

**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**KRONİK OBSTRÜKTİF AKCİĞER HASTALIĞI (KOAH) OLAN KİŞİLERDE
TNF ALFA VE TGF BETA GEN POLİMORFİZMLERİ**

Mehmet Ali ERKOÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Davut ALPTEKİN

ADANA-2011

T.C.

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**KRONİK OBSTRÜKTİF AKCİĞER HASTALIĞI (KOAİ) OLAN KİŞİLERDE
TNF ALFA VE TGF BETA GEN POLİMORFİZMLERİ**

Mehmet Ali ERKOÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Davut ALPTEKİN

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
TF2009YL25 no’lu proje olarak desteklenmiştir.**

Tez No:

ADANA-2011

KABUL VE ONAY

Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütölmüş olan
“Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAİ) Olan Kişilerde TNF alfa ve TGF beta gen
polimorfizmleri” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul
edilmiştir.

Tarih: 28.07.2011

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Davut ALPTEKİN
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. Ümit LÜLEYAP
Çukurova Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Ali KOCABAŞ
Çukurova Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile
kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halil KASAP
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren, tez konumun seçilmesinde ve çalışmamın her aşamasında beni destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Davut ALPTEKİN'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerine teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvar çalışmalarında ve tez yazımında her türlü desteklerinden dolayı Dr. M. Bertan YILMAZ'a ve Doktora öğrencisi Ceyhun Bereketoğlu'na özellikle teşekkürlerimi sunuyorum.

Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Ali KOCABAŞ'a, Yrd. Doç. Dr. Sedat Kuleci'ye göstermiş oldukları yardımlardan dolayı teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca örneklerin toplanmasında yardımcı olan Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Asistanı Gülsüm Tezçağırır'a yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışması TF2009YL25 numaralı proje ile Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Son olarak manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	1
2.1. Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı	1
2.1.1. Tanım	2
2.1.2. Patoloji, Patogenez ve Patofizyoloji	2
2.1.3. Tanı	3
2.1.4. KOAH'ın şiddeti ve Evrelerinin Sınıflandırılması	4
2.1.5. Tedavi	6
2.1.6. KOAH'ın Yüğü	7
2.1.6.1. Epidemiyoloji	7
2.1.6.2. Prevalans	8
2.1.6.3. Morbidite	8
2.1.6.4. Mortalite	9
2.1.6.5. KOAH'ın Ekonomik ve Sosyal Yüğü	9
2.2 KOAH GELİŞİMİNDE ROL OYNADIĞI DÜŞÜNÜLEN FAKTÖRLER	9
2.2.1 Genetik Faktörler	9
2.2.1.1. α -1 Antitripsin (AAT)	10
2.2.1.2. Matriks metalloproteinaz (MMP)	11
2.2.1.3. Mikrozomal Epoksid Hidrolaz (EPHX)	11
2.2.1.4. Glutasyon S-transferazlar (GST)	12

2.2.1.5. Sitokrom P4501A1 (CYP1A1)	12
2.2.1.6. Heme oksijenaz-1 (HMOX1)	13
2.2.1.7. Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α)	13
2.2.1.8. Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF β 1)	13
2.2.1.9. Vitamin D Bağlanma Proteini (VDBP)	14
2.2.1.10. İnterlökin-1(IL-1) kompleksi	15
2.2.1.11. Beta-adrenerjik reseptör (ADRB2)	15
2.2.1.12. Mikrosatellit DNA İnstabilitesi (MSİ)	16
2.2.2. Çevresel Faktörler	16
2.2.2.1. Hava Yolu Aşırı Yanıtlılığı	16
2.2.2.2. Sigara İçimi	17
2.2.2.3. İç ve Dış Ortam Hava Kirliliği	17
2.2.2.4. Enfeksiyonlar	18
2.2.2.5. Sosyoekonomik Durum	18
2.3. SİTOKİNLER	19
2.3.1. Genel Sitokin Karakteristikleri	20
2.3.2. Sitokinlerin Bölgesel Görevleri	21
2.3.3. Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF β)	23
2.3.3.1. Sentez, Yıkım ve Biyolojik Fonksiyonlar	23
2.3.4. Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α)	26
2.3.4.1. Sentez, Yıkım ve Biyolojik Fonksiyonlar	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Araç ve Gereçler	29
3.1.1. Kimyasal Malzemeler	29
3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler	30
3.2 Kan Örneklerinin Sağlanması	30
3.2.1. Hasta Rızası	31
3.3. Yöntem	31
3.3.1. Periferik Kandan DNA Elde Edilmesi	31
3.3.2. Agaroz Jelin Hazırlanması	32

3.3.3. Örneklerin Agaroz Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi	33
3.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yönteminin Uygulanması	33
3.3.4.1 <i>TNF-α</i> Geni 308 Promotor Bölgesi içi PZR Yönteminin Uygulanması	34
3.3.4.2 <i>TGF-β</i> Geni 509 Promotor Bölgesi için PZR Yönteminin Uygulanması	35
3.3.4.3 <i>TGF-β</i> Geni 869 Bölgesi içi PZR Yönteminin Uygulanması	37
3.3.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism) Yönteminin Uygulanması	38
3.3.5.1 <i>TNF-α</i> Geni 308 Promotor Polimorfizminin Belirlenmesi İçin <i>NcoI</i> Restriksiyon Enzimi İle Kesimi	39
3.3.5.2 <i>TGF-β</i> Geni 509 Promotor Polimorfizminin Belirlenmesi İçin <i>Eco81I</i> Restriksiyon Enzimi Kesimi	39
3.3.5.3 <i>TGF-β</i> Geni 869 Polimorfizminin Belirlenmesi İçin <i>PstI</i> Restriksiyon Enzimi İle Kesimi	40
3.4. İstatistiksel Analiz	40
4. BULGULAR	41
4.1. Moleküler Genetik Analizler	43
4.1.1. <i>TNF-α</i> Geni 308 Promotor Polimorfizmi Genetik Analizleri	43
4.1.2. <i>TGF-β</i> Geni 509 Promotor Polimorfizmi Genetik Analizleri	48
4.1.2. <i>TGF-β</i> Geni 869 Polimorfizmi Genetik Analizleri	52
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
7. KAYNAKLAR	65
EKLER	72
ÖZGEÇMİŞ	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	TGF- β 'nın sentezi ve salgılanması	25
Şekil 4.1	Bazı örneklerin PZR yöntemi ile çoğaltılan TNF- α 308 promotor bölgesi agaroz jel bant görüntüleri.	43
Şekil 4.2	Bazı örneklerin PZR yöntemi ile çoğaltılan TNF- α 308 promotor bölgesi agaroz jel bant görüntüleri.	43
Şekil 4.3	Bazı örneklerin RFLP yöntemi kullanılarak <i>NcoI</i> restriksiyon enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel bant görüntüleri	44
Şekil 4.4	Bazı örneklerin RFLP yöntemi kullanılarak <i>NcoI</i> restriksiyon enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel bant görüntüleri.	45
Şekil 4.5	Bazı örneklerin PZR yöntemi ile çoğaltılan TGF- β 509 promotor bölgesi agaroz jel bant görüntüleri.	48
Şekil 4. 6	Bazı örneklerin PZR yöntemi ile çoğaltılan TGF- β 509 promotor bölgesi agaroz jel bant görüntüleri.	48
Şekil 4.7	Bazı örneklerin RFLP yöntemi kullanılarak <i>Eco81I</i> restriksiyon enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel bant görüntüleri.	49
Şekil 4.8.	Bazı örneklerin RFLP yöntemi kullanılarak <i>Eco81I</i> restriksiyon enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel bant görüntüleri.	49
Şekil 4.9	Bazı örneklerin PZR yöntemi ile çoğaltılan TGF- β 869 gen bölgesi agaroz jel bant görüntüleri.	52
Şekil 4.10	Bazı örneklerin PZR yöntemi ile çoğaltılan TGF- β 869 gen bölgesi agaroz jel bant görüntüleri.	52
Şekil 4.11	Bazı örneklerin RFLP yöntemi kullanılarak <i>PstI</i> restriksiyon enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel bant görüntüleri.	53
Şekil 4.12	Bazı örneklerin RFLP yöntemi kullanılarak <i>PstI</i> restriksiyon enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel bant görüntüleri.	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Post-bronkodilatör FEV ₁ temel alınarak yapılan spirometrik KOAH şiddetinin sınıflaması	3
Çizelge2.2	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı Tanısını Düşündüren Anahtar Göstergeler	5
Çizelge 2.3	Sitokin aileleri	20
Çizelge 2.4	Sitokin aktiviteleri örnekleri	21
Çizelge 3.1	TNF- α geni 308 promotor bölgesi amplifikasyonu için kullanılan primer çiftleri	34
Çizelge 3.2	TNF- α geni 308 promotor bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleşmesinde kullanılan maddeler ve miktarları	35
Çizelge 3.3	TNF- α geni 308 promotor bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleştiği PZR programı ısı döngüleri	35
Çizelge 3.4	TGF- β geni 509 promotor bölgesi amplifikasyonu için kullanılan primer çiftleri	36
Çizelge 3.5	TGF- β geni 509 promotor bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleşmesinde kullanılan maddeler ve miktarları	36
Çizelge 3.6	TGF- β geni 509 promotor bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleştiği PZR programı ısı döngüleri	36
Çizelge 3.7	TGF- β geni 869 bölgesi amplifikasyonu için kullanılan primer çiftleri	37
Çizelge 3.8	TGF- β geni 869 bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleşmesinde kullanılan maddeler ve miktarları	37
Çizelge 3.9	TGF- β geni 509 promotor bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleştiği PZR programı ısı döngüleri	38
Çizelge 3.10	RFLP reaksiyon koşulları	38
Çizelge 4.1	Hasta ve kontrol grubu genel özellikleri	42
Çizelge 4.2	Evrelere göre hasta grubu özellikleri	42

Çizelge 4.3	Hastaların TNF- α 308 promotor bölgesi için <i>NcoI</i> kesim bantlarına göre belirlenen genotipleri	46
Çizelge 4.4	Kontrollerin TNF- α 308 promotor bölgesi için <i>NcoI</i> kesim bantlarına göre belirlenen genotipleri	47
Çizelge 4.5	Hasta ve kontrol gruplarının TNF- α 308 promotor bölgesi için genotip dağılımları ve allel frekansları	47
Çizelge 4.6	Hastaların TGF- β 509 promotor bölgesi için <i>Eco81I</i> kesim bantlarına göre belirlenen genotipleri	50
Çizelge 4.7	Kontrollerin TGF- β 509 promotor bölgesi için <i>Eco81I</i> kesim bantlarına göre belirlenen genotipleri	51
Çizelge 4.8	Hasta ve kontrol gruplarının TGF- β 509 bölgesi için genotip dağılımları ve allel frekansları	51
Çizelge 4.9	Hastaların TGF- β 869 bölgesi için <i>PstI</i> kesim bantlarına göre belirlenen genotipleri	55
Çizelge 4.10	Kontrollerin TGF- β 869 promotor bölgesi için <i>PstI</i> kesim bantlarına göre belirlenen genotipleri	56
Çizelge 4.11	Hasta ve kontrol gruplarının TGF- β 869 bölgesi için genotip dağılımları ve allel frekansları	56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAT	Alfa-1 Antitripsin
ADRB2	Beta-adrenerjik reseptör-2
bç	Baz Çifti
°C	Santigrat Derece
CSF	Koloni uyarıcı faktör
CYP1A1	Sitokrom P4501A1
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotit Tri Fosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EPHX	Mikrozomal Epoksit Hidrolaz
EtBr	Etidyum Bromür
FEV₁	Maksimum bir ekspirasyonun 1. saniyesinde dışarıya verilen hava miktarı
FVC	Maksimum inspirasyondan sonra maksimum ekspirasyonla verilen hava miktarı
g	Gram
GOLD	Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
GST	Glutasyon S-transferaz
HMOX1	Heme oksijenaz-1
IFN- α	İnterferon alfa
IFN- β	İnterferon beta
IFN- γ	İnterferon gama
IL-1	İnterlökin-1
IL1RN	IL-1 reseptör antagonisti
kb	Kilobaz
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogram

KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
L	Litre
LPS	Lipopolisakkarit
MAD	Mother against dpp
mg	Miligram
MHC	Doku uygunluk antijenleri
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mmHg	Milimetre Civa
MMP	Matriks metalloproteinaz
MSİ	Mikrosatellit DNA instabilitesi
NaCl	Sodyum Klorür
NF κ B	B hücreleri tarafından aktive edilen nükleer faktör kappa
ng	Nanogram
NK	Doğal öldürücü hücreler
Pa-O₂	Kısmi oksijen basıncı
Pa-CO₂	Kısmi karbondioksit basıncı
pmol	Pikomol
post-br	Post-bronkodilatör
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SNP	Tek Nükleotit Değişikliği
sn	Saniye
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris EDTA
TGF- β	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
TLR	Toll-benzeri reseptör

TNF-α	Tümör Nekroz Faktör Alfa
TNF-β	Tümör Nekroz Faktör Beta
UTR	Translasyonu yapılmayan bölge
VDBP	Vitamin D Bağlanma Proteini
μl	Mikrolitre

ÖZET

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH) Olan Kişilerde TNF Alfa ve TGF Beta Gen Polimorfizmleri

KOAH; önemli bazı akciğer dışı etkileri olan, tam olarak geri dönüşümlü olmayan hava akımı kısıtlaması ile karakterize, önlenabilir ve tedavi edilebilir bir hastalıktır. KOAH gelişiminde genetik risk faktörleri ile ilgili çeşitli araştırmalar yapılmış olup bunlar en çok TNF alfa ve TGF beta polimorfizmlerini kapsayan çalışmalardır. Her ne kadar bu çalışmalarda KOAH ile bu genlerin polimorfizmlerinin ilişkili olduğu düşünülsede genel olarak bu çalışmaların sonuçları çelişkilidir. Bizde bu bağlamda, bölgemizde ki KOAH vakalarının bu genler açısından polimorfizmlerinin değerlendirilmesini amaçladık.

Çalışmamıza 83 KOAH'lı, 35 kontrol dahil edilmiş olup; KOAH ile tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) G-308A promotor polimorfizmi, transormo edici büyüme faktörü beta (TGF- β) C-509T promotor polimorfizmi ve TGF- β T869C polimorfizmleri arasındaki ilişki PZR-RFLP yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca bu polimorfizmlere genotip dağılımları ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grubunda dağılımları incelenmiştir.

Çalışmamız sonuçlarına göre hasta ve kontrol grubu genotip frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p değerleri sırasıyla; 0.343, 0.096, 0.207). Hasta ve kontrol grubu allel frekansları karşılaştırıldığında da anlamlı bir fark elde edilememiştir (p değerleri sırasıyla 0.470, 0.071, 0.110).

Sonuç olarak Türk toplumu için ilk olan bu çalışmamızda adı geçen polimorfizmler ile KOAH arasında bir ilişki saptanamamıştır.

Anahtar Sözcükler: KOAH, polimorfizm, promotor, TGF- β , TNF- α

ABSTRACT

TNF Alpha and TGF Beta Gene Polymorphisms Among Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Patients

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a preventable and treatable disease with some significant extrapulmonary effects that may contribute to the severity in individual patients. There have been many studies, primarily on TNF alpha and TGF beta gene polymorphisms, conducted on the genetic risk factors of COPD. Even though, TNF alpha and TGF beta gene polymorphisms were thought to be associated with COPD, these results are controversial. In this regard, our goal was to evaluate the TNF alpha and TGF beta gene polymorphisms of COPD cases in our region.

In our study, 83 COPD patients and 35 healthy controls included and the relationship between tumour necrosis factor alpha (TNF- α) G-308A promotor polymorphism, transforming growth factor beta (TGF- β) C-509T promotor polymorphism, TGF- β T869C polymorphism and COPD were evaluated by using PCR-RFLP method.

As a result, no significant statistical difference were observed between the genotype prevalences of COPD patients and healthy controls ($p=0.343, 0.096, 0.207$, respectively). And also, allele frequencies did not differ between COPD patients and healthy controls ($p=0.470, 0.071, 0.110$, respectively).

In conclusion, no association was found between COPD and mentioned polymorphisms in the first study conducted at Turkish population.

Key Words: COPD, polymorphism, promotor, TGF- β , TNF- α

1. GİRİŞ

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH); birbirinden bağımsız olarak hasta bireylerde bazı anlamlı akciğer dışı etkileri olan, önlenebilir ve tedavi edilebilir bir hastalıktır¹. Bu hastalığın akciğer bileşeni ise tamamen geri dönüşümü olmayan, hava akışı kısıtlamasıdır. Hava akışı kısıtlaması genellikle ilerleyicidir ve akciğerlerin zararlı partikül veya gazlara maruz kalmasıyla oluşan anormal immün cevapla ilişkilendirilmiştir¹.

KOAH'ın genetik temeli tam olarak anlaşılamamıştır. Muhtemelen farklı gen kombinasyonları çevresel faktörlere karşı duyarlılığı artırmaktadır. Bu nedenle KOAH, karmaşık bir genetik hastalık olarak tanımlanabilir. KOAH ile ilişkili olabileceği düşünülen aday genlerden 20'den fazla gen bölgesinde birçok polimorfizm çalışılmıştır. Bununla birlikte yapılan çalışmalar farklı ve çelişkili sonuçlar vermiştir.

Bu çalışmanın amacı, Çukurova bölgesindeki KOAH'lı hastalardan izole edilen DNA'ların, TNF alfa ve TGF beta1 genlerinin gerekli primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılması ve RFLP kullanılarak bireylerin sahip oldukları polimorfizm tiplerinin belirlenmesi, bu polimorfizmler için allel frekanslarının ve bu polimorfizmlerin KOAH ile ilişkisinin olup olmadığı da araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı

2.1.1. Tanım

KOAH; önemli bazı akciğer dışı etkileri olan, tam olarak geri dönüşümlü olmayan hava akımı kısıtlaması ile karakterize, önlenebilir ve tedavi edilebilir bir hastalıktır. KOAH'ın karakteristik özelliği olan kalıcı hava akımı kısıtlanması, genellikle ilerleyicidir ve zararlı partiküllere karşı akciğerlerde gelişen anormal inflamatuvar yanıt ile ilişkilidir. KOAH akciğerleri etkilemekle birlikte, ciddi sistemik etkilere de yol açabilmektedir¹.

Zararlı partikül ve gazların uzun süre solunum yoluyla alınması akciğerlerde gelişen

kronik inflamasyon; büyük hava yolları, küçük hava yolları ve akciğer parankimini etkilemekte ve kronik bronşit, küçük hava yolu hastalığı ve amfizem gelişimine yol açmaktadır. Bu iki bileşenin hastalığa katkısı görece kişiden kişiye değişmektedir. Gelişen küçük hava yolu hastalığı (obstrüktif bronşiyolit) ve amfizem KOAH'a özgü kalıcı hava akımı obstrüksiyonu gelişiminde önemli bir role sahiptir. Genetik olarak bu hastalığın gelişimine yatkın olan kişilerin uygun çevresel risk faktörlerine uzun süre maruz kalması hastalık gelişimine neden olmaktadır⁵⁻⁸.

2.1.2. Patoloji, Patogenez ve Patofizyoloji

KOAH'ın karakteristiği olan patolojik değişiklikler proksimal hava yolları, periferik hava yolları, akciğer parankiması ve pulmoner damar sisteminde bulunmuştur. Patolojik değişiklikler; kronik inflamasyon, akciğerlerin farklı parçalarında spesifik inflamatuvar hücre tiplerinin sayısının artması, tekrarlanan hasar ve tamir sonucu oluşan yapısal değişiklikleri içerir^{1,10,11}. Genel olarak, inflamatuvar ve yapısal değişiklikler hastalığın ciddiyeti ve sigarayı bırakmamakta ısrar etmek ile artar.

KOAH'lı hastalarda solunum sistemi inflamasyonunun, solunum sistemindeki normal inflamatuvar cevabın sigara içimi gibi kronik uyarıcı faktörlerle artması sonucu meydana çıkmış gibi görünmektedir. Bu amplifikasyon mekanizması henüz anlaşılamamıştır ama belki genetik yönden tanımlanabilir. Sigara içimi olmadan bazı kişilerde KOAH gelişebilir, fakat gelişen bu inflamatuvar cevabın doğası bilinmemektedir^{1,10,11}. Oksidatif stres ve akciğerlerde proteinazların artması yoluyla akciğer inflamasyonunun daha fazla artmasıyla gerçekleşir. Bu mekanizmalar birlikte KOAH patolojisinin karakteristiğini oluşturan değişikliklere öncülük eder. KOAH'daki karakteristik fizyolojik anormallik ve semptomların altında yatan süreçler günümüzde iyi anlaşılmıştır. Örneğin, periferik havayollarının daralması ve inflamasyonun primer sonucu FEV1 azalması sırasında, parankimal yıkım (amfizem)'dan dolayı gaz transferinin azalması ortaya çıkar. Küçük havayollarındaki inflamasyonun ölçüsü, fibrozis ve lümene ait salgılar ile FEV₁ ve FEV₁/FVC oranının azalması ve muhtemelen KOAH karakteristiği olan FEV₁'in hızlandırılmış şekilde düşmesi ile ilişkilidir¹. Gaz değişim anormallikleri

hipoksemi ve hiperkapni gibi sonuçları ve KOAH'da çeşitli mekanizmaları vardır. Genel olarak hastalık ilerledikçe gaz transferi kötüleşir. Hafif KOAH'tan – orta KOAH'a hastalığının seyrinin geç zamanlarında, küçük havayolu arterlerinin daralması nedeniyle hipoksik pulmoner hipertansiyon gelişebilir. KOAH'ın özellikle çeşitli sistemik etkileri içerdiği gittikçe kabul edilmektedir, bu hastalık için hayatta kalma oranının komorbid hastalıklar ile büyük ilişkisi vardır^{1,12}.

2.1.3. Tanı

Nefes darlığı, kronik öksürük ya da balgam çıkarma yakınması olan veya hastalıkla ilgili risk faktörlerine (tütün dumanı, biomass yakıt kullanımı, mesleki toz ve kimyasallar) maruziyeti olan hastalarda KOAH akla gelmelidir ve tanı spirometre ile doğrulanmalıdır (Çizelge 2.2). Nefes darlığı, genellikle egzersizde artar, ilerleyicidir ve her gün vardır. Kronik öksürük ise genellikle ilk semptomdur; balgamlı veya balgamsız olabilir. Genellikle akciğer fonksiyonları bozulana kadar hava akım kısıtlamasının fiziksel belirtileri yoktur, saptanmasının duyarlılığı ve özgüllüğü düşüktür¹.

KOAH tanısı koymada spirometrik tetkik çok önemlidir. Hava yolu obstrüksiyonunun varlığı spirometrik olarak gösterilmelidir. KOAH ile ilgili olarak yayınlanan rehberlerde tanının spirometre ile doğrulanması konusunda ortak görüş söz konusudur. Ancak spirometrik kriterin ne olması gerektiği konusu net değildir. Spirometride maksimum inspirasyon noktasında zorlu bir nefes vermeye çıkarılan hava miktarı (FVC) ve maksimum bir ekspirasyonun ilk saniyesinde dışarıya verilen hava miktarı (FEV1) ölçülmeli ve bu iki ölçümün oranı (FEV1/FVC) hesaplanmalıdır. Spirometre ölçümleri yaş, boy, cinsiyet ve ırka uygun referans değerleriyle karşılaştırılmalıdır. Tipik KOAH'lı hastalarda hem FEV1, hem de FVC azalmıştır. Hava akım kısıtlaması varlığı bronkodilatör sonrası $FEV1/FVC < \%70$ şeklinde tanımlanır. Yaşlılarda olduğundan fazla KOAH tanısı konulmasını önlemek için yaşla ilişkili normal değerlerle karşılaştırılmalıdır¹.

