

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

ASTIMLI HASTALARDA
 β_2 -ADRENERJİK RESEPTÖR 16 (ADRB2 16) ve
GLUTATYON S-TRANSFERAZ P1 (GSTP1) GEN
POLİMORFİZM
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Yrd. Doç. Dr. Çetin KAYMAK

Danışman
Prof. Dr. Ali Esat KARAKAYA

Ankara - 2007

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında desteği, yakınlığı ve hoşgörüsünü her zaman hissettiğim,
değerli hocam sayın Prof. Dr. Ali Esat KARAKAYA'ya,

Çalışmalarım sırasında yakınlığı ve desteğini esirgemeyen değerli hocam sayın Prof. Dr.
Semra SARDAŞ'a,

İhtiyaç duyduğum her an yanımda hissettiğim ve değerli bilgilerine başvurduğum
hocalarım sayın Prof. Dr. Sema BURGAZ'a, sayın Prof. Dr. İsmet ÇOK'a, sayın Prof. Dr. Bensu
KARAHALİL'e,

Çalışmamın planlanması, kurulması, PCR ve genotipleme yöntemlerini öğrenmem için
gösterdiği destek ve ilgisi yanı sıra bilgisi ve dostluğuyla destek veren sevgili arkadaşım sayın
Doç. Dr. Neslihan Aygün KOCABAŞ'a,

Dostluk, yardımseverlik ve paylaştığımız güzel günlerin anısına sevgili arkadaşlarım Öğr.
Gör. Gonca ÇAKMAK'a, Arş. Gör. Eren CİVELEK'e, Arş. Gör. Ela KADIOĞLU'na, Arş. Gör.
Emre DURMAZ'a, Arş. Gör. Erdem COŞKUN'a, Arş. Gör. Onur Kenan ULUTAŞ'a, Arş. Gör.
Esra TUFAN'a, ve sevgili arkadaşım Uzm. Dr. Seval İZDEŞ'e,

Çalışma grubunu oluşturan bireylerin biyolojik materyallerinin temininde yardımcı olan
Uzm. Dr. Nesrin AYDIN'a,

Yetişmemde her türlü maddi ve manevi desteği gösteren, sevgileri ve varlıklarıyla
mutluluk veren KAYMAK ailesine,

Sevgisi, dostluğu, sabır ve özverisini eksik etmeyen canım oğlum Arda KAYMAK ve
sevgili eşim Yeşim KAYMAK'a,

En İçten Teşekkürlerimi Sunarım...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
I. <u>GİRİŞ</u>	
II. <u>GENEL BİLGİLER</u>	5
II. 1. Astım	5
II.1. 1. Tanım	5
II. 1. 2. İnsidans	5
II. 1. 3. Prevalans	5
II. 1. 4. Popülasyon	6
II. 1. 5. Epidemiyolojik Risk Faktörleri	6
II. 1. 5. 1. Genetik Faktörler	6
II. 1. 5. 2. Çevresel Faktörler	7
II. 1. 5. 3. Sigara	7
II. 1. 5. 4. Atopi	8
II. 1. 5. 5. Bronşial Hiperreaktivite	8
II. 1. 5. 6. Doğum Faktörleri	9
II. 1. 5. 7. Yaş ve Cinsiyet	9
II. 1. 5. 8. Solunumsal Enfeksiyonlar	9
II. 1. 5. 9. Fiziksel aktivite ve ozmotik uyarı	10
II. 1. 5. 10. Gıdalar ve katkı maddeleri	10
II. 1. 5. 11. İlaçlar	11
II. 1. 5. 12. Mesleksel Faktörler	11
II. 1. 6. Astım Patogenezi	11
II. 1. 7. Mediatorların Rolü	13
II. 1. 8. Klinik Fizyopatolojisi	14
II. 1. 9. Tanı	15
II. 1. 10. Moleküler Genetik Çalışmalar	16

II. 1. 10. 1. Genetik Polimorfizm	16
II. 1. 10. 2. Astım Farmakogenetiği	17
II. 1. 10. 3. Astımda Moleküler Genetik Çalışmalar	18
II. 1. 10. 3. 1. 11q13 Kromozomu	19
II. 1. 10. 3. 2. 5q Kromozomu	19
II. 1. 10. 3. 3. 6p Kromozomunda MHC lokusu	19
II. 1. 10. 3. 4. 12q15-q24.1 Kromozomu	20
II. 2. β_2-Adrenoreseptör	20
II. 2. 1. β_2-Adrenoreseptör Vücutta dağılımı	20
II. 2. 2. β_2-Adrenoreseptör Gen (ADRB2) Polimorfizmi	21
II. 2. 3. ADRB2 16 Polimorfizmi	22
II. 3. Glutasyon S-Konjugat Transferazlar (GSTs)	25
II. 3. 1. GSTs Genel Özellikleri	25
II. 3. 2. Ksenobiyotiklerin Glutatyona Bağlı Biyoaktivasyonu	25
II. 3. 3. Sitozolik GSTs Detoksifikasyonu	26
II. 3. 4. GSTs'lerin Sınıflandırılması	26
II. 3. 5. GSTs Gen Polimorfizmi	27
II. 3. 6. GST pi Enzimi	28
II. 3. 7. GSTP1 Gen Polimorfizmi	28
II. 4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	32
II. 4. 1. PCR Tekniği	32
II. 4. 2. DNA İzolasyonu	32
II. 4. 3. DNA Polimeraz Enzimi	34
II. 4. 4. PCR Etkileyen Faktörler	35
II. 4. 4. 1. Enzim Konsantrasyonu	35
II. 4. 4. 2. Deoksitükleotid Trifosfatlar	35

II. 4. 4. 3. Primerler	36
II. 4. 4. 4. Primerlerin Bağlanması (Annealing)	36
II. 4. 4. 5. Primerlerin Ekstensiyonu	37
II. 4. 4. 6. Denatürasyon Zamanı- Sıcaklığı	37
II. 4. 4. 7. Siklus Sayısı	37
II. 4. 4. 8. Magnezyum Konsantrasyonu	38
II. 4. 4. 9. Diğer Reaksiyon Bileşenleri	38
II. 4. 5. PCR Tekniğinin Uygulama Alanları	39
II. 4. 6. PCR Tekniğinin Avantajları	40
II. 4. 7. PCR Tekniğinin Dezavantajları	40
II. 4. 8. Restriksiyon Enzimleri	40
III. <u>MATERYAL ve YÖNTEM</u>	42
III. 1. Çalışma Popülasyonu	42
III. 2. DNA İzolasyonu	44
III. 2. 1. DNA İzolasyonu için Kullanılan Kimyasal Maddeler	44
III. 2. 2. DNA İzolasyonu için Kullanılan Çözeltiler	44
III. 2. 3. DNA İzolasyonu için Kullanılan Aletler	45
III. 2. 4. Deneyin Yapılışı	45
III. 3. DNA Örneklerinin PCR'a Uygulanması	46
III. 3. 1. ADRB2 16-PCR'da Kullanılan Kimyasal Maddeler	46
III. 3. 2. GST P1-PCR'da Kullanılan Kimyasal Maddeler	47
III. 3. 3. DNA Amplifikasyonu için Kullanılan Aletler	47
III. 3. 4. DNA Amplifikasyonu için Kullanılan Çözeltiler	47
III. 3. 5. ADRB2-16 Amplifikasyonu için PCR	47
III. 3. 6. GSTP1 Amplifikasyonu için PCR	48
III. 3. 7. PCR Ürünlerinin Jele Uygulanması	48

III. 3. 7. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	48
III. 3. 7. 2. Kullanılan Aletler	49
III. 3. 7. 3. Kullanılan Çözeltiler	49
III. 3. 7. 4. Jelin Hazırlanması	50
III. 3. 7. 5. PCR Örneklerinin Jele Uygulanması	50
III. 4. ADRB2 16 ve GSTP1 Genotipinin Belirlenmesi	51
III. 4. 1. ADRB2 16-Digest’inde Kullanılan Kimyasal Maddeler	51
III. 4. 2. GSTP1-Digest’inde Kullanılan Kimyasal Maddeler	51
III. 4. 3. ADRB2 16 ve GST P1 -Digest’inde Kullanılan Aletler	51
III. 4. 4. 1. ADRB2 16-Digest’inde Kullanılan Çözeltiler	51
III. 4. 4. 2. GSTP1 -Digest’inde Kullanılan Çözeltiler	52
III. 4. 4. 3. 1. ADRB2 16 Reseptörünün <i>NcoI</i> ve <i>BtsI</i> ile Kesilmesi	52
III. 4. 4. 3. 2. GSTP1 Reseptörünün <i>Bsm</i> AI ile Kesilmesi	52
III. 4. 4. 4. ADRB16 ve GST P1 Digest Ürünlerinin Jele Uygulanması	53
III. 4. 4. 4. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	53
III. 4. 4. 4. 2. Kullanılan Aletler	53
III. 4. 4. 4. 3. Kullanılan Çözeltiler	53
III. 4. 4. 4. 4. Jelin Hazırlanması	53
III. 4. 5. Digest Ürünlerinin Jele Uygulanması ve Elektroforez	53
III. 4. 5. 1. ADRB2 16 Genotipinin Belirlenmesi	53
III. 4. 5. 2. GSTP1 Genotipinin Belirlenmesi	54
III. 5. İstatistiksel Analiz	55
IV. <u>BULGULAR</u>	56
IV. 1. ADRB2 16 Genetik Polimorfizmi	57
IV. 2. GSTP1 Genetik Polimorfizmi	62
V. <u>TARTIŞMA ve SONUÇ</u>	67
V. I. ADRB2 16	67
V. II. GSTP1	72

VI. <u>ÖZET</u>	78
VII. SUMMARY	80
VIII. <u>ÖZGEÇMİŞ</u>	82
IX. <u>KAYNAKLAR</u>	83

Tabloların Listesi

Sayfa No.

Tablo 1. Popülasyonlardaki Sağlıklı Bireylerin ADRB2 16 Genotip ve Alel Frekansları	24
Tablo 2. Popülasyonlardaki Astımlı Bireylerin ADRB2 16 Genotip ve Alel Frekansları	24
Tablo 3. İnsan Glutatyon S-Transferazlarının Sınıflandırılması	27
Tablo 4. Popülasyonlardaki Sağlıklı Bireylerin GSTP1 Genotip ve Alel Frekansları	31
Tablo 5. Popülasyonlardaki Astımlı Bireylerin GSTP1 Genotip ve Alel Frekansları	31
Tablo 6. ADRB2 16 Genotipinin Şematik Gösterimi	54
Tablo 7. GSTP1 Genotipinin Şematik Gösterimi	54
Tablo 8. Kontrol ve Astım Grubuna ait Fiziksel Özellikler	56
Tablo 9. Kontrol ve Astım Grubuna ait BMI Değerleri	56
Tablo 10. Türk Popülasyonundaki ADRB2 16 Genotip Frekansı	59
Tablo 11. Cinsiyet Bakımından ADRB2 16 Alel Frekansları	59
Tablo 12. Astım ve Kontrol Grubuna ait ADRB2 16 Genotip ve Alel Frekansları	60
Tablo 13. Astım ve Kontrol Grubunun ADRB2 16 Genotip Frekansları	60
Tablo 14. Astım ve Kontrol Grubunun ADRB2 16 Genotip Frekansları	60
Tablo 15. Astım ve Kontrol Grubunun ADRB2 16 Genotip Frekansları	61
Tablo 16. Türk Popülasyonundaki GATP1 Genotip Frekansı	63
Tablo 17. Cinsiyet Bakımından GSTP1 Alel Frekansları	63
Tablo 18. Astım ve Kontrol Grubuna ait GSTP1 Genotip ve Alel Frekansları	64
Tablo 19. Astım ve Kontrol Grubunun GSTP1 Genotip Frekansı	65
Tablo 20. Astım ve Kontrol Grubunun GSTP1 Genotip Frekansı	65
Tablo 21. Astım ve Kontrol Grubunun GSTP1 Genotip Frekansı	66

Şekillerin Listesi

	Sayfa No.
Şekil 1. β 2-Adrenoreseptör Gen Polimorfizmi	22
Şekil 2. β 2-Adrenoreseptör Gen Sekansı	23
Şekil 3. GSTP1 Geni ekzon 5 ve ekzon 6 Genetik Polimorfizmi	29
Şekil 4. GSTP1 Ekzon 5 Gen Sekansı	29
Şekil 5. PCR Tekniğı ile DNA Çoğaltılması	33
Şekil 6. ADRB2 16 PCR Ürünleri	57
Şekil 7. ADRB2 16 <i>Nco</i> I ve <i>Bts</i> I Ürünleri	58
Şekil 8. GSTP1 PCR Ürünleri	62
Şekil 9. GSTP1 <i>Bsm</i> AI Digest Ürünleri	62

I. GİRİŞ

Astım özellikle yetişkinler arasında insidans ve prevalansında giderek artış görülen bir hastalıktır. İnsidansı yılda 2.65-4 /1000 arasında değişmektedir. Astım prevalansı yaklaşık olarak erişkinlerde % 3-5, çocukluk çağında ise % 5-10 arasında olduğu tespit edilmiştir. Endüstrileşmiş ülkelerden Japonya'da % 0.7, ABD'de % 8.5 ve Avrupa ülkelerinde ise ortalama % 5 oranında astım prevalansı saptanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'deki genel popülasyonda % 4 oranında gözlenirken; 10 milyon insanın astımlı olduğu ve poliklinik hizmetlerine başvurulardaki en yaygın 13. hastalık olarak ortaya çıktığı rapor edilmiştir ^{1,2}. Astım etiyojisinde yer alan hava yolu aşırı duyarlılığı Avrupa popülasyonunda % 20 iken; Amerika ve Pasifik Adaları kökenlilerde bu oranlar sırasıyla % 9 ve % 16 olarak bulunmuştur ³. Türkiye'de astım hastalığının prevalansı kesin olarak bilinmemekle birlikte yapılan epidemiyolojik çalışmalarda prevalansın çocuklarda % 6.9-15.3, erişkinlerde ise % 2.2-6.4 arasında olduğu bildirilmiştir ⁴⁻⁶.

Son 10 yılda astımın ortaya çıkışını hazırlayan etiyojik faktörleri aydınlatmak amacıyla pek çok çalışma yapılmasına rağmen bronşial astım hastalığına sebep olan faktörler ve oluşum yolları kesinlik kazanmamıştır. Astım olgularının çoğunluğunda bireysel (genetik, bronşial hiperaktivite, atopi, yaş, doğumsal faktörler, fiziksel aktivite) ve çevresel (enfeksiyonlar, ilaçlar, gıda katkı maddeleri, mesleksel maruziyet) risk faktörleri mevcuttur. Bütün astım olgularının % 4'ü non-astmatik aile bireylerinde gözlenirken; % 13'ünde astımlı aile bireylerinde monogenetik geçiş saptanmıştır ⁷.

Astım olgularının % 30'dan fazlası çevresel maruziyetlerin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Birçok ksenobiyotik ve/veya metabolitine maruziyet nedeniyle astım olgularına rastlanabilir. Pek çok çalışma sunucunda vücuttaki çeşitli reseptör ve enzim sistemini kontrol eden bireysel genetik polimorfizmler, astım olgularının etiyojik faktörleri arasında sayılmaktadır. Bu genetik değişikliklerin yanı sıra spontan olarak oluşan ve DNA onarım sistemi tarafından düzeltilemeyen DNA replikasyon hatalarının toplu sonucu olarak primer astım olgularının oluşumu ve gelişimi gözlenebilmektedir ⁸⁻¹⁰.

β_2 -adrenoreseptör (ADRB2) geni 5q31-33 kromozomunda yer alır. Bu gen için 9 adet tek nükleotid polimorfizmi belirlenmiştir. Astım tablosunda en sık gözlenen nokta mutasyonu, ADRB2 geninin 16 nolu kodonunda Glisin amino asitinin, Arginin amino asitine substitüsyonuna neden olmasıyla ADRB2 gen sekansındaki 16. kodon 46 nolu nükleotiddeki Adenin bazının, Guanin bazına dönüşerek bir polimorfik kısım oluşturmaktadır. Bunun sonucunda ADRB2 reseptör aktivitesini etkileyen 3 farklı genotip (Wild: Arg16Arg; Heterozigot: Arg16Gly; Mutant: Gly16Gly) görülmektedir. Bu fonksiyonel polimorfizmde reseptör ekspresyonu sonucu down-regülasyon ve ADRB2’de intrinsek cevap yanı sıra agonist olarak kullanılan ilaçların etkilerinde de bireysel farklılıklara neden olabilir. Liggett ve ark.¹¹, Gly16Gly homozigot mutant bireylerin, endojen katekolaminlere maruz kaldıklarında reseptör sayısında azalma tespit etmişlerdir. Böylece, Gly16Gly mutant bireylerde, ilaç cevapsızlığı gözlenirken; Arg16Arg wild bireylerde, ilaçlara karşı taşiflaksi gelişmektedir. Bu nedenle ADRB2 16 polimorfizminin incelendiği astımlı hastalarda, Gly16 fenotipik özelliğin reseptörde down-regülasyon ve beta-2 agonist ajanlara karşı duyarsızlık oluşturarak astım ciddiyetini arttırdığı bilinmektedir. Dolayısıyla astım tanısı almamış bireylerde, bronşial düz kaslardaki beta-2 reseptörde gelişen down-regülasyon ve endojen katekolaminlere karşı direnç nedeniyle endojen ve ekzojen havayolu duyarlılığı oluşturan etkenlere maruziyet nedeniyle havayolu duyarlılığında artış ve hava yolu obstrüksiyonu gelişebileceği kanısına varılmıştır^{12, 13}.

Akciğer alveoler hücreleri, alveoler makrofaj ve respiratuar bronşiollerdeki glutatyon S-transferaz P1 (GSTP1) geninin, diğer GST sınıfı genlere oranlara daha fazla oranda baskın olması yanı sıra respiratuar havayolundaki GSTP1 izoenziminin oksidatif strese karşı katalitik aktivitesinin, diğer GST izoenzimlerine göre daha fazla olduğu bilinmektedir. GSTP1 geninin DNA dizilimindeki bir nokta mutasyon nedeniyle enzim aktivitesinin değiştiği saptanmıştır. Bu nokta mutasyonu, GST enziminin 105 nolu kodonunda Valin (Val) amino asitinin İzolösin (Ile) amino asitine substitüsyonuna neden olmaktadır. Bir başka deyişle GSTP1 gen sekansındaki 105. kodon 313 nolu nükleotiddeki Adenin bazının, Guanin bazına dönüşerek bir polimorfik kısım

oluşturmaktadır. Bunun sonucunda GST enzim aktivitesini etkileyen 3 farklı genotip (Wild: Ile105Ile; Heterozigot: Ile105Val; Mutant: Val105Val) görülmektedir ¹⁴⁻¹⁶.

Genetik faktörlere bağlı olarak ksenobiyotikleri metabolize eden bazı enzimlerin etkinliğinin bireysel farklılık göstermesi son yıllarda yoğun çalışmalara konu olmuştur. Özellikle genetik polimorfizm araştırmaları, ilaç etkisi ve toksisitesi yönünden önemlidir. Genetik polimorfizm, ksenobiyotik metabolizmasından sorumlu enzimleri ve vücutta yaygın olarak dağılım göstererek hormonal ve hemodinamik etkileri kontrol eden reseptörleri kodlayan genlerdeki alellerin mutasyonuna bağlıdır. Belirli enzimleri ve reseptörleri kodlayan genlerdeki polimorfizmler enzim ve reseptör aktivitesinin yokluğuna ya da değişmesine neden oluşturmaktadır. Aynı zamanda ksenobiyotik metabolizmasındaki polimorfizmlerin, ilaçlara karşı duyarsızlığa, advers ilaç reaksiyonlarına ve ksenobiyotik maruziyetine bağlı olarak özellikle kanser olmak üzere belirli hastalıklara karşı duyarlılığın artmasına da neden olduğu bildirilmiştir ¹⁷.

Astımlı hastalardaki ADRB2 16 ve GSTP1 gen polimorfizmi son yıllarda çeşitli popülasyonlarda araştırma konusu yapılmaktadır. Özellikle İnsan genom projesinin sonuçlandırılmasından sonra hızlanan gen-hastalık ilişkisinde güvenilir verilere ulaşılabilmesi için, çalışmaların sonuçta bir meta analize imkan verecek şekilde farklı popülasyonlarda ve geniş örnek sayılarıyla incelenmesi stratejisi izlenmektedir. Astım patolojisi ile ADRB2 16 ve GSTP1 ilişkisinin Türk popülasyonunda incelenmesi de bu nedenle önem kazanmaktadır. Bu tez çalışmasında hem erişkinler hem de çocuklarda önemli bir klinik patoloji oluşturan astım hastalığının Türk popülasyonundaki ADRB216 ve GSTP1 genetik polimorfizmleriyle olan ilişkisi saptanması amaçlanmıştır. Özet olarak, Türk popülasyonunda yapılan bu çalışma aşağıdaki hedeflere yönelik planlanmıştır:

1. Astımlı hastalarda ve sağlıklı bireylerde 16. kodon, 46. nükleotiddeki ADRB2 alel frekansının saptanarak astım hastalığı ve ADRB2 16 polimorfizmi ilişkisinin araştırılması;
2. Astımlı hastalarda ve sağlıklı bireylerde 105. kodon, 313. nükleotiddeki GSTP1 alel frekansının hesaplanarak astım hastalığı ve GSTP1 polimorfizmi ilişkisinin araştırılması

II. GENEL BİLGİLER

II. 1. Astım

II.1. 1. Tanım

Astım, hava yollarında çeşitli hücre ve hücreyel elemanların rol aldığı kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Kronik inflamasyon hava yolu duyarlılığında artışa neden olurken, buna bağlı olarak özellikle geceleri veya sabaha karşı ortaya çıkan ve tekrarlayan wheezing (hışıltılı solunum), nefes darlığı, göğüste sıkışma hissi ve öksürük ataklarına neden olur. Bu ataklara genellikle spontan olarak veya tedaviyle reversible olan yaygın ancak değişken hava akımı kısıtlılığı eşlik eder. Astım, bronşların çeşitli uyarılara aşırı cevabı, artmış hava yolu direnci ve ekspiratuvar akım değişiklikleriyle karakterize bir hastalık olarak tanımlanmıştır^{18,19}.

II. 1. 2. İnsidans

Astım özellikle yetişkinler arasında insidans ve prevalansında giderek artış görülen bir hastalıktır. İnsidans yılda 2.65-4 /1000 arasında değişmektedir. Beş yaşın altındaki çocuklarda yıllık insidans erkek çocuklarda 8.1-14 /1000 ve kız çocuklarda 4.3-9 /1000 olarak saptanmıştır. 25 yaşın üstündekilerde ise yılda 2.1 /1000 olarak tespit edilmiştir^{1, 20}.

II. 1. 3. Prevalans

Astım prevalansı hastalığın hem insidansını hem de süresini gösterir. Bir hastalığın, hastanın birinci derece akrabalarındaki prevalansının o hastalığın genel popülasyondaki prevalansına oranı olarak tanımlanan risk oranı (RR; risk ratio), astım için yaklaşık 5-6 olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda astım prevalansı erişkinlerde yaklaşık olarak % 3-5, çocukluk çağında ise % 5-15 arasında olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda dünyanın birçok bölgesinde astım ve alerjik hastalıkların prevalansında artış olduğu rapor edilmektedir^{2, 19}. ABD’de 10 milyon insanın astımlı olduğu ve poliklinik hizmetlerine başvurulardaki en yaygın 13. hastalık olarak ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Ek olarak, yılda 470.000 kişi hastaneye yatarken, 5000’den fazla ölüm kaydedilmiştir^{2,21}. Emosyonel faktörlerin astım hastalığını arttırdığı bilinmektedir. Bunun yanı sıra psikolojik faktörlere bağlı astım ölümleri de bildirilmiştir. Bu

açından astım psikosomatik olmaktan çok somatik-psişik bir hastalık olarak tanımlanabilir. Gelişmiş toplumlarda astım prevalansı % 4-23 arasında değişmektedir. İngiltere’de genel nüfustaki astım prevalansı yaklaşık olarak % 4-8 iken, bu oran birinci dereceden akrabalarında hastalık bulunanlarda % 20-25’e çıkmaktadır. Japonya’da % 0.7, ABD’de % 8.5 ve Avrupa ülkelerinde ortalama % 5 oranında astım prevalansı saptanmıştır ²². Türkiye’de hastalığın prevalansı kesin olarak bilinmemekle birlikte yetişkinlerde % 2.2-6.4; çocuklarda ise % 6.9-15.3 olarak tespit edilmiştir. Ancak bölgesel farklılıklar ile prevalansın % 11 (doğu-güneydoğu bölgesi) ile % 18.4’e (kuzey bölgesi) kadar çıktığı bildirilmiştir ⁴⁻⁶.

II. 1. 4. Popülasyon

Astımın tüm dünyada ırksal özellik gösterdiği bildirilmiştir. ABD’de her yaşta zencilerde beyazlara oranla daha sık astım görülmektedir. New York’ta yaşayan Portorikolu çocuklarda en yüksek astım oranı saptanırken, Meksika kökenli Amerikalılar’da en düşük oran bulunmuştur ^{1,2}. Dünyanın değişik coğrafi bölgelerinde yaşayanlarda farklı astım prevalansının saptanması hastalığın ırksal özelliklerini kanıtladığını düşündürse de, önemli iklim ve çevresel özelliklerin katkısı prevalans farklılığına neden olabilir. Avustralya’da yapılan bir çalışmada da aynı şehirde yaşayan değişik ırktan bireylerdeki astım ve hava yolu aşırı duyarlılığı incelenerek çevresel etkiler ortadan kaldırılmıştır. Aynı çalışmada, Avrupa kökenlilerde hava yolu aşırı duyarlılığı % 20 iken; Pasifik Adaları kökenlilerde bu oranlar sırasıyla % 9 ve % 16 olarak bulunmuştur ³.

II. 1. 5. Epidemiyolojik Risk Faktörleri

II. 1. 5. 1. Genetik Faktörler

Astım genetiği alanındaki araştırmaların temelini, klinik hastalığın ancak genetik açıdan duyarlı bireylerde ortaya çıktığı düşüncesi oluşturur. Bu duyarlılık kendini, bir çevresel tetikleyici faktöre maruz kalındıktan sonra gösterir. Astımda ev tozu akarları, sigara dumanı, viral solunum yolu infeksiyonları ve hava kirliliği gibi çevresel faktörler sorumlu tutulmuştur. Ancak genetik duyarlılığa ait çalışmalar halen tartışılmaktadır ²³. Astımlı hastaların yakın akrabalarında astım prevalansının artmış olması hereditenin rolünü kanıtlamaktadır. Astımlı olguların aile bireylerinde

% 13; non-astmatik aile bireylerinde ise % 4 oranında monogenetik geçiş saptanmıştır ⁷. İkizler üzerinde yapılan çalışmalarda ayrı semptomlu alerjik hastalık monozygot ikizlerde %19 oranında saptanırken; bu durum dizigotik ikizlerde % 4.8 olarak bulunmuştur ²⁴. Duffy ve ark. ²⁵, bu oranı sırasıyla % 30 ve % 12 olarak bulmuşlardır. Astım, genel popölasyonda % 4 oranında gözlenirken; ebeveynlerden birinin astımlı olması halinde % 25 ²⁶; her ikisinin de astımlı olması durumunda % 50 oranında astım riski saptanmıştır ²⁷.

II. 1. 5. 2. Cevresel Faktörler

Astımlı hastaların ozon, kükürt dioksit ve nitrojn oksit gibi gazları solumaları halinde krize girdikleri ve tedaviye zor cevap verdikleri bilinmektedir. Endüstrileşmiş ölkeler üzerindeki atmosferde yüksek konsantrasyonlarda bulunan sülfür dioksit ve ozon astımın tetikleyici faktörü olarak kabul edilmektedir. Sülfür dioksitin 1 ppm konsantrasyonundaki inhalasyonu normal kişilerde herhangi bir değışikliğe neden olmazken; astımlı olgularda hava yolu daralmasına yol açmaktadır ²⁸. Hava kirliliğı olan bölgelerdeki astım görölme oranı ile havadaki nitrik oksit, sis ve hidrokarbonların düzeyleri arasında korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Bu duruma örnek olarak 1996 Atlanta Olimpiyat Oyunları gösterilmektedir. Atlanta Olimpiyat Oyunları boyunca yapılan trafik düzenlemeleri ile egzoz gazlarının %30 oranında azaltılmasıyla, hastanelere başvuran astım krizi vakalarında erişkinlerde %40, çocuklarda ise %19 oranında azalma tespit edilmiştir ⁹.

