

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS HASTALIKLARI A.D.

ABDOMİNAL YAĞ DOKUSUNDAN İZOLE EDİLEN
MEZENŞİMAL HÜCRELERİN RATLARDA
OLUŞTURULAN AMFİZEM MODELİ ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİ

Dr. Pınar YILDIZ GÜLHAN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet EKİCİ

2013-KIRIKKALE



T.C.

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

GÖĞÜS HASTALIKLARI A.D.

**ABDOMİNAL YAĞ DOKUSUNDAN İZOLE EDİLEN
MEZENŞİMAL HÜCRELERİN RATLARDA
OLUŞTURULAN AMFİZEM MODELİ ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİ**

Dr. Pınar YILDIZ GÜLHAN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet EKİCİ

2013-KIRIKKALE

Çalışmanın Başlığı: Abdominal Yağ Dokusundan İzole Edilen Mezenşimal Hücrelerin Ratlarda Oluşturulan Amfizem Modeli Üzerine Olan Etkileri

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesinde “Göğüs Hastalıkları Uzmanlık Eğitimi” çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıda belirtilen jüri üyeleri tarafından uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: Haziran 2013

**Pro. Dr. Mehmet EKİCİ
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı
Jüri Başkanı**

**Prof. Dr. Aydanur EKİCİ
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı
Üye**

**Yard.Doç. Dr. Emel BULCUN
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı
Üye**

TEŞEKKÜR

Öncelikle asistanlığım süresince deneyimlerini ve bilgi birikimi ile yönlendirme ve desteklerini benden esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Mehmet EKİCİ'ye; eğitimime değerli katkıları olan ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Aydanur EKİCİ, Prof. Dr. Fusun Kalpaklıoğlu, Yard.Doç. Dr. Emel Bulcun, Yard.Doç.Dr. Ayşe BACCIOĞLU KAVUT'a ve birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, Göğüs Hastalıkları kliniği hemşireleri, personeline teşekkür ederim.

Tezimin her döneminde bilgi birikimlerini esirgemeyen ve sonsuz katkıları olan Hacettepe Üniversitesi Fizyoloji AD. Öğretim üyesi sayın Doç Dr. Aylin GÜRPINAR' a ve asistan arkadaşım Mehmet Niyaz' a, teşekkür ederim.

Tezimin patoloji preparatlarını hazırlayan Patoloji AD. çalışanlarına, değerlendiren sayın Prof. Dr. Önder Bozdoğan ve asistan arkadaşım Emre Erçin' e teşekkür ederim. Biyokimya AD. Öğretim üyesi sayın Prof.Dr.Üçler Kısa ve asistan arkadaşım Nurkan Aksoy' a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde sonsuz destek ve sevgileriyle hep yanımda olan annem, babam, kardeşlerim, ablam Oya YILDIZ ve eşim Muhammet Gülhan'a minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Pınar YILDIZ GÜLHAN

ÖZET

YG, Pınar. Abdominal Yağ Dokusundan İzole Edilen Mezenşimal Hücrelerin Ratlarda Oluşturulan Amfizem Modeli Üzerine Olan Etkileri. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Kırıkkale, 2013.

Amfizem ve kronik bronşit, kronik obstrüktif akciğer hastalığının (KOAH) farklı fizyopatolojiye sahip önemli bileşenleridir. Elastaz, rat amfizem modeli oluşturmak amacıyla sık olarak kullanılmaktadır. Amfizem modellerinde, bronkoalveolar lavaj sıvısı (BALS) ve serumdaki matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) düzeylerinin amfizem süreci ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Adipoz doku kökenli mezenşimal kök hücrelerin (MKH) amfizem üzerine iyileştirici etkileri olduğuna dair sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışmanın amacı, ratlarda elastazla oluşturulan amfizem modelinde adipoz dokudan kökenli MKH'lerin, amfizemi iyileştirici ve MMP-9 düzeyleri üzerine etkilerinin olup olmadığını araştırmaktır.

Bu çalışmada, ağırlıkları 250-300 gr arasındaki 6-8 haftalık 31 Wistar albino rat değerlendirildi. Çalışmanın birinci gününde, kontrol grubuna (n=10), intratrakeal olarak salin çözeltisi; Elastaz grubuna (n=12) ve Elastaz-MKH grubuna (n=9) 0.5 ml salin çözeltisi içinde vücut ağırlığının gramına 0.1 IU "porcine" pankreatik elastaz (PPE) verildi. Elastaz-MKH grubundaki ratlara çalışmanın 21. gününde serum fizyolojik içinde süspanse edilen MKH'ler kuyruk veninden uygulandı. Çalışmanın 42. gününde tüm ratlar sakrifiye edildi. BALS ve serum MMP-9 konsantrasyonları ölçüldü ve her iki akciğer amfizem indeksi (Aİ) hesaplandı.

Elastaz (p=0.008) ve Elastaz-MKH (p=0.001) gruplarının Aİ medyan değerleri, kontrol grubunun değerinden anlamlı düzeyde düşüktü. Üç grubun serum MMP-9 düzeyleri (p>0.005) ve BALF MMP-9 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark yoktu (p>0.005).

Bizim sonuçlarımız, adipoz doku kökenli MSC uygulamasının amfizematöz ratlarda serum ve BALS MMP-9 düzeylerine etkisi olmadığını düşündürmektedir

Anahtar Sözcükler: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı, amfizem, mezenşimal hücre, matriks metalloproteinaz-9.

ABSTRACT

YG, Pınar. The Effects of Mesenchymal Cells Isolated from Abdominal Adipose Tissue on Rat Model of Emphysema. Kırıkkale University Faculty of Medicine, Department of Pulmonary Medicine, Thesis of Speciality, Kırıkkale, 2013.

Emphysema and chronic bronchitis which have different physiopathology, are the significant components of chronic obstructive lung disease (COPD). Elastase is frequently used to create rat model of emphysema. In emphysema models, it is known that bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in serum are related with emphysema process. There is limited number of study claiming that adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (MSC) obtained from have recovering effects on emphysema. The objective of the study is to investigate whether adipose tissue-derived MSCs have recovering effects on emphysema and on MMP-9 levels in an elastase rat model of emphysema.

In this study, 6/8- week-old 31 Wistar albino rats weighing between 250-300 g were assessed. In the first day of study, saline solution was administered intratracheally to the controls (n=10); 0.5 ml saline solution containing 0.1 IU "porcine" pancreatic elastase (PPE) per body weight in grams was administered intratracheally to the Elastase group (n=12) and the Elastase-MSC group (n=9). Rats in Elastase-MSC group were injected with MSCs suspended in serum physiologic via caudal vein at day 21 . In 42nd day of study, all rats were sacrificed. BALF and serum MMP-9 concentrations were measured and emphysema index (EI) was calculated for both lung.

EI median values of Elastase (p=0.008) and Elastase-MSC (p=0.001) groups were significantly lower than that of control group. There was no statistically significant difference between serum and BALF MMP-9 levels of the groups (p>0.005 for two comparisons).

Our findings suggest that treatment with adipose tissue-derived MSC has no effect the serum and BALF MMP-9 levels in emphysematous rats.

Key Words: Chronic obstructive pulmonary disease, emphysema, mesenchymal cell, matrix metalloproteinase-9.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER.....	vii
TABLolar	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAİ).	3
2.2. MMP-9 ve KOAİ.	21
2.3. KOAİ ve Amfizem.	24
2.4. KOAİ’ta Senesens, Hüresel Yaşlanma ve Onarım Mekanizmaları.....	28
2.5. KOAİ’ta Yeni Tedavi Yaklaşımları.	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. Etik Kurul Onayı.....	37
3.2.Yağ Dokusu Mezenşimal Kök Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü	37
3.3.Yağ Dokusu Mezenşimal Kök Hücrelerinin Karakterizasyonu	40
3.4.Çalışma Tasarımı	41
3.5. İstatistiksel Analizler	45
4. BULGULAR.....	45
5. TARTIŞMA.....	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56
7. KAYNAKLAR	57

KISALTMALAR

AEPC	:	Alveoler epitel hücreler
Aİ	:	Amfizem indeksi
AKG	:	Arter kan gazı
AP	:	Aktivatör protein
BAL	:	Bronkoalveolar lavaj
BALS	:	Bronkoalveolar lavaj sıvısı
BKİ	:	Beden kitle indeksi
BT	:	Bilgisayarlı tomografi
CAT	:	COPD Assessment Test
EKG	:	Elektrokardiyografi
EKO	:	Ekokardiyografi
EPC	:	Endotel progenitör hücreler
ESM	:	Ekstraselüler matriks
FBS	:	Fetal bovine serum
FEF ₂₅	:	Maksimum Ekspiryum Akım Hızı (ilk % 25)
FEF ₂₅₋₇₅	:	Maksimum Ekspiryum Ortalama Akım Hızı (% 25-75 arası)
FEV ₁	:	Birinci saniyedeki zorlu ekspiratuar volüm
FRC	:	Fonksiyonel rezidüel kapasite
FVC	:	Zorlu Vital Kapasite
G-CSF	:	Granülosit koloni uyarıcı faktör
GOLD	:	The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HGF	:	Hepatosit büyüme faktörü
hLSC	:	İnsan akciğer kök hücreleri
IL	:	İnterlökin
İKS	:	İnhale kortikosteroidler

KGF	:	Keratinosit büyüme faktörü
KOAH	:	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
LABA	:	Uzun etkili β_2 agonistler
LAMA	:	Uzun etkili antimuskarinik
LPS	:	Lipopolisakkarit
Maks	:	Maksimum
Med	:	Medyan
Min	:	Minimum
MKH	:	Mezenşimal kök hücreler
MMP	:	Matriks metalloproteinaz
mMRC	:	Modified Medical Research Council Questionnaire for Assessing the Severity of Breathlessness
MT	:	Membran tipi
Ort	:	Ortalama
PA	:	Postero-anterior
PBS	:	Fosfat tampon çözeltisi
PEFR	:	Peak Ekspiratuar Akım Hızı
PH	:	Pulmoner hipertansiyon
PPE	:	Porcine pankreatik elastaz
RA	:	Retinoik asit
RV	:	Rezidüel volüm
SLPI	:	Sekretuar lökoproteaz inhibitörü
SS	:	Standart sapma
TIMP	:	Doku matriks metalloproteinaz inhibitörü
TAK	:	Total akciğer kapasitesi
TNF- α	:	Tümör nekrozis faktör- α

- VA : Vücut ağırlığı
VC : Vital Kapasite
VGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ŞEKİLLER

- Şekil 2.1.** KOAH patogenezi.
- Şekil 2.2.** KOAH'ta "American Thoracic Society/European Respiratory Society" tarafından önerilen tedavi algoritması.
- Şekil 2.3.** KOAH değerlendirmesinin belirti/risk modeli
- Şekil 2.4.** Matriks metalloproteinaz (MMP)-9'un üç boyutlu çizimi.
- Şekil 2.5.** Amfizematöz akciğerde MMP-9'un majör kaynakları, hedefleri ve etkileri.
- Şekil 3.1.** Sıçan flank yağdokusundan izole edilmiş yağ doku parçaları.
- Şekil 3.2.** MKH'in 75 cm²'lik kültür kaplarında çoğaltılması.
- Şekil 3.3.** MKH'in dondurulması.
- Şekil 3.4.** Kontrol grubundaki ratların akciğerlerinin histolojik görünümü hemotoksileneozin x 200.
- Şekil 3.5.** Elastaz grubundaki ratların akciğerlerinin histolojik görünümü hemotoksileneozin x 200.
- Şekil 3.6.** Elastaz-MKH grubundaki ratların akciğerlerinin histolojik görünümü hemotoksileneozin x 200.
- Şekil 4.1.** Üç grubun Aİ ortalama değerlerine ait çubuk grafiği.
- Şekil 4.2.** Üç grubun serum MMP-9 ve BAL MMP-9 ortalama değerlerine ait çubuk grafiği.
- Şekil 4.3.** Üç grubun VA değişim (0-6 hafta) değerlerin ortalamalarına ait çubuk grafik.

TABLULAR

- Tablo 2.1.** KOAH'ta aday genler.
- Tablo 2.2.** KOAH'ta risk faktörleri.
- Tablo 2.3.** GOLD kılavuzuna göre KOAH evreleri.
- Tablo 2.4.** KOAH majör kılavuzlarındaki tedavi önerileri.
- Tablo 2.5.** KOAH değerlendirmesinin belirti/risk modeline göre hasta kategorilerinin özellikleri.
- Tablo 2.6.** GOLD 2013 güncellemesine göre risk gruplarında tedavi yaklaşımları.
- Tablo 4.1.** Üç grubun Aİ, serum MMP-9 ve BAL MMP-9 düzeylerinin karşılaştırılması.
- Tablo 4.2.** Tüm ratlarda Aİ, serum MMP-9 ve BAL MMP-9 değerlerinin ilişkileri.
- Tablo 4.3.** Elastaz grubunda Aİ, serum MMP-9 ve BAL MMP-9 değerlerinin ilişkileri.
- Tablo 4.4.** Elastaz-MKH grubunda Aİ, serum MMP-9 ve BAL MMP-9 değerlerinin ilişkileri.
- Tablo 4.5.** Kontrol grubunda Aİ, serum MMP-9 ve BAL MMP-9 değerlerinin ilişkileri.
- Tablo 4.6.** Üç grubun başlangıç VA ve VA değişim (0-6 hafta) değerlerinin karşılaştırılması.

GİRİŞ

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), mortalite ve ilerleyici yeti kaybının önemli nedenlerinden biridir (1). Amfizem ve kronik bronşit, KOAH'ın farklı fizyopatolojiye sahip önemli bileşenleridir. KOAH'ta, matriks hasarı ve amfizeme neden olan proteaz-antiproteaz dengesizliği; inflamatuvar hücre göçüne ve protein oksidasyonuna neden olan oksidatif stres; pulmoner hipertansiyona neden olan küçük havayollarında alveolar matriks yıkımı ve bozulan rejenerasyon kapasitesi, ve pulmoner arterlerdeki aşırı matriks birikimi; ve endotelial ve epitelyal hücrelerin apoptozisi (2, 3) gibi fizyopatolojik anormallikler suçlanmaktadır.

Hamster akciğeri, elastaz hasarına -amfizem gelişimine- ve inflamasyona, rat ve fare akciğerinden daha yatkın olmakla birlikte (4, 5), elastaz ile oluşturulan amfizem modeli ratlarda da uygulanmaktadır (6, 7).

Mezenşimal kök hücreler (MKH); kolay izole edilebilmeleri, kültürde büyük miktarlarda çoğalabilmeleri, farklılaşma kapasiteleri, immünesupressif özellikleri, parakrin etkileri, hasarlı doku bölgesine göç edebilmeleri ve konak uyumluluğu gibi karakteristikleri nedeniyle çeşitli hastalıkların biyolojik tedavisinde kullanılmaya adaydırlar (8). Çalışmalar, MKH'lerin ratlarda oluşturulan amfizem modelinde pulmoner amfizem oluşumuna karşı koruyucu etkileri olduğuna dair kanıtlar sunmaktadır (9, 10). Akut akciğer hasarı hayvan modellerinde MKH'lerin inflamasyonu baskıladığı (11-13); papain veya elastazla oluşturulan hayvan amfizem modellerinde de, rat MKH'lerinin akciğer amfizemini kısmen düzelttiği saptanmıştır (14-16).

Adipoz dokulardan elde edilen MKH'ler, hücre tedavisinde görelî yakın zamanda kullanılmaya başlanan seçeneklerdir (17). Primat (18) ve murin amfizem modellerinde (19) yapılan değerlendirmelerde adipoz dokudan elde edilen MKH'lerin amfizem üzerine olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, adipoz dokudan elde edilen MKH'lerin anti-inflamatuvar etkilerinin kemik iliği kökenli MKH'lerden daha belirgin olduğuna dair kanıtlar vardır (19).

Literatürde, amfizem modelinde amfizemi iyileştirmek amacıyla uygulanan MKH'lerin matriks metalloproteinaz (MMP)-9 ekspresyonu üzerine etkileri ile ilgili çalışma yok denecek kadar azdır. Bir çalışmada, kemik iliği MKH'lerinin ratların akciğerlerindeki MMP-9 ve bu proteinin mRNA ekspresyonunun azalttığı saptanmıştır (20).

Bu çalışmanın amacı, elastazla oluşturulan rat amfizem modelinde adipoz doku kökenli MKH'lerin amfizem üzerine iyileştirici etkilerinin olup olmadığını; ve serum ve bronkoalveolar lavaj sıvısındaki (BALS) MMP-9 düzeylerini azaltıp azaltmadığını araştırmaktır. MKH'lerin amfizem üzerine iyileştirici etkilerinin olacağı; ve serum ve BALS'taki MMP-9 düzeylerini azaltacağı hipotez edilmiştir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH)

KOAH; tam olarak geri dönüşümlü olmayan, ilerleyici hava akımı kısıtlanması ile karakterize bir hastalıktır. Bu hastalık, zararlı gaz ve partiküllere özellikle sigara dumanına karşı oluşan enflamatuvar bir süreç sonucu gelişir. İnflamasyon yalnızca akciğerlerle sınırlı olmayıp, sistemik özellikler de göstermektedir (21-23). Önlenabilir ve tedavi edilebilir bir hastalık olan KOAH, şiddeti ve sıklığı artan alevlenmelerle seyrederek eşlik eden hastalıklar, hastalığın doğal gidişini etkiler (24).

1.1.1. Epidemiyoloji

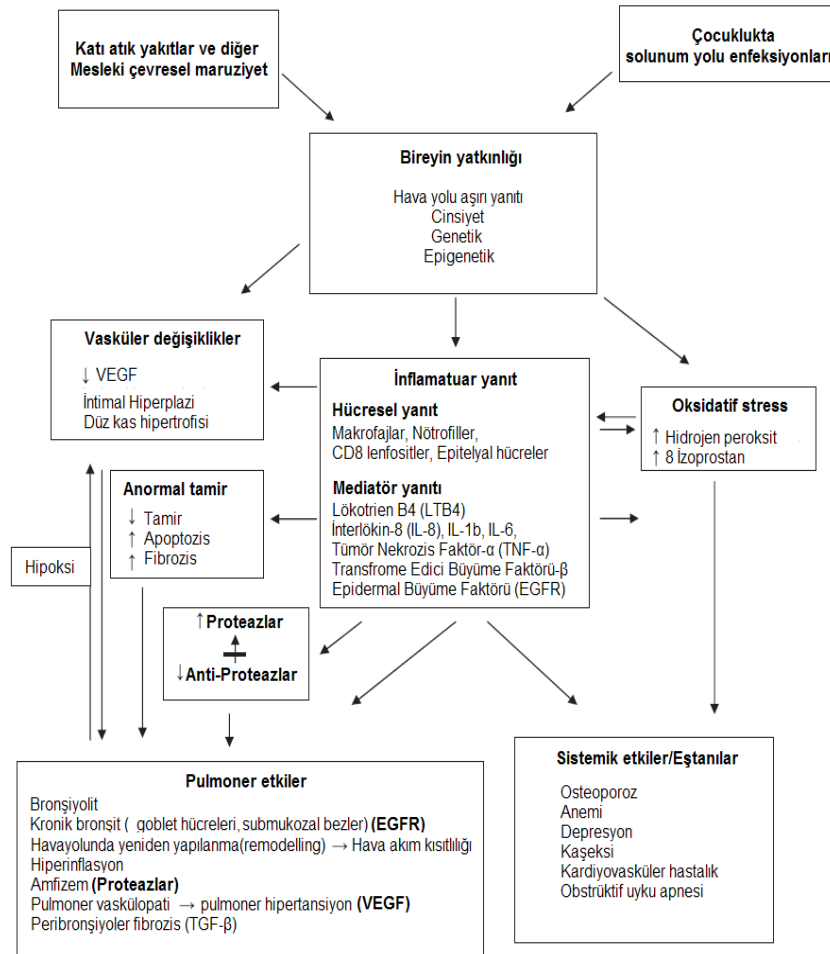
Önemli bir halk sağlığı sorunu olan KOAH, sağkalım üzerine olumsuz etkileri ve yaşam kalitesinde yol açtığı kayıplar nedeni ile 1996 yılında topluma maliyeti yüksek hastalıklar arasında 12. sırada yer almaktayken, 2020 yılında maliyeti yüksek hastalıklar arasında beşinci sırayı alması beklenmektedir (25). Erişkinlerdeki KOAH prevalansının % 5-10 aralığında olduğu tahmin edilmektedir (26, 27). KOAH'a bağlı mortalite 1980 yılından 2000 yılına kadar kadınlarda 20.1/100000'den 56.7/100000'ye; erkeklerde 73/100000'den 82.6/100000'ye yükselmiştir (28).

Etimesgut (Ankara) bölgesinde 1976 yılında yapılan bir çalışmada KOAH prevalansı 40 yaş üzeri toplumda yaklaşık % 13.6 olarak bulunmuştur (29). İstanbul'da 1996 yılında yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre, 20-51 yaş grubunda KOAH prevalansının % 10 olduğu saptanmıştır (30). Sağlık Bakanlığı tarafından yürütülen bir çalışmada, KOAH'ın ölüm nedenleri arasında üçüncü sırayı aldığı belirlenmiştir (31).

KOAH, daha çok orta ve ileri yaş hastalığıdır. Yaş ilerledikçe ölüm oranı artar. Erkeklerde daha sık görülür. Bu durum erkeklerin kadınlara oranla KOAH'a neden olan faktörlere daha fazla maruz kalmalarıyla açıklanmaktadır. Günümüzde sigara içme alışkanlığının kadınlarda da giderek artmasına paralel olarak morbidite ve mortalitede cinsiyete bağlı olan bu farkın gelecekte ortadan kalkacağı düşünülmektedir (32).

