



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PULMONER AMFİZEMDE LİZİL OKSİDAZ
ENZİMLERİNİN SENTEZİNDEKİ DEĞİŞİMLER**

Neziha BEŞİKTEPE

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Programı

Danışman

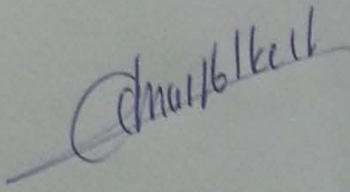
Prof. Dr. Füsun ÖZTAY

Mart, 2016

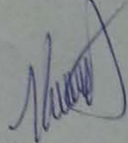
İSTANBUL

Bu çalışma 04/03/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

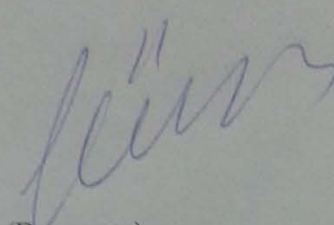
Tez Jürisi:



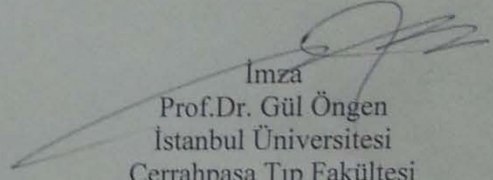
İmza
Prof.Dr. Şehnaz Bolkent
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



İmza
Prof.Dr. Kadir Turan
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



İmza
Prof.Dr. Füsün Öztay (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



İmza
Prof.Dr. Gül Öngen
İstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi



İmza
Doç.Dr.Selda Gezginci Oktayoğlu
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 47811 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

2013 Eylül'ünde başladığım yüksek lisans öğrenimim boyunca bana, bilgi birikimiyle, tecrübeleriyle kısacası tüm imkânlarıyla yol gösteren ve bu güzel çalışmanın meydana gelmesinde çok büyük payı olan, bana her anlamda danışmanlık yapan sayın hocam Prof. Dr. Füsün Öztay'a sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca insan akciğer örneklerini temin eden Uzm. Dr. Ezel Erşen'e ve bu iş birliğinin kurulmasını sağlayan Prof. Dr. Gül Öngen'e çok teşekkür ederim. Tez çalışmam boyunca tecrübeleriyle bana destek olan sayın hocalarım Doç. Dr. Selda Gezginci-Oktayoğlu'na ve Yrd. Doç. Dr. Serap Sancar-Baş'a çok teşekkür ederim. Ayrıca laboratuvarında bize çalışma imkânı sağlayan sayın Doç. Dr. Ömür Bulan'a çok teşekkür ederim.

Tüm yaptığım çalışmalar esnasında birlikte aynı laboratuvarlarda çalıştığım dönem arkadaşım ve can dostum Biyolog Merve Erçin'e, aynı ekipte bulunduğumuz yakın arkadaşlarım Biyolog Merve Yıldırım'a ve Uzm. Biyolog Özgecan Kayalar'a benim için yaptıkları her türlü destekten dolayı çok teşekkür ederim. Onların varlığı benim için her zaman motivasyon kaynağı olmuştur ve olmaya da devam edecektir.

Akademisyenlik kariyerimin ilk ve önemli adımlarından biri olan yüksek lisans çalışmam esnasında maddi manevi destekleri nedeni ile canım aileme çok teşekkür ederim. Son olarak tüm bu zaman boyunca ondan en büyük moral desteğini gördüğüm ve sevgisiyle beni ayakta tutan, tutmaya da devam edecek olan Necati Erhan Ünyeli'ye çok teşekkür ederim.

Mart, 2016

Neziha BEŞİKTEPE

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	vi
SİMGE VE KISALTIMA LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
SUMMARY	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	9
2.1. PULMONER AMFİZEM	9
2.1.1. Pulmoner Amfizemin Sınıflandırılması	9
2.1.2. Pulmoner Amfizemin Moleküler Mekanizması	10
2.2. ELASTİK FİBRİLLER	13
2.3. LİZİL OKSİDAZLAR	14
2.4. HIF-1 α ve HİPOKSİK SİNYALLEME	16
2.5. COMMD1	17
2.6. PTEN	18
3. MALZEME VE YÖNTEM	19
3.1. DOKULARIN TEMİN EDİLMESİ VE SINIFLANDIRILMASI	19
3.2. AMFİZEMLİ ve AMFİZEMLİ OLMAYAN AKCİĞER DOKU ÖRNEKLERİNİN TESPİTİ	19
3.3. BİYOKİMYASAL ANALİZLER	20
3.4. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZLER	22
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	24
4. BULGULAR	25
4.1. MİKROSKOBİK BULGULAR	25
4.1.1. Histolojik Bulgular	25
4.1.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	30
4.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	41

KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	63

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 1.1:** Çalışmada öngörülen hipotez şematize edilmiştir.....7
- Şekil 2.1:** Elastik fibril biyosentezi (Kielty ve diğ., 2002’den değiştirilerek hazırlanmıştır).....14
- Şekil 4.1:** Amfizemli olmayan insan akciğer örneğinin genel yapısal görüntüsü. Alveoller (*) ve hasarlı alveol duvarı (►) gösterilmiştir (HE).....26
- Şekil 4.2:** Amfizemli olmayan akciğer örneğinde korunmuş alveolar yapı dikkati çekmekteydi. Alveoller (*), alveolar lümendeki eritrositler (⇔) ve antrokoz alanlar(→) gösterilmiştir (HE).27
- Şekil 4.3:** Amfizemli olmayan diğer bir doku örneğinin görüntüsünde alveol lümeninde (*) bazı hücelere (⇔) rastlandı. Bu bireylerde alveolar duvar (►) yapısı bütünlüğü genelde korunmuştu (HE).....27
- Şekil 4.4:** Amfizemli insan akciğer örneğinden genel bir görünüş. Doku genelinde geniş ve büyük alveollere (*), bozulan alveollerin lümenlerinde çok sayıda eritrosite (⇔) ve dokuda lökosit infiltrasyonuna (●) rastlandı (HE).....28
- Şekil 4.5:** Amfizemli akciğer doku örneklerinde gözlenen en belirgin özellik, geniş ve büyük alveollerin (*) varlığı idi. Terminal (TB) ve respiratör bronşöller (RB) ile incelmış alveol duvarları ve alveolar duvarında kopmalar (→) gösterildi (HE).....29
- Şekil 4.6:** Amfizemli akciğer doku örneğinin bu görüntüsünde genişlemiş alveoller (*), alveollerin yapısında bozulma, alveol epitel duvarında incelmeler (→) ve alveol lümeninde eritrositler (⇔) tespit edildi (HE).....29
- Şekil 4.7:** Amfizemli akciğer doku örneğinin daha büyük büyütmede alınan bu görüntüsünde genişlemiş alveoller (*), alveol epitel duvarındaki incelmeler (→) ve alveolar alandaki eritrositler (⇔) görülmektedir (HE).30
- Şekil 4.8:** Amfizemli olmayan akciğer örneklerinde CD68 immünoaktif hücreler (→) gösterilmiştir (Mayer’s hematoksilen ile zıt boyama).31
- Şekil 4.9:** Amfizemli akciğer örneklerinde alveol lümeninde biriken CD68 immünoaktif hücreler (→) topluluğu yakınlaştırılmış olarak gösterilmiştir (Mayer’s hematoksilen ile zıt boyama).31
- Şekil 4.10:** Amfizemli olmayan akciğer dokusunda, özellikle alveol duvarında bariz olan ve lümendeki HIF-1α immünoaktif hücreler (→) gösterilmiştir (Mayer’s hematoksilen ile zıt boyama).32
- Şekil 4.11:** Amfizemli olmayan dokuda HIF-1α immünoaktif hücreler (→) alveol lümeninde daha yoğun olarak görülmektedir (Mayer’s hematoksilen ile zıt boyama).....33

Şekil 4.12: Amfizemli olmayan dokuda HIF-1 α immünoreaktif hücreler (➔) gösterilmiştir (Mayer's hematoksilen ile zıt boyama).	33
Şekil 4.13: Amfizemli olmayan dokuda HIF-1 α immünoreaktif hücreler (➔) gösterilmiştir (Mayer's hematoksilen ile zıt boyama).	34
Şekil 4.14: Amfizemli olmayan dokuda HIF-1 α immünoreaktif hücreler (➔) gösterilmiştir (Mayer's hematoksilen ile zıt boyama).	34
Şekil 4.15: Amfizemli akciğer doku örneğinde HIF-1 α immünoreaktif hücrelerin (➔) hem epitelde hem de lökositlerde yoğun olduğunu görmekteyiz (Mayer's hematoksilen ile zıt boyama).	35
Şekil 4.16: Amfizemli akciğer doku örneğinde alveol duvarlarında ve bağ dokuda HIF-1 α immünoreaktif hücreler (➔) oldukça belirgin olarak gösterilmiştir (Mayer's hematoksilen ile zıt boyama).	35
Şekil 4.17: Amfizemli akciğer doku örneğinde nükleusları HIF-1 α immünoreaktif veren hücreler(➔) gösterilmiştir. (Mayer's hematoksilen ile zıt boyama).	36
Şekil 4.18: Alveolar epitel hücrelerinde (a), bağ doku hücrelerinde (b), lökositlerde (c) ve makrofajlarda (d) nükleusları HIF-1 α immün pozitif reaksiyon veren hücre sayısı gösterilmiştir. Anlamlılık değeri (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$	36
Şekil 4.19: Amfizemli ve amfizemli olmayan akciğer örneklerinde elastin protein miktarındaki değişiklikler (a) ve elastin protein bantları (b) gösterilmiştir. Anlamlılık p değeri (***) $p < 0,001$	37
Şekil 4.20: Amfizemli ve amfizemli olmayan akciğer örneklerinde LOX (a.1), LOXL1 (b.1) ve LOXL2 (c.1) protein miktarlarındaki değişimler ve LOX (a.2), LOXL1 (b.2) ve LOXL2 (c.2) protein bantları gösterilmiştir. Anlamlılık değeri (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$	38
Şekil 4.21: Amfizemli ve amfizemli olmayan akciğer örneklerinde HIF-1 α protein miktarındaki değişiklikler (a) ve HIF-1 α protein bantları (b) gösterilmiştir. Anlamlılık p değeri (*) $p < 0,05$	39
Şekil 4.22: Amfizemli ve amfizemli olmayan akciğer örneklerinde COMMD1 protein miktarındaki değişiklikler (a) ve COMMD1 protein bantları (b) gösterilmiştir. Anlamlılık p değeri (**) $p < 0,01$	39
Şekil 4.23: Amfizemli ve amfizemli olmayan akciğer örneklerinde PTEN protein miktarındaki değişiklikler (a) ve PTEN protein bantları (b) gösterilmiştir. Anlamlılık p değeri (*) $p < 0,05$	40
Şekil 5.1: Çalışmamızın sonuçları doğrultusunda KOAH'lı hastalarda pulmoner amfizem patogenezi modellenmiştir.....	53

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: İnsanlarda, LOX protein ailesi üyelerine ait genel bilgiler (Lopez ve diğ., 2010)	15
Tablo 3.1: Akciğer doku parçaları alınan hastalara ait anamnez ve diagnoz verileri.....	20
Tablo 3.2: İmmünohistokimya (IHC) ve Western emdirim (WB) yönteminde kullanılan primer antikorlar ve kullanım şekilleri	22
Tablo 3.3: Stripping tamponu için gerekli olan malzemeler. Hazırlanan stok solüsyondan 20 ml alınarak içerisine (Etüvde inkübasyondan hemen önce)144µl 2-β-merkaptotonal ilave edilir	23
Tablo 4.1: Akciğer doku örneklerinde hasar indeksi	25

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
°C	: Santigrad derece
µl	: Mikrolitre
α	: Alfa
β	: Beta
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
N	: Normalite
ml	: Mililitre
W	: Watt
Mg	: Mikrogram
kDa	: kilodalton

Kısaltmalar	Açıklama
AAT	:Alfa-1-antitripsin
COMM1	:COMM domain bağlı-1 protein
ECM	: Ekstraselular matriks
HE	: Hematoksilen eozin
HIF-1	: Hipoksiya ile uyarılan Faktör-1
HIF-1α	: Hipoksiya ile uyarılan Faktör-1 alfa
HIF-1β	: Hipoksiya ile uyarılan Faktör-1 beta
IHC	: İmmünohistokimya
KOAH	: Kronik Obstüriktif Akciğer Hastalığı
LOX	: Lizil Oksidaz
LOXL1	: Lizil Oksidaz benzeri protein-1
LOXL2	: Lizil Oksidaz benzeri protein-2
MMP	: Matriks metalloproteinaz
NF-κB	: Nüklear faktör kappa B
PBS	: Fosfat tamponu
PI3K	: Fosfotidilinositol-3
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu
TBS	: Tris Tamponu
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
WB	:Western emdirim

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

PULMONER AMFİZEMDE LİZİL OKSİDAZ ENZİMLERİNİN SENTEZİNDEKİ DEĞİŞİMLER

Neziha BEŞİKTEPE

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Füsun ÖZTAY

Pulmoner amfizem genişlemiş alveoller, alveol duvarının yıkımı ve elastik fibril yapım ve yıkımındaki anomaliler ile karakterize edilir. Pulmoner amfizemde elastik fibril oluşum ve organizasyonundaki anomalilere yönelik araştırmalar çok yaygın değildir. Lizil oksidazlar, tropoelastin monomerleri arasında çapraz bağlar kurarak elastik fibrillerin oluşumunu ve fibrillerin bağ dokuda birikimini sağlarlar. Lizil oksidaz enzim ailesinin üyeleri (LOX, LOXL1 ve LOXL2) bakır bağımlı çalışan enzimlerdir. Bu çalışmada, lizil oksidaz enzimlerinin sentezindeki değişimler ile pulmoner amfizem patogenezi arasındaki ilişkinin açıklanması amaçlanmıştır.

Çalışmada akciğer kanseri tanısı konulan kronik obstrüktif akciğer hastalığına (KOAH) sahip hastalardan alınan akciğer dokularında amfizemli (n=10) ve amfizemli olmayan (n=6) alanlar mikroskopik yöntemlerle belirlenmiştir. Daha sonra, doku örneklerinde elastin, LOX, LOXL1, LOXL2, hipoksiya ile uyarılan faktör-1alfa (HIF-1 α), COMMD1 (bakır metabolizmasında etkili protein) ile fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) proteinlerinin miktarları Western emdirim yöntemi ile belirlendi. Ayrıca dokularda HIF-1 α aktivasyonu immünohistokimyasal olarak analiz edildi.

Pulmoner amfizemli dokularda genişlemiş alveoller, alveol duvarda incelme ve kopmalar, alveol lümeninde biriken çok sayıda makrofaj gözlemlendi. Ayrıca bu dokularda kontrol dokularla karşılaştırıldığında elastin, LOX, LOXL1, LOXL2, HIF-1 α , COMMD1 ve PTEN protein miktarlarında anlamlı bir azalma ve amfiyatöz alanlarda HIF-1 α aktivasyonunda artış tespit edildi. Pulmoner amfizemde HIF-1 α miktarındaki azalışın, aktif LOX, LOXL1 ve LOXL2 proteinlerinin miktarının azalmasına neden olduğunu ve bu azalmanın da elastik fibril biyolojisinde anomalilere yol açtığını düşünmekteyiz. Amfizemli akciğer örneklerinde miktarı azalan COMMD1 proteini

nedeni ile aktivasyonu uyarılan HIF-1 α ve yine dokuda miktarı azalan PTEN proteinleri aracılığı ile proteazların aktivasyonunun artması, hastalık patogenezinin oluşumunu sağlayabilir. Sonuç olarak aktif LOX, LOXL1, LOXL2 ile COMMD1 ve PTEN proteinlerinin miktarlarını arttırmaya yönelik yaklaşımlar, pulmoner amfizemin geriletilmesinde etkili olabilir. Dolayısıyla bu proteinleri kodlayan genler, KOAH hastalarında pulmoner amfizem gelişiminin önlenmesinde yeni hedef genler arasında gösterilebilir.

Mart 2016, 77 sayfa.

Anahtar kelimeler: Pulmoner amfizem, lizil oksidazlar, HIF-1 α , COMMD1, PTEN.

SUMMARY

M. Sc. THESIS

ALTERATION IN THE SYNTHESIS OF LYSYL OXIDASE ENZYMES IN PULMONARY EMPHYSEMA

Neziha BESIKTEPE

Istanbul University

The Institute of Graduate School of Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Fusun OZTAY

Pulmonary emphysema is characterized by enlargement alveoli, the destruction of alveolar wall and abnormalities in production and digestion of elastic fiber. Studies performed on the abnormalities in the assembly and organization of elastic fiber are not common. Lysyl oxidases provide the production of elastic fibers and their accumulation in the connective tissue, thereby installing cross-linking of each tropoelastin monomers. Members of lysyl oxidase family (LOX, LOXL1 and LOXL2) are copper-dependent enzymes. In the present study, the clarification of relationship between alterations in the expression of lysyl oxidase enzymes and pulmonary emphysema pathogenesis was aimed.

In the present study, areas with emphysema (n = 10) and without emphysema (n = 6) in the lung tissues which were removed from patients with chronic obstructive lung disease (COPD) who have lung cancer diagnosis were determined by microscopic methods. Then, protein levels of elastin, LOX, LOXL1, LOXL2, hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α), COMMD1 (an effective protein on copper metabolism) and phosphatase and tensin homolog (PTEN) were measured by Western blotting in the tissue samples. HIF-1 α activation was also analysed by immunohistochemical method in tissues.

Enlargement alveoli, thinnings and disruptions in alveolar wall and a lot of accumulated macrophages in alveolar lumen were observed in pulmonary emphysematous tissues. Furthermore, it was detected a significant decrease in elastin, LOX, LOXL1, LOXL2, HIF-1 α , COMMD1 and PTEN protein levels and an increase in HIF-1 α activation in

pulmonary emphysematous tissues comparing with control tissues. These results suggest that the reductions of HIF-1 α level in pulmonary emphysema leads to decrease activated LOX, LOXL1 and LOXL2 and this situation causes abnormalities in elastic fiber biology. In emphysematous lung samples, HIF-1 α activation induced by decreased COMMD1 protein and protease activation induced by decreased PTEN protein levels can contribute to the generation of disease pathogenesis. As a result, approaches made to increase activated LOX, LOXL1, LOXL2, COMMD1 and PTEN protein levels can be effective for the regression of pulmonary emphysema. Accordingly, genes which are coding these proteins, can be shown as new target genes for the prevention of pulmonary emphysema progression in COPD patients.

March 2016, 77 pages.

Keywords: Pulmonary emphysema, lysyl oxidases, HIF-1 α , COMMD1, PTEN.

1. GİRİŞ

Pulmoner amfizem, akciğerde artan oksidatif stres, proteaz-antiproteaz dengesizliği, pulmoner epitel ve endotel hücrelerinde apoptozun uyarıldığı ve bu değişimlere bağlı olarak alveolar alanda hasarın meydana geldiği patolojik bir durumdur. Genişleyen alveoller ve alveollerin sayısındaki azalma, akciğer elastikiyetinde kayıp, akciğerlerin hava ile şişmesi ve solunum gazlarının değişim oranının düşmesi pulmoner amfizemin tipik göstergeleridir. Pulmoner amfizemin gelişiminde organizmanın yaşı, beslenme yetersizliği, çocukluk döneminde geçirilen solunum hastalıkları, hava kirliliği, mesleki maruziyetler ve kronik sigara içiciliği oldukça etkilidir (Morris ve Sheppard, 2006). Pulmoner amfizem, sıklıkla kronik obstrüktif akciğer hastalığı (**KOAH**)'nın bir parçası olarak kabul edilmektedir. KOAH, genişlemiş alveoller ve ilerleyen alveol kaybı ile karakterize edilen amfiyatöz alanlar, kronik bronşit ve inflamasyon ile birlikte seyreder. Diğer yandan, amfiyatöz akciğer hasarı sigara içicisi olmayan insanlarda da gelişebilir. Örneğin insan bağışıklık yetmezlik virüsü-1 enfeksiyonu ya da hipersensitif pnömoni hastalarında, kronik bronşit ve astım hastalarında da görüldüğü rapor edilmiştir (Taraseviciene-Stewart ve Voelkel, 2008).

Dünya üzerinde yaklaşık olarak 600 milyon KOAH hastası bulunmaktadır. Yapılan araştırmalarda, KOAH görülme sıklığının erkeklerde daha fazla olduğu belirlenmiştir. KOAH'ın görülme sıklığı ve KOAH kaynaklı ölümler, yaşa bağlı olarak artar; 40 yaş üstü bireylerde daha fazla görülür. KOAH hastalarında ölümlerin % 20'si amfizeme, % 80'i de ağır kronik inflamasyona bağlıdır. Bu hastalarda KOAH'a bağlı ölüm nedeni olarak, solunum yetmezliği gösterilmektedir (Tuder ve diğ., 2003). Her yıl, KOAH hastalarının yaklaşık 2,7 milyonu ölmektedir. Amerika'daki hastalık kontrol ve engelleme merkezinin verilerine göre, KOAH, kanser ve kalp hastalıklarından sonra en fazla ölüme sebep olduğu için ölümcül hastalıklar arasında dördüncü sıradan üçüncü sıraya alınmıştır (Turino, 2011). Türk Toraks Derneği, ülkemizde yaklaşık 2,5-3 milyon KOAH hastası bulunduğunu ve solunum hastalıklarına bağlı ölümlerin % 61,5'nin KOAH nedeniyle olduğunu rapor etmektedir. Klinik araştırmalar ve hasta kayıtları, KOAH hastalarında 10 yıl içinde akciğer kanserine yakalanma riskinin ve buna bağlı

ölümlerin, sağlıklı akciğere sahip bireylerle karşılaştırıldığında 4-5 kat yüksek olduğunu göstermektedir (Raviv ve diğ., 2011).

KOAH'ın önemli sebeplerinden biri sigara içiciliğidir. KOAH hastalarında görülen pulmoner amfizemin nedeni olarak da sigara içiciliği gösterilmektedir. İngiliz epidemiyolojistler Fletcher ve Peto (1977), kronik bronşit ile amfizemin en önemli sebebi olarak kronik sigara içiciliği fikrini önermişlerdir. Dünyada yaklaşık 1,1 milyar insan sigara içmektedir. Ne yazık ki bu sayının 2025'de 1,6 milyardan daha fazla olması öngörülmektedir (Tuder ve diğ., 2003). Sigara içiciliğindeki bu artış, KOAH'ın görülme sıklığının artacağına sinyallerini vermektedir. Dünyada sık görülen ve ölüme sonuçlanabilen KOAH'ın tedavisi, bronkodilatör-steroit ilaçlar ve hastaya oksijen takviyesi ile sınırlıdır ve çoğunlukla hastalığın semptomlarını azaltmaya yöneliktir. Dolayısıyla daha etkili yeni tedavi yöntemlerinin bulunması, bu hastalıkla mücadelede çok önemlidir.

Pulmoner amfizemli hayvan ve insan akciğerleri üzerinde yapılan çalışmalar ile amfizem etiyojisi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmaların sonuçları sigara içiciliği, akciğerde gelişen proteaz/antiproteaz dengesizliği ve kronik inflamasyonun pulmoner amfizemin gelişiminde etkili olduğunu göstermektedir. Sigara içicisi olan insanların akciğerleri yanı sıra sigara dumanına maruz bırakılan kemirgen akciğerlerinde de amfiyatöz lezyonlar oluşur (Bartalesi, 2005). KOAH hastalarının serumlarında, bir antiproteaz olan alfa-1 antitripsin (AAT) seviyelerinin azaldığı saptanmıştır (Tuder ve diğ., 2006). AAT geni çıkarılan farelerde sigara dumanı maruziyeti sonucunda amfizem geliştiği gözlenmiştir (Liu ve diğ., 2004). Dokudaki proteazların aktivitesini kontrol eden antiproteazların miktarının azalmasının dokunun proteazlarca yıkımına neden olabileceği fikri, pulmoner amfizem gelişiminde proteaz/antiproteaz dengesizliği hipotezinin temelini oluşturmaktadır. Proteazların pulmoner amfizem oluşumundaki etkisi deneysel hayvan modelleri üzerinde test edilmiştir. Hayvanlara intratrakeal yoldan elastaz ya da papain gibi matriks azaltıcı enzimlerin verilmesi sonrasında amfiyatöz lezyonların meydana geldiği gözlenmiş ve akciğerde elastik fibril yıkımı ile genişleyen alveollerin oluşumu arasındaki ilişki açıklanabilmiştir (Kawakami ve diğ., 2008; Antunes ve Rocco, 2011). Sigara dumanı solutulan hayvanların akciğerinde proteaz miktarında artışın olduğu birçok çalışmada

ortaya konmuştur. Ayrıca, proteazlarca dokuda meydana gelen yıkımının ve sigara dumanının, akciğerde başta nötrofiller olmak üzere makrofaj ve T hücreleri gibi diğer inflamatuvar hücrelerin alveolar alanlara infiltrasyonunu uyardığı ve amfiyatöz lezyonların geliştiği saptanmıştır (Sharafkhaneh ve diğ., 2008). Böylelikle proteaz/antiproteaz dengesizliği yanı sıra akciğerde uyarılan inflamasyonun da amfizem gelişimine katkı sağladığı anlaşılmıştır. Tudor ve diğ. (2006), inflamatuvar hücrelerin birer proteaz kaynağı olduklarını ve pulmoner amfizem patogenezinde etkili olduklarını söylemektedirler. Diğer yandan KOAH hastalarının akciğerlerindeki amfiyatöz alanlarında, alveolar duvar hücrelerinin apoptoz ile öldükleri tespit edilmiştir. Bu çalışmada alveolar epitel hücrelerinde görülen apoptozun, sigara içen ve sigara içicisi olmayan sağlıklı bireylere göre oldukça fazla olduğu belirtilmektedir (Yokohori ve diğ., 2004). Sigara dumanı solutulan fareler üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda, proteazların hedefi haline gelen alveolar epitel hücrelerinde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve reseptörünün inaktivasyonuna bağlı olarak apoptozun arttığı ve bunun sonucu olarak da amfizemin oluştuğu tespit edilmiştir (Tang ve diğ., 2004; Petrache ve diğ., 2005). Ayrıca, transgenik fareler üzerinde yapılan çalışmalarda elastik fibrillerin sentezlenememesi durumlarında da pulmoner amfizemin gelişebileceği rapor edilmektedir. Örneğin *fibulin-5* geni çıkarılan farelerde akciğer gelişiminde elastik fibrillerin oluşmaması nedeniyle amfiyatöz alanlar meydana gelmektedir (Liu ve diğ., 2004). *Elastin* geni çıkarılan farelerde de hava yollarında meydana gelen yoğun genişlemeler sonucunda erken ölümlerin olduğu saptanmıştır (Tudor ve diğ., 2003). Sigara içiciliğinin etkisiyle akciğerde artan proteaz/antiproteaz dengesizliği, inflamasyon, oksidatif stres, değişen matriks remodellenmesi, apoptoz ve elastin biyogenezindeki anomaliler, KOAH etmenleri arasında yer alır. Tüm bu süreçler KOAH'ın patogenezinin oluştururken birbirlerinden bağımsız değildir. Bu süreçlerin oluşum ve gelişiminde hepsinin birbiri ile etkileşimi söz konusudur (Demedts ve diğ., 2006). Pulmoner amfizemde yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde, hastalığın oluşum aşamalarının bilinmesi oldukça önemlidir. Ayrıca deneysel çalışmalardan elde edilen verilerin, klinik çalışmalar ile desteklenmesi gerekir. Çünkü oluşturulan deneysel pulmoner amfizem veya pulmoner amfizemin eşlik ettiği KOAH modellerinde hastalık patogenezinde bazı farklılıklar vardır. Deneysel pulmoner amfizem modelleri, insanda meydana gelen pulmoner amfizemin tüm karakteristik özelliklerini sıklıkla gösterememektedir. Bu hastalığın patogenezinin baktığımızda, sigara içimiyle reaktif

oksijen türlerinin ve proteolitik enzimlerin salınımıyla inflamatuvar hücreler alveolar alanlarda birikir ve bu da akciğerlerde matriks yıkımına ve hücre ölümlerine neden olur. Buna rağmen, çeşitli hayvan modellerinde, amfizem gelişimi boyunca inflamasyonda azalma olduğu, ancak alveolar hücrelerde ve endotelial hücrelerde ölümün fazla olduğu rapor edilmiştir (Tuder ve diğ., 2003). Hayvanlar ve insanlardaki pulmoner amfizem patogenezi arasında görülen bu farklılıklar göz önüne alındığında, amfizemli insan akciğerlerinden elde edilen bulguların hastalık patogenezini anlamada ve yeni tedavi yaklaşımlarının önerilmesinde oldukça değerli olduğu söylenebilir.