II. 1. 5. 3. Sigara

Sigara iyi bilinen bir solunum yolu irritanıdır. Hayatın ilk yılında aileleri sigara içen çocukların hışıltılı alt solunum yolu enfeksiyonu ve astım gibi durumları sigara içmeyen ailelerin çocuklarına oranla daha sık gösterdikleri dikkati çekmiştir. Günde 10 ya da daha fazla sigara içen ebeveynlerin çocuklarında 12 yaşından önce astım gelişme riski 2.5 kat artmaktadır ¹⁰. Yetişkinlerde, sigara içen ve içmeyenler arasında astım prevalansında bir değışiklik saptanmamıştır. Ancak sigara içimi mukozal permeabilite artışı sonucu bronkospazm yapan etkenlerin penetrasyonunda artış ve serum IgE ile kan eozinofilisinde artış yanı sıra immün sistemi etkileyerek astım etiyopatogenezinde de rol oynamaktadır ²⁹.

II. 1. 5. 4. Atopi

Solunum sırasında akciğerlere ulaşan pek çok iritan hava yolu fonksiyonunu değiştirmektedir. Alerjik bronşial astımın en önemli nedeni inhalasyon yolu ile alınan aeroalerjenleri içeren çevresel ajanlar ve çevre kirliliğidir. İnhalan alerjenler olarak polenler, mantar sporları, ev tozu, hayvan kıl, tüy ve deri döküntüleri sayılabilir. Atopi hava yolu inflamatuvar hastalıkları için risk faktörü olarak tanımlanmakta ve astımda atopinin rolü giderek daha önemli bir yer almaktadır. Alerjik faktörler en belirgin hastalık nedeni olarak izlenmekte ve erişkin atopik olguların yaklaşık % 35-55'sinde; çocukların ise % 80-90'ında tanımlanabilmektedir³⁰. Atopinin tanımlanmasından sonra aile taramaları bu yönde yoğunlaşmıştır. Aile bireylerinden birinde atopi saptanması kişide atopi bulunma riskini %30-50; anne ve babanın da atopik olması ise riski % 60-100 oranına yükseltmektedir. IgE veya deri testi reaktivitesinin artmasıyla astımın her yaşta görüldüğü dikkati çekmiştir. Serum total ve spesifik IgE düzeyi yüksekliğinin saptanması ve deri testi pozitifliği monozygotik ikizlerde, dizigotik ikizlere göre daha sık bulunmuştur³¹. Popülasyonun % 30-50'si atopik olmasına rağmen sadece % 5-7'sinde astım gelişmektedir. Genel olarak 30 yaş altındaki astım patolojisi alerjik kökenli iken, 40 yaşın üzerinde başlayanlarda alerjik değildir. Bu nedenle astım hastalığında alerjik komponentler mevcutken, atopi hastalık gelişimi için yeterli bulunmamıştır^{30, 31}.

II. 1. 5. 5. Bronşial Hiperreaktivite

Astımın karakteristik bir özelliği olan ancak normal bireylerde de bulunabilen hava yolu aşırı duyarlılığında da ailesel özellik saptanabilmektedir. Astmatik olguların % 70-80'inde egzersiz sırasında havayolu darlığı bulguları izlenebilmektedir³². Longo ve ark.²⁷, astımlı çocukların, non-astmatik ebeveynlerinde bronşiyal aşırı yanıtıllığı % 50 oranında bulunurken; astımlı olmayan çocukların ebeveynlerinde bu oran % 10 oranında kalmıştır. Bu sonuçlar, hava yolu aşırı duyarlılığının otozomal dominant yolla geçen bir özellik olduğunu düşündürmüştür.

II. 1. 5. 6. Doğum Faktörleri

Prematüre bebeklerin normal bebeklere oranla daha fazla havayolunda aşırı duyarlılık gösterdiği bildirilmiştir. Prematürelerde astım ile akciğer hastalığı arasındaki ilişki birçok araştırmaya konu olmuştur. Yeni doğan akciğer hastalığından kurtulan bebeklerde özellikle bronkopulmoner displazi varsa, çocukluk çağında havayolu akım hızları daha düşük olmaktadır. Doğum ağırlığı 2000 g altında olan bebekler yedi yıl boyunca takip edilmiş ve aynı yaştaki diğer çocuklara oranla daha fazla bronşial duyarlılık gösterdiği saptanmıştır ^{27, 32}.

II. 1. 5. 7. Yaş ve Cinsiyet

Çocukluk döneminde yoğun alerjen maruziyeti astım semptomlarının erken başlamasına yol açmaktadır. Ekstresek astım için genç yaşta olmak oldukça kuvvetli bir predispozan faktördür. Alerjik hastalıklar, 10 yaş altındaki erkek çocuklarda çok daha fazla görülmektedir ¹⁹. Kadınlarda, 35-54 yaşları arasında yeni vakaların ortaya çıkması, erkeklerde daha fazla olmakta ancak 55-64 yaşları arasında ise kadınların insidansında artış gözlenmektedir. Kırsal kesimdeki astım vakalarının %75'inde 20 yaşından önce semptomların ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Genel olarak gelişmiş ülkelerde kentleşme ve batı tarzı yaşam solunum yolu alerjenlerini ve astım görülme sıklığını arttırmaktadır ³³.

II. 1. 5. 8. Solunumsal Enfeksiyonlar

İki yaş altındaki çocuklarda solunumsal sinsitiyal virus enfeksiyonları en önemli etiyolojik faktör olarak rol oynamakta ancak, solunum enfeksiyonlarının kesin etiyolojisi bilinmemektedir. Ancak çocukluk çağında geçirilen bazı enfeksiyonların alerji yönünden koruyucu olduğuna dair bulgular mevcuttur. Kabakulak ve tüberküloz gibi enfeksiyonları geçiren çocuklarda astım görülme oranının daha düşük olduğu saptanmıştır. Ayrıca atopik bebekler ilk bir yaş içerisinde nonatopik bebeklere göre daha az solunum yolu enfeksiyonu geçirmektedirler ³⁴. Yaşın ilerlemesi ile üst hava yolu enfeksiyonları astım için tetikleyici etkenler arasında en sık rastlanan faktörlerdendir. Rhinovirüsler, influenza, parainfluenza ve mikoplazmal enfeksiyonları ön plana çıkmakta, bakteriel enfeksiyonlar ise daha arka planda kalmaktadır. Viral enfeksiyonlar akciğerde bazofil ve

mast hücrelerinden inflamatuvar mediatörlerin salınımını artırmaktadır. Bu nedenle astmatiklerin daha fazla viral infeksiyonları geçirdiği gözlenmiştir. Alt solunum yollarındaki viral infeksiyonlar sırasında T hücre sitokin ekspresyonu Tip 1'den, Tip 2'ye değişerek immün yanıtın modifiye olmasına ve astmatik inflamasyonun ortaya çıkmasına yol açmaktadır³⁵. Hemafilus influenza ekstrelerinin erken ve geç faz tepkimelerine neden olduğu ve özellikle erişkinlerde astım krizine daha sık oranlarda yol açabileceği tespit edilmiştir^{36,37}.

II. 1. 5. 9. Fiziksel aktivite ve ozmotik uyarı

Astımlı olguların %70-80'inde egzersiz sırasında hava yolu darlığı bulguları izlenebilmektedir. Özellikle soğuk havalarda ani olarak başlayan egzersiz, astım semptomlarının ortaya çıkmasına ve artışına yol açmaktadır. Bu konuda iki hipotez üzerinde durulmaktadır. Egzersiz sırasında hızlı solunum ile su buharı dışarı atılmakta ve bu sırada bronş epitelinde osmolarite artmakta ve yine aynı nedenle hava yolu yüzey ısısının düşmesi sonucu astım bulguları ortaya çıkmaktadır. Bu iki uyarının aynı anda olduğu ve bunların sonucunda inflamatuvar hücrelerden özellikle mast hücrelerinden mediatör salınımı ve nöral refleksin aktivasyonu sonucu astım semptomları tetiklenebilmektedir. Egzersize bağlı astım tablosu ya hemen ya da egzersizden 1-2 saat sonra gelişmektedir^{32,38}.

II. 1. 5. 10. Gıdalar ve katkı maddeleri

Sindirim yolu ile alınan besinler astıma neden olabilirler. Özellikle yumurta, süt, balık, çikolata ve kuru yemişler ile astım krizleri ortaya çıkabilir. En fazla besin alerjisine süt çocukluğu döneminde rastlanır ve en önemli alerjik gıda inek sütüdür. İlk yaş içinde inek sütü verilen çocuklarda atopi gelişme olasılığı vardır. Gıda alerjisi yaş ilerledikçe azalır. Gıdalar fırıncı astımında olduğu gibi nadir olarak inhalen alerjen gibi davranarak astıma yol açabilirler. Hazır gıdalar içine renk vermek, tatlandırmak, lezzet vermek ve bozulmayı önlemek amacıyla konulan bazı katkı maddeleri astım ve diğer alerjik reaksiyonlara neden olabilirler. Sarı renk veren tartarazin, mavi renk veren indigotin, kırmızı renk veren amartadin gibi kimyasal ajanlar astmatik reaksiyonlara yol açabilirler. Sülfidler, besinlerin bozulmasını önlemek ve uzun süre taze

kalmalarını sağlamak için kullanılan koruyucu maddelerdir. Toplumun %1'inde sülfite alerjisi tespit edilmiştir. Sülfite bileşiklerinin kullanıldığı gıda maddeleri alerjik reaksiyonlara yol açarak astım ataklarını tetiklemektedir³⁹.

II. 1. 5. 11. İlaçlar

Astımda önemli rol oynayan ilaçların başında aspirin gelmektedir. Hastaların % 3'ünde tetikleyici faktör aspirin olup genellikle nazal polip ve perrenial rinit ile beraber izlenmektedir. Bu hastalarda nonsteroidal anti-inflamatuar (NSAID) ilaçlar, antibiyotikler, beta blokerler, ACE inhibitörleride önemlidir. Beta blokerlerin ölümcül astım ataklarına yol açabildiği tespit edilmiştir. Sülfite içeren bazı ilaçlarda alerjik reaksiyonlara ve astıma yol açabilir. Adrenalin, isoprenal gibi bronkodilatör ilaçlar, lokal anestetikler ve antibiyotikler, antiaritmikler, parenteral nütrisyon ve diyaliz solüsyonları gibi ilaçlar içerdikleri sülfite nedeniyle astmatik reaksiyonları başlatabilirler⁴⁰.

II. 1. 5. 12. Mesleki Faktörler

Bazı meslek gruplarında astım görülme oranı daha yüksektir. Çalışma ortamındaki kimyasal ya da çeşitli organik iritan maddeler hava yollarında aşırı cevap oluşumuna yol açarak astımlı kişilerde uyarıcı bir rol oynayabilir. Pamuk tozları, persülfat, etilen diamin, formaldehit, pankreatik enzimler, platin, krom, nikel gibi çalışma ortamında bulunabilen maddeler astıma neden olabilirler. Mesleki astım insidansı maruz kalınan antijenin miktarına bağlı olarak değişebilir.

II. 1. 6. Astım Patogenezi

Astım hastalığı poligenik ve multifaktöriyel bir patolojidir. Özellikle bireysel yatkınlığı olanlarda çevresel uyarılar ile etkileşen çeşitli genetik faktörler mevcuttur. Astım patofizyolojisi, havayolu açıklığına eşlik eden havayolunun kronik inflamasyonundan oluşur. İnflamasyon hücreleri havayolu boyunca toplanarak konaktaki proinflamatuvar ajanların salınımıyla epitelial hücrelerde düzleşme, mukus hipersekresyonu ve havayolunda ödem gelişimine katkıda bulunur. Bronşial subepitelial parasempatik sinir hücrelerinin uyarılması, alerjen ve iritanları içeren çeşitli uyarılara havayolunun aşırı duyarlılığı ve düz kas kontraksiyonuna neden olan vagal tonus artışına

yol açmaktadır¹⁹. Bronşiyal duyarlılık, havayollarının çeşitli provoke edici uyaranlara cevap olarak çok kolay ve çok aşırı şekilde daralarak cevap vermesi halidir. Bu durum klinik olarak bronşiyal irritabilitenin mevcudiyetini göstermektedir. Havayolları, ya direkt olarak havayolu düz kaslarının eksitasyon kontraksiyon mekanizmalarını harekete geçiren spesifik reseptörler yoluyla uyarılmakta ya da özellikle mast hücreleri gibi mediyatör salgılayan hücreleri tetikleyerek provoke etmektedir^{41, 42}.

Astımda havayolu daralması multifaktoryal bir olaydır. En önemli neden inflamatuvar hücrelerden salınan çeşitli mediatörlerin provoke etmesi sonucu bronş düz kası kontraksiyonudur. Bu mediyatörler arasında; mast hücrelerinden salınan histamin, triptaz, prostoglandin D₂ ve lökotrien C₄, lokal afferent sinirlerden salınan nöropeptidler, postganglionik efferent sinirlerden salınan asetil kolin sayılabilir. Hava yolu düz kaslarının kontraksiyonunun oluşturduğu daralmayı, ödem, hücrel infiltrasyon ve remodelling (düz kasların, damarların ve salgı bezlerinin kronik hiperplazisi ile birlikte hava yolu duvarında matriks birikmesi) gibi hava yolu duvarını kalınlaştıran faktörler daha da belirgin hale getirir. Eğer hava yollarının içi goblet hücreleri ve submukozal salgı bezleri tarafından salgılanan bol miktardaki yapışkan ve visköz sekresyonlarla dolmuş ve ayrıca hücrel artıklar ve damarlardan sızan plazma proteinleri de birikmişse hava yolu daralması iyice belirgin hale gelir. Esas olarak astıma bağlı fonksiyonel bozukluklardan hava yollarındaki bu daralma sorumludur. Hava yolu daralması trakeobronşial ağacın bütününde mevcut olmakla beraber esas olarak 2-5 mm çapındaki hava yolları etkilenmektedir. Hava yolu direnci artmış ve ekspiratuar akım hızları azalmıştır. Daralmış hava yolları ekspiryum sırasında yüksek akciğer hacimlerinde kollabe olduğundan rezidüel volüm artmıştır. Sonuç olarak, daralmış olan hava yollarından ekspiryum yapmak için gereken efor ve yüksek akciğer hacimleri nedeniyle azalmış kompliyansı yenme zorunluluğu solunum işini önemli ölçüde artırır³².

Semptomatik astımda, mast hücreleri ve eozinofillerin sekretuar granülleri büyüklük ve elektron dansitesi yönünden heterojen olup mediatör salgılamak üzere aktive oldukları düşünülmektedir. Eozinofiller venüllerden dışarı çıkarak submukozal dokular ve epitel yoluyla

lumen yüzeyine doğru göç etmektedir. Astmatik ve normal hava yollarındaki lenfosit tipi T hücrelerdir. Ancak, hafif ve orta derecedeki astımda epitel ve submukozada T hücre sayısında ve T hücre subgruplarının (CD₄ ve CD₈) sayısında artış olmamıştır. İntrinsik astımda özellikle CD₄ hücreleri olmak üzere T hücre sayıları artmaktadır. Atopik ve non-atopik astımlıların bronşiyal biyopsileri incelendiğinde T hücre aktivasyonu için marker olan IL-2 reseptörleri ve HLA-DR reseptörlerinde artış olduğu görülmüştür. Bu bulgular, T hücrelerinin mediatör salgılayan hücreler olarak fonksiyon gören mast hücreleri ve eozinofillerin hava yollarındaki birikmesinin kontrolünde önemli rolü olduğu görüşünü desteklemektedir ⁴²⁻⁴⁴. Hayvan çalışmalarında, CD₄ hücrelerinin alt gruplarının farklı sitokinler salgıladıkları gösterilmiştir. TH₁ hücreleri, IL-3, IL-4, IL-4, GM-CSF ve IL-10 yapımını yürütmektedir. Fonksiyonel olarak TH₁ hücreleri klasik gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarında rol alırken; TH₂ hücreleri alerjik ve parazitik cevapta rol almaktadırlar. TH₁ ve TH₂ hücreleri negatif feed-back mekanizması ile kontrol edilirler. Mast hücreleri, preform şekilde IL-4, IL-5 ve TNF- α içermekte ve IgE'ye bağlı bir uyarı sonucu salınmaktadır. IL-4 endotel hücrelerinde vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM) ekspresyonunu indüklediği ve IL-5, eozinofiller için potent bir kemoatraktan ve aktivatör olarak etki göstermesi nedeniyle mast hücrelerinden bu sitokinlerin salınması alerjene bağlı geç cevabından sorumludur ⁴².

II. 1. 7. Mediatörlerin Rolü

Mast hücreleri astım patogeneğinde rol alan primer efektör hücre olarak tanımlanmaktadır. Astımın erken cevabında rol aldığı gibi sekonder efektör hücreleri de aktive ederek geç dönem kronik inflamasyondaki reaksiyonlara neden olur ⁴⁵. Mediyatörler, hedef hücre üzerindeki reseptörlerle birleşen ve bu hücrelerden sekonder biyokimyasal reaksiyonlara yol açan, biyolojik efektör moleküllerdir. Mast hücresi granülleri içinde biyokimyasal (histamin, serotonin, kinin, peptid kemotaktik faktör) ve kimyasal (lökotrienler, prostaglandinler, PAF, taşikininler, interlökinler) çok sayıda mediatörler vardır ⁴⁶. Astımda eozinofiller, inflamasyon oluşumunda en önemli rolü oynayan hücrelerdir. Eozinofiller kemik iliği prekürsör hücrelerinden köken alırlar ve mezenkimal hücrelerden, T lenfositlerden derive olan growth veya coloni-stimüle edici faktörlerin kontrolü altında değişime uğrar. Eozinofillerin oluşumunda sitokinler, IL-3 ve IL-5 rol alır.

Eozinofilik mediyatörler içinde, membrandan köken alanlar (PAF, LT-C4, PGE, TXA) ve granüllerde depo edilenler (MBP, ECP, EDN, EPO) olmak üzere ikiye ayrılırlar ⁴⁷.

Astımda hava yolu epiteli, eozinofiller tarafından üretilen oksidanlar ve katyonik proteinler nedeni ile hasarlanmıştır. Bu durum permeabilitenin artmasına neden olur ⁴⁸. Alerjen sensitive olmuş organizmaya ikinci kez girdiğinde bronşial duvarda ve alveol boşluğunda, astımlılarda normale göre artmış, özellikle mast hücresi ve bazofillerde bulunan FceRI, alveoler makrofajların, lenfositlerin, eozinofillerin üstünde FceRII reseptörlerine bağlanmış olan en az iki IgE'nin Fab bölümü ile birleşerek immün kompleks oluşturur. Hücre yüzeyinde bulunan reseptöre bağımlı kalsiyum kanaldan içeri girerek kalmodin ile birleşir ve daha önceden hücre içinde yapılmış hazır bulunan mediyatörlerin (histamin, bradikinin, serotonin) salınımına neden olur. Aynı dönemde eozinofilik ve nötrofilik kemotaktik faktör de salınır. Salınan bu mediyatörler epiteli daha geçirgen hale getirir. Bronş düz kasları kasılır, klara hücrelerinden mukus artışı olur ve damardaki geçirgenlik artışıyla ödem gelişir. Bu reaksiyon zinciri 30 dakikada doruğa çıkarak, iki saat içinde kaybolur. 6-8 saat sonra erken immün kompleksin olduğu mast hücresi veya benzeri hücrelerin duvarında bulunan fosfodil serinden, fosfatadil etanolamin oluşur. Metiltransferaz 1 ve 2 enzimleri metillenerek fosfatil haline dönüşür. Fosfolipaz A₂ enzimi yardımı ile araşidonik asid oluşur. Araşidonik asid, lipooksijenaz ve siklooksijenaz yardımı ile yıkılır. Heksoneikopentoneik asit grubu maddeler, lökotrienler, prostaglandinler, tromboksan A₂ ve PAF ortaya çıkar ^{49, 50}.

II. 1. 8. Klinik Fizyopatolojisi

Bronşial astım doğada poligenik ve çok faktörlü bir hastalıktır. Değişik genetik faktörler çevresel uyarılarla etkileşerek şüpheli kişilerde fenotip üretir. Bu kişilerde solunum solunum yolunda kronik inflamasyon, inflamatuvar hücrelerin birikimi, pro-inflamatuvar mediatörlerin salınması ve epitel hücrelerinin ayrılması astım gelişimine katkıda bulunur. Subepitelial parasempatik sinir uçlarının maruziyet sonucu uyarılması ve vagal uyarı sonucu bronş kaslarının kasılması ve terminal bronşiollerin tıkanması görülür ⁵¹.

Astımda alerjik cevap erken ve geç faz olarak iki klinik tabloda incelenir;

Erken faz: Alerjen (Ag) ile karşılaşma sonucunda B lenfositleri tarafından salgılanan alerjen spesifik IgE antikorları (Ab) mast hücreleri ve bazofillerde bulunan yüksek afiniteli IgE reseptörlerine bağlanırlar. Bu olay alerjik sensitizasyon olarak bilinir. Aynı alerjen daha sonraki karşılaşmalarda dakikalar içinde bir Ag-Ab reaksiyonu oluşur. Eğer alerjen iki veya daha fazla IgE molekülü arasında köprü yapacak şekilde IgE moleküllerine bağlanırsa, IgE reseptörleri hücre yüzeyinde agregre olarak membran bağımlı proteolitik enzimleri de içeren bir dizi anjimatik olayı başlatır. Böylece enerji bağımlı non-sitolitik bir sürecin sonunda hücre içi granüller hücre membranı ile birleşir ve içeriklerini hücre dışına boşaltır (degranülasyon). Degranülasyon materyali histamin, triptaz, kinaz, kininojenaz, heparin gibi önceden sentez edilmiş mediatörleri içerir. Ayrıca mast hücreleri PGD₂ ve lökotrienleri (LTC₄, E₄, D₄) de sentezleyerek salgılar. Bu mediatörler, damarlardaki değişikliklere neden olarak bronkospazm, mukozal ödem ve sekresyonlara yol açarak dispne ve vizing tablosu gelişir. Bu arada duyu sinirleri de uyarılarak öksürük refleksini başlatır^{46, 49, 50}.

Geç Faz: Erken faz sırasında salınan mast hücre kökenli mediatörler, postkapiller endotel hücreler üzerine etki ederek, dolaşan lökositlerin endotel hücrelerine adezyonunu kolaylaştıran damar hücresi adezyon molekülü VCAM ve E-selektin ekspresyonunu artırır. IL-5 gibi kemoatraktan sitokinler de eozinofiller, nötrofiller, bazofiller, T lenfositleri ve makrofajların mukozayı infiltre etmesini kolaylaştırırlar. Alerjen ile karşılaşmadan 4-8 saat sonra bu hücreler aktive olur ve arken fazın bir çok proinflamatuvar reaksiyonlarını reaktif eden inflamatuvar mediatörler salgılanır. Bu hücre aracılıklı inflamatuvar reaksiyona geç faz cevabı denir^{42- 44}.

II. 1. 9. Tanı

Astım klinik tablosundaki “wheezing” solunum yollarındaki obstrüksiyonun en önemli semptomu ve klinik bulgusudur. Daralmış bronşlardan havanın girip çıkarken çıkarttığı hışırtılı solunum sesi olarak tanımlanmıştır. Ekspiratuvar bir ses olduğu halde, obstrüksiyon çok şiddetli ise ekspiryumun yanı sıra inspiriyuma da kayabilir. İnfant ve çocuklardaki periferik hava yolları total

solunum yolu rezistansının yaklaşık olarak %50'sini oluşturur. Ayrıca bu yaşta pulmoner kompliyans basıncı da azalmıştır. Bu nedenlerle küçük hava yollarını etkileyen bronşiyolit gibi hastalıklarda kolaylıkla periferik hava yolu obstrüksiyonu oluşturur. İnfant ve küçük çocuklarda rekürrent öksürük ve “wheezing” epizotları hemen daima astım nedeniyledir. Ancak her epizot nedeninin astım olmadığı unutulmamalıdır ⁵².

II. 1. 10. Moleküler Genetik Çalışmalar

II. 1. 10. 1. Genetik Polimorfizm

Bir hastalığa yol açan genetik bozukluk anormal bir proteinin bulunması ile gösterilebilir. İnsanda yaklaşık olarak 30 bin gen bulunduğu ve gen ile ilişkili yaklaşık 4000 kadar hastalık bulunduğu tahmin edilmektedir. Genetik polimorfizm mutasyon sonucu oluşmaktadır. Polimorfizmin en basit tipi bir nükleotidi başka bir nükleotid ile değiştiren tek tabanlı mutasyon sonucu oluşur ve “tek nükleotid polimorfizmi” veya “single nucleotide polymorphisms (SNPs)” olarak adlandırılır ^{53, 54}. SNPs insan genomu boyunca en genel polimorfizm tipi olup ekzonlar, intronlar, promotörler, yükselticiler ve genler arası bölgelerde bulunmaktadır. SNPs sıklığının kesin olarak saptanması zor olup çoğunlukla farklı nüfus ve genom bölgeleri arasında değişmektedir. Ancak bazı araştırmalar, SNPs insan genomunda ortalama her 0.3-1 kilobaz (kb) sıklığında bulunabileceğini öne sürmüşlerdir ⁵⁵. Bitişik SNP’lerden oluşan gruplar, gen haritalarını çıkartmak için kullanılabilecek bağlantı dengesizliği örneklerini sergileyebilir. Ancak, SNP’lerin diğer polimorfizmlere kıyasla daha az oranda değişebileceği yönünde bulgular mevcuttur ⁵⁶. SNPs bağlantılarının analizi konusundaki sorunlar genotip işlemlerindeki teknik sınırlamalar ve çok sayıda etkileşimli genetik ve çevresel etkenleri de kapsayan karmaşık insan hastalıklarında gen ile fenotip arasındaki bağlantı üzerine yapılan araştırmalar belirtilen sınırlamalardan kaynaklanmaktadır ^{53, 55-57}. SNPs’ler, genin kodlayıcı veya düzenleyici bölgelerinde bulunarak gen işlevini ya da ifadesini direkt olarak etkileyebilirler. Ancak çoğu SNPs’ler hiçbir şekilde gen yapısını ya da işlevini değiştirmez, dolayısıyla fenotipik değişimle ilişkilendirilemez. Böylece, incelenen DNA diziliminin, potansiyel olarak işlevsel (fenotipik) bozukluk mu oluşturduğu yoksa

tedaviye yanıtındaki farklılığın gerçek nedeninin başka bir DNA dizilimi sonucu mu ortaya çıktığını kesin olarak saptamak önemlidir⁵⁸.

II. 1. 10. 2. Astım Farmakogenetiği

Astım gibi karmaşık hastalıkların farmakogenetiğini araştırmada SNPs kullanımının çok sayıda potansiyel avantajı bulunmaktadır^{53, 57}. Astımın çok faktörlü ve poligenik yapısı, en iyi şekilde çevresel ve genetik etkileri arasındaki modelle açıklanır. Bu modele göre, genetik mutasyona uğramış kişinin astım duyarlılığı artmaktadır. Bunda hastalığın gelişmesi için çok az derecede çevresel faktöre ihtiyaç duyulurken; daha az genetik mutasyona uğramış kişilerde semptomların gelişmesi için daha çok çevresel faktöre ihtiyaç vardır. Ancak genetik mutasyona uğramamış kişilerde çevresel faktörlere bağlı olarak hastalık gelişmemektedir⁵⁹. Aday gen çalışmaları, seçilmiş genlerin etkisini ortaya koymak, hastalığa neden olan genleri belirlemek, hastalık ciddiyeti ve fenotipi üzerine olan etkisini araştırmak ve tedaviye olan cevabın farklılıklarını tespit etmek üzerine odaklanmıştır⁶⁰.

Astım fenotipine katkıda bulunan genetik faktörlerin çalışmasında 2 yol izlenir;

1. Linkage analiz çalışmaları: Polimorfik genotip markerleri ile genomun tümü ya da bir kısmı gözden geçirilir⁶¹.
2. Aday gen çalışmaları: Belirlenen genlerin, hastalığın gelişmesinde, seyrinde ve tedaviye olan cevaptaki farklılıklara olan etkisi araştırılır⁶⁰.

Doğru fenotipin tanımlanması, hastalığı etkileyen genetik faktörlerin çalışılmasında kritik bir noktadır. Astım fenotipi heterojendir ve bazı belirtiler farklı hastalıklarda görülebilir veya görülmeyebilir. Bu problemi saptamak için iki yaklaşım önerilmiştir⁶²:

1. Doğru olarak klinik ve diagnostik kriterlere göre saptanmış astımların sınıflandırılması
2. Solunum yolu aşırı duyarlılığı, serum IgE seviyesi, ortopne, noktürnal dispne gibi fenotipik özelliklerin tespiti ve karakteristik genetik varyasyonların tanımlanması.

Bireysel astım tedavisinde yanıtlarının değişkenliği, hastalık şiddeti ve tipi, tedaviye uyum, aynı zamanda geçirilen hastalık, alınan diğer ilaçlar ve yaş gibi çeşitli faktörlerden

etkilenebilir ⁵⁹. Ancak genetik faktörlerin, tedavi değişkenliğinin büyük kısmının temelinde yattığına inandıran sebepler mevcuttur. Tedavi yanıtı açısından tek kişi üzerinde ve kişiler arası gözlemlenen varyasyonların karşılaştırılmasıyla beyaz ırktaki bireylerde %80 oranında genetik temele dayandığı ileri sürülmüştür ^{59, 63}.

