Scientific, ABD)
- ✓ Ribolock RNase Inhibitor (40 U/µl) (EP0442, Thermo Scientific, ABD)
- ✓ Ribozol (EP0442, Thermo Scientific, ABD)
- ✓ Steril Distile Su (Polifarma, Türkiye)
- ✓ 0,2 µmol (200 nmol) Primer HPLC Purified (60 bp) (Macrogen)
- ✓ 6-VIC 3 TAMRA Labelled Probe (Almanya)
- ✓ Yakima Yellow Labelled Probe (Almanya)
- ✓ PRİMER HPLC 0,2 UMOL (Metabion, Almanya)
- ✓ Yakima Yellow-BHQ1 Modifiye Primer (Metabion, Almanya)
- ✓ Yakima Yellow-BHQ1 3 Adet PDC Modifiye (Metabion, Almanya)
- ✓ Fam-BHQ1 Modifiye Primer (Metabion, Almanya)
- ✓ Fam-BHQ1 Modifiye Primer PDC Modifiye (Metabion, Almanya)
- ✓ Sodyum Etilendiamintetraasetik asit (Na<sub>2</sub>EDTA) (Sigma E-5134)
- ✓ 2 × TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD )
- ✓ Tris-Hidroklorit (Thermo, ABD)
- ✓ Proteinaz K (Thermo, ABD)

### 3.2.3 RNA İzolasyonu için Kullanılan Kimyasallar

- ✓ Ribozol.....500 µl
- ✓ Kloroform .....200 µl
- ✓ İzoamilalkol ..... (24:1)
- ✓ İzopropanol .....500 µl
- ✓ Etanol .....%80

### 3.3. SNP Analizi

#### 3.3.1 Periferik Kandan DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için HibriGen (MG-GDNA-01) genomik DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. HibriGen genomik DNA izolasyon kiti, DNA izolasyonunu fenol/kloroform kullanılmadan silika-jel membran teknolojisini ile basit ve hızlı bir şekilde gerçekleştirir. Homojenizasyon gerekmez, dokunun lizisi direk olarak proteinaz-K tarafından gerçekleştirilir. Buffer sistemi DNA'nın seçici olarak silika-jel membranına bağlanması şeklinde optimize edilmiştir. Basit bir santrifüj işlemi ile protein, divalent iyonlar ve ikincil metabolitler gibi kontaminantlar kolaylıkla uzaklaştırılır. Saf DNA, su veya düşük tuz çözeltisi içinde çözülür ve kullanıma hazırdır. Purifiye edilen DNA; kontaminantlardan ve enzim inhibitörlerinden arınmış haldedir. A260/A280 değeri 1.7 ila 1.9 arasında olup; dizileme, enzim kesimi, PCR, Southern Hibridizasyon vs. gibi uygulamalarda kullanıma uygundur.

#### 3.3.2. DNA İzolasyon Protokolü

- Koagüle olmamış 200 µl total kan 1.5 ml lik santrifüj tüpüne koyulur. 600 µl LB Buffer total kanın üzerine pipetaj yapılarak eklenir ve homojen hale getirilir.
- Sonra 10.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Kalan pellet beyaz yada hafif pembe renkte olacaktır.
- Pelletin üzerine 200 µl DS Buffer eklenir. Pipetaj yapılarak pelletin parçalanması sağlanır. Homojen bir görüntü oluşana kadar vortekslenir.
- Üzerine 20 µl Proteinaz-K ve 220 µl BB Buffer eklenir sonra 70° C de 15 dakika inkübasyona bırakılır.

- İnkübasyondan alınan örnekler 200 µl önceden soğutulmuş etanol eklenir. Vortekslenir. Karışım filtreli tüpe alınır, 12.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilir. Filtreden geçen ve altta kalan sıvı kısım dökülür.
- Filtrenin üstüne 500 µl Wash Solüsyonu (WB) eklenir. 12.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilir. Filtrenin altı boşaltılır. (Bu işlem iki defa uygulanır).
- Toplama tüpü atılır. Kolon temiz toplama tüpüne alınır. Filtre herhangi bir reaktif eklenmeden boş oolarak 12.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilir.
- Filtre altı atılır. Filtre yeni eppendorf'a yerleştirilir. Filtrenin üzerine 100 µl Elution Buffer eklenir. 1 dk oda sıcaklığında beklenir. 12.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilir. Filtre atılır. DNA eppendorf tüpündedir.

### 3.4. Çalışma Gruplarının Polimorfizmler için Genotip Tayini

#### 3.4.1. Genotipleme Yapılacak SNP'lerin Seçilmesi

Cilt hastalığı olan vitiligoda önemli rollerinin olduğu düşünülen ve miRNA biyogenez yolağında yer alan (gen ekspresyonu üzerinde etkili olan 3'-UTR ve promotor bölgelerde yer alan) *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8* genlerine ait polimorfizmler (rs1057035, rs493760, rs1640299) seçilmiştir (Tablo 3.1). İzole edilen DNA örneklerine uygun, Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) programı ile Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Enstitüsü'nde (NCBI; National Institute of Biotechnology Information) bulunan referans insan genom dizilerinden yararlanılarak seçilen genlerin polimorfizmlerine özgü primer ve proplar sentezlenmiştir. Applied Biosystems (ABI) Prism 7500 Real Time PCR cihazı üzerinde hasta ve kontrol grubuna ait DNA örneklerinin, sentezlenen proplarla işaretlenmesi ile genotipleme deneyi gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3.1** Genotip Tayini Yapılan miRNA Oluşum Yolağındaki SNP'ler

Gen	Gen ID	Kromozomal Lokasyon	SNP No	Pozisyon	Varyant
<i>DICER</i>	23405	chr14	rs1057035	3'-UTR	T>C
<i>DROSHA</i>	29102	chr5	rs493760	3'-UTR	T>C
<i>DGCR8</i>	54487	chr22	rs1640299	3'-UTR	G>T

### 3.4.2. Genotipleme için Primer ve Problemlerin Sentezlenmesi

*DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8* gen polimorfizmlerine özgü referans genom dizileri aşağıda belirtilmiştir. Primer eşleşme bölgesi sarı ile, prob eşleşme bölgesi yeşil ile, nükleotid polimorfik allelin yeri ise kırmızı ile işaretlenmiştir (Şekil 3,1-3).

NG_016311.1
ACAGAAGGAAAAAGCTATTATAAAAACGCAGCATAGTTAGGACTGCGGAAAGCATATTATAA AAGAAATTTTAAAAAATTTACAAATGAAGGTTTCATGTTAACCTTGCACACAATCATCATAAGGA ATTTCTGCAGTTGCTTTTTCAAGACACGCCTCCCCAGTCCTTTACACACGTTGCTCAGGGCACAACCACA CCCCACTGGTAGGTTTTCCATATTACATTGGGTCTCACATTGCAATCACAGGAACACAGGGTGGCACA CAGGGCTCTA

Şekil 3.1 *DICER*'e ait Real Time PCR ile çoğaltılan rs1057035'in (T>C) yer aldığı bölgenin dizisi

NG_051574.1
ACACACACACACACACACACACACACACACACACACACTAGAAAATCTGGTCATTAA AATTACTTGTAAGCTTTACTTCCCTTGAGATCAGAAAGAGTAAGAAAGGGATCAAAGACAAATCCTA GAAGATGAAATGACATTTTAAAAATATCATCCCTTTCTTTACAAATTGAAATAAGCTCTGAAGCATCT AGACCAAAGGCAAGCTGATCTCTTGTGGCTGTAAGCAACTTTAACATATACTTGACAGGACAGAGACAC CAGCCTTTGATCTTGTAATCTCACTCATTACAGCATCAGTGAGTGCCAGTTATCAGGGCAAGGGCCAC AGACATGTGGC

Şekil 3.2 *DROSHA*'ya ait Real Time PCR yöntemi ile çoğaltılan rs493760'ın (T>C) yer aldığı bölgenin dizisi

NG_022931.1
AACCATCAAGGTGGTCCCTCTCCAGTCTGGACACGATGCCAGCAAGGATGACGTCCTGCCACCTCCTGGAGTT ACCC TGGCCTCCTAGGGTCCCTTTTTCTGATGAAGTCTTAATCCCTAAAAGCGCCTCTTTGGACACTGAGGC CCTCTCTGCCTTTCCTGGCCTCCGGCAACAGTTTTTTTACAAAGATTTTTTGCAGTCGAGTCCATATGTCCACC CATTGATTTTTAAAGCTTTTGTGATATTTTAGCATTTTGAAAGACTTTCACAGTGAGAGTAGGAGGTAGATT T GGAATCATGCATTTTAGCAAGTGGACTTGTGAAACAGGAAGCAAGGAATTCAGTGT

Şekil 3.3 *DGCR8*'e ait Real Time PCR yöntemi ile çoğaltılan rs1640299'un (G>T) yer aldığı bölgenin dizisi

Tablo 3.2 *DICER* rs1057035, *DROSHA* rs493760, *DGCR8* rs1640299 polimorfizmleri için dizayn edilen primer ve prob dizileri

Gen	Gen bölgesi	Nükleotit Değişimi	SNP Referans No
DICER	3' UTR	T>C	1057035
Forward Primer	5'-TCTGCAGTTGCTTTTTCAAGACA-3'		
Reverse Primer	5'GAGACCGAATGTAATATGGAAAACCT-3'		
Prob C	5'-Yakima Yellow-CTTTACACACGGCTCAGGGCA-BHQ-1-3'		
Prob T	5'-FAM-CTTTACACACGTGCTCAGGGCAACC-BHQ-1-3'		
Gen	Gen bölgesi	Nükleotit Değişimi	SNP Referans No
DROSHA	3' UTR	T>C	493760
Forward Primer	5'-AAAGACAAATCCTAGAAGATGAAATGACA-3'		
Reverse Primer	5'-AGATCAGCTTGCCTTGGTCTAGA-3'		
Prob C	5'-Yakima Yellow-CTTTACACACGGCTCAGGGCA-BHQ-1-3'		
Prob T	5'-FAM-CTTTACACACGTGCTCAGGGCAACC-BHQ-1-3'		
Gen	Gen bölgesi	Nükleotit Değişimi	SNP Referans No
DGCR8	3' UTR	G>T	1640299
Forward Primer	5'-TGGCCTCCTAGGGTCCCTT-3'		
Reverse Primer	5'AAGGCAGAGAGGGCCTCAGT-3'		
Prob T	5'Yakima Yellow-T(pdC)TTAATTC(pdC)CTAAAAG(pdC)GCCT-BHQ-1-3'		
Prob G	5'-FAM-TCTTAATGC(pdC)CTAAAAG(pdC)GCCT-BHQ-1-3'		

“Metabion International AG, D-82152 Martinsried/Deutschland” tarafından primer ve prob oligonükleotid dizileri sentezlendi. Problemlerin 5' ucuna FAM veya Yakima Yellow ile işaretlenmiş floresan ışığa yapabilen boya ve buna ek olarak 3' ucuna ise ışımının gerçekleştiği dalga boyuna sahip ve ışığın yayılmasını engelleyen Black Hole Quencher™ (BHQ) adındaki “quencher” (soğurucu) kovalent bağ ile bağlanmıştır. Floresan boya ile işaretli oligonükleotidin erime sıcaklığını ( $T_m$ ) arttıran PdC hedefe özgüllük sağlamaktadır. Bu nedenle sitozen nükleotidi yerine pdC (sitozen analogu olan C-5 propinil-deoksiribo Sitozen) ilave edilip prob dizayn edildi (Tablo 3.2).  $T_m$  her bir pdC eklenmesiyle yaklaşık 2,8 °C yükselmektedir. VIC'e alternatif olarak kullanılan spesifik boya Yakima Yellow dur. Emisyon (549 nm) ve maksimum absorpsiyon (530,5 nm) ile Fluorescence Resonance Energy Transfer; Floresan Rezonans Enerji Transferi teknolojisini kullanan florofor ışığa algılayıcıları ile uyumludur. En iyi sonucun Black Hole Quencher™ (BHQ) ile elde edileceği düşünülmektedir. Prob dizilerinde altı çizili nükleotid polimorfik alleli belirtmektedir.

