













KRONİK OBSTRÜKTİF AKCİĞER HASTALIĞINDA GLUTATYON-S-TRANSFERAZ MU1 VE TETA1 POLİMORFİZMLERİNİN ROLÜ

THE ROLE OF GLUTATION-S-TRANSFERASE MU1 AND TETA1 POLYMORPHISMS IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Buket HAYAT¹ , Muhsin Selçuk YAVUZ² , Engin ŞAHİN³ , Onur DİRİCAN^{1,*} ,
Sezen YILMAZ SARIALTIN⁴ , Can YILMAZ⁵ , Işıl YILDIRIM⁶ , Tülay ÇOBAN⁴ ,
Gülçin GÜLER ŞİMŞEK⁷ , Serpil OĞUZTÜZÜN¹ 

¹ Kırıkkale Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 71450, Kırıkkale, Türkiye

² Duatepe Polatlı Devlet hastanesi, Anestezi ve Reanimasyon Kliniği, 06900, Ankara, Türkiye

³ Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göğüs Hastalıkları Kliniği, 06280, Ankara, Türkiye

⁴ Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, 06560, Ankara, Türkiye

⁵ Van Yüzüncüyıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 65090, Van, Türkiye

⁶ Beykent Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Programı, Biyokimya Alanı, 34500, İstanbul, Türkiye

⁷ Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, 06000, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Çalışmamızın amacı, KOAH hastalığının oluşumunda GSTM1 ve GSTT1 gen bölgesindeki "null" allellerinin rolü olup olmadığını araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, Polatlı Duatepe Devlet Hastanesi Göğüs hastalıkları bölümünden Etik Kurul izni alınmış 36 KOAH'lı hasta ve 14 kontrol vakası bulunmaktadır. 2019 yılı içerisinde hasta ve kontrol grubundan alınmış olan kan örneklerinden DNA izolasyonları yapıldı. KOAH hasta ve kontrol grubunda qPCR

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Onur Dirican
e-posta / e-mail: onurdirican@hotmail.com

metodu ile GSTM1 ve GSTT1 gen bölgelerinde ki delesyon durumları incelendi. Çalışmanın sonuçları Hardy-Weinberg, Chi-Squared ve Fisher's exact kuralına göre gen dozu seviyesinde dağılımları yapılarak karşılaştırmalı olarak değerlendirilmeye alındı.

Sonuç ve Tartışma: Yapılan qPCR analizleri sonrası 36 KOAH hastasından alınan numunelerde, tüm hasta grubunda gen dozlarına bağlı delesyon ifadelerinden; GST-M1 için (+/-) genotipinde 23 birey (%63,8), (-/-) genotipinde 13 birey (%26,2) şeklinde gözlemlenmiştir. GST-T1 için, (+/+) genotipinde 14 bireyde (%38,8) delesyon en yüksek oranda gözlemlenirken, (+/-) genotipinde 4 bireye (%11,1) ve (-/-) genotipinde 18 bireye (%50,1) rastlanmıştır. GST-M1 için erkek bireylerde (+/-) genotipinde delesyon 19 bireyde (%63,3) gözlemlenirken kadınlarda aynı genotipte 4 bireyde (%66,6) şeklinde gözlemlenmiştir. Erkeklerde 11(%36,7) hastada GST-M1 delesyonu gözlemlenmezken, bu oran kadınlarda 2(%33,4) şeklinde gözlemlenmiştir. GST-T1 de bu durum delesyonun gerçekleştiği ve "null allel" frekansının yüksek olarak gözlemlendiği (+/+) genotipinde erkek hastalarda 10(%33,3), kadın hastalarda ise 4(%66,6) bireye rastlanmıştır. (+/-) Genotipinde erkeklerde 3(%10) kadınlarda ise 1(%16,7) bireye rastlanmıştır. Delesyonun gözlemlenmediği ve genin korunduğu (-/-) genotipinde erkek hastalarda 17(%56,7), kadın hastalarda ise 1(%16,7) birey gözlemlenmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada, GST-M1 gen bölgesinde gen "null" allel durumunun GST-T1 gen bölgesine göre bir miktar daha fazla olduğu belirlenmiş olup bu durumun kronik obstrüktif akciğer hastalığında etken olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Delesyon, GST izozimleri, KOAH, qPCR

ABSTRACT

Objective: The aim of this study the investigation of "null" alleles in GSTM1 and GSTT1 gene regions in the development of COPD disease.

Material and Method: There are 36 patients with COPD and 14 control cases, who received the Ethics Committee permission from Polatlı Duatepe State Hospital Chest Diseases Department. DNA isolations were made from blood samples from the end of 2019 and the control group. Deletions in GSTM1 and GSTT1 gene regions were examined by qPCR method in COPD patient and control groups. The results of the study were evaluated comparatively by distributing the gene dose according to the Hardy-Weinberg.