Çizelge2.2. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı Tanısını Düşündüren Anahtar Göstergeler

Eğer 40 yaşın üstündeki bireylerde bu göstergelerden birisi mevcut ise KOAH tanısı düşünülmeli ve spirometre uygulanmalıdır. Bu göstergeler tek başlarına tanı sağlamazlar fakat çoklu anahtar göstergenin varlığı KOAH tanısı ihtimalini artırır. KOAH tanısının doğruluğunu onaylamak için spirometre uygulaması gereklidir.	
Nefes Darlığı	İlerleyicidir (zamanla ağırlaşır) Genellikle egzersizle daha da ağırlaşır İnatçıdır (her gün görülür) Hasta tarafından “nefes almakta zorlanmanın artması”, “ağırılık”, “hava açlığı”, veya “nefes almada zorlanma” olarak tanımlanır.
Kronik öksürük	Periyodik olabilir ve balgam üretimi görülmeyebilir.
Kronik balgam çıkarma	Herhangi bir kronik balgam çıkarma modeli KOAH’a işaret edebilir
Risk faktörlerine maruz kalma öyküsü, özellikle:	Tütün dumanı Mesleki tozlar ve kimyasallar Evde ısınmak ve yemek pişirmek için kullanılan yakıt dumanı.

2.1.4.KOAH’ın Şiddeti ve Evrelerinin Sınıflandırılması

Eğitim amacıyla, hastalığın basit spirometrik sınıflandırılması için 4 evre önerilmektedir¹ (çizelge 2.1). Spirometre hastalığın tanısının temelidir ve KOAH’daki patolojik değişikliklerle ilgili yararlı açıklamalar sağlar. Spesifik spirometrik sınır noktaları[cut-points] (örneğin, post-bronkodilatör FEV₁/FVC oranı <70 veya FEV₁ <80,50 veya %30 tahmini olarak) basitleştirmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu sınır noktaları klinik olarak tasdik edilmemiştir. Rastgele bir popülasyondan seçilerek yapılan bir çalışma FEV₁/FVC 0.70 sınır oranını bütün yaş gruplarında bu değerin üstünde olduğu bulunmuştur, bu durum belirlenmiş sabit oranların kullanımını desteklemektedir⁹. Bununla

birlikte, yaşlanma süreci dolayısıyla akciğer kapasitesi etkilenmektedir. Özellikle hafif seyreden hastalıklarda bu sabit oranın kullanılması yaşlılarda daha fazla KOAH tanısı, 45 yaşından genç yetişkinler için daha az KOAH tanısına sebep olabilmektedir¹.

Kronik ve ilerleyici nefes darlığı, öksürük ve balgam üretimi KOAH'ın karakteristik semptomlarıdır. Kronik öksürük ve balgam üretimi hava akışı kısıtlamasından birkaç yıl önce gelişebilir. Bu model sigara içicilerinde ve diğer risk gruplarında tanımlama ve henüz büyük bir sağlık problemi haline gelmeden müdahale etmek için eşsiz bir fırsat sunar. Diğer taraftan, anlamlı derecede hava akışı kısıtlaması öksürük ve balgam üretimi olmadan da gelişebilir.

Çizelge 2.1. Post-bronkodilatör FEV₁ temel alınarak yapılan spirometrik KOAH şiddetinin sınıflaması¹

Evre I: Hafif	FEV ₁ /FVC <%70 FEV ₁ ≥ %80 tahmini
Evre II: Orta	FEV ₁ /FVC <%70 %50 ≤ FEV ₁ <%80 tahmini
Evre III: Ağır	FEV ₁ /FVC <%70 %30 ≤ FEV ₁ <%50 tahmini
Evre IV: Çok ağır	FEV ₁ /FVC <%70 FEV ₁ <%30 veya FEV ₁ <%50 artı kronik solunum yetmezliği

Evre I: Hafif KOAH – Hafif hava akışı kısıtlaması ile karakterizdir (FEV₁/FVC <70, FEV₁ ≥ %80 tahmini). Kronik öksürük ve balgam semptomları gelişebilir fakat her zaman görülmeyebilir. Bu evrede, kişi genellikle akciğer fonksiyonunun anormal olduğundan habersizdir.

Evre II: Orta KOAH – Karakterize hava akışı kısıtlaması daha kötüye gitmiştir ($FEV_1/FVC < 70$ % $50 \leq FEV_1 > 80$ tahmini) solunum zorluğuyla gelişen nefes darlığı, öksürük ve balgam üretimi bununla beraber görülebilir. Bu evrede kronik solunum semptomları veya alevlenme sebebiyle bazı hastalar sıklıkla tıbbi yardım almaktadırlar.

Evre III: Ağır KOAH – Hava akışı kısıtlaması daha da kötüye gitmiştir ($FEV_1/FVC < 70$, % $30 \leq FEV_1 > 50$ tahmini), fazla nefes darlığı, azalmış egzersiz kapasitesi, halsizlik ve neredeyse her zaman hastanın yaşam kalitesini etkileyen tekrarlayan alevlenmeler ile karakterizedir.

Evre IV: Çok ağır KOAH – Ciddi derecede hava akışı kısıtlaması ($FEV_1/FVC < 70$, $FEV_1 < 30$ tahmini veya $FEV_1 < 50$ artı kronik solunum yetmezliği) ile karakterizedir. Solunum yetmezliği, deniz seviyesinde nefes alırken arteriyel kısmi O_2 basıncının (PaO_2) 8.0 kPa (60 mm-Hg)’dan az olması ile arteriyel kısmi CO_2 basıncının ($PaCO_2$) 6.7 kPa (50 mm-Hg)’dan fazla olması ile birlikte veya olmadan tanımlanır. Solunum yetmezliği aynı zamanda kor pulmonale (sağ kalp yetmezliği) gibi kalp üzerinde etkili olabilir. Kor pulmonalenin klinik işaretleri jugular venöz basıncı yükselmesi ayak bileği çukurunda ödem oluşumudur. Evre IV: Çok ağır KOAH olan hastalarda $FEV_1 > 30$ olsa bile bu komplikasyonlar vardır. Bu evrede, fark edilebilecek şekilde yaşam kalitesi bozulmuştur ve alevlenmeler yaşamı tehdit edecek seviyede olabilir.

2.1.5. Tedavi

KOAH’da tedavinin hedefleri; hastalığın ilerlemesini önlemek, semptomları iyileştirmek, egzersiz toleransını arttırmak, yaşam kalitesini arttırmak, komplikasyonlarını önlemek ve tedavi etmek, mortaliteyi azaltmaktır. Tedavi programı; risk faktörlerinin azaltılması, stabil KOAH’ın tedavisi, alevlenmelerin tedavisini içermektedir.

a) Risk faktörlerinin azaltılması: Akciğer fonksiyonlarındaki azalmanın engellenmesinde tek etkili girişim sigara içiminin bırakılmasıdır. Bunun yanında mesleki maruziyetin kontrolü, ev içi ve dış ortam hava kirliliğinin önlenmesi konusunda da özel gayret sarf edilmelidir.

b) Stabil KOAH'ın tedavisi: Stabil KOAH tedavisi hasta eğitimi ile başlamalıdır. KOAH'ın tedavi edilebilir bir hastalık olduğu hastaya mutlaka anlatılmalıdır. Hastalığın özellikleri, tedavide kullanılacak ilaçların etkileri, cihazların kullanılışı, hasta hekim iletişiminin önemi, atak tablosunun özellikleri, kendi başına yapması gerekenler, doktora ne zaman başvurması gerektiği, egzersizin önemi ve hastalığın seyrinde oluşabilecek komplikasyonlar konusunda bilgilendirilmelidir¹.

Semptomları önlemek ve kontrol etmek, atak sıklığı ve şiddetini azaltmak, hastalık durumunu iyileştirmek ve egzersiz toleransını arttırmak için farmakolojik tedavi kullanılmaktadır. Günümüzde kullanılabilir olan hiçbir ilaç tedavisi, akciğer fonksiyonlarındaki azalma üzerine uzun süreli etkili değildir.

2.1.6. KOAH'ın Yüku

KOAH prevalansı, morbiditesi ve mortalitesi; ülkeler ve aynı sınırlar içindeki farklı gruplar arasında çeşitlidir fakat genel olarak tütün içim prevalansı direk olarak KOAH'la ilişkilendirilmiştir. Bununla beraber, birçok ülkede odun yakma ve diğer biyomas yakıtların kullanımı ile oluşan hava kirliliği aynı zamanda KOAH risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Önümüzdeki 10 yılda devamlı KOAH risk faktörlerine maruz kalma ve dünya popülasyonunun değişen yaş yapısı nedeniyle KOAH yükünün ve prevalansının artacağı öngörülmektedir¹.

2.1.6.1. Epidemiyoloji

Geçmişte, kesin olmayan ve çeşitli tanı yöntemleri ile prevalans, morbidite ve mortalitenin kesin ölçümünü başarmak zordu. Buna ek olarak KOAH'ın normalden az tanımlanması ve teşhisi KOAH'ın anlamlı şekilde olduğundan az beyan edilmesine neden olmaktadır. KOAH olgularının normalden az beyan etmenin boyutu; ülkeler arasında farklıdır ve sağlık alanında çalışan profesyonellerin bilinçlenme ve KOAH'ı anlama seviyelerine, sağlık hizmetleri organizasyonlarında çalışanların kronik hastalıklarla başa çıkabilmelerine, KOAH tedavisinde ilaçlardan yararlanılabilirliğine bağlıdır^{1, 14}.

2.1.6.2. Prevalans

Örnekleme metodu, cevap oranı, spirometrinin kalite kontrolü ve spirometride pre-/post- bronkodilatör uygulanıp uygulanmadığı gibi birçok çeşitli kaynaktan gelen etkenler KOAH prevalansını etkileyebilir. Bu karmaşıklığa rağmen, bu veriler KOAH prevalansının ortaya çıkmasına olanak sağlayabilir. 1990-2004 yılları arasında 28 ülkede gerçekleştirilmiş sistematik değerlendirilen meta-analiz çalışmasında; sigara içen ve bırakmış kişilerde içmeyenlere göre, 40 yaşının üstündekilerde, 40 yaşın altına göre ve erkeklerde kadınlara göre KOAH prevalansının (evre 1: Hafif KOAH ve üstü) kayda değer derecede yüksek olduğu yönünde kanıtlar sağlamıştır^{1, 13}.

2.1.6.3. Morbidite

Morbidite geleneksel olarak fiziksel muayeneler, acil servis muayeneleri ve hastaneye yatma ile ölçülür. KOAH veritabanı bu sonuç parametreleri için az kullanışlı ve genellikle mortalite veritabanlarına göre daha az güvenilir olmasına rağmen, kullanılabilen bu az veri, yaşla birlikte KOAH morbiditesi artışı ve erkeklerde kadınlara göre daha yüksek olduğuna işaret etmektedir^{1, 14}. KOAH'ın erken aşamaları (Evre I: Hafif KOAH ve Evre II: Orta KOAH) çoğu zaman farkına varılmamış, tanı konmamış veya tedavi edilmemiştir ve bundan dolayı hastaların tıbbi kayıtlarında tanı olmayabilir.

KOAH kaynaklı morbidite diğer kronik komorbid şartlar tarafından etkilenebilir (örneğin kas-iskelet hastalıkları, diabetes mellitus), bunlar KOAH ile doğrudan ilişkili değildir ama yinede hastanın sağlık durumunda etkileri olabilir veya KOAH yönetimini olumsuz yönde etkileyebilir^{1, 14}. Hastalığın daha ileri safhalarında (Evre III: Ağır KOAH ve Evre IV: Çok ağır KOAH) KOAH kaynaklı morbidite, diğer komorbid şartlardan dolayı yanlış yorumlanabilir.

2.1.6.4. Mortalite

Çoğu ülkede KOAH önemli bir ölüm sebeplerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, 1990 yılında altıncı sırada ölüm sebebi olduğu, 2030 yılında dünya çapında üçüncü ölüm sebebi olacağı öngörülmektedir¹⁵. Mortalitenin bu kadar artması, sigara içiminin salgın hale gelmesi, demografinin çoğu ülkedeki değişimi ve popülasyonun daha uzun yaşaması nedenlerine bağlanmaktadır.

2.1.6.5. KOAH'ın Ekonomik ve Sosyal Yükü

KOAH maliyetli bir hastalıktır. Gelişmiş ülkelerde sağlık sistemine en büyük yük oluşturan KOAH alevlenmeleridir. Avrupa Birliğinde, direk olarak solunum hastalıklarının maliyeti toplam sağlık bütçesinin tahmini %6'sıdır, KOAH maliyeti hesaplandığında %56 (38.6 milyon Euro)'dur¹. Amerika'da 2002 yılında, KOAH'ın direk maliyeti 18 milyar dolar, indirekt maliyeti toplamda 14.1 milyar dolardır¹⁶. Hasta başına düşen maliyet, sağlık hizmetlerinin nasıl sunulduğuna ve nasıl ödendiğine göre ülkeden ülkeye farklılık gösterecektir. Şaşırtıcı olmayan şekilde, KOAH'ın şiddeti ve bakım maliyeti arasında çarpıcı bir direk ilişki vardır ve hastalık ilerledikçe maliyetin dağılımı değişmektedir¹.

2.2 KOAH GELİŞİMİNDE ROL OYNADIĞI DÜŞÜNÜLEN FAKTÖRLER

2.2.1 Genetik Faktörler

Sigara bağımlısı olan ya da aynı çevresel karşılaşmanın söz konusu olduğu kişilerin bazılarında KOAH gelişmesi ve bazı ailelerde KOAH'ın sık görülmesi, patogeneze genetik faktörlerin çok önemli bir yerinin olduğuna işaret eder⁵. Yapılan çalışmalarda, KOAH hastalarının kardeşlerinde kontrol grubuna göre KOAH gelişme riskinin 2-3 kat daha fazla olduğu ve özellikle erkek kardeşlerde risk artışının daha belirgin olduğu belirtilmiştir⁸. KOAH patogeneğinde, çok sayıda hücre tipi, enzimler ve inflamatuvar medyatörler kompleks bir interaksiyonla hava yolu inflamasyonu ve akciğer parankim harabiyetine neden olur⁵⁻⁸. Bu nedenle KOAH'tan sorumlu olabilecek tek bir majör genin

bulunması söz konusu değildir. KOAH'ın genetik temeli tam olarak anlaşılmamıştır. Muhtemelen farklı gen kombinasyonları çevresel faktörlere karşı duyarlılığı artırmaktadır. KOAH patogenezinde yer alan genler; antiproteoliz, toksik maddelerin metabolizması, antioksidan, oluşan inflamatuvar yanıtla ilgili genler olarak sınıflandırılabilirler⁸. Bu nedenle KOAH, karmaşık bir genetik hastalık olarak tanımlanabilir.

2.2.1.1. α -1 Antitripsin (AAT)

En iyi bilinen KOAH genetik risk faktörü, şiddetli konjenital alfa 1 antitripsin (AAT) antiproteazının eksikliğidir¹⁷. AAT karaciğerden ve alveoler makrofajlardan sentez edilir ve en az 75 alleli olan akut faz proteindir^{18,19}. AAT allellerinden normal olarak kabul edilen M allelidir. Ağır AAT eksikliği S (Glu264Val) ve Z (Glu342Lys) nokta mutasyonu olan bu polimorfik allellerde görülür¹⁸. AAT alleli Z varyantının homozigotluğu durumunda, normal M alleleline göre çok önemli oranda AAT eksikliği gözlemlendiği için, ZZ genotipi olan insanlarda sigara içmeseler bile solunum fonksiyonlarında belirgin bir azalma saptanabilir²⁰. Ancak toplumda bu homozigot durum çok ender görülür. ZZ genotipli insanlar arasında akciğer fonksiyonlarındaki azalma oranı yüksek değişkenlik gösterir. ZZ genotip insanlarda solunum fonksiyon testleri normal bulunabilir ve eğer sigara içmezlerse sağkalım oranı normal topluluktakiyle benzerdir²¹. 52 ZZ hasta ile yapılan bir çalışmada, hastaların çoğunda klinik olarak önemli akciğer fonksiyon kaybının olmadığını saptamışlardır²². Sigara içen veya sigarayı bırakmış olanların akciğer fonksiyonlarında önemli bir azalma olmaktadır. Ancak sigara içen bazı hastalarda, FEV₁ değerinin normal veya normale yakın olduğu da görülmüştür. Sigara içmiş ya da bırakmış olanlarda ortalama FEV₁ %47.2, sigara içmeyenlerde ise %86.3 bulunmuştur²².

Brantly ve arkadaşları, serum AAT düzeyleri 30 mg/dl'nin altında bulunan, amfizemli ve çoğu sigara içmeyen 124 ZZ hastanın sonucunu incelemişlerdir²¹. Hastalarda nefes darlığı yakınmasının 10 yaşlarında başladığını, ancak yoğun olarak nefes darlığının 25 ve 40 yaşları arasında ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Bu hastaların 50 yaşında yaşam olasılığı %52 iken, 60 yaşında oran %16'ya düştüğü görülmektedir. Normal kişilerde ise sırasıyla yaşam olasılıkları %93 ve %85 olduğunu belirtmişlerdir. Bruce ve arkadaşlarının

yaptığı çalışmada, 143 MZ olgusu M fenotipli insanlarla karşılaştırılmış yaş, cinsiyet ve sigaradan bağımsız olarak, MZ genotipine sahip bireylerde, akciğer hastalığı riskinde bir artış saptanmamıştır²³.

2.2.1.2. Matriks metalloproteinaz (MMP)

Matriks metalloproteinaz (MMP), “doku remodelling” , onarım ilişkili gelişim ve inflamasyonda rol oynayan, en az 20 farklı yapısal ve fonksiyonel enzimleri içeren bir aileyi kapsamaktadır²⁴. MMP genleri 11, 14, 16, 20, 22. kromozomların uzun kollarında tanımlanmıştır^{24,25}. MMP aşırı ekspresyonu hastalığın seyrinde önemli rol oynar. Hayvan ve insanlarda yapılan çeşitli çalışmalarda, MMP-1 (interstisiyal kollejenaz), MMP-12 (insan makrofaj elastaz), MMP-9 (jelatinaz B)’un amfizem gelişimi ve hava yolu inflamasyonunda önemli rolü olduğuna dair kanıtlar vardır²⁶. MMP-1 geninin aşırı ekspresyonu sağlanmış transgenik farelerle yapılan bir çalışmada, insan akciğer amfizemine benzer morfolojik değişimlerin olduğunu kanıtlanmıştır²⁶. Wild tip farelerle karşılaştırılma yapıldığında, MMP-12 knockout farelerde sigaraya maruz kalma sonrasında amfizem gelişmiştir. Sonuçlara göre sigara ile uyarılmış akciğer hasarında MMP-12 kritik olduğu düşünülmektedir. MMP genindeki çeşitli promotor polimorfizmlerinin genin ekspresyonunu değiştirdiği bilinmektedir. MMP-9 (C-1562T) polimorfizminde, T alleli daha yüksek promotor aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir. Bu durum transkripsiyon baskılayıcı proteinin, bağlanmak için öncelikli olarak C allelik promotoru tercih ettiği şeklinde açıklanmıştır²⁷. 184 KOAH’a sahip birey ve 212 kontrol ile Tayvanda yapılan bir çalışmada, T allel frekansı 0.370 olarak bulunmuş; hasta grubu ile kontrol grubu arasında T allel frekansı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur²⁸.

2.2.1.3. Mikrozomal Epoksid Hidrolaz (EPHX)

EPHX enzimi, akciğer hasarına yol açan sigara dumanındaki reaktif epoksitlerin (naftalin, benzipiren, aflatoksin) detoksifikasyonunu katalize eden önemli bir antioksidan maddedir²⁹. EPHX özellikle hepatositler ve bronş epitel hücreleri olmak üzere birçok değişik hücrede sentez edilir. Sigara dumanına karşı kişisel duyarlılık artışında EPHX gibi enzimlerdeki polimorfizm rol oynayabilir²⁹.

EPHX geninde iki yaygın polimorfizm vardır: Bunlar ekzon 3 (Tyr113His) ve ekzon 4 (His139Arg)'deki amino asit değişimlerdir. EPHX enziminin yavaş metabolize eden formu hasta bireylerde amfizem (%22), ve KOAH (%19) kontrol örneklerine (%6) göre yüksek oranda bulunmuştur³⁰. Küçük bir Japon çalışmasında, EPHX enziminin yavaş metabolize eden formu KOAH ile daha fazla ilişkilendirilmiştir³¹. Bu sonuç Kore popülasyonunda ise doğrulanmamıştır³².

2.2.1.4. Glutasyon S-transferazlar (GST)

GST'ler sigara dumanında bulunan aromatik hidrokarbonları detoksifiye eden enzimlerdendir. Memelilerde alpha, kappa, mu, omega, pi, sigma, theta ve zeta olarak 8 farklı GST tanımlanmıştır. GST enzimleri elektrofilik substratları glutasyon ile konjuge hale getirir. Bu olay toksinlerin uzaklaştırma ve salgılama metabolizması olarak kullanılır³³. GSTM1 karaciğer ve akciğer hücrelerinde eksprese edilir. Akciğer kanserine sahip amfizemli bireylerde ve çeşitli ağır sigara içicisi olan kronik bronşitli hastalarla homozigot GSTM1 eksikliği ile bu hastalıklarla ilişkilendirilmiştir³⁴.

GSTP1 enzimi GSTM1 ile aynı hücre tipinde eksprese edilmesine rağmen daha yüksek bir seviyede eksprese edilir. Enzimin aktivitesini *in vitro* olarak artıran 105. pozisyonda (Ile105Val) polimorfizm vardır^{35,36}. Japon popülasyonunda, kontrol grubu ile karşılaştırılmış KOAH'a sahip bireylerde homozigot izolösün allelinde önemli bir artış görülmüştür³⁷. 184 hasta ve 212 kontrol ile Tayvan'da yapılan bir çalışmada GSTT1 için null allel frekansı 0.538 olarak gösterilmiş, hasta grubu ve kontrol allel frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır³⁸.

2.2.1.5. Sitokrom P4501A1 (CYP1A1)

Sitokrom P4501A1 ksenobiyotiklerin atılması için uygun hale getirilmesini sağlar. CYP1A1'in prokarsinojenlerin aktivasyonu boyunca rol aldığı düşünülmektedir. CYP1A1 geninin 7. eksonundaki bir mutasyon (Ile462Val), CYP1A1 enziminin aktivitesinde *in vivo* olarak bir artışa neden olur³⁹. Yüksek aktiviteli allel (Val462), akciğer kanserine sahip hastalarda "centriacinar amfizem" duyarlılığı ile ilişkilendirilmiştir⁴⁰.

2.2.1.6. Heme oksijenaz-1 (HMOX1)

Heme oksijenaz, heme- grubunun biliverdine yıkımını yapar ve heme- grubuna bağlı veya bağlı olmayan oksidant hasarlarında koruma sağladığı gösterilmiştir⁴¹. Bu genin promotorunda dinükleotit (GT) tekrarları vardır. Araştırmacılar dinükleotit tekrar sayısında artışın enzimin üretiminde azalmaya yol açtığını ve böylece sigara içiminde antioksidant korumanın azaldığına dair kanıtlar sunmuştur⁴². Japon populasyonunda yapılan bir çalışmada sigara içen hastalarda amfizem ile bu genin promotorundaki mikrosatelit polimorfizmi ilişkilendirilmiştir⁴³.

2.2.1.7. Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α)

Tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve TNF- β , kemik iliğinden nötrofil salımı ve nötrofil aktivasyonu gibi KOAH patogenezinde önemli rol oynayan proinflamatuvar bir sitokindir⁴⁴. TNF- α ve TNF- β genleri; TNF- α geninin promotorunda G→A değişimi (TNF- α G-308A) ve TNF- β geninin ilk intronunda A→G değişimi (TNF- β A+252G) dahil olmak üzere çeşitli polimorfizmler içerirler^{45,46}. Bu polimorfizmlerin TNF- α ve TNF- β 'nın *in vitro* üretim seviyesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ek olarak TNF- α G-308A alleli, astım gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir⁴⁵. TNF- α G-308A alleli ile KOAH, arasındaki ilişki Japonya'da yapılan bir çalışmada gösterilmiştir⁴⁶. TNF- α -308A allelinin prevalansı hasta bireylerde kontrol grubuna göre oldukça yüksek olduğu saptanmıştır.