### 3.4.3. Real Time PCR ile Genotipleme Deneyi

Genotipleme deneyi Applied Biosystems (ABI) Prism 7500 Real Time PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. İlk olarak çalışılacak olan her bir allele ait reaksiyon karışımı Tablo 3.3' te belirtildiği gibi hazırlandı. Hazırlanan bu PCR reaksiyon karışımı 96 kuyucuklu saydam polipropilen plate kuyucuklarının her birine 20 µl olacak şekilde dağıtıldı. Her reaksiyon için ilk kuyucuk, hazırlanan karışımın kontamine olup olmadığını tespit etmek amacıyla, DNA içermeyen negatif kontrol olarak kullanıldı. Daha sonra negatif kontrol kuyucuk hariç her kuyucuğa genomik DNA örneğinden 2 µl ilave edildi. Reaksiyon karışımı kuyucuklara dağıtıldıktan sonra Real-time PCR film ile plate kuyucuklarının üzeri kaplanmıştır. Ardından DNA örneklerinin dibe çökmesi amacı ile 1 dk santrifüj edilmiştir. Plate Real Time cihazına yerleştirildikten sonra her gen için belirlenen uygun reaksiyon şartları ile deney tamamlanmıştır (Tablo 3.4). 135 ile 150 dakika arasında süren deneylerin ardından multicomponent grafikleri üzerinden genotip tayini yapıldı.

Tablo 3.3. Genotipleme Deneyinde Kullanılan Real-Time Karışımı (Mix) İçeriği

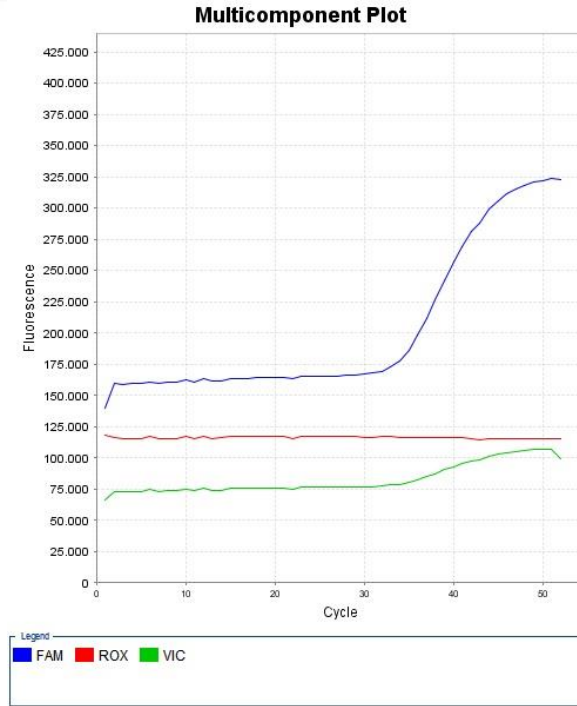
Reaksiyon Bileşeni	Miktar
dH <sub>2</sub> O	5 µl
Master Mix	12,5 µl
Primer R	2,5 (primer çifti)
Primer F	900 nM
Prob FAM	0,6 prob
Prob VIC	200 nM
Her Tüp İçin	20µl

Tablo 3.4. Genotipleme deneyi için tasarlanan Real Time PCR koşulları

Sıcaklık°C	PCR Aşaması	Döngü Sayısı
60 °C	1 dk PCR ön okuma	1 Döngü
95°C	10 dk DNA Polimeraz Aktivasyon	1 Döngü
95°C	15 sn Denatürasyon	50 Döngü
60-62°C	1-1,5 dk bağlanma/uzama	50 Döngü
60°C	1 dk PCR sonrası okuma	1 Döngü

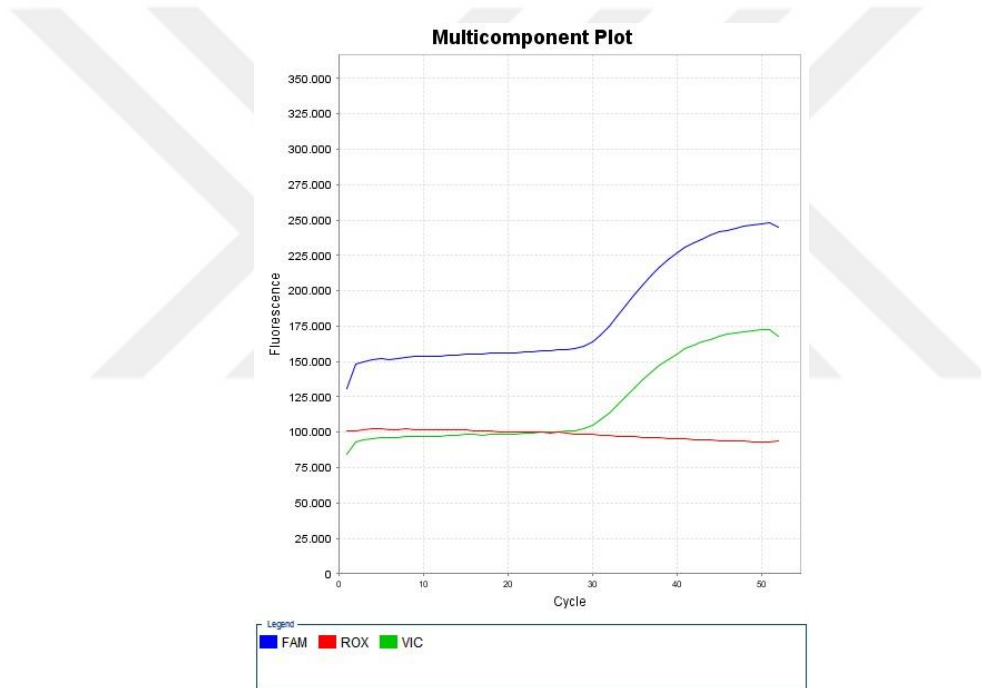
### 3.4.4.Genotip Tayini

Genotipler, SDS 2.0.6 yazılımı logaritmik şekilde gerçek zamanlı amplifikasyon eğrilerinin analizi yapılarak eş zamanlı PCR cihazı ile belirlenmeye çalışıldı. Polimorfik allelleri taşıyan ve 5' ucunda prob bağlı olan DNA örneklerinin floresan ışımaya miktarının birim PCR termal döngüsüne göre, DNA çift zincirli moleküler yapıya sahip olduğundan, her bir döngü sonunda DNA miktarı iki katına çıkacağından dolayı artış eğrisinin yukarı doğru bir pik vermesi beklenmektedir. Ancak reaksiyon sonunda ortamdaki PCR bileşenleri tükendiğinden eğri plato evresine girer ve yatay seyrederek.



Şekil 3.4. DICER rs1057035 polimorfizmi C-T için Genotipleme Deneyi Sonucunda Elde Edilen Multicomponent Grafiğinde Homozigot TT Genotipi

Şekilde mavi renkli eğri C allelini taşıyan DNA fragmanını, yeşil renkli eğri T allelini ve kırmızı renkli yatay çizgi arka plandaki ışmayı belirten ROX (6-Karboksi-X-Rhodamin) pasif referans boyayı temsil etmektedir. ROX analiz sırasında floresan ışmanın normalize edilebilmesi için gerekli referans ışmayı yapar. Bu çizgi arka plandaki bazal düzeydeki floresan ışmayı temsil etmektedir. ROX ışmasına bağlı olarak da her deneysel kurulum kendine bir bazal seviye belirlemiş olmaktadır. T allelini taşıyan prob Yakıma Yellow'la ve C alleli ise FAM (5-Karboksifloresin) ile işaretlenmiştir. Şekil 3.4'te ışma sadece mavi renkli çizgide ani FAM probunda olduğundan genotip homozigot TT olarak değerlendirildi.



Şekil 3.5. DICER rs1057035 polimorfizmi C-T için Genotipleme Deneyi Sonucunda Elde Edilen Multicomponent Grafiğinde Heterozigot CT Genotipi

Şekilde mavi renkli eğri C alelini taşıyan DNA fragmanını, yeşil renkli eğri T allelini ve kırmızı renkli yatay çizgi arka plandaki ışmayı belirten ROX (6-Karboksi-X-Rhodamin) pasif referans boyayı temsil etmektedir. ROX analiz sırasında floresan ışmanın normalize edilebilmesi için gerekli referans ışmayı yapar. Bu çizgi arka plandaki bazal düzeydeki floresan ışmayı temsil etmektedir. ROX ışmasına bağlı olarak da her deneysel kurulum kendine bir bazal seviye belirlemiş olmaktadır. T allelini taşıyan prob Yakıma Yellow'la ve C alleli ise FAM (5-Karboksifloresin) ile işaretlenmiştir. Şekil 3.5'te ışma hem yeşil renkli çizgide VIC (Yakıma

Yellow) probunda hem de mavi renkli çizgide FAM probunda olduğundan genotip heterozigot CT olarak değerlendirildi.

### **3.5 EKSPRESYON ANALİZİ**

#### **3.5.1 Periferik Kandan RNA İzolasyonu**

##### **3.5.1.1. RNA İzolasyon Protokolü**

- EDTA'lı 500 µL kan örneği 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. Üzerine 500 µl ribozol eklendi ve hemen vorteksenerek buz içinde 15 dakika inkübe edildi.
- Daha sonra üzerine +4°C'de soğutulmuş 200 µl kloroform izoamilalkol (24:1) eklendi ve hemen vorteklendi.
- Sonra 14.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra örnek üç faza ayrıldı. Üstteki açık sıvı fazda RNA, orta beyaz bulutumsu fazda DNA, alttaki kırmızı fenol fazda protein olmak üzere üç faz oluştu.
- RNA içerikli üst açık sıvı faz, etiketli tüplere transfer edildi.
- Sıvı fazın üzerine 500 µl hacimde izopropanol eklendi ve RNA'yı çöktürmek için 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- Tüpler +4°C'de 10 dk 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
- Süpernatant, pelletin altüst olmamasına dikkat edilerek pipetle atıldı.
- Pellet üzerine 1 ml hacimde %80'lik soğuk etanol ilave edilerek RNA yıkanması sağlandı. Daha sonra, tüpler +4°C'de 10 dk 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
- Pipetle yine pellete dikkat edilerek süpernatant atıldı ve kuruması için 10-15 dk inkübe edildi. Etanolün kalmamasına dikkat edildi.
- RNA pelletinin çözünmesi için üzerine 50 µl steril distile su ilave edildi. 15 sn kadar vorteks yapıldı ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra tüpler -20°C'de saklandı

### **3.6 RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Analizi ve cDNA sentezinde kullanılacak RNA kalıp miktarlarının belirlenmesi**

Nanodrop spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) kullanılarak RNA örneklerinin optik dansite ölçümleri (safılık ve miktar tayini) yapıldı. Örneklerin A260/A280 oranlarının 1.7-2 arasında olmasına dikkat edildi. cDNA sentezinde kalıp olarak kullanılacak RNA miktarları, her bir örnek için, toplam 50µl'lik reaksiyon volumü içinde 2 µg/µl olacak şekilde hesaplandı ve reaksiyon karışımına eklendi. Bu yöntem ile, bütün örnekler için eşit miktarlarda

RNA'nın kullanılması ile cDNA sentezlenmesi ve örneklerdeki gen ekspresyon farklılıklarının kalıp RNA miktarlarındaki değişkenlikten kaynaklanmaması sağlandı.