Result and Discussion: When seen from 36 COPD patients after qPCR analysis, it was found that deletion expressions due to gene doses in all patient groups; 23 individuals (63.8%) in the (+/-) genotype for GST-M1, 13 individuals (26.2%) in the (- / -) genotype. For GST-T1, 14 (%) in the (+ / +) genotype 38.8), while deletion was observed with the highest rate, 4 individuals (11.1%) in the (+/-) genotype and 18 individuals (50.1%) in the (- / -) genotype were found. For GST-M1, deletion was observed in 19 individuals (63.3%) in the genotype (+/-) in male individuals, while it was observed in 4 individuals (66.6%) with the same genotype in women. While deletion was not observed in 11 (36.6%) male patients, this rate was observed as 2 (33.4%) in women. In the GST-T1 gene region, there were 10 (33.3%) males in male patients and 4 (66.6%) individuals in female patients with deletion occurring and the frequency of the "null allele" was high (+ / +). In the (+/-) genotype, 3 (10%) in males and 1 (16.7%) in females were found. In the genotype where deletion was not observed and the gene was conserved (- / -), 17 (56.7%) individuals were observed in male patients and 1 (16.7%) in female patients. In the case that the gene "null" allele status in the GST-M1 gene region is slightly higher than the GST-T1 gene communication, this situation is thought to be a factor in obstructive pulmonary disease.

Keywords: Deletion, GST Isozymes, COPD, qPCR

GİRİŞ

KOAH; zararlı gaz ve partiküllerin akciğerlerde oluşturduğu anormal iltihabi yanıtla ilişkili yavaş ilerleyen kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Bu hastalık tam olarak geri dönüşümlü olmayan hava geçişinin engellenmesi ile ayırt edilebilir, önlenabilir 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, 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 [2,3]. 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 göstermiştir [4]. 2010 yılında kronik solunum hastalıkları sebebi ile gerçekleşen 3.8 milyon ölümün yaklaşık %76'sının (2.9 milyon) nedeni KOAH'tır [5].

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'undan fazlası orta ve düşük gelir düzeyli ülkelerde gerçekleşmektedir [6]. Hastalığın riskini azaltmak ve tedavisini etkili bir şekilde yürütmek için KOAH yönetim planı oluşturuldu. Bu planın bileşenleri hastalığı değerlendirmek ve izlemek; risk faktörlerini azaltmak, stabil KOAH'ı yönetmektir, alevlenmeler ve komorbiditeler hastalığın şiddetine katkıda bulunur [7]. 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 [8]. Hastalık, hastalığın son aşamasından önce, sakatlığın önemli olduğu durumlarda tanımlanmalıdır. Bununla birlikte, genel popülasyon veya sigara içenlerin spirometrik taramanın yararlarını belirtmek ve sigara tüketimini azaltılmasını sağlamak bu hastalığın temel bir özelliğidir. 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 düşünüş daha hızlı olacağından, ilerleyen yaşla birlikte klinik olarak belirgin KOAH önlenmesi için kaçınılmaz olacaktır. KOAH, genetik yatkınlık, çevresel uyarılara maruziyet arasında karşılıklı etkileşim sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır [9].

KOAH'ta, sigara içen ve sigara dumanının zararlı etkilerini azaltmak ancak iyi bir detoksifikasyon ile mümkündür. Bu detoksifikasyon, oksidanların sorumlu olduğu metabolik yolların aktivasyonu ile mümkün olabilmektedir. Glutatyon-S-Transferaz (GST)'lar sigara dumanında bulunan aromatik hidrokarbonları detoksifiye eden enzimlerdendir [10,11]. GST enzimleri elektrofilik substratları glutatyon ile konjuge hale getirir. Bu olay toksinlerin uzaklaştırma ve salgılama metabolizması olarak açıklanır [12]. Teramoto ve ark. Yaptığı çalışmaya göre proteaz-antiproteaz dengesizliği ile ilgili genler ve oksidan-antioksidan dengesizliği, KOAH patolojisinin gelişmesine yol açabilir [13]. GSTM1 ve GSTT1 genleri de oksidan-antioksidan dengesizliği ile ilgili genlerdendir, bu genlerdeki delesyonlar işleyiş bozulmalarına sebep verebilir. Ding ve ark. Ocak 2000 ile Aralık 2017 tarihleri arasındaki çalışmaları kapsayan, içerisinde 37 makale, 4674 KOAH'lı, 5006 kontrol bulunan ve KOAH oluşumunda GSTM1 ve GSTT1 polimorfizmlerinin hastalığa katkısını tahmin etmek için yapılan çalışma sonucuna göre, GSTM1 ve GSTT1 polimorfizminin KOAH duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir. Etnik kökene göre yapılan alt grup analizi, aralarında yakın bir ilişki olduğunu

göstermiştir. Farklı etnik kökenlerdeki KOAH duyarlılığı, GSTT1 delesyonu açısından değerlendirildiği bir çalışmada, yalnızca Asyalı etnik kökene sahip bireylerde KOAH hastalığının ilişkili olduğu gösterilmiştir [14]. Uzun süreli sigara kullanan ve sigara kullanmaya devam eden bireylerde, GST polimorfizmine bağlı KOAH yatkınlığı ve şiddeti arasında ki ilişki üzerinde çalışan Hemini ve ark., 140 KOAH hastası ve 140 kontrol grubunda, GST-M1 delesyonuna sahip bireylerin KOAH gelişimine daha yatkın olduğu, GST-T1 delesyonlarının ise KOAH gelişimi ile ilişkili bir durumunun olmadığı gösterilmiştir [15].

