



**T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DEKSAMETAZONUN KOAH'LILARIN BRONŞ EPİTEL
HÜCRELERİNDE İNFLAMATUAR SİTOKİN
SALINIMINA ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. İbrahim KOÇ
GÖĞÜS HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof Dr. Hasan BAYRAM**

Ocak 2013

**T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DEKSAMETAZONUN KOAH'LILARIN BRONŞ EPİTEL
HÜCRELERİNDE İNFLAMATUAR SİTOKİN
SALINIMINA ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. İbrahim KOÇ
GÖĞÜS HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof Dr. Hasan BAYRAM**

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 1133 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

DEKSAMETAZONUN KOAH'LILARIN BRONŞ EPİTEL HÜCRELERİNDE İNFLAMATUAR SİTOKİN SALINIMINA ETKİSİ

Dr. İbrahim KOÇ

23/01/2013

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

(İmza)
Prof. Dr. Abdurrahman Kadayıfçı
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının "Tıpta Uzmanlık" derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

(İmza).....
Prof. Dr. Ayten Filiz
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile "Tıpta Uzmanlık" tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

(İmza)
Prof. Dr. Hasan Bayram
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof. Dr. Hasan Bayram
2. Prof.Dr. Ayten Filiz
3. Prof. Dr. Öner Dikensoy

I. ÖNSÖZ

Bu tezin hazırlanmasında, verdiği bilimsel, akademik ve kişisel katkılarından, kendi gösterdiği sabrı bana da öğrettiğinden, hoşgörüsü ve insancıl tavırlarından dolayı hocam Prof. Dr. Hasan BAYRAM'a,

Tezime konu olan çalışmaların yürütülmesi için gerekli hasta ve akciğer dokularının sağlanmasında gösterdikleri işbirliği ve yardımlarından dolayı Göğüs Cerrahisi Kliniğine,

Tez çalışmamda laboratuvar deneyimlerini benimle paylaşan ve kişisel desteklerini esirgemeyen değerli dostlarım Dr.Bülent GÖGEBAKAN, Biyolog Recep BAYRAKTAR ve Kimyager Demet TAŞDEMİR'e,

Beraber çalışmaktan son derece zevk aldığım ve ihtisasım boyunca bana katkılarından dolayı emekli hocam Prof. Dr. Erhan EKİNCİ'ye, değerli hocalarım Prof. Dr.Ayten FİLİZ, Prof.Dr. Öner DİKENSÖY, Yrd. Doç. Dr. Nazan BAYRAM ve Doç. Dr. Meral UYAR'a,

Birlikte uyum ve zevkle çalıştığımız tüm asistan arkadaşlarıma ve hastane çalışanlarına,

Tüm sıkıntılı günlerimde bana destek çıkan eşime ve kızıma,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Dr. İbrahim KOÇ

Gaziantep 2013

II. İÇİNDEKİLER

I. ÖNSÖZ.....	I
II. İÇİNDEKİLER	II
III. ÖZET	V
IV. ABSTRACT	VI
V. KISALTMALAR.....	VII
VI. TABLO LİSTESİ	XII
VII. ŞEKİL LİSTESİ	XIII
VIII. RESİM LİSTESİ.....	XII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Risk Faktörleri	4
2.1.1. Genetik Faktörler	4
2.1.2. Tütün Dumanı Maruziyeti	4
2.1.3. Mesleki Toz, Buhar ve Duman	5
2.1. 4. İç Ortam Hava Kirliliği.....	6
2.1.5. Dış Ortam Hava Kirliliği	6
2.1.6. Yaşlanma	7
2.1.7. Enfeksiyonlar	7
2.1.8. Astım.....	8
2.1.9. Cinsiyet	8
2.1.10. Sosyoekonomik Faktörler	8
2.1.11. Akciğer Gelişimi Üzerine Etkili Faktörler.....	9
2.2. KOAH'ın Patogenezi.....	10

2.2. 1. KOAH'ta Akciğer İnflamasyonu.....	10
2.2.2. KOAH'ta Sitokin Salınımı ve Profili.....	12
2.2.2.1. Granülosit-Makrofaj Koloni Stimulan Faktör (GM-CSF).....	13
2.2.2.2. İnterlökin-6 (İL-6).....	14
2.2.2.3. İnterlökin-8 (İL-8).....	14
2.2.2.4. İnterlökin-1 β (İL-1 β).....	15
2.2.2.5. Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α)	15
2.2.3. İntrasellüler Sinyal İleti Yolakları	16
2.2.4. Amfizem	18
2.2.5. Apoptozis.....	19
2.2.6. Mukus Hipersekresyonu	20
2.2.7. Fibrozis	20
2.2.8. KOAH'ın Sistemik Etkileri	21
2.3. KOAH'ta Steroid Direnci	22
2.3.1. Kortikosteroidlerin Anti-İnflamatuvar Mekanizmaları	26
2.3.2. Kortikosteroid Reseptörleri.....	28
2.3.4. İnflamatuvar Genlerin Devre Dışı Bırakılması.....	28
2.4. Solunum Yolu Epiteli	30
2.4. 1. Epitelyumun Anatomisi	30
2.4. 2. Kolumnar Siliyalı Epitel	31
2.4.3. Mukus Hücreleri (Goblet Hücreleri).....	31
2.4.4. Seröz Hücreler	31
2.4.5. Bazal Hücreler	32
2.4.6. Klara Hücreleri	32
2.4.7. Epitelin Görevleri	33
3. GEREÇ ve YÖNTEM	35
3.1. Çalışmaya Alınan Hastalar	35
3.2. Bronş Epitel Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerleri.....	36
3.2.1. Taşıma Vasatı	36
3.2.2. FCS (Fötal Buzağı Serumu)'li Vasat (CM)	36
3.2.3. Nu Serum 4 Vasatı (NuS4)	37
3.3. Bronş Epitel Hücre Kültürü	37

3.4. Primer Bronş Epitel Hücrelerinin Dekzametazon ile İnkübasyonu.....	37
3.5. ELISA protokolü.....	41
3.6. İstatistiksel Analiz.....	41
4. BULGULAR.....	42
4.1. Hava Yolu Epitel Hücre Kültürü	42
4.2. Bazal Sitokin Değerleri.....	44
4.3. Dekzametazonun Bronş Epitel Hücrelerinde GM-CSF Salınımına Etkisi	46
4.4. Dekzametazonun Bronş Epitel Hücrelerinde İL-6 Salınımına Etkisi	51
4.5. Dekzametazonun Bronş Epitel Hücrelerinde İL-8 Salınımına Etkisi	55
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	66
7. KAYNAKLAR	69

III. ÖZET

DEKSAMETAZONUN KOAH'LILARIN BRONŞ EPİTEL HÜCRELERİNDE İNFLAMATUAR SİTOKİN SALINIMINA ETKİSİ

Dr. İbrahim KOÇ

Uzmanlık Tezi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı

Tez Danışmanı, Prof. Dr. Hasan BAYRAM

Ocak 2013, 68 sayfa

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığının (KOAH) tedavisinde steroid direnci ciddi sorun oluşturmaktadır ve altta yatan mekanizmalar ile bronş epitel hücrelerinin (BEH) bu süreçteki rolü yeterince bilinmemektedir. Çalışmamızda, primer BEH kültürlerinde deksametazonun (DEKS) sitokin salınımı üzerine olan etkisini araştırmayı amaçladık. KOAH'lı, sigara içen ancak KOAH gelişmeyen (sigaralı) ve sigara içmemiş olan (sigarasız) hastaların cerrahi ile alınan bronş eksplantlarından BEH kültürleri elde edilerek, interlökin (İL)-1 β yokluğunda ve varlığında DEKS (0, 0,1nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM) ile 24 saat inkübasyonun bu hücrelerden granülosit makrofaj-koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), İL-6 ve İL-8 salınımı üzerine olan etkilerine bakıldı. İL-1 β maruziyeti sonrasında tüm gruplarda sitokin salınımı bazal düzeye göre anlamlı olarak arttı. BEH kültürlerinden GM-CSF salınımına bakıldığında, İL-1 β 'sız ortamda bu sitokinin düzeyi sigaralı grupta, sigarasız ve KOAH'lı gruplara göre daha yüksek gözlenirken, ortama İL-1 β eklendiğinde bir fark gözlenemedi. İL-6 düzeyleri ise hem bazal koşullarda hem de İL-1 β ile indüksiyondan sonra, sigaralı ve KOAH'lı grupta sigarasız gruba kıyasla daha yüksekti. Bazal İL-8 salınımı, İL-1 β ile indüksiyondan sonra KOAH'lı grupta sigaralı ve sigarasız gruplara göre artmıştı. DEKS verildikten sonra sigarasız grupta bazal GM-CSF düzeyi değişmezken, ortamda İL-1 β bulunduğu, DEKS bütün gruplarda bu sitokin düzeyini azalttı. İL-6 düzeyleri sigaralı grupta hem bazal koşullarda hem de İL-1 β varlığında DEKS tarafından baskılanırken, sigarasız grupta sadece İL-1 β yokluğunda İL-6 düzeyi azaldı. İL-8'e bakıldığında, DEKS bu sitokinin düzeyini sigarasızlarda İL-1 β varlığında ve yokluğunda inhibe ederken, KOAH'lılarda İL-1 β verilen gruplarda İL-8 düzeyini azalttı. Sonuç olarak, bulgularımız DEKS'in BEH'lerinde inflamatuvar sitokin salınımını baskıladığını, KOAH'lı hücrelerin DEKS'in bu etkisine kısmen de olsa dirençli olduklarını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: KOAH, primer bronş epitel hücreleri, deksametazon, GM-CSF, İL-6, İL-8.

IV. ABSTRACT

EFFECTS OF DEXAMETHASONE ON RELEASE OF INFLAMMATORY CYTOKINES FROM BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS OF PATIENTS WITH COPD

Dr. İbrahim KOÇ

Thesis for specialization, Department of Pulmonary Medicine

Supervisor, Prof. Dr. Hasan BAYRAM

January 2013, 68 pages

Steroid resistance is an important issue in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and the underlying mechanism, and the role of bronchial epithelial cells (BECs) are unclear. We studied effects of 24 hours' incubation with dexamethasone (DEX) (0, 0,1nM, 1nM, 10nM, 100nM) on the release of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), IL-6 and IL-8 from BECs cultured from bronchial explants of patients with COPD, smokers and non-smokers, in the absence and presence of IL-1 β . The release of cytokines was significantly increased by IL-1 β in BECs. Although the level of GM-CSF was higher in the smoker group as compared to non-smokers and COPDs under the basal culture condition, when IL-1 β added no difference was observed. Basal IL-6 levels were higher in smoker and COPD cultures in the absence and presence of IL-1 β , comparing to non-smokers. IL-8 was higher after stimulation with IL-1 β in COPD BECs comparing to both non-smoker and smoker cells. DEX did not show any effect on the release of GM-CSF in non-smoker cultures under basal condition, however, when IL-1 β added the release of this cytokine was decreased in all culture groups. Similarly, DEX inhibited release of IL-6 in BECs of smokers in the presence and absence of IL-1 β . However, in non-smokers this cytokine was suppressed by DEX only under basal condition. The release of IL-8 from non-smoker cells decreased by DEX both in the absence and presence of IL-1 β , whereas DEX suppressed the release from COPD cells only in IL-1 β -stimulated cells. In conclusion, our findings demonstrate that DEX suppresses release of inflammatory cytokines from BECs, and that cells of COPD patients are, at least in part, resistant to DEX.

Key Words: COPD, primary bronchial epithelial cells, dexamethasone, GM-CSF, IL-6 and IL-8.

V. KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AP-1	Aktivatör Protein-1
A1AT	Alfa 1 Antitripsin
BAL	Bronko Alveoler Lavaj
BEH	Bronş Epitel Hücreleri
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CX-C	Motif Ligand
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DMSO	Dimetilsülfoksit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
ELISA	Enzyme Linked İmmunosorbent Assay
FCS	Fetal Buzağı Serumu
GRa	Glukokortikosteroid Reseptör a
GRb	Glukokortikosteroid Reseptör b
GRE	Glukokortikosteroid Cevap Elemetleri
GM-CSF	Granülosit-Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
HBSS	Hank'ın Tamponlu Tuz Sülüsypnu ('Hank's Buffered Salt Solution')
HDAC	Histon Deasetilaz
HAT	Histonasetiltransferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
İL	İnterlökin
IG	İmmunglobulin
İKS	İnhaler Kortikosteroidler

IFN	İnterferon
JNK	C-Jun N-Terminal Kinaz
JAKS	Janus Kinaz
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LT	Lökotrien
MKP-1	Mitojen Aktive Protein Kinaz Fosfataz-1
MDR1	Çoklu İlaç Direnç Geni
MIF	Makrofaj Migrasyon İnhibisyon Faktörü
MAP	Mitojen Aktive Eden Protein
MCP	Monosit Kemoatraktan Protein
M-199	Medium 199
MAPK	Mitojen-Aktive Protein Kinaz
MIP-1- α	Makrofaj İnflamatuar Protein 1 Alfa
MMP	Matriks Metaloproteinaz
NE	Nötrofil Elastaz
NAC	N-Asetil Sistein
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NF- κ B	Nükler Faktör-Kappa B
NuS-IV	Nu Serum-IV
PDE-4	Fosfodiesteraz-4
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PDE	Fosfodiesteraz
PI3	Fosfoinozitol-3
PI3K	Fosfoinositid-3 Kinaz
ROS	Reaktif Oksijen Ürünü
RANTES	Normal T Hücreleri Tarafından Sekrete Edilen ve Düzenlenen Medyator
SF	Serumsuz Vasat
STAT	Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktive Edici
TGF- β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
Th ₂	Yardımcı T Hücreleri

TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü- Alfa
TIMPs	Doku Matriks Metalloproteinaz İnhibitörünü
TIMP	Endojen Metalloproteinaz İnhibitorleri
TM	Taşıyıcı Vasat
UHY	Ulusal Hastalık Yüğü
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
4-HNE	4 Hidroksi 2 Nonenal

VI. TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmaya alınan hastaların demografik özellikleri.....	36
Tablo 2. GM-CSF medyan (%25-75 persentil) değerleri.....	50
Tablo 3. İL-6 medyan (%25-75 persentil) değerleri	54
Tablo 4. İL-8 medyan (%25-75 persentil) değerleri	58

VII. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. KOAH'ta steroid direnç mekanizmaları.....	25
Şekil 2. Kortikosteroidlerin etki mekanizmaları.....	27
Şekil 3. Hasta kültürlerinde bazal GM-CSF seviyelerin karşılaştırılması.....	45
Şekil 4. Hasta kültürlerinde bazal İL-6 seviyelerin karşılaştırılması.....	45
Şekil 5. Hasta kültürlerinde bazal İL-8 seviyelerin karşılaştırılması.....	46
Şekil 6. Dekzametazonun (DEKS), 0,1, 1, 10 ve 100nM konsantrasyonlarının interlökin (İL)-1 β ile stimüle edilen ve edilmeyen sigarasız bronş epitel hücrelerinden granüosit makrofaj-koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) salınımına etkileri.....	47
Şekil 7. Dekzametazonun (DEKS), 0,1, 1, 10 ve 100nM konsantrasyonlarının interlökin (İL)-1 β ile stimüle edilen ve edilmeyen sigaralı bronş epitel hücrelerinden granüosit makrofaj-koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) salınımına etkileri.....	48
Şekil 8. Dekzametazonun (DEKS), 0,1, 1, 10 ve 100nM konsantrasyonlarının interlökin (İL)-1 β ile stimüle edilen ve edilmeyen KOAH'lı bronş epitel hücrelerinden granüosit makrofaj-koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) salınımına etkileri.....	49
Şekil 9. Dekzametazonun (DEKS), 0,1, 1, 10 ve 100nM konsantrasyonlarının interlökin (İL)-1 β ile stimüle edilen ve edilmeyen sigarasız bronş epitel hücrelerinden İL-6 salınımına etkileri.	52
Şekil 10. Dekzametazonun (DEKS), 0,1, 1, 10 ve 100nM konsantrasyonlarının interlökin (İL)-1 β ile stimüle edilen ve edilmeyen sigaralı bronş epitel hücrelerinden İL-6 salınımına etkileri.	53

- Şekil 11.** Dekzametazonun (DEKS), 0,1, 1, 10 ve 100nM konsantrasyonlarının interlökin (İL)-1 β ile stimüle edilen ve edilmeyen KOAH'lı bronş epitel hücrelerinden İL-6 salınımına etkileri 53
- Şekil 12.** Dekzametazonun (DEKS), 0,1, 1, 10 ve 100nM konsantrasyonlarının interlökin (İL)-1 β ile stimüle edilen ve edilmeyen sigarasız bronş epitel hücrelerinden İL-8 salınımına etkileri. 56
- Şekil 13.** Dekzametazonun (DEKS), 0,1, 1, 10 ve 100nM konsantrasyonlarının interlökin (İL)-1 β ile stimüle edilen ve edilmeyen sigaralı bronş epitel hücrelerinden İL-8 salınımına etkileri. 56
- Şekil 14.** Dekzametazonun (DEKS), 0,1, 1, 10 ve 100nM konsantrasyonlarının interlökin (İL)-1 β ile stimüle edilen ve edilmeyen KOAH'lı bronş epitel hücrelerinden İL-8 salınımına etkileri. 57

VIII. RESİM LİSTESİ

Resim 1. Bronş epitelinin elde edilmesi.....	39
Resim 2. Bronş epiteli hücre kültürünün aşamaları.....	40
Resim 3. Bronş epitel hücre kültürleri 4. haftanın sonunda kullanıma hazır hale geldiler.....	43
Resim 4. Pansitokeratin ile boyanan bronş epite hücreleri.....	44

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Tüm dünyada önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olan kronik obstrüktif akciğer hastalığında (KOAH), tedavi alternatifleri oldukça kısıtlıdır. Hastalığın ilerlemesini engelleyen ve tedavi eden yeni uygulamalara acilen gerek duyulmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, 1990 yılında sakat ya da güçsüz bırakma açısından 12. sırada yer alan KOAH, mortalite nedenleri arasında 6. sırada yer almaktadır (1). Yine DSÖ tahminlerine göre, KOAH'ın bütün dünyada 2020 yılında 5. hastalık ve sakatlık nedeni olurken, mortalitenin de 6. sebebi olacağı tahmin edilmektedir (1). Türkiye'de yapılan çeşitli çalışmalarda KOAH prevalansı %13,6 - 20 arasında bulunmuş olup, ülkemizde halihazırda 3 milyon civarında KOAH'lı hasta olduğu tahmin edilmektedir (2).

KOAH'da, nötrofillerin ön planda rol aldığı bir inflamasyon ve bu inflamasyonda rol oynayan sitokinlerin baskınlığı vardır. KOAH'daki inflamasyonda rol oynayan sitokin ve enzimlerin başında interlökin (İL)-8 ve diğer kemokinler, lökotrien (LT) B4, tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), fosfodiesteraz 4, nötrofil elastaz (NE) ve matriks metalloproteinazlar (MMP) yer almaktadır (3). İnflamasyon steroidlere dirençli olup, KOAH'ta bu ajanların antiinflamatuvar etkilerinde bir defekt olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, steroid direncinin KOAH'lı hastaların akciğer hücrelerinde histon deasetilaz (HDAC)-2 aktivitesindeki azalma ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir.

Araştırmalar, solunum sisteminin dış ortama karşı birincil savunma bariyerini oluşturan hava yolu epitel hücrelerinin metabolik olarak da aktif hücreler oldukları ve salgıladıkları çeşitli inflamatuvar mediatörler ile hava yollarındaki inflamasyonu başlatmada ve düzenlemede anahtar hücreler olduklarını göstermektedir (4). Daha önce yapılan çalışmalarda, astımlılardan elde edilen bronş epitel hücrelerinin (BEH), sağlıklı

bireyler ile kıyaslandıklarında daha yüksek oranlarda inflamatuvar mediatör salgıladıkları ortaya konmuştur (5, 6). Buna karşın KOAH'lıların BEH'leri ile yapılan sınırlı sayıda çalışma (7), bu bireylerden elde edilen hücrelerin inflamatuvar sitokin salgılama kapasitelerinin sigara dumanına maruziyet sonrasında, KOAH'ı olmayan bireylere göre farklılık gösterebileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan, BEH'lerin KOAH'ta görülen steroid direncinde ne derece rol oynadıkları yeterince bilinmemektedir. Çalışma hipotezimize göre, KOAH'lı hastaların BEH'leri, KOAH'ı olmayanların hücrelerine göre inflamatuvar sitokin salgılama kapasiteleri açısından farklılık gösterir ve KOAH'lı BEH'deki inflamasyon steroide dirençlidir.

Bu çalışmanın amacı KOAH'ı olan ve olmayan hastaların akciğer eksplantlarından primer BEH kültürleri elde ederek, deksametazonun bu hücrelerden inflamatuvar sitokin salınımına olan etkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

KOAH tam geri dönüşümü olmayan hava yolu kısıtlılığı ile karakterize bir hastalıktır (8). Hava yolu obstrüksiyonu genellikle ilerleyici olup, akciğerin zararlı partikül ve gazlara anormal inflamatuvar yanıtı ile birliktedir (8). KOAH gelişiminde en önemli risk faktörü sigaradır. Bundan başka genetik ve diğer edinsel sebepler de rol oynamaktadır. Bireylerin etyolojik ajanlara (sigara dumanı, biyomas vs.) maruz kalma sürelerine ve bireysel karakteristiklerine bağlı olarak hastalığın ağırlığı değişebilmektedir (9). Çoğunlukla hava akımı kısıtlılığı yıllar içinde progresif olarak gelişir. Hava akımı kısıtlılığına katkıda bulunan değişiklikler akciğerin elastik recoil kaybı, fibrozisi ve küçük hava yollarının daralmasıdır ki, son ikisi havayollarının kalıcı darlığından sorumlu tutulmaktadır. Bundan başka çalışmalar, KOAH'ın sistemik bir hastalık olduğunu ve hastalığın gidişatının havayolu kısıtlamasından ziyade hastalığın sistemik etkileri ile ilişkili olduğunu bildirmektedir (10).

DSÖ verilerine göre, 1990 yılında sakat ya da güçsüz bırakma açısından 12. sırada yer alan KOAH mortalite nedenleri arasında da 6. sırada yer almıştır (1). Yine DSÖ öngörülerine göre, KOAH'ın bütün dünyada 2020 yılında 5. hastalık ve sakatlık nedeni olurken, mortalitenin de 6. sebebi olacağı beklenmektedir (1). Metodolojik sorunlar nedeniyle hastalığın dünyadaki prevalansı konusunda net bir rakam elde etmek zor olsa da, yapılan çalışmalar KOAH prevalansının sigara içenlerde hiç sigara içmemişlere göre daha yüksek olduğunu göstermektedir (11, 12). Yine, 40 yaş ve üstündekilerde, daha genç olanlara, erkeklerde kadınlara göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (8). KOAH gerek gelişmiş, gerekse de gelişmekte olan ülkelerde sağlık harcamalarında da büyük bir paya sahiptir (8).

Türkiye'de yapılan çeşitli çalışmalarda, metodolojik farklılık olmakla beraber KOAH prevalansı %13,6-20 arasında bulunmuş olup, ülkemizde halen 3 milyon civarında KOAH'lı hasta olduğu düşünülmektedir (2).

2.1. Risk Faktörleri

Risk faktörleri genetik faktörlerle çevresel maruziyetlerin ve bazen komorbid hastalıkların (astım, bronşektazi, geçirilen enfeksiyonlar) etkileşimleriyle ilişkilidir.

2.1.1. Genetik Faktörler

KOAH için en iyi bilinen genetik anomali bir serin proteaz olan α -1 antitripsin eksikliğidir (12, 13). Alfa-1 antitripsin, enflamatuvar hücrelerden salınır ve yıkıcı enzimleri bloke ederek görev yapar. KOAH'ın yanı sıra siroz, bronşektazi ve dermatolojik hastalık gelişiminde de rol alabilen alfa-1 antitripsin eksikliğinin görülme sıklığı, ırktan ırka ve bölgeden bölgeye değişiklik göstermekle beraber % 1-3 arasında olduğu saptanmıştır (13). Bu enzimin düşük konsantrasyonları genellikle sigara içimi veya diğer maruziyetlerle beraber panlobüler amfizem gelişimine sebep olmaktadır (13). 40 yaşından küçük belirgin risk faktörü olmayan amfizem ağırlıklı KOAH'lılarda, mutlaka alfa-1 antitripsin eksikliği araştırılmalıdır (14).

Diğer yandan, KOAH'ta transforme edici büyüme faktörü (TGF)- β 1, tümör nekroze edici faktör (TNF)- α , mikrozomal epoksid hidrolaz-1, interlökin salınımını düzenleyici genler ile histon deasetilaz (HDAC) aktivitesini baskılayan gen bozuklukları ve özellikle 2, 12 ve 22 numaralı kromozom anomalileride bildirilmiştir (15, 16).

2.1.2. Tütün Dumanı Maruziyeti

Dünya genelinde sigara içimi KOAH gelişimi için en büyük riski oluşturmaktadır. DSÖ yüksek gelir düzeyli ülkelerde KOAH'a bağlı ölümlerin %73'ünün, düşük ve orta gelir düzeyli ülkelerde %40'ının sigara içimine bağlı olduğunu belirtmiştir (17). Bu durum genetik faktörlerle ilişkilendirilmiştir, çünkü sigara içenlerin % 25'inde KOAH geliştiği vurgulanmaktadır (18, 19). Normal sağlıklı insanlarda 30 yaşından sonra FEV1 (1. Saniyedeki Zorlu Ekspiratuvar Volüm) değerinde yaklaşık olarak 40 ml/yıl azalma olabilmektedir (20). Ancak sigara içenlerde bu oran daha fazla olmaktadır. Erkeklerde

sigara içimi ve KOAH gelişimi daha fazla olmasına rağmen yapılan çalışmalarda kadınların sigara dumanına erkeklerden daha duyarlı olduğu vurgulanmıştır (21, 22). Bunların yanında gebelik sırasında sigara içilmesi akciğer gelişimini kötü etkilemekte ve akciğer hastalığı gelişmesine sebep olmaktadır (23).