### 3.7. Real-Time PCR ile Gen Ekspresyon Analizine Yönelik Primer ve Prob Dizaynı

Ekspresyonları analiz edilmek istenen *DICER*, *DROSHA*, *DGCR8* genleri ve endojen kontrol olarak kullanılan *ACTB* (*Beta Aktin*) geninin RNA dizileri, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Enstitüsü (NCBI; National Institute of Biotechnology Information) veri tabanından belirlendi. Ekspresyon analizi için, belirlenen bu genlerin primer ve prob dizileri Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) programı kullanılarak dizayn edildi (Tablo 3,5 te gösterilmiştir).

Tablo 3.5. Ekspresyon Analizinde Kullanılan *DICER*, *DROSHA*, *DGCR8* ve *BETA AKTİN (ACTB)* Genlerine Ait Primer-Prob Dizileri

Gen adı	ID No	miRNA Nükleotit Dizi No	Primer prob dizileri
<i>DICER</i>	23405	NM_001195573.1	F-5'CCCGGCTGAGAGAACTTACG 3'
			R-5'TGTAACCTTCGACCAACACCTTTAAAT3'
			PR-5'-FAM-CGGGAAGGT(pdC)AGAGT(pdC)A-ZNA4-BHQ-1-3'
<i>DROSHA</i>	29102	NM_013235.4	F-5'-GAACAGTTCAACCCCGATGTG-3'
			R-5'-CTCAACTGTGCAGGGCGTATC-3'
			PR-5'-FAM-TTA(pdC)TTTT(pdC)CGATTAT(pdC)GTC-ZNA4-BHQ-1-3'
<i>DGCR8</i>	54487	NM_022720.6	F 5'-TCTTTGAATGTGAGAACCCAAGTG-3'
			R 5'-CCGTAAGTCACACCATCAATGG-3'
			PR 5'-FAM-CCTTTTGGTGCTCGGT-ZNA4-BHQ-1-3'
<i>BETA AKTİN (ACTB)</i>	60	NG_007992.1	F 5' AAAGTGAACGGTGAAGGTG-3' R 5'AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT-3' PR 5'VIC-TCCCCAAAGTTCACAATGT-TAMRA-3'

### 3.8. Real Time PCR ile Ekspresyon Analizi

Hedeflenen cDNA ya da DNA dizisini çoğaltarak ürün miktarını tayin etmek amacıyla gen ekspresyon ölçümünde kullanılan bir yöntem olan Real Time PCR yöntemi, mRNA ekspresyonunu ölçmesinin yanı sıra, verimliliği ve doğruluğu nedeniyle de tercih edilen bir yöntemdir. Real-Time PCR ile gen ekspresyon çalışması; cDNA sentezlenmesi, PCR ürünlerinin saptanması ve veri analizi olmak üzere üç aşamadan meydana gelmektedir.

#### 3.8.1. cDNA Eldesi

Kontrol hasta gruplarından elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi için gereken karışım miktarları ve koşulları Tablo 3.6'daki miktarlar baz alınarak hazırlandı. Uygun reaksiyon tüpünde cDNA karışımı (mix) hazırlandı. Hazırlanan bu karışımdan her bir örnek için PCR tüpüne 28 µl cDNA mixi eklendi. Bütün örnekler için her bir tüpün üzerine 5'er µl izole edilen total RNA eklendi ve cDNA sentezlendi. Böylece örneklerdeki gen ekspresyon farklılıklarının kalıp RNA miktarlarındaki değişkenlikten kaynaklanmaması sağlandı. Ardından tüpler PCR cihazına yerleştirildi ve 16°C'de 30 dk, 42°C'de 30 dk, 85°C'de 5 dk PCR koşullarında total RNA'lar özgül olarak cDNA'ya dönüştürüldü. Elde edilen cDNA örnekleri ekspresyon analizi için -20°C'de saklandı. Ekspresyon analizi için ise endojen kontrol olarak seçilen ACTB (Beta Aktin), ekspresyon düzeyleri belirlenecek üç genden ve sağlıklı bireylerin RNA'larından oluşturulan havuzdan (0 olarak adlandırılan kontrol RNA havuzu) cDNA'lar oluşturuldu.

Tablo 3.6. cDNA Eldesi için Hazırlanan Karışım Miktarları

Reaksiyon Bileşeni	Miktar (1x için)	Miktar (105 x için)
dH <sub>2</sub> O	12 µl	1260 µl
5x RT Buffer	4 µl	420 µl
dNTP 2mM	10 µl	1050 µl
Primer	2,5 µl	262,5 µl
Revers Transkriptaz 200 U / µl	0,1 µl	10,5 µl
RNaz İnhibitör 40 U / µl	0,25 µl	26,25 µl
Toplam	28,85 µl	3029,25 µl

### 3.8.2. PCR Ürünlerinin Saptanması

Bu adımda oluşturulan cDNA ürünlerinin gerçek zamanlı ölçülmesi gerçekleştirildi. Taqman prob gen saptamasında floresan saptama boyası olarak kullanıldı. Real Time plakasının (plate) 96 kuyucuğunun her bir kuyucuğuna Tablo 3.7'de belirtilen miktarlar baz alınarak hazırlanan ekspresyon karışımından 20 µl konuldu. Daha sonra kuyucuklara ekspresyon karışımı üzerine 5 µl özgül cDNA konuldu. Sonra plate üzeri film ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kaplanarak Real Time cihazının ısı bloğuna yerleştirildi. Başlama evresinde 50°C'de 2 dk, 95°C'de 10 dk ve döngü evresinde 50 döngü 95°C'de 15 sn, 60°C'de 90 sn olacak şekilde Real-Time PCR analizi gerçekleştirildi.



Tablo 3.7 Gen Ekspresyon Analizi İçin Hazırlanan Karışım

Reaksiyon Bileşeni	Miktar (1x için)	Miktar (100 x için)
MASTER MIX	12,5 µl	1250 µl
dH <sub>2</sub> O	5 µl	500 µl
<i>DICER</i>	2,5 µl Primer çifti 900 nM 0,6 µl prob 200 nM	250 µl Primer çifti 60 µl prob
<i>DROSHA</i>		
<i>DGCR8</i>		
ACTB (B AKTİN)		
Toplam	28,4 µl	2840 µl

### **3.8.3. Ekspresyon Çalışması için Veri Analizi**

Son olarak, iki farklı örnekte bulunan (endojen kontrol ve hedef gen) gen miktarlarının pozitif kontrol oluşturduğumuz kontrol RNA havuzu örnekleriyle beraber karşılaştırılarak gen miktarında meydana gelen değişiklikler tespit edildi. Gen ekspresyon düzeyindeki bu değişimler, SDS 2.0.6 yazılımı ile  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleri kullanılarak belirlendi.

## **3.9. İstatistiksel Analiz**

### **3.9.1. Genotip Verilerinin Düzenlenmesi ve İstatistiksel Analizi**

Vitiligo hastalığı olan hasta grubunun ve kontrol grubunun genotip ile allel verileri "Ki-kare" testi ile analiz edilmiştir. Genotip ve allel frekansları açısından hasta ve kontrol gruplarının "Hardy Weinberg" dengesinde olup olmadıkları kontrol edildi. Sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma cinsinden, kategorik değişkenler için ise frekans ve yüzde olarak verildi. İstatistiksel analizler SPSS v.11.5 programı ile yapıldı. Sonuçlar  $p < 0,05$  olanlar anlamlı kabul edildi.

### **3.9.2. Ekspresyon Verilerinin Düzenlenmesi ve İstatistiksel Analizi**

Kategorik değişkenler sayı ve yüzde cinsinden, sürekli değişkenler ise medyan, 1. ve 3. çeyreklik değerleri ile özetlenmiştir. Normal dağılım kontrolü Shapiro- Wilk testi ile yapılmıştır. Hasta-Kontrol ve polimorfizm grupları arasındaki yaş ve ekspresyon düzeyleri arasındaki farklar için Mann Whitney U testi kullanılmış ve box-plot grafikleri çizilmiştir. Hasta-kontrol gruplarıyla cinsiyet ve polimorfizm grupları arasındaki ilişkileri analiz etmek için Ki kare testi kullanılmıştır. İstatistik anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  kabul edilmiştir.

## 4.BULGULAR

### 4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Yaş ve Cinsiyet Bakımından Değerlendirilmesi

Bu çalışmaya hasta grubunda 55 ve kontrol grubunda 56 birey olmak üzere toplam 111 birey dahil edilmiştir. Kontrol grubunu oluşturan toplam 56 bireyin 29'u erkek (%51,8), 27'si kadın (%49,2) olup; hasta grubunu ise toplam 55 bireyin 27'sini erkek (%49,1) 28'ini kadın (%50,9) bireyler oluşturmaktadır. Kontrol ve hasta grubundaki bireylerin yaş medyanları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ( $p>0,05$ ).

Tablo 4.1. Hasta ve Kontrol grubundaki kadın ve erkek bireylerin yaş medyanları

YAŞ DAĞILIMLARI					
CİNSİYET	KONTROL	%	HASTA	%	P değeri
ERKEK	29	51,8	27	48,2%	0,761
KADIN	27	48,2%	28	50,9%	
MEDYAN	28,5		23		0,761

### 4.2. Hasta ve Kontrol Gruplarında *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8* Gen Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi

Hasta ve kontrol gruplarının genotip dağılımları incelendiğinde *DICER* gen rs1057035 polimorfizminin grup ile genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki vardır ( $p<0,05$ ). Buna göre; sadece hastaların CT genotip oranı (%35,2) kontrollerin CT oranından (%14,8) daha yüksektir ve bu iki oran arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

*DROSHA* ve *DGCR8* genlerine ait, rs493760 ve rs1640299 polimorfizmlerinin allel frekansları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Kontrol ve hasta grubunda *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8*'e ait genotip dağılımları Hardy-Weinberg dengesinde değildir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Polimorfizmlerin Genotip Dağılımları

Gen	SNP Referans No	Majör>Minör Allel	Allel	Kontrol	Birey sayısı (n)*	Yüzde %	Hasta	Birey sayısı (n)*	Yüzde %	P Değeri (P<0,05)
<i>DICER</i>	1057035	C>T	CC/TT/CT	43/3/8	54	14,8	34/1/19	54	35,2	0,046**
<i>DROSHA</i>	493760	C>T	TT/CC/CT	35/5/14	54	25,9	29/2/20	51	39,2	0,257**
<i>DGCR8</i>	1640299	G>T	GG/TT/GT	14/14/27	55	49,1	17/9/27	53	50,9	0,532**

\* Birey sayıları (n), analizi yapılabilen genotip verilerine göre düzenlenmiştir.

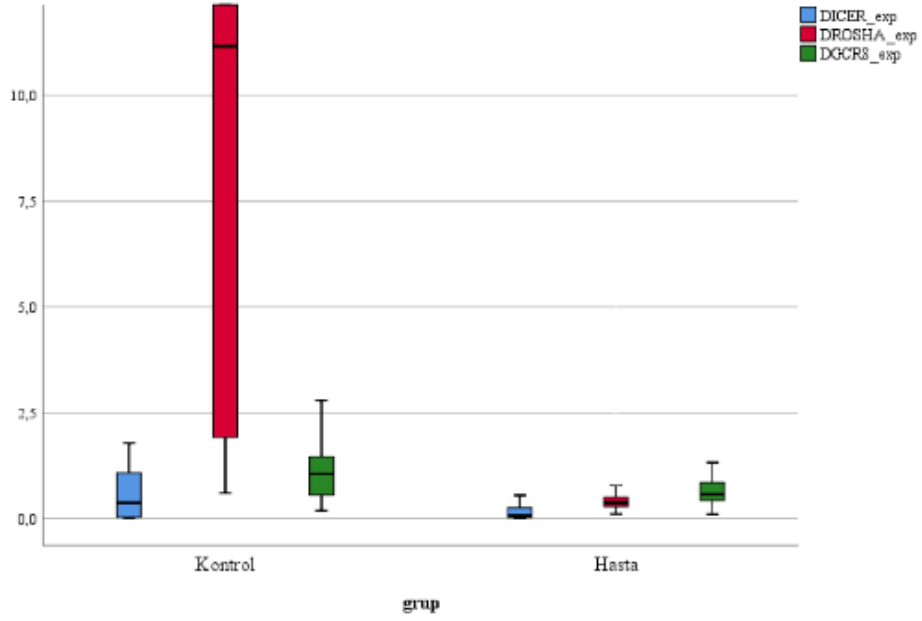
\*\* Kontrol ve hasta grubu Hardy-Weinberg dengesinde değildir.