Bugüne kadar yapılan deneysel çalışmalarda, çeşitli antioksidan, antiapoptotik, proteaz/antiproteaz dengesizliğini azaltan moleküllerin kullanımı ile pulmoner amfizem tedavisinde iyi sonuçlar elde edilse de, bu moleküllerin çoğu klinikte test edilmemiştir. Son zamanlarda pulmoner amfizemin tedavisinde “elastik fibril yıkımının önüne geçilmesinin” bu hastalıkla mücadelede önemli olduğu düşünülmektedir. Elastik fibrillerin esas proteini elastindir. Elastin proteininin elastazlarca sindirimi elastik fibrillerin yıkımına neden olur. Elastazın intratrakeal olarak uygulanmasıyla pulmoner amfizem oluşturulan hayvan modellerinde, elastik fibril yıkımı, alveolar yapıda bozulma ve gaz değişiminde azalma meydana geldiği tespit edilmiştir (Griffiths ve diğ., 1993). Sigara içimi akciğerlerde nötrofil sayısını artırır ve nötrofil elastazların salınımını uyarır (Sharafkhaneh ve diğ., 2008). Salınan nötrofil elastazlar, AAT azlığı nedeniyle inhibe edilemez ve artan proteolitik aktiviteye bağlı olarak elastik fibrillerin yıkımını gerçekleştirerek amfizem oluşumunu sağlarlar. Fera ve diğ. (1986) sağlıklı gönüllüler ile yaptıkları çalışmada, sigara içiminin bu bireylerin bronşyoalveolar sıvılarında nötrofil elastaz miktarını arttırdığını bulmuştur. Ayrıca AAT geni çıkarılan hayvanlarda makrofajlardan salınan elastazların, kronik sigara dumanı maruziyeti sonucu akciğerlerde amfiyatöz alanların oluşumuna katkı sağladığı tespit edilmiştir (Hautamaki ve diğ., 1997). Deneysel olarak pulmoner amfizemin uyarıldığı sıçanlar ve farelerde, elastaz aktivitesinin baskılanması ile elastik ve kollagen fibril sentezinin hızla tekrar başladığı ve alveolar alandaki yapısal hasar derecesinin azaltılabileceği gösterilmiştir (Sharafkhaneh ve diğ., 2008). Bu veri, daha önceleri geri dönüşümsüz olarak tanımlanan amfizemin aslında geri dönüşümlü olabileceğini gösterir. Ancak bu iyileşme yaşa, beslenmeye ve yaşam koşullarına bağlı olarak değişebilir.

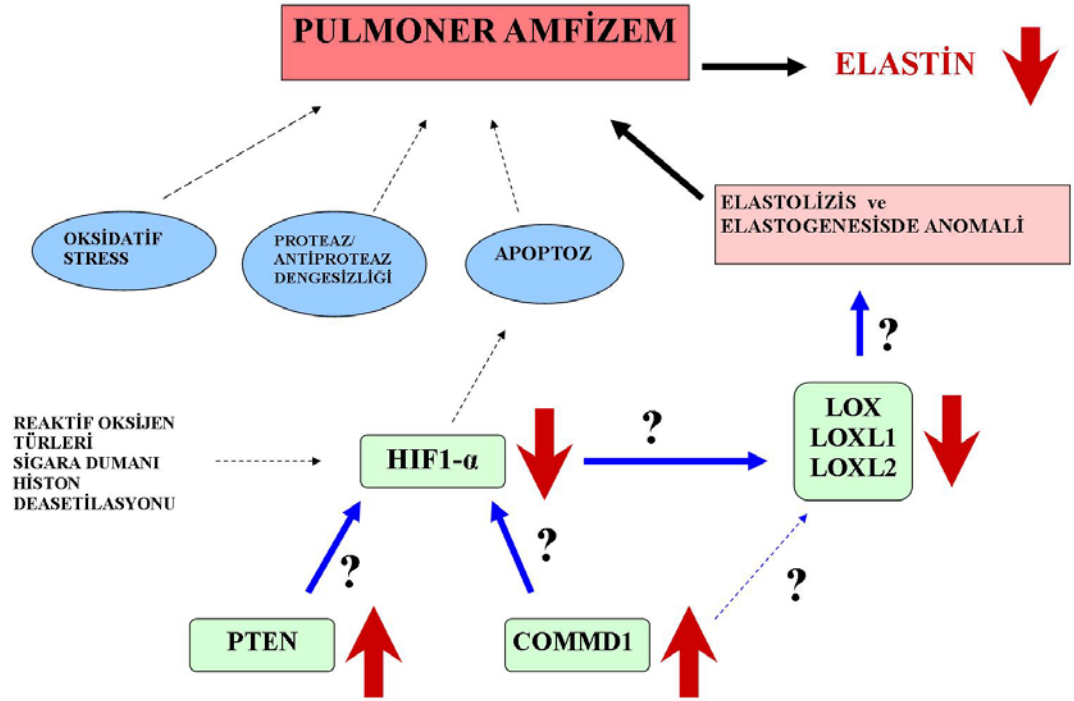
Elastik fibriller, tropoelastin monomerlerinin bir araya gelmesiyle oluşan elastin proteinden oluşan bir öz ve onu çevreleyen mikrofibrillerden meydana gelir (Kielty ve diğ., 2002). Komşu tropoelastin molekülleri rastgele bir araya toplanır ve daha sonra monomerler arasında lizil oksidaz (**LOX**) ailesine ait enzimler tarafından çapraz bağlar kurularak elastin polimerleri oluşturulur (Kielty ve diğ., 2002; Mithieux ve Weiss, 2005; Kielty, 2006). LOX'lar bakır bağımlı çalışan amin oksidazlardır. Sıçanlarla yapılan deneysel çalışmalarda hayvanların bakır eksik diyetle beslenmesi sonrasında pulmoner amfizemin geliştiği saptanmıştır (O'Dell ve diğ., 1978). Sıçanlarda ve hamsterlarda, bakır eksik diyetle beslenildiğinde akciğerlerde amfiyatöz alanlar geliştiği rapor edilmiştir (O'Dell ve diğ., 1978; Soskel ve diğ., 1984). *Lizil oksidaz benzeri protein-1 (LOXLI)* geni eksik sıçan fibroblast hücrelerinde elastik fibril birikimi gerçekleşmemektedir (Thomassin ve diğ., 2005). KOAH'ın en önemli nedenlerinden biri olan sigara içimi ile *LOX* geninin ekspresyonu baskılanır, buna bağlı olarak da *LOX* enzim miktarı azalır ve akciğerlerde amfizemin gelişir (Li ve diğ., 2011). Kida ve Thurlbeck (1980), genç farelerde *LOX* inhibisyonu sonucu amfiyatöz lezyonlar tespit edildiğini rapor etmişlerdir. İnsanlarda pulmoner amfizem gelişiminde *LOX* ailesine ait enzimlerin etkili olduğuna dair herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, *LOX* ailesine ait enzimlerin pulmoner amfizem patogenezindeki etkileri KOAH hastalarında araştırılmıştır.

LOX geninin ekspresyonundan sorumlu olan en önemli transkripsiyon faktörü, hipoksiya ile uyarılan faktör-1 (**HIF-1**) proteindir. HIF-1, iki alt ünitenin (HIF-1 alfa ve beta: **HIF-1 α** ve **HIF-1 β**) birleşmesi ile oluşan heteromerik bir proteindir. *LOX* promotörü analiz çalışmalarında, bu promotör bölgenin evlasyonel gelişim sürecinde oldukça iyi korunduğu ve sıçan, fare ve insan *LOX* gen ekspresyonunun kontrolünün benzer olabileceği ileri sürülmektedir (Pez ve diğ., 2011). Sıçanlarla yapılan çalışmanın sonuçlarına göre, sigara dumanı ile histon deasetilazın inhibisyonu *p53* gen ekspresyonunu artırır. *P53* ekspresyonunun artması HIF-1 α 'nın ekspresyonunu azaltır. Yetersiz HIF-1 aktivasyonu, *LOX* geninin transkripsiyonunu bozar. Böylece elastin ve kollagenin çapraz bağlanması bozulur ve akciğer dokusunda meydana gelen hasar sonucu amfizem gelişir (Mizuno ve diğ., 2010). Diğer yandan KOAH hastalarında HIF-1 α 'nın akciğer dokusunda miktarının azaldığı gösterilmiştir (Yasuo ve diğ., 2011). Ayrıca bakır eksikliği nedeniyle gelişen amfizemin oluşumunda, HIF-1 α 'nın

aktivasyonundaki bozulma sonucu HIF-1 α hedef genlerinin ekspresyonundaki azalmanın etkili olduğu ileri sürülmüştür (Mizuno ve diğ., 2012).

HIF-1 α proteinin sentezi, fosfotidilinositol-3-kinaz (**PI3K**) hücre içi sinyal yolağı ile kontrol edilir. Çeşitli kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, PI3K oluşumunu engelleyen tümör baskılayıcı fosfataz ve tensin homologunun (**PTEN**, PI3K/Akt sinyal yolu inhibitörü) hücrelerde uyarılmasıyla, hücrelerde HIF-1 α birikiminin azaldığı ifade edilmektedir (Zundel ve diğ., 2000). Ayrıca, *PTEN* geni eksik gliyobilastoma hücrelerinde, PTEN eksikliği nedeniyle PI3K/Akt sinyal yolunun uyarıldığı ve buna bağlı olarak HIF-1 α seviyesinin arttığı rapor edilmektedir (Jiang ve diğ., 2001). Bu çalışmaların sonuçları, PTEN'nin PI3K/Akt sinyal yolu üzerinden HIF-1 α sentezini kontrol edebileceğini açıkça göstermektedir. Diğer yandan, yine çeşitli kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, COMM domain-bağılı 1 (**COMMD1**) proteininin HIF-1 α ve β dimerizasyonuna engel olarak, HIF-1 proteininin aktivitesini azalttığını ve DNA'ya bağlanmasını engellediğini ortaya koymaktadır (Wang ve diğ., 1995). Farelerde yapılan bir çalışmada COMMD1'in hipoksiya varlığında HIF-1 α 'yı azaltarak HIF-1 aktivasyonunu düzenlediği gösterilmiştir. Ayrıca yapılan tümör çalışmalarına göre COMMD1, HIF-1 α 'yı inaktive ederek tümör invazyonunu etkilediği gösterilmiştir (Van de Sluis ve diğ., 2010).

Yukarıda bahsedilen deneysel çalışmaların verilerine dayanarak, çalışmamızda, aktif LOX, LOXL1 ve lizil oksidaz benzeri protein-2 (**LOXL2**) proteinlerinin ekspresyonlarındaki değişimlerin, insanlarda pulmoner amfizem gelişiminde etkili olup olmadıkları ilk kez araştırılmıştır. Aktif LOX, LOXL1 ve LOXL2 proteinlerinin seviyelerindeki azalmaların elastik fibril biyogenezini bozarak, sigara içicisi insanlarda pulmoner amfizem oluşumuna katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz (**Şekil 1.1:**).



Şekil 1.1: Çalışmada öngörülen hipotez şematize edilmiştir. Sigara içicisi olan insanlarda HIF-1 α protein miktarındaki azalma, akciğerde aktif LOX, LOXL1 ve LOXL2 proteinlerinin miktarında azalmaya neden olur ve elastik fibril biyogenezinde meydana gelen aksamlar sonucunda pulmoner amfizem gelişebilir. LOX enzim ailesinin ekspresyonlarını kontrol eden HIF-1 α protein miktarındaki azalmadan dokuda miktarı artan COMMD1 ve PTEN proteinleri sorumlu olabilir.

Çalışmamızın amaçları ve çıktıları şöyle sıralanabilir.

Amaçlar:

- Amfizemli insan akciğerinde LOX, LOXL1 ve LOXL2 proteinlerinin miktarındaki değişimleri saptamak ve pulmoner amfizem patogeneğinde etkili olup olmadıklarını test etmek.
- İnsanlarda pulmoner amfizemde elastik fibril anomalilerinden sorumlu olduğunu düşündüğümüz aktif LOX, LOXL1 ve LOXL2 proteinleri ile HIF-1 α proteinleri arasındaki biyolojik ilişkiyi açıklamak.
- Pulmoner amfizemde, COMMD1 ve PTEN proteinlerinin miktarlarını belirlemek ve bu proteinler üzerinden HIF-1 α sentezindeki muhtemel değişimleri açıklamak.

- Yukarıdaki amaçlar doğrultusunda, pulmoner amfizemin tedavisinde kullanılabilecek yeni moleküller önermek.

ıktılar:

Pulmoner amfizemde, alveoller esnekliklerini kaybederler, içlerindeki hava gerektiği gibi dışarı atılamaz ve akciğerler şişer. Amfizemin en önemli nedeni sigara kullanımınıdır. Bu nedenle dünyada sıkça görülen hastalıklar arasında yer almaktadır. Günümüzde amfizemin iyileştirilmesinde kullanılan kesin bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Çalışmamızda, amfizemli insan akciğer örneklerinde aktif LOX, LOXL1 ve LOXL2 enzimlerinin protein miktarlarındaki değişimler araştırılacaktır. Ayrıca bu değişimlerin nedeni, HIF-1 α , COMMD1 ve PTEN proteinlerinin sentezleri incelenerek açıklanmaya çalışılacaktır. Böylece insanlarda pulmoner amfizemin tedavisine yönelik yeni hedef moleküllerin ve tedavi yaklaşımlarının önerilmesi mümkün olacaktır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. PULMONER AMFİZEM

Patolojik olarak genişlemiş hava boşlukları yanı sıra alveol duvarında meydana gelen hasar ve kayıpla karakterize edilen pulmoner amfizem, insanlarda ilk olarak 17. yüzyılın sonunda Amsterdam'da Ruysch tarafından tanımlanmıştır. Ayrıca 19. yüzyılda Fransız doktor Laennec tarafından otopsi çalışmaları sonrasında şu şekilde bir not alınmıştır: “Hava keseleri çok çeşitli boylarda olabilir; darı tohumundan daha küçük ya da bir vişne çekirdeğinden yada fasulye tanesinden daha büyük gibi. Büyük boydaki hava keseleri alveolar duvarların bozulmasını takiben komşu alveollerin birleşmesiyle oluşur” (Taraseviciene-Stewart ve Voelkel, 2008). Pulmoner amfizemin patolojisini açıklamaya yönelik araştırmalar 1950’li yıllarda başlar. İlk öne sürülen hipotez, dokuda gelişen elastaz/antielastaz dengesizliğinin pulmoner amfizeme neden olduğu ile ilgilidir ve 1960’lı yıllardan itibaren detaylı olarak araştırılmaya başlanmıştır. Günümüzde ise elastik fibril yıkımı yanı sıra birbiri ile ilişkili olan birçok etmenin (oksidatif stres, hücre ölümü, inflamasyon ve artan proteaz aktivitesi gibi) pulmoner amfizem patogenezinde aktif rol oynadığı bilinmektedir.

2.1.1. Pulmoner Amfizemin Sınıflandırılması

Pulmoner amfizem, insanlarda sekonder pulmoner loblardaki amfimatöz alanların dağılımına göre sentriasinar, panasinar, distal asinar ve irregular (düzensiz) amfizem olarak 4 alt grupta sınıflandırılır (Stren ve Frank, 1994).

Sentriasinar amfizem, respiratör bronşioollerin genişlemesiyle karakterize edilir ve pulmoner amfizemin en yaygın görülen tipidir (Leopold ve Gough, 1957). Sentriasinar

amfizem gelişiminin sigara içiciliği ile sıkı bir ilişkisi olduğu düşünülmektedir (Satoh ve diğ., 2001).

Panasinar amfizem, sekonder lobüllerdeki eşit dağılmış amfimatöz değişimlerle sonuçlanan, respiratör bronşiollelerinden alveollere doğru uzanan hava yollarının tek düze genişlemesiyle karakterize edilir (Thurlbeck, 1995). Panasinar amfizemin en büyük etmenlerinden biri olarak AAT eksikliği gösterilmektedir (Eriksson, 1965). Sentriasinar amfizem akciğerlerin üst kısımlarında görülmesine karşın, panasinar amfizem yaygın olarak akciğerlerin alt kısımlarında gözlenir (Thurlbeck, 1963).

Distal asinar ya da paraseptal amfizem, lobüllerin periferinde genişlemiş hava boşlukları ile karakterize edilir (Thurlbeck, 1995). Akciğerlerin üst kısımlarında dorsal yüzeyleri boyunca rastgele meydana gelen distal asinar amfizem, sıklıkla fibrozis ve diğer amfizem tipleri ile ilişkilidir.

İrregüler pulmoner amfizemin lobüllerdeki tutulumu düzensiz olduğundan “irregüler” amfizem olarak adlandırılır. Ayrıca bu amfizem çeşidi pulmoner fibrozis ile birlikte çok sık görülür.

2.1.2. Pulmoner Amfizemin Moleküler Mekanizması

Proteazlar, akciğer ekstrasellular matriks (ECM) proteinlerini enzimatik olarak yıkarken, antiproteazlar da proteazların aktivitesini düşürerek bu yıkıma karşı koruma sağlayan proteinlerdir. Gerek klinik gerekse pulmoner amfizemli deneysel hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda, proteaz ve antiproteaz dengesizliğinin rolü detaylı olarak araştırılmış ve amfizemli dokuda proteaz miktarı ve proteaz aktivitesindeki artışın, antiproteazlarca tolere edilememesinden dolayı, doku yıkımına neden olduğu ortaya konulmuştur. Araştırmalarda elastaz, çeşitli matriks metalloproteinazlar (MMP) ve katepsinler öne çıkan proteazlardandır. Ayrıca amfimatöz dokularda kaspazların aktivitelerinde de bir artışın olduğu bu araştırmalarda rapor edilmiştir. Bu da proteaz/antiproteaz dengesizliğinin beraberinde alveolar septal hücrelerdeki ölümlerinin de pulmoner amfizem patogenezinin katkı sağladığını

göstermektedir. İnflamatuar hücrelerinden salınan proteazların aktivitesi, alveolar duvardaki hücrelerde bulunan proteazlar doku onarımının devamında yapıyı işgal ederken, antiproteazları inhibe eder ve sonrasında nötrofil ve makrofaj elastazlar sonradan kazanılan bağışıklığın bir parçası olarak proteaz aktivitesine katılır. Amfizemde ve amfizem modellerinde elastik fibril ve kollagen yıkımının artarak akciğer doku hasarına neden olduğu rapor edilmiştir. Daha önce söylendiği gibi alveolar alandaki makrofajlar, endotelial hücreler ve epitelial hücrelerde proteaz aktivitesinin artışı, oksidatif stres, kaspaz bağlı ve bağlı olmayan hücre ölümü ile yakından ilişkilidir. Örneğin, amfizemin kemirgenler ile oluşturulmuş modelinde, kaspaz ve MMP inhibitörleri ve AAT gibi antioksidanlar hücre ölümünü inhibe ettiği rapor edilmiştir (Tuder ve diğ., 2003). Bu çalışma grubu ayrıca, AAT'nin proteoliziz/oksidatif stres/hücre ölümü döngüsünü durdurabileceğini ve kemirgenlerde deneysel amfizeme karşı koruyabileceğini bu araştırma ile söylemişlerdir. Bu teoriyi destekleyecek şekilde, AAT eksikliği olan bireylerde sigara içimi sonucu amfizem geliştiği görülmüştür. Karaciğerde sentez edilen, serum ve dokularda yaygın olarak bulunan AAT, nötrofillerden salgılanan proteazların major inhibitörüdür (Husein, 2005; Wright ve Churg, 2006). AAT eksikliği ile ilişkili en yaygın fenotipli bireylerin % 80'inde erken yaşta, sigara içimiyle birlikte şiddeti artan semptomatik amfizem gelişmektedir. Aynı zamanda proteaz/antiproteaz dengesizliği akciğer de yapısal hücrelerin ya da inflammatuar hücrelerinin ortama çeşitli proteazlar salgılamasını tetikler. Sigara dumanındaki organik fazlar ve gazlardaki oksidantların yüksek seviyeleri inflamasyonu ve proteaz aktivitesini arttıran etmenlerdir. Hücresel sinyalizasyonlar, antiproteaz fonksiyonu, hücre ölümü ve hücre çoğalması oksidatif strese bağlıdır. Normalde, süperoksit dismutaz ve glutatyon gibi antioksidanların desteğiyle akciğerdeki oksidatif hasar minimumda tutulur. Sigara dumanı bu antioksidan mekanizmaları tüketmekle kalmaz, dumanda bulunan serbest radikaller de doku yıkımına yol açar (MacNee, 2005).

Amfizemde hücre ölümüyle birlikte elastik fibril yapım ve yıkımındaki anomaliler baskındır. Örneğin proteaz/antiproteaz hipotezini destekleyici şekilde elastini yıkan proteolitik enzim papainin intratrakeal enjeksiyonunun ardından amfizem geliştiği rapor edilmiştir (MacNee, 2003). Akciğerdeki nötrofil sayısını arttıracak ya da elastaz içeren granüllerini salgılayacak herhangi bir uyarı elastolitik aktiviteyi uyarabilir ve bunun sonucunda amfizem gelişimi görülebilir. Elastik fibrillerin yıkımından AAT eksikliği

olanlarda öncelikli olarak nötrofillerdeki elastaz sorumluyken, sigara ile ilişkili pulmoner amfizemde makrofajlardan salınan proteazlar da önemli rol oynar (Wright ve Churg, 2006). Fareler ile oluşturulan bir deney grubunda potansiyel elastolitik proteaz olan makrofaj MMP-12'nin artmış olması amfizem ile ilişkili olduğu göstermiştir (Woodruff ve diğ., 2005). Makrofaj MMP-12'in genetik delesyonu farelerle yapılan bir başka amfizem modellemesinde amfizem oluşumunu zayıflatmıştır (Hautamaki ve diğ., 1997). AAT degradesyonu ile MMP-12'in elastolizisin gelişiminde oldukça etkili olduğu gösterilmiştir ve böylece nötrofil elastazlarında lokal aktivitesinin artışı tetiklenmiştir (Shapiro ve diğ., 2003). Ayrıca MMP-12 diğer matriks metalloproteinazların ve proinflamatuvar sitokin tümör nekroz faktör- α 'ın aktivasyonunda da kritik rol oynar. Öte yandan, nötrofil elastaz, MMP-12, katepsin S ve MMP-9 (Gelatinaz B) amfizemin hayvan modellerinde araştırılmıştır. Katepsin S intraselüler proteolizide etkili olan lizozomal sisteinal endopeptidazların bir üyesidir. Katepsin S'in öncelikli kaynağı aktif makrofajlardır. Deneysel modellemelerde katepsin S'in genetik delesyonunun amfizemi zayıflatmış olduğu söylenmiştir (Zheng ve diğ., 2000). MMP-9'da, özellikle tip IV ve tip V kollagenlerin degrades eden elastolitik ekstraselüler kollagenazdır. MMP-9'un artışının amfizeme yol açtığı çeşitli hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. Ohnishi ve diğ. (1998) normal akciğer ve amfiyatöz akciğerlerde yaptıkları karşılaştırma ile alveolar makrofajlar ve alveolar septal hücrelerde diğer bir metalloproteinaz olan MMP-2 (Gelatinaz A)'nin arttığını rapor etmişlerdir. Yapılan deneyler, normal akciğerler ile amfizemli akciğer örneklerinin karşılaştırıldığında MMP'lerin amfizemde arttığını göstermektedir. İmmünohistokimyasal olarak MMP'lerin endotel, epitel ve inflamatuvar hücrelerde artışı gösterilmiştir (Bergeron ve Boulet, 2006; Sziası ve diğ., 2006).

Bunun yanı sıra ortamda bulunan CD8⁺ T hücrelerinin, alveol epitelinde apoptozise yol açarak ya da makrofajların toplanmasını sağlayarak, elastik fibrillerin yıkım sürecine katıldığı düşünülmektedir. Sigara dumanının olasılıkla VEGF reseptörlerini inhibe ederek endotel fonksiyonlarını bozduğu ve böylelikle apoptozise yol açtığı söylenmektedir. Sigara içimi sonucu, nikotin direkt olarak kemoatraktan etkisiyle nötrofil ve makrofajları ortama çekerken, sigara dumanında bulunan reaktif oksijen türevleri de inflamasyona katkı sağlar (Kanazawa ve diğ., 2003).

