

**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KRONİK OBSTRÜKTİF AKCİĞER HASTALIĞINDA (KOAH)
GSTM1 VE GSTT1 İZOZİMLERİNİN ROLÜ**

BUKET HAYAT

ŞUBAT 2021

Biyoloji Anabilim Dalında Buket HAYAT tarafından hazırlanan "KRONİK OBSTRÜKTİF AKCİĞER HASTALIĞINDA (KOA) GSTMI VE GSTTI İZOZİMLERİNİN ROLÜ" adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Aysun ERGENE

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylanm.

Dr. Öğr. Üyesi Işıl YILDIRIM
Eş Danışman

Prof.D
Danışman

Jüri Üyeleri

Üye (Başkan): Prof. Dr. Duygu Uçkan ÇETİNKAYA

Üye(Danışman): Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN

Üye : Prof. Dr. Nazife Yiğit KAYHAN

...../...../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Recep ÇALIN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

KRONİK OBSTRÜKTİF AKCİĞER HASTALIĞINDA (KOAİ) GSTM1 VE GSTT1 İZOZİMLERİNİN ROLÜ

HAYAT, Buket

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Işıl YILDIRIM

Şubat 2021, 64 Sayfa

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAİ), günümüzün en önemli küresel çaptaki sağlık sorunlarından biridir. KOAİ oluşumunda genetik faktörlerin rolünün önemli olduğu fikri genel olarak kabul edilmektedir. Hastalığın giderek artan prevalansı ile morbidite ve mortalitesine neden olan risk faktörleri arasında genetik kaynaklı olarak proteaz ve antiproteaz enzimlerini düzenleyen gen bozuklukları (ekspresyonlar, delesyonlar) ve en sık rastlanan antioksidan enzim gen bozuklukları bulunmaktadır. Antioksidan enzim genlerinin ekspresyonu, sigara içilmesi ile ilişkili hava yolu epitelinde bulunan oksidatif hasara karşı hücrel koruyuculuk sağlamaktadır. Antioksidan enzim gen aileleri arasında, Glutasyon S-transferazlar (GST)'ler en önemli olan ailesidir. GST'ler sigara dumanında bulunan aromatik hidrokarbonların detoksifiye edilmesinde önemli rol oynayan enzimlerdir. Önemli rollerine rağmen, henüz bu enzimlerin genleri ile KOAİ arasındaki ilişki üzerine yapılmış özellikle Türkiye'de geniş kapsamlı çalışma yoktur. Bu eksikliği gidermek için yapılan bu çalışma kapsamında glutasyon aracılı antioksidan etki ile KOAİ

hastalığının gen bozuklukları ile ilgili tedavi süreçlerine yardımcı olabilmek hipotezini ileri sürmekteyiz.

Çalışmamızın amacı, KOAH hastalığının oluşumunda GSTM1 ve GSTT1 polimorfizminin rolü olup, olmadığını araştırmaktır.

Bu çalışmada, Polatlı Duatepe Devlet Hastanesi Göğüs hastalıkları bölümünden Etik Kurul izni alınmış 36 KOAH'lı hasta ve 14 kontrol vakası kullanıldı. 2019 yılı içerisinde hasta ve kontrol grubundan alınmış olan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı. KOAH hasta ve kontrol grubunda qPCR metodu ile GSTM1 ve GSTT1 polimorfizmleri çalışıldı.

GSTM1 için delesyon görülmeyen 13 hasta (% 36,11), belirli oranda gen kaybı söz konusu olan 23 hasta (% 63,89) gözlemlendi ve tamamen delesyona uğramış oldukları gözlenmedi. GSTM1 için kontrol grubumuzda delesyon gözlenmeyen 11 (%78,57), belirli oranda delesyon gözlenen 2 (% 14,29), ve delesyon gözlenen 1 (%7,14) olgu bulundu. GSTT1 için delesyon görülmeyen 18 hasta (% 50), belirli oranda gen kaybı söz konusu olan 4 hasta (% 11,11), ve neredeyse tamamen delesyona uğramış ve kaybolmuş 14 hasta (% 38,89) gözlemlendi. GSTT1 için kontrol grubumuzda delesyon gözlenmeyen 28 (% 56), belirli oranda delesyon gözlenen 6 (%12,00), ve delesyon gözlenen 16 (% 32) olgu bulundu.

Çalışmada, KOAH hastalarında GSTM1 ve GSTT1 genlerinin delesyonu farklı oranlarda sıklıkla görüldü. Sonuç olarak, KOAH hastalığına yakalanma riskinde GSTM1 ve GSTT1'in rolü olabileceği bu çalışma ile gösterildi.

Anahtar kelimeler: Delesyon, GST, KOAH, Polimorfizm, qPCR metot

ABSTRACT

ROLE OF GSTM1 AND GSTT1 ISOZYMES IN CRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE (COPD)

HAYAT, Buket

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Master Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN

Co-Supervisor: Asst. Prof. Işıl YILDIRIM

February 2021, 64 pages

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is one of the most important global health problems today. The idea that genetic factors play an important role in the development of COPD is generally accepted. Among the risk factors that cause morbidity and mortality with the increasing prevalence of the disease, there are gene disorders (expressions, deletions) that regulate protease and antiprotease enzymes and the most common antioxidant enzyme gene disorders. The expression of antioxidant enzyme genes provides cellular protection against oxidative damage in the airway epithelium associated with smoking. Among the antioxidant enzyme gene families, Glutathione S-transferases (GST) are the most important family. GSTs are enzymes that play an important role in detoxifying aromatic hydrocarbons found in cigarette smoke. Despite their important role, yet on the relationship between COPD and genes of these enzymes is not particularly extensive studies in Turkey. Within the scope of this study conducted to overcome this deficiency, we hypothesize that it can help the treatment processes of COPD disease with its antioxidant effect through glutathione.

Our study aims to investigate whether GSTM1, and GSTT1 polymorphisms play a role in the development of COPD disease.

In this study, there are 36 COPD patients and 14 controls with the permission of the Ethics Committee from the Department of Chest Diseases of Polatlı Duatepe State Hospital. DNA isolation was performed from blood samples taken from the patient and control groups in 2019. GSTM1 and GSTT1 polymorphisms were studied with qPCR method in COPD patient and control groups.

For GSTM1, 13 patients (36.11 %) with no deletion, 23 patients (63.89 %) with a certain rate of gene loss were observed, and it was not observed that they were completely deletion. For GSTM1, 11 (78.57 %) cases with no deletion, 2 (14.29 %) with a certain rate of deletion, and 1 (7.14 %) with deletion were found in our control group.

For GSTT1, 18 patients (50 %) without deletion, 4 patients (11.11 %) with a certain percentage of gene loss, and 14 patients (38.89 %) who were almost completely deletion or even lost were observed. In our control group for GSTT1, 28 (56 %) cases with no deletion, 6 (12 %) cases with certain deletions, and 16 (32 %) cases with deletions were found.

In the study, GSTM1 and GSTT1 deletions were frequently seen at different rates in COPD patients. As a result, this study demonstrated that GSTM1 and GSTT1 may have a role in the risk of developing COPD.

Key Words: COPD, Deletion, GST, Polymorphism, qPCR method

TEŞEKKÜR

Tez konusunu seçerken isteklerimi göz önünde bulundurup, tezimin hazırlanmasında çok büyük emeği olan, mesleki bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, öğrenmeyi ve öğretmeyi çok seven saygıdeğer tez yöneticisi hocam Sayın Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN'e, eş danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Işıl YILDIRIM'a, tez çalışmalarım esnasında, bilimsel konularda daima yardımını gördüğüm Sayın Dr. Sezen YILMAZ SARIALTIN'a ve Sayın Onur DİRİCAN'a,

Her konuda yardımcı olan ve sunduğu imkânlar için Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları Müdürlüğü ve orada çalışan hocalarıma,

Son olarak hayatım boyunca ellerini omuzlarımda hissettiğim, her zaman arkamda olduklarını bildiğim, her şeyim aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklendi. Proje numarası 2019/123. Desteği için Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. KRONİK OBSTRÜKTİF AKCİĞER HASTALIĞI (KOAİ)	1
1.1.1. Tanım ve Epidemiyoloji	1
1.1.2. Prevalans ve Mortalite	2
1.1.3. Risk Faktörleri	3
1.1.3.1. Yaş ve Cinsiyet	3
1.1.3.2. Sigara ve Biyokütle	4
1.1.3.3. Genetik Faktörler	5
1.1.4. Patogenez	5
1.1.4.1. Oksidan Antioksidan Dengesizliği	6
1.2. GLUTATYON-S-TRANSFERAZ (GST)	6
1.2.1. Mü Sınıfı Glutatyon-S-Transferazlar	6
1.2.2. Teta Sınıfı Glutatyon-S-Transferazlar	7
1.3. LİTERATÜR ÖZETİ.....	7
2. MATERYAL VE YÖNTEM	10
2.1. MATERYAL	10
2.1.1. Materyalin Temini ve Hazırlanışı	10
2.1.1.1. Biyolojik Numunelerin Hazırlanması	10
2.1.1.2. Kandan DNA İzolasyonu	10
2.1.1.3. RNA izolasyonu	10
2.1.1.4. cDNA sentezi	12
2.1.1.5. PCR için Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltilerin Hazırlanışı	13
2.1.1.6. Kullanılan Cihazlar	14
2.2. YÖNTEM	15

2.2.1. PCR Yöntemi.....	15
2.2.1.1. Primerlerin Seçimi ve Kontrolünün Sağlanması.....	15
2.2.1.2. PCR Koşulları	17
2.2.1.3. Sonuçlanan Melting Curve'lerden Tm (Melting Temperature) seviyelerindeki qPCR değerlerinin tespit edilmesi	18
2.2.1.4. Sonuç Bilgilerinin Kontrolünün Sağlanması: Agaroz Jel Elektrofrezisi	18
2.2.1.5. Primerlerin Etkinliği.....	18
2.2.1.6. qPCR Verilerinin ΔCt ve $\Delta\Delta Ct$ Analizi.....	19
2.2.1.7. qPCR testinin analizinin yapılması için verilerin ANOVA programıyla değerlendirilmesi	19
2.2.1.8. DNA Panel Analizi	20
2.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	21
3. BULGULAR	22
3.1. HASTALARA AİT GENEL BİLGİLER	22
3.2. GSTM1 VE GSTT1 POLİMORFİZM SONUÇLARI.....	23
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	38
KAYNAKLAR	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
2. 1. Çalışmamızda kullanılacak primerlerin elektroforez jel konfirmasyon görüntüsü	16
3. 1. Hasta ve kontrol grubunun cinsiyete göre dağılımı	22
3.2. KOAH hastalarında GSTM1'e ait analiz sonrası Melting Curve grafiklerinin genel görüntüsü	36
3. 3. GSTM1 için döngülere bağlı olarak değerlendirme sonrası normalize edilen kantitatif floresan değer grafikleri.....	36
3. 4. KOAH hastalarındaGSTT1'e ait analiz sonrası Melting Curve grafiklerinin genel görüntüsü	37
3. 5. GSTT1 için döngülere bağlı olarak değerlendirme sonrası normalize edilen kantitatif floresan değer grafikleri.....	37

TABLolar DİZİNİ

<u>TABLO</u>	<u>Sayfa</u>
1. 1. TÜİK, Ölüm nedeni istatistikleri içerisinde solunum sistemi hastalıkları	3
2. 1. WizScript™ cDNA sentez karışımı	12
2. 2. Uygulanan sıcaklık zaman grafiği.....	12
2. 3. Çalışmada kullanılan primerler	16
2.4. qPCR aşamasında kullanılan oranlar	17
2.5. qPCR Çalışma şartları	17
3. 1. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri (n, %)	23
3. 2. Hasta ve kontrol grubunun GSTM1 ve GSTT1 genotipleri.....	24
3. 3. Hasta grubunun gözlenen ve beklenen gen frekansları.....	25
3. 4. Kontrol grubunun gözlenen ve beklenen gen frekansları	25
3. 5. Hasta grubun GSTM1 genotipleme si.....	26
3.6. Hasta grubun GSTT1 genotipleme si.....	28
3. 7. Hasta grubunun cinsiyete göre GSTM1 genotipleme si	30
3. 8. Hasta grubunun cinsiyete göre GSTT1 genotipleme si.....	33

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

g	Gram
°C	Derece Santigrat
L	Litre
mL	Mililitre
ng	Nanogram
Δ Ct	Normalisation To Endogenous Control
$\Delta\Delta$ Ct	Normalisation To Calibrator
μ l	Mikrolitre

KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BOLD	Burden of Obstructive Lung Disease
Cp	Crossing Point
Ct	Treshold Cycle
CYP	Cytochrome p450
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
ddH ₂ O	Double Distilled Water
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü

EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FEV	Forced Expiratory Volume
FVC	Forced Vital Capacity
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
GST	Glutasyon S-Transferaz
GSTM1	Glutasyon S-Transferaz mü-1
GSTT1	Glutasyon S-Transferaz tetra-1
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribo Nükleik Asit
RNAaz	Ribonükleaz
Rpm	Revolutions per Minute
TBE	Tris Boric EDTA
TBS	Tris Buffer Saline
Tm	Melting Temperature
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurum

1. GİRİŞ

1.1. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH)

1.1.1. Tanım ve Epidemiyoloji

KOAH; zararlı gaz ve partiküllerin akciğerlerde oluşturduğu anormal iltihabi yanıtla ilişkili yavaş ilerleyen kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Bu hastalık tam olarak geri dönüşümü olmayan hava geçişinin kısıtlanması ile ayırt edilebilen, en sık görülen semptomları nefes darlığı, kronik öksürük ve balgam çıkarma olan önlenebilir ve tedavi edilebilir durumudur [1]. Bu hastalık çeşitli inhalasyon yolu ile alınan ve hava yollarına zarar verme olasılığı yüksek olan gaz, toz ve partiküllere maruz kalma, iç ve dış ortam hava kirliliği, hava yolu hiper reaktivitesi ve astım ile ilişkili olsa da, epidemiyolojisi için en önemli faktör sigaradır. Sigara içmenin KOAH gelişimi ile ilişkisi yaklaşık 50 yıldır bilinmesine rağmen, toplumlar arasındaki KOAH sıklığı sigara içme oranlarından bağımsız olarak büyük değişiklikler göstermektedir [1].