### 4.3. Hasta ve Kontrol Gruplarında *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8* Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Analizi

Vitiligo hastalığına neden olabileceği düşünölen, miRNA oluşum yolağında rol alan 3 genin (*DICER*, *DROSHA*, *DGCR8*) ekspresyon düzeyleri kontrol ve hasta gruplarına göre değerlendirilerek p değerleri hesaplandı. Sonuç olarak hasta ve kontrol grupları arasında *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8* ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir ( $p < 0,05$ ). Hasta grubunda kontrole göre ekspresyon düzeylerine düşüktür.

Tablo 4.3. Kontrol ve Hasta Gruplarına Göre İlgili Genlerin Min-Max, Medyan, Q1-Q3 ve P Değerleri.

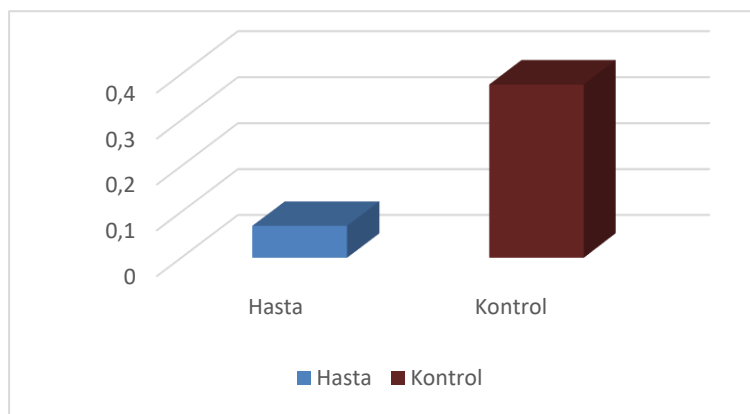
Gen	Grup	Min-Max	Medyan	Q1-Q3	P
<i>DICER</i>	Kontrol	,010615-301973005,000000	0,37742166	0,03727748-1,08926227	0,001
	Hasta	,006969-1,529223	0,06958070	0,02541410-0,25919962	
<i>DROSHA</i>	Kontrol	,603867-29,308566	11,16155682	1,75810650-20,56500713	0,0001
	Hasta	,109344-4,923351	0,38450205	0,28274804-0,52288711	
<i>DGCR8</i>	Kontrol	,186212-2,798187	1,05889607	0,55361186-1,47591862	0,003
	Hasta	,100314-3,151098	0,57621159	0,42408332-0,85728699	



Şekil 4.1 Gruplara Göre Ekspresyon Düzeylerinin Dağılım Grafiği

#### 4.3.1 *DICER* Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

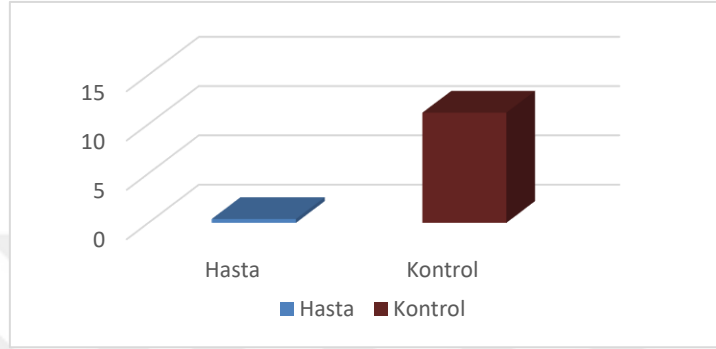
Hasta grubunda *DICER* gen ekspresyon düzeyi 0,06958070, kontrol grubunda ise 0,37742166 olduğu gözlemlendi. Ekspresyon düzeyleri dikkate alındığında hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla 0,5 kat azalış olduğu saptandı. Hasta ve kontrol grubunda *DICER*'a ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ( $p= 0,001$ ).



Şekil 4.2. Hasta ve kontrol grubunda *DICER* genine ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi

#### 4.3.2. *DROSHA* Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

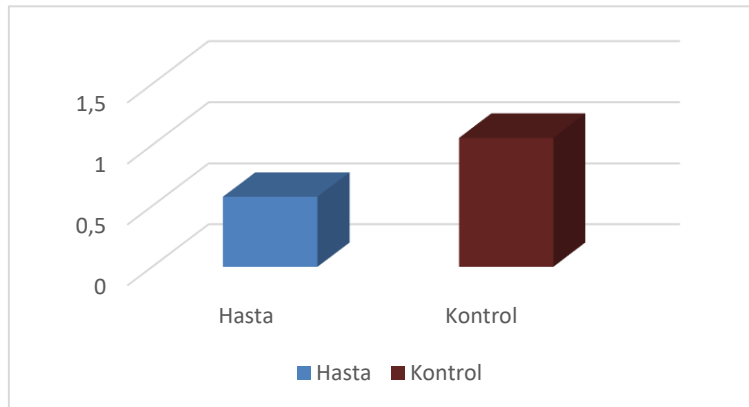
Hasta grubunda *DROSHA* gen ekspresyon düzeyi 0,38450205, kontrol grubunda ise 11,16155682 olduğu gözlemlendi. Ekspresyon düzeyleri dikkate alındığında hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla 29 kat azalış olduğu saptandı. Hasta ve kontrol grubunda *DROSHA*'ya ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ( $p=0,0001$ ).



Şekil 4.3. Hasta ve kontrol grubunda *DROSHA* genine ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi

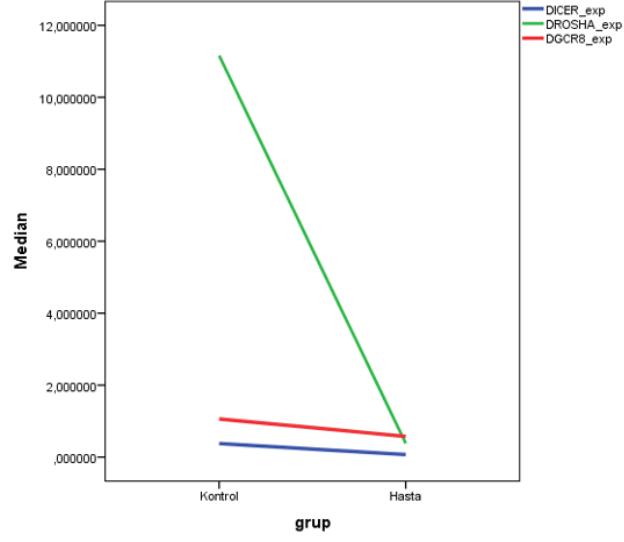
#### 4.3.3. *DGCR8* Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Hasta grubunda *DGCR8* gen ekspresyon düzeyi 0,57621159, kontrol grubunda ise 1,05889607 olduğu gözlemlendi. Ekspresyon düzeyleri dikkate alındığında hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla 1,8 kat azalış olduğu saptandı. Hasta ve kontrol grubunda *DGCR8*'e ait ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ( $p=0,003$ ).

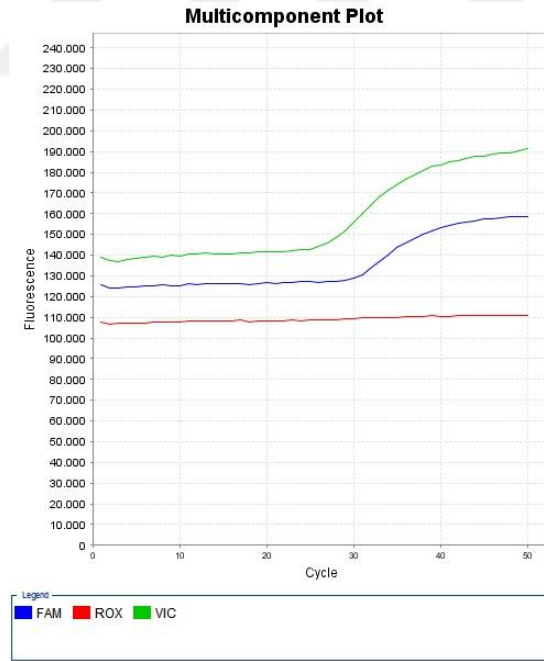


Şekil 4.4. Hasta ve kontrol grubunda *DGCR8* genine ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi

Gruplarası gen interaksyonu incelendiğinde *DROSHA* ile *DGCR8* geni arasında interaksyon gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil.4.5. Gruplarası Gen İnteraksiyon Grafiği



Şekil 4.6. Real Time PCR'da Endojen Kontrol Olarak Kullanılan  $\beta$  Aktin ve DICER Geninin Ekspresyon eğrisi.

#### 4.4. Genotip ve Ekspresyon Düzeylerinin Birbirleri ile İlişkisi

##### 4.4.1. rs1057035 Polimorfizmi ile *DICER* Ekspresyon Analizi

Hasta *DICER* rs1057035 CC, TT ve CT genotipleri ile ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p=0,672$ ). Kontrol grubunda *DICER* rs1057035 CC, TT ve CT genotipleri ile ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p=0,584$ ).

Tablo 4.4. Polimorfizm Grupları İle *DICER* Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

Grup	<i>DICER</i> rs1057035	Birey Sayısı	Medyan	Q1	Q3	Min	Max	P
Kontrol	CC	43	0,35689755	0,03791041	1,00714743	0,010615	301973005,00	0,672
	TT	3	1,16967571	0,02951221	-	0,029512	1,707702	
	CT	8	0,49445008	0,01527113	1,23496855	0,013614	1,378773	
Hasta	CC	34	0,07030374	0,02706334	0,26847873	0,006969	1,371209	0,584
	TT	1	0,02323075	0,02323075	0,02323075	0,023231	0,023231	
	CT	19	0,04394417	0,02403929	0,32547890	0,008739	1,529223	

##### 4.4.2. rs493760 Polimorfizmi ile *DROSHA* Ekspresyon Analizi

Hasta grubunda *DROSHA* rs493760 CC, TT ve CT genotipleri ile ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p=0,448$ ). Kontrol grubunda *DROSHA* rs493760 CC, TT ve CT genotipleri ile ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p=0,511$ ).

Tablo 4.5. Polimorfizm Grupları İle *DROSHA* Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

Grup	<i>DROSHA</i> rs493760	Birey Sayısı	Medyan	Q1	Q3	Min	Max	P
Kontrol	TT	43	10,83161119	2,25302494	19,41019744	,603867	27,988784	0,511
	CT	3	8,85193744	1,24983642	26,00910994	,946275	27,328892	
	CC	8	14,79095869	1,57654944	26,17408275	,661667	29,308566	
Hasta	TT	34	0,38450205	,30737893	,47291482	,109344	4,923351	0,448
	CT	1	0,28544603	,23404528	-	,234045	,336847	
	CC	19	0,33249511	,22788328	,48201478	,143257	3,631552	

#### 4.4.3. rs1640299 Polimorfizmi ile *DGCR8* Ekspresyon Analizi

Hasta grubunda *DGCR8* rs1640299 GG, TT ve GT genotipleri ile ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p=0,816$ ). Kontrol grubunda *DGCR8* rs493760 CC, TT ve CT genotipleri ile ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p=0,051$ ).

