

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**PSÖRİAZİS'Lİ HASTALARDA
VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖR
POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Tuba BOZDUMAN

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.**

ANKARA

2014

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**PSÖRİAZİS'Lİ HASTALARDA
VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖR
POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Tuba BOZDUMAN
UZMANLIK TEZİ**

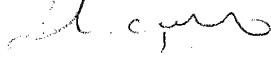
**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. İncilay LAY**

**ANKARA
2014**

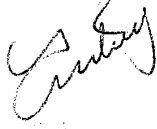
ONAY SAYFASI

Dr. Tuba Bozduman'ın 13 Ocak 2014 tarihinde Jürimiz önünde savunmasını yaptığı "Psöriazisli Hastalarda Vasküler Endotelial Büyüme Faktör (VEGF) Polimorfizminin Araştırılması" başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

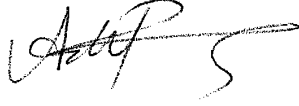
Prof. Dr. N. Leyla Açıan



Doç. Dr. İncilay Lay



Doç. Dr. Aslı Pınar

**ONAY**

Bu tez, Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliği ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı tarafından kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Bülent Sivri
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimim süresince bana her konuda destek olan, tezimin tamamlanmasında bilgi ve deneyimleriyle katkıda bulunan tez danışmanım Doç. Dr. İncilay Lay'a,

Uzmanlık eğitimime katkılarından dolayı Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. N. Leyla Açıan'a ve Anabilim Dalımızın tüm öğretim üyelerine,

Tez çalışması için örneklerin toplanmasındaki yardımları nedeniyle Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Sibel Ersoy Evans ve Arş. Gör. Dr. Yıldız Kantarcı'ya

Sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde değerli katkılarından dolayı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Arş. Gör. Dr. Sevilay Karahan'a

Eğitim hayatım boyunca beni her konuda destekleyen değerli aileme, asistanlığım boyunca yanımda olan ve manevi desteğini hep yanımda hissettiğim sevgili eşim Ömer Bozduman'a ve biricik kızım Zeynep Bozduman'a teşekkür ederim.

Dr. Tuba BOZDUMAN

ÖZET

BOZDUMAN T. , Psöriazis'li hastalarda vasküler endotelyal büyüme faktör polimorfizminin araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı uzmanlık tezi. Ankara, 2014. Psöriazis kronik, hiperproliferatif bir deri hastalığıdır. Lezyonlu deride inflamatuvar hücreler artmakta ve mikrovasküler değişiklikler meydana gelmektedir. Çalışmalarda psöriazisli hastalarda vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) düzeyleri yüksekliği gösterilmiştir. VEGF geninin polimorfik olduğu bilinmektedir ve psöriazisle VEGF polimorfizmi ilişkisini gösteren sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışmada Türk populasyonunda psöriazise duyarlılığın, VEGF (+405C/G), VEGF (-460T/C), VEGF (-1540C/A), VEGF (-1451C/T) ve VEGF (-1512Ins18) gen polimorfizmleri ile ilişkisinin açığa çıkarılması ve bu genetik varyasyonların VEGF, VEGFR-1 (*fms like* tirozin kinaz-1; flt-1) ve VEGFR-2 (kinaz *domain region* KDR; flk-1), protein düzeyine etkilerinin analiz edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla yaş ve cinsiyet uyumlu 100 psöriazisli hasta ve 100 sağlıklı kontrol grubundan tam kan ve serum örnekleri toplandı. Tam kan örneklerinden DNA izolasyonu sonrası, belirlenen bölgeler polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. PCR ürünleri VEGF polimorfizmlerine özgü restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak kesildi. Kesim ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve bireyler bant sayılarına göre normal, homozigot, heterozigot olarak tanımlandı. Psöriazis risk değerlendirmeleri SPSS v21.0 ve haplotip analizleri *Haplotype Analysis* v1.04 programları kullanılarak yapıldı. ELİSA yöntemiyle serum VEGF, VEGFR1, VEGFR2 düzeyleri analiz edildi ve bunların haplotipler ile ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirildi. VEGF (+405 C/G) gen bölgesinde homozigotluk (GG) ve heterozigotluğun (GC) psöriazis riskini sırasıyla yaklaşık 9 ve 7 kat artırdığı saptandı (Tahmini riskler, ORs=9.40 ve 7.02; $p<0.001$). Hastalarda G allel ve kontrollerde C allel sıklığının yüksek olduğu görüldü ($p<0,001$). Aile hikayesi olan hastalarda homozigot genotipi yüksek bulundu ($p<0.05$). VEGF (-460 T/C) heterozigotluğun (TC), psöriazis riskini azalttığı gözlemlendi (OR=0,48; $p=0,05$). VEGF (-1540 C/A) heterozigotluğun (CA), psöriazis riskini yaklaşık 2.5 kat artırdığı tespit edildi (OR=2.5; $p<0.001$). Hastalarda A allel ve kontrollerde C allel sıklığı yüksek izlendi ($p<0,002$). VEGF (-1512Ins18) polimorfizminin psöriazis riskini 4 kat artırdığı görüldü (OR=4.01; $p<0.001$).

Hastalarda en sık VEGF (+405 GG) + (-1512Ins18) haplotipi gözlemlendi. ($p < 0.001$). Kontrollerde tüm VEGF polimorfizmlerinin normal genotipte olduğu VEGF (+405 CC) + (-460 TT) + (-1540 CC) + (-1512 N/N) haplotipi, hastalara göre yüksek bulundu ($p < 0.001$). Hastalarda diğer sık gözlenen haplotipler VEGF (+405 CG) + (-1512Ins18); VEGF (+405 GG) + (-1540 CA) ve VEGF (+405 CG) + (-1540 C/A) olarak tespit edildi ($p = 0.002$). VEGF (+405 CG) + (-1540 CA) + (-1512Ins18) haplotipi de hastalarda yüksek bulundu ($p = 0.013$). Hardy-Weinberg dengesinin VEGF (+405 C/G) polimorfizminde hasta ($p = 0,002$) ve kontrol gruplarında ($p < 0,001$); VEGF (-1512 Ins18) için hasta grubunda ($p < 0,001$) anlamlı ölçüde bozulduğu gözlemlendi. Çalışmamızda hastalık tipi (Tip I-Tip II), hastalık derecesi (PASI) ve tedaviye yanıt ile haplotipler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Sonuç olarak, çalışmamız VEGF gen polimorfizmlerinin Türk populasyonunda psöriasis için risk faktörleri olarak değerlendirilebileceğini gösterdi. Genetik riskin net olarak gösterilebilmesi için daha geniş katılımlı çalışmalar gerekmektedir. Destekleyen kuruluş: HÜBAB 013D06101001

Anahtar kelimeler: Psöriasis, vasküler endotelial büyüme faktörü, VEGF Polimorfizmleri

ABSTRACT

Bozduman T. , The investigation of vascular endothelial growth factor polymorphism in patients with psoriasis. Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry Thesis, Ankara, 2014. Psoriasis is a chronic, hyperproliferative skin disease. Microvascular changes occur and inflammatory cells are increased in the lesional skin. In studies, high levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) have been shown in patients with psoriasis. VEGF gene is known as a polymorphic gene and limited studies exist showing the relationship between VEGF polymorphisms with psoriasis. This study aimed to reveal the relationship between VEGF (+405 C/G), VEGF (-460T/C), VEGF (-1540C/A), VEGF (-1451C/T) and VEGF (-1512Ins18) polymorphisms with psoriasis susceptibility in Turkish population, and analyze the effects of these genetic variations to VEGF, VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase-1, flt-1) and VEGFR-2 (kinase domain region KDR, flk-1) protein levels. For this purpose, whole blood and serum samples were collected from age and sex matched 100 patients with psoriasis and 100 healthy controls. After DNA isolation from whole blood samples, the selected regions were amplified by using polymerase chain reaction (PCR). PCR products were cut with restriction endonuclease enzymes that are specific for VEGF polymorphisms. Cutting products were carried on agarose gel electrophoresis and individuals were identified as normal, homozygote, heterozygote according to the number of bands. Psoriasis risk assessment was performed using SPSS v21.0 and haplotype analyzes were performed using Haplotype Analysis v1.04 programs. Serum VEGF, VEGFR1, VEGFR2 levels were analyzed with ELISA and their association with haplotypes were statistically evaluated. Being homozygous (GG) and heterozygous (CG) for VEGF (+405 C/G) increased the risk in developing psoriasis by approximately 9 and 7 fold, respectively (ORs=9.40 and 7.02 respectively; $p<0.001$ for both). High frequency of G allele in patients and high frequency of C allele in controls were observed ($p<0,001$). Homozygosity is found increased in the patients with family history ($p<0.05$). Heterozygote (TC) patients for VEGF (-460 T/C) showed a decreased risk for psoriasis (OR=0,48; $p<0,05$). Two and a half fold increased risk of psoriasis was observed in heterozygote (CA) genotype of VEGF (-1540 C/A) (OR=2.5; $p<0.001$). High frequency of A allele in

patients and high frequency of C allele in controls were observed ($p < 0.002$). VEGF (-1512Ins18) polymorphism increased the risk of disease by 4 fold (OR=4.01; $p < 0.001$). The most common haplotype was found as VEGF (+405 GG) + (-1512Ins18) in patients ($p < 0.001$). The presence of haplotype VEGF (405 CC) + (-460 TT) + (-1540 CC) + (-1512 without ins18) was found higher in controls compared to patients ($p < 0.001$). The other common haplotypes in patients were VEGF (+405 CG) + (-1512Ins18); VEGF (+405 GG) + (-1540 CA); VEGF (+405 CG) + (-1540 CA), respectively ($p = 0.002$ for all). The haplotype of VEGF (+405 CG) + (-1540 CA) + (-1512Ins18) was also observed high in patients ($p = 0.013$). Hardy-Weinberg equilibrium was found significantly not provided in the patient ($p = 0.002$) and control ($p < 0.001$) groups for VEGF (+405 C/D); in patient group ($p < 0.001$) for VEGF (-1512 Ins18) polymorphisms. No significant relationships were detected between haplotypes with the types of disease (Type I - Type II), the severity of disease (PASI) and treatment response in our study. In conclusion, our study showed that VEGF gene polymorphisms can be considered as risk factors for psoriasis in Turkish population. More extensive studies with large sample size are needed to show a clear genetic risk. Supported by: HÜBAB 013D06101001

Keywords: Psoriasis, vascular endothelial growth factor, VEGF Polymorphisms

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Psöriazis	3
2.1.1. Tanım	3
2.1.2. Epidemiyoloji	3
2.1.3. Etiyoloji	3
2.1.4. İmmunopatogenez	6
2.1.5. Klinik	9
2.1.6. Histopatoloji	12
2.1.7. Psöriazis Alan ve Şiddet İndeksi (PASI)	12
2.2. VEGF ve Genetik Özellikleri	13
2.3. VEGF Polimorfizmleri	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Gereçler	19
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Bileşikler	19
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	19
3.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	20
3.2.1. Hasta Grubunun Oluşturulması	20
3.2.2. Kontrol Grubunun Oluşturulması	20
3.3. Klinik Değerlendirme	21
3.4. Kan Örneklerinin Alınması ve Serumların Ayrılması	21
3.5. Yöntemler	21

3.5.1.	Tam kandan DNA izolasyonu	21
3.5.2.	DNA saflığı ve miktar tayini	22
3.5.3	Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	22
3.5.4.	Restriksiyon enzim analizleri	26
3.5.5.	Agaroz jel elektroforezi	28
3.5.6.	NuSieve agaroz jel elektroforezi	29
3.5.7.	VEGF Ölçümü	29
3.5.8.	VEGFR-1 Ölçümü	29
3.5.9.	VEGFR-2 Ölçümü	30
3.5.10.	İstatistiksel Yöntem	30
4.	BULGULAR	31
4.1.	Hasta ve kontrol grubunun özellikleri	31
4.2.	VEGF Polimorfizm Sonuçları	32
4.2.1.	VEGF (+405 C/G) Polimorfizmi	32
4.2.2.	VEGF (-460 T/C) Polimorfizmi	33
4.2.3.	VEGF (-1540 C/A) Polimorfizmi	35
4.2.4.	VEGF (-1512Ins18) polimorfizmi	36
4.3.	VEGF genotip dağılımı	36
4.4.	VEGF haplotipleri ve Hardy -Weinberg dengesi	38
4.5.	Psöriazis Kliniği ve VEGF Genotipleri ilişkisi	39
4.6.	VEGF haplotipleri ve serum VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2 düzeyleri ilişkisi	41
5.	TARTIŞMA	45
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	53
	KAYNAKLAR	55

SİMGELER ve KISALTMALAR

ASH	: Antijen Sunan Hücreler
AMP	: Antimikrobiyal Peptitler
CDSN	: Korneodesmozin
DİP	: Distal İnterfalangeal
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
ELISA	: Enzim Bağlı İmmunassay
flt-1	: <i>Fms Like</i> Tirozin Kinaz-1
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
GM-CSF	: Granülosit-Makrofaj Koloni-Uyarıcı Faktör
HCR	: <i>Alpha-Helix Coiled-Coil Rod Homolog</i>
IFN- γ	: İnterferon- γ
IGF- 1	: İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü 1
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
IL-17	: İnterlökin-17
IL-20	: İnterlökin-20
IL-22	: İnterlökin-22
IL-23	: İnterlökin-23
IRES-B	: <i>İnternal Ribosome Entry Site B</i>
KDR	: <i>Kinaz Domain Region</i>
KGF	: Keratinosit Büyüme Faktörü
MHC	: Majör Histokompatibility Kompleks
MZF1	: <i>Myeloid Zinc Finger Protein</i>
NSAID	: Non-Steroid Antiinflatuar İlaç
NK-T	: Doğuştan Katil T Hücreleri
Np-1	: Nörofilin-1
Np-2	: Nörofilin-2
PASI	: Psöriazis Alan Şiddet İndeksi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PLGF	: Plasental Büyüme Faktörü
PSORS	: <i>Psoriasis Susceptibility</i>
RTK	: Reseptör tirozin kinazlar
STAT 1	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i>
TCM	: Santral Bellek Hücresi
TE	: Efektör T Hücresi
TEM	: Efektör Bellek T Hücresi
Tc1	: Sitotoksik T Hücresi
TGF- α	: Tranforme Edici Büyüme Faktörü
Th 1	: Yardımcı T hücresi 1
Th 17	: Yardımcı T Hücresi 17
TLR	: Toll Benzeri Reseptörler
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktör - α
TLR	: Toll Benzeri Reseptörler
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR-1	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptör 1
VEGFR-2	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptör 2
VPF	: Vasküler Permeabilite Faktörü

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 2.1. VEGF protein yapısı	14
Şekil 2.2. VEGFA geni ve VEGFA izoformları	15
Şekil 2.3. VEGF çeşitleri ve VEGF reseptörleri ile etkileşimleri	17
Şekil 3.1. <i>BsmFI</i> restriksiyon enziminin kesim bölgesi	26
Şekil 3.2. <i>BstUI</i> restriksiyon enziminin kesim bölgesi	27
Şekil 3.3. <i>BgIII</i> restriksiyon enziminin kesim bölgesi	28
Şekil 4.1. VEGF (+405 C/G) polimorfizmi için farklı sıcaklıklarda yapılan <i>gradient</i> PCR görüntüsü.	32
Şekil 4.2. VEGF (+405 C/G) polimorfizmi PCR görüntüsü.	32
Şekil 4.3. VEGF (+405 C/G) polimorfizmi <i>BsmfI</i> restriksiyon enzim analizi.	33
Şekil 4.4. VEGF (-460 T/C) polimorfizmi için farklı Mg konsantrasyonlarında yapılan PCR görüntüsü.	33
Şekil 4.5. VEGF (-460 T/C) polimorfizmi PCR görüntüsü.	34
Şekil 4.6. VEGF (-460 T/C) polimorfizmi <i>BstUI</i> restriksiyon enzim analizi.	34
Şekil 4.7. VEGF (-1540 C/A) polimorfizmi PCR görüntüsü.	35
Şekil 4.8. VEGF (-1540 C/A) polimorfizmi <i>BgIII</i> restriksiyon enzim analizi.	35
Şekil 4.9. VEGF (-1512Ins18) polimorfizmi analizi.	36

TABLOLAR

Sayfa No:

Tablo 2.1.	Psöriazisle ilişkili duyarlılık gen lokusları ve kromozom yerleşimleri	4
Tablo 2.2.	Psöriazisi tetikleyen veya şiddetlendiren ilaçlar	6
Tablo2.3.	PASI skorunun hesaplanması	13
Tablo 3.1.	Polimorfizm çalışmaları için dizayn edilen primerler ve ilgili gen ürünleri	23
Tablo 3.2.	VEGF (+405 C/G) polimorfizmi için PCR tepkime ortamı	23
Tablo 3.3.	PCR yöntemi için sıcaklık döngüleri	24
Tablo 3.4.	VEGF (-460 T/C) polimorfizmi için PCR tepkime ortamı	24
Tablo 3.5.	PCR yöntemi için sıcaklık döngüleri	25
Tablo 3.6.	VEGF (-1540 C/A) ve VEGF (-1512Ins18) polimorfizmleri için PCR tepkime ortamı	25
Tablo 3.7.	PCR yöntemi için sıcaklık döngüleri	25
Tablo 3.8.	<i>BsmFI</i> restriksiyon enzimi için hazırlanan tepkime ortamı	26
Tablo 3.9.	<i>BstUI</i> restriksiyon enzimi için hazırlanan reaksiyon ortamı	27
Tablo 3.10.	<i>BgIII</i> restriksiyon enzimi için hazırlanan tepkime ortamı	28
Tablo 4.1.	Hasta ve kontrol grubunda yaş ve cinsiyet dağılımı	31
Tablo 4.2.	Hasta grubunun özellikleri	31
Tablo 4.3.	Hasta ve kontrol gruplarında VEGF polimorfizmleri dağılımı	37
Tablo 4.4.	En sık gözlenen haplotipler	38
Tablo 4.5.	Hasta ve kontrol gruplarının Hardy-Weinberg Dengesi	39
Tablo 4.6.	Hastalık tipinin VEGF genotip dağılımları ile ilişkisi	39
Tablo 4.7.	Hastalık şiddetinin (PASI'ye göre) VEGF genotip dağılımları ile ilişkisi	40
Tablo 4.8.	Tedavi yanıtın VEGF genotip dağılımları ile ilişkisi	40
Tablo 4.9.	Aile öyküsünün VEGF genotip dağılımları ile ilişkisi	41
Tablo 4.10.	VEGF değerlerinin (pg/ml) haplotip ve çalışma gruplarında karşılaştırılması	42
Tablo 4.11.	VEGFR1 değerlerinin (pg/ml) haplotip ve çalışma gruplarında karşılaştırılması	43

Tablo 4.12. VEGFR2 değerlerinin (pg/ml) haplotip ve çalışma gruplarında karşılaştırılması	44
Tablo 4.13. Hasta ve kontrol gruplarının VEGF, VEGFR1, VEGFR2 düzeyleri	44

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Psöriazis etiyolojisi kesin olarak bilinmeyen, vücudun değişik yerlerini tutabilen kronik seyirli, tekrarlayıcı, inflamatuvar, hiperproliferatif bir deri hastalığıdır. Sıklığı etnik köken, yaş, coğrafik konum ve çevresel faktörlere göre değişmektedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda prevalans % 0.2 ile % 4.8 arasında bulunmuştur. Türkiye'deki prevalansı ise % 1.3'tür. Psöriazis saçlı deri, diz, dirsek, sakral bölge ve eklemlerin ekstensör yüzlerinde simetrik olarak yerleşen lezyonlarla seyretmektedir. Psöriazis lezyonları, eritemli skuamlı papül ya da plaklarla karakterizedir. Lezyonların morfolojisi veya yerleşim bölgelerine ve başlama yaşına göre psöriazisin farklı klinik tipleri mevcuttur. Lokalize eritemli, skuamlı plaklardan jeneralize şiddetli tutulumu kadar değişen klinikte seyredabilen, relaps ve iyileşme dönemleriyle hayat boyu devam edebilen bir hastalık olan psöriazis, yaşam kalitesini etkilemesi, ömür boyu tedavi gerektirmesi ve eşlik eden komorbiditeler nedeniyle günümüzde deriye sınırlı bir hastalıktan ziyade sistemik bir hastalık olarak tanımlanmaya başlanmıştır. Psöriazis'in kesin bir tedavisi yoktur. Tedavide birçok yöntem ve ajan kullanılmaktadır fakat kür zordur. Tedavideki başarısızlığın en büyük nedeni etyopatofizyolojinin tam olarak aydınlatılamamış olmasıdır. Psöriaziste deride inflamatuvar hücreler gözlenmekte ve inflamatuvar hücrelerin dokulara mikrosirkülasyonun aktif rolü ile taşındığı düşünülmektedir. Dermal vasküler yapılarda morfolojik ve fonksiyonel değişikliklerin erken patofizyolojik olay olduğu kabul edilmektedir. Bu değişiklikler endotel hücre proliferasyonu (anjioenez), dermiste yüzeysel perivasküler lenfositik hücre infiltrasyonu ve dermal papillalarda kapiller dilatasyondur. Dermal papillada ödem, kapiller konjesyon, geçirgenlik artışı, perikapiller mast hücre sayısında artış ve kapillerlerin kıvrımlı bir yapı (tortüöz kapillerler) göstermeleri diğer bulgulardır. Psöriatik deri lezyonlarında potent bir anjiogenik faktör olan Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) ekspresyonunun arttığı ve hastalığın şiddeti ile doğru orantılı olarak dolaşımdaki VEGF düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. VEGF geni, yüksek polimorfizme sahip bir gendir ve en az 25 çeşit polimorfizm içermektedir. VEGF polimorfizmlerinin psöriazis ile ilişkisini gösteren sınırlı sayıdaki çalışmalarda VEGF ekspresyonunun etkilendiği gösterilmiştir. Yapılan az sayıdaki çalışmalarda psöriazisle ilişkilendirilen VEGF gen polimorfizmleri VEGF (-2578

C/A), VEGF (-1540 C/A), VEGF (-1451C/T), VEGF (-1154G/A), VEGF (-1512Ins18), VEGF (-460T/C), VEGF (-160C/T), VEGF (-152G/A), VEGF -116G/A) ve VEGF (+405G/C) bölgeleridir.

