



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KRONİK OBSTRÜKTİF AKCİĞER HASTALIĞINDA HÜCRESEL
YAŞLANMA VE SİSTEMİK İNFLAMASYONLA İLİŞKİLİ GCLC
GEN POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sümeyye YILDIRIM

Danışman

Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ

TOKAT- 2024

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Nevin Karakuş danışmanlığında hazırlamış olduğum “Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığında Hücresel Yaşlanma ve Sistemik İnflamasyonla İlişkili *GCLC* Gen Polimorfizminin Araştırılması” adlı Yüksek Lisans tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

23/07/2024

Sümeyye Yıldırım

İmza

X X X X

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, danışmanlığımı üstlenen, bilgi ve tecrübesiyle her konuda destek olan, tanımaktan onur duyduğum saygıdeğer danışman hocam Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ'a, tez çalışmalarım sırasında büyük bir özveriyle araştırılacak hasta grubunun oluşturulmasını sağlayan Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Gökhan AYKUN'a teşekkür ederim. Ayrıca örneklerin toplanmasında yardımcı olan Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Araş. Gör. Hacer KILINÇ'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Hiçbir zaman desteğini ve sevgisini esirgemeyen, her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.



ÖZET

KRONİK OBSTRÜKTİF AKCİĞER HASTALIĞINDA HÜCRESEL YAŞLANMA VE SİSTEMİK İNFLAMASYONLA İLİŞKİLİ *GCLC* GEN POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI

Yıldırım, Sümeyye

Yüksek Lisans, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nevin Karakuş

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), solunum yolu inflamasyonları ile karakterize edilen, yüksek morbidite ve mortaliteye sahip ve sıklığı yaşla artan, yaygın bir akciğer hastalığıdır. Antioksidan savunma mekanizması, reaktif oksijen türleri (ROS) ve inflamasyon arasındaki etkileşimler, hücresel yaşlanma nedeniyle değişikliğe uğradığında akciğerlerin homeostazının bozulmasına yol açar. Glutamat-sistein ligaz (*GCLC*), hava yolu epitelini hasarlardan koruyan ve akciğerde önemli bir antioksidan olan glutatyonun (GSH) sentezi, modifikasyonu ve aktivasyonunda önemli bir role sahiptir. Bu çalışmanın amacı, KOAH tanısı alan hasta grubunda *GCLC* geni G>C (rs600033) polimorfizmini karakterize etmektir. Bu çalışmada, 117 KOAH Hastası (59 Stabil KOAH (Grup 1), 58 Akut Alevlenme (Grup 2)) ve 115 sağlıklı kontrolün DNA'ları polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) testleri ile analiz edilmiştir. İstatistiksel analizler ki-kare testi kullanılarak yapılmıştır. *GCLC* geni G>C (rs600033) polimorfizminin allel ve genotip dağılımları KOAH hastaları ve sağlıklı kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir ($p>0.05$). Fakat KOAH hastalarının gruplandırılması ile yapılan analiz sonucunda, Akut Alevlenme hastaları ile kontrollerin *GCLC* geni G>C (rs600033) polimorfizminin genotip dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu, CC genotipine kontrollerde daha sık rastlandığı tespit edilmiştir ($p=0.037$, OR 0.44, %95 CI: 0.19-0.95). Sonuç olarak, Türk popülasyonunda *GCLC* geni G>C (rs600033) polimorfizminin KOAH hastalarında Akut Alevlenme için bir risk oluşturabileceği bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı, Hücresel Yaşlanma, İnflamasyon, Oksidatif Stres, *GCLC*, rs600033

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *GCLC* GENE POLYMORPHISM ASSOCIATED WITH CELLULAR AGING AND SYSTEMIC INFLAMMATION IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Yıldırım, Sümeyye

Master's Thesis, Department of Medical Biology

Advisor: Doç. Dr. Nevin Karakuş

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a common lung disease characterized by airway inflammation, with high morbidity and mortality and increasing prevalence with age. The interactions between the antioxidant defense mechanism, reactive oxygen species (ROS) and inflammation are altered due to cellular aging, leading to disruption of lung homeostasis. Glutamate-cysteine ligase (*GCLC*) has an important role in the synthesis, modification and activation of glutathione (GSH), an important antioxidant in the lung that protects the airway epithelium from damage. The aim of this study is to characterize the *GCLC* gene G>C (rs600033) polymorphism in a group of patients diagnosed with COPD. In this study, DNAs of 117 COPD Patients (59 Stable COPD (Group 1), 58 Acute Exacerbation (Group 2)) and 115 healthy controls were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) tests. Statistical analyzes were performed using the chi-square test. Allele and genotype distributions of the *GCLC* gene G>C (rs600033) polymorphism did not show a statistically significant difference between COPD patients and healthy controls ($p>0.05$). However, as a result of the analysis performed by grouping COPD patients, it was determined that there was a statistically significant difference between the genotype distributions of the *GCLC* gene G>C (rs600033) polymorphism in Acute Exacerbation patients and controls, and the CC genotype was more common in controls ($p=0.037$, OR 0.44, 95% CI: 0.19-0.95). As a result, it was determined that the *GCLC* gene G>C (rs600033) polymorphism in the Turkish population may pose a risk for Acute Exacerbation in COPD patients.

Keywords: Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Cellular Aging, Inflammation, Oxidative Stress, *GCLC*, rs600033

İÇİNDEKİLER

ETİK SÖZLEŞME	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. KOAH Tanımı ve Epidemiyolojisi	3
2.2. KOAH için Risk Faktörleri	4
2.2.1. Sigara Kullanımı	4
2.2.2. Mesleki ve Çevresel Maruziyetler	4
2.2.3. Cinsiyet.....	5
2.3. KOAH Patofizyolojisi.....	5
2.3.1. Mukus Hipersekreasyonu	5
2.3.2. Hava akımı kısıtlanması ve hiperinflamasyon.....	6
2.3.3. Gaz Değişim Anormallikleri.....	6
2.4. KOAH'ta Akut Alevlenmeler	6
2.5. KOAH Tanısı	7
2.6. KOAH'ta Hücresel Yaşlanma.....	8
2.6.1. Yaşlanma Mekanizmaları	10
2.6.1.1. DNA Hasarına Bağlı Yaşlanma.....	10
2.6.1.2. P38 MAPK Sinyali	11
2.6.1.3. NF-κB Sinyali.....	11
2.7. KOAH'ta Sistemik İnflamasyon	11
2.8. KOAH Genetiği	13
2.9. Glutasyon (GSH, γ glutamil sisteinil glisin).....	14
2.10. GCLC Geni (Gen ID:2729) ve GCLM Geni (Gen ID:2730).....	15
2.11. GSH ve KOAH İlişkisi.....	17
2.12. GCLC Geni ve KOAH İlişkisi	18
3. MATERYAL VE METOD	21

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER.....	22
3.1.1. Aletler ve Cihazlar.....	22
3.1.2. Kimyasal Maddeler	22
3.1.3. Çözeltiler	23
3.2. YÖNTEM.....	23
3.2.1. DNA İzolasyonu.....	23
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	24
3.2.3. GCLC Geni G>C (rs600033) Polimorfizmi PZR Analizi.....	25
3.2.4. GCLC geni G>C (rs600033) Polimorfizmi RFLP Analizi	26
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	27
4. SONUÇ VE BULGULAR	28
5. TARTIŞMA	37
7. REFERANS	41
8. ÖZGEÇMİŞ	51

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2. 1. GOLD 2022 Rehberine Göre Evreler.....	7
Tablo 2. 2. GOLD 2022 Rehberine Göre Gruplar	8
Tablo 2. 3. mMRC Dispne Skalası Evreleri.....	8
Tablo 2. 4. KOAH fenotipleri ve genotipleri arasındaki ilişkiler.....	13
Tablo 3. 1. Hastaların ve kontrol grubundaki bireylerin araştırmaya dahil edilip, edilmeme kriterleri.....	21
Tablo 3. 2. <i>GCLC</i> geni G>C (rs600033) polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı.....	25
Tablo 3. 3. <i>GCLC</i> geni G>C (rs600033) polimorfizmi için kullanılan PZR amplifikasyon koşulları.....	25
Tablo 3. 4. Polimorfizm analizinde kullanılan primer dizileri, gen dizisi üzerinde polimorfik bölgenin gösterimi ve PZR ürününün boyutu	25
Tablo 3. 5. RFLP reaksiyon bileşenleri ve miktarları.....	26
Tablo 3. 6. RFLP analizinde kullanılan enzim, enzim tanıma dizisi ve kesim paterni..	26
Tablo 4. 1. Çalışmaya dahil edilen KOAH hastaları ve kontrol grubundaki bireylerin cinsiyet ve yaş ortalamalarına ait istatistiksel bulgular.....	28
Tablo 4. 2. <i>GCLC</i> gen polimorfizminin KOAH hastası ve sağlıklı kontrollerdeki genotip ve allel sıklıkları.....	31
Tablo 4. 3. <i>GCLC</i> geni G>C (rs600033) polimorfizminin Stabil KOAH, Akut Alevlenme ve sağlıklı kontrollerdeki genotip ve allel sıklıklarının karşılaştırılması	34
Tablo 4. 4. Çalışmaya dahil edilen KOAH hastalarının demografik ve klinik özelliklerinin <i>GCLC</i> geni G>C (rs 600033) polimorfizmine göre değerlendirilmesi	35

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1. KOAH'ta hava keseciklerinde amfizem oluşumu.....	3
Şekil 2. 2. Hava yolu epitelinin yapısı.....	6
Şekil 2. 3. Akciğer dokusundaki hücrelerin çeşitliliği	9
Şekil 2. 4. Hücre döngüsü kontrol noktaları ve DNA onarım yollarının şematik şekli.....	11
Şekil 2. 5. GSH sentezi.....	15
Şekil 2. 6. <i>GCLC</i> geninin kromozom 6 üzerindeki yerleşiminin gösterimi.....	15
Şekil 2. 7. <i>GCLC</i> geninin ekzon ve intron bölgelerinin gösterimi.	16
Şekil 2. 8. <i>GCLC</i> geninin mRNA dizisinin gösterimi.	16
Şekil 2. 9. <i>GCLC</i> geninin protein dizisinin gösterimi.	16
Şekil 2.10. Akciğerlerde ROS aracılı inflamasyon.....	17
Şekil 4. 1. Çalışmaya dahil edilen KOAH hastaları ve kontrol grubundaki bireylerin cinsiyet dağılımı.....	29
Şekil 4. 2. Bazı örneklerin PZR yöntemi ile çoğaltılan <i>GCLC</i> G>C (rs600033) bölgesine ait jel elektroforezi görüntüsü	29
Şekil 4. 3. <i>GCLC</i> geni G>C (rs600033) polimorfik bölgesinin <i>FspBI</i> restriksiyon endonükleazı ile belirlenen RFLP sonuçları.	30
Şekil 4. 4. KOAH ve Kontrollerde Genotip Frekanslarının Karşılaştırılması	32
Şekil 4. 5. KOAH ve Kontrollerde Allel Frekanslarının Karşılaştırılması	32

SİMGELER VE KISALTMALARI

AAT:	Alfa-1 antitripsin
AP-1:	Aktivatör protein 1
ARE:	Antioksidan tepki elemanı
BPD:	Bronkopulmoner displazi
BALF:	Bronkoalveoler lavaj sıvısı
BER:	Baz ekzisyon onarımı
CAM:	Hücre adezyon molekülleri
CAT:	COPD Assessment Test
cGAS:	Siklik GMP-AMP Sentaz
CHRNA:	Kolinerjik Nikotinik Alfa Reseptörü
cGAMP:	Siklik GMP-AMP
CRP:	C-reaktif protein
DSB:	Çift iplikçik kırılmaları
ERK:	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
FEV1:	1.saniyedeki zorlu ekspiratuar hacim
FVC:	Vital kapasite
FKBP5:	FK506 Bağlayıcı protein 5 faktör
GCL:	Glutamat sistein ligaz
GCLC:	Glutamat sistein ligaz katalitik alt birim
GM-CSF:	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı
GOLD:	Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease
GSH:	Glutatyon
GWAS:	Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları
HMOX1:	Heme Oksijenaz 1
HFNT:	Yüksek akışlı nazal tedavi
HPV:	Hipoksik pulmoner vazokonstriksiyon
HR:	Homolog rekombinasyon
HSPA1L:	Işık Şok Protein ailesi üyesi 1

ICS: İn hale kortikosteroidler
IFN: İnterferon
IL: İnterlökin
IL1 β : İnterlökin 1 Beta
İNOS: İndüklenabilir nitrik oksit sentaz
ISE: İnterleukin silyasyon enhansörleri
ISS: İnterleukin silyasyon silansörleri
JNK: C-Jun N terminal kinaz
KOAİ: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
LPS: Lipopolisakkarit
MAPK: Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz
MMP: Matriks metalloproteinazlar
mMRC: Modifiye Medical Research Council Ölçeğı
MSS: Merkezi Sinir Sistemini
NE: Nötrofil elastaz
NER: Nükleotid ekzisyon onarımı
NET: Nötrofil hücre dışı tuzaklar
NF-K β : Nükleer faktör-kappa B
NHEJ: Homolog olmayan uç birleştirme
NIV: Non-invaziv ventilasyon
NO: Nitrik oksit
Nrf2: Nükleer faktör eritroid 2- ilişkili faktör 2
PaCO₂: Parsiyel arteriyel karbondioksit basıncı
PaO₂: Parsiyel arteriyel oksijen basıncında
RLR: RIG-I benzeri reseptörler
RNS: Reaktif azot türleri
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
RV: Rhinovirüs
SAPK: Stresle aktive edilen protein kinaz
SASP: Yaşlılıkla ilişkili sekretuar fenotipin

SERPINA1: Serpin ailesi A üyesi 1

SLC6A4: Serotonin Taşıyıcı Reseptör ailesi 6 üyesi 4

SMAD4: SMAD ailesi üyesi 4

SNP: Tek nükleotid polimorfizmi

SSB: Tek iplikçikli kırılmalarını

STING: İnterferon stimülatör genleri

TGF- β 1: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta 1

TLR: Toll benzeri reseptörler

TNF: Tümör nekroz faktörü



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), solunum yolu inflamasyonları ile karakterize edilen, yüksek morbidite ve mortaliteye sahip ve sıklığı yaşla artan, yaygın bir akciğer hastalığıdır (Onishi, 2017). KOAH, dünyada ölüm oranının fazla olduğu hastalıklar arasında dördüncü sırada yer almaktadır (Schwartz, 2012.). KOAH'ta ana risk faktörü sigaradır fakat iç ve dış mekandaki hava kirliliği gibi çevresel faktörler de rol oynayabilir (Postma ve ark., 2015). Sigara dumanına düşük maruziyetin bile akciğer fonksiyonunu etkilediği belirlenmiştir (Jayes ve ark., 2016).

Oksidatif stres, hücresel yaşlanma, inflamasyon, epigenetik değişiklikler ve mitokondriyal disfonksiyon, KOAH gelişiminde etkili olan faktörlerdendir (Tuder ve ark., 2012). Hücresel yaşlanma, doku onarımı veya yeniden şekillenmesinde önemli bir etkiye sahiptir (Kuвано ve ark., 2016). Yaşlanmaya bağlı kronik inflamasyon, sitokinler, kemokinler, proteazlar ve büyüme faktörlerinde artışa yol açar (Liu ve ark., 2007). Yaşlanmış alveoler epitel ve endotel hücreleri, akciğerlerde birikir ve alveolar hücre kaybı ve küçük hava yolu fibrozuna neden olur (Barnes ve ark., 2019). Ayrıca, sigara dumanı ve çevresel maruziyetlerden kaynaklanan oksidatif stres KOAH'ta bir yaşlanma indükleyicisidir (Vij ve ark., 2018).

Glutasyon (GSH), akciğerlerde hava yolu epitelini hasarlardan koruyan önemli bir antioksidandır (Cheng ve ark., 2016). GSH, ATP gerektiren iki ardışık enzimatik reaksiyonla sentezlenir. Birincisi, glutamat ve sistein ligasyonunun, glutamat sistein ligaz (GCL) tarafından katalize edilmesi ve γ -glutamilsistein (γ -GC) oluşumunu içerir (Chen ve ark., 2005). İkincisi, γ -GC'nin glisin ile birleşmesi ve GSH oluşumudur (M. Li ve ark., 2006). GSH biyosentezinin ilk hız sınırlayıcı adımı GCL katalitik alt birim (GCLC) (73 kDa) ve GCL modülatör alt birimi (GCLM) (29 kDa) tarafından katalize edilir. İkinci adımı ise glutasyon sentetaz (GS) tarafından katalize edilir (Cortes-Wanstreet ve ark., 2009).

Gen polimorfizm çalışmaları, akciğer fonksiyon değişkenleri, hücresel yaşlanma, oksidatif hasar ve enflamatuar yanıtın, KOAH artışına neden olduğunu göstermiştir (De Andrade ve ark., 2012). Ayrıca yapılan birçok çalışmada, düşük GCLC ifade düzeylerinin GSH seviyelerini önemli ölçüde azalttığı ve bunun sonucunda akciğer fonksiyonlarının azaldığı bildirilmiştir (Siedlinski ve ark., 2008). Normal GSH seviyelerinin korunamaması, inflamatuvar yanıtı inhibe edememekle birlikte KOAH'ta alevlenme riskini de arttırabilir (Raghu ve ark., 2021). *GCLC* genindeki polimorfizmlerin, oksidatif

stresi arttıran koşullara maruz kalan bireylerde KOAH riskini arttırdığı rapor edilmiştir (Nichenametla ve ark., 2008).

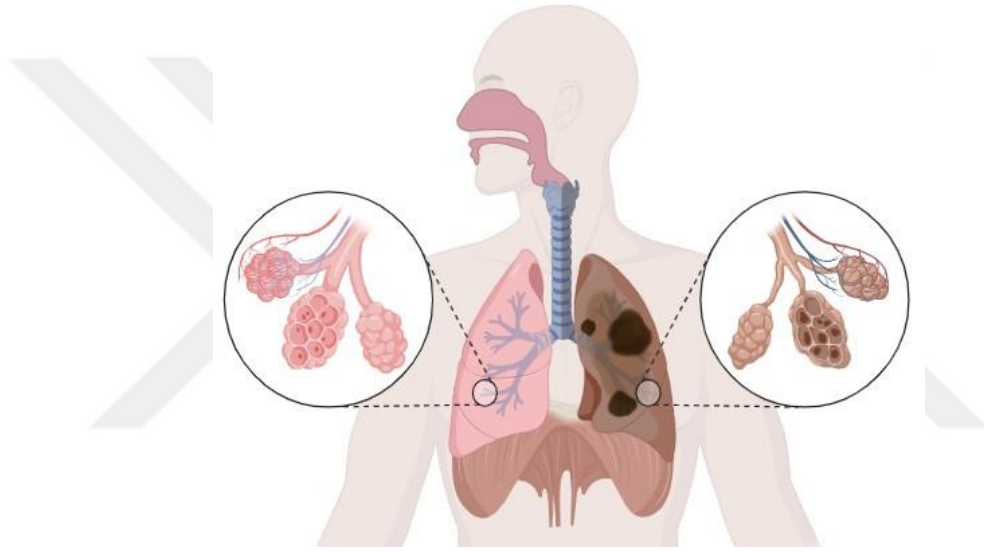
Bu çalışmada, Türk popülasyonunda KOAH ile *GCLC* geni G>C (rs600033) polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. KOAH Tanımı ve Epidemiyolojisi

KOAH, solunum yolu inflamasyonları ile karakterize edilen, yüksek morbidite ve mortaliteye sahip ve sıklığı yaşla artan, yaygın bir akciğer hastalığıdır (Onishi, 2017). KOAH, amfizem ve kronik bronşit olmak üzere iki bileşen içerir. Amfizem, akciğerlerdeki alveoller olarak adlandırılan hava keseciklerinin sigaraya bağlı olarak iltihaplanmasıdır (Şekil 2.1). Kronik bronşit ise küçük hava yollarının iltihaplanması ile birlikte balgam üretiminde artış olması ve hava yolu kısıtlanmasının meydana gelmesidir (Kim & Criner, 2013.)