KOAH gelişiminde; sigaraya kaç yaşında başlandığı, ne kadar içildiği ve günlük içilen sigara sayısı gibi faktörler önem taşımaktadır (24). Değişik sigara çeşitleri (nikotini düşük olan sigaralar, ince sigaralar vb.) ve tütün kullanma şeklinin (nargile, pipo vb.) KOAH gelişme riskini azaltmadığı bildirilmiştir (25). KOAH gelişiminin önlenmesindeki en önemli hedef, sigara içme oranlarının düşürülmesidir (26). Sigara içmeseler dahi bireyler pasif olarak sigara dumanına maruz kaldıklarında KOAH gelişme riski, hiç sigara dumanına maruz kalmamış bireylere göre belirgin olarak artmaktadır. Yapılan çalışmalarda haftada 40 saatten fazla ve 5 yıldan uzun süreli sigara dumanına maruz kalmanın KOAH gelişme riskini %50 oranında arttırdığı saptanmıştır (27).

2.1.3. Mesleki Toz, Buhar ve Duman

İşyerinde çeşitli kimyasallar, tozlar ve buhara maruziyet KOAH gelişimi için risk oluşturmaktadır. Yapılan bir çalışmada Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) KOAH olgularının %2-19 oranında çalışma yerlerinde çeşitli toz ve dumana maruz kaldıkları saptanmıştır (28). KOAH gelişme riski düşük-orta gelir düzeyli ülkelerde yüksek gelir düzeyli ülkelere göre daha fazladır çünkü buralarda toz ve dumana maruziyet yüksek gelir düzeyli ülkelere göre daha fazla olmaktadır. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığına Karşı Küresel Girişim ("Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease", GOLD) 2007 raporuna göre KOAH veya kronik bronşit tanısı alan hastalarda diğer popülasyona göre 2 kat daha fazla çalışma yerlerinde gaz, duman ve buhar maruziyeti saptanmıştır (8).

2.1. 4. İç Ortam Hava Kirliliği

Global olarak KOAH gelişiminde ısınma ve yemek amaçlı kullanılan saman, hayvan gübresi, ekin ve odun kalıntıları gibi biyomas yakıtlarına maruziyet suçlanmaktadır. Dünya genelinde yaklaşık 3 milyar insanın ısınma ve yemek pişirme amacı ile değişen oranlarda biyomas ürünlerini kullandığı tahmin edilmektedir (29). DSÖ verilerine göre düşük-orta gelir düzeyi olan ülkelerde KOAH'ı olan hastaların %35'inde eviçi biyomas yakıt maruziyeti gözlenmiştir (17). Yine aynı verilere göre ev içi biyomas yakıt maruziyetinden kaynaklı alt solunum yolu hastalıklarından % 36 oranında ölüm görülmüştür.

Çin'de yapılan bir çalışmada hiç sigara içmeyen kırsal kesimde yaşayıp biyomas maruziyeti olan ve kentlerde yaşayıp biyomas maruziyeti olmayanlarla kıyaslandığında KOAH prevalansının 2-3 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır (30). Ülkemizde yapılan bir çalışmaya göre bazı kırsal kesimlerinde özellikle kadınlar arasında yoğun biyomas maruziyeti saptanmıştır (31). Düşük-orta gelir düzeyli ülkelerdeki toplam KOAH olgularının yaklaşık %20'sinde biyomas maruziyeti saptanmış olup, ülkemizde yapılan çalışmaların verileri de benzer niteliktedir (32).

2.1.5. Dış Ortam Hava Kirliliği

Dış ortam hava kirliliği potansiyel KOAH nedenlerinden birisi olarak düşünülse de tek başına KOAH'a neden olduğu yönünde yeterli veri yoktur. Dış ortam hava kirliliğinin KOAH geliştirme riski eviçi maruziyetlerden daha azdır. DSÖ kentsel hava kirliliğinin gelir düzeyi yüksek ülkelerde % 1 düşük-orta gelir düzeyli ülkelerde %2 oranında KOAH sebebi olduğunu bildirmiştir (17).

Hava kirliliği alt havayolları infeksiyonları ve kardiyopulmoner problemlerle ilişkili bulunmuştur ki bunlar hem KOAH gelişimi hemde progresyonunda önemlidir. Yoğun hava kirliliği özellikle çocuklarda akciğer gelişimini olumsuz yönde etkiler (33). Dış ortam hava kirliliğinin KOAH gelişiminde ne kadar etkili olduğu tam olarak bilinmemekle beraber sigara dumanıyla kıyaslandığında risk çok daha küçük kalmaktadır. Uzun dönemde atmosferik hava kirliliğinde bir tek maddenin etkisini

araştırmak zordur. Özellikle büyük Őehirlerde motorlu araç yakıt ürünleri azalmış solunum fonksiyonları ile ilişkili saptanmıştır (34). Kısa süreli yoğun maruziyet ve uzun süreli az miktarda maruziyetler halen araştırılması gereken konulardır.

2.1.6. Yaşlanma

KOAH prevelansı morbiditesi ve mortalitesi yaşla beraber artmaktadır. Akciğer fonksiyonları gençlik döneminde zirveye ulaşır. Hayatın 3-4. dekatlarında azalmaya başlar (35). Bu azalma normal olarak değerlendirilmesine rağmen bazı araştırmacılar akciğer fonksiyonları yüksek olan yaşlı hastaların düşük olan hastalara göre daha uzun yaşadıklarını saptamışlardır (36). Yaşla birlikte KOAH prevelansında artışın bir sebebi de dünya nüfusunda demografinin değişmesi, daha iyi beslenme, çocukluk dönemi enfeksiyonlarından bazılarının elimine edilmesi ve gençlerde lme yol açan kardiyak hastalıklar ve enfeksiyonlar gibi durumların azalmasıdır. Sonuç olarak dünya nüfusunun büyük bir kısmı daha uzun yaşamaya ve KOAH gibi kronik hastalıklar açısından daha yüksek risk altında olmaya başlamıştır (37).

2.1.7. Enfeksiyonlar

Enfeksiyonların hem KOAH gelişiminde hem de ilerlemesinde büyük rolleri vardır. Hayatın erken dönemlerinde enfeksiyona maruziyet bronşektazi gelişimi ve havayolu cevabında artışa yol açabilir. Viral veya bakteriyel enfeksiyonlar KOAH gelişimi, progresyonu ve alevlenmelerinde de rol oynayabilmektedirler (38). Havayollarındaki kolonizasyon da alevlenmelerde önemli rol oynamaktadır (39). Çocukluk ağında geçirilen ciddi solunum yolu enfeksiyonlarının ilerleyen yaşlarda solunum fonksiyonlarında azalma ve semptomlarda artış ile ilişkili olduğu saptanmıştır (40, 41).

Bu durumun birkaç açıklaması bulunmaktadır. Havayollarında aşırıcevaplılığı olanlarda enfeksiyonlar nedeniyle erken teşhis, yine enfeksiyonlara bağlı düşük doğum ağırlılığı ki her iki durumda KOAH daha erken ortaya çıkabilmektedir. HIV (Human Immunodeficiency Virus)'li hastalarda sigaraya bağlı amfizemin daha hızlı ortaya

çıkıldığı saptanmıştır (42). Yine tüberküloz geçirme hikayesi olanlarda 40 yaşından sonra havayolu obstrüksiyonu ile ilişkili olabileceği saptanmıştır (43)

2.1.8. Astım

Hollandalı araştırmacıların hipotezine (“Dutch hipotezi”) göre astım, kronik bronşit ve amfizem tek bir hastalığın farklı klinik görünümüdür ve aynı zamanda bronşiyal aşırı duyarlanma ve cevaplılık KOAH gelişimine ilerleyebilir. Ancak bu durum tartışmalıdır (44). Çalışmalarda klinik olarak KOAH tanısı olanlarda %30’a varan overlap (astım+KOAH) durumları saptanmıştır (45). Diğer bir çalışmada astımlı özellikle sigaralı hastaların astımı olmayan hastalarla kıyaslandığında akciğer fonksiyon kayıplarının daha hızlı olabileceği saptanmıştır (46).

2.1.9. Cinsiyet

Cinsiyetin KOAH gelişimi ve progresyonu üzerindeki etkisi çelişkili ve halen araştırma konusudur (47). Tarihe bakıldığında sigara içimi ve mesleki maruziyetlerden dolayı KOAH erkeklerde daha fazla saptanmıştır (48). Aynı maddelere maruz kalmaları halinde kadınlarda KOAH gelişme riskinin daha mı yüksek olduğu konusu halen araştırılmaktadır, ancak bu hipotezi destekleyen çalışmalar da mevcuttur (49, 50).

2.1.10. Sosyoekonomik Faktörler

Düşük sosyoekonomik seviyeli toplumlarda KOAH gelişme ve komplikasyonlarına maruz kalma riski daha yüksektir (51). Yoksulluk KOAH için risk faktörü olan durumları arttırmaktadır. Bunların arasında kötü beslenme koşulları, hava kirliliğine maruziyet, kalabalık yaşam koşulları, daha fazla sigara içim oranları, sağlık hizmetlerine daha zor ulaşılması ve respiratuvar enfeksiyonların daha sık gözlenmesi gibi durumlar sayılabilir (52).

2.1.11. Akciğer Gelişimi Üzerine Etkili Faktörler

Akciğerlerin gelişimi gebelik dönemlerinde başlar. Dolayısıyla anne karnında akciğer gelişimi üzerinde etkili olabilecek her türlü faktör ilerleyen yaşlarda meydana gelebilecek akciğer hastalıkları için zemin hazırlayabilir ki bunlardan bir tanesi de KOAH'tır. Düşük doğum ağırlığı, akciğerlerin gelişimini de olumsuz etkiler. Bu şekilde doğan çocuklar daha sık ve ağır bakteriyel veya viral solunum yolu enfeksiyonu geçirmektedirler. Aynı zamanda ilerleyen yaşlarda optimal akciğer fonksiyonlarına ulaşmaları zorlaşmaktadır. Solunum fonksiyon testlerinde düşüklük saptanan bireylerde KOAH gelişme riski artmaktadır (10). Benzer şekilde, çocukluk çağlarında ağır ve sık bakteriyel veya viral solunum yolu enfeksiyonu geçiren bireylerde KOAH gelişme riski artmaktadır. Örneğin tüberküloz geçirenlerde bu risk yaklaşık olarak 4 kat artış göstermektedir (11).

2.2. KOAH'ın Patogenezi

KOAH; tütün dumanı, toksik gaz ve çeşitli partiküllere maruz kalınması sonucu akciğerde inflamasyon, doku hasarı, tamir ve savunma mekanizmalarında hasarlanma ile oluşan bir hastalıktır (8). KOAH'lı hastalarda görülen inflamasyon normal sigara içenlerde görülen enflamasyona, hem inflamatuvar hücre profili hemde inflamatuvar belirteçler açısından benzemektedir. Ancak KOAH'da normal sigara içenlere göre inflamatuvar yanıt daha abartılıdır. Bu abartılı yanıt; aşırı miktarda mukus üretimi, hava yollarında fibrozis ve daralma, parankimal ve vasküler yapılarda hasarlanmaya yol açmaktadır (8). Sonuç olarak olarak hava hapsi ve hava akımı kısıtlanması meydana gelmektedir. Ancak bazı KOAH'lı hastalar sigara içmemiş grubu oluşturmaktadır. Bu hastalardaki inflamasyonun özellikleri tam olarak bilinmemektedir.

Bireyler sigarayı bıraksalar bile inflamatuvar değişikliklerin devam ettiği gözlenmektedir. Bu sebepten dolayı olayda inflamatuvar sürecin devamlılığını sağlayan otoimmünite gibi endojen mekanizmalar, ya da persistan enfeksiyonlardan şüphe edilmektedir (53). Biyomas maruziyeti ve pasif sigara içiminin de benzer bulgulara yol açabileceği gösterilmiştir (54). Hücrel inflamasyon, oksidatif stres ve proteaz–antiproteaz dengesizliğinin yarattığı etkiler nedeniyle artabilmektedir (55).

2.2. 1. KOAH'ta Akciğer İnflamasyonu

KOAH'taki patolojik değişiklikler proksimal ve periferik hava yolları ile akciğer parankimini ve pulmoner vasküler yapıları kapsamaktadır (8, 56). Söz konusu alanlarda, kronik inflamatuvar değişiklikler, akciğerin değişik alanlarında spesifik inflamatuvar hücrelerin düzeylerindeki artış ve tekrarlayan hasarlanma ve tamirden kaynaklanan yapısal değişikliklerden (remodelling) oluşmaktadır (8). Genel olarak, hava yollarındaki inflamatuvar ve yapısal değişiklikler hastalığın şiddeti ile ilişkili olup, çoğu zaman sigara bırakıldıktan sonra da devam etmektedir (8).

KOAH'taki inflamatuvar olayların oldukça karmaşık olduğu düşünülmektedir (26). İnflamasyon özellikle akciğer parankimi ve küçük hava yollarında olsa da, stabil KOAH'taki bronş biyopsi çalışmaları bronş mukozasında makrofaj ve interferon (IFN)- γ , CXCL10 IFN γ -indüklenebilir10-kD protein (IP-10) ve İL-9 eksprese eden başta CD8+'ler olmak üzere aktive T lenfosit infiltrasyonunun arttığını göstermiştir (26). Bundan başka, hava yollarında yaygın bir nötrofil söz konusudur (57). KOAH'luların bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvıları incelendiğinde genel olarak makrofaj ve nötrofil oranlarının sigara içmeyen ve sigara içip KOAH gelişmeyen bireylerden yüksek olduğu bulunmuştur (26). Lenfosit oranı da sigara içenlerde, içmeyenlere göre daha yüksektir (26). Benzer şekilde, indükte balgamda total hücre sayısı, nötrofil oranı, bazı hastalarda eozinofil oranı ve CD8+ T hücre sayısında artış olduğu gösterilmiştir (58, 59).

Alevlenmeler sırasında da eozinofil ve nötrofilide artış gözlenmiştir. Bu artışın, normal T hücreleri tarafından aktivasyon ile eksprese olan ve salınan protein [regulated on activation, normal Tcell expressed and secreted (RANTES)] ile epitelyal nötrofil aktive edici peptid-78 (CXCL5), IL-4 ve IL-5 ile ilişkili olduğu bulunmuştur (60, 61). Diğer yandan, total elastaz aktivitesinin normal bireylere göre KOAH'lılarda arttığı ve anti elastaz aktivitesinin azaldığı bildirilmektedir (62).

KOAH'ta inflamasyon tipik olarak alt solunum yollarında meydana gelmektedir. İnflamasyonun ani kötüleşmeleri KOAH alevlenmelerinin tipik özelliğidir. Stabil hastalıkta makrofajlar respiratuvar bronşiyollerde ve alveollerde birikir. Makrofajlar hem normal akciğer, hemde KOAH'lı hastaların akciğerinde birçok koşulda en fazla bulunan hücrelerdir. Makrofaj kaynaklı mediyatörler KOAH'ın anahtar patogenetik mediyatörleridir. Aynı şekilde nötrofiller havayolu lümeni ve havayolu salgı bezlerinde (63) bulunurlar ve hastalık ilerledikçe dokularda birikme eğilimindedirler (64). Lenfositler, özellikle CD8+ lenfositler havayollarında, alveolar yapılarda, damarlarda ve lenf nodlarında bulunmaktadır (65, 66). Artmış CD8+ hücre sayısı hastalığın ciddiyeti ile ilişkilidir (67). KOAH hastalarının T lenfositleri CCR5 ve CXCR3 eksprese ettikleri saptanmış ki bunlar T helper 1 (Th1) hücreleri için markırdırlar (68). Daha az anlaşılmiş olmakla beraber mast hücreleri de KOAH'ta havayolu duvarlarında ve mast hücre

mediyatörleri BAL sıvılarında artmış olarak saptanmıştır (69). Eozinofiller de havayolu duvarında, lavaj sıvılarında ve indükte balgamda saptanmıştır (70). Eozinofil ilişkili mediyatörlerin varlığı eozinofil aktivasyonunun göstergesidir (70). İlginç olarak eozinofili ve mast hücre aktivasyonu ile seyreden hastaların KOAH'ın bir alt tipiyle ilişkili olabilecekleri düşünülmektedir (71). Balgamında eozinofili olan hastaların kortikosteroidlere daha iyi cevap verdikleri düşünülmektedir (58).

Bundan başka akciğerin yapısal hücreleri olan epitel hücreleri ve mezenkimal hücreler de inflamatuvar mediyatör sentezleyebilirler ve bu hücrelerin KOAH'taki inflamasyonda anahtar rol oynadıkları düşünülmektedir.

Sigara içmeyi bırakan ve KOAH gelişmemiş bireylerde alt solunum yollarındaki inflamasyon düzelmektedir (72). Daha önceden sigara içmiş KOAH'lı hastalar ile halen sigara içen KOAH'lı hastalar kıyaslandığında inflamasyonun benzerlik gösterdiği saptanmıştır (73). Hastalık belli bir noktaya geldikten sonra inflamatuvar cevap devam etmektedir. Sigarayı bırakmanın öksürük ve balgamı azalttığı ve hastalık progresyonunu yavaşlattığı gösterilmiştir (74). Bir başka çalışmada, hafif KOAH'lı hastalar değerlendirilmiş ve sigarayı bıraktıktan sonra akciğer fonksiyonlarında minimal bir düzelme olduğu saptanmış ancak bunlarda da ilerleyen zamanlarda tekrar bozulma olduğu görülmüştür (75).

2.2.2. KOAH'ta Sitokin Salınımı ve Profili

Sitokinler değişik hücre tipleri tarafından üretilen hücreler arası etkileşimlerde görev alan ekstrasellüler sinyal proteinleridir. Genellikle bitişik hücreleri etkilemektedirler ve dolayısıyla parakrin etkileri olmaktadır. Bununla beraber dolaşım vasıtasıyla endokrin ve kendi salgılandıkları hücreler üzerinde otokrin etkileşimleri de olabilmektedir. Sitokinler nadir olarak tek başlarına üretilirler. Genellikle diğer sitokinlerle beraber salınır ve etkileşirler. Sitokinlerin birden fazla etkisi olabildiği gibi birden fazla sitokinin de aynı görevi ve etkileri olabilmektedir (76). Bir sitokinin etkisi aynı hücreden salınan sitokinlerden etkilenebileceği gibi hedef hücrelerden salınan sitokinlerle de değişebilmektedir ki sonuç olarak sinerjistik veya antagonistik sonuçlar

oluşabilmektedir. Sitokinlerin etkileri yüksek afiniteli hücre yüzey proteinleri ile etkileşimleri sonucu ortaya çıkmaktadır (76). Sitokinler kendileri reseptör ekspresyonunu uyarabilmektedir ki sonuçta sitokin ve hedef hücrelerin cevabını etkileyebilmektedirler.

KOAH'taki patoloji doku hasarı ve tamir ile süregelen kronik inflamatuvar bir hadisedir ve bu süreçte birçok sitokin rol oynamaktadır. Stabil KOAH'lı hastaların balgamlarında İL-6, İL-8 ve İL-1 β düzeylerinde artış saptanmıştır (77). Yine NE, matriks metalloproteinaz (MMP)-8, -9 ve -12 gibi proteazların KOAH'luların balgamında arttığı saptanmıştır (78, 79). KOAH'lı ve sigaralı hastalarda alveoler makrofajlarda proinflamatuvar sitokinler İL-8, İL-1 ve TNF- α ile anti-inflamatuvar sitokin olan İL-10 salınımının artmış olduğu saptanmıştır (80).

Kronik sigara içenlerden elde edilen BAL sıvılarının sigara içmeyenlerle kıyaslandığı bir çalışmada kronik sigaralı grupta TNF- α , İL-1 β , İL-8 ve İL-6 düzeylerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (81). Sigara dumanına akut maruziyet kemokin salınımına da yol açmaktadır. Dolayısıyla sitokin salınımının başlaması sigara içiminin direkt etkisi gibi görünmektedir. Sigara içimi İL-8 gen ekspresyonu ve bronş epitel hücrelerinden salınımını ve alveoler makrofajlardan da TNF- α ile beraber İL-6 salınımını arttırmaktadır (82). Sigara dumanında bulunan oksidanlar da makrofaj ve epitel hücrelerinden İL-1 ve İL-8 gibi proinflamatuvar sitokinleri uyarmaktadır (83). Epitel hücrelerinin sigara dumanı ekstraktına maruz bırakılması sonucu İL-8, G-CSF ve MCP-1 aracılığıyla nötrofilik ve monositik kemotaktik aktivitede ve ekspresyonunda artış olduğu görülmüştür (84).

2.2.2.1. Granülosit-Makrofaj Koloni Stimülan Faktör (GM-CSF)

GM-CSF nötrofil, eozinofil ve makrofajların sağkalımı ve farklılaşması üzerinde önemli etkilere sahip olup KOAH patogenezinde suçlanan bir sitokindir. Bir reseptörü GM-CSF için spesifik olup diğer bir zinciri ise İL-3 ve İL-5 için de kısmi reseptör görevi görmektedir. GM-CSF çoğunlukla makrofajlardan, epitel hücrelerinden ve T hücrelerinden inflamatuvar stimulusa cevap olarak salınmaktadır (53). KOAH'lı

hastaların makrofajlarından çok miktarda salgılanmakta ve nötrofiller ile makrofajların sağkalımının uzamasından sorumlu tutulmaktadır (85). Alevlenme sırasında KOAH'lı hastaların BAL sıvılarında artmış olarak saptanan GM-CSF konsantrasyonlarının uzamış nötrofil sağkalımı ile paralellik gösterdiği saptanmıştır (86).

2.2.2.2. İnterlökin-6 (İL-6)

İL-6 genellikle diğer sitokinlerle beraber etki eder. Kalıtsal ve edinsel bağışıklık arasında bir bağlantı oluşturur. İL-6 üzerinde yapılan çalışmalarda KOAH'lı hastaların balgam, verilen solukta ve plazmalarında özellikle alevlenme dönemlerinde artmış olarak saptanmıştır (87, 88). İL-6'nın artmış plazma konsantrasyonları yüksek C-reaktif protein (CRP) değerleri ile ilişkili olarak saptanmıştır. İL-6, aynı zamanda karaciğerden CRP salınım mekanizmasının majör stimülanıdır. İL-6 diğer sitokinlerden farklı olarak dolaşımında stabil olarak bulunmakta ve KOAH'ın sistemik etkilerinden sorumlu tutulmaktadır. İL-6 aynı zamanda endotel hücre disfonksiyonu kas güçsüzlüğü, insülin rezistansı, osteoporoz ve depresyon ile ilişkili olarak saptanmıştır (89). İL-6 reseptör blokörü, anti İL-6 (tocilizumab) romatoid artrit ve inflamatuvar barsak hastalığı tedavisinde etkili bir ajan olarak tedavide kullanılmaktadır, ancak KOAH'ta etkinliği henüz test edilmemiştir.

2.2.2.3. İnterlökin-8 (İL-8)

Genel olarak KOAH'ta en yoğun çalışılan inflamatuvar mediatör İL-8 olup, bunun KOAH'lılarda arttığı ve hastalığın şiddeti ile (beklenen %FEV₁) korelasyon gösterdiği bulunmuştur (77, 90). İL-8 bir CXC kemokin ve nötrofil kemoatraktanı ve aktivatörüdür. İntrasellüler kalsiyum konsantrasyonlarında artışa yol açmakta, intrasellüler depo organellerinden enzim salınımına ve dolayısıyla solunumsal patlamaya yol açabilmektedir. İL-8 nötrofil 5-lipoksijenazı, lökotrien B4 ve 5-hidroksi-eikosanotetraenoik asit üretimini aktive etmektedir. İL-8'in aynı zamanda T hücreleri için de kemoatraktan etkileri olmaktadır. Bakteriler, hava yolu epitel hücrelerinde İL-8

ekspresyonunu uyarabilmektedir. KOAH'lı hastaların balgamlarında bakteri yükü ve aktive nötrofillerden salınan myeloperoksidaz düzeyi ile korele olarak İL-8 seviyelerinde artış olabilmektedir. Balgamın kemotaktik aktivitesinin %43'ünden İL-8 sorumlu bulunmuştur (91). Nötrofillerden salınan elastazın da İL-8 ve lökotrien B4 salınımını stimüle edici etkisi bulunmaktadır (92).

2.2.2.4. İnterlökin-1 β (İL-1 β)

İL-1 β kemik iliğinden nötrofil salınımını uyararak lökositoz oluşumuna neden olmakta aynı zamanda İL-1, -2, -3, -4, -5, -6 ve -8, RANTES, GM-CSF, İFN- γ , TNF gibi sitokinlerin farklı hücrelerden salınımına yol açmaktadır. Fibroblastların proliferasyonuna, prostaglandin artışına ve aynı zamanda fibronektin ve kollajen sentezinde artışa yol açmaktadır (76). TNF- α ile beraber İL-1 β endotel hücrelerinden ICAM-1 ekspresyonunu indüklemektedir. İL-1 β ekspresyonu KOAH'lı hastalarda artış göstermektedir. Bu sitokin KOAH'lı hastaların makrofajlarını inflamatuvar sitokin, matriks metalloproteinaz (MMP) 9 salgılamak üzere uyarır (85). KOAH'lı hastaların balgamında İL-1 β konsantrasyonlarında artış saptanmıştır ki hastalığın ciddiyeti İL-1 reseptör antagonisti ve İL-1 reseptör konsantrasyonlarında azalma ile korelasyon göstermiştir (93). İnsan İL-1 β bloke edici antikor (canakinumab) ile klinik çalışmalar yapılmakla beraber halen İL-1 β 'nin rolü tam olarak aydınlatılamamıştır.

2.2.2.5. Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α)

Sigaralı normal bireyler ile kıyaslandığında tümör nekroz faktörü (TNF)- α ve solubl TNF- α reseptör düzeylerinin indükte balgamda arttığı görülmüştür (10, 77). İn vitro kültür ortamındaki çalışmalarda da KOAH'lılardan alınan makrofajların TNF- α , İL-8, MMP-9 gibi inflamatuvar proteinleri daha yüksek oranda eksprese ettikleri gözlenmiştir (26, 94). Birçok hücrenin TNF- α salgılama kapasitesi bulunmaktadır. Bunların arasında akciğer epitel hücreleri, makrofajlar, T lenfositler ve havayolu düz kas hücreleri sayılabilir. Özellikle alevlenme dönemlerinde KOAH'lı hastaların balgamlarında TNF- α

düzeylerinde artış saptanmıştır (77). Belirgin kilo kaybı olan hastalarda dolaşım hücrelerinden yoğun miktarda TNF- α salınımı olmaktadır. TNF- α sigara dumanı ile amfizemin tetiklendiği farelerde de yüksek oranda saptanmıştır (95). Dolayısıyla KOAH'ta bu sitokini hedef alan tedavi stratejileri faydalı olabilir. Ancak romatoid artrit tedavisinde kullanılan bloke edici antikor olan infliximab KOAH'ta semptomlarda, akciğer fonksiyonlarında egzersiz performansında fayda sağlayamamıştır (96).