1.1.2. KOAH'ın Patogenezi

KOAH'ta hastaya ait faktörler (cinsiyet, havayolu aşırı yanıtı, genetik, epigenetik) ile çevresel faktörler (maruziyet ve diyet gibi) arasında karmaşık etkileşimler vardır. Bu etkileşimler KOAH'a yatkınlık gelişmesine neden olur ve KOAH gelişiminde çeşitli patojenik mekanizmalar (inflamatuvar hücre yanıtı, inflamatuvar mediatör salınımı, oksidatif stres, doku yıkımı ve proteaz/antiproteaz dengesizliği, hücre tamiri, apoptozis ve fibrozis) katılır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. KOAH patogenezi (33).

KOAH'ta inflamasyon, havayolları, parankim ve pulmoner damarları kapsayan akciğler bölümlerine sınırlı değıldir. Çizgili kaslarda, sistemik damarlarda ve periferik kanda inflamasyon geliştiğine dair kanıtlar hastalığın sistemik yönünü ortaya koymaktadır (34). KOAH'ta santral ve periferik hava yollarının tümünde başlıca makrofaj, nötrofil ve T-lenfositlerin (özellikle CD8+) bulunduğu karakteristik bir inflamasyon vardır (34, 35). Nötrofiller daha çok hava yolu lümeninde; makrofajlar lümeninde, bronş duvarında ve parankimde; lenfositler ise parankimde ve bronş duvarında

artmıştır ve bu hücreler arasında etkileşimler vardır (24). Makrofajların, gerek nötrofil kemotaktik faktörler ve mediyatörler (interlökin (IL)-8, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), lökotrien-B4 gibi), gerekse proteolitik enzimler (matriks metalloproteinazlar) üreterek, KOAH'taki inflamatuvar süreci yönlendirdiği düşünülmektedir. Kemotaktik faktörlerce hava yollarına çekilen nötrofiller, nötrofil elastaz ve diğer proteazları salgılayarak parankim harabiyetine katkıda bulunmakta, çeşitli sitokinlerin salınımını artırmakta ve mukus sekresyonunda artışa neden olmaktadır (35). T lenfositlerin salgıladıkları enzimler ve sitokinler ile (perforin, garanzim, TNF- α) hücre hasarına katkıda buldukları ve inflamasyonun devamlılığında sorumlu oldukları düşünülmektedir. Astımda temel rol oynayan eozinofillerin ise KOAH patogenezindeki rolleri tam olarak ortaya konamamış fakat atak sırasında hava yollarında eozinofil aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (24). KOAH'ta ayrıca hava yolu epitel hücrelerinin doğal bronkodilatör (nitrik oksit ve prostasiklin E2 gibi) salgılamalarının azaldığı, bronkokonstrüktörlerin salınımını artırarak ve hava yoluna inflamatuvar hücre göçünü sağlayacak sitokinler (IL-2 ve 8) serbestleştirerek hava akımı kısıtlanmasına ve hücre hasarına katkıda buldukları düşünülmektedir (34).

KOAH'ta artmış oksidan aktivitenin kaynağı, sigara dumanı, aktifleşmiş nötrofil ve makrofaj gibi inflamatuvar hücrelerden salınan oksidan maddelerdir (24, 34). Normal bireylerde akciğerlerde bulunan süperoksit dismutaz, glutatyon, vitamin C gibi antioksidanlar organizmayı oksidatif stresten korurlar. Fakat KOAH'ta artmış oksidan strese karşılık antioksidan seviyelerinde de azalma olduğu gösterilmiştir (24). KOAH'lı hastalarda periferik kanda, ekspiryum havasında ve indüklenmiş balgam incelemelerinde hidrojen peroksit, 8-izoprostan gibi oksidatif stres belirteçlerinin arttığı, bu artışın ataklarda daha belirgin hale geldiği ortaya konmuştur (24). Oksidanlar, lipid ve nükleik asit gibi çeşitli biyolojik moleküller ile reaksiyona girerek hücre hasarına ve disfonksiyonuna yol açarlar. Bunun yanı sıra, matriks metalloproteinaz (MMP) gibi proteazları aktive ederek ve sekretuar lökoproteaz inhibitörü (SLPI) gibi antiproteazları inaktive ederek proteaz/antiproteaz dengesizliğine neden olurlar. Çeşitli inflamatuvar genlerin transkripsiyonunu artırarak inflamasyonun devamını kolaylaştırdıkları gibi direkt bronkokonstrüktif etkileri ile de hava akımı kısıtlılığına katkıda bulunurlar (24). Son yıllarda, oksidatif stres nedeniyle artan histon deasetilaz aktivitesinin, KOAH'lı hastalarda inhale kortikosteroidde yetersiz yanıt ile ilişkili olduğu da ileri sürülmektedir (24).

KOAH'ta hem inflamasyonun ve oksidatif stresin etkisi ile hem de başta nötrofiller olmak üzere aktive olmuş inflamatuvar hücrelerden salgılanan proteolitik etkili enzimler nedeni ile proteaz aktivitesi artmıştır (24). Buna karşılık başta α_1 antitripsin olmak üzere α_2 makroglobulin, SLPI, elafin ve doku matriks metalloproteinaz inhibitörü (TIMP) gibi antiproteazların aktivitesinde azalma vardır (34). Alveol duvarının temel proteini olan elastin, başta nötrofil elastaz olmak üzere pek çok proteaz tarafından yıkıma uğratılır (36). Bu yıkım, amfizem gelişiminden sorumlu tutulmaktadır (24). KOAH'ta tespit edilen diğer proteazlar arasında, nötrofil kaynaklı katepsin G, makrofaj kaynaklı elastaz, katepsin S ve L ve lenfosit kaynaklı garanzim ve perforinler sayılabilir (34, 37).

1.1.3. KOAH'ta Risk Faktörleri

Sigara kullanımı, birçok yoldan inflamatuvar yanıtı başlatabilir (38). Tütün kullanımı, KOAH'ın en iyi bilinen nedenidir. Ancak, mesleki maruziyetler (çeşitli organik ve inorganik tozlar, kimyasal dumanlar) (39) ve az gelişmiş ülkelerdeki katı atık yakıtlar (biomass) (40) KOAH'a neden olabilmektedir. Esrar (Cannabis) kullanımının da KOAH'a katkısı olabileceği gösterilmiştir (41). Hava kirliliğinin KOAH'taki alevlenmeler üzerine belirgin etkisi olduğu bilinmekle birlikte, hava kirliliği ile KOAH oluşumu arasındaki ilişki halen tam olarak aydınlatılamamıştır (42).

Sigara kullanan bireylerin sadece % 20-30'unda KOAH geliştiği dikkate alındığında, KOAH'a yatkınlık oluşturan genlerin bulunması beklenebilir ve bu genler çeşitli medikal tedavilere yanıtı ve hastalığın şiddetini etkiliyor olabilir (43-45) (**Tablo 2.1**).

Tablo 2.1. KOAH'ta aday genler.

Tıbbi Durum	Genler
α_1 -antitripsin eksikliği	SERPINA1
KOAH gelişimi veya düşük akciğer fonksiyonu	(EPHX1, GST, MMP12, TGF- β 1, SERPINE2) (44) (HHIP, FAM13A, XRCC5) (46) Sümfaktan proteini B (43)
Nikotin bağımlılığı ve akciğer kanseri	CHRNA3/5 (47)

Hava yolu aşırı yanıtı KOAH gelişim riskini 12 kat kadar arttırmaktadır. Sigara içen astım hastaları veya astım tanısı konmayan havayolu aşırı yanıtı olan hastaların KOAH'a daha yatkın olması bu duruma örnek olarak gösterilebilir (48). Sigara kullanan kadınlar, sigara dumanının etkilerine daha duyarlı olabilir. Ayrıca, sigara kullanan kadınlarda amfizem daha yaygındır ve hava yolu hastalığı erkek KOAH hastalarından daha kötü seyretmektedir ve yaşam kaliteleri daha düşüktür (49, 50). Bu gözlem, sigara dumanı maruziyetini yüksek dozlarına göre akciğer boyutunun küçük olması ve hormonal etkilerle açıklanabilir (51). KOAH için hastaya ait faktörleri α -1 antitripsin eksikliği, genetik faktörler, aile öyküsü, etnik faktörler, yaş, hava yolu hiperreaktivitesi, atopi, düşük doğum ağırlığı olarak sıralanabilir (35) (**Tablo 2.2**).

Tablo 2.2. KOAH'ta risk faktörleri.

Çevre faktörleri	Konakçı ile ilgili faktörler
<i>Sigara İçimi</i>	<i>Alfa-1 antitripsin eksikliği</i>
Aktif Sigara İçimi	<i>Genetik faktörler</i>
Pasif Sigara İçimi	<i>Aile öyküsü</i>
Annenin Sigara İçimi	<i>Etnik faktörler</i>
<i>Mesleki Karşılaşmalar</i>	<i>Yaş</i>
<i>Hava Kirliliği</i>	<i>Hava yolu hiperreaktivitesi</i>
Dış Ortam	<i>Atopi</i>
İç Ortam	<i>Düşük doğum ağırlığı</i>
<i>Sosyoekonomik faktörler/yoksulluk</i>	<i>Semptomlar (aşırı mukus yapımı vb.)</i>
<i>Diyetle ilgili faktörler</i>	
Yüksek tuzlu diyet	
Diyette antioksidan	
Vitaminlerin azlığı	
Diyette doymamış yağ asitlerinin azlığı	
<i>Enfeksiyonlar</i>	

1.1.4. KOAH'ta Patobioloji

Çeşitli çalışmalarda, KOAH tanısı ile izlenen bireylerden elde edilen örneklerde IL-8 , TNF- α , CXC motif ligand 1 ve monosit kemoreaktan faktör protein 1'i kapsayan çeşitli proinflamatuvar sitokin düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (52). KOAH'taki en yatkın ve en erken morfolojik değişikliklerin gözlemlendiği bölge küçük hava yollarıdır. Küçük hava yollarındaki hasara bağlı olarak bronşiyolit gelişir (22). Alfa 1-antitripsin eksikliği nedeni ile ortaya çıkan proteaz-antiproteaz dengesizliği doku yıkımına neden olur. Ancak, günümüzde inflamasyonu arttıran mediatörler ile inflamasyona engel olan mediatörler arasındaki dengesizliğin amfizem gelişimine neden olduğu ileri sürülmektedir (52). Oksidanlar da, sigara dumanının inflamatuvar sonuçlarının bir bileşeni olarak düşünülmektedir. Ancak, akciğerler kendisini korumak amacı ile antioksidanlar üretmektedir. Endojen antioksidan sistemler yetersiz kaldığında, hücre hasarı ve akciğer yıkımı gerçekleşir (53). Vasküler endotel büyüme faktörünün düzeylerindeki azalma ve artan apoptozis, inflamasyondan bağımsız olarak amfizeme neden olabilir (53, 54).

1.1.5. KOAH'ta Klinik Bulgular

KOAH'ın en önemli belirtileri öksürük, balgam çıkarma ve eforla ortaya çıkan solunum sıkıntısıdır. Dispneye genellikle hışıltı eşlik eder. Belirtilerin solunum yolu enfeksiyonları ile alevlenmesi tipiktir. Hastaların büyük çoğunluğu 50 yaş üzerinde, en az 20 paket-yıl sigara kullanımı olan erkeklerdir (55).

KOAH'ı olan hastalar, dispne ancak günlük yaşam ve aktivitelerini etkilemeye başladığında, yani birinci saniyedeki zorlu ekspiratuvar volüm (FEV₁) genellikle % 50 düzeylerine düştüğünde klinisyene başvururlar. Dispne uzun yıllardır progresif bir seyir göstermekte olup majör bir fonksiyon kaybı belirtisidir. İstirahatte var olan dispne ise çok ciddi bir bulgudur ve ortaya çıktığında FEV₁ genellikle % 30'un altındadır. Dispne, tek belirti ise amfizem bileşeni ön plandadır (56). Dispneye çoğunlukla öksürük eşlik eder. Hastaların % 75'inde öksürük dispneden önce ortaya çıkar ya da dispne ile birlikte başlar. Öksürük, kronik, genellikle produktif ve sabahları daha belirgindir. Öksürüğe eşlik eden diğer önemli bir belirti ise balgamdır. Normal bireylerde 24 saatte 100 ml kadar balgam oluşabilir ve farkında olmadan yutulur. Bu nedenle hastanın farkına vardığı balgam patolojik olarak kabul edilir. KOAH hastalarında zaman zaman hemoptizi ve göğüs ağrısı yakınması olabilir. Özellikle atak sırasında dispne, öksürük ve balgam ile birlikte hemoptizi de görülebilir. Göğüs ağrısı, genellikle hastalığın kendisine bağlı olmayıp

gelişen bir komplikasyon nedeni ile ortaya çıkar. Pnömotoraks veya pulmoner emboli en sık nedenlerdir. Göğüs ağrısı peptik ülser veya gastroözofajiyal reflüye de bağlı olabilir. Sigara ve teofilin alt özofagus sfinkterinin basıncını azaltarak reflüye neden olur (57). Yorgunluk ve göğüs ağrısı (pulmoner anjina) pulmoner hipertansiyon (PH) akla getirmelidir. Hastalık ilerledikçe ve sağ ventrikül yetmezliği tablosu yerleştikçe, kor pulmonalenin iyi bilinen belirti ve bulguları –egzersiz toleransında kötüleşme, pedal ödem, siyanoz ve abdominal distansiyon- ortaya çıkar (58).

Hastalığın ileri döneminde anoreksi, iştahsızlık ve kilo kaybı gelişir. Kilo kaybı kötü prognoz göstergesidir. Hastalık ilerledikçe gelişen aktivite kısıtlaması, hareketsizlik ve sosyal izolasyon psikiyatrik bozuklukların gelişmesinde rol oynar. Hipoksemi ve hiperkarbi, hafıza kaybı ve dikkat gibi bilişsel işlevlerde kötüleşmeye neden olabilir (59).

KOAH genel klinik özelliklerine göre, “amfizem baskın” (Tip A: Pink buffer) ve “kronik bronşit baskın” (Tip B: Blue Bloater) olarak ayrılabilir. Amfizem baskın tip (Tip A); sıklıkla zayıf, 50-75 yaşlarında, başlangıç semptomu olarak nefes darlığının ön planda olduğu, hafif siyanotik, az balgam çıkaran ve solunum seslerinin belirgin azaldığı hastaları kapsamaktadır. Bununla beraber bronşit baskın tip (Tip B); şişman, 40-55 yaş yaşlarında, başlangıç semptomu olarak öksürüğün ön planda olduğu, belirgin siyanotik, bol miktarda balgam çıkaran ve solunum seslerinin orta derecede azaldığı hastaları tanımlamaktadır (60).

1.1.6. KOAH’ın Tanısı ve Evrelendirilmesi

1.1.6.1. Öykü

Öksürük ve/veya dispne, KOAH’ı olan hastalarda en sık başvuru belirtisidir. Çoğu hasta, solunumdaki değişikliklerin yaşa bağlı genel bir durum olduğunu kabul eder. Yaşlanmakla birlikte ortaya çıkan, göreceli sedanter yaşam tarzı nedeni ile solunumdaki bu değişim kısmen doğru kabul edilebilir. Çoğu hasta, solunum gücünü, yeti yitimine neden olana kadar, solunumla ilgili değişiklikleri gözden kaçırmaz ve bu aşamada hastalık ilerler ve kısmen geri dönüşsüz hale gelir. Balgamlı öksürük önlenmemelidir. Kronik günlük öksürük, sık alevlenmenin bir prediktörü olarak düşünülmektedir (61). Çoğu hasta, sigara kullanımına ara verdikten hemen sonra öksürük ve balgamda artış olduğunu bildirmektedir. Ancak, uzun süreli sigara bırakma dönemlerini takiben aşamalı bir düzelme gözlenir (62). Yorgunluk, göğüs ağrısı,

güçsüzlük, hemoptizi kilo kaybı gibi belirtilerin varlığında ilerlemiş hastalık, komplikasyonlar, eş tanılar ve akciğer kanseri akılda tutulmalıdır.

1.1.6.2. Spirometrik ölçümler

Birinci Saniyedeki Zorlu Ekspiratuar Volüm (FEV₁): Maksimum bir inspirasyondan sonra yapılan maksimum bir ekspirasyonun birinci saniyesinde çıkarılan hava hacmidir. Akciğerlerin ne kadar hızlı boşalabildiğini gösteren bir ölçümdür ve hava yolu dinamiğini değerlendiren en yararlı testtir.

Vital Kapasite (VC): Derin bir inspirasyon yapıldıktan sonra derin ekspirasyonla dışarı atılan maksimum hava hacmidir.

Zorlu Vital Kapasite (FVC): Derin ve zorlu bir inspirasyonu takiben zorlu, hızlı ve derin bir ekspirasyonla çıkarılabilen hava hacmidir (63). FVC ölçümü sırasında ekspirasyonun 6 saniyeden daha uzun olması ve plato oluşturması bronş obstrüksiyonun bir göstergesi olarak kabul edilir (64). FEV₁/FVC, hava akımındaki sınırlamanın klinik açıdan yararlı bir göstergesidir. Hastanın kendi vital kapasitesinin ne kadarını bir saniyede çıkardığını gösterir.

Zirve Ekspiratuar Akım Hızı (PEFR): Efora bağımlıdır ve akciğer fonksiyonunun kaba ölçümünü yapar. Ancak KOAH'ta FEV₁ kadar yararlı değildir ve tanı amaçlı kullanılmamalıdır.

Maksimum Ekspirasyon Akım Hızı (ilk % 25) (FEF₂₅): FVC manevrası sırasında volümün % 25'inin çıkarıldığı sıradaki akım hızı, trakea ve ana bronşlar gibi büyük hava yollarının akım özelliklerini yansıtır.

Zorlu vital kapasite manevrasında, volümün % 50'sinin ve % 75'inin çıkarıldığı sıradaki akım hızları FEF₅₀ ve FEF₇₅ olarak ifade edilirler. Küçük (periferik) hava yolları hakkında bilgi verirler.

Maksimum Ekspirasyon Ortalama Akım (% 25-75 arası) (FEF₂₅₋₇₅): Zorlu ekspirasyon sırasında volümlerin % 25 ile % 75'inin atıldığı dönemdeki ortalama akım hızıdır. FEF₂₅₋₇₅ olarak da ifade edilir. Zorlu ekspirasyonun efora bağlı olmayan kısmı olduğundan küçük hava yolları obstrüksiyonunu belirleyen en duyarlı test olarak kabul edilir (63).

“The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease” (GOLD) kılavuzuna göre, bronkodilatör sonrası birinci saniyedeki FEV₁/FVC oranının % 70’in altında olması, KOAH’taki belirgin hava yolu kısıtlılığını tanımlamak amacı ile bir ölçüt olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, FEV₁ değerinin >% 80 olması evre I, % 50-80 aralığında olması evre II, % 30-50 aralığında olması evre III ve <% 30 olması evre IV olarak tanımlanmaktadır (**Tablo 2.3**).

Tablo 2.3. GOLD kılavuzuna göre KOAH evreleri.

Evre	FEV ₁ /FVC (%)	FEV ₁	Belirti ve Bulgular
I (Hafif)	<70	≥80	Kronik belirtiler var veya yok
II (Orta)	<70	50-80	Kronik belirtiler var veya yok
III (Ağır)	<70	30-50	Kronik belirtiler var veya yok
IV (Çok Ağır)	<70	<30	-
		veya <50 ile birlikte solunum yetmezliği ya da kalp yetmezliği bulguları	

Reversibilite testi

KOAH’ta hava akım obstrüksiyonu kısmen geri dönüşlüdür. Bu nedenle, reverzibilite ölçümü KOAH’ı astımdan ayırt etmede, reverzibilitenin derecesini saptamada, hastaların kortikosteroid tedavisinden yarar görüp göremeyeceklerini öngörmeye ve prognoz tahmininde kullanılır.

Test öncesi bronkodilatatörler kesilir (kısa etkili bronkodilatatörler 6 saat, uzun etkili β₂ agonistler 12 saat, yavaş salımlı teofilin 24 saat, uzun etkili antikolinergik 24 saat önce). Bazal FEV₁ ölçülür ve ardından kısa etkili β₂ agonist (400 mcg salbutamol veya 1000 mcg terbutalin), 160 mcg kısa etkili antikolinergik veya ikisinin kombinasyonu kullanılır. Kısa etkili β₂ agonistten 10-15 dakika veya kısa etkili antikolinergik veya kombinasyondan 30-45 dakika sonra FEV₁ ölçümü tekrarlanır (65). Onbeş-yirmi dakika sonra FEV₁’de bazal değere göre % 12 ve mutlak değer olarak 200 ml artış pozitif kabul edilir. KOAH hastalarının % 10-30’unda reversibilite testi pozitif bulunmaktadır (35).

Statik akciğer hacimleri

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı'nda erken dönemde akciğer volümleri genelde değişmemiş iken, zamanla özellikle de amfizemin artışı ile birlikte rezidüel volüm (RV), fonksiyonel rezidüel kapasite (FRC) ve total akciğer kapasitesinde (TLC) artış meydana gelir. Yine RV'nin TLC'ye oranı artar. Artmış TLC'ye karşın RV'deki daha belirgin artıştan dolayı VC azalmıştır (66).