Günümüzde yaygın olarak kullanılan dört ana sınıf astım farmakoterapisi bulunmaktadır; (i) bronşial hava yollarının genişletilmesi amacıyla inhalasyon yoluyla kullanılan bronkodilatatörler (β_2 agonitler: albuterol, salmeterol, fenoterol); (ii) hem inhaler hem de sistemik olarak kullanılan glukokortikoidler (beklametazon, triamsinolon, prednizon); (iii) hem bronkodilatatör hem de antiinflamatuvar etkili ajanlar (teofilin ve türevleri); (iv) sisteinil-leukotrien inhibitörleri ve reseptör antagonistleri (montelukast, pranlukast, zafirlukast, zileuton). Farmakoterapötik maddelerin her biri için tedavi yanıtlarının değişken olduğunu gösteren veriler bulunsada steroidler ve teofilin için tedavi yanıtlarının değişken olmasının nedenlerini araştıran sistematik çalışmalar yoktur. Dolayısıyla, sisteinil yolunun β agonistleri ve antagonistlerin farmakogenetiğine yönelik çalışmalar mevcuttur ⁶³.

II. 1. 10. 3. Astımda Moleküler Genetik Çalışmalar

Astım genetiği üzerine yapılan çalışmalarda, beyaz ırktan akraba çiftlerinde 5q23-31, 6p21.3-23, 11p15, 12q14-24.2, 13q21.3, 14q11.2-13 ve 19q13 kromozomları; Afrikalı-Amerikalı akraba çiftlerinde 5p15 ve 17p11.1-q11.2 kromozomları; İspanyol kökenli Amerikalı akraba çiftlerinde ise 2q33, 12q14-24.2 ve 21q21 kromozomları ile bağlantı gösterilmiştir. Bu çalışmalar, bir arada ele alındığında, astım ve alerjinin özellikleriyle bağlantılı birçok yeni lokus bulunabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte bu lokusların ancak çok küçük bir bölümünün (5q, 6p, 11q, 12q ve 13q kromozomları) replike olduğu bulunmuştur ⁶⁴.

II. 1. 10. 3. 1. 11q13 Kromozomu

Atopi ölçütlerinden biri olan serum IgE düzeyi genetik kontrol altındadır. Atopinin kontrolünü sağlayan, otozomal dominant geçişli ve kromozomun 11q lokalizasyonunda bulunan APY geni olarak adlandırılan bir gen lokusu tespit edilmiştir. Bu geni taşıyanların % 85’inde alerjik semptomlar bulunmuş ve % 20’si astmatik olarak tanımlanmıştır. Tespit edilen 11q kromozomu “alerjinin non-spesifik duyarlılık kromozomu” olarak adlandırılmıştır. Ancak kullanılan tekniğin karmaşık olması, az sayıda ailenin incelenmiş olması sonuçların yorumlanmasını güçleştirmektedir⁶⁵.

II. 1. 10. 3. 2. 5q Kromozomu

Astmatik olgularda diğer bir ilgi çeken gen bölgesi 5q31 kromozomudur. IL-4 gen bölgesi olarak isimlendirilen bu bölge serum IgE yüksekliği ile ilişkili bulunmuştur. IgE yapımını kontrol eden genler HLA sistemine bağlı değildir. Total IgE düzeyleri ile 5q kromozomunun sitokin gen kümesindeki en güçlü bağlantıyı IL-4 ve IL-9’da göstermiştir. Bu genin astımdan sorumlu tutulabilecek özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir^{66, 67}. Bu sonuçlar, Meyers ve ark.⁶⁸, tarafından total IgE düzeyleri ile IL-9 arasında bağlantı olduğunu gösterilen akraba çifti analizleriyle doğrulanmıştır. Daha önce tanımlanan IL-4 sitokin sentezinden sorumlu olan 5q bölgesi ile IFN- γ ve nitrik oksit sentezi ile ilişkili 5q31-q33.16 bölgesi tanımlanmıştır. Bu bölgenin de bronşial aşırı cevaplılık ve serum Ig E değişiklikleri ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Ek olarak, astım için bir risk faktörü olan hava yolu aşırı duyarlılığının genetik kontrol altında olduğu düşünülmektedir. Kolinerjik uyarılara karşı bronşlardaki aşırı duyarlılığın bağımsız bir otozomal resesif genle geçtiği deneysel hayvan çalışmalarında gösterilmiştir⁶⁹.

II. 1. 10. 3. 3. 6p Kromozomunda MHC lokusu

Belirli atopik reaksiyonlara ya da astım reaksiyonlarına neden olan alerjen yanıtlarına genetik yatkınlık, dikkatleri HLA ya da T hücresi reseptör proteinlerindeki varyasyonla ilişki olasılığına çekmiştir. Bu moleküller antijenlerin ele alınmasında ve tanınmasında büyük önem taşır. Bu ilişki HLA Sınıf II haplotipler ile özgül Ig E yanıtları arasındadır. Ancak astım veya

bronşial aşırı cevabın HLA ile ilişkisi konusunda yapılan çalışmalarda, gerek atopi gerekse bronşial cevap açısından 6p kromozomu ile herhangi bir bağlantı saptanmamıştır⁷⁰.

II. 1. 10. 3. 4. 12q15-q24.1 Kromozomu

Bu kromozom lokusu üzerinde IF- γ , insülin-benzeri büyüme faktörü-1 ve nükleer faktör- γ alt birim genlerinin yer alması bu bölgeyi astım ve atopiye yatkınlık yaratan lokusların bulunması açısından çekici bir aday haline getirmektedir. Barnes ve ark⁷¹, 12q kromozomunda astım ile total serum IgE konsantrasyonları arasında bağlantı bulduklarını bildirmişlerdir.

II. 2. β_2 Adrenoseptör

II. 2. 1. β_2 Adrenoseptör Vücutta dağılımı

Sempatik sinir sinir sisteminde farmakolojik olarak ayırt edilmiş çeşitli adrenerjik reseptör grupları bulunur. Bu reseptörler, epinefrin, norepinefrin ve isoproterenol gibi adrenerjik agonistlere verdikleri yanıtı göre α ve β olarak iki gruba ayrılırlar. Beta reseptörler, β_1 ve β_2 tipinde olup, uyarılması ile düz kaslarda gevşeme (bronş, myometrium, kan damarları, barsaklar, mesane) oluşturur. β_2 -adrenoreseptör, vücutta yaygın olarak dağılarak çeşitli organ ve dokularda katekolamin etkisine aracılık eden, ekstrasellüler (N-terminal) ve intrasellüler (C-terminal) 7 adet trans-membran reseptör içeren klonlanmış 413 aminoasit dizilimine sahip bir G protein çiftidir. Kromozomun 5q31.32 kolunda lokalize olan bir 1242 baz intronsuz genin ürünüdür⁷².

β_2 -adrenoseptör, akciğer vasküler endotelyumunda, alveoler duvarlarda ve kolinerjik sinirlerin ganglionlarındaki hücrelerde yaygın olarak bulunur. Katekolaminlere cevap oluşturan fonksiyonel bir G protein çiftidir. Nörotransmitterlerin bu reseptörlere bağlanması adenilat siklazu aktive ederek hücre içerisindeki cAMP konsantrasyonunu artırır. β_2 -adrenoseptör uyarılması sonucunda birincil etki olarak vazodilatasyon ve bronkodilatasyon gelişir^{73, 74}.

β_2 -agonist ajanların farmakodinamiği ve moleküler biyolojisi yoğun bir şekilde incelenmiştir. Bu ajanlar, hücre yüzeyinde bulunan G protein kuplajlı reseptör olan β_2 -

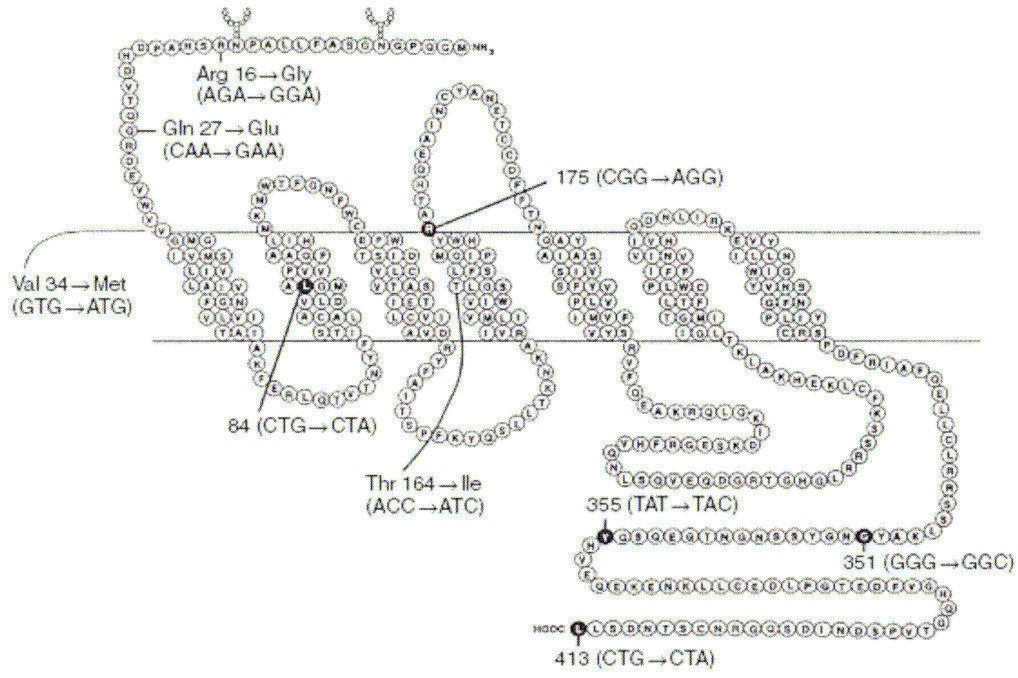
adrenoseptöre bağlanarak etkisini gösterir. Bu reseptörlerin aktive olmasının mukus aktivitesini artırdığı, vasküler geçirgenliği azalttığı ve nörotransmitterlerin serbestliğini modifiye ettiği düşünülmektedir. Agonist ilaçlar bronkokonstriksiyona karşı korumada önerilmektedir. Agonist ajanlara uzun süre maruz kalınması reseptörlerin sayısında azalma ve down-regülasyonuna neden olurken, reseptörlerin sürekli uyarılması desensitizasyon ile sonuçlanır⁷³⁻⁷⁵. Bu ajanlara karşı bireysel cevaplar ve ilacın etkisine karşı hızlı bir şekilde bağışıklığın gelişmesi, 5q31.32 kromozomunda bulunan intronsuz gen olan β_2 -adrenoseptör genine yoğunlaşmıştır^{11, 76, 77}.

II. 2. 2. β_2 -Adrenoseptör Gen (ADRB2) Polimorfizmi

ADRB2 5. kromozomun uzun kolundaki 5q31.32 alanda lokalizedir ve tek bir ekzon tarafından kodlanır. İlk kez 1987 yılında tespit edilmiştir⁷². ADRB2 geninde 9 farklı SNPs belirlenmiştir. İlk olarak Lentès ve ark.⁷⁸, tarafından restriksiyon enzimi kullanarak “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) rapor edilmiştir. McQuitty ve ark.⁷⁹, restriksiyon enzimi Fnu 4HI’yı kullanarak biallelik polimorfizm tespit etmişlerdir. Reihnsaus ve ark.⁸⁰, tarafından ADRB2’ye ait 9 farklı SNPs tanımlanmıştır. Bu SNPs’lerden 5 tanesi dejeneratifken; 4 tanesi (16., 27., 34. ve 164. kodon) matür reseptörler içindeki tek amino asit substitüsyonu ile sonuçlanır. Bunlar arasında en sık 16. ve 27. kodondaki değişimler gözlenir⁷⁷. Tanımlanan SNP’lerden, popülasyonlarda en sık rastlanılan ve amino asit değişikliğine neden olarak fenotipi etkileyebilen Arg16Gly ve Gln27Glu fonksiyonel mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlardan bir tanesi Arg16Gly, 16. kodonda yer almakta ve Arjinin (Arg) amino asitinin Glisin (Gly) amino asitine dönüşmesine neden olmaktadır. Diğer mutasyon Gln27Glu; 27. kodonda yer almakta ve Glutamin (Gln) amino asitinin Glutamik asit (Glu) amino asitine dönüşmesine neden olmaktadır. Diğer nadir görülen bir polimorfizmde ise 164. konumda Thr(tirozin) amino asitinin Ile(alanin) amino asiti ile yer değişimidir. 16. ve 27. konumdaki SNP’de ADRB2 geninin ekspresyonunu, down-regülasyonunu ve ADRB2 agonistlerinin reseptöre bağlanmalarını değiştirmektedir (Şekil 1)⁸¹.

ADRB2’ni üzerinde bulunduran kromozomun 5q alanı, astım ve alerji ile ilişkilendirilen çok sayıda geni içermektedir. Örneğin, serum IgE üretiminde rol alan IL-4 ve IL-9 sitokinlerinin

regülasyonu ile yakın ilişki içindedir⁸². Bu ilişki nedeniyle ADRB2 polimorfizmi ve astım fenotipi arasında yakın ilişki olabileceği önerilmiştir⁷⁷. ADRB2 polimorfizminin; solunum hastalıkları, konjestif kalp yetmezliği, hipertansiyon, obezite ve diyabet gibi hastalıkların oluşumunda yer aldığı gösterilmiştir. İn vivo ve invitro çalışmalarda, ADRB2 polimorfizmi varlığında fonksiyonel adrenerjik cevabın farklı olabileceği ve kardiyovasküler ve metabolik fenotip modülasyonunu değiştirebileceği tespit edilmiştir⁸³⁻⁸⁶.



Şekil 1. β_2 -Adrenoseptör Gen (ADRB2) Polimorfizmi (Liggett ve ark.¹¹)

II. 2. 3. ADRB2 16 Polimorfizmi

ADRB2 16. kodon, 46. nükleotid sırasında Guanin (G)'nin, Adenin (A)'e substitüsyonunu sonucu Arjinin (Arg) amino asitinin, Glisin (Gly) amino asitine dönüşmesine neden olmaktadır. Rekombinant ve non-rekombinant hücre sistemlerinde Gly16 mutasyonu reseptör sayısında azalmaya neden olurken aşağıya doğru etki eden geçiş yollarıyla reseptör kuplajının verimini azaltmaktadır. Buna karşılık Arg16 reseptörleri de sayıca azalma etkisine karşı dayanıklıdır. ADRB2 gen fonksiyonlarındaki bu değişimler, genin regüle ettiği bütün fizyolojik,

biyokimyasal ve farmakolojik olayları etkileyerek, bireysel farklılık göstermesine neden olmaktadır⁸⁰. Şekil 2’de insan ADRB2 16 gen sekansı şematize edilmiştir

```
4201 acctgccaga ctgcgcgcca tggggcaacc cgggaacggc agcgccttct tgctggcacc
4261 caatggaagc catgcgccgg accacgacgt cacgcagcaa agggacgagg tgtgggtggt
4321 gggcatgggc atcgtcatgt ctctcatcgt cctggccatc gtgtttggca atgtgctggt
4381 catcacagcc attgccaagt tcgagcgtct gcagacggtc accaactact tcatcacttc
4441 actggcctgt gctgatctgg tcatgggcct ggcagtgggt ccctttgggg ccgcccata
4501 tcttatgaaa atgtggactt ttggcaactt ctggtgcgag tttggactt ccattgatgt
4561 gctgtgcgtc acggccagca ttgagacct gtgcgtgac gcagtggatc gctactttgc
```

Şekil 2. ADRB2 16 Gen Sekansı

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide>)

Bu mutant alel frekansı popülasyonlara göre farklılık göstermekle beraber beyaz Avrupa ırkı popülasyonunda Arg16 alleli frekansı 0.40 ve Arg16Arg genotip frekansı %13.5 olarak bulunmuşken; Asya popülasyonundaki Arg16 alel frekansı 0.28 oranında tespit edilmiştir^{59, 60, 87}. Türk popülasyonunda yapılan çalışmada ise Arg 16 alel frekansı % 40.4 iken, Gly 16 alel frekansı % 59.6 olarak bildirilmiştir⁸⁸ (Tablo1). Farklı popülasyonlara ait astımlı bireylerdeki ADRB2 16 genotip ve alel frekansları Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Popülasyonlardaki Sağlıklı Bireylerin ADRB2 16 Genotip ve Alel Frekansları

<i>Genotip-Alel (%)</i>	<i>Arg16Arg</i>	<i>Arg16Gly</i>	<i>Gly16Gly</i>	<i>Arg</i>	<i>Gly</i>
Çin (n=41) Ho ve ark. ¹¹⁵	36.6	46.3	17.1	60	40
Y. Zelanda (n=92) Holloway ve ark. ¹¹⁸	20	42	38	40	60
Afrika-Amerikan (n=188) Xie ve ark. ¹¹⁹	23.6	50.4	26	48.8	51.2
Amerikan (n=188) Xie ve ark. ¹¹⁹	26.6	38.3	35.1	45.7	54.3
Amerikan (n=56) Reihhsaus ve ark. ⁸⁰	12.5	28.5	59	26.8	73.2
Türk (n=104) Aynacıoğlu ve ark. ⁸⁸	15.4	50	34.6	40.4	59.6

Tablo 2. Popülasyonlardaki Astımlı Bireylerin ADRB2 16 Genotip ve Alel Frekansları

<i>Genotip-Alel (%)</i>	<i>Arg16Arg</i>	<i>Arg16Gly</i>	<i>Gly16Gly</i>	<i>Arg</i>	<i>Gly</i>
Y. Zelanda (n=59) Holloway ve ark. ¹¹⁵	13.6	32.6	53.8	30	70
İngiliz (n=60) Lipworth ve ark. ⁸³	13.3	46.7	40	36.7	63.3
Amerikan (n=321) Dewar ve ark. ¹²⁰	11	44	45	33	67
Kore (n=440) Kim ve ark. ¹¹⁶	21.4	50.7	28	46.7	53.3
İspanyol (n=269) Martinez ve ark. ¹¹⁷	14.9	46.8	38.3	38	62
Çin (n=65) Ho ve ark. ¹¹⁵	13.8	73.8	12.8	51	49
Amerikan (n=51) Reihhsaus ve ark. ⁸⁰	10	37	53	28.5	71.5

II. 3. Glutasyon S-Konjugat Transferazlar (GSTs)

II. 3. 1. GSTs Genel Özellikleri

Canlı organizmalar besin öğeleri dışında sentetik ve doğal çeşitli kimyasallara sürekli maruz kalırlar. Bu ksenobiyotikler, toksik ve karsinogenik etkilere neden olarak organizmaya zarar verebilirler. Fungal-plant kaynaklı (plant fenoller, aflatoksin) ve reaktif oksijen türlerini (ROS) (süperoksit radikal, hidrojen peroksit) içeren toksik bileşikler doğal olarak gözlenmektedir. Ksenobiyotiklerin metabolizmasındaki Faz I ve Faz II reaksiyonları, lipofilik ve non-polar bir bileşiğin, hücreler tarafından daha kolay elimine edilen suda çözünür ve daha az toksik metabolite dönüşümünü içerir. Faz I reaksiyonları başlıca sitokrom P450 sistemi tarafından katalize edilir. Faz II enzimler, glutasyon, UDP-glukronik asit veya glisin gibi endojen suda çözünür maddelere indirgemek için aktive edilmiş ksenobiyotiklerin konjugasyonunu katalize eder. GSTs tarafından katalize edilen indirgenmiş glutatyon konjugasyon reaksiyonu, önemli bir faz II detoksifikasyon reaksiyonudur⁸⁹.

II. 3. 2. Ksenobiyotiklerin Glutatyona Bağlı Biyoaktivasyonu

Glutasyon konjugasyonu organik moleküllerin elektrofilik bölgelerinde meydana geldiği için, bu elektrofillerin biyolojik makromoleküllerle reaksiyonuna engel olur. Birçok durumda; glutasyon S-konjugasyonu kendileri biyolojik aktiviteye sahip olan ya da biyolojik olarak aktif hale gelebilmek için daha ileri metabolizasyona uğrayan glutasyon S-konjugatların oluşumuna yol açan biyoaktivasyon yolu olarak tanımlanmıştır. Konjugasyon reaksiyonlarına ek olarak glutasyon, ksenobiyotikleri indirgeyici mekanizmalarla da biyoaktif edebilmektedir^{90, 91}.

Glutasyon detoksifikasyon sistemi, ökaryotik hücrelerdeki en önemli sistemlerden biridir. Glutasyon, GSTs'ın katalizlediği bir reaksiyonda enzimatik olarak pek çok elektrofilik bileşiklere konjuge olur. Bu reaksiyonlarda oluşan glutasyon S-konjugatlar daha sonra ATP'ye bağımlı bir tarzda hücrelerden dışarı atılırlar. GSTs, indirgenmiş glutatyonun sülfür atomunun endojen ve eksojen kaynaklı çeşitli elektrofilik ve hidrofobik bileşiklerle konjugasyonunu katalizleyerek suda çözünen ve genellikle daha az reaktif metabolitler oluşturan büyük bir detoksifikasyon izoenzim

ailesidir ^{89, 91, 92}. İnsan vücudundaki toksik metabolitlerin çoğunu toksik ksenobiyotiklerden kaynaklanan substratlar oluşturmakla beraber; lipid hidroperoksitler ve alkenaller gibi bazı endojen kökenli oksijen metabolizma ürünlerinin de belirli GST izoenzimleri için substrat oldukları görülmektedir. Nükleofilik tiyolat anyonunun hidrofobik substratın elektrofilik merkezine saldırarak toksisitesi az ve suda kolayca çözünen glutatyon bağları oluşturması bunların hücrelerden uzaklaştırılmalarını kolaylaştırır ⁹³.

II. 3. 3. Sitozolik GSTs'lerin Detoksifikasyonu

GSTs izoenzimleri, çeşitli dokularda kalitatif ve kantitatif olarak çok farklı miktarlarda ifade edilebilirler. Ayrıca GSTs, bir organ içindeki farklı bölgelerde seçici olarak lokalize olabilirler. Çeşitli organlarda GSTs izoenzimlerinin oluşumundaki kalitatif ve kantitatif farklılıklar, ksenobiyotiklerin toksik etkilerine karşı dokuların farklı etkilenmelerine yol açabileceklerinden dolayı özel ilgi konusudurlar ⁹⁴. Memeli GSTs, hem sitoplazmada hem de endoplazmik retikülümde lokalize olmuştur. Fakat sitozolik GSTs aktivitesi, mikrozomal olanlara göre 40 kat daha fazladır. Sitozolik GSTs fizikokimyasal ve immünokimyasal farklılıkların yanında substrat seçiciliğinde de büyük farklılıklar gösterirler. Substrat seçiciliği muhtemelen elektrofilik substratların bağlanma yeri olan H-bölgesinin üç boyutlu yapısal özellikleri tarafından belirlenir. Sitozolik enzimlerin katalitik çeşitliliği nedeniyle, yapısal farklılık açısından çok geniş dağılım gösteren elektrofilik substratlar glutatyon tarafından detoksifiye edilmektedir ⁹⁵.

II. 3. 4. GSTs'lerin Sınıflandırılması

GSTs, sitozolik olarak substrat spesifikliğı, immünolojik özellikler, amino asit dizi benzerlikleri ve izoelektrik noktalarına bağlı olarak homolog olmayan ve türden bağımsız sınıflara ayrılmışlardır. İnsanlarda bulunan GSTs üzerine yapılan ilk genetik çalışmalar, genetik olarak birbirinden farklı üç sitozolik GSTs izoenziminin bulunduğunu göstermiştir ⁹⁶. Mannervik ve ark. ⁹⁴ yaptıkları daha ileri çalışmalarda, bu grupların diğer bütün memelilerde bulunduğu ve alfa, mü ve pi olarak adlandırılan üç sınıfı ifade ettikleri bulunmuştur. Bunu izleyen çalışmalarda, teta olarak adlandırılan sitozolik bir GST sınıfı daha bulunmuştur ⁹⁷. Teta sınıfı GSTs, aktif bölgedeki

bir serin amino asit kalıntısının varlığıyla karakterize olup; bu durum alfa, mü ve pi sınıflarında korunmuş olan aktif bölge tirozin kalıntısından farklılık göstermektedir. Daha yakın bir zamanda kappa olarak adlandırılan, suda çözünebilir, mitokondriye spesifik bir GST tanımlanmıştır. Fakat bu sınıfın yapı, fonksiyon ve evolusyonu hakkında çok az şey bilinmektedir ⁹⁸.

Sitozolik GSTs, 8 alt sınıfa ayrılmaktadır. Bunlardan alfa 6 kromozomda; mü 1. kromozomda; pi 11. kromozomda; teta 22. kromozomda; sigma 14. kromozomda; zeta 14. kromozomda; sigma 4. kromozomda ve omega 10. kromozomda yer alırlar (Tablo 3) ⁹⁹. Sınıflar arasındaki amino asit dizilimi % 50'den fazla benzerlik göstermekle beraber, her sitozolik sınıfın kristal yapısından, genel polipeptid katlanmasının oldukça benzer olduğu görülmektedir. GSTs, aynı gen sınıfında aynı ya da farklı alt ünitelerden oluşmuş dimerik proteinlerdir. GSTs'in 24-29 kDa ağırlığındaki alt üniteleri homodimer veya heterodimerler oluştururlar ve her bir monomer kinetik olarak bağımsız aktif bir bölgeye sahiptir ^{93, 94}.

Tablo 3. İnsan Glutasyon S-Transferazlarının Sınıflandırılması (Strange ve ark. ⁹⁹)

<i>Enzim</i>	<i>Alfa</i>	<i>Mu</i>	<i>Teta</i>	<i>Pi</i>	<i>Zeta</i>	<i>Sigma</i>	<i>Kappa</i>	<i>Omega</i>
Kromozom	6p	1p	22q	11q	14q	4q	ND	10q
Gen	A1-A4	M1,M5	T1, T2	P1	Z1	S1	K1	O1

II. 3. 5. GSTs Gen Polimorfizmi

GSTs ailesi iyi tanımlanmış polimorfizmler gösteren pek çok lokus bulunmaktadır. Bu enzimler elektrofillerin sitotoksik ve mutajenik etkilerine karşı hücrel korunmada kritik rol oynaması nedeniyle detoksifikasyonu allellerin çeşitli hastalıklara yatkınlığı arttırdığı düşünülmektedir ¹⁵.

Havayolu duyarlılığı oluşturan çevresel iritanların yaygın özelliği lokal inflamasyona yol açma yeteneklerinin olmasıdır. Örneğin, ozon hava yolu inflamasyonu ile karakterize respiratuar

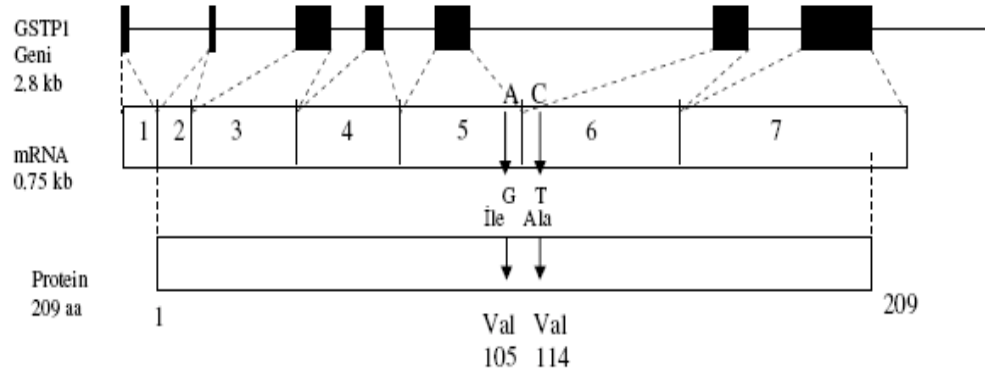
semptomlar ve takiben ROS lokal formasyonlarının oluşumuna yol açar ¹⁰⁰. ROS'dan kaynaklanan oksidatif stres, hücrel inflammatuar cevapla sonuçlanan önemli bir komponenttir. Hava yolundaki bu inflammatuar cevap, DNA oksidasyonuna ve hidroperoksitler ile aldehitleri içeren lipid ürünlerinin oluşumuna neden olur. Ancak, bronşial hava yolunun bu gibi sitotoksik ürünlerden korunmasında bireysel ve genetik farklılıklar mevcuttur. ROS'nin detoksifikasyonundaki yetersizlik, konakçı hücrelerindeki inflammatuar süreci sürekli hale getirerek bronkokonstriktör mekanizmayı aktive eder ve astım semptomlarının artmasına neden olur ¹⁰¹. ROS aracılı reaksiyonların toksik ürünlerinden hücrelerin korunmasında, başlıca sitozolik mü ve pi sınıf enzimlerin rol aldığı gösterilmiştir. Başlıca sitozolik aktivitesi olan pi sınıf GST, oksidatif strese karşı hücrel korumada rol aldığı için yaygın olarak insan akciğerinde ifade edilir ¹⁰². Havayolu irritasyonu sonucu astım hastalığının da dahil olduğu kronik obstriktif akciğer hastalıklarının (KOA) gelişmesi, polimorfik genler ve kalıtsal mutasyonların varlığı ile sonuçlanır. Bu açıdan GST'nin üyesi olduğu gen ailesinin incelenmesi anlamlı bulunmuştur ⁹⁴.