2.2.3. İntrasellüler Sinyal İleti Yolakları

Transkripsiyon düzeyindeki değişikliklere bakıldığında, KOAH'lı hastaların BEH'de nükleer faktör- κ B (NF- κ B) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunun arttığı, bunun hastalık şiddeti ile ilişki gösterdiği saptanmıştır (97). NF- κ B aktivasyonu KOAH'lı hastaların indükte balgamından elde edilen makrofajlarda, periferik akciğerlerinde ve hava yolu epitel hücrelerinde alevlenmeler sırasında daha da artmaktadır (97, 98).

Histon asetiltransferaz (HAT) (61) ve histon deasetilaz (HDAC), kromatin yapısını modifiye ederek inflamatuvar genlerin ekspresyonunu düzenleyen nükleer enzim aileleridir (99). Çekirdek (core) histonların asetilasyonu, inflamatuvar genlerin transkripsiyonu ve aktivasyonu ile ilişkili olup, intrinsek HAT aktivitesi olan ko-aktivatör moleküllerce düzenlenmektedir (99). NF- κ B ve aktivatör protein (AP)-1 gibi proinflamatuvar transkripsiyon faktörleri bu koaktivatör moleküllere bağlanarak HAT'ı aktive etmektedir (101). Histon asetilasyonu, HDAC'lar tarafından geri döndürülmektedir (101). KOAH'ta alveoler makrofajlarda, bronşlarda ve periferik akciğerde HDAC aktivitesinde belirgin azalma olduğu, bunun artmış NF- κ B aktivitesi ve artmış inflamatuvar gen ekspresyonu ile korelasyon gösterdiği saptanmıştır (102, 103).

Diğer yandan, NF- κ B ve AP-1 gibi KOAH'taki inflamasyonda gen ekspresyonunu regüle eden birçok önemli transkripsiyon faktörü kinazlar tarafından düzenlenmektedir (104). KOAH'taki inflamatuvar yanıtta önemli olan birçok eksternal hücrel sinyal hücrelerdeki transmembran reseptörlere bağlanarak intrasellüler kinazları aktive

etmektedir (105). Mitojen aktive protein (MAP) kinazlara (MAPKs) ilave olarak, IKK kinaz inhibitörü (IKK) 2, fosfo-inositol-3 (PI3) kinaz ve sinyale daha spesifik olan Janus kinazlar (JAKs)/sinyal iletici ve transkripsiyon aktive edici (STATs) gibi yollar da inflamatuvar yanıt için gerekli olmaktadır (104). MAPKs'lerin alt grupları olan ekstraselüler regüle kinaz (106), c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38MAPK da inflamasyonda aktif rol oynamaktadır (107).

Fosfoinositid 3-kinazlar (PI-3Ks) hücre aktivasyonu, büyümesi/bölünmesi ve apoptozisi/yaşamını düzenleyen lipid yapısındaki ikincil mesaj ileticilerini (messenger) üreten önemli enzimlerdir (107, 108). PI-3Ks'ler sitokinler, antijenler ve ko-stimülatuar moleküller tarafından başlatılan sinyal iletiminde de rol oynar ve reseptörle ilişkili tirozin kinazlar tarafından aktive edilir (104). PI-3Ks yolağının aşağı doğru olan anahtar efektörü bir serine-threonine kinaz olan Akt'dir (3). Akt PI-3K'nın aktivasyonuna yanıt olarak kinazlar (MAPKs), transkripsiyon faktörleri ve diğer düzenleyici moleküllerden oluşan bir dizi hedef molekülün aktivitesini düzenler (3). Akt'nin hücre yaşamı, proliferasyonu ve inflamasyonunda önemli rol oynadığı bildirilmektedir (104).

Her sinyal ileti yolağının kendisine spesifik transkripsiyon faktörlerini aktive edebilmesine rağmen, kinaz yolları arasında gerek membran öncesinde, gereksede transkripsiyon faktörünün devreye girmesinin öncesinde bir çapraz iletişim olmakta, böylece sinyal bütünlüğü sağlanmaktadır (104). Kinaz yollarının bir diğer önemi, bu yollara selektif inhibitörlerin birçok inflamatuvar mediatörü ve adezyon molekülünü düzenleme yeteneğinde olmalarıdır (106, 109). Bu inhibitörler, ayrıca granülosit apoptozisi ve kemotaksisi ile T hücreleri, makrofaj ve epitel hücre fonksiyonlarını kontrol edebilmektedirler (106, 109). Bundan başka, kinaz inhibitörleri havayolu düz kas proliferasyonu ve hava yolunun yeniden yapılanmasıyla ilişkili diğer faktörleri düzenleyebilmektedir (110). Diğer yandan, primer hücre çalışmaları ile hayvan ve klinik araştırmalar PI-3K/Akt inhibitörlerinin astım ve KOAH gibi hastalıklarda yeni tedavi olanakları sunacağını düşündürmektedir (108, 111).

Siklik nükleotidler ortak sinyal sistemi olarak işlev görebilmektedirler. Nötrofil kemotaksisi siklik guanozin monofosfat (cGMP) ve siklik adenozin monofosfat (cAMP) ile düzenlenmektedir (112, 113). cAMP yüksekliği genellikle lökosit adezyonunu ve

migrasyonunu baskılamaktadır. cAMP üzerinden etkiler ve inflamatuvar mekanizmalar teofilinin KAOH'taki inflamasyon üzerindeki etkileri açısından etkili olabilir (114). cAMP düzeylerini arttıran fosfodiesteraz (PDE)-4 inhibitörleri antiinflamatuvar etki gösterebilmektedir (115).

2.2.4. Amfizem

Akciğer amfizeminin karakteristik lezyonu alveolar duvarın yıkımıdır. Aşırı proteolitik aktivite (proteaz-antiprotez dengesizliği) akciğer yıkımına neden olmaktadır. Uzun zaman önce yapılan çalışmalarda α 1-antitripsin eksikliği ve akciğer amfizemi arasındaki ilişki açıklanmıştır (116). Deneysel çalışmalarda elastolitik aktivitesi olan enzimlerin akciğerlere verilmesi amfizem gelişmesini uyarmıştır (117, 118).

Başlangıçta bütün dikkatin α -1 protez inhibitörü ve NE üzerine toplanmasına rağmen diğer enzim ve inhibitörlerin de rol oynadığına inanılmaktadır. Lökosit elastaza ek olarak kimotripsin ve proteinaz 3'ün elastolitik aktivitesi mevcuttur ve amfizem gelişimine katkı sunabilmektedir (119). Benzer şekilde metalloproteazlar ve sistein proteazların da elastolitik aktiviteleri olabilmektedir ve KOAH'lı hastalarda amfizem gelişiminde suçlanmaktadır (120). Normal akciğerlerde bu enzimlerin inhibitörleri mevcut olup proteaz-antiproteaz dengesini korumaktadır. Proteinaz-antiproteinaz arasındaki denge konjenital antiproteaz eksikliklerine ek olarak başka mekanizmalarla da gelişebilmektedir. KOAH'lı hastalarda alt solunum yollarında nötrofil kaynaklı enzimlerin salınımında artış olduğu saptanmıştır (62). Aynı zamanda BAL ile alt solunum yollarından elde edilen elastaz oranının bilgisayarlı tomografi ile saptanan amfizemin ağırlığı ile korele olduğu saptanmıştır (62).

KOAH'lı hastalarda aynı şekilde elastolitik aktiviteleri bulunan matriks metalloproteinaz (MMP) 9 ve MMP-12 düzeyleri artmış olarak saptanmıştır (121). KOAH'ta sistein proteazlar da alt hava yollarında bulunmaktadır. Alt solunum yollarında artış gösteren değişik tipteki proteazlar farklı tip hücrelerden kaynaklanmaktadır. Sigaraya bağlı olarak artan reaktif oksijen ürünlerinin düzeyi inflamasyona yol açarak, antiproteaz aktiviteyi baskılayabilir. α -1 antitripsin gibi antiproteazlar oksidayona hassas olup artmış reaktif oksijen ürünleri tarafından hasara

uğratılabilirler. Bunun sonucu olarak sigara içen bir kişi veya aktif inflamatuvar cevabı olan biri edinilmiş α -1 antitripsin eksikliği geliştirebilir (122).

Doku hasarı multipl proteazların entegrasyonu sonucu gelişmektedir. Bu anlamda proteazların farklı sınıfları arasında önemli etkileşimler gelişmektedir. Birinci olarak katepsinler ve metalloproteazlar serin proteaz inhibitörlerini proteolitik olarak ayırabilirler. (123). Aynı şekilde serin proteazlar doku matriks metalloproteinaz inhibitörünü (TIMPs) yıkabilirler. Böylece bu grup proteazlar inhibitörler ve diğer sınıfları etkileyerek proteolitik, antiproteolitik dengeyi bozabilirler. Ek olarak metalloproteinazlar inaktif öncül moleküller olarak salınırlar (124). Proteazlar muhtemelen ekstrasellüler matriksin yıkımıyla KOAH'ın patogeneze katkıda bulunmaktadır. Bu bağlamda elastinin MMP12 ile yıkımı makrofajlar için potansiyel kemoatraktan peptidlerin oluşmasına neden olur. (125). MMP12 eksikliği olan fareler sigara dumanına maruz bırakıldığında akciğerde makrofaj birikmemektedir. Dolayısıyla MMP12 yokluğunda makrofaj birikmemesi MMP12'nin inflamatuvar cevap için gerekli olduğunu düşündürmektedir (125). MMPs, TGF- β ve TNF- α gibi diğer sitokinlerin aktivasyonunda da rol alabilir (126).

NE direkt olarak fibroblast kasılmasını stimüle edebilir ki, buda havayollarının daralmasına katkıda bulunur. Yine nötrofil elastaz epidermal büyüme faktörü reseptörünü uyararak goblet hücre metaplasisine yol açabilmektedir (127). Proteaz-antiproteaz dengesizliği ekstrasellüler matriksin yıkımına yol açmaktadır.

2.2.5. Apoptozis

KOAH gelişiminde önemli olabilecek mekanizmalardan biri de hücre apoptozistir. KOAH'lı hastaların akciğerlerinde apoptotik hücre sayısında artış olduğu görülmüştür (128). Ancak apoptozis oksidatif veya proteolitik hasardan bağımsız gelişmemektedir. Ekstrasellüler matriksin proteolitik yıkımı apoptozisin özel bir formu olan anokizis olarak adlandırılan hücre ölümüne yol açmaktadır (129). Oksidatif stresin de apoptozis gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmekte ve hem-oksijenaz-1'in antioksidan etkisiyle apoptozisi inhibe edebileceği ileri sürülmektedir (130). Sigara içiminin

apoptozisi uyarmakla beraber (100) apoptotik yolları inhibe edebileceği de gösterilmiştir (131).

2.2.6. Mukus Hipersekresyonu

KOAH sadece havayolu darlığı ile karakterize değildir, birçok olguda olduğu gibi öksürük ve balgam çıkarma vardır. Bu durum çoğunlukla havayolu epitelinin metaplazisi ile ilişkilidir. Normal psödostratifiye siliyalı epitel goblet hücreleri ve daha ağır hastalıkta skuamoz metaplazi ile sonuçlanmaktadır. Bunlara ek olarak mukus bezlerinde hipertrofi de olmaktadır. Bu anatomik değişiklikler müsin genlerinin ekspresyonunda değişikliklerle ilişkilendirilmiştir (132). Sonuç olarak anormal miktarda ve yapıda mukus üretilmektedir. Aynı zamanda mukus temizlenmesinde görevli olan silya farklılaşmaktadır (132). EGF reseptörünün direkt ligand aktivasyonu oksidanlar veya proteolitik yollarla non-ligand aktivasyonu müsin gen ekspresyonunda değişikliklerle sonuçlanabilmektedir (127). Hayvan modellerinde EGF reseptör aktivasyonu goblet hücre metaplazisinde muhtemelen anahtar rol oynamaktadır (133).

2.2.7. Fibrozis

KOAH'lıların küçük havayolları kollajenöz ekstrasellüler matriks birikimine yol açan mezenkimal hücrelerle dolmaktadır. Bu fibrotik cevap vücudun diğer bölgelerinde gelişen skar dokusunu andırır ve onlar gibi kontrakte olabilmektedir (134). Bu durum küçük havayollarındaki daralma ile ilişkilidir ve fikse havayolu daralmasının derecesini belirleyebilir (64).

TGF β 'nın merkezi bir rol oynadığı tahmin edilmektedir. Genel olarak bu mediyatörün yara iyileşmesinde anahtar rol oynadığı kabul edilmektedir (135). TGF- β fibroblastlar için potent bir aktivatördür ve onları myofibroblast benzeri fenotipe dönüştürür ki, bu da ekstrasellüler matriks üretimini uyarır (136). TGF- β 'ye ek olarak KOAH'ta akciğerde diğer bir kısım sitokinler de fibroblast aktivitesini düzenlemektedir. KOAH'ta alveoler duvarlarda kollajen birikimi söz konusu olup, amfizem geliştirebilen hayvan modellerinde benzer şekilde kollajende artış saptanmıştır (137). Sigara içimi fibroblast tamir mekanizmalarını inhibe edebilmektedir. Çalışmalarda sigara dumanının tamir mekanizmalarını engellemesi hücre yoğunluğuyla ilişkili bulunmuştur (138).

2.2.8. KOAH'ın Sistemik Etkileri

Günümüzde KOAH'ın sadece havayolu kısıtlılığı ve solunum semptomları ile değil, aynı zamanda sistemik etkilere de yol açtığı görülmüştür (10). Bunların arasında jeneralize güçsüzlük ve kardiyovasküler hastalıklar da bulunmaktadır (139, 140). Bu hasta grubunda asıl ölüm sebebi çoğu zaman kardiyovasküler hastalıklar olmaktadır (141). Bu durum hem hafif, hem de ağır derecede hastalığı olanlar için geçerlidir.

Risk artışına sebep olan mekanizmalar henüz tam anlamıyla aydınlatılamamıştır, ancak sadece sigara içimine bağlanamamaktadır. Sigaraya bağlı havayolu darlığı ve akciğerlerde ortaya çıkan inflamasyon kardiyovasküler hastalık gelişimi için risk oluşturabilir (139). Akciğerlerde TNF- α ve GM-CSF gibi inflamatuvar mediyatör üretimi vasküler hasara, artmış lökosit sayısı ve progresif ateroskleroza neden olabilir.

KOAH'lı hastalarda karakteristik olarak artmış C-reaktif protein değerleri gözlenmiş olup bu durumun aterosklerotik vasküler hastalıklar için de risk faktörü oluşturabileceği düşünülmektedir (139). Yine akciğerlerdeki inflamasyon İL-6 gibi sitokinlerin dolaşıma katılmasına ve hiperkuagülabilite oluşmasına yol açabilir (142).

KOAH'ta iskelet kaslarının güçsüzlüğü ile ilgili olarak çeşitli mekanizmalar ileri sürülmektedir. Bunların arasında kondüsyonsuzluk ve kortikosteroidler gibi ilaçların kullanılması da vardır (140). KOAH'lı hastaların inaktif olmaları muhtemelen multifaktöryeldir. Bitkinlikle sonuçlanan nefes darlığı, aktivitede azalmaya bu da kas disfonksiyonuna, yetersiz egzersize ve dispnede kötüleşmeye neden olur. Bu kısır döngü aktivitede giderek azalmaya ve daha fazla kondüsyon bozukluğuna yol açar (140). Bu konuda yapılan çalışmalar, iskelet kaslarında anormallikler ve artmış apoptozis olduğunu bildirmiştir (143, 144).

KOAH'lı hastalarda yüksek TNF- α seviyeleri kilo kaybıyla ilişkili bulunmuştur (145). KOAH'ta dolaşımda artan sitokin düzeyi duygu durumu üzerinde de etkili olabilir ve depresyon gelişmesine katkıda bulunabilir (146). Benzer şekilde osteoporoz da KOAH'lı hastalarda yüksek oranda görülmektedir. Kemik yoğunluğundaki azalma inaktivite, sigara içimi, diyet ve tedavide glukokortikoidlerin kullanımı ile ilişkilendirilmiştir (89).

2.3. KOAH'ta Steroid Direnci

Astımlı hastalarla kıyaslandığında KOAH'ta kortikosteroidlere daha az cevap vardır (147). Kortikosteroidlerin inflamasyonu baskılamadaki mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ile KOAH ve astımda kortikosteroid direncinin moleküler temeli üzerine ışık tutulmuştur. İnhaler kortikosteroidler astımda yüksek oranda fayda sağlamalarına rağmen KOAH'ta devam eden inflamasyonda düşük oranlarda fayda sağlamaktadırlar.

Birçok geniş çalışmada kortikosteroidlerin KOAH progresyonunu önleyemedikleri ve mortaliteyi azaltmadıkları saptanmıştır (148). Son rehberler inhaler kortikosteroidlerin sadece ileri evre (FEV1 < % 50 beklenen) hastalığı olanlarda, sık alevlenme geçirenlerde (yılda 2 defadan fazla), ki bu hastaların %10 una karşılık gelmektedir, kullanılması gerektiğini önermektedir. Ancak klinik olarak KOAH tanısı konan hastaların %80'inde inhaler kortikosteroid kullanılmaktadır (149).

Kortikosteroidler normal bireylerin havayollarında ozon ile uyarılan nötrofilik inflamasyonu baskılayamamaktadırlar (150). Kortikosteroidler, astımın kontrolünde, tipik eozinofilik inflamasyonu ve hava yollarındaki çeşitli inflamatuvar genleri baskılamada oldukça etkin ajanlardır. Buna karşın, steroidlerin yüksek dozları bile KOAH'taki inflamasyonu, dolayısıyla hastalığın progresyonunu baskılamada yetersiz kalmaktadır (151). KOAH ile beraber astımı olan (overlap sendromu) hastaların balgamında yüksek oranda eozinofil ve ekshale nitrik oksit mevcut olup hem inhaler kortikosteroidlere hemde bronkodilatör tedaviye iyi cevap verdikleri gözlenmiştir (152).

İn vitro çalışmalarda, KOAH'luların alveolar makrofajlarından sitokin salınımının, sigara içenlerin hücreleriyle kıyaslandığında kortikosteroidlerin inhibitör etkilerine karşı daha duyarsız olduğu saptanmıştır. Bu direnç, sigara içen bireylerde, sigara içmeyenlere göre de daha yüksek bulunmuştur (85). Çalışmalar, inhale veya oral steroidlerin KOAH'lı hastaların indükte balgamlarında veya hava yolu biyopsilerinde inflamatuvar hücre sayıları, sitokinler, kemokin veya proteazlar üzerinde etkili olmadıklarını bildirmektedir (151). Aynı şekilde, kortikosteroidlerin KOAH'lı hastalardan alınan alveoler makrofajlardan salınan çeşitli inflamatuvar proteinleri baskılamada etkisiz kaldıkları görülmektedir (153). Bu durum, KOAH'ta steroidlerin antiinflamatuvar etkilerinde bir defekt olduğunu düşündürmektedir.

Son zamanlarda kortikosteroidlerin antiinflamatuvar mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasıyla kortikosteroid direncinin birçok moleküler mekanizma ile meydana geldiği ortaya çıkmıştır. Bazı sitokinler p38 mitojen-aktif protein kinazı aktive eder ki bu da glukokortikoid reseptörlerinin (GRs) nükleer lokalizasyonlarına etki edebilmektedir. Diğer hastalarda GR'nin nükleer lokalizasyonu normal ancak histon-4'te lizin rezidülerinin asetilasyonunda azalma mevcut olup bu da bazı anti-inflamatuvar genlerin aktivasyonunda azalmaya yol açar (151).

Şekil 1'de de görüldüğü üzere KOAH'ta oksidatif stres histon deasetilazları inaktivite ederek ve ekspresyonunda baskılanmaya yol açarak kortikosteroidlerin antiinflamatuvar etkilerinde azalmaya yol açabilmektedir. Bu mekanizmalar gelecekte kortikosteroid direncinin aşılmasında yeni terapötik yaklaşımların olabileceğini düşündürmektedir. Örneğin antioksidanlar, p38 MAP-kinaz inhibitörleri ve histon deasetilazı aktive eden teofilin gibi ajanlar kullanılabilir (101).

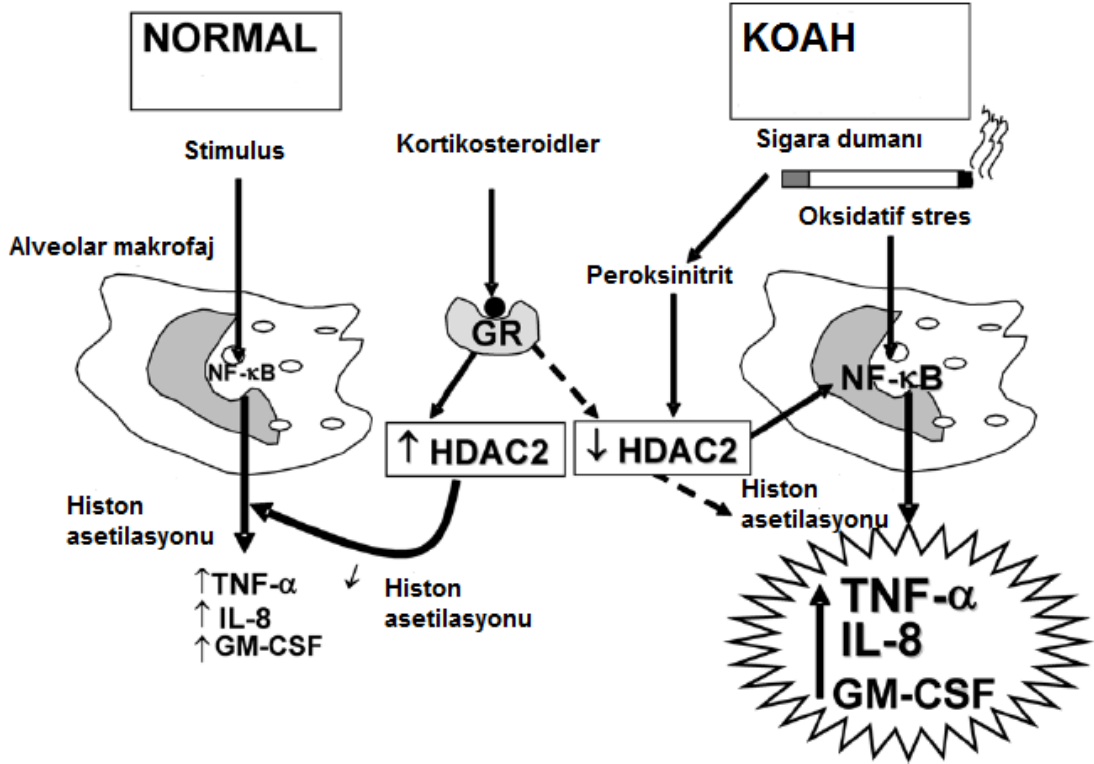
Mikrobiyal süperantijenler in vitro koşullarda ekstrasellüler reseptör kinaz yollarını uyararak GR fosforilasyonuna ve sonuçta glukokortikoid direncinde artışa yol açarlar (155). Mitojen Aktive Protein Kinaz Fosfataz (MKP)-1, MAPK'nın endojen bir inhibitörüdür, glukokortikoidlerle aktive edilir. KOAH ve ağır astımda indüklenbilir nitrik oksit (NO) sentaz ekspresyonunda artış olmaktadır. Sonuçta salınan NO glukokortikoidlere verilen cevabı azaltmaktadır.

KOAH'luların periferik akciğerinde HDAC aktivitesi ve ekspresyonunda belirgin bir azalma mevcuttur (156). Sigarayı bırakan hastalarda bile kortikosteroid direnci devam etmektedir (157, 158). Bu hastalar süregelen oksidatif strese maruz kalırlar (159). Oksidatif stres ve sigara içiminin hangi mekanizmalarla HDAC disfonksiyonu yaptığı konusu halen araştırılmaktadır. Bu mekanizma oksidatif stresin belirgin olarak arttığı ciddi astımda da geçerli olabilir (160).

Sigara dumanına maruz bırakılan ratlarda azalmış HDAC2 ekspresyonunun steroid yanıtızlığı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (161). Bu gözlemler, HDAC2 ekspresyonunu azaltan kritik mekanizmaların oksidatif ve nitratif stres aracılığıyla olabileceğini ve bu enzimin steroide yanıtta kritik rol oynadığını düşündürmektedir (162). Nitekim

HDAC2'nin ekspresyonunun indüklenmesinin hücrelerin steroide yanıtını restore ettiği gösterilmiştir.