Bu çalışmada, Türk populasyonunda, güçlü *linkage disequilibriumu* gösteren VEGF (-1540 C/A), VEGF (-1512Ins18), VEGF (-460T/C) ve VEGF (+405G/C) gen polimorfizmlerinin psöriazis duyarlılığına etkilerinin belirlenmesi ve farklı klinik tipleri (Tip I – Tip II) ile ilişkilerinin açığa çıkarılması amaçlandı. Hastalık şiddeti (Psöriazis Alan ve Şiddet İndeksi: PASI), aile öyküsü ve tedaviye yanıt ile VEGF genotip dağılımları arasında ilişki sorgulandı. VEGF polimorfizm genotipleri birlikteliğinin psöriazis risk faktörü olarak değerlendirilmesinde haplotiplerin belirlenmesi amaçlandı. Genetik varyasyonların serum VEGF, Vasküler Endotelial Büyüme Faktör Reseptör 1 (VEGFR-1) ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktör Reseptör 2 (VEGFR-2) protein düzeylerine etkilerinin analiz edilmesi planlandı. Psöriazis’li hastalarda VEGF polimorfizmleri dağılımının ve serum VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 düzeylerine etkilerinin gösterilmesi, hastalığın etyopatofizyolojisinin aydınlatılmasında, psöriaziste genetik risk faktörlerinin ve yeni tedavi yaklaşımlarının belirlenmesinde, Türk populasyonunda etnik duyarlılığın açığa çıkarılmasında önemlidir ve uluslararası bilimsel literatüre katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Psöriazis

2.1.1. Tanım

Psöriazis keskin sınırlı, eritemli, parlak sedefi beyaz skuamli papül ve plaklar ile seyreden kronik inflamatuvar bir deri hastalığıdır. Skuamli karakterinden dolayı halk arasında “sedef hastalığı” adıyla anılmaktadır.

2.1.2. Epidemiyoloji

Psöriazis sıklığı etnik, coğrafik ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişen kronik, sistemik tutulum gösteren bir deri hastalığıdır. Hastalık prevalansı epidemiyolojik çalışmalarda % 0,2 ile % 4,8 arasında değişmekte ve ortalama %2 olarak bildirilmektedir (1,2). Türkiye’deki insidansı % 1,3 olarak belirlenmiştir (3). Dermatoloji polikliniğine başvuran hastaların % 6.8’ini psöriazisli hastalar oluşturmaktadır (4). Psöriazis kadın ve erkekte eşit sıklıkla görülmektedir (5). Hastalık her yaşta görülebilmekle birlikte, %70 hastada ilk belirtiler 40 yaşından önce başlamaktadır (6). Psöriazis başlama yaşının 15-20 ve 55-60 yaşlarında iki kez pik yaptığı bilinmektedir (7). Hastalık başlama yaşına göre ikiye ayrılmaktadır. Başlama yaşı 40 yaşından önce olanlar Tip I psöriazis (erken başlangıçlı psöriazis), 40 yaşından sonra olanlar ise Tip II (geç başlangıçlı psöriazis) olarak adlandırılmaktadır. Tip I psöriazisde Human Lökosit Antijen (HLA) birlikteliği ve aile öyküsü daha sık oranda tespit edilmekte ve bu tip daha şiddetli seyretmektedir (8). Çocuk hastalar ise tüm psöriazis vakalarının 1/3’ünü oluşturmaktadır (9).

2.1.3. Etiyoloji

Psöriazis, etiyolojisi ve patogenezi tam olarak aydınlatılmamış multifaktöryel bir hastalıktır.

Genetik Faktörler

Psöriazis poligenik ve kompleks kalıtım gösteren bir hastalıktır. Hastaların birinci ve ikinci derece akrabalarında normal populasyona göre psöriazis görülme sıklığı artmıştır. Monozigotik ikizlerde dizigotik ikizlerden daha fazla görülmektedir (10). Erken başlangıçlı psöriazis olgularında sınıf I ve sınıf II HLA (HLA-B13, -B17, -B27, -B38, -B39, -B57, -Cw7, -DR4, -DR7) ile ilişki gösterilmiştir (11,12). Psöriazis görülme riski, anne ve babada psöriazis yoksa % 4, ebeveynlerden birinde varsa % 28, her ikisinde varsa % 65 olarak saptanmıştır (12,13).

Psöriazis gelişiminde etkili en önemli genetik lokusun kromozom 6p21'de yerleşmiş Majör Histokompatibilite Kompleksi (MHC) bölgesindeki PSORS 1 (*Psoriasis Susceptibility 1*) gen bölgesi olduğu kabul edilmektedir . PSORS 1 lokusunda HLA, CDSN (korneodesmozin), HCR (*alpha-helix coiled-coil rod homolog*) ve VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü) genleri bulunur (82'de 13). HLA-Cw6 alleli taşıyan kişilerde psöriazis gelişme riskinin yaklaşık 10 kat arttığı ve erken başlangıçla ilişkili olduğu gösterilmiştir (14-16).

Psöriazisli hastalarda yüksek oranda saptanan diğer HLA antijenleri HLA-A2, HLA-A30, HLA-B13, HLA-B17, HLA-B27, HLA-B39, HLA-Bw6, HLA-Bw17, HLA-Bw37, HLABw57, HLA-Cw7, HLA-DR2, HLA-DR4, HLA-DR7'dir (17,18).

Hastalığın patogenezinde tek bir gen lokusu sorumlu değildir. Farklı kromozomlarda yer alan 10 adet psöriazis duyarlılık gen lokusu (PSOR1-10) saptanmıştır (19). Psöriazisle ilişkili duyarlılık gen lokuslarının kromozom yerleşimleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Psöriazisle ilişkili duyarlılık gen lokusları ve kromozom yerleşimleri

Gen lokusu	Kromozom yerleşimleri
PSORS1	6p21.33
PSORS2	17q25
PSORS3	4q
PSORS4	1q21
PSORS5	3q21
PSORS6	19p13
PSORS7	1p
PSORS8	16q
PSORS9	4q31-34
PSORS10	18p11.23

Çevresel Faktörler

Genetik olarak yatkınlığı olan bireylerde çevresel faktörler hastalığın ortaya çıkmasını tetikleyebilir veya hastalığı alevlendirebilir.

Fiziksel Travma (Köbner Fenomeni)

Travma sonucu psöriazisli hastaların sağlam derilerinde lezyonların ortaya çıkması Koebner fenomeni olarak tanımlanır (20). Hastaların yaklaşık üçte birinde görülür. Travma sonucu papiller kan akımının arttığı, çeşitli mediyatörlerin travma bölgesine geldiği ve lezyonların oluştuğu düşünülmektedir.

Enfeksiyon

Psöriazis ile ilişkisi en iyi bilinen mikroorganizma beta hemolitik streptokoklardır. Streptokoklar dışında *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pitrosporium orbiculare* ve çeşitli virusların psöriazis etiyolojisinde rolü olduğu düşünülmektedir (21).

Endokrin Faktörler

Psöriazis başlama yaşı, puberte ve menopoz dönemi olmak üzere iki dönemde pik yapmaktadır (22). Hastalık gebelik döneminde daha iyi, postpartum dönemde ise daha kötü seyretme eğilimindedir.

Hipokalseminin jeneralize püstüler psöriazis için tetikleyici bir faktör olduğu saptanmıştır. Düşük vitamin D3 seviyelerinin psöriazisi indüklediği gösterilmiştir ve aktif vitamin D3 analogları psöriazisi iyileştirmektedir.

İlaçlar

İlaçlar psöriazis hastalığını tetikleyebilir veya alevlendirebilir.(23). Psöriazisle güçlü, orta dereceli ve zayıf ilişkili ilaçlar tabloda görülmektedir. (24)

Tablo 2.2. Psöriazisi tetikleyen veya şiddetlendiren ilaçlar

Güçlü ilişkisi olanlar	Lityum, Non-Steroid Antiinflatuvar İlaçlar (NSAID), β blokörler, tetrasiklin, antimalaryaller
Orta derecede ilişkisi olanlar	İnterferon, ACE inhibitörleri
Zayıf ilişkisi olanlar	Amiadaron, kinidin, digoksin, klonidin, karbamazepin, altın, cıva, ampisilin, penisilin, gemfibrozil, fluoksetin, kalsiyum antagonistleri, progesteron, morfin, asetozolamid, valproik asit

Alkol ve Sigara

Alkol kullanımı psöriazis riskini artırmakta ve tedaviyi olumsuz yönde etkilemektedir (25). Alkolün psöriazisteki etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Alkolün, siklin D1 ve Keratinosit Büyüme Faktörü (KGF) gibi çeşitli hücre siklüs aktivatör ve inflamatuvar sitokin salınımına yol açarak inflamasyon ve epidermal hiperproliferasiyona sebep olduğu düşünülmektedir (25).

Sigara psöriazis patogenizinde yer almaktadır (26). Sigara, deride doğal immun sistem hücrelerini (keratinosit, dentritik hücre, makrofaj) uyarır. Bu hücreler T lenfositleri uyarır ve kronik inflamasyon döngüsünü başlatırlar (27,28). Sigara içen kişilerde özellikle palmoplantar püstüler psöriazis, içmeyenlere göre daha sık izlenmiştir (29).

Stres

Stres, psöriazis için iyi tanımlanmış sistemik bir tetikleyici faktördür. Stres, hastalığın ilk ortaya çıkışında etkili olabilmekte veya varolan hastalığı alevlendirebilmektedir (18).

2.1.4 İmmunopatogenez

Psöriazis patogenezi komplekstir. Doğal ve kazanılmış immun sistemde ve keratinositlerdeki değişikliklerin patogenezde etkili olduğu düşünülmektedir. Doğal immun sistemdeki hücreler; keratinositler, dendritik hücreler, mast hücreleri, nötrofil ve endotel hücreleridir. Hücreler aktive olduklarında sitokin ve kemokin üreterek kazanılmış immun sistem hücrelerini uyarırlar (30). Antijenik uyarılarla epidermis ve

dermisteki hücreler uyarılır ve aktive olurlar(31). Aktive olmuş dermal hücre ve keratinosit çeşitli kemokin, sitokin ve büyüme faktörleri salgılar.

Hüresel Özellikler

T Lenfositler

Dendritik hücrelerin T lenfositte antijen sunması sonucu daha önce hiç antijenle karşılaşmamış doğal T lenfosit, dendritik hücre yüzeyindeki antijeni tanır ve aktive olur. Bu aktivasyon sonunda 3 tür T lenfosit oluşur (32-34).

- 1- Efektör T hücresi (TE); hızla iltihaplı dokuya göç ederek efektör fonksiyonları yerine getirerek apoptozla ölen hücreler.
- 2- Efektör bellek T hücresi (TEM); sürekli kan ile periferik doku arasında göç edip bir uyarana karşılaşıncaya sitokin salgılayan hücreler.
- 3- Santral bellek hücresi (TCM); lenfosit ile kan arasında göç eden, ikincil bir uyarana karşılaşıncaya çoğalarak efektör fonksiyon gösteren hücreler.

Psöriazis hastalarında T lenfositlerin çoğunu TEM oluşturmaktadır. (32)

Aktive olan T lenfositler iki yönde farklılaşırlar. İnterlökin-12 (IL-12) ve İnterferon- γ (IFN- γ) etkisiyle CD4+ T hücreler, Yardımcı T hücresi 1 (Th1) yönünde farklılaşırken; CD8+ T hücreler, Sitotoksik T Hücresi (Tc1) yönünde farklılaşırlar. Dermiste yüksek oranda CD4+ hücreler, epidermiste CD8+ hücreler bulunur.

Keratinositler

Psöriazisli hastalarda epidermal keratinositlerde proliferasyon ve değişmiş differansiasyon görülür. Bu hastalarda keratinosit bölünme, olgunlaşma ve dökülmesi için geçen süre 26-28 günden 3-4 güne inmiştir. Hücre döngüsü 9-10 kat kısalmıştır ve keratinosit üretimi 28 kat artmıştır. Keratinosit hiperproliferasyonu, T lenfosit ve keratinositlerden salgılanan sitokinler ile indüklenmektedir. Keratinositler çeşitli sitokin ve proinflamatuvar kemokin salgılayarak (IL-1, IL-6, IL-8, IL-23, IL-17, TGF- α , IFN- γ) nötrofil, T lenfosit aktivasyonu ile immun sistemi uyarır. Epidermal proliferasyonu uyaran en temel faktör Th1 ve Yardımcı T Hücresi 17 (Th17) hücreleri tarafından üretilen İnterlökin-20 (IL-20) ve İnterlökin-22 (IL-22)'dir.

Aktive olmuş keratinositler VEGF ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) sentezleyerek anjiogenezi uyarırlar.

Son yıllarda keratinosit hiperproliferasyonunun lezyon oluşumuna tek başına neden olamayacağı üzerinde durulmakta, çalışmalar immünolojik mekanizmalara yönelmektedir (35).

Doğuştan Katil (NK) T Hücreleri

NK T hücreleri doğal immun sistemin bir elemanıdır. Bu hücreler self ve yabancı antijenlerin tanınmasında ve bunlara karşı sitokin üretilmesinde görev alır. Sitolitik aktivite göstererek immün regülatuar olarak görev yapar (36,37). Psöriatik lezyonlarda NK-T hücrelerin arttığı gösterilmiştir (37).

Sitokinler

Sitokinler, aktive olmuş lenfositler ve makrofajlar başta olmak üzere birçok hücreden sentezlenen ve hücrelerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde, inflamasyon, koruma, doku tamiri ve yeniden yapılanma, büyüme, fibrozis, anjiyogenez ve neoplazm kontrolünde rolü olan polipeptid yapıda sinyal molekülleridir. (38). Dendritik hücreler ve keratinositler sitokin ve kemokinleri üretebilirler (39). Psöriatik lezyonlu deride sitokinlerin bulunduğu gösterilmiştir (40). VEGF polimorfizmlerinin sitokin üretimini etkilediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (41).

Büyüme Faktörleri

Tranforme edici büyüme faktörü (TGF- α), epidermal büyüme faktörü (EGF), VEGF, keratinosit büyüme faktörü (KGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) , insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) ve bu büyüme faktörlerin reseptörlerinin psöriatik lezyonlarda yükseldiği tespit edilmiştir. Bu büyüme faktörleri, keratinositlerin proliferasyonundan sorumludur. (40,42).

Antimikrobiyal Peptitler (AMP)

AMP'ler, enfeksiyon ve doku hasarına cevap olarak keratinosit, mast ve nötrofil hücrelerinden salınan moleküllerdir (43.) Bu peptitler bakterilerin zarlarında porlar oluşturularak doğal antibiyotik görevi yapmaktadır. Psöriatik plaklar bakteri süperenfeksiyonlarına karşı dirençlidir. Bu durumun, plaklarda artmış olan antimikrobiyal peptitlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. İnsan derisinde katelisidin (LL-37) ve β -defensinler olmak üzere iki ana AMP grubu bulunmaktadır (37). Bu iki grup AMP, monosit ve nötrofillerin ortama toplanmasını, antijen alımını ve Antijen Sunan Hücreler (ASH)'in fonksiyonlarını artırmaktadır. Böylece AMP'ler ASH'lerin antijen sunma fonksiyonlarını artırarak T hücre cevabına ve T hücre aktivasyonuna neden olur (43).

Toll Benzeri Reseptörler (TLR)

TLR'ler mikroorganizmalara ait moleküler komponentleri tanıyan doğal immun sistemin en önemli patern tanıma reseptörleridir. Psöriazisli hastalarda TLR1,2,4,5,9 seviyelerinin normal deriye göre arttığı gösterilmiştir (44). TLR'ler psöriatik lezyonlarda AMP düzeylerini artırmaktadır.

2.1.5. Klinik

Psöriazis başlama yaşının 15-20 ve 55-60 yaşlarında iki kez pik yaptığı bilinmektedir (7). Hastalık başlama yaşına göre ikiye ayrılmaktadır:

Tip I: Başlama yaşı 40 yaşından önce olan erken başlangıçlı psöriazis

Tip II: Başlama yaşı 40 yaşından sonra olan geç başlangıçlı psöriazis

Tip I psöriazisde Human Lökosit Antijen (HLA) birlikteliği ve aile öyküsü daha sık oranda tespit edilmekte ve bu tip daha şiddetli seyretmektedir.

Psöriazis formları:

Psöriazis Vulgaris

Klasik psöriazis formu olarak kabul edilir ve tüm yaş grupları içinde en sık bildirilen klinik formdur. Tüm psöriazisli hastaların % 80-90'ı psöriazis vulgaristir. Bilateral, simetrik yerleşimli, keskin sınırlı, eritemli sedefi skuamlı plaklarla karakterizedir. Lezyonlar, özellikle diz, dirsek gibi ekstensör yüzeyler ile

lumbosakral bölgede görülürler. Bu bölgeler dışında saçlı deri, tırnaklar ve genital bölge de sıklıkla tutulur (45).

Guttat Psöriazis

Çocuk ve genç erişkinlerde sık karşılaşılan klinik formdur. Hızlı başlangıçlı ve 0,5-1,5 cm çaplı küçük lezyonlar sıklıkla gövde üst kısım ve ekstremitelerinde görülmektedir. Faringeal streptokok infeksiyonları hastalığın başlaması veya alevlenmesinde önemli tetikleyici faktördür.

Püstüler Psöriazis

Klinik tabloya steril püstüllerin hakim olduğu formdur ve psöriazis hastalarının %2-5'ini oluşturur. Lokalize ve jeneralize olmak üzere iki klinik tipi vardır. Lokalize püstüler psöriaziste akrodermatitis continua ve palmoplantar püstüloz olmak üzere iki alt tipe ayrılır (46).

Eritrodermik Psöriazis

Eritrodermik psöriazis, vücudun %90'dan fazlasının eritem ve skuamla kaplı olduğu jeneralize bir tablodur (45).