1.1.6.3. Pulse oksimetri ve Arter Kan Gazları

Kan gazlarının ölçümü arteriyel ponksiyon ile yapılmalıdır. Oksimetreler oksijenasyonu değerlendirmek için akut alevlenmeler sırasında kullanılabilir. Ancak, parmak ya da kulak oksimetresi kan gazına göre daha az güvenilirdir. $SaO_2 < \% 92$ olduğunda arteriyel kan gazı (AKG) ölçümüne başvurulur. AKG, orta şiddette ve ağır KOAH hastalarının değerlendirilmesinde gereklidir. KOAH'ta başlangıçta hiperkapni olmaksızın hafif veya orta şiddette hipoksemi vardır. Hastalık ilerledikçe hipoksemi şiddetlenir; hiperkapni gelişir. Kan gazı anormalliği akut ataklarda, efor ve uyku sırasında daha da ağırlaşır (67).

1.1.6.4. Görüntüleme Yöntemleri

Postero-anterior Akciğer Grafisi

Postero-anterior (PA) akciğer grafisi KOAH tanısı için duyarlı değildir. Ancak, ilk değerlendirmede yararlıdır. Amfizem, anatomik bir tanım olduğu için tanısında radyolojik bulgular önemlidir.

Amfizemde görülebilen radyolojik bulgular; göğüs ön-arka çapında artma, interkostal aralıklarda genişleme, lateral grafide retrosternal alanda genişleme, diyafram kubbelerinde çökme, düzleşme hatta konkavlaşma, normalden küçük ve orta hat yerleşimli kalp gölgesi, artmış pulmoner hipertansiyona bağlı olarak ana pulmoner arterlerde dolayısıyla hiluslarda genişleme, akciğerlerde havalanma fazlalığı ve pulmoner vasküler yapılarda incelme sonucu akciğer alanlarında hiperlüsensi biçiminde sıralanabilir (68). Kronik bronşitte PA akciğer grafisi genellikle normal olmakla birlikte bronşiyollerin duvarında kalınlaşma ve bronkovasküler izlerde artma (dirty lung-kirli akciğer) izlenebilir. KOAH'ta göğüs radyografileri, pulmoner hipertansiyon (PH) ve kor pulmonale ile ilgili bilgi de verir. PH, hilus damar gölgelerinin belirginleşmesine yol açar. Kor pulmonale gelişmesi ile sağ ventrikül hipertrofisine bağlı olarak kalp gölgesi genişler ve retrosternal aralığı doldurur (69).

Bilgisayarlı tomografi (BT)

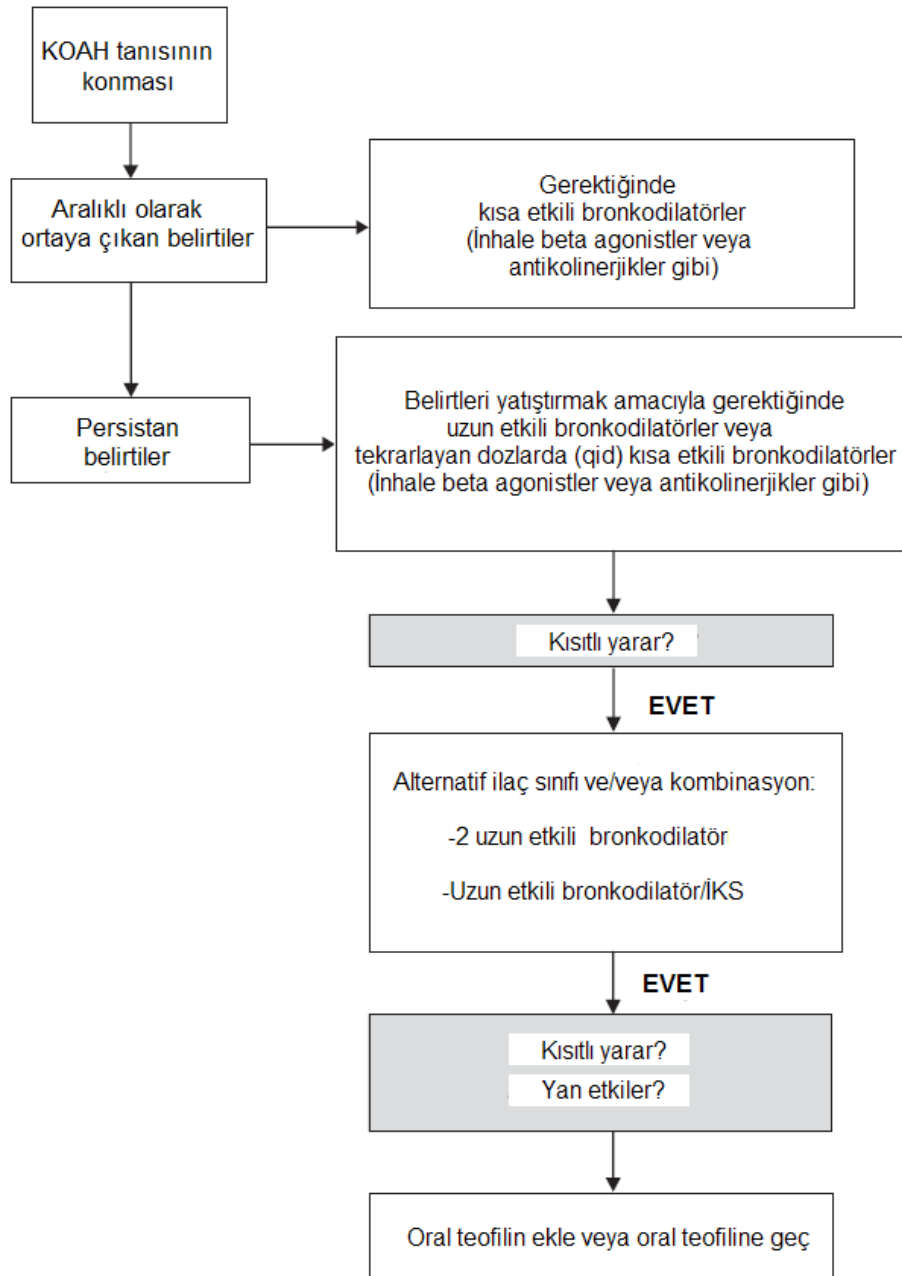
KOAH'ta bilgisayarlı tomografinin (BT) rolü, dev bülleri olan hastalarda akciğer rezeksiyonunun sağlayacağı yararın belirlenmesi, volüm azaltıcı cerrahiye karar verilmesi ve bu hastalık ile birlikte bulunabilecek bronşektazi, tromboemboli veya akciğer kanseri kuşkusunun araştırılmasıyla sınırlıdır (35).

Elektrokardiyografi (EKG)-Ekokardiyografi (EKO)

KOAH'a özgü elektrokardiyografi (EKG) değişiklikleri yoktur. Sağ ventrikül hipertrofisi ve dilatasyonuna ait EKG değişiklikleri gözlenebilir. Aşırı havalanmanın EKG'de neden olduğu düşük voltaj miyokard enfarktüsü yanlış tanısına neden olabilir (35). Ekokardiyografi (EKO) ile pulmoner vasküler basınç, sağ ventrikül fonksiyonu ve boyutları değerlendirilebilir (70).

1.1.7. KOAH Tedavisi

KOAH, FEV₁'deki azalma hızını arttırabilir, solunum fonksiyon kaybı, solunum yetmezliği ve ölüme neden olabilir. KOAH tedavisi, akciğer işlev kaybının ilerleyişini önlemek veya yavaşlatmak, belirtileri yatıştırmak, egzersiz toleransını arttırmak ve hastanın sağlık durumunu düzeltmeyi, alevlenmelerin ve komplikasyonların önlenmesi ve tedavisini, tedavinin yan etkilerinin azaltılmasını ve mortalite oranlarının düşürülmesini hedeflemektedir (**Şekil 2.2**). Akciğer fonksiyonları, KOAH'a tanı konulması ve şiddetinin belirlenmesi önemlidir. Ancak, klinisyenler ve hastalar, belirtiler, solunum fonksiyon kaybı, yaşam kalitesi ve sağlık durumu gibi hasta merkezli sonuçlarla daha yakından ilgilenmektedirler (71). Son yıllarda akciğer fonksiyonları, egzersiz toleransı, dispne skorları ve yaşam kalitesi gibi çeşitli hastalık sonuçlarında "klinik açıdan önemli minimal değişimin" tanımlanması gerektiği vurgulanmaktadır (72).



Şekil 2.2. KOAH'ta "American Thoracic Society/European Respiratory Society" tarafından önerilen tedavi algoritması (73).

1.1.7.1. Farmakolojik Olmayan Tedavi Girişimleri

Sigara Bırakma

Birleşik Devletlerde 2009 yılında "Family Smoking Prevention and Tobacco Control Act" ile tütünle ilişkili morbidite ve mortalitenin azaltılmasını amaçlayan halk sağlığı stratejileri geliştirmiş ve tütün pazarını yeniden düzenlemiştir. Nikotin sakızları, 1982 yılında pazara sunulmuştur. Nikotin sakızı ile 12 aydan daha uzun süre sigara bırakma oranları yaklaşık 1.5-2 kat yüksektir (74). Nikotin replasman tedavisine alternatif olarak geliştirilen bupropion, noradrenalin ve dopaminin nöronal geri alınımını inhibe

etmektedir. Vareniklin ise, $\alpha_4 \beta_2$ nikotin reseptörlerinde kısmi agonist olarak rol oynar (75). Vareniklin, sigara bırakmayı uzamış salınımlı bupropion veya plaseboya göre yaklaşık 3 kat artırmaktadır (75-78).

Pulmoner Rehabilitasyon

Çeşitli çalışmalarda, KOAH'ta uygulanan pulmoner rehabilitasyon tedavisinin sağlıkla ilişkili yaşam kalitesi, belirtilerde yatışma, periferik kas gücünde düzelme, egzersiz toleransında iyileşme, hastane yatış sayısında/gününde ve acil başvurularında azalma ve psikososyal durumda düzelme sağladığı gösterilmiştir (79, 80).

Oksijen Tedavisi

Oksijen tedavisinin esas amacı; deniz seviyesinde oksijen parsiyel basıncını 60 mmHg ve üzerinde, oksijen saturasyonunu ise %90 düzeyinde tutmaktır (24, 81). Bu değerler ile vital organ fonksiyonları sağlanabilmektedir. Sürekli oksijen tedavisi için seçilecek hastalar; optimal tedavi altında iken, alevlenmelerden en az 4-6 hafta sonra değerlendirilmelidir. Evde uzun süreli oksijen tedavisinin verilebilmesi için, hastaların stabil dönemde hipoksik olmaları gerekmektedir. Bu durumun saptanması için arteriyel kan gazı ile değerlendirme yapılmalıdır (73).

Uzun süreli oksijen tedavisi endikasyonları

- Hiperkapnik olsun ya da olmasın üç hafta boyunca iki kez $PaO_2 \leq 55$ mmHg veya $SaO_2 \leq \% 88$ olması

- $PaO_2 < 55-59$ mmHg ve/veya $SaO_2 < \% 88-92$ ancak aşağıdaki durumlardan biri varlığında;

- Pulmoner hipertansiyon
- Polisitemi (hematokrit $> \% 55$)
- Periferik ödem
- Konjestif kalp yetmezliği

Oksijen verme yöntemleri

Oksijen yüz maskesi veya nazal yolla uygulanabilir. Yüz maskelerinin kullanımı, uygun oksijen titrasyonuna olanak verir. Ancak yemek yeme ve konuşmayı engellediğinden, kullanımı çok kolay değildir. Bu nedenle birçok olgu, nazal kanülleri tercih etmektedir. Nazal kanülle oksijen uygulandığında, etkin oksijenizasyonu kontrol

etmek için arteriyel kan gazı ölçümü gereklidir. Uzun süreli oksijen, genellikle oksijen konsantratörleri ile hastanın evinde yatak odası ya da yaşam odalarında sağlanmaktadır. Tedavi süresi uykuyu kapsayacak şekilde, günde en az 15 saat ve üzerinde önerilmektedir (82).

1.1.7.2. Farmakolojik Tedavi

KOAH'taki birincil sorunun hava yolu obstrüksiyonu olduğu düşünüldüğünde, kısa etkili ve uzun etkili bronkodilatörler farmakolojik tedavinin köşe taşları olarak kabul edilebilir. Salbutamol ve albuterol gibi kısa etkili inhale β_2 agonistler, ipratropium bromid gibi kısa etkili antikolinergik ajanlardan daha hızlı etki göstermekte ve etkisi daha kısa sürmektedir. Salbutamol ve albuterol gibi ilaçlar, akut bronkospazmı yatıştırmakta daha sık kullanılan ilaçlardır (24, 83, 84). Persistan belirtileri olan hastalarda kısa etkili ajanlardan uzun etkili (12 saat) bronkodilatörlere geçilmesi önerilmektedir. Bu ajanlar, salmeterol, formoterol ve uzun etkili antimuskarinik (LAMA) ajan olan tiotropium (24 saat) gibi ilaçlardır (85). Çeşitli çalışmalarda, uzun etkili β_2 agonistlerin (LABA) KOAH hastalarında belirtileri yatıştırdığı, akciğer fonksiyonları ve sağlıkla ilişkili yaşam kalitesinde düzelme sağladığı gösterilmiştir (83). Çalışmalar kısa etkili β_2 agonistlerin, antikolinergiklerin (86), LABA ve LAMA'ların (87) kombinasyonunun additif etkileri olduğunu göstermiştir (**Tablo 2.4**).

KOAH patogenezinde inflamasyonun önemi dikkate alındığında, inhale kortikosteroidler (İKS)' in KOAH hastaları için bir sonraki tedavi aşaması olarak değerlendirilebilir. İKS, KOAH hastalarında monoterapi olarak kullanılmamalı, bronkodilatörlerle kombine edilmelidir (33, 88) (**Tablo 2.4**).

Kurtarma tedavisini sık olarak kullanan, belirtileri optimal olarak kontrol edilemeyen ve sık alevlenmesi olan hastalarda İKS ve LABA veya uzun etkili antikolinergikler ile kombinasyon tedavisi önerilmektedir. Flutikazon propionat/salmeterol (89) ve budesonid/formoterol (90-92) kombinasyonlarını değerlendiren çalışmalarda, akciğer fonksiyonlarında düzelme, belirtilerde azalma ve hasta merkezli sonuçlarda iyileşme, yaşam kalitesinde monoterapiden daha belirgin düzelme olduğu saptanmıştır.

Tablo 2.4. KOAH majör kılavuzlarındaki tedavi önerileri.

İlaç	GOLD Evresi	ERS/ATS	ACP
Kısa etkili bronkodilatörler	I FEV ₁ ≥% 80	Hafif FEV ₁ ≥% 80	FEV ₁ <% 80
Uzun etkili bronkodilatörler	II-IV FEV ₁ <% 80	Orta FEV ₁ <% 80	FEV ₁ <% 60 Semptomatikse bronkodilatör kombinasyonu kullanılır
İnhale kortikosteroidler (bronkodilatörler ile kombine)	III-IV Son 12 ay içinde oral steroid ve/veya antibiyotik kullanımı gerektiren alevlenme	Ağır FEV ₁ <% 50 Son 12 ay içinde oral steroid ve/veya antibiyotik kullanımı gerektiren alevlenme	FEV ₁ <% 60 Semptomatik, fakat stabil KOAH hastalarında kullanılır.
Teofilin	III-IV	Çok ağır FEV ₁ <% 30	Dahil edilememiştir

ACP, American College of Physicians Guidelines (93);

ERS/ATS, European Respiratory Society/American Thoracic Society Guidelines (73);

GOLD, Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Guidelines (24).

Flutikazon/salmeterol/tiotropium üçlü tedavisi ile ikili tedavilerin karşılaştırıldığı çalışmaların sonuçları, üçlü kombinasyonun ileri evre hastalıkta bronkodilatasyon ve belirtilerde düzelme ve kurtarma tedavisi gereksiniminde flutikazon/salmeterol veya tiotropium/salmeterol ikili tedavilerine üstün olduğunu göstermiştir (94, 95).

Teofilin

Dar terapötik indeksi ve potansiyel yan etkileri nedeniyle teofilin, KOAH'ta üçüncü sıra tedavi olarak düşünülmektedir. Ancak, teofilinin steroid duyarlılığını düzenleyebileceğinin (artırabileceğinin) ileri sürülmesi nedeniyle bu ajana ilgi yeniden artmıştır (96).

1.1.7.3. KOAH'ta Risk Sınıflaması

Risk GOLD Hava Akımı Kısıtlılığı	4	(C)	(D)	≥ 2
	3			
	2	(A)	(B)	1
	1			0
		mMRC 0-1 CAT<10	mMRC \geq 2 CAT \geq 10	
		Belirtiler		

Şekil 2.3. KOAH değerlendirilmesinin belirti/risk modeli (*Risk değerlendirilmesi yapılırken GOLD derecesi veya alevlenme öyküsüne göre en yüksek risk seçilir. [KOAH alevlenmesi nedeniyle bir veya daha fazla hastane yatışı yüksek risk olarak düşünülmelidir.]*).

GOLD 2013 güncellemesinde (65); alevlenme sayısı, GOLD sınıflaması, "Modified Medical Research Council Questionnaire for Assessing the Severity of Breathlessness" (mMRC) (97) ve "COPD Assessment Test" (CAT) (98) adlı ölçeklerle değerlendirilen belirti şiddetine göre bir belirti/risk modeli oluşturulmuştur. GOLD 2013 güncellemesine göre grup A hastalar, belirtileri az sayıda ve alevlenme riski düşük olan hastaları; grup B hastalar, daha belirgin belirtileri olmakla birlikte, alevlenme riskleri düşük olan hastaları; grup C hastalar, az sayıda belirtisi olan ancak alevlenme riski yüksek olan hastaları; grup D hastalar, çok sayıda semptomu olan ve alevlenme riski yüksek olan hastaları kapsamaktadır (**Şekil 2.3.** ve **Tablo 2.5.**).

Tablo 2.5. KOAH değerlendirmesinin belirti/risk modeline göre hasta kategorilerinin zellikleri.

Hasta Kategorisi	Karakteristikler	Spirometrik Sınıflama	Alevlenme/yıl	mMRC	CAT
A	Düşük alevlenme riski, az sayıda belirti	GOLD 1-2	≤ 1	0-1	<10
B	Düşük alevlenme riski, çok sayıda belirti	GOLD 1-2	≤ 1	≥ 2	≥ 10
C	Yüksek alevlenme riski, az sayıda belirti	GOLD 3-4	≥ 2	0-1	<10
D	Yüksek alevlenme riski, çok sayıda belirti	GOLD 3-4	≥ 2	≥ 2	≥ 10

1.1.7.4. Stabil KOAH'ta Farmakolojik Tedavi

Tablo 2.6. GOLD 2013 güncellemesine göre risk gruplarında tedavi yaklaşımları.

Hasta Kategorisi	Önerilen ilk seçenek	Alternatif seçenek	Diğer tedaviler
A	Kısa etkili antikolinergik veya Kısa etkili β_2 agonist (gerektiğinde=LH)	Uzun etkili antikolinergik veya Uzun etkili β_2 agonist veya Kısa etkili β_2 agonist ve Kısa etkili antikolinergik	Teofilin
B	Uzun etkili antikolinergik veya Uzun etkili β_2 agonist	Uzun etkili antikolinergik ve Uzun etkili β_2 agonist	Kısa etkili β_2 agonist ve/veya Kısa etkili antikolinergik Teofilin
C	İnhale kortikosteroid+ Uzun etkili β_2 agonist ve/veya Uzun etkili antikolinergik	Uzun etkili antikolinergik ve uzun etkili β_2 agonist veya Uzun etkili antikolinergik ve Fosfodiesteraz-4 inhibitörü veya Uzun etkili β_2 agonist ve Fosfodiesteraz-4 inhibitörü	Kısa etkili β_2 agonist ve/veya Kısa etkili antikolinergik Teofilin
D	İnhale kortikosteroid+ Uzun etkili β_2 agonist ve/veya Uzun etkili antikolinergik	İnhale kortikosteroid+ Uzun etkili β_2 agonist ve Uzun etkili antikolinergik veya İnhale kortikosteroid+ Uzun etkili β_2 agonist ve Fosfodiesteraz-4 inhibitörü veya İnhale kortikosteroid+ Uzun etkili antikolinergik ve Fosfodiesteraz-4 inhibitörü Uzun etkili antikolinergik	Karbosistein Kısa etkili β_2 agonist ve/veya Kısa etkili antikolinergik Teofilin

GOLD 2013 güncellemesine göre KOAH risk gruplarında tedavi yaklaşımları Tablo 2.6'da özetlenmiştir.

1.1.7.5. Akut Alevlenmede Tanı ve Tedavi

Anthonisen'in tanımlamasına göre KOAH akut alevlenme tanısı için aşağıdaki bulgulardan birisinin veya daha fazlasının bulunması gerekir: balgam pürülansında artış, balgam volümünde artış ve dispne de kötüleşme (99). Atağın ağırlığı ise şu şekilde değerlendirilir:

- Tip I (ağır) üç semptomun hepsini,
- Tip II (orta) üç semptomun ikisini,

• Tip III (hafif) semptomlardan sadece birini ve aşağıdakilerden en az birini içerir: Son 5 gün içinde üst solunum yolu infeksiyonu, başka bir nedeni olmayan ateş, hışıltıda artış, artmış öksürük, solunum hızında veya kalp hızında bazale göre %20 artış.