KOAH'a duyarlılıkta genetik faktörlerin rolünü anlamak için gen polimorfizmi çerçevesinde yapılan çalışmalar zıt sonuçlar vermiştir⁴⁵⁻⁵⁰. Bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar göz önüne alınarak TNF- α gen polimorfizminin KOAH'taki rolü kesinlik kazanmamıştır.

2.2.1.8. Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF β 1)

Transforme edici büyüme faktörü beta (Transforming growth factor beta [TGF β]), çeşitli hücre tiplerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını, doku tamirini, immün cevabın düzenlenmesini, ekstraselüler matriks üretimini sağlayan multifonksiyonel bir sitokindir⁵¹. Yapılan çalışmalar, TGF- β 1 sinyal yolundaki anormalliklerin KOAH patogenezinin

etkileyebileceği yönünde güçlü kanıtlar ileri sürmektedir. TGF- β 1 geninin kodlayan bölümü 7 ekson ve 6 intron içerir. Bu gendeki polimorfizmler TGF ekspresyonunu etkilemektedir. Bu nedenle polimorfizmlerden bazıları KOAH ve diğer hastalıklarla ilişkilendirilmiştir⁵². Bu polimorfizmlerden, T+869C ve C-509T polimorfizmlerinin TGF beta 1 geninin ekspresyonunu değiştirebileceğine ve bununla birlikte KOAH'a yatkınlık sağlayabilecek belirli genlerle bağlantılı olabileceğine dair önemli bulgular vardır^{52,53}.

Çin'de yapılan bir çalışmada KOAH sahibi kişilerin, plazma TGF- β 1 seviyelerinin aynı genotipe sahip kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bulunmuş; T+869C ve T-509C polimorfizmleri için hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır⁵⁴.

2.2.1.9. Vitamin D Bağlanma Proteini (VDBP)

Vitamin D-binding proteini (VDBP) karaciğerden salgılanan 55 kDa ağırlığında, D vitamini, ekstraselüler aktin ve endotoksin bağlama yeteneğinde bir proteindir. VDBP C5a ve C5a des-Arg nötrofillerinin kemotaktik aktivitesini, bir veya iki bölgesinin konformasyonunu düzenleyerek artırdığı düşünülmektedir⁵⁵. Ek olarak VDBP'nin kuvvetli bir makrofaj aktive edici faktör olduğu bilinmektedir⁵⁶. Böylece D vitamini bağlama fonksiyonundan başka, VDBP proteininin inflamatuvar cevabın yoğunluğu üzerinde önemli bir etkisi vardır.

Bu proteinin kodlandığı genin 11. eksonunda oluşan iki yaygın yer değiştirmeden dolayı 3 önemli izoformu vardır; 1S, 1F ve 2 olarak isimlendirilirler. Allel 2'den bir veya iki kopyaya sahip bireylerin KOAH'a karşı korunmuş olduğu gösterilmiştir⁵⁷. Ek bir çalışmada 1F homozigot bireylerde KOAH gelişim riskinin anlamlı şekilde arttığı bulunmuştur⁵⁸. Ishii ve arkadaşları bu sonucu Japon populasyonunda da doğrulamışlardır⁵⁹. Schellenberg ve arkadaşları VDBP izoformlarının KOAH'da nötrofil kemotaksisine etki edip etmediğini araştırmışlardır. Bununla birlikte VDBP'nin 3 izoformunun nötrofil C5a kemotaksisini artırma yeteneği arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır⁵⁸.

2.2.1.10. İnterlökin-1 (IL-1) kompleksi

IL-1 ailesi pro-inflamatuar sitokinler olan IL-1 α ve IL-1 β ; doğal olarak bulunan IL-1 reseptör antagonisti (IL1RN) olan anti-inflamatuar ajanları içerirler. IL-1'in iki formu farklı genlerle üretilirler fakat yapısal olarak benzerdirler ve aynı reseptöre bağlanırlar. Makrofaj ve monosit gibi çeşitli hücre tiplerinde sentezlenirler. IL1RN 16-18 kDa proteindir ve IL-1 reseptörüne IL-1'le aynı afinite ile bağlanır fakat aynı etkiyi göstermez ve IL-1'in kompetitif inhibitörüdür⁶⁰. IL-1 genleri 2. kromozomun uzun kolunda kompleks haldedir ve genlerden her biri polimorfiktir. IL-1 beta (IL-1 β) geni promotor bölgesinde tek nükleotidlik (C-511T) polimorfizm vardır ve IL1RN geninin 2. intron bölgesinde penta-allelik polimorfik bölge tanımlanmıştır⁶¹. Bu bölge arka arkaya dizilmiş 86 bç uzunluğunda ve 2-6 tekrar içerir.

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada sigara içicilerinde IL-1 genotipini akciğer fonksiyonunun azalması ile ilişki olmadığı bulunmuştur⁶². Bununla birlikte araştırmacılar IL1RN/IL1B haplotipinin bu bireylerde anlamlı bir etkisinin olabileceğini belirtmişlerdir⁶³. Japon popülasyonunda yapılan bir çalışmada ise IL1B ve IL1RN polimorfizmleri ile KOAH arasında ilişki kurulamamıştır⁶⁴.

2.2.1.11. Beta-adrenerjik reseptör (ADRB2)

Havayolu aşırı duyarlılığı KOAH solunum semptomlarında bilinen bir risk faktörüdür. β_2 -adrenerjik reseptör (ADRB2) polimorfizmlerinin astım şiddeti⁶⁵, havayolu aşırı yanıtı⁶⁵, bronkodilatör cevap⁶⁶ ve solunum fonksiyon seviyesi⁶⁷ ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. ADRB2 genindeki Arg16Gly ve Gln27Glu polimorfizmlerinin agonist-uyarılmış reseptörün azalması üzerine etkileri *in vitro* ve *in vivo* olarak bilinmektedir⁶⁸. Joos ve arkadaşları sigara kullananlarda akciğer fonksiyon azalma oranının bu polimorfizmler ile ilişkisini araştırmış, hızlı akciğer fonksiyon azalması ve heterozigot 27. pozisyonu arasında anlamlı negatif bir ilişki saptamışlardır. Buna bağlı olarak genotipin koruyucu bir etkisi olduğunu öne sürmüşlerdir⁶⁹. 16. pozisyonundaki polimorfizmin akciğer fonksiyon azalma oranına katkısı olmadığı düşünülmektedir.

2.2.1.12. Mikrosatellit DNA İnstabilitesi (MSİ)

DNA mikrosatellitleri insan genomunda yaygın olan kısa nükleotid tekrarlarıdır. MSİ yüksek mutasyon hızı ile bağlantılıdır ve bazı malign hastalıklarda arttığı bildirilmiştir⁷⁰⁻⁷². Sigara dumanı, hava yolu epitel tabakasında inflamasyon ve hasara yol açan önemli bir oksidatif strese neden olur. Bu hastalarda KOAH gelişmesinin önemli bir nedeni, hava yollarında “remodelling” ile sonuçlanan onarım süreçlerindeki yetersizliktir. Onarım süreci oldukça kompleks bir olgudur. Bu süreçte migrasyon, premitoz diferansiasyon, mitoz ve postmitoz diferansiasyon yer alır⁷⁰⁻⁷². Bu nedenle MSİ, KOAH’ta onarım süreçlerinde yer alan genlerin anormalliğine yol açabilir. Siafakas ve arkadaşları⁷², 59 şiddetli KOAH ve 60 sigara bağımlısının balgam hücrelerinde mikrosatellit instabilitesini araştırdılar. KOAH olmayan olgularda MSİ saptanamamakla birlikte, KOAH olgularının %24’nün pozitif olduğu saptanmıştır. O halde MSİ, KOAH’ın kompleks genetik temelinin bir parçasıdır. Araştırmacılar, sigara bağımlılarının balgam hücrelerinde MSİ pozitifliğinin KOAH gelişme riskini gösteren bir belirteç olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

2.2.2. Çevresel Faktörler

2.2.2.1. Hava Yolu Aşırı Yanıtlılığı

Hava yolu aşırı yanıtlılığının KOAH patogenezindeki yeri tam olarak açığa çıkarılamamıştır. Astım ve hava yolu aşırı yanıtlılığı, KOAH gelişimi için bir risk faktörü olarak kabul edilen çok sayıda genetik ve çevresel faktörle ilişkili kompleks bir hastalıktır^{1,3}. Hava yolu aşırı yanıtlılığı ile FEV₁ arasında ters bir orantı vardır. KOAH’ta hava yolu aşırı yanıtlılığı ne kadar artmış ise akciğer fonksiyonları o kadar düşük bulunmuştur. Daralmış hava yollarında hava yolu direnci önemli oranda arttığı için hava yolu aşırı yanıt ile FEV₁ azalması arasında neden-sonuç ilişkisi belirlenemez. Sigara içenlerde akciğer fonksiyon kaybının hava yolu aşırı yanıtlılığına bağlı olabileceğini gösteren kanıtlar vardır^{1,3}.

Hava yolu aşırı yanıtılığı olan bir grup sigara içende, normal sigara içicilere kıyasla akciğer fonksiyon kaybının daha hızlı olduğu saptandı⁷³. Ancak bu eğilimin KOAH gelişimi ile ilgisi tam olarak belirlenemedi. Ayrıca hava yolu aşırı yanıtılığının, KOAH için risk faktörü olmayıp sigara içimi veya diğer çevresel inhalasyonlara bağlı olarak gelişebileceğı de ileri sürüldü⁷⁴.

2.2.2.2. Sigara İçimi

Yapılan çalışmalar sonucunda, FEV₁ ile sigara içimi süresi ve miktarı arasında doz-yanıt ilişkisinin olduğu ortaya çıktı⁷⁵. Böylece sigara içimi ile akciğer fonksiyonları arasındaki bu doz-yanıt ilişkisinin, yaş ilerledikçe KOAH gelişme riskinin artışından sorumlu bir mekanizma olduğu kesin olarak gösterilmiş oldu. Bir toplumda KOAH prevalans ve mortalite rakamlarını etkileyen en önemli faktör, o toplumdaki sigara içme yaygınlığıdır. Tütün kullanımı, KOAH gelişme riskinin %80-90'ından sorumludur. ABD'de 1980'li yıllardaki KOAH'a bağlı mortalitenin, erkeklerde yaklaşık %85, kadınlarda yaklaşık %70 oranlarında sigarayla bağlantılı olduğu bulundu⁷⁶.

Pasif sigara içiminin akciğer sağlığı üzerindeki etkisi tartışmalıdır. Fakat genel olarak pasif sigara içiminin solunum problemlerine ve akciğerde fonksiyon kaybına neden olabileceğı düşünülmektedir⁷⁷. Gebelik döneminde sigara içmek, fetüsün akciğer gelişimi üzerinde zararlı olabilir. Tager ve arkadaşları⁷⁸ bir kohort çalışmasında, gebelikte sigara içen annelerin çocuklarında akciğer fonksiyonları izlendi. 5-9 yaşlarında 1156 çocuk çalışmaya alındı. Çalışmaya göre, anneleri sigara içen çocuklarda yıllık FEV₁ artışı, anneleri sigara içmeyenlere kıyasla anlamlı derecede azalmış bulundu.

2.2.2.3. İç ve Dış Ortam Hava Kirliliğı

Isınma ve yemek pişirme amacıyla katı yakıt olarak odun, bitki ve tezek kullanılmaktadır ve organik yakıtlara "biyomas" ismi verilmektedir. Katı yakıtların kullanıldığı ve havalandırılmanın yetersiz olduğu evlerde yaşayanlar, çocukluklarından itibaren bu dumanı yoğun bir şekilde solunum yaparlar¹.

Dış ortam hava kirliliğinin KOAH gelişimindeki rolü tam olarak açık değildir. Dış

ortam hava kirliliğinin solunum fonksiyon kaybına, kronik bronşite yol açabileceği ve KOAH semptomlarını kötüleştirebileceği düşünülmektedir¹. Hava kirliliğinin çocuklarda solunum sistemi enfeksiyonlarını artırdığı bilinmektedir. Bu yüzden hava kirliliği KOAH'ın ilerlemesinin nedenlerinden biri olarak kabul edilmelidir. Bütün bu bulgular, dış ortam hava kirliliğinin, kesin olarak gösterilmese de KOAH risk faktörleri arasına girmesine yol açmıştır.

2.2.2.4. Enfeksiyonlar

Çocukluk dönemi solunum sistemi enfeksiyonları erişkin dönemde akciğer fonksiyonlarında azalmaya yol açabilmektedir^{78,79}. Değişik mekanizmalar bu ilişkiden sorumlu olabilir. Tek başına KOAH için bir risk faktörü olarak kabul edilen hava yolu aşırı yanıtılığı, çocuklarda alt solunum yolu enfeksiyonlarını kolaylaştırabilir. Shahan ve arkadaşları, ortalama 70 yaşında olan 618 kişinin hastane kayıtlarını incelediler. İlk 2 yaş içinde pnömoni geçiren erkeklerde FEV₁ değeri önemli oranda düşük bulundu. Ancak kadınlarda FEV₁ düşük olmasına karşın anlamlı bulunmadı. Bir epidemiyolojik çalışmada, 16 yaş öncesinde solunum sistemi hastalığı geçiren kişilerin sigaranın etkilerine daha duyarlı oldukları gösterildi. Bu konuda yapılmış zaman içinde uzunlamasına çalışma yoktur. Bu nedenle, KOAH gelişiminde çocukluk çağı solunum sistemi enfeksiyonlarının bir risk faktörü olabileceği tam olarak kanıtlanamamıştır.

2.2.2.5. Sosyoekonomik Durum

KOAH'a bağlı morbidite ve mortalite ile sosyoekonomik durum arasında ters bir orantı vardır¹. KOAH tanısı konulmuş hastaların, üst gruba kıyasla düşük sosyoekonomik sınıfta 3 kat fazla olduğu saptandı. Bunun nedenleri büyük bir olasılıkla; ev içi ve ev dışı ortamın hava kirliliği, kalabalık aile ortamı ve kötü beslenmedir¹.

2.3. SİTOKİNLER

Sitokinler, sayılarının bir yansıması olarak biyolojinin her alanında büyük etki yapmışlardır. Günümüzde iyi bilinen yüzden fazla sitokin vardır. Biyolojinin farklı branşlarındaki keyfi adlandırmaya rağmen çeşitli alt sınıflarda gruplandırılabilirler (Çizelge 2.3). Yaygın şekilde görülen genetik polimorfizmler tanımlanmıştır, çoğu vakada bu polimorfizmlerin ekspresyon seviyeleri ve çeşitli hastalıklarla bağlantıda önemli rol oynadığı düşünülmektedir⁸⁰.

Genellikle farklı organlar tarafından üretilen, dokuların günlük fonksiyonları ve normal fizyolojik cevabın düzenlenmesi için önemli olan klasik endokrin hormonların aksine sitokinler sadece fizyolojik zorluklara veya değişimlere maruz kalındığı zaman önemli rol oynamaktadır⁸⁰⁻⁸⁴. Tipik olarak enfeksiyon ve doku travması gibi durumlar sırasında meydana gelen savunma ve doku tamiri gibi olaylarda önemli rol oynamaktadır. Sitokinler özellikle bağışıklık ile ilişkilendirilmiştir. Bunun yanı sıra doğal ve kazanılmış bağışıklık hücrelerinin hücre büyümesi ve farklılaşmasının düzenleyen sitokinler embriyo implantasyonu ve fetal gelişime tesir edebilir; belki immün sistem dışı hastalıklarda önemli rolü olabilir⁸⁰. Buna rağmen, erişkinlerde immün sistem travmatik veya bulaşıcı hastalıklarla mücadele etmede sitokinler olmadan aylarca iyi durumda idare edebilir.

Çizelge 2.3. Sitokin aileleri

Aile	Örnekler	Aktiviteler
İnterlökinler	IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-26	Doğal ve kazanılmış bağışıklığın düzenlenmesi
Kemokinler	IL-8, monosit kemotaktik faktör	Lökosit kemotaksisi ve aktivasyonu
Tümör nekrozis faktörleri	TNF- α , TNF- β	IL-1 ile benzer + tümör sitotoksistesi
İnterferonlar	IFN- α , IFN- β IFN- γ	Antiviral İmmüno düzenleyici
Koloni uyarıcı faktörler	Granülosit uyarıcı faktör, makrofaj uyarıcı faktör, IL-3, 5,6,7	Miyelopoiesis
Nörotrofinler ve nöropoietinler	Siliar nörotropik faktör, sinir büyüme faktörü, IL-6	Nöral büyüme ve farklılaşma
Büyüme Faktörleri	Fibroblast büyüme faktörü, endotelial büyüme faktörü, Transforme edici büyüme faktörü	Hücre büyümesinin düzenlenmesi

2.3.1. Genel Sitokin Karakteristikleri

Sitokinler temel olarak, çoğunlukla 8 ve 30 kDa arasında olan, bütün dokularda ve çoğu hücrede üretilebilen protein veya glikoprotein hormonlardır⁸². Sitokinlerin pek çoğu bölgesel olarak üretilir ve etkili olurlar. Sitokinlerin çok az bir kısmı biyolojik olarak anlamlı miktarlarda sistemik dolaşıma girerler ve birkaçı orada fizyolojik olarak önemli rol oynarlar. Bununla birlikte bunların “endokrin” rolleri diğer klasik endokrin hormonlara göre ince bir şekilde farklıdır. Endokrin hormonların amacı normal dokuların ve tüm organizmanın fonksiyonlarının verimli olmasını temin etmek iken, sitokinlerin dolaşımdaki fizyolojik rolü üretildikleri dokunun normal fonksiyona geri döndürülmesi ile alakalıdır. Aslında, dokular şiddetli sorunlarla karşılaştığı ve büyük miktarlarda sitokin dolaşıma girdiği zaman, sistemik homeostasisin bozulması, ateşin tetiklenmesi, hastalık belirtileri, aşırı kilo kaybı ve çeşitli hormon dengesizliklerinden sorumlu olabilir. Tek başına bir

sitokin çeşitli aktiviteler gösterebilir ve bu aktivitelerin çoğu diğer sitokinlerin aktiviteleri ile çakışabilir⁸¹⁻⁸³ (Çizelge 2.4.).

Çizelge 2.4. Sitokin aktiviteleri örnekleri

	TNF - α	IL-1	IL-6
Eikosanoid ve nitrik oksit indüksiyonu	+	++	-
Endotelial hücre aktivasyonu	+	++	+
Proteolitik enzim indüksiyonu	+	++	-
Sitokin indüksiyonu	+	++	-
T lenfositlerinin indüksiyonu	$\pm$	$\pm$	+
B lenfositlerinin indüksiyonu	-	$\pm$	+
Akut faz proteinlerinin indüksiyonu	$\pm$	+	++
Kortikosteroid indüksiyonu	$\pm$	+	+
Ateş	$\pm$	+	+
Kaşeksi/anoreksi	+	-	+
Miyelopoiesis	$\pm$	+	++

Farmakolojik araştırmaların bir sonucu olarak sitokinler için tanımlanmış birçok etki de dikkate alınmalıdır. Bunların fizyolojik ve patofizyolojik rolleri çok fazla kısıtlanmış olabilir ve tam olarak anlaşılamamıştır. Örneğin İnterlökin-1 (IL-1) başlangıçta fizyologlar tarafından endojen pirojen ve immünologlar tarafından lenfosit aktivasyon faktörü olarak tanımlanmıştır. Ateşin çıkmasının tetiklenmesi ile ilişkili yollarda yer alabilecek olması mümkünken dolaşımda nadir bir şekilde etkili konsantrasyonlarda bulunur ve kazanılmış immün cevapların tetiklenmesinde genelde kritik bir etkiye sahip değildir⁸¹.

2.3.2. Sitokinlerin Bölgesel Görevleri

Biyolojik ve immüno-serolojik yöntemler çeşitli doku sıvılarında sitokinlerin ölçülmesi için kullanılmıştır. Örneğin, romatizma hastalarının sinoviyal sıvısında, enfeksiyon veya inflamatuvar hastalığı olanların serebrospinal sıvılarında, travma, foliküler sıvı, veya bronşiyal sıvıda artmış sitokin konsantrasyonu ile doku aktivasyonu ve hastalık

aktivitesi ilişkilendirilmiştir⁸⁰⁻⁸³. En kullanışlı ölçümlerden biri amnion sıvısında yapılmıştır, amnion sıvısında IL-6 tespit edildiğinde enfeksiyon ve erken doğum riski için değerli bir göstergedir.

Enfeksiyon veya travma durumuna genellikle ilk olarak cevap veren hücreler doku makrofajları, dendritik hücreler veya beyin microglia'ları gibi monositik hücre neslidir. Çeşitli diğer patojen bileşenlerinin hücre yüzeyindeki Toll-benzeri reseptörlerini (TLR) ⁸¹ benzer bir şekilde aktive etmesine rağmen hücreler tarafından sitokin üretiminin klasik uyarıcısı bakteriyel toksinler veya lipopolisakkaritlerdir (LPS). Bu reseptörler NFκB aktivasyonunu da içeren hücre içi sinyal çağlayanını tetiklemektedir ve IL-1, IL-6 ve TNF-α gibi erken sitokinlerin transkripsiyonu ile sonuçlanmaktadır. IL-1 ve TNF-α kendi başlarına proinflamatuardır ve LPS ile benzer bir yolağı aktive etme yeteneğindedirler⁸¹⁻⁸³. IL-1 ve TNF; eikosanoidlerin ve nitrik oksit üretiminin öncülüğünde, özellikle endotel hücrelerinin üzerinde hücre adezyon moleküllerinin indüksiyonu ve diğer bir yandan IL-6, IL-8 ve koloni uyarıcı faktörün (CSF'ler) dahil olduğu sitokinlerin üretimi gibi daha ileri ilave inflamatuvar yolları aktive eder⁸¹.

IL-1 ve TNF-α'nın aksine IL-6 kemokinlerin uyarılması ve endotel hücrelerinin yüzeyinde adezyon moleküllerinin artmasında rol oynamasına rağmen doku katabolizmasının, inflamatuvar düzenleyicilerin veya diğer inflamatuvar sitokinlerin uyarılmasında minimal rol oynuyor gibi görünmektedir. Bu durum klasik inflamasyon ajanları, kimyasallar ve kirleticilere karşı inflamatuvar cevabın üretilmesinde önemli olabilir⁸¹⁻⁸³. IL-6, IL-8 ve CSF'ler makrofaj ürünlerinin büyük çoğunluğunu oluştururlar fakat fibroblast ve endotel hücrelerinin de içinde bulunduğu diğer hücreler tarafından da büyük miktarlarda üretilirler⁸¹.

İnterlökin-8 hızlı bir şekilde artan kemokin ailesinde tanımlanan ilk örnektir. Bu ailenin 40 üyesi ve 20 farklı reseptörü vardır; inflamatuvar bölgelere ve aynı zamanda aktivitelerini teşvik ederek hücrelerin etkileşimleri, özellikle lökositlerin, üzerinde önemli rol oynar⁸². IL-8 özellikle nötrofillerin inflamasyon bölgesine toplanmasında etkilidir. Diğer çoğu kemokin gibi doku matriksi bileşenlerine tutunur ve hücreler artan kemokin

gradientine göre doku boyunca hareket eder⁸¹. Doku makrofajları IL-12 ve IL-18'de üretirler, T-lenfositleri ve diğer önemli doğal bağışıklık sistemi hücresi "Natural Killer" (Doğal öldürücü hücreler, NK) tarafından interferon- γ (IFN- γ) üretimi için anahtar uyarıcıdır⁸¹. NK hücreleri tarafından IFN- γ üretimi makrofajları aktive eder ve kazanılmış bağışıklık için önemli bir düzenleyicidir. Sitokin şelalesinin dokular tarafından kademeli olarak oluşturulurlar, farklı inflamatuvar uyarıcıların farklı yolları ve farklı miktarda sitokinleri farklı kinetiklerle uyarması beklenebilir ve hala bunu tanımlamamız ve manasını anlamamız gerekmektedir.