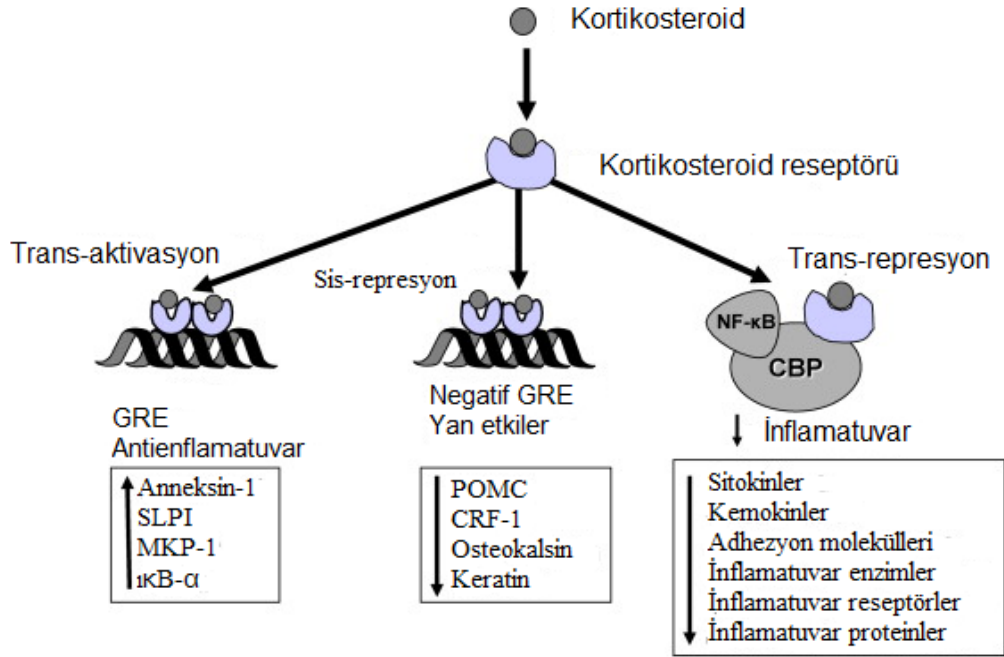
Glukokortikoid dirençli KOAH'luların bronkoalveolar lavaj sıvılarından elde edilen makrofajlarda HDAC2 ekspresyonu arttırılarak (plazmid vektör kullanarak) kontrol gruplarındaki değere kadar azaltılmıştır (163). HDAC2'nin KOAH'ta azalması konusu açıklığa kavuşturulmaya çalışılmaktadır (164). Oksidatif ve nitratif stres peroksinitrat oluşumuna neden olur bu da HDAC 2'nin tirozin rezidülerini inaktive eder ve yıkar (165). Oksidatif stres aynı zamanda fosfoinositid-3 kinazı (PI3K) aktive eder buda HDAC2 nin fosforilasyonu ve inaktivasyonuna yol açar (166). Bu durum sigaraya maruz bırakılan farelerde akciğerde inflamasyon gelişmesi ve steroide dirençli olmasıyla teyit edilmiştir. Bu steroid direnci PI3K geni inaktive edilen farelerde tamamen kaybolmuştur (167). Bu da oksidatif stresin steroid direncinde önemli bir direnç mekanizması olduğunu desteklemektedir.



Şekil 1. KOAH'ta steroid direnç mekanizmaları: Normal insanlarda alveolar makrofajların stimülasyonu nükleer faktör kapa B (NF-κB) ve diğer transkripsiyon faktörlerini uyarır. Histon asetiltransferaz uyarılır, histon asetilasyonu ve nihayetinde TNF-α, İL-8 VE GM-CSF gibi inflamatuvar proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonu gerçekleşir. Normal insanlarda kortikosteroidler reseptörlerine bağlanarak (GR) ve HDAC-2'yi uyararak bu olayı geriye çevirirler. Bu durum NF-κB ile uyarılan histon asetilasyonunu geri çevirir ve aktive olan inflamatuvar genler baskılanır. KOAH'lı hastalarda sigara dumanı ve aktive nötrofiller HDAC2'nin fonksiyonlarını engelleyen oksidatif strese yol açar. Bu durum NF-κB aktivasyonuna yanıt olarak ortaya çıkan inflamatuvar cevabı güçlendirir. HDAC2 histon asetilasyonunu geri çeviremez ve sonuç olarak kortikosteroidlerin etkilerini azaltır. (169) nolu kaynaktan modifiye edilmiştir.

2.3.1. Kortikosteroidlerin Anti-İnflamatuvar Mekanizmaları

Astımda kortikosteroidlerin inflamasyonu baskılamalarının moleküler mekanizmalarıyla ilgili büyük gelişmeler kaydedilmiştir (168). Kortikosteroidler inflamasyonda birçok antiinflamatuvar geni aktive ederken aynı zamanda birçok proinflamatuvar geni de baskılamaktadırlar (147). Kortikosteroidler astım gibi kronik inflamatuvar ve immün hastalıkların tedavisinde son derece etkili ajanlardır. Ancak KOAH gibi bazı hastalıklarda yeterince fayda sağlayamamaktadırlar. Kortikosteroidler inflamasyonu birkaç mekanizma ile baskılamaktadırlar. Astım gibi kronik hastalıkların birçoğunda aktive olan inflamatuvar genleri baskırlar. Bu etkilerini kortikosteroid reseptörlerine bağlanarak gösterirler (Şekil 2). Aktive olan inflamatuvar genlerin histon asetilasyonunu geri çevirmek için koaktivatör moleküllere bağlanırlar ve HDAC-2 uyarılmış olur. Ancak yüksek dozlarda antiinflamatuvar genlerin histon asetilasyonu ve kortikosteroidlerin yan etkilerine yol açan birçok genin transkripsiyonuna yol açarlar.



Şekil 2. Kortikosteroidlerin etki mekanizmaları; kortikosteroidler gen ekspresyonunu birkaç yolla gerçekleştirmektedirler. Kortikosteroidler sitoplazmadaki reseptörlerine (GR) bağlanmak üzere hücre içine girerler ve sonuçta nükleusa transloke olurlar. GR homodimerleri steroide duyarlı genlerin promotor bölgesindeki kortikosteroid-cevab elementlerine (GRE) bağlanırlar ve antiinflamatuvar proteinler kodlanır. Daha az sıklıkla GR homodimerleri negatif GRE'lerle etkileşir sonuç olarak gen süpresyonu meydana gelir. Aynı zamanda nükleer GR CREB-bağlayıcı protein (CBP) gibi koaktivatör moleküllerle de etkileşir ki bunlar da nükleer faktör-κB (NF-κB) gibi proinflamatuvar transkripsiyon faktörlerince aktive edilmektedir. SLPI: sekretuvar lökoproteaz inhibitörü; MKP-1: mitojen aktive kinaz fosfataz -1; IκB-α: NF-κB inhibitörü POMC: proopiomelanokortin; CRF: kortikotropin salgılayıcı faktör. (169) nolu kaynaktan modifiye edilmiştir.

2.3.2. Kortikosteroid Reseptörleri

Kortikosteroidler hücre membranı boyunca diffüze olurlar ve sitoplazmada bulunan reseptörlerine bağlanırlar (170). Kortikosteroidlerin liganda bağlanmasıyla reseptör aktive olur ve şaperon proteinlerinden (ısı şok proteinleri) salınırlar. Hızlıca nükleusa transloke olurlar ve etkilerini göstermeye başlarlar. Nükleer translokasyon mekanizması nükleer import protein-a ve importin¹³'ü kapsar (171). Kortikosteroidleri bağlayan GRa olarak adlandırılan bir kortikosteroid reseptör formu mevcuttur. GRb kortikosteroidlerle etkileşmeyen ancak DNA ile etkileşen formudur ve teorik olarak kortikosteroid etkisine negatif etki ediyor olabilir (171). Diğer birkaç post-translasyonel modifikasyon ve reseptör etkilerine ve dolayısıyla hücrelerde steroid cevabına yol açan reseptörden bahsedilmektedir (172).

2.3.3. Gen Aktivasyonu

Kortikosteroid reseptörleri homodimerize olup glukokortikoid-responsive genlerin kortikosteroidlere cevap veren elementlerin (GRE)'nin promotor bölgesinde bağlanır ve bu etkileşim gen transkripsiyonunu uyarır. Nadir olarak ta yavaşlatır. Glukokortikoid responsive genlerin aktive olması DNA-bağlı GR ve transkripsiyonel ko-aktivatör moleküllerince gerçekleşir. Histonlar kromatin remodelling lokomotiflerini toplar ve RNA polimeraz II bağlantısıyla gen aktivasyonu meydana gelir (173). Kortikosteroidlerle uyarılan genler arasında β 2 adrenerjik reseptörünü kodlayan genler, MAP kinaz yollarını inhibe eden MKP-1 ve antiinflamatuvar protein sekreteruar lökoproteaz bulunur. Bu etkileşimler kortikosteroidlerin anti-inflamatuvar etkilerine katkıda bulunmaktadır (174). GR'nin GRE ile negatif etkileşimleri gen ekspresyonunu suprese edebilmekte ve bu durum kemik sentezinde önemli rol oynayan osteokalsinin inhibe edilmesi gibi birçok yan etkinin ortaya çıkmasında rol oynayabilmektedir (175).

2.3.4. İnflamatuvar Genlerin Devre Dışı Bırakılması

Kortikosteroidlerin major etkisi sitokin, kemokin, adezyon molekülleri inflamatuvar enzim ve reseptörleri kodlayan inflamatuvar genlerin inhibe edilmesidir. Bu genler havayollarında pro-inflamatuvar transkripsiyon faktörleri örneğin NF-kB, AP-1 ile

uyarılır ki her ikisi de KOAH'ta inflamasyon bölgesinde aktive edilir ve sonuçta birçok inflamatuvar gen uyarılmış olur. Aktive GR ko-reseptörlerle etkileşerek NF-kB bağlantılı ko-aktiviteyi azaltır. Bu yolla histon asetilasyonu, kromatin remodelingi ve RNA polimeraz 2'nin etkisi azalır (176). Histon asetilasyonunun azalması daha çok aktive GR tarafından HDAC2'nin inflamatuvar alana çağrılmasıyla olur. Böylece nükleusta inflamatuvar genlerin etkili supresyonu gerçekleşir. Bu sadece glukokortikoidlerin inflamasyonda neden bu denli etkili olduklarını açıklamakla kalmaz aynı zamanda inflamatuvar genlerin dışında genler etkilenmediğinden güvenli olduklarını da açıklamaktadır.

GR ligand bağlanmasıyla asetile olur, GRE'ye bağlanır ve HDAC2 asetile GR'yi hedef alarak NF-kB kompleksiyle bağlantı kurmasına olanak sağlar (163). Bazı proinflamatuvar genlerin, örneğin TNF- α instabil mesajcı (m)RNA'ları vardır ve RNA'azlarla hızlıca yıkılmaktadır. Ancak inflamatuvar mediyatörlerle stimüle edildiklerinde stabilize edilirler. Kortikosteroidler bu etkiyi geriye çevirip mRNA'nın hızlıca yıkılmasına ve inflamatuvar protein sekresyonunda azalmaya yol açar (177). Bu inflamatuvar proteinlerin mRNA'larını destabilize eden proteinlerin gen ekspresyonu ile regüle edilmektedir (178). Kortikosteroidlerin MAPK sinyal yolları üzerinde potansiyel inhibitör etkileri vardır. Bu etkilerini MKP-1 indüksiyonu üzerinden gösterir ki bu da birçok inflamatuvar genin ekspresyonunu inhibe eder (179).

Kortikosteroidlerin alerjik hastalıklarda kullanılmalarını sağlayan önemli etkileri Th2'nin sitokinleri interlökin (İL)-4, İL-5, İL-13'ü süprese etmeleriyle meydana gelmektedir. Bu durum transkripsiyon faktörü GATA3 aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (180). Bu da GATA3'ün, p38 MAPK ile fosforile edildikten sonra sitoplazmadan nükleusa translokasyonu ile gerçekleşmektedir. Kortikosteroidler GATA3'ün nükleer translokasyonunu inhibe ederler. GR hem yarışmalı inhibisyonla hemde MKP-1'in GATA3'ü fosforilasyonunu geri çevirmesiyle etki etmektedir (181).

Kortikosteroidlerin başka bir immünsüpresif etkisi de indolamin-2, 3-dioksijenaz aktivitesinin arttırılmasıdır. Bir triptofan yıkıcı enzimdir ve alerjik hastalıklarda anti-inflamatuvar sitokin olan İL-10'un salınımını arttırarak T hücrelerinin regülasyonunda

önemli rol oynamaktadır (182). İlginç olarak steroidlerin indolamin-2, 3-dioksijenaz üzerine olan bu etkisi statinlerle arttırılmıştır (183).

2.4. Solunum Yolu Epiteli

Solunum yollarının önemli kısmını oluşturan trakea ve bronşlar kendilerine has epitel dokusuna sahiptir. Hava yollarının epitel tabakası hava yolları ile alınan toksik ve bulaşıcı etmenlere karşı birincil savunmayı oluşturmaktadır (4). Bu hücreler aynı zamanda çeşitli metabolik işlevlere de sahiptirler. Trakea ve ana bronşlar belirgin bir bazal lamina üzerine oturan yalancı çok katlı silli silindirik epitel ile örtülüdür. Burada birçok hücre tipi ayırt edilebilir. Lümeden bazal laminaya uzanan bu hücrelerin önemli kısmını silli prizmatik hücreler oluşturur. Goblet hücreleri sayıca fazla olup silya bulundurmazlar, bazal lamina ve lümenle ilişkili hücrelerdir. Bazal hücreler bazal lamina üzerine oturur ve lümeneye kadar uzanmazlar. Trakeanın epitel örtüsünde ayrıca endokrin hücreler de bulunur. Bu hücreler küçük granülleri ile epitelin bazal bölümü içinde görülebilir ve toplam hücre popülasyonunun yaklaşık %8'ini oluştururlar (4).

Memeli solunum yolları özelleşmiş görevleri olan birçok hücre ile kaplıdır (4). Bu hücrelerin asıl görevleri akciğer sıvı dengesini ayarlamak, solunan hava ile alınan ajanların metabolize edilmesi ya da temizlenmesidir. Hasar ve yaralanma durumunda inflamatuvar sistemin harekete geçirilmesinden ve hava yolları düz kas hücrelerinin fonksiyonlarının düzenlenmesinden de sorumludurlar (4, 184).

2.4. 1. Epitelyumun Anatomisi

İnsan epitelinde en az sekiz çeşit hücre tipi mevcuttur. Ancak ultrayapısal, fonksiyonel ve biyokimyasal kriterlere göre 3 gruba ayrılabilir. Bazal, siliyalı ve sekretuar (184, 185). Bunların yanında immün hücreler, inflamatuvar hücreler, fagositik hücrelerde epitele göç ederek orada bulunabilirler. Duyusal ve kolinerjik sinir uçları da bulunabilmektedir.

2.4. 2. Kolumnar Siliyalı Epitel

Siliyalı hücreler havayollarında baskın olarak bulunan hücreler olup epitel hücrelerinin %50'sini oluştururlar (185). Siliyalı epitel hücreleri bazal veya sekretuar hücrelerden kaynaklanarak terminal diferansiyasyon gösterirler (186). Siliyalı epitel hücreleri hücre başına yaklaşık olarak 300 siliya ve apikal yüzlerinin hemen altında çok sayıda mitokondriye sahiptirler ki bu durum akciğerden boğaza doğru mukus taşınması görevlerini yansıtmaktadır (184).

2.4.3. Mukus Hücreleri (Goblet Hücreleri)

Mukus hücreleri membran bağlantılı elektron lüsent asidik müsin granülleriyle karakterizedirler. Müsin salgısı havayollarındaki yabancı cisimlerin yakalanması için önemli görev üstlenmektedir (187). Yeterli miktarda akışkanlıkta mukus üretimi uygun bir mukusliyer temizlik için gereklidir. Glikoprotein bileşeni olan sialik aside bağlı asidite viskoelastik profili ve silialarca transport kolaylığı sağlamaktadır. Granüllerden asit müsin salgısı sigara dumanı veya sülfür dioksit gibi maruziyetler sonucu artabilmektedir. Normal bir insanın trakeasında epitel yüzeyinde milimetre kare başına 6800 civarında mukus salgılayan hücre olduğu tahmin edilmektedir.

Kronik bronşit gibi kronik inflamatuvar havayolu hastalıklarında mukus hücre hiperplazi ve metaplazisi sık görülmekte olup bu hastalarda görülen öksürük patogenezi katkıda bulunmaktadır (188). Bu hücreler aynı zamanda kendilerini yenileyebilme ve siliyalı epitel hücrelerine dönüşebilme yeteneklerine sahiptirler (189).

2.4.4. Seröz Hücreler

Seröz hücreler morfolojik olarak mukus hücrelerini andırırlar ancak granül içerikleri elektron-lüsent olmanın dışında elektron denstir (190). Son zamanlara kadar bu hücreler sadece kemirgenlerin havayollarında tarif edilmişti. Ancak nispeten nadir görülen bu hücrelerin insan küçük havayollarında iki popülasyonuna rastlanmıştır (190).

Granüllerinin kimyasal kompozisyonu geniş anlamda karakterize edilememekle beraber ratların havayollarında nötral müsün ve anlaşılamamış non-müsün içerik mevcuttur (184).

2.4.5. Bazal Hücreler

Bazal hücreler birleşme noktalarında epitelde sık rastlanan hücrelerdir. Havayolu çapındaki artışla beraber sayıları da azalmakta eğilimindedir (191). Epitel kalınlığı ile bazal hücrelerin sayısı arasında direkt ilişki bulunmaktadır. Bunun yanında bazal hücreler aracılığıyla bazal membrana tutunan kolumnar hücrelerde bu durum geçerlidir. Bazal hücreler düşük molekül ağırlıklı sitokeratin yığınları içeren seyrek eletron dens sitoplazmalar içermektedir (192). Epitelde bazal hücreler bazal membrana sıkıca bağlanmış olan tek hücrelerdir ve hemidesmozomal kompleksler aracılığıyla bazal membrana daha fazla yüzeyel hücrenin bağlanmasını sağlamaktadırlar (191, 193). Epitel hücrelerinin bağlanmaları desmozomlar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Ve sadece bazal hücreler hemidesmozomları eksprese etmektedirler. Deride olduğu gibi bazal hücre primer kök hücre olarak kabul edilmektedir aynı zamanda mukus ve siliyalı epitel hücrelerine dönüşebilmektedir. Boers ve arkadaşları bazal ve parabazal hücrelerin dağılım ve proliferasyona katkılarını sistematik olarak normal insan akciğer otopsi örneklerinde incelemişlerdir (194). Bazal hücreler proliferasyon olarak büyük havayollarında alanının %51'ini küçük havayollarında da %81'ini kaplamışlardır. Bulgular bu hücrelerin progenitör hücre oldukları düşüncesini desteklemektedir (194). Daha küçük havayollarında Klara hücreleri primer kök hücre rolünü üstlenmektedir. Progenitör ve yapısal işlevlerinin yanında bazal hücreler nötral endopeptidaz, 15-lipoksijenaz ürünleri ve sitokinler gibi biyoaktif moleküller üretmektedirler (184).

2.4.6. Klara Hücreleri

İnsanlarda Klara hücreleri büyük (bronşiyal) ve küçük (bronşiyoler) hava yollarında bulunmaktadır. Bu hücreler elektron dens granüller içerir ve bronşiyoler sürfaktan

ürettikleri tahmin edilmektedir. Apikal sitoplazmada ve bazalde granüler endoplazmik retikulumla karakterizedirler. Salgı görevlerinin yanında klara hücreleri p450 mono-oksijenaz enziminin etkisiyle ksenobiyotik bileşenlerini de metabolize edebilmektedirler. Bunlarla beraber sekretuvar lökoproteaz inhibitörü gibi spesifik antiproteazları da üretebilirler (195). Ayrıca bu hücreler siliyalı ve mukus sekrete eden hücreler için kök hücre görevi de görmektedirler (184, 196).

2.4.7. Epitelin Görevleri

Daha önceleri, epitel, akciğer ile dış ortam arasında bariyer görevi gören durağan bir yapı olarak biliniyordu. Ancak günümüzde epitelin havayollarının birçok fonksiyonunda kontrol edici rol üstlendiği gösterilmiştir (197). Bazal durumlarda ve stimülasyon halinde mediyatör salınımına iştirak ediyor olması havayollarında merkezi bir rol aldığına göstergesidir. Mukosiliyer tabaka ve intersellüler adhezyon kompleksleri fiziki bir bariyer olarak işlev görmektedir (198). Bitişik hücrelerin apekslerinde bulunan zonula occludensler elektrolit ve diğer moleküllerin parasellüler difüzyonunu kısıtlar. Desmozomlar ve “gap-junctionlar” epitelin yapısal bütünlüğünü sağlarlar.

Epitel lipid mediyatörler, büyüme faktörleri, bronkokontrüksiyona yol açan peptidler, kemokinler ve sitokin üretebilmektedir. Havayolu epiteli havayolu düz kaslarının regülasyonunda görev alan araşidonik asit metabolitlerinin major kaynaklarından biridir. Sikloksijenaz, lipoksijenaz ve monoksijenazlar insan havayolu epitelinde eicosanoid sentezinden sorumludur (199). Sikloksijenaz enzimlerinin uyarısıyla PGE₂, PGI₂ gibi prostoglandinler ve az miktarlarda PGF₂ α ve TxA₂ havayolu epitelinde üretilmektedir. Havayolu düz kaslarında yaptığı inhibisyona bağlı olarak PGE₂ bronkoprotektif mediyatör olarak bilinmektedir (200). Havayolu epiteli ayrıca 15-HETE için büyük bir kaynak olup kayda değer oranlarda 15-HETE ve 12-HETE de üretebilmektedir. (201). 15-HETE'nin havayollarındaki fonksiyonu tam olarak bilinmiyor ancak astımlı ve kronik bronşitli hastalarda miktarında artış saptanmıştır (202). NAPH sitokrom p450 redüktaz yoluyla yönlendirilen araşidonik asit metabolizmasının monooksijenaz yolağı da havayolu epitelinde mevcuttur. Bu

metabolitlerin tam olarak fonksiyonları bilinmemekle beraber düz kaslarda gevşemeye yol açmaktadır (201).

Epitel kaynaklı nitrik oksit (NO) havayollarında hücre sinyalizasyonu düzeyinde önemli roller üstlenmektedir ve birçok havayolu hastalığının patogenezinde suçlanmaktadır (203). Birçok hücre l-arjininden nitrik oksit sentaz (NOS) ile NO üretebilmektedir (204). NOS izoformları endotel ve sinir hücrelerinin regülasyonunda rol oynamaktadır (203). İndükte edilebilir NOS izoformunun havayollarında ekspresyonu proinflamatuvar sitokinler, oksidanlardan sonra upregüle olmakta ve havayolu hastalıklarının patogenezinde rol oynamaktadır (205).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, 01. 03. 2011- 01. 06. 2012 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı bünyesindeki Hücre Kültürü Araştırma Laboratuvarında yürütülmüş olup, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)'inden alınan 1133 no'lu proje ile desteklenmiştir.

3.1. Çalışmaya Alınan Hastalar

Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesinde Göğüs Cerrahisi Kliniğince çeşitli nedenlerle lobektomi veya pnömonektomi yapılan hastaların ameliyat materyallerinden tanı için kullanılmayan dokular kullanıldı. Yerel etik kurul izni (T.C Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Komisyonu, Karar No: 02/2011-05 Tarih:24.02.2011) ve çalışmaya katılan her hastadan yazılı onam alındı. Hastalara ayrıntılı sorgulama ve fizik muayene yapıldı. İlaç kullanımı kemoterapi ve radyoterapi alma durumları sorgulandı. Çalışma grubu olarak Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığına Karşı Küresel Girişim ("Global Initiative For Chronic Obstructive Lung Disease", GOLD)'klavuzuna göre KOAH (8) olarak kabul edilen 4 hasta ile kontrol grubu olarak sigara içen (sigaralı) 5 ve sigara içmemiş olan (sigarasız) 2 hasta çalışmaya dahil edildi. Son bir ayda akciğer enfeksiyonu geçiren, yine son bir ayda herhangi bir nedenle steroid veya sitostatik ilaç kullanan veya bu süre zarfında radyoterapi uygulanan ve son bir ayda başka bir çalışmada yer alan hastalar çalışmaya alınmadı. Hastaların klinik ve demografik bilgileri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmaya alınan hastaların demografik özellikleri

Hastalar	Sayı	Yaş Ortalaması (Minimum-Maksimum)	Kadın/Erkek
Sigarsız	2	36 (51-12)	0/2
Sigaralı	5	60,6 (50-70)	1/4
KOAH	4	57 (52-60)	0/4

3.2. Bronş Epitel Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerleri

3.2.1. Taşıma Vasatı

50 ml Medium 199 (Sigma, İnterlab, Türkiye) üzerine 40 µl Gentamisin (80 mg/ml) eklenerek hazırlandı.

3.2.2. FCS (Fötal Buzağı Serumu)'li Vasat (CM)

187 ml Medium 199 (Sigma), 5 ml fötal buzağı serumu (Fetal Calf Serum, FCS Sigma), 2 ml bovine pankreatik insulin (25 mg/100 ml) (Sigma), 2 ml Hidrokortizon (3, 6 mg/100 ml) (Sigma), 2 ml insan transferrin (25 mg/100 ml) (Sigma) 60 µl epidermal büyüme faktörü (0, 1 mg/2 ml) (Beckton Dickinson, Türkiye), 2 ml antibiyotik-antimikotik (Sigma). Tüm bileşenler eklendikten sonra 50 ml'lik enjektör ile 0,25 µm por çaplı filtreden (Millipore, İrlanda) geçirildi.

3.2.3. Nu Serum 4 Vasatı (NuS4)

NuS4 vasatı ile CM⁴ un hazırlanması işlemi FCS yerine kültür vasatına 5 ml Nu Serum 4 (Becton Dickinson) konması dışında aynıdır.

3.3. Bronş Epitel Hücre Kültürü

BEH kültürleri primer insan BEH eksplant kültür tekniğiyle elde edilmişlerdir (6). Ameliyathaneden alınarak hastanemizin Patoloji Laboratuvarına götürülen akciğer eksplantı bir patolog tarafından gözden geçirildi, hastanın tanısal işlemleri için gerekli doku alındıktan sonra, arta kalan bronş eksplantının tümörsüz kısmından bir miktar alınarak transfer vasatına konarak Hücre Kültürü Laboratuvarına getirildi. Laboratuvara getirilen bronş dokusu diseksiyon mikroskobu altında gözlenerek epitel disseke edildi ve 1-2 mm³'lük parçalara bölündü. Yedi-sekiz parça %2,5 FCS, bovine pancreatic insulin, hydrocortison, human transferrine, epidermal growth factor ve antibiyotik/antimikotik içeren medium 199 vasatı içinde %5 CO₂'li ortamda 37C°'de inkübe edildi.

Prolifere olmaya başlayan hücre kültürleri 3-4 gün sonra %2,5 Nu serum (Becton Dickinson) ve yukarıda belirtilen kimyasalları içeren medium 199 vasatında aynı koşullarda inkübe edildiler. BEH'leri, kültür kabında yeterli yüzeyi kaplayıncaya kadar 2-3 hafta süre ile izlenip 2-3 günlük aralar ile vasatları değiştirildi.