Eski veriler tüm sigara içicilerinin ancak % 10-15'inde KOAH oluştuğunu bildirirse de, yeni veriler bu oranın eski verilere göre yaklaşık 2 kat fazla olduğunu ve yaşla birlikte belirgin şekilde arttığını gösterdi [2]. 2010 yılında kronik solunum hastalıkları sebebi ile gerçekleşen 3.8 milyon ölümün yaklaşık % 76'sının (2.9 milyon) nedeni KOAH'tır [3].

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünya genelinde yaklaşık 80 milyon kişinin orta ve ağır KOAH'lı olduğu tahmin edilmekte ve her yıl 3 milyon civarında insan KOAH nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Bu verilerin çoğu gelişmiş ülkelere ait olmakla birlikte, KOAH'a bağlı ölümlerin % 90'ından fazlası orta ve düşük gelir düzeyli ülkelerde gerçekleşmektedir [4].

Hastalığın riskini azaltmak ve tedavisini etkili bir şekilde yürütmek için KOAH yönetim planı oluşturulmuş, ve bu planın kapsamında hastalığı değerlendirmek ve izlemek, risk faktörlerini azaltmak, stabil KOAH'ı yönetmek olup, alevlenmeler ve komorbiditeler hastalığın şiddetine katkıda bulunma riskini belirlemeyi öngörmüşlerdir. Bu hedeflerin ne ölçüde gerçekleştirileceği her bireye göre değişmekle beraber, bazı tedavilerin birden fazla alanda faydalar sağlayacağı tahmin edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca, hastalığın son aşamasından önce sakatlığın önemli olduğu durumlarda tanımlanma kapsamına alınmıştır. Bununla birlikte, genel

popülasyon veya sigara içenlerin spirometrik taramanın yararlarını belirtmek ve sigara tüketimini azaltılmasını sağlamak bu hastalığın temel bir önlemidir. Tütün dumanına, kişisel maruz kalmanın azaltılması, KOAH'ın başlamasını ve ilerlemesini önlemek için önemli hedeflerdir. Sigara içen ve sigara dumanının zararlı etkilerine karşı duyarlı olan kişilerde ise bu düşüş daha hızlı olacağından, ilerleyen yaşla birlikte klinik olarak belirgin KOAH önlenmesi için kaçınılmaz olacaktır [5].

Son yirmi yılda yapılan çalışmalar, bir toplum sağlığının % 15'inin biyolojik ve genetik faktörlere, %10'unun fiziksel çevreye, % 25'inin tedavi çalışmalarına ve % 50'sinin ekonomik ve sosyal çevreye bağlı olduğunu göstermektedir [6]. KOAH'ta, sigara içen ve sigara dumanına maruz kalanlar için zararlı etkileri azaltmak ancak iyi bir detoksifikasyon ile mümkündür. Bu detoksifikasyon, oksidanların neden olduğu metabolik yolların düzenlenmesi ile mümkün olacaktır.

1.1.2. Prevalans ve Mortalite

KOAH prevalansı ile ilgili yapılan çalışmalar sonrası tahminler, kullanılan metot, tanısal yöntem ve analitik yaklaşımlara göre şekillenmektedir [7]. Çünkü KOAH tanısı çabuk, spesifik, kesin olarak konulabilen bir hastalık olmadığı gibi birçok hastalık ile fazla benzerlik gösterir. KOAH kas ve kemik kaybı gibi başka etkiler ile giderek daha sistemik bir hastalık olarak kabul edilmektedir [8].

On iki ülkede yapılan BOLD çalışmasında, 40 yaş üstü olan kişilerde KOAH prevalansının, sabit oran ölçütü (post bronkodilatör FEV₁/FVC<%70) kullanıldığında % 25'lere ulaştığını, GOLD evre II+ ölçütü (pb FEV₁/FVC<%70 ve FEV₁< beklentinin % 80'i) kullanıldığında ise bu oranın % 10,1 olduğu (erkeklerde %11,8; kadınlarda % 8.5) gösterildi [9]. Birçok ülkede KOAH prevalansının yaş ile arttığı, en çok 60 yaş üstünde görüldüğü belirlenmiştir [10].

Bugün dünyadaki tüm ölümlerin % 66'sı kronik hastalıklar sebebiyle gerçekleşmektedir. Kalp-damar hastalıkları, diyabet, kronik solunum hastalıkları ve kanser tüm kronik hastalıkların % 80'ini oluşturmaktadır [3]. Küresel Hastalık Yüklü Çalışması verilerinde 1990'da altıncı ölüm sebebi olan KOAH'ın 2020 yılında dünya çapında üçüncü ölüm nedeni, en son tahminlere göre 2030 yılında dördüncü ölüm nedeni olacağı düşünülmektedir [11]. Her yıl yaklaşık 3 milyon civarında insan KOAH

nedeni ile hayatını kaybetmektedir ve bu rakam tüm ölümlerin % 5'ine karşılık gelmektedir [12].

Tablo 1. 1. TÜİK, Ölüm nedeni istatistikleri içerisinde solunum sistemi hastalıkları

Daimi ikametgaha göre seçilmiş ölüm nedenlerinin dağılımı, 2013 - 2018

	Solunum sistemi hastalıkları (2013)	Solunum sistemi hastalıkları (2014)	Solunum sistemi hastalıkları (2015)	Solunum sistemi hastalıkları (2016)	Solunum sistemi hastalıkları (2017)	Solunum sistemi hastalıkları (2018)
Türkiye - Turkey	35 331	40 593	43 820	49 296	50 224	52 568
Ankara	1 906	2 122	2 355	2 372	2 460	2 697
Antalya	617	737	858	1 017	1 111	1 065
Bursa	1 242	1 498	1 666	1 756	1 791	1 981
Eskişehir	483	552	573	604	671	657
Gaziantep	639	604	646	750	709	720
İstanbul	5 420	6 123	6 541	7 189	7 512	7 508
İzmir	2 109	2 528	2 784	3 423	3 479	3 979
Kocaeli	590	741	813	951	1 027	1 035
Konya	990	1 233	1 297	1 467	1 530	1 487
Manisa	876	1 156	1 105	1 267	1 123	1 403
Trabzon	490	584	570	592	635	672
Kırıkkale	182	171	176	182	153	186

TÜİK, Ölüm Nedeni İstatistikleri

1.1.3. Risk Faktörleri

KOAH, genetik yatkınlık, çevresel uyaranlara maruziyet arasında karşılıklı etkileşim sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır [13]. Sigara kullanımı, mesleki maruziyet, iç ortam hava kirliliği gibi etkiler ile zararlı gaz ve partiküllere uzun süre maruz kalmanın KOAH'a sebebiyet verdiği bilinmektedir. Yoksulluk, yeterli besin alınmaması ve hareketsizlikte diğer sebepler olarak sayılabilir [14].

1.1.3.1. Yaş ve Cinsiyet

KOAH prevalansından bahsedilirken yaş da önemli bir faktördür, yaş ilerledikçe prevalans da artmaktadır. Prevalans değeri 40-50 yaş grubunda % 5 civarında iken, 70 yaş üzerinde % 30'un üstünde seyretmektedir [9, 10]. Kadınların KOAH gelişimine karşı genetik olarak erkeklerden daha dayanıklı oldukları görüşünün aksine, sigara içme oranları eşitlendiğinde KOAH prevalansı ve KOAH'ın yol açtığı mortalite oranları bakımından kadın ile erkek arasında belirgin fark görülmemektedir [15]. Gelişmiş ülkelerde kadınların sigara içme oranında artma,

gelişmekte olan ülkelerde ise kadınların daha fazla biyokütle maruziyetinin KOAH'a sebep olduğu düşünülmektedir [16]. Sigara ve partikül maruziyeti en önemli KOAH etkenidir. ABD Halk Sağlığı Kurumu raporuna göre (2004), KOAH gelişimi %90 oranında sigara içimi kaynaklıdır. Fakat son çalışmalar, sigara içiminin sorumluluğu ile ilgili bu tahmini % 44-45 oranında azaldığını gösterdi [17, 18]. Pasif sigara dumanına maruz kalmanın da KOAH gelişmesi riskini % 50 gibi bir oranda arttırdığı yapılan son çalışmalarla gösterildiğinden özellikle küçük yaşlarda başlayarak pasif maruziyetin engellenmesi KOAH'la mücadelede önemli bir yere sahiptir [19]. Sigaraya başlama yaşı, sigara içme süresi ve günlük içilen sigara sayıları gibi faktörler de KOAH gelişiminde önemlidir [20]. Sigara içmek, sigara içenlerde artan KOAH riski gibi sağlık sorunlarıyla ilişkili olabilecek çeşitli genleri değiştirebilir [21].

Gebelikte sigaranın bebeğe verdiği zararı inceleyecek olursak fetüs doğrudan (sistemik yolla) sigara dumanının toksik etkilerine maruz kalır ve henüz gelişmekte olduğu için daha fazla duyarlıdır. Gelişmekte olan sistemler, aktif bölünen hücre sayısının fazlalığı, DNA hasarını onarma ve detoksifiye etme becerilerinin daha zayıf olması nedeniyle bebeklerde hasara daha yatkındır. Özellikle, gelişmekte olan solunum yolları ve immün fonksiyon üzerindeki etkisi astım ve alerjik hastalığa duyarlılık riskini artırabilir [22, 23].

1.1.3.2. Sigara ve Biyokütle

Dünyada yaklaşık 3 milyar kişi ısınmak ve beslenmek amacıyla biyokütle veya kömür kullanmaktadır [24]. Biyokütle, yaşayan ya da yakın zamanda yaşamış canlılardan elde edilen fosilleşmemiş tüm biyolojik malzemenin genel adıdır. Biyokütle yakıt veya kömürden kaynaklanan iç ortam hava kirliliğinin KOAH gelişimi için önemli bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir [25]. Hindistan gibi gelişmekte olan ülkelerde biyokütle yakıt (odun, bitki atıkları, tezek vb.) dumanına maruz kalmanın KOAH gelişimine % 30-50 katkı sağladığı bildirildi [26]. Hava kirliliğinin KOAH gelişimindeki rolü tam olarak bilinmemek ile beraber sigara dumanı ile karşılaştırınca bu riskin diğer risklere göre daha düşük olduğu görülmektedir [27]. Gelişmekte olan veya az gelişmiş ülkelerde yapılan araştırmalar ile KOAH sebebi ile oluşan ölümlerin %50'si biyokütle nedeni olup, % 75'i hiç sigara içmeyen ev hanımlarıdır [28]. ABD'de yapılan NHANES III isimli çalışmada KOAH nedenleri

araştırıldı, sonuçları doğrultusunda % 80 oranında sigara, % 20 oranında da işyeri maruziyeti sorumlu gösterildi [28].

1.1.3.3. Genetik Faktörler

Genetik temeli tam olarak çözülemese de, patogeneizde etkili olduğu düşünülen birçok genin varlığı sebebiyle, KOAH karmaşık bir genetik hastalık olarak düşünülebilir [29]. KOAH gibi karmaşık hastalıklar genellikle gen-çevre etkileşimi sonucu ortaya çıkmaktadır [30]. Sigara bağımlısı olan veya aynı çevresel şartlara sahip olan kişilerin bazılarında KOAH gelişmesi ve bazı ailelerde KOAH'ın sık görülmesi, patogeneizde genetik faktörlerin çok önemli bir yerinin olduğunu gösterir [31]. Yapılan bazı araştırmalarda, KOAH hastası bireylerin kardeşlerinde kontrol grubuna göre KOAH gelişme olasılığının 2-3 kat daha fazla olduğu belirlendi [32]. Risk grubu olarak görülmeyen genç yaştaki KOAH hastalarında akla ilk gelen epidemiyoloji genetik bozukluktur, sigara içilmesi durumunda hastalığın ortaya çıkma yaşı erkene çekilir [33].

1.1.4. Patogeneiz

KOAH, önleyici ve tedavi edilebilir bir hastalık olarak tanımlanır ve genellikle ilerleyici olan, kapsamlı ve kalıcı hava akışı sınırlaması ile karakterizedir. Solunum yollarının ve akciğerin zararlı parçacıklara ya da gazlara karşı inflamatuvar yanıtıdır [34].

Sigara dumanı veya biyokütle maruziyeti sonrası vücuda giren ksenobiyotik bileşiklerin çoğu öncelikle akciğer tarafından metabolize edilir, çünkü akciğer ksenobiyotik metabolizmanın en önde gelen bölgesidir. Akciğer göze çarpmayan 40'tan fazla farklı hücre tipine sahiptir ve bu farklı hücre tipleri farklı seviyelerde metabolik yeterliliğe sahiptir [35]. Akciğer dokusunda alveoler, makrofajlar ve bronşiyal epitel hücreleri 40 farklı hücre tipinin bir parçasıdır ve biyolojik fonksiyonları diğer hücrelerden farklıdır. Alveoler makrofajların iyi çalıştığı hücre, akciğer sağlığı için tütün dumanı parçacıklarına karşı en önemli savunma mekanizmasıdır [36, 37]. Akciğer epitelyumu, faz I ve faz II enzimlerinde (CYP ve GST'ler) tütün dumanı toksik bileşenleri ve metabolitleri giderilir [38, 39].