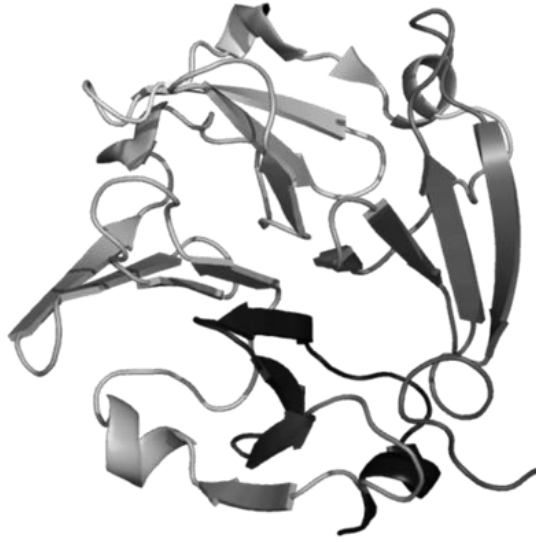
KOAH'taki akut alevlenme, yoğun bakım ve yoğun bakım dışındaki hastane mortalite oranlarının yaklaşık % 10'undan sorumludur (100). Bu nedenle, akut alevlenmelerin agresif ve erken dönem tedavisi önemlidir. Bronkodilatörler, akut alevlenme sırasında agresif bir biçimde kullanılmalıdır. Hızlı etki gösteren ajanlar ve nebulize formülasyonlar, ağır hastalığı olan bireylerde ve diğer tedavi yaklaşımları için gerekli hava akımını oluşturamayan hastalarda kullanılmalıdır. Oksijen destek tedavisi, PaO₂ düzeyini 60 mm Hg'nın ve oksijen saturasyon (SaO₂) düzeyini % 90'nın üzerinde olmasını sağlayacak biçimde sürdürülmelidir (72). Öksürük, balgam ve dispne belirtileri daha belirgin olan, balgamı daha pürülan olan hastalar ampirik antibiyotik tedavisinden fayda görmeleri daha olasıdır (101).

Akciğer hacim azaltıcı cerrahi, KOAH'taki sağ kalımda, işlevsellikte, fizyolojik parametrelerde ve yaşam kalitesinde belirgin düzelme sağlamaktadır (102).

1.2. MMP-9 ve KOAH

MMP'ler, ekspresyon profilleri ve substratları açısından farklıdırlar. Çinko içeren bir endopeptidaz ailesinin üyesidirler. Ekstrasellüler matriksi yıkmak, aktif bölgelerinde çinko içermek, stabilite için kalsiyum gereksinimi ve nötral pH'de aktivite gösterebilmek MMP'lerin ortak özellikleridir. Membran tipi (MT-MMP) dışındakiler, ön formlarında salınırlar ve ekstrasellüler alanda aktive olurlar. Substrat özgüllükleri ve yapısal karakteristiklerine dayanarak çok sayıda alt sınıfa ayrılırlar (103):

- Jelatinazlar: MMP-2 ve MMP-9
- Kollajenazlar: MMP-1, MMP-8 ve MMP-13
- Stromelizinler: MMP-3, MMP-10 ve MMP-11
- Matrilizin: MMP-7
- Elastaz: MMP-12
- MT-MMPlar: MMP-14, MMP-15, MMP-16 ve MMP-17.



Şekil 2.4. Matriks metalloproteinaz (MMP)-9'un üç boyutlu çizimi.

Matriks metalloproteinaz (MMP)-9; matriks metalloproteinaz 9 (MMP-9), 92 kDa type IV kollajenaz, 92 kDa jelatinaz veya jelatinaz B (GELB) olarak da adlandırılmaktadır.

MMP-9'un proform ve aktif formlarının kütleleri 92 kDa ve 83 kDa'dur. Erişkinlerde MMP-9'un yapısal ekspresyonu nötrofil (104) ve eozonofiller (105) ile sınırlıdır. Ancak, inflamatuvar uyarı; endotel hücreleri, alveolar hücreler, makrofaj hücreleri, fibroblastlar ve diğer bağ dokusu hücreleri gibi çok sayıda hücre tipinde MMP-9 ekspresyonunda artışa neden olabilir (106). MMP-9 geninin promotor bölgesinde 2-TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)-yanıt veren bileşen (TRE_S) bulunmaktadır. Bu bileşenler, transkripsiyon faktör aktivatör protein (AP)-1 için bir bağlanma bölgesi olarak görev yapar (107). Pro-inflamatuvar koşullar altında, AP-1 transkripsiyon faktörü aktive olur ve AP-1 bağlanma bölgesine sahip genlerin transkripsiyonunda artışa neden olur. Bu durum, inflamasyon sırasında MMP-9 ekspresyonunun artışının olası bir nedenidir. Jelatinazlardan biri olan MMP-9, inaktif proform olarak salgılanır ve ekstrasellüler ortamda aktive olur. Her enzimin inaktif formu bir pro-peptid içerir. Bu pro-peptid, aktif bölgedeki çinko iyonuyla etkileşir ve enzimin inaktif durumu korunur. Pro-peptid bileşenin ayrılması, çinko iyonunun su molekülü ile etkileşime girmesine ve takiben enzimin aktifleşmesine neden olur (108).

MMP-9, pro-peptid bölgesinin serin proteazlar tarafından -proteolitik reaksiyon ile- molekülden ayrılmasıyla aktive olur (109). Ayrıca, MMP-9'un serbest radikaller tarafından doğrudan aktive edildiğine dair (proteolitik reaksiyon dışında) artan kanıtlar vardır (110).

Normal akciğer dokusunda, endotel dışında (yapısal olarak MMP-2 üretir) jelatinaz eksprese edilmez. Enfeksiyonlar veya inflamatuvar hastalıklar sırasında ise bronşial epitelium hücreleri, Clara hücreleri, alveolar tip II hücreler, düz kas hücreleri ve fibroblastların tümü MMP-9 üretebilir. İnfiltrate olan lökositler, jelatinazların diğer majör kaynaklarından biridir (hem nötrofiller hem de eozinofiller yapısal olarak MMP-9 üretir; makrofaj, mast hücreler, ve lenfositler inflamatuvar koşullar altında MMP-9 salgırlar) (111).

Jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9), ekstraselüler matriksin (ESM) yıkımında etkili olabilirler. ESM kollajen ve elastin yanında çeşitli glukoproteinler, proteoglikanlar ve glukozaminoglikanlar gibi proteinlerden oluşan karmaşık bir yapıdır. ESM, akciğeri de kapsayan çeşitli organlardaki yapısal desteğin sağlanabilmesi için gereklidir. ESM'nin bütünlüğü, protein depolanması ve yıkımı arasındaki dinamik denge ile sürdürülür. MMP'lerin anahtar karakteristiklerinden biri ESM proteinlerini yıkabilme yetileridir. Hem MMP-2 hem de MMP-9, jelatin tip IV ve tip V kollajenler, elastin ve vitronektini kapsayan matriks proteinlerin metabolize edebilirler (112).

ESM'nin MMP'ler tarafından yıkılması hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda ortaya çıkabilir ve bu süreç büyüme ve gelişme, vaskülarizasyon ve doku yeniden modellenmesi gibi süreçlerde rol alır. Örneğin anjiyogenezisin potent indükleyicilerinden biri olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) MMP-9 tarafından salgılanır (113, 114).

Dokunun yeniden modellenmesi, kaybolan ECM bileşenlerinin üretimi ile yıkımı arasındaki dengeye bağlıdır. Hastalık veya hasarın bir sonucu olarak matrikste aşırı bir zararlanma olduğunda mükemmel bir tamir gerçekleştirilemez ve interstisyumda kalıcı yapısal değişiklikler olur. Bu koşullar altında, ESM bileşenlerinin miktarı; yetersiz, gelişmiş veya aşırı olabilir ve işlevsel bozukluklar ortaya çıkabilir. Vücuttaki çeşitli organlar ve dokular inflamasyona, enfeksiyona veya hasara yanıtta yeniden modellemeyi kullanırlar. Fonksiyonellikte sorunlara neden olan aşırı doku

yeniden modellenmesi, amfizem ve astım gibi pulmoner hastalık süreçlerinin merkezindedir. Matriks protein yıkımının düzenleyicileri olan jelatinazlar, bu süreci modüle ederler ve doku yeniden modellenmesi, çeşitli pulmoner patolojilerde jelatinazların anormal aktivasyonu veya inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir (108).

Jelatinazlar, protein yıkımında rol almaktadır. MMP'ler ESM'yi yıktıktan sonra, interstisyuma normal olarak adhere olmuş hücrelerin adheransı azalır ve göç etmeye başlarlar (115). Akciğerde bazal membran proteinlerinin yıkımı ile giden hasarları takiben epitelyum hücrelerinin göçünde jelatinazlar önemlidir (116). Nötrofillerin, lenfositlerin ve dentritik hücrelerin akciğere infiltrasyonunda jelatinazlar görev alır. Gerçekten de MMP-9 bulunmayan farelerde antijen uygulamasını takiben bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısındaki T lenfositler ve dentritik hücrelerin sayısının daha düşük olduğu gözlenmiştir (117). Bu etkinin doğrudan MMP'lerin rol aldığı inflamatuvar süreçlerle ilişkili olduğu bildirilmiş olmasına karşın, yakın zamanda yapılan çalışmalar, bu sonuçların, MMP'lerin sitokinler ve kemokinler üzerinden olan etkilerini yansıtabileceğini düşündürmektedir (108).

1.3. KOAH ve Amfizem

Amfizem, ilk olarak Laenec (1838) tarafından tanımlanmıştır (118). KOAH'ta amfizematöz ve bronşitik fenotipler yaklaşık 40 yıl önce Burrow (1966) tarafından ayırt edilmiştir (119). KOAH'ın amfizematöz fenotipi için, görüntüleme teknikleri ile amfizem varlığı, diffüzyon testlerinde kötüleşme, düşük beden kitle indeksi (BKİ), balgam üretim miktarında azalma eğilimi, arter kan gazlarında belirgin bozulma olmaması ve belirgin dispne gibi karakteristikler sıralanabilir (120).

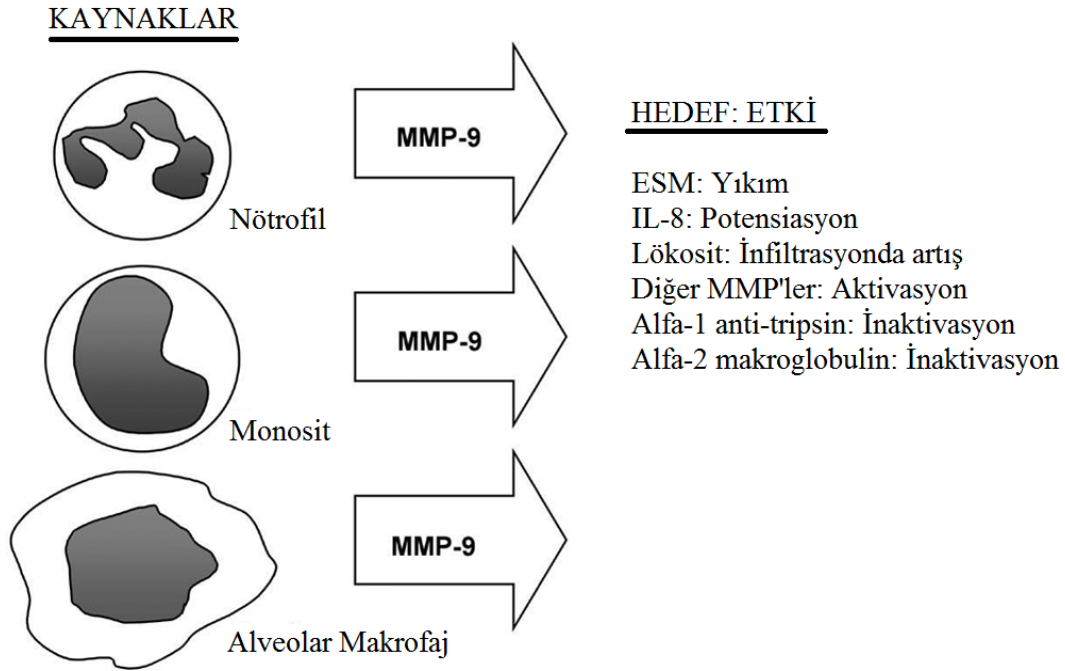
Amfizem, "terminal bronşiyollerin distalindeki hava yollarında anormal genişleme ile birlikte alveol duvarında yıkıcı süreçlerle karakterize bir akciğer değişikliği" olarak tanımlanmaktadır (121). Laenec, amfizemi kronik bronşitin bir sonucu olarak değerlendirmiştir. Günümüzde ise, sigara kullanımı ile başlayan ve devam eden hava yolu infalamasyonunun ön planda olduğu; kronik enfeksiyonun sürece katkıda bulunduğu bir kronik hava yolu inflamasyonu olarak düşünülmektedir (22). Alveol duvarındaki hasarlanma, nötrofil ve makrofajlardan salınan proteazların gradienti ile ilişkilendirilmektedir. Proteaz gradyenti, küçük hava yollarını çevreleyen alveolar septaların sindiriminden sorumlu tutulmaktadır. Ayrıca, akciğer vasküler

yapıları ile ilgili anormalliklerin ve endotel hücre ölümünün amfizem patolojisine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (3).

KOAH, amfizem ve kronik obstrüktif bronşit gibi, birçok inflamatuvar akciğer patolojisini kapsayan jenerik bir terimdir (122). Jelatinazların kronik obstrüktif bronşit patogenezindeki rolüne dair az sayıda kanıt olmasına karşın (123), amfizemin patogenezinde proteaz antiproteaz dengesizliğinin pulmoner mimarinin yıkımı ile sonuçlandığını gösteren çalışmalar vardır (124). Amfizemi olan hastaların balgamlarında ve BALS'ta MMP-9 düzeylerinin yüksek olduğu gösterilmiştir. MMP-9'un kaynakları değişkenlik göstermektedir. Aktive alveoler makrofajlar MMP-9 sentezleyebilmektedir. Ayrıca, infiltrate olan nötrofillerde pre-formda MMP-9 granülleri bulunmaktadır. Bu bulgular ışığında, KOAH'ta, akciğerdeki proteazların aşırı etkin olduğu söylenebilir (125, 126). Aşırı MMP-9 varlığı IL-8 üzerindeki kemoreaktan etkisi yoluyla nötrofillerin infiltrasyonuna da katkıda bulunabilir. MMP-9'un IL-8 üzerine etkisi, IL-8'i daha güçlü bir nötrofil agonisti yapar.

Proteazlar, α_1 -antitripsin ve α_2 -makroglobulin gibi antiproteazlar tarafından kontrol altında tutulur. KOAH'ta, α_1 -antitripsinin nötrofil elastazların bir inhibitörü olarak rol aldığı iyi bilinmektedir (122). Ancak, bu antiproteaz katepsin G (127) ve nötrofil kollajenaz (128) gibi diğer serin proteazlarını da inhibe edebilmektedir. MMP-9'un yüksek düzeyleri α_1 -antitripsini yıkabilir ve proteaz aktivitesi artabilir. Böylece masif doku yıkımı ve amfizemde genişleme görülebilir (129). Amfizeme yatkınlaştıran genetik faktörler, α_1 -antitripsin (130) ve α_2 -makroglobulin düzeylerini (122) etkileyen eksikleri kapsar. Çünkü, α_2 -makroglobulin, jelatinazların önemli fizyolojik inhibitörlerinden biridir ve yokluğunda jelatinazların akciğer matriksindeki etkileri oldukça olumsuzdur. Amfizemi olan hastaların akciğerlerinde artmış oksidatif strese eğilim vardır (131). Sigara dumanının bileşenlerinden ve infiltrate olan immün hücrelerden kaynaklanan reaktif oksijen türleri; α_1 -antitripsini inaktive ederek, elastin ve kollajenin yıkımını hızlandırarak, nötrofillerin aktivitesini arttırarak, proinflamatuvar genlerin aktivasyonuna neden olarak ve MMP'leri proformlarından aktif formlarına dönüştürerek proteaz-antiproteaz dengesizliğine katkıda bulunabilir (132).

AMFİZEM



Şekil 2.5. Amfizematöz akciğerde MMP-9'un majör kaynakları, hedefleri ve etkileri.

Amfizemin sınıflandırılmasında, genişlemenin lobül içindeki anatomik lokalizasyonu esas alınır (133-135). Miller'in sekonder lobül yapısı, interlobüler septa ya da plevra ile dört taraftan sınırlanmış, özellikle periferik akciğer alanlarında gros olarak da izlenebilen, sayısı 3 ile 5 arasında değişen asinüsten oluşur (135). Asinüs, terminal bronşiol ve distalindeki 3 farklı kuşak respiratuar bronşiol (alveoler duktus, sakkul ve alveol) yapısından oluşan akciğer parankimine işaret etmektedir ve gros olarak tanımlanamaz.

Santrasiner (sentrlobüler) amfizem

Bu amfizem tipinde asinüslerin santral ve proksimal kısımları tutulur, distal alveoller sağlamdır (134-136). Bu nedenle aynı lobülde hem amfizematöz hem de normal hava boşlukları görülür. Lezyonlar akciğerin üst loblarında daha sık ve şiddetlidir (135, 136). Üst lobta sıklıkla posterior ve apikal segment, alt loblarda ise sıklıkla üst segment etkilenmiştir (134, 135). Amfizematöz boşlukların duvarında sıklıkla siyah renkli pigment birikimi bulunur. Bronş ve bronşiol çevresi genellikle inflamedir. Şiddetli olgularda distal asinüsler de tutularak santrasiner amfizemden ayırt edilemez bir görünüme yol açabilir (134, 135). Santrasiner amfizem karakteristik olarak

ağır düzeyde sigara içenlerde ortaya çıkar. Hastaların çoğunda kronik bronşitle birliktelik gösterir (135).

Panasiner (panlobler) amfizem

Bu tipte, asinuslardaki genişleme, respiratuar bronşiol düzeyinden alveollere kadar uzanır. Normal bir akciğerde küçük alveoller, alveoler duktuslardan ve respiratuar bronşiollerden kolaylıkla ayrılır. Panlobler amfizemde ise alveoller genişleyerek keskin aıllarını kaybettiğinden duktuslarla olan boyut farkı azalır (134-136). İnflamasyon minimaldir. Akciğerin alt bölgelerinde daha sık, anterior sınırlarında daha yaygındır. En şiddetli tutulum akciğer bazalindedir. Bu amfizem tipi, α -1 antitripsin eksikliği ile ilişkilidir.

Distal asiner (paraseptal) amfizem

Bu tip amfizemde, asinusun yalnızca distal kısmı etkilenmiştir. Amfizem, plevraya komşu alanlarda, lobüllerin kenarında ve septum boyunca daha çarpıcıdır. Akciğerin st yarısında daha belirgin olup fibrozis, skarlaşma ve atelektazi alanlarına komşu bölgelerde gelişir (134, 135). Karakteristik bulgusu birbiriyle devamlılık gösteren, multipl ve 0.5-2 cm arasında değişen çapa sahip genişlemiş hava boşluklarıdır. Gençlerde görülen spontan pnömotoraks olgularının çoğunun altta yatan nedeni olan amfizem tipidir (134, 135).

KOAH'taki hava akım ksıtlılığının altında yatan anahtar patofizyolojik değişiklikler, alveoler septa ve terminal bronşiyollerin (amfizem) yıkımına bağlı elastik akciğer geri tepme (recoil) basıncı kaybı, solunum yolu duvarının yeniden modellenmesine (küçük solunum yolu duvarının kalınlaşması) bağlı olarak artan solunum yolu direnci ve solunum yolu lümeninde mukoid impaksiyon olarak sıralanabilir (137). Bununla birlikte, endotel disfonksiyonunun, vasküler yeniden modellenmenin ve endotel hücrelerin vasküler endotel büyüme faktörü ile başlatılan apoptozisinin, KOAH'taki hastalık gidişine katkıda bulunduğuna dair kanıtlar vardır (138).

Son yirmi yıl içinde, KOAH'ın patobiyolojisini kavramamızı sağlayan büyük gelişmelere karşın, amfizem ve solunum yolunun yeniden modellenmesinin gerçekleştiği patolojik mekanizma, büyük oranda gizemini korumaktadır. Konuyla ilgili yaygın kuramlardan biri, "inflamatuvar varsayım"dır. Hava kirliliği ve sigara kullanımı gibi çevresel faktörlerin tetiklemesine yanıt olarak ortaya çıkan akciğer

inflamasyonunun; hastalığa yatkın bireylerde (genetik), çevresel etkenlere maruz sürecinin herhangi bir noktasında, "normal" bir yanıtın anormal yanıtı dönüşmesinin, aşırı aktifleşmiş doğal ve adaptif bağışıklıkla karakterize olup olmadığı tartışılmaktadır (139). Bu anormal inflamatuvar yanıt, alevlenmeler sırasında daha da şiddetlenmektedir. Bu anormal inflamatuvar yanıtta patojenik olarak önemli kabul edilen iki süreç, nötrofiller, makrofajlar (doğal yanıt) ve lenfositler (adaptif yanıt) gibi inflamatuvar hücrelerin inflamasyon bölgesine yönelmesi ile ilişkili proteolizis (140) ve oksidan stres (141, 142). İlginç bir biçimde, akciğerlerde belirgin inflamatuvar değişiklikler oluştuğunda, sigara kullanımı gibi çevresel tetikleyicilerin uzaklaştırılması, solunum yollarındaki anormal inflamatuvar yanıtı tam olarak ortadan kaldırmamaktadır. Gerçekten de, sigarayı bırakanların solunum yolu inflamasyonu sorunları devam etmektedir (143).