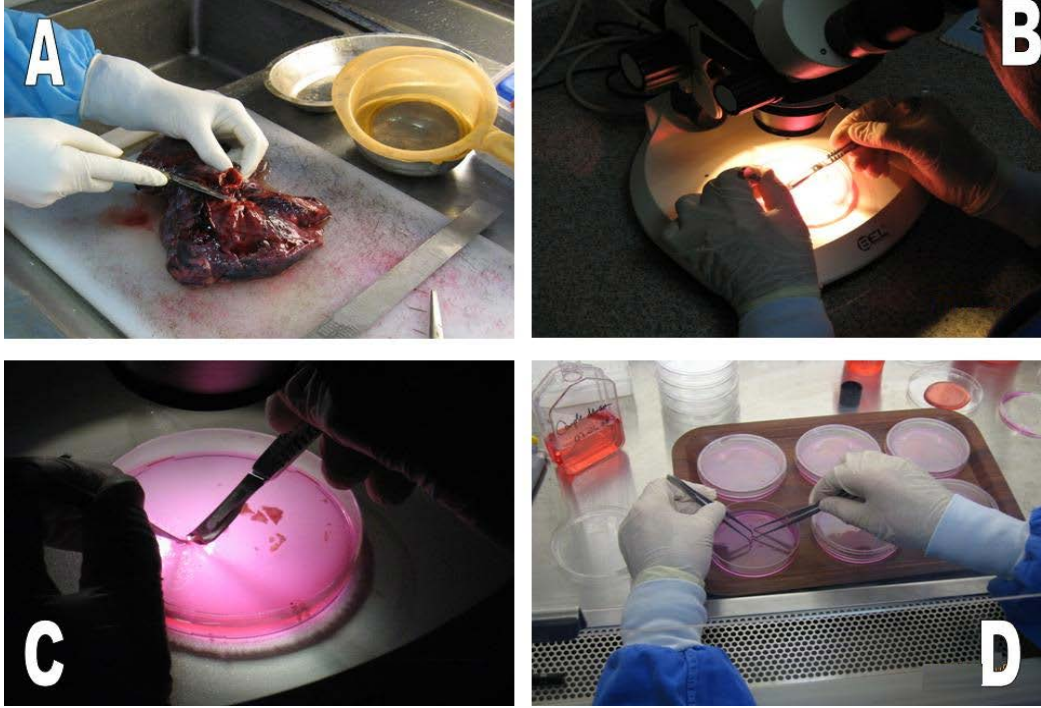
3.4. Primer Bronş Epitel Hücrelerinin Dekzametazon ile İnkübasyonu

BEH'leri kültür kaplarının yüzeyini kapladıktan sonra hücrelerin üzerine 5 ml Hanks'ın Dengeli Tuz Çözeltisi ("Hank's Balanced Salt Solution", HBSS, Gibco, Türkiye) eklenerek hücreler yıkandı. Üzerine 1X'lik Tripsin-EDTA (Gibco, Türkiye) eklenip, 37 C°'de 10 dakika kadar beklendi. Hücrelerin kalkıp kalkmadığı mikroskopla kontrol edildi. Hücreler kalktıktan sonra tripsini etkisizleştirmek için 5-10 ml %10 FCS içeren kültür vasatı eklendi.

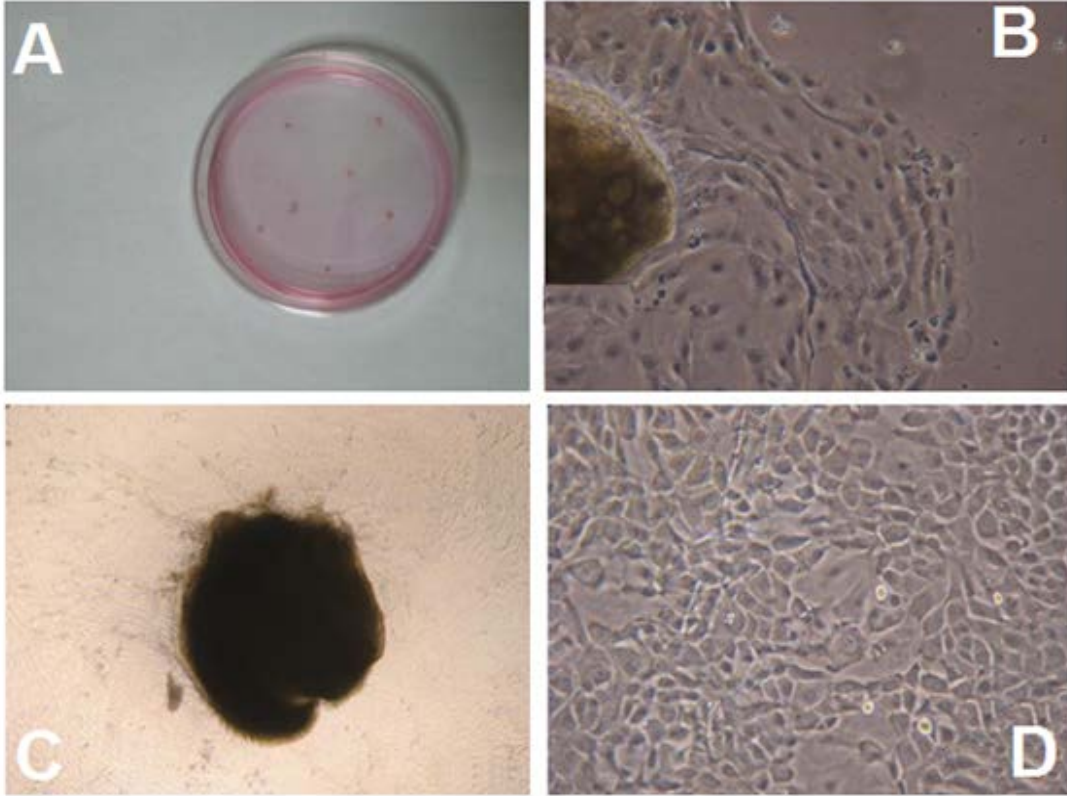
Kültür kabındaki hücreler 50 ml'lik steril tüpe (Falcon; BD, ABD) aktarıldı ve 1500 rpm'de 4 dk döndürüldü. Santrifüj işleminin ardından tüp içerisindeki üst faz atıldı ve tüpün alt kısmında toplanmış olan hücreler tüpün kenarlarına yavaşça vurularak homojenize hale getirilip üzerine 5 ml hücre kültür vasatı eklenerek toplam hücre sayısı belirlendi. Sayılan hücreler 20.000 hücre/ml olacak şekilde hücre vasatına eklenerek 24 kuyucuk içeren kültür kaplarına (Falcon; BD Biosciences, ABD) ekildi.

Yaklaşık 72 saat inkübe edilen hücreler kültür kabının %80'ini kapladıktan sonra kültür kaplarındaki hücre vasatı alınarak, yerine SF konu ve hücreler 24 saat inkübe edildiler. Hücre kültürleri SF veya farklı konsantrasyonlarda DEKS (0,1, 1, 10, 100nM) ile 24 saat süre ile inkübe edildi. Hücre kültürlerinin bir kısmı DEKS verildikten yaklaşık 1 saat sonra İL-1 β ile stimüle edildiler. 24 saatin sonunda hücre kültür kaplarının üzerindeki kültür vasatı toplanarak -20 °C de analiz edilinceye kadar saklandı. Bronş epitelyum dokusunun elde edilmesi ve diseksiyon işlemi Resim 1'de, BEH kültürünün aşamaları Resim 2'de görülmektedir.

Bu çalışmada sigarasız olan 2 hasta, sigaralı 5 hasta ve KOAH'lı 4 hastanın bronş epitel dokusundan elde edilen BEH kullanıldı. İnterlökin İL-6, İL-8 ve GM-CSF düzeyleri DuoSet ELISA (R&D System, Abingdon, UK) kitleri kullanılarak ölçüldü. ELISA kitlerinin sensitivitesi İL-8 için 3,5 pg/ml GM-CSF için ise 3 pg/ml, İL-6 kitinin saptayabildiği en düşük standart değeri ise 9.38 pg/ml idi. Çalışmalar üretici firmanın tavsiyelerine göre yapılmıştır.



Resim 1. Bronş epitelinin elde edilmesi; (A). Bronş dokusundan epitel tabakasının diseksiyon mikroskobu eşliğinde ayrılması; (B). Ayrılan epitel dokusunun küçük parçalara ayrılması; (C). Epitel dokusunun hücre kültür ortamına ekimi; (D) (206, 207).



Resim 2 . Bronş epiteli hücre kültürünün aşamaları: Küçük parçalara ayrılan bronş epitel dokusunun hücre kültür kaplarına ekilmesi (A); Ekimden sonraki ilk haftada doku parçasından çevreye doğru üremeye başlayan bronş epitel hücrelerinin faz-kontrast mikroskopundaki görüntüsü (X100) B; (C) (X40) ve (D) (X100) 30. günde hücrelerin kültür ortamındaki görünüşü (206, 207).

3.5. ELISA protokolü

Yakalayıcı antikorun (“capture antibody”) konsantrasyonu 4µg/ml olacak şekilde PBS ile sulandırılarak 96 kuyucuklu ELISA tabağına 100µl eklendi ve oda ısısında 1 gün inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün ELISA tabağı boşaltılarak 400µl yıkama tamponu ile kuyular toplam 3 kez yıkandı. 300µl engelleyici tampon eklenerek 1 saat beklendi. Ardından 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Daha sonra standartlar ve örnekler 100µl olacak şekilde eklendi ve 2 saat oda ısısında beklendi. Standartlar her sitokine ait protokolde belirtildiği üzere reaktif sulandırıcı ile sulandırıldı. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. Yakalayıcı antikorun (“detection antibody”) konsantrasyonu 20ng/ml olacak şekilde reaktif sulandırıcı ile sulandırılarak 100 µl kuyucuklara eklendi. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. Ardından 100µl streptavidin eklenerek 20 dk beklendi. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. 100 µl substrat solüsyonu eklenerek 20 dk beklendi. Yıkama işlemi yapılmadan kuyuların üzerine 50µl H₂SO₄ eklendi ve hızlı bir şekilde spektrofotometre (Biotek, ABD) ile 450-570 nm’de değerlendirildi.

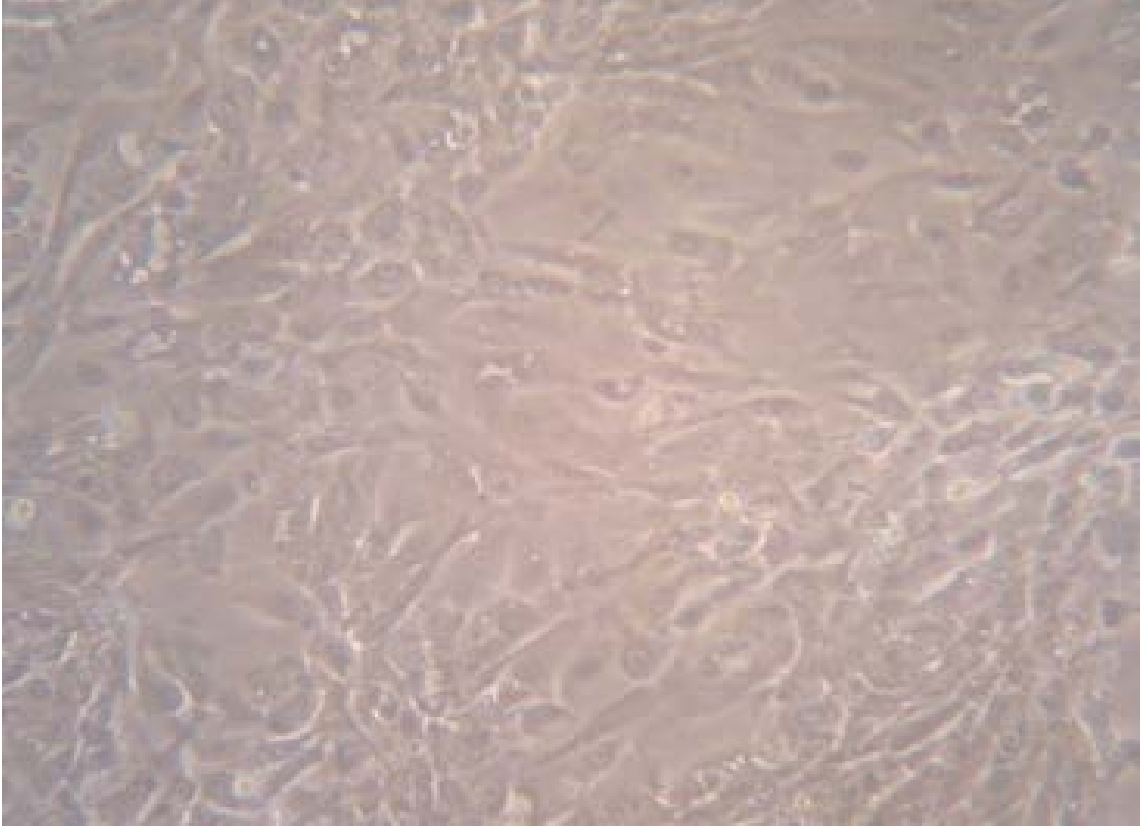
3.6. İstatistiksel Analiz

Öncelikle, elde edilen verilerin normal dağılımlı olup olmadıklarına bakıldı. Daha sonra tek yönlü varyans analizi (‘One-way analysis of variance’, ANOVA) yapıldı. Anlamlılık görüldüğünde, gruplar arası karşılaştırmalar Dunnett’in çoklu karşılaştırmalar testi, Bonferroni’nin çoklu karşılaştırmalar testi, eşleştirilmemiş *t*- test’i veya Mann-Whitney U testi kullanıldı. Her test grubu uygun kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak, 0.05’ten küçük *p* değerleri anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama ± standart hatanın ortalaması veya ortanca ± %25-75 persentil değerleri (‘interquartile range’, IQ) ile ifade edildi. İstatistikî analizler için ‘prism 5’ bilgisayar programı kullanıldı (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

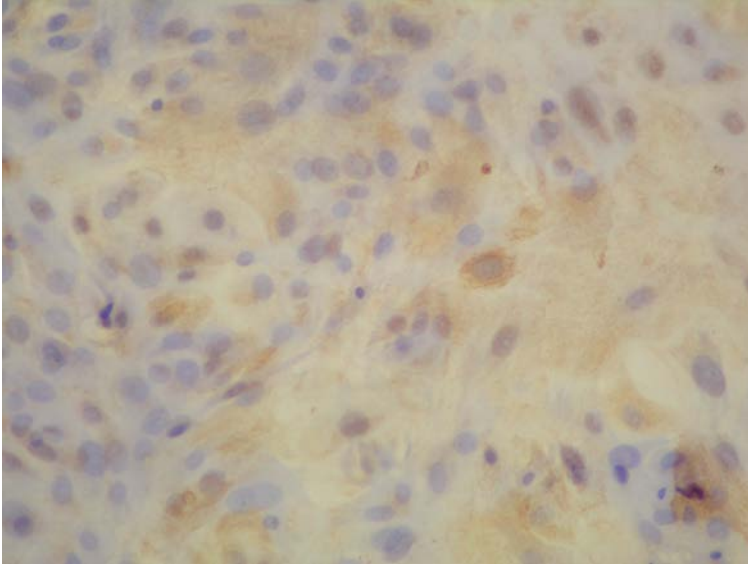
4. BULGULAR

4.1. Hava Yolu Epitel Hücre Kültürü

Bu tez çalışması kapsamında hava yolu primer BEH kültürleri başarılı bir şekilde elde edilerek deneylerde kullanıldılar (Resim 3). Hücrelerin epitel kimliği pansitokeratin boyası kullanılarak teyid edildi (Resim 4). Genel olarak 3. ve 4. haftanın sonunda yeterli miktarda hücre proliferasyonunun olduğu gözlemlendi ve kültürler kaldırılarak 24 kuyucuklu kültür plaklarına transfer edildiler. Kültür plaklarına transfer edilen hücreler 2. günün sonunda büyük oranda kuyucukların zeminine yapıştılar. Bu kültürler 1. haftanın sonunda deneylerde kullanılmaya hazır hale geldiler.



Resim 3. Bronş epitel hücre kültürleri 4. haftanın sonunda kullanıma hazır hale geldiler (“Hoffman modulation” faz-kontrast mikroskobu, X200)



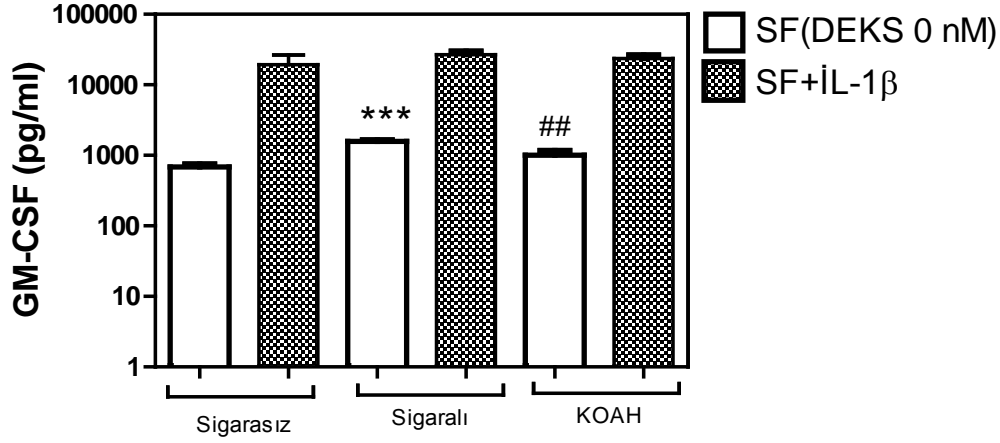
Resim 4. Pansitokeratin ile boyanan bronş epitel hücreleri (X400).

4.2. Bazal Sitokin Değerleri

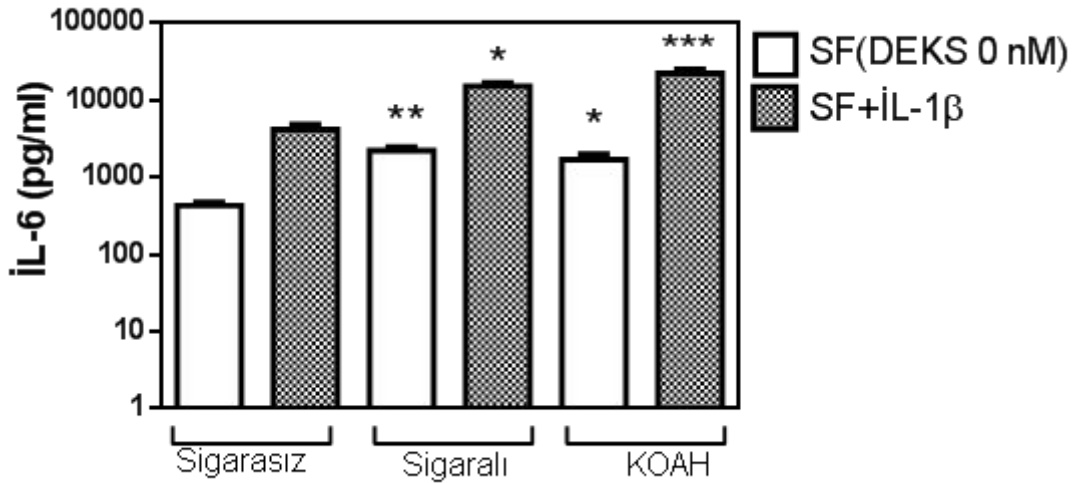
Hasta gruplarından elde edilen kültürlerdeki bazal GM-CSF düzeyleri karşılaştırıldığında, sigaralı gruptaki düzeyin hem sigarasız hem de KOAH'lı gruba göre daha yüksek olduğu saptandı. İL-1 β ile uyarılan hücrelerde ise GM-CSF salınımı açısından bir fark bulunamadı (Şekil 3).

İL-6'ya bakıldığında ise bazal koşullarda ve İL-1 β ile indüklenen ortamda sigaralı ve KOAH'lı BEH'den saptanan düzeyin sigarasız gruba oranla daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 4).

İL-8 salınımı sadece İL-1 β uygulanan KOAH'lı hücrelerde sigarasız ve sigaralı bireylerin hücrelerine göre anlamlı olarak artmış bulundu (Şekil 5).

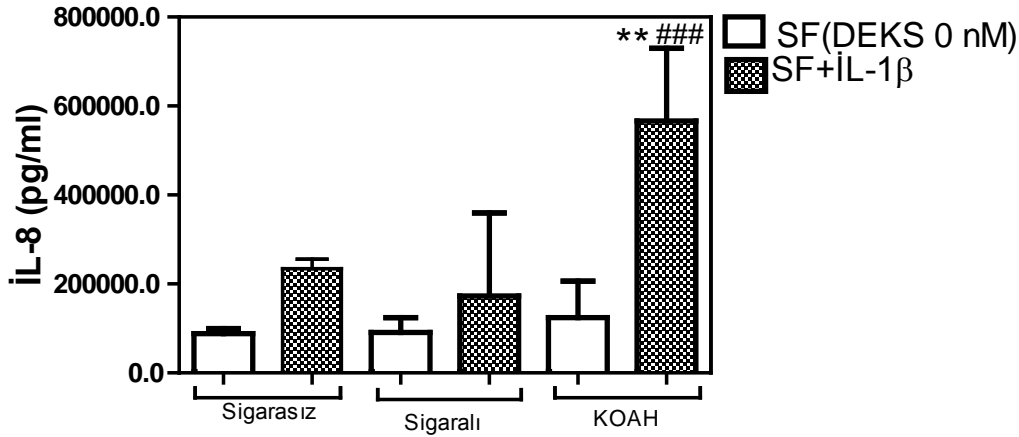


Şekil 3. Hasta kültürlerinde bazal GM-CSF seviyelerin karşılaştırılması. *** $p < 0,0001$ Sigarasız grup ile karşılaştırıldığında; ## $p < 0,001$ Sigaralı grup karşılaştırıldığında Not: SF'li gruplar sigarasız ve sigaralı BEH'lerin eş kültürleri ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4. Hasta kültürlerinde bazal İL-6 seviyelerin karşılaştırılması. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ ve *** $p < 0,0001$, Sigarasız grup ile karşılaştırıldığında.

Not: SF'li gruplar ve İL-1β'li gruplar sigarasız BEH'lerin eş kültürleri ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 5. Hasta kültürlerinde bazal İL-8 seviyelerin karşılaştırılması.

** $p < 0,001$ Sigarasız grup ile karşılaştırıldığında; ### $p < 0,0001$ Sigaralı grup ile karşılaştırıldığında. Not: SF'li gruplar ve İL-1 β 'li gruplar sigarasız ve sigaralı BEH'lerin eş kültürleri ile karşılaştırılmıştır.

4.3. Dekzametazonun Bronş Epitel Hücrelerinde GM-CSF Salınımına Etkisi

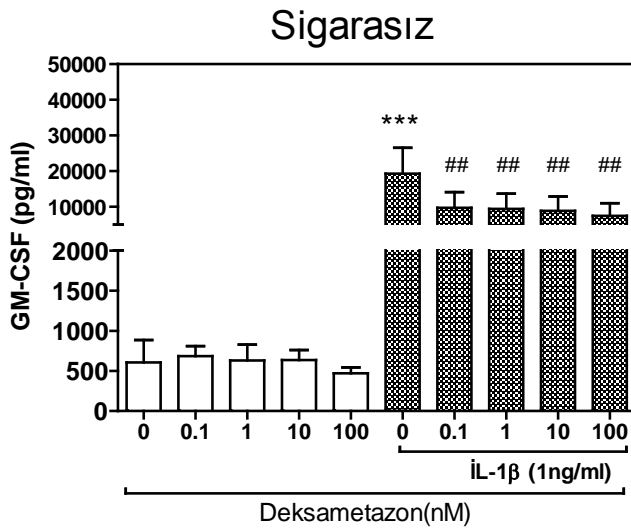
Sigarasız hastalar analiz edildiğinde sadece DEKS verilen grupta anlamlı baskılanma olmazken İL-1 β eklenen grupta DEKS kullanılan bütün dozlarda (0,1 nM-100nM) anlamlı baskılanma olduğu görüldü (Şekil 6).

Sigaralı hasta grubuna bakıldığında, bazal koşullarda ve İL-1 β ile uyarı sonucunda DEKS kullanılan bütün konsantrasyonlarda GM-CSF salınımı anlamlı olarak baskılandı (Şekil 7).

KOAH'lı hastaların GM-CSF verilerine bakıldığında ise, sadece İL-1 β uygulanan grupta 0,1 nM hariç, hem bazal koşullarda hem de İL-1 β uygulandığı durumlarda bu hücrelerde de GM-CSF salınımı anlamlı olarak baskılandı (Şekil 8).

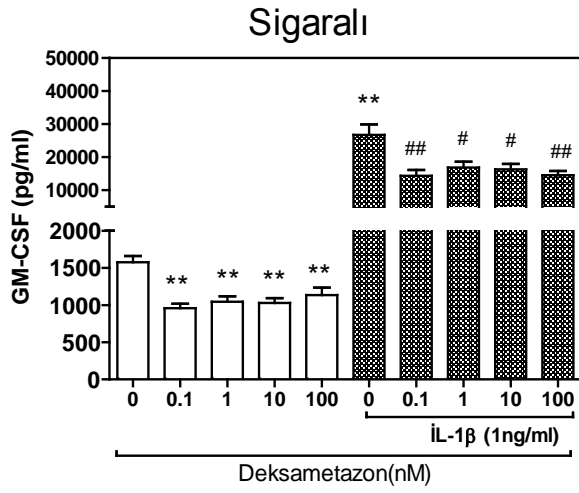
BEH kültürlerinde saptanan GM-CSF düzeyleri Tablo 2'de görülmektedir. Sigaralı hastalarda bazal koşullarda sadece DEKS verilen grupta tüm konsantrasyonlarda, İL-1 β eklenen grupta ise 10 ve 100nM DEKS verilen hücrelerdeki GM-CSF düzeyleri, sigarasız gruba göre anlamlı olarak yüksekti. Buna karşın KOAH'lı grup ile sigarasız

grup arasında DEKS ile inkübasyon sonrasında ölçülen GM-CSF değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Ancak, KOAH'lı hastalar sigaralılarla birebir kıyaslandığında İL-1 β verilmeyen grupta DEKS sonrası saptanan GM-CSF düzeylerinin sigaralı grupta saptanan düzeye göre daha düşük olduğu gözlemlendi. İL-1 β ile stimüle edilen hücrelerde DEKS sonrası gözlenen GM-CSF düzeyi iki grupta farklı değildi (Tablo 2).