1.1.4.1. Oksidan Antioksidan Dengesizliği

KOAH patogenezinden biri oksidan / antioksidan dengesizliğidir. Kronik tütün içiminin KOAH gelişimi için önemli bir risk faktörü olduğu iyi bilinmektedir ve sigara dumanı tarafından üretilen reaktif türlerin detoksifikasyonundaki bir bozukluk, sigara içenleri hava akımı tıkanıklığına yatkın hale getirebilir [40].

KOAH'lı hastaların akciğerlerinde oksidan-antioksidan dengesizliği aşırı oksidatif strese neden olur. Oksidatif stresin artması proteaz anti-proteaz dengesinin bozulmasını tetikler ve bu durum sigara içicilerinde hava yolu inflamasyonunu şiddetlendirirken, aynı zamanda akciğer yapısal hücrelerinin (zellikle alveoler epitelyum ve endotel hücreleri) lmn (apoptozis) uyarır. Sigara kullanımı bırakılsa ve biyokütle maruziyeti giderilse bile akciğerde yapısal hücrelerin ölümü ve yenilenmesi arasındaki dengenin bozulması kendi kendini tetikler ve kısır döngüye girer [30].

1.2. Glutasyon-S-Transferaz (GST)

Glutasyon-S-Transferaz (GST)'lar sigara dumanında bulunan aromatik hidrokarbonları detoksifiye eden enzimlerdir [36, 41]. Sekiz farklı GST enzimi tanımlandı; alpha, kappa, mu, omega, pi, sigma, theta ve zeta. GST enzimleri elektrofilik substratları glutasyon ile konjuge hale getirir. Bu olay toksinlerin uzaklaştırma ve salgılama metabolizması olarak açıklanır [42].

1.2.1. M Sınıfı Glutasyon-S-Transferazlar

GSTM1 karaciğer ve akciğer hücrelerinde eksprese edilir. Akciğer kanserine sahip amfizemli bireylerde ve çeşitli ağır sigara içicisi olan kronik bronşitli hastalarda homozigot GSTM1 eksikliğinin yüksek olduğu bulundu [43]. GSTM1 delesyonu gerçekleşmiş bireylerde akciğer, mesane, kolon ve meme kanseri gelişme riskinin arttığı gösterildi [44].

GSTM1 genetik varyasyonu, akciğer kanseri de dhil olmak üzere görünüşte ilgisiz olmasına karşın bir dizi kanserle ilişkilendirildi. Amfizem, sıklıkla akciğer kanseriyle birlikte bulunan yaygın bir akciğer hastalığıdır. GSTM1, sigara dumanı bileşenlerinin detoksifikasyonu yoluyla bu tür hasarlara karşı koruma sağlayabilir. Bu

genin polimorfizmi, bu nedenle, sadece akciğer kanserine değil, diğer akciğer hastalığı formlarına da duyarlılığı etkileyebilir [45].

1.2.2. Teta Sınıfı Glutasyon-S-Transferazlar

GST Teta'nın GSTT1 ve GSTT2 olmak üzere 2 izoenzimi vardır ve % 55 aminoasit benzerlik gösterir. Gen delesyonu sonucu oluşan GSTT1 eksikliği sıklıkla gözlemlenir [46]. Beyaz ırkta % 20 olarak bulunan GSTT1 diğer ırklarda % 16-64 arasında değişmektedir. GSTT1'in ile kolon kanseri arasındaki bağlantıyı araştıran 8 çalışmanın 4'ünde kanser riskinin arttığı bulundu [47, 48]. GSTT1 delesyonunun GSTM1 ile bağlantısı birçok araştırmacı tarafından çalışıldı. Teorik olarak GSTT1 ve GSTM1 genlerini taşıyan bireyler kimyasal karsinojenlere karşı daha hassastır [49].

1.3. Literatür Özeti

Polimorfik yapıda olan ve çok sayıda maddeyi metabolize edebilme kabiliyetlerinden dolayı oldukça fazla ilgi çeken üç gen ailesinden biri olan Glutasyon S- Transferaz'dır. Bu enzimler detoksifikasyon enzimleri oldukları için bu enzimlerde moleküler genetik mekanizmalar enzimini kodlayan genin bulunmaması, genin regülatör kısımlarında olan mutasyonlardan dolayı genin kaybolması veya zarar görmesi, proteindeki önemli görev alan aminoasitlerin mutasyona uğramış olması ile enzimin inaktivasyonu, proteindeki önem derecesi düşük olan aminoasitlerin mutasyona uğramış olması ve bunun sonucunda enzimin aktivitesinin değişmesi gibi çeşitli mekanizmalar ile belirlenir [50]. Yapılan bir çalışmada GSTM1 ve GSTT1 polimorfizmlerinin hastalığa katkısını tahmin etmek için yapılan çalışma sonucuna göre, GSTM1 ve GSTT1 polimorfizminin KOAH duyarlılığını arttırdığı gösterildi. Etnik kökene göre yapılan alt grup analizi, aralarında yakın bir ilişki olduğunu gösterdi. GSTM1 delesyonu için çalışılan her etnik kökende KOAH duyarlılığı, GSTT1 delesyonu için ise sadece Asyalı KOAH hastaları ile ilişkisi olduğu belirlendi [51]. Tayvan popülasyonuna yönelik yapılan bir çalışmada, GSTT1 için null allel frekansı bulunmuş, hasta grubu ve kontrol grubu allel frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır [52].

Hu ve arkadaşlarının yaptığı etnik kökenlere göre yapılan bir başka analize göre GSTM1 delesyonunun, her etnik kökende KOAH riski vardır, ancak GSTT1 delesyonu sadece Asya popülasyonunda KOAH riski ile ilişkili olduğu gösterildi [53].

Shukla ve arkadaşları Kuzey Hindistan popülasyonunda 412 olguda (204 KOAH hastası ve 208 sağlıklı kontrol) GSTM1 boş polimorfizminin KOAH'a genetik yatkınlıkla yakın bir ilişkisi olduğunu buldu [54].

Teramoto ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre proteaz-antiproteaz dengesizliği ile ilgili genler ve oksidan-antioksidan dengesizliği, KOAH patolojisinin gelişmesine yol açabilir [55]. GSTM1 ve GSTT1 genleri de oksidan-antioksidan dengesizliği ile ilgili genlerdendir, bu genlerdeki delesyonlar işleyiş bozulmalarına sebep verebilir.

Tkáčová ve arkadaşlarına göre oksidatif stres, hem akciğer kanserinin hem de kronik obstrüktif akciğer hastalığının (KOAH) gelişimine katkıda bulunur. Antioksidatif enzimler bu tür hasarlara karşı koruma sağlayabilir. Glutasyon S-transferaz M1 ve T1 genlerinin genetik varyasyonlarından aktif alellerin akciğer kanseri olan hastalarda KOAH gelişimine karşı koruyucu bir etkisi olduğu gösterildi [56].

Castaldi ve arkadaşları tarafından PubMed'de indekslenen ve tüm popülasyonları kapsayan, KOAH ve genetik üzerine yapılan çalışmalarının sistematik bir incelemesi ve meta-analizi gerçekleştirilmiştir. Yeterli veriye sahip 27 genetik varyant belirlenmiş ancak 23'ünde sonuçlar genetik etkileri tespit etmede yetersiz bulmuşlardır. Kantitatif meta-analiz sonucu GSTM1, TGFB1, TNF ve SOD3'te KOAH duyarlılığı ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki belirlendi. Çeşitli duyarlılık analizlerinde, GSTM1 bulgusu sağlam kaldığını belirlemişlerdir [57].

Dimov ve arkadaşları Bulgar hastalar ve kontroller üzerinde yapılan vaka kontrol çalışmalarında GSTM1 ve GSTT1 gen polimorfizmlerinin KOAH riski ile ilişkisini inceledi. GSTM1 delesyon varlığı için önemli bir vaka-kontrol farkı gözlemlendi (0.67'ye karşı 0.36, $p = 0.003$), ancak GSTT1 için gözlenmedi (0.13'e karşı 0.07, $p = 0.364$). GSTM1 delesyonu ile ilişkili 3.60 kat artmış risk bulundu. Böylece, GSTM1'in kalıtsal yokluğunun KOAH ile ilişkili bir faktör olduğu gösterildi [58].

Hemimi ve arkadaşları sigara içenlerde GST polimorfizmi ile KOAH yatkınlığı ve şiddeti arasındaki ilişkiyi inceledi. Tüm denekler uzun yıllar sigara içmiş veya hala sigara içen kişilerdi. 140 KOAH hastası ve 140 kontrol üzerinde yapılan çalışmada, GSTM1 delesyonuna sahip sigara içenlerin ciddi tipte KOAH geliştirmeye daha

duyarlı olduğuna dair kanıt sunmaktadır. Bununla birlikte, GSTT1 delesyonunda anlamlı farklılık göstermemektedir [59].

Bugüne dek yapılan çalışmalarda KOAH'ın erkeklerde daha fazla görüldüğü çeşitli çalışmalarda dikkat çekti. Pilar Carrasco-Garrido ve arkadaşları tarafından İspanya'da KOAH hastalarında yapılan bir çalışmaya 11711 kişi alınmış ve % 75,6 oranında erkek hasta saptanmıştır [60].



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Materyalin Temini ve Hazırlanışı

Bu çalışmada Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu tarafından alınan etik kurul onayı doğrultusunda, Duatepe Polatlı Devlet Hastanesi Göğüs hastalıkları bölümünde rutin kontrolleri yapılan ve çalışma için uygun kriterleri taşıyan gönüllüler belirlendi. Gönüllülerden temin edilen kan numuneleri EDTA'lı laboratuvar tüplerine alındı. Toplanan numuneler, uygun saklama ve nakil koşulları gözetilerek ön hazırlık ve birkaç analizin yapılacağı Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Araştırma Laboratuvarı'na soğuk zincir ile nakledildi. Daha sonra numuneler yine soğuk zincir ile hızlı bir şekilde özel araç ile Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarlarına getirildi. Bu çalışmada 36 hasta ve 14 kontrol kullanıldı.

2.1.1.1. Biyolojik Numunelerin Hazırlanması

Duatepe Polatlı Devlet Hastanesi Göğüs hastalıkları bölümünden alınan ve Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'na getirilen EDTA'lı tüplerdeki tam kan numunelerinden önce RNA izolasyonu daha sonra cDNA sentezi yapıldı.

2.1.1.2. Kandan DNA İzolasyonu

Bu çalışma da kit kullanımı yöntemi ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Çalışmada cDNA sentezi için önce RNA izolasyonu daha sonra izole edilen RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi.

2.1.1.3. RNA izolasyonu

Kandan RNA izolasyonu için EcoPURE tam kandan RNA izolasyon kiti kullanıldı. Kan numunelerinden RNA izolasyonu için aşağıdaki prosedür uygulandı [62].

1. RNAaz içermeyen bir mikrosantrifüj tüpüne 100 µL kadar pıhtılaşmayan taze kan aktarıldı.

2. Her 100µl tam kan örneğine 400 Ecol EcoPURE Lizis / Binding Buffer eklendi.
3. Pipetleyerek iyice karıştırıldı ve daha sonra karışımın rengi kahverengimsi siyah olana kadar vortekslendi (yaklaşık 10 saniye).
4. Lizata 400 µl absolute mutlak (% 96-100) etanol eklendi ve 10 saniye boyunca vorteksleyerek iyice karıştırıldı.
5. Bir Toplama Tüpüne bir EcoPURE Kolonu yerleştirildi ve adım 3'ten EcoPURE Kolonlarına 700 µl örnek aktarıldı. Bir masa üstü mikrosantrifüjde oda sıcaklığında 30 saniye maksimum hızda santrifüjlendi. Lizat hacmine bağlı olarak, 4. Adımı gerektiği kadar tekrarlandı.
6. Akışı boşaltın ve EcoPURE Kolonuna 400 µl Ecol EcoPURE Yıkama Tamponu 1 eklendi. Bir masa üstü mikrosantrifüjde oda sıcaklığında 30 saniye maksimum hızda santrifüjlendi.
7. Akışı boşaltın ve EcoPURE Kolonuna 500 µl Ecol EcoPURE Yıkama Tamponu 2 eklendi. Bir masa üstü mikrosantrifüjde oda sıcaklığında 30 saniye maksimum hızda santrifüjlendi.
8. Kalan yıkama tamponunu tamamen çıkarmak için 200 µl flow EcoPURE Wash Buffer 2 ürününü EcoPURE Kolonuna eklendi ve 2 dakika boyunca maksimum hızda santrifüjlendi.
9. EcoPURE Kolonunu temiz bir RNaz içermeyen 1.5 mL mikrosantrifüj tüpünün üzerine yerleştirildi.
10. EcoPURE Kolon membranının merkezine 30-50 µl EcoPURE Elüsyon Tamponu eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
11. Bir masa üstü mikrosantrifüjde oda sıcaklığında 30 saniye maksimum hızda santrifüjlendi.

EcoPURE Kolonunu atın ve saflaştırılan RNA'yı kullanana kadar -20 °C'de (birkaç gün) veya -80 °C'de (uzun süreli depolama için) saklandı.