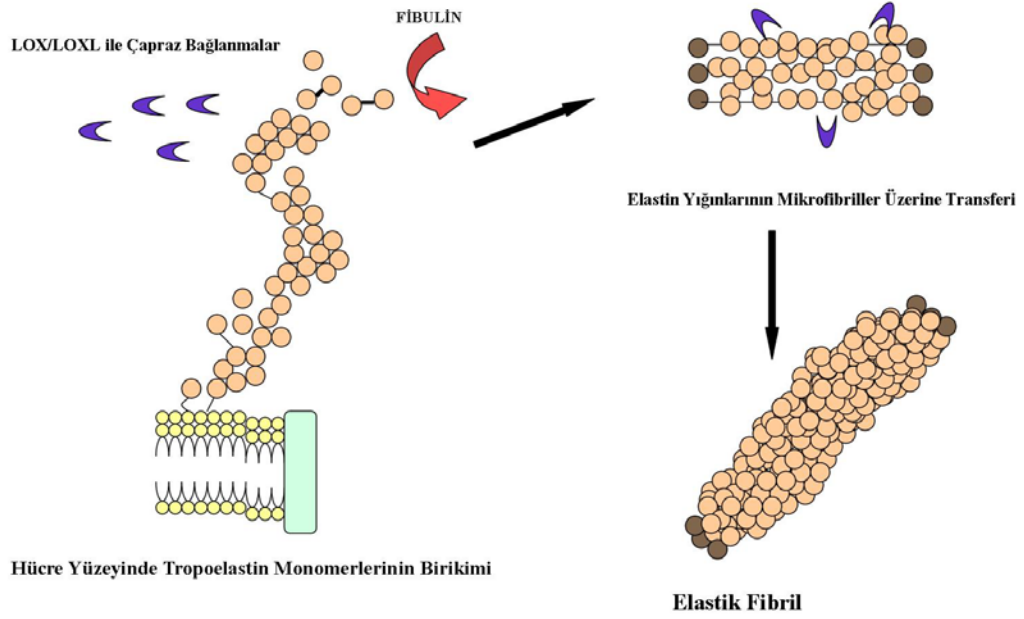
2.2.ELASTİK FİBRİLLER

Elastik fibriller, akciğerlerde alveol cidarlarında, atardamar duvarında, deride ve idrar kesesi stromasında yaygın olarak bulunur. Elastik fibriller, bulunduğu organlarda esnekliği sağlayarak organların normal fizyolojik fonksiyonlarını devam ettirmesine yardımcı olur. Elastik fibril kaybına bağlı olarak dokuda gelişen elastikiyet kaybı, yaşlanmaya, amfizeme, bazı damar ve deri hastalıklarına neden olur.

Elastik fibriller, elastin proteininden oluşan amorf bir öz ve elastin birikimi için gerekli yapı iskeletini oluşturan mikrofibrillar proteinlerden oluşur (Cleary ve Gibson, 1996). Elastin proteini, ECM'de bulunan elastik fibrillerin en önemli yapısal proteinidir. Hidrofobik protein olarak bilinen elastin, lizin artıklarındaki yaygın çapraz bağlanmalar nedeniyle yoğun, çözülmez bir protein halini alır. İnsanlarda, elastinin tüm amino asit sekanslarının % 70'i hidrofobik amino asitler olan glisin, valin, alanin ve prolinden meydana gelir ve amino asit artıklarının % 30'undan fazlası glisin artıklarıdır. Elastin, akciğerlerde % 3-7, aort ve büyük kan damarlarında % 28-32, bağ dokuda yaklaşık olarak % 50, tendonlarda % 4 ve deride % 2 oranında bulunur (Vrhovski ve Weiss 1998; Debelle ve Tamburro, 1999). Akciğerlerde ve diğer organlarda elastin proteini fibroblastlar, miyofibroblastlar, mezotelial hücreler, endotelial hücreler, düz kas hücreleri ve kondroblastlar tarafından üretilir. Akciğerlerin alveolar alanlarında bol miktarda bulunan elastik fibriller, alveollerin duvarlarında yerleşerek soluk alma sırasında alveolleri açar ve alveolar septalarda genişlemeyi uzamayı sağlar. Akciğerlerin gaz değişim bölgelerinde elastik fibrillerin çözülmesi ve zarar görmesi, alveollerde elastikiyet kaybına, değişmiş alveolar yapıya ve dolayısıyla amfizem gelişmesine neden olabilir (Turino ve diğ., 2011).

Elastin proteini tropoelastin moleküllerinin bir araya gelmesi ile oluşturulur. Tropoelastin molekülü, insanlarda 7q11 kromozomunda yerleşen tek bir gen tarafından kodlanır (Vrhovski ve Weiss, 1998). Hücrelerde sentezlenen tropoelastin molekülleri, yaklaşık 70 kDa ağırlığında suda erir bir protein olarak hücre dışına salgılanır. Tropoelastin molekülleri arasındaki çapraz bağlanmalar ile ECM'de tropoelastin yığınlarını oluşturulmaya başlanır. Bu çapraz bağlanmalarda LOX proteinleri ve hücre yüzey glikozaminoglikanları görev alır. ECM'de biriken tropoelastin yığınları, elastin

yığınları olarak adlandırılır. Fibulin proteinleri, LOX'larla birlikte tropoelastin molekülleri arasında çapraz bağlanmaları kolaylaştırır ve tropoelastin moleküllerinin elastin yığınları halinde ECM'de birikmesini sağlar (Şekil 2.1:). Yeni sentezlenen tropoelastin moleküllerinin de mevcut elastin yığınının katılması ile ECM'de elastin proteini birikimi artar. Elastin yığını ECM'deki mikrofibriller üzerine transfer edilir. LOX ve fibulin proteinleri aracılığı ile mikrofibriller üzerindeki elastin yığınları arasında çapraz bağlanmalar kurulur ve elastik fibriller oluşur (Papke ve Yanagisawa, 2014). LOX proteinleri ve fibulinler tropoelastin molekülleri, elastin yığınları ve hatta elastik fibriller arasında çapraz bağlanmalara neden olarak elastik fibrillerin oluşumu ve bu fibrillerin yığınlar halinde ECM'de birikiminden sorumludur (Şekil 2.1:).



Şekil 2.1: Elastik fibril biyosentezi (Kielty ve diğ., 2002'den değiştirilerek hazırlanmıştır).

2.3.LİZİL OKSİDAZLAR

Lizil oksidazlar (E.C 1.4.3, protein-lizin 6-oksidadz) amin gruplarını reaktif aldehitlere okside eden bakır bağımlı enzimlerdir. LOX enzimlerinin en önemli görevleri, elastik fibril oluşumunu ve elastik fibrillerin ECM'de birikimini sağlamak, ayrıca elastik fibrillerin birbirleri ve kollagenler ile çapraz bağlanmalarını katalizlemektir. LOX'lar

elastinin lizil artıklarının ve kollagen hidroksilizil ve lizinin ϵ -amino grubunun oksidatif deaminasyonunu katalizler (Smith-Mungo ve Kagan, 1998; Maki ve diğ., 2005). İnsanda 5 beş farklı LOX enzimi tanımlanmıştır: LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL3 ve LOXL4 (**Tablo 2.1:**). LOX enzim ailesinin üyelerinin her birinde, C terminal bölgede yer alan büyük ölçüde korunmuş katalitik bölge bulunurken, bu enzimlerin N terminal bölgelerindeki amino asit dizilimi farklılık gösterir. N terminal bölgesindeki bu değişiklikler LOX enzimlerinin çeşitliliğine neden olur (Maki ve diğ., 2005).

Tablo 2.1: İnsanlarda, LOX protein ailesi üyelerine ait genel bilgiler (Lopez ve diğ., 2010).

Protein	Gen yerleşimi	mRNA ve protein büyüklüğü	Yüksek mRNA seviyelerine sahip dokular	LOX'a benzerliği (%)
LOX	5. kromozom	4.8 kb, 417 aa	Akciğer, İskelet kası, Böbrek, Kalp	100
LOXL1	15. kromozom	2.4 kb, 574 aa	Akciğer, Kalp, Dalak, İskelet kası, Pankreas	85
LOXL2	8. kromozom	4.0 kb, 774 aa	Akciğer, Timus, Deri, Testis, Ovaryum	58
LOXL3	2. kromozom	3.3 kb, 753 aa	Kalp, Uterus, Testis, Ovaryum	65
LOXL4	10. kromozom	3.5 kb, 756 aa	İskelet Kası, Testis, Pankreas	62

LOX: Lizil Oksidaz, LOXL: LOX benzeri, aa: amino asit., kb: kilobaz

LOX protein ailesinin üyeleri, hücrede preproLOX öncülleri olarak sentezlenir ve posttranslasyonel işlemler sonrasında proLOX öncülü olarak hücreden salınır. Bu molekülün aktif forma dönüşmesi, molekülden propeptit bölgesinin ayrılmasıyla gerçekleşir. Aktif LOX proteinleri hedef molekülleri üzerindeki etkilerini bakır varlığında gösterirler (Lucero ve Kagan, 2006).

LOX enzimi 417 amino asit içeren 46 kDa ağırlığında bir proteindir. Bu enzim elastik ve kollagen fibriller arasındaki çapraz bağlanmalardan sorumludur (Maki ve diğ., 2005). LOXL1 enzimi, 32 kDa moleküler ağırlığında olup 574 amino asit içerir. LOXL1 elastogeneziste oldukça önemli bir rol oynamaktadır. LOXL1, elastin ve fibrillar kollagenler arasındaki çapraz bağlanmaları sağlamak dışında, özellikle elastinin ECM'de birikiminde de görevlidir. Örneğin, LOXL1 geni çıkarılan farelerde

elastogeneziste ciddi aksamalar görülmüştür (Kagan ve Li, 2003). LOXL2 enzimi, 63kDa moleküler ağırlığına sahiptir ve 774 aminoasitten oluşur. LOXL2, elastogeneziste elastin ve fibulin-5'in ECM'de birikimi ve organizasyonundan ve ayrıca fibriller arası çapraz bağlanmadan sorumludur (Liu ve diğ., 2004).

2.4. HIF-1 α ve HİPOKSİK SİNYALLEME

Dokularda düşük oksijen seviyesi (hipoksiya), kanserden infeksiyona kadar pek çok patolojik durumda görülebilir. Gelişen hipoksik şartlar, hücrelerde hipoksik sinyalleme başlatır. Hipoksik sinyallemede HIF-1, HIF-2 ve HIF-3 transkripsiyon faktörleri etkilidir. Bunlardan HIF-1 ve HIF-2 dokularda çok yaygın olarak bulunurlar. HIF-1'in hipoksik gen sinyallesindeki rolü çok iyi tanımlanmıştır. HIF-1, α ve β alt ünitelerinden oluşan heterodimerik formda temel bir ilmek-dönüş-ilmek proteindir. *HIF-1 α* geni, 14. kromozomda (14q21-q24) bulunur ve kodlanmış proteini 826 amino asit içerir. *HIF-1 β* geni, 1. kromozomda (1q21) bulunur ve kodlanmış proteini 789 amino asit içerir. Her iki proteinin homologileri iyi korunmuş olup, insan, sıçan ve farelerde % 90 oranında benzerlik taşımaktadır. HIF-1 α , oksijen-bağımlı yıkım domainine (401-603 amino asitler arasındaki bölge) ve HIF-1'in transkripsiyon aktivitesi için gerekli olan iki transaktivasyon domainine (N-terminalde 531-575, C-terminalde 813-826 amino asitler arasındaki bölgeler) sahiptir (Dery ve diğ., 2004). HIF-1 α alt ünitesi, hücrelerde sürekli üretilmesine rağmen normoksiya şartlarında yarı ömrü 5 saniyeden azdır, sadece hipoksiya şartlarında hücrede stabil kalır (Salceda ve Caro, 1997). Hâlbuki HIF-1 β alt ünitesi hem normoksiya hem de hipoksiya şartlarında hücrede sürekli üretilir ve hücre nukleusunda bulunur. Bu nedenle HIF-1 α , HIF-1 aktivasyonunu belirlemektedir (Berra ve diğ., 2003). HIF-1 α 'nın stabilizasyonu, hücrelerde bulunan oksijen duyarlı hidroksilaz enzimleri tarafından düzenlenir. Oksijen varlığında, HIF-1 α 'nın özel amino asit artıkları hidroksillenir ve ubiquitinlenerek proteozomalarda yıkılır. Prolil hidroksilazlar, HIF-1 α 'nın 402 ve 564 prolin amino asitlerini hidroksiller (Schofield ve Ratcliffe, 2004). Ayrıca demir ve α -ketoglutarat da prolil hidroksilaz aracılığı ile gerçekleşen hidroksilasyon için gereklidir. Hidroksillenen HIF-1 α , E3 ubiquitin ligaz kompleksini tanıyan fosforillenmiş von Hippel Lindau proteini tarafından tanınır. Böylece HIF-1 α 'nın proteozomal yıkımı ubiquitinasyon ile gerçekleşmiş olur. Prolil hidroksilaz oksijen bağımlı çalışan bir enzim olduğu için

hipoksiya şartlarında bu enzimin aktivitesi azalacağından HIF-1 α hidroliz edilemez, HIF-1 α stabil kalır ve hücre içinde miktarı artar.

Hipoksiya, düşük oksijen şartlarında adaptasyon için önemli genleri aktive eder. Hipoksiyada HIF-1 α geninin transkripsiyonu ve translasyonu değişmeden kalır. Eğer ortamda oksijen azalırsa HIF-1 α 'nın yıkımı engellenir. Böylece HIF-1 α 'nın stabil hale gelmesiyle hücre içinde HIF-1 α seviyesi artar. HIF-1 α sitoplazmadan nukleusa geçer ve nukleusta HIF-1 β ile dimerize olarak aktif HIF-1 kompleksini oluşturur. HIF-1 hedef genlerin promotöründe bulunan "Hipoksiya yanıt elementlerine (5'-(A/G)CGTG-3')" bağlanarak transkripsiyonu başlatır. HIF-1, VEGF ya da VEGF reseptörleri, laktat dehidrogenaz, LOX enzimleri gibi 60'dan fazla genin ekspresyonunu kontrol etmektedir. Bu genler hücre sağ kalımı, hücre çoğalması, apoptoz, glukoz metabolizması ve angiogenezis gibi birçok farklı hücreyel olayda işlevseldir (Semenza, 2003). HIF-1 α makrofajlarda, nötrofillerde, dendritik hücrelerde ve lenfositlerde sentezlenir (Lang ve diğ., 2002).

2.5.COMMD1

COMMD protein ailesi, karboksi terminal uçlarında evolusyonel olarak iyi korunmuş bir bölge (*Copper Metabolism MURR1* veya *COMM domain*) içeren bir protein sınıfıdır. COMMD1 proteini, bu protein ailesinin tanımlanan ilk üyesidir. *COMMD1* geni insanda 2p15 kromozomunda yer alır. Moleküler ağırlığı 21 kDa olan COMMD1 proteini, 190 aminoasit uzunluğundadır; proteinin C- ucundaki 85 amino asitlik bölgesi lösün amino asidince zengin iyi korunmuş bir COMM domainine sahiptir (Maine ve Burstein, 2007). COMMD1'in başlıca görevleri arasında bakır homeostazisini sağlamak, epiteliyal sodyum kanal fonksiyonunu düzenlemek ve transkripsiyon faktörlerinden nuklear faktör kappa-B (**NF- κ B**) ve HIF-1 aktivasyonunu kontrol etmek yer almaktadır. Diyetle alınan bakır, hepatik dolaşım ile karaciğere gelir. Bakırın bir kısmı safraya verilirken, büyük bir kısmı hepatositlerde seruloplazmin protein ile birleştirilerek kana verilir. Böylelikle karaciğere kan aracılığı ile bakır taşınımı sağlanır. Özellikle "Bedlington Terriers" köpek ırklarında görülen *COMMD1* geninin ikinci eksonundaki yaklaşık 10 kb'lık delesyonun, köpeklerde

karaciğerde bakır birikimine neden olduğu bilinmektedir. Su ve diğ. (1982), COMMD1 eksikliği nedeniyle hepatositlerden safra kanalına bakır salınımının önemli ölçüde azaldığını ve bu nedenle hücre içinde biriken bakırın da toksisiteye sebep olduğunu rapor etmektedirler. İnsanlarda COMMD1'in bakır homeostazisinde etkili olduğunu gösteren çalışmalar da vardır. Karaciğer ve beyinde aşırı bakır birikimi ile karakterize edilen Wilson hastalarında hücre içi bakır taşıyıcılarından ATP7B proteinini kodlayan gende meydana gelen mutasyon, hücre içinde bakır birikimi ile sonuçlanır. Bu hastalarda, COMMD1'in ATP7B proteininin stabilitesini düzenlemek suretiyle bakırın hücre dışına salgılanmasında görev alır; bu nedenle bakır homeostazisinde etkilidir (De Bie ve diğ., 2007).

2.6. PTEN

PTEN, 1997 yılında keşfedilmiş olup kromozom 10q23.31 üzerinde lokalize olan kuvvetli bir tümör supresör genidir (Govender ve Chetty, 2012). *PTEN* geninin ekspresyonu ile oluşan PTEN proteini 403 amino asitten oluşur ve 55 kDa ağırlığındadır. PTEN proteininin N-terminalindeki ilk 190 aminoasitlik kısmı protein tirozin fosfataz aktivitesi gösterirken, C-terminal bölgesi PTEN'in fosfolipid membrana bağlanmasını sağlar. PTEN, hem polipeptid hem de fosfoinositler için fosfataz aktivitesine sahiptir. Ancak, protein tirozin fosfataz aktivitesi zayıftır. PTEN, güçlü bir şekilde, lipid fosfataz aktivitesi ile fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfatın inositol halkasının 3. pozisyonundaki fosfat grubunu defosforile eder. Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat, PI3K'yı aktive eder. Bu nedenle, PTEN, PI3K/Akt sinyal yolunun negatif düzenleyicisi olarak bilinir (Maehama ve Dixon, 1998). Bilindiği gibi PI3K hücre çoğalması ve hayatta kalması gibi çeşitli hücresel süreçleri düzenler ve PTEN aktivasyonunun azalması ya da kaybı sonucu PI3K sinyal yolağının aktivasyonuna neden olur. Bu durum kanserli dokuda yaygın olarak görülür. Birçok insan kanserleri PTEN geninin mutasyonu ya da somatik delesyonu ile ilişkilidir (Bozinovski ve diğ., 2006). PTEN, PI3K yolağını baskılayarak, bu yolak aracılığı ile kontrol edilen HIF-1 α proteinin sentezini ve birikimini engellemektedir (Shi ve diğ., 2012; Song ve diğ., 2012).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Proje, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından incelenerek 01.10.2013 tarihli ve a-15 nolu kararı ile Etik Kurul İlkeleri'ne uygun bulundu.

3.1.DOKULARIN TEMİN EDİLMESİ ve SINIFLANDIRILMASI

Çalışmada, akciğer kanseri tanısı alan KOAH hastalarından (GOLD 2016 kriterlerine göre) loboskopi cerrahi yöntemi ile uzaklaştırılan tümör etrafındaki akciğer doku parçaları kullanılmıştır (**Tablo 3.1:**).

Alınan akciğer doku parçaları mikroskopik incelemelerinden sonra amfizemli ($n = 10$) ve amfizemli olmayan ($n = 6$, kontrol grup) örnekler olarak iki grup altında toplanmıştır.

Hastalardan alınan akciğer doku örneklerinin her biri ikiye bölünerek, parçalardan biri mikroskopik, diğeri ise biyokimyasal analizler için kullanılmıştır.

3.2.AMFİZEMLİ ve AMFİZEMLİ OLMAYAN AKCİĞER DOKU ÖRNEKLERİNİN TESPİTİ

Mikroskopik yöntemlerde kullanılmak üzere alınan parçalar, % 10 nötral formalin fiksatifinde $+4$ °C de 24 saat süresince fikse edildi. Fikse edilen akciğer doku örnekleri, % 70 alkol ile yıkanarak fiksatiften arındırıldılar. Daha sonra dokular yükselen alkol serilerinden geçirilerek, ksilolde şeffaflandırılmalarını takiben parafine gömüldüler. Parafine gömülü akciğer doku örneklerinden 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Seri akciğer kesitlerinden 100µm aralıklarla seçilen kesitler, albumin mayer kaplı lamlara yapıştırıldı. Kesitler hematoksilin-eozin (**HE**) ile boyandılar ve ışık mikroskopunda incelendiler. Amfizemli ve amfizemli olmayan (Kontrol grup) doku örneklerinin ayrımı, kesitlerdeki genişlemiş alveollerin varlığı, alveol epiteline/duvarında incelmeler, kırılmalar ve kopmalar gibi hasar parametreleri dikkate alınarak yapıldı.

Tablo 3.1:Akciğer doku parçaları alınan hastalara ait anamnez ve diaagnoz verileri.

Örnek	Cinsiyeti	Yaşı	Ameliyat nedeni	FEV%1	Hala sigara içicisi mi?	Sigara içme oranı (Paket/Yıl)
K1	Erkek	67	Adenokarsinom	87	Hayır	35
K2	Erkek	72	Adenokarsinom	67	Evet	30
K3	Erkek	42	Adenokarsinom	40	Evet	20
K4	Erkek	69	Adenokarsinom	62	Evet	40
K5	Erkek	36	Adenokarsinom	-	Hayır	-
K6	Erkek	55	Adenokarsinom	70	Evet	32
A1	Erkek	56	Organize pnömoni	101	Evet	35
A2	Erkek	66	İrregüler amfizem	68	Evet	30
A3	Erkek	72	Adenokarsinom	88	Hayır	30
A4	Erkek	49	Squamöz hücreli karsinom	103	Hayır	25
A5	Erkek	74	Adenokarsinom	78	Hayır	30
A6	Erkek	57	Adenokarsinom	58	Hayır	40
A7	Erkek	69	Adenokarsinom	68	Hayır	35
A8	Erkek	51	Adenokarsinom	73	Evet	35
A9	Erkek	69	Adenokarsinom	62	Evet	55
A10	Erkek	55	Adenokarsinom	70	Evet	32

K: Kontrol, A: Amfizem, FEV %1: Zorunlu Ekspiratuar Hacim % 1

3.3.BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Biyokimyasal yöntemlerde kullanılmak üzere alınan akciğer doku örnekleri, sıvı azotta hızlı dondurma yöntemi ile dondurulduktan sonra, analiz edilecekleri güne kadar -86 °C'de saklandılar. Dokuların homojenizasyonu radyoimmünopresipitasyon lizis tamponu içinde +4 °C derecede 75 dakika süresince gerçekleştirildi. Homojenizasyonda 200 mg akciğer doku örneği kullanıldı. Elde edilen lizatlar +4 °C da 10 dakika 13.000 rpm santrifüj edildikten sonra süpernatant kısımları alındı ve süpernatantlar -20 °C derin dondurucuda saklandılar. Daha sonra süpernatantlarda total protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlendi (Bradford, 1976).

Her bir bireyden alınan 80 µg protein örneği, sırasıyla 70 voltta 20 dakika, 100 voltta 45 dakika ve 120 voltta 35 dakika süre ile % 3-12 jellerde yürütüldü ve moleküler ağırlıklarına göre proteinlerin ayrımı yapıldı.

Elektroforez ile jelde ayrımı yapılan protein bandları,yarı-kuru aktarım ile jelden nitroselüloz membrana aktarıldı. Membran aktarım işlemi sonrasında Ponceau S boyama solusyonu kullanılarak 3-5 dakika transfer etkinliği kontrol edildi. Membranlar Ponceau S boyasından arındırılmaları için sırasıyla 0,1 N sodyum hidroksit çözeltisi ve ultra saf su ile 10'ar dakika yıkandılar. Daha sonra membranlar, 150 ml fosfat tamponu (**PBS**; 0,1 M ve pH: 7,4) içerisinde maksimum sıcaklıkta mikrodalgada iki buçuk dakika muamele edildiler. 20 dakikalık soğutma işleminden sonra, membranlar % 4'lük formalin solüsyonu ile 5 dakika inkübe edildiler. PBS ve formalin ile yapılan antijen iyileştirme işleminden sonra membranlar, üçer kez Tris tamponu (**TBS**) ile yıkandıktan sonra yağsız süt tozu ile hazırlanan bloklama solüsyonuyla 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Membranlar, bloklama işlemi sonrası uygun sulandırma oranıyla hazırlanan ve insana karşı geliştirilen elastin, LOX, LOXL1, LOXL2, HIF-1 α , COMMD1 ve PTEN primer antikolarıyla inkübe edildiler (**Tablo 3.2:**). Bu işlem sonrasında yıkanan membranlar, peroksidaz işaretli keçi anti-tavşan sekonder antikoru ile 1 saat süreyle oda ısısında muamele edildi. Sekonder antikor ile muamele işlemi sonrası membranlar, öncelikle 15 dakikalık periyotlarda iki kez % 0,1'luk Tween 20 içeren TBS ile daha sonra da 10, 10 ve 5 dakikalık periyotlarda TBS ile yıkandılar. Sonrasında kemilüminesans lumünol reagent substratı kullanılarak, spesifik protein bandları Kodak GL1500 jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi ve "Kodak Molecular Imaging Systems" yazılımı ile densitometrik analizleri yapıldı. Densitometrik analizleri yapılan protein örneklerine ait band yoğunlukları, β -aktin proteininin yoğunluğuna normalize edilerek gruplar arasında istatistiksel analizleri yapıldı.

Membranlar, ilk primer uygulamalarından ve görüntülenmelerinin ardından ikinci kez primer uygulamaları için, önce TBS ile beş dakika muamele edildi. Daha sonra Stripping solüsyonu (**Tablo 3.3:**) ile 30 dakika süresince 50°C'lik etüvde inkübe edildi. Ardından üç kez olmak üzere membranlar oda sıcaklığından 5'er dakika TBS ile yıkandılar ve Western emdirim yöntemine blocking aşamasından itibaren devam edildi.

Tablo 3.2: İmmünohistokimya (IHC) ve Western emdirim (WB) yönteminde kullanılan primer antikolar ve kullanım şekilleri.