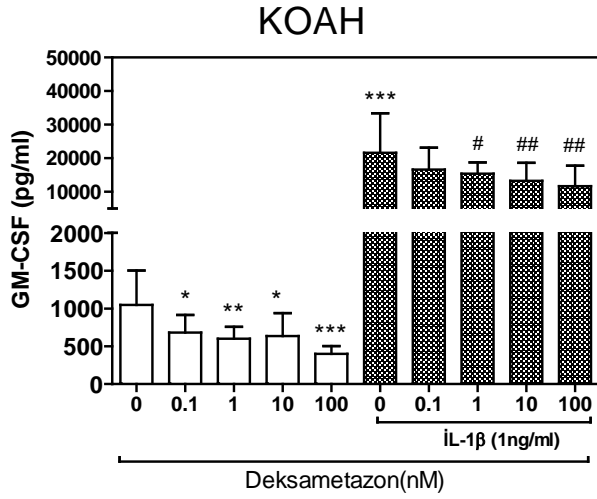


Şekil 6. Dekzametazonun (DEKS), 0,1, 1, 10 ve 100nM konsantrasyonlarının interlökin (İL)-1 β ile stimüle edilen ve edilmeyen sigarasız bronş epitel hücrelerinden granüosit makrofaj-koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) salınımına etkileri.

***p <0,0001, 0 nM DEKS ile karşılaştırıldığında; ##p<0,0001, 0 nM DEKS + İL-1 β ile karşılaştırıldığında.



Şekil 7. Dekzametazonun (DEKS), 0,1, 1, 10 ve 100nM konsantrasyonlarının interlökin (İL)-1 β ile stimüle edilen ve edilmeyen sigaralı bronş epitel hücrelerinden granüosit makrofaj-koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) salınımına etkileri. ***p <0,0001, 0 nM DEKS ile karşılaştırıldığında; #p<0,001 ve ##p<0,0001, 0 nM DEKS + İL-1 β ile karşılaştırıldığında.



Şekil 8. Dekzametazonun (DEKS), 0,1, 1, 10 ve 100nM konsantrasyonlarının interlökin (İL)-1β ile stimüle edilen ve edilmeyen KOAH'lı bronş epitel hücrelerinden granülosit makrofaj-koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) salımına etkileri. *p<0,01, **p<0,001, ***p<0,0001, 0 nM DEKS ile karşılaştırıldığında; #p<0,001, ##p<0,0001, 0 nM DEKS + İL-1β ile karşılaştırıldığında.

Tablo 2. GM-CSF medyan (%25-75 persentil) değerleri

DEKS (nM)	SİGARASIZ	SİGARALI	KOAH
0	607.0 (526,5-883,5)	1429*** (1286-1865)	1047 ## (267,3-1502)
0.1	685.4 (559,5-809,0)	910.6* (770,4-1165)	680,8 # (220,1-914,4)
1	630.3 (558,2-826,8)	963.8* (778,1-1324)	599,6 ### (170,0-756,6)
10	635.9 (504,2-760,8)	1071* (813,3-1217)	634,5 ## (219,3-939,3)
100	469.2 (778,9-1410)	1020*** (778,9-1410)	399,6 ### (202,7-502,1)
0+β	19326 (10133-26528)	21359 (15849-38218)	21619 (15610-33367)
0,1+β	9704 (6003-14092)	16468 (8131-17787)	16599 (5859-23150)
1+β	9402 (5785-13673)	14585 (11378-25505)	15409 (10435-18742)
10+β	8860 (5527-12891)	13401* (9709-24094)	13278 (2856-18625)
100+β	7486 (4180-10981)	14219*** (12270-19490)	11669 (6161-17794)

***p <0,0003, **p <0,003, *p <0,05 sigarasız grup ile karşılaştırıldığında; ###p <0,0003, ##p<0,003, #p <0,05 Sigaralı grup ile karşılaştırıldığında.

β: İnterlökin 1β, İL: İnterlökin, GM-CSF: Granülosit makrofaj-koloni stimüle edici faktör.

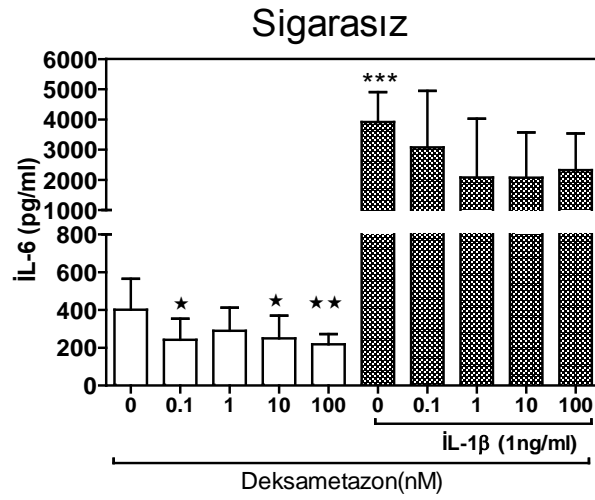
4.4. Dekzametazonun Bronş Epitel Hücrelerinde İL-6 Salınımına Etkisi

Sigarasız hastaların İL-6 verilerine bakıldığında, bazal kültür ortamında DEKS 0,1, 10 ve 100 nM konsantrasyonlarında bu sitokinin salınımını baskımlarken, ortama İL-1 β eklendiğinde DEKS'in anlamlı bir etki göstermediği saptandı (Şekil 9).

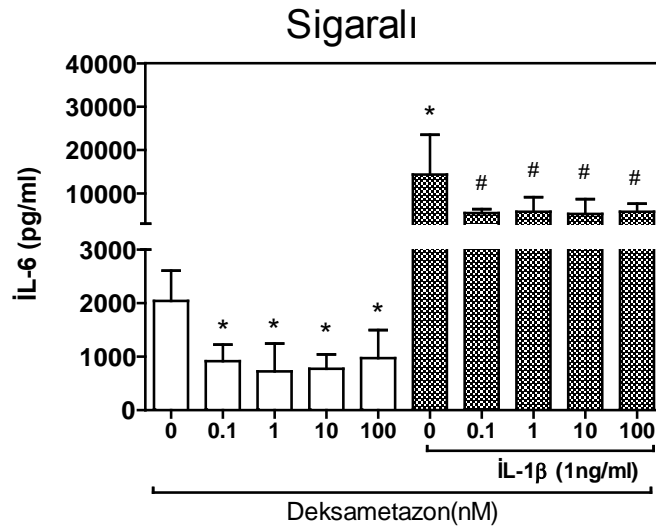
Sigaralı hastalarda ise hem bazal koşullarda, hemde İL-1 β ile stimüle edilen grupta İL-6 salınımında baskılanma olduğu görüldü (Şekil 10).

KOAH'lı hasta gurubunda ise sadece uyarılmayan hücrelerde 10 nM DEKS bu sitokinin salınımını anlamlı bir şekilde baskımlarken, İL-1 β ile uyarılan grupta anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 11).

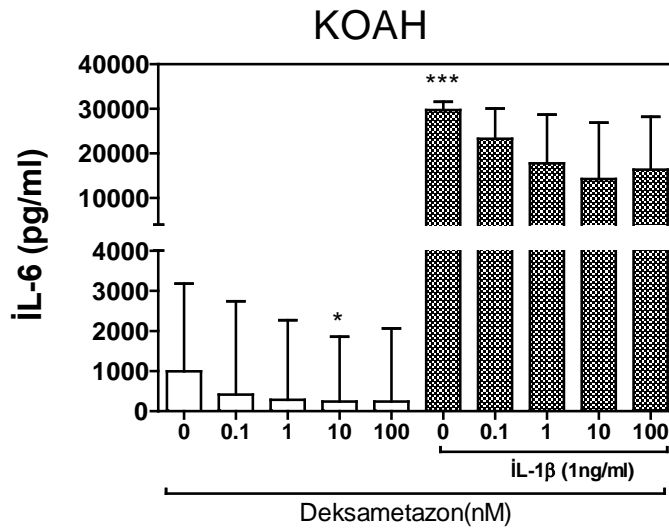
Üç grubun BEH'den salınan İL-6 düzeyi Tablo 3'de görülmektedir. Sigaralı BEH'de tüm DEKS konsantrasyonlarında, KOAH'lı grupta ise İL-1 β ile uyarılan hücrelerde DEKS ile inkübasyon sonunda salınan İL-6 düzeylerinin sigarasız gruba göre daha yüksek olduğu gözlendi. KOAH'lı hücreler ile sigaralı BEH'leri karşılaştırıldığında, 10 ve 100nM DEKS ile bazal koşullarda inkübe edilen KOAH'lı BEH'den salınan İL-6 düzeyi daha düşükken, ortamda İL-1 β bulunduğunda DEKS ile inkübasyon sonrasında KOAH'lı hücrelerde saptanan İL-6 düzeyi sigaralı gruba göre anlamlı olarak yüksekti (Tablo 3).



Şekil 9. Dekzametazonun (DEKS), 0,1, 1, 10 ve 100nM konsantrasyonlarının interlökin (İL)-1β ile stimüle edilen ve edilmeyen sigarasız bronş epitel hücrelerinden İL-6 salınımına etkileri. *p<0,05 , **p<0,005 ve ***p<0,0001 0 nM DEKS ile karşılaştırıldığında.



Şekil 10. Dekzametazonun (DEKS), 0,1, 1, 10 ve 100nM konsantrasyonlarının interlökin (İL)-1β ile stimüle edilen ve edilmeyen sigaralı bronş epitel hücrelerinden İL-6 salınımına etkileri. * $p < 0,0001$ 0 nM DEKS ile karşılaştırıldığında; # $p < 0,0001$ 0, nM DEKS + İL-1β ile karşılaştırıldığında.



Şekil 11. Dekzametazonun (DEKS), 0,1, 1, 10 ve 100nM konsantrasyonlarının interlökin (İL)-1β ile stimüle edilen ve edilmeyen KOAH'lı bronş epitel hücrelerinden İL-6 salınımına etkileri. * $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ 0 nM DEKS ile karşılaştırıldığında

Tablo 3. İL-6 medyan (%25-75 persentil) değerleri

nM DEKS	SİGARASIZ	SİGARALI	KOAH
0	401.9 (314,5-565,8)	2041** (1322-2608)	992,2* (689,0-3180)
0.1	242 (207,8-354,2)	918,3** (589,7-1225)	414,1 (276,7-2742)
1	289.7 (228,0-412,8)	727,1** (540,5-1246)	284,5 (214,9-2266)
10	249.7 (185,4-370,5)	772,8*** (700,7-1045)	243,4 # (214,4-1856)
100	218.6 (132,6-272,1)	974,9*** (590,3-1500)	241,2 # (183,2-2062)
0+β	3920 (2838-4908)	14347* (8964-23534)	29732 *** (6730-31595)
0,1+β	3078 (1644-4948)	5501* (4661-6402)	23291** # (5394-30090)
1+β	2080 (1162-4025)	5784** (4357-9149)	17778** # (4306-28731)
10+β	2073 (1092-3571)	5295* (3628-8694)	14248** # (4404-26921)
100+β	2322 (1066-3535)	5791** (4191-7650)	16354*** ### (11687-28214)

***p <0,0003, **p <0,003, *p <0,05 sigarasız grup ile karşılaştırıldığında; ###p <0,0003, ##p <0,003, #p <0,05 Sigaralı grup ile karşılaştırıldığında
β: İnterlökün 1β , İL: İnterlökün

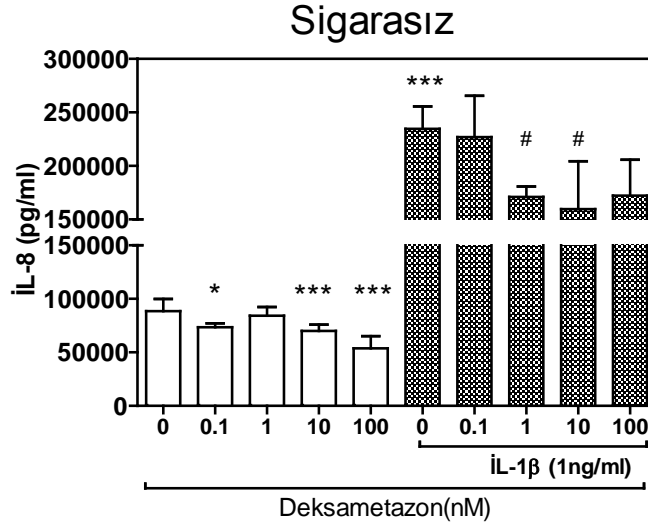
4.5. Dekzametazonun Bronş Epitel Hücrelerinde İL-8 Salınımına Etkisi

Sigarasız hastaların BEH'den İL-8 salınımına bakıldığında İL-1 β olmayan bazal kültür ortamında, DEKS 0,1, 10 nM ve 100 nM'de İL-8 salınımını baskıladı. Ortama İL-1 β eklendiğinde ise sadece 1 nM ve 10 nM DEKS anlamlı bir inhibisyona yol açtı (Şekil 12).

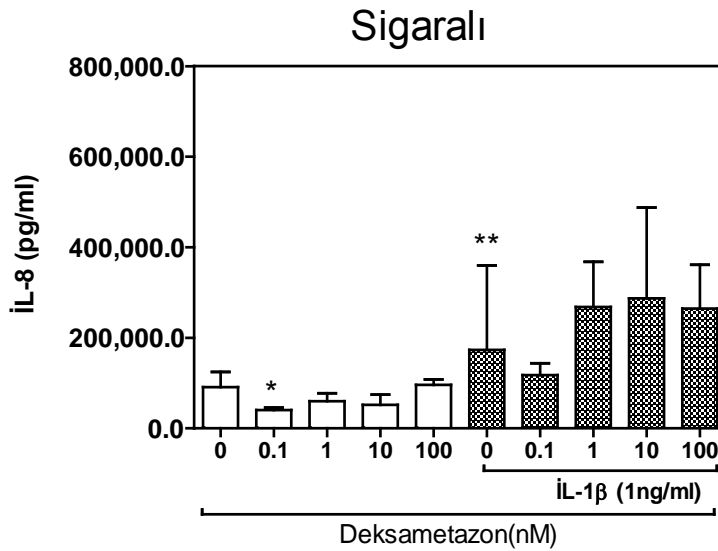
Sigaralı hastalarda ise bazal kültür ortamında sadece 0,1 nM DEKS İL-8 salınımını anlamlı olarak baskılayan, İL-1 β ile stimüle edilen hasta grubunda hiçbir DEKS konsantrasyonunda baskılanma saptanmadı (Şekil 13).

KOAH'lı BEH'de bazal kültür ortamında DEKS herhangi bir etki göstermezken, hücreler İL-1 β ile uyarıldığında, 0,1 nM DEKS'te baskılanma gözlenmezken, diğer kullanılan bütün konsantrasyonlarda DEKS (1,10, 100 nM) bu sitokinin düzeylerinde doza bağlı olarak anlamlı bir inhibisyona yol açtı (Şekil 14).

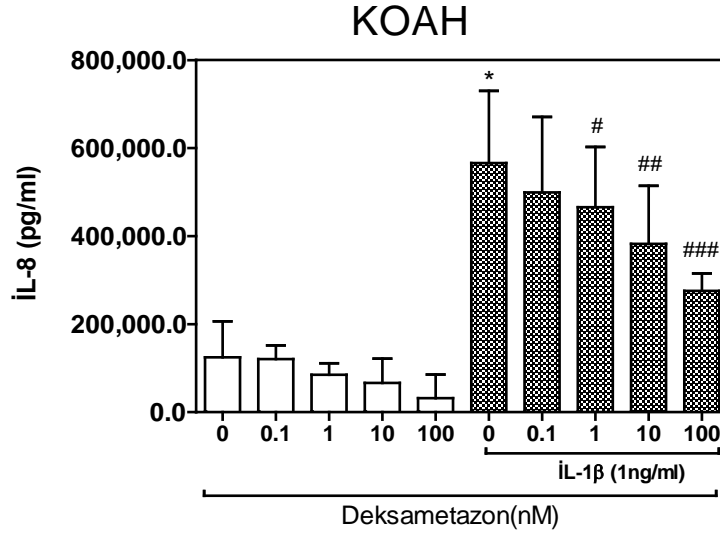
Her üç grupta saptanan İL-8 düzeyi Tablo 4'de verilmektedir. Sigarasız grupla yapılan kıyaslamada sigaralı grupta bazal koşullarda 0.1 ve 1nM DEKS ile inkübe edilen hücrelerde gözlenen İL-8 düzeyi daha düşüktü. Ortamda İL-1 β bulunduğunda sigaralılarda 0.1nM DEKS ile inkübasyondan sonra salınan İL-8 düzeyi sigarasız gruba göre düşükken, 10 ve 100nM DEKS ile inkübe edilen sigaralı hücrelerde İL-8 düzeyi daha yüksekti. KOAH'lı grubun hücreleri sigarasız BEH'leri karşılaştırıldığında, sadece İL-1 β ile uyarılan KOAH'lı hücrelerde DEKS (1, 10, 100nM) sonrası saptanan İL-8 düzeyi anlamlı olarak daha yüksekti. Sigaralı grup ile kıyaslandığında ise, KOAH'lı hücrelerde bazal koşullarda 0.1nM DEKS ile gözlenen İL-8 düzeyi daha yüksek iken, 100nM sonrasında saptanan İL-8 düzeyi sigaralı gruptan daha düşüktü. Ortamda İL-1 β bulunduğunda ise, sadece 0.1nM DEKS ile KOAH'lılarda saptanan İL-8 düzeyi sigaralı gruba göre daha yüksekti (Tablo 4).



Şekil 12. Dekzametazonun (DEKS), 0,1, 1, 10 ve 100nM konsantrasyonlarının interlökin (İL)-1β ile stimüle edilen ve edilmeyen sigarasız bronş epitel hücrelerinden İL-8 salınımına etkileri. *p <0,05, ***p<0,0001 0nM DEKS ile karşılaştırıldığında; #p <0,05 0 nM DEKS + İL-1β ile karşılaştırıldığında .



Şekil 13. Dekzametazonun (DEKS), 0,1, 1, 10 ve 100nM konsantrasyonlarının interlökin (İL)-1β ile stimüle edilen ve edilmeyen sigaralı bronş epitel hücrelerinden İL-8 salınımına etkileri. *p<0,01 ve **p<0,0001 0 nM DEKS ile karşılaştırıldığında.



Şekil 14 . Dekzametazonun (DEKS), 0,1, 1, 10 ve 100nM konsantrasyonlarının interlökin (İL)-1β ile stimüle edilen ve edilmeyen KOAH'lı bronş epitel hücrelerinden İL-8 salınımına etkileri. *p<0,005 0 nM DEKS ile karşılaştırıldığında; #p<0,01, ##p<0,001 ve ###p<0,0001 0 nM DEKS + İL-1β ile karşılaştırıldığında.

Tablo 4. İL-8 medyan (%25-75 persentil) değerleri

DEKS β=İL-1β	SİGARASIZ	SİGARALI	KOAH
0	88424 (81605-99851)	91075 (50518-124648)	124621 (28015-206303)
0,1	73503 (67908-77099)	40555** (35839-45937)	120870 # (18714-151680)
1	84181 (81988-92328)	60178* (27365-77574)	84795 (18524-111008)
10	70096 (61183-75820)	51889 (34596-74247)	66395 (48037-121563)
100	53727 (43594-65071)	96266 (30948-107855)	31805 # (18907-85516)
0+β	234649 (184391-255511)	173084 (123576-359843)	566228 **, ### (414570-729923)
0,1+β	226958 (187036-265529)	117525*** (99317-143722)	499145 # (137731-670786)
1+β	171053 (155394-180784)	267856 (120020-367749)	465894 * (131723-602682)
10+β	159563 (129008-204310)	287158* (241137-487614)	382499* (81537-514436)
100+β	172238 (142954-205778)	264485** (245542-361192)	275740 * (209443-314996)

***p <0,0003, **p <0,003, *p <0,05 sigarasız grup ile karşılaştırıldığında; ###p <0,0003, ##p <0,003, #p <0,05 Sigaralı grup ile karşılaştırıldığında
β: İnterlökin 1β , İL: İnterlökin

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, sigarasız, sigaralı KOAH'ı olmayan ve sigaralı KOAH'ı olan bireylerden değişik sebeplerle (Akciğer Ca gibi) lobektomi veya pnömonektomi yapılarak alınan akciğer dokularından elde edilmiş BEH'den inflamatuvar sitokin salınımını ve buna deksametazonun etkisi İL-1 β 'nin varlığında ve yokluğunda araştırıldı. BEH'in kültür ortamına İL-8, GM-CSF ve İL-6 salgıladıkları gözlemlendi. İL-1 β eklendiğinde bu sitokinlerin çok belirgin bir şekilde arttığı görüldü. Sitokinlerin kültür vasatındaki bazal düzeyine bakıldığında, gruplar arasında bazı farklılıklar olduğu, DEKS'in sitokin salınımını değişik derecelerde baskıladığı gözlemlendi.

Bu çalışmada, Devalia ve ark. (208), ile Bayram ve ark. (6, 209) tarafından daha önceden kullanılan eksplant kültür tekniği ile hücreler başarılı bir şekilde üretildiler. Ancak hücre proliferasyonu gözlemlendiğinde, KOAH'lı hastalardan alınan dokulardan hücre çoğalmasının diğer gruplara göre nispeten yavaş olduğu gözlemlendi. Dolayısıyla bu hücrelerin yeterli düzeyde çoğalması için bazı hastalarda daha fazla zamana ihtiyaç duyuldu. Sigarasız grupta ise hücre çoğalmasının daha hızlı olduğu ve kültür kaplarının yüzeyinde daha fazla hücrenin ürediği görüldü. Diğer yandan, düşük düzeyde üremenin olduğu kültür kaplarında vasat değişimi sırasında, kapakta su zerreciklerinin varlığı dikkat çekti. Her ne kadar bu gözlemleri test etme imkânı olmadıysa da, gelecek çalışmalarda bu konuların araştırılması yararlı olur.

Bu çalışma bildiğimiz kadarıyla literatürdeki KOAH'ın patogenezinde BEH'den inflamatuvar sitokin salınımının rolü araştırıldığı ilk çalışmadır. Sitokin salınımı hem bazal hücre kültürü koşullarında, hem de bir pro-inflamatuvar sitokin olan İL-1 β mevcudiyetinde araştırıldı. Ortama İL-1 β eklenmesiyle, literatürde çeşitli çalışmalarda olduğu gibi (210) tıpkı alevlenme veya eksternal bir inflamatuvar uyarıya benzer bir

ortam oluşturularak, hücrelerin bu uyarıya verdikleri inflamatuvar cevap da gözlenmek istendi. Hücre kültürlerindeki bazal sitokin düzeyleri karşılaştırıldığında, İL-1 β uygulanmayan hücrelerde GM-CSF düzeylerinin sigaralı grupta sigarasız ve KOAH'lı gruba göre yüksek olduğu saptandı. İL-6 salınımı gerek sigaralıların, gerekse de KOAH'lıların İL-1 β uygulanan ve uygulanmayan hücrelerinde sigarasız gruba göre daha yüksekti. Buna karşın, İL-8 salınımı sadece İL-1 β uygulanan KOAH'lı hücrelerde sigarasız ve sigaralı bireylerin hücrelerine göre anlamlı olarak artmıştı. Bu bulgular, sigaranın GM-CSF düzeyinin artışında rol oynayabileceğini, ancak KOAH geliştiğinde bu sitokin salınımının azalabileceğini göstermektedir. Ancak ortamda bir pro-inflamatuvar uyarı olduğunda (İL-1 β gibi), bütün hücrelerde GM-CSF sentezi bir birine yaklaşmaktadır. Bu belki de normal hücrenin inflamatuvar uyarıya karşı GM-CSF salgılayarak kendini koruma davranışının bir yansıması olabilir. Sonuçta bu sitokin hücrenin diferensiasyonunda ve yaşamında rol oynamaktadır (53). Diğer yandan, dışarıdan gelen sigara ve hava kirliliği gibi hücrede inflamatuvar cevaba yol açan uyarıların normal hücrede de GM-CSF salınımını artırdığı gösterilmiştir (6).

İL-6 düzeyinin sigaralı ve KOAH'lı grupta, sigara içmeyenlere göre yüksek olması, bu sitokin sigaralılarda ve KOAH'lılarda görülen hava yolu inflamasyonunda etkin rol oynadığını düşündürmektedir. Diğer taraftan, İL-8 düzeyinin özellikle İL-1 β uyarısı sonrasında KOAH'lı hücrelerde sigaralı ve sigarasız gruba göre çok belirgin artış göstermesi, bu sitokin KOAH patogeneğinde rol oynamanın yanısıra, özellikle KOAH alevlenmelerinde önemli olduğunu düşündürmektedir. Nitekim çalışmalar, İL-6 ve İL-8'in KOAH'lı hastaların balgam, ekspirasyon havası ve plazmalarında arttığını, bu artışın özellikle alevlenme sırasında daha belirgin olduğunu bildirmektedir (53, 77, 87, 90). Bundan başka indükte balgamda İL-8 düzeyinin, balgamda artmış nötrofil düzeyi ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur (53).

Benzer metodoloji kullanılarak akciğer eksplantlarından elde edilen BEH kültürleri ile yaptıkları çalışmalarında, herhangi bir uyarı olmadığında Rusznak ve ark. sigarasız, sigaralı ve KOAH'lı bireylerin BEH'den İL-1 β ve soluble interselüler adezyon molekülü-1 (SICAM-1) salınımı arasında fark olmadığını bulmuşlardır (7).