İzole edilen RNA, cDNA'ya çevrildi. İyi bir cDNA sentezi için yüksek saflıkta RNA ile çalışıldı. Elde edilen RNA'ların saflık dereceleri ve yoğunlukları Nano-drop cihazıyla kontrol edilip bir sonraki aşama olan cDNA sentezine geçildi.

Yeterli genomik DNA eldesi için minimum RNA miktarı da hesaplanmalı, bu hesaplama yapılırken solid moleküler materyalin PCR'da çoğalma indeksi tel iplikten çift iplikli yapıya geçeceği için yaklaşık 2 kat olacağı göz ardı edilmemelidir.

2.1.1.4. cDNA sentezi

İzole edilen RNA'dan cDNA sentezi WizScript™ cDNA Sentez Kiti (Yüksek Kapasite) prosedürüne göre yapıldı [63].

1. Sentez öncesi mikrotüp içinde karışım hazırlama basamağı. (2X RT)

Tablo 2. 1. WizScript™ cDNA sentez karışımı

Reagent	Volume	
	without RNase Inhibitor	with RNase Inhibitor
10X Reaction Buffer	2 µl	2 µl
20X dNTP mix	1 µl	1 µl
Random hexamer	2 µl	2 µl
WizScript™ RTase	1 µl	1 µl
RNase Inhibitor	-	0.5 µl
RNase free Water	4 µl	3.5 µl
Total	10 µl	10 µl

**Buz üzerinde çalışıldı.

2. Revers Transkripsiyon Karışımı Hazırlama

- Hazırlanan karışımdan 10 µL bir tüpe aktarıldı.
- Üzerine 10 µL RNA numunesi eklendi. RNA eklenmeden önce 2-3 kez pipetaj işlemi yapıldı.
- Düşük devirde, kısa süreli santrifüj ile hava kabarcıkları elemine edildi.
- RT (Revers Transkripsiyon) basamağına kadar bu karışımın bulunduğu tüp buz üzerinde bekletildi.

3. Revers Transkripsiyon

Tablo 2. 2. Uygulanan sıcaklık zaman grafiği

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperature (°C)	25	37	85	4
Time	10 min.	120 min.	5 min.	∞

*** Tablo 2.2.'de ki şartlarda PCR programı oluşturularak hazırlanan karışımlara uygulandı.

Elde edilen RNA ve cDNA'ların saflık dereceleri ve yoğunlukları Nano-drop cihazıyla kontrol edilip bir sonraki aşama olan Quantitative-PCR (qPCR) sürecine alındı. Ayrıca Quantitative-PCR (qPCR) metodunda kullanılmak üzere elde edilen ve ardından uygun yoğunluk ve saflık derecelerine sahip olduğu tespit edilen DNA örnekleri -20°C soğuk ortamda muhafaza edildi. GSTM1 ve GSTT1 için uygun primerler seçildi.

2.1.1.5. PCR için Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltilerin Hazırlanışı

- SYBR Green PCR Master Karışım (Power)
- EcoPURE tam kandan RNA izolasyon kiti
- WizScript™ cDNA Sentez Kiti (Yüksek Kapasite)
- XTBE
- Agaroz

Çözeltiler ve hazırlanışları;

1. Antijen Retrieval Çözeltilisinin Hazırlanışı (0,01 M, pH: 6.0): 2,101 g sitrik asit (A) 100 mL distile suda; 0,1 M 14,7 g sodyum sitrat (B) 500 mL distile suda çözüldü. 27 mL A solüsyonundan, 123 mL B solüsyonundan alınarak 1500 mL'ye distile su ile tamamlandı.
2. 0,005 M Tris Tamponunun Hazırlanışı: 60,55 g tris base, 85,20 g NaCl 500 mL distile suda çözülür. 370 mL 1 M HCl eklenerek pH: 7,6'ya getirilip 1 L'ye tamamlanır. (1 mL TBS 100 mL distile suyla dilüe edilerek kullanıldı.)
3. Antikor Yıkama Çözeltisi: % 0.05 Tween-20 içeren PBS tampon kullanıldı.
4. 6X Loading Dye: 10mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03 % bromofenol mavi, 0.03 % ksilen siyanol, 60 % gliserol, 60mM EDTA (0.5M pH8.0) çözeltileri ilave edildi.
5. Ethidium Bromide: ddH₂O da(Stok çözelti için) çözünmüş 10 mg/mL Ethidium bromide 1:10.000 dilüsyon ile çalışma (1µl her 10mL jel için)

6. 10X TBE: Tris Boric EDTA (0,5M pH7.5)-1/10 Dilüsyon ile çalışmada 1X olarak Agaroz Jel Elektrofözezi aşamasında kullanıldı.

2.1.1.6. Kullanılan Cihazlar

- ❖ MIC qPCR (Magnetic Induction Cycler)
- ❖ Thermal Cycler PCR (Techne-TCPLUS)
- ❖ Florometre (İnvitrogen- Qubit)
- ❖ Thermokarışırner (Tetra)
- ❖ Soğutmalı Santrifüj (Hettich-Rotina)
- ❖ Sitospın cihazı (Thermo- Cytospın 4)
- ❖ Floresan Ataçmanlı Araştırma Mikroskobu (Leica 5000B)
- ❖ Işık Mikroskobu (Zeiss- Primostar)
- ❖ Otomatik mikropipet seti (CAPP)
- ❖ Lamiar flow kabin (Ecco-Class II)
- ❖ Kit saklama dolabı (Efostar)
- ❖ Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Heidolph-MRHei)
- ❖ Vortex (Heidolph)
- ❖ Etüv (Binder-ED53)
- ❖ Ultra distile Su sistemi (Elga Purelab Optia)
- ❖ Otoklav (Hirayama HG-80)
- ❖ Buzdolabı (Beko-9621)
- ❖ Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (IKA C-Mag H58)
- ❖ Ocak (Arçelik021)
- ❖ -80 °C Buzdolabı (GFL6485)
- ❖ Mezür, beher, erlenmayer, balon joje (isolab)

- ❖ Multiwell plate (Roche)
- ❖ Pipet Tabancası (Eppendorf)

2.2. Yöntem

2.2.1. PCR Yöntemi

Bu çalışmada DNA kit ile izole edildi. Saflıkları ve konsantrasyonları nanodrop ile ölçülünerek uygun dilüsyonlara ayarlandı. Elde edilen genomik DNA, çalışmamızda pattern olarak kullanıldı ve analizi yapılacak hedef bölge için uygun primerler belirlenerek yine uygun konsantrasyonlarda PCR bileşeni olarak dahil oldu.

Yapılan analiz esasına dayalı bu bölgede oluşan erime eğrisi analizi grafiklerindeki piklerin şiddetinden yararlanılarak, elde edilen piklerin sinyalindeki kayıp durumları “delesyon” miktarı ile ilişkilendirildi. Kayıpsız piklerin tamamı delesyon olmadığı, belirli orandaki kayıplar bir miktar delesyon olduğu ve son olarak pikin en son eşik noktasının altında veya tamamen kaybolduğu durumlar ise genin delesyon nedeniyle tamamen yok olduğu şeklinde değerlendirildi. Bu durumun sebebinin aynı yaşam süreci içinde veya bir önceki jenerasyondan eksik aktarım olabileceği düşünüldü. Çift pikler ise özgül olmayan (non-spesifik) bağlanmaları işaret ettiği göz önüne alındı [51, 64].

2.2.1.1. Primerlerin Seçimi ve Kontrolünün Sağlanması

Çalışmamızda elimizdeki uygun yoğunluktaki cDNA örneklerimiz GSTM1 ve GSTT1 genine ait spesifik primer kullanılarak amplifiye edildi. Gen bölgesinde ki delesyon tespiti için kullanılacak primerlerin “blast” işlemleri NCBI uluslararası veri tabanı kullanılarak teyit edildi. Tm (Melting Temperature) değerleri yine “NCBI Tool” ları kullanılarak hesaplandı ayrıca ΔC_t değeri ile mukayese edildi ve kontrol amaçlı yapılan PCR “annealing” sıcaklık değerleri bu şekilde ayarlanarak PCR sistemi üzerinden uygulandı.

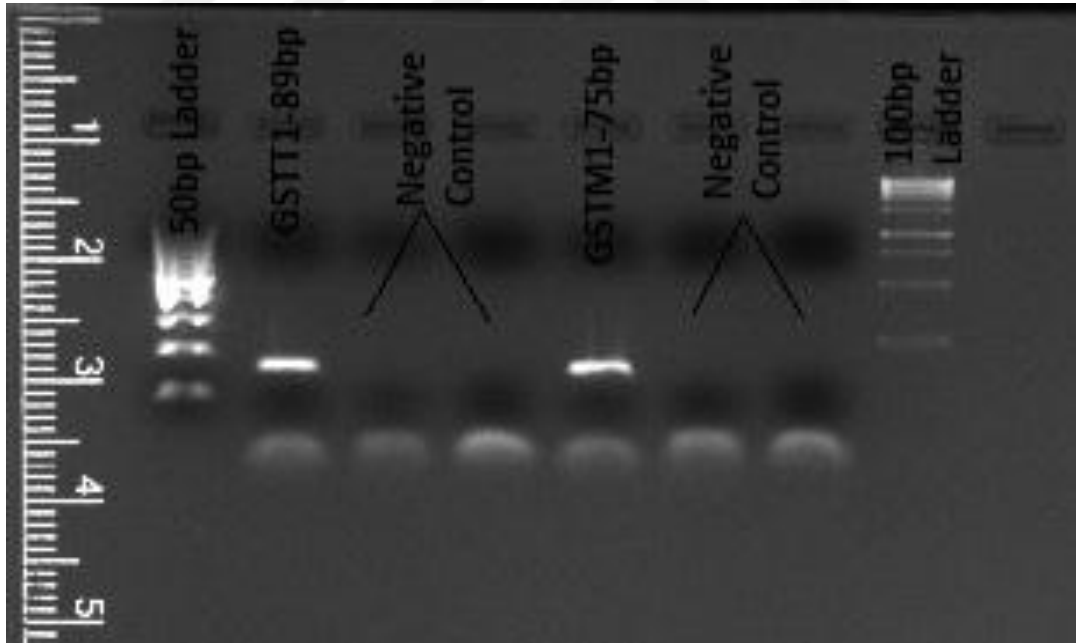
Ayrıca GST-T1 bölgesi için 89 baz çiftlik bölgeyi, GST-M1 bölgesi için ise 75 baz çiftlik bölgeyi çoğaltma durumunun söz konusu olduğu yine NCBI veri tabanında ki “human genome” kısmından tespit edildi.

Amplifikasyon için aşağıda verilen primerler kullanıldı [66].

Tablo 2. 3. Çalışmada kullanılan primerler

Primer adı	Primer Dizisi
GSTT1	5'-CAAGTCCCAGAGCACCTCACCTC-3' (forward)
GSTT1	5'-GTGTGCATCATTGTGGCTT-3' (reverse)
GSTM1	5'-TGCATTTCGTTTCATGTGACAGTATTCT-3' (forward)
GSTM1	5'-GAGAGGAGACCGGGCACTCA-3' (reverse)

Bu bilgiler doğrultusunda seçilen primerlerin kontrolü konvensiyonel PCR ve elektroforez işlemleri uygulanarak confirmasyonu sağlanmış oldu.



Şekil 2. 1. Çalışmamızda kullanılacak primerlerin elektroforez jel confirmasyon görüntüsü

2.2.1.2. PCR Koşulları

Çalışmamızda MIC qPCR (Magnetic Induction Cycler) cihazı kullanıldı. qPCR ön hazırlık aşamasında ki oranlar Tablo 2.4’de belirtildi. Tablo 2.5’de gösterildiği şartlarda çalışıldı.

Tablo 2.4. qPCR aşamasında kullanılan oranlar

Reaktif / Solüsyon	Hacim (µl)
SYBR Green PCR Master Karışım (Power)	10
Primer (Forward)	0,8
Primer (Reverse)	0,8
cDNA	2(Total cDNA 100ng-50ng/µl)
DNase/RNase-free water	6,4
Toplam hacim	20

Tablo 2.5. qPCR Çalışma şartları

Aşamalar	Sıcaklık & Süreler	Döngüler
Initial Denaturation (Ön Denatürasyon)	95°C, 5’	
Denaturation (Denatürasyon)	95°C, 10’	50 Döngü
Annealing (Yapışma)	58°C, 20’	
Extension (Sentez)	72°C, 20’	
Acquisition	95°C, 5’ 55°C, 1’ 95°C, Acquisition aşamasının devamı	
Final Extension (Final Sentez)	40°C, 10’	

2.2.1.3. Sonuçlanan Melting Curve'lerden Tm (Melting Temperature) seviyelerindeki qPCR değerlerinin tespit edilmesi

qPCR aşamasındaki aykırılıkları tespit etmek için, beklenen Tm değerlerinden daha önemli olarak ortaya çıkan Tm değerlerinin ortaya konulması için, % 1,5'lik agaroz jel hazırlandı. 2X 6 µl Loading Dye, 10 µl qPCR numunesine eklendi ve bu numunenin 8µl'lik kısmı kuyucuğa yüklendi. 1°C'den daha az veya daha fazla Tm değerine sahip olan numunelerde beklenen baz büyüklükleri görülmeyebilir. Bu durum, Primer dimerleri, DNA kontaminasyonu veya farklı dimerizasyon üretimi ile açıklanmaktadır.

Sonuç bilgilerinin güvenilirliğini artırması açısından, $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'den farklı Tm değerlerine sahip numuneler ile çalışmanın kalan kısmına devam edilmesi düşünülmeyen bu numunelerin çıkarılması beklenmektedir. Bu nedenle bu çalışma kapsamında en uygun numuneler kullanıldı.