II. 3. 6. GST pi Enzimi

GST pi enzimi ilk olarak insan plasentasında bulunan anyonik GST olduğu tespit edilmiştir. Sonradan başlıca beyin, karaciğer, kalb, testis, adrenal bez, böbrek, pankreas ve akciğer olmak üzere dokuların büyük bir kısmında sentezlendiği görülmüştür. GST pi, pek çok normal dokuda, akciğer kanseri ve kolon kanseri gibi bazı malign dokularda saptanmıştır ¹⁰³. GST pi, platinyum bileşiklerinin detoksifikasyonuna doğrudan katılmakta ve bu bileşiklere karşı var olan kazanılmış rezistansların oluşumunda önemli bir rol üstlenmektedir ¹⁰⁴.

II. 3. 7. GSTP1 Gen Polimorfizmi

GSTP1, pi sınıf GST aktivitesini kontrol eden aday bir gendir ve atopi ve havayolu duyarlılığı gibi fenotipik özellikler ile ilişkili kromozomun 11q13 kolu üzerinde lokalize olan ve 7 adet ekzon içerir ¹⁰¹. GSTP1 geninde, ekzon 5 ve ekzon 6'da SNPs'ler belirlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. GSTP1 Geni ekzon 5 ve ekzon 6 Genetik Polimorfizm (Fryer ve ark. ¹⁰⁸)

Genetik çalışmalar ile ekzon 5’de, 313. nükleotid ve 105. kodonda Adenin (A) yerine Guanin (G) değişimini içeren; İsolösin yerine Valin amino asitinin geçmesi (Ile105→Val105) ile GSTP1 polimorfizmi tanımlanmıştır. Şekil 4’de GSTP1 ekzon 5 gen sekansı şematize edilmiştir (^{105- 107}).

```
2461 acagcccccct ggttgcccac tccccagtga ctgtgtgttg atcaggcgcc cagtcacgcg
2521 gctgtctccc ctccacccaa ccccagggtt ctatgggaag gaccagcagg agcagccct
2581 ggtggacatg gtgaatgacg gcgtggagga cctccgctgc aaatacatct ccctcatcta
2641 caccaactat gtgagcatct gcaccagggt tgggcactgg gggctgaaca aagaaagggg
```

Şekil 4. GSTP1 Ekzon 5: 2547-2650 Gen Sekansı

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide>)

Erişkin akciğer epitelyal hücreleri, çeşitli GST gen isoenzimleri tarafından etkilenmesine rağmen, başlıca akciğer epitelyumundaki sitozolik GST isoenzim aktivitesinin %90’dan fazlası GSTP1 gen, tarafından şifrelenmektedir ¹⁰⁸. GSTP1, DNA oksidasyonuna neden olan ROS’nin detoksifikasyonunu katalize eder. Aynı zamanda astım cevabında kritik rol oynayan mediatörlerden biri olan eikosanoidlerin sentezini ROS seviyelerinin modülasyonu aracılığıyla

etkileyebileceği önerilmiştir. Dahası, ROS'dan türeyen sitotoksik ürünler, proinflamatuvar eikosonoidlerin üretimini takiben araşidonik asit mobilizasyonunda da önemli rol oynamaktadırlar¹⁵. Böylece, GST gen ailesinin polimorfizmi, akciğer hastalıklarındaki bireysel faktörler arasında kabul edilmektedir. GSTP1 polimorfizmi nedeniyle GST enzim aktivitesindeki değişiklik sonucu ROS'nin vücuttaki detoksifikasyonunun etkinliği GSTP1 polimorfizmi tarafından belirlenerek, özellikle astım ve havayolu duyarlılığının gelişmesi ve şiddeti etkilenebileceği tespit edilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile yüksek aktiviteli GSTP1 genotipleri, ROS'nin etkilerine karşı havayolu epitelial hücrelerinin enzimatik detoksifikasyon aktivitesinde bireysel farklılıklara neden olarak havayolu duyarlılığı ve astım hastlığına karşı yatkınlık geliştirdiği tespit edilmiştir^{105, 106, 108, 109}. Farklı popülasyonlara ait sağlıklı ve astımlı bireylerdeki GSTP1 genotip ve alel frekansları sırasıyla Tablo 4 ve 5'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Popülasyonlardaki Sağlıklı Bireylerin GSTP1 Genotip ve Alel Frekansı

<i>Genotip - Alel (%)</i>	<i> Ile 105 Ile</i>	<i> Ile 105 Val</i>	<i> Val105 Val</i>	<i> Ile</i>	<i> Val</i>
Amerikan (n=1158) Gilliland ve ark. ⁽¹⁴⁾	39	45.2	13.7	63	37
İngiliz (n=44) Fryer ve ark. ⁽¹⁰⁸⁾	22.7	59.1	18.2	52.3	47.7
Alman (n=122) Nickel ve ark. ⁽¹¹⁰⁾	44	49	6	68.9	31.1
Tayvan (n=184) Lee ve ark. ⁽¹²⁹⁾	60.9	34.8	4.4	78.3	21.7
Kore (n=94) Yim ve ark. ⁽¹²¹⁾	61	37	2	79.3	20.7
Türk (n=150) Çahkılıoğlu ve ark. ⁽¹⁴²⁾	38	38	24	57	43
Türk (n=265) Aynacıoğlu ve ark. ⁽¹⁴³⁾	50.6	37.4	12.1	69.2	30.8
Türk (n=103) Tamer ve ark. ⁽¹³⁴⁾	47.6	44.7	7.8	72.7	27.3
Türk (n=134) Toruner ve ark. ⁽¹⁴⁵⁾	68.6	27.27	4.13	82.23	17.77

Tablo 5. Popülasyonlardaki Astımlı Bireylerin GSTP1 Genotip ve Alel Frekansı

<i>Genotip - Alel (%)</i>	<i> Ile 105 Ile</i>	<i> Ile 105 Val</i>	<i> Val105 Val</i>	<i> Ile</i>	<i> Val</i>
İngiliz (n=58) Fryer ve ark. ⁽¹⁰⁵⁾	46.6	50	3.4	71.6	28.4
Amerikan (n=269) Henningsen ve ark. ⁽¹⁰⁸⁾	14.9	46.8	38.3	38.3	61.7
Alman (n=83) Nickel ve ark. ⁽¹¹⁰⁾	46	47	7	69.3	30.7
Tayvan (n=82) Lee ve ark. ⁽¹²⁷⁾	75.6	22	2.4	86.6	13.4
Kore (n=89) Yim ve ark. ⁽¹²¹⁾	71	27	2	84.3	15.7
Türk (n=101) Tamer ve ark. ⁽¹³⁴⁾	32.7	44.6	22.8	55	45
Türk (n=210) Aynacıoğlu ve ark. ⁽¹⁴³⁾	51.9	44.3	3.8	74	26

II. 4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

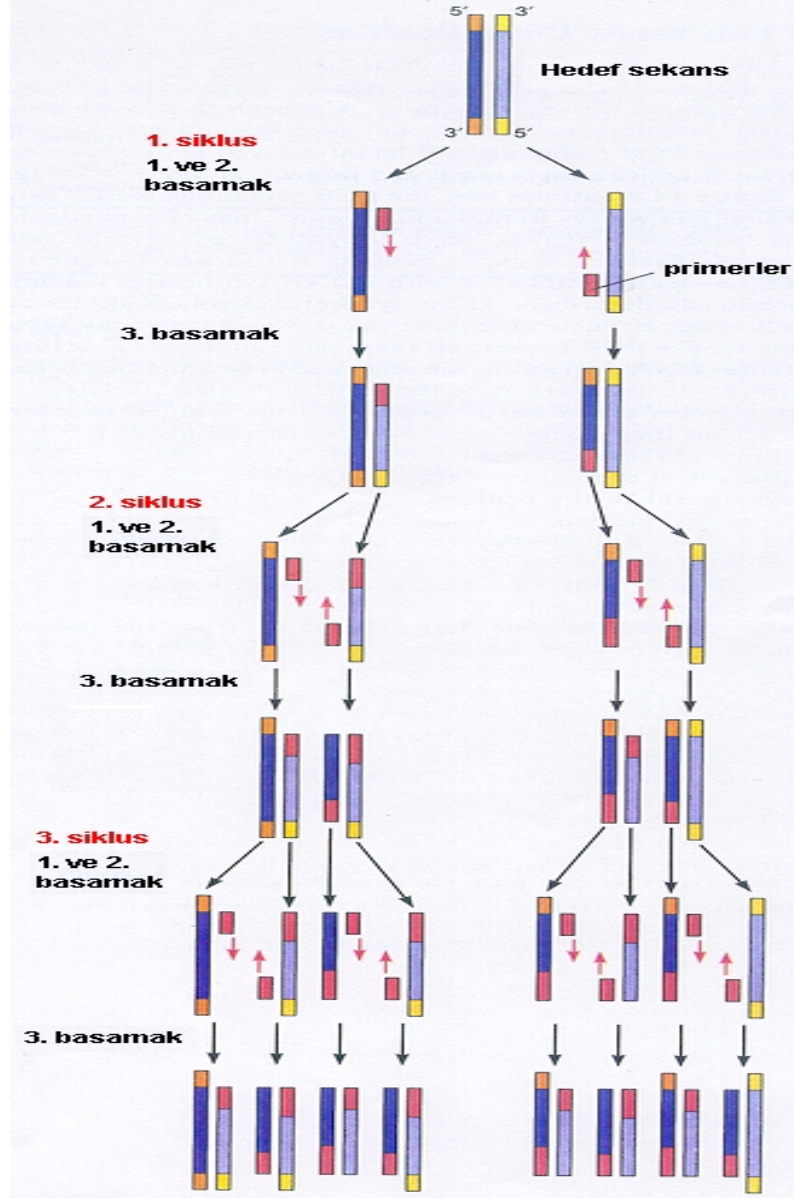
II. 4. 1. PCR Tekniği

Moleküler biyoloji tekniği olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) tekniği; belirli DNA veya RNA segmentinin ya da lokalize edilen genin invitro olarak nükleik asit senteziyle sayısının artırılması yöntemidir ^{110, 111}. İlk kez Saiki ve arkadaşları tarafından 1985 yılında uygulanmaya başlanan PCR, DNA karışımından tanımlanmış DNA sekansını defalarca ve selektif olarak kopyalayan bir tekniktir ¹¹². Bu işlem; yüksek ısı etkisiyle çift sarmallı olan DNA parçasının denatüre olması (denatürasyon), spesifik oligonükleotid primerlerin komplementeri oldukları zincire bağlanmaları (annealing) ve ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi olan Taq DNA polimeraz ile genişletilmelerinden (ekstensiyon) oluşan DNA replikasyonudur ^{113, 114}. PCR ile yeni sentezlenen DNA miktarı geometrik olarak artmaktadır. 1 DNA molekülü ile başlayarak 1 PCR siklusunda 2 molekül, 2 siklusta 4 molekül, 2 siklusta 8 molekül oluşur. Sıcaklıkları kendisi otomatik olarak değiştirebilen PCR aleti ile 3-4 saat gibi kısa bir zamanda 20 siklus sonunda 1 milyona yakın orjinal DNA kopyası elde edilmiş olur (Şekil 5).

II. 4. 2. DNA İzolasyonu

Canlıların tüm özellikleri, kuşaktan kuşağa gen adı verilen genetik maddelerle taşınmaktadır. Genler, kromozomların üzerinde lokalize bir ya da bir dizi nükleotidden oluşan parçacıklardır. Bu nükleotidler (DNA, RNA), nükleik asit bazları, fosfat molekülü ve pentoz şekerden oluşmuştur. Hücrelerdeki bütün biyolojik olayları (fizyolojik, biyokimyasal, genetik v.b.) yöneten, genetik bilgiler taşıyarak bunların nesillere aktarılmasında önemli fonksiyonu bulunan DNA molekülüdür.

DNA; kan, doku (karaciğer, dalak gibi), kemik, idrar, sperm, yanak epitel, saç teli (kıl kökü), embriyo gibi canlı biyolojik materyallerden ve mumya, arkeolojik örnekler, postmortem doku gibi ölü materyallerden de elde edilebilir.



Şekil 5. PCR Tekniği ile DNA Çoğaltılması (Mullis ve ark. ¹¹⁴)

II. 4. 3. DNA Polimeraz Enzimi

DNA polimeraz enzimi 1 parental DNA'yı kalıp olarak kullanarak 5'-3' yönünde yeni DNA sentezleyen enzimdir. Bu enzimin 5'-3' yönünde hem polimerizasyon hem de ekzonükleaz aktivitesi bulunmaktadır. Bu enzim substrat olarak dNTPlere ve kopyalamak için 1 DNA kalıbına ihtiyaç duyar. Çok sayıda termostabil DNA polimeraz enzimi bulunmaktadır. Vent polimeraz (Thermo litalis), Pfu polimeraz (Pyrococcus furious), Tth polimeraz (Thermus thermophilus), Tma polimeraz (Thermotoga maritima), Tli polimeraz (Thermococcus litoralis), Taq polimeraz (Thermus aquaticus) en fazla kullanılan termostabil DNA polimeraz enzimleridir.

Taq polimeraz enzimi, Yellow Stone Ulusal Park'ta Thermus aquaticus isimli bakteriden, 1969'da izole edilmiş bir diğer termostabil enzimdir ^{100, 101}. Taq DNA polimeraz'ın izole edilmesi, moleküler biyoloji ve diğer bilimsel alanlarda PCR'in uygulanabilirliğini arttırdığı için yararlı olmuştur. 832 aminoasitten oluşmuş, 94kDa molekül ağırlığı ve 200.000 Ü/mg spesifik aktivitesi olan Taq DNA polimerazın en önemli avantajı, termostabil bir enzim olduğu için denatürasyon aşamasında aktivitesini kaybetmemesi ve daha önce izole edilen polimerazlar gibi her denatürasyon aşamasında ilave etme gerekliliğinin olmamasıdır ^{110, 111}.

Taq DNA Polimeraz'ın yarılanma süresi (T_{1/2}); 92.5°C'de 130 dk, 95.0°C'de 40 dk, 97.5 °C'de 5-6 dk'dır. Taq DNA polimeraz'da her enzim molekülü, 75-80°C'de saniyede yaklaşık 150 nükleotidi kapsayan spesifik polimeraz aktivitesini sahiptir. Taq DNA polimerazın saniyedeki polimeraz (ekstansiyon) aktivitesi; 70°C'de 60≥ nükleotid, 55°C 'de 24 nükleotid, 37°C'de 1.5 nükleotid, 22°C'de 0.25 nükleotid'dir ^{110, 111}.

Taq DNA polimeraz aktivitesini; ortamda bulunan bazı iyon ve solventler değiştirebilir. 0.7-0.8 mM total dNTP varlığında;

2 mM MgCl ₂	stimüle eder
10mM MgCl ₂	%40-50 inhibe eder
50mM KCl	%50-60 stimüle
50-75mM KCl	inhibe eder
75mM≥ KCl	bilinmiyor
NH ₄ Cl ₂	50mM kons. orta derecede inhibe eder
NaCl	%25-30 stimüle eder
DMSO	%10 inhibe eder

II. 4. 4. PCR Etkileyen Faktörler

II. 4. 4. 1. Enzim Konsantrasyonu

Taq Polimeraz için önerilen konsantrasyon her 100 µl reaksiyon için 1-2.5 Ünite'dir. Enzim miktarı hedef template veya primerlere bağlı olarak değişebilir. PCR optimize edildiğinde, enzim konsantrasyonun 100µl reaksiyon için 0.5-5 Ünite arasında olması ve jel elektroforezi ile analiz edilmesi önerilir. Enzim konsantrasyonu çok fazla ise nonspesifik ürünler birikebilecek, çok az ise hedef ürün istenen miktarda çoğaltılamayacaktır ^{110, 111}.

II. 4. 4. 2. Deoksinükleotid Trifosfatlar

PCR'da polimerizasyonun yapılabilmesi için gerekli olan dNTP (dGTP, dATP, dTTP, dCTP) stok konsantrasyonlarının her biri 1-2mM'dır. PCR'da 50 siklustan sonra yaklaşık dNTP'nin %50'si stabil olarak kalır. dNTP konsantrasyonunun 20-200 µM arasında olması ürünlerin optimal verimliliğine, spesifik ve stabil olmasına neden olur. Birleşme hatalarının minimum olması için 4 dNTP'nin eşit konsantrasyonda olması gerekir. 4 nükleotidden oluşan miksin konsantrasyonu, sınır değerlerden az olana daha yakın olursa PCR ürününün spesifikliği ve

verimi artmış olur. Çünkü düşük dNTP konsantrasyonları hedef olmayan bölgelere hatalı primer bağlanma riskini azaltmış olur^{110, 111}.

II. 4. 4. 3. Primerler

Genellikle olması gereken primer konsantrasyonu 0.1-0.5 µM'dır. Daha yüksek primer konsantrasyonu, yanlış primer bağlanmasını ve spesifik olmayan ürünlerin birikmesini ve primer-dimer diye adlandırılan kalıp DNA'dan farklı ürün oluşma ihtimalini artırabilir. Primerler genellikle %50-60'ı G+C'den oluşan 18-28 nükleotid dizisidir. Aynı zamanda, primerlerde 3' sonundaki C-G'lerin 3'ten fazla olması, G+C'den zengin sekanslarda yanlış primer bağlanmasını artırabilir. Bu nedenle bundan kaçınılmalı ve mümkünse primerlerde palindromik sekanslar bulunmalıdır. Bazı primerlerin çalışmamasının bir nedeni de kalıp DNA'daki ikincil yapıların varlığıdır. Bazı araştırmacılar DNA'daki sekonder yapıların varlığını önleyebilmek ve nonspesifik ürünlerin oluşumunu azaltmak amacıyla dGTP'ye ek olarak 7-deaza-2'-deoksiguanosin trifosfat (c7dGTP) nükleotid analogunun kullanılmasının yararlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Primerler seçilirken kendi baz sıralarının sadece hedef DNA üzerinde 1 bölgede bulunmasına ve başka bölgedeki sekanslarda bulunmamasına dikkat edilmelidir^{110, 111}.

II. 4. 4. 4. Primerlerin Bağlanması (Annealing)

Primerlerin bağlanması için gereken süre ve sıcaklık amplifikasyon primerlerinin konsantrasyonuna, uzunluğuna, baz kompozisyonuna bağlıdır. Uygulanabilir annealing sıcaklığı, primerlerin gerçek erime derecesinden (T_m) 5°C düşüğüdür. Genelde 55-72°C'deki annealing sıcaklığında en iyi sonuçlar elde edilir. Tipik primer konsantrasyonunda (0.2µM) bağlanma için sadece 1-2 saniye yeterlidir.

Annealing sıcaklığının artması, primerlerin yanlış bağlanma ve 3' sonundaki nükleotidlerin yanlış ekstensiyon riskini azaltır. Bu nedenle annealing sıcaklıkları özellikle ilk siklularda spesifikliğin artmasına yardımcı olacaktır. Yüksek dNTP konsantrasyonu ile düşük

ekstansiyon sıcaklığı primerlerin yanlış ekstansiyonuna ve nükleotidlerin yanlış ayrılarak genişlemesine neden olur.

II. 4. 4. 5. Primerlerin Ekstansiyonu

Ekstansiyon zamanı, hedef sekansın konsantrasyonuna, uzunluğuna ve sıcaklığına bağlıdır. Primer ekstansiyon, optimal sıcaklık olan 72°C'de yapılır. Nükleotidlerin 72°C'de DNA ile birleşme oranı (saniyede 35-100 nükleotid); buffera, PH'a, tuz konsantrasyonuna, kalıp DNA'nın yapısına bağlıdır. 72°C'de 1 dakika ekstansiyon zamanı, 2kb uzunluğu için bile yeterlidir.

II. 4. 4. 6. Denatürasyon Zamanı- Sıcaklığı

PCR'ın başarısızlığı için muhtemel neden, hedef kalıbın veya PCR ürününün bütünüyle ayrılmamasıdır. Tipik denatürasyon 95°C 30 sn veya 97°C 15 sn'dir. Bununla beraber, G+C bakımından zengin targetlarda daha yüksek sıcaklıklar uygun olabilir. DNA'yı denatüre etmek için sarmal ayrılma sıcaklığı -Tss- (strand separation temp.) sadece bir kaç saniye alır. Bütünüyle denatüre olmama kalıp DNA'nın bir kısmının ayrılmamasına neden olur. Bu nedenle istenen üründe azalma olur. Tersine, denatürasyon basamakları çok yüksek/ ya da çok uzun olursa gereksiz enzim aktivite kaybına yol açar.

II. 4. 4. 7. Siklus Sayısı

Siklus sayısı diğer parametreler ayarlandığında başlangıç konsantrasyonuna bağlıdır. Genel bir hata, fazla ürün elde etmek için çok sayıda siklus yapmaktır. Bir geni amplifiye etmek için siklus sayısı 40'tan daha fazla olursa PCR'da ciddi olarak bir şeyler yanlış demektir. Çok fazla sayıda siklus, spesifik olmayan ürünlerin miktarını ve kompleksliliğini artırabilir (Plato etkisi). Önemli olan başlangıç hedef konsantrasyonuyla siklus sayısı arasındaki ilişkinin belirlenerek, oluşan ürünün kalitesine bağlı olarak siklus sayısına karar vermektir ^{110, 111}.

<u>Hedef Molekül</u>	<u>Siklus Sayısı</u>
3. 10 ⁵	25- 30
1.5. 10 ⁴	30-35
1. 10 ³	35-40
50	40-45

II. 4. 4. 8. Magnezyum Konsantrasyonu

Magnezyum konsantrasyonu; primerlerin bağlanmasını, her iki DNA sarmalının ve PCR ürününün ayrılma sıcaklığını, ürün özelliğini, primer-dimer oluşumunu, enzim aktivitesini ve verimliliğini etkileyebilir.

Taq DNA polimeraz, DNA kalıp, primerler ve dNTP'lerin maksimum düzeyde bağlanması için serbest halde Mg'a ihtiyaç duyar. Bu nedenle, PCR'da Mg konsantrasyonu, total dNTP konsantrasyonundan daha fazla 0.5-2.5 mM olmalıdır. EDTA ya da diğer şelatörler mevcut primer stoklarındaki ya da kalıp DNA'daki Mg optimizasyonunu bozabilir.

II. 4. 4. 9. Diğer Reaksiyon Bileşenleri

PCR için önerilen buffer 10-50 mM Tris-HCl (PH=8.3-8.8) dipolar iyonik buffer'dır. 20mM Tris-HCl (PH=8.3) 20° C'de tipik termal siklusta PH'sı 7.8 ile 6.8 arasında değişir. Primerlerin bağlanmasını kolaylaştırmak amacıyla 50mM KCl reaksiyon ortamına ilave edilebilir. 50mM'dan fazla KCl veya 50mM NaCl Taq polimeraz aktivitesini inhibe eder. Genomik PCR için 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂ ve 100µg/ml jelatin içeren standart buffer gereklidir.

DMSO, E. Coli DNA Polimeraz I'in Klenow fragmenti ile yapılan PCR'da etkili iken, %10 DMSO, Taq polimeraz'da %50'ye yakın aktiviteyi inhibe eder. Bu nedenle çoğu uygulamada tavsiye edilmez. DMSO ve non iyonik deterjanlar DNA sekansının oluşmasını özellikle sekonder yapıları azaltarak sağlar. Bir çok protokolde protein ilavesi bulunmamasına rağmen, jelatin, bovin

serum albumin ve noniyonik deterjanlar (Tween 20 ya da Laureth 12 gibi) enzimin stabile olmasına yardım etmek amacıyla ilave edilirler.

II. 4. 5. PCR Tekniğinin Uygulama Alanları

Çok sayıda uygulama alanı olan PCR'ın kullanıldığı alanlar ^{112, 113};

- Gen delesyonlarının belirlenmesi
- Spesifik nokta mutasyonlarının saptanması
- Enzim ya da spesifik DNA sekanslarının gen haritalarının oluşturulması
- Popülasyonda genetik polimorfizm gösteren enzimlerin genotip dağılımlarının saptanarak, kişilerin hastalıklara / kansere duyarlılıklarının araştırılması
- Popülasyon epidemiyolojisi
- Hastalıkların klinik teşhisi
- Hastalıklara neden olan genetik etkenlerin araştırılması
- Aile soy ağacının çıkarılması
- Genetik danışmanlık
- Adli tıplık vakalar
- Mikrobiyolojik çalışmalar
- Temel biyolojik çalışmalar'dır.

Kısaca PCR; moleküler biyoloji ve genetik alanlarında, genetik araştırmanın ilerlemesinde; moleküler biyoloji alanında; DNA sekanslarının hızla çıkarılmasında, insan gen haritalarının geliştirilmesinde, gen aktivite çalışmalarında bir ya da daha fazla hücre analizlerini olası kılarak katkılı olacaktır. Genetik alanında ise, iyi belirlenmiş hastalıklarda mutasyonların doğrudan DNA sekans analizi ile tanınmasını ve bazı genetik hastalıkların genel popülasyonda taranmasını sağlayacaktır.

II. 4. 6. PCR Tekniğinin Avantajları

1. Çok küçük 1ng'dan dah az genomik DNA parçaları bile kullanarak istenilen miktarda yeni DNA oluşturulmasına olanak sağlar.
2. Southern blot 5-10 mikrogram DNA kullanarak, 6-7 günlük sürede DNA analizi yaparken, PCR birkaç saatte DNA'yı çoğaltabilir.
3. Spesifik DNA dizisini seçip, istenmeyen dizilerin ortaya çıkmasını önleyebilir.
4. DNA'nın saflaştırılması gerekmediğinden zaman ve emek nükleik asitlerle yapılan çalışmalardan daha az olmakta ve hücresiz (Cell-free Molecular Cloning) klonlama olarak da adlandırılmaktadır.

II. 4. 7. PCR Tekniğinin Dezavantajları

1. Taq DNA Polimeraz enziminin yaklaşık olarak $2 \cdot 10^{-4}$ hata oranı taşıması

$$m = 2f / c$$

Hata oranı = m

Nükleotidlerin diziye katılmasında görülen hata=f

Döngü sayısı=c

2. Amplifiye edilmek istenen DNA parçasının her 2 sonu içinde spesifik proba, primere ihtiyaç duyulması.
3. Çoğaltılan DNA dizilerinin doğru çoğalmayıp, diziye yanlış nükleotidler katılabilir.
4. Primerlerin yanlış bağlanması/genişlemesi sonucu ya da primer-dimerlerinin oluşması nedeniyle nonspesifik ürünlerin elde edilmesi, istenen ürünün elde edilememesi ya da çok az elde edilmesi
5. Kontaminasyon riski
6. Çok ucuz bir yöntem olmadığı için, rutin teşhislerde kullanılamaması.

II. 4. 8. Restriksiyon Enzimleri

Yabancı DNA'ların spesifik nükleotid dizilerini tanıma bölgelerinden kesen endonükleazlara genel olarak restriksiyon enzimleri (RE) denir. Restriksiyon endonükleaz enziminin, çift iplikli DNA'da spesifik bölgelerden kesim yaparak DNA'dan genin veya gen

taşıyan bir DNA segmentinin çıkarılmasında etkin ve spesifik fonksiyonları vardır. Bu amaçla bu tür enzimler klonlamada ve genetik manipulasyonlarda fazlaca kullanılırlar. Bugün için 400'den fazla RE tanımlanmıştır. Bu enzimlerin 100 kadar değişik tanıma bölgesi bulunmaktadır. Bu enzimler ilk olarak izole edildikleri bakterinin adını alırlar. Bu enzimlerin bakterilerde kromozom üzerinde ya da ekstra kromozomal elemanlar üzerinde (plazmid ya da profaj gibi) bulundukları sanılmaktadır. RE'leri adlandırmak için 3 harf kullanılmaktadır, italik yazılırlar. Bunlardan ilki enzimin elde edildiği bakterinin cins adını göstermektedir. Diğer ikinci ve üçüncü harfler ise bakterinin tür adını gösterir. Daha sonra romen rakamıyla yazılan sayılar ise o bakteriden elde edilen kaçınıcı enzim olduğunu anlatır.