Ürün İsmi	Seyreltme Oranı		İnkübasyon Süresi ve Koşul		Üretici Firma	Ürün Kodu
	IHC	WB	IHC	WB		
Tavşan anti-Elastin	-	1/500	-	Bir gece, +4 °C	Santa Cruz	Sc-25736
Tavşan anti-LOX	-	1/500	-	Bir gece, +4 °C	Novus Biologicals	NB100-2527
Tavşan anti-LOXL1	-	1/500	-	Bir gece, +4 °C	Santa Cruz	Sc-66949
Tavşan anti-LOXL2	-	1/500	-	Bir gece, +4 °C	Santa Cruz	Sc-66950
Tavşan anti-PTEN	-	1/500	-	Bir gece, +4 °C	Santa Cruz	Sc-9145
Tavşan anti-COMMD1	-	1/500	-	Bir gece, +4 °C	Bioss	Bs-80348
Tavşan anti-HIF-1 α	1/100	1/500	Bir gece, +4 °C	Bir gece, +4 °C	Novus Biologicals	NB100-479
Fare Anti-CD68	1/2500		32 dakika, 37 °C	-	Thermo Scientific	MS-579

Tablo 3.3: Stripping tamponu için gerekli olan malzemeler. Hazırlanan stok solüsyondan 20 ml alınarak içerisine (Etüvde inkübasyondan hemen önce) 144 μ l 2- β -merkaptotonal ilave edilir.

Stripping Tamponu	Miktar(ml)
Sodyum dodesil sülfat (%2)	2
Tris-HCl (0,5 M; pH:6,8)	12
Distile Su	36

3.4.İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZLER

Işık mikroskobu düzeyinde bir immünoenzimatik yöntem olarak kullanılan Streptavidin-Biyotin-Peroksidaz kompleksi yöntemi kullanılmıştır. Parafine gömülü akciğer doku örneklerinden alınan 5 μ m kalınlığındaki seri kesitlerden, 100 μ m ara ile

seçilen kesitler poly-L-lizin kaplı lamlara yapıştırıldı. Kesitler, deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra saf suda çalkalanıp, antijen iyileştirmesi için sitrat tamponunda (pH 6,0) mikrodalga fırında (650W) 15 dakika boyunca tutuldular. Daha sonra 20 dakika oda ısısında bırakıldılar. Dokudaki endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için kesitler, 1:1 metanol/PBS karışımında hazırlanan % 3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 30 dakika süresince bekletildiler. Daha sonra Histostatın-Plus kiti (Invitrogen, life technologies, 85-9043) için verilen yönteme göre, kesitler sırasıyla tavşan anti-HIF-1 α (1:100 seyreltme oranında % 0,3 Triton'lu PBS'de hazırlanarak) +4 °C'de bir gece ve tavşan anti-CD68 (makrofaj belirteci, 1:2500 seyreltme oranında PBS'de hazırlanarak) primer antikoru ile 32 dakika 37 °C'de inkübe edildiler (**Tablo 3.3**). Daha sonra da biyotinlenmiş sekonder antikor ve streptavidin peroksidaz enzim konjugatında 20'şer dakika oda ısısında nemli bir kap içerisinde bekletildiler. Peroksidaz reaksiyonu aminoetilkarbazol substrat kiti (Thermo, CA, USA, TA-060-HA) ile geliştirildi. Kesitler daha sonra Mayer's hematoksilin zıt boyası ile boyandı. Kesitler her bir inkübasyon basamağında PBS'de 10'ar dakika yıkandı. İmmünohistokimyasal işaretlemelerin doğruluğunu kontrol etmek üzere negatif kontrol boyamaları primer antikor basamağında primer antikor yerine PBS kullanımını ile yapıldı.

Amfizemli ve amfizemli olmayan bireylerden seçilen toplam 10 preparatta, her bir birey için rastgele seçilen 1 mm²'lik 5 farklı alveolar alanda (bronş, bronşiolardan ve büyük kan damarları bulunmayan) 400X büyütmede HIF-1 α immünoreaktif hücreler sayıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki formül aracılığıyla değerlendirildi ve immünoreaktif hücrelerin sayısı % olarak ifade edildi. Ayrıca HIF-1 α immünoreaktivitesinin hücrenin sitoplazma ya da nükleusta bulunmasına göre hücrelerde HIF-1 α aktivasyonu değerlendirildi.

$$\text{İmmünoreaktif hücre sayısı}(\%) = \frac{\text{İmmünoreaktif hücre sayısı}}{\text{Alandaki tüm hücre sayısı}} \times 100$$

3.5.İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Westen emdirim ve immünohistokimyasal bulgularının istatistiksel değerdendirmeleri Graphpad Prism 6,0 adlı yazılım programı ile yapıldı. İki grup arasındaki karşılaştırılmalar “Student *T*-tesi” kullanılarak yapıldı. Hesaplamaların sonuçlarında *p* değeri 0,05’ten küçük olan farklılıklar ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. MİKROSKOBİK BULGULAR

4.1.1. Histolojik Bulgular

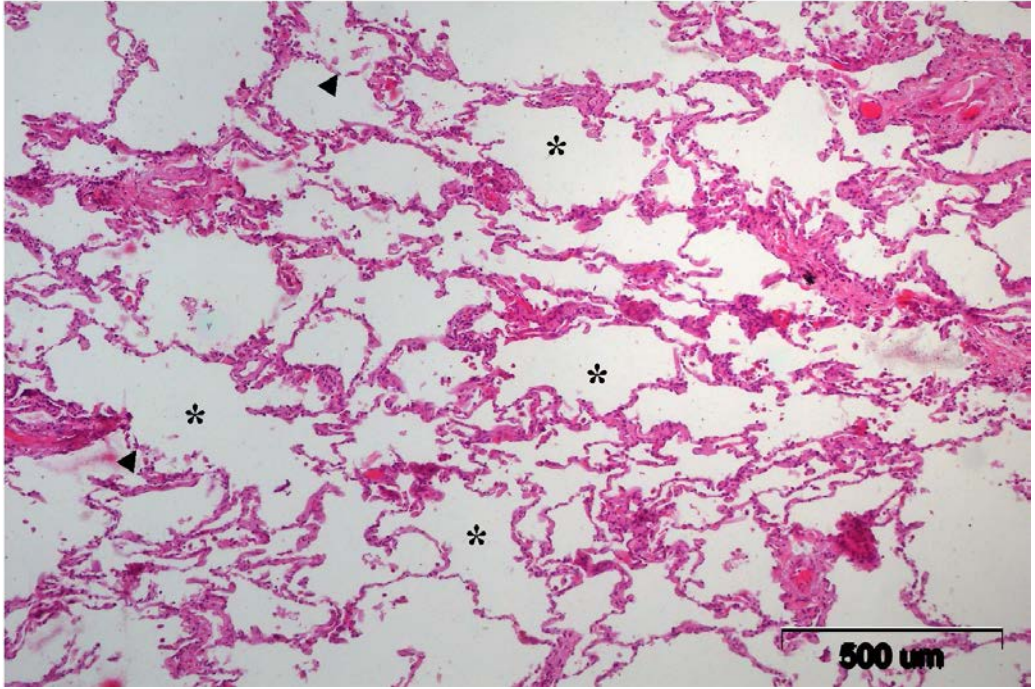
Toplanan akciğer doku örnekleri distal bölgelerden alınan parçalar olduğundan, kesitlerin genelinde bronş ve bronşiolle nadiren rastlandı. Doku genelinde hemoraji ve intersitisiyel alanda antrokoz mevcuttu.

Tablo 4.1: Akciğer doku örneklerinde hasar indeksi.

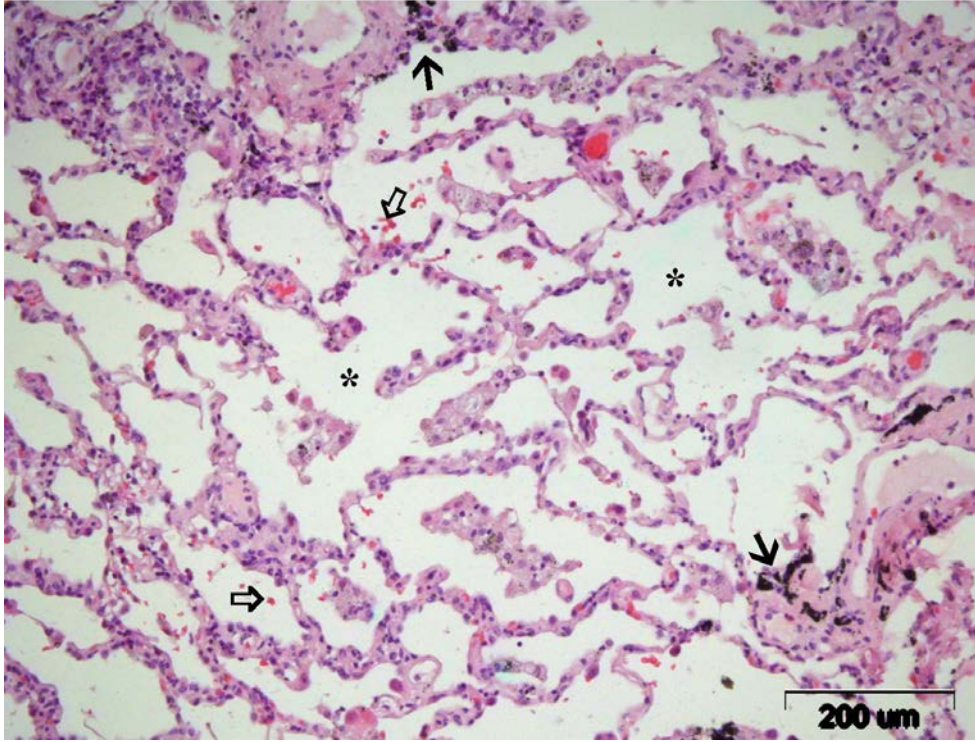
Örnek	Genişlemiş Alveoller	Amfizemin Yaygınlığı	Alveol lümende hücre birikimi
K1	+	+	++
K2	+	+	+++
K3	++	++	++
K4	+	+	+
K5	++	++	++
K6	+	+	+
A1	+++	+++	+++
A2	++++	++++	+++
A3	++++	++++	++++
A4	++++	++++	++
A5	++++	++++	++
A6	++++	++++	++++
A7	+++	++++	++++
A8	++++	++++	+++
A9	++++	++++	+++
A10	++++	++++	+++

K: Kontrol, A: Amfizem, + : Nadir, ++ : Az, +++: Çok, ++++: Çok fazla

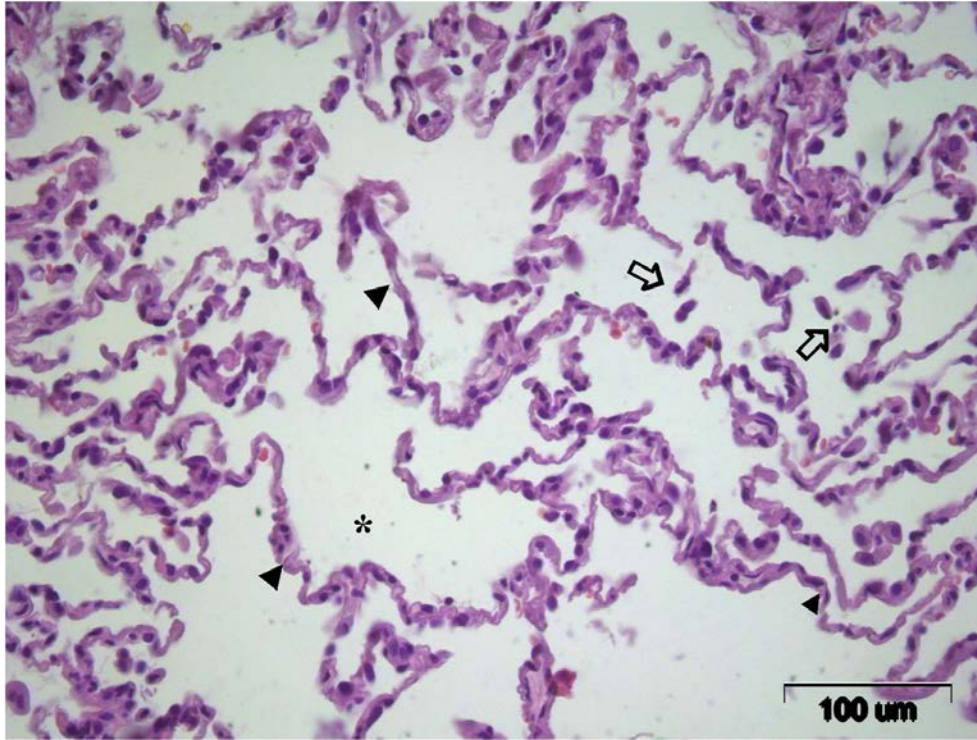
Kontrol grubun akciğer örneklerinde genel olarak lökosit infiltrasyonları, yer yer alveolar epitelde hasar, bazı alveollerin lümeninde eritrosit, bazı hücrelere ve hücresel atıklara rastlanmasına rağmen, alveolar yapının nispeten korunmuş olduğu tespit edildi (Şekil 4.1-4.3;,Tablo 4.1:).



Şekil 4.1: Amfizemli olmayan insan akciğer örneğinin genel yapısal görüntüsü. Alveoller (*) ve hasarlı alveol duvarı (►) gösterilmiştir (HE).

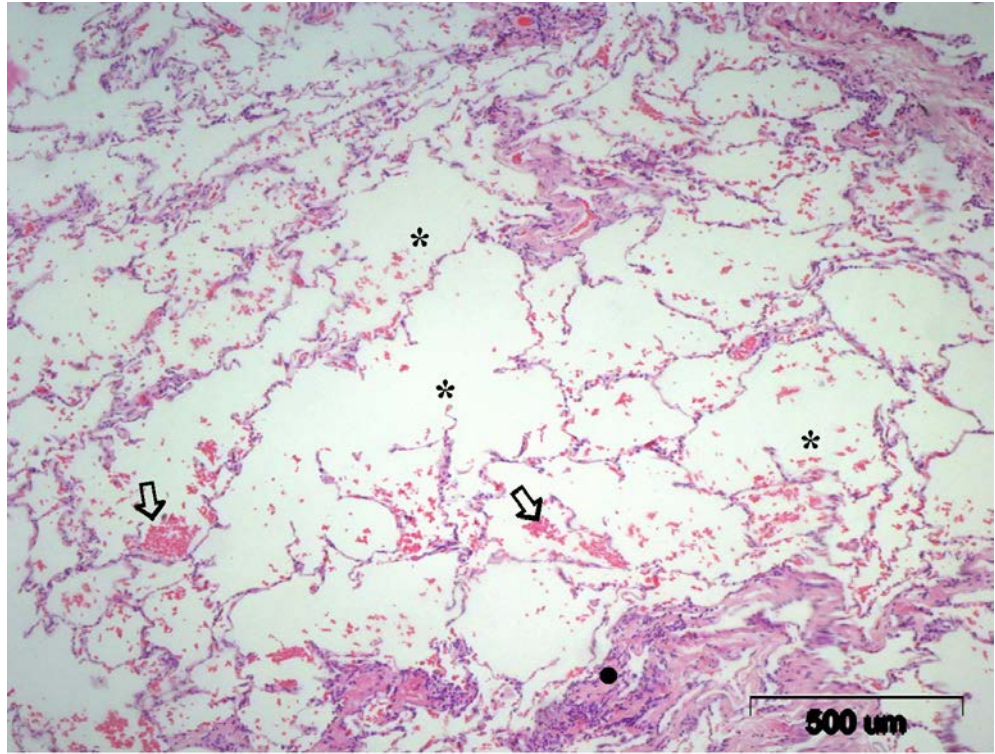


Şekil 4.2: Amfizemli olmayan akciğer örneğinde korunmuş alveolar yapı dikkati çekmekteydi. Alveoller (*), alveolar lümenindeki eritrositler (⇨) ve antrokoz alanlar(→) gösterilmiştir (HE).

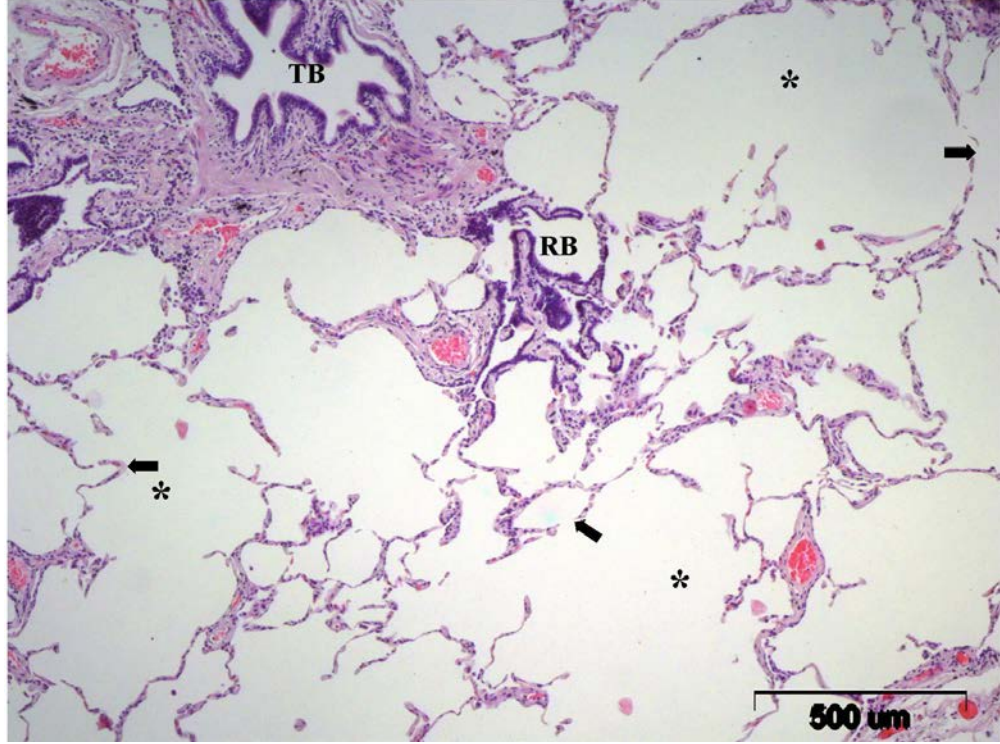


Şekil 4.3: Amfizemli olmayan diğer bir doku örneğinin görüntüsünde alveol lümeninde (*) bazı hücelere (⇨) rastlandı. Bu bireylerde alveolar duvar (▶) yapısı bütünlüğü genelde korunmuştu (HE).

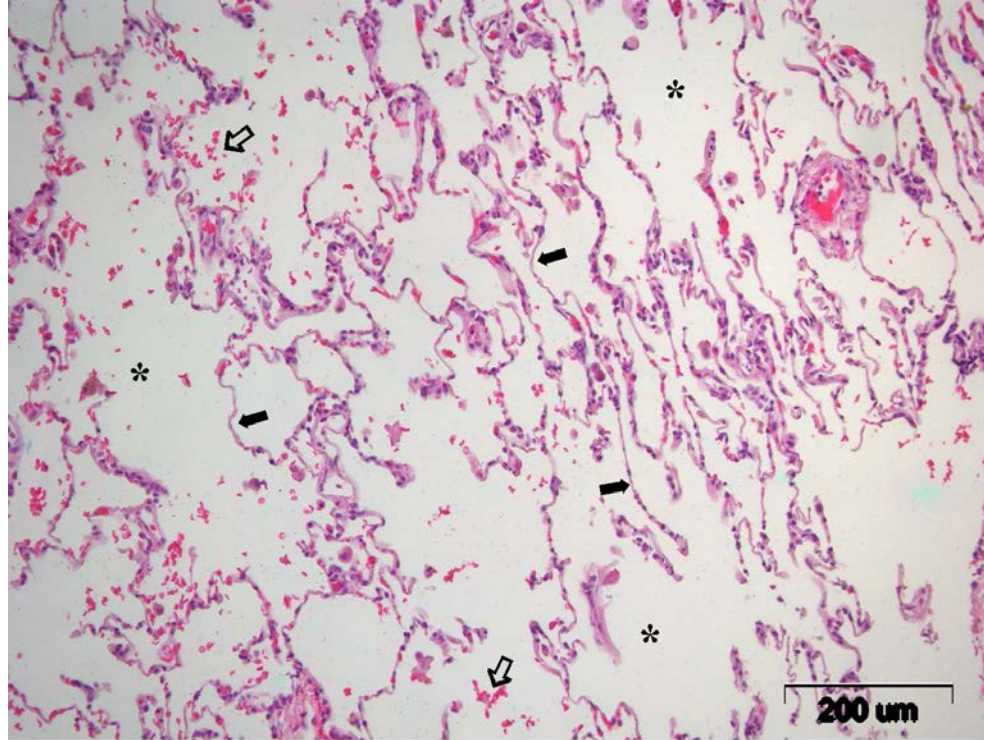
Diğer grubun akciğer örneklerinde ise kontrol grubunkilerden farklı olarak doku genelinde yaygın, genişlemiş ve büyük alveoller dikkati çekmekteydi (Şekil 4.4: ve 4.5:, Tablo 4.1:). Ayrıca, alveolar yapının büyük ölçüde bozulduğu gözlemlendi. Alveol duvarlarının incelendiği ve alveol duvarlarında yer yer kopmaların olduğu tespit edildi (Şekil 4.5:-4.7:). Alveolar alanlarda eritrosit ve lökosit gibi kan hücrelerinin yanı sıra diğer bazı hücrelere yoğun olarak rastlandı (Şekil 4.4:, 4.6: ve 4.7:).



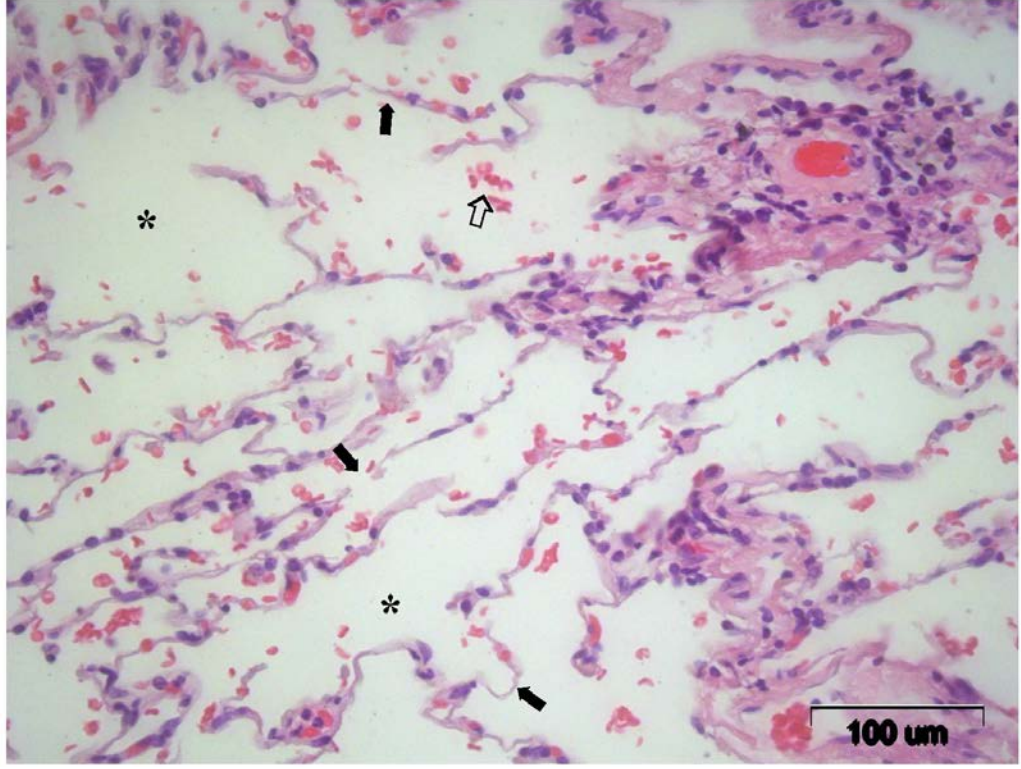
Şekil 4.4: Amfizemli insan akciğer örneğinden genel bir görünüş. Doku genelinde geniş ve büyük alveollere (*), bozulan alveollerin lümenlerinde çok sayıda eritrosite (⇨) ve dokuda lökosit infiltrasyonuna (●) rastlandı (HE).



Şekil 4.5: Amfizemli akciğer doku örneklerinde gözlenen en belirgin özellik, geniş ve büyük alveollerin (*) varlığı idi. Terminal (TB) ve respiratör bronşiyoller (RB) ile incelmış alveol duvarları ve alveolar duvarında kopmalar (→) gösterildi (HE).



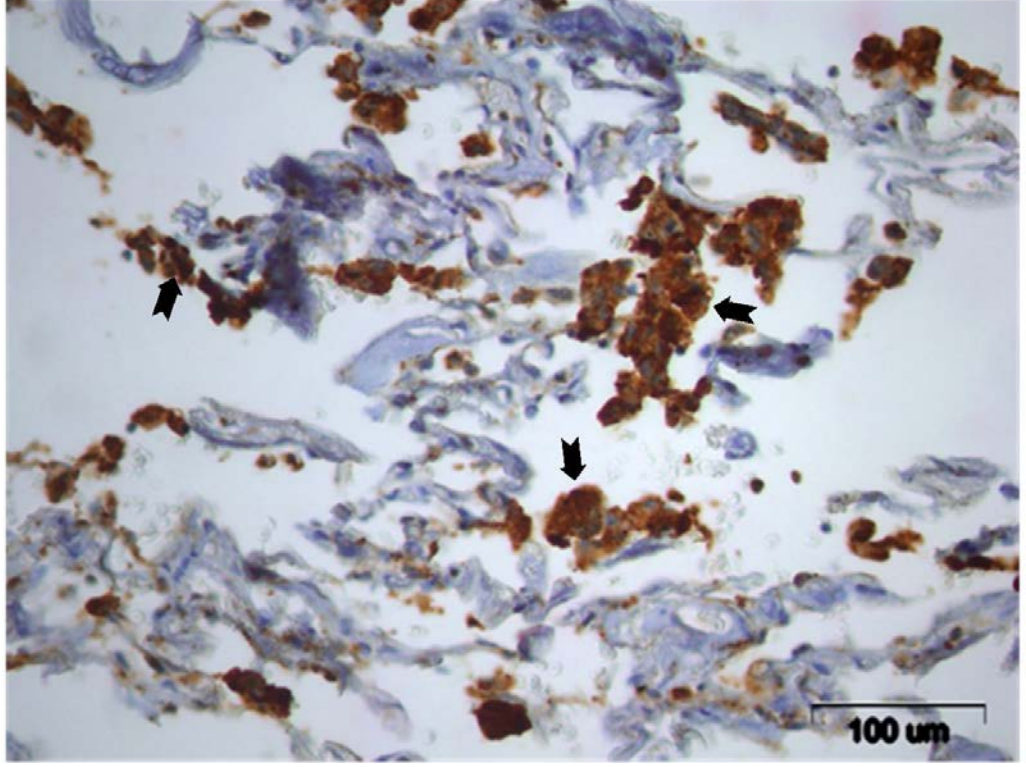
Şekil 4.6: Amfizemli akciğer doku örneğinin bu görüntüsünde genişlemiş alveoller (*), alveollerin yapısında bozulma, alveol epitel duvarında incelmeler (→) ve alveol lümeninde eritrositler (⇒) tespit edildi (HE).