2.2.1.4. Sonuç Bilgilerinin Kontrolünün Sağlanması: Agaroz Jel Elektroforezi

% 1,5'lik agaroz jel; 200 mL 1XTBE ve 3 g Agaroz kullanılarak hazırlandı. Jel karışımına 1 mg/mL Ethidium bromide eklendi. Hazırlanan jel kuyucuklara yüklenen ve kontrol amaçlı oluşturulan bu sisteme qPCR ürünlerinden, Loading Dye ile birlikte karışımdan 8 µl kadar her bir kuyucuğa yüklenerek, qPCR aşamasında ki amplifikasyonun doğruluğu sağlandı. Bu işlem elektroforez güç ünitesi için; 110 V ve ortalama 40 dakika süre ile gerçekleştirildi.

2.2.1.5. Primerlerin Etkinliği

Primerlerin amplifikasyon etkinliğinden emin olmak için primerler kullanılmadan önce test edilmelidir. Güvenilir sonuçların ortaya konması açısından bunun her test için yapılması oldukça önemlidir. Primerlerin hangi koşullar altında optimize çalıştığından ve etkinliğinin güvenilir olduğundan emin olmak gerekmektedir. Primer kalitesi ve optimize edilmesi, sonuç güvenilirliği açısından referans oluşturmaktadır.

En iyi dilüsyon oranının belirlenmesi açısından cDNA'nın 1/5'in katları şeklinde (1:5,1:25,1:125,1:625) 4 kez dilüsyon gerçekleştirilerek, dilüsyonsuz konsantrasyon oranı ile birlikte 5 farklı kontrol noktasının oluşturulması sağlandı. Bu

oranlar ile Tablo 6'da gösterilen primerler ile optimum oranlar belirlenerek tüm numuneler için uygun sonuçların alınacağı oranlar belirlendi ve çalışmaya bu oranlar ile devam edildi.

Threshold cycle (Ct) oranları ve dilüsyonların logaritması çizelgesi etkinlik oranları şu formül kullanılarak hesaplandı;

$$E = 10^{(-1/m)}$$

E: Primer etkisi

m: Ct-log(Dilüsyon) grafiğinin eğim oranı

2.2.1.6. qPCR Verilerinin ΔCt ve $\Delta\Delta Ct$ Analizi

Primer etkinlik oranlarına bağlı kalarak, referans bir gen üzerinde ΔCt ve $\Delta\Delta Ct$ değerleri hesaplandı.

Bu analiz yöntemi, analiz sonucu ortaya çıkan sonuçların değerlendirilmesinde ektedir. DNA panel deneyleri için; Ct oranlarının yönlendirilmesi ve arasında ki ilişki göz önünde bulundurularak aşağıdaki formül kullanılarak ΔCt değerleri hesaplandı;

$\Delta\Delta Ct$ değeri aşağıda ki formül kullanılarak gerçekleştirildi;

$$\Delta\Delta Ct = (E_{\text{target}}^{\Delta Ct(\text{hedef})} / E_{\text{ref}}^{\Delta Ct(\text{ref})})$$

$$\log_2(\Delta\Delta Ct)$$

E: Primer etkinliği

$$\Delta Ct(\text{hedef}): \text{Kontrol}_{(\text{Hedef})} - \text{Uygulama}_{(\text{Hedef})}$$

$$\Delta Ct(\text{ref}): \text{Kontrol}_{(\text{ref})} - \text{Uygulama}_{(\text{ref})}$$

$$\Delta Ct = \log_2 (E_{(\text{ref})}^{Ct_{(\text{ref})}} / E_{(\text{Hedef})}^{Ct_{(\text{Hedef})}})$$

2.2.1.7. qPCR testinin analizinin yapılması için verilerin ANOVA programıyla değerlendirilmesi

ANOVA analizi her qPCR testinin analizinin yapılması için verilerin önemini test etmek amacıyla kullanıldı. Verilerin alınması ve kontrol edilen Tm değerlerinin

tanımlanmasından sonra, verileri ve analiz edilmek istenen grupları içeren bir Excel (.xls) dosyası düzenlendi. Her bir ANOVA içerisine tanıtılmak üzere etiketlendi.

Bu çalışmanın analizinde, genel fonksiyon düzenlenmesi kullanıldı;

$$[P, ANOVATAB, STATS] = ANOVA1(X)$$

Grupların anlamlandırılmasındaki eşitliğin anlamlandırılmasını ki null allel hipotezi için P-seviyesi (P) raporlandırıldı. İki veya daha fazla veri grubunun karşılaştırılmasında tek yönlü olarak ANOVA1 programı kullanıldı. Çoklu test karşılaştırılmasında MATLAB yazılımında bulunan *multicompare* fonksiyonu kullanıldı.

Bu karşılaştırma gruplarında; hsd (*honestly significant difference*), lsd (*least significant difference*) seçenekleri ve sadece çoklu karşılaştırma sorunlarına karşı koruma sağlamayan, t-test kullanıldı.

2.2.1.8. DNA Panel Analizi

Çalışmada uygunluğu belirlenen KOAH gözlemlenen 36 hastanın ve 14 kontrolün kan dokularından ekstraksiyon ve purifikasyonu sağlanan numuneleri ile bu çalışma yapıldı. GSTM1 ve GSTT1 gen frekansı değerlendirilen numuneler, DNA izolasyonu öncesi herhangi bir gruptan alınmadı. Numuneler sadece takibe alınan hastaların diğer verileri doğrultusunda gruptan alınarak değerlendirilmeye alındı.

qPCR Verilerinin İstatistiksel Analizi yapılırken, genel olarak ANOVA test değerlendirmek suretiyle DNA numunelerindeki GSTM1 ve GSTT1'e ait log₂ (ΔCt) değeri doğrulandı.

$$[\Delta Ct = \text{Eff}^{(\text{reference Ct})} / \text{Eff}^{(\text{target Ct})}]$$

Tüm bu analizler, çalışmanın karşılaştırmalı olarak değerlendirmeye alındı. Numunelere ait parametreler ve genetik analiz sonuçları ile birlikte çalışmanın Bulgular bölümünde değerlendirildi.

2.3. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi amacıyla IBM SPSS Versiyon 25.0. (Armonk, NY: IBM Corp) istatistik paket programı kullanıldı. Hasta ve kontrol grubunda yer alan katılımcıların klinik ve demografik özelliklerini tanımlayan sayısal değişkenler ortalama \pm standart sapma/standart hata olarak ifade edildi. Kategorize edilebilen değişkenler betimleyici istatistiklerle hasta/kontrol sayısı (n) ve yüzde (%) olarak tanımlaması yapıldı.

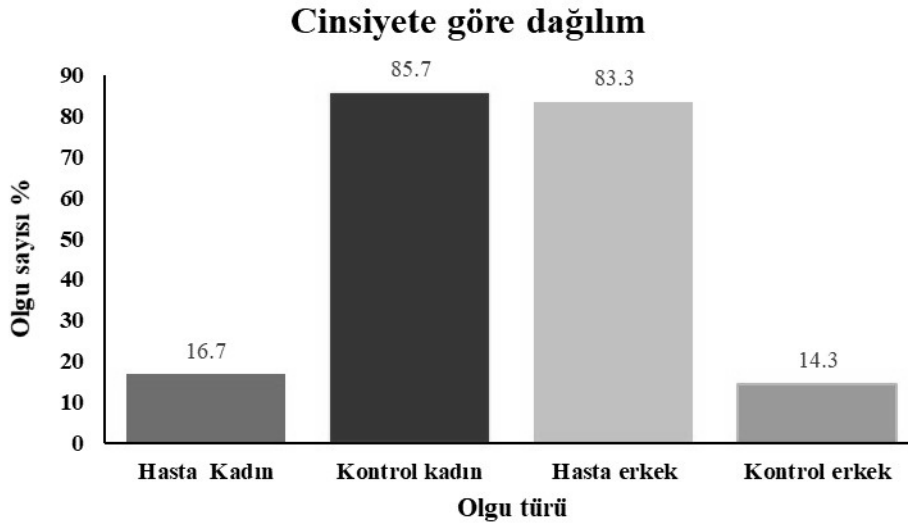
Kategorik değişkenler arasındaki ilişkilerin anlamlılık düzeylerinin belirlenmesi amacıyla Ki-Kare (Chi square) testi kullanıldı. Hasta ve kontrol grubundaki her bir katılımcının GSTM1 ve GSTT1 gen dozları hesaplandı, genotipler ve delesyonlar tablolarda ifade edildi. Allel frekanslarının Hardy-Weinberg (HW) eşitliğine göre uyumluluğu değerlendirildi. Popülasyonların ilgili lokuslar bakımından Hardy-Weinberg genetik dengesinde olup olmadıkları Ki-Kare (Chi square) testi ve Fisher's exact test ile kontrol edilip ve değerlendirildi. $p < 0.05$ düzeyindeki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Hastalara Ait Genel Bilgiler

Çalışmamızda 36 hasta ve 14 kontrol olmak üzere toplam 50 olgu kullanıldı. Hasta grubumuzun % 16,7'sini kadınlar, % 83,3'ünü erkekler oluşturdu. Kontrol grubu incelendiğinde ise % 85,7'sinin kadınlar, 14,3'ünün erkeklerden oluştuğu görüldü. Hasta grubunun yaş ortalaması $67,36 \pm 1,16$ iken, kontrol grubunun yaş ortalaması 45.64 ± 4.80 bulundu. Hasta grubunun % 22,2'si, kontrol grubunun ise % 50'si aktif sigara içicisiydi. Hasta grubunun %77,8'i, kontrol grubunun ise % 50'si sigara kullanmamaktaydı. Hem hasta, hem de kontrol grubunda yer alan katılımcıların tamamı hiç alkol kullanmadıklarını beyan etti.

Hasta ve kontrol grubunun cinsiyete göre dağılımı görsel olarak Şekil 3.1'de gösterildi.



Şekil 3. 1. Hasta ve kontrol grubunun cinsiyete göre dağılımı

Hasta ve kontrol grubunda yer alan katılımcıların demografik ve klinik özellikleri kategorize edilerek Tablo 3.1'de açıklandı.

Tablo 3. 1. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri (n, %)

Değişken	Kategori	Hasta	Kontrol	<i>p</i> -değeri
		Grubu n (%)	Grubu n (%)	
Yaş	<65	14 (%38,9)	12 (% 85,7)	0,008
	≥65	22 (%61,1)	2 (% 14,3)	
	Toplam	36 (%100)	14 (%100)	
Cinsiyet	Kadın	6 (%16,7)	12 (% 85,7)	0,00001
	Erkek	30 (%83,3)	2 (% 14,3)	
	Toplam	36 (%100)	14 (%100)	
Sigara Kullanım Durumu	Aktif içici	8 (%22,2)	7 (%50,0)	0,085
	Kullanmıyor	28 (%77,8)	7 (%50,0)	
	Toplam	36 (%100)	14 (%100)	
Alkol Kullanım Durumu	Kullanıyor	0 (%0)	0 (%0)	1,000
	Kullanmıyor	36 (%100)	14 (%100)	
	Toplam	36 (%100)	14 (%100)	

3.2. GSTM1 ve GSTT1 Polimorfizm Sonuçları

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan popülasyonların GSTM1 ve GSTT1 genotipleri belirlendi ve sonuçlar [Tablo 3.2](#)'de özetlendi.

Tablo 3. 2. Hasta ve kontrol grubunun GSTM1 ve GSTT1 genotipleri

Gen	Genotip	Hasta	Kontrol	Toplam
		Grubu	Grubu	
		n (%)	n (%)	n(%)
GSTM1*	0/0	-	1 (%7,14)	1 (%2,00)
	1/0	23 (%63,89)	2 (%14,29)	25 (%50,00)
	1/1	13 (%36,11)	11(%78,57)	24 (%48,00)
	Toplam	36 (%100)	14 (%100)	50 (%100)
GSTT1*	0/0	14 (%38,89)	2 (%14,29)	16 (%32,00)
	1/0	4 (%11,11)	2 (%14,29)	6 (%12,00)
	1/1	18 (%50,00)	10 (%71,42)	28 (%56,00)
	Toplam	36 (%100)	14 (%100)	50 (%100)

Tablo 3.2'ye göre;

GSTM1 için gen dozu oranı 0,80 ve üzeri olan delesyon görülmeyen 13 olgu (% 36,11) gözlemlendi. 0,80 - 0,32 arası gen dozu oranında belirli oranda gen kaybı söz konusu olan 23 olgu (% 63,89) bulundu. Gen dozu oranı 0,32 ve altında yani tamamen delesyona uğramış hasta bulunamadı. GSTM1 için kontrol grubumuzda delesyon gözlenmeyen 11 (% 78,57), belirli oranda delesyon gözlenen 2 (% 14,29) ve delesyon gözlenen 1 (% 7,14) olgu bulundu.

GSTT1 için gen dozu oranı 0,80 ve üzeri olan delesyon görülmeyen 18 hasta (% 50) gözlemlendi. 0,80 - 0,36 arası gen dozu oranında belirli oranda gen kaybı söz konusu olan 4 hasta (% 11,11) bulundu. Gen dozu oranı 0,36 ve altında yani neredeyse tamamen delesyona uğramış hatta kaybolmuş 14 hasta (% 38,89) gözlemlendi. GSTT1 için kontrol grubumuzda delesyon gözlenmeyen 28 (% 56), belirli oranda delesyon gözlenen 6 (% 12) ve delesyon gözlenen 16 (% 32) olgu bulundu.