Şekil 2. 1. KOAH'ta hava keseciklerinde amfizem oluşumu (<https://app.biorender.com>).

KOAH, hastalıklardan kaynaklı ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada yer almaktadır (Genel popülasyonda prevalans yaklaşık %10'dur) (Schwartz, 2012.). KOAH prevalansı yaşla birlikte artar ve 65 yaş üstü hastalar, 40 yaş altındakilere oranla 5 kat daha fazla KOAH riski taşımaktadır (Raheison & Girodet, 2009.). Bununla birlikte, henüz tanı koyulmamış hastaları da değerlendirildiğinde KOAH sıklığının 10 kat daha fazla olma olasılığı bulunmaktadır (Tatsumi, 2001). Hastaların %60-85'ine, tanı koyulmamış olduğu düşünülmektedir. Gelişmiş ülkelerde, 40 yaşından büyük nüfusun %10-20'si KOAH'a sahiptir (Bhandari & Sharma, 2012). Çevresel uyarıcılara maruz kalmak KOAH'ın görülme sıklığını önemli ölçüde arttırmaktadır (Wang, 2006.). KOAH'ta mortalite oranı yaklaşık %50'dir, bu oran, solunum dışı semptomlardan kaynaklanmaktadır (Yin ve ark, 2017).

2.2. KOAH için Risk Faktörleri

KOAH'ta ana risk faktörü sigaradır fakat tek risk faktörü olmayıp, iç ve dış mekandaki hava kirliliği de çevresel risk faktörleri arasındadır. Çocukluk dönemindeki aile öyküsü de (anne veya babada astım; hamilelikte annenin sigara içmesi), KOAH için sigara içmek kadar ciddi risk faktörleri arasında yer alır (Postma ve ark., 2015).

2.2.1. Sigara Kullanımı

Sigara kullanımı, KOAH'ta ana risk faktörüdür. Yüksek gelirli ülkelerde, KOAH ölümlerinin yaklaşık %73'ünün sigarayla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Mannino & Buist, 2007). Yaşamın erken dönemlerinde pasif sigara dumanına maruz kalmanın da olumsuz etkileri giderek çoğalmaktadır. Çocukların ve yetişkinlerin çoğunluğu bu çevresel maruziyeti yaşarlar (Gunlemez ve ark., 2019). Birçok görüş, erken yaşamda oluşan solunum semptomlarının yetişkinliğe kadar devam ettiğini doğrulamaktadır (Allinson ve ark., 2017; Shaheen, 1997; Gold ve ark., 1996).

Sigara dumanı, yaklaşık 4700 kimyasal bileşen içerir (Ryter ve ark., 2010). Bunlardan biri olan nikotin, akciğerlerde biriktikten sonra, hızla emilir ve beyne ulaşır (Salvi, 2014). Sigara dumanında Reaktif Oksijen Türleri (ROS), gaz fazındadır ve yanma yoluyla oluşur (Greabu ve ark., 2007). Partikül fazında bulunan katran, lipit, protein ve DNA'da oksidatif hasara sebep olan serbest radikaller içerir (Horinouchi & Miwa, 2021).

Pasif sigara içme, sigara içen kişiden sızan dumana maruz kalmaktır. Kişinin akciğer dokusunda hasara sebep olur ve KOAH'ta bağımsız bir risk faktörüdür (Robertson ve ark., 2019.). Pasif içicilikte, öksürük, nefes darlığı ve hırıltı görülen semptomlardır (Janson, 2004.).

2.2.2. Mesleki ve Çevresel Maruziyetler

Mesleki maruziyetler, KOAH'ta artan morbidite ile potansiyel olarak ilişkilidir. Koruyucu endüstrilerde çalışan kişilerde, KOAH prevalansının daha yüksek olduğu bilinmektedir. Tarım ve pamuk işçiliği, malzeme taşımacılığı, marangozluk, ulaşım ve kamu hizmetlerinde çalışanlar risk altındadır. İnşaat işçileri, silika ve asbest tozuna maruz kalırlar (Borup ve ark., 2017). Uzun süre inşaatlarda çalışmış işçiler, sigara içmeseler bile yüksek risk altındadır (Silver ve ark., 2021).

Dünya nüfusunun birçoğu, odun, saman, hayvan gübresi, odun kömürü gibi biyokütle yakıtlarını kullanmaktadır. Bu organik yakıtların dumanı, KOAH gibi solunum

yolu hastalıklarına yol açabilir (Sana ve ark., 2018). Tarım işçileri, solunum semptomu oluşturabilecek bakteriyel ürünler ve küfler, pestisitler ve amonyak gibi ortam partikül ve gazlarına maruz kalabilir (Burkes ve ark., 2018).

2.2.3. Cinsiyet

KOAH, ağırlıklı olarak yaşlılarda ve erkeklerde görülen bir solunum yolu hastalığıdır. Ancak son yıllarda, KOAH prevalansı kadınlarda erkeklerden daha hızlı artmaktadır (Gut-Gobert ve ark., 2019). Kadınlarda prevalansın çarpıcı bir şekilde artması, iç mekan kirliliği ve sigara kullanımı ile ilişkili olabilir (Ntritsos ve ark., 2018). KOAH'lı kadınların %15'inde, yemek pişirmeden dolayı biyokütle yakıtına maruz kalınan iç mekan kirliliği daha fazladır; ayrıca kadınlarda pasif içicilik oranı da erkeklere göre daha yüksektir (Choi ve ark., 2020). Bununla birlikte, kadınlarda KOAH tanısı almada gecikme daha fazladır. KOAH tanısı alan kadınlar, sigara içme oranı daha düşük olmasına rağmen, daha şiddetli nefes darlığına sahiptir. Histolojik incelemeler, kadınların bronşiyollerinin daha kalın hava yolu duvarlarına ve lümenlere sahip olduğunu bildirmiştir (Han ve ark., 2007). Ayrıca KOAH'lı erkeklerde kalp hastalığı, kadınlarda ise depresyon, anksiyete, osteoporoz hastalığına eşlik eden diğer durumlardır (Åberg ve ark., 2019).

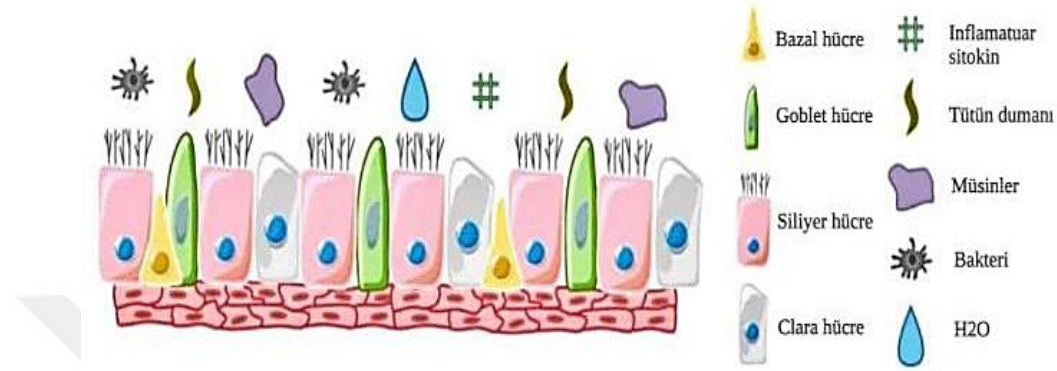
2.3. KOAH Patofizyolojisi

KOAH'ta hava yolu inflamasyonuna bağlı olarak küçük hava yollarında daralma ve akciğer parankim dokusunda yapısal ve fizyolojik değişiklikler meydana gelir, bu da hava akımı kısıtlanmasına neden olur (Hikichi ve ark., 2018). Bu patofizyolojik değişiklikler, hastalarda mukus hipersekresyonu, hava akımı kısıtlanması ve hiperinflamasyon, gaz değişim anormallikleri ve pulmoner hipertansiyon (PH) olarak kendini gösterebilir (J. Li & Ye, 2020).

2.3.1. Mukus Hipersekresyonu

Hava yolu lümeni, epitel yüzeyini koruyan mukus ile kaplanmıştır. Mukus, glikokonjugatların (müsinler), lipidlerin, proteinlerin, enzimlerin ve proteoglikanların bir sulu çözeltisidir (Şekil 2.2) (J. Li & Ye, 2020). Mukus; hem yumuşak hem de viskoelastik bir sıvının özelliğine sahiptir. Mukus'un %97'si su ve %3'ü katı maddeleri (lipit, tuz, müsin ve müsin olmayan proteinler) içerir. Mukus, patojenlere ve toksik kimyasallara karşı savunmada görev alır. Mukoza hücreleri ve yüzey epitelindeki kadeh hücreleri, müsin üretimini sağlar. KOAH hastalarında kadeh hücrelerinin sayısı fazladır.

Dolayısıyla, müsin üretimi de artar, bu da mukus hipersekresyonuna sebep olabilir. Mukozasiliyer fonksiyonun bozulması, hava yolu enfeksiyonlarına ve bakteriyel enfeksiyonlara yol açabilir (Tamaoki, 2015). Artan mukoza hücreleri ve inflamasyonla birlikte, mukusun lümene aniden salgılanması ile balgam sekresyonu artar ve KOAH'da görülen alevlenmelere sebep olabilir (Tesfaigzi ve ark., 2006)



Şekil 2.2. Hava yolu epitelinin yapısı (Li & Ye, *The Potential Role and Regulatory Mechanisms of MUC5AC in Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 2020).

2.3.2. Hava akımı kısıtlanması ve hiperinflamasyon

KOAH'ta hava akımı kısıtlılığının nedenleri; küçük hava duvarının kalınlaşması ve patolojik anormallikler, alveolar bağlantıların kaybı, inflammatuar immün hücrelerin infiltrasyonudur. Hava akımı kısıtlılığı ve azalan akciğer elastansı, hastalık sürecinde nöromekanik ayrışmaya yol açarak hiperinflamasyona sebep olabilir (Thirapatarapong ve ark., 2013).

2.3.3. Gaz Değişim Anormallikleri

Pulmoner gaz değişiminin ana belirleyicisi olarak, ventilasyon/perfüzyon değişimleri en sık görülenlerden biridir. Hiperkapni veya hiperkapni'nin olmadığı durumlarda "hipoksemi" meydana gelebilir (Barberà ve ark., 1997). KOAH akut alevlenmesinde solunum sırasında, parsiyel arteriyel oksijen basıncında (PaO_2) artış ve parsiyel arteriyel karbondioksit basıncında ($PaCO_2$) azalış görülebilir (Young & Bye, 2011). Vücutta değişen metabolik uyarılar için oksijen alımı ve karbondioksit eliminasyonu önemlidir (C. B. Cooper & Celli, 2008).

2.4. KOAH'ta Akut Alevlenmeler

KOAH akut alevlenmeleri, sistemik inflamasyon ve yaşam kalitesinde bozulmalarla birlikte ilerleyici hava yolu obstrüksiyonu ile karakterize edilen sistemik

epizodlardır. Sıkça hastaneye yatışları gerektirebilir. KOAH şiddetinin sınıflandırılması hava akımı kısıtlanmasına göre değişir. Hastalık semptomları; nefes darlığı, öksürük, hırıltı, mukus üretimi, reflü ve halsizliktir. Özellikle hastalar, geceleri ve sabahın erken saatlerinde göğüs sıkışması, öksürük ve ağrılarla karşılaşır. Ancak stabil KOAH olgularında alevlenmelerin sıklığı daha hafif seyretmektedir. KOAH'ta alevlenme gösteren bir hastanın stabil KOAH seviyesine dönmesi ve semptomların iyileşmesi için gerekli zamanın ~14.5 gün olduğu, alevlenmelerin ise 52-72 gün sürdüğü bildirilmiştir (Bollmeier & Hartmann, 2020).

Akut alevlenmenin çeşitli nedenleri arasında yer alan, alt solunum yolu viral enfeksiyonları, KOAH alevlenmelerinin üçte birinden fazlasını oluşturmaktadır. Rinovirüsler bu alevlenmelerin %60'ını oluşturmaktadır. Adenovirüsler, koronavirüsler ve metapnömovirüsler de alevlenme tetikleyicilerdendir (Thibaut ve ark., 2016).

2.5. KOAH Tanısı

KOAH tanısı; nefes darlığı, kronik öksürük, dispne ve balgam çıkarma gibi semptomların varlığına dayanır (Vogelmeier ve ark., 2020). Hava akımı obstrüksiyonu olan hastalarda, bronkodilatör sonrası 1. saniyedeki zorlu ekspiratuar hacim (FEV)'in zorlu vital kapasite (FVC)'ye oranının yüzde 70'den küçük olması KOAH tanısını doğrular. Spirometri, KOAH'ın tanısında ve klinik seyrinin yönetiminde merkezi rol oynar (Fazleen & Wilkinson, 2020). KOAH'ta akciğerdeki yapısal ve fonksiyonel anormalliklerin değerlendirilmesi için akciğer grafisi yaygın olarak kullanılan hızlı, erişilebilir ve güncel bir görüntüleme yöntemidir. Ancak, amfizemi tespit etmek konusunda yeterli duyarlılığı sağlamaz (Washko, 2010). KOAH'ın spirometrik şiddetini değerlendirmek için Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (GOLD) rehberi önerilmektedir (Tablo 2.1.). GOLD rehberi, semptomları hafifletmeye yönelik hedefleri ve olası riskleri göz önünde bulundurur (Vestbo ve ark., 2013). Hastalığın seyrini değerlendirmek için Modifiye Medical Research Council Ölçeği (mMRC) Dispne Skalası ve öksürük, balgam, nefes darlığı gibi semptomları değerlendirmek için de COPD Assessment Test (CAT) kullanılarak evreleme anketi geliştirilmiştir (Tablo 2.2. ve Tablo 2.3.) (Ulmeanu ve ark., 2020).

Tablo 2. 1. GOLD 2022 Rehberine Göre Evreler

Evre	FEV1
GOLD1	≥ 80

GOLD2	50-79
GOLD3	30-39
GOLD4	<30

Tablo 2. 2. GOLD 2022 Rehberine Göre Gruplar

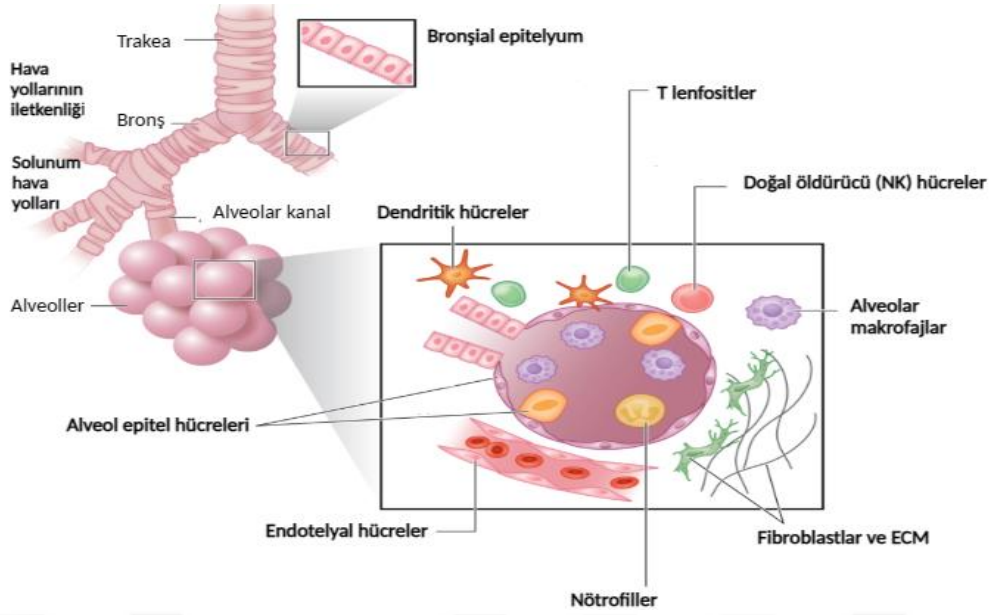
Atak öyküsü	≥ 2 veya ≥ 1 (hastane yatışı gerektiren)	C	D
	0 veya 1 (hastane yatışı gerektirmeyen)	A	B
		mMRC 0-1 CAT<10	mMRC ≥ 2 CAT ≥ 10
		Semptomlar	

Tablo 2. 3. mMRC Dispne Skalası Evreleri

mMRC Evre 0	Sadece ağır egzersiz sırasında nefesim daralıyor.
mMRC Evre 1	Sadece düz yolda hızlı yürüdüğümde veya hafif yokuş çıkarken nefesim daralıyor.
mMRC Evre 2	Nefes darlığım nedeniyle düz yolda kendi yaşlarıma göre daha yavaş yürümek veya ara ara durup dinlenmek zorunda kalıyorum.
mMRC Evre 3	Düz yolda 100 metre veya birkaç dakika yürüdükten sonra nefesim daralıyor ve duruyorum.
mMRC Evre 4	Nefes darlığım yüzünden evden çıkamıyorum veya giyinip soyunurken nefes darlığım oluyor.

2.6. KOAH'ta Hücresel Yaşlanma

Hücresel yaşlanma, hücrelerin replikasyon yeteneklerini kaybederek işlevlerini yitirdiği bir süreçtir. Bu süreç, oksidatif stresin neden olduğu telomer kısalması, epigenetik değişiklikler, mitokondriyal disfonksiyon ve proteaz kaybı gibi çeşitli biyolojik mekanizmalarla ilişkilidir (Barnes ve ark., 2019). Antioksidan savunma mekanizması, ROS ve inflamasyon arasındaki etkileşimler, hücresel yaşlanmanın etkisi altında değişikliğe uğradığında KOAH gibi kronik akciğer hastalıklarının gelişimine yol açabilir (Kiyokawa ve ark., 2021).



Şekil 2.3. Akciğer dokusundaki hücrelerin çeşitliliği (ECM: hücre dışı matriks).

Pulmoner immün homeostaz, hava yolunda istilacı patojenik ajanlara ve yabancı maddelere karşı korumada kritik bir rol oynar. Hava yolu epiteli, iç ve dış ortam arasında bir bariyer görevi görerek patojenlere karşı bir savunma sağlar. Ayrıca, epitelyal hücreler zararlı partiküllerin temizlenmesini kolaylaştırır (Şekil 2.3.) (Cho & Stout-Delgado, 2020). İleri yaş, akciğer hastalıkları için önemli bir risk faktörüdür. Bu süreç, solunum sisteminin fonksiyonel, yapısal ve mekanik özelliklerini etkileyen pulmoner vasküler yeniden şekillenmenin değişmesine yol açar. Hava yolu ve alveolar epiteli döşeyen hücreler, yaşlanma sürecinde hastalıklara ve ölüme karşı savunma yeteneklerini kaybetmeye başlar (Schneider ve ark., 2021). Hayflick ve Moorhead çalışmalarında, hücrelerin kalıcı olarak bölünme yeteneklerini kaybetmelerinin hücresel yaşlanma ile ilişkili olabileceğini öne sürmüştür (Hayflick & Moorhead, 1961).