2.3.3. Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF β)

Transforme edici büyüme faktörü beta (Transforming growth factor beta [TGF β]), çeşitli hücre tiplerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını, doku tamirini, immün cevabın düzenlenmesini, ekstraselüler matriks üretimini sağlayan multifonksiyonel bir stokindir⁸¹⁻⁸³. Yapılan çalışmalar, TGF- β_1 sinyal yolundaki anormalliklerin KOAH patogenezi etkileyebileceği yönünde güçlü kanıtlar ileri sürmektedir.

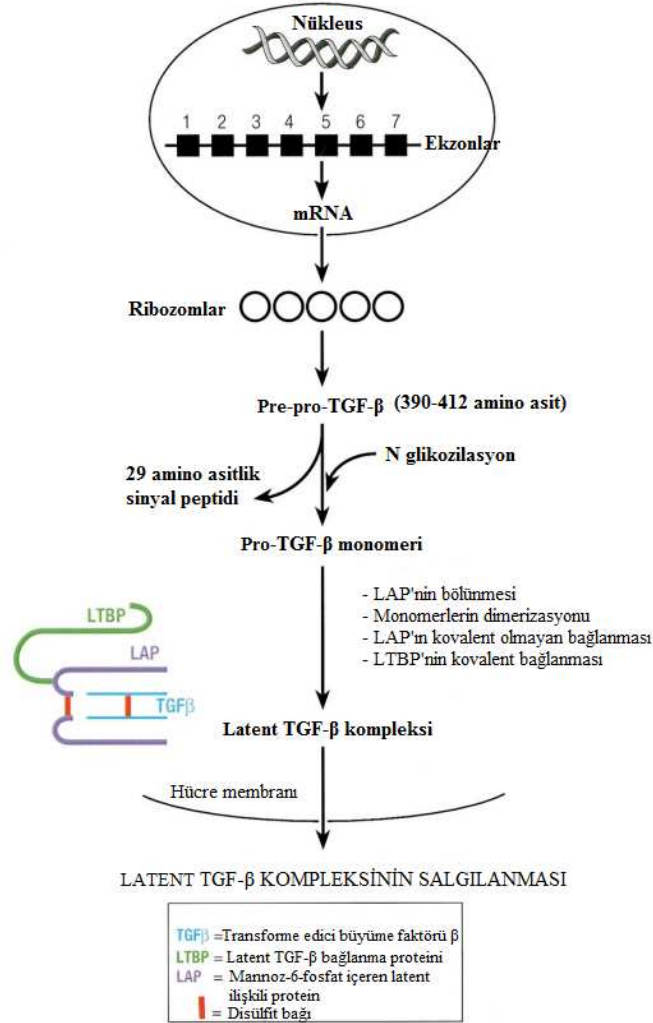
TGF- β süperailisi en az 23 farklı gen tarafından kodlanır ve en az 5 TGF- β izoformu vardır. TGF- β amino asit sekansı türler arasında yüksek derecede korunmuştur. Biyoaktif molekül 12.5 kDa ağırlığında sülfidril bağlarıyla bağlanmış 25 kDa'luk homodimerdir. (TGF- $\beta_{1.1}$, $\beta_{2.2}$ veya $\beta_{3.3}$). Heterodimerlerde (örneğin, TGF- $\beta_{1.2}$ ve $\beta_{2.3}$) oluşturabilir. Bazı biyoaktif TGF- β 'ların atipik moleküler ağırlıkları vardır⁸¹⁻⁸³. Örneğin insan meme kanseri hücresi homojenatlarında 40 ve 30 kDa'luk moleküller, 120/90 kDa glioblastoma kaynaklı faktörler ve gebe farelerin rahim hücreleri tarafından yayımlanan 30-32 kDa ve 15-20 kDa'luk faktörler vardır. Bu atipik moleküller TGF- β_{1-3} izoformları ile fonksiyonel olarak farklı ve bu nedenle TGF- β izoformlarının yapı-işlev ilişkileri için değerli bilgiler sunabilirler.

2.3.3.1. Sentez, Yıkım ve Biyolojik Fonksiyonlar

Hücre içi işleme detayların çoğu TGF- β_1 'da tanımlanmıştır (şekil 2.1). TGF- β_1 ve β_3 genleri 100 kb ve β_2 70 kb büyüklüğündedir. Pro-TGF- β 'nın 12.5 kDa'luk monomerlerine bölünmesine furin gibi endopeptidazlar aracılık eder. Parçalanmış

monomerlerin 25 kDa'luk dimer halinde katlanmasına 75 kDa'luk latens bağlanma peptidi yardım eder ve latent ilişkili kompleks olarak kalır. 135 kDa'luk mannozca zengin karbonhidrat içeren latens bağlanma peptidi, kompleks latens peptid dimerine eklenebilir. Latent kompleks trombositlerde α granül şeklinde (vücutta TGF- β 'nın en büyük deposu) saklanabilir veya salgılanabilir⁸¹. Salgılanması karbonhidrat tarafından sağlanmaktadır. Farklı genlerden meydana gelen tipik moleküler ağırlığa sahip TGF- β 'ların 25 kDa'luk TGF- β 1-3 oluşturması veya aynı pro-peptidi oluşturan farklı işleme mekanizmaları açık olarak anlaşılmış değildir.

Şekil 2.1. TGF- β 'nın sentezi ve salgılanması



Salgılamada latent TGF- β hücre zarı ile ilişkili mannoz 6-fosfat reseptörüne veya hücre dışı matris bağlanabilir. Neoplastik ve neoplastik olmayan hücrelerden (örneğin, makrofaj ve immunosuppresör hücreleri gibi) biyoaktif TGF- β salgılanmasına eş zamanlı olarak, serin proteazlar tarafından latent TGF- β 'nın aktivasyonu meydana gelir. Benzer enzimatik süreçler bir hücre tipinde (örneğin vasküler endotel hücreleri) latent TGF- β 'nın üretilmesini ve ikinci bir hücre tipinin (örneğin perisitlerden) aktivasyona neden olmasını açıklayabilir. Birkaç farklı enzim hücre dışı matrise bağlı latent TGF- β 'nın aktive edilebilir⁸¹.

Biyoaktif TGF- β matrikste, α_2 -makroglobulin ve dekorin (genellikle aktivitesini inhibe ederler) ya da albümin ve yeni sentezlenen IgG (aktivitesini inhibe etmez) gibi taşıyıcılara bağlanabilir. α_2 -makroglobulin, α_2 -makroglobulin reseptörleri taşıyan hücrelerin üzerinde TGF- β etkilerini kolaylaştırabilir^{81,83}. TGF- β - α_2 -makroglobulin kompleksleri karaciğer mannoz-6 fosfat/insülin benzeri büyüme faktörü II reseptörleri üzerinden görev yapar ve muhtemelen katabolize edilir. Bioaktif TGF- β 'lar da inflamasyon bölgelerinde proteazlar ve elastazlar tarafından yıkılıp, idrar ile dışarı atılabilirler.

TGF- β erişkin, embriyonik gelişim ve farklılaşma sırasında inflamasyon, anjiyogeneze tamir ve konakçı direnç mekanizmalarının düzenlenmesinde rol oynar⁸¹. TGF- β 'ların hem otokrin hem de parakrin etkileri vardır. Biyolojik etkileri reseptörler yoluyla düzenlenir ve altı farklı reseptör tanımlanmıştır. Reseptörler hücre içi sinyali düzenlemelerine, TGF- β sinyal reseptörünü depolamalarına ve/veya bulundurmalarına göre alt gruplara ayrılırlar. Tip II reseptörler TGF- β bağlı iken sinyal kompleksini oluşturmak için tip I reseptörler ile ilişki kurar. Sinyal seri MAD peptitleri yoluyla ilerliyor gibi görünmektedir, baskılama ya da uyarılma ile sonuçlanır⁸¹.

2.3.4. Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α)

Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α , kaşektin) geniş biyolojik aktiviteleri olan polipeptit bir hormondur. İlk çalışmalarda endotoksinle muamele edilmiş farelerin serumunda bazı transplante tümörlerin nekrozunu düzenlediği bulunmuştur. Daha sonra yapılan çalışmalarda hücre kültürlerindeki tümör hücreleri üzerinde TNF- α 'nın sitosidal veya sitostatik etkileri olduğu rapor edilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda TNF- α 'nın konakçı savunması, immünite ve doku homeostasisinde veya enfeksiyon patogeneğinde, doku yaralanması ve inflamasyonunda yararlı süreçlerde düzenleyici rol oynayabileceğini göstermiştir⁸¹⁻⁸³.

Kaşeksinin (aşırı zayıflama) moleküler temeli ile ilgili yapılan çalışmalar endotoksine cevap olarak makrofajlardan salgılanan bir protein olan kaşektinin karakterize edilmesine yol açmıştır. Kaşektin adipositlerde lipoprotein lipaz aktivitesini baskılamakta, hipertrigliseridemi ve aşırı zayıflamaya sebep olmaktadır. Amino asit sekansının

ıkarılması ve kaşektin geninin cDNA klonlama çalışmaları kaşektin ve TNF- α 'nın aynı molekül olduğunu gstermiřtir⁸¹. İnsan TNF- α alt üniteleri, 233 amino asitlik propeptitden 76 amino asitlik sinyal dizisinin kesilmesiyle aktive olan 157 aa'lık (17 kDa) peptittir⁸². Sinyal dizisinin kesilmesi TNF- α 'nın hücre yüzeyinden salgılanması için temel olabileceği öne sürülmektedir. İnsanlarda diğer türlerden farklı olarak molekül glikozillenmemiştir. Her bir alt ünite β kıvrımlı tabaka yapısı içerir ve üç alt ünite kovalent olmayan şekilde bir araya gelerek aktif hormonu oluřturur⁸¹. İnsan TNF- α 'sı fare ve sıçanlarla %70, lenfoid hücrelerin sitotoksik aktiviteleri ile salgılanan bir protein olan lenfotoksin ile %30 benzerlik göstermektedir. TNF- α ve lenfotoksin aynı reseptöre bağlanırlar ve çeşitli biyolojik aktiviteleri paylaşırlar. İnsanlarda 6. kromozomun kısa kolunda farklı genlerden kodlanırlar, bu durumun atasal bir duplikasyon olayı olduğu öne sürülmektedir. TNF- α ve lenfotoksin genleri yaklaşık 1100 baz çifti ile ayrılırlar. Her iki gende major doku uygunluk kompleksi (MHC) içinde bulunurlar ve üç intron içerirler, bu intronlardan birisi protein kodlayan sekansın içinde bulunursa olgun polipeptit oluşmaz. Her iki genin ekspresyonunun koordinasyonu, benzer 5'-UTR (untranslated region) yapıldığı ne srlmektedir⁸¹.

2.3.4.1. Sentez, Yıkım ve Biyolojik Fonksiyonlar

TNF- α makrofajlar, lenfositler, doğal öldürücü hücreler (NK), glomerular mezangial hücreler, astrositler, beyindeki mikrogliya hücreleri ve karaciğerdeki Kuppfer hücrelerini de içeren birçok hücrede sentezlenirler⁸¹⁻⁸³. Endotoksin ve lipopolisakkaritlere (LPS) karşı ana uyarılmayı göstermesinin yanında virüsler, mantar ve parazit antijenleri, enterotoksinler, mikobakteriyel faktörler, immün kompleksler, IL-1 ve otokrin olarak kendisi tarafından da TNF- α sentezi tetiklenebilir^{81,83}.

TNF- α depo olarak bulunmaz fakat *de novo* olarak hücre aktivasyonunu takiben sentezlenirler. TNF- α biyosentezi transkripsiyon sırasında ve transkripsiyon sonrası sıkı şekilde dzenlenir⁸¹. Glukokortikoidler gen transkripsiyonu ve mRNA translasyonunu engelleme yoluyla TNF- α sentezini baskırlarlar. Bununla birlikte mRNA translasyonu bir kere başladığı zaman glukokortikoidler TNF- α sentezini baskılayamazlar⁸¹. Ek olarak INF-

γ TNF- α mRNA'sının translasyonunu teşvik eden bir etkiye sahiptir, böylece TNF- α biyosentezi artar. Ayrıca TNF- α biyosentezi transkripsiyon sonrasında da kontrol edilir. 3'-kodlanmayan TTATTTAT elementi birçok sitokin geninde bulunur ve mRNA sentez edilmiş olsa bile, protoonkogenler tarafından mRNA translasyonu baskılanır⁸¹. Diğer yandan TNF- α ve birçok sitokin mRNA transkripti, tekrar eden ve üst üste çakışan 33 nükleotitlik 3'-kodlanmayan UUAUUUAU sekansını içerirler⁸¹. Bu sekans biyolojik olarak aktif polipeptitlerin uygun olmayan şekilde aşırı üretimini engellemek için mRNA yarı ömrünü azaltıyor gibi görünmektedir.

TNF- α çok sayıda ve farklı hücre tipine birden fazla etkisi vardır. TNF- α 'nın net biyolojik etkileri; konsantrasyona, hücrenin maruz kalma süresine ve ortamda TNF- α ile sinerji yapabilecek diğer düzenleyicilerin varlığına göre yararlı veya zararlı olabilir⁸³. TNF- α üretimine direnç kaşeksiye (aşırı derecede zayıflama) yol açabilir. Aslında TNF- α çeşitli metabolik enzimlerin biyosentezini düzenler⁸¹. Adiposit ve iskelet miyositleri TNF- α ile inkübe edildiklerinde katabolik, lipoliz ve glikoneoliz bakımından uyarılmış hale gelmektedir. Akut sistemik olarak salınan TNF- α septik şok patogenezinde ve endotoksin ile uyarılmış doku hasarında görev alır. İntravenöz endotoksin verilmesinden sonra; TNF- α üretiminin artmasıyla ateş, kas ağrısı, titreme, mide bulantısı ve baş ağrısının meydana gelmesi arasında geçici olarak bağlantı kurulmuştur⁸¹.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, cihazlar ve teknik malzemeler temin edildikleri firmalarla birlikte aşağıda belirtilmiştir.

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

- Taq DNA polimeraz enzimi (Vivantis)
- Polimeraz zincir reaksiyonu tamponu (Vivantis)
- Primerler (ITD Integrated DNA Technologies, Biomers.net)
- dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Dr. Zeydanlı)
- Restriksiyon enzimi *NcoI* (Fermentas)
- Restriksiyon enzimi *Eco81 I* (Fermentas)
- Restriksiyon enzimi *Pst I* (Bioron)
- Etidiyum bromid (Sigma)
- Agaroz (Sigma)
- Tris-baz (Sigma)
- Borik asit (Sigma)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (Sigma)
- Sodyum klorür (NaCl) (Merck)
- Magnezyum klorür
- Tris-HCl
- TritonX100 (Sigma)
- Sükroz (Merck)
- Proteinaz-K (Sigma)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)
- Bromfenol mavisi (Merck)
- Etil alkol (Merck)
- Distile ve bidistile su

3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler

- Soğutmalı santrifüj (Universal 16R)
- Mikrosantrifüj (Techne force 16)
- Su banyoları (Grant)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Terazi (Shimadzu 321-33557)
- pH metre (İnolab)
- UV jel görüntüleme sistemi (UVItec)
- Otomatik pipetler (Gilbson, Biohit, Socorex)
- Vorteks (Nüve NM 110)
- Etüv (Dedeoğlu)
- Elektroforez güç kaynağı (EC3000-90)
- Yatay ve dikey elektroforez tankları (Biogen ve Biolab)
- PZR cihazı (Bioer Xp Thermal Cyclor)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Deepfreez (Siemens, Bosch)
- Otoklav (Trans)

Araştırmanın yapıldığı Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarı, Ç.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda bulunmaktadır.

3.2 Kan Örneklerinin Sağlanması

Çalışma grupları Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Polikliniğinde takip edilen KOAH tanısı konulmuş hastalardan ve herhangi bir hastalık tanısı almamış normal bireylerden oluşturuldu. Hasta grubu MH1 (hasta1), MH2, MH3 olarak, kontrol grubu MK1 (Kontrol 1), MK2, MK3 olarak kodlandırıldı. Bu çalışmada, 35 normal, 84 KOAH olmak üzere toplam 119 birbiri ile akraba olmayan birey moleküler biyolojik açıdan değerlendirildi. Bu kişilerden EDTA'lı tüplere kan alındı. Tüpler alt üst edilerek kanların pıhtılaşması önleildi. Kan örnekleri DNA elde etmek üzere kullanıldı.

3.2.1. Hasta Rızası

Çalışmada yer alan tüm hasta ve kontrol grubunun çalışmaya katılımları, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulları Araştırma Projesi Bilgi ve Taahhüt Formunda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmış DNA Çalışması Onam Formları doldurularak sağlandı (Ek-3).

3.3. Yöntem

3.3.1. Periferik Kandan DNA Elde Edilmesi

Bu çalışmada periferik kandan DNA elde etmek için Miller ve arkadaşlarının geliştirdiği “salting out” (tuzla çöktürme) yöntemi modifiye edilerek kullanıldı⁸⁴.

1. 1,5 ml’lik ependorf tüpü içerisine iyice alt üst edilmiş kan örneğinden 700 µl, eritrosit lizis (Ek-1.1) solüsyonundan da 700 µl konulup dikkatlice alt üst edilerek 3-5 dk. oda ısısında bekletildi. 4500 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı.

2. Elde edilen pellet üzerine 700µl eritrosit lizis solüsyonu eklendi. Tüp kuvvetlice çalkalanarak pellet çözündürüldü. 4500 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı.

3. Pellet üzerine 1000 µl (1 ml) fizyolojik tampon (Ek-1.2) eklenerek çözündürüldü. 4500 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı.

4. Pellet üzerine 300 µl TE-9 (Ek-1.3) tamponu ilave edilerek çözündürüldü. Bunun üzerine 100 µl SDS (Ek-1.4) ile 20 µl Proteinaz-K (Ek-1.5) ilave edildi. Vorteks üzerinde tüp içeriği iyice karıştırıldı. 65°C’de 1-2 saat benmaride tutuldu. 20 dk aralıklarla tüp alt üst edildi.

5. İnkübasyon sonunda tüp içerisine 200 µl 6M NaCl (Ek-1.6) ilave edildi. Oluşan beyaz görünümlü yapıyı dağıtmak için tüp kuvvetlice çalkalandı ve 13500 rpm’de 7 dk santrifüj edildi.

6. Santrifüj sonunda süpernatant başka bir tüpe alınıp pellet atıldı. Süpernatant tekrar 13500 rpm’de 7 dk santrifüj edildi.

7. Yine süpernatant başka bir tüpe alınıp pellet atıldı. Tuzdan arınmış olan süpernatantın üzerine 900 µl %100’lük etil alkol eklendi. Tüp iyice karıştırıldı. Bu aşamada DNA ipliksi

formunda görülebilmektedir.

8. Ependorf tüpü 13500 rpm’de 7 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.

9. Tüpün dibine yapışan DNA’yı kaldırmak için 1000 µl %70’lik etil alkol (Ek-1.7) eklendi. 13500 rpm’de 7 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi.

10. Süpernatant döküldükten sonra tüp ters çevrilip DNA’nın tüpe yapışması için 15 dk beklendi.

11. DNA’nın büyüklüğüne göre 50-100 µl TE (Tris-EDTA) (Ek-1.8) konuldu.

12. DNaz aktivitesini ortadan kaldırmak için 70-80 °C benmaride, 10-15 dk inkübasyona bırakıldı.

13. DNA örnekleri kullanılıncaya kadar +4 °C’de muhafaza edildi. Uzun süreli saklamalar için ise -20 °C ye alındı.

3.3.2. Agaroz Jelin Hazırlanması

PZR sonrasında elde edilen ürünlerin varlığını kontrol etmek için kolay ve hızlı hazırlanması sebebi ile agaroz jellerden yararlanıldı. Genellikle %2 ve %3 oranında agaroz jel kullanıldı.

1. Çalışmaya başlamadan önce jel kabı iyice temizlenip kurutulduktan sonra jel dökme kalıbına yerleştirildi. Bu kalıp, düz bir yüzeye kondu. Kuyuların oluşturulması için kullanılan taraklar düzgünce yerlerine yerleştirildi.

2. Jel dökme kabının boyutları ile jelin kalınlığı dikkate alınarak hesaplama yapıldı. 8 X 9cm boyutundaki jel kabına % 2 konsantrasyonunda jel dökmek için erlenmayerde 1 g agaroz tartılıp, 50 ml 1X TBE solüsyonu (Ek-2.1) eklendi. Mikrodalga fırında agaroz iyice eriyene kadar ısıtıldı.

3. Jelin içine 3 µl stok EtBr (Etidiyum bromür) (Ek-2.2) solüsyonundan ilave edildi. Kuvvetli mutajen ve toksik olan Etidiyum bromür içeren çözeltilerle çalışırken her zaman eldiven kullanıldı.

4. Agaroz çözeltisi, sıcaklığı 45-50 °C’ye (el yakmayacak sıcaklığa) gelinceye kadar soğutuldu.

5. Ilık agaroz çözeltisi hava kabarcığı oluşturulmadan dikkatlice jel dökme kabına

döküldü.

6. Jel, oda sıcaklığında yaklaşık 30-45 dakikada polimerize olması beklenildi.

7. Jel elektroforez tankına alındı, tankın içerisine üzerini örtecek kadar 1 X TBE tamponu ilave edildi. Taraklar dikkatlice çekilerek yükleme yapmak için kuyucuklar hazır hale getirildi.

3.3.3. Örneklerin Agaroze Jele Yüklene ve Yürütülmesi

Kontrol edilmek istenen DNA örnekleri jel yükleme tamponu (Loading dye) (Ek-2.3) ile birlikte yüklendi.

Jel yükleme (veya DNA yükleme) tamponu; örneğin yoğunluğunu arttırarak DNA'nın kuyucuğun içine düzgün olarak aktarılmasını sağlar. Örneği renklendirerek kuyulara yüklenme işlemini basit hale getirir. Elektriksel alanda örneklerin göç hareketinin takip edilmesi sırasında kolaylık sağlar.

- Jelin sağındaki veya solundaki ilk kuyuya moleküler ağırlığı bilinen marker DNA'dan 5µl yüklendi.
- Mikropipet ile 5 µl PZR ürünü ile 1 µl Bromfenolmavisi içeren 6X yükleme tamponu karıştırıldı. Toplamı 6 µl olan karışım kuyucuklara yüklendi. 100 voltta 60 dakika elektrik akımı altında yürütüldü.
- Jel UVİdoc cihazında ultraviyole ışık altında görüntülendi ve jel görüntüleri diskete kaydedildi.

3.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yönteminin Uygulanması

PZR yöntemi, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki dizisi bilinen herhangi bir bölgenin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ve hızlı in-vitro DNA sentez yöntemidir.

PZR reaksiyonunun hazırlanmasında temel olarak sırasıyla şu aşamalar takip edildi:

- Reaksiyonda kullanılacak DNA'lar ve çözeltiler -20°C'tan alınıp çözündürüldü.
- 200 µl'lik PZR tüpleri üzerlerine örnek numarası yazılarak hazırlandı.
- Tüm DNA örnekleri ve çözeltiler önce vortekslendi, daha sonra kısa bir süre santrifüj edildi.

- Reaksiyon hacmini tamamlamak için steril bidistile su kullanıldı.
- PZR miks hazırlamak için 200 µl'lik PZR tüpüne daha önce hesaplanan miktarlarda PZR tamponu, primerler, dNTP miks ve Taq polimeraz eklendi.
- Tüp önce vortekslendi, daha sonra kısa bir süre santrifüj edildi.
- Numaralandırılmış her bir PZR tüpüne önceden hesap edilen miktarlarda su ve numarasına ait DNA eklendi.
- Daha sonra PZR miks tüplere eşit olarak dağıtıldı.
- Böylece tüplerin her birine tüm PZR bileşenleri eklenmiş oldu.
- Tüpler önce vortekslendi, daha sonra kısa bir süre santrifüj edildi.
- Tüpler önceden programlanmış thermal cycler'a yerleştirildi ve cihaz çalıştırıldı.