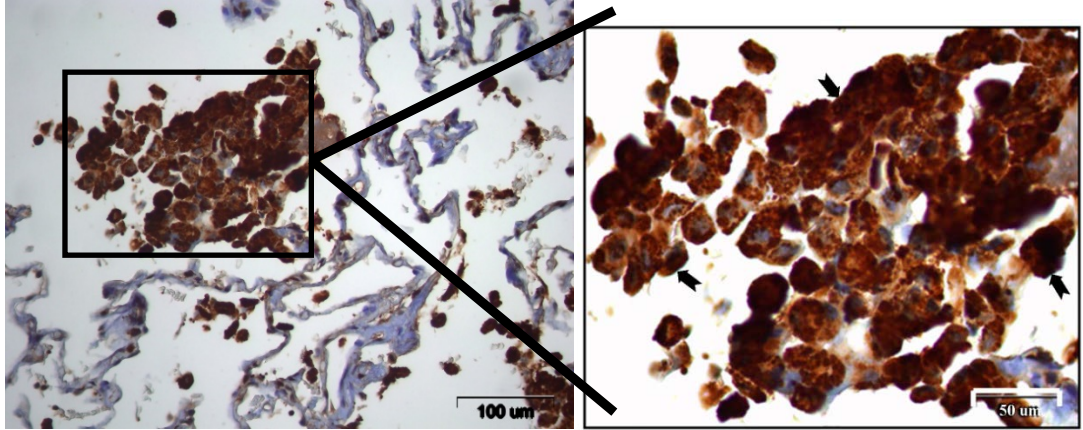
Şekil 4.7: Amfizemli akciğer doku örneğinin daha büyük büyütmede alınan bu görüntüsünde genişlemiş alveoller (*), alveol epitel duvarındaki incelmeler (↔) ve alveolar alandaki eritrositler (⇨) görülmektedir (HE).

4.1.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

Çalışmamızda amfizemli olmayan ve amfizemli olan doku örneklerinde makrofaj markırını uygulanarak dokuda makrofajlar gösterildi. Amfizemli ve amfizemli olmayan akciğer örneklerinde, alveolar lümende çok sayıda sitoplazması CD68 immün pozitif reaksiyon veren hücreye rastlandı. Ancak, amfizemli akciğer örneklerinde bu hücreler sayıca faha fazlaydılar (**Şekil 4.8: ve 4.9:**).

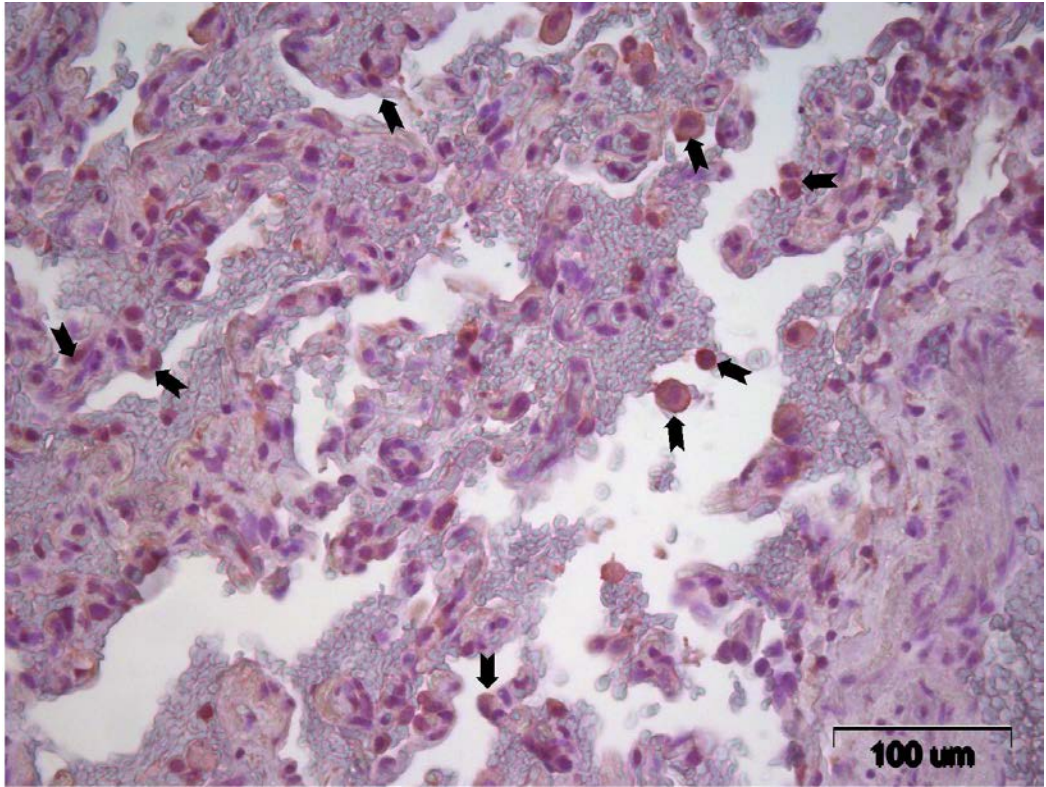


Şekil 4.8: Amfizemli olmayan akciğer örneklerinde CD68 immünoaktif hücreler (→) gösterilmiştir (Mayer's hematoksilen ile zıt boyama).

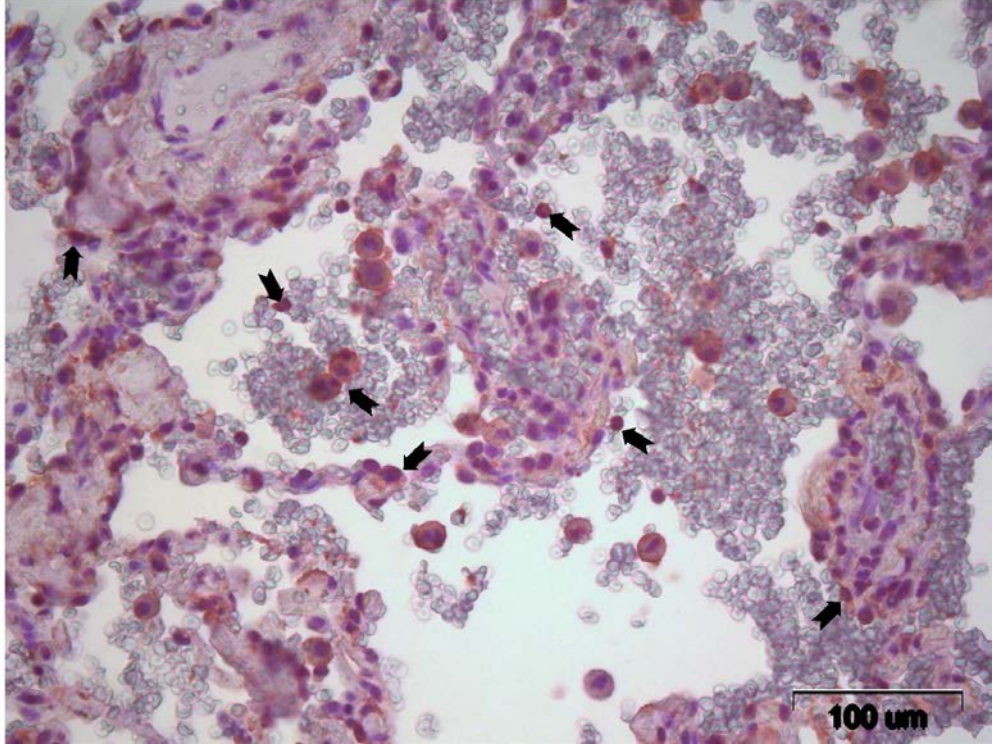


Şekil 4.9: Amfizemli akciğer örneklerinde alveol lümeninde biriken CD68 immünoaktif hücreler (→) topluluğu yakınlaştırılmış olarak gösterilmiştir (Mayer's hematoksilen ile zıt boyama).

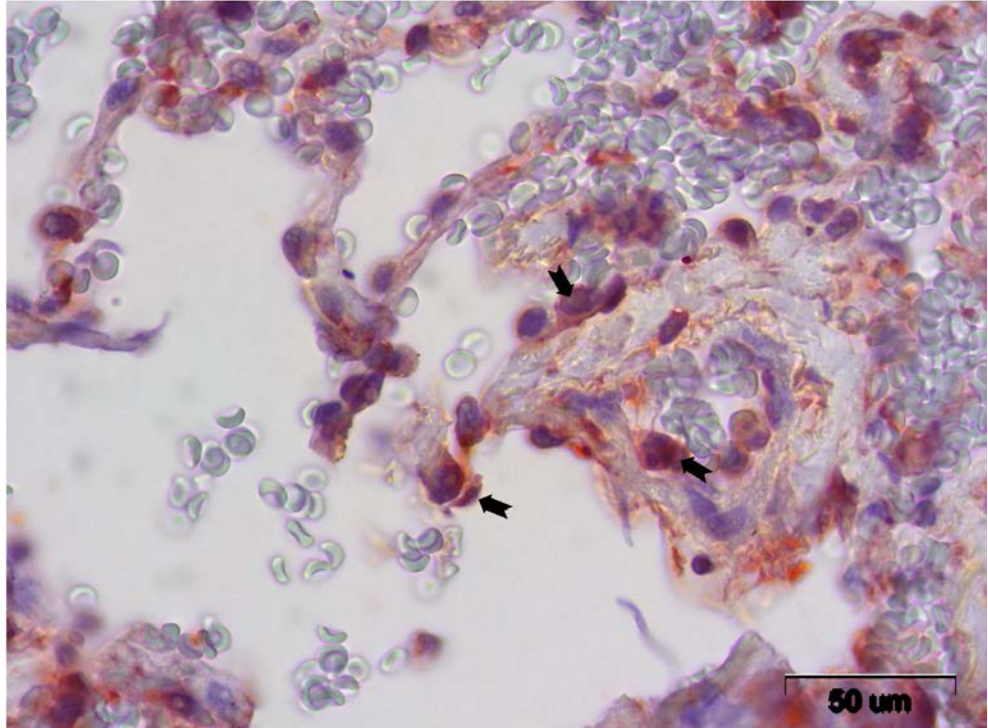
Akciğer doku örneklerindeki HIF-1 α immünreaktivitesi, makrofajların, bağ doku hücrelerinin, lökositlerin ve alveolar epitel hücrelerinin nükleus ve sitoplazmalarında belirgin bir şekilde gözlemlendi (**Şekil 4.10:-4.13:**). Kontrol akciğer doku örneklerinden farklı olarak, diğer grubun akciğer örneklerinde, HIF-1 α immünreaktivitesinin arttığı tespit edildi (**Şekil 4.14:-4.17:**). Alveolar alanlarda, alveolar epitel, bağ doku hücreleri ve alveolar lümende bulunan lökosit ve makrofajlardaki HIF-1 α immünreaktivitesi değerlendirildiğinde, bu hücrelerin nükleusunun yoğun olarak HIF-1 α immünreaktivitesi gösterdiği saptandı. Bu alanlarda sitoplazması immünreaksiyon veren hücreler ile nükleusu immünreaksiyon veren hücreler sayıca karşılaştırıldığında, nükleusu HIF-1 α immünreaktivitesi gösteren hücrelerin daha fazla olduğu gözlemlendi (**Şekil 4.18:**).



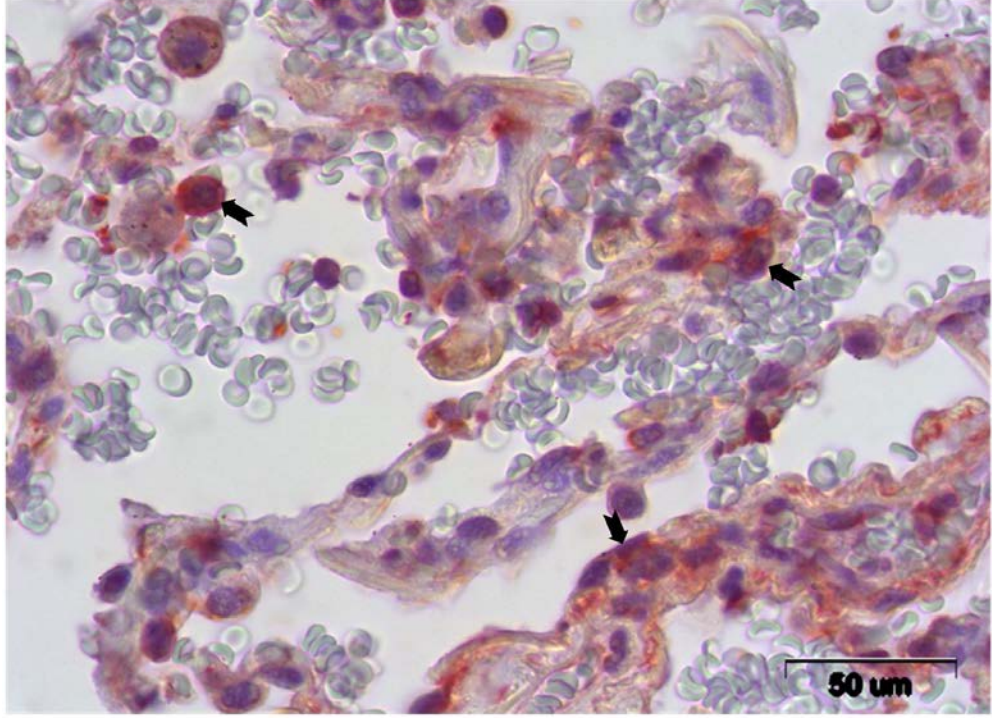
Şekil 4.10: Amfizemli olmayan akciğer dokusunda, özellikle alveol duvarında bariz olan ve lümendeki HIF-1 α immünreaktif hücreler (➔) gösterilmiştir (Mayer's hematoksilen ile zıt boyama).



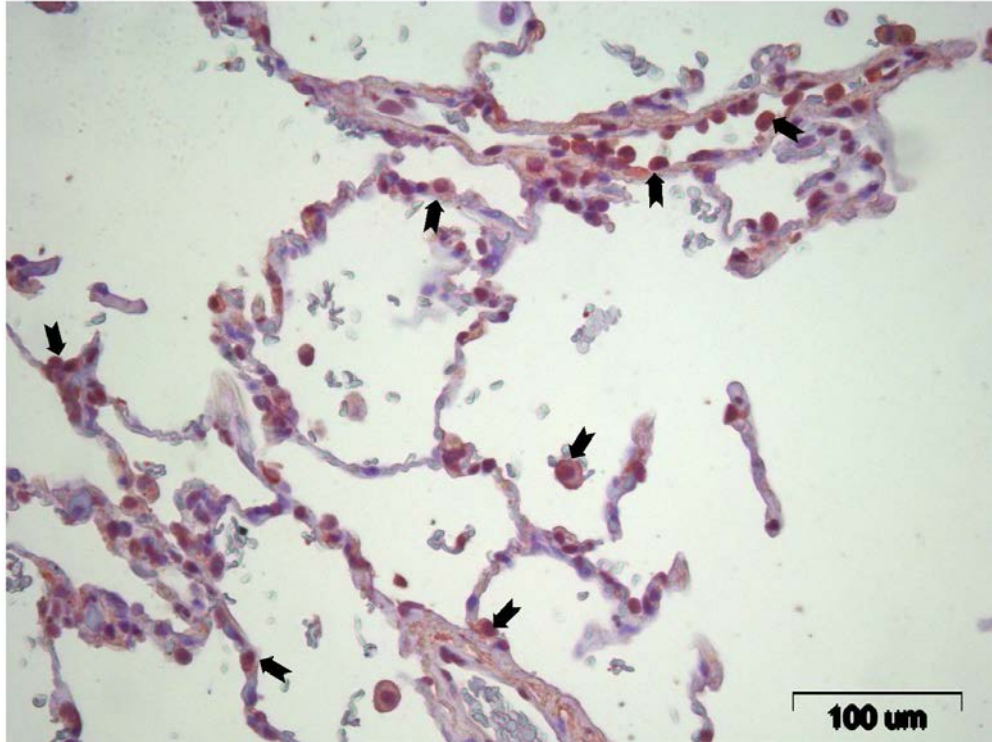
Şekil 4.11: Amfizemli olmayan dokuda HIF-1 α immünoreaktif hücreler (→) alveol lümeninde daha yoğun olarak görülmektedir (Mayer's hematoksilen ile zıt boyama).



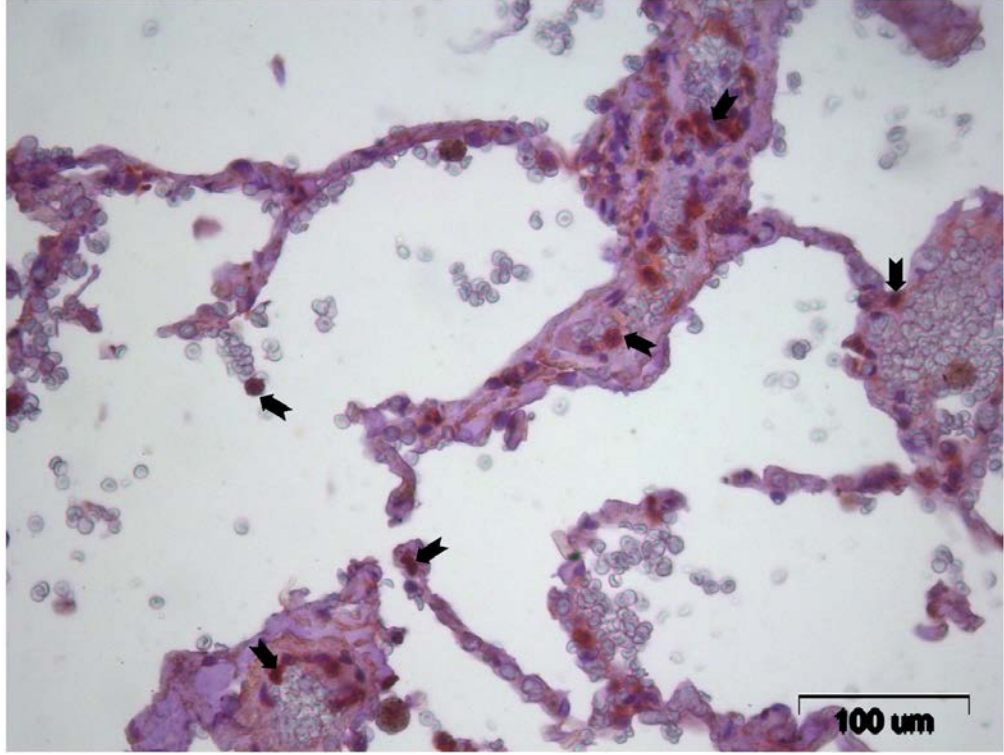
Şekil 4.12: Amfizemli olmayan dokuda HIF-1 α immünoreaktif hücreler (→) gösterilmiştir (Mayer's hematoksilen ile zıt boyama).



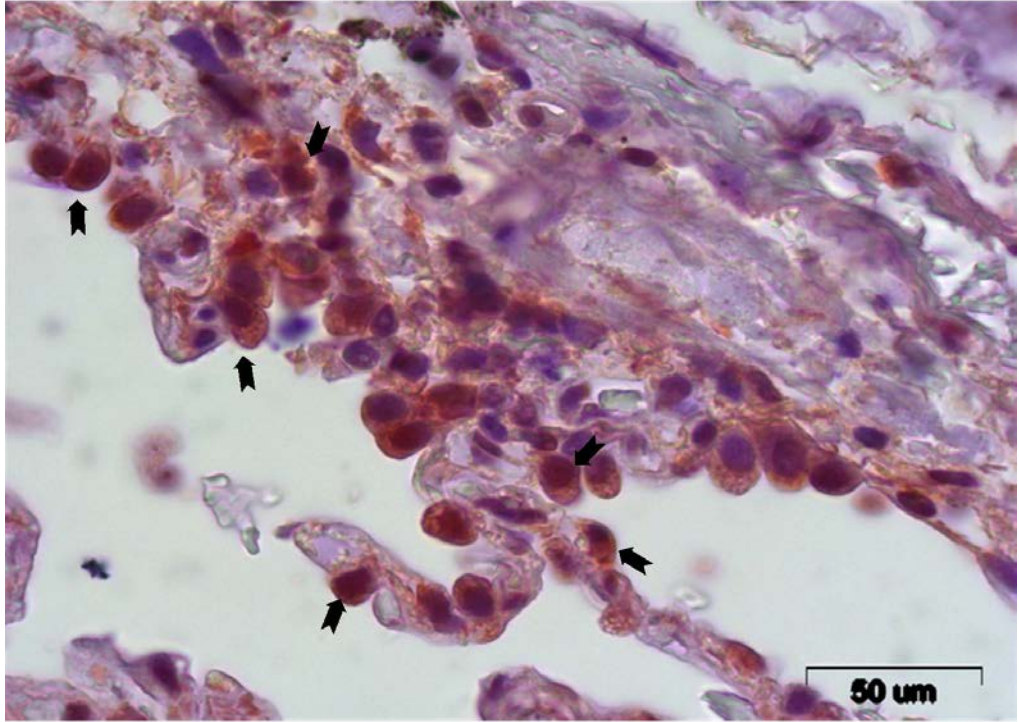
Şekil 4.13: Amfizemli olmayan dokuda HIF-1 α immünoreaktif hücreler (→) gösterilmiştir (Mayer's hematoksilen ile zıt boyama).



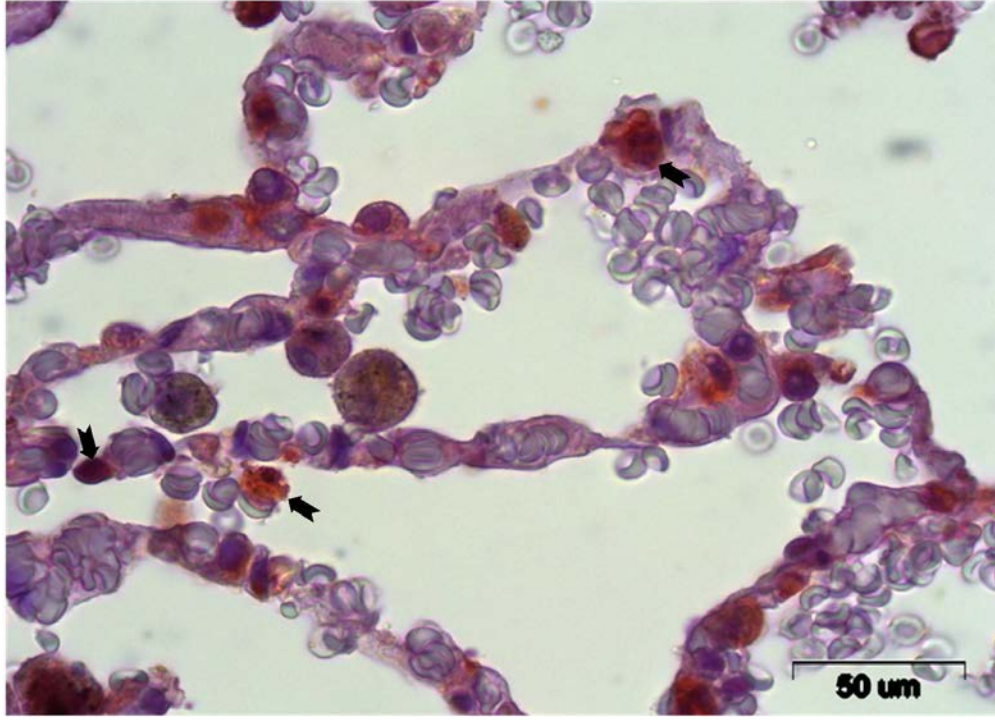
Şekil 4.14: Amfizemli olmayan dokuda HIF-1 α immünoreaktif hücreler (→) gösterilmiştir (Mayer's hematoksilen ile zıt boyama).



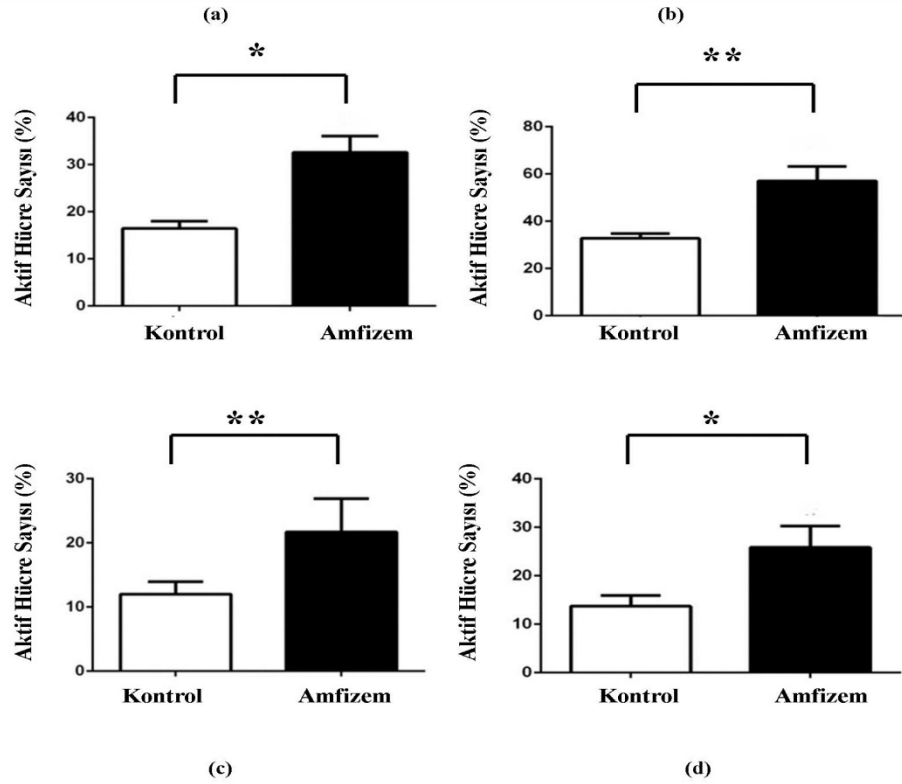
Şekil 4.15: Amfizemli akciğer doku örneğinde HIF-1 α immünoreaktif hücrelerin (→) hem epitelde hem de lökositlerde yoğun olduğunu görmekteyiz (Mayer's hematoxilen ile zıt boyama).