Tablo 4.6. Polimorfizm Grupları İle *DGCR8* Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

Grup	<i>DGCR8</i> rs1640299	Birey Sayısı	Medyan	Q1	Q3	Min	Max	P
Kontrol	GG	14	1,08196778	,55348712	1,68921724	,368614	2,313500	0,816
	TT	41	0,84629640	,52210918	1,45536146	,203998	2,341284	
	GT	27	1,07060325	,54709339	1,48842525	,186212	2,798187	
Hasta	GG	17	0,65760589	,54357756	,98706475	,441510	2,773826	0,051
	TT	9	0,49619672	,41718246	,73724270	,320262	,880409	
	GT	27	0,47157926	,33078557	,76860821	,100314	3,151098	

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Vitiligo genetik yatkınlık, metabolik anormallikler, değişen immün yanıt ve çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıkan kompleks bir hastalıktır. Vitiligonun moleküler genetik oluşum mekanizmasını araştıran çalışmalar ailesel ve genom çapında ilişkilendirme çalışmalarıdır. Yapılan bu çalışmalarda vitiligo ilişkili genler, aday gen, lokuslar ve sinyal yolları tanımlanmıştır (33,46).

Vitiligonun klinik olarak kolay bir tanısı vardır ancak farklı alt tiplerine sahip olması nedeniyle hastalık kişiden kişiye farklılık gösterir. Araştırmamızda hasta grubumuzu vitiligo tanısı almış bireyler oluşturmaktadır ve hasta bireylerin tedavi için kullandığı ilaçlar ve hastalığın ilerleyen seyri hakkındaki bilgiler elimizde olmadığı için tedavilere verdikleri tepkiler ile polimorfizm ve ekspresyon seviyesi arasında bir analiz yapılamamıştır. Yapılacak istatistiksel analizler sonucunda vitiligonun bu polimorfizmler ve gen ekspresyonu arasındaki ilişki bulunabilir. Çalışmamızda, miRNA biyogenez yolağında görevli ve önemli rolleri olan *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8* genleri seçildi. Seçilen genlerin ekspresyon düzeyleri ve polimorfizmleri arasındaki ilişki incelenerek vitiligo hastalığı üzerinde etkili olup olmadığı araştırıldı.

Tek nükleotid polimorfizmi (SNP), insan genlerindeki en yaygın gen varyasyonudur ve gen ekspresyonunu, transkripsiyonunu ve modifikasyonunu etkileyebilir. Çalışmalar SNP'lerin, hastalığın fenotipini veya gelişimini etkileyebilecek birçok insan hastalığı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Mevcut çalışmaların çoğu, miRNA'ların genetik varyasyonları ile kansere yatkınlık arasındaki ilişkiye odaklanmıştır. miRNA biyogenezinde, pri-miRNA, pre-miRNA ya da olgun miRNA'da meydana gelen SNP'ler, miRNA'ların ifadelerini ve fonksiyonunu etkilemektedir. Pri-miRNA veya pre-miRNA da bulunan belirli SNP'ler olgun miRNA'ların ifade seviyelerini değiştirebilmekte, miRNA öncüllerinde değişime neden olabilmekte ve dolayısıyla etkinlik veya seçicilikte hedefi değiştirebilmektedir (93,34).

MiRNA olgunlaşma mekanizmasının genlerindeki SNP'ler hakkındaki veriler azdır. SNP'ler, vitiligo hastalığında immün yanıtta belirleyici rol olarak düşünülmelidir. SNP'ler, miRNA ekspresyonu ve mekanizmasını regüle edebilir. Jing Wen ve arkadaşları (2018) yaptığı bir çalışmada *DROSHA* ve *DGCR8* polimorfizmlerinin kanser riski ile korele olduğunu belirtmiştir. Yapılan çalışma sonucunda *DROSHA* rs10719, rs6877842 ve *DGCR8* rs417309 SNP'lerinin karsinogenezde çok önemli roller oynayabileceği ve kanser için potansiyel biyobelirteçler olabileceğini belirtmişlerdir (95).

Çalışmamızda *DICER* geni için grup ile genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gözlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Sonuçlarımızda; hastaların CT genotip oranı (%35,2) kontrollerin CT oranından (%14,8) daha yüksek bulunmuştur. *DICER* geninde meydana gelen bu dönüşüm 3' UTR

bölgesinde yer almaktadır. *DICER* geninde meydana gelen C/T dönüşümü ilgili proteinlerin ve moleküllerin bağlanması engellemesi dolayısı ile genin işlevsizliğine yol açarak vitiligo hastalığının patogeneze katkıda bulunabileceği düşüncesindeyiz. C/T genotipine sahip bireylerin vitiligoya yakalanma riski yüksek olabilir.

*DROSHA* geni rs493760 polimorfizmi hasta ve kontrol grup içi karşılaştırmalarında genotip ve allel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır (Kontrol  $p=0,511$ ; Hasta  $p=0,448$ ). Yine *DGCR8* geni rs493760 polimorfizmi hasta ve kontrol grup içi karşılaştırmalarında genotip ve allel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır (Kontrol  $p=0,816$ ; Hasta  $p=0,051$ ). Sonuç olarak hasta grubunda *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8* genlerindeki polimorfizmlerin vitiligo patogeneze etkisi düşük bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda araştırdığımız polimorfizmlerin ekspresyonlar ile ilişkisine de bakılmıştır. İncelediğimiz polimorfizmlerin hasta bireylerde ekspresyonları etkilemediğini gözlemledik. Çalışmamızda her gen için sadece bir tek polimorfizm bakabilmiş olmamız, başka polimorfizmlerin etkili olup olamayacağı konusunda araştırılması gerekliliğini düşündürmektedir. Bu nedenle vitiligo patogenezinde miRNA oluşum yolağında görevli genlerin diğer polimorfizmlerine de bakılması önem taşımaktadır.

miRNA' lar son yıllarda gen ifadesi kontrolünde anahtar rol oynadığı düşünülen kodlanmayan RNA'lardır. Biyogenez süreçleri oldukça komplekstir. miRNA biyogenezinde rol oynayan genler çeşitli genetik hastalıklarla ilişkilidir. Bu genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimler genetik kökenli hastalıkların başlangıcı ve ilerlemesi ile ilgili etkileri açıklayabilmektedir. Ayrıca vitiligo ile ilgili bugüne kadar yapılan çalışmalarda miRNA'ların rolleri tam anlamıyla anlaşılabilmiş değildir. Deri hastalıklarının moleküler patogenezindeki bazı yeni sonuçlar, miRNA'ların hücre hasarında ve hücreler arası iletişimde de yer aldığı fikrini desteklemektedir. Artan sayıda çalışma, vitiligo oluşumunun ve ilerlemesinin birden çok faktörden kaynaklandığını, poligenik olduğunu ve miRNA'ların vitiligoya duyarlılığında hayati bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (8,91).

Literatürde cilt hastalıkları ve miRNA arasındaki ilişkiyi gösteren birçok çalışma mevcuttur. Örneğin, bir cilt hastalığı olan sedef hastalığında düzensiz miRNA'ların olduğu ve bunların deride biyolojik işlevlere sahip mRNA hedeflerinin olduğu gösterilmiştir. Dermatoloji alanındaki miRNA araştırması nispeten yeni olmasına rağmen, miRNA'ların sedef hastalığının patogenezindeki rolü için mevcut kanıtlar hızla artmaktadır. Son yapılan çalışmalarla, sedef hastalığı olan hastaların cildinde iltihaplı proteinlerin gen ekspresyonunu kontrol etmede miRNA'ların anahtar rolünü tanımlamıştır. Rostami Mogaddam ve arkadaşları (2017); sedef hastalığında miRNA ekspresyon profilinin öneminden yola çıkarak sedef hastalarında *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8* ekspresyon düzeyinin etkisini değerlendirmeyi amaçlayan bir çalışma

planlamışlardır. Psöriazisli bireylerden psoriatik deri (PP), psoriatikten etkilenmemiş deri (PN) ve sağlıklı deriden (NN) biyopsiler alarak, 25 hasta ve 25 sağlıklı gönüllüde gerçek zamanlı kantitatif gerçek zamanlı PCR ile *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8* ekspresyon düzeyini araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8* ekspresyon düzeylerinin, NN dokuları ile karşılaştırıldığında PP dokularında ve PN dokularında daha yüksek olduğu, ayrıca PP dokularındaki *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8* ekspresyon düzeylerinin PN dokularından daha yüksek olduğunu gözlemişlerdir. Bu sonuçları ile; miRNA biyogenezinde anahtar rolleri olan *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8*'in yüksek ekspresyon düzeylerinin sedef hastalığının patogenezinde rol oynayabileceğini düşünmüşlerdir (97). Biz çalışmamızda *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8* geninde hasta (n=55) ve kontrol grupları (n=56) arasında gen ekspresyonları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu bulduk (p<0,05). *DICER* gen ekspresyon düzeyinin hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla 0,5 kat azaldığı, *DROSHA* geninin ekspresyon düzeyinin hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla 29 kat azaldığı ve *DGCR8* geninde ise hasta grubunun kontrol grubuna kıyasla 1,8 kat azaldığını saptadık. Vitiligo etiyopatogenezinde miRNA oluşum yolağında görevli bu üç genin ifade düzeyini, kontrol grubuna göre kıyasladığımızda, azalmış gözlemlememizin önemli bir veri olabileceği düşüncesindeyiz.

Ayrıca çalışmamızda *DROSHA* ve *DGCR8* interaksiyonu da gözlenmiştir. MikroRNA'ların biyogenezindeki ilk adım, birincil mikroRNA'ların (pri-miRNA'lar) RNA bağlayıcı protein *DGCR8* ve tip III RNase *DROSHA*'dan oluşan mikroişlemci kompleksi tarafından işlenmesidir. İlk olarak kök ve pri-miRNA saç tokasının tek sarmallı RNA'sı arasındaki bağlantının *DGCR8* tarafından tanınması ve ardından RNA dupleksini pre-miRNA ürünü vermeye üzere bölen *DROSHA*' ile gerçekleşir. *DGCR8*, *DROSHA* ile etkileşime giren ve "Mikroişlemci" adı verilen fonksiyonel bir kompleks oluşturan kofaktördür. Bir mikroişlemcinin bir *DROSHA* kopyası ve iki *DGCR8* kopyası içerdiği bilinmektedir. Her iki protein de RNase III alanları (RIIID'ler) ve dsRNA bağlanma alanları (dsRBD'ler) dahil olmak üzere tipik olarak RNA'yı bağlayan alanlar içerir. *DROSHA*'nın dsRBD'si substrat bağlanması için yetersiz olduğundan, *DROSHA*'nın RNA tanıma işlevini temsil eden bir ortak proteine ihtiyacı vardır. Ayrıca *DGCR8*'in protein-protein etkileşimi yoluyla *DROSHA* proteinini stabilize ettiği bilinmektedir. *DROSHA* ve *DGCR8* arasındaki bu etkileşimin, miRNA biyogenezinin homeostatik kontrolüne katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (98,99,100).