GEREÇ VE YÖNTEM

Kandan DNA İzolasyonu

Bu çalışmada 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 numuneleri ile çalışıldı. Çalışma da kit kullanımı yöntemi ile c-DNA sentezi gerçekleştirildi. Çalışmada c-DNA sentezi için önce RNA izolasyonu daha sonra izole edilen RNA'dan c-DNA sentezi gerçekleştirildi.

RNA izolasyonu

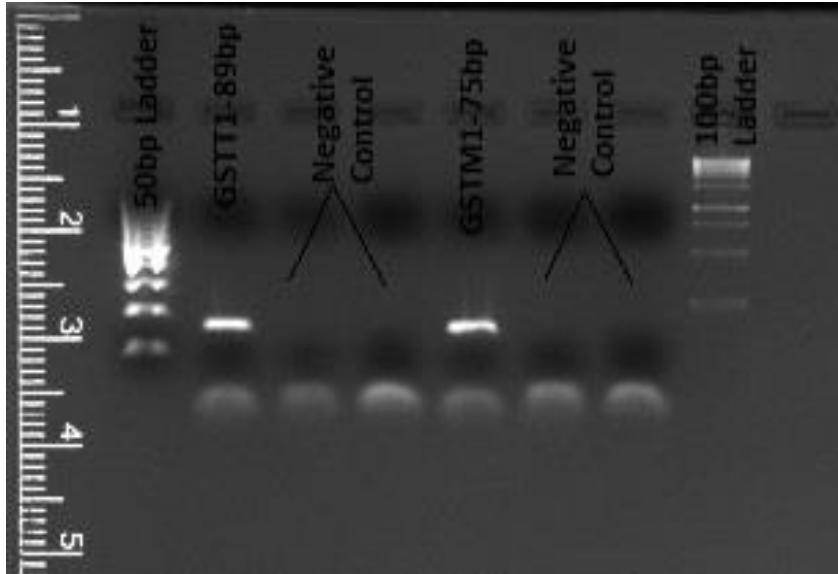
Kandan RNA izolasyonu için EcoPURE tam kandan RNA izolasyon kiti kullanıldı. Kit kullanımı sonunda elde edilen RNA'ların nanodrop cihazı kullanılarak ölçümlendirmeleri yapıldı. Ölçümlendirme sonrası saflık ve konsantrasyon açısından uygun durumda olan numuneler ile ikinci basamak olan "genomik DNA" eldesi için, RT-PCR (Reverse Transkriptaz PCR) yöntemi aşamasına geçilmiştir.

cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'dan cDNA sentezi WizScript™ cDNA Sentez Kiti (Yüksek Kapasite) ile yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA ların saflık ve konsantrasyon oranları nanodrop cihazı ile belirlenerek uygun oranda olduğu gözlemlenen tüm numuneler ile çalışmanın qPCR kısmına devam edilmiştir. Saflık olarak A260/A280 oranı 1.80-2.00 aralığında olan numuneler saf olarak kabul edilmiş olup, konsantrasyon olarak 100ng/uL ve üzerinde ki numuneler belirleyici olmuştur. Ayrıca kullandığımız genomik DNA'nın , qPCR çalışmasında ki normalizasyon için standardize etmek amacıyla tüm numuneler hesaplamalar sonrası uygun oranlar ile dilüe edilerek 100ng/uL konsantrasyona getirilmiştir [17].

Çalışmada Kullanılacak Primerlerin Belirlenmesi

Yapmış olduğumuz çalışmada kullanmış olduğumuz primer yapılarını belirlerken, Girauld I. ve arkadaşlarının 2005 yılında ki çalışmasında ele alınan GST-M1 ve GST-T1 gen bölgelerinden yararlanılmıştır. Gen doz oranlarının belirlenerek bireylerde ki delesyon durumlarının ortaya konulması için kullandıkları primer zincirleri ile aynı diziler kullanılmak üzere belirlenmiştir. Bu diziler, GST-M1 için; 5'-TGCATTCGTTTCATGTGACAGTATTCT-3'(forward), 5'-GAGAGGAGACCGGGCACTCA-3' (reverse), GST-T1 için; 5'-CAAGTCCCAGAGCACCTCACCTC-3'(forward), 5'-GTGTGCATCATTGTGGCTT-3' (reverse) şeklinde belirlenmiştir. Mevcut dizilerin kodlamış olduğu ilgili gen bölgesinde ki baz büyüklüğü NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanı üzerinden kontrolleri sağlanarak belirlenmiştir. Ayrıca, kullanılacak primerlerin Tm (Melting Temperature) değerleri hesaplanarak baz büyüklüklerinin kontrolü amaçlı elektroforez jel kontrolünde ki "Annealing" basamağında ki değerler belirlenmiş ve konvensiyonel PCR aşamasında ki protokol bu şekilde belirlenmiştir. Şekil 1.'de görüldüğü üzere primerlerin uygunluğunun kontrolü için yapılan elektroforez jel görüntüsünde ki baz büyüklüklerinin, NCBI veritabanında ki verilerle aynı olduğu gözlemlenmiştir.