Şekil 4.16: Amfizemli akciğer doku örneğinde alveol duvarlarında ve bağ dokuda HIF-1 α immünoreaktif hücreler (→) oldukça belirgin olarak gösterilmiştir (Mayer's hematoxilen ile zıt boyama).



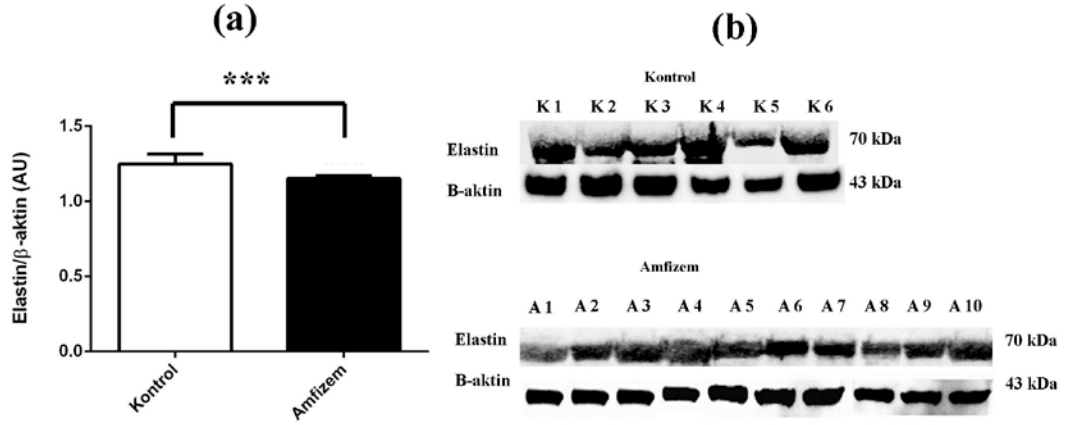
Şekil 4.17: Amfizemli akciğer doku örneğinde nükleusları HIF-1 α immünoreaktif veren hücreler (➔) gösterilmiştir. (Mayer's hematoksilen ile zıt boyama).



Şekil 4.18: Alveolar epitel hücrelerinde (a), bağ doku hücrelerinde (b), lökositlerde (c) ve makrofajlarda (d) nükleusları HIF-1 α immün pozitif reaksiyon veren hücre sayısı gösterilmiştir. Anlamlılık değeri (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

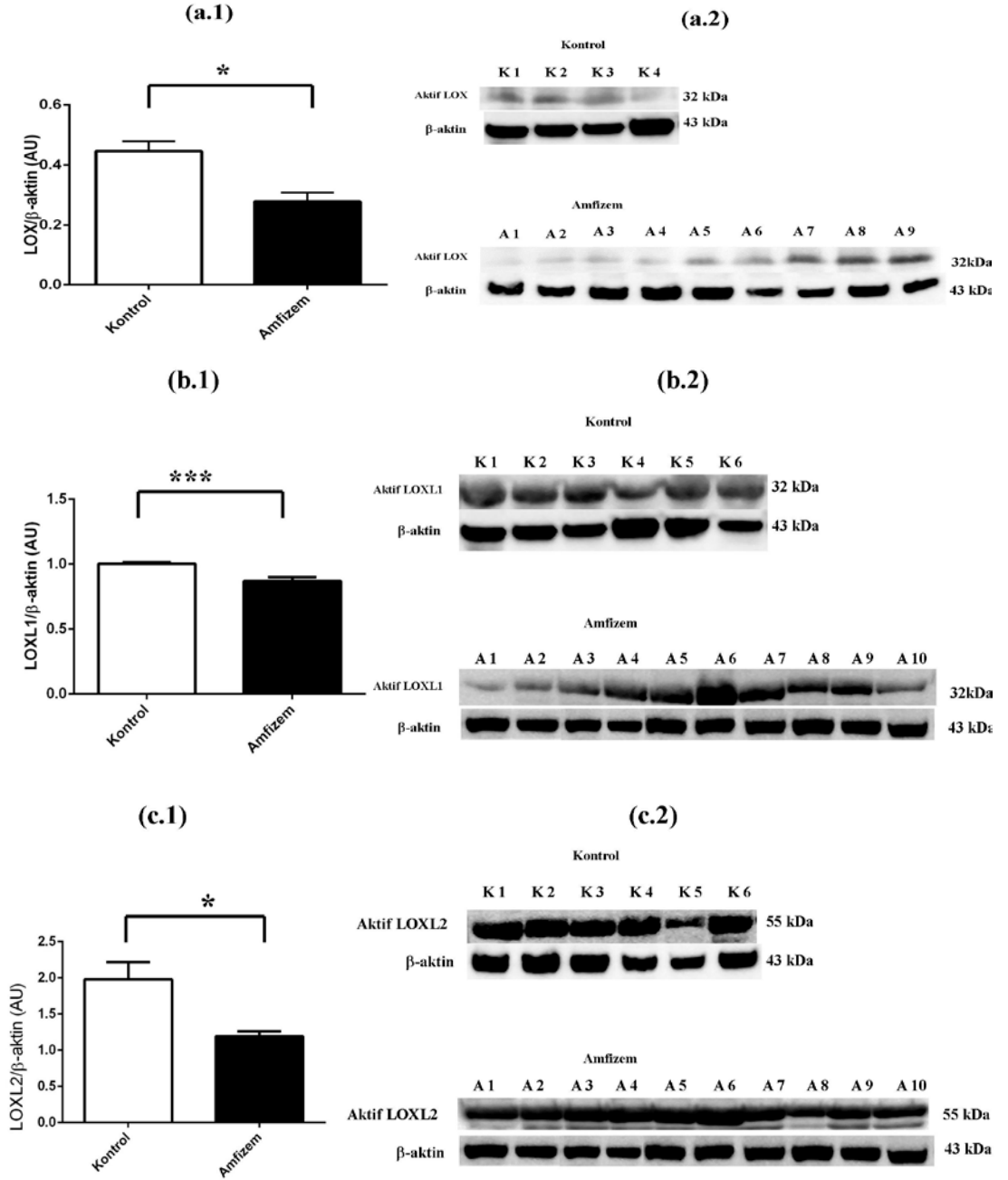
4.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR

Her iki grubun akciğer örneklerinde elastin, aktif LOX, LOXL1, LOXL2, COMMD1, HIF-1 α ve PTEN proteinlerinin seviyeleri karşılaştırıldığında, kontrol gruptan farklı olarak amfizemli akciğer örneklerinde bu proteinlerin seviyelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi (Şekil 4.19:-4.23:).



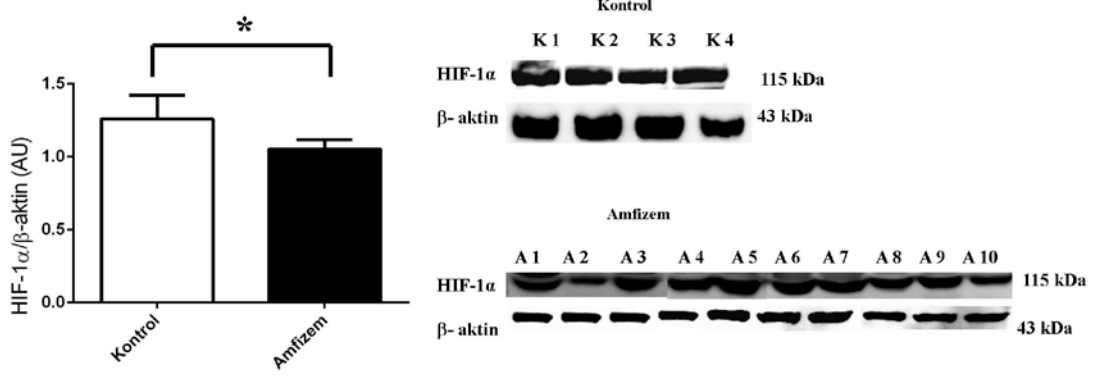
Şekil 4.19: Amfizemli ve amfizemli olmayan akciğer örneklerinde elastin protein miktarındaki değişiklikler (a) ve elastin protein bantları (b) gösterilmiştir. Anlamlılık p değeri (***) $p < 0,001$.

Aktif LOXL2'nin, aktif LOX ve LOXL1'e göre daha fazla eksprese edildiği tespit edildi.



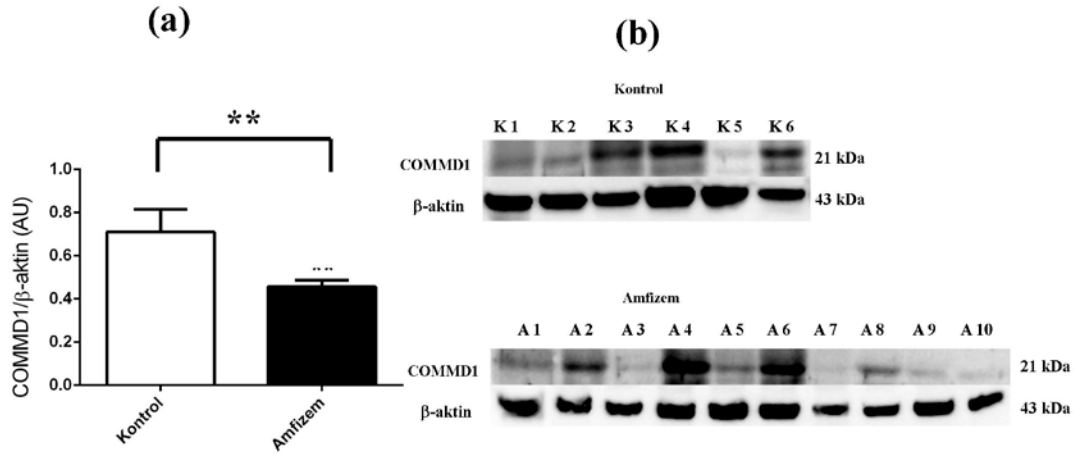
Şekil 4.20: Amfizemli ve amfizemli olmayan akciğer örneklerinde LOX (a.1), LOXL1 (b.1) ve LOXL2 (c.1) protein miktarlarındaki değişimler ve LOX (a.2), LOXL1 (b.2) ve LOXL2 (c.2) protein bantları gösterilmiştir. Anlamlılık değeri (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$.

HIF-1 α proteinin miktarı ise amfizemli bireylerde anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür (Şekil 4.21:).

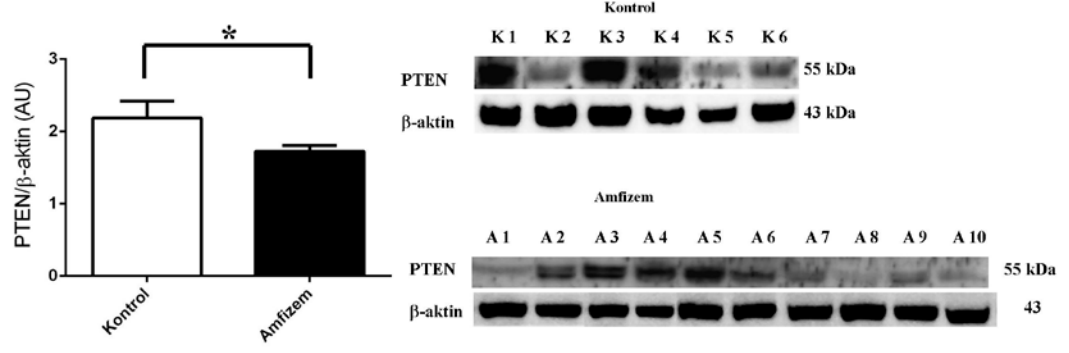


Şekil 4.21: Amfizemli ve amfizemli olmayan akciğer örneklerinde HIF-1 α protein miktarındaki değişiklikler (a) ve HIF-1 α protein bantları (b) gösterilmiştir. Anlamlılık p değeri (*) $p < 0,05$.

Ayrıca analizi yapılan PTEN ve COMMD1 proteinlerinin miktarı ise amfizemli bireylerde anlamlı olarak azalma göstermiştir (Şekil 4.22: ve Şekil 4.23:).



Şekil 4.22: Amfizemli ve amfizemli olmayan akciğer örneklerinde COMMD1 protein miktarındaki değişiklikler (a) ve COMMD1 protein bantları (b) gösterilmiştir. Anlamlılık p değeri (**) $p < 0,01$.



Şekil 4.23: Amfizemli ve amfizemli olmayan akciğer örneklerinde PTEN protein miktarındaki değişiklikler (a) ve PTEN protein bantları (b) gösterilmiştir. Anlamlılık p değeri (*) $p < 0,05$.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsanlarda pulmoner amfizeme neden olan başlıca etmenler arasında sigara içiciliği, hava kirliliği ve yaşlanma yer alır. Sigara dumanı, birçoğunun kanserojen olduğu kanıtlanmış 5000'den fazla toksik madde ve 10^5 serbest radikal içerir (MacNee ve diğ., 1999). Bu moleküllerin yüzlercesi akciğer parenşimine ciddi zararlar verir. Sigara dumanına maruz kalan kemirgenlerin akciğerlerinde pulmoner amfizemin geliştiği çeşitli deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (Wright ve Churg, 1990; Mentzer ve Swanson, 1999). Bu nedenle sigara dumanı, deneysel olarak pulmoner amfizemi uyarmada ve pulmoner amfizemin eşlik ettiği deneysel KOAH modelini oluşturmada kullanılmaktadır. Wright ve Churg (1990), haftada beş gün sigara dumanı solutulan kobaylarda, bir yıllık süre içinde ilerleyici tipte bir pulmoner amfizemin geliştiğini saptamışlardır. Pulmoner amfizem, sigara içicisi olan 45-60 yaş arasındaki hastalarda KOAH'ın bir belirteci olarak tespit edilmiştir (Emam ve diğ., 2010). Birçok hastalığın gelişiminde rolü olan sigara içiciliği, tüm KOAH vakalarının % 82'sinde hastalık nedeni olarak gösterilir ve akciğer kanseriyle de % 80 oranında ilişkilidir (Li ve diğ., 2010; Raviv ve diğ., 2011). Bununla birlikte klinik çalışmaların birçoğunda pulmoner amfizem, akciğer kanseri için bağımsız bir risk faktörü olarak görülür. Ancak, bu çalışmaların büyük bir kısmında akciğer kanseri teşhisinde pulmoner amfizemin değerlendirilmesinin gerektiği sonucuna varılmıştır (Mayne ve diğ., 1999; Lopez-Encuentra ve diğ., 2005). Yaklaşık 1000 hasta üzerinde yapılan değerlendirmelerde kronik sigara içiciliği ile birlikte pulmoner amfizemin, genç yaş grubu insanlarda akciğer kanseri olma riskini 3-4 kat arttırdığı rapor edilmiştir (Li ve diğ., 2011). Ayrıca son dönemde yapılan çalışmalar, yaş ve sigara içiciliğinden bağımsız olarak KOAH'lı hastaların dolayısıyla amfizemli hastaların akciğer kanseri olma riskinin, KOAH'sız ve amfizemsiz sigara içicilerinin akciğer kanseri olma riskinden beş kat daha fazla olduğunu göstermektedir (Raviv ve diğ., 2011). Bu sonuç, pulmoner amfizemin sigaradan bağımsız olarak da akciğer kanserine neden olabileceğini ortaya koymaktadır. Bizim çalışmamızda da akciğer adenokarsinomu tanısı konulan KOAH hastalarından alınan akciğer örneklerinde amfimatöz alanlara rastlanmıştır. Sigara içicisi olan ve

yaşları 40-65 arasında değişen bu hastalarda amfiyatöz alanlar, alveolar duvarda harabiyetin görüldüğü, daha az sayıda ve büyük alveollere sahip bölgeler olarak tespit edilmiştir. Benzer mikroskopik bulgular, deneysel ve klinik çalışmalarda da rapor edilmektedir (Tuder ve diğ., 2003; Turner ve diğ., 2007). Emam ve diğ. (2010), KOAH hastalarında akciğerlerde distal hava yollarından, bronşiolle ve alveollere kadar havayollarındaki anormal genişlemeler ve alveolar duvarda yıkıcı değişimler ile karakterize edilen amfiyatöz alanları tariflemiştir. Shapiro (2000), sigara dumanına maruz kalan farelerin akciğerinde 3-6 ay içinde büyük alveollere sahip amfiyatöz alanların varlığını belirlemiştir. Sigara dumanı solutularak oluşturulan deneysel KOAH modellerinde, akciğer genelinde oksidatif stresin ve proteaz/antiproteaz dengesizliğinin arttığı, alveolar septal hücrelerde apoptozun görüldüğü, buna bağlı olarak da alveol duvarlarının yıkımı sonucu küçük alveollerin birleşmesi ile büyük alveollerin meydana geldiği ve pulmoner amfizemin gelişebildiği not edilmiştir (Tuder ve diğ., 2006). Çalışmamızda, diğer çalışmalarda amfiyatöz alanlar için tariflenen yapısal değişikliklere benzer yapısal değişiklikler gösteren akciğer doku parçaları, amfizemli akciğer örneği olarak kabul edilerek diğer mikroskopik ve biyokimyasal analizler için kullanılmıştır. Ayrıca doku genelinde korunmuş alveolar yapıya sahip, nadiren genişlemiş alveolleri içeren akciğer doku örnekleri ise amfizemli olmayan doku örnekleri (Kontrol grup) olarak kullanıldı.

Pulmoner amfizemin gelişiminde etkili olan süreçlerden biri de alveol cidarında bulunan elastik fibrillerin proteazlarca yıkımıdır. Elastik fibrillerin yıkımı ile pulmoner amfizem gelişimi arasındaki direkt ilişki deneysel çalışmalarla kanıtlanmıştır. Örneğin papain, papain, pankreatik elastaz ve insan nötrofil elastaz gibi çeşitli proteolitik enzimlerin inhalasyon ya da intratrakeal yol ile hayvanlara verilmesi, akciğerde alveol duvarlarının yıkılmasına, alveol cidarındaki elastik fibrillerin 24 saat içinde sindirimine başlamasına ve ilerleyen zaman içinde geniş alveollerin oluşumuna neden olur (Kawakami ve diğ., 2008; Antunes ve Rocco, 2011). Shapiro (1995), kronik sigara içiciliğine bağlı inflamatuvar sürecin tetiklediği elastolitik aktivitenin ve antiproteazların eksikliğine bağlı olarak alveolar alandaki elastik fibrillerin aşırı yıkımının pulmoner amfizemin ilerlemesinde etkili olduğunu ileri sürmektedir. Akciğerde artan oksidatif stres, gelişen proteaz/antiproteaz dengesizliği, inflamatuvar hücre aktivasyonunun uyarılması ve dokunun onarım ve savunma cevabında meydana

gelen aksaklıklar pulmoner amfizem gelişimine katkıda bulunur (MacNee ve diğ., 1999; Shapiro, 1999). Diamond ve diğ. (1988), KOAH hastalarında pulmoner amfizem gelişimine yol açan, bu çok adımlı süreçlerin tetiklenmesinde asıl etkenin sigara içiciliği olduğunu ispatlamışlardır. Sigara içicisi olan KOAH hastalarının akciğerlerinde özellikle makrofaj, nötrofil ve lenfositlerden salınan proteazlar (Elastaz, serin proteazlar ve çeşitli MMP'ler) elastik fibril başta olmak üzere matriks yıkımında etkilidirler (Owen, 2008). Farelere elastaz verilmesini takip eden yedinci günde akciğerde inflamatuvar cevabın başladığı, ilk bir ay içinde alveolar lümende makrofaj ve nötrofillerin biriktiği ve ilerleyen zaman içinde elastik fibril kaybının olduğu gözlenmiştir (Shapiro, 2000; Ueno ve diğ., 2015). Nötrofil ve alveolar makrofaj birikiminin önlendiği sıçanlarda ve MMP-12 (bir çeşit elastaz) geni çıkarılan farelerde, sigara maruziyeti sonucu bu hayvanların akciğerlerinde amfizeme karşı bir korumanın olduğu belirlenmiştir (Ofulue ve Ko, 1999). Demedts ve diğ. (2006), MMP-12 aktivasyonunda meydana gelen artışın insanlarda KOAH patogeneğinde etkili olabileceğini savunmuşlardır. Sigara içimiyle beraber aktifleşen makrofajlar, ortama salgıladıkları çeşitli moleküllerle lökositlerin aktifleşmesini tetiklerler. Bu hücrelerin de çeşitli proteazları üretilip ortama salmalarıyla elastik fibril hasarı artar ve pulmoner amfizem gelişir (Shifren ve Mecham, 2006). Sigara içicisi olan KOAH hastalarının akciğer örneklerinde miktarı artan nötrofil elastaz ve çeşitli MMP'lerin, proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin salınımını uyardığı gösterilmiştir (Taraseviciene-Stewart ve Voelkel, 2008). Elastik fibrillerin yıkımı sonrasında ortama daha çok makrofaj çağırılır, artan elastik fibril kaybıyla alveoller elastikiyetlerini kaybeder ve gaz değişimi sekteye uğrar (Hautamaki ve diğ., 1997). Aynı zamanda, proteazlar ECM proteinlerinden elastin ve kollagenin yıkımı yanısıra akciğer septal hücrelerinin apoptozunu da tetikleyerek pulmoner amfizeme neden olabilir. Örneğin, KOAH hastalarında yapılan bir çalışmada proteazların alveolar epitel hücre apoptozuna neden olarak alveollerin genişlemesine sebebiyet verebileceği rapor edilmiştir (Hodge ve diğ., 2005). Sigara dumanının neden olduğu pulmoner amfizemde proteaz/antiproteaz dengesizliği oldukça önemlidir. Sigara içimiyle beraber dokuda proteazların aktivitesini azaltacak olan antiproteazların miktarının azalması, dokunun yapısal proteinlerinin proteazlarca yıkımına neden olur. Sigara dumanının antiproteaz aktivitesini azalttığı bilinmektedir. Sigara içicisi olan KOAH hastalarında AAT eksikliği pek çok çalışmada saptanmıştır (Serres ve diğ., 2009). KOAH'lı hastalarla yapılan bir başka çalışmada alveolar makrofajların MMP-9

salgıladıkları ve artan MMP-9 ve azalan TIMP-1 (MMP inhibitörü) nedeniyle elastolitik aktivitenin arttığı rapor edilmiştir (Russell ve diğ., 2002). Yukarıdaki bilgiler ışığında dokuda yaptığımız incelemeler sonucunda amfizemli doku örneklerinde genişlemiş alveollerin lümeninde çok sayıda makrofaj ve daha az olarak da lökosit varlığı söz konusudur. Aynı zamanda bu dokuların alındığı bireyler, uzun yıllardır sigara içicisi olan hastalardır. Yukarıdaki klinik ve deneysel çalışmaların verileri dikkate alındığında, bu bireylerde inflamasyonun ve proteaz aktivasyonunun uyarılmasının pulmoner amfizeme neden olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca yaptığımız biyokimyasal analizler sonucu amfizemli akciğer örneklerinde elastin miktarında anlamlı bir azalma ($p < 0,001$) tespit edilmiştir. Bu da bize bu hastalarda amfiyatöz akciğerde elastik fibril yıkımına bağlı bir elastin kaybı olduğunu göstermektedir.

Yukarıdaki paragrafta tartışıldığı gibi, pulmoner amfizemin gelişiminde proteaz/antiproteaz dengesizliği nedeniyle aktifleşen proteazlarca başta elastik fibriller olmak üzere diğer ECM elemanlarının yıkımı KOAH patogeneğinde oldukça önemlidir. Pulmoner amfizemde elastik fibrillerin aşırı yıkımı yanı sıra elastolizise eşlik eden elastik fibril oluşumu ve bu fibrillerin ECM'deki organizasyonundaki aksaklıkların da önemli olabileceğini düşünmekteyiz. Hayvanlar üzerinde yapılan az sayıdaki deneysel çalışmalar, bu konu ile ilgili bazı ipuçları vermektedir. Ancak, pulmoner amfizem patogeneğini anlamaya yönelik çalışmalarda insanlarda elastik fibril oluşumu ve organizasyonundaki anomaliler değerlendirilmemiştir. Bu nedenle, çalışmamızda, elastin biyogeneğinde etkili olduğu bilinen LOX enzim ailesine ait üç enzim LOX, LOXL1 ve LOXL2'in protein miktarlarındaki değişimler ile pulmoner amfizem arasındaki ilişki, akciğer kanseri tanısı konulan KOAH hastalarında araştırılmıştır.

Elastik fibriller, elastin ve miyofibrillerin bir araya gelmesiyle oluşurlar ve ECM'nin temel yapısal proteinlerinden biridir. Bağ doku hücrelerinden biri olan fibroblastlarda sentezlenen tropoelastin, hücre dışına salınır ve burada hücre yüzeyine bağlanır (Broekelmann ve diğ., 2005). Tropoelastinlerin birikip elastin proteinini oluşturması ve elastin proteinine fibulin-5 gibi mikrofibrillerin katılmasıyla elastik fibriller oluşur. Elastik fibriller, tropoelastin monomerlerinin bir araya gelmesiyle oluşan elastin bir öz ve onu çevreleyen mikrofibrillerden meydana gelir (Kielty ve diğ., 2002). Elastinin birikiminde ve mikrofibriller ile bağlanmalarında, kısaca elastik fibrillerin oluşumunda

LOX enzim ailesinin üyeleri kilit rol oynar (Shifren ve Mecham, 2006). Esasında beş üyeden oluşan bu enzim ailesinin sadece 3 üyesi akciğerlerde sentezlenmektedir: LOX, LOXL1 ve LOXL2. Fare akciğerlerinde LOX enzimlerinin ekspresyon düzeyleri $LOXL2 > LOX > LOXL1$ şeklindedir (Ovet ve Oztay, 2014). Çalışmamızda KOAH'lı insan akciğerlerinde bu ekspresyon düzeyi $LOXL2 > LOXL1 > LOX$ olarak saptanmıştır. Her üç enziminde elastik fibril biyogenezinde önemli görevleri bulunmaktadır. LOX enzimi elastik fibrillerin kollagenler ile çapraz bağlanmalarını katalizler iken, LOXL1 özellikle elastin birikiminde etkilidir. LOXL2 ise elastinin birikiminde ve aralarındaki çapraz bağların kurulmasında görev alır (Maki ve diğ., 2005; Kagan ve Ryvkin, 2011). Elastik fibrillerin zarar görmesi durumunda, akciğer hücrelerinin bu zararı onarmaları oldukça zaman alır. Bu zararın devam etmesi durumunda onarım yeterli düzeyde gerçekleştirilemeyeceği için çeşitli hastalıkların oluşması kolaylaşır (Shifren ve Mecham, 2006). Pulmoner amfizemde olduğu gibi proteaz aktivitesinin aşırı artmasına bağlı elastik fibrillerin yıkımının gerçekleşmesi buna çok iyi bir örnektir. Amfizemde elastin biyogenezindeki anomalileri gösteren çalışmaların sayısı oldukça azdır. Fibulin-5 geni çıkarılan farelerde akciğer gelişiminde elastik fibrillerin oluşmadığı ve akciğerde amfiyatöz alanların meydana geldiği görülmüştür (Liu ve diğ., 2004). Wendel ve diğ. (2000), elastin geni eksik farelerde hava yollarında meydana gelen yoğun genişlemeler sonucunda erken ölümlerin olduğunu rapor etmiştir. Diğer bir çalışmada, sigara dumanının elastik fibrillerin çapraz bağlanmasını engellediği *in vitro*'da saptanmıştır (Laurent ve diğ., 1983). Yapılan bir başka çalışmada, sigara dumanı ile muamele edilen fütal sıçan akciğer fibroblastlarında LOX enzimin ekspresyonunda, kontrole kıyasla azalma olduğu gösterilmiştir (Chen ve diğ., 2005). Benzer bir çalışmada, sıçan fütal akciğer fibroblastlarının sigara dumanına maruz bırakılmalarıyla, bu hücrelerde LOX mRNA kararlılığının azaldığı ve LOX transkripsiyonunun durdurulduğu belirlenmiştir (Gao ve diğ., 2005). Benzer bulgular *in vivo* çalışmalardan da elde edilmiştir. Sigara dumanı maruziyeti sonrasında sıçanlarda LOX ekspresyonunda azalma ve buna bağlı olarak akciğerlerde amfizem geliştiği rapor edilmiştir (Li ve diğ., 2011). Aynı çalışma grubu, elastik fibril oluşumunda çeşitli anomaliler ve LOX seviyelerinin düşük olması ile karakterize edilen Menkes sendromlu hastalarda akciğerlerde amfiyatöz alanların gelişmesiyle solunum yetersizliği ve erken ölümlerin meydana geldiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmalardan elde edilen bulgular, LOX ekspresyonundaki azalmanın amfizeme neden olabileceğini göstermektedir.