Psöriatik Artrit

Psöriazisli hastaların yaklaşık %5-7'sinde görülen seronegatif inflamatuvar bir artropatidir. Etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır fakat herediter ve çevresel etkenler sorumlu tutulmaktadır. Sıklıkla asimetric tutulumlu oligoartrit (%70-80) görülmektedir. Simetrik poliartrit, distal interfalangeal (DİP) tutulumu ve sakroileit de görülmektedir. DİP tutulumu ve tırnak değişiklikleri tipiktir. Hastaların %80'inde tırnak tutulumu vardır.

İnvers psöriazis (fleksural Psoriazis)

Psöriazis lezyonları aksiller bölge, meme altı, kasık, inguinal bölge, popliteal bölge, umblikus, intergluteal bölge gibi vücudun kıvrım bölgelerinde görülmektedir. Lezyonlar, keskin sınırlı, parlak eritemli plaklar şeklinde görülür (47-49)

Psöriazis ve tırnak tutulumu

Psöriasis, tırnak yatağını ve matriksini etkiler. En sık izlenen tırnak bulgusu *pitting* (yüksük tırnak) denilen tırnak yatağındaki noktasal çukurcuklardır. Psöriazis hastalarının %20'sinde tırnak tutulumu bildirilmiştir (50).

Psöriazis ve Komorbiditeler

Pöriazisli hastalarda, Crohn hastalığı ve ülseratif kolit (51) kalp ve damar hastalıkları (52), lipit anormallikleri (53,54), Tip 2 diyabet (55,56), metabolik sendrom (57) ve kanser (58) riskinin arttığı gösterilmiştir.

Tedavi

1. Topikal Tedaviler

- Topikal steroidler
- Topikal retinoidler
- Salisilik asit ve diğer keratolitikler
- Nemlendiriciler
- Vitamin D analogları
- Katran
- Antralin (Ditranol, Sinyolin)
- Kalsinörin inhibitörleri

2. Fototerapi

- Ultraviyole B Psöralen ve Ultraviyole A
- *Excimer laser*
- Fotodinamik tedavi
- Klimaterapi

3. Sistemik Tedavi

- Siklosporin A
- Metotreksat
- Asitretin
- Fumarik asit esterleri
- Hidroksiüre
- 6- tiyoguanin

- Sülfosalazin
- Sistemik steroidler
- Mikofenolat mofetil
- Adalimumab
- Etanercept
- İnfliksimab

2.1.6. Histopatoloji

Psöriaziste ilk dermopatolojik değişiklikler; dermiste yüzeysel perivasküler lenfositik hücre infiltrasyonu ve dermal papillalarda kapiller dilatasyondur. Dermal papillada ödem, kapiller konjesyon, geçirgenlik artışı, endotel hücre proliferasyonu, perikapiller mast hücre sayısında artış ve kapillerlerin kıvrımlı bir yapı (tortüöz kapillerler) göstermeleri diğer başlangıç bulgularıdır. (45,59,60). Vasküler geçirgenlik artışı ile nötrofiller hızla damar dışına çıkarak epidermise göçerler. Psöriazise özgü histopatolojik bulgular epidermiste görülmektedir. Bu bulgular; epidermal hiperplazi, rete çıkıntılarında düzenli uzama (akantoz), stratum korneumda çekirdeklerini kaybetmemiş keratinositlerin bulunması (parakeratoz), parakeratoz alanlarında nötrofil kümeleri ile oluşturulan epidermal mikroabseler (munro mikroabseleri) dir.

2.1.7. Psöriazis Alan ve Şiddet İndeksi (PASI)

PASI en sık kullanılan psöriazis skorum ölçütüdür (Tablo 2.3). Bu değerlendirmede vücut 4 ayrı bölgeye ayrılır.

b: baş ve boyun bölgesi

g: gövde

a: alt ekstremit

ü: üst ekstremit

Her bir bölge için eritem (E), indürasyon (İ) ve deskuamasyon (D) 0 ile 4 arasında skorlanır. Her bir bölge için tutulan alan (A) yüzde olarak belirlenir ve 0 ile 6 arasında bir skor verilir.

(0=yok, 1=<% 10, 2=% 10-30, 3=% 30-50, 4=% 50-70, 5=% 70-90, 6=% 90-100).

PASI= $0,1Ab(Eb+İb+Db) + 0,2Aü(Eü+İü+Dü) + 0,3Ag(Eg+İg+Dg) + 0,4Aa(Ea+İa+Da)$ formülü ile hesaplanır. Aynı zamanda bu skorlama tedavi takibinde de kullanılmaktadır. Toplam PASI skoru <8 ise hafif, 8-12 ise orta, >12 ise şiddetli psöriazis olarak kabul edilmektedir.

Tablo2.3. PASI skorunun hesaplanması

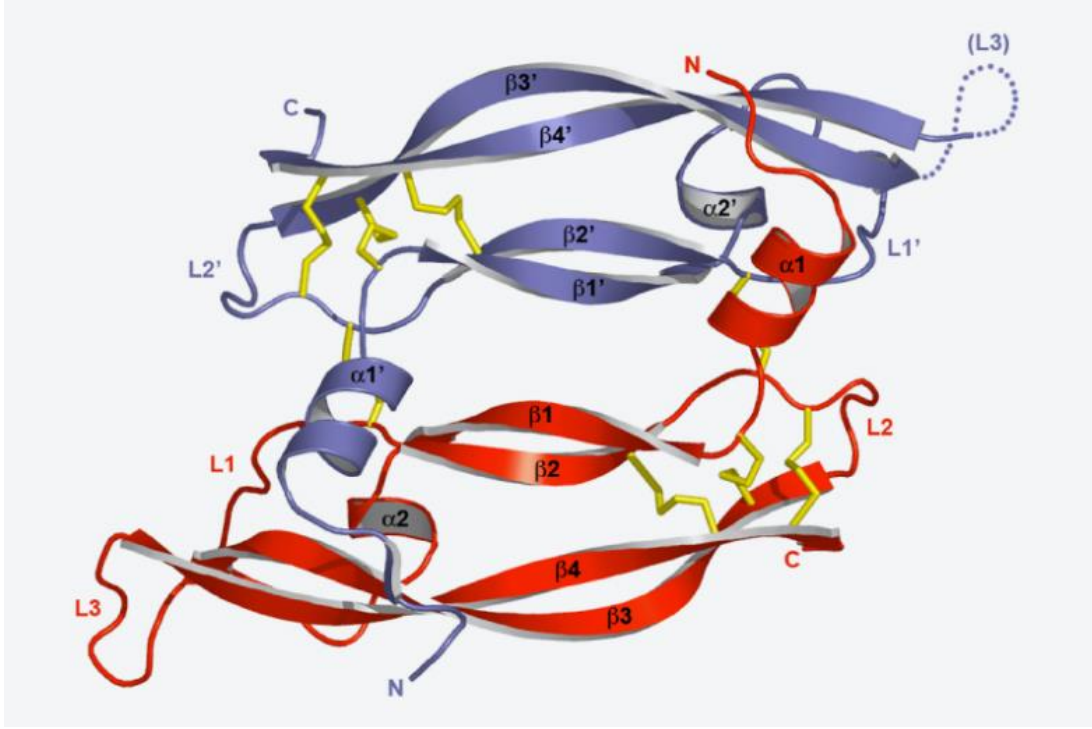
Bölge	Eritem (E)	İndürasyon (İ)	Deskuamasyon (D)	Tutulan Alan % (A)
Baş-Boyun (b)	0-4	0-4	0-4	0-6
Gövde (g)	0-4	0-4	0-4	0-6
Üst Ekstremitte (ü)	0-4	0-4	0-4	0-6
Alt Ekstremitte (a)	0-4	0-4	0-4	0-6
Toplam PASI= $0,1Ab(Eb+İb+Db)+0,2Aü(Eü+İü+Dü)+0,3Ag(Eg+İg+Dg)+0,4Aa(Ea+İa+Da)$				

2.2. VEGF ve Genetik Özellikleri

Vasküler endotelial büyüme faktörü, organın gelişim evresine ve fizyolojik aktivitesine bağlı olarak önemli biyolojik aktiviteleri olan multifonksiyonel bir moleküldür. VEGF, ilk defa karsinoma hücrelerinden salgılanan, tümörlerin asit sıvı akımını artıran bir permeabilite faktörü olarak bulunmuş ve vasküler permeabilite faktörü (VPF) olarak isimlendirilmiştir. Kısa bir süre sonra VEGF bir anjiogenik faktör olarak izole edilmiş ve endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir. Bilinen en potent anjiogenik sitokindir (61).

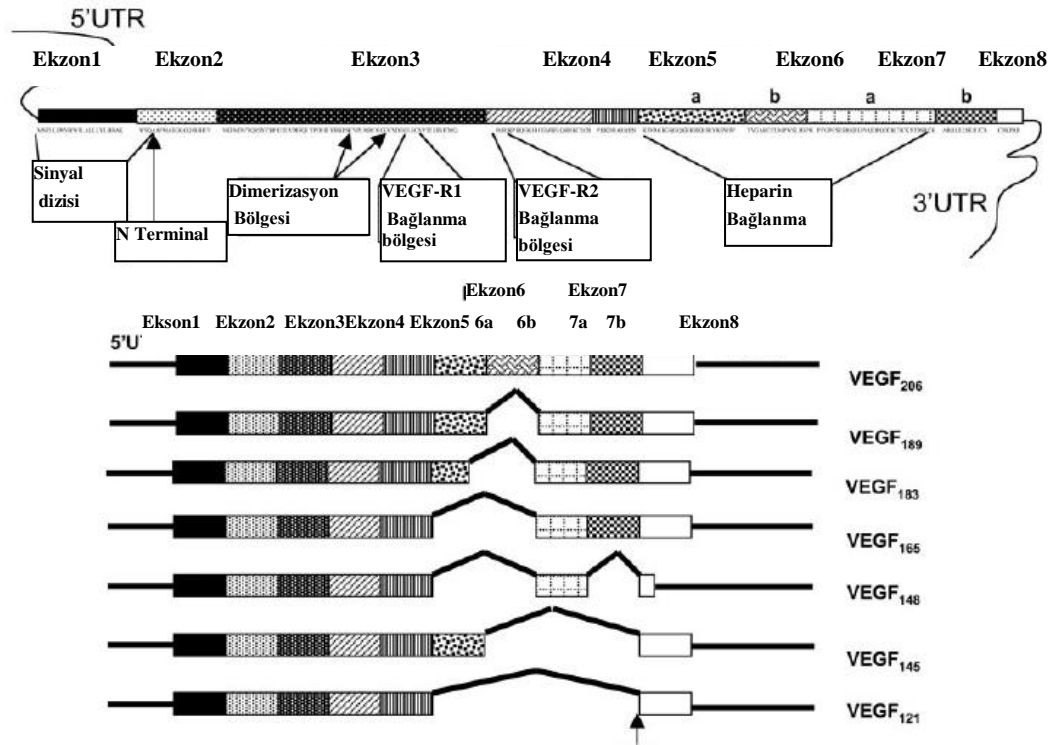
VEGF Ailesi

VEGF homodimerik yapıda 34-46 kDa ağırlığında heparin bağlayan bir glikoproteindir. VEGF ailesinin, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F ve plasental büyüme faktörü (PLGF) olmak üzere 7 üyesi vardır (62,63). VEGF-A predominant formdur (61). Tüm üyeler homolog domainler içermektedir. Anti paralel β -tabakaları olarak organize olmuş monomerler iki adet disülfid bağı ile birleşerek dimerik yapıdaki VEGF'yi oluşturur (64). VEGF'nin reseptörüne bağlanma bölgesinde sistin düğüm motifi bulundurulur (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. VEGF protein yapısı (65)

VEGF-A geni 6. kromozom kısa kolunda 6p21.3 lokalizasyonunda bulunur (66). Sekiz ekzondan oluşur ve alternatif *splicing* mekanizmaları ile 121, 145, 148, 165, 183, 189 ve 206 aminoasitli yedi izoform meydana gelir (Şekil 2.2.). Sekizinci VEGF-A izoformu 110 aminoasitten oluşur ve proteolitik yıkım sonucunda meydana gelir. VEGF-A'nın en fazla bulunan izoformu VEGF 165'dir. VEGF-B geni kromozom 11q13.1 lokalizasyonunda bulunur ve 7 ekzondan oluşur. VEGF-B proteininin 167 ve 186 aminoasitli iki izoformu bulunur. VEGF-C geni kromozom 4q34.3 lokalizasyonunda bulunur ve 7 ekzondan oluşur. VEGF-D geni kromozom Xp22.2 lokalizasyonunda bulunur ve 7 ekzondan oluşur.



Şekil 2.2. VEGFA geni ve VEGFA izoformları (67)

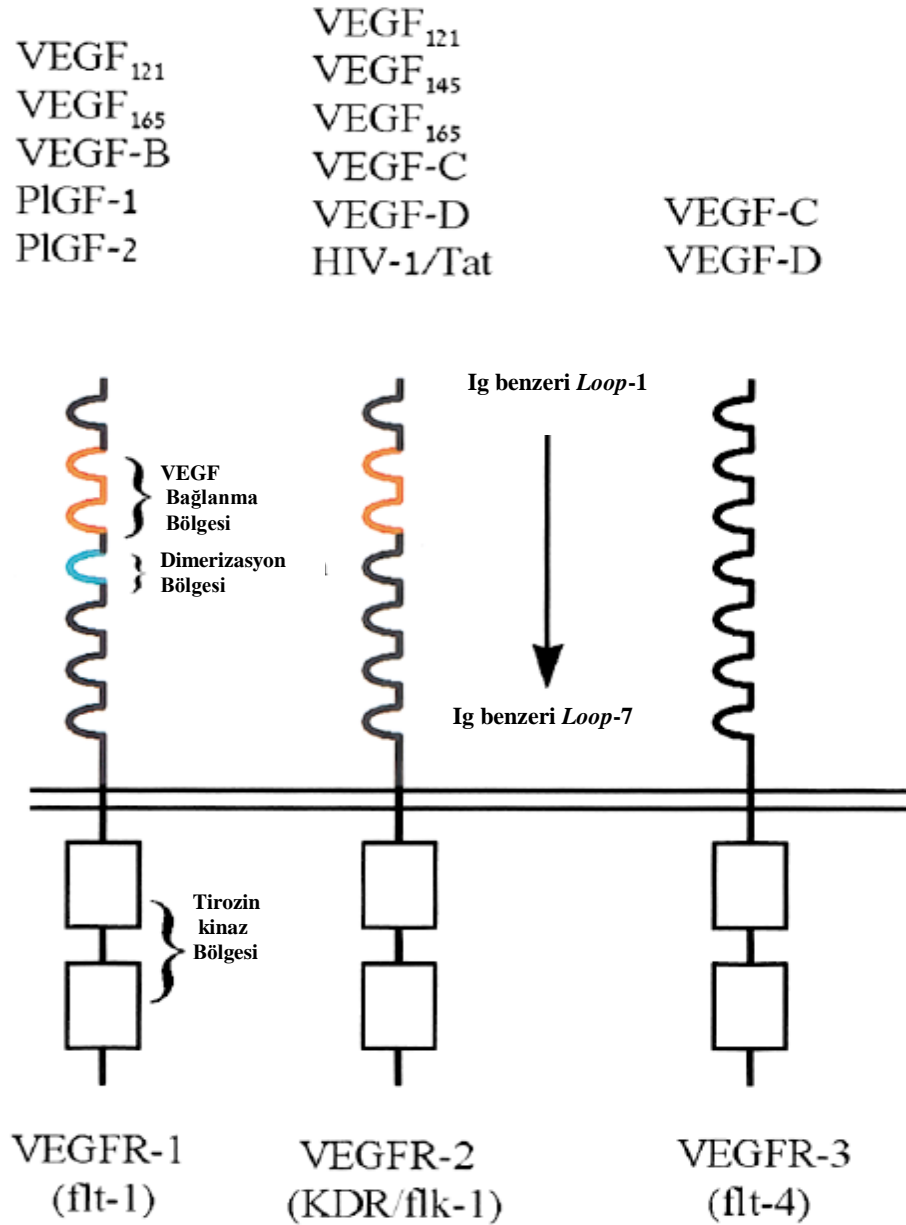
VEGF Reseptörleri ve Koreseptörleri

VEGF'ün biyolojik aktivitesi özgül reseptörlerine ve koreseptörlerine bağlanması ile meydana gelir. Etkilerini transmembran tirozin kinaz reseptörlerinin aktivasyonlarıyla gösterirler. Reseptör tirozin kinazlar (RTK), 1300 aminoasitten oluşur ve iki bölüm içerirler. İlk bölüm, tirozin kinazın etkinliğinin olduğu intrasellüler bölüm, ikinci bölüm ise membran köprüleri ve ligand bağlama bölgeleri içeren 7 adet Ig benzeri yapı içeren ekstrasellüler bölümdür (68). VEGF reseptöre bağlandığında dimerizasyon meydana gelir. Dimerizasyon sonucu tirozinler üzerinden otofosforilasyon gerçekleşir ve ikincil haberciler ile hücre içi sinyal iletisi başlar (69,70). Bu reseptör ve koreseptörler, vasküler ve lenf damarı endotel hücrelerinde, monosit ve makrofajlarda, hematopoetik kök hücrelerde, epitelyal hücrelerde, fibroblastlarda, düz kas hücrelerinde ve miyojenik öncül hücrelerde bulunur (61).

Üç farklı vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) tanımlanmıştır.

VEGFR-1(*fms like tyrosine kinase-1; flt-1*),
VEGFR-2 (*kinase domain region; KDR*),
VEGFR-3 (*fms like tyrosine kinase-4; flt-4*).

Bunların dışında nörofilin-1 (Np-1), nörofilin-2 (Np-2) ve heparan sülfat, VEGF'ü bağlayabilmektedir. VEGFR-1 ve -2 tüm yetişkin vasküler endotel hücrelerinde bulunur (71). VEGFR-1 reseptörü ek olarak monositler ve nötrofillerde de bulunur ve VEGF'ün kemoatraktan cevabına katkı sağlar (72). VEGF-A ve PLGF inflamatuvar anjiogenezi yönetir (61). VEGF-A, VEGF-R1 ve VEGF-R2 reseptörlerine bağlanmaktadır. VEGFR-2 anjiogenez, proliferasyon ve kapiller geçirgenlik artışından sorumlu reseptördür. VEGF-C ve VEGF-D, VEGFR-3'e bağlanıp lenfanjiogeneze katılırlar. VEGF-B, VEGF-R1 reseptörüne bağlanmaktadır ve bu reseptör hücreler arası haberleşmede migrasyonda rol alır. Nörofilin koreseptörleri (Np-1 ve Np-2)'nin nöronal hücre korunması, akson büyümesi gibi olaylarda fonksiyonu vardır (61).



Şekil 2.3. VEGF çeşitleri ve VEGF reseptörleri ile etkileşimleri (73)

VEGF makrofaj, monosit, fibroblast, keratinosit ve düz kas hücresi gibi pek çok hücreden salgılanır. Endotel hücreleri VEGF üretmez ancak üzerlerinde VEGF için reseptör taşırlar (74,75). VEGF salınımına etkili faktörler hipoksi, inflamatuvar sitokinler, reaktif oksijen radikalleri, nitrik oksit ve hormonlardır. VEGF, PLGF, VEGFR-1 ve VGFR-2 arasında doğru bir denge yokluğunda kontrol edilemeyen inflamatuvar anjiogenez oluşur. Bu da psöriazis, romatoid artrit, ateroskleroz, diyabetik retinopati, maküler dejenerasyon, prematür retinopatisi ve tümör gelişimi gibi patolojik durumlara yol açabilir.

2.3. VEGF Polimorfizmleri

Polimorfizm, bir toplumda farklı allellere bağlı olarak genetik açıdan belirlenmiş iki veya daha çok alternatif fenotipin görülmesidir (76). Eğer toplumda herhangi bir lokusta en az iki farklı allel varsa bu lokusun polimorfizm gösterdiği kabul edilir. Bir allelin polimorfik kabul edilebilmesi için toplumdaki sıklığı %1'den fazla olmalıdır. (77,78). Anjiogenezisi düzenleyen genlerdeki genetik çeşitlilik patofizyolojisinde anjiogenezisin yer aldığı kanser, ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıklar, artrit, psöriazis, diyabetik retinopati gibi hastalıklara yatkınlığın artışı ile ilişkilidir. Anjiogenezisi düzenleyen çok sayıda gen vardır ve polimorfizm ile ilgili en çok araştırılan VEGF'dir. VEGF geni, en az 25 çeşit polimorfizm içeren yüksek polimorfizme sahip bir gendir (79). Anjiyogenezin yer aldığı çeşitli hastalıklarda VEGF genin +405, -460, -1512, -1540, -1451, -2578, -1154 polimorfizmleri araştırılmıştır (80-86) .