Çalışmamızda söz konusu sitokin ve adezyon molekülü çalışılmadığından, verilerimizin paralellik veya farklılık gösterip göstermediğini bilmiyoruz. Ancak, adı geçen çalışmada hücreler sigara dumanına maruz bırakıldığında, sigarasız ve KOAH'lı BEH'deki İL-1 β ve SICAM-1 salınımı havaya maruz bırakılan kontrol gruplarına göre artış gösterirken, sigaralı grupta bir değişiklik bulunmamıştır. Her ne kadar bulgularımız birebir paralellik göstermiyorsa da, bizim ve Rusznak ve ark. nın bulguları BEH'in inflamatuvar uyarı sonrasında inflamatuvar mediyatör salınım düzeyinde farklılık gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

Diğer yandan verilerimiz, Bayram ve ark.'nın kronik hava yolu inflamasyonu ile seyreden bir diğer hastalık olan astımlılardan ve normal bireylerden elde ettiği BEH kültürlerinden elde ettikleri sonuçlar ile kısmen de olsa paralellik göstermektedir. Söz konusu çalışmada astımlı hücrelerin bazal koşullarda astımlı olmayanlara göre daha yüksek oranda İL-8, GM-CSF, RANTES ve SICAM-1 salgıladıkları bildirilmektedir (6). Bizim çalışmamızda İL-1 β ile uyarı sonrasında KOAH'lı BEH'de diğer gruplara göre daha yüksek düzeyde İL-8 salınımı gözlenmiş, GM-CSF salınımı ise bazal koşullarda hem sigaralı grupta, hem de KOAH'lı grupta sigarasız gruba göre artmıştı. İL-6 salınımı ise hem bazal düzeyde, hem de İL-1 β uyarısı sonrasında KOAH'lı ve sigaralı grupta sigarasız gruba göre daha yüksekti. Bu bulgular, yapısal olarak inflamatuvar bir hastalık varlığının veya sigara gibi bir inflamatuvar uyarıya maruz kalmanın inflamatuvar mediyatör salınımını artırabileceğini göstermektedir.

KOAH'ın patogenezi araştırılan çalışmalar hava yollarında ve akciğer parankiminde kronik inflamasyon olduğunu bulmuşlardır (8) Gerek klinik çalışmalar, gerekse de çeşitli hücreler ile yapılan invitro çalışmalar KOAH'ta görülen inflamasyonun başta steroidler olmak üzere anti-inflamatuvar ajanlara dirençli olduğunu göstermiştir (85, 147, 153, 211). Bizim çalışmamızda ise, steroide cevapta gruplar arasında farklılık olmakla beraber, genel olarak DEKS ile inkübasyon sonrasında çalıştığımız sitokinlerin düzeyinde bir azalma olduğunu gözledik. Ancak, bazı çelişkili bulgular olmakla beraber, genel olarak DEKS sonrası gözlenen sitokin düzeylerine bakıldığında sigarasız gruba göre sigaralı ve KOAH'lı grupta steroide daha az cevap

vardı.

DEKS'in GM-CSF salınımına olan etkisine baktığımızda DEKS'in İL-1 β 'nin verilmediği ortamda sigaralı ve KOAH'lılarda bu sitokin salınımını baskılamakta, sadece sigarasız grupta bu hücrelerde bir etki göstermediğini bulduk. Sigarasız hücrelerdeki bu cevapsızlık, İL-1 β uyarısının olmadığı ortamda zaten düşük olan bazal GM-CSF düzeyinden kaynaklanmış olabilir. DEKS uygulandıktan sonra gözlenen sitokin salınımının gruplar arasında farklılık gösterip göstermediğine bakıldığında, GM-CSF düzeylerinin sigaralı grupta KOAH'lı ve sigarasız gruba göre daha yüksek seyrettiği görüldü. İL-1 β ile uyarılan hücrelerde ise, sadece kullanılan en düşük doz olan 0.1nM DEKS'in KOAH'lı hücrelerde GM-CSF salınımında anlamlı bir etki göstermediğini, diğer gruplarda ise kullanılan bütün dozların bu sitokin salınımını baskıladığını bulduk. Sadece en düşük dozda görülen bu farklı cevabın gerçekten KOAH'lı hücrelerdeki steroid duyarsızlığının bir sebebi olup olmadığının daha ayrıntılı araştırılması gerekir. Diğer yandan, İL-1 β uygulanan hücrelerde steroid sonrası GM-CSF salınımı gruplar arasında karşılaştırıldığında sigaralı (10 ve 100nM) grupta saptanan GM-CSF düzeyleri sigarasız gruba göre daha yüksek olarak izlendi. KOAH'lı grupta ise anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Bu bulgu, steroidin yol açtığı GM-CSF baskılamasının, yine de sigaralı ve KOAH'lı grupta sigarasız gruba göre daha az olduğunu düşündürmektedir.

DEKS'in IL-6 salınımına olan etkisine baktığımızda, İL-1 β 'süz ortamda genel olarak sigarasız ve sigaralı hücrelerde bu sitokin salınımı baskılanırken, KOAH'lı hücrelerde, sadece 10nM DEKS ile anlamlı bir baskılanma gözledik. Bu koşullardaki İL-6 salınımı gruplar arasında karşılaştırıldığında DEKS uygulandıktan sonra bu sitokin konsantrasyonunun genel olarak sigaralı grupta sigarasız ve KOAH'lı gruba göre daha yüksek olduğunu bulduk. Diğer yandan ortamda İL-1 β bulunduğunda, bütün DEKS dozlarının sigaralı grupta İL-6 düzeyini baskıladığını, sigarasız grupta ve KOAH'lı hücrelerde ise DEKS'un hiçbir dozunun etkili olmadığını bulduk. Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında, ilginç olarak ortamda İL-1 β bulunduğunda, KOAH'lı BEH'de steroid ile inkübasyon sonrasında saptanan İL-6 düzeyi hem sigarasız, hemde

sigaralı gruba göre daha yüksekti. Benzer şekilde aynı koşullarda sigaralı gruptan salınan İL-6 düzeyi sigarasız gruba göre yüksek bulundu. Bu bulgu İL-1 β ile uyarılan sigaralı ve belirgin şekilde KOAH'lı BEH'den İL-6 salınımının DEKS'den daha az etkilendiğini düşündürmektedir.

İL-8 salınımı incelendiğinde ise, İL-1 β 'süz ortamda, DEKS genel olarak sigarasız hücrelerde bir inhibisyona yol açarken, sigaralı BEH'de sadece 0,1nM İL-8 salınımını baskıladı. KOAH'lı hücrelerde ise aynı koşullarda İL-8 salınımı baskılanmadı. DEKS sonrası salınan İL-8 düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldığında, sigaralı grupta, İL-1 β 'süz ortamda saptanan İL-8 düzeyinin sigarasız (0,1 ve 1nM DEKS) gruba göre azaldığını bulduk. Benzer şekilde, KOAH'lı (100nM DEKS) grupta salınan İL-8 düzeyi sigaralı gruba göre daha azdı. Kültür vasatına İL-1 β eklendiğinde ise, sigaralı hücrelerde bir etki gözlenmezken, genel olarak sigarasız ve KOAH'lı hücrelerde doza bağımlı bir inhibisyon gözlendi. Hücre grupları karşılaştırıldığında, ortamda İL-1 β varlığında, 0.1nM DEKS ile inkübasyon sonunda sigaralı grupta salınan İL-8 düzeyleri sigarasız gruba göre düşükken 10 ve 100nM gibi daha yüksek dozlarda gözlenen düzey sigaralı grupta sigarasız hücrelere göre yüksekti. Benzer şekilde KOAH'lı hücrelerde DEKS (1, 10 ve 100nM) ile muamele sonunda gözlenen sitokin düzeyi, sigarasız gruba göre daha yüksek düzeydeydi. Bu da, sigara içilmesinin ve KOAH gelişmesinin hücrelerden İL-8 salınımını kısmen de olsa steroidlere cevapsız hale getirdiğini düşündürmektedir.

Bulgularımız bir bütün olarak değerlendirildiğinde, sınırlı da olsa, özellikle KOAH'lı BEH'den sitokin salınımının DEKS'e daha az cevap verdiğini düşündürmektedir. Yine de BEH'in steroidlere cevabında, literatürde çeşitli akciğer hücrelerinde gözlenene benzer belirgin bir steroid cevapsızlığı olmadığını düşünüyoruz. Bu gerçekte, BEH'nin yapısal özelliklerinden kaynaklanabilmiş olsada, bu durumun bir nedeni de, her ne kadar çalıştığımız BEH kültür sayısı güvenli istatistiksel analiz yapacak sayıda olduysa da, dokularını kullandığımız donör sayısının yetersizliğine bağlı olmuş olabilir (her bir grup için bu sayı 6'nın altındaydı). Bu da bireyler arasındaki varyasyonun yüksek olmasına yol açmış olabilir. Ne yazık ki, çalışmanın yapıldığı süre zarfında daha fazla donör dokusu bulunaamadığı için bu sayıyı artırmak mümkün

olmadı.

Nitekim Cosio ve ark. yaptıkları çalışmada sigarasız, sigaralı ve KOAH'lı hastalardan elde ettikleri alveolar makrofajları LPS ve DEKS'e maruz bırakarak İL-8 ve TNF- α düzeylerine bakmışlardır. Sonuçta, iki sitokin bazal düzeyinin KOAH'lı ve sigaralı grupta sigarasız gruba göre daha yüksek olduğunu, LPS varlığında, DEKS ile muamele sonrasında bu sitokinlerin düzeyinde görülen azalmanın KOAH'lı hücrelerde sigarasız hücrelere göre daha az olduğunu, dolayısıyla bu hücrelerde bir steroid duyarsızlığı olduğunu bildirmişlerdir (153). Benzer şekilde, aynı laboratuardan Culpitt ve ark. nın (85) alveolar makrofajlarla yaptıkları başka bir çalışmada, sigaralı ve KOAH'lı grupta İL-8 ve GM-CSF salınımı araştırılmış, bazal İL-8 seviyeleri KOAH'lı grupta sigaralı gruptan 5 kat daha yüksek saptanırken, GM-CSF düzeyi benzer bulunmuştur (85). İL-1 β ve sigara dumanı maruziyeti sonrasında iki sitokin düzeyinin de arttığı gözlenmiştir. Hücreler DEKS ile muamele edildiğinde İL-8 salınımının sigaralı grupta baskılanırken, KOAH'lı grupta baskılanmadığı saptanmıştır. GM-CSF düzeyinin ise çalışmamızda olduğu gibi hem sigaralı hem de KOAH'lı grupta baskılandığı bildirilmiştir.

Hava yollarının diğer yapısal hücrelerinden insan primer düz kas hücreleri ile yapılan bir çalışmada, sigarasız, sigaralı ve KOAH'lı hücrelerden bazal kültür koşullarında ve TNF- α ile stimülasyon sonrasında İL-8, GM-CSF, and VEGF salınımı araştırılmış, bazal koşullarda gruplar arasında bir fark gözlenmezken, TNF- α stimülasyonu sonrasında İL-8 düzeyinin sigaralı ve KOAH'lı grupta sigarasız gruba göre daha fazla arttığı saptanmıştır (210). Ortama DEKS konduğunda TNF- α 'nın indüklediği İL-8, GM-CSF ve VEGF salınımı baskılanmış, GM-CSF ve İL-8 salınımındaki baskılanma en az KOAH'lı hücrelerde, en çok ta sigarasız hücrelerde gözlenmiştir.

Çalışmalar GM-CSF, İL-6 ve İL-8 gibi sitokinlerin makrofajlar, T lenfositleri ve nötrofiller gibi inflamatuvar hücrelerin yanı sıra hava yolu epitel hücreleri gibi yapısal hücrelerden de salındıklarını göstermiştir (6, 7, 53). Nitekim çalışmalar bu sitokinlerin

KOAH'lı hastaların balgam, ekspirasyon havası ve plazmalarında arttığını, bu artışın özellikle alevlenme sırasında daha belirgin olduğunu bildirmektedir (53). Bu sitokinlerin kaynağının olabildiğince aydınlatılması, sentez ve salınımlarının modifiye edilmesi başta KOAH olmak üzere kronik hava yolu hastalıklarının patogenezinin aydınlatılması, hem de tedavilerine yönelik stratejilerin geliştirilmesine önemli katkı sunabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada, bildiğimiz kadarıyla literatürde ilk kez, invitro kültür ortamında KOAH'lı hastaların BEH'den bu hastalığın patogenezinde etkin role sahip üç sitokin salınımı ve steroidlerin etkisi araştırılmış oldu. Bulgularımız, KOAH'lı BEH'den inflamatuvar sitokin salınımının DEKS'in etkilerine karşı çok belirgin bir direnç göstermediğini ortaya koymuştur. Ancak, veriler ayrıntılı incelendiğinde söz konusu hücrelerden inflamatuvar sitokin salınımının DEKS'in inhibe edici etkisine karşı daha az duyarlı olduklarını düşündürmektedir. BEH'lerinin KOAH'ın patogenezi ve steroid direncindeki rollerinin daha iyi anlaşılması için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda, literatürde ilk kez KOAH'lı bireylerden elde edilen BEH'de DEKS'in bu hücrelerden sitokin salınımı üzerine olan etkisi araştırılmış oldu.
2. Sigarasız, sigaralı ve KOAH'lı bireylerden elde edilen BEH bazal kültür koşullarında ölçülebilir düzeyde GM-CSF, İL-6 ve İL-8 salgıladıkları, bunun İL-1 β tarafından belirgin olarak artırıldığı saptandı.
3. Bazal sitokin düzeylerine bakıldığında, GM-CSF salınımı sigaralı BEH'lerinde sigarasız ve KOAH'lılara göre daha yüksekti. İL-6 salınımı hem bazal düzeyde, hem de İL-1 β uyarısı sonrasında sigaralı ve KOAH'lı grupta sigarasız gruba göre artmıştı. İL-8 salınımı ise sadece İL-1 β ile muamele edilen KOAH'lı hücrelerde, sigarasız ve sigaralı gruba göre daha yüksekti.
4. DEKS'in etkilerine bakıldığında;
 - a. DEKS, bazal GM-CSF salınımını sigarasız grupta etkilemezken, hem sigaralı, hem de KOAH'lı hücrelerde kullanılan bütün konsantrasyonlarda (0,1-100nM) bu sitokin salınımını baskıladı. İL-1 β ile uyarılan hücrelerde ise, sadece 0.1nM DEKS KOAH'lı hücrelerde bu sitokin salınımını etkilemedi. Bunun dışında DEKS her üç grupta da İL-1 β 'lı ortamda GM-CSF salınımını baskıladı. Gruplar arası kıyaslamada sigarasız ve KOAH'lı gruplarla kıyaslandığında sigaralı grupta genel olarak GM-CSF seviyelerinin daha yüksek olduğu saptandı.
 - b. İL-6 salınımı incelendiğinde, DEKS bazal koşullarda (1nM hariç), bu sitokin salınımını sigarasız grupta baskılamakta, İL-1 β 'lı ortamda bir etki göstermedi. Sigaralı grupta ise hem bazal ortamda, hem de İL-1 β varlığında bu sitokin salınımını baskıladı. KOAH'lı hücrelerde ise sadece bazal koşullarda 10nM DEKS ile anlamlı bir baskılanma gözlemlendi. Gruplar arası kıyaslamada İL-1 β 'sız ortamda sigaralı hasta

grubunda İL-6 sevipleri sigarasız ve KOAH'lı hasta grubuna göre daha yüksek saptanırken, İL-1 β verildiğinde KOAH'lı grupta İL-6 düzeylerinin diğer iki gruptan daha yüksek olduğu saptandı.

- c. İL-8 düzeyine bakıldığında, KOAH'lı hücrelerde bazal koşullardaki salınım etkilenmezken, İL-1 β bulunan ortamda DEKS doza bağımlı olarak bu sitokinin salınımını baskıladı. Sigaralı grupta sadece 0.1nM bazal salınımı baskılarken, sigarasız hücrelerde DEKS bazal düzeyde ve İL-1 β varlığında İL-8 salınımını baskıladı. Gruplar arası kıyaslamada sigarasız grupla kıyaslandığında, sigaralı grupta 0,1 ve 1 nM, İL-1 β ile uyarılan ortamda da 0,1nM DEKS ile muamele edilen hücrelerdeki İL-8 düzeyi, sigarasız gruba göre daha düşüktü. İL-1 β ortamda 10 ve 100nM ile inkübe edilen sigaralı BEH'deki İL-8 düzeyi ise sigarasızlardan daha yüksekti. KOAH'lı hasta grubunda ise İL-1 β ile stimüle ortamda DEKS (1, 10, 100nM) sonrası gözlenen İL-8 düzeyi sigarasızlardan yüksekti. KOAH'lular sigaralılarla kıyaslandığında ise, bazal koşullarda 0,1 ile 100nM DEKS sonrası gözlenen İL-8 salınımı KOAH'lılarda daha düşüktü. İL-1 β 'lı ortamda ise 0.1nM DEKS ile KOAH'lı hücrelerde gözlenen İL-8 seviyesi sigaralı gruba göre artmıştı.

5. Çalışma bulgularım doğrultusunda gerek bazal düzeyde, gerekse de DEKS'e maruziyet sonrasında BEH'lerde inflamatuvar sitokin salınımında gözlenen değişikliklerin altında yatan mekanizmaların daha ayrıntılı olarak araştırılması gerekmektedir. Bu amaçla;

- a. Çalışmamın donör sayısı artırılarak genişletilmesi yararlı olur
- b. Protein salınım düzeyinde GM-CSF, İL-6 ve İL-8 düzeyindeki değişikliklerin gen ifadesi düzeyinde etkilenip etkilenmediğinin anlaşılması için bu sitokinlerin mRNA ekspresyonlarının araştırılması gerekir.
- c. İnflamatuvar sitokinlerin sentezinde önemli rol oynayan MAPK ve NF- κ B ile ilişkili sinyal ileti yollarının rollerinin araştırılması uygun olur.

- d. Bu sitokinlerin transkripsiyonunu düzenleyen AP-1 ve NF- κ B gibi transkripsiyon faktörlerin düzeylerinde veya aktif formlarında bir değişiklik olup olmadığı araştırılabilir.
- e. Anti-inflamatuar potansiyeli olan diğer ajanların etkileri (Teofilin, anti oksidanlar ve yukarıda belirtilen sinyal ileti yolak ve transkripsiyon faktör inhibitörleri gibi) tek başlarına veya DEKS ile kombinasyon halinde araştırılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global burden of disease study. *Lancet* 1997;349(9064):1498-1504.
2. Tatlicioglu T. [chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and its future]. *Tuberk Toraks* 2007;55(3):303-318.
3. Bayram H. [the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease, steroid resistance and the place of theophylline in the treatment]. *Tuberk Toraks* 2009;57(1):115-124.
4. Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease. *Respirology* 2003;8(4):432-446.
5. Bayram H, Sapsford RJ, Abdelaziz MM, Khair OA. Effect of ozone and nitrogen dioxide on the release of proinflammatory mediators from bronchial epithelial cells of nonatopic nonasthmatic subjects and atopic asthmatic patients in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107(2):287-294.
6. Bayram H, Devalia JL, Khair OA, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Sagai M, Davies RJ. Comparison of ciliary activity and inflammatory mediator release from bronchial epithelial cells of nonatopic nonasthmatic subjects and atopic asthmatic patients and the effect of diesel exhaust particles in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102(5):771-782.
7. Rusznak C, Mills PR, Devalia JL, Sapsford RJ, Davies RJ, Lozewicz S. Effect of cigarette smoke on the permeability and il-1beta and sicam-1 release from cultured human bronchial epithelial cells of never-smokers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23(4):530-536.
8. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, et al. Global strategy for the

diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: Gold executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176(6):532-555.

9. Silverman EK. Genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Novartis Found Symp* 2001;234:45-58; discussion 58-64.
10. Vernooij JH, Kucukaycan M, Jacobs JA, Chavannes NH, Buurman WA, Dentener MA, Wouters EF. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: Soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(9):1218-1224.
11. Menezes AM, Perez-Padilla R, Jardim JR, Muino A, Lopez MV, Valdivia G, Montes de Oca M, Talamo C, Hallal PC, Victora CG. Chronic obstructive pulmonary disease in five latin american cities (the platino study): A prevalence study. *Lancet* 2005;366(9500):1875-1881.
12. Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of copd: Systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2006;28(3):523-532.
13. Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 2005;365(9478):2225-2236.
14. Molfino NA. Genetics of COPD. *Chest* 2004;125(5):1929-1940.
15. Celedon JC, Lange C, Raby BA, Litonjua AA, Palmer LJ, DeMeo DL, Reilly JJ, Kwiatkowski DJ, Chapman HA, Laird N, et al. The transforming growth factor-beta1 (tgfb1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (copd). *Hum Mol Genet* 2004;13(15):1649-1656.
16. Cheng SL, Yu CJ, Chen CJ, Yang PC. Genetic polymorphism of epoxide hydrolase and glutathione s-transferase in copd. *Eur Respir J* 2004;23(6):818-824.
17. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJL. Measuring the global burden of disease and risk factors, 1990-2001. 2006.
18. Mannino DM, Watt G, Hole D, Gillis C, Hart C, McConnachie A, Davey Smith G, Upton M, Hawthorne V, Sin DD, et al. The natural history of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006;27(3):627-643.

19. Rennard SI, Vestbo J. Copd: The dangerous underestimate of 15%. *Lancet* 2006;367(9518):1216-1219.
20. Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J* 1977;1(6077):1645-1648.
21. Xu X, Weiss ST, Rijcken B, Schouten JP. Smoking, changes in smoking habits, and rate of decline in fev1: New insight into gender differences. *Eur Respir J* 1994;7(6):1056-1061.
22. Silverman EK, Weiss ST, Drazen JM, Chapman HA, Carey V, Campbell EJ, Denish P, Silverman RA, Celedon JC, Reilly JJ, et al. Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(6):2152-2158.
23. Gilliland FD, Rappaport EB, Berhane K, Islam T, Dubeau L, Gauderman WJ, McConnell R. Effects of glutathione s-transferase p1, m1, and t1 on acute respiratory illness in school children. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(3):346-351.
24. Burrows B, Knudson RJ, Cline MG, Lebowitz MD. Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function. *Am Rev Respir Dis* 1977;115(2):195-205.
25. Al-Fayez SF, Salleh M, Ardawi M, Zahran FM. Effects of sheesha and cigarette smoking on pulmonary function of saudi males and females. *Trop Geogr Med* 1988;40(2):115-123.
26. Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, Magnussen H, Page CP, Postma D, Saetta M. Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174(1):6-14.
27. Yin P, Jiang CQ, Cheng KK, Lam TH, Lam KH, Miller MR, Zhang WS, Thomas GN, Adab P. Passive smoking exposure and risk of copd among adults in china: The guangzhou biobank cohort study. *Lancet* 2007;370(9589):751-757.
28. Hnizdo E, Sullivan PA, Bang KM, Wagner G. Association between chronic obstructive pulmonary disease and employment by industry and occupation in the us population: A study of data from the third national health and nutrition examination survey. *Am J Epidemiol* 2002;156(8):738-746.

29. Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet* 2009;374(9691):733-743.
30. Ran PX, Wang C, Yao WZ, Chen P, Kang J, Huang SG, Chen BY, Wang CZ, Ni DT, Zhou YM, et al. [the risk factors for chronic obstructive pulmonary disease in females in chinese rural areas]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2006;45(12):974-979.
31. Gunen H, Hacievliyagil SS, Yetkin O, Gulbas G, Mutlu LC, Pehlivan E. Prevalence of copd: First epidemiological study of a large region in turkey. *Eur J Intern Med* 2008;19(7):499-504.
32. Ekici A, Ekici M, Kurtipek E, Akin A, Arslan M, Kara T, Apaydin Z, Demir S. Obstructive airway diseases in women exposed to biomass smoke. *Environ Res* 2005;99(1):93-98.
33. Grigg J. Particulate matter exposure in children: Relevance to chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6(7):564-569.
34. Abbey DE, Burchette RJ, Knutsen SF, McDonnell WF, Lebowitz MD, Enright PL. Long-term particulate and other air pollutants and lung function in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(1):289-298.
35. Fletcher CM. Letter: Natural history of chronic bronchitis. *Br Med J* 1976;1(6025):1592-1593.
36. Mannino DM, Davis KJ. Lung function decline and outcomes in an elderly population. *Thorax* 2006;61(6):472-477.
37. Jemal A, Ward E, Hao Y, Thun M. Trends in the leading causes of death in the united states, 1970-2002. *JAMA* 2005;294(10):1255-1259.
38. Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciruba FC, Rogers RM, Hayashi S, Hogg JC. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(3):469-473.
39. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S, Maccallum P, Meade TW, Jeffries DJ, Johnston SL, et al. Respiratory viruses,

- symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(9):1618-1623.
40. Barker DJ, Godfrey KM, Fall C, Osmond C, Winter PD, Shaheen SO. Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease. *BMJ* 1991;303(6804):671-675.
 41. Tager IB, Segal MR, Speizer FE, Weiss ST. The natural history of forced expiratory volumes. Effect of cigarette smoking and respiratory symptoms. *Am Rev Respir Dis* 1988;138(4):837-849.
 42. Diaz PT, King MA, Pacht ER, Wewers MD, Gadek JE, Nagaraja HN, Drake J, Clanton TL. Increased susceptibility to pulmonary emphysema among hiv-seropositive smokers. *Ann Intern Med* 2000;132(5):369-372.
 43. Menezes AM, Hallal PC, Perez-Padilla R, Jardim JR, Muino A, Lopez MV, Valdivia G, Montes de Oca M, Talamo C, Pertuze J, et al. Tuberculosis and airflow obstruction: Evidence from the platino study in latin america. *Eur Respir J* 2007;30(6):1180-1185.
 44. Guilbert T, Krawiec M. Natural history of asthma. *Pediatr Clin North Am* 2003;50(3):523-538.
 45. Soriano JB, Davis KJ, Coleman B, Visick G, Mannino D, Pride NB. The proportional venn diagram of obstructive lung disease: Two approximations from the united states and the united kingdom. *Chest* 2003;124(2):474-481.
 46. Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med* 1998;339(17):1194-1200.
 47. de Torres JP, Casanova C, Hernandez C, Abreu J, Aguirre-Jaime A, Celli BR. Gender and copd in patients attending a pulmonary clinic. *Chest* 2005;128(4):2012-2016.
 48. Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, Ford ES, Redd SC. Chronic obstructive pulmonary disease surveillance--united states, 1971-2000. *Respir Care* 2002;47(10):1184-1199.