Tablo 3. 3. Hasta grubunun gözlenen ve beklenen gen frekansları

Gen	Toplam (N)		1/1	1/0	0/0	χ^2	<i>p</i>
GSTM1	36	Gözlenen	0,3611	0,6389	-	6,0179	<0.05
		Beklenen	0,4632	0,4348	0,1020		
GSTT1	36	Gözlenen	0,5000	0,1111	0,3889	21,6224	<0.05
		Beklenen	0,3080	0,4928	0,1971		

Hasta grubunun gözlenen ve beklenen GSTM1 ve GSTT1 genotip frekansları karşılaştırıldı (Tablo 3.3).

GSTM1 bakımından hasta popülasyonunda gözlenen ve beklenen genotip frekansları arasındaki farklılık ($\chi^2 = 6,0179$) ile istatistik olarak önemli fark bulundu ($p < 0.05$).

GSTT1 bakımından hasta popülasyonunda gözlenen ve beklenen genotip frekansları arasındaki farklılık ($\chi^2 = 21,6224$) ile istatistik olarak önemli fark bulundu ($p < 0.05$).

Tablo 3. 4. Kontrol grubunun gözlenen ve beklenen gen frekansları

Gen	Toplam (N)		1/1	1/0	0/0	χ^2	<i>p</i>
GSTM1	14	Gözlenen	0,7857	0,1429	0,0714	2,4307	<0.05
		Beklenen	0,7347	0,2449	0,0204		
GSTT1	14	Gözlenen	0,7143	0,1429	0,1429	4,6394	<0.05
		Beklenen	0,6173	0,3367	0,0459		

Kontrol grubunun gözlenen ve beklenen GSTM1 ve GSTT1 genotip frekansları karşılaştırıldı (Tablo 3.4).

GSTM1 bakımından kontrol popülasyonunda gözlenen ve beklenen genotip frekansları arasındaki farklılık ($\chi^2 = 2,4307$) istatistik olarak önemli bulunmadı ($p > 0.05$).

GSTT1 bakımından kontrol popülasyonunda gözlenen ve beklenen genotip frekansları arasındaki farklılık ($\chi^2 = 4,6394$) ile istatistik olarak önemli bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 3. 5. Hasta grubun GSTM1 genotiplemesi

Hasta Grubu Örnekleri	GSTM1 gen dozu	GSTM1 deletion junction
GSTM1* 1/0		
37	0,71	(+)
50	0,70	(+)
47	0,62	(+)
31	0,58	(+)
16	0,56	(+)
38	0,55	(+)
28	0,53	(+)
30	0,48	(+)
36	0,48	(+)
17	0,43	(+)
39	0,43	(+)
18	0,42	(+)
46	0,41	(+)
33	0,41	(+)
29	0,40	(+)
34	0,38	(+)
32	0,37	(+)

43	0,37	(+)
41	0,37	(+)
35	0,37	(+)
42	0,37	(+)
40	0,36	(+)
48	0,32	(+)
Ort±SD	0,46±0,11	
95% CI	0,51-0,42	

GSTM1* 1/1		
22	1,19	(-)
26	1,14	(-)
25	1,14	(-)
15	1,05	(-)
20	1,03	(-)
19	1,01	(-)
23	0,98	(-)
45	0,96	(-)
21	0,94	(-)
44	0,93	(-)
49	0,85	(-)
27	0,82	(-)

24	0,81	(-)
Ort±SD	0,99±0,12	
95% CI	0,92-1,05	

SD: standart sapma

% 95 CI: % 95 Confidence Interval: Güven aralığı

Hasta grubun GSTM1 genotipleme ile ilgili gen dozu ve delesyon bilgileri Tablo 3.5'te açıklandı. GSTM1 için gen dozu 0,32'nin altında olan ve tamamen delesyona uğramış hasta bulunmadı (GSTM1* 0/0).

Tablo 3.6. Hasta grubun GSTT1 genotipleme

Hasta Grubu Örnekleri	GSTT1 gen dozu	GSTT1 deletion junction
GSTT1* 0/0		
25	0,35	(+)
23	0,32	(+)
40	0,24	(+)
21	0,19	(+)
43	0,16	(+)
42	0,11	(+)
48	0,10	(+)
41	0,10	(+)
44	0,09	(+)
22	0,09	(+)
32	0,09	(+)
36	0,08	(+)

37	0,06	(+)
39	0,06	(+)
Ort±SD	0,15±0,09	
95% CI	0,10-0,20	

GSTT1* 1/0		
26	0,79	(+)
47	0,76	(+)
46	0,68	(+)
17	0,56	(+)
Ort±SD	0,70±0,10	
95% CI	0,59-0,80	

GSTT1* 1/1		
15	1,00	(-)
30	1,00	(-)
31	1,00	(-)
34	0,98	(-)
19	0,94	(-)
29	0,93	(-)
33	0,92	(-)
50	0,91	(-)
38	0,91	(-)

35	0,91	(-)
27	0,91	(-)
24	0,90	(-)
16	0,87	(-)
20	0,86	(-)
45	0,83	(-)
28	0,83	(-)
18	0,82	(-)
49	0,82	(-)
Ort±SD	0,91±0,06	
95% CI	0,88-0,94	

SD: standart sapma

% 95 CI: % 95 Confidence Interval: Güven aralığı

Hasta grubun GSTT1 genotiplenmesi ile ilgili gen dozu ve delesyon bilgileri Tablo 3.6'da açıklandı.

Tablo 3. 7. Hasta grubunun cinsiyete göre GSTM1 genotiplenmesi

Hasta Grubu Örnekleri	GSTM1 gen dozu	GSTM1 deletion junction
GSTM1* 1/0		
Erkek		
37	0,71	(+)
50	0,70	(+)
31	0,58	(+)
16	0,56	(+)

38	0,55	(+)
28	0,53	(+)
30	0,48	(+)
36	0,48	(+)
17	0,43	(+)
39	0,43	(+)
18	0,42	(+)
46	0,41	(+)
33	0,41	(+)
29	0,40	(+)
34	0,38	(+)
32	0,37	(+)
43	0,37	(+)
35	0,37	(+)
48	0,32	(+)
Ort±SD	0,47±0,11	
95% CI	0,42-0,52	

Kadın		
47	0,62	(+)
41	0,37	(+)
42	0,37	(+)
40	0,36	(+)

Ort±SD	0,43±0,13
95% CI	0,30-0,56

GSTM1* 1/1		
Erkek		
26	1,14	(-)
25	1,14	(-)
15	1,05	(-)
20	1,03	(-)
19	1,01	(-)
23	0,98	(-)
45	0,96	(-)
21	0,94	(-)
44	0,93	(-)
27	0,82	(-)
24	0,81	(-)
Ort±SD	0,98±0,11	
95% CI	0,92-1,05	

Kadın		
22	1,19	(-)
49	0,85	(-)

Ort±SD	1,02±0,24
95% CI	0,69-1,35

SD: standart sapma

% 95 CI: % 95 Confidence Interval: Güven aralığı

Hasta grubun cinsiyete göre GSTM1 genotiplenmesi ile ilgili gen dozu ve delesyon bilgileri Tablo 3.7'de açıklandı.

Tablo 3. 8. Hasta grubunun cinsiyete göre GSTT1 genotiplenmesi

Hasta Grubu Örnekleri	GSTT1 gen dozu	GSTT1 deletion junction
GSTT1* 0/0		
Erkek		
25	0,35	(+)
23	0,32	(+)
21	0,19	(+)
43	0,16	(+)
48	0,10	(+)
44	0,09	(+)
32	0,09	(+)
36	0,08	(+)
37	0,06	(+)
39	0,06	(+)
Ort±SD	0,15±0,11	
95% CI	0,09-0,22	

Kadın		
40	0,24	(+)
42	0,11	(+)
41	0,10	(+)
22	0,09	(+)
Ort±SD	0,14±0,07	
95% CI	0,07-0,20	

GSTT1* 1/0		
Erkek		
26	0,79	(+)
46	0,68	(+)
17	0,56	(+)
Ort±SD	0,68±0,12	
95% CI	0,54-0,81	

Kadın		
47	0,76	(+)
Ort±SD	-	
95% CI	-	

GSTT1* 1/1		
Erkek		

15	1,00	(-)
30	1,00	(-)
31	1,00	(-)
34	0,98	(-)
19	0,94	(-)
29	0,93	(-)
33	0,92	(-)
50	0,91	(-)
38	0,91	(-)
35	0,91	(-)
27	0,91	(-)
24	0,90	(-)
16	0,87	(-)
20	0,86	(-)
45	0,83	(-)
28	0,83	(-)
18	0,82	(-)
Ort±SD	0,91±0,06	
95% CI	0,89-0,94	

Kadın		
49	0,82	(-)
Ort±SD	-	

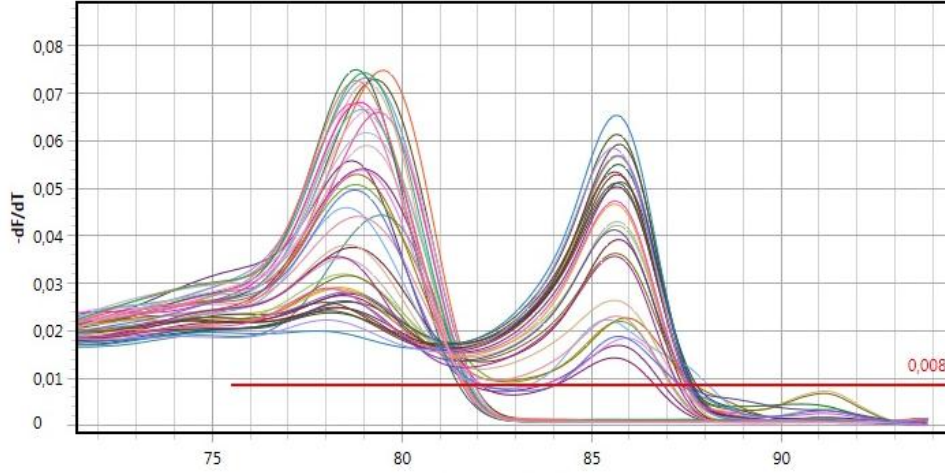
95% CI

-

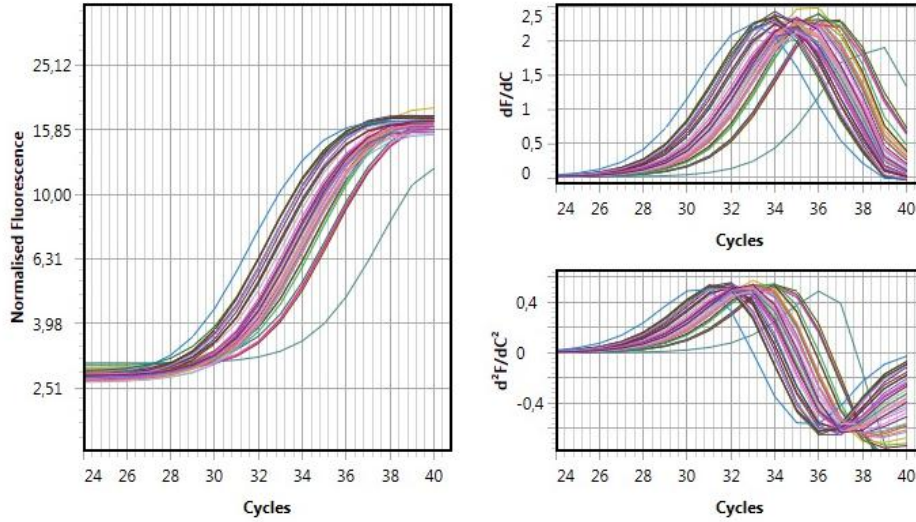
SD: standart sapma

% 95 CI: % 95 Confidence Interval: Güven aralığı

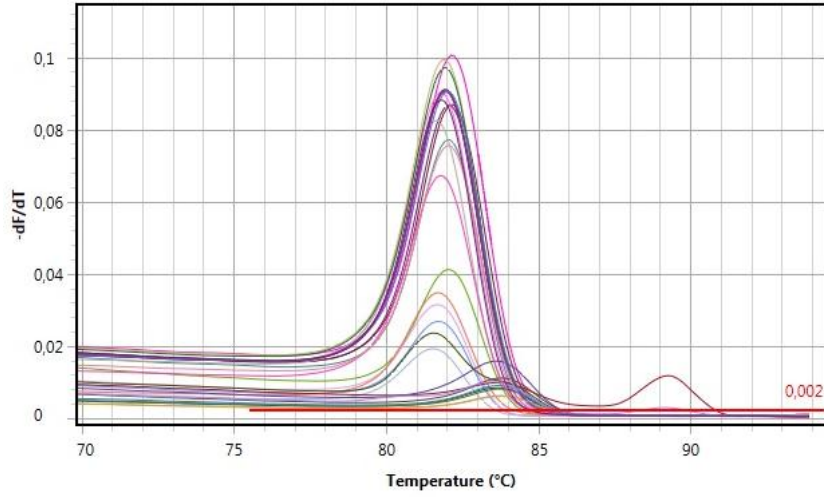
Hasta grubun cinsiyete göre GSTT1 genotiplemesi ile ilgili gen dozu ve delesyon bilgileri Tablo 3.8'de açıklandı.