Psöriazisli hastalarda VEGF'nin çeşitli pozisyonlarındaki fonksiyonel polimorfizmlerinin psöriazis ile ilişkisini gösteren sınırlı sayıda çalışma vardır (84-86). Türk populusyonunda şimdiye kadar yapılan bir çalışma yoktur. Yapılan alışmalarda VEGF gen polimorfizmlerinin, VEGF protein ekspresyonuna etkisi değerlendirildiğinde çelişkili sonuçların bulunduğu gözlenmektedir. VEGF ve reseptörlerinin psöriazisli hastalarda arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (87-90). VEGF'nin fonksiyonel polimorfizmlerinin psöriazis hastaları için moleküler biyokimya belirteci olarak kullanılabilereği ne sürülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Bileşikler

Tris HCl (AppliChem)
Borik asit(AppliChem)
Etidyum Bromür (Sigma)
Etanol (Riedel-de Haen)
EDTA (SERVA)
Bromfenol mavisi (Sigma)
NuSieve Agarose (Prona)
Agarose basica (Prona)
Taq DNA Polimeraz (Sigma)
Primerler (Alpha DNA)
BsmFI restriksiyon enzimi (NEB)
BgIII restriksiyon enzimi (NEB)
BstUI restriksiyon enzimi (NEB)
Deoksinükleotit set (Sigma)
DNA marker (Sigma)
Loading buffer (Sigma)

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Elektroforez güç kaynağı (Consort EV 265)
Spektrofotometre (UV-1700 UV-Visible Spectrophotometer, Shimadzu)
Vorteks (IKA®)
PCR cihazı (i Cyclor) (BIO-RAD)
ELISA mikrolak okuyucu (Sunrise TECAN)
Elektroforez Tankı (Owl)
Mikrosantrifüj (Hettich mikro 22)
UV translüminatör (Herolab)
pH metre (Consort C830)

Buzdolabı (Arçelik)
-80 °C derin dondurucu (SANYO)
Buz makinası (Fiocchetti AF100)
Distile su cihazı (Barnstead nanopure infinity)
Hassas terazi (Shangping FA1104N)
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Torrey Pines Scientific)

3.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Hasta ve kontrol grupları klinik ve biyokimyasal açıdan değerlendirildi. Çalışma grupları bilgilendirilmiş onam formunu okuyarak çalışmaya katılmayı kabul edenler tarafından oluşturuldu. Hasta ve kontrol gruplarını oluşturan kişilerden alınan kan örnekleri Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Polikliniği'nde toplandı. Bu çalışma için etik kurul izni, Hacettepe Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan alındı (GO 2013/131-03).

3.2.1. Hasta Grubunun Oluşturulması

Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Polikliniği'ne Ocak 2013-Ağustos 2013 tarihleri arasında başvuran 18 yaş üstü, Psöriatik artropati veya diğer inflamatuvar artropatisi olmayan, gebe olmayan, klinik veya histopatolojik olarak psöriazis tanısı alan toplam 100 hastadan kan örnekleri alındı.

3.2.2. Kontrol Grubunun Oluşturulması

Kontrol grubu Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Polikliniği'ne psöriazis dışında bir nedenle başvuran, soygeçmişinde psöriazis hikayesi olmayan ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde çalışan, soygeçmişinde psöriazis hikayesi olmayan gönüllü toplam 100 erişkinden oluşturuldu.

3.3. Klinik Değerlendirme

Psöriazisli hastalar ve kontrol grubu demografik bilgileri değerlendirme formlarına kaydedildi. Hastalar psöriazis klinik tipi, PASI skoru, hastalığın başlangıç yaşı, aile hikayesi, sigara içiciliği, tedaviye yanıt açısından değerlendirildi.

3.4. Kan Örneklerinin Alınması ve Serumların Ayrılması

Hasta ve kontrol gruplarında yer alan kişilerden genetik çalışmalar için iki adet 3 ml'lik EDTA içeren tüplere ve serum VEGF, VEGFR-1 ve VEGFR-2 düzeyleri tayini için bir adet biyokimya tüpüne kanlar alındı. Alınan tam kan örnekleri çalışılncaya kadar -20 C'de saklandı. Biyokimya tüpüne alınan kan örnekleri ise 4000 xg'de 10 dk santrifüj edildikten sonra serumları pastör pipetiyle ayrılarak -80 °C'de saklandı.

3.5. Yöntemler

3.5.1. Tam kandan DNA izolasyonu

DNA izolasyonu, hücre çekirdeğindeki DNA'yı diğer hücre bileşenlerinden ayırır ve hücre sel enzimler tarafından parçalanmaya karşı korur.

DNA izolasyonu, 3 ml'lik EDTA'lı tüplere toplanan hasta ve kontrol örneklerinde Qiagen marka DNA izolasyon kiti kullanılarak basamaklara uygun şekilde gerçekteştirildi.

EDTA'lı kandan 200 µl alınarak proteinlerin uzaklaştırılması için 20 µl proteinaz K eklendi. Hücre zarlarının parçalanması için 200 µl lizis tamponu eklenerek vorteks ile karıştırıldı ve 56°C'de 10 dakika inkübe edildi. Lizatta bulunan DNA'yı bir araya getirmek için DNA yapısındaki fosfat grupları ile güçlü bir bağ oluşturan 200 µl etanol (%96) eklendi ve 15 saniye vorteks ile karıştırıldı. Örnekler QIAamp silika-jel içeren mini spin kolonlara aktarılarak 6000 x g (8000 rpm)' de 1 dakika santrifüj edildi. Genomik DNA'ların kolona özgül olarak bağlanması ve kontaminantların kolona bağlanmadan uzaklaştırılması sağlandı. Oluşan filtrat atılarak kolonlar başka bir tüpe aktarıldı. Proteinleri denatüre etmek için kolona, 500 µl AW1 (guanidin hidroklorür) eklendi ve 6000 x g (8000 rpm)' de 1 dakika

santrifüj edildi. Kolonlar tekrar başka tüpe aktarılarak kolondaki tuzun uzaklaştırılması için 500 µl AW2 (70% EtOH) eklendi ve 20000 x g (14000 rpm)'de 3 dakika santrifüj edildi. Saflaşan DNA'yı kolondan indirmek için kolonlara 200 µl elüsyon tamponu (10 mM TrisCl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0) eklenerek oda sıcaklığında (15-25 °C) 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra 6000 x g (8000 rpm)' de 1 dakika santrifüj edilerek DNA izolasyonu tamamlandı. İzole edilen genomik DNA'lar, çalışılıncaya kadar -20'de saklandı.

3.5.2. DNA saflığı ve miktar tayini

İzole edilen genomik DNA'ların saflığı ve miktar tayini spektrofotometrik ölçümle değerlendirildi. Nükleik asit bazlarının 260 nm'de, protein fenilalanin, triptofan ve tirozin amino asitlerinin 280 nm'de maksimum absorpsiyon vermesi esasına dayanan bu ölçümde A260/A280 oranı kullanılır. Saf DNA yaklaşık 1,8 değerini vermelidir. 1,8 üzeri değerler RNA kontaminasyonunu, 1,8 altındaki değerler protein kontaminasyonunu gösterir.

5µl DNA 1/500 oranında dilue edildi. Kör tüpüne 500 µl distile su kondu. Spektrofotometrede 260 ve 280 nm'de absorpsiyonları ölçülerek A260/A280 oranına bakıldı. Örnekteki DNA miktarı, 260 nm'de 50 µl DNA'nın 1 optik dansite vermesinden yararlanılarak hesaplandı.

3.5.3 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR, genomik DNA'daki dizisi bilinen herhangi bir bölgenin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan *in-vitro* DNA sentez yöntemidir. Çalışmamızda VEGF geninin belirlenen bölgelerini çoğaltmak için PCR yöntemi uygulanmıştır.

3.5.3.1. Primerler

VEGF (+405 C/G), VEGF (-460 T/C), VEGF (-1540 C/A) ve VEGF (-1512Ins18) polimorfizmleri için primerler tasarlandı ve uygunluğu primer blast programı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) kullanılarak test edildi. PCR yönteminde kullanılan primerlerin tümü Alpha DNA Biyoteknoloji Şirketi tarafından sentezlendi. Primer dizileri Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Polimorfizm çalışmaları için dizayn edilen primerler ve ilgili gen ürünleri

Polimorfizm	Primer Dizisi	% GC	Çoğaltılan Gen Ürünü Büyüklüğü (bp)
VEGF (+405 C/G)	F5'-ATT TAT TTT TGC TTG CCA TT-3'	58.00	304
	R5'-GTC TGT CTG TCT GTC CGT CA-3'	70.30	
VEGF (-460 T/C)	F5'-TGT GCG TGT GGG GTT GAG CG-3'	74.40	175
	R5'-TAC GTG CGG ACA GGG CCT GA-3'	74.40	
VEGF (-1540 C/A) ve VEGF (1512Ins18)	F5'-CCC TGG AGC GTT TTG GTTA AA-3'	72.17	297 (315)
	R5'-CCC TTA CCT CCA AGC CCC CT-3'	77.29	

3.5.3.2. VEGF (+405 C/G) polimorfizmi

Hasta ve kontrol kan örneklerinden izole edilen genomik DNA örneklerinde polimorfizmi içeren 304 bp'lik bölge PCR ile çoğaltıldı. Özgün primerlerin DNA'ya bağlandığı optimum sıcaklığı belirlemek için *gradient* PCR yönteminden yararlanıldı. *Gradient* PCR yönteminde 54°C ve 61°C arasındaki sıcaklıklar (54 °C, 54.6 °C, 55.4 °C, 56.6 °C, 58.4 °C, 59.7 °C, 60.5 °C, 61 °C) seçildi ve en uygun sıcaklık 58 °C olarak belirlendi. PCR tepkime ortamı Tablo 3.2.' de sunulmuştur.

Tablo 3.2. VEGF (+405 C/G) polimorfizmi için PCR tepkime ortamı

Malzemeler	Stok Derişim	Kullanılan Miktar	Son Derişim
PCR tamponu	10 X	5 µL	1X
dNTP	10 mM	1 µL	0,2 mM
<i>Forward</i> Primer	10 mM	2 µL	0,4 mM
<i>Reverse</i> Primer	10 mM	2 µL	0,4 mM
Taq polimeraz	5 U/µL	0,5 µL	2,5 U
MgCl ₂	25	6 µL	3 mM
DNA örneği	-	8 µL	400 ng
dH ₂ O	-	22,5 µL	-

PCR yöntemi için seçilen sıcaklık döngüleri Tablo 3.3.'de sunulmuştur.

Tablo 3.3. PCR yöntemi için sıcaklık döngüleri

Protokol	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
1	1	94	5
2	40	94	1
		58	1
		72	1
3	1	72	5
4	-	4	∞

3.5.3.3. VEGF (-460 T/C) polimorfizmi

Hasta ve kontrol kan örneklerinden izole edilen genomik DNA örneklerinde polimorfizmi içeren 175 bç'lik bölge PCR ile çoğaltıldı. Özgün primerlerin DNA'ya bağlandığı optimum sıcaklığı belirlemek için 58°C ve 65°C arasında *gradient* PCR yöntemi uygulandı ve en uygun sıcaklık 63°C olarak belirlendi. PCR için en uygun Mg⁺⁺ derişimini bulmak için değişik Mg⁺⁺ derişimlerinde PCR yapıldı ve 2 mM Mg⁺⁺ derişiminde tek bant olarak 175 bç'lik bölgenin çoğaldığı görüldü. Bu bölge için hazırlanan tepkime ortamı Tablo 3.4.'de sunulmuştur.

Tablo 3.4. VEGF (-460 T/C) polimorfizmi için PCR tepkime ortamı

Malzemeler	Stok Derişim	Kullanılan Miktar	Son Derişim
PCR tamponu	10 X	5 µL	1X
dNTP	10 mM	2 µL	0,4 mM
<i>Forward</i> Primer	10 mM	2 µL	0,4 mM
<i>Reverse</i> Primer	10 mM	2 µL	0,4 mM
Taq polimeraz	5 U/µL	0,5 µL	2,5 U
MgCl ₂	25	4 µL	2 mM
DNA örneği	-	5 µL	400 ng
dH ₂ O	-	23,5 µL	-

PCR yöntemi için seçilen sıcaklık döngüleri Tablo 3.5.'de sunulmuştur.

Tablo 3.5. PCR yöntemi için sıcaklık döngüleri

Protokol	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
1	1	94	5
2	35	94	1
		63	1
		72	1
3	1	72	5
4	-	4	∞

3.5.3.4. VEGF (-1540 C/A) ve VEGF (-1512Ins18) polimorfizmleri

Hasta ve kontrol kan örneklerinden izole edilen genomik DNA örneklerinde polimorfizmleri içeren 297 (315) baz çiftlik DNA bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. Tepkime ortamı Tablo 3.6.'da sunulmuştur.

Tablo 3.6. VEGF (-1540 C/A) ve VEGF (-1512Ins18) polimorfizmleri için PCR tepkime ortamı

Malzemeler	Stok Derişim	Kullanılan Miktar	Son Derişim
PCR tamponu	10 X	5 µL	1X
dNTP	10 mM	1 µL	0,2 mM
<i>Forward</i> Primer	10 mM	2 µL	0,4 mM
<i>Reverse</i> Primer	10 mM	2 µL	0,4 mM
Taq polimeraz	5 U/µL	0,5 µL	2,5 U/µL
MgCl ₂	25	2 µL	1 mM
DNA örneği	-	5 µL	400 ng
dH ₂ O	-	29,5 µL	-

Tablo 3.7. PCR yöntemi için sıcaklık döngüleri

Protokol	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
1	1	94	5
2	30	94	1
		64	1
		72	1
3	1	72	5
4	-	4	∞

3.5.4. Restriksiyon enzim analizleri

Restriksiyon enzimi veya restriksiyon endonükleazı çift zincirli DNA moleküllerinde belirli nükleotit dizilerini tanıyan ve her iki zinciri birlikte kesen bir enzim türüdür.

3.5.4.1. *BsmFI* restriksiyon enzim analizi

VEGF (+405 C/G) polimorfizmi taşıyan DNA örneklerinde sitozinden guanine (C→G) bir nükleotit değişimi vardır. *BsmFI* enzimi nükleotit değişikliğini tanır ve DNA'yı o bölgeden keser (Şekil 3.1). Sitozinden Guanine (C→G) bir nükleotit değişimi yoksa DNA'da *BsmFI* enziminin tanıma bölgesi bulunmaz.

PCR ile çoğaltılan polimorfizmi içeren 304 baz çiftlik DNA bölgesi için *BsmFI* restriksiyon enzimi kullanılarak uygun tepkime ortamı (Tablo 3.8.) sağlandı ve kesim yapıldı. Etidyum bromür ile boyanan % 3 lük nusieve agaroz jel elektroforezinde DNA kesim ürünleri gözlemlendi. Kesim sonucunda sitozin nükleotitine değişimi olmayan (normal) bireylerde 304 bp'lik tek bant, tek allelinde değişimi olan (heterozigot) bireylerde 304, 193 ve 111 bp'lik üç bant, her iki allelinde değişim görülen (homozigot) bireylerde 193 ve 111 bp'lik 2 bant izlendi.

Tablo 3.8. *BsmFI* restriksiyon enzimi için hazırlanan tepkime ortamı

Malzemeler	Miktar (µL)
Distile su	5
PCR ürünü	12
Tampon	2
Enzim (<i>BsmFI</i>)	1 (2 ünite)

Toplam hacim 20 µL olacak şekilde hazırlanan reaksiyon ortamı 1 saat 60°C'de inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.1. *BsmFI* restriksiyon enziminin kesim bölgesi

3.5.4.2. *Bst*UI restriksiyon enzim analizi

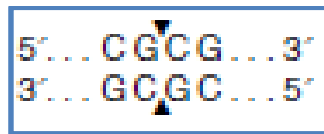
VEGF (-460 T/C) polimorfizmi taşıyan DNA örneklerinde timinden sitozine (T→C) bir nükleotit değişimi vardır. *Bst*UI enzimi nükleotit değişikliğini tanır ve DNA'yı o bölgeden keser (Şekil 3.2.) Timinden sitozine (T→C) bir nükleotit değişimi yoksa DNA'da *Bst*UI enziminin tanıma bölgesi bulunmaz.

PCR ile çoğaltılan polimorfizmi içeren 175 baz çiftlik DNA bölgesi için *Bsm*FI restriksiyon enzimi kullanılarak uygun reaksiyon ortamı (Tablo 3.9.) sağlandı ve kesim yapıldı. Etidyum bromür ile boyanan % 3 lük nusieve agaroz jel elektroforezinde DNA kesim ürünleri gözlemlendi. Kesim sonucunda timin nükleotidine değişimi olmayan (normal) bireylerde 175 bp'lik tek bant, tek allelinde değişimi olan (heterozigot) bireylerde 175, 150 ve 25 bp'lik üç bant, her iki allelinde değişim görülen (homozigot) bireylerde 150 ve 25 bp'lik 2 bant izlendi.

Tablo 3.9. *Bst*UI restriksiyon enzimi için hazırlanan reaksiyon ortamı

Malzemeler	Miktar (µL)
Distile su	6,5
PCR ürünü	15
Tampon	2,5
Enzim (<i>Bst</i> UI)	1 (10 ünite)

Toplam hacim 25 µL olacak şekilde hazırlanan reaksiyon ortamı 16 saat 65 °C'de inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.2. *Bst*UI restriksiyon enziminin kesim bölgesi

3.5.4.3. *Bg*III restriksiyon enzim analizi

VEGF (-1540 C/A) polimorfizmi taşıyan DNA örneklerinde Sitozinden Adenine (C→A) bir nükleotit değişimi vardır. *Bg*III enzimi nükleotit değişikliğini tanır ve DNA'yı o bölgeden keser (Şekil 3.3) Sitozinden adenine (C→A) bir nükleotit değişimi yoksa DNA'da *Bg*III enziminin tanıma bölgesi bulunmaz.

PCR ile çoğaltılan polimorfizmi içeren 297(315) baz çiftlik DNA bölgesi için *BgIII* restriksiyon enzimi kullanılarak uygun reaksiyon ortamı (Tablo 3.10.) sağlandı ve kesim yapıldı. Etidyum bromür ile boyanan % 3'lük nuSieve agaroz jel elektroforezinde DNA kesim ürünleri gözlemlendi. Kesim sonucunda sitozin nükleotidine değişimi olmayan (normal) bireylerde 297(315) bç'lik tek bant, tek allelinde değişimi olan (heterozigot) bireylerde 297(315) , 197(215) ve 100 bç'lik üç bant, her iki allelinde değişim görülen (homozigot) bireylerde 197(215) ve 100 bç'lik 2 bant izlendi.

Tablo 3.10. *BgIII* restriksiyon enzimi için hazırlanan tepkime ortamı

Malzemeler	Miktar (μL)
Distile su	6,5
PCR ürünü	15
Tampon	2,5
Enzim (<i>BgIII</i>)	1 (10 ünite)

Toplam hacim 25 μL olacak şekilde hazırlanan reaksiyon ortamı 16 saat 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.3. *BgIII* restriksiyon enziminin kesim bölgesi

3.5.4.4 VEGF (-1512Ins18) polimorfizminin belirlenmesi

PCR sonucu insersiyon polimorfizmi olanlarda 297 bç'lik bölge çoğalırken, normal bireylerde 315 bç'lik bölge çoğaldı. NuSieve agaroz jelde normal bireylere ait bantlar üst bölgede, polimorfik bireylere ait bantlar daha alt bölgede görüldü.

3.5.5. Agaroz jel elektroforezi

Kontrol ve hastaların VEGF geninin polimorfizm içeren PCR ürünleri amplifikasyon ve kontaminasyon açısından ve restriksiyon enzim kesim ürünleri

homozigot, heterozigot ve polimorfizm taşımama açısından %2'lik agaroz jel elektroforezine uygulanarak değerlendirildi.