Bu bulgularımız ile ekspresyon düzeylerini araştırdığımız genlerin diğer cilt hastalıkları ve kompleks genetik hastalıklardaki rolleri dikkate alındığında, ekspresyon seviyelerindeki değişimlerinin vitiligo oluşumunu tetiklediği düşüncesindeyiz. Bu ekspresyonundaki azalmanın nedeni tam olarak bilinmemektedir. Fakat bu azalmaya neden olarak mRNA degradasyonu, miRNA disregülasyonu veya miRNA molekülünde rol alan diğer yardımcı genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin neden olabileceği düşünülmektedir. Sonuçlarımız sedef

hastalığındaki sonuçlar ile ekspresyon düzeyleri bakımından farklılık göstermiştir. Bunun nedeni olarak hastalıkların altında yatan moleküler mekanizmalar, deneysel metod ve yöntemler, örneklem büyüklüğü ve özelliklerinin farklı olmasından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

MiRNA düzensizliğinin diyabetik cilt değişikliklerinde bir rol oynayıp oynamadığını daha fazla araştırmak için yapılan çalışmada, geniş bir miRNome analizi gerçekleştirilmiş olup, tip 1 diyabetli bir fare modelinde diyabetik ve diyabetik olmayan derideki miRNA temel ekspresyon seviyelerini karşılaştırılmıştır. MiRNA profili, streptozotosin ile indüklenen diyabetik farelerin, tip 1 diyabet modelinin ve diyabetik olmayan farelerin derisinden ekstrakte edilen RNA üzerinde miRNome analizi ile gerçekleştirilmiştir. 400'den fazla farklı miRNA türü tanımlanmış ve bunlardan 30'unun önemli ölçüde modüle edilmiş ve şaşırtıcı bir şekilde bu 30 miRNA'dan, 27'sinin down regüle edildiği gözlenmiştir. Bu miRNA'lar arasında bazıları, cilt homeostazının düzenlenmesinde ve Wnt, TGF-, HIF-1 $\alpha$  ve VEGF-A sinyali gibi diyabetik cilt komplikasyonlarının teşvik edilmesinde önemli rollere sahip yollarda yer alan hedef genleri kanıtlamıştır. Bulgular, miRNA'ların bir alt kümesini analiz ederek, diyabetik fare grubundan ve diyabetik olmayan kontrollerden alınan deri örneklerinde gerçek zamanlı RT-PCR ile doğrulanmıştır. Diyabetik deride miRNA'nın yaygın bir şekilde azaldığını bulduktan sonra, miRNA biyogenez sürecinde rol oynayan *DICER*, *DROSHA*, *DCGR8*, *XPO5* ve *AGO2* genlerin ekspresyonu analiz edilmiştir. Çalışma sonunda diyabetik deri örneklerinde miRNA biyogenezinden sorumlu bu genlerin ekspresyon seviyelerinde önemli bir düşüş gözlenmiştir. Bu sonuçlar, azalmış miRNA seviyelerinin, pri-miRNA transkripsiyonunu da etkileyen daha genel bir transkripsiyonel bozukluktan kaynaklandığını göstermektedir. MiRNA'ların, diyabetik ciltte farklı şekilde eksprese edilmesi pri-miRNA'ların ve miRNA biyogenezinden sorumlu genlerin ekspresyonunu da etkileyen daha geniş bir transkripsiyonel defektlerin olduğunu ve muhtemelen bunların da diyabetik cilt patogenezinde katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Ayrıca araştırmacılar, gen ekspresyonunu düzenleyen moleküler mekanizmayı hedeflemenin, diyabetik deri komplikasyonları için terapötik bir seçenek olabileceğini düşünmüşlerdir. Bu çalışma yaptığımız çalışma ile ekspresyon düzeyleri bakımından benzerlik göstermekte ve çalışmamızı destekler niteliktedir. Ayrıca deri homeostazında potansiyel rolü olan miRNA'ların ve miRNA biyogenezinde rol oynayan genlerin daha fazla araştırılması gerektiğini vurgulamaktadır (101).

Deri hastalıkları üzerinde yapılan başka bir miRNA çalışması ise, dünya popülasyonunun %4'üne varan bir prevalansı ile hastaların yaşam kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip kronik inflamatuvar bir cilt bozukluğu olan Hidradenitis süpürativadır(HS). HS için tipik bölgeler, kasık, aksilla ve ağırlı derin yerleşimli, iltihaplı lezyonların ortaya çıktığı perianal ve gluteal bölgeleridir. Bununla birlikte, HS'ye yol açan inflamatuvar patogeneze ve doğuştan gelen bağışıklığın rolü tam

olarak anlaşılammıştır. Son çalışmalar, miRNA deregülasyonunun otoimmün hastalıklar, sedef hastalığı ve ülseratif kolit gibi enflamatuar hastalıkların patogeneze ve kronik inflamasyona katkıda bulunabileceğini ortaya çıkarmıştır. Şimdiye kadar HS'de miRNA'ların ifadesi veya işlevi hakkında veriler yoktur. Bu nedenle yapılan bir çalışmada HS'nin enflamatuar mikro ortamında miRNA anahtar düzenleyicileri *DICER*, *DROSHA*, *DGRC8* ve *EXPORTİN-5*'in ekspresyon düzeyleri normal cilt ve psoriatik cilt ile değerlendirilmiştir. Çalışma için örnekleri lezyonel 18 HS derisinden, sağlıklı görünen 7 HS deriden, lezyonel psoriatik 10 deriden ve sağlıklı 10 deneklerden almışlar. Çalışmaya 11 kadın ve 7 erkek olmak üzere toplam 18 HS hastası dahil edilmiştir. Hastaların %50'si koltuk altı, % 33.3 kasık bölgesinde ve % 16.7'si genital bölgede HS ye sahip olduklarını ifade etmiş. Veriler kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR ile değerlendirilmiş. Sonuç olarak HS hastalarının lezyonel derisindeki *DROSHA* ekspresyon seviyeleri sağlıklı kontrollere ve sağlıklı görünen perilezyonel cilde göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuş. Sağlıklı görünen perilezyonel cilt, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde daha düşük *DROSHA* ekspresyon seviyeleri sergilediği gözlenmiş. *DROSHA* ekspresyonuna benzer şekilde, HS hastalarının lezyonel derisindeki *DICER* ekspresyonu, sağlıklı kontrollere ve sağlıklı görünen perilezyonel cilde kıyasla önemli ölçüde daha düşük bulunmuş. HS hastalarının sağlıklı görünen perilezyonel derisi ve psoriatik deri arasında *DICER* ifadesinde anlamlı bir farklılık göstermemiş. HS hastalarının lezyonel derisindeki *DGRC8* ekspresyon seviyeleri, sağlıklı kontrollere kıyasla önemli ölçüde daha düşük bulunmuş. Sağlıklı görünen perilezyonel ciltte, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde daha düşük *DGRC8* ekspresyon seviyeleri gözlemlenmiş. *DROSHA* ekspresyon seviyeleri ile tutarlı olarak, *DGRC8* ekspresyonu, sağlıklı kontrollere kıyasla psoriatik deride anlamlı olarak daha düşük bulunmuş. Psoriatik cilt, lezyonel HS cilt ve sağlıklı görünen perilezyonel HS cilt ile karşılaştırıldığında *DGRC8* ekspresyonunda fark gözlemlenmemiş. Bu veriler, miRNA olgunlaşma mekanizmasının birincil faktörlerinin, yani *DICER*, *DROSHA*, *DGRC8* ve *Exportin-5*'in, HS lezyonlarında sağlıklı cilde kıyasla önemli ölçüde düzensiz olduğunu göstermiştir. Çalışılan bu miRNA'lar HS'nin enflamatuar patogenezinde yer alır. Bulgular ayrıca *DROSHA* ve onun ko-faktör *DGRC8* ekspresyonunun HS hastalarının sağlıklı görünen perilezyonel derisinde erken inflamatuvar süreçlerde değiştiğini ve bu faktörlerin inflamasyonun kısır döngüsünü başlatmada rol oynayabileceğini düşündürmektedir. *DICER* ve *Exportin-5*, HS'de gözle görülür cilt değişiklikleri ile inflamatuvar sürecin sonraki aşamalarına katkıda bulunabilir. Bu veriler umut vericidir fakat, miRNA olgunlaşma sürecini araştırmak ve HS'nin patogenezinde miRNA'ların rolünü daha fazla ele almak için daha fazla çalışma gereklidir. Sonuç olarak bu veriler miRNA'ların terapötik ajanlar, terapötik ilaçlar için hedefler ve inflamasyon ve terapötik yanıtlar için biyobelirteçler olarak potansiyelini desteklemektedir. HS'de olduğu gibi çalışmamızda da *DICER*, *DROSHA* ve *DGRC8* genlerinin ekspresyon düzeyleri düşük çıkmıştır. Bu

veriler çalışmamızdaki sonuçlar ile benzerlik göstermektedir ve çalışmamızın literatür ile uyumlu olduğunu göstermektedir (102).

Yapılan son çalışmalarda miRNA'lar deri hastalıklarının moleküler mekanizmasının altında yatan nedenlerden biri olarak gösterilmektedir. Araştırmacılar, miRNA'nın vitiligo hastalığında önemli roller oynayabileceğini bildirmişlerdir. Bildiğimiz kadarıyla, vitiligo hastalığı olan hastalarda miRNA yolağında görev alan *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8* genlerinin ekspresyonları ile ilgili hiçbir çalışma yapılmamıştır ve bu açıdan çalışmamızın literatürdeki bu boşluğu dolduracağını düşünmekteyiz. Çalışmamızda genlerin ekspresyon düzeylerine ek olarak ilk defa vitiligo hastalığında tek nükleotit polimorfizmi de bakılmıştır. Çalışmamız vitiligo ve miRNA biyogenezi arasında muhtemel bir ilişki olduğunu göstermiştir ve son yıllarda yapılan başka çalışmalarla da benzerlik göstermektedir. Vitiligo hastalığının moleküler mekanizmasının aydınlatılabilmesi için miRNA biyogenezinin ve değişen miRNA fonksiyonlarının daha fazla araştırılmasına ihtiyaç olduğu görüşündeyiz.

Bu veriler doğrultusunda yaptığımız çıkarımlar şu şekildedir.

- Yaptığımız bu tez çalışmasına hasta grubunda 55, kontrol grubunda ise 56 birey olmak üzere toplam 111 birey dahil edilmiştir. Kontrol grubunu oluşturan toplam 56 bireyin 29'u erkek (%51,8), 27'si kadın (%49,2) olup; hasta grubunu ise toplam 55 bireyin 27'sini erkek (%49,1) 28'ini kadın (%50,9) bireyler oluşturmaktadır. Yaş bakımından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi ( $p>0,05$ ).
- Hasta ve kontrol gruplarının genotip dağılımları incelendiğinde *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8* polimorfizmlerinin genotip dağılımları arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı. Kontrol ve hasta grubunda *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8*'e ait genotip dağılımları Hardy-Weinberg dengesinde olmadığı gözlemlendi. SNP analizlerinde daha verimli sonuçlar elde edebilmek için daha geniş örneklem aralığı ve diğer SNPler ile çalışmanın önemli olacağı düşünülmektedir.
- *DICER*, *DROSHA* ve *DGCR8* genlerinin kontrol ve hasta grupları arasında ekspresyon düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ( $p<0,05$ ). Bu genlerin ekspresyon düzeylerinin hasta bireylerde kontrollere göre azalmış olduğu gözlemlendi. MiRNA biyogenezinde anahtar gen olarak rol oynayan bu genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin miRNA veya pre-miRNA oluşumunu engelleyerek vitiligo hastalığının oluşumuna aracılık edebileceğini düşündürmektedir.
- Çalışmamızda hasta ve kontrol bireylerinin periferik kan örneklerinden yaptığımız ilgili genlerin analizi, vitiligo hasta ve kontrol bireylerinden alınacak doku örneklerinde de yapılabilir. MiRNA biyogenezinde görev alan bu genlerin ekspresyon düzeyleri, vitiligolu

hastaların hem lezyonlu hemde lezyonsuz cilt biyopsilerinde ve kontrol bireylerinden alınacak biyopsi örnekleri ile kıyaslanarak miRNA'ların vitiligo hastalığının patogeneziindeki rolü araştırılabilir. Vitiligo ile miRNA'ların ifade düzeyleri arasındaki ilişkinin aydınlatılması hastalığın tanı, tedavisi ve literatüre katkısı açısından büyük öneme sahiptir.