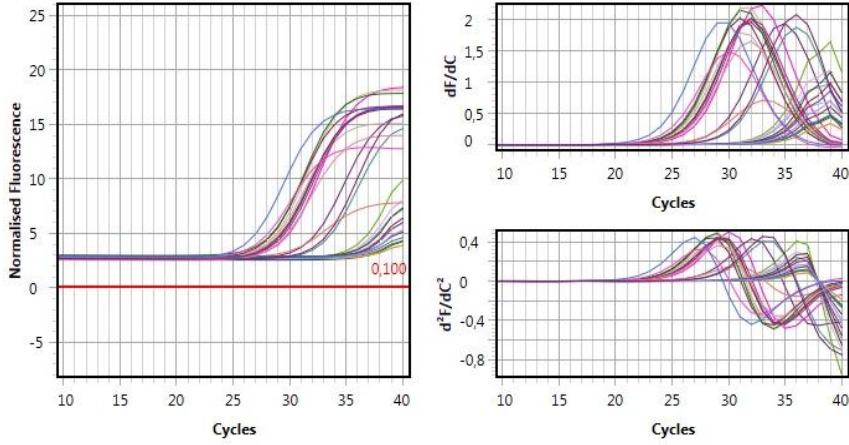
Şekil 3.2. KOAH hastalarında GSTM1'e ait analiz sonrası Melting Curve grafiklerinin genel görüntüsü



Şekil 3.3. GSTM1 için döngüye bağlı olarak değerlendirme sonrası normalize edilmiş kantitatif floresan değer grafikleri



Şekil 3. 4. KOAH hastalarında GSTT1'e ait analiz sonrası Melting Curve grafiklerinin genel görüntüsü



Şekil 3. 5. GSTT1 için döngülere bağlı olarak değerlendirme sonrası normalize edilen kantitatif floresan değer grafikleri

Yapılan analiz esasına dayalı bu bölgede oluşan erime eğrisi analizi grafiklerindeki piklerin şiddetinden yararlanılarak, elde edilen piklerin sinyalindeki kayıp durumları “delesyon” miktarı ile ilişkilendirildi. Kayıpsız piklerin tamamı delesyon olmadığı, belirli orandaki kayıplar bir miktar delesyon olduğu ve son olarak pikin en son eşik noktasının altında veya tamamen kaybolduğu durumlar ise genin delesyon nedeniyle tamamen yok olduğu şeklinde değerlendirildi. Bu durumun sebebinin aynı yaşam süreci içinde veya bir önceki jenerasyondan eksik aktarım olabileceği düşünülebilir. Çift pikler ise özgül olmayan (non-spesifik) bağlanmaları işaret etmektedir [51].

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

KOAH akciğeri zayıflatan bir hastalıktır zamanla kötüleşir ve günlük aktiviteleri zorlaştırır [51, 52]. Günümüzde KOAH teşhisi yapılırken, özellikle hastalığın ilk zamanlarında bronşit ile karıştırılabilir. Bu gibi durumları önlemek amacıyla teşhis için bazı önemli biyobelirteçleri tanımlamak acil bir ihtiyaçtır ve terapötik stratejilere rehberlik edecektir [53].

KOAH'ta prognostik öneme sahip parametreler beden kitle indeksi, alevlenme sıklığı, komobilite, ileri yaş, yaşam kalitesi vb. durumlar etkilidir. Tedavinin yeterliliği, tedavi etkilerinin, varsa yan etkilerinin belirlenmesi, ek hastalıkların yeterli tedavi edilip edilmediği, koruyucu önlemlerin alınıp alınmadığı gibi durumlarda incelenmelidir. Bu amaçla yapılan etiyolojik faktörlerinde göz önüne alınması gerekir. Bu faktörlerden biride sigara kullanımınıdır. Sigara içiminin kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) için en önemli risk faktörü olduğu genel olarak kabul edilmektedir. Sigara kullanımının yaygınlaşması ile son yıllarda KOAH hasta sayısında artış gözlemlenmiştir. Küresel Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı Girişimi (GOLD) yönergelerine göre, sigara içenlerin % 50 'sinde KOAH gelişir [61]. Bu çalışmada ise sigara kullanan kişilerin % 22,2 olduğu belirlendi (Tablo 3.1). Bu kişilerde hastalığın gelişmesinde sigaranın da KOAH ile ilişkili ciddi solunum fonksiyon bozukluğu geliştirdiği düşünülebilir.

Silverman ve arkadaşları yaptıkları çalışmada erkeklerde KOAH prevalans oranlarını, tarihsel olarak daha yüksek sigara içme oranlarına bağlamışlardır Bununla birlikte, son birkaç on yılda kadınlarda artan sigara içme oranlarını, kadınlarda giderek artan KOAH oranları ile ilişkilendirmiş ve çalışmanın sonuçları kadınların şiddetli KOAH gelişimine daha duyarlı olabileceğini gösterdi [62].

Hu ve arkadaşları tarafından genetik kökenlere göre yapılan bir başka analize göre GSTM1 delesyonunu, her genetik kökende KOAH riski olduğunu ancak GSTT1 delesyonunun Asya popülasyonunda KOAH riski ile daha güçlü ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir [53]. Çalışmamızda kullanılan olgular Türk popülasyonuna aittir. GSTM1'deki belirli oranda delesyon sonuçları ile Türk popülasyonu KOAH riski ile ilişkili arasında bir korelasyon bulunmuş ve bulgular önceki çalışmanın sonuçlarını desteklemiştir. Çalışmada genetik kökenler farklı olsa da, hastalığın farklı popülasyonlarda da görülebileceği ve bu hastalığın risk faktörlerinin belirlenmesinde

genlerdeki varyant değişikliklerinin belirlenmesi için daha detaylı çalışmaların yapılmasının önemli olduğunu göstermektedir.

Zuntar ve arkadaşları Hırvat popülasyonunda yaptıkları çalışmada, KOAH hastaları içerisinde, GSTM1 delesyonu (null-GSTM) olanların oranını % 50-55 aralığında tespit etmiş; buna karşılık GSTT1 delesyonu olanların oranı % 20 civarında belirlemişlerdir [63]. Çalışmamızda hasta ve kontrol gruplarımızın toplam değerlendirmesi sonucuna göre, GSTM1’de delesyon gözlenmeyenlerin oranının GSTT1’de delesyon gözlenmeyenlerin oranından düşük olduğunu gözlemledik. Bu çalışma kapsamında GSTM1 de delesyon gözlemlenmezken, GSTT1 delesyonu % 38,89 olarak belirlenmiştir (Tablo 3.2). Bu bulgular olgu sayıları ile ilişkili olabileceği gibi, GSTT1’in etnik gruplar arasında varyant farklılaştığını göstermektedir. Bu farklılaşma DNA zincirindeki tek bir baz çiftinden kaynaklanabileceği gibi, binlerce baz çiftini de içeriyor olabilir.

Cheng ve arkadaşları GSTM1'in, polimorfik durumunun, yani genomdaki eksikliğinin amfizeme ve bu yolla KOAH'a yakalanma oranlarında anlamlı bir artışa sebep olduğunu bildirmişlerdir [64]. Mısırlılar üzerine yapılan diğer bir çalışmada, GSTM1 delesyonunun KOAH'lı hastalarda % 53 civarındayken, kontrol grubunda yaklaşık % 27 olduğu tespit edilmiştir. [65]. Hindistan popülasyonu üzerinde yapılan geniş ölçekli araştırmada GSTM1 null polimorfizmi sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında KOAH'lı hastalarda, % 60 oranında, anlamlı olarak yüksek bulunmuştur [66]. Çalışmamızda bu oranlar KOAH'lı hastalarda GSTM1 % 63,89 iken kontrol grubumuzda % 7.4 seviyelerinde bulunmuştur.

Kronik obstrüktif akciğer hastalığının (KOAH) gelişimine genetik yatkınlık, enzimlerin aktivitelerindeki varyasyona bağlı olabilir [67]. GSTM1 ve GSTT1 genleri, elektrofil bileşiklerinin glutasyon ile konjugasyonunu katalize eden Glutasyon-S-Transferaz ailesinin enzimlerini kodlar ve bunların atılmasına yardımcı olurlar. Her iki gen de polimorfiktir ve enzim aktivitesi eksikliği ile ilişkili kalıtsal bir silinme vardır [68].

Bu çalışmada ilk olarak GSTM1 ve GSTT1 gen polimorfizimleri 36 KOAH'lı hasta ve 14 kontrolde qPCR metoduyla belirlendi. GSTM1 ve GSTT1 gen polimorfizimlerinin KOAH hastalığındaki önemini tespit etmek amacı ile çalışıldı. GSTM1 ve GSTT1 gen polimorfizimlerinin risk faktörü olabilirliği açısından

istatistiksel olarak değerlendirildi. qPCR sonuçlarımıza göre GSTM1 kısmi ve GSTT1'de hem kısmi hem de tamamen oluşan delesyonun (Tablo 3.2) KOAH oluşumuna katkı sağladığını dşunlebiliriz.

GSTM1 için delesyon gözlenmeyen 13 hasta (% 36,11), belirli oranda gen kaybı söz konusu olan 23 olgu (% 63,89) bulundu. Neredeyse tamamen delesyona uğramış hatta kaybolmuş olgu gözlenmedi. GSTM1 için kontrol grubumuzda delesyon gözlenmeyen 11 (% 78,57), belirli oranda delesyon gözlenen 2 (% 14,29) ve delesyon gözlenen 1 (% 7,14) olgu bulundu (Tablo 3.2).

GSTT1 için delesyon görülmeyen olgu 18 (% 50), belirli oranda gen kaybı söz konusu olan olgu 4 (% 11,11) ve neredeyse tamamen delesyona uğramış hatta kaybolmuş olgu 14(% 38,89) olarak belirlendi. GSTT1 için kontrol grubumuzda delesyon gözlenmeyen 28 (% 56), belirli oranda delesyon gözlenen 6 (% 12) ve delesyon gözlenen 16 (% 32) olgu bulundu (Tablo 3.2).

Bu hastalıkla mücadele etmek için birçok araştırma yapılmasına rağmen, antioksidan metabolizmasının KOAH vakalarının sıklığı ve hastalığın seyrinde toplam GST aktivite ve ifadesi [69, 70] ile GST izozimlerinin polimorfik profillerinin rolleri ve ayrıca, bunların biyobelirteç olarak kullanımı, farklı popülasyonlarda çalışılan önemli konulardan biri olmuştur [71, 72, 73]. Teramoto ve arkadaşları yaptığı çalışmada proteaz-antiproteaz dengesizliği ile ilgili genler ve oksidan-antioksidan dengesizliği, KOAH patolojisinin gelişmesine yol açabildiğini rapor etmişlerdir [54]. GSTM1 ve GSTT1 genleri de oksidan-antioksidan dengesizliği ile ilgili genlerdendir, bu genlerdeki delesyonlar işleyiş bozulmalarına sebep verebilir. Bu dengesizliği gidermek hastalıkla ilişkili ölüm oranını azaltmaya yardım edebilecektir.

Öneriler

GSTT1 polimorfizmleri ile Türk toplumunda KOAH gelişimi arasında bir ilişki bulunmuştur. Türk toplumunda Ankara bölgesine ait yapılan bu konuda yapılan çalışmada sonuçlarımızın karşılaştırılabileceği daha geniş ölçekli çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu sayede Türk toplumunda elde edilebilecek sonuçlar diğer toplumlarla karşılaştırılarak KOAH ve GSTT1 geni arasındaki ilişki daha net bir şekilde ortaya koyulabilecek ve hastalıkla ilişkili genetik etkenlerin aydınlatılmasına katkı sağlanacaktır. Hastalığın genetik yönünün aydınlatılması ise risk profili dikkate alınarak erken teşhis sağlanması, daha etkin ve kişiye özel tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi gibi uzun vadeli hedeflerin gerçekleştirilmesine olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] www.goldcopd.com (Erişim tarihi: 18.03.2020)
- [2] Gunen, H., Hacievliyagil, S.S., Yetkin, O., Gulbas, G., Mutlu, L.C., Pehlivan, E. Prevalence of COPD: first epidemiological study of a large region in Turkey. Eur J Intern Med. 19:499-504, 2008 [[CrossRef](#)]
- [3] Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet. 380:2095-128, 2012 [[CrossRef](#)]
- [4] <http://www.who.int/respiratory/copd/burden/en/index.html> (Erişim tarihi: 19.04.2020)
- [5] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease: Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (Güncelleme 2016). <https://goldcopd.org/gold-reports/> (Erişim tarihi: 16.04.2020)
- [6] McGinnis, J.M., Williams-Russo, P., Knickman, J.R. The case for more active policy attention to health promotion. Health Affairs. 21:78-93, 2012 [[CrossRef](#)]
- [7] Türk Toraks Derneği, Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı Tanı ve Tedavi Uzlaşı Raporu. Turk Thorac J. 11:13-15, 2010 <http://www.toraks.org.tr/> (Erişim tarihi: 16.04.2020)

- [8] Van Eeden, S.F., Yeung, A., Quinlan, K., Hogg, J.C. Systemic response to ambient particulate matter: relevance to chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac. Soc.* 2: 61–67, 2005 [[CrossRef](#)]
- [9] Buist, A.S., McBurnia, M.A., Vollmer, W.M., et al. BOLD Collaborative Research Group. International variation in the prevalence of COPD (The BOLD Study): A population-based prevalence study. *Lancet.* 370:741-50, 2007 [[CrossRef](#)]
- [10] Menezes, A.M.B., Perez-Padilla, R., Jardim, J.B., Muiño, A., Lopez, M.V., Valdivia, G., et al. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet.* 366(9500):1875-81, 2005 [[CrossRef](#)]
- [11] Mathers, C.D., Loncar, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PloSmed.* 3(11):e442, 2006 [[CrossRef](#)]
- [12] www.tusak.saglik.gov.tr (Erişim tarihi: 19.02.2020)
- [13] Hooper, R., Burney, P., Vollmer, W.M., et al. Risk factors for COPD spirometrically defined from the lower limit of normal in the BOLD Project. *a. Eur Respir J.* 39:1343-53, 2012 [[CrossRef](#)]
- [14] Fabbri, L.M., Luppi, F., Beghe, B., Rabe, K.F. Complex chronic comorbidities of COPD. *Eur Respir J.* 31:204-12 2008 [[CrossRef](#)]
- [15] Petty, T.L. Equality for women is not fair. *Respir Care.* 47:1148-1149, 2002
- [16] Ulubay, G., Yıldız, Ö. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığında Risk Faktörleri. *Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı.* 2013;40-41.