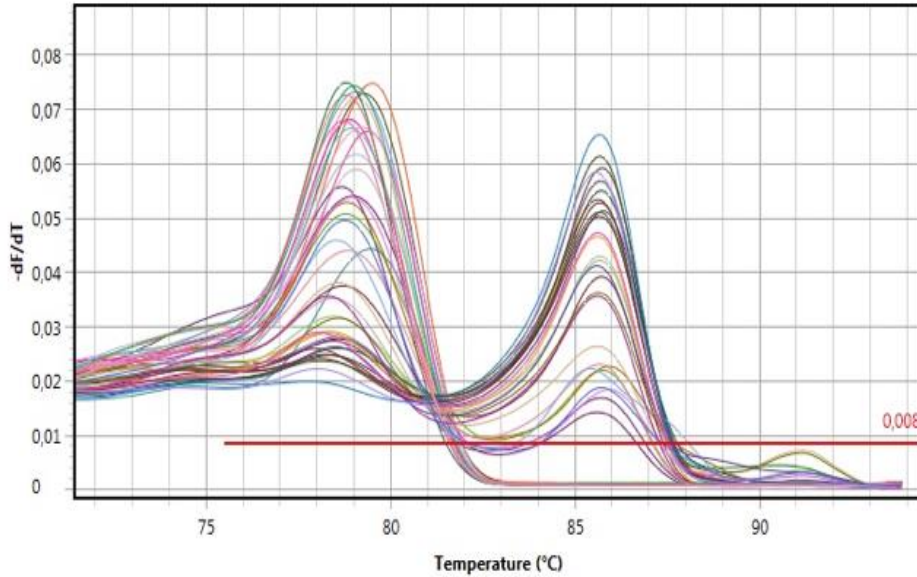


Şekil 1. Primerlerin uygunluğunun kontrolü amacıyla yapılan konvensiyonel PCR ve elektroforez jel görüntüsü. (Kuyucuklar;1-50bp ladder, 2-GST-T1 89bp, 3-Negatif kontrol, 4-Negatif kontrol, 5-GST-M1 75bp, 6-Negatif kontrol, 7-Negatif kontrol, 8-100bp ladder)

Çalışmanın bir sonra ki basamağında kullanılan primerler 10uM seviyesine dilüsyonları gerçekleştirilerek qPCR basamağına hazır hale getirilmiştir.

Kantitatif PCR (qPCR)

qPCR sistemi, spektrofotometrik analiz esasına dayalı, polimeraz zincir reaksiyonu sonrası elde edilen ürünün miktarını, kullanılan bir prob veya yapıya bağlanan bir flouresan bir boya (dye) ile kantitatif olarak belirleyen bir sistemdir. Çalışmamızda bu sistemin “Melting Curve” analizinden yararlanmak suretiyle, BIO-RAD/Sso Advanced Universal Sybr Green Supermix enzim ve flouresan etkili yapı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız kantitatif PCR karışım oranları şu şekildedir; SYBR Green PCR Master Mix (Power) 5uL, forward primer 0,4uL, reverse primer 0,4uL, cDNA 1uL(100ng/uL), Su (DNase/RNase free) 3,2uL şeklinde ve her reaksiyonda toplam hacim 10uL olacak şekilde hazırlanmıştır. qPCR çalışma protokolü ise şu şekilde belirlenmiştir; Ön (initial denaturation) denatürasyon 95°C, 5’; denatürasyon (denaturation) 95°C, 10’’, birleşme reaksiyonu (annealing) 58°C, 20’’, sentez (extension) 72°C, 20’’, 50 döngü; Uzama (Acquisition) 95°C,5’’, 55°C,1’, 1 döngü; Son sentez (Final extension) 40°C, 10’’ şeklinde uygulanmıştır.



Şekil 2. qPCR çalışması sonrası KOAH hastalarına ait melting-curve analiz grafiklerinin genel görüntüsü (dC/dT & Temperature)

İstatistiksel Analiz

Elde edilen sayısal verilerin, kullanılan qPCR sisteminin yazılımı üzerinden eşik değerleri belirlenmiş veriler standardize edilmiştir. Standardize edilen verilerin analizi Hardy-Weinberg prensibine göre gen dozuna bağlı delesyon durumlarının dağılımları yapılmıştır (17).

SONUÇ VE TARTIŞMA

Verilerin analizi amacıyla IBM SPSS Versiyon 25.0. (Armonk, NY: IBM Corp) istatistik paket programı kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grubunda yer alan katılımcıların klinik ve demografik özelliklerini tanımlayan sayısal değişkenler ortalama±standart sapma/standart hata olarak ifade edilmiştir. Kategorize edilebilen değişkenler betimleyici istatistiklerle hasta/kontrol sayısı (n) ve yüzde (%) olarak tanımlanmıştır. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkilerin anlamlılık düzeylerinin belirlenmesi amacıyla Ki-Kare (Chi square) testi kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grubundaki her bir katılımcının GSTM1 ve GSTT1 gen dozları hesaplanmış, genotipler ve delesyonlar tablolarda ifade edilmiştir. Allel frekanslarının Hardy-Weinberg (HW) eşitliğine göre uyumluluğu değerlendirilmiştir. Popülasyonların ilgili lokuslar bakımında Hardy-Weinberg genetik dengesinde olup olmadıkları Ki-Kare (Chi square) testi ve Fisher's exact test ile kontrol edilmiş ve değerlendirilmiştir. $p < 0.05$ düzeyindeki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Hasta ve kontrol grubunda yer alan katılımcıların demografik ve klinik özellikleri kategorize edilerek Tablo 1'de açıklanmıştır. Çalışma grubumuzda 36 hasta ve 14 kontrol yer almıştır. Hasta grubumuzun %16.7'si kadınlar, % 83.3'ü erkeklerden oluşmuştur. Kontrol grubu incelendiğinde ise %85.7'sinin kadınlar, %14.3'ünün erkeklerden oluştuğu görülmüştür. Hasta grubunun yaş ortalaması 67.36 ± 1.16 iken, kontrol grubunun yaş ortalaması 45.64 ± 4.80 bulunmuştur. Hasta grubunun %22.2'si, kontrol grubunun ise %50.0'si aktif sigara içicisidir. Hasta grubunun %77.8'i, kontrol grubunun ise %50.0'si sigara kullanmamaktadır. Hem hasta, hem de kontrol grubunda yer alan katılımcıların tamamı hiç alkol kullanmadıklarını beyan etmiştir. Hasta ve kontrol grubunu oluşturan popülasyonların GSTM1 ve GSTT1 genotipleri belirlenmiştir. Ayrıca hastaların yaş, cinsiyet, sigara ve alkol kullanım durumları da aynı şekilde raporlanmıştır. Tüm bu hasta verileri **Tablo 1.** ve **Tablo 2.**'de özetlenmiştir.