1 x TBE (54 g Tris, 27,5 g Borat, 20 ml 0,5 M EDTA) tamponu içinde %2'lik agaroz jel hazırlandı. 1µg/ml etidyum bromür eklendi ve homojen dağılması için karıştırıldı. 8 x 8 cm² boyutlarındaki elektroforez plağına hava kabarcığı olmayacak şekilde döküldü. Oda sıcaklığında 45 dk jelin polimerize olması için beklendi. 8 µl PCR ürününden alındı ve 2 µl *loading* (yükleme) (bromofenol mavisi 2,5 mg/ml) tamponu eklendi. 10 x 20 cm² boyutlarındaki elektroforez tankı 1xTBE tamponu ile dolduruldu. Hazırlanan örnekler jeldeki çukurlara uygulandı. Oda sıcaklığında 100 V'da bromfenol mavisi jelde yeterli seviyeye gelinceye kadar elektroforez uygulandı. Elektroforez plağından çıkarılan jeldeki bantlar UV transilluminatör ile gözlemlendi.

3.5.6. NuSieve agaroz jel elektroforezi

Küçük bç'lik DNA bantlarının daha iyi ayrılabilmesi için %3'lük NuSieve agaroz jel elektroforezi yapıldı. 1xTBE tamponu içinde %3'lük NuSieve agaroz jel hazırlandı. Agaroz jel elektroforezinde anlatıldığı şekilde elektroforez yöntemi uygulandı.

3.5.7. VEGF Ölçümü

Serum VEGF düzeyi Boster marka Human VEGF kiti kullanılarak ELISA yöntemiyle ölçüldü. Tüm ölçümler iki kez tekrarlandı ve ortalamaları alınarak değerlendirmeler yapıldı.

3.5.8. VEGFR-1 Ölçümü

Serum VEGFR-1 düzeyi Boster marka Human VEGFR-1 kiti kullanılarak ELISA yöntemiyle ölçüldü. Tüm ölçümler iki kez tekrarlandı ve ortalamaları alınarak değerlendirmeler yapıldı.

3.5.9. VEGFR-2 Ölçümü

Serum VEGFR-2 düzeyi Boster marka Human VEGFR-2 kiti kullanılarak ELİSA yöntemiyle ölçüldü. Tüm ölçümler iki kez tekrarlandı ve ortalamaları alınarak değerlendirmeler yapıldı.

3.5.10. İstatistiksel Yöntem

İstatistiksel analizler IBM SPSS for Windows Version 21.0 paket programında, haplotip analizleri ise Haplotype Analysis v1.04 programında yapıldı. Sayısal değişkenler ortalama \pm standart sapma, kategorik değişkenler ise sayı ve yüzde ile gösterildi. Hasta ve kontrol grubunun yaş bakımından farklı olup olmadığı bağımsız gruplarda t testi ile verildi. Kategorik değişkenler arasında ilişki olup olmadığı ki kare testi veya Fisher kesin test ile incelendi. Serum VEGF, VEGFR-1 ve VEGFR-2 düzeylerinin çalışma grupları ve haplotip grupları arasında farklı olup olmadığı Mann Whitney U veya Kruskal Wallis testi ile belirlendi. Genotip dağılımlarının hastalık üzerine etkisi yaş ve cinsiyete göre düzeltme yapılarak çoklu lojistik regresyon analizi ile araştırıldı. Genotip dağılımlarının Hardy Weinberg eşitliğine uyup uymadığı ki kare testi ile incelendi. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. Hasta ve kontrol grubunun özellikleri

Bu çalışmaya 100 hasta ve 100 kontrol grubu dahil edildi. Kontrol ve çalışma grubunu oluşturan bireylerin yaş, cinsiyet sayıları ve yaş ortalamalarının benzer olmasına dikkat edildi. Hasta ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet dağılımı Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubunda yaş ve cinsiyet dağılımı

	Kontrol (n=100)	Hasta (n=100)	İstatistik	p
Yaş	40,8±13,4	40,7±13,8	t=0,057	0,955
Cinsiyet (E/K)	51/49	51/49	X ² =0,0	1,000

Çalışmaya alınan hasta grubu; PASI skoru, psöriazis tipi (Tip I-Tip II), aile öyküsü, tedaviye yanıt, NSAID kullanımı, sigara içiciliği, hastalık aktivitesi açısından sorgulanmış ve dağılımları Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

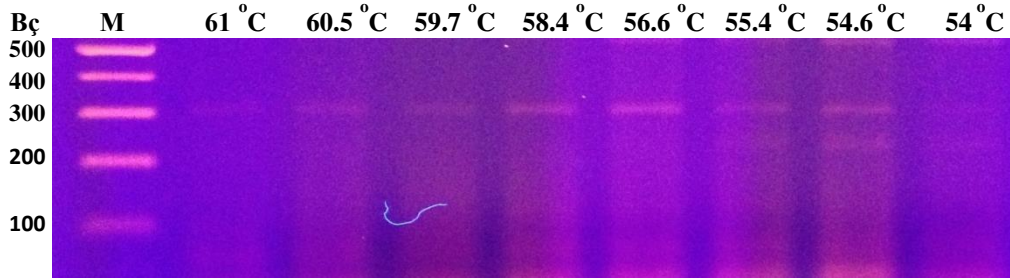
Tablo 4.2. Hasta grubunun özellikleri

		Sayı
Hastalık Şiddeti (PASI'ne göre)	Hafif	22
	Orta	61
	Şiddetli	17
Tip	I	78
	II	22
Aile öyküsü	Yok	60
	Var	40
Tedaviye yanıt	Yok	27
	Var	73
Sigara	Hiç içmemiş	37
	Eski içici	24
	Aktif içici	39
Aktivite	Aktif	48
	Kısmi remisyon	32
	Tam remisyon	20
NSAID Kullanımı	<ayda 1	59
	Ayda 1-3 kez	26
	Haftada 1-3 kez	9
	>haftada 3 kez	6

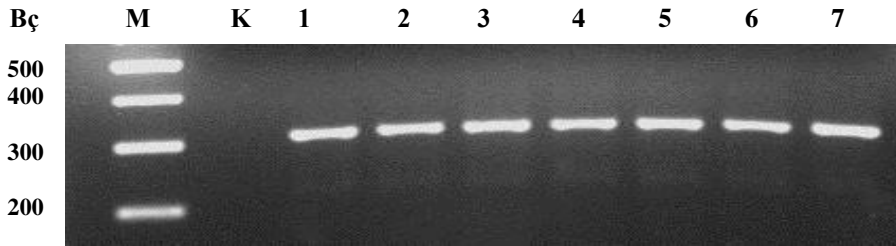
4.2. VEGF Polimorfizm Sonuçları

4.2.1. VEGF (+405 C/G) Polimorfizmi

Gradient PCR yöntemi ile özgün primerlerin DNA'ya bağlandığı optimum sıcaklık 58°C olarak belirlendi (Şekil 4.1). PCR ile polimorfizmi içeren 304 bç'lik DNA bölgesi hasta ve kontrol grubunda saf ve özgün olarak elde edildi (Şekil 4.2).

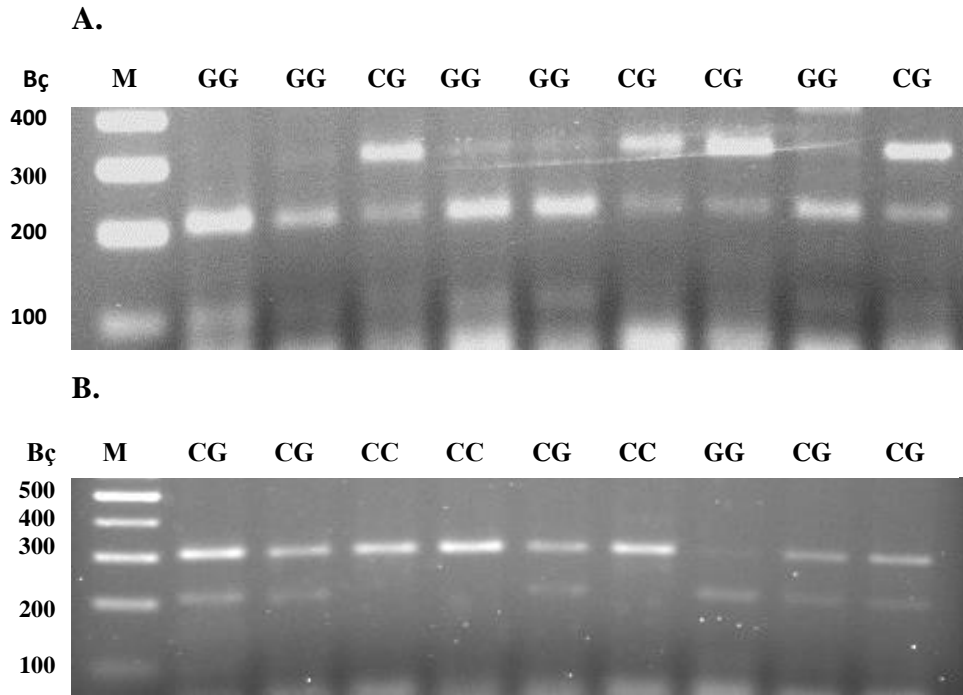


Şekil 4.1. VEGF (+405 C/G) polimorfizmi için farklı sıcaklıklarda yapılan *gradient* PCR görüntüsü. bç: bazçifti, M: DNA belirteci



Şekil 4.2. VEGF (+405 C/G) polimorfizmi PCR görüntüsü. bç: bazçifti, M: DNA belirteci, K: kör, 1-7: hasta örnekleri.

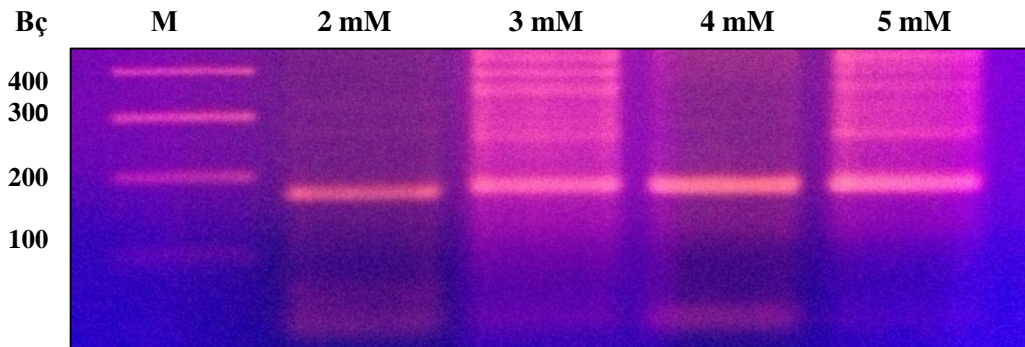
BsmfI restriksiyon enzim analizi sonucunda polimorfizm taşımayan (CC) (normal) bireylerde 304 bç'lik tek bant, heterozigot (CG) bireylerde 304, 193 ve 111 bç'lik üç bant, homozigot (GG) bireylerde 193 ve 111 bç'lik 2 bant izlendi (Şekil 4.3.A ve B).



Şekil 4.3. VEGF (+405 C/G) polimorfizmi *BsmfI* restriksiyon enzim analizi. bç: bazçifti, M: DNA belirteci, CC: polimorfizm taşımayan (normal), CG: heterozigot, GG: homozigot.

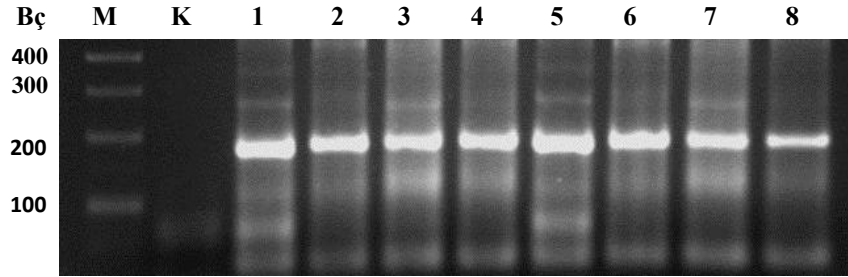
4.2.2. VEGF (-460 T/C) Polimorfizmi

Polimorfizmi içeren 175 bç'lik DNA saf ve özgün olarak optimum 2 mM Mg^{++} derişimi içeren PCR tepkimesinde elde edildi (Şekil 4.4).



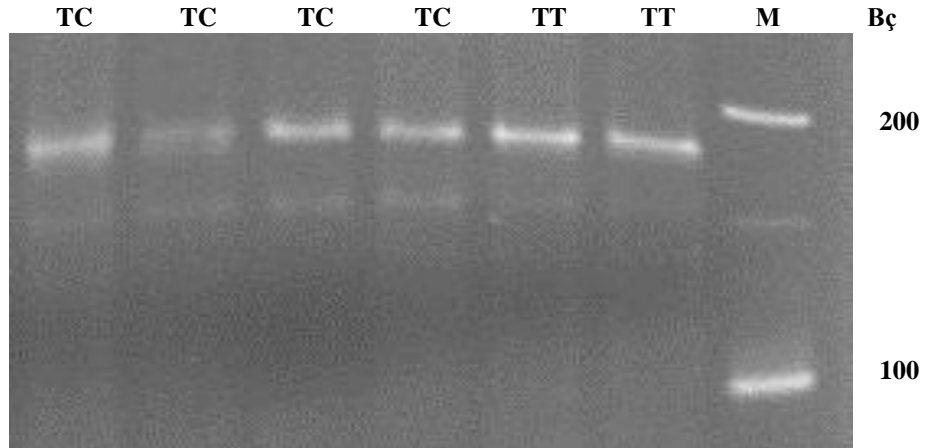
Şekil 4.4. VEGF (-460 T/C) polimorfizmi için farklı Mg konsantrasyonlarında yapılan PCR görüntüsü. bç: bazçifti, M: DNA belirteci. 2 mM Mg^{++} derişiminde 175 bç'lik bölgenin tek bant olarak çoğaldığı görülmektedir.

Hasta ve kontrol grubunda PCR ile polimorfizmi içeren 175 bç'lik DNA bölgesi çoğaltıldı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. VEGF (-460 T/C) polimorfizmi PCR görüntüsü. bç: bazçifti, M: DNA belirteci, K: kör, 1-8: hasta örnekleri.

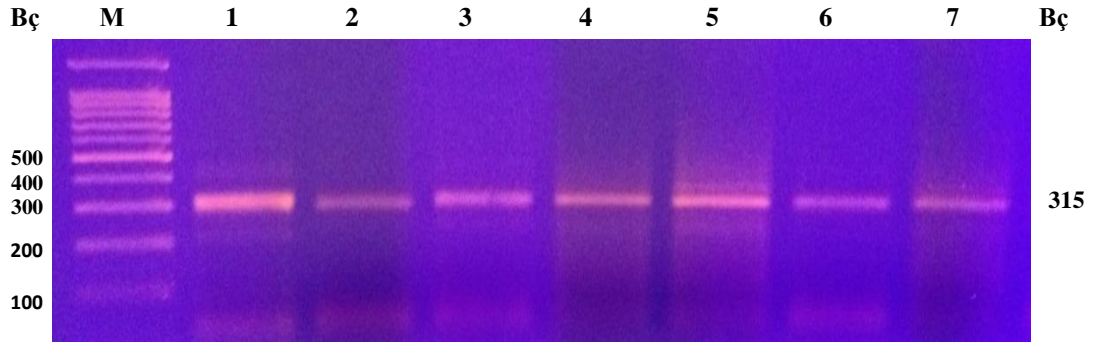
*Bst*UI restriksiyon enzim analizi sonucunda polimorfizm taşımayan (TT) (normal) bireylerde 175 bç'lik tek bant, heterozigot (TC) bireylerde 175, 150 ve 25 bç'lik üç bant, homozigot (CC) bireylerde 150 ve 25 bç'lik 2 bant izlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. VEGF (-460 T/C) polimorfizmi *Bst*UI restriksiyon enzim analizi. bç: bazçifti, M: DNA belirteci, TT: polimorfizm taşımayan (normal), TC: heterozigot.

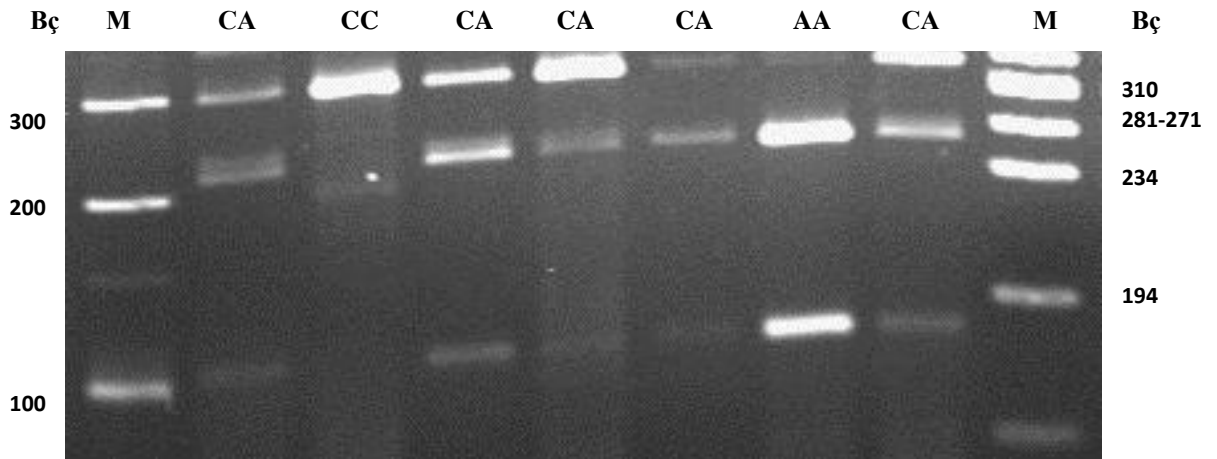
4.2.3. VEGF (-1540 C/A) Polimorfizmi

Hasta ve kontrol grubunda PCR ile polimorfizmi içeren 297 (315) bç'lik DNA bölgesi çoğaltıldı (Şekil 4.7)



Şekil 4.7. VEGF (-1540 C/A) polimorfizmi PCR görüntüsü. bç: bazçifti, M: DNA belirteci, 1-7: hasta örnekleri.

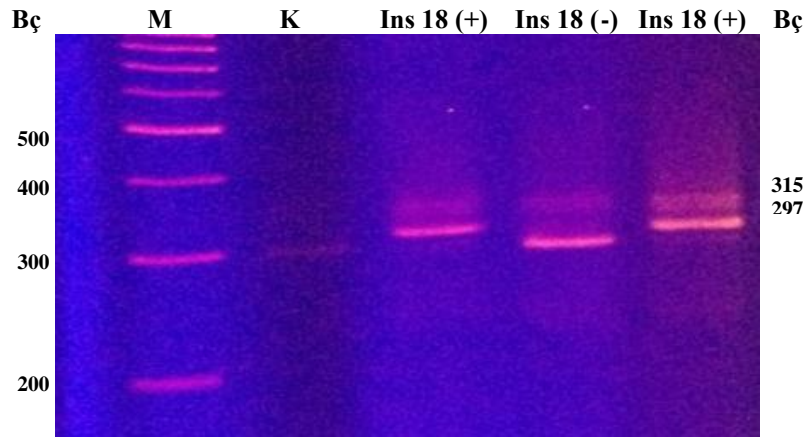
BgIII restriksiyon enzim analizi sonucunda polimorfizm taşımayan (CC) (normal) bireylerde 297 (315) bç'lik bant, heterozigot (CA) bireylerde 297 (315), 197 (215) ve 100 bç'lik bantlar, homozigot (AA) bireylerde 197 (215) ve 100 bç'lik bantlar izlendi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. VEGF (-1540 C/A) polimorfizmi *BgIII* restriksiyon enzim analizi. bç: bazçifti, M: DNA belirteci, CC: polimorfizm taşımayan (normal), CA: heterozigot, AA: homozigot.