Yapılan bir başka çalışmada da LOXL1 geni çıkarılan sıçan fibroblast hücrelerinde pulmoner amfizem geliştiği tespit edilmiştir (Thomassin ve diğ., 2005). LOX enzim ailesinin üyelerinin pulmoner amfizem patogenezindeki etkisi insanlar üzerinde araştırılmamıştır. Çalışmamızda adenokarsinomlu KOAH hastalarından alınan amfizemli akciğer örneklerinde elastin protein miktarındaki azalmaya paralel olarak, aktif LOX ($p < 0,05$), LOXL1 ($p < 0,001$) ve LOXL2 ($p < 0,05$) protein miktarlarında da anlamlı bir azalışın olduğu tespit edildi. Bu proteinler arasında aktif LOXL1 miktarındaki azalma oldukça belirgindi. LOXL1 proteini özellikle elastin birikiminde etkili olduğundan, aktif LOXL1 protein miktarındaki azalma bize amfizemli örneklerde, elastik fibrillerin oluşumun önemli basamaklarından biri olan elastin birikiminde aksamaların olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca aktif LOX ve LOXL2 protein miktarlarındaki azalmalar da, elastik fibrillerin birikimdeki aksaklıklara ek olarak elastin monomerlerinin birbiri arasında ve mikrofibrillerle olan çapraz bağlanmalarında aksamaların olabileceğini akla getirmektedir. Dolayısı ile amfimatöz akciğerde elastin miktarının azalması, aktif LOX, LOXL1 ve LOXL2 protein miktarlarındaki azalmaya bağlı olarak elastik fibril biyogenezinde bazı anomalilerin gelişmiş olabileceğini gösterebilir. Diğer yandan, aktif LOX ve LOXL2 seviyelerinde azalma ile birlikte elastik fibrillerin çapraz bağlar kurarak ECM'de yığınlar oluşturmasında da bazı aksamalar görülebilir. Böylelikle büyük yığınlar halinde ECM'de organize olamayan elastik fibriller, proteazların açık hedefi haline gelerek hızlıca yıkılabilirler. Sonuç olarak aktif LOX, LOXL1 ve LOXL2 protein seviyelerindeki azalmalar, elastik fibril oluşumu ve bu fibrillerin ECM'deki organizasyonunu bozarak pulmoner amfizem gelişimine katkı sağlayabilirler.

Bakır vücutta bulunan önemli eser elementlerden biridir. Bakır, süperoksit dismutaz, LOX'lar, tirozinaz ve dopamin β -hidroksilaz gibi enzimlerin kofaktörüdür. Bakır, enerji metabolizması, antioksidan aktivite, melanin ve dopamin sentezi gibi önemli olaylarda kofaktör olarak iş görür (Grubman ve White, 2014). Sıçanların bakır eksik diyetle beslenmesi pulmoner amfizeme neden olur (Mizuno ve diğ., 2012). Soskel ve diğ. (1984), bakır eksik diyetle beslenen hamsterların akciğerlerinde amfimatöz lezyonlar saptamışlardır. Bakır, elastik fibril biyogenezinde ve organizasyonunda görev alan LOX, LOXL1 ve LOXL2 öncül proteinlerinin aktivasyonu için gereklidir (Kagan ve Ryvkin, 2011). Menkes sendromlu hastalarda bakırın barsaklardan emilememesinden

dolayı vücutta bakır eksikliği görülür. Wilson hastalarında ise özellikle beyin, karaciğer, böbrek ve korneada bakır birikimi söz konusuysen, bu hastalar total vücut bakır ve serüloplazmin miktarında azalma ile karakterize edilirler. Kalıtsal bakır metabolizma hastalıkları olan Menkes ve Wilson hastalıklarında ve ayrıca lekeli deri hastalığı olan fareler (blotchy mice) ile oluşturulan hayvan modellerinde, bakır eksikliğine dayalı olarak, LOX enzimlerinin aktivitesinde aksamalar ve elastinin biyosentezindeki ciddi zararlar dolayısıyla pulmoner amfizem görülmektedir (Ranga ve diğ., 1983; Grande ve diğ., 2005; Telianidis ve diğ., 2013). Soskel ve diğ. (1982), domuzların bakır eksik diyetle beslenmesi sonucu, akciğerlerde yoğun alveolar genişlemeler saptamışlardır ve bu genişlemelere LOX enzimlerindeki azalmaya bağlı olarak elastin miktarındaki azalma ve elastik fibrillerin yıkımıyla ilgilisi olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmaların sonuçları bakır eksikliğine bağlı olarak LOX enzimleri miktarındaki ve aktivasyonundaki azalmanın pulmoner amfizem patogenezinde etkili olduğunu göstermektedir. COMMD1, hipoksiyaya adaptasyonda, inflamatuvar cevapta, sodyum salınımında ve bakır metabolizması gibi bir çok biyolojik işte etkili olan bir proteindir (Van de Sluis ve diğ., 2010). COMMD1 proteini, hücre içi bakır seviyesini belirler. Bakırın hücre dışına sekresyonunu sağlayan ATP7A ve ATP7B proteinleri ile etkileşime giren COMMD1, hücre içinde bulunan bakırın hücre dışına taşınmasında görev alır (McDonald, 2013). İlk olarak, köpeklerde yapılan bir çalışmada *COMMD1* mutasyonuna bağlı olarak hepatositlerde bakır birikiminin, karaciğerde toksisiteye yol açtığı bulunmuştur (Su ve diğ., 1982). Aynı şekilde, farelerde *COMMD1* delesyonu ile karaciğerde yaygın bakır birikimi tespit edilmiştir (Vonk ve diğ., 2011). Çalışmamızda, amfizemli akciğer doku örneklerinin, amfizemli olmayan örneklerinden daha az miktarda COMMD1 protein içerdiği ($p < 0,01$) saptanmıştır. Yukarıda bahsedilen deneysel çalışmaların sonuçlarına göre, bakır eksikliğinde amfizem oluşabilmektedir. Verilerimizde, saptadığımız COMMD1 protein miktarında azalma, amfizemli örneklerde akciğerde bakırın hücreden salgılanmasında bazı aksaklıkların meydana gelmesine neden olabilir. Bununla birlikte aktif LOX, LOXL1 ve LOXL2 proteinlerin seviyesinde saptadığımız azalmanın, bakır metabolizmasındaki muhtemel aksaklıkla ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Sonuç olarak, COMMD1 proteinindeki azalmaya bağlı olarak hücre dışına salgılanamayan bakır, ECM'de bakır bağımlı çalışan LOX'ların aktivitelerinde bir azalmaya neden olmuş olabilir. LOX, LOXL1 ve LOXL2 aktivitelerindeki bu azalma elastik fibril biyogenezi ve bu fibrillerin ECM'deki

organizasyonun bozulmasına neden olarak pulmoner amfizemin gelişiminde etkili olmuş olabilir.

HIF-1 proteini, HIF-1 α ve HIF-1 β alt ünitelerinden oluşan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. HIF-1 α alt ünitesi, oksijene duyarlıdır, hipoksik şartlar altında hücrede stabil kalır ve HIF-1'in aktivasyonunu belirler. Hipoksik şartlarda HIF-1 α yıkımı durdurulur; HIF-1 α sitoplazmadan nükleusa geçerek burada HIF-1 β ile dimerize olur ve aktif HIF-1 kompleksini oluşturur (Dery ve diğ., 2004). Yapılan çalışmalarda, yaygın birçok kanser türünde, hücrelerin hipoksik şartlar altında olduğu ve HIF-1'in tümör vaskulogenezisi kontrol ettiği gösterilmiştir. Örneğin, akciğer adenokarsinomlu ve vasküler invazyonlu hastalarda, HIF-1 α ekspresyonu belirgin bir şekilde yüksektir (Enatsu ve diğ., 2006). HIF-1 α 'nın ekspresyonunun artmasının, akciğer adenokarsinom hücrelerinin invazif kapasitesini arttırdığı rapor edilmiştir (Shyu ve diğ., 2007). Andersen ve diğ. (2011), akciğer skuamöz hücre karsinomlu hastalarda, HIF-1 α ekspresyonu artışının kanser hücrelerinin yaşamları için gerekli olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmamızda kullanılan doku örnekleri adenokarsinom tanısı konulan KOAH hastalarından alınmıştır. Ancak alınan ve çalışmada kullanılan akciğer örnekleri, kanserli bölgenin etrafındaki kanserleşmemiş parçalardır. Bu parçalardan amfiyotöz akciğer örneklerinde, amfiyotöz olmayan akciğer örneklerine kıyasla daha az miktarda HIF-1 α ($p < 0,05$) belirlenmiştir. Bu durum bize akciğer kanseri tanısı konulan bu hastalarda, kanserli bölge dışındaki alanlarda HIF-1 α ekspresyon profilinin farklı olabileceğini göstermektedir. KOAH hastalarından alınan akciğer örneklerinde, amfiyotöz akciğerlerde HIF-1 α ekspresyonu azalmaktadır (Yasuo ve diğ., 2011). Sıçanlarda sigara dumanı ile oluşturulan KOAH modelinde, HIF-1 α immüno reaktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir (XiaoQian ve Jian, 2010). Bizim verilerimizde de benzer şekilde amfizemli doku örneklerinde HIF-1 α miktarında anlamlı bir azalma saptandı. Ancak, immünohistokimyasal analizlerimiz makrofaj, lökosit, interstitial bağ doku hücreleri ve alveolar epitel hücrelerinde HIF-1 α immüno reaktivitesinin çoğunlukla hücrelerin nükleuslarında olduğunu gösterdi. Bu gözlemlere dayanarak amfiyotöz akciğerde HIF-1 α ekspresyonunun azaldığını, ancak aktivasyonunun arttığını söyleyebiliriz. Sıçanların sigara dumanına maruz bırakılması ve intratrakeal lipopolisakkarit verilmesi ile oluşturulan deneysel KOAH modelinde, uyarılan HIF-1 α aktivasyonunun akciğerlerde KOAH patogeneze doğrudan katkı sağladığı ileri

sürülmektedir (Jiang ve diğ., 2010). HIF-1, 60'dan fazla genin ekspresyonunu kontrol eder (Semenza, 2002). HIF-1 α , hedef genlerin promotöründe bulunan hipoksiya yanıt elementlerine bağlandığında ilgili genlerin transkripsiyonunu başlatır. HIF-1 kompleksi *LOX* geninin ekspresyonunu kontrol eden önemli bir transkripsiyon faktörüdür. *LOX*, bağ doku hücrelerinden fibroblastlar tarafından üretilir. *LOX* promotörü analiz çalışmalarında, bu promotör bölgenin evlasyonel gelişim sürecinde oldukça korunduğu ve sıçan, fare ve insan *LOX* gen ekspresyonunun kontrolünün benzer olabileceği ileri sürülmektedir (Pez ve diğ., 2011). Sıçanlarda yapılan bir çalışmaya göre, histon deasetilazın inhibisyonu p53 protein ekspresyonunu artırır. P53'ün artması, HIF-1 α 'nın ekspresyonunu azaltır. Yetersiz HIF-1 α nedeni ile *LOX* transkripsiyonu azalır. Böylece *LOX* tarafından gerçekleştirilen elastik fibriller arasında çapraz bağlanmalar bozulur ve akciğer dokusunda meydana gelen hasar sonucu amfizem gelişir (Mizuno ve diğ., 2010). Çalışmamızın verilerine göre, HIF-1 α 'nın nükleer lokalizasyonunun artmasına rağmen, amfimatöz insan akciğerinde azalan HIF-1 α miktarının bu bireylerde *LOX*, *LOXL1* ve *LOXL2* genlerinin ekspresyonunu yeterli miktarda uyaramamış olabileceğini düşünmekteyiz. Bu durum, öncül proteinlerden yeterli miktarda aktif *LOX*, *LOXL1* ve *LOXL2* proteinlerinin oluşmaması ile sonuçlanmış olabilir. Bu da elastik fibril biyogenezi ve bu fibrillerin ECM'deki organizasyonunda bazı anomalilerin ortaya çıkmasına neden olarak pulmoner amfizem patogeneziye katkı sağlamış olabilir. Ayrıca bir çalışmaya göre hipoksik sinyalleme, sıçan akciğer fibroblastlarında *de novo* elastin üretimini % 70 oranında azaltır (Berk ve diğ., 2005). Diğer yandan KOAH hastalarının pulmoner amfizemli akciğer parçalarında azalan HIF-1 α protein miktarına rağmen, HIF-1 α aktivasyonunun uyarılması amfizem patogeneziye katkı sağlamış olabilir. Şöyle ki, HIF-1 α 'nın elastolitik aktiviteye sahip çeşitli proteazları aktive ettiği bilinir. Alveolar epitel hücreleri ile nötrofil ve makrofajlarda sentez edilen HIF-1 α , hipoksik şartlar altında bu hücrelerden elastaz, MMP-9, MMP-12 gibi elastazların salınımını uyarır (Semenza, 2003). Biz de çalışmamızda amfimatöz alanlardaki lökosit, makrofaj ve alveolar epitel hücrelerinde HIF-1 α aktivitesinin arttığını saptadık. Amfimatöz bölgelerde bu hücrelerdeki HIF-1 α aktivasyonu sonucu bu hücrelerden salınan proteazlar elastik fibril yıkımını uyarmış olabilir. *COMMD1* proteini, HIF-1 α 'nın hücre içi stabilizasyonunu ve HIF-1 α /HIF-1 β dimerizasyonunu düzenler. Örneğin, *COMMD1* ekspresyonu azaldığı zaman HIF-1 α 'nın hücre içi stabilizasyonu artar ve dolayısıyla HIF-1 α aktivasyonu da artar (Van De Sluis ve diğ., 2007). Bir

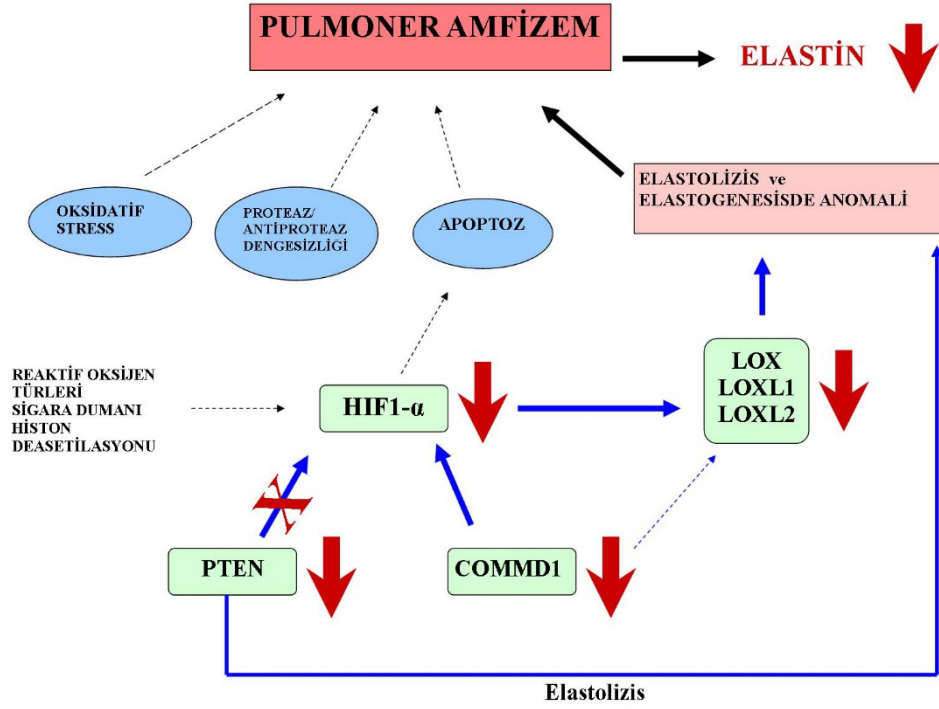
çalışmada COMMD1 proteini HIF-1 α ve HIF-1 β dimerizasyonunu bozarak HIF-1 aktivasyonunu engellediği ve böylelikle tümör invazyonunu sekteye uğrattığı gösterilmiştir (Van De Sluis ve diğ., 2010). Diğer bir çalışmada da COMMD1 proteininin HIF-1 α ve β dimerizasyonuna engel olarak, HIF-1 proteininin aktivitesini azalttığını ve DNA'ya bağlanmasını engellediğini ortaya koyulmuştur (Wang ve diğ., 1995). Böylelikle verilerimizdeki COMMD1 proteinindeki azalmanın, HIF-1 α aktivasyonundaki artışa katkı sağladığını söyleyebiliriz. Sonuç olarak KOAH hastalarında amfiyatöz alanların oluşumunda azalan COMMD1 proteini nedeniyle aktivasyonu uyarılan HIF-1 α 'nın etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

PTEN, PI3K-Akt yolağını negatif olarak düzenleyerek HIF-1 α ekspresyonunda etkili olan tümör baskılayıcı bir gen dir (Zundel ve diğ., 2000). Tüm kanser türlerinde, PTEN protein seviyesinin düşük olduğu, dolayısıyla Akt aktivasyonunda artış olduğu bilinmektedir (Bozinovski ve diğ., 2006). Bu durum kanserli dokularda HIF-1 α ekspresyonunda artışa neden olarak hipoksik sinyalleme yi etkin kılmaktadır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında yapılan bir çalışmada PTEN'in eksikliği rapor edilmiştir (Soria ve diğ., 2002). *PTEN* geni eksik gliyobilastoma hücrelerinde, PTEN proteini eksikliği nedeniyle PI3K/Akt sinyal yolunun uyarıldığı ve buna bağlı olarak HIF-1 α seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (Jiang ve diğ., 2001). Çeşitli kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, PTEN'in PI3K/Akt sinyal yolu inhibitörü olarak hücrelere uygulanmasının, hücrelerde HIF-1 α birikiminin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (Zundel ve diğ., 2000). Bu nedenle kanserli dokuda PTEN protein sentezinin uyarılmasının hipoksik sinyallemenin azaltılması yönünde kanser tedavisinde faydalı olacağı düşünülmüştür. İnsan adenokarsinom hücre hattında yapılan bir çalışmada, PTEN'nin artmış ekspresyonuyla, akciğer kanser invazyonunun inhibe edebileceği gösterilmiştir (Hong ve diğ., 2000). Çalışmamızda, LOX ve elastin gibi genlerin transkripsiyonunu düzenleyen HIF-1 α protein ile PTEN proteini arasındaki olabilecek muhtemel zıt ilişkiden yola çıkılarak, KOAH hastalarının amfiyatöz akciğerlerinde her iki proteinin seviyeleri analiz edilmiştir. Ancak, KOAH hastalarının amfiyatöz akciğer örneklerinde hem PTEN hem de HIF-1 α seviyesinde bir azalma tespit edilmiştir. Yukarıdaki çalışmalarda PTEN ve HIF-1 α proteinleri arasında kurulan zıt ilişki çalışmamızda kurulamamıştır: PTEN protein seviyesinde azalma, HIF-1 α proteinleri seviyesinde bir artışla sonuçlanmamıştır. KOAH'ın etiolojisini anlamak için

bir araştırmada, 107 hasta üzerinde geniş çapta hedef gen taramaları yapılmıştır. Sonuçlar, PTEN'nin KOAH'lı hastalarda için önemi bir risk faktörü olabileceği ve bu hastalarda akciğer kanserine yol açabileceğini göstermektedir (Hosgood ve diğ., 2009). Yamada ve diğ. (2014), sigara içen KOAH hastalarının bronkoskopik biopsi örneklerinde PTEN mRNA seviyelerinin azaldığını belirlemişlerdir. Diğer yandan, mide kanserine yakalanmış hastalarda, azalmış PTEN ekspresyonu ile artmış MMP-7 ekspresyonu arasında sıkı bir ilişki saptanmıştır (Zheng ve diğ., 2000). MMP-7, kollagenler ve fibronektin gibi ECM proteinleri ve elastin proteininin yıkımından sorumlu bir proteindir. U87MG glioblastoma hücrelerinde artan PTEN ekspresyonunun, bir elastaz olan MMP-9 ekspresyonunu durdurduğu saptanmıştır (Park ve diğ., 2002). Bu veriler, PTEN proteininin MMP-7 ve 9 gibi elastazların ekspresyonunu azaltmada etkili olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda KOAH hastalarının amfiyatöz akciğer örneklerinde PTEN protein seviyesinin azalması, MMP-7 ve 9 gibi elastazların ekspresyonunu uyararak elastik fibrillerin yıkımına ve amfiyatöz alanların oluşununa neden olabileceğini söyleyebiliriz. KOAH hastalarında PTEN protein seviyesinin azalması, bu hastalarda pulmoner amfizemin gelişiminde etkili olabilir.

KOAH'lı hastalarda görülen pulmoner amfizem, bu hastalardaki ölüm nedenlerinden biridir. Çünkü pulmoner amfizem, gaz değişiminin yapıldığı solunum yüzey alanındaki ciddi hasar nedeniyle bu yüzey alanının kaybına; dolayısı ile kan gazları seviyelerin normalin dışına çıkmasına neden olur. Pulmoner amfizem patogenezi anlamaya yönelik çalışmaların çoğu proteaz/antiproteaz dengesizliği nedeniyle görülen doku yaralanması ve elastik fibriller başta olmak üzere ECM elemanlarının yıkımı üzerinde yoğunlaşmıştır. Bununla birlikte, pulmoner amfizemde elastik fibril yıkımı yanı sıra elastik fibril biyogenezi ve ECM'nin organizasyonunda meydana gelebilecek anomalilerin pulmoner amfizem patogenezi etkili olabileceği göz ardı edilmemelidir. Bu alanda az sayıda yapılan çalışma ve bizim çalışmamızın sonuçları bu düşünceyi doğrulamaktadır. Çalışmamızın sonuçları, adenokarsinomlu KOAH hastalarının akciğerlerinde görülen amfizemin gelişiminde aktif LOX, LOXL1 ve LOXL2 protein seviyelerindeki azalmanın önemli olduğunu göstermektedir. Bu proteinlerin aktivasyonundaki azalmayla birlikte dokuda elastin miktarındaki azalma, dokudaki aktif LOX, LOXL1 ve LOXL2 protein seviyelerinin elastik fibril oluşumu ve bu fibrillerin ECM'de birikimi için oldukça önemli olduğunu göstermektedir. Aktif

LOX, LOXL1 ve LOXL2 protein seviyelerinin azalması ile birlikte elastik fibril biyogenezinde oluşan aksaklıkların ve ECM'deki elastik fibril yığınlarının proteazların açık hedefi haline gelmesi sonucunda yıkılmalarının, pulmoner amfizemin oluşumuna önemli bir katkı sağladığını düşünmekteyiz (**Şekil 5.1:**). Ayrıca amfizemli akciğer örneklerinde miktarları azalan COMMD1, HIF-1 α ve PTEN proteinlerinin de bu süreçte etkili olduklarını düşünmekteyiz. Amfizemli akciğer örneklerinde miktarı azalan COMMD1 proteini nedeniyle, aktivasyonu uyarılan HIF-1 α ve yine dokuda miktarı azalan PTEN proteini aracılığıyla uyarılan proteazlar KOAH hastalarında pulmoner amfizem oluşumunu sağlayabilir. Pulmoner amfizemin eşlik ettiği KOAH hastalığının tedavisine yönelik bugün için kesin bir tedavi bulunmamaktadır. Çalışmamızın sonuçları, bu hastalarda yeni tedavi yöntemi olarak aktif LOX, LOXL1 ve LOXL2 protein miktarlarını arttırmaya yönelik yaklaşımların etkili olabileceğini işaret etmektedir. Ayrıca, COMMD1 ve PTEN ekspresyonlarını arttırmaya yönelik uygulamaların da KOAH hastalarında pulmoner amfizem gelişiminin önlenmesinde etkili olabileceğini söyleyebiliriz. Dolayısı ile LOX, LOXL1, LOXL2, COMMD1 ve PTEN genleri, KOAH hastalarında pulmoner amfizem gelişiminin önlenmesinde yeni hedef genler arasında gösterilebilir.



Şekil 5.1: Çalışmamızın sonuçları doğrultusunda KOAH'lı hastalarda pulmoner amfizem patogenezi modellenmiştir. Sigara içicisi olan insanlarda HIF-1 α protein miktarındaki azalma, akciğerde aktif LOX, LOXL1 ve LOXL2 proteinlerinin miktarında azalmaya neden olur ve elastik fibril biyogenezinde ve ECM'deki organizasyonunda meydana gelen aksamalar sonucunda pulmoner amfizem gelişebilir. Ayrıca KOAH hastalarında miktarı azalan COMMD1 proteini nedeniyle aktivasyonu uyarılan HIF-1 α ve miktarı azalan PTEN proteini elastazların aktivasyonu aracılığıyla pulmoner amfizeme neden olabilir.