Hasta grubunun gözlenen ve beklenen GSTM1 ve GSTT1 genotip frekansları karşılaştırılmıştır (**Tablo 3**). GSTM1 bakımından hasta popülasyonunda gözlenen ve beklenen genotip frekansları arasındaki farklılık ($\chi^2 = 6,0179$) istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). GSTT1 bakımından hasta popülasyonunda gözlenen ve beklenen genotip frekansları arasındaki farklılık ($\chi^2 = 21,6224$) istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

Kontrol grubunun gözlenen ve beklenen GSTM1 ve GSTT1 genotip frekansları karşılaştırılmıştır (**Tablo 4**). GSTM1 bakımından kontrol popülasyonunda gözlenen ve beklenen genotip frekansları arasındaki farklılık ($\chi^2 = 2,4307$) istatistik olarak önemli bulunmamıştır ($p > 0.05$). GSTT1 bakımından kontrol popülasyonunda gözlenen ve beklenen genotip frekansları arasındaki farklılık ($\chi^2 = 4,6394$) istatistik olarak önemli bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Hasta grubun GST-M1 genotipleme ile ilgili gen dozu ve delesyon bilgileri **Tablo 5.**'te açıklanmıştır.

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

Değişken	Kategori	Hasta Grubu n (%)	Kontrol Grubu n (%)	p-değeri
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)	0.0001
	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)	

Tablo 2. Hasta ve kontrol grubunun GSTM1 ve GSTT1 genotipleri

Gen	Genotip	Hasta Grubu n (%)	Kontrol Grubu n (%)	Toplam 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. Hasta grubunun gözlenen ve beklenen gen frekansları

Gen	Toplam (n)		1/1	1/0	0/0	χ^2	P
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		

Tablo 4. Kontrol grubunun gözlenen ve beklenen gen frekansları

Gen	Toplam (n)		1/1	1/0	0/0	χ^2	P
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		

Tablo 5. KOAH hasta grubunda GST-M1 Genotiplerine bağı gen dozları ve delesyon durumları

Numuneler	GSTM1 Gen Dozu	GSTM1 Delesyon Bağıntısı
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	(+)
Ortalama±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	(-)
Ortalama±SD	0,99±0,12	
95% CI	0,92-1,05	

SD: Standart Sapma

95% CI: %95 Güvenilirlik Aralığı

Hasta grubun GST-T1 genotipleme ile ilgili gen dozu ve delesyon bilgileri **Tablo 6.**'da açıklanmıştır.

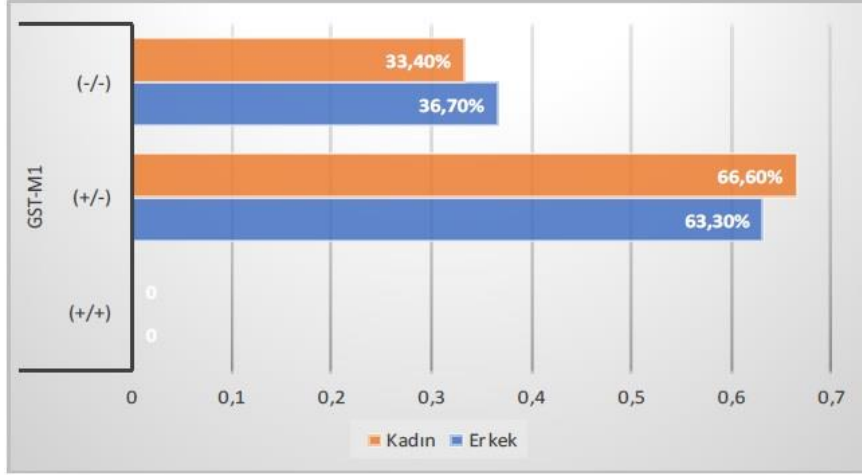
Tablo 6. KOAH hasta grubunda GSTT1 Genotiplerine bağlı gen dozları ve delesyon durumları

Numuneler	GSTT1 Gen Dozu	GSTT1 Delesyon Bağlılığı
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	(+)
Ortalama±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	(+)
Ortalama±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	(-)
Ortalama±SD	0,91±0,06	
95% CI	0,88-0,94	