- [17] Soriano, J.B., Rodriguez-Roisin, R. Chronic obstructive pulmonary disease overview. Epidemiology, risk factors and clinical presentation. Proc Am Thorac Soc. 8:363-7, 2011 [[CrossRef](#)]
- [18] Lindberg, A., Bjerg-Backlund, A., Ronmark, E, et al. Prevalence and underdiagnosis of COPD by disease severity and the attributable fraction of smoking: report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies. Respir Med 100:264-72, 2006 [[CrossRef](#)]
- [19] Yin, P., Jiang, C.Q., Cheng, K.K., Lam, T.H., Miller, M.R., Zhang, W.S., Thomas, G.N., Adab, P. Passive smoking exposure and risk of COPD among adults in China: the Guangzhou Biobank Cohort Study. Lancet. 370:751-757, 2007 [[CrossRef](#)]
- [20] Burrows, B., Knudson, R.J., Cline, M.G., Lebowitz, M.D. Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function. Am Rev Respir Dis. 115:195-205, 1997 [[CrossRef](#)]
- [21] Besingi, W., Johansson, A. Smoke-related DNA methylation changes in the etiology of human disease, Hum. Mol. Genet. 23 (9):2290–2297, 2014 [[CrossRef](#)]
- [22] Gilliland, F.D., Berhane, K., McConnell, R., et al. Maternal smoking during pregnancy, environmental tobacco smoke exposure and childhood lung function. Thorax. 55:271–276, 2000 [[CrossRef](#)]
- [23] Aycicek A, Erel O, Kocyigit A. Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. Eur J Pediatr. 164:775–778, 2005 [[CrossRef](#)]

- [24] Salvi, S.S., Barnes, P.J. Chronic obstructive pulmonary disease in non- smokers. The Lancet. 374 (9691):733-43, 2009 [[CrossRef](#)]
- [25] Lopez, A.D., Mathers, C.D., Ezatti, M. Global burden of disease and risk factors. Washington, DC: World Bank, 2006. <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/7039> (Erişim tarihi: 11.04.2020)
- [26] Regional COPD Working Group. COPD prevalence in 12-Asia-Pacific countries and regions: projections based on the COPD prevalence estimation model. Respirology. 8:192-8, 2003 [[CrossRef](#)]
- [27] Grigg J. Particulate matter exposure in children: relevance to chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc. 6:564-69, 2009 [[CrossRef](#)]
- [28] Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, Ford ES, Redd SC. Chronic Obstructive Pulmonary Disease Surveillance – United States, 1971-2000. MMWR surveillance Summaries. 51:1-16, 2002
- [29] Erkoç, M., Bereketoğlu, C., Alptekin, D. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığında (KOA) Genetik Risk Faktörleri. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 19(3):168-179, 2010
- [30] Kocabaş, A., Atış, S., Çöplü, L., Erdinç, E., Ergan, B., Gürgün, A. et al. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOA) Koruma, Tanı ve Tedavi Raporu. Turk Thorac J 15(2): 1-11, 2004
- [31] Joos, L., Paréa, P.D, Sandfordb, A. Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. Swiss Med Wkly, 132:27- 37, 2002 [[CrossRef](#)]
- [32] Silverman, E.K. Genetic Epidemiology of COPD. Chest, 121;1S-6S, 2002

- [33] Molfino, N.A. Genetics of COPD. *Chest*. 125:1929-1940, 2004
- [34] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, (2013), p.1. Available at <https://goldcopd.org/> (Erişim tarihi: 19.02.2020).
- [35] Ding, X., Kaminsky, L.S. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 43: 149-73, 2003 [\[CrossRef\]](#)
- [36] Hukkanen, J., Pelkonen, O., Hakkola, J., Raunio, H. Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Crit Rev Toxicol*. 32: 391- 411, 2002 [\[CrossRef\]](#)
- [37] Drath, D.B., Karnovsky, M.L., Huber, G.L. Tobacco smoke. Effects on pulmonary host defense. *Inflammation*.3: 281-8,1979 [\[CrossRef\]](#)
- [38] Crawford, E.L., Khuder, S.A., Durham S.J., Frampton, M., Utell, M., Thilly, W.G. et al. Normal bronchial epithelial cell expression of glutathione transferase P1, glutathione transferase M3, and glutathione peroxidase is low in subjects with bronchogenic carcinoma. *Cancer Res*. 2000, 60: 1609-18.
- [39] Han, W., Pentecost, B.T., Pietropaolo, R.L., Fasco, M.J., Spivack, S.D. Estrogen receptor alpha increases basal and cigarette smoke extract-induced expression of CYP1A1 and CYP1B1, but not GSTP1, in normal human bronchial epithelial cells. *Mol Carcinog*. 44: 202-11, 2005 [\[CrossRef\]](#)

- [40] Lakhdar, R., Denden, S., Knani, J., et al, Relationship between glutathione S-transferase P1 polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease in a Tunisian population, *Genet. Mol. Res.* 2: 897–907, 2010 [[CrossRef](#)]
- [41] Needham, M., Stockley, R.A. Alpha 1-antitrypsin deficiency.3: Clinical manifestations and natural history. *Thorax* 59:441-445, 2004 [[CrossRef](#)]
- [42] Wilce, M.C., Parker, M.W. Structure and function of Glutathione S Transferases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1205 (1): 1–18, 1994 [[CrossRef](#)]
- [43] Harrison, D.J., Cantlay, A.M., Rae, F., et al. Frequency of glutathione S-transferase M1 deletion in smokers with emphysema and lung cancer. *Hum Exp Toxicol.* 16:356-360, 1997 [[CrossRef](#)]
- [44] Geisler, S.A., Olshan, A.F. GSTM1, GSTT1, and the Risk of squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: a Mini- Huge Review. *Am J Epidemiol* 154:95-105, 2001 [[CrossRef](#)]
- [45] Zhong, S., Howie, A.F., Ketterer, B., et al. Glutathione S-transferase mu locus: use of genotyping and phenotyping assays to assess association with lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis.* 12:1533-7, 1991 [[CrossRef](#)]
- [46] Coggan, M., Whitbread, L., Whittington, A, Board P. Structure and organization of the human theta- class glutathione S – transferase and D- dopachrome tautomerase gene. *Complex. Biochem.* 334: 617- 23,1998 [[CrossRef](#)]
- [47] Gertig, D.M., Stampfer, M., Haiman, C., Hennekens, C.H., Kelsey, K., Hunter, D.J. Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and colorectal cancer risk: a prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:100- 5, 1998

- [48] Chenevix Trench, G., Young, J., Coggan, M., Board, P. Glutathione S-Transferase M1 and T1 polymorphisms: susceptibility to colon cancer and age of onset. *Carcinogenesis*. 16:1655-7, 1995 [[CrossRef](#)]
- [49] Chen, C.L., Liu, Q., Relling, M.V. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmacogenetics*, 6:187-91, 1996 [[CrossRef](#)]
- [50] Ekinci, M. Bronşiyal Astımlı Çocuklarda Glutatyon-S-Transferaz Gen Polimorfizminin Bir Risk Faktörü Olarak Belirlenmesi. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği. Uzmanlık tezi. 2006, İstanbul
- [51] Ding, Z., Wang, K., Li, J., Tan, Q., Tan, W., Guo, G. Association between Glutathione-S-transferase gene M1 and T1 polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease risk: a meta-analysis. *Clin Genet*. 95:53–62, 2019 [[CrossRef](#)]
- [52] Cheng, S.L., Yu, C.J., Chen, C.J, et al. Genetic polymorphism of epoxide hydrolase and Glutathione S-Transferase in COPD. *Eur Respir J*. 23:818– 824, 2004 [[CrossRef](#)]
- [53] Hu, G., Yao, W., Zhou, Y.; et al. Meta- and pooled analyses of the effect of Glutathione-S-Transferase M1 and T1 deficiency on chronic obstructive Pulmonary disease. *International Journal of Tuberculosis & Lung Disease the Official Journal of the International Union Against Tuberculosis & Lung Disease*.12: 1474 1481, 2008
- [54] Shukla, R.K., Kant, S., Bhattacharya S., et al. Association of Genetic Polymorphism of GSTT1, GSTM1 and GSTM3 in COPD Patients in a North Indian Population. *Chronic Obstr Pulm Dis*. 8:167-172, 2011[[CrossRef](#)]

- [55] Teramoto, S. 1. COPD Pathogenesis from the viewpoint of risk factors. JPN J MED, 46: 77-79, 2007 [[CrossRef](#)]
- [56] Tkacova R, Salagovic J, Ceripkova M et al. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism is related to COPD in patients with non-small-cell lung cancer. Wiener Klinische Wochenschr. 116: 131-134, 2004 [[CrossRef](#)]
- [57] Castaldi, P.J., Cohn, C.M., Langerman, F. et al. The COPD genetic association compendium: a comprehensive online database of COPD genetic associations. Hum Mol Genet. 19: 526, 2010 [[CrossRef](#)]
- [58] Dimov, D., Vlaykova, T., Kurzawski, M. et al. Effect of genetic polymorphisms of some cytokines and xenobiotic-metabolizing enzymes on the lung function in patients with COPD. Eur. Respir. J. 40: P1750, 2012
- [59] Hemimi, N.E.D., Attar, M.A., Abd Elwahab, M.A. Genetic Polymorphism of Glutathione-S Transferase and Susceptibility to and Severity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. The FASEB Journal, 27: 117-128, 2009
- [60] Pilar, C.G., Javier, M.D., Javier, R.G., Antonio, M. C., Elena, G.V., Valentin, H.B, Angel, G.M, Rodrigo, J.G. Characteristics of chronic obstructive pulmonary disease in Spain from a gender perspective BMC Pulm Med prepublished online. 9:2, 2009
- [61] S. Yılmaz Sarıaltın, Biyolojik Numunelerden Periferik Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2019.
- [62] (http://ecotechbiotechnology.com/FileUpload/ep926784/File/ecopure%C2%A0total_rna_kit_datasheet.pdf) (Erişim tarihi: 16.03.2020)
- [63] (https://docs.wixstatic.com/ugd/b34516_ac66ca66852942a1b00768b432a81c0e.pdf) (Erişim tarihi: 17.04.2020)

- [64] Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2008.
- [65] Silverman, E.K., Weiss, S.T., Drazen, J.M, et al. Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 162:2152-2158., 2000 [\[CrossRef\]](#)
- [66] Zuntar, I., Petlevski, R., Dodig, S., Popović-Grle, S. GSTP1, GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and total serum GST concentration in stable male COPD. *Acta Pharm.* 64(1):117-29, 2014 [\[CrossRef\]](#)
- [67] Cheng, S.L., Yu, C.L., Chen, C.J., Yang, P.C. Genetic polymorphism of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in COPD. *Eur. Respir. J.* 23: 818-824, 2004 [\[CrossRef\]](#)
- [68] Faramawy, M.M., Mohammed, T.O., Hossaini, A.M., Kashem, R.A., Abu Rahma, RM. Genetic polymorphism of GSTT1 and GSTM1 and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J Crit Care.* 2009 24(3):e7-10. [\[CrossRef\]](#)
- [69] Shukla, R.K, Kant, S., Mittal, B., Bhattacharya, S. Comparative study of GST polymorphism in relation to age in COPD and lung cancer. *Tuberk Toraks.* 61(4):275-82, 2013 [\[CrossRef\]](#)
- [70] Girault, I., Lidereau, R., Bièche, I. Trimodal GSTT1 and GSTM1 genotyping assay by real-time PCR. *Int J Biol Markers.* 20(2):81-6, 2005 [\[CrossRef\]](#)
- [71] Mathers, C.D., Loncar, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine.* 209–224, 2006 [\[CrossRef\]](#)

- [72] Zinellu, E. Zinellu, A., Fois, A.G. et al. Circulating biomarkers of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review. *Respir Res.* 17(1):150, 2016 [[CrossRef](#)]
- [73] Kirkham, P.A., Barnes, P.J. Oxidative stress in COPD. *Chest.* 144(1):266-273, 2013 [[CrossRef](#)]
- [74] Lakhdar, R., Denden, S., Mouhamed, M.H., Chalgoum, A., Leban, N., Knani, J., et al. Correlation of EPHX1, GSTP1, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms with antioxidative stress markers in chronic obstructive pulmonary disease. *Exp. Lung Res.* 37(4): 195-204, 2011 [[CrossRef](#)]
- [75] Cao, T., Xu, N., Wang, Z., Liu, H. Effects of Glutathione S- Transferase Gene Polymorphisms and Antioxidant Capacity per Unit Albumin on the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev* [[CrossRef](#)]
- [76] Nakamura H. Genetics of COPD. *Allergol Int.* 60(3):253-8, 2011 [[CrossRef](#)]