1.4. KOAH'ta Senesens, Hücresel Yaşlanma ve Onarım Mekanizmaları

Diğer bir varsayım, hızlanmış hücresel yaşlanma veya hücre morfolojisi ve fonksiyonunda bir dizi karışıklıkla sonuçlanan senesans ile ilişkilendirilmekte ve hücre siklusu arresti ile sonuçlanmaktadır (144, 145). Hücresel senesans ile ilişkilendirilen moleküler ve hücresel mekanizmalar; DNA hasarı (146), anormal DNA onarımı (147), DNA'nın epigenetik modifikasyonlarında bozulma (148), telomer kısalması (149), serbest radikal formasyonu ve protein hasarını (150) kapsamaktadır.

Amfizemli KOAH hastalarında, yapısal hücrelerdeki çeşitli değişikliklerin yaşlanma ve senesansla ilgili olduğu gösterilmiştir. Örneğin, amfizemli hastalardan alınan akciğer fibroblastlarında, senesansın belirteci olan β -galaktosidaz pozitif boyanmıştır ve sağlıklı sigara kullanıcılarından alınan fibroblastlarla karşılaştırıldığında daha düşük proliferatif kapasite sergilemektedir (151). Ayrıca, amfizemli hastalardan alınan Tip II alveoler ve endotel hücrelerde, senesansı indikleyebilen, sikline bağlı kinaz inhibitörlerinin (p16INK4a ve p21Waf1/CIP1)' ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir (152).

KOAH'taki belirli genlerle ilişkili epigenetik modifikasyonlar tam olarak anlaşılammış olsa da, sigarayı bırakan KOAH hastalarının akciğerlerinde histon H3'te global asetilasyon saptanmıştır (153). Bununla birlikte, DNA sessizleştirmeyi ayarlama görevini üstlenen histon rezidüleri üzerinde etkili olan histon deasetilazlar (histon deasetilaz (HDAC) 2 ve Sirtuin 1), KOAH hastalarının akciğerlerinde, KOAH

geliştirmemiş sağlıklı sigara kullanıcılarına göre daha düşük bulunmuştur (154, 155). Sirtuin 1'in KOAH hastalarında daha düşük olan ekspresyonunun, sigara kullanımına bağlı posttranslasyonel oksidatif modifikasyondan kaynaklandığı gösterilmiştir (154).

Somatik hücrelerde telomerler, her hücre siklusunda kısalmakta ve kritik bir boya ulaştıklarında senesans başlamaktadır. Bu nedenle, telomerler, hücre yaşlanmasının iyi bir belirteçidir. Çeşitli çalışmalar, sigara kullananların lökositlerinde, sigarayı bırakanlar veya sigara kullanmayanlara göre daha kısa telomerler bulunduğunu göstermiştir (156, 157). Tsuji ve arkadaşları (2006), KOAH'lı hastaların Tip II epitel ve endotel hücrelerindeki telomerlerin, sigara kullanan ve kullanmayan kontrol gruplarının telomerlerine oranla daha kısa olduklarını göstermiştir (152). Buna karşın Muller ve arkadaşları (2006), amfizemli olan ve olmayan bireyler arasında, akciğer fibroblastların telomer uzunlukları yönünden belirgin bir fark olmadığını saptamışlardır (151).

Kuramsal olarak, akciğerlerdeki onarıcı ve yenileyici süreçler, yıkıcı, inflamatuvar veya apoptotik süreçlere paralel seyretmekte ve normal doku ve işlevin korunmasını sağlayacak akciğer homeostazı bu şekilde devam ettirilmektedir. Epitel hasarının ardından, solunum yolu epiteli onarım sürecini başlatır. Hasarlı bölge sınırındaki hasarsız epitel hücreleri farklılaşmakta, hasarlı alanı "kaplamak" üzere göç etmekte ve normal yara onarımı için önemli olan ESM'nin onarımı için gerekli protein ve hücreleri onarım bölgesine yönlendirmek amacıyla, çeşitli proinflamatuvar sitokinler ve büyüme faktörleri salgılamaktadırlar. Erişkin insan akciğeri özel solunum yolu epitel tipleri ile çevrelenmiş çeşitli trofik birimler barındırmaktadır (158). Bir hasar durumunda akciğerin kendisini onarma yetisi, her bir trofik birimin içindeki yerleşik kök ve progenitör hücreleri mobilize eden moleküler olaylara bağlıdır. Kök hücreler ve progenitörler, çoğalma ve farklılaşmış hücelere dönüşebilme potansiyeli açısından birbirlerine benzemektedir, fakat sadece kök hücreler kendilerini yenileme özelliğine sahiptirler (159).

1.5. KOAH'ta Yeni Tedavi Yaklaşımları

Akciğer, karmaşık üç boyutlu bir organdır. Akciğer dokusunda, 40'ın üzerinde farklı hücre tipi vardır. Gaz değişimi akciğerin en önemli işlevidir. Bu nedenle akciğer, primer olarak kılcal bir ağ ile çevrelenmiş milyonlarca alveolün birleşimidir. Alveolar yüzey, alveolar tip I ve II epitel hücreleriyle kaplıdır ve hava ile temas halindedir. Hava kirliliği, sigara dumanı ve patojenler gibi dışarıdan gelen toksik reaktifler, solunum yoluna kolaylıkla ulaşabilmektedir. Bu reaktiflerin bazıları alveollere de ulaşabilmektedir. Zararlı etkenler, bronşiyal ve alveoler epitel hücrelere hasar vermektedir. Akciğer homeostazını sağlamak için, bu hasarlı epitellerin hemen onarılması veya yerlerine yenilerinin konması gerekmektedir. Ama akciğer hücre döngüsü, deri ve bağırsak gibi dışarıya açılan diğer organlara oranla genelde daha yavaştır. Bronşiyal ve alveoler epitelin bu kapasitesi, akciğer inflamasyonunun ardından rezolüsyonu etkilemektedir.

Akciğerin işlevini düzgün bir biçimde yerine getirmesi için gerekli başka bir anahtar bileşen de matrikstir. Akciğer alveoler yapısı bir süngere benzemektedir. Bir labirent gibi yapılanmış ince duvarları vardır ve içi hava ile doludur. Hava ile dolmak, diğer solid organlardan farklı olan akciğerin benzersiz karakteristiklerinden biridir ve bu durum, hücre göçünü güçlendirmektedir. Matriks, hasara uğramazsa, hasarlı alveoler epitel, çoğalan hücrelerin göçü ile yenilenebilmektedir. Ancak, alveoler yapı bir kez bozulduğunda; progenitör hücreler, uygun-işlevsel akciğer yapısını oluşturamamaktadırlar ve alveoler duvarın yeniden oluşturulması için, elastik fiberler (160) tarafından oluşturulan parankimden bir güç gerekmektedir. Akciğerin büyüme ve rejenerasyonu sırasında, parankimal büyüme ile birlikte alveolar septasyon (alveolerizasyon) gereklidir. Primer akciğer yapısının gelişimi doğumdan önce tamamlansa da alveollerin sayısı, doğumdan sonra, çocukluk çağı ve ergenlikte de artmaya devam etmektedir (postnatal alveolerizasyon) (161). Çocuklarda (162) ve deneysel hayvan modellerinde (163-165), postlobektomi ve postpnömonektomi alveolarizasyon (kompansatuar akciğer büyümesi) gözlenmiştir.

1.5.1. Yeni Farmakolojik Yaklaşımlar

Retinoik Asit

Akciğer amfizemi hayvan modellerinde, çeşitli ajanların akciğer rejenerasyonu üzerine olumlu etkileri olduğu bilinmektedir (166-171). Aktif bir A vitamini metaboliti

olan retinoik asit (RA), en yoğun şekilde araştırılmış reaktiftir. RA'nın, akciğer gelişimi ve alveogeneziste, embriyonik dallanma morfogenezisi (172), alveoler elastik liflerin üretimi (173) ve elastin sentezi (174) gibi çeşitli rolleri vardır.

RA, rat ve fare amfizem modellerinde akciğer yıkım sürecini anatomik ve işlevsel olarak tersine çevirmektedir (166, 175). Ancak, RA tarafından tetiklenen akciğer rejenerasyonunun kapasitesi, amfizem modelleri arasında farklılıklar göstermektedir. Bu farklılığın nedenlerinden biri yaşlanmadır. Kemirgenler gibi küçük hayvanların akciğer rejenerasyon kapasiteleri çok daha iyidir. Çünkü somatik büyümeleri ömürleri boyunca devam etmektedir.

Hayvan çalışmalarının sonuçlarına dayanarak, orta ile şiddetli arası KOAH hastalarında RA tedavisinin uygulandığı çift kör plasebo kontrollü çalışmalar vardır (176, 177). Oral RA uygulaması KOAH hastalarında proteaz/ antiproteaz dengesini düzenlese de (178), akciğer fonksiyonu veya BT görüntülerindeki doku yoğunluğunda istatistiksel bir değişiklik gözlenmemiştir. Alfa-1 antitripsin eksikliği olan hastalarda aktif γ -selektif retinoidin belirgin bir fayda göstermediği bildirilmiştir (REPAIR çalışması) (179). KOAH hastalarında retinoid kullanımı ile ilgili bir başka çalışmada (TESRA çalışması), seçilmiş hastalarda retinoidin potansiyel yararları olduğu gösterilmiştir (180).

Adrenomedullin

Adrenomedullin, insan feokromositomasından izole edilmiş, çok sayıda işlevi olan düzenleyici bir peptittir (181). Adrenomedullinin; cAMP üretimini, bronkodilatasyonu, hücre büyüme regülasyonunu ve anjiyogenezi indüklediği ve antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir (182). Adrenomedullin reseptörü, akciğerin epitel rejenerasyonuna katkıda bulunan solunum yolu epitelinin bazal hücrelerinde ve alveoler tip II epitel hücrelerde eksprese edilmektedir (183). Farelerde elastazla oluşturulan amfizem modelinde, subkütanöz ozmotik pompa ile sürekli adrenomedullin infüzyonu, periferel kanda Sca-1+ hücrelerini artırmakta ve alveollerde ve damarsal yapılarda rejenerasyona neden olmaktadır (170).

Simvastatin

Kolesterol düşürücü etkisinin yanı sıra, 3-hidroksi- 3-metilglutaril koenzim A redüktaz inhibitörlerin (statinler), antienflamatuar etki ve endotel fonksiyonu artırma gibi çeşitli farmakolojik etkileri vardır. Statinler ayrıca, doku rejenerasyonu üzerinde de

yararlı bir etkiye sahiptirler (184). Elastazla indüklenen bir fare amfizem modelinde, intraperitoneal simvastatin enjeksiyonu uygulanmış ve Lm'de azalma ve proliferen olan hücre (PCNA+) sayısında artış gözlemlenmiştir (171).

1.5.2. Büyüme Faktörleri

Hepatosit Büyüme Faktörü

Hepatosit büyüme faktörü (HGF) gibi diğer ajanlarda, akciğer rejenerasyonu üzerinde umut verici olumlu etkiler göstermektedir (168, 169). Ancak, bu büyüme faktörleri sıklıkla tümör büyümesini tetiklemektedir. KOAH hastalarında akciğer kanseri riski yüksek olduğundan, bu tür ajanların kullanıldığı klinik deneylerin yapılması güçtür.

KOAH'lı akciğerlerde rejeneratif yaklaşımla ilgili bir başka sorun da, çoğu KOAH'lı akciğerin gelişimini tamamlamış olmasıdır. Aralarında endojen kök hücrelerin de bulunduğu KOAH'lı akciğer hücrelerinin yaşlanması ve senilite, farmakolojik tedavinin rejeneratif kapasitesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir.

Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör

Granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF), kök hücreleri kemik iliğinden periferel kana yönlendirerek, doku yenilenmesini ve miyokard infarktüsünün ardından hayatta kalma oranını arttırmaktadır (185). G-CSF, postiskemik dokularda anjiyogenezi de indüklemektedir (186). Amfizemli bir farede, G-CSF tedavisi, amfizemin belirgin bir biçimde azalmasını sağlamıştır. G-CSF ile tedavi edilen farelerde, amfizemin morfometrik bir parametresi olan "alveoler mean linear intercept" (Lm)'in, azaldığı gösterilmiştir. G-CSF, dolaşımdaki kemik iliği kökenli endotel progenitör hücreleri arttırmaktadır. G-CSF ve RA birlikte kullanılarak uygulanan tedavi, Lm'nin azalmasında tek başına G-CSF'den daha etkili olmuştur (167).

Keratinosit Büyüme Faktörü

Keratinosit büyüme faktörü (KGF) reseptörü, alveoler tip II epitel hücrelerde eksprese edilmektedir. KGF, tip II hücrelerin sağkalımı, çoğalması ve yer değiştirmelerine katkıda bulunmaktadır (187). İntratrakeal KGF uygulaması, alveoler tip II hiperplaziyi indüklemektedir (188). Diğer bir çalışmada, önceden uygulanan KGF tedavisinin, elastazla indüklenen amfizemi önlediği gösterilmiştir. Tedavi sonrasında uygulanan KGF (elastaz uygulamasından 3 hafta sonra) alveoler hiperplaziyi tersine

çevirmemiştir (189). Bu sonuçlar, KGF'nin etkisinin sadece antiinflamatuvar etkisinin olduğunu ve alveoler onarımı başlatmadığını düşündürmektedir.

1.5.3. Akciğer ve Hücre/Doku Tedavileri

Fare akciğer kök hücreleri ile ilgili artan bilgilere karşın (190, 191), insan akciğer dokusunun endojen kök/progenitör hücreler ile ilgili bilgilerimiz sınırlıdır (192, 193). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, çok sayıda insan akciğer kök/ progenitör hücre adayı bildirilmiştir (194, 195). Bu progenitör hücrelerin onarım kapasitesi ve epigenetik modifikasyonunu analiz etmek, KOAH'ın gelişimi ve yeni bir terapötik strateji ile ilgili yani bir anlayış gelişmesini sağlayabilir.

Alveoler Epitel Progenitör Hücreler

Alveoler boşluğun duvarı, alveoler tip I ve tip II epitel hücrelerle kaplıdır. Tip I hücreler basıktır ve alveol bölgesinin yüzeyinin % 95'ini kaplamaktadır. Tip II hücreler kübiktir ve alveollerin yüzey gerilimini sağlayan sürfaktan proteini salgılamaktadır. Alveoler yüzeyde kapladıkları alanın küçüklüğüne karşı, tip II hücrelerin sayısı, tip I hücrelerden çok daha fazladır. Tip II hücrelerin, tip I hücrelerin progenitörleri oldukları düşünülmektedir. KOAH'lı hastaların akciğerlerinde tip II hücre sayısının yetersiz olduğu gözlenmiştir (152, 196).

Erişkin insan akciğerlerinden izole edilen alveoler epitel hücreleri (AEPC'ler) (194), mezenşimal kök hücre karakterli epitel fenotipe sahiptir. "Mikrodizi" (microarray) analizi yapılan bir çalışmada, AEPC'ler ile tip II hücreler ve mezenşimal kök hücrelerin bir çok ortak geni paylaştıkları saptanmıştır. Buna göre, bu hücreler ile hem alveoler epitel hem de mezenşim hücreleri arasında örtüşen bir fenotip olduğu düşünülebilir. Alveoler tip II hücre hiperplazisi alanlarında AEPC'lerle karşılaşılmıştır. AEPC'lerin epitel ile mezenşim arasındaki transisyonel fenotipi, bu hücrelerin, akciğer doku onarımındaki akciğer endojen hücreler gibi davrandıklarını düşündürmektedir. Antiapoptotik aktivite ve motilite gibi mezenşimal özellikler, fonksiyonel bir epitel progenitörün, KOAH'lı akciğerlerde alveoler onarıma katılmasını sağlayabilir.

c-kit-Pozitif İnsan Akciğeri Kök Hücreleri

Kajstura ve arkadaşları (2011), insan akciğerlerinde c-kit-pozitif ve soy (lineage)-negatif hücrelerin bir kök hücre fenotipi sergilediklerini bildirmişler ve bu hücrelere insan akciğer kök hücreleri (hLSC'ler) adını vermişlerdir (195). hLSC'ler, farklılaşarak, sadece epitel hücrelere değil, aynı zamanda hasarlanmış fare akciğerlerindeki mezenşimal ve endotel soylara da dönüşebilmektedir.

c-kit, transmembran bir tirozin kinaz reseptörüdür ve fetal akciğer gelişiminde eksprese olduğu saptanmıştır (197, 198). Ligandına bağlanması, hücre çoğalması ve diferensiyasyonunu artırmaktadır (199). Lindsey ve arkadaşları (2011), c-kit'in spontan solunum boşluğu gelişimiyle ilişkili olduğunu belirlemişlerdir (200).

İnsan akciğerlerindeki naif hLSC'lerin, in situ kök hücrelerle aynı kapasiteye sahip olup olmadıkları kesin olarak bilinmemektedir. hLSC'lerin kök hücre özellikleri, in vitro hücre kültür şartlarında kazanılmış olabilir. Bu nedenle, hLSC'lerin insan akciğerlerindeki karakteristikleri halen tartışma konusudur (201-203). Ayrıca, hLSC'lerin KOAH'ın patogenezindeki rolü de kesin değildir.

Mezenşimal Kök Hücreler (MKH)

Mezenşimal kök hücreler (MKH'ler), klinik hücre tedavisi alanında en çok değerlendirilen adaylardır. Otolog MKH'ler, kemik iliği ve diğer dokulardan kolaylıkla ayrıştırılmaktadır. MKH'lerin inflamasyonu azaltmaları ve onarım sürecine katkıda bulunmaları beklenmektedir. Bu yararlı etkilerin, MKH'lerin immün sistemi modüle edebilme yetilerine; ve keratinosit büyüme faktörü, HGF ve prostaglandin E₂ gibi büyüme faktörü ve sitokinleri üretebilme kapasitelerine bağlı olduğu düşünülmektedir (8).

Bu antiinflamatuvar etkilerinden dolayı, orta ve şiddetli KOAH hastalarında MKH'lerin kullanıldığı faz II klinik bir çalışma yapılmıştır (204). Bu çalışma, MKH tedavisinin güvenli olduğunu ve KOAH hastalarında inflamatuvar yanıtta azalma olduğunu göstermiş, ancak akciğer işlevinde her hangi bir yararlı etki göstermemiştir.

MKH'lerin, akut akciğer zedelenmesi, (205) KOAH, (206) pulmoner hipertansiyon, (207) astım (208) ve akciğer fibrozu (209) gibi şiddetli akciğer hastalıklarını tedavi etme potansiyeli yaygın olarak değerlendirilmiştir. Deneysel modellerde, MKH'ler hasarlı akciğerlere gerek intravenöz gerekse intratrakeal olarak uygulanmıştır. Kemik iliği hücreleri veya kemik iliğinden alınmış MKH'lerin (12), intravenöz (210) veya intratrakeal (11) uygulaması, farelerde lipopolisakkarit (LPS)

tarafından tetiklenen akciğer hasarını iyileştirmiş; bleomisin tarafından tetiklenen yangı, kolajen depolanması, fibrozis intratrakeal ve intravenöz MKH'lerin infüzyonu ile azalmıştır. MKH fenotipine sahip akciğer endojen kök hücreleri, elastaz ile hasarlanmış fare akciğerlerine intratrakeal olarak uygulandığında akciğer hasarında düzelmeye sağladığı gösterilmiştir (206).

Endotel Progenitör Hücreler

Hasarlı damarların endotel progenitör hücreler (EPC'ler) ile onarımı KOAH'ın tedavisinde iyi bir strateji olabilir. EPC'ler, hasarlı endoteli onarma potansiyeline sahiptirler ve bu özellikleri nedeniyle EPC'ler hücre tedavisinde diğer bir adaydırlar. Pulmoner hipertansiyonu olan hastalarda otolog EPC'lerin kullanıldığı klinik çalışmalar yapılmıştır (211). KOAH hastalarında, endotelial disfonksiyon ve dolaşımda daha düşük miktarda EPC bulunduğu gözlenmiştir (212, 213).

Fetal Akciğer Dokusu veya Kök Hücrelerin İmplantasyonu

Kenzaki ve arkadaşları (2006), erişkin rat akciğerlerine fetal akciğer doku parçaları implante etmişlerdir (214). İmplant edilen akciğer dokusu, pulmoner dolaşıma bağlanmış ve alveoler boşluklar oluşmuştur. Ancak, erişkin ratlardan alınan akciğer parçaları, implantasyondan sonra genişleme göstermemiştir (214). Bu gözlemler, gelişmemiş akciğer hücrelerinin ve/veya gelişmemiş hücrelerce üretilen büyüme faktörlerinin, akciğerin yeniden gelişmesi için anahtar ögeler olduklarını göstermektedir.

Andrade ve arkadaşları (2007), erişkin rat akciğerlerine fetal rat akciğerleri yerleştirilmiş "gelfoam" süngerleri implante etmişlerdir (215). Süngerlerin içine yerleştirilen hücreler, neovaskülarizasyona ve alveol benzeri yapıların oluşmasını sağlamıştır. Bu yaklaşımlar deneyseldir ve etik sorunları vardır, ancak, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerdeki son gelişmeler bu yaklaşımlara güvenilirlik sağlayabilir.

1.5.4. Diğer Tedaviler

Hacim Azaltıcı Cerrahi ve Kompansatuar Akciğer Büyümesi

Pulmoner amfizemli hastalarda hacim azaltıcı cerrahi, rezidüel hacmi arttırmakta ve semptomları yatıştırmasına karşın, son yıllarda yaygın olarak uygulanmamaktadır

(102, 216). Hacim azaltıcı cerrahiyi takiben kompensatuar akciğer büyümesini indüklemek, KOAH hastalarının tedavi sonuçlarını iyileştirmek amacıyla kullanılabilir bir strateji olabilir.