3.3.4.1 *TNF-α* Geni 308 Promotor Bölgesi içi PZR Yönteminin Uygulanması

. Çalışmamızda *TNF-α* geninin 308 promotor bölgesini çoğaltmak için Park ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandıkları primerler seçilmiştir⁸⁵. Kullanılan primer çiftlerinin dizileri aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. *TNF-α* geni 308 promotor bölgesi amplifikasyonu için kullanılan primer çiftleri⁸⁵

Primer F	5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3'
Primer R	5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'

Çalışmamıza uygun amplifikasyon koşullarını saptamak için çeşitli denemeler yapıldı. Her denemede sadece bir değişken değiştirilerek primerlerin, Taq polimerazın ve dNTP'nin farklı konsantrasyonları ile PZR programında farklı ısı döngüleri ve annealing (yapışma) ısıları denemeleri yapıldı. En iyi amplifikasyonun görüldüğü koşullar, bütün PZR reaksiyonları için kullanıldı.

PZR reaksiyonunu gerçekleştirmek için kullanılan malzemelerin tümü ticari olarak satın alınmıştır. Amplifiye olan ürünler ileri ki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de saklandı

Çizelge 3.2. TNF- α geni 308 promotor bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleşmesinde kullanılan maddeler ve miktarları

Reaksiyon karışımı	Kullanılan miktar	Son konsantrasyon
10X PZR tamponu	2.5 μ l	1X PZR tamponu
dNTP	0.25 μ l	25mM
Taq polimeraz enzimi	0.5 μ l	0,05 U/ μ l
Primer F	1 μ l	10 pmol
Primer R	1 μ l	10 pmol
Genomik DNA	3 μ l	100-200 ng
Bidistile su	16,75 μ l	-
Toplam Hacim :	25 μ l	

Çizelge 3.3. TNF- α geni 308 promotor bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleştiği PZR programı ısı döngüleri

Döngüler	Sıcaklık	Süre
1. Ön denaturasyon	94.0°C	4dk
2. Denaturasyon*	94.0°C	30 sn
3. Yapışma* (Annealing)	58.0°C	20 sn
4. Sentez* (Extension)	72.0°C	35 sn
5. * Her seferinde ikinci basamağa dönerek, toplamda 35 döngü		
6. Son uzama (Final extension)	72.0°C	4 dk
7. Bekletme	4.0°C	∞

3.3.4.2 TGF- β Geni 509 Promotor Bölgesi için PZR Yönteminin Uygulanması

Çalışmamızda TGF- β geninin 509 promotor bölgesini çoğaltmak için de Su ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandıkları primerler seçilmiştir⁸⁶. Kullanılan primer çiftlerinin dizileri aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. TGF- β geni 509 promotor bölgesi amplifikasyonu için kullanılan primer çiftleri⁸⁶

Primer F	5'-CCAGCTAAGGCATGGCACCG-3'
Primer R	5'-GCGGTGTGGGTCACCAGAGA-3'

Çalışmamıza uygun amplifikasyon koşullarını saptamak için çeşitli denemeler yapıldı. Her denemede sadece bir değişken değiştirilerek primerlerin, Taq polimerazın ve dNTP'nin farklı konsantrasyonları ile PZR programında farklı ısı döngüleri ve annealing (yapışma) ısıları denemeleri yapıldı. En iyi amplifikasyonun görüldüğü koşullar, bütün PZR reaksiyonları için kullanıldı.

Çizelge 3.5. TGF- β geni 509 promotor bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleşmesinde kullanılan maddeler ve miktarları

Reaksiyon karışımı	Kullanılan miktar	Son konsantrasyon
10X PZR tamponu	2.5 μ l	1X PZR tamponu
dNTP	0.25 μ l	25mM
Taq polimeraz enzimi	0.5 μ l	0,05 U/ μ l
Primer F	1 μ l	10 pmol
Primer R	1 μ l	10 pmol
Genomik DNA	3 μ l	100-200 ng
Bidistile su	16,75 μ l	-
Toplam Hacim :	25 μ l	

Çizelge 3.6. TGF- β geni 509 promotor bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleştiği PZR programı ısı döngüleri

Döngüler	Sıcaklık	Süre
1. Ön denaturasyon	94.0°C	4dk
2. Denaturasyon*	94.0°C	45 sn
3. Yapışma* (Annealing)	61.0°C	30 sn
4. Sentez* (Extension)	72.0°C	30 sn
5. * Her seferinde ikinci basamağa dönerek, toplamda 35 döngü		
6. Son uzama (Final extension)	72.0°C	10 dk
7. Bekletme	4.0°C	∞

3.3.4.3 *TGF-β* Geni 869 Bölgesi içi PZR Yönteminin Uygulanması

Çalışmamızda *TGF-β* geninin 869 bölgesini çoğaltmak için de Buraczynska ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandıkları primerler seçilmiştir⁸⁷. Kullanılan primer çiftlerinin dizileri aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.7. *TGF-β* geni 869 bölgesi amplifikasyonu için kullanılan primer çiftleri⁸⁷

Primer F	5'-ACCACACCAGAACTGTTTCGC-3'
Primer R	5'-AGTAGCCACAGCAGCGGTAGCAGCTGC-3'

Çalışmamıza uygun amplifikasyon koşullarını saptamak için çeşitli denemeler yapıldı. Her denemede sadece bir değişken değiştirilerek primerlerin, Taq polimerazın ve dNTP'nin farklı konsantrasyonları ile PZR programında farklı ısı döngüleri ve annealing (yapışma) ısıları denemeleri yapıldı. En iyi amplifikasyonun görüldüğü koşullar, bütün PZR reaksiyonları için kullanıldı.

Çizelge 3.8. *TGF-β* geni 869 bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleşmesinde kullanılan maddeler ve miktarları

Reaksiyon karışımı	Kullanılan miktar	Son konsantrasyon
10X PZR tamponu	2.5 µl	1X PZR tamponu
dNTP	0.25 µl	25mM
Taq polimeraz enzimi	0.5 µl	0,05 U/ µl
Primer F	1 µl	10 pmol
Primer R	1 µl	10 pmol
Genomik DNA	5 µl	200-300 ng
Bidistile su	14,75 µl	-
Toplam Hacim :	25 µl	

Çizelge 3.9. TGF- β geni 509 promotor bölgesinin optimal amplifikasyonlarının gerçekleştiği PZR programı ısı döngüleri

Döngüler	Sıcaklık	Süre
1. Ön denaturasyon	94.0°C	3dk
2. Denaturasyon*	94.0°C	50 sn
3. Yapışma* (Annealing)	67.0°C	1 dk
4. Sentez* (Extension)	72.0°C	1 dk
5. * Her seferinde ikinci basamağa dönerek, toplamda 40 döngü		
6. Son uzama (Final extension)	72.0°C	10 dk
7. Bekletme	4.0°C	∞

Örneklerin amplifikasyonu ve elde edilen bantların kontrolü önce anlatıldığı gibi (3.3.3), örnekler agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

3.3.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism) Yönteminin Uygulanması

Agaroz jel elektroforeziyle amplifikasyon kontrolü yapıldı, amplifikasyon görülen örnekler restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesim reaksiyonuna alındı. Kesim reaksiyonunun gerçekleştirilmesi için aşağıda belirtilen şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı.

Çizelge 3.10. RFLP reaksiyon koşulları

Reaksiyon Karışımı	Kullanılan Miktar (μ l)
Tampon	2.0 μ l
Restriksiyon Enzimi	0.5 μ l
Amplifiye Ürün (PZR ürünü)	12.5 μ l
Steril Bidistile Su	5 μ l
Toplam Hacim	20 μ l
Reaksiyon Isısı	37°C
Reaksiyon Süresi	17 saat

Kesim reaksiyonun sonlandırılması ve kesim ürünlerinin agaroz jelde yürütülmeye hazır hale getirilmesi için reaksiyon süresi sonunda, örnekler 5 µl Bromfenol mavisi (6X) (Ek 2.3) ile karıştırıldı.

3.3.5.1 *TNF-α* Geni 308 Promotor Polimorfizminin Belirlenmesi İçin *NcoI* Restriksiyon Enzimi İle Kesimi

Park ve arkadaşlarının yöntemine göre *NcoI* restriksiyon enzimi ile kesim yapılmıştır⁸⁵. *NcoI*, *Nocardia coralline*'den elde edilen bir restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA' yı;

5'-C↓CATGG...-3'

3'-GGTAC↑C...-5'

dizisinden tanıyarak yapışkan uçlu kesim yapmaktadır. PZR ile elde edilen 107 bç'lik hedef gen bölgesi *NcoI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede guanin içeren allel (G) *NcoI* kesim noktası taşımaktadır. Guaninden adenine (G→A) bir nükleotit değişimi varsa *NcoI* enziminin tanıma bölgesi bulunmaz (A alleli). Guanin nükleotitinden adenin nükleotitine değişimi olmayan (GG genotipli) bireylerde 87 ve 20 bç'lik iki bant, heterozigot bireylerde (GA genotipli) 107, 87 ve 20 bç'lik üç bant, her iki allelinde değişim görülen bireylerde (AA genotipli) 107 bç'lik tek bant görülecektir.

Örneklerde elde edilen kesim ürünleri 3.3.3'te anlatıldığı gibi, agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

3.3.5.2 *TGF-β* Geni 509 Promotor Polimorfizminin Belirlenmesi İçin *Eco81I* Restriksiyon Enzimi Kesimi

Su ve arkadaşlarının yöntemine göre *Eco81I* restriksiyon enzimi ile kesim yapılmıştır⁸⁶. *Eco81I*, *Escherichia coli* *RFL81*'den elde edilen bir restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA' yı;

5'-CC↓TNAGG...-3'

3'-GGANT↑CC...-5'

dizisinden tanıyarak yapışkan uçlu kesim yapmaktadır. PZR ile elde edilen 400 bç'lik hedef gen bölgesi *Eco81I* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede sitozin

içeren allel (C) *Eco81I* kesim noktası taşımamaktadır. Sitozinden timine (C→T) bir nükleotit değişimi varsa *Eco81I* enziminin tanıma bölgesi oluşur (T alleli). Sitozin nükleotitinden timin nükleotitine değişimi olmayan (CC genotipli) bireylerde 400 bp'lik tek bant, heterozigot bireylerde (CT genotipli) 400 ve 200 bp'lik iki bant, her iki allelinde değişim görülen bireylerde (TT genotipli) 200 bp'lik tek bant görülecektir.

Örneklerde elde edilen kesim ürünleri 3.3.3'te anlatıldığı gibi, agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

3.3.5.3 *TGF-β* Geni 869 Polimorfizminin Belirlenmesi İçin *PstI* Restriksiyon Enzimi İle Kesimi

Buraczynska ve arkadaşlarının yöntemine göre *PstI* restriksiyon enzimi ile kesim yapılmıştır⁸⁷. *PstI*, *Providencia stuartii*'den elde edilen bir restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA' yı;

5'-CTGCA↓G...-3'

3'-G↑ACGTC...-5'

dizisinden tanıyarak yapışkan uçlu kesim yapmaktadır. PZR ile elde edilen 110 bp'lik hedef gen bölgesi *PstI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede timin içeren allel (T) *PstI* kesim noktası taşımaktadır. Timinden sitoze (T→C) bir nükleotit değişimi varsa *PstI* enziminin tanıma bölgesi ortadan kalkar (C alleli). Timin nükleotitinin sitoze değişimi olmayan (TT genotipli) bireylerde 84 ve 26 bp'lik tek bant, heterozigot bireylerde (TC genotipli) 110, 86 ve 24 bp'lik üç bant, her iki allelinde değişim görülen bireylerde (CC genotipli) 110 bp'lik tek bant görülecektir.

Örneklerde elde edilen kesim ürünleri 3.3.3'te anlatıldığı gibi, agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

3.4. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde SPSS 13.0 paket programı kullanıldı⁸⁸. Hasta ve kontrol grubunun klinik özellikleri, ortalama ve standart sapmaları bulunarak değerlendirildi. Hasta ve kontrol grubu genotip dağılımları ve allel frekansları karşılaştırıldı. Genotip ve allel frekansları Pearson's Ki kare testi kullanılarak tespit edildi. Tüm testlerde istatistiksel önem değeri $p \leq 0,05$ olarak alındı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniğine başvuran KOAH tanısı almış 83 hasta, 35 kontrol olmak üzere toplam 118 birey araştırmaya dahil edildi. Hasta grubunda 71 erkek (%85,5) 12 kadın (%14,5), kontrol grubunda ise 29 erkek (%82,9), 6 kadın (%17,1) birey vardır. Çalışmaya katılan tüm bireylere solunum fonksiyon testi yapıldı. Tüm bireylerin yaş, cinsiyet, sigara içip/içmediği, sigara içiyorsa ne kadar süredir içtiği ve günlük sigara tüketim miktarı, hasta bireylerden ne kadar zamandır hasta olduğu yapılan anketlerle tespit edildi. Toplanan kanlardan tuzla çöktürme yöntemi ile elde edilen DNA'lar PZR yöntemi kullanılarak TNF- α geni G-308A promotor bölgesi, TGF- β geni C-509T promotor bölgesi ve TGF- β geni T869C bölgesi polimorfizmleri araştırıldı.

Hasta ve kontrol grubu; yaş, kaç yıl önce sigarayı bıraktığı, sigara içme süresi, sigara içme miktarı, paket/yıl sigara miktarı, post-br FEV1 yüzdesi, post-br FEV1 litrede, post-br FEV1/FVC yüzdesi ve hastalık süresi ortalamaları bakımından değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1). Hasta grubunda kontrol grubuna göre yaş, sigara içme süresi, sigara içme miktarı ortalamaları yüksek bulunmuşken; sigara bırakma süresi ortalaması daha düşük bulunmuştur. Beklenildiği şekilde hasta grubunda post-br FEV1 (%), post-br FEV1 (lt), post-br FEV1/FVC (%) ortalamaları kontrol grubuna göre daha düşük, paket/yıl sigara içme miktarı daha yüksek bulunmuştur(Çizelge 4.1).

Hastalığın evrelerine göre değerlendirme yapıldığında (Çizelge 4.2); hastalığın evresi ilerledikçe hastanın ne kadar süre önce sigarayı bıraktığı, sigara içme süresi, paket/yıl sigara miktarı ortalamaları artmaktadır ve aralarında anlamlı bir ilişki yoktur ($p>0.05$). Hastalık süresi ortalamaları evreler ilerledikçe artmakta, post-br FEV1 değeri ortalamaları azalmaktadır ve aralarında anlamlı bir ilişki vardır ($p=0.017$, çizelge 4.2).

Hasta ve kontrol grubu bireyleri oluşturulması; hasta grubunun KOAH evrelerine göre sınıflandırılması için KOAH çalışmalarında yaygın olarak kabul görmüş, GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) raporlarında tanımlanmış kriterler kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. Hasta ve kontrol grubu genel özellikleri

	Hasta		Kontrol		
	n	Ortalama	n	Ortalama	p değeri
Hasta yaşı (yıl)	83	62,36±10,729	35	54,83±8,252	000
Ne kadar önce sigarayı bıraktığı (yıl)	48	7,77±6,162	14	8,79±8,313	0,619
Sigara içme süresi (yıl)	82	36,74±11,953	35	28,86±9,114	0,001
Sigara miktarı (gün/paket)	82	1,421±0,5852	35	1,157±0,3156	0.013
Paket/yıl sigara miktarı	82	52,28±26,918	35	32,93±11,771	000
Post-br FEV1 %	83	59,316±20,6734	35	93,677±11,0711	000
Post-br FEV1 lt	83	1,8188±0,80553	35	3,0457±0,60535	000
Post-br FEV1/FVC %	83	56,572±10,5371	35	79,795±5,6980	000
Hastalık süresi (yıl)	83	4,96±4,410	0	0	-

Çizelge 4.2. Evrelere göre hasta grubu özellikleri

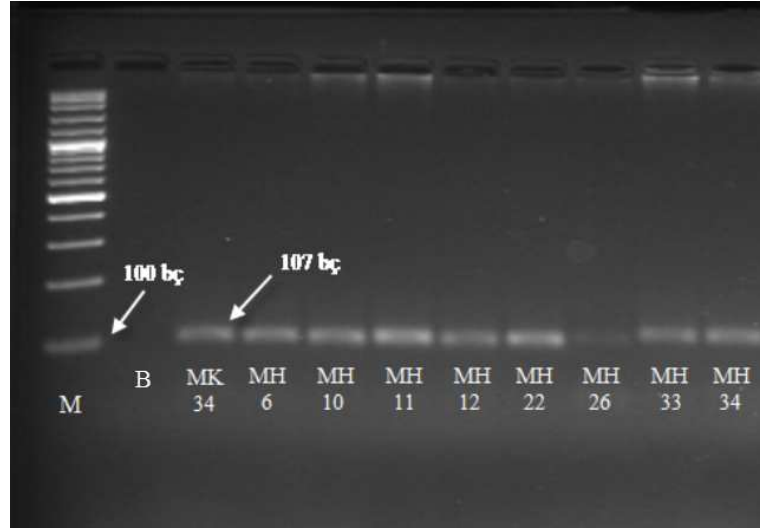
	Hafif (Evre 1)		Orta (Evre 2)		Ağır (Evre 3 ve 4)		
	n	Ortalama	n	Ortalama	n	Ortalama	p değeri
Hasta Yaşı	20	40±11,189	30	62,13±10,092	33	65,58±10,112	0,025
Kaç yıl önce sigarayı bıraktığı	11	2±8,968	14	5,71±5,312	23	8,78±4,899	0,331
Sigara içme süresi (yıl)	20	15±12,074	29	36,10±9,298	33	39,58±13,493	0,143
Sigara içme miktarı	20	1,0±0,598	29	1,466±0,680	33	1,394±0,496	0,879
Paket/yıl sigara miktarı	20	17±25,541	29	53,34±28,377	33	55,39±26,519	0,429
Post-br FEV1 %	20	70,9±7,639	30	64,866±8,754	33	38,379±8,971	000
Post-br FEV1 lt	20	1,58±0,505	30	1,8920±0,384	33	1,2012±0,679	000
Post-br FEV1/FVC %	20	52,4±5,594	30	60,632±6,715	33	47,112±7,789	000
Hastalık süresi (yıl)	20	1±2,417	30	4,17±3,869	33	6,61±5,291	0,017

4.1. Moleküler Genetik Analizler

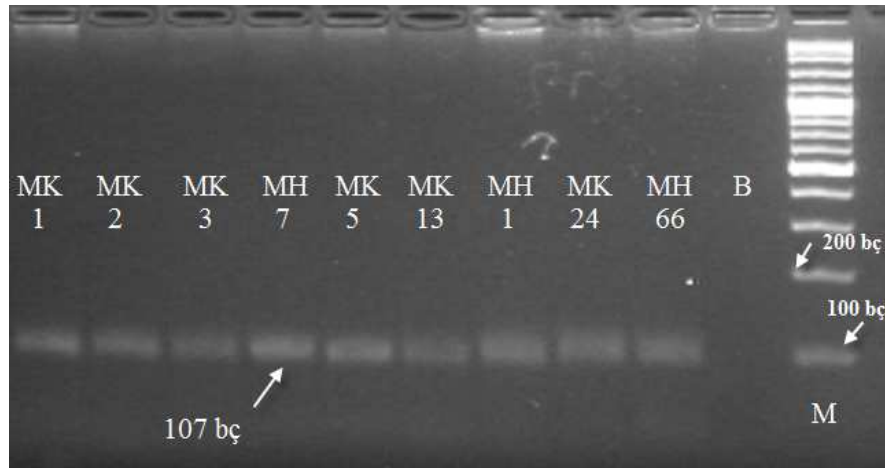
4.1.1. TNF- α Geni 308 Promotor Polimorfizmi Genetik Analizleri

TNF- α geni 308 promotor bölgesinin 107 bç'lik kısmı PZR yöntemi ile çoğaltıldı. Bazı örneklerin PZR ile çoğaltılmış TNF- α promotor bölgesinin görüntüleri Şekil 4.1 ve 4.2'de verilmiştir.

Şekil 4.1. Bazı örneklerin PZR yöntemi ile çoğaltılan TNF- α 308 promotor bölgesi agaroz jel bant görüntüleri. M: marker DNA'lar, B: negatif kontrol (blank), MH: hasta, MK: Kontrol, Bantlar 107 bç büyüklüğündedir.

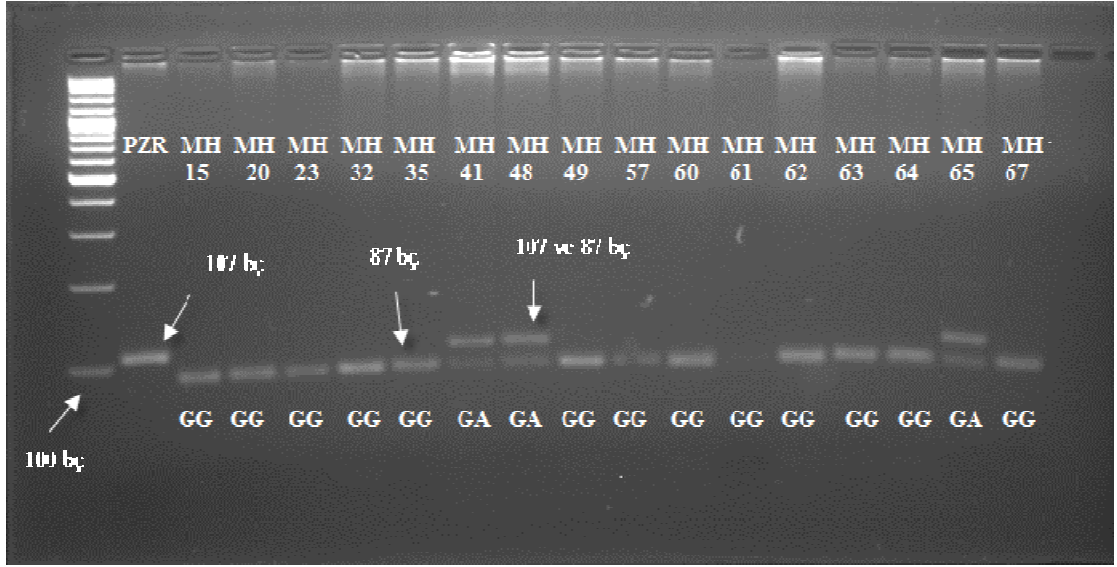


Şekil 4.2. Bazı örneklerin PZR yöntemi ile çoğaltılan TNF- α 308 promotor bölgesi agaroz jel bant görüntüleri. M: marker DNA'lar, B: negatif kontrol (blank), MH: hasta, MK: Kontrol,, Bantlar 107 bç büyüklüğündedir.