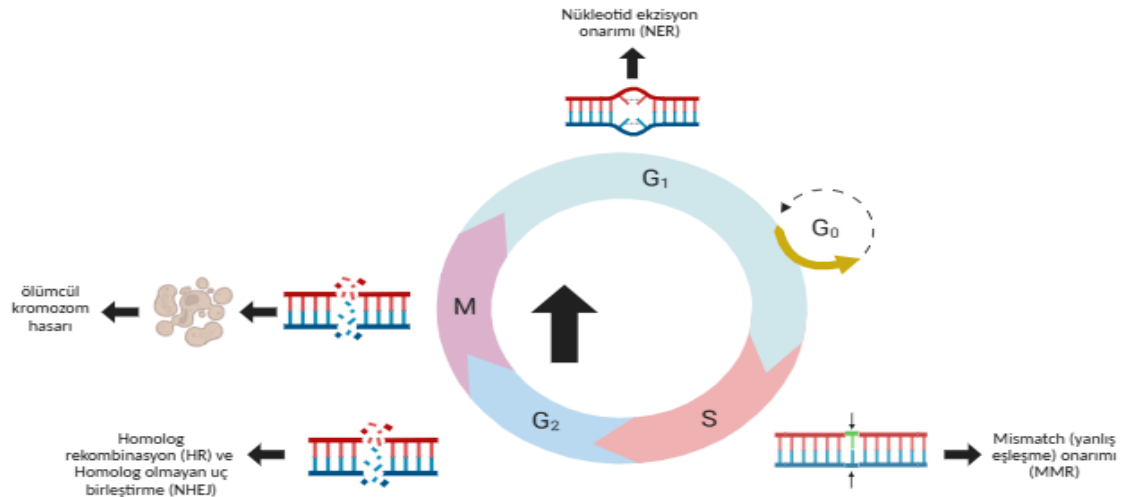
Yaşlanmanın önemli bir özelliği, akciğer hastalıklarının patogeneğinde rol oynayan yaşlılıkla ilişkili sekretuar fenotipin (SASP) doku yeniden şekillenmesini etkilemesidir (Y. Wei ve ark., 2022). Sigara dumanı maruziyetinden kaynaklanan oksidatif stres, KOAH'ta amfizem ve hücre yaşlanmasına bağlı SASP mekanizmalarını aktifleştirir. Burada, akciğerlerdeki hücreler yenilenme ve onarım özelliklerini kaybederler ve bunun sonucunda akciğer epitel hücrelerinin yaşlanmasına neden olurlar (Szilasi ve ark., 2006). Ayrıca, çevresel kirleticiler genotoksik strese yol açmakta ve akciğer fonksiyonlarında azalma nedeniyle sıklıkla hücresel yaşlanma ve KOAH gelişimine aracılık etmektedir (Bartling, 2013).

2.6.1. Yaşlanma Mekanizmaları

Hücresel yaşlanma, telomer kısalması, oksidatif ve onkojenik stres gibi çeşitli uyaranlarla başlar. Bu uyaranlar, replikatif yaşlanma ve erken yaşlanma gibi farklı hücresel yaşlanma türlerini tetikleyebilir (Zhu ve ark., 2019). Birincisi, replikatif yaşlanma, hücre çoklu bölünmeleri sonucunda telomer kısaltmalarıyla ilişkilidir, bu da hücre proliferasyonunun durmasına neden olur (Roger ve ark., 2021). Telomerler, kromozom uçlarını korumak için önemlidir. Telomer koruma mekanizmaları eksik olduğunda hücreler artık replikatif yaşlanmaya girer (*Sharpless & Sherr, 2015*). Shelterin kompleksi, telomer kısaltmasını önler ve telomer yapısının stabilitesini korur (*Lin & Epel, 2022*). İkinci tür yaşlanma ise erken yaşlanmadır, bu durum çeşitli stres faktörlerine (oksidatif stres ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi) bağlı olarak gelişir. Kansere ilişkili birçok uyarıcı ROS ve DNA hasarına neden olan maddeler yaşlanma sürecini tetikler (Roger ve ark., 2021).

2.6.1.1. DNA Hasarına Bağlı Yaşlanma

DNA'yı hasarlardan korumak ve hücre bütünlüğünü sağlamak için DNA hasar onarım mekanizmaları vardır. DNA hasar yanıtı, çift iplikçik kırılmaları (DSB'ler) ve tek iplikçik kırılmalarını (SSB'ler) algılayan, genomik bütünlüğü koruyan, yaşlanmayı önleyen, geçici hücre büyümesi durmasını ve apoptozu düzenleyen sinyal yoludur. DNA hasarı aynı zamanda, DNA bazlarının değiştirilmesiyle de ortaya çıkabilir. DSB'ler, SSB'ler ve uyumsuz nükleotidler olmak üzere çeşitli DNA hasarları vardır. Bu maruziyetlerin onarılamaması, genomik instabilite ve geçici hücre döngüsü durması, tümör ilerlemesi ve yaşlanmayı teşvik edebilir. DNA hasarını önlemek için çeşitli DNA onarım mekanizmaları vardır. Bunlar; nükleotid ekzisyon onarımı (NER), homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ve baz ekzisyon onarımıdır (BER) (Şekil 2.4.) (Yu ve ark., 2015).



Şekil 2.4. Hücre döngüsü kontrol noktaları ve DNA onarım yollarının şematik şekli.

2.6.1.2. P38 MAPK Sinyali

p38, mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal yolunun önemli bir bileşenidir. MAPK, hücre dışı stres sinyallerini düzenler ve hücrel tepkilere yardımcı olan serin treonin protein kinazlardan oluşur (Coulthard ve ark., 2009). Diğer önemli bileşenler arasında, hücre dışı sinyallerle ilişkili kinazlar (ERK1/2), ERK5, C-Jun N terminal kinazlar (JNK 1/2/3) bulunur. MAPK/ERK ve JNK sinyal yolları, erken yaşlanmayı, apoptoz ve inflamasyon gibi süreçleri indüklemek için aktive edilirler (W. Wei & Ji, 2018). JNK, stresle aktive edilen protein kinazlar (SAPK), sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından aktive edilerek çeşitli sitotoksik streslere neden olabilirler (Haq ve ark., 2002).

2.6.1.3. NF- κ B Sinyali

NF- κ B, adaptif ve doğuştan gelen bağışıklık ve hücre yaşlanması dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerin ana düzenleyicisidir. NF- κ B, SASP'nin hücrel fenotipinin oluşumuna aracılık eder, enflamatuvar bileşenleri salgılar ve böylece büyüme baskılayıcısı da olarak işlev görür (Salminen ve ark., 2012).

2.7. KOAH'ta Sistemik İnflamasyon

Çalışmalar KOAH'ın sistemik bir hastalık olduğunu, solunum dışı hastalıkları da önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir (Chan ve ark., 2019). KOAH patogeneğinde yer alan akciğer fonksiyonlarında azalma ve doku hasarı, kronik inflamatuvar süreçlerin

bir nedenidir. Alevlenmelerde hava yolu inflamasyonu, hastalığın ilerlemesi ile birlikte mortalite ve morbidite üzerinde önemli etkilere sahiptir (Jayes ve ark., 2016).

KOAH'lı hastalarda, özellikle alevlenmeler sırasında dolaşımdaki sitokinler, kemokinler, CRP ve pıhtılaşma faktörlerindeki anormallikler sistemik inflamasyona işaret etmektedir (Barbu ve ark., 2011). Fibroblastlar, endotel hücreleri ve hava yolu epitel hücreleri de inflamasyonla ilişkili mortalite ve komorbid hastalıkların artışına neden olabilir (Barnes, 2016).

Epitel hücreleri, akciğerin iç ve dış arayüzünde bulunur ve antimikrobiyal, antibakteriyel ve mukosiliyer tabaka ve antiproteaz moleküllerinin bütünlüğünün korunmasına yardımcı olur. Ayrıca immün yanıt ve inflamasyon mekanizmasının düzenlenmesinde, patojenlere karşı savunmada rol alarak, kalıcı bir enflamatuvar yanıt meydana getirir (Burgoyne ve ark., 2021).

Alveolar makrofajlar, KOAH'ta hava yolu inflamasyonunun düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır (Schuliga, 2015). Bazı makrofajlar pro-inflamatuvar fenotipe sahipken bazıları da anti-inflamatuvar fenotipe sahiptir. Makrofajlar, doku yıkıcı proteazlar üretirler ve fagositik fenotipe etki gösterirler. KOAH hastalarının bronkoalveoler lavaj sıvısında (BALF), balgamlarında ve hava yollarında sayıları artan makrofajlar olduğu bilinmektedir (Hiemstra, 2019).

Makrofajlar, ROS ve reaktif azot türleri (RNS) gibi oksidanları üretme yeteneğine sahiptir. Bu oksidanların üretimindeki dengesizlikler ve makrofaj fonksiyonundaki değişiklikler hastalık şiddeti ile ilişkilidir. Kronik inflamasyon durumunda oksidanların aşırı üretimi, oksidatif strese yol açarak çeşitli süreçlerde hasara yol açabilir (de Groot ve ark., 2019).

Nötrofiller, invaziv patojenlere karşı doğuştan gelen bağışıklığın ilk düzenleyicisidirler. Periferik kandaki lökositlerin yaklaşık %70'ini oluşturmaktadırlar. Makrofajların ve dendritik hücrelerin aktive edilmesine katkıda bulunurlar. Bu hücreler, doğuştan gelen bağışıklığın dengesini koruyarak, konak savunmasında hayati önem taşırlar (Uddin ve ark., 2019). KOAH'ta artan nötrofilik inflamasyonun diğer belirteçleri arasında IL-6, IL-8 ve TNF'nin yüksek seviyeleri, hem stabil durumda hem de akut alevlenmelerde mevcuttur (Quint & Wedzicha, 2007).

Dendritik hücreler, doğuştan gelen adaptif bağışıklık sistemini birbirine bağlayan antijen sunan hücrelerdir ve periferik dokudaki antijenleri tanımak, yakalamak ve T lenfositlere sunmaktan sorumludurlar (Haczku, 2012; Eapen ve ark., 2017; Nurwidya ve ark., 2016).

2.8. KOAH Genetiği

KOAH, ağırlıklı olarak sigaradan kaynaklanan, çevresel ve genetik faktörlerin etkisi ile ortaya çıkan bir solunum yolu hastalığıdır. KOAH gelişiminde Genetik faktörlerin %40 etkili olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (Wood & Stockley, 2006).

KOAH'ta en yaygın bilinen genetik risk faktörü Alfa-1 antitripsin (AAT)'dir. AAT, kromozom 14 üzerindeki serpin peptidaz inhibitörü *A1(SERPINA1)* geni tarafından kodlanmaktadır. AAT proteini, nötrofillerin azurofil granüllerinde bulunur ve proteaz inhibitörü olarak bilinir (Hersh, 2019). AAT eksikliği, akciğer dokularını proteolitik enzimlerin yol açtığı hasarlardan koruyan AAT proteinin düşük dolaşım seviyeleri sebebiyle görülen otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. AAT eksikliği olan hastalarda, düşük plazma seviyeleri sonucu nötrofil elaztazı inhibe edememeye başlar; bu da KOAH gelişimine sebep olur (Torres-Durán ve ark., 2018).

Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), KOAH fenotipleri ve akciğer fonksiyonları ile ilgili başka lokuslar tanımlamıştır (Tablo 2.4). Bu analizler ile, genetik yatkınlık, epigenetik değişiklikler ve oksidatif stres dahil birçok faktörün KOAH gelişiminde rol oynadığı belirlenmiştir (Brusselle ve ark., 2011).

Tablo 2.4. KOAH fenotipleri ve genotipleri arasındaki ilişkiler

Fenotip	Gen	Genotip	Kaynak
Sigara	CHRNA3	rs578776 G>A	(Chaity & Apu, 2022)
	CHRNA4	rs11072768 T>G	
	CHRNA5	rs16969968 G>A	(Jensen, ve diğerleri, 2015)
İnflamasyon	IL-33	rs1891385 A>C	(Sun, Ma, Qi, & Zhang, 2019)
	HMOX1	rs2071749 G>A	(Tanaka, ve diğerleri, 2011)
	SMAD4	rs12455792 G>A	(Hou, Yuan, Wang, Chang, & Gao, 2022)
	IL-4	rs2070874 C>T	
	HSPA1L	rs2227956 G>A	(Kohan, Tabiee, & Sepahi, 2019)
	IL-6	rs2069825 C>T	

	IFN-G	rs2069727 A/G	(Hackett, ve diğerleri, 2011)
	IL1 β	rs16944 C/T	
	TGF- β 1	rs1982073 C>T	(Liao, Zhao, Chen, & Xie, 2017)
Amfizem	SERPINA1	rs8004738 G>A	(Deng, Yuan, & Chang, 2017)
	MMP-9	rs3918242 C/T	(Yuan, Chang, Lu, & Deng, 2017)
	SERPINA2	rs840088 C/T rs975278 A/G	(Fujimoto, ve diğerleri, 2010)
	MMP-1	rs1799750	(Lee, ve diğerleri, 2010)
Depresyon	FKBP5	rs4713916 G/A	(Ishii, Wakabayashi, Kurosaki, Gemma, & Kida, 2011)
	SLC6A4	rs2020936 T>C rs3794808 A>G	

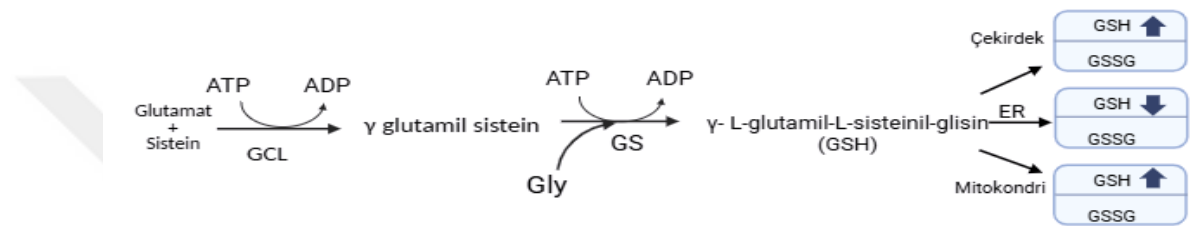
(CHRNA3, Kolinerjik Nikotinik Alfa Reseptörü 3; CHRNA4, Kolinerjik Nikotinik Alfa Reseptörü 4; CHRNA5, Kolinerjik Nikotinik Alfa Reseptörü 5; IL-33, İnterlökin 33; HMOX1, Heme Oksijenaz 1; SMAD4, SMAD ailesi üyesi 4; IL-4, İnterlökin 4; HSPA1L, Işı Şok Protein ailesi üyesi 1; IL-6, İnterlökin 6; IFN-G, İnterferon Gama; IL1 β , İnterlökin 1 Beta; TGF- β 1, Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta 1; SERPINA1, Serpin ailesi A üyesi 1; MMP-9, Matriks Metalloproteinazlar 9; SERPINA2, Serpin ailesi A üyesi 2; MMP-1, Matriks Metalloproteinazlar 1; FKBP5, FK506 Bağlayıcı protein 5; SLC6A4, Serotonin Taşıyıcı Reseptör ailesi 6 üyesi 4).

2.9. Glutasyon (GSH, γ glutamil sisteinil glisin)

Vücutta serbest radikallerin yol açtığı oksidatif strese karşı antioksidan savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmaların en önemlilerinden biri GSH sentezidir (Eksi ve ark., 2013). Hücresel GSH'nın çoğu sitozolde (%85-90), geri kalanı ise mitokondride (%10-15) ve küçük bir yüzdesi endoplazmik retikulumda bulunur. GSH, glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerini içerir. Glutamat ve sistein arasında γ -peptid bağı vardır (Labarrere & Kassab, 2022). GSH, hem hücre içi hem de hücre dışı koruyucu role sahip, sülfhidril grubu (tiyol, -SH) içeren ve hücre içinde 1-10 mM konsantrasyonlarda bulunan antioksidan bir tripeptid ve detoksifikasyon ajanıdır (Nichenametla ve ark., 2013). Sisteinin -SH grubu bir elektron verici gibi davranır. Ayrıca -SH grubu GSH'nın konjugasyon ve redüksiyon reaksiyonlarında yer alırlar; bununla birlikte, hücrenin reaktif oksijen/nitrojen türlerine karşı korunmasına yardımcı olurlar (Brown & Jones, 2015). GSH, Glutaredoksin (GRX), glutasyon peroksidaz (GPX) ve glutasyon S transferaz (GST)

gibi birçok proteinin kofaktörüdür. GSH, antioksidan aktivitesi sayesinde, pro-oksidanlara ve serbest radikallere karşı hücreyi korumadan sorumludur (Kang ve ark., 2021). Bunun yanı sıra, protein tiyollerinin oksidasyonunun korunmasında ve protein katlanmasında da önemli rol oynamaktadır (Averill-Bates, 2023).

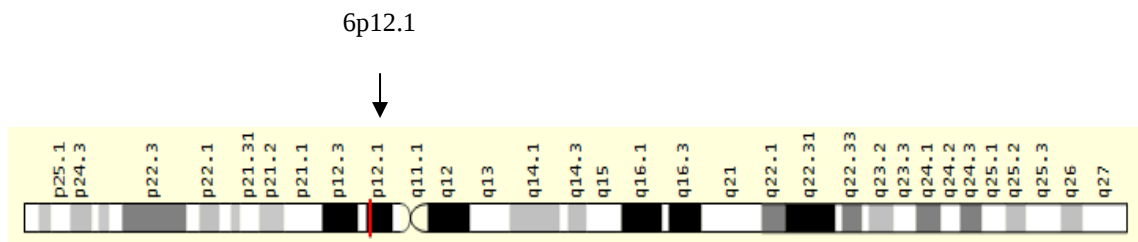
GSH, ATP'ye bağımlı enzimatik bir reaksiyon yoluyla sentezlenir. Başlangıçta L-glutamat ve L-sistein Glutamat-sistein ligaz (*GCL*) enzimi ile katalizlenerek γ -glutamil sistein oluşturur. Ardından, oluşan γ -glutamil sisteinden, L-glisin ürünü ile glutatyon sentetaz (*GS*) enziminin katalizörlüğünde GSH sentezlenir. Sentezlenen GSH, çekirdek, ER ve mitokondriye taşınır ve depolanır (Zhang ve ark., 2022) (Şekil 2.5).



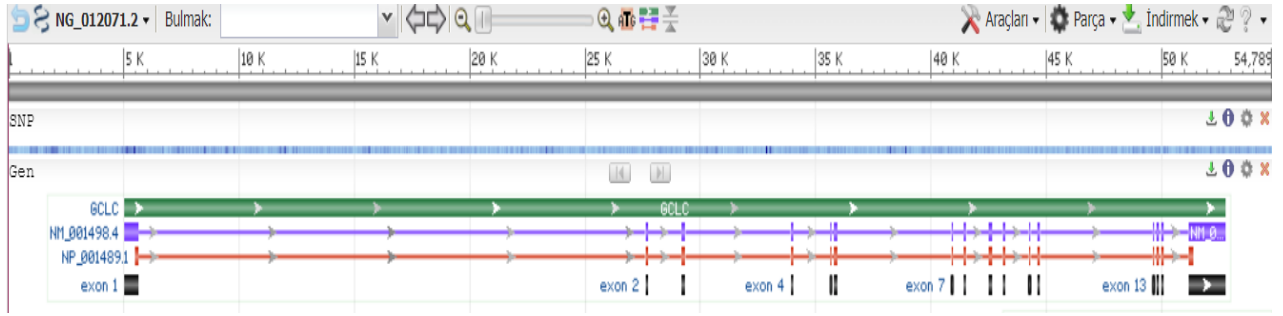
Şekil 2.5. GSH sentezi. GCL, glutamat sistein ligaz; GS, glutatyon sentetaz; GSH, indirgenmiş glutatyon; GSSG, okside glutatyon; ER, endoplazmik retikulum (Zhang, Tsutsuki, Li, & Sawa, 2022).