Deneysel hayvan modellerinde, kompensatuar akciğer büyüme farklılıkları, türler arasında ve yaşa göre farklılıklar göstermektedir. Küçük hayvanların kompensatuar büyüme kapasiteleri, büyük hayvanlardan daha iyi ve hızlıdır. Örneğin, ratlarda pnömonektomiden 14 gün sonra kalan akciğerin ağırlığı iki katına çıkarken (217), tavşanlarda bu süre 28 gün (218), köpeklerde ise 5 aydır (163). Bu sonuç, yaşam süresinin kompensatuar akciğer büyümesini etkiliyor olabileceğini düşündürmektedir. Yaş da, akciğerin büyümesinde başka bir önemli faktördür. Yetişkin köpek akciğerinde, kompensatuar akciğer büyümesi yavaş ve tamamlanmamıştır, ama erişkin olmayan bir köpekte yaygın akciğer rezeksiyonu, hızlı ve güçlü kompensatuar büyümeyi başlatmakta ve erişkinlik çağında akciğer işlevinin tamamen normalleşmesini sağlamaktadır (164). Bu sonuç, kompensatuar akciğer büyümesinin, matürasyon durumuna bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Kompensatuar akciğer büyümesiyle ilgili diğer bir anahtar faktör de mekanik strestir. Akciğer hücrelerindeki "stretch stimulation" (germe stimülasyonu), cAMP ekspresyonunu (217), hücre çoğalmasını (219), büyüme faktörü üretimini (220) ve "early growth response gene-1" gibi genlerin ekspresyonunda artışa neden olmaktadır (221). Pozitif solunum yolu basıncı, hücre çoğalması ve ESM yeniden modellemesini tetiklemektedir (222). Pulmoner kılcal damarlarda artan kan akışı ve kayma gerilimi (shear stress), endotel hücre büyümesi ve septal yeniden modellemeyi tetiklemektedir (223). Hacim azaltıcı cerrahi ile ortaya çıkan torasik boşluktaki açık alan, kalan akciğer dokusu üzerinde mekanik strese neden olmakta ve kalan akciğer dokusunun büyümesine neden olabilmektedir.

Shigemura ve arkadaşları (2005), ratlarda hacim azaltıcı cerrahi uygulamışlar ve kalan akciğer dokusunun cerrahi uygulanan yüzeyine, kültüre alınmış adipoz doku kökenli stromal hücrelerle kaplı poliglikolik asit katmanı uygulamışlardır (224). Ameliyattan sonra "sheet" ile kapatılan bölgede alveoler rejenerasyon hızlanmıştır. Ameliyattan sonra akciğerin bu kadar hızlı büyümesi; bu hücrelerden salınan HGF ile ilişkilendirilmiştir.

Yapay Akciğer

Akciğerleri yapay olarak yeniden yapılandırmak zordur. Çünkü akciğer, üç boyutlu yapıda, 30'un üzerinde hücre tipine sahip karmaşık bir organdır. Son zamanlarda, az sayıda yapay akciğer modeli oluşturulamaya çalışılmıştır. Bütün çalışmalarda, deterjan perfüzyonu ile deselülarize edilip, iskelet üzerine yeni endotel ve epitel hücreler implante edilmiş akciğerlerler kullanılmıştır (225-227).

GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

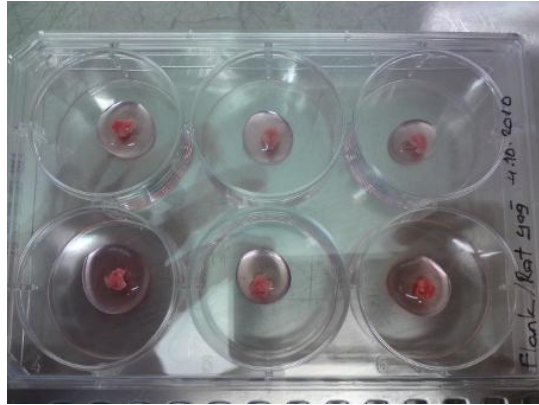
Bu çalışmanın, Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Laboratuvarı'nda Çalışma etik kurul onayı (Etik Kurul No: 2011/121), Nisan-Mayıs 2010 tarihleri arasında Kırıkkale Üniversitesi Etik Kurulu'ndan alındı. Çalışmamız, Kırıkkale Üniversitesi tarafından "Bilimsel Araştırma Projesi" (Proje no: 2010/21) olarak desteklenmiştir. Hayvanlara uygulanan tüm prosedürler Helsinki Sözleşmesi'ne (1986) uygun biçimde gerçekleştirilmiştir.

3.2. Yağ Dokusu Mezenşimal Kök Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü

3.2.1. Yağ Dokusu Mezenşimal Kök Hücrelerinin İzolasyonu

Bu çalışmada yağ dokusu mezenşimal kök hücreleri, ratların (Wistar albino, erkek, 6-8 haftalık, 300 g) deri altı (flank) yağ dokusundan izole edildi. Hücre izolasyonu ve *in vivo* uygulamalar için kullanılan ratlar için gerekli izinler Kırıkkale Üniversitesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır. Xylazine (10 mg/kg) (Richter Pharma AG, Austria) ve ketamin (50 mg/kg) (Richter Pharma AG) anestezisinden sonra, steril koşullar altında flank yağ dokusu alındı. İzolasyon işlemi aynı aileden üç rat kullanılarak yapıldı. Her bir rat için ortalama olarak 0.62 g yağ dokusu izole edildi ($n = 3$; $n_1 = 0.72$ g, $n_2 = 0.57$ g, $n_3 = 0.57$ g). Yağ dokusu mezenşimal kök hücrelerinin izolasyonu için primer eksplant kültür yöntemi kullanıldı. Yağ dokusu alındıktan hemen sonra %10 fetal bovine serum (FBS) (Biochrom AG, Germany), %0.4 penisilin-streptomisin (v/v) (Sigma Chemical Co., USA) içeren taşıma besiyerine alındı ve bundan sonraki işlemler steril hava kabini içinde gerçekleştirildi. Cam bir petri kabına içine alınan yağ doku parçaları, hayvansal kaynaklı olabilecek kontaminasyon risklerini

önlemek için yıkandı, dokular makas yardımıyla hızlı bir şekilde 2-3 mm'lik parçalara ayrıldı. Bir kez daha antibiyotikli besiyeri ile yıkandıktan sonra şekilde görüldüğü gibi (**Şekil 3.1**), altı kuyucuklu kültür kaplarına konulmuş ve üzerlerine birer damla % 20 FBS, % 0.2 penisilin-streptomisin (v/v) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Ham's F12 (DMEM / F12) (Biochrom AG, Germany) içeren solüsyon damlatıldı, 37 °C'de % 5 CO₂ - % 95 hava koşulunda standart kültür koşullarında 30-45 dakika inkübe edildi. Böylece, doku parçalarının kültür kabının yüzeyine yapışması ve dokudan hücrelerin ayrılmaları için daha uygun bir ortam sağlandı. Bu bekleme süresinin ardından doku parçalarının yüzeyden çok fazla ayrılmamaları sağlanarak 2 ml % 20 FBS içeren DMEM/F12 eklendi ve inkübasyona gece boyunca devam edildi. Hücreler bundan sonra mikroskopik olarak takip edildi (IX70 Olympus, Japan) ve MKH'den kaynaklanabilecek sitokinlerin olası etkilerini önlemek için besi ortamı her gün değiştirildi.

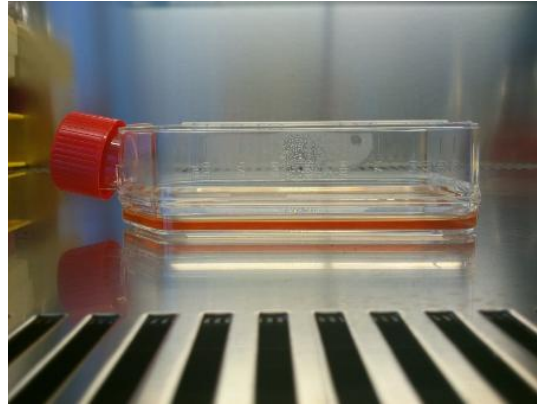


Şekil 3.1. Rat flank yağdokusundan izole edilmiş yağ doku parçaları.

3.2.2. Yağ Dokusu Mezenşimal Kök Hücrelerinin Kültürü

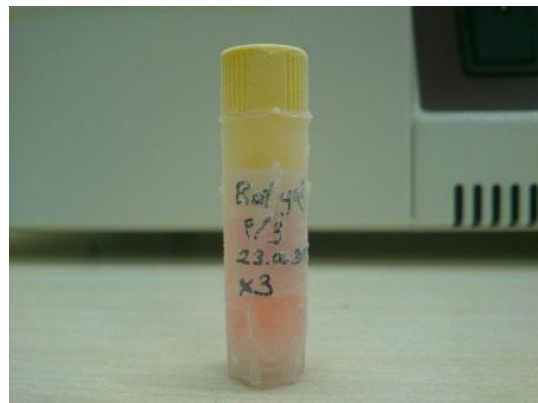
İnkübasyonun 5. gününde yağ doku parçaları uzaklaştırıldı ve hücrelerin konfluent hale gelmesi beklenmeden klasik tripsinizasyon yöntemi ile pasajı yapıldı. Bunun için, hücrelerin üzerindeki besiyeri alınmış ve serumun tripsin üzerindeki inhibe edici etkisini ortadan kaldırmak için hücre yüzeyine her bir kuyucuk için 0.5 ml olacak şekilde tripsin/EDTA (%0.05/%0.02; w/v) (Biochrom AG, Germany) eklenerek yıkama yapılmış tripsin/EDTA çözeltisi toplanarak atıldı. Ardında yine her bir kuyucuk için 0.5 ml tripsin eklenmesi yapılarak 0.5 konularak 37⁰C'de hücrelerin tutundukları kabın

yüzeyinden ayrılmaları sağlandı. Yüzeye tutunan hücrelerin tamamen yüzeyden ayrıldıkları ve süspansiyon haline geldikleri gözlemlendikten sonra, hücreler 5 ml % 20 FBS içeren DMEM/F12 ile toplanmış ve santrifüj tüpüne alınarak 800 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler (pelet), % 10 FBS içeren DMEM/F12 ile süspansiyon edilmiş, 75 cm² yüzey alanına sahip kültür kaplarına aktarıldıktan (**Şekil 3.2**) sonra inkübasyona %10 FBS ile devam edildi. Bu işlemle primer kültürdeki hücrelerden 1. pasaj elde edildi (P1). Ardından hücreler 5. pasaja kadar çoğaltıldı. Bu şekilde P1, P2, P3, P4 ve P5 hücreler elde edilmiş, ikinci pasajdaki hücreler karakterizasyon için kullanıldı. Tüm pasajlardaki hücreler çalışmanın *in vivo* aşamasında kullanılmak üzere dondurularak saklandı.



Şekil 3.2. MKH'in 75 cm²'lik kültür kaplarında çoğaltılması.

Hücreler kademeli dondurma işlemi ile donduruldu. Bunun için kültür kabının yüzeyine tutunmuş olan hücreler, tripsin/EDTA çözeltisi kullanılarak yukarıda da ifade edildiği gibi tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden toplandı, hücre süspansiyonu % 10 FBS içeren DMEM/F12 ile 800 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücreler (pelet), bu kez % 50 FBS, % 40 DMEM/F12 ve % 10 dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma Chemical Co., USA) içeren dondurma besiyeri ile süspansiyon edildi ve dondurma tüplerine (**Şekil 3.3**) alınarak 48 saat süreyle -80°C'de bekletildi. Ardından hücreler daha uzun süre saklanması için -196 °C'de sıvı azot ortamına alındı.



Şekil 3.3. MKH'in dondurulması.

Hücrelerin *in vivo* uygulamasında transplante edilecek doku alanı göz önünde bulundurularak her uygulama noktasına 10 milyon hücre/ml verilmesi planlandı. Bunun için her bir uygulama noktası için istediğimiz hücre sayısını oluşturduğu için, 3 adet 75 cm² flasttaki hücreler tek bir tüpte donduruldu.

3.3. Yağ Dokusu Mezenşimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Mezenşimal kök hücrelerin karakterizasyonu için immunoflorasan boyama ve flow sitometrik analiz yöntemi kullanıldı.

3.3.1. Mezenşimal Kök Hücrelerin İmmunoflorasan Boyama Yöntemi ile Karakterizasyonu

İmmunoflorasan boyama yöntemi için mezenşimal kök hücrelerin karakterizasyonunda kullanılan iki yüzey antijeni olan CD13 ve CD29 molekülleri seçildi. İkinci pasajdaki hücreler, altı kuyucuklu kültür kaplarına alınarak inkübe edildi, hücreler kültür kabının hemen hemen yarısını kapladığında (yarı konfluent) uygun primer ve sekonder antibadi molekülleri (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) kullanılarak boyandı ve floresan mikroskopunda incelendi. İmmunoflorasan boyama yönteminde sırasıyla şu aşamalar gerçekleştirildi:

1. Hücrelerin üzerindeki besiyeri alındı ve bir kez fosfat tampon çözeltisi (PBS) (Sigma Chemical Co., USA) ile bir kez yıkandı.
2. Hücreler -10 °C'de metanol ile fikse edildi.
3. Metanol uzaklaştırıldı ve havada kurutuldu.
4. Hücrelerin üzerine blocking serum eklenerek (CD13 için Kat.No: Sc2043; CD29 için Kat.No: Sc2044) 20 dakika süreyle inkübe edildi.
5. Blocking serum uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı.
6. Primer antibadi (CD13 için Kat.No: Sc6595; CD29 için Kat.No: Sc6583) konularak 60 dakika süreyle inkübe edildi.
7. Primer antibadi uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile üç kez 5 dakika süreyle yıkandı.

8. Sekonder antibadi (CD13 için Kat.No: Sc2783; CD29 için Kat.No: Sc2783) konularak 60 dakika inkübe edildi.

9. Sekonder antibadi uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile üç defa 5 dakika süreyle yıkandı.

10. Hücrelerin yüzeyi mounting medium ile kapatılarak florasın mikroskopta (BH2-RFL-T3 model fluorescence attachment, Olympus) incelendi.

Primer ve sekonder antibadi ile blocking medium solüsyonları 1:100 (v/v) olacak şekilde PBS içinde hazırlandı ve tüm işlemler oda ısısında gerçekleştirildi. Boyamanın yapılmasından hemen sonra mikroskop incelemesinin yapılması florasın ışımının kaybolmadan iyi bir görüntü elde edilebilmesi için önemlidir. Bu nedenle, bekleme süresi (30-45 dakikayı geçmemek kaydıyla) gerektiğinde kültür kabının yüzeyi alüminyum folyo ile sarılarak +4 °C'de buzdolabında saklandı.

3.3.2. Mezenşimal Kök Hücrelerin Flow Sitometri Yöntemi ile Karakterizasyonu

Hücrelerin flow sitometrik karakterizasyonu için ikinci pasajdaki hücreler hazırlandı. Bu hücrelerin, hizmet alımı karşılığında Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (KOGEM, Kocaeli, Türkiye) CD29, CD45, CD54, CD90, CD106, MHC Class I ve MHC Class II yüzey molekülleri için flow sitometrik analizleri yapıldı. Bu şekilde MKH'in sözü geçen yüzey moleküllerinin ne oranlarda ifade edildiği incelendi.

3.4. Çalışma Tasarımı

Ratlar

Çalışmada, aynı çevresel ortamda yetiştirilmiş, ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen 34 Wistar albino rat kullanıldı. Deney öncesi 20-21 °C sıcaklıkta 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ritminde izlenen ratların anestezi uygulamasından 2 saat öncesine kadar su ve gıdaya serbest erişimleri sağlandı. Toplam 34 rat üç gruba ayrıldı.

Elastaz Uygulaması

Elastaz çözeltileri, uygulamadan hemen önce steril koşullar altında hazırlandı. Elastaz uygulamasından önce ratlara, ketamin (100 mg/kg; intraperitoneal olarak) anestezi uygulandı. Elastaz ve Elastaz-MKH grubuna "porcine" pankreatik elastaz (PPE) uygulamasından bir saat önce taşıyıcı çözelti (% 5'lik Gummi arabicum [Arap zamkı])

intratrakeal olarak verildi (6). İntratrakeal uygulama, yeşil (18G) ve gri (16G) intraket granül uçları birleştirildikten sonra, insülin enjektörüne alınan elastaz çözeltisi veya tek başına salin trekeaya yerleştirilen intraket setinden otoskop yardımıyla verildi. Çalışmanın başlangıç gününde, kontrol grubuna (n=10), intratrakeal olarak salin çözeltisi; Elastaz grubuna (n=13) ve Elastaz-MKH grubuna (n=11) 0.5 ml salin çözeltisi içinde vücut ağırlığının gramına 0.1 IU/gr "porcine" pankreatik elastaz (48.0 U/mg protein; CALBIOCHEM, EMD Biosciences Inc., CA) intratrakeal olarak uygulandı. Takiben, ratlar Trendelenburg pozisyonuna getirilerek, elastazın her iki akciğere eşit olarak dağılması sağlandı. Elastaz ve Elastaz-MKH gruplarında postelastaz letalite gözlenen rat sayısı , sırasıyla n=1 ve n=2 idi.

Elastaz-MKH grubundaki ratlara çalışmanın 21. gününde ml'de en az 1×10^6 olacak şekilde serum fizyolojik içinde süspansiyon edilen MKH'ler kuyruk veninden uygulandı. Üç gruptaki ratlar, çalışmanın 42. gününde yüksek doz ketamin (100 mg/kg) anestezisi altında sakrifiye edildi.

Bronkoalveolar Lavaj Sıvısında ve Serumda Matriks Metalloproteinaz Analizi

Bronkoalveolar lavaj (BAL) daha önce Wang ve arkadaşları (2003) tarafından tanımlandığı şekilde uygulandı (228). Bronko alveolar lavaj sıvısı (BALS), ratlar sakrifiye edildikten ve trakea üst uçtan bağlandıktan hemen sonra trakeal kanülden 3 kez püskürtülen 3'er ml'lik salin çözeltisinin geri alınması yöntemi ile biyokimya tüpünde toplandı. Toplanan BALS, soğutuldu ve 1500 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden elde edilen süpernatant BALS matriks metalloproteinaz (MMP)-9 analizi için ayrıldı.

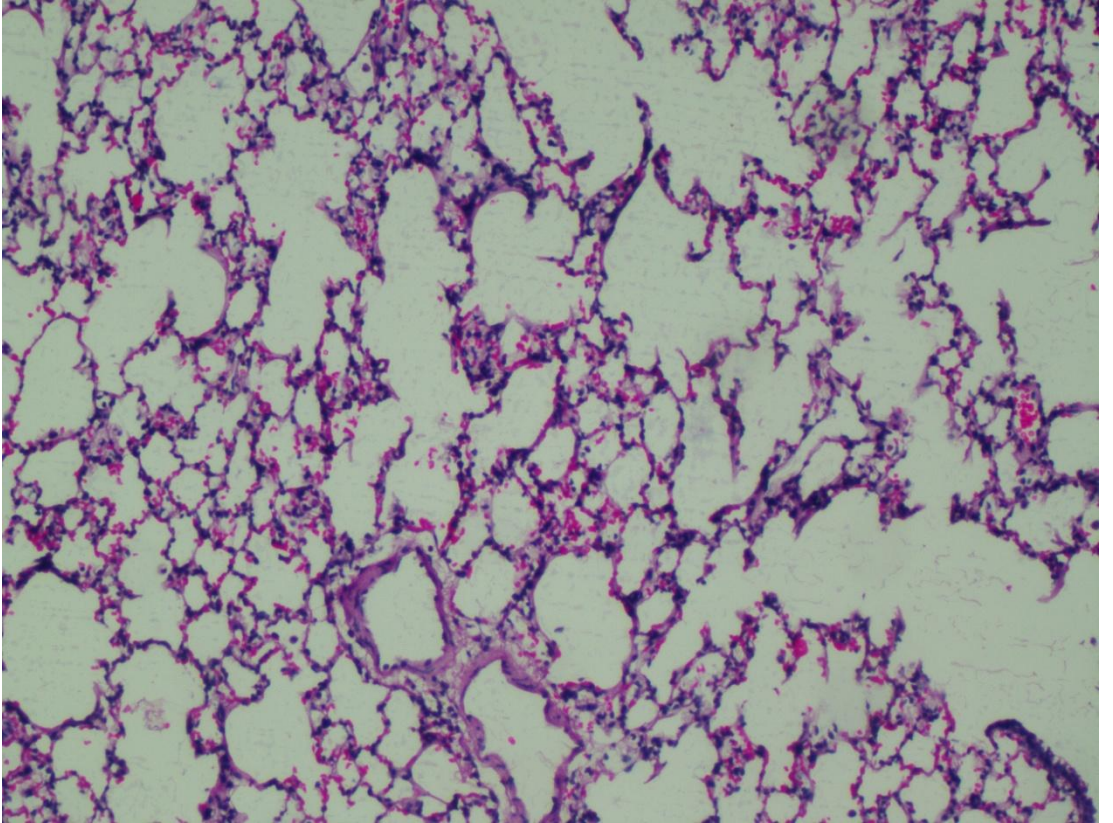
Serum MMP-9 konsantrasyonları, venöz kandan elde edilen serum örneklerinden ticari ELISA kitleri (R&D System Inc. USA) ile üreticinin önerdiği protokole göre ölçülmüştür. Serumların yerleştirildiği mikrolate kuyularının herbirine 100 µL MMP-9 assay çözeltisi eklendikten sonra, standart veya kontrol örneklerinden 50 µL eklendi. Sabit çalkalayıcıda (500±50 rpm) 2 saatlik inkübasyondan sonra, sırasıyla reaksiyon çözeltisi aspire edildi, kuyular yıkama tamponu ile dört kez yıkandı, her kuyuya 200 µL MMP-9 konjugatı eklendi ve oda sıcaklığında çalkalayıcıda 2 saat daha inkübe edildi. Takiben, yukarıda tarif edildiği biçimiyle aspirasyon/yıkama adımları tekrar edildi ve her kuyuya 200 µL substrat çözeltisi eklendi. mikrolate'ler karanlıkta oda sıcaklığında 30 dk boyunca bekletildikten sonra 50 µL "stop" çözeltisi

eklendi ve her kuyudaki optik densite 450 nm'de hesaplandı. Her örnekteki MMP-9 konsantrasyonu standart eğriden yararlanılarak hesaplandı.