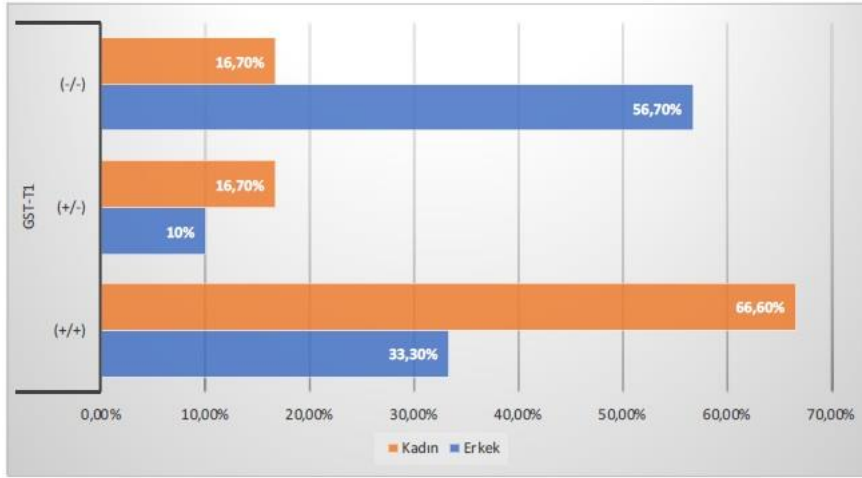
SD: Standart Sapma

95% CI: %95 Güvenilirlik Aralığı

Elde etmiş olduğumuz bu sonuçların yanı sıra cinsiyete bağlı olarak GST-M1 ve GST-T1 gen bölgelerinde ki gen dozu ve delesyon durumlarına ilişkin durumlar ise **Şekil 3.** ve **Şekil 4.**'te gösterildiği gibidir.



Şekil 3. KOAH Hastalarında GST-M1 delesyon oranlarının cinsiyete bağlı dağılımı.



Şekil 4. KOAH Hastalarında GST-T1 delesyon oranlarının cinsiyete bağlı dağılımı.

İncelemiş olduğumuz KOAH hasta grubunda cinsiyete bağlı GST-M genotiplerinde ki dağılıma baktığımızda (+/+) genotipinde hem erkek hem de kadınlar da bir durum gözlemlenmemiştir. (+/-) Genotipinde erkek hastalarda 19, kadın hastalarda ise 4 birey gözlemlenmiştir. Yine GST-M1 genotipinde delesyonun gözlemlenmediği (-/-) genotipinde erkek hastalarda 11, kadın hastalarda ise 2 bireye rastlanmıştır. GST-T1 de bu durum delesyonun gerçekleştiği ve “null allel” frekansının yüksek olarak gözlemlendiği (+/+) genotipinde erkek hastalarda 10, kadın hastalarda ise 4 bireye rastlanmıştır.

(+/-) Genotipinde erkeklerde 3 kadınlarda ise 1 bireye rastlanmıştır. Delesyonun gözlemlenmediği ve genin korunduğu (-/-) genotipinde erkek hastalarda 17, kadın hastalarda ise 1 birey gözlemlenmiştir.

KOAH akciğeri zayıflatan bir hastalıktır zamanla kötüleşir ve günlük aktiviteleri zorlaştırır [14,18]. 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[14]. Sigara kullanımının yaygınlaşması ile son yıllarda KOAH hasta sayısında artış gözlemlendi. KOAH ile ilgili yapılan çalışmalarda birçok enzim ve proteinin rolü incelenmiştir.

Oksidatif strese GST'ler kimyasallara karşı enzimatik savunmanın önemli bir parçasıdır. Strange ve ark. yaptıkları çalışmada akciğer, mesane ve kolon kanserlerinde bazı vaka-kontrol durumlarını, GSTM1 ve GSTT1 genotipleri ile risk arasında ilişkili olduğu gözlemlenirken, diğer çalışmalarda bu polimorfizmlerin sigara ile ilişkili kanser riskine aracılık etmedeki önemi ve tersi bulgular da bildirilmiştir [19].

GSTM1 ve GSTT1 genleri ile yapılan KOAH patolojisi ile ilgili bir başka çalışmada bu genlerdeki delesyonların oksidan-antioksidan dengesiliği ile ilgili işleyiş bozukluğuna sebep olduğu sonuçları elde edilmiş ve sonuçlar bu genlerin KOAH patolojisi ile direkt ilişkili olduğu şeklinde yorumlanmıştır [13].

Ding ve ark. Ocak 2000 ile Aralık 2017 tarihleri arasındaki çalışmaları kapsayan, içerisinde 37 makale, 4674 KOAH'lı, 5006 kontrol bulunan ve KOAH oluşumunda GSTM1 ve GSTT1 polimorfizmlerinin hastalığa katkısını tahmin etmek için yapılan çalışma sonucuna göre, GSTM1 ve GSTT1 polimorfizminin KOAH duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir. Etnik kökene göre yapılan alt grup analizi, aralarında yakın bir ilişki olduğunu göstermiştir. GSTM1 delesyonu için çalışılan her etnik kökende KOAH duyarlılığı, GSTT1 delesyonu için ise sadece Asyalı KOAH hastaları ile ilişki göstermiştir [14].