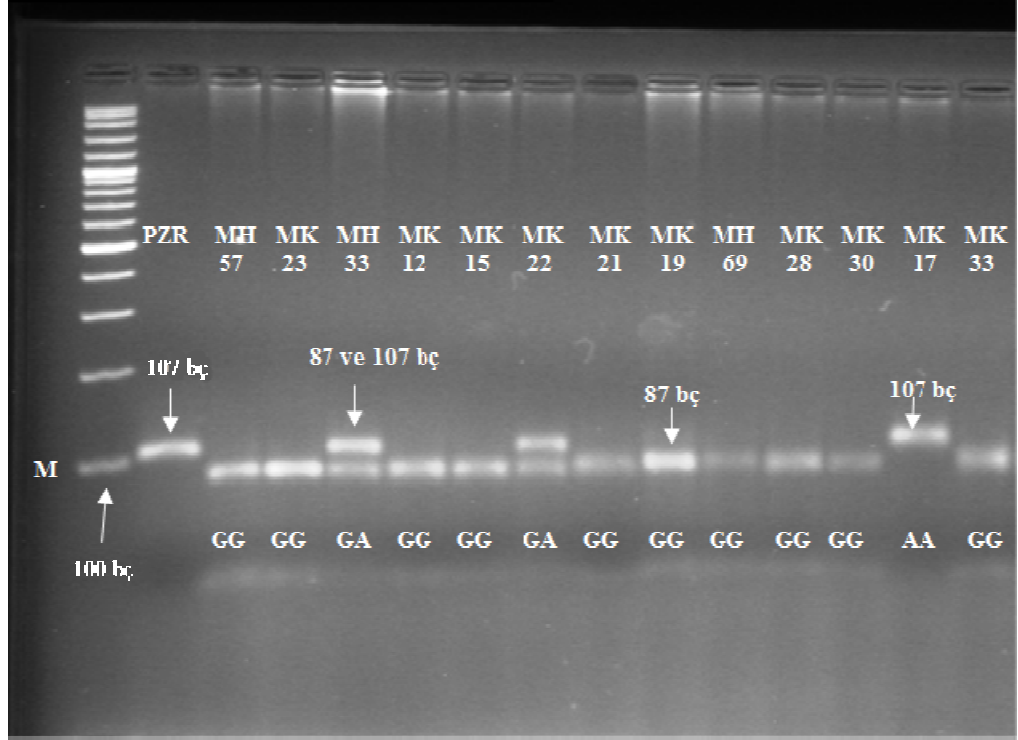


TNF- α geni 308 promotor bölgesinin 107 bç'lik kısmı PZR ile çoğaltıldı, hedef gen bölgesi *NcoI* restriksiyon enzimi ile kesildi. Bu bölgede guanin içeren allel (G) *NcoI* kesim noktası taşımaktadır. Guaninden adenine (G→A) bir nükleotit değişimi varsa *NcoI* enziminin tanıma bölgesi bulunmaz (A alleli). Guanin nükleotitinden adenin nükleotitine değişimi olmayan (GG genotipli) bireylerde 87 ve 20 bç'lik iki bant, heterozigot bireylerde (GA genotipli) 107, 87 ve 20 bç'lik üç bant, her iki allelinde değişim görülen bireylerde (AA genotipli) 107 bç'lik tek bant görülecektir (şekil 4.3, 4.4). GG ve GA genotipli bireylerde görülmesi gereken kesim ürünlerinden 20 bç'lik bant agaroz jel elektroforezinde görüntülenememesinden dolayı 87 ve 107 bç dikkate alınarak değerlendirme yapıldı.

Şekil 4.3. Bazı örneklerin RFLP yöntemi kullanılarak *NcoI* restriksiyon enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel bant görüntüleri. PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu ürünü, MH: Hasta



Şekil 4.4. Bazı örneklerin RFLP yöntemi kullanılarak *NcoI* restriksiyon enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel bant görüntüleri. PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu ürünü, MH: Hasta, MK: Kontrol



Çalışmamıza dahil olan 83 KOAH'lı bireyin TNF alfa 308 promotor bölgesi polimorfizmleri açısından; 70 bireyin GG, 12 bireyin GA ve 1 bireyin AA genotipine sahip olduğu RFLP analiziyle bulunmuştur. Çalışmamıza dahil edilen 35 normal bireyin ise; 29 bireyin GG, 4 bireyin GA ve 2 bireyin AA genotipine sahip olduğu RFLP analiziyle bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubundaki bireylerin genotipleri kodlarına göre Çizelge 4.3 ve 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Hastaların TNF- α 308 promotor bölgesi için *NcoI* kesim bantlarına göre belirlenen genotipleri

Hasta Numarası	TNF- α 308	Hasta Numarası	TNF- α 308	Hasta Numarası	TNF- α 308	Hasta Numarası	TNF- α 308
MH 1	GA	MH 26	GA	MH 51	*	MH 76	GG
MH 2	GG	MH 27	GG	MH 52	GG	MH 77	GG
MH 3	GG	MH 28	GG	MH 53	GG	MH 78	GG
MH 4	GG	MH 29	GG	MH 54	GG	MH 79	GG
MH 5	GA	MH 30	GG	MH 55	GG	MH 80	GG
MH 6	GG	MH 31	GG	MH 56	GG	MH 81	GG
MH 7	GG	MH 32	GG	MH 57	GG	MH 82	GA
MH 8	GG	MH 33	GA	MH 58	GG	MH 83	GG
MH 9	GG	MH 34	GG	MH 59	GG	MH 84	GG
MH 10	GG	MH 35	GG	MH 60	GG		
MH 11	GA	MH 36	GG	MH 61	GG		
MH 12	GG	MH 37	GA	MH 62	GG		
MH 13	GG	MH 38	GG	MH 63	GG		
MH 14	GG	MH 39	GG	MH 64	GG		
MH 15	GG	MH 40	GG	MH 65	GA		
MH 16	GG	MH 41	GA	MH 66	GG		
MH 17	AA	MH 42	GG	MH 67	GG		
MH 18	GG	MH 43	GG	MH 68	GG		
MH 19	GA	MH 44	GG	MH 69	GG		
MH 20	GG	MH 45	GG	MH 70	GG		
MH 21	GG	MH 46	GG	MH 71	GG		
MH 22	GG	MH 47	GG	MH 72	GG		
MH 23	GG	MH 48	GA	MH 73	GG		
MH 24	GG	MH 49	GG	MH 74	GA		
MH 25	GG	MH 50	GG	MH 75	GG		

* MH51 kod numaralı hasta bireye ait genotip tespit edilemedi, bu sebeple çalışma dışı bırakıldı

Çizelge 4.4. Kontrollerin TNF- α 308 promotor bölgesi için NcoI kesim bantlarına göre belirlenen genotipleri

Kontrol Numarası	TNF- α 308	Kontrol Numarası	TNF- α 308	Kontrol Numarası	TNF- α 308	Kontrol Numarası	TNF- α 308
MK 1	GG	MK 11	GG	MK 21	GG	MK 31	GG
MK 2	GG	MK 12	GG	MK 22	GA	MK 32	GG
MK 3	GG	MK 13	GA	MK 23	GG	MK 33	GG
MK 4	AA	MK 14	GG	MK 24	GG	MK 34	GG
MK 5	GG	MK 15	GG	MK 25	GG	MK 35	GG
MK 6	GA	MK 16	GG	MK 26	GG		
MK 7	GG	MK 17	AA	MK 27	GG		
MK 8	GG	MK 18	GG	MK 28	GG		
MK 9	GG	MK 19	GG	MK 29	GA		
MK 10	GG	MK 20	GG	MK 30	GG		

TNF- α geni 308 promotor polimorfizmlerinin genotip dağılımları ve allel frekansları SPSS 13.0 Ki-kare testi kullanılarak analiz edilmiştir. Hasta ve kontrol grupları genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Çizelge 4.5, $p=0.343$). Aynı şekilde hasta ve kontrol grubu allel frekansları karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.470$).

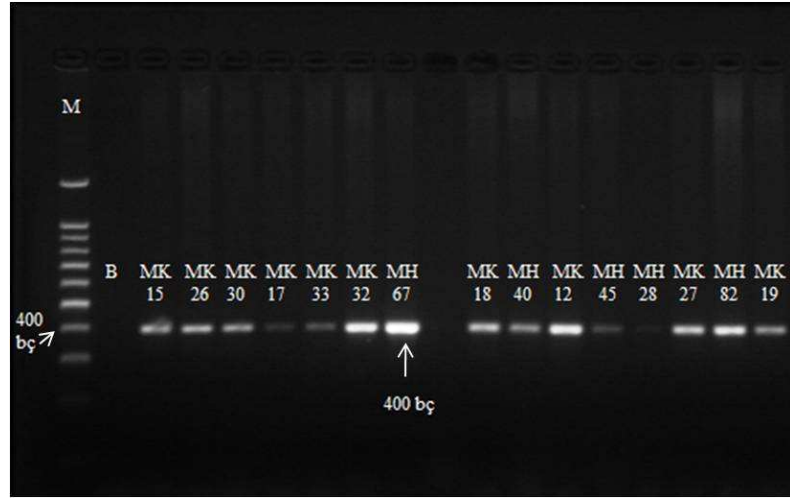
Çizelge 4.5. Hasta ve kontrol gruplarının TNF- α 308 promotor bölgesi için genotip dağılımları ve allel frekansları

TNF alfa 308 genotipi	Hasta		Kontrol		P değeri
	n	%	n	%	
GG	70	84,3	29	82,9	0,343
GA	12	14,5	4	11,4	
AA	1	1,2	2	5,7	
GG+GA	82	98,8	33	94,3	0,155
AA	1	1,2	2	5,7	
G	152	91,6	62	88,6	0,470
A	14	8,4	8	11,4	

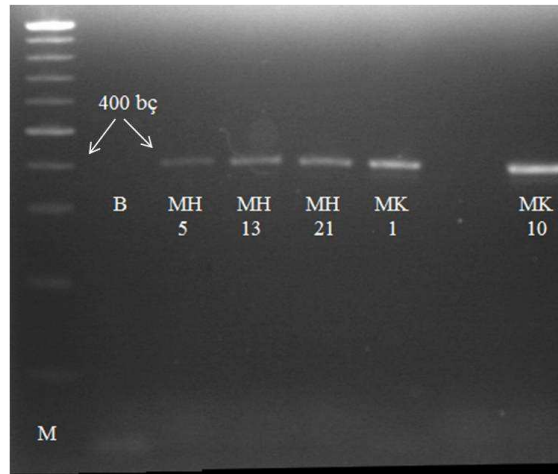
4.1.2. TGF- β Geni 509 Promotor Polimorfizmi Genetik Analizleri

TGF- β geni 509 promotor bölgesinin 400 bç'lik kısmı PZR yöntemi ile çoğaltıldı. Bazı örneklerin PZR ile çoğaltılmış TGF- β promotor bölgesinin görüntüleri Şekil 4.5 ve 4.6'da verilmiştir.

Şekil 4.5. Bazı örneklerin PZR yöntemi ile çoğaltılan TGF- β 509 promotor bölgesi agaroz jel bant görüntüleri. M: marker DNA'lar, B: negatif kontrol (blank),, MH: Hasta, MK: Kontrol, bantlar 400 bç büyüklüğündedir.

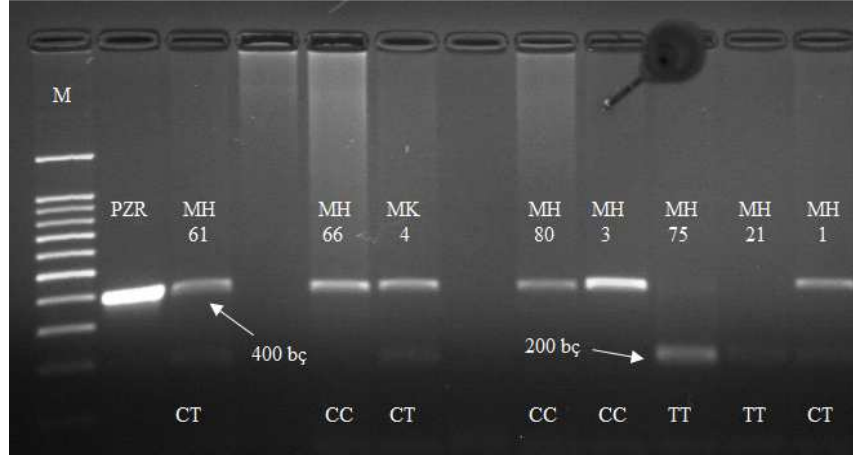


Şekil 4.6. Bazı örneklerin PZR yöntemi ile çoğaltılan TGF- β 509 promotor bölgesi agaroz jel bant görüntüleri. M: marker DNA'lar, B: negatif kontrol (blank),, MH: Hasta, MK: Kontrol, bantlar 400 bç büyüklüğündedir.

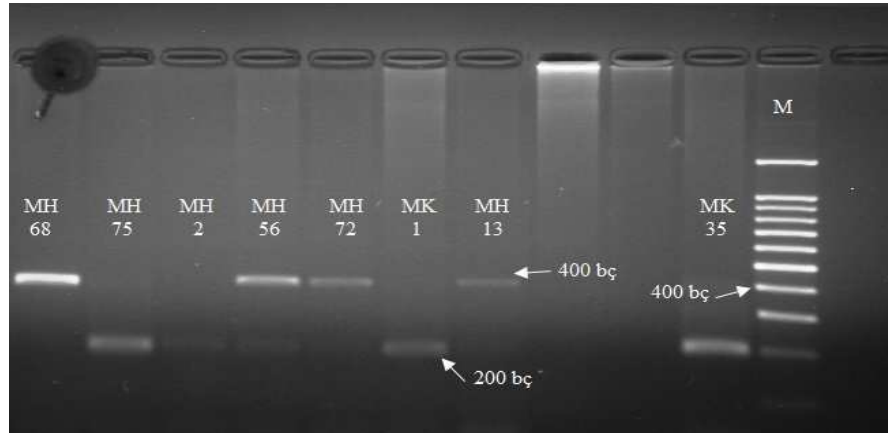


PZR ile elde edilen 400 bç'lik hedef gen bölgesi *Eco81I* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede sitozin içeren allel (C) *Eco81I* kesim noktası taşımamaktadır. Sitozinden timine (C→T) bir nükleotit değişimi varsa *Eco81I* enziminin tanıma bölgesi oluşur (T alleli). Sitozin nükleotitinden timin nükleotitine değişimi olmayan (CC genotipli) bireylerde 400 bç'lik tek bant, heterozigot bireylerde (CT genotipli) 400 ve 200 bç'lik iki bant, her iki allelinde değişim görülen bireylerde (TT genotipli) 200 bç'lik tek bant görülecektir (şekil 4.7 ve 4.8).

Şekil 4.7. Bazı örneklerin RFLP yöntemi kullanılarak *Eco81I* restriksiyon enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel bant görüntüleri. PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu ürünü, MH: Hasta, MK: Kontrol



Şekil 4.8. Bazı örneklerin RFLP yöntemi kullanılarak *Eco81I* restriksiyon enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel bant görüntüleri. PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu ürünü, MH: Hasta, MK: Kontrol



Çalışmamıza dahil olan 83 KOAH'lı bireyin TGF- β 509 promotor bölgesi polimorfizmleri açısından; 43 bireyin CC, 18 bireyin CT ve 22 bireyin TT genotipine sahip olduğu RFLP analiziyle bulunmuştur. Çalışmamıza dahil edilen 35 normal bireyin ise; 11 bireyin CC, 13 bireyin CT ve 11 bireyin TT genotipine sahip olduğu RFLP analiziyle bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubundaki bireylerin genotipleri kodlarına göre Çizelge 4.7 ve 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Hastaların TGF- β 509 promotor bölgesi için *Eco81I* kesim bantlarına göre belirlenen genotipleri

Hasta Numarası	TGF- β 509	Hasta Numarası	TGF- β 509	Hasta Numarası	TGF- β 509	Hasta Numarası	TGF- β 509
MH 1	CT	MH 23	TT	MH 45	CC	MH 67	TT
MH 2	TT	MH 24	CC	MH 46	CC	MH 68	CC
MH 3	CC	MH 25	TT	MH 47	CC	MH 69	CT
MH 4	CT	MH 26	CC	MH 48	TT	MH 70	CC
MH 5	CT	MH 27	TT	MH 49	TT	MH 71	CC
MH 6	CC	MH 28	CC	MH 50	CT	MH 72	CC
MH 7	CC	MH 29	CC	MH 51	*	MH 73	CC
MH 8	CC	MH 30	CC	MH 52	TT	MH 74	CC
MH 9	CT	MH 31	CC	MH 53	CC	MH 75	TT
MH 10	CC	MH 32	CT	MH 54	TT	MH 76	CC
MH 11	CC	MH 33	TT	MH 55	CC	MH 77	CC
MH 12	CT	MH 34	CC	MH 56	CT	MH 78	CC
MH 13	CC	MH 35	CC	MH 57	CC	MH 79	CC
MH 14	CT	MH 36	CT	MH 58	TT	MH 80	CC
MH 15	TT	MH 37	TT	MH 59	TT	MH 81	TT
MH 16	CC	MH 38	TT	MH 60	TT	MH 82	CT
MH 17	TT	MH 39	CC	MH 61	CT	MH 83	CC
MH 18	TT	MH 40	CT	MH 62	CC	MH 84	TT
MH 19	CC	MH 41	CC	MH 63	CT		
MH 20	CT	MH 42	CC	MH 64	CT		
MH 21	TT	MH 43	CC	MH 65	CT		
MH 22	CC	MH 44	CC	MH 66	CC		

* MH51 kod numaralı hasta bireye ait genotip tespit edilemedi, bu sebeple çalışma dışı bırakıldı

Çizelge 4.7. Kontrollerin TGF- β 509 promotor bölgesi için *Eco81I* kesim bantlarına göre belirlenen genotipleri

Kontrol Numarası	TGF- β 509	Kontrol Numarası	TGF- β 509	Kontrol Numarası	TGF- β 509	Kontrol Numarası	TGF- β 509
MK1	TT	MK 11	CT	MK 21	TT	MK 31	CT
MK 2	CC	MK 12	CT	MK 22	CT	MK 32	TT
MK 3	TT	MK 13	CC	MK 23	TT	MK 33	TT
MK 4	CT	MK 14	CC	MK 24	CC	MK 34	CC
MK 5	CC	MK 15	CT	MK 25	CT	MK 35	TT
MK 6	CT	MK 16	CC	MK 26	TT		
MK 7	CT	MK 17	CC	MK 27	TT		
MK 8	CC	MK 18	TT	MK 28	CC		
MK 9	CC	MK 19	TT	MK 29	CT		
MK 10	CT	MK 20	CT	MK 30	CT		

TGF- β 509 promotor polimorfizmlerinin genotip dağılımları ve allel frekansları SPSS 13.0 Ki-kare testi kullanılarak analiz edilmiştir. Hasta ve kontrol grupları genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Çizelge 4.9). Aynı şekilde hasta ve kontrol grubu allel frekansları karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

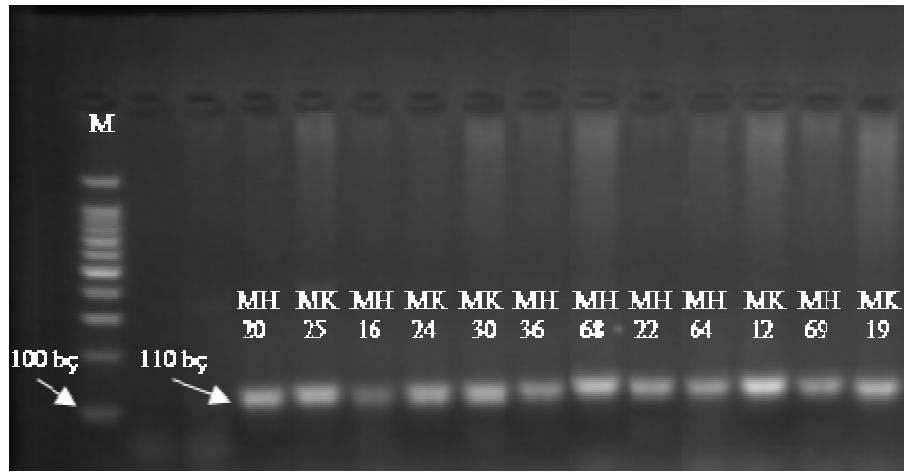
Çizelge 4.8. Hasta ve kontrol gruplarının TGF- β 509 bölgesi için genotip dağılımları ve allel frekansları

TGF beta 509 genotipi	Hasta		Kontrol		P değeri
	n	%	n	%	
CC	43	51,8	11	31,4	0,096
CT	18	21,7	13	37,2	
TT	22	26,5	11	31,4	
CC+CT	61	73,5	16	45,7	0,586
TT	22	26,5	19	54,3	
C	104	62,65	35	50,0	0,071
T	62	37,35	35	50,0	

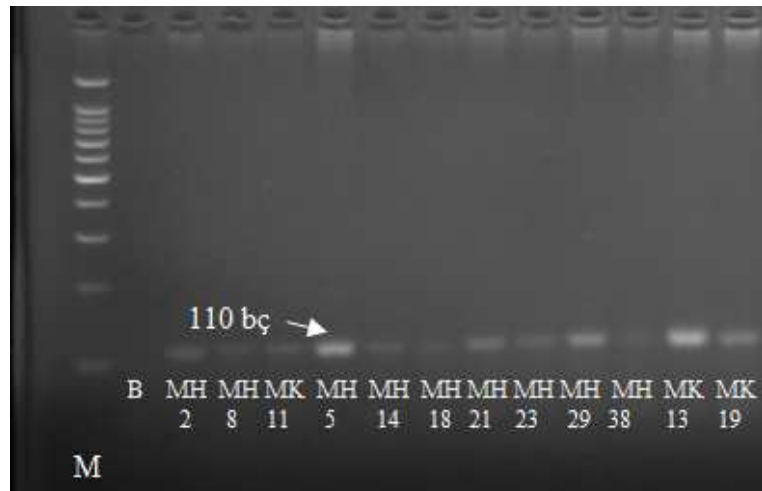
4.1.2. TGF- β Geni 869 Polimorfizmi Genetik Analizleri

TGF- β geni 869 gen bölgesinin 110 bç'lik kısmı PZR yöntemi ile çoğaltıldı. Bazı örneklerin PZR ile çoğaltılmış TGF- β promotor bölgesinin görüntüleri Şekil 4.9 ve 4.10'da verilmiştir.

Şekil 4.9. Bazı örneklerin PZR yöntemi ile çoğaltılan TGF- β 869 gen bölgesi agaroz jel bant görüntüleri. M: marker DNA'lar, B: negatif kontrol (blank), MH: Hasta, MK: Kontrol, bantlar 110 bç büyüklüğündedir.

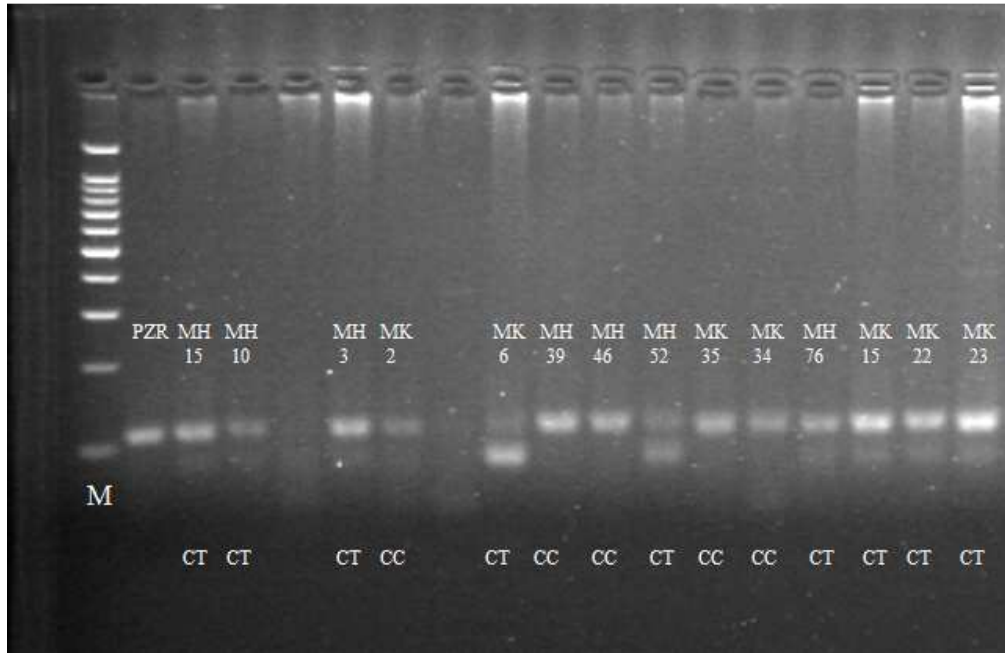


Şekil 4.10. Bazı örneklerin PZR yöntemi ile çoğaltılan TGF- β 869 gen bölgesi agaroz jel bant görüntüleri. M: marker DNA'lar, B: negatif kontrol (blank), MH: Hasta, MK: Kontrol, bantlar 110 bç büyüklüğündedir.