2.10. *GCLC* Geni (Gen ID:2729) ve *GCLM* Geni (Gen ID:2730)

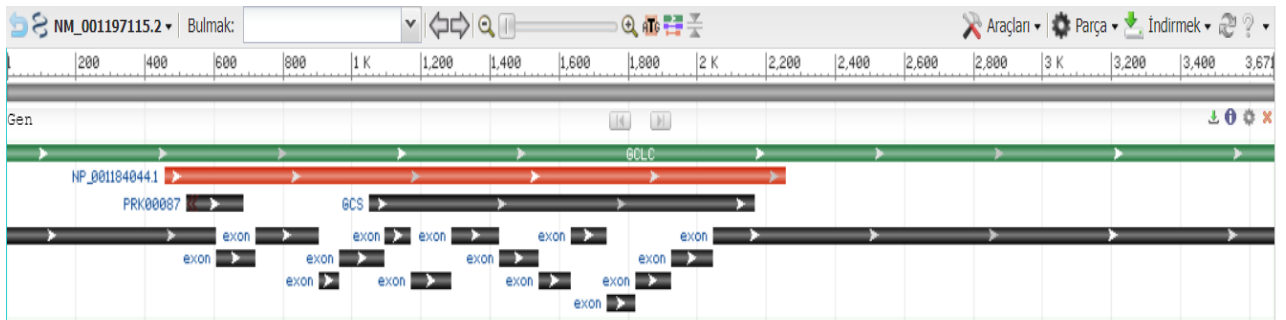
γ -glutamilsistein sentetaz olarak da bilinen ve GSH biyosentezi sürecine katılan *GCL*, protein oluşumu için sistein kaynağıdır. *GCL*'nin yüksek seviyeleri, GSH sentezini arttırdığından dolayı hız sınırlayıcı enzim olarak kabul edilir. *GCL*, katalitik (*GCLC*) ve modülatör (*GCLM*) olmak üzere 2 alt birimden oluşur (Franklin ve ark., 2009). *GCL*'nin katalitik alt birimini sentezleyen *GCLC* geni, 51.4 kb uzunlukta olup, kromozom 6p12.1 bölgesinde yerleşiktir ve 16 ekzon ile 15 intron içerir (NG_012071.2) (Şekil 2.6.) (Şekil 2.7). *GCLC* geni, 3671 bç'lik bir mRNA ve 599 amino asitlik bir polipeptit sentezler (NM_001197115.1, NP_001184044.1) (Şekil 2.8 ve Şekil 2.9).



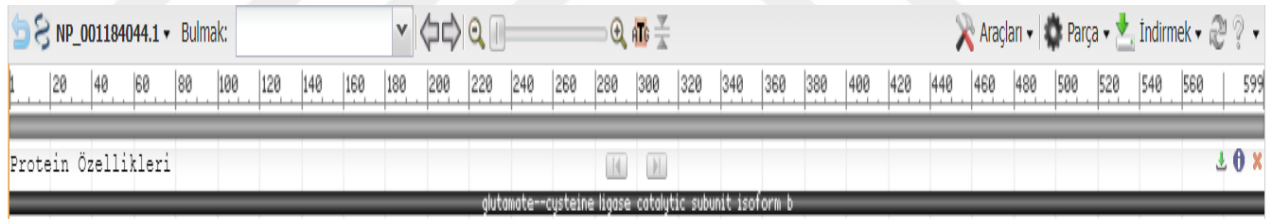
Şekil 2.6. *GCLC* geninin kromozom 6 üzerindeki yerleşiminin gösterimi (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GCLC>).



Şekil 2.7. *GCLC* geninin ekzon ve intron bölgelerinin gösterimi.



Şekil 2.8. *GCLC* geninin mRNA dizisinin gösterimi.



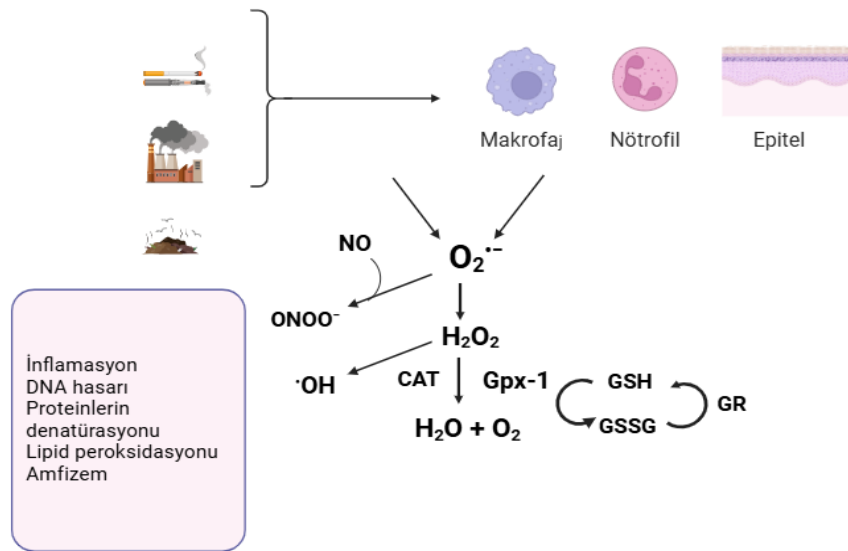
Şekil 2.9. *GCLC* geninin protein dizisinin gösterimi.

GCLM geni ise, 22 kb uzunlukta olup, kromozom 1p22.1 bölgesine yerleşiktir ve 9 ekzon içerir. 30,73 kDa moleküler ağırlığı olan, 274 amino asitlik bir polipeptit kodlar (Ferguson & Bridge, 2016). *GCLC* ve *GCLM* alt birimlerinin 5' translate olmayan (5'UTR) bölgeleri antioksidan yanıt elementleri (ARE), NF-KB ve Aktivatör protein-1 (AP-1) transkripsiyon faktörü ailesi için çoklu bağlanma bölgeleri içerir. ARE'ler, oksidatif stresin kontrolü ve birçok genin ifade düzeyinin düzenlenmesi için gereklidir (Bea ve ark., 2009). *GCLC* ve *GCLM* alt birimlerinin aşırı ifadeleri GSH seviyesini yükseltip hücrel yanıtı etkileyerek apoptotik uyarılara karşı duyarlılığı arttırırlar. Bu

yüzden *GCLC* ve *GLCM* aktivitesi, hücre içi GSH homeostazında anahtar rol oynamaktadır (Franklin ve ark., 2002).

2.11. GSH ve KOAH İlişkisi

Antioksidanlar, vücutta oluşan oksidan artışını belirli bir düzeye kadar dengede tutmaktadır. Ancak, oksidan ve antioksidan sistemdeki bir dengesizlik, özellikle akciğer hastalıkları olmak üzere birçok kronik hastalıkla yakından ilişkilidir (Labarrere & Kassab, 2022). Akciğerlerde nötrofil, makrofaj ve epitel hücrelerinin aktivasyonu, süperoksit radikallerinin ($O_2^{\cdot-}$) üretimine yol açar. Bu radikaller, nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girerek reaktif peroksinitrit ($ONOO^-$) moleküllerini oluşturur veya hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürür ve ardından Glutatyon peroksidaz (GPX) ve katalaz (CAT) tarafından indirgenir. GPX-1, H_2O_2 'nin H_2O 'ya indirgenmesini katalize ederek okside glutatyon (GSSG) oluşumunu sağlar (Şekil 2.10) (Vlahos & Bozinovski, 2013).



Şekil 2.10. Akciğerlerde ROS aracılı inflamasyon. $O_2^{\cdot-}$, Süperoksit radikalleri; NO, Nitrik oksit; $ONOO^-$, Reaktif peroksinitrit; H_2O_2 , Hidrojen peroksit; GPX, Glutatyon peroksidaz 1; GR, Glutatyon redüktaz; GSH, indirgenmiş glutatyon; GSSG, okside glutatyon (Vlahos & Bozinovski, 2013).

Oksidatif stres, oksidan ve antioksidan dengesizliği, KOAH'ta alevlenmelere ve çeşitli biyolojik değişikliklere yol açar. Oksidatif stres ile birlikte GSH seviyelerinin önemli ölçüde azaldığına dair kanıtlar vardır. Bu antioksidanların hücre içi ve hücre dışında azalması durumunda kontrolsüz bir şekilde ROS ve RNS üretimi meydana gelebilir (Santus ve ark., 2014). GSH konsantrasyonu, hücre tipine ve organizmaya göre

değişkenlik gösterir. Özellikle plazmadaki GSH konsantrasyonu, bazı hücre dışı boşluklarda ve epitel hücrelerinde yüksek oranda bulunur. Akciğerlerde sıklıkla inflamasyonla ilgili GSH eksikliği vardır (Lu, 2013). İlerleyen yaşla birlikte GSH seviyesinin azaldığı ve bunun oksidatif stres ile birçok akciğer hastalığının oluşumuna yol açtığı bilinmektedir (Vašková ve ark., 2023). Normal GSH seviyelerinin korunamaması, inflamatuvar yanıtı inhibe edememekle birlikte KOAH'ta akut alevlenme riskini de arttırabilir. Bu nedenle, GSH seviyeleri, inflamatuvar süreçlerde antioksidan bir savunma sağlamada kritik öneme sahiptir (Raghu ve ark., 2021).

Akciğerin epitel yüzeyi, çeşitli oksidanlara maruz kalma potansiyeli nedeniyle, oksidatif hasara karşı savunmasızdır (Gould ve ark., 2011). Epitelyal sıvı (ELF), mukus, proteinler ve çeşitli antioksidan moleküller içeren bir sıvıdır (Wright ve ark., 1994). ELF'nin bu bileşenleri, sigara gibi solunan maddelere ve reaktif türlere karşı koruyucu etki gösterir (Cantin & Bégin, 1991). Sigara içenlerin akciğer ELF'sinde, oksidatif strese karşı adaptif yanıt olarak yüksek GSH seviyelerin bulunduğunu gösteren birçok çalışma yapılmıştır (Cantin ve ark., 1987; Neurohr ve ark., 2003).

2.12. *GCLC* Geni ve KOAH İlişkisi

GCLC aktivitesi yaşla birlikte azalır ve *GCLC* geninin ifade düzeyi, transkripsiyonel olarak Nrf2 tarafından ARE aracılığıyla düzenlenir (Suh ve ark., 2004). *GCLC* geni ifade düzeyi çalışmaları, KOAH'ta aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalar, *GCLC* ifade düzeylerinin KOAH'ta oksidatif stres ve inflamasyonda rol oynadığını göstermektedir. Rahman ve arkadaşları, KOAH'lı ve sigara içen bireyler ile KOAH'lı olmayıp sigarayı bırakmış bireyler arasında *GCLC* mRNA ifade düzeylerini inceledikleri çalışmalarında, KOAH'lı olan ve sigara içen hastalarda akciğer epitelinde yüksek *GCLC* mRNA ifade düzeylerinin olduğunu bulmuşlardır (Rahman ve ark., 2000).

Yapılan birçok genetik çalışma, oksidatif stres ile ilişkili aday genlerin yaşlanma ve uzun ömürdeki rolünü desteklemektedir. Dato ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, yaşlanma ve yaşa bağlı hastalıklar için 38 gen ve 311 SNP incelenmiştir. *GCLC* genine ait SNP'lerden rs16883912 ($p=0.017$), rs2397147 ($p=0.024$), ve rs2100375 ($p=0.007$) ile günlük yaşam aktiviteleri arasında ilişki bulunmuştur. Ayrıca, bu SNP'lerin oksidatif stresi arttırabileceği ve yaşa bağlı fenotiplerde GSH metabolizmasını etkileyebileceği rapor edilmiştir (Dato ve ark., 2014).

Polimorfizmler bir genin, promotör, ekzon, intron, 5' UTR ve 3'UTR gibi farklı bölgelerinde bulunabilirler. Genin promotör bölgesindeki polimorfizmler, genin transkripsiyonunu ve promotör aktivitesini etkileyebilir. Ekzon bölgesindeki polimorfizmler, protein yapısını ve fonksiyonunu etkileyebilecek aminoasit değişikliklerine neden olabilirler. 5'UTR ve 3'UTR'de yer alan polimorfizmler, translasyonda mikroRNA bağlanmasını etkileyebilirler (Deng ve ark., 2017). İntron bölgesindeki polimorfizmler ise mRNA'nın splays bölgelerini etkileyebilirler. Gen ifade düzeyinde, pre-mRNA splays bölgeleri önemlidir. Splays bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar, mRNA'nın splays bölgelerinde değişiklik yapabilir veya ortadan kaldıracırlar (D. N. Cooper, 2010). Splaysing faktörleri, aktivatör ve inhibitör splays düzenleyiciler tarafından yönetilir ve intronik splaysing enhansırları ve silensırları (ISE ve ISS) olarak işlev görürler. Bazı intronik mutasyonlar, ISE veya ISS içindeki konumları nedeniyle hastalık fenotipleri üzerinde çeşitli etkilere yol açabilirler (Solis ve ark., 2008). Ayrıca, intronların gen içindeki konumları da önemlidir. Bazı 5'UTR'lerdeki ilk intronlar diğer intronlara kıyasla daha uzundur ve transkripsiyonel ve translasyonel düzenlemede daha işlevsel rollere sahiptirler (Jo & Choi, 2015).

GCLC geninin 5'UTR bölgesinde -129 C>T polimorfizmi birçok hastalık üzerinde çalışılmıştır. Japon popülasyonunda yapılan bir çalışmada, *GCLC* geninin promotör bölgesinde iki polimorfik bölge (-129 C>T ve -350 A>G) rapor edilmiştir. Bu çalışmada, *GCLC* -129 C>T promotör polimorfizminin CC ve CT genotipleri ile miyokard enfarktüsü arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu bulunmuştur ($p= 0,01$, OR 1.88, %95Cl 1.17-3.02) (Koide ve ark., 2003).

GCLC geninin 5'UTR bölgesi trinükleotid tekrarları (TNR) için oldukça polimorfiktir. Birçok çalışmada, *GCLC* GAG tekrar dizilerinin, in vitro ve in vivo koşullarda gen ifade düzeyini ve enzimatik aktiviteleri etkileyerek hücrelerde daha düşük GSH seviyelerine neden olduğu rapor edilmiştir (Xin ve ark., 2016). Nichenametla ve arkadaşlarının yaptığı in vitro çalışmada, *GCLC* geninin 5'UTR bölgesinde birinci ekzonun 10 bç önünde yer alan GAG tekrarları tanımlanmıştır ve bu tekrarlar 5 allele (4,7,8,9 ve 10) sahiptir. Bu çalışmada, 7 ve 8 tekrarlı alleller daha düşük kan GSH seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir (Nichenametla ve ark., 2013).

GCLC geni üçüncü intronunda, bizim de tezimizde çalıştığımız, G'den C'ye şeklinde olan bir tek nükleotid polimorfizmi tanımlanmıştır. Sloan ve arkadaşları

tarafından yapılan bir analiz çalışmasında, *GCLC* G>C (rs600033) polimorfizmi, akciğer kanseri olan hastalarda yaşam kalitesi sonuçları ile ilişkilendirilmiştir. Aynı çalışmada, *GCLC* aktivitesinin hastaların bildirdiği nefes darlığı, yorgunluk gibi belirtilerin fiziksel ve zihinsel yaşam kalitesini olumsuz etkilediği ve akciğer kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir (Sloan ve ark., 2012).



3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmaya, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları polikliniğine başvuran ve atakta olmayan 59 Stabil KOAH hastası (Grup 1) ile Göğüs Hastalıkları servisine atak nedeni ile yatırılan 58 Akut Alevlenme hastası (Grup 2) olmak üzere toplam 117 KOAH hastası dahil edildi. Kontrol grubu ise 115 bireyden oluşmaktaydı. Hasta ve kontrol grubundaki bireylerden çalışmamıza dahil edildiklerine dair izinleri alındı. KOAH hastalarındaki ve kontrol grubundaki bireylerin çalışmaya dahil edilip edilmeme kriterleri Tablo 3.1.'de gösterildiği şekildeydi. Bu çalışma için, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 13.07.23 tarihli toplantısında 23-KAEK-158 kayıt numarası ile onay alındı. Çalışmanın tamamı, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nda yapıldı. Kit yöntemiyle saflaştırılan DNA'lara polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulandı. PZR ürünleri restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) ile değerlendirildi.

Tablo 3. 1. Hastaların ve kontrol grubundaki bireylerin araştırmaya dahil edilip, edilmeme kriterleri

Dahil Edilme Kriterleri	Araştırmanın Hasta Grubu İçin Dahil Etme Ölçütleri 1. KOAH tanısı konulmuş olması 2. Yazılı bilgilendirilmiş olur formunu imzalamış olması 3. 18 yaşından büyük olması
	Araştırmanın Kontrol Grubu İçin Dahil Etme Ölçütleri 1. KOAH tanısı almamış olması 2. Yazılı bilgilendirilmiş olur formunu imzalamış olması 3. 18 yaşından büyük olması
Dahil Edilmeme Kriterleri	Araştırmanın Hasta Grubu İçin Dahil Etmeme Ölçütleri 1. KOAH, Astım tanısı almamış olması ve yakın zamanlı (3 ay içinde) akut koroner sendrom, pulmoner emboli veya majör cerrahi geçirmesi ve aktif kanseri bulunması 2. Yazılı bilgilendirilmiş olur formunu imzalamamış olması 3. 18 yaşından küçük olması
	Araştırmanın Kontrol Grubu İçin Dahil Etmeme Ölçütleri 1. Kronik bir hastalığı, cerrahi, medikal ve diğer obstetrik şikayetleri ve kanser öyküsü bulunması 2. Yazılı bilgilendirilmiş olur formunu imzalamamış olması 3. 18 yaşından küçük olması

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

3.1.1. Aletler ve Cihazlar

1. PZR Cihazı (Termal Cyclor) (Applied Biosystems, Singapore)
2. Elektroforez Tankı (Cleaver Scientific, MSCHOİCE)
3. Elektroforez Güç Kaynağı (Thermo Scientific, EC 300 x L)
4. Jel Görüntüleme Sistemi (QUANTUM-ST4, 1000/20M- 09200806)
5. Bilgisayar (Exper, Intelcore2)
6. Mikrodalga Fırın (Arçelik Intellowave, MD 554)
7. Hassas Terazı (Kern, ABJ 220-4M)
8. Mikrosantrifüj (Mikro120, Hettich Zentrifugen D- 78 532n)
9. Vorteks (Velp Scientifica; F20220176)
10. Mikropipet Seti (Gilson)
11. Etüv (Memmert, Beschickung-Loading 100- 800)
12. Otoklav (HMC Hirayama, HV-25L)
13. Buzdolabı (Vestel,BZP-L3302W)
14. Su banyosu (MEMMERT)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

1. Taq DNA Polimeraz (Thermo Scientific)
2. FspB I Restriksiyon Enzimi (Thermo Scientific)
3. Primerler (Macrogen Europe)
4. Agaroı (Biomax)
5. Nusieve Agaroı (Biomax)
6. pUC 19 DNA/MspI (HpaII) Marker (Thermo Scientific)
7. Loading dye (A.B.T.)