RE'ler Tip 1,2,3 olmak üzere 3 kısma ayrılır. Tip 1 ve 3, DNA'da spesifik baz sıralarını tanır ancak kesme işlemini başka baz sıraları arasından yapar. Bu nedenle bu gruplarda bulunan enzimler gen manipulasyonlarında kullanılmazlar (EcoAI, EcoBI). 2. grupta bulunanlar ise tanıma ve kesme yönünden daha spesifiklerdir ve rekombinat DNA teknolojisinde de amaca yönelik kullanılabilir. Bakterilerden çok sayıda tip 2 enzim izole edilmiştir. Tip 2 RE'ler 4,5,6,7 ya da 13 baz çifti uzunluğundaki DNA parçalarını palindromik keser. Tanıma bölgesindeki DNA molekülünün 1 dalı üzerindeki 5' uçtan 3' uca doğru olan baz sırası, komplementer dalın 5' uçtan 3' uca doğru olan baz sırası ile aynıdır.

DNA'daki tanıma bölgelerine bağlı olarak kestikleri parçacıklara yani DNA'daki aktivitelere göre tip 2 enzimleri; yapışkan uç oluşturanlar (sticky ya da cohesive), küt uç oluşturanlar (blunt), izoşizomerlar (isoschizomer) ve değişik tanıma yapanlar olmak üzere 4 grupta toplanırlar^{110, 111}.

III. MATERYAL ve YÖNTEM

III. 1. Çalışma Popülasyonu

Türk popülasyonundaki ADRB2 16 ve GSTP1 genetik polimorfizm dağılımını araştırmak amacıyla yaşları 18 ile 65 (Ortalama;38) arasında değişen 84 kadın ve 43 erkekten oluşan 127 sağlıklı bireyin kan örneklerinden yararlanılmıştır. Araştırma yapılan bu grup; hiç bir medikasyon almayan, kendisinde ve ailesinde kanser / herhangi bir kalıtsal hastalık gözlenmemiş bireylerden oluşturulmuştur. Ek olarak, Türk popülasyonundaki astım hastalığına ait ADRB2 16 ve GSTP1 genetik polimorfizm dağılımını araştırmak amacıyla yaşları 18 ile 75 (Ortalama;39) arasında değişen 88 kadın ve 41 erkekten oluşan 129 astımlı bireyin kan örnekleri toplanmıştır.

ADRB2 16 ve GST P1 genetik polimorfizmi ile astım oluşumu arasındaki ilişkinin araştırılması amacıyla Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göğüs Hastalıkları Kliniği'nde astım teşhisi konulmuş 129 olgunun kan örneklerinden yararlanılmıştır. 127 olgudan oluşan kontrol grubu; yaş ve cinsiyet dağılımı astımlı hastalarla uyumlu olacak şekilde, ailesinde ve kendisinde kalıtsal ve sistemik herhangi bir hastalık gözlenmemiş, herhangi bir medikasyon almayan bireylerden oluşturulmuştur. Astımlı hastalara ve kontrol grubuna astım oluşumunda rol oynadığı düşünülen diğer faktörlerin yer aldığı bir sonraki sayfada belirtilen anket formu uygulanmıştır.

-ASTIMLI HASTALAR İÇİN ANKET FORMU -

1.Adı, Soyadı:

2.Yaşı:

3.Medeni hali:

4.Ağırlığı (kg):

5.Boy (cm):

6.Mesleği:

7.İlk menstrüasyon periyodunun başlama yaşı:

8.Menapozal durumu:

Premenapozal ise; son menstrüasyon periyodunun kaç gün önce olduğu?

Postmenapozal ise; son menstrüasyon periyodunun kaç yıl önce olduğu?

9.Tanı konulduğu zamanki menopozal durumu:

10.Tanının ne zaman konulduğu?:

11.Uygulanan tedavi:

12. Daha önce hormon tedavisi gördü mü?Ne tip?

12.Oral kontraseptif kullandı mı?Nedir?

13.Kaç çocuğu var?

İlk doğumunu yaptığı yaş?

Son doğumunu yaptığı yaş?

14.Daha önce meme ile ilgili bir operasyon geçirdi mi?

15.Ooferektomi (Yumurtalıkların alınması) yapıldı mı? Yapıldı ise kaç yıl önce?

16.Sigara içme alışkanlığı:

Hiç içmedim () Eskiden içerdim ()

1-10 sigara/gün () 11-20 sigara/gün ()

20 ve daha fazla sigara/gün ()

1 yıldır içiyorum () 2-5 yıldır içiyorum ()

5-10 yıldır içiyorum () 10-15 yıldır içiyorum ()

15-20 yıldır içiyorum () 20 ve daha fazla yıldır içiyorum ()

17.Sigara içilen ortamlarda sıkça bulunuyor musunuz?

Evet () Hayır ()

18.Alkol kullanıyor musunuz?

Evet () Hayır ()

Nadiren () Haftada 1 kez ()

Haftada 2-3 kez () Haftada 4-5 kez ()

Haftada 6-7 kez ()

19.Beslenme alışkanlığınızda size en fazla uyan tanım aşağıdakilerden hangisi?

a)Kızartma ağırlıklı yağlı diyet

b)Sebze ağırlıklı yağsız diyet

c)Dengeli beslenme

20.Radyasyona maruz kaldınız mı? Hangi sıklıkta?

Evet () Hayır ()

21.Tiroidle ilgili bir rahatsızlığınız var mı?

Evet () Hayır ()

Hipotiroidizm () Hipertiroidizm ()

22.Aile bireylerinde ve sizde genetik bir hastalık var mı? Tipi?

Evet () Hayır ()

23.Ailenizde meme kanserli başka bireyler var mı?(Anne, kardeş, anneanne vb)

Evet () Hayır ()

III. 2. DNA İzolasyonu

III. 2. 1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Trizma Baz (Sigma Kat. No: T-1503)
- Sukroz (Sigma Kat. No: S-1513)
- Triton (Sigma Kat. No: X-100)
- Magnezyum Klorid (Sigma Kat. No: M-9272)
- Etilendiamin Tetra Asetik Asit (EDTA) (Sigma Kat. No:ED2SS)
- Sodyum Klorür (Merck)
- Sodyumperklorat (Sigma Kat. No: S-1513)
- Lauryl Sülfat (SDS) (Sigma Kat. No: L-4509)
- Kloroform (Merck)
- Hidroklorik asit (Merck)
- Mutlak Etanol (Kimetsan)
- Sodyum Hipoklorit (çamaşır suyu)

III. 2. 2. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Çözeltiler

-*Lysis Buffer(Reaktif A):* (10 mM Tris HCl (pH=8),320 mM Sukroz, 5 mM MgCl₂, %1 Triton); 12.1g Trizma Baz tartılarak 100ml distile suda çözüldü ve HCl ile pH'sı 8'e ayarlandı. 109.5 g Sukroz, 1.0g Magnezyum Klorid tartıldı, 1M Tris HCl (pH=8) çözeltisinden 10 ml ilave edilerek 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı. Otoklav ile steril edildi. En son olarak sıcakken 10ml Triton X-100 ilave edilerek, + 4 °C' de saklandı.

-*Reaktif B:* (400 mM Tris HCl (pH=8), 60 mM EDTA,150 mM NaCl, %1 SDS, 1000 ml distile su); 48.5 g Trizma Baz, 22.3 g EDTA, 8.8 g NaCl tartılarak 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı. HCl ile PH'sı 8'e ayarlanarak otoklav ile steril edildi. En son olarak sıcakken 10 g SDS ilave edilerek, oda sıcaklığında saklandı.

5M Sodyumperklorat çözeltisi: 70.2 g sodyumperklorat tartılarak 100 ml'ye distile su ile tamamlanarak, otoklav ile sterile edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

III. 2. 3. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Aletler

- Terazi (Sartorius BA 610)
- Su banyosu (Nüve BM 102)
- EDTA'lı steril vakumlu kan tüpü (Greiner)
- Falkon tüpü (Greiner)
- Kromozom tüpü (Greiner)
- Plastik Pastör pipeti (Greiner)
- Ağzı vidalı ependorf tüpü (Greiner)
- Steril Bioloop
- Mikropipetler
- Mavi ve sarı mikropipet uçları
- Otoklav bantı

III. 2. 4. Denevin Yapısı

1. 5-10 ml kan örnekleri EDTA'lı tüplere alındı. Kan örnekleri izolasyon yapılmaya kadar -20 °C'de saklandı. Kan örneklerinden sodyumperklorat-kloroform yöntemiyle DNA izolasyonu yapıldı.
2. Her birey için bir falkon tüpü kullanıldı. Her falkona soğuk Lysis bufferdan (Reaktif A) 35ml ilave edildi.
3. Kan örnekleri falkonlara boşaltıldı. Tüpler alt üst edilerek karıştırıldı.
4. 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi.
5. Bu arada kromozom tüplerine 5M Sodyumperklorat çözeltisinden 0.5ml koyuldu.
6. Santrifüjden çıkartılan falkonların süpernatantları çamaşır suyu dolu behere boşaltıldı.
7. Pelletlerin üzerine Reaktif B'den pastör pipet yardımıyla 2ml ilave edildi.
8. Falkondaki Reajan B'li pellet sodyumperklorat içeren kromozom tüplerin üzerine aktarıldı.
9. 15 dakika el ile alt üst edildi.
10. 65 °C'de 30 dakika etüvde inkube edildi.
11. Etüvden alınan tüplere soğuk kloroformdan 2ml ilave edildi.

12. 10 dakika alt üst edildi.
13. 10 dakika 1400 rpm’de santrifüj edildi.
14. Üst fazın hepsi pastör pipeti ile yeni kromozom tüplerine aktarıldı.
15. Yeni tüpe aktarılan süpernatantların üzerine 5ml soğuk etanol ilave edildi.
16. EtOH’lü tüpleri iyice alt üst edilerek, DNA sarmalının oluşumu gözlemlendi.
17. Bioloop ile oluşan DNA sarmalı alındı. Kuruması için ependorfa aktarılıp 5-10 dk bekletildi.
18. Kuruyan DNA’lar ependorfların içine aktarıldı ve DNA’nın büyüklüğüne göre 200/300µL steril distile su ilave edildi.
19. 60 °C’ de 1 gece su banyosunda inkübe edildi.
20. Çözünen DNA’lar +4 ° C’de saklandı.

III. 3. DNA Örneklerinin PCR’a Uygulanması

III. 3. 1. ADRB2 16-PCR’da Kullanılan Kimyasal Maddeler

- ADRB2 16 Primer (AR6) (5’-GCCTTCTTGCTGGCACCCCCAT-3’)
- ADRB2 16 Primer (AR4) (5’-CAGAGCACATCAATGGAAGTC-3’)
- dATP, 100mM (Fermentas)
- dCTP, 100mM (Fermentas)
- dGTP, 100mM (Fermentas)
- dTTP, 100mM (Fermentas)
- Taq DNA Polimeraz (Promega)
- 10x Termofilik Reaksiyon Bufferı (no Mg²) (Promega)
- 25mM MgCl₂ (Promega)

III. 3. 2. GST P1-PCR’da Kullanılan Kimyasal Maddeler

- GSTP1-F Primer (Operon) (5’-ACCCCAGGGCTCTATGGGAA-3’)
- GSTP1-R Primer (Operon) (5’-TGAGGGCACAAGAAGCCCCT-3’)
- dATP, Li-salt 25µmol (Fermentas)
- dCTP, Li-salt 25µmol (Fermentas)
- dGTP, Li-salt 25µmol (Fermentas)
- dTTP, Li-salt 25µmol (Fermentas)
- Taq DNA Polimeraz (NEBioLabs)
- 10x Termofilik Reaksiyon Bufferı (no Mg²⁺) (Promega)
- 25mM MgCl₂ (Promega)

III. 3. 3. DNA Amplifikasyonu İçin Kullanılan Aletler

- PCR aleti (DNA Thermal Cycler) (Techne PHC-1)
- Mikrosantrifüj (MSE, Sanyo)
- 0.5 ml’lik ependorf tüpü (Greiner)
- Mikropipetler
- Mavi ve sarı mikropipet uçları

III. 3. 4. DNA Amplifikasyonu için Kullanılan Çözeltiler

2 mM dNTP miks: 100 mM’lık dATP, dTTP, dCTP, dGTP nükleotid stok çözeltilerinden 20’er µl alınarak, üzerlerine 920µl steril distile su ilave edildi. Santrifüjle karıştırılıp –20°C’de saklandı.

25µM Primer I ve Primer II: Stok primer çözeltilerinin µmolaritelerine bağlı olarak, 25µM konsantrasyona steril distile su ile dilue edildiler. -20°C’de saklandılar.

III. 3. 5. Örneklerin ADRB2-16 Amplifikasyonu için PCR’a Uygulanması

DNA izolasyonu ile elde edilen DNA’lar, ADRB2 16 geninin çoğaltılması için ADRB2 16-PCR’ına uygulandı. Bu amaçla 500 µl’lik master miks hazırlandı. 0.5ml’lik ependorfa 25µM’lık primer I ve primer II’den 7.3 µl, 2mM nükleotid (dNTP miks)’den 7.3 µl ve Mg-free

buffer'dan 36 µl, 50mM MgCl₂'den 28.8 µl, 5Ü/µl aktiviteli Taq Polimeraz'dan 0.2 µl ve 216.2 µl steril distile su ilave edilerek karıştırıldı. 500µl' lik master miks → 50 µl'lik porsiyonlara bölündü → üzerine 2 µl DNA ilave edildi → santrifüj edildi → PCR aletine (Thermal cyclers) konuldu.

ADRB2 16-PCR'ın şartları; ilk basamak denatürasyon için 94°C'de 2 dakika, 40 siklus olan denatürasyon için 94°C'de 40 saniye, annealing için 64°C'de 40 saniye, ekstensiyon için 72°C'de 50 saniyedir. 1 siklus olan son ekstensiyon ise 72°C'de 10 dakika olarak belirlendi.

III. 3. 6. Örneklerin GSTP1 Amplifikasyonu için PCR'a Uygulanması

DNA izolasyonu ile elde edilen DNA'lar, GSTP1 geninin çoğaltılması için GSTP1-PCR'ına uygulandı.

Bu amaçla 23 µl'lik master miks hazırlandı. 25µM'lık primer I ve primer II'den 0.5'er µl, 2mM nükleotid (dNTP miks)'den ve 10x NH₄ reaksiyon buffer'dan 2.5'şer µl, 5Ü/µl aktiviteli Taq Polimeraz'dan 0.15µl ve 16.85 µl steril distile su ilave edilerek karıştırıldı → üzerine 2 µl DNA ilave edildi → santrifüj edildi → PCR aletine (Thermal cyclers) konuldu.

GSTP1-PCR'ın şartları; başlangıç denatürasyon için 94°C'de 5 dakika, 30 siklus PCR'da denatürasyon için 94°C'de 30 saniye, annealing için 57°C'de 30 saniye, ekstensiyon için 72°C'de 30 saniyedir. 1 siklus olan son ekstensiyon ise 72°C'de 7 dakika olarak belirlendi.

III. 3. 7. PCR Ürünlerinin Jele Uygulanması

III. 3. 7. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Rutin Elektrophorez Grade Agaroz (Flowgen Kat. No: A3-0500)
- Etidium Bromide (Sigma)
- Trisma Baz (Sigma Kat. No: T-1503)
- Borik Asit (Sigma Kat. No: B-0252)

- Etilendiamin Tetra Asetik Asit (EDTA) (Sigma Kat. No: ED2SS)
- Bromofenol Blue (Sigma Kat. No:B-6896)
- Ksilen Siyanol FF(Sigma Kat. No:X-4126)
- Gliserol (Sigma)
- 100 bp'lik DNA markerı (Gibco BRL)
- Jel maskeleye bandı (Sigma Kat. No:T-6656)

III. 3. 7. 2. Kullanılan Aletler

- Elektroforez güç kaynağı (Consort E 425) (Şekil 9)
- Elektroforez tankı (Pharmacia GN 100) (Şekil 10)
- Elektroforez tepsisi (Pharmacia)
- Jel tarakları (Pharmacia)
- Mikrotiter kabı
- UV-transilluminatör (UVP)
- Elektrikli ısıtıcı
- Terazi (Sartorius BA 610)
- Mikropipetler (Gilson)
- Sarı ve mavi mikropipet uçları
- Otoklav bantı

III. 3. 7. 3. Kullanılan Çözeltiler

TBE buffer (x10): Trisma bazdan 108 g, borik asitten 55 g, EDTA'dan 9.3 g tartıldı. 1L'ye steril distile su ile tamamlanarak otoklav ile sterilize edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

TBE buffer (x1): 100 ml TBE buffer (x10) üzerine 900 ml steril distile su ilave edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

%2'lik rutin agaroz çözeltisi: 2 g rutin agaroz tartıldı ve üzerine 100 ml TBE (x1) buffer'ından ilave edildi. Elektrik ısıtıcısı üzerinde kaynatılarak çözünmesi sağlandı.

Jel-loading buffer(jel yükleme tamponu): 0.25 g bromofenol blue, 0.25 g ksilen siyanol FF tartıldı ve 30 ml gliserol ve 70 ml distile su ilave edilerek karıştırıldı. Çözünmeleri için ısıtıldı. Oda sıcaklığında saklandı.

0.1µg/ml DNA marker'ı: 10µl 1µg/ml DNA marker, 90µl steril distile su ve 15µl loading buffer ilave edilerek karıştırıldı. +4 °C'de saklandı.

III. 3. 7. 4. Jelin Hazırlanması

Yukarıda açıklandığı gibi hazırlanan 100 ml %2 'lik agaroz çözeltisi soğumadan önce üzerine 10µl EtBr ilave edildi ve homojen dağılması için karıştırıldı. Bu sıcak karışım, daha önceden kenarları bant ile kapatılmış ve uygun taraklar yerleştirilmiş olan mika elektroforez tepsilerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü. Jellerin donması için 15 dakika beklendi. Taraklar çıkartılarak jeller + 4 °C'de saklandı.

III. 3. 7. 5. PCR Örneklerinin Jele Uygulanması ve Elektroforez

Enzim amplifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacı ile örnekler, PCR işlemi bitiminde %2'lik rutin agaroz jellere tatbik edildi. Bu amaçla önce mikrotiter kaplara her örnek için 2µl loading buffer konuldu. Loading buffer üzerine PCR ürününden 10µl ilave edilerek, pipetaj ile karıştırıldı. Bu arada jel TBE buffer (x1) içeren elektroforez tankına alındı. Loading buffer'lı PCR ürünleri, tarak dişleri sayesinde oluşan boşluklara teker teker uygulandı. 1 jele 10 örnek ve oluşan ürünün büyüklüğünü ölçebilmek için gerekli olan 1 DNA marker'ı uygulandı. Amplifikasyon ürünleri direkt olarak 100V akım varlığında 20 dakika jel elektroforezis'e tabi tutuldu. İşlem sonunda amplifiye edilen ADRB2 16 genine spesifik 323 bp'lik ve GST P1 genine spesifik 176 bp'lik bantlar UV-transilluminatör'de kontrol edildi.

III. 4. ADRB2 16 ve GSTP1 Genotipinin Belirlenmesi

III. 4. 1. ADRB2 16-Digest'inde Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 5'...C[▼]CATGG...3'
3'...GGTACC[▲]...5'
- Nco I (NEBioLabs) restriksiyon enzim sekansı
- 5'...GCAGTGNN[▼]...3'
3'...CGTCAC[▲]NN...5'
- Bts I (NEBioLabs) restriksiyon enzim sekansı
- BSA Buffer (x100) (NEBioLab)
- NEB Buffer 4 (x10) (NEBioLab)

III. 4. 2. GST P1-Digest'inde Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 5'...GTCTC(N)₁[▼]...3'
3'...CAGAG(N)₅[▲]...5'
- Bsm AI (NEBioLabs) restriksiyon enzim sekansı
- BSA Buffer (x100) (NEBioLab)
- NEB Buffer 4 (x10) (NEBioLab)

III. 4. 3. ADRB2 16 ve GST P1 -Digest'inde Kullanılan Aletler

- Santrifüj (Mistral 1000)
- Etüv (Nüve EN 400)
- 0.5 ml'lik ependorf tüpü (Greiner)
- Mikropipetler
- Sarı ve mavi mikropipet uçları

III. 4. 4. 1. ADRB2 16-Digest'inde Kullanılan Çözeltiler

NEB Buffer 4 (x1): 100µl NEB buffer 4 (x10) çözeltisine 900µl steril distile su ilave edilerek, santrifüj ile karıştırıldı. -80°C'de saklandı.

BSA Buffer(x10): 100µl BSA Buffer (x100) çözeltisine 900µl NEB buffer 4 (x1) ilave edilerek, santrifüj ile karıştırıldı. -80°C'de saklandı.

III. 4. 4. 2. GSTP1 -Digest'inde Kullanılan Çözeltiler

NEB Buffer 4 (x1): 100µl NEB buffer 4 (x10) çözeltisine 900µl steril distile su ilave edilerek, santrifüj ile karıştırıldı. -80°C'de saklandı.

BSA Buffer(x10): 100µl BSA Buffer (x100) çözeltisine 900µl NEB buffer 4 (x1) ilave edilerek, santrifüj ile karıştırıldı. -80°C'de saklandı.

III. 4. 4. 3. 1. ADRB2 16 Reseptörünün *NcoI* ve *BtsI* ile Kesilmesi

ADRB2 16-PCR ürünleri, *Nco I* ve *Bts I* restriksiyon endonükleaz enzimleri tarafından sırasıyla ADRB2 16 reseptörünün DNA diziliminde CCATGG spesifik nükleotid dizisi tanınarak 4265 konumundaki guanin bazından ve GCAGTG spesifik nükleotid dizisi tanınarak 4479 konumundaki timin bazından kesildi. Bu amaçla, ependorfa 10 µl PCR ürünü, 2 µl NEB Buffer 4 (x10) ve 0.2 µl *NcoI* ve 0.2 µl *BtsI* konulup, santrifüj ile karıştırıldı. 37°C'de etüvde 16 saat inkübasyona bırakıldı.

III. 4. 4. 3. 2. GSTP1 Reseptörünün *BsmAI* ile Kesilmesi

GSTP1-PCR ürünleri, restriksiyon endonükleaz enzimi olan *Bsm AI* tarafından spesifik nükleotid dizisi tanınarak, GSTP1 reseptörünün cDNA diziliminde 313'üncü baz olan Adenin bazından kesildi. Bu amaçla, ependorfa 8 µl PCR ürünü, 3 µl NEB Buffer 4 (x10), 0.8 µl *BsmAI* (4IU) ve 3.2 µl steril distile su konulup, santrifüj ile karıştırıldı. 55°C'de etüvde 16 saat inkübasyona bırakıldı.

III. 4. 4. 4. ADRB16 ve GSTP1 Digest Ürünlerinin Jele Uygulanması

III. 4. 4. 4. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

-Nusieve 3:1 Agaroz (FMC)

ADRB2 16 ve GST P1-PCR ürünlerinin jele uygulanmasında kullanılan kimyasal maddeler digest ürünleri için de kullanılmıştır.

III. 4. 4. 4. 2. Kullanılan Aletler

ADRB2 16 ve GST P1-PCR ürünlerinin jele uygulanmasında kullanılan aletler digest ürünleri için de kullanılmıştır.

III. 4. 4. 4. 3. Kullanılan Çözeltiler

%3.5'lik Nusieve agaroz çözeltisi: 3.5 g Nusieve agaroz tartıldı ve üzerine 100 ml TBE (x1) buffer'ından ilave edildi. Elektrik ısıtıcısı üzerinde kaynatılarak çözünmesi sağlandı.

ADRB2 16 ve GST P1-PCR ürünlerinin jele uygulanmasında kullanılan çözeltiler digest ürünleri için de kullanılmıştır.

III. 4. 4. 4. 4. Jelin Hazırlanması

Jel hazırlanması, PCR ürünleri bölümünde açıklandığı şekilde hazırlandı.

III. 4. 5. Digest Ürünlerinin Jele Uygulanması ve Elektrophorez

III. 4. 5. 1. ADRB2 16 Genotipinin Belirlenmesi

ADRB2 16 genotipinin belirlenmesi için, ADRB2 16-PCR ürünleri *Nco* I ve *Bts* I restriksiyon enzimleri tarafından kesildi. Astım hastaları ve kontrol grubunun ADRB2 16 genotip analizlerini yapılabilmek amacıyla, *Nco* I ve *Bts* I restriksiyon enzimleri tarafından kesilen örnekler jele uygulandı. Digest ürünleri, PCR ürünlerinin jele uygulanması ve elektrophorez bölümünde açıklandığı şekilde hazırlanarak, 120 V akım varlığında 30 dakika jel elektrophorezis'e tabi tutuldu. İşlem sonunda astım ve kontrol grubunun Tablo 6'da gözlenen spesifik bantları UV-transilluminatör'de incelenerek ADRB2 16 genotip analizleri yapıldı.

Tablo 6. ADRB2 16 Genotipinin Şematik Gösterimi

	Örnek-1	Örnek-2	Örnek-3
PCR			
323 bp			
DIGEST			
236 bp			
218 bp			
87 bp			
ADRB2	Arg16Arg	Arg16Gly	Gly16Gly

III. 4. 5. 2. GST P1 Genotipinin Belirlenmesi

GST P1 genotipinin belirlenmesi için, GST-PCR ürünleri *Bsm* AI restriksiyon enzimi tarafından kesildi. Astım hastaları ve kontrol grubunun GSTP1 genotip analizlerini yapılabilmek amacıyla, *Bsm* AI restriksiyon enzimi tarafından kesilen örnekler jele uygulandı. Digest ürünleri, PCR ürünlerinin jele uygulanması ve elektroforez bölümünde açıklandığı şekilde hazırlanarak, 120 V akım varlığında 30 dakika jel elektroforezis'e tabi tutuldu. İşlem sonunda astım ve kontrol grubunun Tablo 7'de gösterilen spesifik bantları UV-transilluminatör'de incelenerek GSTP1 genotip analizleri yapıldı.

Tablo 7. GSTP1 Genotipinin Şematik Gösterimi

	Örnek-1	Örnek-2	Örnek-3
PCR			
176 bp			
DIGEST			
176 bp			
93 bp			
83 bp			
GSTP1	Ile105Ile	Ile105Val	Val105Val

III. 5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizde, her iki gruba ait tanımlayıcı demografik verilerin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Cinsiyet, sigara ve menapoz durumları bakımından her iki grubun karşılaştırılmasında ki-kare testi yapıldı. ADRB2 16 ve GSTP1 genotip frekansları üzerine etkili risk faktörlerinin belirlenmesinde lojistik regresyon analizi uygulandı.

IV. BULGULAR

Türk popülasyonunda sağlıklı bireyler ve astım hastalarındaki ADRB2 ve GSTP1 genetik polimorfizminin belirlenmesi amacıyla kontrol grubunda 127 sağlıklı birey ve 129 astımlı hasta incelenmiştir. Kontrol grubu 84 kadın ve 43 erkekten oluşurken; Astımlı hastalar, 88 kadın ve 41 erkekten oluşmuştur. Kontrol ve astım grubuna ait yaş ortalamaları sırasıyla 38 ve 39 olarak saptanmıştır. Her iki gruba ait fiziksel özellikler (yaş, kilo, boy) Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. Kontrol ve Astım Grubuna ait Fiziksel Özellikler

Grup	n(%)		median(min-max)		
	Kadın	Erkek	Yaş (yıl)	Kilo (kg)	Boy (cm)
Kontrol (n=127)	84 (% 66.1)	43 (% 33.9)	38 (18-65)	70 (40-95)	165 (162-190)
Astım(n=129)	88 (% 68.2)	41 (% 31.8)	39 (18-75)	72 (44-106)	160 (143-194)

Kontrol grubu, bireyler kendisinde ve ailesinde kalıtsal ve sistemik hastalık gözlenmemiş herhangi bir medikasyon almayan bireylerden oluşmuştur. Kontrol grubundaki bireylerin 20 tanesi (% 15.5) sigara içerken; 109 tanesi (% 84.5) sigara içmemektedir. Astım hastalarında ise 26 tanesi (% 20.5) sigara içerken; 101 tanesi (% 79.5) sigara içmemektedir. Hastaların vücut kitle oranı (BMI)’na göre dağılımı Tablo 9’de gözlenmektedir.

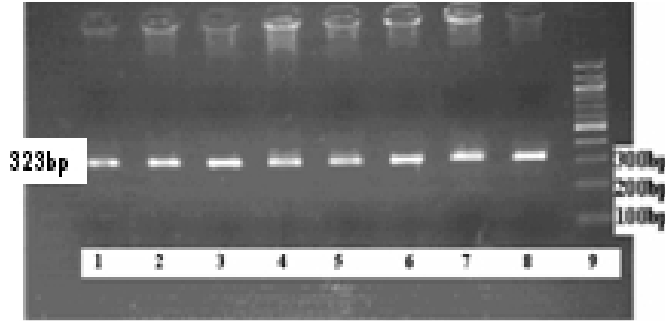
Tablo 9. Kontrol ve Astım Grubuna ait BMI Değerleri

Grup	BMI (kg/m ²)			
	Zayıf (< 18.5)	Normal (18.5- 24.9)	Hafif (25- 29.9)	Obezite (> 30)
Astım	4 (% 3.1)	37 (% 28.7)	34 (% 26.4)	54 (% 41.9)
Kontrol	5 (% 3.9)	57 (% 44.9)	4 (% 3.4.6)	21 (% 16.5)

Astım hastalarında atopi (IgE>100 IU/mL) insidansı; 42 (% 35.55) hastada pozitifken; 87 (% 66.7) hastada negatif olarak tespit edilmiştir. Astımlı hastalarda birlikte sistemik hastalık bulunması sorgulandığında, 2 hastada diabetes mellitus; 15 hastada hipertansiyon; 1 hastada epilepsi; 1 hastaya hiperkolesterolemi ve 3 hastada multinodüler guatr saptanmıştır. Her iki gruptaki kadınlar menapoz durumlarına göre incelendiğinde; astma grubunda 74 (% 84.1) hasta premenapozal ve 14 (% 15.9) hasta postmenapozal dönemde iken, kontrol grubunda 73 (% 86.9) hasta premenapozal ve 11 (% 13.1) hasta postmenapozal dönemde tespit edildi.