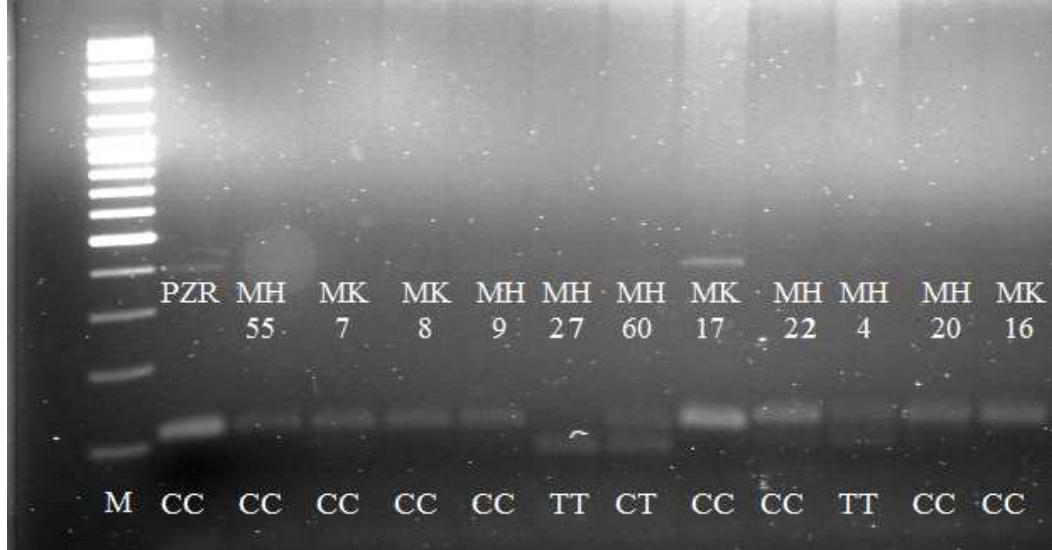


PZR ile elde edilen 110 bç'lik hedef gen bölgesi *PstI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede timin içeren allel (T) *PstI* kesim noktası taşımaktadır. Timinden sitozine (T→C) bir nükleotit değişimi varsa *PstI* enziminin tanıma bölgesi ortadan kalkar (C alleli). Timin nükleotitinin sitozine değişimi olmayan (TT genotipli) bireylerde 86 ve 24 bç'lik tek bant, heterozigot bireylerde (TC genotipli) 110, 86 ve 24 bç'lik üç bant, her iki allelinde değişim görülen bireylerde (CC genotipli) 110 bç'lik tek bant görülecektir. TC ve TT genotipli bireylerde görülmesi gereken kesim ürünlerinden 24 bç'lik bant agaroz jel elektroforezinde görüntülenememesinden dolayı 86 ve 110 bç dikkate alınarak değerlendirme yapıldı.

Şekil 4.11. Bazı örneklerin RFLP yöntemi kullanılarak *PstI* restriksiyon enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel bant görüntüleri. PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu ürünü, MH: Hasta, MK: Kontrol



Şekil 4.12. Bazı örneklerin RFLP yöntemi kullanılarak *PstI* restriksiyon enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel bant görüntüleri. PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu ürünü, MH: Hasta, MK: Kontrol



Çalışmamıza dahil olan 83 KOAH'lı bireyin TGF- β 869 bölgesi polimorfizmleri açısından; 7 bireyin TT, 24 bireyin CT ve 52 CC bireyin genotipine sahip olduğu RFLP analiziyle bulunmuştur. Çalışmamıza dahil edilen 35 normal bireyin ise; 7 bireyin TT, 9 bireyin TC ve 19 bireyin CC genotipine sahip olduğu RFLP analiziyle bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubundaki bireylerin genotipleri kodlarına göre Çizelge 4.10 ve 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.9. Hastaların TGF- β 869 bölgesi için *PstI* kesim bantlarına göre belirlenen genotipleri

Hasta Numarası	TGF- β 869	Hasta Numarası	TGF- β 869	Hasta Numarası	TGF- β 869	Hasta Numarası	TGF- β 869
MH1	CC	MH 23	CT	MH 45	CC	MH 67	CT
MH 2	TT	MH 24	CC	MH 46	CC	MH 68	CC
MH 3	CT	MH 25	CC	MH 47	CC	MH 69	CC
MH 4	CT	MH 26	CC	MH 48	TT	MH 70	CC
MH 5	CT	MH 27	TT	MH 49	CT	MH 71	CT
MH 6	CC	MH 28	CC	MH 50	CC	MH 72	CC
MH 7	CT	MH 29	CC	MH 51	*	MH 73	CC
MH 8	CC	MH 30	CT	MH 52	CT	MH 74	CC
MH 9	CC	MH 31	CC	MH 53	CC	MH 75	CT
MH 10	CC	MH 32	CT	MH 54	CT	MH 76	CT
MH 11	CC	MH 33	CT	MH 55	CC	MH 77	CC
MH 12	CC	MH 34	CC	MH 56	CC	MH 78	CC
MH 13	CC	MH 35	CC	MH 57	CT	MH 79	CC
MH 14	CC	MH 36	CC	MH 58	CC	MH 80	CC
MH 15	CT	MH 37	TT	MH 59	TT	MH 81	CT
MH 16	CC	MH 38	TT	MH 60	CT	MH 82	TT
MH 17	CT	MH 39	CC	MH 61	CC	MH 83	CC
MH 18	CC	MH 40	CC	MH 62	CC	MH 84	CT
MH 19	CC	MH 41	CT	MH 63	CC		
MH 20	CC	MH 42	CC	MH 64	CC		
MH 21	CT	MH 43	CC	MH 65	CT		
MH 22	CC	MH 44	CC	MH 66	CC		

* MH51 kod numaralı hasta bireye ait genotip tespit edilemedi, bu sebeple çalışma dışı bırakıldı

Çizelge 4.10. Kontrollerin TGF- β 869 promotor bölgesi için *PstI* kesim bantlarına göre belirlenen genotipleri

Kontrol Numarası	TGF- β 869	Kontrol Numarası	TGF- β 869	Kontrol Numarası	TGF- β 869	Kontrol Numarası	TGF- β 869
MK1	TC	MK 11	CC	MK 21	TT	MK 31	TC
MK 2	CC	MK 12	CC	MK 22	TC	MK 32	TT
MK 3	TT	MK 13	CC	MK 23	TC	MK 33	TC
MK 4	TC	MK 14	CC	MK 24	CC	MK 34	CC
MK 5	CC	MK 15	TC	MK 25	CC	MK 35	CC
MK 6	TC	MK 16	CC	MK 26	TT		
MK 7	CC	MK 17	CC	MK 27	TT		
MK 8	CC	MK 18	TT	MK 28	CC		
MK 9	CC	MK 19	TT	MK 29	TC		
MK 10	CC	MK 20	CC	MK 30	CC		

TGF- β 869 polimorfizmlerinin genotip dağılımları ve allel frekansları SPSS 13.0 Ki-kare testi kullanılarak analiz edilmiştir. Hasta ve kontrol grupları genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Çizelge 4.12, $p=0.207$). Aynı şekilde hasta ve kontrol grubu allel frekansları karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır($p=0,110$).

Çizelge 4.11. Hasta ve kontrol gruplarının TGF- β 869 bölgesi için genotip dağılımları ve allel frekansları

TGF beta 869 genotipi	Hasta		Kontrol		P değeri
	n	%	n	%	
TT	7	8,4	7	20,0	0,207
TC	24	28,9	9	25,7	
CC	52	62,7	19	54,3	
TT+TC	31	37,4	16	45,7	0,397
CC	52	62,6	19	54,3	
T	38	22,90	23	32,9	0,110
C	128	77,10	47	67,1	

5. TARTIŞMA

Aday genlerden TNF- α G-308A promotor polimorfizmi, TGF- β C-509T promotor ve T869C polimorfizmleriyle KOAH arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçlayan bu çalışmada, hasta ve kontrol grubu genotip dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Hasta grubunda kontrol grubuna göre yaş, sigara içme süresi, sigara içme miktarı ortalamaları yüksek bulunmuşken; sigara bırakma süresi ortalaması daha düşük bulunmuştur (Çizelge 4.1). Bu durumun genotip dağılımlarını ve allel frekanslarını etkilemiş olabileceğini düşünmekteyiz. Elde edilen genotip dağılımı ve allel frekanslarının diğer çalışmalardan farklı olması çalışma populasyonumuzun farklı olması ile ilişkili olabilir. Bunlara ek olarak, çalışmamız sonuçlarının diğer sonuçlardan farklı olmasının sebebinin, genotip dağılımları ve allel frekanslarının toplumdan topluma değişebilmesi nedeniyle olabileceğinden düşünmekteyiz.

Tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) kemik iliğinden nötrofil salımı ve nötrofil aktivasyonu gibi KOAH patogenezinde önemli rol oynayan proinflamatuvar bir sitokindir³⁶. TNF- α geni; TNF- α geninin promotorunun 308 bölgesinde G→A değişimi (TNF- α G-308A), promotorun 238 bölgesinde G→A değişimi (TNF- α G-238A), promotorun 376 bölgesinde G→A değişimi (TNF- α G-376A) dahil olmak üzere çeşitli polimorfizmler içerirler⁸⁹. Bu polimorfizmlerin TNF- α 'nın *in vitro* üretim seviyesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ek olarak TNF- α G-308A alleli, astım gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir³⁷. TNF- α G-308A promotor polimorfizminin KOAH ile ilişkisinin saptanması için yapılmış çok sayıda çalışma vardır^{45-50,89-92} ve bu çalışmaların sonuçları birbiriyle çelişkilidir. Bu yüzden TNF- α 'nın KOAH'daki rolü kesinlik kazanmamıştır.

Hegap ve arkadaşları⁹¹ Japon toplumunda 88 KOAH'lı birey ve 61 kontrol ile yaptığı bir çalışmada, KOAH ile TNF- α arasındaki ilişkiyi araştırmış; hasta ve kontrol grubu genotipleri ile KOAH arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır. Hasta grubunda GG genotipine sahip birey sayısı 86 (%98) iken kontrol grubunda 61 (%100) birey bulunmuştur. Hasta grubunda GA genotipli 2 (%2) birey bulunurken, kontrol grubunda bu

genotip görülmemiştir. Hasta ve kontrol grubunun her ikisinde de AA genotipli bireye rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda ise aynı şekilde hasta ve kontrol grubu genotipleri ile KOAH arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,343$). Çalışmamız hasta grubunda GG genotipine sahip 70 (%84,3) birey bulunurken kontrol grubunda 29 (%82) birey bulunmuştur. Çalışmamızda GG genotipi için; Hegap ve arkadaşlarının çalışmasından elde edilen sonuçlara göre daha düşük değerler elde edilmiştir. Bununla birlikte çalışmamız hasta grubunda GA genotipine sahip 12 (%14,5) birey bulunurken, kontrol grubunda 4 (%11) birey bulunmuştur. Çalışmamızda GA genotipi, Hegap ve arkadaşlarının çalışmasına göre yüksektir. Ayrıca Hegap ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak çalışmamız hasta grubunda AA genotipine sahip 1(%1,2) birey bulunurken, kontrol grubunda 2(%5,7) bulunmuştur.

Higham ve arkadaşlarının⁹² İngiltere toplumunda 86 KOAH'lı birey ve sigara içen 63 kontrol ile yapmış olduğu bir çalışmada, KOAH ile TNF- α arasındaki ilişkiyi araştırmış; hasta ve kontrol grubu genotipleri ile KOAH arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Hasta grubunda GG genotipine sahip birey sayısı 62 (%72) iken kontrol grubunda 45 (%71) birey bulunmuştur. Hasta grubunda GA genotipli 22 (%26) birey bulunurken, kontrol grubunda 17 (%27) bulunmuştur. Hasta grubunda AA genotipli 2 (%2) ve kontrol grubunda 1 (%1) birey bulunmuştur. Çalışmamız hasta ve kontrol grubu GG genotipi oranı daha yüksek bulunmuş bunun yanında GA genotipi daha düşük saptanmıştır (Çizelge 4.5). AA genotipleri benzer şekilde bulunmuştur. Higham ve arkadaşlarının çalışması hasta grubunda G allel frekansı 0.85 bulunurken, A allel frekansı 0.15 bulunmuştur. Bizim çalışmamızda G allel frekansı 0.92 bulunurken, A allel frekansı 0.08 bulunmuştur. A allel frekansı çalışmamızda elde edilenden daha düşüktür.

Sakao ve arkadaşlarının⁴⁶ Japon toplumunda yaptığı bir çalışmada KOAH ile TNF- α arasındaki ilişkiyi araştırmış; 106 KOAH, 110 sigara içen kontrol ve 129 sigara içmeyen populasyon kontrol bireyleri kullanılmıştır. Hasta grubu ve sigara içen kontrol grubu ($p=0.0231$); ayrıca hasta ve populasyon kontrol grubu ($p=0.0142$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Hasta grubunda GG genotipine sahip birey sayısı 77 (%72,7), sigara içen kontrol grubunda 86 (%87,2), populasyon kontrol grubunda 113

(%87,6) birey bulunmuştur. Hasta grubunda GA genotipli 23 (%21,7), sigara içen kontrol grubunda 10 (%9,1), populasyon kontrol grubunda 12 (%9,3) birey bulunmuştur. Hasta grubunda AA genotipli 6 (%5,7), sigara içen kontrol grubunda 4 (%3,6), populasyon kontrol grubunda 4 (%3,1) birey bulunmuştur. Çalışmamız hasta grubu GG genotipi daha yüksek, GA ve AA genotipleri daha düşük bulunmuştur (Çizelge 4.5). Çalışmamızda sadece sigara içen kontrol grubu kullanılmıştır. Çalışmamız kontrol grubu ile Sakao ve arkadaşlarının sigara içen kontrol grubu genotip oranları benzerdir. Sakao ve arkadaşlarının hasta grubunda G allel frekansı 0.835, A allel frekansı 0.165 olarak bulunmuştur. Sigara içen kontrol grubunda ise G allel frekansı 0.918, A allel frekansı 0.082 olarak bulunmuş, A allelli artan KOAH riski ile ilişkilendirilmiştir ($p=0.0084$). Çalışmamız allel frekansları ile Sakao ve arkadaşlarının çalışmasındaki allel frekansları benzerdir (Çizelge 4.5). Bununla birlikte hasta ve kontrol grubumuz allel frekansları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.470$).

Transforme edici büyüme faktörü beta (Transforming growth factor beta [TGF β]), çeşitli hücre tiplerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını, doku tamirini, immün cevabın düzenlenmesini, ekstraselüler matriks üretimini sağlayan multifonksiyonel bir stokindir⁵¹. TGF- β geni; promotordaki 509 bölgesinde C→T değişimi (TGF- β C-509T), promotorun 800 bölgesinde G→A değişimi (TGF- β G-800A) ve 869 bölgesinde T→C değişimi olmak üzere çeşitli polimorfizmler içerirler. Bu gendeki polimorfizmler TGF ekspresyonunu etkilemektedir. Bu nedenle polimorfizmlerden bazıları KOAH ve diğer hastalıklarla ilişkilendirilmiştir⁴³. Bu polimorfizmlerden, T+869C ve C-509T polimorfizmlerinin TGF beta 1 geninin ekspresyonunu değiştirebileceğine ve bununla birlikte KOAH'a yatkınlık sağlayabilecek belirli genlerle bağlantılı olabileceğine dair önemli bulgular vardır^{52,53}

Su ve arkadaşlarının⁸⁶ Çin toplumunda yaptıkları bir çalışmada KOAH ile TGF- β C-509T promotor polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmış; 84 KOAH'lı birey ve 97 kontrol kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grupları genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0,036$). Hasta grubunda CC genotipine sahip birey sayısı 61 (%72,6) iken kontrol grubunda 54 (%55,7) birey bulunmuştur. Hasta grubunda CT genotipli 21 (%25) birey bulunurken, kontrol grubunda 35 (%36,1) bulunmuştur. Hasta grubunda TT

genotipli 2 (%2,4) ve kontrol grubunda 8 (%8,2) birey bulunmuştur. Çalışmamız hasta grubunda CC genotipine sahip birey sayısı 43 (%51,8), kontrol grubunda 11 (%31,4) birey bulunmuştur. Hasta grubumuzda CT genotipine sahip 18 (%21,7), kontrol grubunda 13 (%37,2) birey bulunmuştur. Hasta grubumuzda TT genotipine sahip 22 (%26,5), kontrol grubunda 11 (%31,4) bulunmuştur. Su ve arkadaşlarının bulgularının aksine çalışmamız hasta ve kontrol grupları genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p=0,096$). Su ve arkadaşlarının çalışmasının hasta grubunda C allel frekansı 0,851 bulunurken T allel frekansı 0.149 bulunmuştur. Kontrol grubunda ise C allel frekansı 0,737 bulunurken, T allel frekansı 0.263 bulunmuştur. Bu çalışmada T allel frekansının KOAH'lı hastalarda anlamlı derecede düşük olduğu sonucunu bulmuşlardır ($p=0.008$). Çalışmamız da ise hasta ile kontrol grupları allel frekansları arasında anlamlı bir fark bulunamamış (Çizelge 4.8) ve bu çalışmayı destekleyen bulgular elde edilmemiştir.

Yoon ve arkadaşlarının⁹³ Kore populasyonunda yaptığı bir çalışmada KOAH ile TGF- β C-509T promotor polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmış; 102 KOAH'lı erkek birey ve 159 erkek kontrol kullanılmıştır, hasta ve kontrol grupları genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Hasta grubunda CC genotipine sahip birey sayısı 21 (%20) iken kontrol grubunda 48 (%30) birey bulunmuştur. Hasta grubunda CT genotipli 54 (%53) birey bulunurken, kontrol grubunda 74 (%47) bulunmuştur. Hasta grubunda TT genotipli 27 (%27) ve kontrol grubunda 37 (%23) birey bulunmuştur. Çalışmamız hasta grubu CC genotip oranı daha yüksek, CT genotip oranı düşük ve TT genotip oranı benzer bulunmuştur (çizelge 4.8). Yoon ve arkadaşlarının çalışması hasta grubunda C allel frekansı 0,470 bulunurken, T allel frekansı 0,530 bulunmuştur. Çalışmamız hasta grubu allel frekansı daha yüksek, kontrol grubu daha düşük bulunmuştur (Çizelge 4.8). Bununla birlikte Yoon ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde çalışmamızda hasta ile kontrol grubu genotipleri ve allel frekansları arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Ito ve arkadaşları⁹⁴ Japon toplumunda yaptıkları bir çalışmada KOAH'ın amfizem fenotipi ile TGF- β C-509T promotor polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmış; 70 KOAH'lı birey ve sigara içen 99 kontrol kullanmışlardır. Amfizemli hasta grubunda C allel

frekansını 0,560, T allel frekansını 0,440 bulmuşlardır. Sigara içen kontrol grubunda ise C allel frekansını 0.510, C allel frekansını 0.490 bulmuşlardır. Hasta ve kontrol grubu allel frekansları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Ito ve arkadaşlarının çalışması C allel frekasına göre çalışmamız hasta grubu allel frekansı daha yüksek, kontrol grubu allel frekansları benzerdir (Çizelge 4.8).

Wu ve arkadaşlarının⁹⁶ Yeni Zelanda toplumunda yaptıkları bir çalışmada KOAH ile TGF- β T+869C polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmış; 165 KOAH'lı birey ve 76 sigara içen kontrol kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grupları genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0,02$). Hasta grubunda TT genotipine sahip birey sayısı 69 (%41,6) iken kontrol grubunda 22 (%28,9) birey bulunmuştur. Hasta grubunda TC genotipli 83 (%50,0) birey bulunurken, kontrol grubunda 39 (%51,3) bulunmuştur. Hasta grubunda CC genotipli 13 (%8,4) ve kontrol grubunda 15 (%19,7) birey bulunmuştur. Çalışmamız hasta grubunda TT genotipine sahip birey sayısı 7 (%8,4), kontrol grubunda 7 (%20,0) birey bulunmuştur. Hasta grubumuzda TC genotipine sahip 24 (%28,9), kontrol grubunda 9 (%25,7) birey bulunmuştur. Hasta grubumuzda CC genotipine sahip 52 (%62,7), kontrol grubunda 19 (%54,3) bulunmuştur. Wu ve arkadaşlarının bulgularının aksine çalışmamız hasta ve kontrol grupları genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p=0,207$). Çalışmamız genotip oranları ile Wu ve arkadaşlarının çalışmasının genotip oranları birbirinden çok farklıdır ve çalışmalarını destekleyen veriler elde edilememiştir. Bu durumun etnik farklılıktan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Wu ve arkadaşlarının hasta grubunda C allel frekansı 0.330 bulunurken, kontrol grubunda 0.450 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda C allel frekansı daha yüksek olarak belirlenmiş, hasta ve kontrol grubu allel frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0.01$). Bizim çalışmamızın hasta grubunda C allel frekansı 0,771 bulunurken, kontrol grubunda 0,671 bulunmuş ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p=0,110$).

Liu ve arkadaşlarının⁹⁶ Çin toplumunda yaptıkları bir çalışmada KOAH ile TGF- β T+869C polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmış; 219 KOAH'lı birey ve 148 kontrol kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grupları genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir

ilişki bulunmuştur ($p=0,007$). Hasta grubunda TT genotipine sahip birey sayısı 60 (%27,4) iken kontrol grubunda 50 (%33,8) birey bulunmuştur. Hasta grubunda TC genotipli 105 (%47,9) birey bulunurken, kontrol grubunda 81 (%54,7) bulunmuştur. Hasta grubunda CC genotipli 54 (%24,7) ve kontrol grubunda 17 (%11,5) birey bulunmuştur. Bu çalışmanın genotip oranlarında çalışmamızdan çok farklıdır (Çizelge 4.11) ve çalışmalarını destekleyen veriler elde edilememiştir. Liu ve arkadaşlarının hasta grubunda C allel frekansı 0,514 bulunurken, kontrol grubunda C allel frekansı 0,611 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda C allel frekansı daha yüksek olarak belirlenmiş, hasta ve kontrol grubu allel frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p<0.05$). Liu ve arkadaşlarının çalışmasının aksine çalışmamız hasta grubunda kontrol grubuna göre C allel frekansı daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.11).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniğine başvuran KOAH tanısı almış 83 hasta, 35 kontrol olmak üzere toplam 118 birey KOAH ile ilgili kriterler göz önünde bulundurularak incelenip moleküler biyolojik yönden değerlendirilmiş ve aşağıda belirtilen sonuçlar elde edilmiştir.

1. Hasta grubu hasta yaşı, sigara içme süresi, sigara içme miktarı, paket/yıl sigara miktarı ortalamaları daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca beklenildiği şekilde hasta grubu post-br FEV1 ve post-br FEV1/FVC ortalaması kontrol grubuna göre daha yüksektir.

2. TNF- α 308 promotor polimorfizmi için hasta grubunda GG genotip frekansı %84.3, GA %14.5 ve AA %1.2 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ise sırasıyla %82.9, %11.4 ve %5.7 olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubu genotip frekansları bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.343$).

3. Hasta grubunda A allel frekansı %8.4, kontrol grubunda %11.4 olarak bulunmuştur. Allel frekansları için hasta ve kontrol grubu arasında fark saptanamamıştır ($p=0.470$). A alleli ile KOAH arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir.

4. TGF- β 509 promotor polimorfizmi için hasta grubunda CC genotip frekansı %51.8, CT %21.7 ve TT %26.5 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ise sırasıyla %31.4, %37.2 ve %31.4 olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubu genotip frekansları bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.096$).

5. Hasta grubunda T allel frekansı %37,35 kontrol grubunda %50.0 olarak bulunmuştur. Allel frekansları için hasta ve kontrol grubu arasında fark saptanamamıştır ($p=0.071$). T alleli ile KOAH arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir.

6. TGF- β 869 polimorfizmi için hasta grubunda TT genotip frekansı %8.4, TC %28.9 ve CC %62.7 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ise sırasıyla %20.0, %25.7 ve %54.3 olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubu genotip frekansları bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.207$).