- Transgenik fare modeli üzerinde yapılacak kan ve doku örneği bazı farklı çalışmalarla, miRNA oluşum yolağında yer alan genlerin ve bu genlerin etki mekanizmalarından anlamlı sonuçlar elde edilebilirse hastalığın tanı ve tedavisi için büyük önem arz edebilir.
- Vitiligo gerek klinik tanı gerek hastalığın ilerleyiŐi açısından kendi içinde birden fazla farklı alt tiplere ayrılır. Vitiligonun tüm alt tipleri ayrı ayrı çalışılarak, farklı miRNA ve genlerin ekspresyon düzeylerine ait çalışmalar yapılarak literatüre daha zengin katkı yapacağı düşünmekteyiz. Ayrıca vitiligo, çok faktörlü kalıtımının gösterir. Dolayısıyla hastalığın etiolojisinde tek bir genin etkisi ile değil, birden fazla gen, mekanizma ve farklı genetik yolaklar yer alır. Araştırılacak SNP'lerin bütün genomu kapsayacak şekilde belirlenmesi ile daha anlamlı sonuçlar elde edilebileceğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

- [1]. Tarlé, R. G., Nascimento, L. M. D., Mira, M. T., & Castro, C. C. S. D. (2014). Vitiligo-part 1. *Anais brasileiros de dermatologia*, 89(3), 461-470.
- [2]. Grimes, P. E. (2017). Vitiligo: pathogenesis, clinical features, and diagnosis. *UpToDate*. *Accedido Marzo, 19, 2019*
- [3]. Al-Shobaili, H. A. (2011). Update on the genetics characterization of vitiligo. *International journal of health sciences*, 5(2), 167.
- [4]. Whitton, M. E., Pinart, M., Batchelor, J., Leonardi-Bee, J., Gonzalez, U., Jiyad, Z., ... & Ezzedine, K. (2015). Interventions for vitiligo. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2).
- [5]. Patel, S., Rauf, A., Khan, H., Meher, B. R., & ul Hassan, S. S. (2017). A holistic review on the autoimmune disease vitiligo with emphasis on the causal factors. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92, 501-508.
- [6]. Picardo, M., & Taïeb, A. (2019). Correction to: Vitiligo. In *Vitiligo* (pp. C1-C11). Springer, Cham.
- [7]. Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(8), 509-524.
- [8]. Ruksha, T. G., Komina, A. V., & Palkina, N. V. (2017). MicroRNA in skin diseases. *European Journal of Dermatology*, 27(4), 343-352.
- [9]. Sand, M. (2014). The pathway of miRNA maturation. *miRNA Maturation*, 3-10.
- [10]. Faria, A. R., Tarlé, R. G., Dellatorre, G., Mira, M. T., & Castro, C. C. S. D. (2014). Vitiligo-Part 2-classification, histopathology and treatment. *Anais brasileiros de dermatologia*, 89(5), 784-790.
- [11]. Abdel-Malek, Z. A., Jordan, C., Ho, T., Upadhyay, P. R., Fleischer, A., & Hamzavi, I. (2020). The enigma and challenges of vitiligo pathophysiology and treatment. *Pigment cell & melanoma research*, 33(6), 778-787.
- [12]. Ezzedine, K., Sheth, V., Rodrigues, M., Eleftheriadou, V., Harris, J. E., Hamzavi, I. H., & Pandya, A. G. (2015). Vitiligo is not a cosmetic disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73(5), 883-885.
- [13]. Cupertino, F., Niemeyer-Corbellini, J. P., & Ramos-e-Silva, M. (2017). Psychosomatic aspects of vitiligo. *Clinics in dermatology*, 35(3), 292-297.
- [14]. Allam, M., & Riad, H. (2014). Concise review of recent studies in vitiligo. *Qatar medical journal*, 2013(2), 10.

- [15]. Rashighi, M., & Harris, J. E. (2017). Vitiligo pathogenesis and emerging treatments. *Dermatologic clinics*, 35(2), 257-265.
- [16]. Bishnoi, A. ve Parsad, D. (2018). Vitiligo tedavilerinin klinik ve moleküler yönleri. *Uluslararası moleküler bilimler dergisi*, 19 (5), 1509.
- [17]. Sandoval-Cruz, M., García-Carrasco, M., Sánchez-Porras, R., Mendoza-Pinto, C., Jiménez-Hernández, M., Munguía-Realpozo, P., & Ruiz-Argüelles, A. (2011). Immunopathogenesis of vitiligo. *Autoimmunity reviews*, 10(12), 762-765.
- [18]. Alikhan, A., Felsten, L. M., Daly, M., & Petronic-Rosic, V. (2011). Vitiligo: a comprehensive overview: part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 65(3), 473-491.
- [19]. Topal, I. O., Duman, H., Goncu, O. E. K., Durmuscan, M., Gungor, S., & Ulkumen, P. K. (2016). Knowledge, beliefs, and perceptions of Turkish vitiligo patients regarding their condition. *Anais brasileiros de dermatologia*, 91(6), 770-775.
- [20]. AlGhamdi, K. M., Moussa, N. A., Mandil, A., AlKofidi, M., Madani, A., AlDaham, N., & AlKamel, A. A. (2012). Public perceptions and attitudes toward vitiligo. *Journal of cutaneous medicine and surgery*, 16(5), 334-340.
- [21]. Frisoli, M. L., Essien, K., & Harris, J. E. (2020). Vitiligo: mechanisms of pathogenesis and treatment. *Annual review of immunology*, 38, 621-648.
- [22]. Nordlund, J. J. (2017). The Medical Treatment of Vitiligo: An Historical Review. *Dermatologic clinics*, 35(2), 107-116.
- [23]. Patel, P., Sanghvi, S., & Patel, P. (2018). The Vedic View of Vitiligo. *JAMA dermatology*, 154(4), 434-434.
- [24]. Lotti, T., & D'Erme, A. M. (2014). Vitiligo as a systemic disease. *Clinics in dermatology*, 32(3), 430-434.
- [25]. Spritz, R. A., & Andersen, G. H. (2017). Genetics of vitiligo. *Dermatologic clinics*, 35(2), 245-255.
- [26]. Silverberg, N. B. (2015). The epidemiology of vitiligo. *Current dermatology reports*, 4(1), 36-43.
- [27]. Ezzedine, Khaled; Eleftheriadou, Viktoria; Whitton, Maxine; van Geel, Nanja (2015). *Vitiligo. The Lancet*, 386(9988), 74-84.

- [28]. Colucci, R., Dragoni, F., & Moretti, S. (2015). Oxidative stress and immune system in vitiligo and thyroid diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015.
- [29]. Spritz, R. A. (2012). Six decades of vitiligo genetics: genome-wide studies provide insights into autoimmune pathogenesis. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(2), 268-273.
- [30]. Bleuel, R. Therapeutisches Management bei Vitiligo Therapeutic management of vitiligo.
- [31]. Hercogová, J., Schwartz, R. A., & Lotti, T. M. (2012). Classification of vitiligo: a challenging endeavor. *Dermatologic therapy*, 25, S10-S16.
- [32]. Passeron, T., & Ortonne, J. P. (2005). Physiopathology and genetics of vitiligo. *Journal of autoimmunity*, 25, 63-68.
- [33]. Sarkar, R., Sethi, S., & Madan, A. (2017). Pathogenesis of Vitiligo. In *Melasma and Vitiligo in Brown Skin* (pp. 191-196). Springer, New Delhi.
- [34]. Manga, P., Elbuluk, N., & Orlow, S. J. (2016). Recent advances in understanding vitiligo [version 1; referees: 3.
- [35]. [kayakalpskincare.blogspot.com/2016/11/ayurvedic-treatments-for-segmental.html?m=1](http://kayakalpskincare.blogspot.com/2016/11/ayurvedic-treatments-for-segmental.html?m=1) (Erişim Tarihi: 07.04.2021)
- [36]. Molho-Pessach, V., & Schaffer, J. V. (2011). Blaschko lines and other patterns of cutaneous mosaicism. *Clinics in dermatology*, 29(2), 205-225.
- [37]. Mazereeuw-Hautier, J., Bezio, S., Mahe, E., Bodemer, C., Eschard, C., Viseux, V., ... & Groupe de Recherche Clinique en Dermatologie Pédiatrique (GRCDP. (2010). Segmental and nonsegmental childhood vitiligo has distinct clinical characteristics: a prospective observational study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 62(6), 945-949.
- [38]. <https://somepomed.org/articulos/contents/mobipreview.htm?38/61/39890> (Erişim Tarihi: 08.04.2021)
- [39]. <http://kayakalpskincare.blogspot.com/2016/11/ayurvedic-treatments-for-segmental.html?m=1> (Erişim Tarihi: 09.04.2021)
- [40]. Molho-Pessach, V., & Schaffer, J. V. (2011). Blaschko lines and other patterns of cutaneous mosaicism. *Clinics in dermatology*, 29(2), 205-225.
- [41]. Mazereeuw-Hautier, J., Bezio, S., Mahe, E., Bodemer, C., Eschard, C., Viseux, V., ... & Groupe de Recherche Clinique en Dermatologie Pédiatrique (GRCDP. (2010). Segmental and nonsegmental childhood vitiligo has distinct clinical characteristics: a prospective observational study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 62(6), 945-949.

- [42]. Spritz, R. A. (2010). The genetics of generalized vitiligo: autoimmune pathways and an inverse relationship with malignant melanoma. *Genome medicine*, 2(10), 1-5.
- [43]. Majid, I., & Imran, S. (2017). Depigmentation with Q-switched Nd: YAG laser in universal vitiligo: a long-term follow-up study of 4 years. *Lasers in medical science*, 32(4), 851-855.
- [44]. Jerjen, R., Moodley, A., & Sinclair, R. (2020). Repigmentation of acrofacial vitiligo with subcutaneous tildrakizumab. *Australasian Journal of Dermatology*, 61(4), e446-e448.
- [45]. Boniface, K., Seneschal, J., Picardo, M., & Taïeb, A. (2018). Vitiligo: focus on clinical aspects, immunopathogenesis, and therapy. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 54(1), 52-67.
- [46]. Roberts, G. H., Santorico, S. A., & Spritz, R. A. (2020). The genetic architecture of vitiligo. *Pigment cell & melanoma research*, 33(1), 8-15.
- [47]. Dwivedi, M., Kemp, E. H., Laddha, N. C., Mansuri, M. S., Weetman, A. P., & Begum, R. (2015). Regulatory T cells in vitiligo: implications for pathogenesis and therapeutics. *Autoimmunity reviews*, 14(1), 49-56.
- [48]. Mohammed, G. F., Gomaa, A. H., & Al-Dhubaibi, M. S. (2015). Highlights in pathogenesis of vitiligo. *World Journal of Clinical Cases: WJCC*, 3(3), 221.
- [49]. Singhvi, G., Manchanda, P., Rapalli, V. K., Dubey, S. K., Gupta, G., & Dua, K. (2018). MicroRNAs as biological regulators in skin disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, 996-1004.
- [50]. Eckhart, L., & Zeeuwen, P. L. (2018). The skin barrier: Epidermis vs environment. *Experimental dermatology*, 27(8), 805-806.
- [51]. Arda, O., Göksügür, N., & Tüzün, Y. (2014). Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in dermatology*, 32(1), 3-13.
- [52]. Gupta, A., Avci, P., Dai, T., Huang, Y. Y., & Hamblin, M. R. (2013). Ultraviolet radiation in wound care: sterilization and stimulation. *Advances in wound care*, 2(8), 422-437.
- [53]. D'Mello, S. A., Finlay, G. J., Baguley, B. C., & Askarian-Amiri, M. E. (2016). Signaling pathways in melanogenesis. *International journal of molecular sciences*, 17(7), 1144.
- [54]. Lin, J. Y., & Fisher, D. E. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 445(7130), 843-850.
- [55]. D'Alba, L., & Shawkey, M. D. (2019). Melanosomes: biogenesis, properties, and evolution of an ancient organelle. *Physiological reviews*, 99(1), 1-19.
- [56]. Shain, A. H., & Bastian, B. C. (2016). From melanocytes to melanomas. *nature reviews Cancer*, 16(6), 345.