8. 10 mM dNTP mix (Amplicon)
9. 10XTBE Buffer (Biobasic)
10. SBYR Safe (Hibrogen)
11. DNA İzolasyon Kiti (invitrogen)

3.1.3. Çözeltiler

1XTBE (Tris-Borat-EDTA) Tamponu

10XTBE tamponundan distile su ile seyreltilerek 1XTBE hazırlandı.

%3'lük Agaroz Jel (100ml)

3 g agaroz ve 100 ml 1XTBE erlenmayer içerisine eklendi ve mikrodalga fırında 2 dakika homojen olana kadar ısıtıldı. Sıcaklığın yaklaşık 65°C düşmesi beklenildikten sonra 3 µl SBYR safe (20,000x) eklenip hızlı bir şekilde iyice karıştırıldı ve yükleme yapılacak tarakları hazırlanmış olan kasete döküldü.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. DNA İzolasyonu

Çalışma grubumuzun kan örnekleri, EDTA içeren vakumlu tüplere 5'er ml olarak alındı. Kandan DNA izolasyonu yönteminde Invitrogen marka DNA İzolasyon kitinden (PureLink Genomic DNA Mini Kit) yararlanıldı.

Lizat hazırlama

1. Su banyosu veya ısı bloğu 55 °C'ye ayarlandı.
2. Steril bir mikrosantrifüj tüpüne 200 µl kan eklendi.
3. Üzerine 20 µl Proteinaz K eklendi.
4. Üzerine 20 µl RNase A eklendi, vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi.
5. Üzerine 20 µl Lysis/binding buffer eklendi, homojen bir karışım elde etmek için vortekslendi.
6. 55 °C'de 10 dk inkübe edildi. (proteinlerin parçalanması için)
7. Lizatın üzerine 200 µl %96-100'lük etanol eklendi. Homojen bir karışım elde etmek için 5 sn vortekslendi.

Bağlama aşaması

8. Toplama tüpü ve içindeki spin kolonlar çıkartıldı.
9. Yaklaşık 640 µl lizat spin kolona eklendi.
10. Kolon oda sıcaklığında 10.000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
11. Toplama tüpü atıldı ve spin kolon yeni bir Toplama tüpüne yerleştirildi.

Yıkama aşaması

12. Kolona 500 µl Wash Buffer 1 (etanol ile hazırlanan) eklendi.
13. Kolon oda sıcaklığında 10.000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
14. Toplama tüpü atıldı ve spin kolon yeni bir Toplama tüpüne yerleştirildi.
15. Kolona 500 µl Wash Buffer 2 (etanol ile hazırlanan) eklendi.
16. Kolon oda sıcaklığında max hızda 3 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı.

DNA’nın sulandırılması

17. Spin kolon steril 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
18. Kolonun üzerine 100 µl Elution buffer eklendi.
19. Kolon oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi.
20. Kolon oda sıcaklığında max hızda 1 dk santrifüj edildi. Tüp saflaştırılmış DNA’yı içerecektir. Spin kolon atıldı.
21. DNA’yı içeren tüp -20 °C’de saklandı

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR, nükleik asitlerin in vitro olarak, uygun koşullar altında istenilen sayıda tekrarlanabilen döngüler ile çoğaltılması esasına dayanan bir yöntemdir. PZR döngüsündeki üç aşama sırasıyla, DNA çift zincirinin ısıyla birbirinden ayrılması (94°C Denatürasyon), oligonükleotidlerin hedef DNA’ya bağlanması (Hibridasyon 55-60°C) ve zincirin yeni çift zincirli DNA’lar oluşturacak şekilde uzamasından (Polimerizasyon 72 °C) oluşmaktadır (Saiki ve ark., 1998). Kalıp DNA, dH₂O, tampon, dNTP’ler (serbest nükleotidler), primerler ve Taq DNA polimeraz PZR karışımı için gerekli olan malzemelerdir (Ergin, 2004). Kalıp DNA olarak; çalışmamızda genomik DNA kullanıldı.

3.2.3. *GCLC* Geni G>C (rs600033) Polimorfizmi PZR Analizi

GCLC geni G>C (rs600033) polimorfizmini belirlemek amacıyla Tablo 3.2’de örnek başına düşen miktarları verilen PZR bileşenleri ile 23 µl’lik PZR karışımı hazırlanarak üzerine 2 µl DNA ilave edildi ve toplam hacim 25 µl’e tamamlandı.

Tablo 3.2. *GCLC* geni G>C (rs600033) polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı

PZR Bileşeni Stok	25 µl Karışımındaki Miktar	Final konsantrasyon
Steril bidistile su	18,84 µl	-
PZR buffer (10x)	2,5 µl	1x
dNTP mix (10 mM)	0,5 µl	200 µl
Primer-forward (20 pmol/ µl)	0,5 µl	10 pmol
Primer-reverse (20 pmol/ µl)	0,5 µl	10 pmol
Taq DNA Polimeraz (5 u/µl)	0,16 µl	0,8 u
Genomik DNA	2 µl	-
Toplam	25 µl	

GCLC Geni G>C (rs600033) polimorfizmini belirlemek için yapılan PZR amplifikasyon koşulları Tablo 3.3’de gösterildiği şekildedir.

Tablo 3.3. *GCLC* geni G>C (rs600033) polimorfizmi için kullanılan PZR amplifikasyon koşulları

95°C	3 dk ilk denatürasyon	
95°C	30 sn denatürasyon	
58°C	45 sn hibridizasyon	35 döngü
72°C	40 sn uzama	
72°C	7 dk son uzama	

GCLC geni G>C (rs600033) polimorfizmini içeren bölgeyi çoğaltmak için Tablo 3.4.’de belirtilen primerler kullanılarak 280 bç’lik PZR ürünü elde edildi.

Tablo 3.4. Polimorfizm analizinde kullanılan primer dizileri, gen dizisi üzerinde polimorfik bölgenin gösterimi ve PZR ürününün boyutu

Polimorfizm	Primer Dizileri	GCLC geni G>C polimorfik bölgenin gösterimi	PCR ürünü boyut
GCLC G>C (rs600033)	F: 5'-AATGAAGCAGTGCCGTAGGT- 3' R: 5'-GCCCAAATCCACCTTGTA- 3'	5'- tagaatgaagcagtgccgtaggtgtccgaagatgca agttctgattctaccttctccctccacacaaacacattctca ttctcttcatccaatctgattctggtagcaaggaatcccc tcagatttaagtttattactctccaaaggactattcctaagg tt [G/C] taggctcatagtaataatgcacatagcttcaag aattctcaagaaccctttagctgggaactgtttctagata agatcactacctcaattgtttacaagggtgatttgggc- 3'	280 bp

3.2.4. GCLC geni G>C (rs600033) Polimorfizmi RFLP Analizi

GCLC geni G>C (rs600033) polimorfik noktasını içeren PZR ürününün RFLP analizi için reaksiyon karışımı Tablo 3.5'te gösterildiği şekilde oluşturuldu. PZR ürünleri Tablo 3.6'de tanıma dizisi belirtilen FspBI restriksiyon enzimi ile 37°'de 16 saat kesime bırakıldı. Tablo 3.2.4.2'de genotiplere göre büyüklükleri belirtilen RFLP kesim ürünleri, SYBR safe ile boyanmış %3'lük jelde yürüterek görüntülendi.

Tablo 3.5. RFLP reaksiyon bileşenleri ve miktarları.

RFLP Bileşeni (Stok)	15 µl Karışımdaki Miktar
Fast Digest Green Buffer (10x)	1 µl
Restriksiyon Enzimi	0,3 µl
PZR ürünü	6 µl
dH2O	7,7 µl
Toplam	15 µl

Tablo 3.6. RFLP analizinde kullanılan enzim, enzim tanıma dizisi ve kesim paterni.

Gen bölgesi	Restriksiyon Endonükleaz	Enzim Tanıma Dizisi	Kesim Paterni
GCLC (rs600033)	FspBI		
		5' C T A G 3' 3' G A T C 5'	CC: 165 bp, 115 bp GC: 280 bp, 165 bp, 115 bp GG: 280 bp

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizleri yapmak için Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS Statistics, sürüm 22) ve OpenEpi Info yazılım paketi sürüm 3.01 (www.openepi.com) kullanıldı. *GCLC* geni G>C (rs600033) polimorfizmi genotip ve allel dağılımlarında Hardy Weinberg dengesinden (HWE) sapma olup olmadığını belirlemek için ki-kare testi uygulandı. KOAH hastalarının ve sağlıklı kontrollerin allel ve genotip frekanslarını karşılaştırmak için Fisher's exact ve Ki-kare testleri kullanıldı. *GCLC* geni G>C (rs600033) polimorfizmi ile hastaların klinik ve demografik özellikleri arasındaki korelasyon, varyans analizi (ANOVA), Fisher's exact ve ki-kare testleri ile değerlendirildi. Risk faktörü tespiti için %95 güven aralığı (GA) ve olasılık oranı (OR) hesaplandı. P değerleri <0,05 ise anlamlı kabul edildi ve 2 uçlu p değerleri dikkate alındı. Genotip sıklıklarının belirlenmesinde R Studio programının 'ggplot2' paketinden yararlanıldı. G*Power 3.1.9.4 programı yardımıyla bağımsız gruplarda iki örneklem düzenine göre %80 güç ve %5 yanılma payı ve 0.09'luk etki büyüklüğü ile çalışma için 191 örneklem belirlendi.

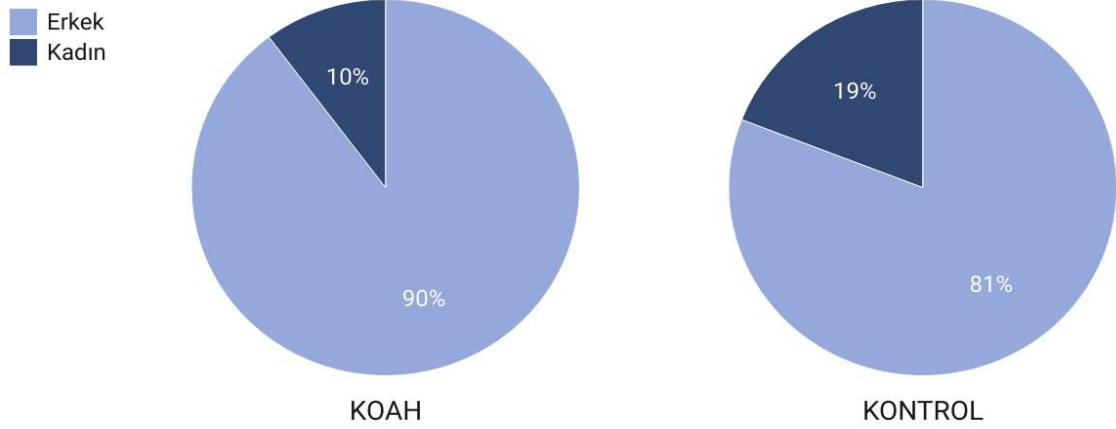
4. SONUÇ VE BULGULAR

Bu çalışmada, *GCLC* geni G>C (rs600033) polimorfizmi ile KOAH arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla, yaş ortalaması $62,21 \pm 11,159$ (en düşük 27, en yüksek 82) olan, 12 kadın ve 105 erkekten oluşan 117 KOAH hastası ile yaş ortalaması $59,19 \pm 13,380$ (en düşük 28, en yüksek 85) olan 22 kadın ve 93 erkekten oluşan 115 sağlıklı kontrol değerlendirildi. Hasta grubu, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları polikliniğine kontrol amacı ile başvuran, atakta olmayan 59 stabil KOAH hastası (Grup 1) ile ve Göğüs Hastalıkları servisine atak nedeni ile yatırılan 58 Akut Alevlenme hastasından (Grup 2) oluşmakta idi. Hasta ve kontrollerin cinsiyet, yaş, lenfosit (LYM) ve platelet (PLT) verileri birbiri ile uyumlu idi ($p>0.05$) (Tablo 4.1) (Şekil 4.1). Ancak hasta ve kontrollerin aile öyküsü, sigara öyküsü, C-reaktif protein (CRP), beyaz küre (WBC) ve nötrofil (NEU) verileri birbirinden farklılık göstermekte idi ($p<0.05$) (Tablo 4.1).

Tablo 4. 1. Çalışmaya dahil edilen KOAH hastaları ve kontrol grubundaki bireylerin demografik ve klinik özelliklerine ait istatistiksel bulgular

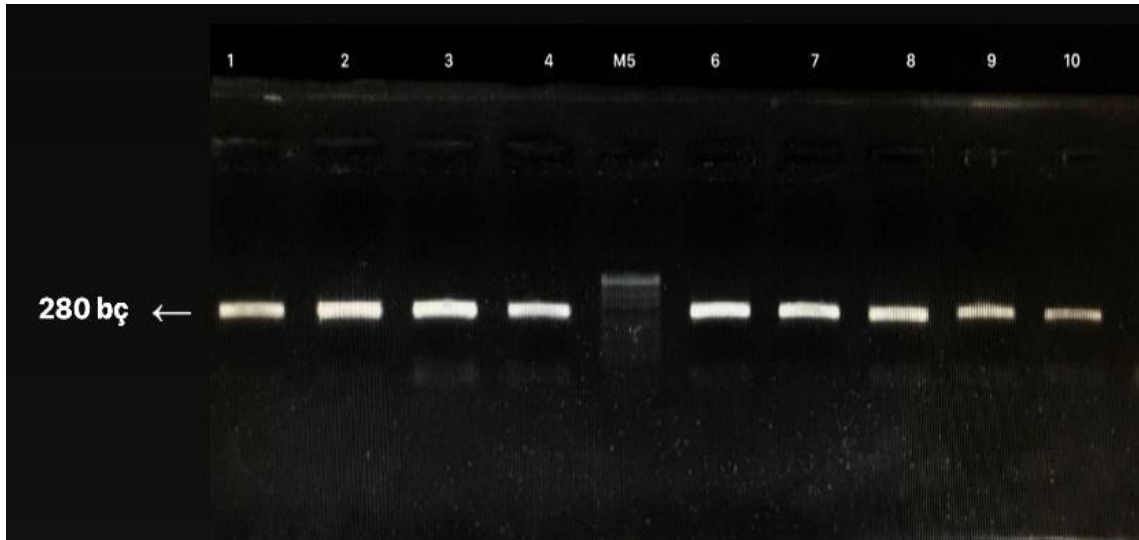
	KOAH Hasta Grubu (n=117)	Kontrol Grubu (n=115)	p değeri
Cinsiyet n(%)			
Kadın	12 (%10,3)	22 (%19,1)	0,065
Erkek	105 (%89,7)	93 (%80,9)	
Aile Öyküsü			
Var	8 (%40,0)	6 (%9,7)	0,004
Yok	12 (%60,0)	56 (%90,3)	
Sigara Öyküsü			
İçiyor	31 (%27,9)	25 (%23,1)	0,000
İçmiş	66 (%59,5)	43 (%39,8)	
Hiç içmemiş	14 (%12,6)	40 (%37,0)	
Yaş Ortalaması	$62,21 \pm 11,159$	$59,19 \pm 13,380$	0,063
CRP	$72,14 \pm 89,875$	$11,45 \pm 26,537$	0,000
WBC	$9933,97 \pm 3607,138$	$8156,32 \pm 2821,389$	0,000
NEU	$7220,09 \pm 3614,692$	$5091,07 \pm 2279,209$	0,000
LYM	$6433,62 \pm 50538,548$	$2201,52 \pm 906,356$	0,377

PLT	241425,22 ± 92963,774	233515,18 ± 64885,482	0,459
------------	-----------------------	-----------------------	-------



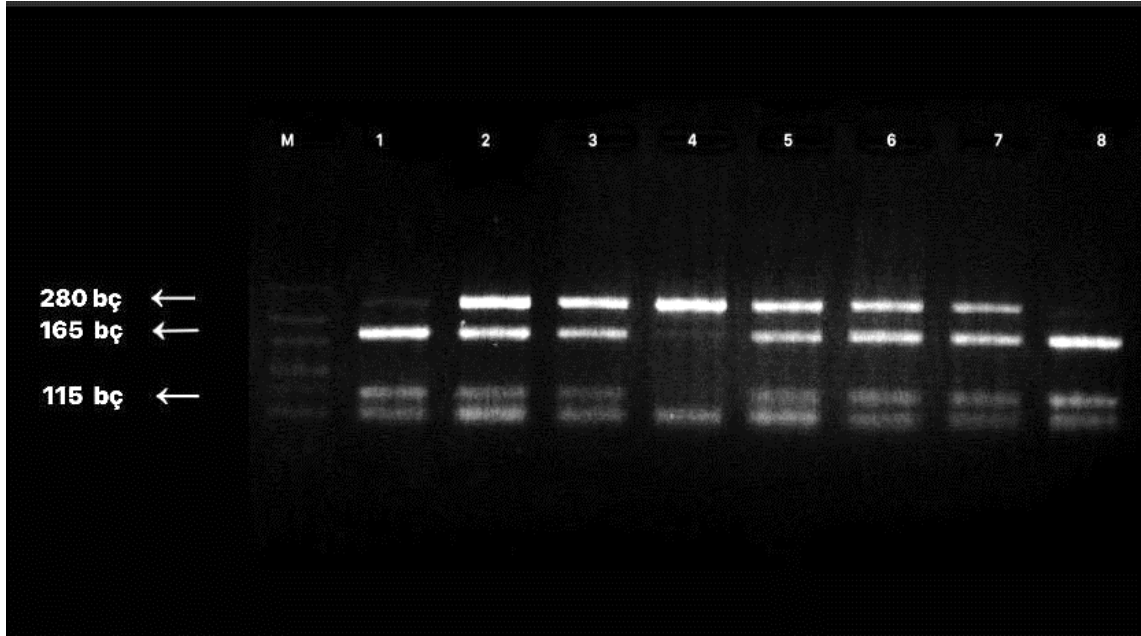
Şekil 4. 1. Çalışmaya dahil edilen KOAH hastaları ve kontrol grubundaki bireylerin cinsiyet dağılımı

Çalışma grubu DNA'larına uygulanan PZR şartları ve programı tamamen bizim tarafımızdan optimize edilerek başarılı PZR ürünleri elde edildi. PZR sonucunda 280 bç'lik bölge çoğaltılıp elde edilen ürünler %2'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. Bazı örneklerin PZR yöntemi ile çoğaltılan *GCLC* G>C (rs600033) bölgesine ait jel elektroforezi görüntüsü. Bantlar 280 bç büyüklüğündedir. (Kuyu 5 pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker)

PZR ürünlerinin FspB I restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi sonucunda homozigot dominant GG, heterozigot GC ve homozigot resesif CC olmak üzere üç farklı genotip belirlendi. Üç farklı genotip %3'lük agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.3).