IV. 1. ADRB2 16 Genetik Polimorfizmi

Astım ve kontrol grubunun kan örneklerinden izole edilen DNA'lar, ADRB2 16 amplifikasyonu için PCR'a uygulandı. Şekil 6'da ADRB2 PCR'ı sonucunda elde edilen 323 bp büyüklüğündeki ürünler görülmektedir.

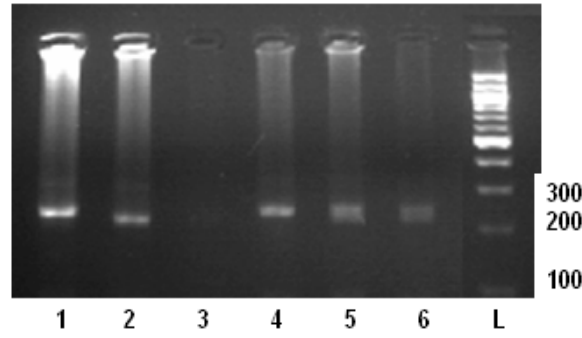


Şekil 6. ADRB2 16 PCR ürünleri

PCR ÜRÜNLERİ: 1,2,3,4,5,6,7,8

DNA LADDER (100 bp lik): 9

ADRB2 genotipinin belirlenmesi amacıyla astım ve kontrol grubunun PCR ürünleri *Nco* I ve *Bts* I ile digest edilmiştir. ADRB2 16 nolu kodunun genotip tayini için, amplifiye edilen DNA örnekleri restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra jellere yüklenerek elektroforeze tabi tutulmuştur. Arg16Arg (wild) genotipini taşıyanlar 236 bp; Gly16Gly (mutant) genotipini taşıyanlar 218 ve Arg16Gly (heterozigot) genotipini taşıyanlar ise 236 ve 218 bp'de bant vermektedirler Şekil 7'de farklı ADRB2 genotipleri görülmektedir.



Şekil 7. ADRB2 16 *Nco* I ve *Bts* I Digest Ürünleri

DiGEST ÜRÜNLERİ: Wild (1, 4); Heterozigot (5, 6); Mutant (2)

DNA LADDER (100 bp lik): L

Türk popülasyonunda ADRB2 16 genetik polimorfizmi

Türk popülasyonunda Arg16 ADRB2 aktiviteli alel frekansı % 42.5 iken; Gly 16 ADRB2 aktiviteli alel frekansı % 57.5 olarak bulunmuştur.

Türk popülasyonundaki ADRB2 16 genotip frekansı incelendiğinde, % 24.4'ü homozigot (Arg16Arg), % 36.2'si heterozigot (Arg16Gly) ve % 39.4'ü mutant (Gly16Gly) olarak tespit edilmiştir. Tablo 10'da Türk popülasyonundaki ADRB2 genotip dağılımı gösterilmiştir.

Tablo 10. Türk Popülasyonunda ADRB2 16 Genotip Frekansı

Grup	Arg16Arg	Arg16Gly	Gly16Gly
Total (n=127)	31 (% 24.4)	46 (% 36.2)	50 (% 39.4)
Kadın (n=84)	27 (% 21.2)	33 (% 26)	24 (% 18.9)
Erkek (n=43)	4 (% 3.2)	13 (% 10.2)	26 (% 20.5)

Türk popülasyonunda ADRB16 genotipinin cinsiyete bağlı olarak dağılımı incelendiğinde kadın bireylerde Agr 16 ve Gly16 ADRB2 aktiviteli alel frekansı sırasıyla % 51.7 ve % 48.3 iken; erkek bireylerdeki Arg16 ve Gly16 ADRB2 aktiviteli alel frekansları ise sırasıyla % 24.4 ve % 75.6 olarak tespit edilmiştir (Tablo 11).

Tablo 11. Cinsiyet Bakımından ADRB2 16 Alel Frekansları

Genotip	Erkek	Kadın
Arg	% 24.4	% 51.7
Gly	% 75.6	% 48.3

Astım ve ADRB2 Genetik Polimorfizmi

Astımlı hastalarda Arg16 ADRB2 aktiviteli alel frekansı % 35.27 iken; Gly 16 ADRB2 aktiviteli alel frekansı % 64.73 olarak bulunmuştur.

Astımlı hastalarda ADRB2 genotip frekansı incelendiğinde, % 10.9'u homozigot (Arg16Arg), % 48.8'i heterozigot (Arg16Gly) ve % 40.3'ü mutant (Gly16Gly) olarak tespit edilmiştir. Tablo 12'de astım ve kontrol grubunun Türk popülasyonundaki ADRB2 genotip ve alel frekansları gösterilmiştir. Astım ve kontrol grupları, genotip frekansları açısından karşılaştırıldığında heterozigot ve mutant genotiplar arasında fark gözlenmezken; kontrol grubunda homozigot genotip frekansı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0.011). Her iki grubun Arg ve Gly alel frekansları arasında anlamlı farklılık mevcut değildir.

Tablo 12. Astım ve Kontrol Grubuna ait Genotip ve Alel Frekansları

n (%)	Genotip frekansı			Alel frekansı	
	Arg16Arg	Arg16Gly	Gly16Gly	Arg	Gly
Kontrol(n=127)	31(% 24.4)*	46(% 36.2)	50 (% 39.4)	108(%42.5)	146(% 57.5)
Astım(n=129)	14(% 10.9)	63(% 48.8)	52 (% 40.3)	91(% 35.3)	167(% 64.7)

* p<0.05 (p=0.011)

Astım ve kontrol grubunun ADRB2 genotip frekansları; iki mutant aleli taşıyan bireyler ile bir mutant alel taşıyan ya da hiç mutant alel taşımayan bireylere göre karşılaştırıldığında astım ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamıştır (Tablo 13).

Tablo 13. Astım ve Kontrol Grubunun ADRB2 16 Genotip Frekansı

Genotip	Gly16Gly	Arg16Gly+Arg16Arg
Kontrol (n=127)	50 (% 39.4)	77 (% 60.6)
Astım (n=129)	52 (% 40.3)	77 (% 59.7)

Astım ve kontrol grubunun ADRB2 genotip frekansları; iki mutant aleli ya da bir mutant alel taşıyan bireyler ile hiç mutant alel taşımayan bireyler açısından karşılaştırıldığında, astım ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmuştur (Tablo 14). Mutant alel taşıyan bireylerin astım hastalığına yakalanma riski, mutant alel taşımayan bireylere oranla 2.65 kat daha fazla olarak tespit edilmiştir.

Tablo 14. Astım ve Kontrol Grubunun ADRB2 16 Genotip Frekansı

Genotip	Arg16Arg	Arg16Gly+Gly16Gly
Kontrol (n=127)	31 (% 24. 4)	96 (% 75. 6)
Astım (n=129)	14 (% 10. 9)	115 (% 89. 1)*

* p<0.05 (p=0.005); OR=2.653; %95 CI=1. 335 – 5. 272

Astım ve kontrol grubunun ADRB2 genotip frekansları; iki mutant aleli taşıyan ya da hiç mutant alel taşımayan bireyler ile bir mutant alel taşıyan bireyler açısından karşılaştırıldığında, astım ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmuştur (Tablo 15). Bir Mutant alel taşıyan bireylerin astım hastalığına yakalanma riski, iki mutant alel taşıyan veya hiç mutant alel taşımayan bireylere oranla 1.68 kat daha fazla olarak tespit edilmiştir.

Tablo 15. Astım ve Kontrol Grubunun ADRB2 Genotip Frekansı

Genotip	Arg16Gly	Arg16Arg+Gly16Gly
Kontrol (n=127)	31 (% 24.4)	81 (% 63.8)
Astım (n=129)	63 (% 48.8)*	66 (% 51.2)

* $p<0.05$ ($p=0.041$); $OR=1.68$; %95 $CI=1.019 - 2.772$

Astımlı hastaların 42 tanesi (% 35.55) atopiye sahipken; atopiye sahip bireylerin (n=2) % 4.8'i Arg16Arg, (n=19) % 45.2'si Arg16Gly ve (n=21) % 50'si Gly16Gly olarak tespit edilmiştir. Atopik hastalardaki Arg16 ve Gly16 alel frekansları sırasıyla, % 27.38 ve % 72.62 olarak saptanmıştır.

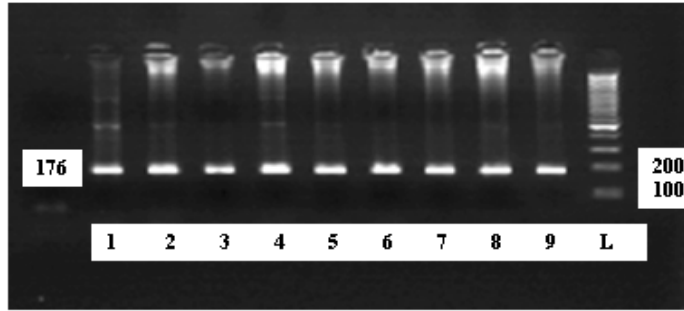
Astımlı hastaların 57 (% 44.18) tanesi nokturnal dispneye sahipken; nokturnal dispneli bireylerin (n=2) % 3.51'i Arg16Arg, (n=20) % 35.09'u Arg16Gly ve (n=35) % 61.4'ü Gly16Gly olarak tespit edilmiştir. Nokturnal dispneli hastalardaki Arg16 ve Gly16 alel frekansları sırasıyla, % 21 ve % 79 olarak saptanmıştır.

Astımlı hastaların 39 (% 30.23) tanesinde steroid bağımlılığı mevcutken; steroid bağımlı bireylerin (n=2) % 5.41'i Arg16Arg, (n=7) % 18.92'si Arg16Gly ve (n=28) % 71.8'i Gly16Gly olarak tespit edilmiştir. Steroid bağımlılığı olan hastalardaki Arg16 ve Gly16 alel frekansları sırasıyla, % 19.23 ve % 80.77 olarak saptanmıştır.

IV. 2. GSTP1 Genetik Polimorfizmi

Türk popülasyonunda GSTP1 genetik polimorfizmi

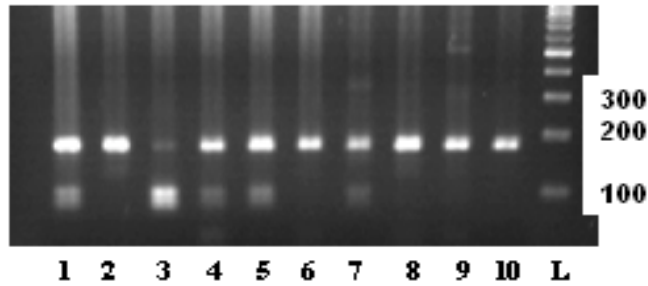
Astım ve kontrol grubunun kan örneklerinden izole edilen DNA'lar, GSTP1 amplifikasyonu için PCR'a uygulandı. Şekil 8' de GSTP1 PCR'ı sonucunda elde edilen 176 bp büyüklüğündeki ürünler görülmektedir.



Şekil 8. GSTP1 PCR Ürünleri

PCR ÜRÜNLERİ: 1,2,3,4,5,6,7,8,9; DNA LADDER (100 bp lik): L

GSTP1 genotipinin belirlenmesi amacıyla astım ve kontrol grubunun PCR ürünleri *BsmA* I ile digest edilmiştir. Şekil 9'da farklı ADRB2 genotipleri görülmektedir.



Şekil 9. GSTP1 *BsmA*I Digest Ürünleri

DiGEST ÜRÜNLERİ: Wild (2,6,8,9,10); Heterozigot (1, 4, 5, 7); Mutant (3)

DNA LADDER (100 bp lik): L

Türk popülasyonunda GSTP1 Ile105 alel frekansı % 86.6 iken; GSTP1 Val105 alel frekansı %13.4 olarak bulunmuştur. Türk popülasyonundaki GSTP1 genotip frekansları incelendiğinde, % 75.6'sı homozigot (Ile105Ile), %22'si heterozigot (Ile105Val) ve % 2.4'ü mutant (Val105Val) olarak tespit edilmiştir (Tablo 16).

Tablo 16. Türk Popülasyonunda GSTP1 Genotip Frekansı

Grup	Ile105Ile	Val105Ile	Val105Val
Total(n=127)	96 (% 75.6)	28 (% 22)	3 (% 2.4)
Kadın(n=84)	65 (% 51.2)	16 (% 12.5)	3 (% 2.4)
Erkek(n=43)	31 (% 24.4)	12 (% 9.5)	0 (% 0)

Türk popülasyonunda GSTP1 genotipinin cinsiyete bağlı olarak dağılımı incelendiğinde kadın bireylerde Ile105 ve Val105 GSTP1 aktiviteli alel frekansı sırasıyla % 87 ve % 13 iken; erkek bireylerdeki Ile105 ve Val105 GSTP1 aktiviteli alel frekansları ise sırasıyla % 86 ve % 14 olarak tespit edilmiştir (Tablo17).

Tablo 17. Cinsiyet Bakımından GSTP1 Alel Frekansları

Genotip	Erkek	Kadın
Ile	%86	%87
Val	%14	%13

Astım ve GSTP1 Genetik Polimorfizmi

Astımlı hastalarda Ile105 GSTP1 alel frekansı % 76.7 iken; Val105 GSTP1 alel frekansı % 23.3 olarak bulunmuştur.

Astımlı hastalarda GSTP1 genotip frekansı incelendiğinde, % 55'i homozigot (Ile105Ile), % 43.4'ü heterozigot (Ile105Val) ve % 1.6'sı mutant (Val105Val) olarak tespit edilmiştir. Tablo 18'de astım ve kontrol grubunun Türk popülasyonundaki GSTP1 genotip ve alel frekansları gösterilmiştir. Kontrol ve astım grubunun homozigot ve mutant bireyleri arasında fark gözlenmezken; astım grubundaki heterozigot GSTP1 genotip frekansları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.001$). Her iki grubun alel frekansları karşılaştırıldığında, Ile105 alel frekansında farklılık gözlenmezken; Val105 alel frekansı astım grubunda anlamlı olarak yükseklik saptandı ($p=0.004$).

Tablo 18. Astım ve Kontrol Grubuna Ait GSTP1 Genotip ve Alel Frekansları

n (%)	Genotip frekansı			Alel frekansı	
	Ile105Ile	Val105Ile	Val105Val	Ile	Val
Kontrol(n=127)	96 (%75. 6)	28 (% 22)	3 (% 2. 4)	% 86.6	% 13.4
Astım(n=129)	71 (% 55)	56(%43.4)*	2 (% 1. 6)	% 76.7	% 23.3**

* $p<0.05$ ($p=0.001$), ** $p<0.01$ ($p=0.004$)

Astım ve kontrol grubunun GSTP1 genotip frekansları, iki mutant aleli taşıyan kişilerin, bir mutant alel taşıyan (heterozigot) ya da hiç mutant alel taşımamasına (wild) göre karşılaştırıldığında (Tablo 19); astım hastalığına yakalanma riski açısından kontrol ve astım grupları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamıştır.

Tablo 19. Astım ve Kontrol Grubunun GSTP1 Genotip Frekansı

Genotip	Val105Val	Val105Ile+Ile105Ile
Kontrol (n=127)	3 (% 2.4)	124 (% 97.6)
Astım (n=129)	2 (% 1.6)	127 (% 98.4)

Astım ve kontrol grubunun GSTP1 genotip frekansları; iki mutant aleli taşıması ya da bir mutant alel (heterozigot) taşıyan kişiler ile hiç mutant alel taşınamasına (wild) göre karşılaştırıldığında, astım ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmuştur (Tablo 20). Mutant alel taşıyan bireylerin astım hastalığına yakalanma riski, mutant alel taşımayan bireylere oranla 2.53 kat daha fazla olarak tespit edilmiştir.

Tablo 20. Astım ve Kontrol Grubunun GSTP1 Genotip Frekansı

Genotip	Ile105Ile	Val105Val+Ile105Val
Kontrol (n=127)	96 (% 75. 6)	31 (% 24. 4)
Astım (n=129)	71 (% 55)	58 (% 45)*

*p<0.05 (p=0.001); OR=2.53; %95 CI=1. 484 - 4.312

Astım ve kontrol grubunun GSTP1 genotip frekansları, iki mutant aleli taşıyan ya da hiç mutant alel taşımayan bireyler ile bir mutant alel taşıyan bireyler açısından karşılaştırıldığında, astım ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmuştur (Tablo 21). Bir mutant alel taşıyan bireylerin astım hastalığına yakalanma riski, iki mutant alel taşıyan veya hiç mutant alel taşımayan bireylere oranla 2.71 kat daha fazla olarak tespit edilmiştir.

Tablo 21. Astım ve Kontrol Grubunun GSTP1 Genotip Frekansı

Genotip	Val105Ile	Val105Val+Ile105Ile
Kontrol (n=127)	28 (% 22)	99 (% 78)
Astım (n=129)	56 (% 43.4)*	73 (% 56.6)

* $p<0.05$ ($p=0.001$); $OR=2.712$; %95 $CI=1.572 - 4.679$

129 astım hastası içinde atopiye sahip astımlı 42 (%35.55) bireylerin (n=23) % 54.8'i Ile105Ile, (n=19) % 45.2'si Ile105Val olarak tespit edilmiştir. Atopik hastalardaki Ile105 ve Val105 alel frekansları sırasıyla % 77.38 ve % 22.62 olarak saptanmıştır.

Astımlı hastaların 57 (% 44.18) tanesi nokturnal dispneye sahipken; nokturnal dispneli bireylerin (n=32) % 56.15'i Ile105Ile, (n=24) % 42.10'u Ile105Val ve % 1.75'i (n=1) Val105Val olarak tespit edilmiştir. Nokturnal dispneli hastalardaki Ile105 ve Val105 alel frekansları sırasıyla % 77.19 ve % 22.81 olarak saptanmıştır.

Astımlı hastaların 37 (% 30.23) tanesinde steroid bağımlılığı mevcutken; steroid bağımlı bireylerin (n=22) % 59.46'sı Ile105Ile, (n=14) % 37.84'ü Ile105Val ve (n=1) % 2.8'i Val105Val olarak saptanmıştır.

V. TARTIŞMA ve SONUÇ

V. I. ADRB2

Yapılan çeşitli araştırmalarla sağlıklı popülasyonlarda ADRB2 16 genetik polimorfizmine yönelik çalışmalarda beyaz, siyah ve asya ırkında farklı alel ve genotip frekansları tespit edilmiştir. Arg16 ve Gly16 alel frekansları sırasıyla, Çin popülasyonunda (n=41) % 60 ve 40 ¹¹⁵; Kore popülasyonunda (n=44) % 53.3 ve % 46.7 ¹¹⁶; İspanyol popülasyonunda (n=269) % 38 ve % 62 ¹¹⁷; Yeni Zelanda popülasyonunda (n=92) %40 ve % 60 ¹¹⁸; Afrika-Amerikan popülasyonunda (n=123) % 49.8 ve % 51.2, Amerikan beyaz ırkında (n=188) % 45.7 ve %54.3 ¹¹⁹ ve Amerikalı Çin popülasyonunda (n=104) % 58.7 ve % 41.3 ¹¹⁹ olmak üzere etnik farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Türk popülasyonundaki Arg16 ve Gly16 alel frekansları, Aynacıoğlu ve ark. ⁸⁸ tarafından sırasıyla (n=104) % 40.4 ve % 59.6 olarak bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında, Türk popülasyonunda astım ve ADRB2 16 polimorfizmi ilişkisinin araştırılması için kontrol grubu seçilen 127 sağlıklı bireyin Arg16 alel frekansı % 42.5 ve Gly 16 alel frekansı % 57.5 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubumuzun sağlıklı bireylerdeki bu sonuçlar, Aynacıoğlu ve ark.'nın ⁸⁸, sağlıklı bireyler üzerinde yaptıkları çalışmanın sonuçları ile uyumludur. İki farklı araştırmada benzer sonuçların elde edilmesi Türk popülasyonundaki Arg16 ve Gly 16 alel frekanslarının beyaz Avrupa ırkı ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Farklı popülasyonlara ait astımlı bireyler, ADRB2 16 genetik polimorfizmi açısından incelenmiştir. Arg16 ve Gly16 alel frekansı sırasıyla, Yeni Zelanda popülasyonunda (n=59) % 40.7 ve % 59.3 ¹¹⁸; İngiliz popülasyonunda (n=60) % 36.7 ve %63.3 ⁸⁵; İspanyol popülasyonunda (n=269) %38 ve %62 ¹¹⁷; Amerika-İngiliz popülasyonunda (n=321) % 33 ve % 67 ¹²⁰; Kore popülasyonunda (n=440) % 46.7 ve % 53.3 ¹²¹ olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda Türk popülasyonundaki astımlı bireylere ait ADRB2 Arg16 ve Gly16 alel frekansları sırasıyla % 35.3 ve %64.7 olarak bulunmuştur.

Bronşial havayolunda yer alan ADRB2 reseptörlerinin fonksiyonel özelliklerinin değişimiyle sirkülasyondaki endojen ve ekzojen katekolaminlere maruz kalındığı zaman farklı reseptör cevabı gözlenmektedir. Gly16Gly homozigot genotip özelliğine sahip astımlı bireylerdeki beta-2 reseptörlerin down-regülasyonu nedeniyle bronkodilatatör desensitizasyonunun derecesi anlamlı olarak yüksektir ¹²². Martinez ve ark. ¹¹⁷ Gly16Gly genotip özelliğine sahip bireylerin; Arg16Arg genotipe sahip bireylere göre 5.3 kat, Arg16Gly genotipe sahip bireylere göre 2.3 kat daha az agonist cevap oluşturduğunu göstermişlerdir. Bu nedenle pek çok uyarıya karşı güçlenmiş aşırı bronşial havayolu cevabı astım gelişiminde bir risk faktörü olarak sunulmuştur.

ADRB2 Gly16Gly polimorfizmi, histamine karşı solunum yolu aşırı duyarlılığının artması ve hava yolu tıkanıklığı ile seyreden astım olgularına eşlik ettiği tespit edilmiştir. Gly 16 alelin özellikle kadınlarda astım gelişiminde rol aldığı gösterilmiştir ⁸⁵. Benzer şekilde İtalyan popülasyonunda yapılan bir çalışmada astım hastalığında bir fizyolojik marker olarak incelenen havayolu duyarlılığı ve Gly 16 polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ¹²³. Buna karşın, ADRB2 16 polimorfizmi ile total IgE, aeroallerjenlere karşı deri testi pozitifliği, beta-2 agonist ajanlara karşı bronşial duyarsızlık ve solunum fonksiyon testleri gibi astımın fenotipik özellikleri arasında herhangi bir ilişki olmadığını savunan çalışmalar da mevcuttur ^{116, 120}.

Astım hastalarından belirgin bir alt grubun egzersiz kaynaklı astımı olsa da yetişkinlerde görülen astımın bedensel faaliyet eksikliği ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Buna göre sedanter hayat süren kadınlarda astım riskini taşıyan bir alt grup tespit edilmiştir. Bu gruptaki olgular, düşük seviyeli bedensel faaliyet durumunda derin nefes alınmasıyla hava yolları aracılığıyla terminal bronşiallere doğru ilerleyen bronş spazmı geliştirmektedir ⁸⁶. Farklı bir çalışmada ise ciddi astım hastalığının güçlü bir fenotipik göstergesi olan bronşial havayolu duyarlılığı ile Arg16 ve Gly16 polimorfizmi arasında bir ilişki saptanmamıştır ¹²⁴.

Bu çalışmaların aksine ADRB2'ye ait 3 fonksiyonel moleküler haplotip yapısının bronşial havayolu duyarlılığına karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir ¹²⁵. Haplotipler, kromozom boyunca SNP'lerin oluşturduğu lineer kombinasyonlardır. Gen içindeki SNP'ler arasından haplotiplerin tespit edilmesi fenotip/genotip korelasyonunu tespit etme imkanlarımızı arttırabilir. Astım hastalarında, kromozomun destek (promoter) ve kodlama (coding) bölgelerindeki ADRB2'ye ait 13 SNP'in moleküler haplotipleri araştırılmıştır. Astımlılarda gözlenen SNP'lerin genel haplotiplerinin incelenmesiyle belirli haplotiplerin görünüşte reseptör işlevlerini farklı bir şekilde etkilediğini ve klinik fenotiplerle korelasyonlarının olduğu gösterilmiştir ^{60, 107, 122}.

Astım hastalığında, serum IgE düzeyi, aeroallerjenlere karşı deri testi cevabı, bronşial havayolu duyarlılığı, solunum fonksiyon testlerinin cevabı ve steroid bağımlılığı gibi fenotipik özellikler atopik ve nonatopik astım patolojisinin gelişiminde önemlidir. Noktürnal astımlı hastalardaki Gly16 alel frekansının, non-noktürnal astımlı hastalardan daha yüksek olduğu ve Gly16 alel frekansının astımın ciddi formu ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir ^{83, 90, 108}. Astım tanısı almamış ve herhangi bir semptomu olmayan bireylerde son bir yıl içinde tekrarlayan wheezing, gece öksürmesi ile karakterize astım atakları (noktürnal astım), aeroallerjenlere karşı deri cevabı ve metakolin testine karşı havayolu duyarlılığı gibi astımın fenotipik özellikleri ile ADRB2 16 polimorfizmi arasında herhangi bir ilişki mevcut değilken ^{85, 106}; Astım hastalığı tanısı almış bireylerdeki yukarıda sayılan astımın fenotipik özellikleri ile ADRB2 16 reseptör geninin lokalize olduğu 5q31.33 kromozomu arasında belirgin bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ^{77, 83}. Buna karşın Gly16 ADRB2 polimorfizmi ile atopi insidansı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ¹²⁰.

Astım hastalığının da dahil olduğu kronik obstrüktif akciğer hastalıkları (KOAH) gibi kompleks yapıdaki poligenik hastalıkların, polimorfizmden kaynaklanan çeşitli genetik olaylara bağlı patolojiler ile yakın ilişkisi tespit edilmiştir. Ho ve ark. ¹¹⁵ Çin popülasyonuna ait 65 KOAH ve 41 sağlıklı bireyin ADRB2 genotip analizini yapmışlardır. Arg16Arg genotip frekansı açısından sağlıklı bireylerin (% 36.6), KOAH'lı bireylere (% 13.8) göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek genotip frekansı gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada sağlıklı bireylerdeki Arg16

alel frekansının sağlıklı popülasyondan anlamlı olarak farklı olduğu bildirilmiştir. KOAH'lı bireylerin daha yüksek olasılıkla en azından bir tane Gly16 aleline sahip olduğu, Gly16 aleline sahip bireylerdeki beta adreno reseptör down-regülasyonunun, sağlıklı bireylere göre KOAH'nın gelişimine yatkınlık oluşturan genetik faktörlerden biri olabileceği ve bu konuda daha fazla çalışma yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

Astım ve ADRB2 polimorfizmine ilişkisine yönelik farklı sonuçlar da bildirilmiştir. Beyaz Avrupa ırkında yapılan bir çalışmada, Amerikan-İngiliz popülasyonuna ait 321 astımlı birey ile Gly16 polimorfizmi arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır ¹²⁰. Holloway ve ark. ¹¹⁸ Yeni Zelanda popülasyonundaki 92 kontrol, 59 orta dereceli astım ve 95 ciddi astımlı bireylerin genotip frekanslarını incelemişlerdir. Gly16 alel frekansları sırasıyla ciddi astımlı bireylerde %70; orta dereceli astımlı bireylerde % 59.3 ve kontrol grubunda % 60 olarak tespit edilmişlerdir. Ciddi astım popülasyonundaki Gly16Gly genotip frekansı (% 54), kontrol (% 38) grubuna göre 1.91 kat daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada hem mortalite hem de morbidite riski artmış kronik ciddi astımlı Gly16 alel frekansına sahip hastaların, kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Turki ve ark. ⁸³ Gly16 alel frekansının; nokturnal ataklara sahip ciddi astımlı bireylerde 3.8 kat daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Reihsaus ve ark. ⁸⁰ Amerika popülasyonuna ait 51 astım ve 56 kontrol bireyin ADRB2 16 genotip analizini yapmışlardır. Gly16 polimorfizmi açısından astım ve kontrol grupları arasında fark bulunmamıştır. Ancak astım grubunda steroid bağımlılığı ve immünizasyon tedavisi alan bireylerde Gly16 alel frekansında artış saptanmıştır. Gly16 polimorfizmi ile astımın gelişimi arasında ilişki yokken; Gly16 alele sahip bireylerde ciddi astım formlarının gelişebileceği kanısına varılmıştır.