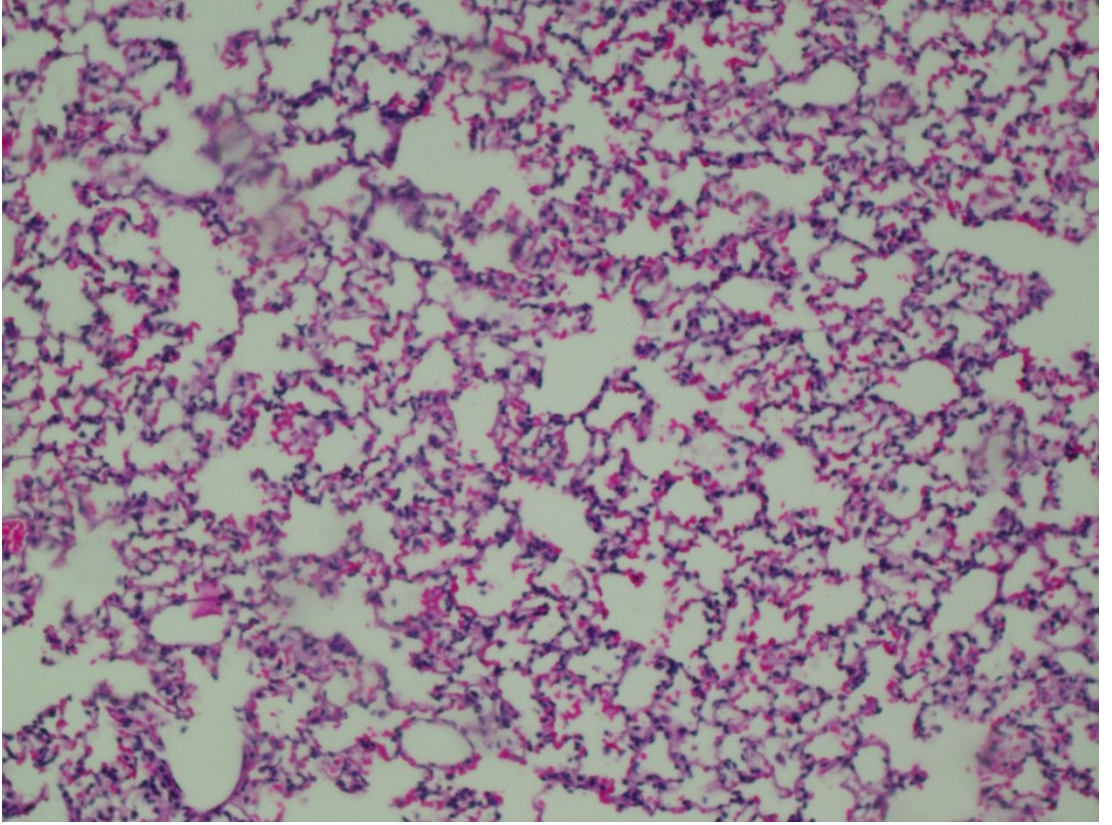
Akciğerin Histolojik Analizi

Sakrifiye edildikten sonra ratların sağ ve sol akciğeri alındı. Akciğerler % 10'luk formaldehit içinde fikse edildi. Akciğer dokuları 2 mm kalınlığındaki bloklara ayrılıp parafine gömüldükten sonra dokular 5 µm'lik kesitler halinde ayrıldı ve hemotoksileneozin ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu altında (229), amfizem alanı açısından değerlendirildi. Her bir preparattan makroskopik olarak rastgele seçimle 5 fotoğraf alındı ve sonra amfizem indeksi hesaplandı: Amfizem indeksi= (Amfizemli alan+Normal alan)/ (Amfizemli alan+Normal alan+Stromal alan) formülü (Prof. Dr. Önder Bozdoğan ve arkadaşları, Kırıkkale Patoloji AD.) kullanılarak hesaplandı.

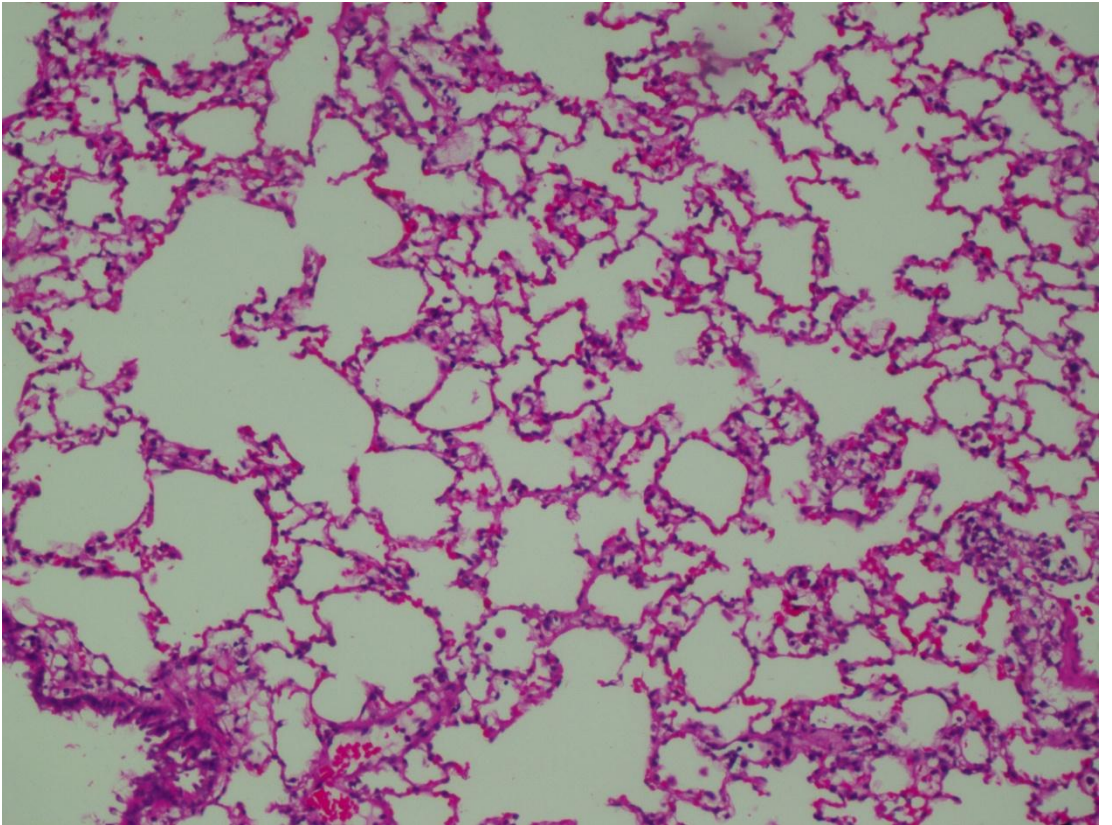
Şekil 3.4. Kontrol grubundaki ratların akciğerlerinin histolojik görünümü hemotoksileneozin x 200.



Şekil 3.5. Elastaz grubundaki ratların akciğerlerinin histolojik görünümü hemotoksileneozin x 200.



Şekil 3.6. Elastaz-MKH grubundaki ratların akciğerlerinin histolojik görünümü hemotoksileneozin x 200.



BALS ve Serumda MMP-9 Analizi

BALS ve serumdaki MMP-9 düzeyleri ELIZA kitleri ile (Med-Systems Diagnostics Gmbh, Vienna, Austria) üreticinin protokollerine uygun olarak ölçüldü.

3.5. İstatistiksel Analizler

Çalışmadan elde edilen tüm veriler bilgisayarda Windows işletim sisteminde, “Statistical Packages for the Social Science” (SPSS) 11.5 kullanılarak analiz edildi. Tanımlayıcı istatistiksel analizler yapıldıktan sonra (frekans, yüzde dağılımı, ortalama±standart sapma; medyan [minimum-maksimum]), *Kruskal Wallis Varyans Analizi testi* sonuçları gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdiğinde ikili karşılaştırmalarda *Mann-Whitney U testi* kullanıldı. Sürekli değişkenler arasındaki ilişkiler, *Spearman's Korelasyon Testi* ile değerlendirildi.

$p \leq 0.005$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

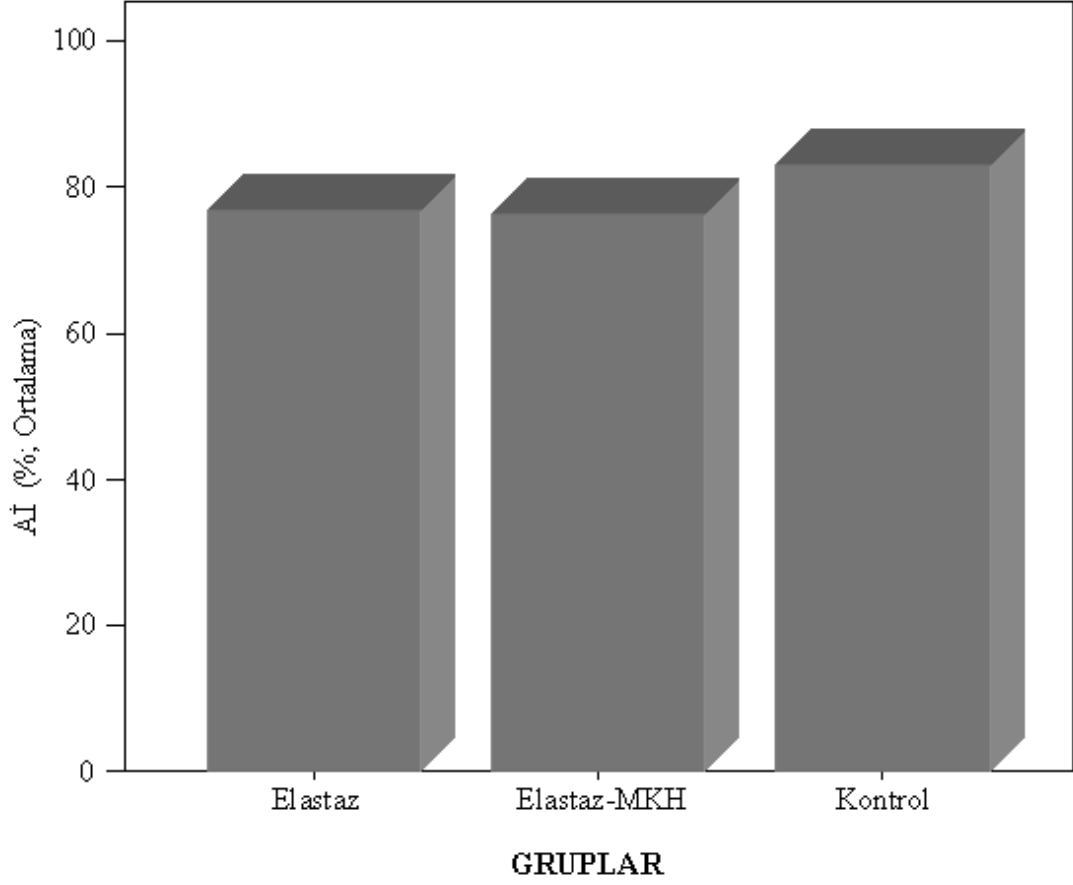
4. BULGULAR

Çalışmaya alınan üç rat grubunun Aİ medyan değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark saptandı ($p=0.005$). Bu anlamlı fark, elastaz ($p=0.008$) ve elastaz-MKH ($p=0.001$) gruplarının Aİ medyan değerlerinin, kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olmasından kaynaklanmaktaydı. Üç grubun serum MMP-9 düzeyleri (medyan) ($p=0.018$) ve BAL MMP-9 düzeyleri (medyan) arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark yoktu ($p=0.742$) (**Tablo 4.1**, **Şekil 4.1** ve **Şekil 4.2**).

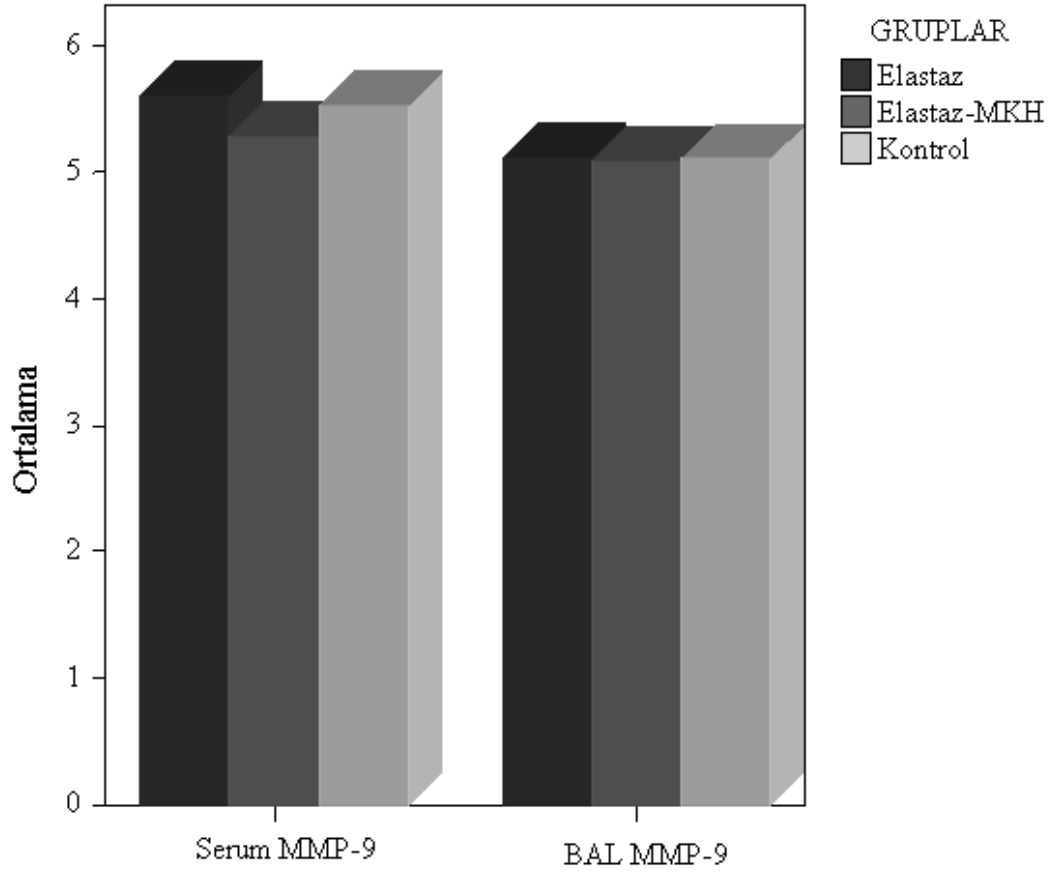
Tablo 4.1. Üç grubun Aİ, serum MMP-9 ve BAL MMP-9 düzeylerinin karşılaştırılması.

	GRUPLAR															p
	Elastaz (n=12)					Elastaz-MKH (n=9)					Kontrol (n=10)					
	Ort	SS	Med	Min	Maks	Ort	SS	Med	Min	Maks	Ort	SS	Med	Min	Maks	
Aİ (%)	76.75	5.57	76.45	69.50	87.30	76.22	6.13	77.60	61.70	84.30	82.94	2.83	84.00	78.70	85.60	0.005
Serum MMP-9	5.60	1.07	5.19	5.08	8.85	5.29	0.26	5.23	5.06	5.95	5.52	0.19	5.42	5.36	5.84	0.018
BAL MMP-9	5.11	0.08	5.09	5.02	5.31	5.09	0.03	5.08	5.04	5.13	5.11	0.04	5.10	5.06	5.16	0.742

Kruskal Wallis Test



Şekil 4.1. Üç grubun AI ortalama değerlerine ait çubuk grafiği.



Şekil 4.2. Üç grubun serum MMP-9 ve BAL MMP-9 ortalama değerlerine ait çubuk grafiği.

Çalışmaya dahil edilen tüm ratlar birlikte değerlendirildiğinde; Aİ düzeyleri ile serum MMP-9 ($r=0.205$, $p=0.269$) ve BAL MMP-9 ($r=-0.069$, $p=0.712$), düzeyleri arasında; serum MMP-9 ($r=0.184$, $p=0.323$) düzeyleri ile BAL MMP-9 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ilişki yoktu (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Tüm ratlarda Aİ, serum MMP-9 ve BAL MMP-9 değerlerinin ilişkileri.

		Aİ	Serum MMP-9
Serum MMP-9	r	0.205	
	p	0.269	
BAL MMP-9	r	-0.069	0.184
	p	0.712	0.323

Spearman's rho

Elastaz grubundaki ratlar değerlendirildiğinde; Aİ düzeyleri ile serum MMP-9 ($r=0.214$, $p=0.505$) ve BAL MMP-9 ($r=-0.260$, $p=0.414$) düzeyleri arasında; serum MMP-9 ($r=0.030$, $p=0.926$) düzeyleri ile BAL MMP-9 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ilişki saptanmadı (**Tablo 4.3**).

Tablo 4.3. Elastaz grubunda Aİ, serum MMP-9 ve BAL MMP-9 değerlerinin ilişkileri.

Elastaz		Aİ	Serum MMP-9
Serum MMP-9	r	0.214	
	p	0.505	
BAL MMP-9	r	-0.260	0.030
	p	0.414	0.926

Spearman's rho

Elastaz-MKH grubundaki ratlar değerlendirildiğinde; Aİ düzeyleri ile serum MMP-9 ($r=-0.628$, $p=0.070$) ve BAL MMP-9 ($r=-0.380$, $p=0.313$) düzeyleri arasında; serum MMP-9 ($r=0.470$, $p=0.201$) düzeyleri ile BAL MMP-9 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ilişki yoktu (**Tablo 4.4**).

Tablo 4.4. Elastaz-MKH grubunda Aİ, serum MMP-9 ve BAL MMP-9 değerlerinin ilişkileri.

Elastaz-MKH		Aİ	Serum MMP-9
Serum MMP-9	r	-0.628	
	p	0.070	
BAL MMP-9	r	-0.380	0.470
	p	0.313	0.201

Spearman's rho

Kontrol grubundaki ratlar değerlendirildiğinde; Aİ düzeyleri ile serum MMP-9 ($r=-0.600$, $p=0.067$) ve BAL MMP-9 ($r=0.200$, $p=0.580$) düzeyleri arasında; serum MMP-9 ($r=-0.600$, $p=0.067$) düzeyleri ile BAL MMP-9 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ilişki yoktu (**Tablo 4.5**).

Tablo 4.5. Kontrol grubunda Aİ, serum MMP-9 ve BAL MMP-9 değerlerinin ilişkileri.

Kontrol		Aİ	Serum MMP-9
Serum MMP-9	r	-0.600	
	p	0.067	
BAL MMP-9	r	0.200	-0.600
	p	0.580	0.067

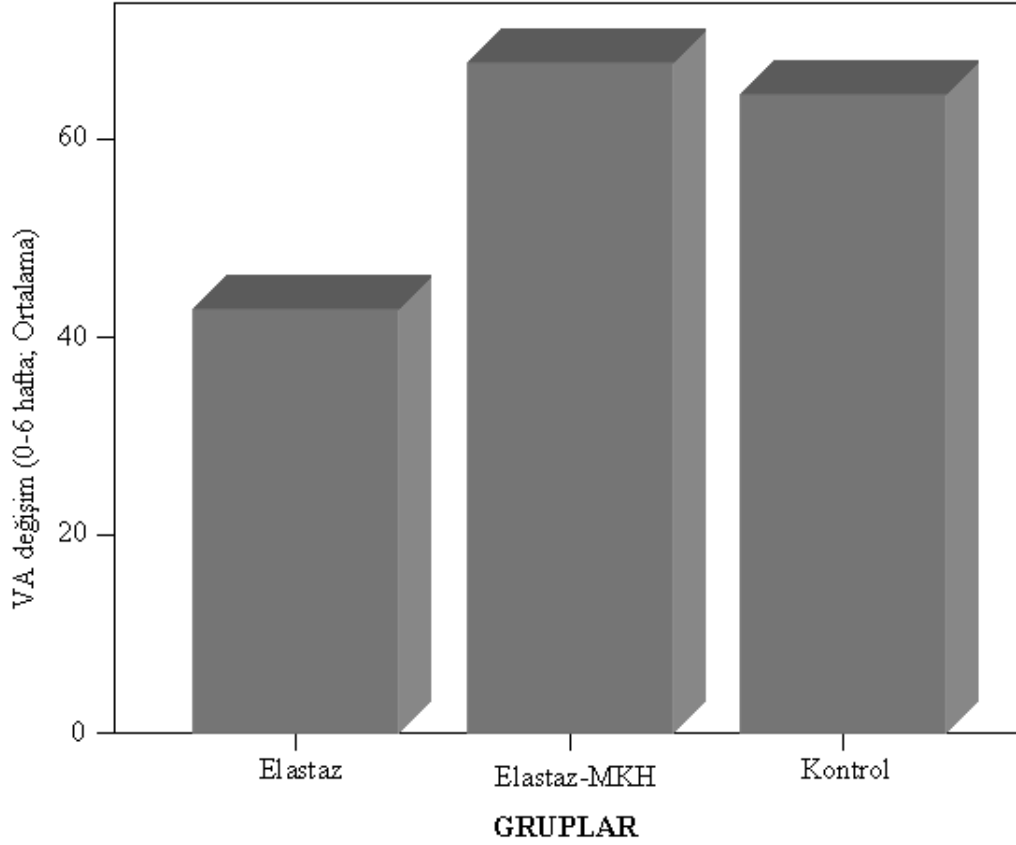
Spearman's rho

Çalışmaya alınan üç rat grubunun başlangıç VA ($p=0.119$) değerleri ve VA değişim ($p=0.153$) değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark saptanmadı (**Tablo 4.6 ve Şekil 4.3**).