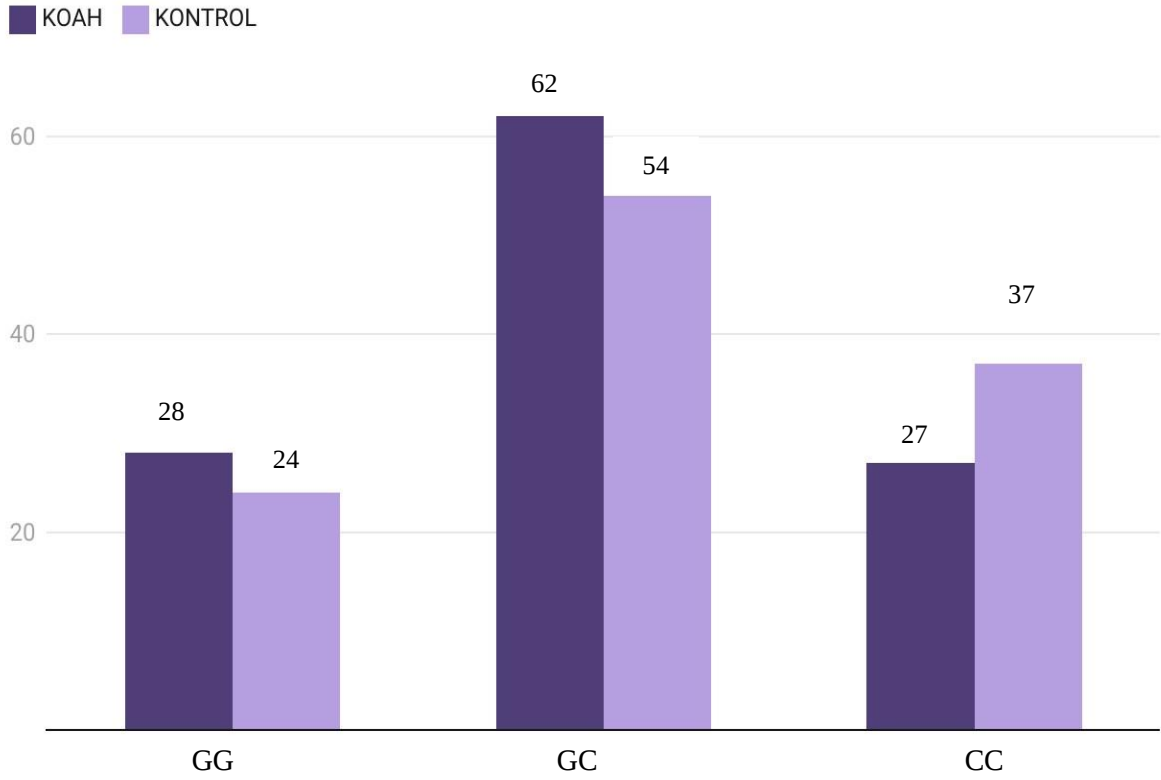
Şekil 4. 3. *GCLC* geni G>C (rs600033) polimorfik bölgesinin FspBI restriksiyon endonükleazı ile belirlenen RFLP sonuçları. Kuyulardan 4 homozigot dominant (GG); 1 ve 8 homozigot resesif (CC); 2,3,5,6 ve 7 heterozigot (GC). (Kuyu 1 pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz sonuçlar şu şekildeydi: Toplam 117 KOAH hastanın 28'i (%23,9) homozigot dominant GG, 62'si (%53,0) heterozigot GC ve 27'si (%23,1) homozigot resesif CC; toplamda 115 kontrolden de 24'ü (%20,9) homozigot dominant GG, 54'ü (%47,0) heterozigot GC ve 37'si (%32,2) homozigot resesif CC. Allel frekanslarına baktığımızda hastalarda toplam 234 allelden 118'i (%50,4) G alleli, 116'sı (%49,6) C alleli ve kontrollerde toplam 230 allelden 102'si (%44,34) G alleli, 128'i (%55,7) C alleli şeklindeydi. Hastaların ve kontrollerin genotip ve allel sıklıkları karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunamadı (sırasıyla $p=0,961$, $p=0,211$ ve $p=0,190$). Hasta ve kontrol genotiplerini, GG'ye karşı GC+CC ve GG+GC'ye karşı CC şeklinde karşılaştırdığımızda da istatistiksel olarak herhangi bir fark saptanmadı (sırasıyla $p=0,576$, $p=0,121$) (Tablo 4.2.) (Şekil 4.4) (Şekil 4.5). Hasta ve kontrol grubunun genotip dağılımları Hardy-Weinberg dengesi ile uyum içerisindeydi (sırasıyla $p=0,517$ ve $p=0,601$).

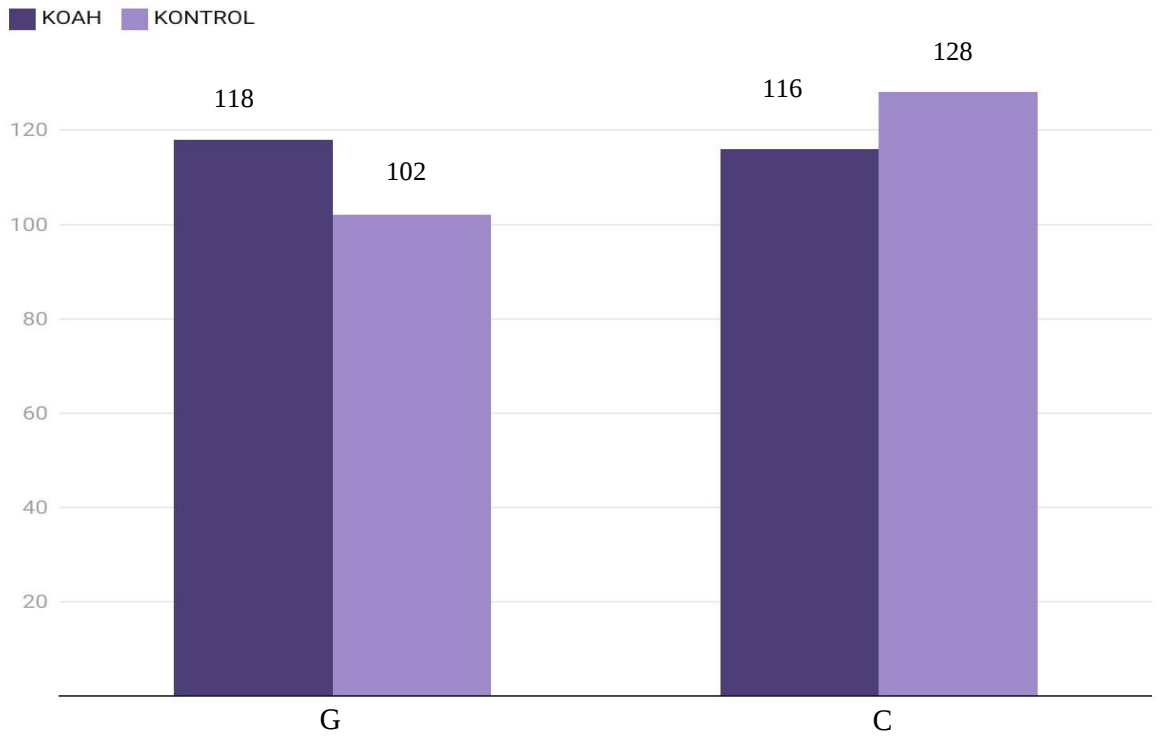
Tablo 4. 2. *GCLC* gen polimorfizminin KOAH hastası ve sağlıklı kontrollerdeki genotip ve allel sıklıkları

Polimorfizm	KOAH Hastası	Sağlıklı Kontrol	p	OR (%95 CI)
<i>GCLC</i> G>C (rs600033)	HWE: 0.517 n=117 (%)	HWE: 0.601 n=115 (%)		
Genotipler				
GG	28 (23.9)	24 (20.9)	Ref.	
GC	62 (53.0)	54 (47.0)	0.961	0.98(0.50-1.90)
CC	27 (23.1)	37 (32.2)	0.211	0.63(0.29-1.31)
GG : GC+CC	28 (23.9) : 89 (76.1)	24 (20.9) : 91 (79.2)	0.576	0.84(0.44-1.56)
GG+GC : CC	90 (76.9) : 27 (23.1)	78 (67.8) : 37 (32.2)	0.121	0.84(0.44-1.56)
Alleller				
G : C	118 (50.4) : 116 (49.6)	102 (44.3) : 128 (55.7)	0.190	0.78(0.54- 1.13)

Veriler χ^2 test ile analiz edildi. *GCLC*, glutamate sistein ligaz katalitik ünitesi; HWE, Hardy Weinberg dengesi; Ref, referans.



Şekil 4. 4. KOAH Hastaları ve Kontrollerde Genotip Frekanslarının Karşılaştırılması



Şekil 4. 5. KOAH Hastaları ve Kontrollerde Allel Frekanslarının Karşılaştırılması

Hastaların stabil KOAH ve Akut Alevlenme olarak gruplandırılması sonrası yapılan karşılaştırma sonucunda elde ettiğimiz veriler ise şu şekildedir: 59 Grup 1 Stabil KOAH hastasının 14 'ü (%23.7) homozigot dominant GG, 28'i (%47.5) heterozigot GC ve 17'si (%28.8) homozigot resesif CC; 58 Grup 2 Akut Alevlenme hastasının 14'ü (%24.1) homozigot dominant GG, 34'ü (%58.6) heterozigot GC ve 10'u (%17.2) homozigot resesif CC; 115 Grup 3 kontrolden de 24'ü (%20,9) homozigot dominant GG, 54'ü (%47,0) heterozigot GC ve 37'si (%32,2) homozigot resesif CC. Allel frekanslarına baktığımızda Grup 1 Stabil KOAH toplam 118 allelden 56'sı (%47.5) G alleli, 62'si (%52.5) C alleli, Grup 2 Akut Alevlenme toplam 116 allelden 62'si (%53.5) G alleli, 54'ü (%46.5) C alleli ve kontrolden ise toplam 230 allelden 102'si (%44,34) G alleli, 128'i (%55,7) C alleli şeklindeydi. Grup 1 ve Grup 3'ün genotip ve allel sıklıklarının karşılaştırılması sonucunda, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmadı ($p>0.05$) (Tablo 4.3). Grup 2 ve Grup 3'ün allel sıklıklarının karşılaştırılması sonucu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0.05$), genotip sıklıklarının karşılaştırılması sonucunda GG+GC'ye karşı CC şeklinde yapılan genotip karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p=0.037$, OR 0.44, %95 CI: 0.19-0.95) (Tablo 4.3). CC genotipinin sıklığı kontrol grubunda Akut Alevlenme hastalarına oranla daha yüksekti.

Çalışmaya dahil edilen KOAH hastalarının demografik ve klinik özelliklerinin *GCLC* geni G>C (rs600033) polimorfizmine göre değerlendirilmesi Tablo 4.4'de verilmiştir. Yapılan ki-kare ve varyans analizleri sonucunda hastalara ait cinsiyet, aile öyküsü, çevresel faktörlere maruziyet, GOLD evreleri, GOLD grupları, mMRCDispne skalası evreleri, yaş, FEV1, FVC, FEV1/FVC, SpO2, CRP, WBC, NEU, LYM, PLT verileri ile *GCLC* geni G>C (rs600033) polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkiye rastlanmadı (Tablo 4.4).

Tablo 4. 3. *GCLC* geni G>C (rs600033) polimorfizminin Stabil KOAH, Akut Alevlenme ve sağlıklı kontrollerdeki genotip ve allel sıklıklarının karşılaştırılması

Polimorfizm	Grup 1 Stabil KOAH n=59 (%)	Grup 2 Akut Alevlenme n=58 (%)	Grup 3 Sağlıklı Kontrol n=115 (%)	Grup 1'e karşı Grup 2		Grup 1'e karşı Grup 3		Grup 2'ye karşı Grup 3	
				p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)
Genotipler									
GG	14 (23.7)	14 (24.1)	24 (20.9)	Ref.					
GC	28 (47.5)	34 (58.6)	54 (47.0)	0.670	0.82 (0.33-2.04)	0.773	0.88 (0.39-2.02)	0.849	1.07 (0.49-2.41)
CC	17 (28.8)	10 (17.2)	37 (32.2)	0.332	1.68 (0.56-5.10)	0.592	0.78 (0.32-1.92)	0.113	0.46 (0.17-1.22)
GG : GC+CC	14 (23.7) : 45 (75.5)	14 (24.1) : 44 (75.8)	24 (20.9) : 91 (79.2)	0.958	1.02 (0.43-2.42)	0.665	0.84 (0.40-1.83)	0.624	0.82 (0.39-1.79)
GG+GC : CC	42 (71.2) : 17 (28.8)	48 (82.7) : 10 (17.2)	78 (67.9) : 37 (32.2)	0.137	1.93 (0.79-4.83)	0.650	0.85 (0.42-1.69)	0.037	0.44 (0.19-0.95)
Alleller									
G	56 (47.5)	62 (53.5)	102 (44.4)	0.359	1.27 (0.75-2.12)	0.581	0.88 (0.56-1.38)	0.109	1.43 (0.91-2.25)
C	62 (52.5)	54 (46.5)	128 (55.6)	Ref.					

Veriler χ^2 test ile analiz edildi. *GCLC*, glutamate sistein ligaz katalitik ünitesi; HWE, Hardy Weinberg dengesi; Ref, referans

Tablo 4. 4. Çalışmaya dahil edilen KOAH hastalarının demografik ve klinik özelliklerinin GCLC geni G>C (rs600033) polimorfizmine göre değerlendirilmesi

		GCLC G>C			
Karakterler	Toplam n=117	GG n=28	GC n=62	CC n=27	p
Cinsiyet n (%)					
Kadın	12 (%10,3)	2 (%7,1)	7 (%11,3)	3 (%11,1)	0,824
Erkek	105 (89,7)	26 (%92,9)	55 (%88,7)	24 (%88,9)	
Aile Öyküsü n (%)					
Var	8 (%40,0)	2 (%100,0)	5 (%33,3)	1 (%33,3)	0,189
Yok	12 (%60,0)	0 (%0,0)	10 (%66,7)	2 (%66,7)	
Çevresel Faktörlere Maruziyet n (%)					
Var	13 (%65)	1 (%50,0)	9 (%60,0)	3 (%100,0)	0,372
Yok	7 (%35)	1 (%50,0)	6 (%40,0)	0 (%0,0)	
GOLD Evreleri n (%)					
GOLD 1	14 (%14,6)	2 (%8,0)	8 (%16,3)	4 (%18,2)	0,897
GOLD 2	32 (%33,3)	9 (%36,0)	15 (%30,6)	8 (%36,4)	
GOLD 3	35 (%36,5)	10 (%40,0)	17 (%34,7)	8 (%36,4)	
GOLD 4	15 (%15,6)	4 (%16,0)	9 (%18,4)	2 (%9,1)	
GOLD Grupları n(%)					
A	49 (%42,2)	12 (%42,9)	23 (%37,1)	14 (%53,8)	0,398
B	9 (%7,8)	2 (%7,1)	5 (%8,1)	2 (%7,7)	
C	1 (%0,9)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	1 (%3,8)	
D	57 (%49,1)	14 (%50,0)	34 (%54,8)	9 (%34,6)	
mMRCDispne Skalası Evreleri n(%)					
mMRC Evre 0	18 (%15,5)	2 (%7,1)	10 (%16,1)	6 (%23,1)	0,327
mMRC Evre 1	32 (%27,6)	10 (%35,7)	13 (%21,0)	9 (%34,6)	
mMRC Evre 2	15 (%12,9)	10 (%35,7)	10 (%16,1)	2 (%7,7)	
mMRC Evre 3	32 (%27,6)	10 (%35,7)	21 (%33,9)	5 (%19,2)	
mMRC Evre 4	32 (%27,6)	7 (%25,0)	8 (%12,9)	4 (%15,4)	
Yaş	62,21 ± 11,159	63,82 ± 9,843	60,95 ± 11,946	63,44 ± 10,581	0,430
FEV1	53,14 ± 21,877	52,76 ± 20,955	51,65 ± 22,173	56,82 ± 22,819	0,657
FVC	68,00 ± 21,821	66,56 ± 20,199	67,66 ± 24,356	70,41 ± 17,81829	0,826

FEV1/FVC	60,31 ± 14,09	60,12 ± 12,892	60,08 ± 14,301	61,05 ± 15,496	0,963
SpO₂	92,86 ± 3,244	91,46 ± 3,382	93,09 ± 3,288	94,00 ± 2,398	0,158
CRP	72,14 ± 89,875	111,61 ± 121,189	68,44 ± 83,906	45,79 ± 62,482	0,152
WBC	9933,97 ± 3607,138	10492,14 ± 4522,369	9690,97 ± 3255,512	9912,31 ± 3377,689	0,625
NEU	7220,09 ± 3614,692	7650,00 ± 4752,915	7053,87 ± 2998,190	7153,46 ± 3673,218	0,768
LYM	6433,62 ± 50538,548	21218,21 ± 102850,369	1661,13 ± 718,174	1892,31 ± 777,413	0,207
PLT	241425,22 ± 92963,774	237185,18 ± 84791,616	249209,68 ± 98645,605	227265,38 ± 88372,887	0,583

(GOLD, Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease; mMRC, Modifiye Medical Research Council Ölçeği; FEV1, 1.saniyedeki zorlu ekspiratuar hacim; FVC, Vital kapasite; SpO₂, Oksijen saturasyonu; CRP, C-reaktif protein; WBC, Beyaz küre; NEU, Nötrofil; LYM, lenfosit; PLT, Platelet)

5. TARTIŞMA

GCL, serbest radikallerin temizlenmesi ve hücrenin oksidatif hasara karşı korunması için gerekli olan GSH'ın de novo sentezinde hız sınırlayıcı bir enzimdir. Bu enzim, katalitik (GCLC) ve modülatör (GCLM) olmak üzere 2 alt birimden oluşan bir heterodimerdir (Franklin ve ark., 2009). GCL'nin katalitik alt birimi olan GCLC tüm enzimatik aktiviteye sahiptir (Ferguson & Bridge, 2016). GSH metabolizmasında rol oynayan genlerdeki polimorfizmlerin, oksidatif stresi arttıran koşullara maruz kalan bireylerde KOAH riskini arttırdığı rapor edilmiştir (Nichenametla ve ark., 2013). Ayrıca yapılan birçok çalışmada, düşük *GCLC* ifade düzeylerinin GSH seviyelerini önemli ölçüde azalttığı ve bunun sonucunda akciğer fonksiyonlarının azaldığı bildirilmiştir (Siedlinski ve ark., 2008). *GCLC* genindeki polimorfizmler, KOAH, akciğer kanseri, pulmoner tüberküloz, miyokard enfarktüsü, tip I diyabet ve sedef hastalığı gibi birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Liu ve ark., 2007; Nichenametla ve ark., 2013; T & E, 2016; Koide ve ark., 2003; Azarova ve ark., 2020; Efanova ve ark., 2023).