Hu ve ark. 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 gösterilmiştir [20].

Shukla ve ark. Kuzey Hindistan popülasyonunda 412 denek ile (204 KOAH hastası ve 208 sağlıklı kontrol) GSTM1 boş polimorfizminin KOAH'a genetik yakınlıkla yakın bir ilişkisi olduğunu bulunmuştur [21].

Tkácová ve ark. Göre oksidatif stres, hem akciğer kanserinin hem de kronik obstrüktif akciğer hastalığının (KOAH) gelişimine katkıda bulunur. Antioksidatif enzimler bu tür hasarlara karşı koruma sağlayabilir. Glutatyon S-transferaz M1 ve T1 genlerinin (sırasıyla GSTM1 ve GSTT1) genetik varyasyonlarından aktif alellerin akciğer kanseri olan hastalarda KOAH gelişimine karşı koruyucu bir

etkisi olduğu gösterildi [22]. Biz de çalışmamızda GSTM1 geninde delesyon bulunan hastaların KOAH hatalığına sahip olma riskinin arttığını gözlemleyerek Tkáčová ve ark. bu çalışmalarını destekledik.

Castaldi ve ark. PubMed'de indekslenen ve tüm popülasyonları kapsayan, KOAH ve genetik üzerine yapılan çalışmalarının sistematik bir incelemesini ve meta-analizini gerçekleştirmiştir. Yeterli veriye sahip 27 genetik varyant belirledi ancak 23'ünde sonuçlar genetik etkileri tespit etmede yetersiz bulundu. Kantitatif meta-analiz sonucu GSTM1, TGFB1, TNF ve SOD3'te KOAH duyarlılığı ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki belirlenmiştir [23].

Dimov ve ark. 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 gözlemlenmiştir (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. GSTM1'in kalıtsal yokluğunun KOAH ile ilişkili bir faktör olduğunu belirlenmiştir [24].

Silverman ve ark. erkeklerde KOAH prevalans oranlarını, tarihsel olarak daha yüksek sigara içme oranları ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, son birkaç on yılda kadınlarda artan sigara içme oranlarını, kadınlarda giderek artan KOAH oranları ile ilişkilendirilmiş ve çalışmanın sonuçları kadınların şiddetli KOAH gelişimine daha duyarlı olabileceği gösterilmiştir [25].

Bu güne dek yapılan çalışmalarda KOAH'ın erkeklerde daha fazla görüldüğü çeşitli çalışmalara dikkat çekmektedir. Pilar Carrasco-Garrido ve arkadaşları tarafından İspanya'da KOAH hastalarında yapılan bir çalışmaya 10.711 kişi alınmış ve hastaların %75,6 oranında erkeklerden oluştuğu saptanmıştır. Ayrıca çalışmada değerlendirilen KOAH'lı kadınlar KOAH'lı erkeklerden daha genç olduğu, daha az sigara kullandığı, daha fazla komorbiditeye, daha düşük yaşam kalitesine ve daha az hastalık şiddetine sahip olduğu gözlemlenmiştir [26].

Yapmış olduğumuz bu çalışmada GST-M1 gen bölgesinde 36 KOAH'lı hastadan 23'sinde (%63,8) delesyon gözlemlenmiştir. 13 bireyde (%36,2) delesyon olmadığı gözlemlenmiştir. 14 kontrol vakamızdan 3'ünde (%21,4) delesyon gözlenirken, 11'unda (%78,6) delesyon gözlenmemiştir. GST-T1 gen bölgesinde 36 KOAH'lı hastadan 18'sinde (%50) delesyon gözlenirken, 18'inde (%50) delesyon olmadığı gözlemlenmiştir. 14 kontrol vakamızdan 4 (%28,5) bireyde delesyon gözlenirken 10(%71,5)'un da delesyona rastlanmamıştır. GST-M ve GST-T gen bölgelerindeki "null allele" durumları incelendiğinde, kadınlardaki delesyon durumunun erkeklere oranla daha fazla oranda olduğu gözlemlenmiştir. GST-T1 ve GST-M1 gen bölgelerindeki delesyon durumlarıyla bağlantılı olarak; sigara kullanımı, alkol kullanımı ve yaş ile ilgili, bir bağıntı olmadığı gözlemlenmiştir.

Çalışmamız, kronik obsraktif akciğer hastalığı (KOAH) teşhisi konulmuş bireylerde, ksenobiyotik mekanizmasının faz 2 enzimleri arasında yer alan ve hücre içi detoksifikasyon mekanizmasının önemli etkenlerinden biri olan glutatyon-s transferaz enzimi izozimlerinden GST-T1 (Teta1) ve GST-M1(Mu1) enzimlerinin gen bölgelerinde ki kalıtsal veya epigenetik faktörlere bağlı