- [57]. Tadokoro, R., Shikaya, Y., & Takahashi, Y. (2019). Wide coverage of the body surface by melanocyte-mediated skin pigmentation. *Developmental biology*, 449(2), 83-89.
- [58]. Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M. T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., & Saboury, A. A. (2019). A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 279-309.
- [59]. Rzepka, Z., Buszman, E., Beberok, A., & Wrześniok, D. (2016). From tyrosine to melanin: Signaling pathways and factors regulating melanogenesis. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*, 70, 695-708.
- [60]. Yamaguchi, Y., & Hearing, V. J. (2014). Melanocytes and their diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(5), a017046.
- [61]. Serre, C., Busuttill, V., & Botto, J. M. (2018). Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation. *International journal of cosmetic science*, 40(4), 328-347.
- [62]. Hearing, V. J. (2011). Determination of melanin synthetic pathways. *J Invest Dermatol*, 131(E1), E8-E11.
- [63]. Smit, N., Vicanova, J., & Pavel, S. (2009). The hunt for natural skin whitening agents. *International journal of molecular sciences*, 10(12), 5326-5349.
- [64]. Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., & Tymińska, A. (2013). Skin melanocytes: biology and development. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii I Alergologii*, 30(1), 30.
- [65]. Videira, I. F. D. S., Moura, D. F. L., & Magina, S. (2013). Mechanisms regulating melanogenesis. *Anais brasileiros de dermatologia*, 88(1), 76-83.
- [66]. Wasmeier, C., Hume, A. N., Bolasco, G., & Seabra, M. C. (2008). Melanosomes at a glance. *Journal of cell science*, 121(24), 3995-3999.
- [67]. Raposo, G., & Marks, M. S. (2007). Melanosomes—dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(10), 786-797.
- [68]. Rzepka, Z., Buszman, E., Beberok, A., & Wrześniok, D. (2016). From tyrosine to melanin: Signaling pathways and factors regulating melanogenesis. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*, 70, 695-708.
- [69]. Lambert, M. W., Maddukuri, S., Karanfilian, K. M., Elias, M. L., & Lambert, W. C. (2019). The physiology of melanin deposition in health and disease. *Clinics in dermatology*, 37(5), 402-417.
- [70]. Costin, G. E., & Hearing, V. J. (2007). Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *The FASEB journal*, 21(4), 976-994.

- [71]. Lai, X., Wichers, H. J., Soler-Lopez, M., & Dijkstra, B. W. (2018). Structure and Function of Human Tyrosinase and Tyrosinase-Related Proteins. *Chemistry–A European Journal*, 24(1), 47-55.
- [72]. Ali, S. A., & Naaz, I. (2018). Biochemical aspects of mammalian melanocytes and the emerging role of melanocyte stem cells in dermatological therapies. *International journal of health sciences*, 12(1), 69.
- [73]. Niu, C., & Aisa, H. A. (2017). Upregulation of melanogenesis and tyrosinase activity: potential agents for vitiligo. *Molecules*, 22(8), 1303.
- [74]. Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), 597-610.
- [75]. Catalanotto, C., Cogoni, C., & Zardo, G. (2016). MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1712.
- [76]. Connerty, P., Ahadi, A., & Hutvagner, G. (2016). RNA binding proteins in the miRNA pathway. *International journal of molecular sciences*, 17(1), 31.
- [77]. Olejniczak, M., Kotowska-Zimmer, A., & Krzyzosiak, W. (2018). Stress-induced changes in miRNA biogenesis and functioning. *Cellular and molecular life sciences*, 75(2), 177-191.
- [78]. Bhaskaran, M., & Mohan, M. (2014). MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Veterinary pathology*, 51(4), 759-774.
- [79]. Liu, B., Li, J., & Cairns, M. J. (2014). Identifying miRNAs, targets and functions. *Briefings in bioinformatics*, 15(1), 1-19.
- [80]. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402.
- [81]. Matsuyama, H., & Suzuki, H. I. (2020). Systems and synthetic microRNA biology: from biogenesis to disease pathogenesis. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 132.
- [82]. Lu, T. X., & Rothenberg, M. E. (2018). MicroRNA. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(4), 1202-1207.
- [83]. Correia de Sousa, M., Gjorgjieva, M., Dolicka, D., Sobolewski, C., & Foti, M. (2019). Deciphering miRNAs' action through miRNA editing. *International journal of molecular sciences*, 20(24), 6249.
- [84]. Simonson, B., & Das, S. (2015). MicroRNA therapeutics: the next magic bullet?. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 15(6), 467-474.
- [85]. Treiber, T., Treiber, N., & Meister, G. (2019). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(1), 5-20.

- [86]. Stavast, C. J., & Erkeland, S. J. (2019). The non-canonical aspects of MicroRNAs: many roads to gene regulation. *Cells*, 8(11), 1465.
- [87]. Abdelfattah, A. M., Park, C., & Choi, M. Y. (2014). Update on non-canonical microRNAs. *Biomolecular concepts*, 5(4), 275-287.
- [88]. O'carroll, D., & Schaefer, A. (2013). General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 39-54.
- [89]. Lawrence, P., & Ceccoli, J. (2017). Advances in the application and impact of microRNAs as therapies for skin disease. *BioDrugs*, 31(5), 423-438.
- [90]. J Cheng, C., Mark Saltzman, W., & J Slack, F. (2013). Canonical and non-canonical barriers facing anti-miR cancer therapeutics. *Current medicinal chemistry*, 20(29), 3582-3593.
- [91]. Yan, S., Shi, J., Sun, D., & Lyu, L. (2020). Current insight into the roles of microRNA in vitiligo. *Molecular biology reports*, 47(4), 3211-3219.
- [92]. Ruksha, T. G., Komina, A. V., & Palkina, N. V. (2017). MicroRNA in skin diseases. *European Journal of Dermatology*, 27(4), 343-352.
- [93]. Boni V, Zarate R, Villa JC, Bandre's E, Gomez MA, Maiello E, Garcia-Foncillas J, Aranda Z. Role of primary miRNA polymorphic variants in metastatic colon cancer patients treated with 5-fluorouracil and irinotecan. *The Pharmacogenomics Journal*, 2011; 11: 429–436.
- [94]. Bandiera S, Hatem E, Lyonnet S, Henrion-Caude A. microRNAs in diseases: From candidate to modifier genes. *Clin Genet*, 2010; 77: 306–313.
- [95]. Wen, J., Lv, Z., Ding, H., Fang, X., & Sun, M. (2018). Association of miRNA biosynthesis genes DROSHA and DGCR8 polymorphisms with cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *Bioscience reports*, 38(3).
- [96]. Duvetorp, A., Olsen, R. S., Skarstedt, M., Söderman, J., & Seifert, O. (2017). Psoriasis and pro-angiogenic factor CD93: Gene expression and association with gene polymorphism suggests a role in disease pathogenesis. *Acta dermato-venereologica*, 97(8-9), 916-921.
- [97]. Hessam, S., Sand, M., Skrygan, M., Gambichler, T., & Bechara, F. G. (2016). Inflammation induced changes in the expression levels of components of the microRNA maturation machinery Drosha, Dicer, Drosha co-factor DGCR8 and Exportin-5 in inflammatory lesions of hidradenitis suppurativa patients. *Journal of dermatological science*, 82(3), 166-174.
- [98]. Rostami Mogaddam, M., Safavi Ardabili, N., Shafaei, Y., Maleki, N., Jafari, N., & Jafari, A. (2017). Overexpression of Drosha, DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR 8), and Dicer mRNA s in the pathogenesis of psoriasis. *Journal of cosmetic dermatology*, 16(4), e48-e53.

- [99]. Alarcón, C. R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N., & Tavazoie, S. F. (2015). N 6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*, 519(7544), 482-485.
- [100]. Han, J., Pedersen, J. S., Kwon, S. C., Belair, C. D., Kim, Y. K., Yeom, K. H., ... & Kim, V. N. (2009). Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell*, 136(1), 75-84.
- [101]. Partin, A. C., Zhang, K., Jeong, B. C., Herrell, E., Li, S., Chiu, W., & Nam, Y. (2020). Cryo-EM structures of human Drosha and DGCR8 in complex with primary microRNA. *Molecular cell*, 78(3), 411-422.
- [102]. Baldini, E., Testa, E., Voellenkle, C., De Domenico, E., Cianfarani, F., Martelli, F., ... & Odorisio, T. (2020). Dysregulation of microRNA expression in diabetic skin. *Journal of dermatological science*, 98(3), 186-194.



Ek 1: Kurum izni.



T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTUSU.  
ENSTİTÜ YÖNETİM KURULU KARARLARI



Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
25.07.2019	18	2019/344

Karar 344- Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanlığından gelen 24.07.2019 tarihli 1111658 sayılı, yüksek lisans tez önerisi konulu yazılar ve ekleri üzerine görüşüldü.

Doç.Dr. Ozlem IZCI AYDIN danışmanlığında hazırlanan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Soner AŞIR'ın "Vitiligo Hastalarında DROSHA DİCER ve DGCR8 Gen Polimorfizmlerinin ve Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması" konulu tez önerisinin "Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin 30/1. maddesi uyarınca kabul edilmesine, durumun gereği thin danışmanına, Anabilim Dalı Başkanlığına, adı gelen öğrenciye bildirilmesine oybirliği ile karar verildi.

(imza)  
Prof.Dr. Balıar TAŞDELEN  
(Balkan)

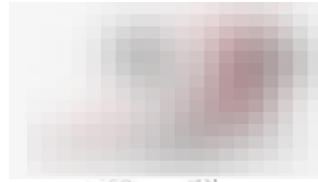
(imza)  
Doç.Dr. Seda TEZCAN ULÇERER  
(Uye)

(imza)  
Doç.Dr. Gulay ALTUN UĞRAŞ  
(Uye)

(iznli)  
Prof.Dr. Seyhan BAHAN FIRAT  
(Uye)

(imza)  
Prof.Dr. Oztekin ALGUL  
(Uye)

(imza)  
Doç.Dr. Meral GB  
(Uye)



Ek 2: Etik kurul izin belgesi.

**KLINİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
04/09/2019	16	380

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Özlem İZCİ AY'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan "Viteligo Hastalarında DROSHA, DICER ve DGCR8 Gen Polimorfizmlerinin ve Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması" adlı araştırma için hazırlanmış olan ve 03/09/2019 tarihinde sunulan Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar İçin Başvuru Formu ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın yürürlükte olan yasal düzenlemelere uyularak yürütülmesi ve sonuçlandırılması koşulu ile gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

İmza Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN Başkan	İmza Prof. Dr. Selma ÜNAL Başkan Yardımcısı	İmza Prof. Dr. F. Özlem KANDEMİR Üye
İmza Prof. Dr. Olgu HALLIOĞLU KILINÇ Üye	İmza Prof. Dr. Murat BOZLU Üye	İmza Prof. Dr. M. Sami SERİN Üye
İmza Prof. Dr. Bahar TAŞDELEN Üye	(Katılmadı) Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE Üye	İmza Prof. Dr. İsmail ÜN Üye
İmza Dr. Öğr. Üyesi M. Türkan IŞIK Üye	İmza Dr. Öğr. Üyesi Nalan TİFTİK Üye	İmza Dr. Öğr. Üyesi Mustafa AZİZOĞLU Üye

## ÖZGEÇMİŐ

**Adı ve Soyadı :**

**Doğum Tarihi :**

**E-mail :**

### Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Kilis 7 Aralık Üniversitesi	2014-2018
Yüksek Lisans	Tıbbi Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2018-2021