4.2.4. VEGF (-1512Ins18) polimorfizmi

Hasta ve kontrol grubunda PCR ile 18 bç'lik insersiyon (Ins18) polimorfizmi tanımlandı. Polimorfizmi taşıyan bireylerde 315 bç'lik, polimorfizm taşımayan bireylerde 297 bç'lik bantlar gözlemlendi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. VEGF (-1512Ins18) polimorfizmi analizi. bç: bazçifti, M: DNA belirteci, K: kör. Ins 18 (+): polimorfizm taşıyan, Ins 18 (-): polimorfizm taşımayan (Normal)

4.3. VEGF genotip dağılımı

VEGF (+405 C/G) polimorfizmi için, psöriazisli hasta grubunda homozigotluk (GG) ve heterozigotluk (CG) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0,001$). Bu bölgede allel frekansına bakıldığında, hastalarda G allel sıklığının ve kontrollerde C allel sıklığının yüksek olduğu görüldü ($p<0,001$). Bu polimorfizm için homozigotluk, psöriazis hastalık riskini yaklaşık 9 kat artırmaktadır ($p<0,001$). Tahmini risk (Odds ratio, OR) 9,40 bulunmuştur. Heterozigotluk, psöriazis hastalık riskini yaklaşık 7 kat artırmaktadır ($p<0,001$). Tahmini risk (Odds ratio, OR) 7,02 bulunmuştur.

VEGF (-1540 C/A) polimorfizmi için psöriazisli hasta grubunda heterozigotluk (AC), kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p<0,002$). Bu bölgede allel frekansına bakıldığında, hastalarda A allel sıklığı, kontrollerde ise C allel sıklığı yüksek gözlemlendi ($p<0,002$). Bu polimorfizm için heterozigotluk, psöriazis

hastalık riskini yaklaşık 2.5 kat artırmaktadır ($p<0,001$). Tahmini risk (Odds ratio, OR) 2,51 bulunmuştur.

VEGF (-1512Ins18) polimorfizmi değerlendirildiğinde, hastalarda 18 bç'lik insersiyonun kontrol grubuna göre yüksek olduğu, kontrol grubunda ise normal bireylerin daha yüksek olduğu bulundu ($p<0,001$). 18 bç'lik insersiyon polimorfizminin, psöriazis hastalık riskini yaklaşık 4 kat artırdığı gözlemlendi ($p<0,001$). Tahmini risk (Odds ratio, OR) 4,10 bulunmuştur.

VEGF (-460 T/C) polimorfizmi için heterozigot (TC)'luk kontrol grubunda sınırdan yüksek bulundu ($p=0,005$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Hasta ve kontrol gruplarında VEGF polimorfizmleri dağılımı

		Kontrol (n=100)	Hasta (n=100)	İstatistik	P	OR (%95 CI)	P (Multivariate)
VEGF (+405 C/G)	Normal (CC)	73	26	$X^2=44,401$	$<0,001^*$	9,40 (4,25 – 20,79)	$<0,001$
	Homozigot (GG)	13	40				
	Heterozigot (CG)	14	34				
	C alleli	160	86	$X^2=57,819$	$<0,001^*$		
	G alleli	40	114				
VEGF (-460 T/C)	Normal (TT)	75	86	$X^2=3,185$	0,074	0,48 (0,23 – 1,00)	0,05
	Heterozigot (CT)	25	14				
	T alleli	175	186	$X^2=2,841$	0,092		
	C alleli	25	14				
VEGF (-1540 C/A)	Normal (CC)	78	57	$X^2=12,741$	0,002*	2,51 (1,34 – 4,68)	0,004
	Homozigot (AA)	-	3				
	Heterozigot (AC)	22	40				
	C alleli	178	154	$X^2=9,373$	0,002*		
	A alleli	22	46				
VEGF (-1512Ins18)	Normal	72	39	$X^2=22,047$	$<0,001^*$	4,10 (2,26 – 7,47)	$<0,001$
	Ins18	28	61				

Normal grup referans olarak alınmıştır.

4.4. VEGF haplotipleri ve Hardy -Weinberg dengesi

Hasta ve kontrol gruplarında haplotip dağılımına bakıldığında; tüm genlerin normal olma durumu en yüksek kontrol grubunda bulunurken, hastalarda ise en sık VEGF (+405 C/G) homozigot + VEGF (-1512Ins18) haplotipi görüldü (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. En sık gözlenen haplotipler

	Kontrol (n=100)	Hasta (n=100)	P
Normal (tüm genler)	45	3	<0,001
VEGF(-1512 Ins18)	22	13	0,094
VEGF (-1540 C/A) heterozigot	4	3	0,700
VEGF (+405 C/G) heterozigot	3	4	0,700
VEGF(+405 C/G) heterozigot + VEGF (-1512 Ins18)	-	13	0,002
VEGF(+405 C/G) heterozigot + VEGF (-1540 C/A) heterozigot	-	9	0,002
VEGF(+405 C/G) heterozigot + VEGF (-1540 C/A) heterozigot + VEGF (-1512 Ins18)	-	6	0,013
VEGF(+405 C/G) heterozigot + VEGF (-460 T/C) heterozigot + VEGF (-1540 C/A) heterozigot	6	1	0,054
VEGF(+405 C/G) homozigot + VEGF (-1512 Ins18)	-	16	<0,001
VEGF405 homozigot + VEGF (-1540 C/A) heterozigot	-	9	0,002
VEGF(+405 C/G) homozigot + VEGF (-460 T/C) heterozigot + VEGF (-1540 C/A) heterozigot	7	3	0,194

Psöriazisli hasta ve kontrol grubunda tüm lokuslar için Hardy-Weinberg dengesi değerlendirildiğinde eşitlik VEGF (+405 C/G) polimorfizmi için kontrol grubunda ($p<0,001$), VEGF (-1512 Ins18) polimorfizmi için hastalar grubunda ($p<0,001$) anlamlı ölçüde bozulmaktadır (Tablo4.5.).

Tablo 4.5. Hasta ve kontrol gruplarının Hardy-Weinberg Dengesi

		Kontrol (n=100)	HW sonuç	Hasta (n=100)	HW sonuç
VEGF (+405 C/G)	Normal (CC)	73	$X^2=31,6$ $p<0,001$	26	$X^2=9,4$ $p=0,002$
	Homozigot (GG)	13		40	
	Heterozigot (CG)	14		34	
VEGF (-460 T/C)	Normal (TT)	75	$X^2=2,041$ $p=0,1531$	86	$X^2=0,567$ $p=0,4516$
	Heterozigot (CT)	25		14	
VEGF (-1540 C/A)	Normal (CC)	78	$X^2=1,528$ $p=0,2165$	57	$X^2=1,672$ $p=0,1960$
	Homozigot (AA)	-		3	
	Heterozigot (AC)	22		40	
VEGF (-1512 Ins18)	Normal	72	$X^2=2,650$ $p=0,1035$	39	$X^2=19,26$ $p<0,001$
	Ins18	28		61	

4.5. Psöriazis Kliniği ve VEGF Genotipleri ilişkisi

Çalışmamızda hastalık tipi (Tip I - Tip II) ile genotip arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo.4.6).

Tablo 4.6. Hastalık tipinin VEGF genotip dağılımları ile ilişkisi

		Tip I (n=78)		Tip II (n=22)		İstatistik	P
		Sayı	%	Sayı	%		
VEGF (+405 C/G)	Normal (CC)	18	69,2	8	30,8	$X^2=5,610$	0,060
	Homozigot (GG)	36	90,0	4	10,0		
	Heterozigot (CG)	24	70,6	10	29,4		
VEGF (-460 T/C)	Normal (TT)	68	79,1	18	20,9	-	0,502
	Heterozigot (CT)	10	71,4	4	28,6		
VEGF (-1540 C/A)	Normal (CC)	48	84,2	9	15,8	$X^2=2,971$	0,226
	Homozigot (AA)	2	66,7	1	33,3		
	Heterozigot (AC)	28	70,0	12	30,0		
VEGF (-1512 Ins18)	Normal	31	79,5	8	20,5	$X^2=0,002$	0,968
	Ins18	47	77,0	14	23,0		

Hastalık şiddeti (PASI'ye göre) (Tablo4.7) ve tedaviye yanıt (Tablo 4.8) ile VEGF genotip dağılımları arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Aile öyküsü ile genotip ilişkisine bakıldığında VEGF (+405 C/G) polimorfizmi için, psöriazisli hasta grubunda homozigot (GG)'luk kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p=0,044$) (Tablo 4.9.).

Tablo 4.7. Hastalık şiddetinin (PASI'ye göre) VEGF genotip dağılımları ile ilişkisi

		Hafif (n=22)		Orta (n=61)		Şiddetli (n=17)		İstatistik	p
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%		
VEGF (+405 C/G)	Normal (CC)	3	11,5	19	73,1	4	15,4	$X^2=5,844$	0,211
	Homozigot (GG)	13	32,5	22	55,0	5	12,5		
	Heterozigot (CG)	6	17,6	20	58,8	8	23,5		
VEGF (-460 T/C)	Normal (TT)	18	20,9	54	62,8	14	16,3	$X^2=0,830$	0,660
	Heterozigot (CT)	4	28,6	7	50,0	3	21,4		
VEGF (-1540 C/A)	Normal (CC)	13	22,8	33	57,9	11	19,3	$X^2=3,361$	0,499
	Homozigot (AA)	-	-	3	100,0	-	-		
	Heterozigot (AC)	9	22,5	25	62,5	6	15,0		
VEGF (-1512 Ins18)	Normal	6	15,4	28	71,8	5	12,8	$X^2=3,150$	0,207
	Ins18	16	26,2	33	54,1	12	19,7		

Tablo 4.8. Tedavi yanıtın VEGF genotip dağılımları ile ilişkisi

		Tedaviye yanıt yok (n=27)		Tedaviye yanıt var (n=73)		İstatistik	p
		Sayı	%	Sayı	%		
VEGF (+405 C/G)	Normal (CC)	11	42,3	15	57,7	$X^2=5,703$	0,058
	Homozigot (GG)	11	27,5	29	72,5		
	Heterozigot (CG)	5	14,7	29	85,3		
VEGF (-460 T/C)	Normal (TT)	22	25,6	64	74,4	$X^2=4,638$	0,098
	Heterozigot (CT)	5	35,7	9	64,3		
VEGF (-1540 C/A)	Normal (CC)	18	31,6	39	68,4	$X^2=0,879$	0,349
	Homozigot (AA)	2	66,7	1	33,3		
	Heterozigot (AC)	7	17,5	33	82,5		
VEGF (-1512 Ins18)	Normal	8	20,5	31	79,5	$X^2=0,879$	0,349
	Ins18	19	31,1	42	68,9		

Tablo 4.9. Aile öyküsünün VEGF genotip dağılımları ile ilişkisi

		Aile öyküsü yok (n=60)		Aile öyküsü var (n=40)		İstatistik	p
		Sayı	%	Sayı	%		
VEGF (+405 C/G)	Normal (CC)	18	69,2	8	30,8	X ² =6,261	0,044
	Homozigot (GG)	18	45,0	22	55,0		
	Heterozigot (CG)	24	70,6	10	29,4		
VEGF (-460 T/C)	Normal (TT)	51	59,3	35	40,7	X ² =0,003	0,953
	Heterozigot (CT)	9	64,3	5	35,7		
VEGF (-1540 C/A)	Normal (CC)	34	59,6	23	40,4	X ² =0,976	0,614
	Homozigot (AA)	1	33,3	2	66,7		
	Heterozigot (AC)	25	62,5	15	37,5		
VEGF (-1512 Ins18)	Normal	22	56,4	17	43,6	X ² =0,343	0,558
	Ins18	38	62,3	23	37,7		

4.6. VEGF haplotipleri ve serum VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2 düzeyleri ilişkisi

Çalışmamızda serum VEGF düzeyi ile haplotip arasındaki ilişki değerlendirildi. Buna göre genotipi normal bireylerde; hasta grubunda VEGF düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu ($p=0,048$). Bunun yanında VEGF düzeyi ile diğer haplotipler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. VEGF değerlerinin (pg/ml) haplotip ve çalışma gruplarında karşılaştırılması

	Kontrol		Hasta		Gruplar arası karşılaştırma p
	Ort.±SS	Median [Min – Maks]	Ort.±SS	Median [Min – Maks]	
Normal	148,5±50,2	148,4 [69,4 – 213,6]	307,6±108,6	316,9 [194,7 – 411,2]	0,048
VEGF1512 Ins18	132,7±34,3	129,6 [78,4 – 192,7]	392,5±701,9	207,7 [68,0 – 2378,3]	0,278
VEGF405 heterozigot	260,3±162,3	197,0 [139,2 – 444,7]	187,7±159,8	180,0 [33,7 – 357,0]	0,629
VEGF405 heterozigot + VEGF1512 Ins18	-	-	168,4±94,1	142,3 [79,8 – 365,1]	
VEGF405 heterozigot + VEGF1540 heterozigot + VEGF1512 Ins18	-	-	207,0±165,3	173,8 [59,2 – 495,2]	
VEGF405 homozigot + VEGF1512 Ins18	-	-	177,7±76,5	175,8 [49,1 – 306,3]	
VEGF405 homozigot + VEGF1540 heterozigot	-	-	219,7±43,8	237,7 [148,4 – 264,5]	
VEGF405 homozigot + VEGF460 heterozigot + VEGF1540 heterozigot	164,7±92,2	143,9 [96,5 – 367,2]	177,0±87,8	193,2 [82,2 – 255,5]	0,833
Haplotipler arası karşılaştırma p	0,364		0,701		

Psöriazisli hasta ve kontrol grubunda serum VEGFR1 düzeyi ile haplotip arasındaki ilişki değerlendirildiğinde; haplotipler arası anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 4.11). Aynı şekilde serum VEGFR2 düzeyi ile haplotipler arasında anlamlı bir farklılık görülmedi (Tablo 4.12).

Tablo 4.11. VEGFR1 değerlerinin (pg/ml) haplotip ve çalışma gruplarında karşılaştırılması

	Kontrol		Hasta		Gruplar arası karşı. p
	Ort.±SS	Median [Min – Maks]	Ort.±SS	Median [Min – Maks]	
Normal	2043,4±1571,1	1980,5 [308,0 – 4337,0]	2593,6±214,0	2619,6 [2367,8 – 2793,5]	0,714
VEGF1512 Ins18	2299,8±1500,1	2592,6 [432,0 – 3804,4]	2568,8±810,2	2610,9 [1406,3 – 3543,4]	1,000
VEGF405 heterozigot + VEGF1512 Ins18	-	-	2850,6±971,2	3190,2 [1231,5 – 3967,4]	
VEGF405 homozigot + VEGF1512 Ins18	-	-	2377,3±1083,5	2951,2 [623,2 – 3206,6]	
VEGF405 homozigot + VEGF1540 heterozigot	-	-	2672,3±554,8	2679,4 [2031,3 – 3369,2]	
Toplam	2171,6±1470,6	2478,5 [308 – 4337]	2613,0±790,3	2782,6 [623,2 – 3967,4]	0,389
Haplotipler arası p	0,818		0,897		

Tablo 4.12. VEGFR2 değerlerinin (pg/ml) haplotip ve çalışma gruplarında karşılaştırılması

	Kontrol		Hasta		Gruplar arası karşı. p
	Ort.±SS	Median [Min – Maks]	Ort.±SS	Median [Min – Maks]	
Normal	10217,2±7855,3	9902,3 [1540 – 21685]	14602,6±10730,2	12591,5 [5020,2 – 26196]	0,714
VEGF 1512 Ins18	11498,9±7500,6	12963,2 [2160 – 19022]	8774,2±2991,4	8971,6 [5066,9 – 13073,5]	0,445
VEGF405 heterozigot + VEGF1512 Ins18	-	-	12032,8±2849,5	12396,8 [6693 – 15000]	
VEGF405 homozigot + VEGF1512 Ins18	-	-	10439,8±2240,4	10266,9 [7011,2 – 14013,5]	
VEGF405 homozigot + VEGF1540 heterozigot	-	-	10920,6±2179,6	11204 [7326 – 13486]	
Toplam	10858±7353,1	12392,5 [1540 – 21685]	10913,8±4105,7	10814,3 [5020,2 – 26196]	0,827
Haplotipler arası p	0,818		0,355		

Serum VEGF, VEGFR1, VEGFR2 düzeyleri haplotipten bağımsız olarak değerlendirildiğinde; psöriazli hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmedi (Tablo4.13.).

Tablo 4.13. Hasta ve kontrol gruplarının VEGF, VEGFR1, VEGFR2 düzeyleri

	Birim	Kontrol		Hasta		Gruplar arası karşı. p
		Ort.±SS	Median [Min – Maks]	Ort.±SS	Median [Min – Maks]	
VEGF	pg/ml	160,8±82,5	140,2 [69,4 – 444,7]	232,9±310,3	199,2 [33,7 – 2378,3]	0,095
VEGFR1	pg/ml	2171,6±1470,6	2478,5 [308 – 4337]	2613,0±790,3	2782,6 [623,2 – 3967,4]	0,389
VEGFR2	pg/ml	10858±7353,1	12392,5 [1540 – 21685]	10913,8±4105,7	10814,3 [5020,2 – 26196]	0,827

5. TARTIŞMA

Psöriazis kronik seyirli ve tekrarlayıcı, multifaktöriyel etiyojolojiye sahip bir deri hastalığıdır. Hastalık genetik yatkınlık zemininde infeksiyon, emosyonel stres ve çevresel faktörlerin etkisiyle tetiklenir.

Psöriazis poligenik ve kompleks bir kalıtım gösteren bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda psöriazisin ailesel geçiş gösterdiği kanıtlanmıştır (10-13). Psöriazis ile ilişkili en güçlü genetik birliktelik kromozom 6p21.3'de yerleşmiş MHC bölgesinde PSORS (*psoriasis susceptibility*) 1 lokusudur. PSORS 1 lokusunda HLA, CDSN (*corneodesmosin*), HCR (*alpha-helix coiled-coil rod homolog*) ve VEGF genleri bulunur (91). Bu gen bölgesinin psöriazis gelişiminde en önemli genetik lokus olduğu kabul edilmektedir.

Psöriazis patogeneğinde neovaskülarizasyon önemli bulgulardan biridir ve VEGF anjiyogenik faktör olarak anahtar rol almaktadır (87-89). VEGF geni, en az 25 çeşit polimorfizm içeren bir gendir (79). VEGF fonksiyonel polimorfizmlerinin psöriazis hastalarında görülen mikrovasküler değişiklikler (dilatasyon, geçirgenlik artışı, entotel hücre proliferasyonu) ve anjiogenez için genetik bir regülatör ya da moleküler biyokimya için bir belirteç olabileceği düşünülmektedir. Şimdiye kadar literatürde VEGF polimorfizmlerinin psöriazisle ilişkisini gösteren toplam 7 adet çalışma mevcuttur fakat sonuçlar farklılık göstermekte ve çelişkilidir. Bu çalışmada Türk popülasyonunda psöriazise duyarlılığın (farklı klinik tiplerinin), VEGF (+405C/G), VEGF (-460T/C), VEGF (-1540C/A) ve VEGF (-1512Ins18) gen polimorfizmleri ile ilişkisini açığa çıkarmayı ve bu genetik varyasyonların serum VEGF, VEGF reseptör 1 (flt-1) ve VEGF reseptör 2 (KDR) protein düzeyine etkilerini analiz etmeyi amaçladık.

Çalışmamıza, yaş ve cinsiyet uyumluluğuna dikkat edilerek klinik olarak psöriazis tanısı konmuş 100 hasta ve ailesinde psöriazis öyküsü olmayan 100 erişkin dahil edildi. Çalışmamızda güçlü *linkage disequilibrium*a sahip VEGF polimorfizmleri seçilmiştir.