olarak gen kaybı (delesyon) durumları incelenmiştir. Bu delesyon (gen kaybı) nedeniyle bu durumun protein ifadesi durumunda olan enzim sentez mekanizmasına engel teşkil edeceği ve dolayısıyla da polimorfik durumunun akciğer hastalıklarında etken olduğu düşünülmektedir. Bu gen bölgelerinde ki delesyon, insersiyon veya mutasyon durumlarının KOAH hastalığının oluşumunda etken olabileceği, elde etmiş olduğumuz sonuçlar doğrultusunda düşünülmektedir. Ancak çalışmanın gelecekte yapılacak ve daha çok klinik veriyle desteklenmesi gerekmektedir. Hatta hasta sayısının artırılarak ülkemizde yapılan bu çalışmanın genetik durumu ile hücrede ki ifadesi ve/veya dokuda ki enzim düzeylerinin de karşılaştırmalı olarak aynı bireylerde daha ayrıntılı çalışılması önerilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası 2019/123. Çalışmamızın Etik Kurul onayı 2012-KAEK-15/1856 sayı numarası ile Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Baştabipliği, Etik Kurulu tarafından 22.05.2019 tarihinde verilmiştir. Ayrıca çalışmamız ön verileri ile 24-25 Nisan 2020 tarihinde V.Uluslararası Gevher Nesibe Sağlık Bilimleri Kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Celi, B.R., MacNee, W. (2008). Standarts for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J*, 23, 932.
2. Menezes, A.M., Perez-Padilla, P., Jardim, J.R.. (2005). Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet*, 366, 1875-81.
3. Gunen, H., Hacievliyagil, S.S., Yetkin, O. (2008). Prevalence of COPD: first epidemiological study of a large region in Turkey. *Eur J Intern Med*, 19, 499-504.
4. Oulette, D.R. (2004).The answer is fifteen percent: what is the question? *Chest*, 125, 3-5.
5. Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K. (2012). 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.
6. <http://www.who.int/respiratory/copd/burden/en/index.html> (Erişim tarihi; 20.12.2020)

7. <https://goldcopd.org/gold-reports> (Erişim tarihi; 20.12.2020). Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease: Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.
8. McGinnis, J.M., Williams-Russo, P., Knickman, J.R. (2012). The case for more active policy attention to health promotion. *Health Affairs*, 21, 78-93.
9. Hooper, R., Burney, P., Vollmer, W.M. (2012). Risk factors for COPD spirometrically defined from the lower limit of normal in the BOLD Project. *Eur Respir J*, 39, 1343-53.
10. Crawford, E.L., Khuder, S.A., Durham, S.J., Frampton, M., Utell, M., Thilly, W.G. (2000). Normal bronchial epithelial cell expression of glutathione transferase P1, glutathione transferase M3, and glutathione peroxidase is low in subjects with bronchogenic carcinoma. *Cancer Res*, 60, 1609-18.
11. Han, W., Pentecost, B.T., Pietropaolo, R.L., Fasco, M.J., Spivack, S.D. (2005). 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.
12. Landi, S. (2000). Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res*, 463, 247-83.
13. Teramoto, S. (2007). 1. COPD Pathogenesis from the Viewpoint of Risk Factors. *Japanese Journal of Medicine*, 46, 77-79.
14. Ding, Z., Wang, K., Li, J., Tan, Q., Tan, W., Guo, G. (2019). Association between glutathione S-transferase gene M1 and T1 polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease risk: a meta-analysis. *Clin Genet*, 95, 53-62.
15. Hemimi, N.E.D., Attar, M.A., Abdelwahab, M.A. (2009). Genetic Polymorphism Of Glutathione-S Transferase And Susceptibility To And Severity Of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The FASEB Journal*, 27, 117-128.
16. Vasudevan, S.V. (2011). Textbook Of Biochemistry For Medical Students (Sixth Edition b.). New Delhi India: Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd.
17. Girault, I., Lidereau, R., Bièche, I. (2005). Trimodal GSTT1 and GSTM1 genotyping assay by real-time PCR. *Int J Biol Markers*, 20(2), 81-6.
18. Vogelmeier, C.F., Criner, G.J., Martinez, F.J. (2017). Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report: GOLD Executive Summary. *Respirolog*, 22, 575-601.
19. Strange, R.C., Fryer, A.A. (1999). The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *Iarc Scientific Publications*, 148: 231.
20. Hu, G., Yao, W., Zhou, Y. (2008). 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.

21. Shukla, R.K., Kant, S., Bhattacharya, S. (2011). Association of Genetic Polymorphism of GSTT1, GSTM1 and GSTM3 in COPD Patients in a North Indian Population. *Copd Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 8, 167-172.
22. Tkacova, R., Salagovic, J., Ceripkova, M. (2004). Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism is related to COPD in patients with non-small-cell lung cancer. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 116, 131-134.
23. Castaldi, P.J., Cohn, C.M., Langerman, F. (2010). The COPD genetic association compendium: a comprehensive online database of COPD genetic associations. *Human Molecular Genetics*, 19, 526.
24. Dimov, D., Vlaykova, T., Kurzawski, M. (2012). Effect of genetic polymorphisms of some cytokines and xenobiotic-metabolizing enzymes on the lung function in patients with COPD. *European Respiratory Journal*, 1750.
25. Silverman, E.K., Weiss, S.T., Drazen, J.M. (2000). Gender related differences in severe, early onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 162, 2152–2158.
26. Pilar, C.G., Javier, M.D., Javier, R.G., Antonio, M.C., Elena, G.V., Valentin, H.B., Angel, G.M., Rodrigo, J.G. (2009). Characteristics of chronic obstructive pulmonary disease in Spain from a gender perspective, *BMC Pulmonary Medicine*, 9, 2.