7. Hasta grubunda C allel frekansı %77,10 kontrol grubunda %67.1 olarak bulunmuştur. Allel frekansları için hasta ve kontrol grubu arasında fark saptanamamıştır ($p=0.110$). C alleli ile KOAH arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir.

Yapılan çalışmalarda TNF- α G-308A promotor, TGF- β C-509T promotor ve T869C genotip ve allel frekansları farklı populasyonlarda çalışılması nedeniyle farklı sonuçlar vermiştir. Bununla birlikte çalışmamız diğer araştırmacıların çalışmasından farklı populasyonda yapıldığı için farklı sonuçlar elde edilmiş, araştırmacıların bulgularını destekleyen sonuçlar elde edilememiştir. Bu polimorfizmlerle KOAH ilişkisinin araştırıldığı ulusal bir yayına rastlanmaması nedeniyle elde ettiğimiz bulgular ulusal verilerle karşılaştırılamamıştır. Sonuç olarak hasta ve kontrol sayımız toplumumuza ait genotip dağılımı hakkında kesin bir sonuç vermek için yetersiz olduğunu, ileride hasta sayısının artırılması ve toplumumuza ait bu polimorfizmlerin KOAH ile ilişkisinin araştırıldığı daha fazla çalışmanın yapılmasıyla bulgularımızın güçleneceğini düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

1. Global Strategy for the Diagnosis, Managment, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2009 Report, www.goldcopd.com,
Erişim Tarihi: Mart 2009
2. **Yıldırım N.** KOAH, Türk Toraks Derneği Okulu, 2007
3. **Süerdem M.** Çocuktan Erişkine KOAH. Toraks Dergisi, 2004;5(Ek-1):E31-E37.
4. **Fletcherd CM,** Definitions of emphysema, chronic bronchitis, asthma, and airflow obstruction: 25 years on from the Ciba symposium. Thorax. 1984;39:81-85.
5. **Joasa L, Paréa P, Sandfordb A.** Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. Swiss Med Wkly ,2002 ;132:27 – 37
6. **Wood M, Stockley R.** The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. Respiratory Research, 2006;7:130.
7. **Molfino N.** Genetics of COPD, Chest, 2004;125:1929-1940.
8. **Silverman EK.** Genetic Epidemiology of COPD, Chest, 2002;121;1S-6S.
9. **Johannessen A, Lehmann S, Omenaas ER, Eide GE.** Post-Bronchodilator Spirometry Reference Values in Adults and Implications for Disease Management. Am J Respir Crit Care Med 2006;173:1316-1325.
10. **Stockley RA, Mannino D, Barnes PJ.** Burden and Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Proc Am Thorac Soc, Vol 6. 2009:524–526.
11. **MacNess W.** Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Proc Am Thorac Soc Vol 2. 2005:258–266.
12. **Fabbri LM, Luppi F, Beghe B, Rabe KF.** Complex chronic comorbidities of COPD. Eur Respir J. 2008;31: 204–212.
13. **Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM.** Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. Eur Respir J. 2006; 28:523–532.
14. **Mannino DM.** COPD: Epidemiology, Prevalence, Morbidity and Mortality, and Disease Heterogeneity. Chest 2002;121;121S-126S.
15. **World Health Organization,** World Health Statistics, 2008: S-30
16. **Sullivan SD, Scott D, Lee R, Lee AT.** The Economic Burden of COPD. Chest 2000;117;5S-9S.

17. **Eriksson S**, Studies in α 1-antitrypsin deficiency. *Acta Med Scand* **1965**;177(suppl. 432):1–85.
18. **Brantly M, Nukiwa T, Crystal RG**. Molecular basis of α 1-antitrypsin deficiency. *Am J Med*, **1988**;84:13–31.
19. **Owen MC, Carrell RW, Brennan SO**. The abnormality of the S variant of human alpha-1-antitrypsin. *Biochim Biophys Acta*. **1976**;453:257–61.
20. **Jeppsson JO**. Amino acid substitution Glu leads to Lys alpha-1-antitrypsin PiZ. *FEBS Lett*. **1976**;65:195–7.
21. **Brantly ML, Paul LD, Miller BH, et al**. Clinical features and history of the destructive lung disease associated with α 1-antitrypsin deficiency of adults with pulmonary symptoms. *Am Rev Respir Dis*. **1988**;138:327–36.
22. **Yoshida A, Lieberman J, Gaidulis L**. Molecular abnormality of human alpha-1-antitrypsin variant (Pi-ZZ) associated with plasma activity deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1976**;73:1324–8.
23. **Bruce RM, Cohen BH, Diamond EL, et al**. Collaborative study to assess risk of lung disease in PiMZ phenotype subjects. *Am Rev Respir Dis*. **1984**;130:386–90.
24. **Nagase H, Woessner JF**. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. **1999**;274:21491–4.
25. **Pendas AM, Santamaria I, Alvarez MV, et al**. Fine physical mapping of the human matrix metalloproteinase genes clustered on chromosome 11q22.3. *Genomics*, **1996**;37:266–8.
26. **D’Armiento J, Dalal SS, Okada Y, et al**. Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell*. **1992**;71:955–61.
27. **Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, et al**. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an ETS binding site transcription. *Cancer Res*. **1998**;58:5321–5.
28. **Cheng SL, Yun CJ, Yang PC**. Genetic Polymorphisms of Cytochrome P450 and Matrix Metalloproteinase in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Biochem Genet*. **2009**;47:591–601.
29. **Seidegard J, DePierre JW**. Microsomal epoxide hydrolase. Properties, regulation and function. *Biochim Biophys Acta*. **1983**;695(3-4):251–70.
30. **Smith CA, Harrison DJ**. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet*. **1997**;350:630–3.
31. **Yoshikawa M, Hiyama K, Ishioka S, et al**. Microsomal epoxide hydrolase genotypes and chronic obstructive pulmonary disease in Japanese. *J Mol Med*. **2000**;5:49–53.
32. **Yim JJ, Park GY, Lee CT, et al**. Genetic susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Koreans: combined analysis of polymorphic genotypes for microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase M1 and T1. *Thorax*. **2000**;55:121–5.
33. **Wilce MC, Parker MW**. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim. Biophys. Acta*. **1994**;1205 (1): 1–18.

34. **Harrison DJ, Cantlay AM, Rae F, et al.** Frequency of glutathione S-transferase M1 deletion in smokers with emphysema and lung cancer. *Hum Exp Toxicol.* **1997**;16:356–60.
35. **Cantlay AM, Smith CA, Wallace WA, et al.** Heterogeneous expression and polymorphic genotype of glutathione S-transferases in human lung. *Thorax.* **1994**;49:1010–4.
36. **Sundberg K, Johansson AS, Stenberg G, et al.** Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis.* **1998**;19:433–6.
37. **Ishii T, Matsuse T, Teramoto S, et al.** Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* **1999**;54:693–6.
38. **Cheng SL, Yu CJ, Chen CJ, et al.** Genetic polymorphism of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in COPD. *Eur Respir J.* **2004**;23:818–824.
39. **Cosma G, Crofts F, Taioli E, et al.** Relationship between genotype and function of the human CYP1A1 gene. *J Toxicol Environ Health.* **1993**;40:309–16.
40. **Cantlay AM, Lamb D, Gillooly M, et al.** Association between the CYP1A1 gene polymorphism and susceptibility to emphysema and lung cancer. *J Clin Pathol* **1995**;48:M210–4.
41. **Otterbein LE, Lee PJ, Chin BY, et al.** Protective effects of heme oxygenase-1 in acute lung injury. *Chest.* **1999**;116:61S–3S.
42. **Choi AMK, Alam J.** Heme Oxygenase 1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **1996**;15:9–19.
43. **Otterbein LE, Lee PJ, Chin BY, et al.** Protective effects of heme oxygenase-1 in acute lung injury. *Chest.* **1999**;116:61S–3S.
44. **Bouma G, Crusius JB, Oudkerk PM, et al.** Secretion of tumour necrosis factor α and lymphotoxin a in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol.* **1996**;43:456–63.
45. **Moffatt MF, Cookson WO.** Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genet* **1997**;6:551–4.
46. **Sakao S, Tatsumi K, Igari H, Shino Y, Shirasawa H, Kuriyama T.** Association of Tumor Necrosis Factor Gene Promoter Polymorphism with the Presence of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* Vol 163. **2001**:420–422.
47. **Huang SL, Su CH, Chang SC.** Tumor necrosis factor- α gene polymorphism in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* **1997**;156:1436–9.
48. **Sakao S, Tatsumi K, Igari H, et al.** Association of tumor necrosis factor alpha gene promoter polymorphism with the presence of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* **2001**;163:420–2.
49. **Higham MA, Pride NB, Alikhan A, et al.** Tumour necrosis factor-alpha gene promoter

- polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. **2000**;15:281–4.
50. **Teramoto S, Ishii T.** No association of tumor necrosis factor- α gene polymorphism and copd in Caucasian smokers and Japanese smokers. *Chest*. **2001**;119:315–6.
 51. **Clark DA, Coker R.** Molecules in focus: Transforming growth factor- β (TGF- β). *Biochemistry & CellBiology*, **1998**;30:293-298.
 52. **Ito M, Hanaoka M, Droma Y, et al.** The Association of Transforming Growth Factor Beta1 Gene Polymorphisms with the Emphysema Phenotype of COPD in Japanese. *InterMed*. **2008**;47:1387-1394.
 53. **Su W, Wen F, Feng Y, et al.** Transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms associated with chronic obstructive pulmonary disease in Chinese population. *Acta Pharmacologica Sinica*. **2005**;6:714–720.
 54. **Mak JC, Moira MW, Yeung C, et al.** Elevated plasmaTGF- β 1 levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *RespiratoryMedicine*. **2009**;103:1083-1089.
 55. **Kew RR, Webster RO.** Gc-globulin (vitamin D-binding protein) enhances the neutrophil chemotactic activity of C5a and C5a des Arg. *J Clin Invest*. **1988**;82:364–9.
 56. **Yamamoto N, Homma S.** Vitamin D-binding protein (group-specific component) is a precursor for the macrophage-activating signal factor from lysophosphatidylcholine-treated lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci*. **1991**;88:8539–43.
 57. **Horne SL, Cockcroft DW, Dosman JA.** Possible protective effect against chronic obstructive airways disease by the GC-2 allele. *Hum Hered*. **1990**;40:173–6.
 58. **Schellenberg D, Pare PD, Weir TD, et al.** Vitamin D binding protein variants and the risk of COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. **1998**;157:957–61.
 59. **Ishii T, Keicho N, Teramoto S, et al.** Association of Gc-globulin variation with susceptibility to COPD and diffuse panbronchiolitis. *Eur Respir J*. **2001**;18:753–7.
 60. **Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, et al.** Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol*. **1998**;16:27–55.
 61. **Steinkasserer A, Spurr NK, Cox S, et al.** The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1 α and IL-1 β loci. *Genomics*. **1992**;13:654–7.
 62. **Giovine FS, Takhsh E, Blakemore AI, et al.** Single base polymorphism at -511 in the human interleukin-1 β gene(IL1 β). *Hum Mol Genet*. **1992**;1:450.
 63. **Joos L, McIntyre L, Ruan J, et al.** Association of IL-1 β and IL-1 receptor antagonist haplotypes with rate of decline in lung function in smokers. *Thorax*. **2001**;56:863–6.
 64. **Ishii T, Matsuse T, Teramoto S, et al.** Neither IL-1 β , IL-1 receptor antagonist, nor TNF- α polymorphisms are associated with susceptibility to COPD. *Respir Med*. **2000**;94:847–51.
 65. **Weir TD, Mallek N, Sandford AJ, et al.** Beta2-adrenergic receptor haplotypes in mild, moderate and fatal/near fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. **1998**;158:787-91.

66. **Lima JJ, Thomason DB, Mohamed MH, et al.** Impact of genetic polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor on albuterol bronchodilator pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* **1999**;65:519–25.
67. **Summerhill E, Leavitt SA, Gidley H, Parry, et al.** Beta2-adrenergic receptor arg16/arg16 genotype is associated with reduced lung function, but not with asthma, in the Hutterites. *Am J Respir Crit Care Med*. **2000**;162:599–602.
68. **Green SA, Cole G, Jacinto M, et al.** A polymorphism of the human beta 2-adrenergic receptor within the fourth transmembrane domain alters ligand binding and functional properties of the receptor. *J Biol Chem*. **1993**;268:23116–21.
69. **Joos L, Paré PD, Anthonisen N, et al.** Polymorphisms in the beta2 adrenergic receptor and bronchodilator response, bronchial hyperresponsiveness, and rate of decline in lung function in smokers. *Thorax*. **2003**;58(8):703-7.
70. **Chizhikov VV, Chikina SY, Tatosyan AG, Chuchalin AG, Zborovskaya IB.** The Development of Chronic Obstructive Pulmonary Diseases Correlates with Microsatellite DNA Instability. *Russian Journal of Genetics*. Vol. 39-5, **2003**:571–577.
71. **Makris D, Tzanakis N , Damianaki A.** Microsatellite DNA instability and COPD exacerbations. *Eur Respir J*. **2008**: 32: 612–618.
72. **Siafakas N, Sourvinos G.** Microsatellite DNA Instability in COPD. *Chest J*. 116-1 **1999**.
73. **Lange P, Parner J, Vestbo J.** A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med*. **1998**: 339:1194-200.
74. **Burrows B.** Epidemiologic evidence for different types of chronic airflow obstruction. *Am Rev respir Dis*. **1991**;143:1452-55.
75. **Burrows B, Knudson RJ, Cline MG.** Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function. *Am Rev Respir Dis*. 1977;115:195-205.
76. **American Thoracic Society.** Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir CritCare Med*. **1995**;152:s77-s120.
77. **Radon K, Büsching K, Heinrich J.** Passive smoking exposure. A risk factor for chronic bronchitis and asthma in adults? *Chest* **2002**;122:1086-90.
78. **Tager IB, Segal MR, Speizer FE, Weiss ST.** The natural history of forced expiratory volumes. Effect of cigarette smoking and respiratory symptoms. *Am Rev Respir Dis*. **1988**;138:837-49.
79. **Gold DR, Tager IB, Weiss ST.** Acute lower respiratory illness in childhood as a predictor of lung

- function and chronic respiratory symptoms. *Am Rev Respir Dis* **1989**;140:877-84.
80. **Feldmann M, Brennan FM.** Cytokines and Disease. *Cyto and Dis.* **2000**;10:1003-1006.
 81. **Hopkins JS.** The pathophysiological role of cytokines. *Legal Medicine* **2003**; 5, S45–S57.
 82. **Ikram N, Hassan K, Tufail S.** Cytokines. *International Journal of Pathology.* **2004**; 2(1):47-58.
 83. **Feghali CA, Wright TM.** Cytokines In Acute And Chronic Inflammation. *Frontiers in Bioscience,* **1997**;d12-26.
 84. **Miller SA, Dykes DD and Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.,* **1988**; 16(3): 215.
 85. **Park KS, Kim MY, MOK J.** NcoI Restriction Fragment Length Polymorphism at -308 of The Tumor Necrosis Factor Alpha (TNFA) Promoter Region in Korean. *Jpn J Human Genet.* **1997**;42, 241-247.
 86. **Su Z, Wen F, Feng Y, Xiao M, Wu X.** Transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms associated with chronic obstructive pulmonary disease in Chinese population. *Acta Pharmacologica Sinica* **2005**;26(6): 714–720.
 87. **Buraczynska M, Baranowicz-Gaszczyk I, Borowicz E, Ksiazek A.** TGF- β 1 and TSC-22 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Microvascular Complications in Type 2 Diabetes. *Nephron Physiol.* **2007**;106:p69–p75.
 88. **SPSS Inc.** SPSS for Windows. Version 13.0, Chicago: SPSS Inc., **2004**.
 89. **Boezen HM, Postma DS.** Tumour necrosis factor and lyphotoxin a polymorphisms: a relationship with COPD and its progression?. *Eur Respir J.* **2007**;29:8-10.
 90. **Gingo MR, Silveira LJ, Miller YE, Friedlander AL.** Tumour necrosis factor gene polymorphisms are associated with COPD. *Eur Respir J* **2008**; 31: 1005–1012.
 91. **Hegab AE, Sakamoto T, Saitoh W, Nomura A.** Polymorphisms of TNFa, IL1b, and IL1RN genes in chronic obstructive pulmonary disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**;(329):1246–1252.
 92. **Higham MA, Pride NB, Alikhan A, Morrell NW.** Tumour necrosis factor- α gene promoter polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* **2000**; 15: 281-284.
 93. **Yoon HI, Silverman EK, Lee HW, Yoo CG, Lee CT, Chung HS.** Lack of association between COPD and transforming growth factor- β 1 (TGFB1) genetic polymorphisms in Koreans. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2006**;10(5):504–509.

94. **Ito M, Hanaoka M, Droma Y, Hatayama O, Sato E.** The Association of Transforming Growth Factor Beta 1 Gene Polymorphisms with the Emphysema Phenotype of COPD in Japanese. *Inter Med.* **2008**;47: 1387-1394.
95. **Wu L, Chau J, Young RP, Pokorny V, Mills GD.** Transforming growth factor- β 1 genotype and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* **2004**;59:126-129.
96. **Liu W, Li X, Ying B, Chen L, Wang T, Xu D.** Effects of single nucleotide polymorphisms 869 T/C and 915 G/C in the exon 1 locus of transforming growth factor- β 1 gene on chronic obstructive pulmonary disease susceptibility in Chinese. *Chin Med J* **2010**;123(4):390-394.

EKLER

ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİMYASAL VE SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI

Kullanılan kimyasal ve solüsyonların hazırlanmasında kaynak olarak “Molecular Cloning” esas alınmıştır^{???}. Hazırlanan solüsyonlar genel olarak konsantre stoklar halindedir. Çalışma konsantrasyonlarını elde etmek için stoklardan belli oranlarda alınarak seyreltilir.

Konsantrasyon dönüşümlerinde basitçe şu formülden yararlanılabilir.

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

M1= Hazırlanan stok konsantrasyon (M, N veya %)

V1= Stoktan alınması gereken miktar (V)

M2= Çalışma (son) konsantrasyonu (M, N veya %)

V2= Hazırlanacak olan çözelti (çalışma çözeltisi) miktarı (V)

EK-1. DNA Elde Edilmesinde Kullanılan Solüsyonları

1.1 Eritrosit Lizis Tamponu (pH=7,5)

1 Litre Solüsyon için;

0,32 M Sükroz	109,563 gr
10 mM Tris-HCl (pH=7,5)	1,211 gr
5mM MgCl ₂	1,015 gr
%1 Triton X 100	10 gr

Bir litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözdürülüp otoklavlanır. pH = 7,5 olacak şekilde ayarlanır. Triton X, solüsyona otoklavlandıktan sonra ilave edilir.

1.2. Fizyolojik Tampon (pH=7,5)

1 Litre Solüsyon için;

0,075 M NaCl	4,383 gr
0,025 M EDTA	9,305 gr

Bir litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözündürülüp otoklavlandı. pH = 7,5 olarak ayarlanır

1.3. TE-9 (pH=9)

1 Litre Solüsyon için;

500 mM Tris baz	60,5 gr
20 mM EDTA	7,44 gr
10 mM NaCl	0,58 gr

Bir litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml şekilde bidistile su ile çözündürülüp otoklavlandı. pH = 9 olarak ayarlanır.

1.4. %10'luk SDS

20 ml için;

2 gr SDS tartılıp, üzerine bir miktar saf su ilave edilip iyice çözündürülür. Son hacim 20 ml olacak şekilde ayarlanır.

1.5. Proteinaz-K (10mg/ml)

100 ml için;

10 gr PK tartılır, üzerine bir miktar saf su ilave edilip iyice çözündürülür. Son hacim 100 ml olacak şekilde ayarlanır.

1.6. 6 M NaCl

1 litre için;

321.4 gr NaCl tartılıp, üzerine bir miktar bidistile su ilave edilip iyice çözündürülüp son

hacim 1000 ml olacak şekilde ayarlanır.

1.7. % 70 Etil Alkol

100 ml için;

70 ml etil alkol (saf) ve 30 ml bidistile su ilave edilir.

1.8. TE tamponu (Tris/EDTA) (pH= 8)

10 mM Tris-Cl (pH=8)

0,1 mM EDTA (pH=8)

1 litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözündürülüp otoklavlanır. pH = 8 olarak ayarlanır.

EK-2. Agaroz Jel Solüsyonları

2.1. 10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok solüsyonu

108 gr Tris baz (890 mM)

55 gr borik asit (890 mM)

40 ml 0,5 M EDTA, pH 8.0 (20 mM)

Az miktardaki bidistile su içinde çözündükten sonra pH 8.0 olarak ayarlanıp solüsyon 1 litreye tamamlanır.

1 Litre 5X TBE stok solüsyonu için;

500 ml 10X TBE stok solüsyonu ve 500 ml bidistile su karıştırılır.

1 Litre 1X TBE solüsyonu için;

100 ml 10 X TBE stok solüsyonu ve 900 ml bidistile su karıştırılır.

2.2. Etidyum bromid solüsyonu (10 mg/ml)

0,1 gr etidyum bromid, 10 ml bidistile su içinde çözünüp ışık almayan bir cam şişe içinde buzdolabında muhafaza edilir.

2.3. DNA Yükleme Tamponu (Loading dye) (6X)

40 gr süktroz

0,25 gr bromfenol mavisi,

100 ml olacak şekilde bidistile su içinde çözülür. Ependorf tüplere paylaştırılarak buzdolabında muhafaza edilir.

EK-3 Hasta Rıza Formu

DNA ÇALIŞMASI ONAM FORMU

KRONİK OBSTRÜKTİF AKCİĞER HASTALIĞI (KOAİ) OLAN KİŞİLERDE TNF ALFA VE TGF BETA GEN POLİMORFİZMLERİ

Prof. Dr. Davut Alptekin danışmanlığında, Yüksek Lisans Öğrencisi Mehmet Ali Erkoç tarafından yüksek lisans tez çalışması olarak sürdürülecek olan çalışmamızda Çukurova bölgesindeki KOAH'lı bireylerin kanlarındaki lökosit hücrelerinden izole edilen DNA'lardan, bireylerin sahip oldukları değişimler (polimorfizm tipleri) belirlenecek, bu polimorfizmlerin KOAH ile ilişkisinin olup olmadığı incelenecektir.

Çalışmamız çerçevesinde Ç.Ü.T.F. Balcalı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göğüs hastalıkları polikliniğine başvuran KOAH tanısı almış kadın ve erkek bireylerden kan örneği alınarak Tıbbi biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında değerlendirmeye alınacaktır. Sonuçlar sadece bilimsel amaçlı kullanılacak, kişisel bilgileriniz gizli tutulacaktır. Parasal bir ödeme yapmanızı gerektirmeyen ve size bir ödeme yapılmasının söz konusu olmadığı çalışmaya katılmama hakkınız ve istediğiniz zaman çalışmadan çekilme hakkınız bulunmaktadır.

Araştırmayı katılmayı kabul ettiğiniz takdirde sizden 3ml kan örneği alacağız.

Bu çalışmayla ilgili ek bilgi talebiniz olursa sözlü olarak karşılanacaktır. Aşağıda isimleri ve telefon numaraları bulunan araştırmacılar tarafından gerekli bilgilendirmeler yapılacaktır.

Bio. Mehmet Ali Erkoç

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı: (0322) 338 60 60 /3498

YUKARIDA BELİRTİLEN KOŞULLARI OKUDUM, KANIMDAN GENETİK
İNCELEME YAPILMASINI KABUL EDİYORUM.

Hasta veya hukuksal olarak sorumlu kişi	Şahit Kişi	Kanı alan kişi
Adı-Soyadı:	Adı-Soyadı:	Adı-Soyadı:
İmza:	İmza:	İmza:
Tarih:	Hastaya Yakınlığı:	

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Ankara’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini burada tamamladı. 2004 yılında Ankara Keçiören İncirli Lisesi’nden mezun oldu ve Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nü kazandı. 2008 yılında lisans eğitimini tamamladı ve aynı yıl Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans programına başladı.