Bizim yaptığımız ve 117 KOAH hastası ve 115 sağlıklı kontrolün dahil edildiği çalışmamızda, *GCLC* geni G>C (rs600033) polimorfizmi ile KOAH arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Fakat yaptığımız gruplandırma sonucunda, Akut Alevlenme hastaları ile kontrolleri karşılaştırdığımız zaman, CC genotip sıklığının, kontrollerde Akut Alevlenme hastalarına nazaran daha fazla olduğu görülmüştür ($p=0.037$, OR 0.44, %95 CI:0.19-0.95). Bu da bize CC genotipinin Akut alevlenmeye karşı koruyucu olabileceğini göstermektedir. Henüz bu polimorfizmin gen sentezine veya fonksiyonuna etkisiyle ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. GCL'nin azalması GSH sentezinin de azalması anlamına gelmektedir. Normal GSH seviyelerinin korunamaması, inflamatuvar yanıtı inhibe edememekle birlikte KOAH'ta alevlenme riskini de arttırabilir. Bu varsayımın ileri çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Literatürde *GCLC* G>C (rs600033) polimorfizmi ile KOAH arasındaki ilişkiyi araştıran başka çalışma bulunmamaktadır. Fakat KOAH ile *GCLC* genindeki diğer polimorfizmler arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar mevcuttur. Bu polimorfizmlerin bir kısmı bizim çalıştığımız intronik polimorfizmden farklı olarak promoter polimorfizmidir ve protein sentezine olası etkileri bulunmaktadır.

Çin popülasyonunda, 166 KOAH'lı hasta ve 166 sağlıklı kontrolün dahil edildiği bir çalışmada, *GCLC* geni -129 C>T promotor polimorfizmi ile KOAH arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p > 0.05$, OR 1.8, %95 CI: 1.0-3.3) (Liu ve ark., 2007). Ama bu çalışmada KOAH hastaları gruplandırılmamış olup bizim bulduğumuz ilişkiye benzer bir ilişkinin gözden kaçmış olma ihtimali muhtemeldir. Tang ve arkadaşlarının, 1281 Afrikalı Amerikalı ve 1794 Avrupalı Amerikalı'nın katıldığı çok geniş bir popülasyon ile yaptığı çalışmada, Avrupalı Amerikalı popülasyonunda *GCLC* geni C>T rs17883901 promotor polimorfizmi ile KOAH arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu bulunmuştur ($p = 4.50 \times 10^{-5}$). *GCLC* geni C>T rs17883901 promotor polimorfizmi, in vitro endotel hücrelerinde daha düşük *GCLC* ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir (Tang ve ark., 2013). Bu ilişkinin saptanmasında çalışılan popülasyonun geniş olması ve çalışılan polimorfizmin farklı olması etkili olmuş olabilir. Bentley ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise *GCLC* geni rs2066511, rs2284650 polimorfik bölgeleri ile KOAH ve yaşlanma arasındaki ilişki, 972 Afrikalı Amerikalı ve 1415 Avrupalı Amerikalı üzerinde araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, Avrupalı Amerikalılarda *GCLC* geni intronik rs2066511 polimorfizmi, Afrikalı Amerikalılarda da *GCLC* geni intronik rs2284650 polimorfizmi ile KOAH arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuş olup, bu polimorfizmler akciğerlerde düşük *GCLC* ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir ($p = 0.00008$, $p = 0.0000009$) (Bentley ve ark., 2012). Amerika'da 620 KOAH (KOAH'lı Akciğer kanseri ve yalnızca KOAH) ve 893 sağlıklı kontrol gibi çok geniş popülasyon ile yapılan çalışmada, *GCLC* geninde birçok polimorfizme bakılmış ve *GCLC* geni rs542914, rs4712035, rs12524550, rs2100375 polimorfizmleri ile KOAH arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur (sırasıyla OR= 0.78 %95 CI 0.62-.0.99 $p = 6.26 \times 10^{-3}$, OR= 1.37 %95 CI 1.01-1.86 $p = 7.01 \times 10^{-3}$, OR= 2.42 %95 CI 1.11-5.28 $p = 3.54 \times 10^{-3}$ ve OR= 0.75 %95 CI 0.58-.97 $p = 3.66 \times 10^{-3}$) (De Andrade ve ark., 2012). Çalışılan popülasyonun geniş olması, hasta grubunda akciğer kanseri olan bireylerin de yer alması, bu sonuçta etkili olmuş olabilir.

Yaptığımız literatür taramasında, her ne kadar KOAH ile bizim çalıştığımız *GCLC* geni G>C (rs600033) polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştıran çalışma bulunmasa da, aynı polimorfizmin farklı hastalıklarla ilişkisinin araştırıldığı iki çalışmaya rastlanmıştır. İlki olan ve Amerika'da 1299 akciğer kanseri hastası üzerinde yapılan bir çalışmada (2012), *GCLC* geni G>C (rs600033) polimorfizmi ile hastaların bildirdiği yaşam kalitesi sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Aynı çalışmada, sigara ve alkol tüketiminin akciğer kanseri hastalarında yaşam kalitesi

üzerinde olumsuz etkilere yol açarak akciğer kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir (Sloan ve ark., 2012).

İkinci olarak, Japonya'da (2016) akciğer tüberkülozu (TB) olan 100 hasta (Antitüberküloz ilaca bağlı hepatotoksitesi (TDH) olan ve olmayan TB) ile yapılan bir çalışmada, *GCLC* G>C (rs600033) polimorfizmi ile TDH arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0,718$, OR= 0.869 %95 CI 0.51-1.80) (T & E, 2016).

GCLC geni G>C (rs600033) polimorfizminin allel sıklıklarının, farklı popülasyonlarda değişen sıklıklarda olduğu bildirilmiştir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs600033>). Afrika popülasyonunda G allel sıklığı %66, C allel sıklığı ise %34'dür. Amerikan popülasyonunda G allel sıklığı %43, C allel sıklığı ise %57'dir. Doğu Asya popülasyonunda G allel sıklığı %59, C allel sıklığı ise %41'dir. Avrupa popülasyonunda (Finlandiya, İngiltere, İskoçya, İspanya, İtalya) G allel sıklığı %57, C allel sıklığı ise %43'dür. Güney Asya popülasyonunda (Pakistan, Bangladeş) G allel sıklığı %46, C allel sıklığı ise %54'dür. Bizim çalışmamızda, normal popülasyonun (115 kontrol), G allel sıklığı %44.3, C allel sıklığı ise %55.7 olarak belirlenmiş olup bu değerler, Amerika ve Güney Asya popülasyonlarıyla benzerlik göstermektedir.

KOAH hastalarında, akut alevlenmeler sırasında sistemik inflamatuvar biyobelirteçler olan CRP, WBC, nötrofil, lökosit, trombosit, fibrinojen sayısının belirgin şekilde arttığı bildirilmiştir. Bu biyobelirteçlerin artan düzeylerinin, hastalardaki akut alevlenmelerin bir belirtisi olduğu belirtilmiştir (Larsson K. , 2008). Çalışmamızda, demografik karakterleri karşılaştırdığımızda KOAH'lı hastaların CRP, WBC ve nötrofil düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bulduk ($p=0,000$). KOAH'lı hastalarda inflamasyonun nedenlerini sorgulamak amacıyla, hasta ve kontrol grubunda sigara öyküsünü inceledik. Yapmış olduğumuz karşılaştırma sonucunda, KOAH hastaları ve sağlıklı kontroller arasında sigara öyküsü açısından istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu gözlemlendi ($p=0,000$).

Sonuç olarak, Türk popülasyonunda *GCLC* geni G>C (rs600033) polimorfizminin KOAH hastalarında Akut Alevlenme için bir risk oluşturabileceği tespit edilmiştir. Literatürde, KOAH ile *GCLC* geni G>C (rs600033) polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştıran daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Daha net sonuçların

elde edilmesi açısından geniş popölasyonların çalışılmasına ve mekanizmayı anlamak için de fonksiyonel analizlere gereksinim vardır.



KAYNAKLAR

- Åberg, J., Hasselgren, M., Montgomery, S., Lisspers, K., Stållberg, B., Janson, C., & Sundh, J. (2019). Sex-related differences in management of Swedish patients with a clinical diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 14, 961. <https://doi.org/10.2147/COPD.S193311>
- Allinson, J. P., Hardy, R., Donaldson, G. C., Shaheen, S. O., Kuh, D., & Wedzicha, J. A. (2017). Combined impact of smoking and early-life exposures on adult lung function trajectories. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 196(8), 1021–1030. https://doi.org/10.1164/RCCM.201703-0506OC/SUPPL_FILE/DISCLOSURES.PDF
- Averill-Bates, D. A. (2023). The antioxidant glutathione. *Vitamins and Hormones*, 121, 109–141. <https://doi.org/10.1016/BS.VH.2022.09.002>
- Azarova, I., Klyosova, E., Lazarenko, V., Konoplya, A., & Polonikov, A. (2020). Genetic variants in glutamate cysteine ligase confer protection against type 2 diabetes. *Molecular Biology Reports*, 47(8), 5793–5805. <https://doi.org/10.1007/S11033-020-05647-5>
- Barberà, J. A., Roca, J., Ferrer, A., Félez, M. A., Díaz, O., Roger, N., & Rodriguez-Roisin, R. (1997). Mechanisms of worsening gas exchange during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, 10(6), 1285–1291. <https://doi.org/10.1183/09031936.97.10061285>
- Barbu, C., Iordache, M., & Man, M. G. (2011). Inflammation in COPD: pathogenesis, local and systemic effects. *Rom J Morphol Embryol*, 52(1), 21–27. <http://www.rjme.ro/>
- Barnes, P. J. (2016). Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(1), 16–27. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2016.05.011>
- Barnes, P. J., Baker, J., & Donnelly, L. E. (2019). Cellular senescence as a mechanism and target in chronic lung diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 200(5), 556–564. https://doi.org/10.1164/RCCM.201810-1975TR/SUPPL_FILE/DISCLOSURES.PDF
- Bartling, B. (2013). Cellular senescence in normal and premature lung aging. *Zeitschrift Fur Gerontologie Und Geriatrie*, 46(7), 613–622. <https://doi.org/10.1007/S00391-013-0543-3>
- Bea, F., Hudson, F. N., Neff-LaFord, H., White, C. C., Kavanagh, T. J., Kreuzer, J., Preusch, M. R., Blessing, E., Katus, H. A., & Rosenfeld, M. E. (2009). Homocysteine stimulates antioxidant response element-mediated expression of glutamate-cysteine ligase in mouse macrophages. *Atherosclerosis*, 203(1), 105–111. <https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2008.06.024>
- Bentley, A. R., Kritchevsky, S. B., Harris, T. B., Newman, A. B., Bauer, D. C., Meibohm, B., Clark, A. G., & Cassano, P. A. (2012). Genetic variation in antioxidant enzymes and lung function. *Free Radical Biology & Medicine*, 52(9), 1577–1583. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2012.02.025>

- Bhandari, R., & Sharma, R. (2012). Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease: a descriptive study in the mid-western region of Nepal. *International Journal of COPD*, 2012, 253–257. <https://doi.org/10.2147/COPD.S28602>
- Bollmeier, S. G., & Hartmann, A. P. (2020). Management of chronic obstructive pulmonary disease: A review focusing on exacerbations. *American Journal of Health-System Pharmacy: AJHP*, 77(4), 259. <https://doi.org/10.1093/AJHP/ZXZ306>
- Borup, H., Kirkeskov, L., Hanskov, D. J. A., & Brauer, C. (2017). Systematic review: chronic obstructive pulmonary disease and construction workers. *Occupational Medicine (Oxford, England)*, 67(3), 199. <https://doi.org/10.1093/OCCMED/KQX007>
- Brown, L. A. S., & Jones, D. P. (2015). Glutathione and thiols. *Studies on Experimental Toxicology and Pharmacology*, 131–147. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19096-9_7
- Brusselle, G. G., Joos, G. F., & Bracke, K. R. (2011). New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet (London, England)*, 378(9795), 1015–1026. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60988-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60988-4)
- Burgoyne, R. A., Fisher, A. J., & Borthwick, L. A. (2021). The Role of Epithelial Damage in the Pulmonary Immune Response. *Cells*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/CELLS10102763>
- Burkes, R. M., Gassett, A. J., Ceppe, A. S., Anderson, W., O'Neal, W. K., Woodruff, P. G., Krishnan, J. A., Barr, R. G., Han, M. L. K., Martinez, F. J., Comellas, A. P., Lambert, A. A., Kaufman, J. D., Dransfield, M. T., Wells, J. M., Kanner, R. E., Paine, R., Bleecker, E. R., Paulin, L. M., ... Croxton, T. (2018). Rural residence and chronic obstructive pulmonary disease exacerbations: Analysis of the SPIROMICS cohort. *Annals of the American Thoracic Society*, 15(7), 808–815. https://doi.org/10.1513/ANNALSATS.201710-837OC/SUPPL_FILE/DISCLOSURES.PDF
- Cantin, A. M., & Bégin, R. (1991). Glutathione and inflammatory disorders of the lung. *Lung*, 169(3), 123–138. <https://doi.org/10.1007/BF02714149>
- Cantin, A. M., North, S. L., Hubbard, R. C., & Crystal, R. G. (1987). Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 63(1), 152–157. <https://doi.org/10.1152/JAPPL.1987.63.1.152>
- Chan, S. M. H., Selemidis, S., Bozinovski, S., & Vlahos, R. (2019). Pathobiological mechanisms underlying metabolic syndrome (MetS) in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): clinical significance and therapeutic strategies. *Pharmacology & Therapeutics*, 198, 160–188. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2019.02.013>
- Chen, Y., Shertzer, H. G., Schneider, S. N., Nebert, D. W., & Dalton, T. P. (2005). Glutamate cysteine ligase catalysis: dependence on ATP and modifier subunit for regulation of tissue glutathione levels. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33766–33774. <https://doi.org/10.1074/JBC.M504604200>

- Cheng, L., Liu, J., Li, B., Liu, S., Li, X., & Tu, H. (2016). Cigarette Smoke-Induced Hypermethylation of the GCLC Gene Is Associated With COPD. *Chest*, 149(2), 474–482. <https://doi.org/10.1378/CHEST.14-2309>
- Cho, S. J., & Stout-Delgado, H. W. (2020). Aging and Lung Disease. *Annual Review of Physiology*, 82, 433. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-021119-034610>
- Choi, J. Y., Kim, S. Y., Lee, J. H., Park, Y. B., Kim, Y. H., Um, S. J., Jung, K. S., Yoo, K. H., Park, S. J., & Yoon, H. K. (2020). Clinical Characteristics of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Female Patients: Findings from a KOCOSS Cohort. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 15, 2217–2224. <https://doi.org/10.2147/COPD.S269579>
- Cooper, C. B., & Celli, B. (2008). Venous Admixture in COPD: Pathophysiology and Therapeutic Approaches. *COPD*, 5(6), 376. <https://doi.org/10.1080/15412550802522783>
- Cooper, D. N. (2010). Functional intronic polymorphisms: Buried treasure awaiting discovery within our genes. *Human Genomics*, 4(5), 284–288. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-5-284>
- Cortes-Wanstreet, M. M., Giedzinski, E., Limoli, C. L., & Luderer, U. (2009). Overexpression of glutamate-cysteine ligase protects human COV434 granulosa tumour cells against oxidative and gamma-radiation-induced cell death. *Mutagenesis*, 24(3), 211–224. <https://doi.org/10.1093/MUTAGE/GEN073>
- Coulthard, L. R., White, D. E., Jones, D. L., McDermott, M. F., & Burchill, S. A. (2009). p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends in Molecular Medicine*, 15(8), 369–379. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2009.06.005>
- Dato, S., Soerensen, M., Lagani, V., Montesanto, A., Passarino, G., Christensen, K., Tan, Q., & Christiansen, L. (2014). Contribution of genetic polymorphisms on functional status at very old age: a gene-based analysis of 38 genes (311 SNPs) in the oxidative stress pathway. *Experimental Gerontology*, 52, 23–29. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2014.01.014>
- De Andrade, M., Li, Y., Marks, R. S., Deschamps, C., Scanlon, P. D., Olswold, C. L., Jiang, R., Swensen, S. J., Sun, Z., Cunningham, J. M., Wampfler, J. A., Limper, A. H., Midthun, D. E., & Yang, P. (2012). Genetic variants associated with the risk of chronic obstructive pulmonary disease with and without lung cancer. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 5(3), 365–373. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0243>
- de Groot, L. E. S., van der Veen, T. A., Martinez, F. O., Hamann, J., Lutter, R., & Melgert, B. N. (2019). Oxidative stress and macrophages: driving forces behind exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease? *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 316(2), L369–L384. <https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.00456.2018>
- Deng, N., Zhou, H., Fan, H., & Yuan, Y. (2017). Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget*, 8(66), 110635–110649. www.impactjournals.com/oncotarget/

- Eapen, M. S., Myers, S., Walters, E. H., & Sohal, S. S. (2017). Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a true paradox. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 11(10), 827–839. <https://doi.org/10.1080/17476348.2017.1360769>
- Efanova, E., Bushueva, O., Saranyuk, R., Surovtseva, A., Churnosov, M., Solodilova, M., & Polonikov, A. (2023). Polymorphisms of the GCLC Gene Are Novel Genetic Markers for Susceptibility to Psoriasis Associated with Alcohol Abuse and Cigarette Smoking. *Life (Basel, Switzerland)*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/LIFE13061316>
- Eksi, Y. E., Karaali, Z. E., Incekara, K., & Ergen, H. A. (2013). Myeloperoxidase and glutamate-cysteine ligase polymorphisms in type 2 diabetes mellitus: A preliminary study. *Journal of Medical Biochemistry*, 33(2), 156–161. <https://doi.org/10.2478/JOMB-2013-0022>
- Fazleen, A., & Wilkinson, T. (2020). Early COPD: current evidence for diagnosis and management. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 14. <https://doi.org/10.1177/1753466620942128>
- Ferguson, G., & Bridge, W. (2016). Glutamate cysteine ligase and the age-related decline in cellular glutathione: The therapeutic potential of γ -glutamylcysteine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 593, 12–23. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2016.01.017>
- Franklin, C. C., Backos, D. S., Mohar, I., White, C. C., Forman, H. J., & Kavanagh, T. J. (2009). Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1–2), 86–98. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2008.08.009>
- Franklin, C. C., Krejsa, C. M., Pierce, R. H., White, C. C., Fausto, N., & Kavanagh, T. J. (2002). Caspase-3-Dependent Cleavage of the Glutamate-L-Cysteine Ligase Catalytic Subunit during Apoptotic Cell Death. *The American Journal of Pathology*, 160(5), 1887–1894. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61135-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61135-2)
- Gold, D. R., Wang, X., Wypij, D., Speizer, F. E., Ware, J. H., & Dockery, D. W. (1996). Effects of cigarette smoking on lung function in adolescent boys and girls. *The New England Journal of Medicine*, 335(13), 931–937. <https://doi.org/10.1056/NEJM199609263351304>
- Gould, N. S., Min, E., Gauthier, S., Martin, R. J., & Day, B. J. (2011). Lung glutathione adaptive responses to cigarette smoke exposure. *Respiratory Research*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-133>
- Greabu, M., Battino, M., Totan, A., Mohora, M., Mitrea, N., Totan, C., Spinu, T., & Didilescu, A. (2007). *Effect of gas phase and particulate phase of cigarette smoke on salivary antioxidants. What can be the role of vitamin C and pyridoxine?*
- Gunlemez, A., Er, İ., Baydemir, C., & Arisoy, A. (2019). Effects of passive smoking on lung function tests in preschool children born late-preterm: a preventable health priority. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 32(14), 2412–2417. <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1430759>
- Gut-Gobert, C., Cavaillès, A., Dixmier, A., Guillot, S., Jouneau, S., Leroyer, C., Marchand-Adam, S., Marquette, D., Meurice, J. C., Desvigne, N., Morel, H., Person-Tacnet, C., & Raherison, C. (2019). Women and COPD: do we need more evidence?