Çalışmamız, Türk popülasyonundaki sağlıklı ve astımlı hastaların ADRB2 16 polimorfizmi üzerinde yapılmış ilk araştırmadır. Türk popülasyonunda, ADRB2 Arg16 ve Gly16 alel frekansları sırasıyla sağlıklı bireylerde % 42.5 ve % 57.5 iken; astımlı bireylerde % 35.3 ve 64.7 olarak saptanmıştır. Astım ve kontrol grupları, genotip frekansları açısından karşılaştırıldığında Arg16 ve Gly 16 alel frekansları arasında fark gözlenmezken; kontrol grubundaki Arg16Arg genotip frekansı, astımlı bireylere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda, astımlı bireyler fenotipik özellikleri açısından Arg16 ve Gly16 alel frekansları incelendiğinde, atopik bireylerde % 27.38 ve % 72.62; nokturnal astımlı bireylerde % 21 ve % 79; steroid bağımlılığı olan bireylerde % 19.23 ve % 80.73 olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, ADRB2 Arg16Gly polimorfizmi reseptörde down-regülasyon, nokturnal astım ve astımın ciddiyeti ile ilişkilendirilmiştir. Ancak çalışmalardaki karşıt sonuçların nedenleri tam olarak açık olmamakla beraber çalışma gruplarının seçildiği popülasyonlar veya özellikle astımın en önemli fenotipik özelliği olan bronşial havayolu duyarlılığının tanımlanmasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği üzerinde durulmaktadır. Ek olarak, sağlıklı popülasyonlara ait farklı alel frekanslarının da tespit edilmesinin önemli olduğu vurgulanmaktadır.

V. II. GSTP1

Biyokimyasal çalışmalar, toksik ve karsinogenik bileşiklerin metabolizmasında bireysel farklılıklar olduğunu göstermektedir. Biyotransformasyonda geniş bireysel farklılıklar olması ksenobiyotikleri metabolize eden enzimlerdeki polimorfizm ile açıklanmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, astım hastalığının da dahil olduğu sistemik hastalık ve kanser riskinin artması ile GST genlerinin spesifik alelleri arasında ilişki olduğunu göstermektedir ^{105, 106, 108, 109, 126}. Glutatyon peroksidaz tarafından kataliz edilmeyen bazı epoksit türü ksenobiyotikler, başlıca GST isoenzimleri veya epoksit hidrolazlar tarafından detoksifiye edilebilmektedir. Bu açıdan, epoksit türleri, GSTP1 isoenziminin detoksifikasyonu ile katalizlenmektedir ¹²⁷. Sonuç olarak, GSTP1 isoenzimi aktivitesi, hidrofobik madde bağlayan alanda lokalize olan 105. kodondaki değişiklik tarafından etkilenir. Bu polimorfizmlerin etkisi ile epoksit konjugasyonu, nükleofilik bağlama ve katalitik aktivite gibi kimyasal reaksiyonların tipi etkilenmektedir ¹²⁸.

Sağlıklı popülasyonlardaki GSTP1 genetik polimorfizmine yönelik yapılan çalışmalarda beyaz, siyah ve asya ırkında farklı alel ve genotip frekansları tespit edilmiştir. Popülasyonlara göre Ile105 ve Val105 alel frekansları sırasıyla, Tayvan popülasyonunda (n=184) % 78.3 ve % 21.7 ¹²⁹; Kore (n=94) % 79.3 ve % 20.7 ¹²¹; İngiliz popülasyonunda (n=44) % 52.3 ve % 47.7 ¹⁰⁸; Amerikan popülasyonunda (n=1158) % 63 ve % 37 ¹³⁰; Alman popülasyonunda (n=132) % 68.9 ve % 31.1 ¹³¹ olmak üzere etnik farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Türk popülasyonundaki Ile105 ve Val105 alel frekansları 4 farklı çalışmada incelenmiştir. Ile105 ve Val105 alel frekanslarını sırasıyla Çalikoğlu ve ark. ¹³² % 57 ve % 43; Aynacıoğlu ve ark. ¹³³ % 69.2 ve % 30.8 (n=265); Tamer ve ark. ¹³⁴ % 72.7 ve % 27.3 (n=103); Toruner ve ark. ¹³⁵ % 82.23 ve % 17.77 (n=121) olarak tespit etmişlerdir. Türk popülasyonundaki daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde birbirinden çok farklı sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Çalışmaların sonuçları arasındaki bu farklılıklar dikkate alındığında Türk popülasyonunda GSTP1 polimorfizmine yönelik çalışmaların devam etmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bu yönüyle de araştırma sonuçlarımız önem kazanmaktadır. Çalışmamızdaki 127 sağlıklı bireyin Ile105 alel frekansı % 86.6 ve Val105 alel

frekansı % 13.4 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubumuzun sağlıklı bireylerindeki bu sonuçlar, Toruner ve ark.'nın ¹³⁵, sağlıklı bireyler üzerinde yaptıkları çalışmanın sonuçları ile uyumludur.

GSTP1 genetik polimorfizmi açısından farklı popülasyonlara ait astımlı bireyler incelenmiştir. Ile105 ve Val105 16 alel frekansları sırasıyla, İngiliz popülasyonunda (n=58) % 71.6 ve % 28.4 ¹⁰⁸; Alman popülasyonunda (n=83) % 69.3 ve % 30.7 ¹³¹; Meksika popülasyonunda (n=151) % 42.4 ve % 57.6 ¹³³; Tayvan popülasyonunda (n=82) % 86.6 ve % 13.4 ¹²⁹; Kore popülasyonunda (n=89) % 84.3 ve % 15.7 ¹²¹ olarak bildirilmiştir. Türk popülasyonundaki astımlı bireylerin Ile105 ve Val105 16 alel frekansları yapılan iki farklı çalışmada incelenmiştir. Ile105 ve Val105 16 alel frekanslarını sırasıyla Aynacıoğlu ve ark. ¹³³ % 74 ve % 26 (n=210); Tamer ve ark. ¹³⁴ % 55 ve % 45 (n=101) olarak tespit etmişlerdir. Çalışmamızda, Türk popülasyonundaki 129 astımlı bireyin Ile105 ve Val105 alel frekansları sırasıyla % 76.7 ve % 23.3 olarak tespit edilmiştir. Astımlı bireylerdeki bu sonuçlar, Aynacıoğlu ve ark.'nın ¹³³, astımlı bireyler üzerinde yaptıkları çalışmanın sonuçları ile uyumludur.

Deneyssel olarak elastaz ile indüklenen KOAH modelinde alveoler hücre yapısının retinoik asit tedavisi ile restore edildiği gösterilmiştir. GSTP1 isoenzimi ile lipid peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan aldehidler katalize edilerek embriyonik retinoik asit sentezinin inhibisyonunun önlendiği, böylece akciğer dokusunda GSTP1 kontrolündeki retinoik asit aracılı onarımın mevcut olduğu bilinmektedir ¹³⁷. Akciğer alveoler hücreleri, alveoler makrofaj ve respiratuar bronşiollerdeki GST P1 geninin, diğer GST sınıfı genlere oranlara daha fazla oranda baskın olması yanı sıra respiratuar havayolundaki GSTP1 izoenziminin oksidatif strese karşı katalitik aktivitesinin, diğer GST izoenzimlerine göre daha fazla olduğu bilinmektedir ¹⁴⁻¹⁶.

GSTP1 polimorfizminin araştırıldığı çalışmalarda, Ile105Ile GSTP1 genotipine sahip bireylerin, Val105Val genotipe sahip bireylere göre aromatik epoksitlere karşı 7 kat daha zayıf katalitik etki göstermesine rağmen; klorodinitrobenzen bileşiğine karşı 3 kat daha yüksek katalitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir ^{107, 138}. Böylece GSTP1 Val105Val genotipi lipid

hidroperoksitlere karşı katalitik aktivitede artış oluşturarak ROS ürünlerinin araşidonik asite mobilizasyonunu azaltır ve proinflatuar eikosonoidlerin sentezi azalır ¹⁵. Yapılan farklı biyokimyasal çalışmalar ile GSTP1 Val105 alelinin, Ile105 aleline oranla daha düşük termal stabiliteye sahip olması ¹²⁸ yanı sıra; Val105 homozigot geninin, Ile105 homozigot genine oranla daha düşük konjugasyon aktivitesi gösterdiğini ortaya konmuştur ¹³⁹.

Asya popülasyonuna ait çalışmalarda, Cheng ve ark. ¹²⁶, Tayvan'da KOAH'nın gelişimi ve çeşitli genotip kombinasyonları arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. KOAH'na sahip bireylerdeki GSTP1 polimorfizmi incelendiğinde; kontrol grubuna göre, Ile105Ile GSTP1 genotipine sahip bireylerin 7 kat daha fazla gözleendiği tespit edilmiştir. Benzer olarak, Ishii ve ark. ¹⁴⁰, Japon popülasyonundaki KOAH'da, kontrol grubuna göre 3.5 kat daha yüksek oranda Ile105Ile genotipe sahip bireyler tespit etmişlerdir. Buna karşın Kore popülasyonunda 84 KOAH ve 94 sağlıklı bireyler üzerinde yapılan çalışmada, GSTP1 genetik polimorfizminin incelendiği bir çalışmada Ile105Ile genotip frekansı sırasıyla %71 ve %61 olarak tespit edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Aynı çalışmada GSTP1 genetik polimorfizmi ile KOAH'nın gelişimi arasında herhangi bir ilişkinin olmadığı kanısına varılmıştır ¹²¹.

Astım etiyolojisine yönelik genetik çalışmalarda ise Asya popülasyonunda düşük ve yüksek hava kirliliğine maruz kalan bireyler incelenmiştir. Tayvan popülasyonuna ait çocuklarda yapılan bir çalışmada, 61 astım, 95 kontrol grubundan oluşan ilköğretim çağındaki çocuklarda, hava kirliliğine maruz kalmayan astımlı bireylerde GSTP1 polimorfizmi farklılık göstermezken; yüksek hava kirliliğine maruz kalan Ile105 alel taşıyan bireylerde, Val105 alel taşıyan bireylere göre 5.52 kat yüksek astım riski saptanmıştır ¹⁴¹. Aynı grubun farklı bir çalışmasında da homozigot GSTP1 Ile105 genotipi, astımlı bireylerde 2.99 kat daha yüksek tespi edilmiştir. Sonuçlar, beyaz ırkla kıyaslandığında Asya popülasyonundaki GSTP1 Ile105 alel frekansının, beyaz ırka göre yüksek olmasına bağlanmıştır ¹²⁹. Asya popülasyonuna ait Japon, Kore ve Tayvan'lı bireyler pek çok benzer klinik ve farmakolojik özellikler göstermesine rağmen, çalışmalardaki farklı sonuçların çeşitli nedenlere bağlanabileceği ifade edilmiştir. İlk olarak, astım

ve KOAH'nın gelişiminde sadece genetik faktörler değil aynı zamanda sigara alışkanlığı, kullanılan tütün cinsi, mesleki ve çevresel kirlilik, solunum yolu infeksiyonları etkilemektedir. Genetik faktörler incelendiğinde ise farklı genotip özelliğe sahip bireylerde detoksifikasyon kapasitesinde farklılıklar gelişmesine bağlanmıştır.

Fryer ve ark.¹⁰⁸, İngiliz popülasyonuna ait 44 sağlıklı, 58 astımlı ve 69 havayolu duyarlılığı artmış bireyler GSTP1 polimorfizmi açısından incelenmiştir. GSTP1 Ile105Ile genotip frekansı havayolu reaktivitesinin derecesi ile paralel olarak artarken; Val105Val ve Ile105Val bireylerin genotip frekansında azalma saptamışlardır. Aynı çalışmada, GSTP1 genotipi ile astım hastalığı arasında belirgin oranda ilişki tespit edilmiştir. GSTP1 Val105Val genotip frekansı, Ile105Ile genotip frekansı ile karşılaştırıldığında 6 kat daha az oranda astım hastalığı riski taşıdığı rapor edilmiştir. Ek olarak astım hastalığındaki tüm potansiyel faktörler incelendiğinde (yaş, cinsiyet, deri testi pozitifliği, IgE>100 IU/mL); GSTP1 Val105Val genotipe sahip bireylerdeki astım riskinin 9 kat daha az olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın aynı popülasyondaki nonastmatik-nonatopik, atopik-nonastmatik ve atopik-astmatik 191 birey incelendiğinde, 65 bireyde IgE seviyesi 100 IU/mL üzerinde bulunmasına rağmen GSTP1 genotipi ve IgE seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır¹⁰⁶. Amerikan beyaz ırkında yapılan bir çalışmada, rasgele taranan 1158 okul çağındaki 11-18 yaş arası bireyin % 15. 6'sında astım tespit edilmiştir. Val105Val genotipe sahip bireylerde akut respiratuar infeksiyonların ciddiyeti etkilenmekte ve respiratuar hastalık oranı %40 oranında düşük bulunmuştur. Aynı popülasyonda, GSTP1 Val105Val genotipinin havayolundaki koruyucu etkisi ile astım arasında bir ilişki kurulamamıştır¹⁴². İngiliz popülasyonunda sadece atopik havayolu patolojisi olan bireylerin incelendiğinde ise Val105Val genotipe sahip bireylerin, nonatopik kontrol bireyelerine göre daha düşük genotip frekansı gösterdiği tespit edilmiştir¹⁰⁵.

Beyaz ırkta yapılan farklı çalışmalarda ise, Nickel ve ark.¹³¹, Alman popülasyonundaki 83 pediatrik astımlı bireyler ile 122 sağlıklı bireyi GSTP1 polimorfizmi açısından değerlendirmişlerdir. Her iki grup arasında GSTP1 polimorfizmi açısından herhangi bir ilişki

bulunmadığını bildirilmiştir. Bu durum, astım hastalarının çevresel kirliliğe maruz kalmayan bireylerden oluşması yanı sıra farklı popülasyondan olmasına bağlanmıştır.

Asya popülasyonu ve beyaz ırktaki sonuçlardan farklı olarak Meksika popülasyonundaki 151 astımlı bireylerde Ile105Ile genotip frekansı (% 20.5), Val105Val (% 35.8) ve Ile105Val (% 43.7) genotip frekansına göre düşük tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, Val105Val genotipine sahip astımlı bireylerde ozon ile indüklenmiş havayolu duyarlılığında artış sonucu nefes almada zorluk ve bronkodilatator kullanımında, Ile105Ile ve Ile105Val genotipe sahip bireylere göre anlamlı artış olduğu belirtilmiştir ¹³⁶.

Türk popülasyonundaki GSTP1 genotip frekansına yönelik çalışmalarda, iki farklı sonuç bildirilmiştir. Aynacıoğlu ve ark. ¹³³, 210 astım ve 265 sağlıklı bireyi incelemişlerdir. Astımlı bireylerdeki Val105Val genotip frekansı (% 3.8), kontrol grubuna (% 12.1) göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Val105Val GSTP1 genotip frekansına sahip bireylerin, Ile105Val ve Ile105Ile bireylere göre astım riski 0.29 kat daha düşük bulunmuştur. Tamer ve ark. ¹³⁴, ise 101 astım ve 103 sağlıklı bireyi incelemişlerdir. Astımlı bireylerdeki Val105Val genotip frekansı (% 22.8), kontrol grubuna (% 7.8) göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. GSTP1 Val105Val genotip özelliğine sahip astımlı bireylerin genotip frekansı, kontrol grubuna kıyasla 3.68 kat daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda, 129 astım ve 127 sağlıklı birey incelenmiştir. Kontrol ve astım grubuna ait Ile105Ile ve Val105Val genotip frekansları arasında fark gözlenmezken; astım grubundaki Ile105Val genotip frekansları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. Her iki grubun alel frekansları karşılaştırıldığında, mutant alel taşıyan bireylerin astım hastalığına yakalanma riski, mutant alel taşımayan bireylere oranla 2.53 kat daha fazla olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, astımlı bireyler fenotipik özellikleri açısından Ile105 ve Val105 alel frekansları incelendiğinde, atopik bireylerde % 77.38 ve % 22.62; nokturnal astımlı bireylerde % 77.19 ve % 22.81; steroid bağımlılığı olan bireylerde % 78.37 ve % 21.63 olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, genetik faktörler incelendiğinde, ekzon 5'deki GSTP1 geninin akciğerdeki GST'nin detoksikasyon aktivitesini kontrol etmesine rağmen, Ile105 alel taşıyan bireyler ile Val105 alel taşıyan bireyler arasında farklılık göstermektedir. Akciğerdeki GST aktivitesinin incelendiği çalışmalarda, karsinogenik aromatik epoksitlere karşı Val105 alel taşıyan bireyler Ile105 alel taşıyan bireylere göre daha yüksek katalitik aktivite göstermesine rağmen¹³⁸; akciğerdeki 1-kloro-2,4-dinitrobenzenin detoksifikasyonunda Ile105 alel taşıyan bireylerin Val105 alel taşıyan bireylere göre daha yüksek oranda katalitik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir¹⁴³. GSTP1 Val105Val genotip frekansının özellikle atopik bireylerde düşük insidans göstermesi nedeniyle, bireysel GSTP1 genotip özelliği havayolu disfonksiyonunun ciddiyeti ile ilişkilendirilmiştir. Günümüze kadar yapılmış klinik çalışmalar ile havayolu disfonksiyonu ve astımlı bireylerde Val105Val genotip frekansının düşmesi nedeniyle buna paralel olarak Ile105Ile genotip frekansın arttığı kanısına varılmıştır. Pediatrik ve erişkin astım tablosunun farklı klinik ve genetik özellikleri taşıması, astım hastalığının oluşumunda birden fazla aday genin katkısının olası rolü, çevre kirleticilerin astım oluşumuna katkısı ve çevre kirleticilerinin biyotransformasyonunda GSTP1 geninin regüle ettiği GST enziminin koruyucu rolü, astım hastalarında bu enzimin polimorfizminin araştırılmasını önemli kılmaktadır.

VI. ÖZET

Genetik faktörlere bağlı olarak ksenobiyotikleri metabolize eden bazı enzimlerin etkinliğinin bireysel farklılık göstermesi son yıllarda yoğun çalışmalara konu olmuştur. Özellikle genetik polimorfizm araştırmaları, ilaç etkisi ve toksisitesi yönünden önemlidir. Aynı zamanda ksenobiyotik metabolizmasındaki polimorfizmlerin, ilaçlara karşı duyarsızlığa, advers ilaç reaksiyonlarına ve ksenobiyotik maruziyetine bağlı olarak özellikle kanser olmak üzere belirli hastalıklara karşı duyarlılığın artmasına da neden olduğu bildirilmiştir.

Astım insidansı yılda 2.65-4 /1000 ve prevalansının erişkinlerde yaklaşık olarak %3-5, çocukluk çağında ise %5-10 arasında olduğu tespit edilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki genel popülasyonda %4 oranında gözlenirken; 10 milyon insanın astımlı olduğu ve poliklinik hizmetlerine başvurulardaki en yaygın 13. hastalık olarak ortaya çıktığı rapor edilmiştir. Astım hastalığının etiyolojik ve fenotipik özelliklerinde genetik faktörlerin ön plana çıktığına inanılmaktadır. Bu nedenle bronşial beta-2 adrenoreseptör (ADRB2) fonksiyonları ve glutatyon S-tranferaz P1 (GSTP1) metabolizmasındaki bireysel farklılıklar, popülasyondaki astım hastalığı riskini etkileyebilmektedir.

Astımlı hastalardaki ADRB2 16 ve GSTP1 gen polimorfizmi son yıllarda çeşitli popülasyonlarda araştırma konusu yapılmaktadır. Özellikle İnsan genom projesinin sonuçlandırılmasından sonra hızlanan gen-hastalık ilişkisinde güvenilir verilere ulaşılabilmesi için, çalışmaların sonuçta bir meta analize imkan verecek şekilde farklı popülasyonlarda ve geniş örnek sayılarıyla incelenmesi stratejisi izlenmektedir. Astım patolojisi ile ADRB2 16 ve GSTP1 ilişkisinin Türk popülasyonunda incelenmesi de bu nedenle önem kazanmaktadır.

ADRB2, akciğer vasküler endotelyumunda, alveoler duvarlarda ve kolinerjik sinirlerin ganglionlarındaki hücrelerde yaygın olarak bulunarak katekolaminlere cevap olarak bronkodilatasyon oluşturan fonksiyonel bir G protein çiftidir. ADRB2, 5. kromozomun uzun kolundaki 5q31.32 alanda lokalizedir ve tek bir ekzon tarafından kodlanır. Genetik çalışmalar ile

46. nükleotid ve 16. kodonda Arjinin (Arg) amino asiti yerine Glisin (Gly) amino asitinin geçmesi ile ADRB2 16 polimorfizmi tanımlanmıştır. GSTP1, pi sınıf glutatyon *S*-transferaz aktivitesini kontrol eden aday bir gendir. Bu gen atopi ve havayolu duyarlılığı gibi fenotipik özellikler ile ilişkili kromozomun 11q13 kolu üzerinde lokalizedir ve 7 adet ekzon içerir. Genetik çalışmalar ile ekzon 5’de, 313. nükleotid ve 105. kodonda İzolösin (Ile) amino asiti yerine Valin (Val) aminoasitinin geçmesi ile GSTP1 polimorfizmi tanımlanmıştır.

Bu çalışmada Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile “Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)” tekniği kullanılarak, 129 astımlı hasta ve 127 kontrol grubu ADRB2 ve GSTP1 genotipleri yönünden incelenmiştir. Hasta ve kontrol grubunun ADRB2 genotip frekansları sırasıyla %10.9 (Arg16Arg), %48.8 (Arg16Gly), %40.3 (Gly16Gly); %24.4 (Arg16Arg), %36.2 (Arg16Gly), %39.4 (Gly16Gly) bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubuna ait ADRB2 alel frekansları ise sırasıyla %35.3 (Arg16), %64.7 (Gly16); %42.5 (Arg16), %57.5 (Gly16) bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubundaki GSTP1 genotip frekansları sırasıyla %55 (Ile105Ile), %43.4 (Ile105Val), %1.6 (Val105Val); %75.6 (Ile105Ile), %22 (Ile105Val), %2.4 (Val105Val) olarak bulunmuştur. Alel frekansları ise %76.7 (Ile105), %23.3 (Val105); %86.6 (Ile105), %13.4 (Val105) olarak bulunmuştur. Her iki grup ADRB2 genotip ve alel frekansları yönünden istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Ancak, her iki grup GSTP1 genotip ve alel frekansları yönünden karşılaştırıldığında astım grubunda Ile105Val genotip frekansı ve Val105 alel frekansı kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Ayrıca, astımlı hastalarda, her iki alel frekansları ile atopi, nokturnal dispne ve steroid bağımlılığı gibi fenotipik özellikleri yönünden farklılık gözlenmiştir.

VII. SUMMARY

Individual differences, depending on genetic factors, in activity of some enzymes that metabolise xenobiotics have become the subject of several studies in recent years. Especially the genetic polymorphism researches are important for drug action and drug toxicity. In addition, it's reported that polymorphisms in xenobiotic metabolism increases the susceptibility to certain disease, especially the cancer, via drug resistance, adverse reactions and xenobiotic exposure.

Asthma incidence is determined as 2.65 - 4 / 1000 per year and the prevalence is about 3-5 %, 5-10 % in adults and in childhood, respectively. In United States, it's observed in 4 % of general population. It's also reported that there are 10 million patients with asthma in States and the asthma is the 13th most common disease in the applications for medical medical care. It's believed that genetic factors play the major role in etiological and phenotypical properties of asthma. Hence, the individual differences in the functions of bronchial β_2 adrenoceptors (ADRB2) and individual differences in glutathione S-transferase P1 (GSTP1) metabolism may affect the incidence of asthma in population.

In recent years, ADRB2 16 and GSTP1 gene polymorphisms are studied in different populations. After completion of Human Genome Project to reach reliable datas in gene- diseases relationship, studies are designed in different populations and with larger sample sizes to make meta-analysis possible. Assesment of relationship between pathology of asthma and ADRB2 16 and GSTP1 polymorphism in Turkish population gains importance because of this reason.

ADRB2 is a functional G coupled-protein couple found especially in vascular endothelium of lungs, alveolar walls, ganglions of cholinergic nerves, which causes bronchodilation in response to catecholamines. ADRB2 gene is located at 5q31.32 locus on long arm of chromosome 5 and encoded by one exon. ADRB2 16 polymorphism is identified by which Arginin (Arg) is substituted by Glycine (Gly) at the nucleotide 46 in the codon 16. GSTP1 is a candidate pi class GST gene which controls pi class glutathione S- transferase activity. It's located

on the arm of chromosome 11q13 which is associated with the atopia and airway sensitivity it contains 7 exons. GSTP1 polymorphism is defined by which Isoleucine (Ile) is substituted by Valine (Val) at the exon 5, and codon 105.

In this study, 129 asthmatic patients and 127 healthy control cases were recruited to determine ADRB2 and GSTP1 genotypes using Polymerase Chain Reaction (PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) methods. The ADRB2 genotype frequencies of the patients and control cases were found to be; 10,9 % (Arg16Arg), 48,8 % (Arg16Gly), 40,3 % (Gly16Gly); and 24,4 % (Arg16Arg), 36,2 % (Arg16Gly), 39,4 % (Gly16Gly), respectively. ADRB2 allele frequencies of patients and control cases were; 35,3 % (Arg 16) 64,7 (Gly16); 42,5 % (Arg16), 57,5 (Gly16). GSTP1 genotype frequencies of patients and control cases were found to be; 55 % (Ile105Ile), 43,4 % (Ile105Val), 1,6 % (Val105Val); and 75,6 % (Ile105Ile), 22% (Ile105Val), 2,4 % (Val105Val) respectively. The allele frequencies were found as 76,5 % (Ile105), 23,3 % (Val105); 86,6 % (Ile105), 13,4 % (Val105).

In the cases of ADRB2 gene, we did not observe any significant difference between cases and controls, whereas we found a statistically significant difference in the genotype frequency of Ile105Val and the allele frequency of Val105 in asthmatic group compared to controls. Moreover, we observed a relation between allele frequencies and phenotypical properties like atophia, nocturnal dyspnea and steroid depency in the asthmatic patients.

VIII. ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Ankara’da doğdum. İlk ve orta öğretimimi Ankara’da tamamladıktan sonra 1988 yılında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi’ne başladım. Aynı fakülteden 1994 yılında mezun oldum. 1996 yılında S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniğinde asistan eğitimine başladım. 2000 yılında asistanlık eğitimini tamamlayıp Anesteziyoloji ve Reanimasyonu Uzmanı oldum. Aynı hastanede uzman doktor olarak göreve başladım. 2001 yılında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başladım. 2005 yılında Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı’nda Yrd. Doç. Dr. olarak göreve başladım. Halen aynı üniversitede öğretim üyesi olarak çalışmaktayım.

IX. KAYNAKLAR

1. ASHER, M.I., KEIL, U., ANDERSON, H.R., BEASLEY, R., CRANE, J., MARTINEZ, F., MITCHELL, E.A., PEARCE, N., SIBBALD, B., STEWART, A.W.: International study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): rationale and methods, Eur. Respir. J., 8, 483-91, (1995).
2. OSBORNE, M., DEFFEBACH, M.: The epidemiology and natural history of asthma: Outcomes and treatment regimens, Ann. Allergy Asthma Immunol., 92, 3-4, (2004).
3. SOUEF, L P.: Genetics, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 151, 24-25, (1995).
4. SARACLAR, Y., KUYUCU, S., TUNCER, A., SEKEREL, B., SACKESSEN, C., KOCABAS, C.: Prevalence of asthmatic phenotypes and bronchial hyperresponsiveness in Turkish schoolchildren: an International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) phase 2 study, Ann. Allergy Asthma Immunol., 91, 477-84, (2003).
5. ŞEKEREL, B., CANBAKAN, S., Mungan, D.: Asthma, T. Klin. J. Alerji, 1, 50-79, (2000).
6. AKÇAKAYA, N., KULAK, K., HASSANZADEH, A., CAMCIOĞLU, Y., ÇOKUĞRAŞ, H.: Prevalence of bronchial asthma and allergic rhinitis in İstanbul school children, Eur. J. Epidemiol., 16, 693-9, (2000).
7. DEMOLY, P., BOUSQUET, J., GODARD, P., MICHEL, F.B.: Genetics of allergic asthma, Pres. Med., 22, 817-21, (1993).
8. FOLINSBEE, L.J., BEDI, J.F., HORVATH, S.M.: Pulmonary response to threshold levels of sulfur dioxide (1.0 ppm) and ozone (0.3 ppm), J. Appl. Physiol., 58, 1783-7, (1985).
9. [http:// www.eere.energy.gov/cleancities/conference/2001/pdfs/Michael_Friedman.pdf](http://www.eere.energy.gov/cleancities/conference/2001/pdfs/Michael_Friedman.pdf)
10. MARTINEZ, F.D., CLINE, M., BURROWS, B.: Increased incidence of asthma in children of smoking mothers, Pediatrics, 89, 21-6, (1992).
11. LIGGETT, S.B.: Pharmacogenetics of beta-1 and beta-2 adrenergic receptors, Pharmacology, 61, 167-73, (2000).