KAYNAKLAR

- Andersen S., Eilertsen M., Donnem T., Al-Shibli K., Al-Saad S., Bosund L.T., Bromnes R.M. 2011, Diverging prognostic impacts of hypoxic markers according to NSCLC histology, *Lung Cancer*, 72(3), 294-302.
- Antunes MA, Rocco PR., 2011, Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models, *Anais da Academia Brasileira de Cienccias*, 83(4), 1385-1396.
- Bartalesi B., Cavarra E., Fiineschi S., LucAATeli M., Lunghi B., Martorana P.A. ve Lungarella G., 2005, Different lung responses to cigarette smoke in two strains of mice sensitive to oxidants, *European Respiratory Society*, 25(1), 15-22.
- Bergeron C. ve Boulet L.P., 2006, Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences and pharmacologic modulation, *Chest*, 129(4), 1068-1087.
- Berk J.L., Hatch C.A., Morris S.M., Stone P.J. ve Goldstein R.H., 2005, Hypoxia suppresses elastin repair by rat lung fibroblast, *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289, 931- 936.
- Berra E., Benizri E., Ginouves A., Volmat V., Roux D. Ve Pouyssegur J., 2003, HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 alpha in normoxia, *The EMBO Journal*, 22, 4082-4090.
- Bradfor M.M., 1976, A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Broekelman T.J., Kozel B.A., Ishibashi H., Werneck C.C., Keeley F.W., Zhang L., Mecham R.P., 2005, Tropoelastin interacts with cell-surface glycosaminoglycans via its c-terminal domain, *Journal of Biology Chemistry*, 280, 40939-40947.
- Bozinovski S., Vlahos R., Hansen M., Liu K ve Anderson G.P., 2006, Akt in the pathogenesis of COPD, *International Journal of COPD*, 1(1), 31-38.
- Chen L.J., Zhao Y., Gao S., Chou I.N., Taselli P., Stone P., Li W., 2005, Downregulation of lysyl oxidase and upregulation of cellular thiols in rat fetal lung fibroblasts treated with cigarette smoke condensate, *Toxicology Science*, 83, 372-379.
- Cleary E.G. ve Gibson M.A., 1996, *Elastik tissue, elastin and elastin microfibrils*, Extracellular matrix: an overview (Biology of Extracellular Matrix). In: Mecham R.P. (ed), Chapter 7, Springer Heidelberg Dordrecht, Berlin, Germany, ISBN: 978-3-642-16860-4, 95-130.
- De Bie P, van de Sluis B, Burstein E, van de Berghe PV, Muller P, Berger R, Gitlin JD, Wijmenga C, Klomp LW 2007, Distinct Wilson's disease mutations in ATP7B are associated with enhanced binding to COMMD1 and reduced stability of ATP7B, *Gastroenterology*, 133(4), 1316-26.

- Debelle L. ve Tamburro A.M., 1999, Elastin: molecular description and function, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(2), 261-72.
- Demedts I.K., Morel-Montero A., Lebecque S., Pacheco Y., Cataldo D., Joos G.F., Pauwels R.A. ve Brusselle G.G., 2006, Elevated MMP-12 protein levels in induced sputum from patients with COPD, *Thorax*, 61(3), 196-201.
- Dery M.A., Michaud M.D., Richard D.E., 2004, Hypoxia-inducible factor 1: Regulation by hypoxic and non-hypoxic activators, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37, 535-540.
- Diamond L., Kimmel E.C., Lai Y.L., Winsett D.W., 1988, Augmentation of elastase-induced emphysema by cigarette smoke, Effects of reduced nicotine content, *American Review Respiratory Disease*, 135(5), 1201-1206.
- Enatsu S., Iwasaki A., Shiakusa T., Hamasaki M., Nabeshima K., Iwasaki H., Kuroki M., Kuroki M., 2006, Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha and its prognostic significance in small-sized adenocarcinomas of the lung, *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 29(6), 891-895.
- Eriksson S., 1965, Studies in alpha-1-antitrypsin deficiency, *Acta Medica Scandinavica*, 177 (432), 1-85.
- Emam M., Renaud de la Faverie J-F., Gharbi N. Ve El-Gohary M.I., 2010, Characterization of lung's emphysema distribution: numerical assessment of disease development, *New Trends in Information Science and Service Science*, 1, 464-469.
- Fera T., Abboud R.T., Richter A. ve Johal S.S., 1986, Acute effect of smoking on elastaselike esterase activity and immunologic neutrophil elastase levels in bronchoalveolar lavage fluid, *American Review Respiratory Disease*, 133, 568-573.
- Fletcher C. ve Peto R., 1977, The Natural history of chronic airflow obstruction. *British Medical Journal*, 1, 1645-1648.
- Gao S., Chen K., Zhao Y., Richc B., Chen L., Li S.J., Taselli P., Stone P., Li W., 2005, Transcriptional and posttranscriptional inhibition of lysyl oxidase expression by cigarette smoke condensate in cultured rat fetal lung fibroblasts, *Toxicology Science*, 87, 197-203.
- Govender D. ve Chetty R., 2012, Gene of the month: PTEN, *Journal of Clinical Pathology*, 65, 601-603.
- Grande D.K., Kaler S.G., Albers G.M., Petterchak J.A., Thorpe C.M. ve diğ., 2005, Severe bilateral panlobular emphysema and pulmonary arterial hypoplasia: unusual manifestations of menkes disease. *American Journal of Medical Genetics part A*, 139, 151-155.
- Griffiths C.E., Russman A.N., Majmudar G., Singer R.S., Hamilton T.A. ve Voorhess J.J., 1993, Restoration of collagen formation in photodamaged human skin by tretinoin (retinoic acid), *The New England Journal of Medicine*, 329, 520-535.
- Grubman A. ve White A.R., 2014, Copper as a key regulator of cell signalling pathways, *Expert Review in Molecular Medicine Journal*, 11(16), 1-27.

- Hautamaki R.D., Kabayashi D.K., Senior R.M., Shapiro S.D., 1997, Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice, *Science*, 26, 2002-2004.
- Hong T.M., Yang P. C., Peck K., Chen J.J.M., Yang S.C., Chen Y.C., Wu C.W., 2000, Profiling the downstream genes of tumor suppressor PTEN in lung cancer cells by complementary DNA microarray, *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*, 23, 355-363.
- Hosgood III H.D., Menashe I., He X., Chanock S., Lan Q., 2009, PTEN identified as important risk factor of chronic obstructive pulmonary disease, *Respiratory Medicine*, 103, 1866-1870.
- Husein A.N., ve Kumor V., 2005, The lung, In Kumar A.V., Abbas A.K., Fausto N. (ed), *Robins and Cotan Pathologic Basis of Disease, 7th ed. Elsevier Saunders*; 1, 711-772
- Hodge S, Hodge G, Holmes M, ve diğ., 2005, Increased airway epithelial and T-cell apoptosis in COPD remains despite smoking cessation, *European Respiratory Journal*, 253, 447-454.
- Jiang B.H., Jiang G., Zheng J.Z., Lu Z., Hunter T., Vogt P.K., 2001, Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1, *Cell Growth & Differentiation*, 12, 363-369.
- Jiang H, Zhu Y, Xu H, Sun Y, Li Q., 2010, Activation of hypoxia-inducible factor-1alpha via nuclear factor-kappa B in rats with chronic obstructive pulmonary disease. *Acta Biochimica Biophysica Sinica (Shanghai)*, 42(7), 483-488.
- Kagan H.M. ve Li W., 2003, Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles insides and outside of the cell, *Journal of Cell Biochemistry*, 88(4), 660-672.
- Kagan H.M. ve Ryvkin F., 2011, *Lysyl oxidase and lysyl oxidase-like enzymes*, Extracellular matrix: an overview (Biology of Extracellular Matrix). In: Mecham R.P. (ed), Chapter 9, Springer Heidelberg Dordrecht, Berlin, Germany, ISBN: 978-3-642-16860-4, 303-335.
- Kanazawa H., Asai K., Hirata K., Yoshikawa J., 2003, Possible effects of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Medicine*, 114, 354-358.
- Kawakami M., Matsuo Y., Yoshiura K., Nagase T. ve Yamashita N., 2008, Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31, 1434-1438.
- Kida K. ve Thurlbeck W.M., 1980, The effects of beta-aminopropionitrile on the growing rat lung, *American Journal of Pathology*, 101(3), 693-710.
- Kielty C.M., SherrAAT M.J., Shuttleworth C.A., 2002, Elastik fibers. *Journal of Cell Science*, 115, 2817-2828.
- Kielty C.M., 2006, Elastic fibers in health and disease, *Expert reviews in molecular medicine*, 8, 1-23.

- Lang K.J., Kappel A. ve Goodall G.J., 2002, Hypoxia-inducible factor-1 alpha mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia, *Molecular Biology of the Cell*, 13, 1792-1801.
- Laurent P., Janoff A., Kagan H.M., 1983, Cigarette smoke blocks cross-linking of elastin in vitro, *American Review Respiratory Disease*, 127, 189-192.
- Leopold J.G. ve Gough J., 1957, The centrilobular form of hypertrophic emphysema and its relation to chronic bronchitis, *Thorax*, 12(3), 219-235.
- Li W., Zhou J., Chen L., Lou Z., Zhao Y., 2011, Lysyl oxidase, a critical intra- and extra-cellular target in the lung for cigarette smoke pathogenesis, *Internal Journal of Environmental Research and Public Health*, 8, 161-184.
- Liu W., Zhao Y., Gao J., Pawlyk B., Starcher B., Spencer J.A., Yanagisawa H., Zuo J., Li T., 2004, Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein, *Nature Genetics*, 36, 178-182.
- Lopez- Encuentra A., Astudillo J., Cerezuel J., Gonzalez-Aragones F., Novoa N., Sanchez-Palencia A., 2005, Prognostic value of chronic obstructive pulmonary disease in 2994 cases of lung cancer, *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 278, 8-13.
- Lopez B., Gonzales A., Hermida N., Valencia F., Teresa E. And Diez J., 2010, Role of lysyl oxidase in myocardial fibrosis: from basic science to clinical aspect, *American Journal of Physiology*, 299, 1-9.
- Lucero H.A., Kagan H.M., 2006, Lysyl oxidase; an oxidative enzyme and effector of cell function, *Cellular and Molecular life Sciences*, 63, 2304-2316.
- MacNee W. ve Rahman I., 1999, Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160, 558-565.
- MacNee W., 2003, Acute exacerbations of COPD, *Swiss Medical Weekly*, 133(17-18), 247-257.
- MacNee W., 2005, Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease, *Proceeding of The American Thoracic Society*, 2(4), 258-266.
- Maehama T. ve Dixon J.E., 1998, The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second Messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*. 273, 13375-13378.
- Maine G. N. ve Burstein E., 2007, COMMD proteins: COMMiing to the scene. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1, 1997-2005.
- Maki J.M., Rasanen J., Tikkanen H., Sormunen R. Makikallio K., Kivirikko K.I., Soininen R., 2002, Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunctions and perinatal death in mice, *Circulation*, 106, 2503-2509.
- Maki J.M., Sormunen R., Lippo S., Kaartenaho-Wiik R., Soininen R. Ve Myllyharju J., 2005, Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and fort he integrity of elastic and collagen fibers in various tissues, *American Journal of Pathology*, 167(4), 927-936.

- Mayne S.T., Buenconse J., Janerich D.T., 1999, Previous lung disease and risk of lung cancer among men and women nonsmokers, *American Journal of Epidemiology*, 149, 13-20.
- McDonald F.J., 2013, COMMD1 and ion transport proteins: what is the COMMEction? Focus on "COMMD1 interacts with the COOH terminus of NKCC1 in Calu-3 airway epithelial cells to modulate NKCC1 ubiquitination", *American Journal of Physiology and Cellular Physiology*, 305, 129-130.
- Mentzer S.J. ve Swanson S.J., 1999, Treatment of patients with lung cancer and severe emphysema, *Chest*, 116, 477-479.
- Mithieux S.M. ve Weiss A.S., 2005, Elastin. *Advances in Protein Chemistry*. 70, 437-461.
- Mizuno S., Yasuo M., Bogaard H.J. ve diğ., 2010, HDAC inhibition causes apoptosis in human pulmonary endothelial cells and lung fibroblasts, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181, A3455.
- Mizuno S., Yasuo M., Bogaard H.J., Kraskauskas D., Alhussaini A., Gomez-Arroya J., Farkas D., Ferbas L. ve Voelkel N.F., 2012, Copper deficiency induced emphysema is associated with focal adhesion kinase inactivation, *Plos One*, 7(1), e30678, 1-9.
- Morris D.G ve Sheppard D., 2006, Pulmonary emphysema: when more is less, *Physiology (Bethesda)*, 21, 396-403.
- O'Dell B.L., PhD, Killburn K.H., Md, McKenzie W.N., Ms, and Thurston R. J., PhD, 1978, The lung of the copper-deficient rat, *American journal of pathology*, 91(3), 413-424.
- Ofulue A.F. ve Ko M., 1999, Effects of depletion of neutrophils or macrophages on development of cigarette smoke-induced emphysema, *American Journal of Physiology*, 277 (1 Pt 1), 97-105.
- Ohnishi K., Takagi M., Kurokawa Y., Satomi S. ve Kontinen Y.T., 1998, Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema, *Laboratory Investigation*, 78(9), 1077-1087.
- Ovet H. ve Oztay F., 2014, The copper chelator tetrathiomolybdate regressed bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, by reducing lysyl oxidase expressions, *Biological Trace Element Research*, 162, 189-199.
- Owen C.A., 2008, Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 3(2), 253-268.
- Park M.J., Kim M.S., Park I.C., Kang H.S., Yoo H., Park S.H., Rhee C.H., Hong S.I., Lee S.H., 2002, PTEN suppresses hyaluronic acid-induced matrix metalloproteinase-9 expression in U87MG glioblastoma cells through focal adhesion kinase dephosphorylation, *Cancer Research*, 1;62(21), 6318-6322.
- Papke C.L. ve Yanagisawa H., 2014, Fibulin-4 and fibulin-5 in elastogenesis and beyond: Insights from mouse and human studies, *Matrix Biology*, 37, 142-149.

- Petrache I., Natarajan V., Zhen L., Medler T.R., Richter A.T., Cho C., Hubbard W.C., Berdyshev E.V. ve Tudor R.M., 2005, Ceramide upregulation causes pulmonary cell apoptosis and emphysema-like disease in mice, *Nature Medicine*, 11, 491-498.
- Pez F., Dayan F., Durivault J., Kaniewski B., Almond G., Le Provost G.S., Deux B., Clezardin P., Sommer P., Pouyssegur J., Reynaud C., 2011, The HIF-1- inducible lysyl oxidase activates HIF1 via the akt pathway in a positive regulation loop and synergizes with HIF-1 in promoting tumor cell growth, *Cancer Research*, 71(5), 1647-1657.
- Ranga V., Grahn D., Journey T.M., 1983, Morphologic and phenotypic analysis of an outcross line of blotchy Mouse, *Experimental Lung Research*, 4, 269-279.
- Raviv S., Hawkins K.A., DeCamp M.M. ve Kalhan R., 2011, Lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease enhancing surgical options and outcomes, *American Journal Respiratory and Critical Care Medicine*, 183, 1138-1146.
- Russell R.E., Culpitt S.V. ve DeMatos C. ve diğ., 2002, Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease, *American Journal Respiratory and Cellular Molecular Biology*, 26(5), 602-609.
- Salceda S. ve Caro J., 1997, Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes, *Journal of Biological Chemistry*, 272(36), 22642-22647.
- Satoh K., Kobayashi T., Misao T., Hitani Y., Yamamoto Y., Nishiyama Y., Ohkawa M., 2001, CT assessment of subtypes of pulmonary emphysema in smokers, *Chest*, 120(3), 725-729.
- Semenza G.L., 2002, HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics, *Trends in Molecular Medicine*, 8(4), 62-67.
- Semenza G.L., 2003, Targeting HIF-1 for cancer therapy, *Nature Review Cancer*, 3, 721-732.
- Serres F.J., Blanco I. ve Fernandez-Bustillo E., 2009, Estimating the risk for alpha-1 antitrypsin deficiency among COPD patients: evidence supporting targeted screening, *Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 3(3), 133-139.
- Schofield C. ve Ratcliffe P.J., 2004, Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 343-354.
- Shapiro S.D., 1995, The pathogenesis of emphysema: the elastase:anti-elastase hypothesis 30 years later. *Proceedings Association American Physicians*. 107, 346-352.
- Shapiro S.D. ve Senior R.M., 1999, Matrix metalloproteinases. Matrix degradation and more, *American Journal of Respiratory and Cellular Molecular Biology*, 20, 1100-1102.
- Shapiro, S. D., 2000, Animal models for COPD, *Chest*, 117, 223-227.
- Shapiro S.D., Goldstein N.M., Houghton A.M., Kobayashi D.K., Kelly D., Belaaouaj A., 2003, Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice, *American Journal of Pathology*, 163(6), 2329-2335.

- Sharafkhaneh A., Hanania N.A., Kim V., 2008, Pathogenesis of emphysema: from the bench to the bedside, *Proceedings American Thoracic Society*, 5(4), 475-477.
- Shi Y., Paluch B.E., Wang X., Jiang X., 2012, PTEN at a glance. *Journal of Cellular Science*, 125, 4687-4692.
- Shifren A. ve Mecham R.P., 2006, The stumbling block in lung repair of emphysema elastic fiber assembly, *Proceedings American Thoracic Society*, 3, 428-438.
- Shyu K.G., Hsu F.L., Wang M.F., Wang B.M., Lin S., 2007, Hypoxia-inducible factor 1 alpha regulates lung adenocarcinoma cell invasion, *Experimental Cellular Research*, 313(6), 1181-1191.
- Smith-Mungo L.I., ve Kagan H.M., 1998, Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology, *Matrix Biology*, 16, 387-398.
- Song M.S., Salmena L., Pandolfi P.P., 2012, The functions and regulation of the PTEN tumor suppressor, *Nature Reviews Molecular Cellular Biology*, 13, 283-296.
- Soria J.C., Lee H.Y., Lee, J.I., Wang L., Issa J.P., Kemp B.L., Liu D.D., Kurie J.M., Mao L. e Khuri F.R., 2002, Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation, *Clinical Cancer Research*, 8, 1178-1184.
- Soskel N. T., Watanabe S., Hammond E., Sandberg L.B., Renzetti A.D. Jr., Crapo J.D., 1982, A copper-deficient, zinc-supplemented diet produces emphysema in pigs, *American Reviews Respiratory Disease*, 126(2), 316-325.
- Soskel N.T., Watanabe S. ve Sandberg L.B., 1984, Mechanisms of lung injury in the copper-deficient hamster model of emphysema, *Chest*, 85, 70-72.
- Stren E.J. ve Frank M.S., 1994, CT of the lung in patients with pulmonary emphysema: diagnosis, quantification, and correlation with pathologic and physiologic findings, *American Journal of Roentgenology*, 162, 791-798.
- Su L.C., Ravanshad S., Owen C.A., McCall J., Zollman P.E.ve Hardy R.M., 1982, A comparison of copper-loading disease in Bedlington terriers and Wilson's disease in humans, *American Journal of Physiology*, 243(3), 226-230.
- Szias M., Doliray T., Nemes Z., Strausz J., 2006, Pathology of chronic pulmonary disease. *Pathology & Oncology Research*, 12, 52-60.
- Tang K., Rossiter H.B., Wagner P.D. Breen E.C., 2004, Lung-targeted VEGF inactivation leads to an emphysema phenotype in mice, *Journal of Applied Physiology*, 97, 1559-1566.
- Taraseviciene-Stewart L. ve Voelkel N.F., 2008, Molecular pathogenesis of emphysema, *Journal of Clinical investigation*, 118, 394-402.
- Telianidis J., Hung Y.H., Materia S., Fontaine S.L., 2013, Role of the P-type ATPases, ATP7A and ATP7B in brain copper homeostasis, *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5(44), 1-17.
- Thomassin L., Werneck C.C., Broekelmann T.J., Gleyzal C., Hornstra I.K., Mecham R.P., Sommer P., 2005, The pro-regions of lysyl oxidase and lysyl oxidase-like 1 are required

- for deposition onto elastic fibers, *Journal of Biological Chemistry*, 280(52), 42848-42855.
- Thurlbeck W.M., 1963, The incidence of pulmonary emphysema, with observation on the relative incidence and spatial distribution of various types of emphysema, *American Reviews Respiratory Disease*, 87, 206-215.
- Thurlbeck W.M., 1995, *Chronic airflow obstruction*, Pathology of the lung In: Thurlbeck W.M., Churg A.M. (ed), 2nd Ed. Thieme Medical Publishers, New York, USD, 739-826.
- Turino G.M., Ma S., Li Y.Y., Cantor J.O., Luisetti M., 2011, Matrix elastin; a promising biomarker for chronic obstructive pulmonary disease, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184(6), 637-641.
- Tuder R.M., McGrath S. ve Neptune E., 2003, The pathobiological mechanisms of emphysema models: what do they have in common?, *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 16, 67-78.
- Tuder R.M., Yoshida T., Arap W., Pasqualini R., Petrache I., 2006, State of the art: cellular and molecular mechanisms of alveolar destruction in emphysema: an evolutionary perspective, *Proceedings American Thoracic Society*, 3, 503-510.
- Turner MC, Chen Y, Krewski D, Calle EE, Thun M.J., 2007, Chronic obstructive pulmonary disease is associated with lung cancer mortality in a prospective study of never smokers. *American Journal Respiratory and Critical Care Medicine*, 1;176(3), 285-290.
- Ueno M, Maeno T, Nishimura S, Ogata F, Masubuchi H, Hara K, Yamaguchi K, Aoki F, Suga T, Nagai R, Kurabayashi M., 2015, Alendronate inhalation ameliorates elastase-induced pulmonary emphysema in mice by induction of apoptosis of alveolar macrophages, *Nature Communications*, 10(6), 1-18.
- Van de Sluis B., Muller P., Duran K., Chen A., Groot A.J., Klomp L.W., Liu P.P., Wijmenga C., 2007, Increased activity of hypoxia-induced factor-1 is associated with early embryonic lethality in Commd1 null mice, *Molecular and Cellular Biology*, 27, 4142-4156.
- Van de Sluis B., Mao X., Zhai Y., Groot A.J., Vermeulen J.F., van der Wall E., van Diest P.j., Hofker M.H. Wijmenga C., Klomp L.W., Cho K.R., Fearon E.R., Vooijs M. Ve Burstein E., 2010, COMMD1 disrupts HIF-1 α /beta dimerization and inhibits human tumor cell invasion, *The Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 2119-2130.
- Vonk W.I., Bartuzi P., Bie P., Kloosterhois N., Wichers C.G., Berger R., Haywood S., Klomb A.W.J., Wijmenga C., Van de Sluis B, 2011, Liver-specific COMMD1 knockout mice are susceptible to hepatic copper accumulation. *Plos One*, e29183, 1-8.
- Vrhovski B. ve Weiss A.S., 1998, Biochemistry of tropoelastin. *European Journal of Biochemistry*, 258(1), 1-18.
- Wendel D.P., Taylor D.G., Albertine K.H., Keating M.T. ve Li D.Y., 2000, Impaired disial airway development in mice lacking elastin. *American Journal of Respiratory and Molecular Biology*. 23, 320-326.

- Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A., Semenza G.L., 1995, Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-Pas heterodimer regulated by cellular O₂ tension, *Proceedings National Academy of Sciences USA*, 92(12), 5510-5514.
- Wright J.L. ve Churg A., 1990, Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. *American Reviews Respiratory Disease*;142, 1422–1428.
- Wright J.L. ve Churg A., 2006, Advances in the pathology of COPD, *Histopathology*, 49, 1-9.
- Woodruff P.G., Koth L.L., Yang Y.H., Rodriguez M.W., Favoreto S., Dolganov G.M., Paquet A.C. ve Erle D.J., 2005, A distinctive alveolar macrophage activation state induced by cigarette smoking. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 172, 1383-1392.
- Yamada K., Asai K., Ohara Y., Sugiyama Y., Shirai A.U., Sato K., Yamamoto N., Tamagaki G., Watanabe T. S., Kohnishi K., Tochino Y., Uji M., Kanazawa H., Hirata K., 2014, The effect of smoking on phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN) mRNA expression in human airway epithelial cells, *European Respiratory Journal*, 44(58).
- Yasuo M., Mizuno S., Kraskauskas D., Bogaard H.J., Natarajan R., Cool CD., Zamora M., Voelkel N.F., 2011, Hypoxia inducible factor -1 α in human emphysema lung tissue, *European Respiratory Society*, 37, 775-783.
- Yokohori N., Aoshiba K. Ve Nagai A., 2004, Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cell in patients with pulmonary emphysema, *Chest*, 125(2), 626-632.
- Zheng T., Zhu Z., Wang Z., Homer R.J., Ma B., Riese R.J. Jr, Chapman H.A. Jr, Shapiro S.D. ve Elias J.A., 2000, Inducible targeting of IL-13 to the adult lung cause matrix metalloproteinase and cathepsin dependent emphysema. *The Journal of Clinical Investigation*, 106, 1081-1093.
- Zundel W., Schindler C., Haas-Kogan D., Koong A., Kaper .F, Chen E., Gottchalk A.R., Ryan H.E., Johnson R.S., Jefferson A.B., Stokoe D., Giaccia A.J., 2000, Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes and Development*, 14, 391-396.
- XiaoQian D. ve Jian G., 2010, The significance and expression on HIF-1 α and VEGF in rats model with COPD and the chronic bronchitis, *Journal Progress in Modern Biomedicine*, 10(3), 478-480.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Neziha BEŞİKTEPE
Uyruğu	TC
Doğum tarihi, Yeri	05.02.1991, Bursa
Telefon	05375111755
E-mail	nbeshiktepe@gmail.com
Web adres	-

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji Anabilim Dalı / Moleküler Biyoloji	2016
Lisans	M.Ü. Fen Fakültesi/Biyoloji Bölümü	2013
Lise	Bursa Hasan Coşkun Lisesi	2009

Makaleler / Bildiriler

Besiktepe N., Oztay F., Ersen E., 2015, Pulmoner amfizemde lizil oksidaz enzimlerinin sentezindeki değişimler, Turk Solunum Derneğinin 37. Ulusal Kongresi, 17-21 Ekim, Çeşme İzmir.
--