Yaptığımız çalışmada VEGF (+405 C/G) polimorfizmi homozigot (GG) ve heterozigot (CG)'luğun psöriazis için bir risk faktörü olabileceği tespit edildi. Bu bölgede homozigotluk hastalık riskini tahmini olarak yaklaşık 9 kat [OR (tahmini risk): 9,40; %95 CI (güven aralığı): 4,25 – 20,79; p<0,001), heterozigotluk hastalık

riskini tahmini olarak yaklaşık 7 kat (OR: 7,02; %95 CI: 3,24 – 15,23; $p < 0,001$) artırmaktadır. Psöriazisli hasta grubunda polimorfizm G allel sıklığı anlamlı derecede yüksek bulundu. G alleli varlığının psöriazis ile ilişkili olduğu sonucuna varıldı. G alleli taşıyan bireylerin psöriazis etiyolojisindeki diğer etkenlerle birlikte psöriazise yatkınlığı artırdığı söylenebilir. Wang Z. ve ark. (92) VEGF (+405 C/G) homozigot (GG) ve heterozigotluğun (CG), Wongpiyabovorn J. ve ark. (86) heterozigotluğun (CG) psöriazise yatkınlığı artırdığını göstermişlerdir ve sonuçları bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. Fakat İngiliz populasyonunda VEGF (+405 C/G) polimorfizmi için CC birlikteliğinin erken başlangıçlı psöriaziste risk faktörü olarak tespit edilmiştir (80-93). Değişik populasyonlarda yapılan az sayıdaki çalışmalarda çelişkili sonuçlar gözlenmektedir. Bu farklılığın etnik kökenden ileri geldiği düşünülmektedir. Bu çalışma ile Türk populasyonunda VEGF (+405 C/G) polimorfizmi homozigotluk (GG) ve heterozigotluk (CG) psöriazis için bir risk faktörü olarak değerlendirilebilir.

Hardy-Weinberg dengesi değerlendirildiğinde eşitliğin VEGF (+405 C/G) polimorfizmi için kontrol ($p < 0,001$) ve hasta ($p = 0,002$) grubunda anlamlı ölçüde bozulduğu gözlenmiştir. Bir populasyonda Hardy-Weinberg dengesi şu varsayımlar söz konusu olduğunda geçerlidir: 1) bir populasyonda göç olmaması, 2) populasyondaki birey sayısı sınırsız büyük olacak, 3) mutasyonların olmaması, 4) herhangi bir genotipin diğerine üstünlüğünün olmaması, 5) nesillerin örtüşmemesi, 6) cinsiyetlerdeki allel sıklıklarının eşit olması, 7) bireylerin diploid olması, 8) eşleşmelerin rasgele, eş seçiminin bağımsız olması. Doğada bu varsayımları bir nesil dahi sağlayan bir populasyon yoktur. Evrimsel güçler bu varsayımlardan en az birinin bozulmasına sebep olmaktadır. VEGF (+405 C/G) polimorfizmi için Hardy-Weinberg dengesinin anlamlı derecede bozulması Türk populasyonunda bu varsayımları bozan evrimsel güçlerin büyüklüğünü göstermektedir. Varsayımlar sağlanamamaktadır.

Çalışmamızda VEGF (+405 C/G) polimorfizmi genotip dağılımları ile erken başlangıçlı psöriazis Tip I ve geç başlangıçlı psöriazis Tip II ile anlamlı bir ilişki tespit edilemedi. VEGF (+405 C/G) polimorfizmi için psöriazis aile öyküsü olanlarda homozigotluk anlamlı derecede yüksek bulundu.

Tedaviye yanıt ile VEGF (+405 C/G) polimorfizmi genotip dağılımları arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Stefanaki I ve ark'nın (94) 44 psöriazis hastası ile yaptıkları çalışmada bizim sonuçlarımızla benzer şekilde hastalık tipi, aile öyküsü ve tedaviye yanıt ile VEGF (+405 C/G) polimorfizmi arasında bir ilişki tespit edememişlerdir. Çalışmamızda Tip I psöriazis hasta sayısının 78, Tip II psöriazis hasta sayısının 22; aile öyküsü olan hasta sayısının 40, aile öyküsü olmayan hasta sayısının 60; tedaviye yanıt alınamayan hasta sayısının 27, tedaviye yanıt alınan hasta sayısının 73 olması; polimorfizmin 3 farklı genotip dağılımının olması ve p değerlerinin istatistiksel olarak sınırdaki çıkması dikkate alındığında, sonucumuzu gruplardaki hasta sayısı azlığı ile açıklayabiliriz. Hasta ve kontrol gruplarında alt sınıflandırma yapıldığında sayının azalması istatistiksel değerlendirme gücünü zayıflatmaktadır. Her iki klinik tip, aile öyküsü ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde VEGF (+405 C/G) polimorfizmi ile genotip dağılımlarının net ilişkisinin gruplardaki sayının artırılması ile ortaya konulabileceği sonucuna varıldı. Hastalık derecesi (PASI) ile VEGF (+405 C/G) polimorfizmi genotip dağılımları arasında anlamlı bir ilişki tespit edilemedi.

VEGF (-1540 C/A) polimorfizm için heterozigotluğun (AC), psöriazis hastalık riskini yaklaşık 2.5 kat artırdığı tespit edildi [OR (tahmini risk): 2,51; %95 CI (güven aralığı): 1,34 – 4,68; $p < 0,001$]. Bu bölgede allel frekansına bakıldığında, hastalarda A allel sıklığının, kontrollerde ise C allel sıklığının anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0,002$). Kontrol grubunda homozigotluk (CC) rastlanmazken, hasta grubunda sadece 3 hastada tespit edildi. Gruplarda homozigot sayısının çok az olması nedeni ile güçlü bir istatistiksel değerlendirme yapılamadığı ve istatistiksel anlamlı bir fark çıkmadığı düşünüldü. Barile S ve ark.'nın (85) yaptığı çalışmada VEGF (-1540 C/A) polimorfizm homozigotluğunun (AA) geç başlangıçlı Tip II psöriazis ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak A allelinin psöriazis için bir risk faktörü olduğu söylenebilir.

VEGF (-1540 C/A) polimorfizm genotip dağılımları ile hastalık tipleri, derecesi (PASI), aile öyküsü varlığı ve tedaviye yanıt arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Tedaviye yanıt değerlendirmesinde p değerlerinin istatistiksel olarak sınırdaki çıkması dikkate alındığında, net ilişkinin gruplardaki sayının artırılması ile ortaya konulabileceği sonucuna varıldı.

VEGF (-1512Ins18) polimorfizmi değerlendirildiğinde; hastalarda 18 bç'lik insersiyonun kontrol grubuna göre yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0,01$). 18 bç'lik insersiyon polimorfizmi, psöriazis hastalık riskini yaklaşık 4 kat artırmaktadır [OR (tahmini risk): 4,10; %95 CI (güven aralığı): 2,26 – 7,47; $p<0,001$]. Literatürde bu polimorfizm bölgesi için görülen tek çalışmada (81) VEGF (-1512Ins18) polimorfizminin geç başlangıçlı Tip II psöriazis ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir ve bizim sonuçlarımızı desteklemektedir.

Hardy-Weinberg dengesi değerlendirildiğinde eşitlik VEGF (-1512Ins18) polimorfizmi için hasta grubunda ($p<0,001$) anlamlı ölçüde bozulmaktadır. Bu sonuç, VEGF (-1512Ins18) polimorfizmi için Türk populasyonunda Hardy-Weinberg dengesi varsayımlarını bozan evrimsel güçlerin büyüklüğünü göstermektedir. Varsayımlar sağlanamamaktadır.

VEGF (-1512Ins18) polimorfizm genotip dağılımları ile hastalık tipleri, derecesi (PASI), aile öyküsü varlığı ve tedaviye yanıt arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

VEGF (-460 T/C) polimorfizm heterozigot (TC)'luğunun psöriazis riskini 0,5 oranında azalttığı tespit edildi [OR (tahmini risk): 0,48; %95 CI (güven aralığı): 0,23 – 1,00; $p=0,05$]. Polonya populasyonunda (41) 215 kontrol ve 189 hasta ile yapılan çalışmada VEGF (-460 T/C) polimorfizm heterozigot (TC)'luğunun psöriazis riskini azalttığı gösterilmiştir ve bizim sonucumuzu desteklemektedir. Yine aynı çalışma ve Tayland, İngiliz populasyonlarında (84,86) normal (TT) genotipin, psöriazisin erken başlangıçlı tipi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Fakat Barile S ve ark.'nın (85) İtalyan populasyonunda yaptığı çalışmada homozigot (CC)'luğun geç başlangıçlı psöriazis tipi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Literatürde çelişkili sonuçlar etnik farklılıktan kaynaklanabilir. Sonucumuz, literatürdeki 3 çalışma sonucu ile uyumludur ve T allel varlığının psöriazis ile ilişkili olduğu düşünülebilir.

VEGF (-460 T/C) polimorfizm genotip dağılımları ile hastalık tipleri, derecesi (PASI), aile öyküsü varlığı ve tedaviye yanıt arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Çalışmamızda hasta ve kontrol gruplarında risk faktörü olarak tespit edilen VEGF polimorfizm genotiplerinin birlikteliğinin risk faktörü olarak değerlendirilmesi için haplotip analizi yapıldı. Haplotip analizi güçlü *linkage*

*disequilibrium*ya sahip polimorfizmler için yapılmaktadır ve çalışmamızda güçlü *linkage disequilibrium*ya sahip VEGF polimorfizmleri seçilmiştir.

Haplotip analizine göre;

-Hastalarda en sık VEGF (+405 C/G) homozigot + VEGF (-1512Ins18) haplotipi tespit edildi ($p<0,001$).

-Kontrollerde en sık tüm VEGF polimorfizmlerinin normal genotipte olduğu VEGF (+405 C/C) + VEGF (-460 T/T) + VEGF (-1540 C/C) + VEGF (-1512 N/N) haplotipi gözlemlendi ($p<0,001$).

Hastalarda;

- VEGF(+405 C/G) heterozigot + VEGF (-1512 Ins18) haplotipi,

-VEGF405 homozigot + VEGF (-1540 C/A) heterozigot,

-VEGF(+405 C/G) heterozigot + VEGF (-1540 C/A) heterozigot haplotipleri anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,002$)

- VEGF(+405 C/G) heterozigot + VEGF (-1540 C/A) heterozigot + VEGF (-1512 Ins18) haplotipi yine anlamlı düzeyde yüksek gözlemlendi ($p=0,013$).

Haplotip analizi sonucu, öncelikle VEGF (+405 C/G) homozigot + VEGF (-1512Ins18) haplotipinin psöriazis için bir risk faktörü olduğu sonucuna varıldı. Diğer VEGF polimorfizm genotip birlikteliklerinin (haplotiplerin) psöriazis için risk faktörü olduğu söylenebilir.

Barile S ve ark.'nın (85) yaptığı çalışmada VEGF (-1540 C/A) homozigot + VEGF (-1512Ins18) + VEGF (-460 T/C) homozigot haplotipi geç başlangıçlı psöriazis tipi için risk faktörü olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda bulunan ilk iki VEGF polimorfizm birlikteliğini desteklemektedir. Fakat VEGF (-460 T/C) polimorfizm sonuçları ile çelişkilidir. Polonya ve Tayland populasyonlarında (41) VEGF (+405 C/G) homozigot + VEGF (-460 T/C) normal haplotipinin erken ve geç başlangıçlı psöriazis riskini en az 2 kat artırdığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda VEGF (+405 C/G) homozigot + VEGF (-460 T/C) normal haplotipi değerlendirmeye alınmamıştır fakat tek başına VEGF (+405 C/G) homozigot'lüğün ve VEGF (-460 T/C) normal T allelinin riski artırdığı gösterilmiştir. Sonuçlarımızı desteklemektedir.

VEGF'nin psöriatik epidermiste ve reseptörleri (VEGF-1 ve VEGF-2)'nin papiller mikrodamarlarda fazla miktarda eksprese olduğu gösterilmiştir (90,95).

VEGF sentezini keratinositler, endotel hücreleri, aktive T hücreleri, mast hücrelerinde hipoksi, lokal glukoz derişimi, prostaglandinler, nitrik oksit, çeşitli sitokinler artırmaktadır. Çalışmamızda 55 hasta ve 25 kontrolde serum VEGF düzeyleri ölçüldü ve hasta grubunda istatistiksel olarak sınırdan hafif bir artış tespit edildi ($p=0,095$). Sayının artırılması ile anlamlı istatistik gücün oluşturulabileceği düşünülebilir. Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde Barile S ve ark.'nın (85) yaptığı çalışmada hasta ve kontrol grubunda serum VEGF düzeylerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır. Serum VEGF düzeylerinde anlamlı bir fark çıkmamasının bir nedeni hasta grubunun tedavi altında olması ile açıklanabilir. Psöriazis tedavisinde kullanılan siklosporin, retinoid, neovastat VEGF sentezini inhibe etmektedir (96-97).

Çalışmamızda serum VEGF-1 ve VEGF-2 reseptör düzeylerinde hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. 28 hasta ve 12 kontrolde serum VEGF reseptör düzeyleri ölçülmüştür. Fark gözlenmemesinin nedeni az sayıda örnek olabilir. Papiller mikrodamar örneklerinde VEGF-1 ve -2 reseptörlerinin ölçümünün daha sağlıklı sonuç vereceği düşünülebilir.

Çalışmamızda serum VEGF düzeyi ile haplotipler arasındaki ilişki değerlendirildi. Tüm VEGF polimorfizmleri için genotipi normal haplotipinde; hasta grubunda VEGF düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p=0,048$). VEGF düzeyi ile diğer haplotipler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Literatürde VEGF (-405 G/C) polimorfizminin inflamatuvar ve neoplastik hastalıklarla ilişkisini gösteren çalışmalar mevcuttur. Psöriazis inflamatuvar süreçle giden multisistemik kabul edilen bir deri hastalığıdır. Çalışmamızda psöriazisle anlamlı ilişki gözlenen haplotiplerde VEGF (-405 G/C) homozigot (CC) ve heterozigotluğun (GC) yer aldığı görülmektedir. Çalışmalarda yüksek VEGF düzeyi ile VEGF (-405 G/C) homozigot (CC) (41,98,99) veya normal (GG) (100,101) genotipini içeren haplotiplerle ilişkisi gösterilmiştir ve sonuçlar çelişkilidir. Bizim çalışmamızda bu polimorfizmin homozigot ve heterozigotluğunu içeren haplotipler ile serum VEGF düzeyi arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir. Barile S ve ark.'nın (85) yaptığı çalışmada bizim sonuçlara benzer şekilde VEGF (-405 G/C) polimorfizmi taşıyan haplotipler ile VEGF düzeyi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Literatürde VEGF (-1540 C/A) homozigot (AA) + VEGF (-1512Ins18) haplotipinin VEGF düzeyleri ile çelişkili sonuçları mevcuttur. Çalışmalarda yüksek veya düşük VEGF düzeyleri ile korelasyonlar tespit edilmiş (101-104) veya ilişki bulunamamıştır (85). Yine çalışmamızda VEGF (-1540 C/A) heterozigot (CA) ve VEGF (-1512Ins18) içeren haplotipler ile serum VEGF düzeyi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Haplotipler ile VEGF düzeyi arasındaki ilişkiyi gösteren sonuçlar çelişkilidir. Haplotipleri belirlemek için alt sınıflandırma yapılmaktadır ve sayı çok azalmaktadır. Bu durum istatistiksel değerlendirme gücünü zayıflatmaktadır. Dolaşımında bulunan pek çok farklı faktör serum VEGF düzeyini etkileyebilmektedir. Psöriazis tedavisi VEGF sentezini azaltabilmektedir. Başka polimorfik bölgeler VEGF sentezini etkileyebilmektedir. Tüm bu faktörler dikkate alındığında VEGF polimorfizmlerinin psöriazis patogenezinde fonksiyonel etkilerini kanıtlamak güçtür.

Çalışmamızda serum VEGFR-1 ve VEGFR-2 düzeyi ile haplotipler arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Serum düzeyi yerine papiller mikrodamar bölge örneklerinde reseptör düzeylerinin ölçümlerinin daha sağlıklı sonuç vereceği düşünülmüştür.

VEGF (+405 C/G) polimorfizmi 5' transle edilmeyen bölgededir. Bu bölge miyelopoezde yer alan bir transkripsiyon faktörü olan *myeloid zinc finger protein* (MZF1) bağlama bölgesidir. C allelinin, MZF1 bağlama özgülüğünü düşürerek VEGF transkripsiyonu ve proteinin azalması ile ilişkili olduğu bulunmuştur (105). Aynı zamanda bu polimorfizm *internal ribosome entry site B* (IRES-B) aktivitesini artıran DNA dizisi bölgesindedir ve VEGF translasyonunu etkilemektedir. Psöriaziste regüle olamayan VEGF ekspresyonunun patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir. Çalışmamızda VEGF (+405 C/G) polimorfizmi homozigot ve heterozigotluğu'nun ve bu genotipleri taşıyan haplotiplerin psöriazis riskini artırdığı bulundu. Bu genotipe sahip bireylerde farklı bir fizyolojik uyarı ile düşük veya yüksek VEGF üretimi psöriazis patolojisinde yer almaktadır. VEGF polimorfizmlerinin sitokin üretimini etkilediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (41).

VEGF (-460 T/C) ve VEGF (-1512Ins18) polimorfizmleri promotor bölgede yer almakta ve VEGF ekspresyonunu etkilediği düşünülmektedir (100,106).

Çalışmamızda VEGF (-460 T/C) heterozigotluğun (TC) psöriazis riskini azalttığı, VEGF (-1512Ins18) 18 bç'lik insersiyonun psöriazis riskini artırdığı tespit edildi.

Nofal ve ark. (107) psöriaziste tedaviye cevap alınması ile VEGF düzeyinin düşmesi arasında ilişki göstermişlerdir. Psöriaziste VEGF ekspresyonu veya reseptörlerini hedef alan yeni tedavi yaklaşımlarının gündeme gelmesi önerilmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda VEGF gen polimorfizmleri VEGF (+405C/G), VEGF (-1540C/A) ve VEGF (-1512Ins18) psöriazis hastalığı için bir risk faktörü olarak tespit edilmiştir. Genetik araştırmalarda küçük gruplarla çalışmanın bazı dezavantajları vardır. Bu dezavantajlardan biri birçok genetik mutasyonun ya da polimorfizmin genel popülasyonda düşük prevalansa sahip olmasıdır. Bu durumlarda gen etkisinin gösterilebilmesine yönelik anlamlı istatistik gücün oluşturulabilmesi için daha büyük örneklem boyutlarında çalışmak gerekmektedir. Özellikle altgrup analizleri yapılması gereken ve çalışılan belirteçin diğer genetik ve çevresel faktörlerle etkileşmesi bulunan durumlarda etnik duyarlılığın daha net belirlenebilmesi için çok büyük örneklem sayısı ile çalışmak önemli olmaktadır.

Psöriazis hastalığı ömür boyu devam etmesi, hastaların sık aralıklarla hekime başvurması, eşlik eden hastalıkların olması ile yaşam kalitesini olumsuz etkilemektedir ve cilde sınırlı bir hastalık olmayıp sistemik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Tedavideki başarısızlığın en büyük sebebi ise hastalığın patofizyolojik mekanizmaların tam olarak aydınlatılamamış olmasıdır. Bu tür moleküler çalışmalar hem hastalığın patogenezi aydınlatmada hem de genetik risk faktörlerinin belirlenmesine katkıda bulunacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. VEGF (+405 C/G) polimorfizmi için, psöriazisli hasta grubunda homozigot (GG) ve heterozigot (CG)'luk kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu.
2. VEGF (+405 C/G) gen bölgesinde homozigotluğun (GG) hastalık riskini tahmini olarak yaklaşık 9 kat, heterozigotluğun (CG) hastalık riskini tahmini olarak yaklaşık 7 kat artırdığı saptandı.
3. VEGF (+405 C/G) gen bölgesinde psöriazisli hasta grubunda G allel sıklığı kontrol grubunda C allel sıklığı anlamlı derecede yüksek bulundu.
4. Hardy-Weinberg dengesinin VEGF (+405 C/G) polimorfizmi için kontrol ve hasta grubunda anlamlı ölçüde bozulduğu gözlemlendi.
5. VEGF (+405 C/G) polimorfizmi için psöriazis aile öyküsü olanlarda homozigotluk (GG) anlamlı derecede yüksek bulundu.
6. VEGF (-1540 C/A) polimorfizm için heterozigot (AC)'luğun, psöriazis hastalık riskini yaklaşık 2.5 kat artırdığı tespit edildi.
7. VEGF (-1540 C/A) gen bölgesinde, hasta grubunda A allel ve kontrol grubunda C allel sıklığı anlamlı derecede yüksek gözlemlendi.
8. VEGF (-1512Ins18) polimorfizmi için, hasta grubunda 18 bç'lik insersiyonun kontrol grubuna göre yüksek olduğu gözlemlendi.
9. VEGF (-1512Ins18) gen bölgesinde 18 bç'lik insersiyon polimorfizminin, psöriazis hastalık riskini yaklaşık 4 kat artırdığı tespit edildi.
10. VEGF (-1512Ins18) polimorfizmi için Hardy-Weinberg dengesindeki eşitliğin hasta grubunda anlamlı ölçüde bozulduğu gözlemlendi.
11. VEGF (-460 T/C) polimorfizm heterozigotluğunun (TC) psöriazis riskini 0,5 oranında azalttığı tespit edildi.
12. Haplotip analizine göre, hastalarda en sık VEGF (+405 GG) + (-1512Ins18) haplotipi tespit edildi.
13. Haplotip analizine göre, kontrollerde en sık tüm VEGF polimorfizmlerinin normal genotipte olduğu VEGF (+405 CC) + (-460 TT) + (-1540 CC) + (-1512 NN) haplotipi gözlemlendi.