12. GREEN, S.A., TURKI, J., INNIS, M., LIGGETT, S.B.: Amino-terminal polymorphisms of the human beta (2)-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties, *Biochem.*, 33, 9414-9, (1994).
13. GREEN, S.A., TURKI, J., BEJARANO, P., HALL, I.P., LIGGETT, S.B.: Influence of beta 2-adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth muscle cells, *Am. J. Respir. Cell. Molec. Biol.*, 13, 25-33, (1995).
14. CANTLAY, A.M., SMITH, C.A., WALLACE, W.A., YAP, P.L., LAMB, D., HARRISON, D.J.: Heterogeneous expression and polymorphic genotype of glutathione S-transferase in human lung, *Thorax*, 49, 1010-4, (1994).
15. HAYES, J.D., STRANGE R.C.: Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences, *Pharmacology*, 61, 154-6, (2000).
16. FRYER, A.A., HUME, R., STRANGE, R.C.: The development of glutathione S-transferase and glutathione peroxidase activities in human lung, *Biochim. Biophys. Acta.*, 883, 449-53, (1986).
17. GONZALES, F.J., IDLE, J.R.: Pharmacogenetic phenotyping and genotyping: Present status and future potential, *Clin. Pharmacokinet.*, 26, 59-70, (1994).
18. LEMANSKE, R.F., GREN, C.G.: Asthma in infancy and childhood in "Allergy Principles and Practice", (MIDDLETON, E., ed.) 877-900, St.Louis, Mosby, (1998).
19. HOMER, R.J., ELIAS, J.A.: Airway remodeling in asthma: therapeutic implications of mechanisms, *Physiology*, 20, 28-35, (2005).
20. KILPELAINEN, M., TERHO, E.O., HELENIUS, H., KOSKENVUO, M.: Validation of a new questionnaire on asthma, allergic rhinitis, and conjunctivitis in young adults, *Allergy*, 56, 377-84, (2001).
21. GERGEN, P.J., WEISS, K.B.: Epidemiology of asthma in "Asthma and Rhinitis", (BUSE, W.W., HOLGATE, S.T., ed.) 15-31, Blackwell Science, Taunton, Massachusetts, (1995).
22. THE ISAAK STEERING COMMITTEE. Worldwide variation in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema. The international study of asthma and allergies in childhood, *Lancet*, 351, 1225-32, (1998).

23. SANDFORD, A.J., PARE, P.D.: The genetics of asthma. The important questions, *Am. J. Respir. Care Med.*, 161, 202-6, (2000).
24. EDFORS-BUBS, M.L.: Allergy in 7000 twin pairs, *Allergol.*, 26, 249-85, (1997).
25. NYSTAD, W., ROYSAMB, E., MAGNUS, P., TAMBS, K., HARRIS, J.R.: A comparison of genetic and environmental variance structures for asthma, hay fever and eczema with symptoms of the same diseases: a study of Norwegian twins, *Int. J. Epidemiol.*, 34, 1302-9, (2005).
26. LANDER, E.S., SCHORK, N.J.: Genetic dissection of complex traits, *Science*, 265, 2037-48, (1994).
27. LONGO, G., STRIANTI, R., POLI, F., FUMI, F.: Genetic factors in non-specific bronchial hyperreactivity. An epidemiological study, *Am. J. Dis. Child.*, 147, 331-4, (1987).
28. TRENGA, C.A., KOENIG, J.O., WILLIAMS, P.V.: Sulphur dioxide sensitivity and plasma antioxidants in adult subjects with asthma, *Occup. Environ. Med.*, 56, 544-7, (1999).
29. WESS, K.B.: Seasonal trends in US asthma hospitalizations and mortality, *JAMA*, 263, 2323-8, (1990).
30. CHARPIN, D., KLEISBAUER, J.P., LANTAUME, A.: Asthma and allergy to house-dust mite in populations living in high altitudes, *Chest*, 93, 758-61, (1988).
31. DOLD, S., WJST, M., MUTIUS, E., REITMER, P., STIEPEL, E.: Genetic risk for asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis, *Arch. Dis. Child.*, 67, 1018-22, (1992).
32. GODFERY, S.: Controversies in the pathogenesis of exercise-induced asthma, *Eur. J. Respir. Dis.*, 68, 81-8, (1986).
33. D'AMATO, G., LICCARDI, G., DIAMATO, M., CAZZOLA, M.: Outdoor air pollution, climatic changes and allergic bronchial asthma, *Eur. Respir. J.*, 20, 763-76, (2002).
34. COGSWELL, J.J., HALLIDAY, D.F., ALEXANDER, J.R.: Respiratory infection in the first year of life in children at risk of developing atopy, *BMJ*, 284, 1011-3, (1982).
35. MESSAGE, S.D., JOHNSTON, S.L.: The immunology of virus infection in asthma, *Eur. Respir. J.*, 18, 1013-8, (2001).

36. BUSSE, W.W.: Respiratory infections: their role in airway responsiveness and pathogenesis of asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 85, 671-83, (1990).
37. BRESSER, P., OUT, T., VAN-ALPHEN, L., JANSEN, H.M., LUTTER, R.: Airway inflammation in nonobstructive and obstructive chronic bronchitis with chronic haemophilus influenzae airway infection. Comparison with noninfected patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 162, 947-52, (2000).
38. HALTOM, J.R., STRUN, K.R.C.: Pathogenesis of exercise-induced asthma: Implication for treatment, *Ann. Rev. Med.*, 37, 143-8, (1986).
39. BUSH, R.K., TAYLOR, S.L., HOLDEN, K., NORDLEE, J.A., BUSSE W.W.: Prevalence of sensitivity to sulphating agents in asthmatic patients, *Am. J. Med.*, 81, 816-20, (1986).
40. STEVENSON, D.D.: Diagnosis, prevention and treatment of adverse reactions to aspirin and nonsteroid anti-inflammatory drugs, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 74, 617-22, (1984).
41. O'BYRNE, P.M., INMAN, M.D.: Airway hiperresponsiveness, *Chest*, 123, 411-26, (2003).
42. FLOVAGE, E.: Inflammation and inflammatory mediators in bronchial asthma-A review, *Eur. Respir. J.*, 5, 330-6, (1991).
43. DJUKANOVIC, R., ROCHE, W.R., WILSON, J.W., BEASLEY, C.R., TWENTYMAN, O.P., HOWARTH, R.H., HOLGATE, S.T.: Mukosal inflammation in asthma, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 142, 434-57, (1990).
44. NATIONAL HEART LUNG & BLOOD INSTITUTE AND WORLD HEALTH ORGANISATION.: Global initiative for asthma, Bethesda, National Institutes of Health, (2002).
45. BUSSE, W.W., CALHOUN, W.F., SEDGWICK, J.D.: Mechanism of airway inflammation in asthma, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 147, 20-4, (1993)..
46. RENAULD, J.C.: New insights into the role of cytokines in asthma, *J. Clin. Pathol.*, 54, 577-89, (2001).
47. GLEICH, G.J.: Mechanisms of eosinophil associated inflammation, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 105, 651-63, (2000).

48. KROEGEL, C., WERNER, J.A.: Pulmonary immune cells in health and disease. The eosinophil leukocyt, *Eur. Respir. J.*, 7, 519-43, (1994).
49. HOLGATE, S.T., ROCHE, W.R., CHURCH, M.K.: The role of the eosinophil in asthma, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 143, 66-70, (1991).
50. GLEICH, G.J.: The eosinophil and bronchial asthma: current understanding, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 85, 422-36, (1990).
51. HOGG, J.C.: The pathology of asthma, *APMIS*, 105, 735-45, (1997).
52. WEINBERGER, M.: Clinical patterns and natural history of asthma, *J. Pediatr.*, 142, 15-20, (2003).
53. COLLINS, F.S., PATRINOS, A., JORDAN, E., CHAKRAVARTI, A., GESTELAND, R., WALTERS, L.: New goals for the US Human Genome Project: 1998-2003, *Science*, 282, 682-9, (1998).
54. MARTH, G.T., KORF, I., YANDELL, M.D., YEH, R.T., GU, Z., ZAKERI, H., STITZEL, N.O., HILLIER, L., KWOK, P.Y., GISH, W.R.: A general approach to single nucleotide polymorphism discovery, *Nat. Genet.*, 23, 452-6, (1999).
55. SCHORK, N.J., FALLIN, D., LANCHBURY, J.S.: Single nucleotide polymorphisms and future of genetic epidemiology, *Clin. Genet.*, 58, 250-64, (2000).
56. BROOKES, A.J.: The essence of SNPs, *Gene*, 8, 177-86, (1999).
57. PALMER, L.J., COOKSON, W.O.: Using single cell nucleotide polymorphisms (SNPs) as a means to understanding the pathophysiology of asthma, *Respir. Res.*, 2, 102-12, (2001).
58. GRAY, I.C., CAMPBELL, D.A., SPURR, N.K.: Single nucleotide polymorphisms (SNPs) as a means to understanding the pathophysiology of asthma, *Respir. Res.*, 2, 102-12, (2001).
59. HALL, I.P.: Pharmacogenetics of asthma, *Chest*, 130, 1873-8, (2006).
60. HALL, I.P.: The genetics of asthma. Candidate gene approaches: gene-environmental interactions, *Clin. Exp. Allergy*, 28, 74-6, (1998).
61. OBER, C., HOFFJAN, S.: Asthma genetics: the long and winding road to gene discovery, *Genes Immun.*, 7, 95-100, (2006).

62. WOOLCOCK, A.J., KING, G.: Is there a specific phenotype for asthma?, *Clin. Exp. Allergy*, 25, 3-7, (1995).
63. DRAZEN, J.M., SILVERMAN, E.K., LEE, T.H.: Heterogeneity of therapeutic responses in asthma, *Br. Med. Bull.*, 56, 1054-70, (2000).
64. THE COLLABORATIVE STUDY ON THE GENETICS OF ASTHMA. A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations, *Nature Genet.*, 15, 389-92, (1997).
65. LEVITT, R.C.: Molecular genetic methods for mapping disease genes, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 150, 94-9, (1994).
66. MARSH, D.G., WOLLO, P., HUANG, S.K.: Molecular and cellular studies of human immune responsiveness to the short ragweed allergen, *Eur. Respir. J.*, 4, 60-7, (1991).
67. MARSH, D.G., NEELY, J.D., BREAZEALE, D.R., GHOSH, B., FREIDHOFF, L.R., EHRLICH-KAUTZKY, E., SCHOU, C., KRISHNASWAMY, G., BEATY, T.H.: Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31 markers and total serum IgE concentrations, *Science*, 264, 1152-6, (1994).
68. MEYERS, D.A., POSTMA, D.S., PANHUYSEN, C.I., XU, J., AMELUNG, P.J., LEVITT, R.C., BLEECKER, E.R.: Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5, *Genomics*, 23, 464-70, (1994).
69. AMELUNG, P.J., PANHUYSEN, C.I.M., POSTMA, D.S., LEVITT, R.C., BLEECKER, E.R.: Atopy and bronchial hyperresponsiveness: exclusion of linkage to markers on chromosomes 11q and 6q, *Clin. Exp. Allergy*, 22, 1077-84, (1992).
70. YOUNG, R.P., DEKKER, J.W., WORDSWORTH, B.P., SCHOU, C., PILE, K.D., MATTHIESEN, F., ROSENBERG, W.M., BELL, J.I., HOPKIN, J.M., COOKSON, W.O.: HLA-DR and HLA-DP genotypes and immunoglobulin E responses to common major allergens, *Clin. Exp. Allergy*, 24, 431-9, (1994).
71. BARNES, P.J.: Modulation of neurotransmission in airways, *Physiol. Rev.*, 72, 699-729, (1992).

72. KOBILKA, B.K., DIXON, R.A., FRIELLE, T.: cDNA for human β_2 -adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 46-50, (1987).
73. NIJKAMP, F.P., ENGELS, F., HENRICKS, P.A., VAN-OOSTERHOUT, A.J.: Mechanism of β -adrenergic receptor regulation in lungs and its implications for physiological responses, *Physiol. Rev.*, 72, 323-67, (1992).
74. HAMID, Q.A., MAK, J.C., SHEPPARD, M.N., CORRIN, B., VENTER, J.C., BARNES, P.J.: Localization of β_2 -adrenoceptor Messenger RNA in human and rat lung using in situ hybridization: correlation with receptor autoradiography, *Eur. J. Pharm.*, 206, 133-8, (1991).
75. JOHNSON, M.: The β -adrenoceptor. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 158, 146-53, (1998).
76. SILVERMAN, R.: Treatment of acute asthma: a new look at the old and at the new, *Clin. Chest. Med.*, 21, 361-79, (2000).
77. LIGGETT, S.B.: Polymorphisms of adrenergic receptors: variations on a theme, *Assay Drug Dev. Technol.*, 1, 317-26, (2003).
78. LENTES, K.U., BERRETTINI, W.H., HOEHE, M.R., CHUNG, F.Z., GERSHON, E.S.: A biallelic DNA polymorphism of the human β_2 -adrenergic receptor detected by Ban I-Adrbr-2, *Nucleic Acids Res.*, 16, 2359-64, (1988).
79. MCQUITTY, C.K., EMALA, C.W., HIRSHMAN, C.A., LEVINE, M.A.: Polymorphism in the human β_2 -adrenergic receptor gene detected by restriction endonuclease digestion with Fnu4HI, *Hum. Genet.*, 93, 225-31, (1994).
80. REIHSMAUS, E., INNIS, M., MACLINTYRE, N., LIGGETT, S.B.: Mutations in the gene encoding for the β_2 -adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects, *Am. J. Respir. Cell Biol.*, 8, 334-9, (1993).
81. FENECH, A., HALL, I.P.: Pharmacogenetics of asthma, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 53, 3-15, (2002).

82. HUSS, K., HUSS, R.W.: Genetics of asthma and allergies, *Nurs. Clin. North Am.*, 35, 695-705, (2000).
83. TURKI, J., PAK, J., GREEN, S.A., MARTIN, R.J., LIGGETT, S.B.: Genetic polymorphisms of the beta-2 adrenergic receptor in nocturnal and non-nocturnal asthma: evidence that Gly16 correlates with the nocturnal phenotype, *J. Clin. Invest.*, 95, 1635-41, (1995).
84. CHEN, Y., DALES, R., KREWSKI, D.: Leisure-time energy expenditure in asthmatics and non-asthmatics, *Respir. Med.*, 95, 13-8, (2001).
85. LIPWORTH, B.J., HALL, I.P., TAN, S., AZIZ, I., COUTIE, W.: Clinical investigations: Effects of genetic polymorphism on ex-vivo and in-vivo function of β_2 -adrenoceptors in asthmatic patients, *Chest*, 115, 324-8, (1999).
86. CAMARGO, C.A., WEISS, S.T., ZHANG, S.: Prospective study of body mass index, weight change, and risk of adult-onset asthma in women, *Arch. Intern. Med.*, 159, 2582-8, (1999).
87. TAYLOR, E., KENNEDY, R.: Genetic variation of β_2 -adrenoceptor, *Am. J. Pharmacogenomics*, 1, 165-74, (2001).
88. AYNACIOGLU, A.S., CASCORBI, I., GUNGOR, K., OZKUR, M., BEKIR, N., ROOTS, I., BROCKMOLLER, J.: Population frequency, mutation linkage and analytical methodology for the Arg16Gly, Gln27Glu and Thr164Ile polymorphisms in the beta2-adrenergic receptor among Turks, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 48, 761-4, (1999).
89. SCOTT, E.M., WRIGHT, R.C.: Variability of glutathione S-transferase of human erythrocytes, *Am. J. Hum. Genet.*, 32, 115-7, (1980).
90. TOWNSEND, D., TEW, K.: Cancer drugs, genetic variation and the glutathione-S-transferase gene family, *Am. J. Pharmacogenomics*, 3, 157-72, (2003).
91. ANSARI, G.A.S., SINGH, S.V., GAN, J.C., AWASHTI, Y.C.: Human erythrocyte glutathione S-transferase: A possible marker of chemical exposure, *Toxicol. Lett.*, 37, 57-62, (1987).
92. ADLER, V., YIN, Z.: Regulation of JNK signaling by GSTp, *Embo. J.*, 18, 1321-4, (1999).

93. VAN-DER, E.M., BOUWMAN, T., COMMANDEUR, J.N.M., ERMEULEN, N.P.E.: Structure-activity relationship for chemical and glutathione S-transferase-catalysed glutathione conjugation reactions of a series of 2-substituted 1-chloro-4-nitrobenzenes, *Biochem. J.*, 320, 531-40, (1996).
94. MANNERVİK, B.: The isozymes of glutathione S-transferase, *Adv. Enzymol.*, 57, 357-417, (1985).
95. BOARD, P.G., BAKER, R.T., CHELVANAYAGAM, G., JERMİİN, L.S.: Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans, *Biochem. J.*, 328, 929-35, (1997).
96. HAYES, J.D., FLANAGEN, J.U., JOWSEY, I.R.: Glutathione transferases, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 51-88, (2005).
97. MEYER, D.J., COLES, B., PEMBLE, S.E., GILMORE, K.S., FRASER, G.M., KETTERER, B.: Theta, a new class of glutathione transferase purified from rat and man, *Biochem. J.*, 274, 409-14, (1991).
98. PEMBLE, S.E., WARDLE, A.F., TAYLOR, J.B.: Glutathione S-transferase class kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue, *Biochem. J.*, 319, 749-54, (1996).
99. STRANGE, R.C., SPITERI, M.A., RAMACHANDRA, S., FRYER, A.A.: Glutathione S-transferase family of enzyme, *Mutat. Res.*, 482, 21-6, (2001).
100. KRISHNA, M.T., SPRINGALL, D.R., FREW, A.J., POLAK, J.M., HOLGATE, S.T.: Mediators of inflammation in response to air pollution: a focus on ozone and nitrogen dioxide, *JR. Coll. Physicians. Lond.*, 30, 61-6, (1996).
101. THOMAS, N.S., WILKINSON, J., HOLGATE, S.T.: The candidate region approach to the genetics of asthma and allergy, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 156, 144-51, (1997).
102. HAYES, J.D., STRANGE, R.C.: Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress, *Free. Radic. Res. Commun.*, 22, 193-207, (1995).

103. EATON, D.L., BAMMLER, T.K.: Concise review of glutathione S-transferase and their significance to toxicology, *Toxicological Sciences*, 49, 156-64, (1999).
104. GOTO, S., IIDA, T., CHO, S., OKA, M., KOHNO, S., KONDO, T.: Overexpression of glutathione S-transferase pi enhances the adduct formation cisplatin with glutathione in human cancer cells, *Free Radic. Res.*, 31, 549-58, (1999).
105. SPITERI, M.A., BIANCO, A., STRANGE, R.C., FRYER, A.A.: Polymorphism at the glutathione S-transferase, GSTP1 locus: a novel mechanism for susceptibility and development of atopic airway inflammation, *Allergy*, 55, 15-20, (2000).
106. HEMMINGSEN, A., FRYER, A.A., HEPPLER, M., STRANGE, R.C., SPITERI, M.A.: Simultaneous identification of GSTP1 Ile105 → Val105 and Ala114 → Val114 substitutions using an amplification refractory mutation system polymerase chain reaction assay: studies in patients with asthma, *Respir. Res.*, 2, 255-60, (2001).
107. ALI-OSMAN, F., AKANDE, O., ANTOUN, G., MAO, J.X., BUOLAMWINI, J.: Molecular cloning characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNA of three human glutathione S-transferase Pi gene variants, *J. Biol. Chem.*, 272, 10004-12, (1997).
108. FRYER, A.A., BIANCO, A., HEPPLER, M., JONES, P.W., STRANGE, R.C., SPITERI, M.A.: Polymorphism at the glutathione S-transferase GSTP1 locus. A new marker for bronchial hyperresponsiveness and asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 161, 1437-42, (2000).
109. MAPP, C.E., FRYER, A.A., DE MARZO, N., POZZATO, V., PADOAN, M., BOSCHETTO, P., STRANGE, R.C., HEMMINGSEN, A., SPITERI, M.A.: Glutathione S-transferase GSTP1 is a susceptibility gene for occupational asthma induced by isocyanates, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 109, 867-72, (2002).
110. INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J.: PCR Strategies, first ed., Academic Press, London, (1995).
111. INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J., WHITE, T.J.: PCR Protocols. A guide to methods and applications, first ed., Academic Press, London, (1990).

112. SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., ARNHEIM, N.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 230, 1350-4, (1985).
113. ÇAĞLAYAN, S.H.: Polimeraz zincir reaksiyonu: Nükleik asitleri çoğaltma tekniği ve uygulama alanları, *Doğa*, 15, 9-21, (1991).
114. MULLIS, K.B., FALOONA, F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol.*, 150, 335-50, (1987).
115. HO, L.I., HARN, H.J., CHEN, C.J., TSAI, N.M.: Polymorphism of the β_2 -Adrenoceptor in COPD in Chise subjects, *Chest*, 120, 1493-9, (2001).
116. KIM, S.H., OH, S.Y., OH, H.B., KIM, Y.K., CHO, S.H., KIM, Y.Y., MIN, K.U.: Association of β_2 -adrenoceptor polymorphisms with nocturnal cough among atopic subjects but not with atopy and nonspecific bronchial hyperresponsiveness, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 109, 630-5, (2002).
117. MARTINEZ, F.D., GRAVES, P.E., BALDINI, M., SOLOMON, S., ERICKSON, R.: Association between genetic polymorphisms of the beta-2 adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing, *J. Clin. Invest.*, 100, 3184-8, (1997).
118. HOLLOWAY, J.W., DUNBAR, P.R., RILEY, G.A., SAWYER, G.M., FITZHARRIS, P.F., PEARCE, N., LE GROS, G.S., BEASLEY, R.: Association of beta-2 adrenejic receptor polymorphisms with severe asthma, *Clin. Exp. Allergy*, 30, 1097-103, (2000).
119. XIE H.G., STEIN, C.M., KIM, R.B., XIAO, Z.S., HE, N., ZHOU, H.H., GAINER, J.V., BROWN, N.J., HAINES, J.L., WOOD, A.J.: Frequency of functionally important beta2-adrenoceptor polymorphisms varies markedly among African-American, Caucasian and Chinese individuals, *Pharmacogenetics*, 9, 511-6, (1999).
120. DEWAR, J.C., WILKINSON, J., WHEATLEY, A., THOMAS, N.S., DOULL, I., MORTON, N., LIO, P., HARVEY, J.F., LIGGETT, S.B., HOLGATE, S.T., HALL, I.P.: The glutamine 27 beta-adrenoceptor polymorphism is associated with elevated IgE levels in asthmatic families, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 100, 261-5, (1997).

121. YIM, J.J., YOO, C.G., LEE, C.T., KIM, Y.W., HAN, S.K., SHIM, Y.S.: Lack of association between glutathione S-transferase P1 polymorphism and COPD in Koreans, *Lung*, 180, 119-25, (2002).
122. TAN, S., HALL, I.P., DEWAR, J., DOW, E., LIPWORTH, B.: Association between β_2 -adrenoceptor polymorphism and susceptibility to bronchodilator desensitisation in moderately severe stable asthmatics, *Lancet*, 350, 995-9, (1997).
123. D'AMATO, M., VITIANI, L.R., PETRELLI, G., FERRIGNO, L., DIPIETRO, A., TREZZA, R., MATRICARDI, P.M.: Association of persistent bronchial hyperresponsiveness with beta2-adrenoceptor (ADRB2) haplotypes. A population study, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 158, 1968-73, (1998).
124. HALL, I.P.: Pharmacogenetics of asthma, *Eur. Respir. J.*, 15, 449-51, (2000).
125. ULBRECHT, M., HERGETH, M.T., WJST, M.: Association of β_2 -adrenoceptor variants with bronchial hyperresponsiveness, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 161, 469-74, (2000).
126. CHENG, S.L., YU, C.J., CHEN, C.J., YANG, P.C.: Genetic polymorphism of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in COPD, *Eur. Respir. J.*, 23, 818-24, (2004).
127. HURST, R., BAO, Y., JEMTH, P., MANNERVIK, B., WILLIAMSON, G.: Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases, *Biochem. J.*, 332, 97-100, (1998).
128. JOHANSSON, A.S., STENBERG, G., WIDERSTEN, M., MANNERVIK, B.: Structure-activity relationships and thermal stability of human glutathione transferase P1-1 governed by the H-site residue 105, *J. Mol. Biol.*, 278, 687-98, (1998).
129. LEE, Y.L., HSIUE, T.R., LEE, Y.C., LIN, Y.C., GUO, Y.L.: The association between glutathione S-transferase P1, M1 polymorphisms and asthma in Taiwanese schoolchildren, *Chest*, 128, 1156-62, (2005).
130. GILLILAND, F.D., RAPPAPORT, E.B., BERHANE, K., ISLAM, T., DUBEAU, L., GAUDERMAN, W.J., MCCONNELL, R.: Effects of glutathione S-transferase P1, M1, and T1 on acute respiratory illness in school children, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 166, 346-51, (2002).

131. NICKEL, R., HAIDER, A., SENGLER, C., LAU, S., NIGGEMANN, B., DEICHMANN, K.A., WAHN, U., HEINZMANN, A.: Association study of Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) with asthma and bronchial hyper-responsiveness in two German pediatric populations, *Pediat. Allergy Immunol.*, 16, 539-41, (2005).
132. CALIKOĞLU, M., TAMER, L., ARAS, N.A., KARAKAS, S., ERCAN, B.: The association between polymorphic genotypes of glutathione S-transferases and COPD in the Turkish population, *Biochemical Genetics*, 44, 307-19, (2006).
133. AYNACIOĞLU, S.A., NACAK, M., FILIZ, A., EKINCI, E., ROOTS, I.: Protective role of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) Val105Val genotype in patients with bronchial asthma, *Br. J. Clin. Pharm.*, 57, 213-7, (2003).
134. TAMER, L., CALIKOĞLU, M., ATES, N.A., YILDIRIM, H., ERCAN, B., SARITAS, E., UNLU, A., ATIK U.: Glutathione S-transferase gene polymorphisms (GSTT1, GSTM1, GSTP1) as increased risk factors for asthma, *Respirology*, 9, 493-8, (2004).
135. TORUNER, G.A., AKYERLI, C., UCAR, A., AKI, T., ATSU, N., OZEN, H., TEZ, M., CETINKAYA, M., OZCELIK, T.: Polymorphisms of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and bladder cancer susceptibility in the Turkish population, *Arch. Toxicol.*, 75, 459-64, (2001).
136. ROMIEU, I., RAMIREZ-AGUILAR, M., SIENRA-MONGE, R.R., MORENO-MACÍAS, H., DEL RIO-NAVARRO, B.E., DAVID, G., MARZEC, J., HERNANDEZ-AVILA, M., LONDON, S.: GSTM1 and GSTP1 and respiratory health in asthmatic children exposed to ozone, *Eur. Respir. J.*, 28, 953-9, (2006).
137. LO, H.W., ALI-OSMAN, F.: Genomic cloning of GSTP1 and allelic human pi class glutathione S-transferase gene variant and functional characterization of its retinoic acid response elements, *J. Biol. Chem.*, 272, 32742-9, (1997).
138. SUNDBERG, K., JOHANSSON, A.S., STENBERG, G., WIDERSTEN, M., SEIDEL, A., MANNERVIK, B., JERNSTROM, B.: Differences in catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Carcinogenesis*, 19, 433-6, (1998).

- 139.** HU, X., XIA, H., SRIVASTAVA, S.K., PAL, A., AWASTHI, Y.C., ZIMNIAK, P., SINGH, S.V.: Catalytic efficiencies of allelic variants of human glutathione S-transferase P1-1 toward carcinogenic anti-diol epoxides of benzo(c)phenanthrene and benzo(g)chrysene, *Cancer Res.*, 58, 5340-3, (1998).
- 140.** ISII, T., MATSUSE, T., TERAMOTO, S., MATSUI, H., MIYAO, M., HOSOI, T., TAKAHASHI, H., FUKUCHI, Y., OUCHI, Y.: Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Thorax*, 54, 693-6, (1999).
- 141.** LEE, Y.L., LIN, Y.C., WANG, J.Y., HSIUE, T.R., GUO, Y.L.: Glutathione S-transferase P1 gene polymorphism and air pollution as interactive risk factor childhood asthma, *Clin. Exp. Allergy*, 34, 1707-13, (2004).
- 142.** WATSON, M.A., STEWART, R.K., SMITH, G.B., MASSEY, T.E., BELL, D.A.: Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution, *Carcinogenesis*, 19, 275-80, (1998).