49. Watson L, Vonk JM, Lofdahl CG, Pride NB, Pauwels RA, Laitinen LA, Schouten JP, Postma DS. Predictors of lung function and its decline in mild to moderate copd in association with gender: Results from the euroscop study. *Respir Med* 2006;100(4):746-753.
50. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, Menezes AM, Sullivan SD, Lee TA, Weiss KB, et al. International variation in the prevalence of copd (the bold study): A population-based prevalence study. *Lancet* 2007;370(9589):741-750.
51. Lawlor DA, Ebrahim S, Davey Smith G. Association between self-reported childhood socioeconomic position and adult lung function: Findings from the british women's heart and health study. *Thorax* 2004;59(3):199-203.
52. Anto JM, Vermeire P, Vestbo J, Sunyer J. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2001;17(5):982-994.
53. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* 2008;118(11):3546-3556.
54. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000;343(4):269-280.
55. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: Molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003;22(4):672-688.
56. Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004;364(9435):709-721.
57. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF, Saetta M. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(4):1277-1285.
58. Brightling CE, Monteiro W, Ward R, Parker D, Morgan MD, Wardlaw AJ, Pavord ID. Sputum eosinophilia and short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: A randomised controlled trial. *Lancet* 2000;356(9240):1480-1485.

59. Tzanakis N, Chrysofakis G, Tsoumakidou M, Kyriakou D, Tsiligianni J, Bouros D, Siafakas NM. Induced sputum cd8+ t-lymphocyte subpopulations in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2004;98(1):57-65.
60. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Turato G, Ruggieri MP, Roggeri A, Calcagni P, Mapp CE, Ciaccia A, Fabbri LM. Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150(6 Pt 1):1646-1652.
61. Qiu Y, Zhu J, Bandi V, Atmar RL, Hattotuwa K, Guntupalli KK, Jeffery PK. Biopsy neutrophilia, neutrophil chemokine and receptor gene expression in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(8):968-975.
62. Fujita J, Nelson NL, Daughton DM, Dobry CA, Spurzem JR, Irino S, Rennard SI. Evaluation of elastase and antielastase balance in patients with chronic bronchitis and pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1990;142(1):57-62.
63. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Turato G, Mapp CE, Pieno M, Zanguochi G, Del Prete G, Fabbri LM. Airway eosinophilia and expression of interleukin-5 protein in asthma and in exacerbations of chronic bronchitis. *Clin Exp Allergy* 1996;26(7):766-774.
64. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;350(26):2645-2653.
65. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Ferraresso A, Drigo R, Potena A, Ciaccia A, Fabbri LM. Activated t-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1993;147(2):301-306.
66. Saetta M, Baraldo S, Turato G, Beghe B, Casoni GL, Bellettato CM, Rea F, Zuin R, Fabbri LM, Papi A. Increased proportion of cd8+ t-lymphocytes in the paratracheal lymph nodes of smokers with mild copd. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2003;20(1):28-32.
67. Lams BE, Sousa AR, Rees PJ, Lee TH. Subepithelial immunopathology of the large airways in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2000;15(3):512-516.

68. Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J, Hacken J, Espada R, Bag R, Lewis DE, et al. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med* 2004;1(1):e8.
69. Kalenderian R, Raju L, Roth W, Schwartz LB, Gruber B, Janoff A. Elevated histamine and tryptase levels in smokers' bronchoalveolar lavage fluid. Do lung mast cells contribute to smokers' emphysema? *Chest* 1988;94(1):119-123.
70. Rutgers SR, Timens W, Kaufmann HF, van der Mark TW, Koeter GH, Postma DS. Comparison of induced sputum with bronchial wash, bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies in copd. *Eur Respir J* 2000;15(1):109-115.
71. Louis RE, Cataldo D, Buckley MG, Sele J, Henket M, Lau LC, Bartsch P, Walls AF, Djukanovic R. Evidence of mast-cell activation in a subset of patients with eosinophilic chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2002;20(2):325-331.
72. Skold CM, Hed J, Eklund A. Smoking cessation rapidly reduces cell recovery in bronchoalveolar lavage fluid, while alveolar macrophage fluorescence remains high. *Chest* 1992;101(4):989-995.
73. Rutgers SR, Postma DS, ten Hacken NH, Kauffman HF, van Der Mark TW, Koeter GH, Timens W. Ongoing airway inflammation in patients with copd who do not currently smoke. *Thorax* 2000;55(1):12-18.
74. Buist AS, Sexton GJ, Nagy JM, Ross BB. The effect of smoking cessation and modification on lung function. *Am Rev Respir Dis* 1976;114(1):115-122.
75. Anthonisen NR, Connett JE, Kiley JP, Altose MD, Bailey WC, Buist AS, Conway WA, Jr., Enright PL, Kanner RE, O'Hara P, et al. Effects of smoking intervention and the use of an inhaled anticholinergic bronchodilator on the rate of decline of fev1. The lung health study. *JAMA* 1994;272(19):1497-1505.
76. Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl* 2001;34:50s-59s.
77. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(2):530-534.

78. Hill AT, Bayley D, Stockley RA. The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(3):893-898.
79. Demedts IK, Morel-Montero A, Lebecque S, Pacheco Y, Cataldo D, Joos GF, Pauwels RA, Brusselle GG. Elevated mmp-12 protein levels in induced sputum from patients with copd. *Thorax* 2006;61(3):196-201.
80. Lim S, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ, Chung KF. Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers. Regulation by interleukin-10. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(4 Pt 1):1355-1360.
81. Kuschner WG, D'Alessandro A, Wong H, Blanc PD. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. *Eur Respir J* 1996;9(10):1989-1994.
82. Mio T, Romberger DJ, Thompson AB, Robbins RA, Heires A, Rennard SI. Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(5):1770-1776.
83. Dubar V, Gosset P, Aerts C, Voisin C, Wallaert B, Tonnel AB. In vitro acute effects of tobacco smoke on tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by alveolar macrophages. *Exp Lung Res* 1993;19(3):345-359.
84. Masubuchi T, Koyama S, Sato E, Takamizawa A, Kubo K, Sekiguchi M, Nagai S, Izumi T. Smoke extract stimulates lung epithelial cells to release neutrophil and monocyte chemotactic activity. *Am J Pathol* 1998;153(6):1903-1912.
85. Culpitt SV, Rogers DF, Shah P, De Matos C, Russell RE, Donnelly LE, Barnes PJ. Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(1):24-31.
86. Balbi B, Bason C, Balleari E, Fiasella F, Pesci A, Ghio R, Fabiano F. Increased bronchoalveolar granulocytes and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during exacerbations of chronic bronchitis. *Eur Respir J* 1997;10(4):846-850.

87. Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in copd exacerbations. *Thorax* 2000;55(2):114-120.
88. Bucchioni E, Kharitonov SA, Allegra L, Barnes PJ. High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with copd. *Respir Med* 2003;97(12):1299-1302.
89. Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of copd. *Eur Respir J* 2009;33(5):1165-1185.
90. Aaron SD, Angel JB, Lunau M, Wright K, Fex C, Le Saux N, Dales RE. Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(2):349-355.
91. Mikami M, Llewellyn-Jones CG, Bayley D, Hill SL, Stockley RA. The chemotactic activity of sputum from patients with bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(3 Pt 1):723-728.
92. Nakamura H, Yoshimura K, McElvaney NG, Crystal RG. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J Clin Invest* 1992;89(5):1478-1484.
93. Sapey E, Ahmad A, Bayley D, Newbold P, Snell N, Rugman P, Stockley RA. Imbalances between interleukin-1 and tumor necrosis factor agonists and antagonists in stable copd. *J Clin Immunol* 2009;29(4):508-516.
94. Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, Barnes PJ. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26(5):602-609.
95. Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Wright JL. Tumor necrosis factor-alpha drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(5):492-498.
96. Rennard SI, Fogarty C, Kelsen S, Long W, Ramsdell J, Allison J, Mahler D, Saadeh C, Siler T, Snell P, et al. The safety and efficacy of infliximab in moderate

- to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175(9):926-934.
97. Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, Ioli F, Chung KF, Donner CF, Barnes PJ, et al. Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with copd. *Eur Respir J* 2002;20(3):556-563.
 98. Caramori G, Romagnoli M, Casolari P, Bellettato C, Casoni G, Boschetto P, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM, Ciaccia A, et al. Nuclear localisation of p65 in sputum macrophages but not in sputum neutrophils during copd exacerbations. *Thorax* 2003;58(4):348-351.
 99. Urnov FD, Wolffe AP. Chromatin remodeling and transcriptional activation: The cast (in order of appearance). *Oncogene* 2001;20(24):2991-3006.
 100. Carnevali S, Petruzzelli S, Longoni B, Vanacore R, Barale R, Cipollini M, Scatena F, Paggiaro P, Celi A, Giuntini C. Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284(6):L955-963.
 101. Barnes PJ. Theophylline in chronic obstructive pulmonary disease: New horizons. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2(4):334-339; discussion 340-331.
 102. Ito K, Caramori G, Lim S, Oates T, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Expression and activity of histone deacetylases in human asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(3):392-396.
 103. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, Barczyk A, Hayashi S, Adcock IM, Hogg JC, et al. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2005;352(19):1967-1976.
 104. Adcock IM, Chung KF, Caramori G, Ito K. Kinase inhibitors and airway inflammation. *Eur J Pharmacol* 2006;533(1-3):118-132.
 105. Lee M, Goodbourn S. Signalling from the cell surface to the nucleus. *Essays Biochem* 2001;37:71-85.
 106. Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R, et al. Effects of an interleukin-5

blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000;356(9248):2144-2148.

107. Cuenda A, Rousseau S. P38 map-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773(8):1358-1375.
108. Finan PM, Thomas MJ. Pi 3-kinase inhibition: A therapeutic target for respiratory disease. *Biochem Soc Trans* 2004;32(Pt 2):378-382.
109. Kumar S, Boehm J, Lee JC. P38 map kinases: Key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2(9):717-726.
110. Eynott PR, Nath P, Leung SY, Adcock IM, Bennett BL, Chung KF. Allergen-induced inflammation and airway epithelial and smooth muscle cell proliferation: Role of jun n-terminal kinase. *Br J Pharmacol* 2003;140(8):1373-1380.
111. Ito K, Caramori G, Adcock IM. Therapeutic potential of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in inflammatory respiratory disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;321(1):1-8.
112. Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC. Elevation of intracellular camp inhibits rhoa activation and integrin-dependent leukocyte adhesion induced by chemoattractants. *J Biol Chem* 1997;272(39):24141-24144.
113. Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM. Cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase is targeted to intermediate filaments and phosphorylates vimentin in a23187-stimulated human neutrophils. *Blood* 1995;85(1):222-230.
114. Culpitt SV, de Matos C, Russell RE, Donnelly LE, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of theophylline on induced sputum inflammatory indices and neutrophil chemotaxis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165(10):1371-1376.
115. Vignola AM. Pde4 inhibitors in copd--a more selective approach to treatment. *Respir Med* 2004;98(6):495-503.
116. Bachmann R, Laurell CB. Electrophoretic and immunologic classification of m-components in serum. *Scand J Clin Lab Invest* 1963;15 Suppl 69:11-24.

117. Nolte H, Stahl Skov P. Inhibition of basophil histamine release by methotrexate. *Agents Actions* 1988;23(3-4):173-176.
118. Gross P, Babyak MA, Tolker E, Kaschak M. Enzymatically produced pulmonary emphysema; a preliminary report. *J Occup Med* 1964;6:481-484.
119. Travis J. Structure, function, and control of neutrophil proteinases. *Am J Med* 1988;84(6A):37-42.
120. Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases a and b, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in copd. *Chest* 2000;117(3):684-694.
121. Montano M, Becerril C, Ruiz V, Ramos C, Sansores RH, Gonzalez-Avila G. Matrix metalloproteinases activity in copd associated with wood smoke. *Chest* 2004;125(2):466-472.
122. Gadek JE, Fells GA, Crystal RG. Cigarette smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans. *Science* 1979;206(4424):1315-1316.
123. Taggart CC, Lowe GJ, Greene CM, Mulgrew AT, O'Neill SJ, Levine RL, McElvaney NG. Cathepsin b, l, and s cleave and inactivate secretory leucoprotease inhibitor. *J Biol Chem* 2001;276(36):33345-33352.
124. Shapiro SD, Senior RM. Matrix metalloproteinases. Matrix degradation and more. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20(6):1100-1102.
125. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 1997;277(5334):2002-2004.
126. Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Dai J, Shapiro SD, Wright JL. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor-alpha release. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(8):1083-1089.

127. Kohri K, Ueki IF, Nadel JA. Neutrophil elastase induces mucin production by ligand-dependent epidermal growth factor receptor activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283(3):L531-540.
128. Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(3 Pt 1):737-744.
129. Grossmann J. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--anoikis". *Apoptosis* 2002;7(3):247-260.
130. Morse D, Choi AM. Heme oxygenase-1: The "emerging molecule" has arrived. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27(1):8-16.
131. Wickenden JA, Clarke MC, Rossi AG, Rahman I, Faux SP, Donaldson K, MacNee W. Cigarette smoke prevents apoptosis through inhibition of caspase activation and induces necrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29(5):562-570.
132. Verra F, Escudier E, Lebargy F, Bernaudin JF, De Cremoux H, Bignon J. Ciliary abnormalities in bronchial epithelium of smokers, ex-smokers, and nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(3 Pt 1):630-634.
133. Lee HM, Takeyama K, Dabbagh K, Lausier JA, Ueki IF, Nadel JA. Agarose plug instillation causes goblet cell metaplasia by activating egf receptors in rat airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278(1):L185-192.
134. Gamble E, Grootendorst DC, Brightling CE, Troy S, Qiu Y, Zhu J, Parker D, Matin D, Majumdar S, Vignola AM, et al. Antiinflammatory effects of the phosphodiesterase-4 inhibitor cilomilast (ariflo) in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(8):976-982.
135. Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF-beta-induced smad signaling and gene regulation: Consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci* 2004;35(2):83-92.
136. Fine A, Goldstein RH. The effect of transforming growth factor-beta on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. *J Biol Chem* 1987;262(8):3897-3902.

137. Kuhn C, Yu SY, Chraplyvy M, Linder HE, Senior RM. The induction of emphysema with elastase. II. Changes in connective tissue. *Lab Invest* 1976;34(4):372-380.
138. Wang H, Liu X, Umino T, Kohyama T, Zhu YK, Wen FQ, Spurzem JR, Romberger DJ, Kim HJ, Rennard SI. Effect of cigarette smoke on fibroblast-mediated gel contraction is dependent on cell density. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284(1):L205-213.
139. Sin DD, Man SF. Why are patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of cardiovascular diseases? The potential role of systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation* 2003;107(11):1514-1519.
140. Casaburi R. Skeletal muscle function in copd. *Chest* 2000;117(5 Suppl 1):267S-271S.
141. Mannino DM, Buist AS, Petty TL, Enright PL, Redd SC. Lung function and mortality in the united states: Data from the first national health and nutrition examination survey follow up study. *Thorax* 2003;58(5):388-393.
142. Debigare R, Marquis K, Cote CH, Tremblay RR, Michaud A, LeBlanc P, Maltais F. Catabolic/anabolic balance and muscle wasting in patients with COPD. *Chest* 2003;124(1):83-89.
143. Gosker HR, Kubat B, Schaart G, van der Vusse GJ, Wouters EF, Schols AM. Myopathological features in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003;22(2):280-285.
144. Agusti AG, Sauleda J, Miralles C, Gomez C, Togores B, Sala E, Batle S, Busquets X. Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(4):485-489.
145. Nguyen LT, Bedu M, Caillaud D, Beaufriere B, Beaujon G, Vasson M, Coudert J, Ritz P. Increased resting energy expenditure is related to plasma tnf-alpha concentration in stable copd patients. *Clin Nutr* 1999;18(5):269-274.
146. Sullivan PF, Kendler KS. The genetic epidemiology of smoking. *Nicotine Tob Res* 1999;1 Suppl 2:S51-57; discussion S69-70.

147. Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet* 2009;373(9678):1905-1917.
148. Calverley PM, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, Jones PW, Yates JC, Vestbo J. Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2007;356(8):775-789.
149. Barnes PJ. Glucocorticosteroids: Current and future directions. *Br J Pharmacol*;163(1):29-43.
150. Nightingale JA, Rogers DF, Chung KF, Barnes PJ. No effect of inhaled budesonide on the response to inhaled ozone in normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(2 Pt 1):479-486.
151. Barnes PJ, Ito K, Adcock IM. Corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease: Inactivation of histone deacetylase. *Lancet* 2004;363(9410):731-733.
152. Gibson PG, Simpson JL. The overlap syndrome of asthma and copd: What are its features and how important is it? *Thorax* 2009;64(8):728-735.
153. Cosio BG, Tsaprouni L, Ito K, Jazrawi E, Adcock IM, Barnes PJ. Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in copd macrophages. *J Exp Med* 2004;200(5):689-695.
154. Donnelly LE, Newton R, Kennedy GE, Fenwick PS, Leung RH, Ito K, Russell RE, Barnes PJ. Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: Molecular mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287(4):L774-783.
155. Li LB, Goleva E, Hall CF, Ou LS, Leung DY. Superantigen-induced corticosteroid resistance of human t cells occurs through activation of the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase (mek-erk) pathway. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114(5):1059-1069.
156. Ito K, Lim S, Caramori G, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *FASEB J* 2001;15(6):1110-1112.

157. Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell YM, Barnes PJ. Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(2):542-548.
158. Culpitt SV, Maziak W, Loukidis S, Nightingale JA, Matthews JL, Barnes PJ. Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines, and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(5 Pt 1):1635-1639.
159. Montuschi P, Collins JV, Ciabattoni G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with copd and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(3 Pt 1):1175-1177.
160. Montuschi P, Corradi M, Ciabattoni G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(1):216-220.
161. Marwick JA, Kirkham PA, Stevenson CS, Danahay H, Giddings J, Butler K, Donaldson K, Macnee W, Rahman I. Cigarette smoke alters chromatin remodeling and induces proinflammatory genes in rat lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31(6):633-642.
162. Ricciardolo FL, Caramori G, Ito K, Capelli A, Brun P, Abatangelo G, Papi A, Chung KF, Adcock I, Barnes PJ, et al. Nitrosative stress in the bronchial mucosa of severe chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116(5):1028-1035.
163. Ito K, Yamamura S, Essilfie-Quaye S, Cosio B, Ito M, Barnes PJ, Adcock IM. Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables nf-kappab suppression. *J Exp Med* 2006;203(1):7-13.
164. Barnes PJ. Role of hdac2 in the pathophysiology of copd. *Annu Rev Physiol* 2009;71:451-464.
165. Osoata GO, Yamamura S, Ito M, Vuppusetty C, Adcock IM, Barnes PJ, Ito K. Nitration of distinct tyrosine residues causes inactivation of histone deacetylase 2. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;384(3):366-371.
166. To Y, Ito K, Kizawa Y, Failla M, Ito M, Kusama T, Elliott WM, Hogg JC, Adcock IM, Barnes PJ. Targeting phosphoinositide-3-kinase-delta with

- theophylline reverses corticosteroid insensitivity in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*;182(7):897-904.
167. Marwick JA, Caramori G, Stevenson CS, Casolari P, Jazrawi E, Barnes PJ, Ito K, Adcock IM, Kirkham PA, Papi A. Inhibition of pi3kdelta restores glucocorticoid function in smoking-induced airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179(7):542-548.
168. Barnes PJ. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*;120(2-3):76-85.
169. Barnes PJ. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;120(2-3):76-85.
170. Nicolaidis NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. The human glucocorticoid receptor: Molecular basis of biologic function. *Steroids*;75(1):1-12.
171. Tao T, Lan J, Lukacs GL, Hache RJ, Kaplan F. Importin 13 regulates nuclear import of the glucocorticoid receptor in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35(6):668-680.
172. Lu NZ, Cidlowski JA. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1024:102-123.
173. John S, Sabo PJ, Johnson TA, Sung MH, Biddie SC, Lightman SL, Voss TC, Davis SR, Meltzer PS, Stamatoyannopoulos JA, et al. Interaction of the glucocorticoid receptor with the chromatin landscape. *Mol Cell* 2008;29(5):611-624.
174. Clark AR. Map kinase phosphatase 1: A novel mediator of biological effects of glucocorticoids? *J Endocrinol* 2003;178(1):5-12.
175. Dostert A, Heinzl T. Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr Pharm Des* 2004;10(23):2807-2816.
176. Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone h4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* 2000;20(18):6891-6903.

177. Bergmann MW, Staples KJ, Smith SJ, Barnes PJ, Newton R. Glucocorticoid inhibition of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor from t cells is independent of control by nuclear factor-kappab and conserved lymphokine element 0. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30(4):555-563.
178. Smoak K, Cidlowski JA. Glucocorticoids regulate tristetraproline synthesis and posttranscriptionally regulate tumor necrosis factor alpha inflammatory signaling. *Mol Cell Biol* 2006;26(23):9126-9135.
179. Barnes PJ. Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur Respir J* 2006;27(2):413-426.
180. Maneechotesuwan K, Xin Y, Ito K, Jazrawi E, Lee KY, Usmani OS, Barnes PJ, Adcock IM. Regulation of th2 cytokine genes by p38 mapk-mediated phosphorylation of gata-3. *J Immunol* 2007;178(4):2491-2498.
181. Maneechotesuwan K, Yao X, Ito K, Jazrawi E, Usmani OS, Adcock IM, Barnes PJ. Suppression of gata-3 nuclear import and phosphorylation: A novel mechanism of corticosteroid action in allergic disease. *PLoS Med* 2009;6(5):e1000076.
182. Maneechotesuwan K, Supawita S, Kasetsinsombat K, Wongkajornsilp A, Barnes PJ. Sputum indoleamine-2, 3-dioxygenase activity is increased in asthmatic airways by using inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121(1):43-50.
183. Maneechotesuwan K, Ekjitrakul W, Kasetsinsombat K, Wongkajornsilp A, Barnes PJ. Statins enhance the anti-inflammatory effects of inhaled corticosteroids in asthmatic patients through increased induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase. *J Allergy Clin Immunol*;126(4):754-762 e751.
184. Gögebakan B, Bayram H. Havayolu epiteli. In: (İçinde); Özlü T, Metintaş M, Karadağ M, Kaya A, editors. Solunum sistemi ve hastalıkları. 1: İstanbul Tıp Kitapevi;2010. p. 35-39.
185. Spina D. Epithelium smooth muscle regulation and interactions. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(5 Pt 3):S141-145.
186. Ayers MM, Jeffery PK. Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium. *Eur Respir J* 1988;1(1):58-80.

187. Jeffery PK. Morphology of the airway wall in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1991;143(5 Pt 1):1152-1158; discussion 1161.
188. Lumsden AB, McLean A, Lamb D. Goblet and clara cells of human distal airways: Evidence for smoking induced changes in their numbers. *Thorax* 1984;39(11):844-849.
189. Evans MJ, Plopper CG. The role of basal cells in adhesion of columnar epithelium to airway basement membrane. *Am Rev Respir Dis* 1988;138(2):481-483.
190. Rogers AV, Dewar A, Corrin B, Jeffery PK. Identification of serous-like cells in the surface epithelium of human bronchioles. *Eur Respir J* 1993;6(4):498-504.
191. Evans MJ, Cox RA, Shami SG, Plopper CG. Junctional adhesion mechanisms in airway basal cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;3(4):341-347.
192. Hicks W Jr, Hall L, 3rd, Sigurdson L, Stewart C, Hard R, Winston J, Lwebuga-Mukasa J. Isolation and characterization of basal cells from human upper respiratory epithelium. *Exp Cell Res* 1997;237(2):357-363.
193. Evans MJ, Cox RA, Shami SG, Wilson B, Plopper CG. The role of basal cells in attachment of columnar cells to the basal lamina of the trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989;1(6):463-469.
194. Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(6 Pt 1):2000-2006.
195. De Water R, Willems LN, Van Muijen GN, Franken C, Fransen JA, Dijkman JH, Kramps JA. Ultrastructural localization of bronchial antileukoprotease in central and peripheral human airways by a gold-labeling technique using monoclonal antibodies. *Am Rev Respir Dis* 1986;133(5):882-890.
196. Hong KU, Reynolds SD, Giangreco A, Hurley CM, Stripp BR. Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24(6):671-681.

197. Knight D. Epithelium-fibroblast interactions in response to airway inflammation. *Immunol Cell Biol* 2001;79(2):160-164.
198. Sparrow MP, Omari TI, Mitchell HW. The epithelial barrier and airway responsiveness. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73(2):180-190.
199. Holtzman MJ. Arachidonic acid metabolism in airway epithelial cells. *Annu Rev Physiol* 1992;54:303-329.
200. Matsumoto K, Aizawa H, Takata S, Koto H, Inoue H, Hara N. Cultured epithelial cells release cyclooxygenase-dependent and cyclooxygenase-independent factors that inhibit cholinergic contraction of canine airway smooth muscles. *Respiration* 1996;63(4):205-212.
201. Hill EM, Eling T, Nettekheim P. Changes in expression of 15-lipoxygenase and prostaglandin-h synthase during differentiation of human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18(5):662-669.
202. Kowalski ML, Pawliczak R, Wozniak J, Siuda K, Poniatowska M, Iwaszkiewicz J, Kornatowski T, Kaliner MA. Differential metabolism of arachidonic acid in nasal polyp epithelial cells cultured from aspirin-sensitive and aspirin-tolerant patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(2 Pt 1):391-398.
203. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: Which, where, how, and why? *J Clin Invest* 1997;100(9):2146-2152.
204. Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J, Stamler JS. The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149(2 Pt 1):538-551.
205. Watkins DN, Peroni DJ, Basclain KA, Garlepp MJ, Thompson PJ. Expression and activity of nitric oxide synthases in human airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;16(6):629-639.
206. Göğebakan B. İnsan yapımı nanopartiküllerin kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan bireylerin bronş epitel hücrelerinin inflamasyonu, hücre yaşam döngüsü ve apoptozisine etkisi. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı. Gaziantep: Gaziantep Üniversitesi; 2012. p. 90.

207. Bayram H, Gögebakan B. Primer akciğer hücre kültür modelleri. İstanbul: Toraks Kitapları; 2011.
208. Devalia JL, Sapsford RJ, Wells CW, Richman P, Davies RJ. Culture and comparison of human bronchial and nasal epithelial cells in vitro. *Respir Med* 1990;84(4):303-312.
209. Bayram H, Devalia JL, Sapsford RJ, Ohtoshi T, Miyabara Y, Sagai M, Davies RJ. The effect of diesel exhaust particles on cell function and release of inflammatory mediators from human bronchial epithelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18(3):441-448.
210. Knobloch J, Sibbing B, Jungck D, Lin Y, Urban K, Stoelben E, Strauch J, Koch A. Resveratrol impairs the release of steroid-resistant inflammatory cytokines from human airway smooth muscle cells in chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharmacol Exp Ther*;335(3):788-798.