- European Respiratory Review*, 28(151). <https://doi.org/10.1183/16000617.0055-2018>
- Haczku, A. (2012). The dendritic cell niche in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1465-9921-13-80>
- Han, M. L. K., Postma, D., Mannino, D. M., Giardino, N. D., Buist, S., Curtis, J. L., & Martinez, F. J. (2007). Gender and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Why It Matters. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 176(12), 1179. <https://doi.org/10.1164/RCCM.200704-553CC>
- Haq, R., Brenton, J., Takahashi, M., Finan, D., Finkielstein, A., Damaraju, S., Rottapel, R., & Zanke, B. (2002). Constitutive p38HOG mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence. *Cancer Research*.
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Hersh, C. P. (2019). Pharmacogenomics of chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 13(5), 459–470. <https://doi.org/10.1080/17476348.2019.1601559>
- Hiemstra, P. S. (2019). Macrophage function in chronic obstructive pulmonary disease: The many faces of notch signalling. *EBioMedicine*, 43, 22–23. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2019.04.035>
- Hikichi, M., Hashimoto, S., & Gon, Y. (2018). Asthma and COPD overlap pathophysiology of ACO. *Allergology International*, 67(2), 179–186. <https://doi.org/10.1016/J.ALIT.2018.01.001>
- Horinouchi, T., & Miwa, S. (2021). Comparison of cytotoxicity of cigarette smoke extract derived from heat-not-burn and combustion cigarettes in human vascular endothelial cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 147(3), 223–233. <https://doi.org/10.1016/J.JPHS.2021.07.005>
- Increasing awareness of recognition of chronic obstructive pulmonary disease | Chinese Medical Journal*. (2006.). Retrieved July 28, 2024, from <https://mednexus.org/doi/10.5555/cmj.0366-6999.119.08.p669.01>
- Janson, C. (2004.). *The effect of passive smoking on respiratory health in children and adults [State of the Art]*.
- Jayes, L., Haslam, P. L., Gratiou, C. G., Powell, P., Britton, J., Vardavas, C., Jimenez-Ruiz, C., Leonardi-Bee, J., Dautzenberg, B., Lundbäck, B., Fletcher, M., Turnbull, A., Katsaounou, P., Heederik, D., Smyth, D., Ravara, S., Sculier, J. P., Martin, F., & De Grada Orive, J. I. (2016). SmokeHaz: Systematic Reviews and Meta-analyses of the Effects of Smoking on Respiratory Health. *Chest*, 150(1), 164–179. <https://doi.org/10.1016/J.CHEST.2016.03.060>
- Jo, B.-S., & Choi, S. S. (2015). Introns: The Functional Benefits of Introns in Genomes. *Genomics & Informatics*, 13(4), 112. <https://doi.org/10.5808/GI.2015.13.4.112>
- Kang, Y. P., Mockabee-Macias, A., Jiang, C., Falzone, A., Prieto-Farigua, N., Stone, E., Harris, I. S., & DeNicola, G. M. (2021). Non-canonical Glutamate-Cysteine Ligase

- Activity Protects against Ferroptosis. *Cell Metabolism*, 33(1), 174-189.e7. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2020.12.007>
- Kim, V., & Criner, G. J. (2013.). *Concise Clinical Review Chronic Bronchitis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. <https://doi.org/10.1164/rccm.201210-1843CI>
- Kiyokawa, H., Hoshino, Y., Sakaguchi, K., Muro, S., & Yodoi, J. (2021). Redox Regulation in Aging Lungs and Therapeutic Implications of Antioxidants in COPD. *Antioxidants*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10091429>
- Koide, S. I., Kugiyama, K., Sugiyama, S., Nakamura, S. I., Fukushima, H., Honda, O., Yoshimura, M., & Ogawa, H. (2003). Association of polymorphism in glutamate-cysteine ligase catalytic subunit gene with coronary vasomotor dysfunction and myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(4), 539–545. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(02\)02866-8](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(02)02866-8)
- Kuwano, K., Araya, J., Hara, H., Minagawa, S., Takasaka, N., Ito, S., Kobayashi, K., & Nakayama, K. (2016). Cellular senescence and autophagy in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *Respiratory Investigation*, 54(6), 397–406. <https://doi.org/10.1016/J.RESINV.2016.03.010>
- Labarrere, C. A., & Kassab, G. S. (2022). Glutathione: A Samsonian life-sustaining small molecule that protects against oxidative stress, ageing and damaging inflammation. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.1007816>
- Li, J., & Ye, Z. (2020). The Potential Role and Regulatory Mechanisms of MUC5AC in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Molecules*, 25(19). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25194437>
- Li, M., Liu, R. M., Timblin, C. R., Meyer, S. G., Mossman, B. T., & Fukagawa, N. K. (2006). Age affects ERK1/2 and NRF2 signaling in the regulation of GCLC expression. *Journal of Cellular Physiology*, 206(2), 518–525. <https://doi.org/10.1002/JCP.20496>
- Lin, J., & Epel, E. (2022). Stress and telomere shortening: Insights from cellular mechanisms. *Ageing Research Reviews*, 73. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2021.101507>
- Liu, S., Li, B., Zhou, Y., Zhong, N., & Ran, P. (2007). Genetic analysis of CC16, OGG1 and GCLC polymorphisms and susceptibility to COPD. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 12(1), 29–33. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1843.2006.00958.X>
- Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), 3143–3153. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2012.09.008>
- Mannino, D. M., & Buist, A. S. (2007). Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet*, 370(9589), 765–773. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61380-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61380-4)
- Neurohr, C., Lenz, A. G., Ding, I., Leuchte, H., Kolbe, T., & Behr, J. (2003). Glutamate-cysteine ligase modulatory subunit in BAL alveolar macrophages of healthy smokers. *The European Respiratory Journal*, 22(1), 82–87. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00080403>

- Nichenametla, S. N., Ellison, I., Calcagnotto, A., Lazarus, P., Muscat, J. E., & Richie, J. P. (2008). Functional significance of the GAG trinucleotide-repeat polymorphism in the gene for the catalytic subunit of gamma-glutamylcysteine ligase. *Free Radical Biology & Medicine*, 45(5), 645–650. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2008.05.012>
- Nichenametla, S. N., Muscat, J. E., Liao, J. G., Lazarus, P., & Richie, J. P. (2013). A functional trinucleotide repeat polymorphism in the 5'-untranslated region of the glutathione biosynthetic gene GCLC is associated with increased risk for lung and aerodigestive tract cancers. *Molecular Carcinogenesis*, 52(10), 791–799. <https://doi.org/10.1002/MC.21923>
- Ntritsos, G., Franek, J., Belbasis, L., Christou, M. A., Markozannes, G., Altman, P., Fogel, R., Sayre, T., Ntzani, E. E., & Evangelou, E. (2018). Gender-specific estimates of COPD prevalence: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 13, 1507. <https://doi.org/10.2147/COPD.S146390>
- Nurwidya, F., Damayanti, T., & Yunus, F. (2016). The Role of Innate and Adaptive Immune Cells in the Immunopathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 79(1), 5–13. <https://doi.org/10.4046/TRD.2016.79.1.5>
- Onishi, K. (2017). Total management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) as an independent risk factor for cardiovascular disease. *Journal of Cardiology*, 70(2), 128–134. <https://doi.org/10.1016/J.JJCC.2017.03.001>
- Postma, D. S., Bush, A., & Van Den Berge, M. (2015). Risk factors and early origins of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet (London, England)*, 385(9971), 899–909. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60446-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60446-3)
- Quint, J. K., & Wedzicha, J. A. (2007). The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(5), 1065–1071. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.12.640>
- Raghu, G., Berk, M., Campochiaro, P. A., Jaeschke, H., Marenzi, G., Richeldi, L., Wen, F.-Q., Nicoletti, F., & Calverley, P. M. A. (2021). The Multifaceted Therapeutic Role of N-Acetylcysteine (NAC) in Disorders Characterized by Oxidative Stress. *Current Neuropharmacology*, 19(8), 1202–1224. <https://doi.org/10.2174/1570159X19666201230144109>
- Raherison, C., & Girodet, P.-O. (2009.). *Epidemiology of COPD*. <https://doi.org/10.1183/09059180.00003609>
- Rahman, I., Van Schadewuk, A. A. M., Hiemstra, P. S., Stolk, J., Van Krieken, J. H. J. M., Macnee, W., & De Boer, W. I. (2000). Localization of gamma-glutamylcysteine synthetase messenger rna expression in lungs of smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(6), 920–925. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00179-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00179-9)
- Robertson, S., Pisinger, C. H., Løkke, A., & Godtfredsen, N. S. (2019.). *Passiv rygning er en risikofaktor for udvikling af nedsat lungefunktion og KOL*.
- Roger, I., Milara, J., Belhadj, N., & Cortijo, J. (2021). Senescence Alterations in Pulmonary Hypertension. *Cells*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/CELLS10123456>

- Ryter, S. W., Lee, S. J., & Choi, A. M. K. (2010). Autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 4(5), 573. <https://doi.org/10.1586/ERS.10.61>
- Salminen, A., Kauppinen, A., & Kaarniranta, K. (2012). Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cellular Signalling*, 24(4), 835–845. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2011.12.006>
- Salvi, S. (2014). Tobacco Smoking and Environmental Risk Factors for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clinics in Chest Medicine*, 35(1), 17–27. <https://doi.org/10.1016/J.CCM.2013.09.011>
- Sana, A., Somda, S. M. A., Meda, N., & Bouland, C. (2018). Chronic obstructive pulmonary disease associated with biomass fuel use in women: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open Respiratory Research*, 5(1). <https://doi.org/10.1136/BMJRESP-2017-000246>
- Santus, P., Corsico, A., Solidoro, P., Braido, F., Di Marco, F., & Scichilone, N. (2014). Oxidative stress and respiratory system: pharmacological and clinical reappraisal of N-acetylcysteine. *COPD*, 11(6), 705–717. <https://doi.org/10.3109/15412555.2014.898040>
- Schneider, J. L., Rowe, J. H., Garcia-de-Alba, C., Kim, C. F., Sharpe, A. H., & Haigis, M. C. (2021). The aging lung: Physiology, disease, and immunity. *Cell*, 184(8), 1990. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.03.005>
- Schuliga, M. (2015). NF-kappaB Signaling in Chronic Inflammatory Airway Disease. *Biomolecules*, 5(3), 1266–1283. <https://doi.org/10.3390/BIOM5031266>
- Schwartz, A. G. (2012.). *State of the Art Genetic Epidemiology of Cigarette Smoke-Induced Lung Disease*. <https://doi.org/10.1513/pats.201106-037MS>
- Shaheen, S. (1997). The beginnings of chronic airflow obstruction. *British Medical Bulletin*, 53(1), 58–70. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.BMB.A011606>
- Sharpless, N. E., & Sherr, C. J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Reviews. Cancer*, 15(7), 397–408. <https://doi.org/10.1038/NRC3960>
- Siedlinski, M., Postma, D. S., Van Diemen, C. C., Blokstra, A., Smit, H. A., & Boezen, H. M. (2008). Lung function loss, smoking, vitamin C intake, and polymorphisms of the glutamate-cysteine ligase genes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 178(1), 13–19. <https://doi.org/10.1164/RCCM.200711-1749OC>
- Silver, S. R., Alarcon, W. A., & Li, J. (2021). Incident chronic obstructive pulmonary disease associated with occupation, industry, and workplace exposures in the Health and Retirement Study. *American Journal of Industrial Medicine*, 64(1), 26. <https://doi.org/10.1002/AJIM.23196>
- Sloan, J. A., De Andrade, M., Decker, P., Wampfler, J., Oswald, C., Clark, M., & Yang, P. (2012). Genetic variations and patient-reported quality of life among patients with lung cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society*

- of *Clinical Oncology*, 30(14), 1699–1704.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.5629>
- Solis, A. S., Shariat, N., & Patton, J. G. (2008). Splicing fidelity, enhancers, and disease. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 13(5), 1926–1942.
<https://doi.org/10.2741/2812>
- Suh, J. H., Shenvi, S. V., Dixon, B. M., Liu, H., Jaiswal, A. K., Liu, R. M., & Hagen, T. M. (2004). Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), 3381–3386.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.0400282101>
- Szilasi, M., Dolinay, T., Nemes, Z., & Strausz, J. (2006). Pathology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PATHOLOGY ONCOLOGY RESEARCH*, 12(1).
- T, M., & E, Y. (2016). A Combination Polymorphism of the Glutathione Synthesis Genes Can Be a Predictive Biomarker for Anti-Tuberculosis Drug-Induced Hepatotoxicity in Japanese Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Journal of Lung Diseases & Treatment*, 02(02). <https://doi.org/10.4172/2472-1018.1000105>
- Tamaoki, J. (2015). Targeting airway mucus hypersecretion in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Investigation*, 53(6), 247–248.
<https://doi.org/10.1016/J.RESINV.2015.05.001>
- Tang, W., Bentley, A. R., Kritchevsky, S. B., Harris, T. B., Newman, A. B., Bauer, D. C., Meibohm, B., & Cassano, P. A. (2013). Genetic variation in antioxidant enzymes, cigarette smoking, and longitudinal change in lung function. *Free Radical Biology & Medicine*, 63, 304–312.
<https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2013.05.016>
- Tatsumi, K. (2001). Epidemiological survey of chronic obstructive pulmonary disease in Japan. *Respirology*, 6, S27–S33. <https://doi.org/10.1046/J.1440-1843.2001.00309.X>
- Tesfaigzi, Y., Meek, P., & Lareau, S. (2006). Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease and chronic mucus hypersecretion. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 6(1), 21. <https://doi.org/10.1016/J.CAIR.2006.02.001>
- Thibaut, H. J., Lacroix, C., De Palma, A. M., Franco, D., Decramer, M., & Neyts, J. (2016). Toward antiviral therapy/prophylaxis for rhinovirus-induced exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: challenges, opportunities, and strategies. *Reviews in Medical Virology*, 26(1), 21. <https://doi.org/10.1002/RMV.1856>
- Thirapatarapong, W., Armstrong, H. F., Thomashow, B. M., & Bartels, M. N. (2013). Differences in gas exchange between severities of chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 186(1), 81–86.
<https://doi.org/10.1016/J.RESP.2012.12.013>
- Torres-Durán, M., Lopez-Campos, J. L., Barrecheguren, M., Miravittles, M., Martinez-Delgado, B., Castillo, S., Escribano, A., Balóira, A., Navarro-García, M. M., Pellicer, D., Bañuls, L., Magallón, M., Casas, F., & Dasí, F. (2018). Alpha-1 antitrypsin deficiency: outstanding questions and future directions. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S13023-018-0856-9>

- Tuder, R. M., Kern, J. A., & Miller, Y. E. (2012). Senescence in chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 9(2), 62–63. <https://doi.org/10.1513/PATS.201201-012MS>
- Uddin, M., Watz, H., Malmgren, A., & Pedersen, F. (2019). NETopathic Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Severe Asthma. *Frontiers in Immunology*, 10(FEB). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00047>
- Ulmeanu, R., Fildan, A. P., Rajnoveanu, R. M., Fira-Mladinescu, O., Toma, C., Nemes, R. M., Tudorache, E., Oancea, C., & Mihaltan, F. (2020). Romanian clinical guideline for diagnosis and treatment of COPD. *The Journal of International Medical Research*, 48(8), 1–16. <https://doi.org/10.1177/0300060520946907>
- Vášková, J., Kočan, L., Vaško, L., & Perjési, P. (2023). Glutathione-Related Enzymes and Proteins: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(3). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28031447>
- Vestbo, J., Hurd, S. S., Agustí, A. G., Jones, P. W., Vogelmeier, C., Anzueto, A., Barnes, P. J., Fabbri, L. M., Martinez, F. J., Nishimura, M., Stockley, R. A., Sin, D. D., & Rodriguez-Roisin, R. (2013). Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Https://Doi.Org/10.1164/Rccm.201204-0596PP*, 187(4), 347–365. <https://doi.org/10.1164/RCCM.201204-0596PP>
- Vij, N., Chandramani-Shivalingappa, P., Van Westphal, C., Hole, R., & Bodas, M. (2018). Cigarette smoke-induced autophagy impairment accelerates lung aging, COPD-emphysema exacerbations and pathogenesis. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 314(1), C73–C87. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00110.2016>
- Vogelmeier, C. F., Román-Rodríguez, M., Singh, D., Han, M. L. K., Rodríguez-Roisin, R., & Ferguson, G. T. (2020). Goals of COPD treatment: Focus on symptoms and exacerbations. *Respiratory Medicine*, 166. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.105938>
- Washko, G. R. (2010). Diagnostic Imaging in COPD. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 31(3), 276. <https://doi.org/10.1055/S-0030-1254068>
- Wei, W., & Ji, S. (2018). Cellular senescence: Molecular mechanisms and pathogenicity. *Journal of Cellular Physiology*, 233(12), 9121–9135. <https://doi.org/10.1002/JCP.26956>
- Wei, Y., Giunta, S., & Xia, S. (2022). Hypoxia in Aging and Aging-Related Diseases: Mechanism and Therapeutic Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15). <https://doi.org/10.3390/IJMS23158165>
- Wood, A. M., & Stockley, R. A. (2006). The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research*, 7(1), 130. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-7-130>
- Wright, D. T., Cohn, L. A., Li, H., Fischer, B., Li, C. M., & Adler, K. B. (1994). Interactions of oxygen radicals with airway epithelium. *Environmental Health Perspectives*, 102 Suppl 10(Suppl 10), 85–90. <https://doi.org/10.1289/EHP.94102S1085>

- Xin, L., Mekle, R., Fournier, M., Baumann, P. S., Ferrari, C., Alameda, L., Jenni, R., Lu, H., Schaller, B., Cuenod, M., Conus, P., Gruetter, R., & Do, K. Q. (2016). Genetic Polymorphism Associated Prefrontal Glutathione and Its Coupling With Brain Glutamate and Peripheral Redox Status in Early Psychosis. *Schizophrenia Bulletin*, 42(5), 1185–1196. <https://doi.org/10.1093/SCHBUL/SBW038>
- Yin, H.-L., Yin, S.-Q., Lin, Q.-Y., Xu, Y., Xu, H.-W., & Liu, T. (2017). *Prevalence of comorbidities in chronic obstructive pulmonary disease patients A meta-analysis*. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000006836>
- Young, I. H., & Bye, P. T. P. (2011). Gas Exchange in Disease: Asthma, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Cystic Fibrosis, and Interstitial Lung Disease. *Comprehensive Physiology*, 1(2), 663–697. <https://doi.org/10.1002/CPHY.C090012>
- Yu, Q., Katlinskaya, Y. V., Carbone, C. J., Zhao, B., Katlinski, K. V., Zheng, H., Guha, M., Li, N., Chen, Q., Yang, T., Lengner, C. J., Greenberg, R. A., Johnson, F. B., & Fuchs, S. Y. (2015). DNA-damage-induced type I interferon promotes senescence and inhibits stem cell function. *Cell Reports*, 11(5), 785–797. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2015.03.069>
- Zhang, T., Tsutsuki, H., Li, X., & Sawa, T. (2022). New insights into the regulatory roles of glutathione in NLRP3-inflammasome-mediated immune and inflammatory responses. *Journal of Biochemistry*, 171(4), 367–377. <https://doi.org/10.1093/JB/MVAB158>
- Zhu, Y., Liu, X., Ding, X., Wang, F., & Geng, X. (2019). Telomere and its role in the aging pathways: telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction. *Biogerontology*, 20(1). <https://doi.org/10.1007/S10522-018-9769-1>