14. Haplotip analizinde hastalarda;
 - VEGF (+405 CG) + (-1512 Ins18),
 - VEGF (+405 GG) + (-1540 CA)
 - VEGF (+405 CG) + VEGF (-1540 CA)
 - VEGF (+405 CG) + VEGF (-1540 CA) + VEGF (-1512 Ins18) haplotipleri anlamlı derecede yüksek bulundu.
15. Çalışmamızda serum VEGF protein düzeylerinde hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.
16. Serum VEGF-1 ve VEGF-2 reseptör düzeylerinde hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark saptanmadı.
17. Tüm VEGF polimorfizmleri için genotipi normal haplotipinde; hasta grubunda serum VEGF düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Serum VEGF düzeyi ile diğer haplotipler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.
18. Serum VEGF-R1ve VEGF-R2 düzeyleri ile VEGF haplotip dağılımı arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.
19. VEGF gen polimorfizmleri ile psöriazis klinik tipi, aile öyküsü, hastalık derecesi, tedavi yanıtı arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarabilmek için hasta ve kontrol sayısının artırıldığı daha geniş katımlı çalışmalar gerekmektedir.
20. VEGF haplotip dağılımı ile serum VEGF protein düzeyi arasındaki ilişkiyi gösterebilmek için hasta grubu tedavi almayan bireylerden oluşturulabilir ve istatistiksel olarak anlamlı bir güç elde etmek için haplotiplere sahip hasta ve kontrol sayısı arttırılabilir.
21. VEGF haplotip dağılımı ile VEGF-R1, VEGF-R2 protein düzeyi arasındaki ilişkiyi gösterebilmek için, reseptörlerin serum düzeyi yerine papiller mikrodamar bölge örneklerinde reseptör düzeyi ölçülebilir.

KAYNAKLAR

1. Gudjonsson JE, Elder JT. Psoriasis: epidemiology. *Clin Dermatol.* 2007; 25(6):535-46.
2. Christophers E. Psoriasis-epidemiology and clinic spectrum. *Clin Exp Dermatol.* 2001; 26(4):314-20
3. Vena GA, Altomare G, Ayala F, Berardesca E, Calzavara-Pinton P, Chimenti S, Giannetti A, Girolomoni G, Lotti T, Martini P, Mazzaglia G, Peserico A, Publisi Guerra A, Sini G, Cassano N, Cricelli C. Incidence of psoriasis and association with comorbidities in Italy: a 5 year observational study from a national primary care database. *Eur J Dermatol.* 2010; 20: 593-8.
4. Braun-Falco O, Plewing G, Wolff HH, Burgdorf WHC: *Dermatology.* İkinci baskı. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2000; 585-610.
5. Farber EM, Peterson JB. Variations in the natural history of psoriasis. *Calif Med.* 1961; 95:6-11.
6. Barker JN. Genetic aspects of psoriasis. *Clin Exp Dermatol.* 2001;26(4):321-325.
7. Langley RG, Krueger GG, Griffiths CE. Psoriasis: epidemiology, *Clin Exp Dermatol.* 2001; 26:314-320
8. Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol.*1985; 13(3):450-456
9. Chandran V, Raychaudhuri SP. Geoepidemiology and environmental factors of psoriasis and psoriasis arthritis. *J Autoimmun.* 2010; 34(3):314-321
10. Tamer E, Ilhan MN, Polat M, Lenk N, Alli N. Prevalence of skin diseases among pediatric patients in Turkey. *J Dermatol.* 2008; 35(7):413-418.
11. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med.* 2009; 361:496-509.
12. Erkek E. Psoriasis etyopatogenezi. *Turkish Clinics J Dermatol Special Topics.*2008; 1:-14.
13. Rahman P, Elder JT. Genetic epidemiology of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64:39-9.
14. Nograles KE, Davidovici B, Krueger JG. New insights in the immunologic basis of psoriasis. *Semin Cutan Med Surg.* 2010; 29:3-9
15. Sabat R, Philipp S, Höflich C, Kreutzer S, Wallace E, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Wolk K. Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol.*2007;16:779-98.

16. Bowcock AM, Barker JN. Genetics of psoriasis: the potential impact on new therapies. J Am Acad Dermatol. 2003;49:51-6
17. Henseler T. The genetics of psoriasis. J Am Acad Dermatol. 1997;37:1-11
18. Van De Kerkhof PCM. Psoriasis. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP (eds). Dermatology. 2nd ed Edinburg, Mosby Company 2008; 115-35.
19. Oka A, Acheampong JW, Rowland Payne CM. Skin diseases in Ghana and the UK. Int J Dermatol. 2001;40(5):323-6
20. Weiss G, Shemer A, Trau H. The Koebner Phenomenon: review of the literature. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2002;16(3):241-8
21. Fry L: An atlas of psoriasis. 2nd ed. London. Taylor-Francis, 2005;1-92.
22. Tagami H Triggering factors. Clin Dermatol. 1997;15(5):677-85.
23. Fry L, Baker BS, Triggering psoriasis: the role of infections and medications. Clin Dermatol. 2007;25(6):606-15.
24. Basavaraj KH, Ashok NM, Rashmi R, Praveen TK. The role of drugs in the induction and/or exacerbation of psoriasis. Int J Dermatol. 2010;49(12):1351-61
25. Zhu KJ, Zhu CY Fan YM. Alcohol consumption and psoriatic risk: a meta-analysis of case-control studies. J Dermatol. 2012;39(9):770-3.
26. Li w, Han J, Choi HK, Qureshi AA. Smoking and risk of incident psoriasis among women and men in the United States: a combined analysis. Am J Epidemiol. 2012; 175(5):402-13.
27. Naldi N, Mercuri SR. Smoking and psoriasis: from epidemiology to pathomechanisms. J Invest Dermatol. 2009;129(12):2741-3.
28. Armstrong AW, Armstrong EJ, Fuller EN, Sockolov ME, Voyles SV. Smoking and pathogenesis of psoriasis: a review of oxidative, inflammatory and genetic mechanisms: Br J Dermatol. 2011; 165(6):1162-8.
29. Tagami H. Triggering factors. Clin Dermatol. 1997;15:677-85.
30. Namazi MR. Why is psoriasis uncommon in Africans? The influence of dietary factors on the expression of psoriasis. Int J Dermatol. 2004;43(5):391-392.
31. Lee MR, Cooper AJ. Immunopathogenesis of psoriasis. Austral J Dermatol. 2006;47(3):151-9.
32. Gaspari AA. Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. J Am Acad Dermatol. 2006;54(3 Supply 2):S67-80.

33. Ergu T. Psoriasisın Etyopatogenezi. *Turkderm.* 2008;42(2):18-22.
34. Sabat R, Philips S, Höflich C, Kreutzer S, Wallace E, Asadullak K, Volk HD, Sterry W, Wolk K. Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol.* 2007;16(10):779-98.
35. Yazıcı AC, Karabulut AA. Psoriasisın genetik özellikleri ve patogenezi. *Dermatose* 2003;2:95-102.
36. Şentürk N. Psoriyazis Etyopatogenezi: Son Görüşler. *Türkiye Klinikleri J Dermatol-Special Topics* 2012;5(3):8-20.
37. Sweeney CM, Tobin AM, Kirby B. Innate immunity in the pathogenesis of psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 2011;303(10):691-705.
38. Nickoloff BJ, Stevens SR What have we learned in dermatology from the biologic therapies? *J Am Acad Dermatol* 2006;54:143-51.
39. Ertugrul E, Turgay M. Psoriyazis immünopatogenezi. *T Klin J Int Med Sci* 2005;1:13-5.
40. Bonifati C, Ameglio F. Cytokines in psoriasis. *Int J Dermatol* 1999;38:241-51.
41. Zablotna M, Sobjanek M, Nedoszytko B, Lange M, Kozicka D, Glen J, Roszkiewicz J. Association of psoriasis with the VEGF gene polymorphism in the northern Polish population. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013;27(3):319-23
42. Jullien D. Psoriasis physiopathology. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 2006;20:10–23.
43. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(4):359-65.
44. Baker BS, Ovigne JM, Powles AV, Corrocan S, Fry L. Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol.* 2003;148(4):670-9.
45. Akkaya VB, Ceyhan AM. Psoriyazisde tanı ve ayırıcı tanı. *T Klin J Int Med Sci.* 2005;1:62-7.
46. Naldi L, Gambini D. The clinical spectrum of psoriasis. *Clin Dermatol.* 2007;25(6):510-8.
47. Gür G. Psoriyaziste Klinik Spektrum. *Türkiye Klinikleri J Dermatol-Special Topics.* 2012; 5(3):21-6.
48. Wozel G. Psoriasis treatment in difficult locations: scalp, nails, and intertriginous areas. *Clin Dermatol.* 2008;26:448-59.

49. Van de Kerkhof PC, Murphy GM, Austad J, Ljungberg A, Cambazard F, Duvold LB. Psoriasis of the face and the flexures. *J Dermatol Treat.* 2007;18:351-60.
50. Griffiths CE, Christophers E, Barker JN, Chalmers RJ, Chimenti S, Krueger GG, Leonardi C, Menter A, Ortonne JP, Fry L. A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. *Br J Dermatol.* 2007;156(2):258-62.
51. Mason J, Mason AR, Cork MJ. Topical preparations for the treatment of psoriasis: a systematic review. *Br J Dermatol.* 2002;146(3):351-64.
52. Richard MA, Barnetche T, Horreau C, Brenaut E, Pouplard C, Aractingi S, Aubin F, Cribier B, Joly P, Jullien D, Le Maitre M, Misery L, Ortonne JP, Paul C. Psoriasis, cardiovascular events, cancer risk and alcohol use: evidence-based recommendations based on systematic review and expert opinion. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013;27(Suppl 3): 2-11.
53. Rocha-Pereira P, Santos-Silva A, Rebelo I, Figueiredo A, Quintanilha A, Teixeira F. Dyslipidemia and oxidative stress in mild and in severe psoriasis as a risk for cardiovascular disease. *Clin Chim Acta.* 2001;303(1-2):33-9.
54. Piskin S, Gurkok F, Ekuklu G, Senol M. Serum lipid levels in psoriasis. *Yonsei Med J.* 2003;44(1):24-6.
55. Yang YW, Keller JJ, Lin HC. Medical comorbidity associated with lipid abnormalities at the onset of skin disease. *J Am Acad Dermatol.* 2006;54(4):614-21.
56. Boehncke S, Thaci D, Beschmann H, Ludwig RJ, Ackermann H, Badenhoop K, Boehnke WH. Psoriasis patients show signs of insulin resistance. *Br J Dermatol.* 2007;157(6):1249-51.
57. Armstrong AW, Harskamp CT, Armstrong EJ. Psoriasis and metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Am Acad Dermatol.* 2013;68(4):654-62.
58. Pouplard C, Brenaut E, Horreau C, Barnetche T, Misery L, Richard MA, Aractingi S, Aubin F, Cribier B, Joly P, Jullien D, Le Maitre M, Ortonne JP, Paul C. Risk of cancer in psoriasis: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013;27(Suppl 3):36-46.
59. Baykal C. *Dermatoloji Atlası. 2. baskı.* İstanbul: ARGOS AS. 2000;132-84.
60. Murphy M, Kerr P, Grants-Kels JM. The histopathologic spectrum of psoriasis. *Clin Dermatol* 2007; 25(6):524-8
61. Bren E C. VEGF in Biological Control. *Journal of Cellular Biochemistry* 2007;102:1358-67.

62. Sone H, Sakauchjc M, Takahashia A, Suzuki H. Elevated levels of vascular endothelial growth factor in the sera of patients with rheumatoid arthritis correlation with disease activity. *Life Sciences*. 2001;69:1861-69.
63. Roy H, Bhardwaj S, Yla-Hertualla S. Biology of vascular endothelial growth factors. Minireview, Federation of European Biochemical Societies Published by Elsevier B.V. 2006, doi:10.1016/j.febslet,2006.03.087.
64. Hoeben A, Landuyt B, Highley M S, Wildiers H. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Review, *Pharmacol Rev*. 2004;56:549-580.
65. <http://www.psi.ch/media/studies-on-protein-structures-understanding-the-basic-building-blocks-of-life>
66. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G: Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996; 93:1493.
67. Nowak DG, Woolard J, Amin EM, Konopatskaya O, Saleem MA, Churchill AJ, Ladomery MR, Harper SJ, Bates DO: Expression of pro- and anti angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J Cell Sci*.2008; 121(Pt20): 3487-95.
68. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9: 669-76.
69. Stutfeld E, Ballmer-Hofer K: Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life*. 2009; 61(9): 915-22.
70. Waltenberger J, Claesson- Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. *J Biol Chem*. 1994; 269(43): 26988-95.
71. Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies therapeutic implications. Review, *Blood*. 2005;105:1383-95.
72. Bottomley M J, Webb N J A, Watson C J, Holt P J L. Placenta growth factor (PLGF) induced vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from mononuclear cells and is co-expressed with VEGF in synovial fluid. *Clin Exp Immunol*.2000;119:182-88.
73. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z, Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB J*. 1999;13: 19-22.
74. Das SK, Vasudevan DM. Essential factors associated with hepatic angiogenesis. Minireview, *Life Sciences* 2007;81:1555-64.
75. Kasama T, Shiozawa F, Kobayashi K, Yajima N. Vascular endothelial growth factor expression by activated synovial leukocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2001;44:2512-24.

76. Passarge E. Renkli Genetik Atlası, Formal Genetik: Polimorfizm. Luleci G, Sakizli M. 2. baskı, İstanbul: Nobel Tıp-Yüce Yayınları. 2000;156.
77. Carey J, White B. Medical Genetics. Third Edition. Missouri: Mosby. 2006;29.
78. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Genetics in medicine. Sixth Edition Philadelphia:Saunders Elsevier.2004;87.
79. Rogers MS, D'Amato R. The effect of genetic diversity on angiogenesis Experimental Cell Research: 2006; 312: 561–574.
80. Fan X, Wu Q, Li Y, Hao Y, Ning N, Kang Z, Cui Y, Liu R, Han L. Association of polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and its serum levels with diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes: A cross-sectional study. Clin Med J. 2014; 127(4):625-7.
81. Kapahi R, Manjari M, Sudan M, Uppal MS Singh NR, Sambyal V, Guleria K. Association of +405C>G and +936C>T Polymorphisms of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene with Sporadic Breast Cancer in North Indians. Asian Pac J Cancer Prev. 2014; 15(1): 257-63.
82. Moradzadegan A, Vaisi-Raygani A, Nikzamir A, Rahimi Z. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion (I/D) (rs4646994) and Vegf polymorphism(+405G/C; rs2010963) in type II diabetic patients: Association with the risk of coronary artery disease. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2014.
83. Chen Y, Dawes PT, Matthey DL. Polymorphism in the vascular endothelial growth factor A (VEGFA) gene is associated with serum VEGF-A level and disease activity in rheumatoid arthritis: differential effect of cigarette smoking. Cytokine. 2012; 58(3):390-7.
84. Young HS, Summers AM, Bhushan M, Brenchley PE, Griffiths CE. Single-nucleotide polymorphisms of vascular endothelial growth factor in psoriasis of early onset. Invest Dermatol.2004;122(1):209-15.
85. Barile S, Medda E, Nistico` L, Bordignon V, Cordiali-Fei P, Carducci M, Rainaldi A, Marinelli R, Bonifati C. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms increase the risk to develop psoriasis. Exp Dermatol. 2006; 15: 368–376.
86. J. Wongpiyabovorn, S. Yooyongsatit, K. Ruchusatsawat, Y. Avihingsanon & N. Hirankarn. Association of the CTG (-2578/-460/+405) haplotype within the vascular endothelial growth factor gene with early-onset psoriasis. Tissue Antigens.2008;72(5):458-63.
87. Bhushan M, Mc Laughlin B, Weiss JB, Griffiths CE. Levels of endothelial cell stimulating angiogenesis factor and vascular endothelial growth factor are elevated in psoriasis. Br J Dermatol. 1999; 141:1054-1060.

88. Creamer D, Allen M, Jaggar R, Stevens R, Bicknell R, Barker J. Mediation of systemic vascular hyperpermeability in severe psoriasis by circulating vascular endothelial growth factor. *Arch Dermatol*. 2002;138:791-796.
89. Nielson HJ, Christensen IJ, Svendsen MN, Hansen U, Werther K, Brüner N, Petersen LJ, Kristensen JK. Elevated plasma levels of vascular endothelial growth factor and plasminogen activator inhibitor-1 decrease during improvement of psoriasis. *Inflamm Res*. 2002;51:563-567.
90. Detmar M, Brown LF, Claffey KP, et al. Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J Exp Med*. 1994;180(3):1141-1146.
91. Ferrara N, Davis-Smyth T. The Biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18: 4-25.
92. Wang Z, Liang W, Zhang B, Lv M, Wang J, Zhang L. Single nucleotide polymorphisms of VEGF gene and psoriasis risk. *J Dermatol Sci* 2008;49:263-5.
93. Young HS, Summers AM, Read IR et al. Interaction between genetic control of vascular endothelial growth factor production and retinoid responsiveness in psoriasis. *J Invest Dermatol*. *Dermatol* 2006;126: 453-9.
94. Stefanaki I, Dimisianos G, Antonio C, Katsambas A, Stratigos A. Investigation of +405 and -460 polymorphisms of vascular endothelial growth factor in psoriasis and short-term responsiveness to efalizumab therapy. *Dermatology*. 2008; 217(3):201-2.
95. Zhang Y, Matsuo H, Morita E. Vascular endothelial growth factor 121 is the predominant isoform in psoriatic scales. *Exp Dermatol* 2005;14: 758-764.
96. Diaz B V, Lenoir MC, Ladoux A, Frelin C, Demarchez M, Michel S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes by retinoids. *J Biol Chem* 2000;275: 642-650.
97. Hernandez G L, Volpert O V, Iniguez M A et al. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase. *J Exp Med* 2001; 193: 607-620.
98. Awata T, Inona K, Kurihara S et al. A common polymorphism in the 50-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 1635-1639.
99. Shahbazi M, Fryer A A, Pravica V et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 260-264.

100. Watson C J, Webb NJ A, Bottomley MJ, Brenchley P E C. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms variation in vegf protein production. *Cytokine* 2000; 8: 1232–1235.
101. Stevens A, Soden J, Brenchley P E, Ralph S, Ray D W. Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter. *Cancer Res* 2000; 63: 812–816.
102. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M et al. Vegf is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* 2003; 34: 383–394.
103. Boiardi L, Casali B, Nicoli D et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in giant cell arteritis. *Rheumatol* 2003; 30: 2160–2164.
104. Mohammadi M, Ollier W E R, Hutchinson I V et al. A functional association study of gene promoter polymorphisms with vegf expression by stimulated pbm cells. *Hum Immunol* 2003; 64: S125.
105. Lip GY, Chung I. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in heart failure. *J Card Fail* 2005; 11: 285–7.
106. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 260–64.
107. Nofal A, Al-Makhzangy I, Attwa E et al. Vascular endothelial growth factor in psoriasis: an indicator of disease severity and control. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009; 23: 803–806.