Tablo 4.6. Üç grubun başlangıç VA ve VA değişim (0-6 hafta) değerlerinin karşılaştırılması.

	GRUPLAR															p
	Elastaz (n=12)					Elastaz-MKH (n=9)					Kontrol (n=10)					
	Ort	SS	Med	Min	Maks	Ort	SS	Med	Min	Maks	Ort	SS	Med	Min	Maks	
Başlangıç VA (gr)	236.42	29.80	236	196	287	231.67	52.73	220	177	340	208.60	11.03	214.00	190	220	0.119
VA değişim (0-6. hafta) (gr)	42.92	31.23	42.50	4	102	67.67	45.96	83	7	143	64.40	8.24	66	55	75	0.153

Kruskal Wallis Test



Şekil 4.3. Üç grubun VA değişim (0-6 hafta) değerlerin ortalamalarına ait çubuk grafik.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızın sonuçları, Elastaz ve Elastaz-MKH gruplarının amfizem alanlarının kontrol grubundan daha yüksek olduğunu; üç grubun serum ve BALS MMP-9 düzeylerinin anlamlı düzeyde farklı olmadığını gösterdi.

KOAH; akciğer fonksiyon kaybıyla giden, ilerleyici ve zararlı gazlara ve partiküllere karşı gelişen anormal inflamatuvar yanıtla karakterize bir hastalıktır (230-232). KOAH'daki kronik inflamasyon sürecine dahil olan mekanizmalar; ESM yıkımına neden olan proteaz/antiproteaz dengesizliği ve epitelyal ve/veya endotelyal hücreleri etkileyen apoptozistir. Bu mekanizmalar, alveolar yıkıma ve pulmoner fonksiyonlarda kötüleşmeye katkıda bulunur (233-235). Aşkar fibrozis olmaksızın alveolar yıkım (amfizem), KOAH'nın majör patolojik görünümünden biridir (232).

Amfizem progresyonu, sadece elastin yıkımına atfedilmemekte ve akciğer dokusunun anormal yeniden modellenmesi, küçük hava yollarının fibrozisi ve pulmoner disfonksiyon ile de ilişkilendirilmektedir. Elastazla indüklenen amfizem modelleri, yeniden modelleme sürecindeki mekanizmaları araştırmak üzere kullanılmaktadır (236-238). Amfizemin çoğu manifestasyonu, farelerde tekrarlayan elastaz uygulamaları ile oluşturulabilir ve lezyonun indüklenmesini takiben uzun süre devam eder (239). Elastazla indüklenen amfizem modeli, tek uygulama ile panasiner amfizemin histolojik ve morfolojik karakteristiklerinin hızlı bir biçimde oluşturulabildiği bir yaklaşımdır (240, 241). Elastaz ile oluşan amfizematöz hasar homojen dağılım göstermekte ve doz bağımlı olarak ortaya çıkmaktadır. Elastaz protokollerinin çoğu, tek intratrakeal uygulama biçimindedir ve hastalığın insanlardaki progresyonunun yavaş olması nedeniyle, insandaki amfizemle ilgili çıkarımda bulunurken farklı mediatörlerin de sürece dahil olabileceği akılda tutulmalı ve sonuçlar dikkatli bir biçimde değerlendirilmelidir (242, 243). Tek doz elastaz uygulaması, amfizem benzeri lezyonları indükleyen hava boşluğu genişlemesi ile sonuçlanır (167, 244). Lüthje ve arkadaşları (2009), tekrarlayan elastaz uygulamasının, tek doza göre daha şiddetli amfizem oluşturduğunu gözlemlemişlerdir (239). Biz, intratrekeal tek doz elastaz uygulamasından altı hafta sonra kontrol grubu, elastaz ve elastaz-MKH grubundaki ratları kurban ettik. Yapılan histolojik değerlendirmede; elastaz ve elastaz-MKH grubundaki ratlarda saptanan amfizem alanının kontrol grubundan daha yüksek olduğunu saptadık. Hamster akciğeri, elastaz hasarına -amfizem gelişimine- inflamasyona ve hemorajiye rat ve fare akciğerinden daha yatkındır (4, 5). Hamsterlarda α 1-antitripsin düzeyi düşüktür ve bu nedenle akciğere proteolitiklerle müdahale edildiğinde amfizem oluşturmak daha kolaydır (245, 246). Ratlarda

elastaz ile oluşturulan amfizem modelinin daha güç olduğu bilinmekle birlikte, histolojik değerlendirme sonuçlarımız, ratlarda oluşturduğumuz amfizem modelinin başarılı olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda, elastaz ve elastaz-MKH grubundaki ratların akciğer histolojik değerlendirmesi elastaz uygulamasından altı hafta sonra gerçekleştirildi. Ancak, her rat grubu için sadece bir zaman noktasında değerlendirme yapıldığı için, gruplar için amfizem bulgularının ilerleyiciliğine dair bir sonuç elde edemedik. Elastaz ile oluşturulan fare amfizem modelinde morfolojik değişikliklerin devam ettiği sürenin, elastaz uygulanmasından sonra sekiz hafta veya daha uzun olabileceği belirlenmiştir (247). Diğer bir çalışmada, murin amfizem modelinin bilgisayarlı mikrotomografi ile değerlendirildiği bir çalışmada, elastaz uygulanması ile oluşan morfolojik değişikliklerin dört haftaya kadar devam ettiği saptanmıştır (244). Ratlarda pankreatik elastazla oluşturulan amfizem modelinde bazal membran proteinlerinin değerlendirildiği bir çalışmada, elastazla indüksiyonun 40. gününde bile idrardaki glikozaminoglikan içeriği ile amfizem yaygınlığının pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (6). Finlay ve arkadaşları (1996) tarafından yapılan çalışmada, ratlarda elastazla amfizem gelişip gelişmediği histolojik değerlendirme 4 hafta sonra yapılmış ve amfizem lehine kanıtlar saptanmıştır (248). Rubio ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan çalışmada da, elastaz amfizem modelinin, amfizem gelişimi açısından 28 gün sonra sonuç verdiği belirlenmiştir (237). Inoue ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan çalışmada, tek doz elastaz uygulamasıyla ratlarda oluşturulan amfizem modelinde akciğer histolojisi, BALS'ta inflamatuvar hücre sayımı ve akciğer homojenatlarında proinflamatuvar sitokin değerlendirmeleri, intratrakeal elastaz uygulamasından 21 gün sonra yapılmıştır ve bu zaman noktasındaki histolojik ve immünolojik tablo, 21. günde deneysel amfizem oluşturmada başarılı olduğunu ve inflamatuvar sürecin devam ettiğini göstermiştir (7). Ratlarda, elastaz uygulaması sonrasında morfolojik değişikliklerin devam ettiği süre ile ilgili bilgi yoktur. Ancak, sözü edilen son çalışmanın sonuçları ve bizim sonuçlarımız, ratlarda elastaz uygulamasından sonra geçen üç haftanın (MKH uygulaması dördüncü haftanın başında yapılmıştır) amfizem gelişimi için yeterli bir süre olduğunu ve amfizeme katkıda bulunan inflamatuvar süreçlerin altıncı haftadan sonrada devam edebileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda, çalışma tasarımı ratlarda MKH'lerin amfizeme karşı koruyucu ve amfizem üzerine iyileştirici etkilerini aynı anda gerçekleştirmelerini gerektiriyor gibi görünmektedir.

MKH'ler; kolay izole edilebilmeleri, kültürde büyük miktarlarda çoğalabilmeleri, farklılaşma kapasiteleri, immünsupressif özellikleri, parakrin etkileri, hasarlı doku bölgesine

göç edebilmeleri ve konak uyumluluğu gibi karakteristikleri nedeniyle çeşitli hastalıkların biyolojik tedavisinde kullanılmaya adaydırlar (8). MKH'ler, akciğerin de dahil olduğu non-hematopoetik bir çok dokunun morfolojisine ve parankimal hücrelerinin fenotipine uyum sağlama/dönüşme kapasitesine sahip hücrelerdir (249, 250). Ek olarak, MKH'ler immün modülasyon özelliğine sahiptir. Bu hücreler; dendritik hücreler, T hücreleri ve B hücreleri gibi doğal ve adaptif immün hücrelerin aktivitesini modüle edebilmektedir (251-254). Çalışmalar, MKH'lerin ratlarda oluşturulan amfizem modelinde pulmoner amfizem oluşumuna karşı koruyucu etkileri olduğuna dair kanıtlar sunmaktadır (9, 10). Akut akciğer hasarı hayvan modellerinde MKH'lerin inflamasyonu baskıladığı (11-13); papain veya elastazla oluşturulan hayvan amfizem modellerinde de, rat MKH'lerinin akciğer amfizemini kısmen düzelttiği saptanmıştır (14-16). Sigara dumanına kronik olarak maruz bırakılan ratlarda, rat MKH'lerinin intrapulmoner olarak uygulanmasının amfizeme karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (20). Ratlarda 6 ay boyunca uygulanan sigara dumanı ile indüklenen amfizemin, tek enjeksiyon biçiminde retrobulbar olarak uygulanan kemik iliği kökenli hücrelerle ve MKH'ler ile; ve sigara maruziyetinden sonraki 5 hafta boyunca kuyruk veninden haftada iki kez uygulanan hücreden arındırılmış MKH medyası ile düzelmeye gösterdiği bulunmuştur. Bu çalışmada, ratlar iki ay sonra sakrifiye edilmiş ve donör hücrelerin çoğunun ortadan kalktığı gözlenmiştir. Son sözü edilen histolojik durum ve hücreden arındırılmış MKH medyasının amfizemi onarıcı etkisi (anjyogenezis ve akciğer doku rejenerasyonu) birlikte düşünüldüğünde, MKH'lerin parakrin aktivitelerinin amfizemi iyileştirici etkileri olduğu söylenebilir (255). Diğer bir çalışmada, rat akciğerinde sigara dumanı ile indüklenen hasarın, akciğer fibroblastlarında hücreden arındırılmış MKH medyası ile düzelmeye gösterdiği, akciğer fibroblast proliferasyonunun ve fibroblastlar tarafından üretilen ESM proteinlerinin ekspresyonunun arttığı bulunmuştur (256). Adipoz dokulardan elde edilen MKH'ler, hücre tedavisinde umut vaat eden bir seçenektir (17). Primatlarla yapılan bir çalışmada, adipoz doku kökenli MKH'lerin, desellülarize akciğer matriksine tutunduğu ve proliferasyon gösterdiği gözlenmiştir (18). Adipoz dokudan elde edilen MKH'lerin murin amfizem modelindeki etkilerinin kemik iliği kökenli MKH'lerin etkileri ile karşılaştırıldığı bir çalışmada, adipoz dokudan elde edilen MKH'lerin anti-inflamatuar özelliklerinin daha belirgin olduğu, iki uygulamanın histolojik etkiler açısından benzer olduğu bulunmuştur (19). Üçüncü haftada kuyruk veninden uyguladığımız MKH'lerin elastaza bağlı oluşan amfizem alanlarında anlamlı gerileme sağlamadığını bulduk. Çalışmamızda, akciğer dokusunda adipoz MKH'lerin hangi düzeyde olduğunu değerlendirmek amacıyla immünohistokimyasal değerlendirme yapılmamıştır. Bu nedenle, çalışmamızda kuyruk veninden uyguladığımız

adipoz doku kökenli MKH'lerin rat akciğerindeki yerleşimlerine dair bilgi edinemedik ve MKH'lerin çalışmamızda saptanan etkisizliğinin nedenini tespit edemedik.

İnflamatuar yanıtın modülasyonu, Crohn hastalığı ve graft versus host hastalığı gibi çeşitli inflamatuvar ve immün aracılı hastalıklarda, allojenik insan MKH'lerinin uygulanması ile ilgili klinik temeli oluşturmaktadır (257, 258). Akut akciğer hasarı, akciğer fibrozisi ve KOAH gibi akciğer hastalıklarının tedavisinde MKH'lerin kullanımı; bu hücrelerin lokal inflamasyonu ve immün yanıtları modüle edebilme kapasitesine dayandırılmaktadır (259). Iyer ve arkadaşları (2009) tarafından, orta-ağır KOAH hastalarında allojenik MKH kullanılan faz II, çok merkezli, randomize, plasebo kontrollü bir çalışma başlatmışlardır (260). Çalışmanın orta vadeli sonuçları, KOAH hastalarında MKH uygulamasının güvenli olduğunu ve MKH infüzyonunun KOAH hastalarının CRP düzeylerinde anlamlı azalmaya neden olduğunu göstermiştir (260). KOAH olgularında aylık sistemik MKH infüzyonunun, istenmeyen olay (adverse events-yan etki) ve alevlenme sıklığına, ve KOAH'da hastalığın gidişi açısından olumsuz bir etkisi olmadığı gözlenmiştir (261). Evre IV dispnesi olan dört KOAH/pulmoner amfizem hastasının dahil edildiği, kök hücre olarak kemik iliği mononükleer hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada, kök hücreler sistemik infüzyon yoluyla uygulanmıştır. Bu çalışmada, 12 ay boyunca izlenen KOAH/pulmoner amfizem hastalarının spirometri sonuçlarında hafif bir düzelme olduğu gösterilmiştir (262). Otolog akciğer kökenli MKH'ler de pulmoner amfizem tedavisinde yararlı etkilere sahip olabileceği düşünülen potansiyel MKH'lerden biridir (263).

Aktive olmuş makrofajlar ve nötrofiller, nötrofil elastaz, MMP-9 ve MMP-12 gibi elastolitik enzimlerin salgılanmasına neden olur ve bu durum inflamatuvar hücre göçünün artışı ile sonuçlanır (232, 235, 264-266). Çalışmalar, MMP-9'un amfizemin patogenezinde önemli role sahip olduğunu düşündürmektedir. KOAH'ta; MMP'lerin neden olduğu disfonksiyonel matriks yeniden modellenmesi (267) ve indüklenen inflamasyonun (268) hava yolu obstrüksiyonuna katkıda bulunduğu bilinmektedir. MMP-9, amfizem patogenezinde özel bir öneme sahiptir (269, 270). KOAH hastalarının akciğerlerinde (129) ve alveolar makrofajlarında (125, 271) MMP-9 düzeylerinin arttığı saptanmıştır. İlerlemiş amfizemi olan bireylerin dolaşımındaki monositlerinde de MMP-9 üretiminin yüksek olduğu belirlenmiştir (272). Ayrıca, farelerin alveolar makrofajlarındaki MMP-9 ekspresyonunun erişkin başlangıçlı ilerleyici amfizeme neden olduğu gösterilmiştir (273). D'armiento ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan ve 101 amfizem olgusunun dahil edildiği bir çalışmada, MMP'lerin

amfizemin şiddetini veya progresyonunu öngöremediği sonucuna ulaşılmıştır. Bu çalışmada, amfizem olgularının ve normal sınırlarda akciğer işlevlerine sahip sigara kullanan bireylerin BALS MMP-9 düzeylerinin sigara kullanmayan kontrollerden yüksek olduğu saptanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, amfizem olguları ile normal sınırlarda akciğer işlevlerine sahip sigara kullanan bireylerin BALS MMP-9 düzeyleri arasında anlamlı fark olmadığı gösterilmiştir. Ek olarak, amfizem olgularının plazma MMP-9 düzeylerinin normal sınırlarda akciğer işlevlerine sahip sigara kullanan bireylerden ve sigara kullanmayan kontrollerden yüksek olduğu saptanmıştır (274). Çeşitli derecelerde amfizemi olan olgularda, MMP-9 polimorfizminin alveolar makrofajlardaki MMP-9 mRNA ekspresyonunu etkilediği bulunmuştur (275). Diğer bir çalışmada, amfizem olgularının serum MMP-9 düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir (276). Bu bağlamda, serum örneklerinin MMP düzeylerinin değerlendirilmesinde kullanılması uygun görünmemektedir. Çünkü, bu belirteçler, platelet aktivasyonu veya örnekleme sırasında plateletlerden veya lökositlerden salınmaktadır ve bu belirteçlerin serumdaki düzeyleri yükselmektedir. Bu bulgular ışığında, serum örneklerinde ölçülen MMP-9 düzeylerinin dolaşımdaki MMP-9 düzeylerini yansıtmadığı söylenebilir (277, 278). Gerlach ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, serumun hızlı bir biçimde ayrılmasının bile, serum MMP-9 düzeylerindeki yapay yüksekliğe engel olmadığı ve MMP-9 düzeylerinin sitratlı veya heparinli plazma örneklerinde ölçülmesi gerektiği gösterilmiştir (279).

Guinea piglerde, 6 aylık sigara dumanı maruziyeti boyunca uygulanan MMP-9/MMP-12 inhibitörünün (AZ11557272) pulmoner amfizem üzerine olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (280). Ratlarda tekrarlayan kadmiyum nebulizasyonunun amfizem ve pulmoner MMP-9 üretiminde artışa neden olduğu saptanmıştır (281). MMP-9 polimorfizminin KOAH gelişimi ve progresyonu açısından önemli bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (282). Lipopolisakkaritle oluşturulan KOAH hayvan modellerinde, akciğer dokusundaki MMP-9 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (283). Amfizemin odun dumanı ile indüklendiği diğer bir hayvan modelinde de, BALS ve akciğer doku homojenatındaki MMP-9 ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (284). Nane yağı, ratlardaki amfizematöz değişikliklere karşı koruyucu etkisi vardır ve aynı zamanda amfizematöz değişiklikte artan MMP-9 ekspresyonunu da azaltmaktadır (285). İntraperitoneal olarak makrofaj koloni stimüle edici faktör uygulanan, fare elastaz amfizem modelinde, MMP-9 ekspresyonu yapan pulmoner alveolar makrofajların birikiminin amfizeme eşlik ettiği bildirilmiştir (266). Cheng ve arkadaşları tarafından "wild type" farelerle yapılan bir çalışmada, farelerin akciğerlerinde elastaz instilasyonundan 4 hafta

sonra amfizematöz değişiklikler olduğu saptanmıştır (286). Diğer bir çalışmada, amfizem değerlendirmesi elastaz instilasyonundan 20 gün sonra yapılmıştır. Bu sonuçlar, amfizem ve MMP-9 arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir. Bizim sonuçlarımız, amfizemi yatıştırarak amacıyla herhangi bir uygulama yapılmayan elastaz grubunda altıncı haftada llen MMP-9 düzeylerinin kontrollerden farklı olmadığını gösterdi. Bu durum, elastazla oluşturulan amfizem modelinde amfizem progresyonunun elastaz vb. ajanların kesilmesinde sonra devam etmemesiyle ilişkili olabilir.

Literatürde, MKH'lerin MMP-9 ekspresyonu üzerine etkileri ile ilgili çalışma sayısı kısıtlıdır. Bir çalışmada, üç rat grubundan ikisi 11 hafta boyunca sigara dumanına maruz bırakılmış, bu iki rat grubundan birine 11 haftanın sonunda intrapulmoner olarak (trakea yoluyla) kemik iliği MKH'leri uygulanmıştır. On beş hafta sonunda MKH uygulamasından dört hafta sonra MKH uygulanan grupta oluşan amfizemde düzelme olduğu; MKH uygulanan ratların akciğerlerindeki MMP-9 ve bu proteinin mRNA ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur (20). Bizim alışmamızda ise, bu sonuçlarla uyumsuz bir biçimde, MKH uygulamasının MMP-9 düzeyleri üzerine bir etkisi olmadığı görüldü. Bu sonuçlarımız, çalışmamızda saptanan MKH uygulamasının amfizem üzerine etkisi olmadığı bulgusu ile uyumlu görünmektedir.

KOAH'ta beden ve kas kitlesi kaybı (pulmoner kaşeksi), iskelet kası zayıflığına ve egzersiz kapasitesinde bozulmaya neden olmaktadır (287, 288). Pulmoner kaşeksi ile akciğer inflamasyonu (289) ve dolaşımdaki düzeyleri artan inflamatuvar sitokinler (290-292) arasındaki ilişki, sistemik inflamasyonun kas atrofisini tetikleyebileceğini veya kas atrofisine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (293). Bu sistemik anormallikler, amfizem modelindeki elastaz uygulama protokolleri ile de oluşturulabilmektedir (239, 294-296). Bizim alışmamızda da, literatürle uyumlu biçimde, kilo alımının elastaz grubundaki ratlarda en düşük düzeyde olduğunu saptadık. Ancak, bu fark anlamlılık düzeyine ulaşmıyordu.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmamızın sonuçları, elastaz ve elastaz-MKH gruplarının amfizem alanlarının kontrol grubundan daha yüksek olduğunu; üç grubun serum ve BALS MMP-9 düzeylerinin anlamlı düzeyde farklı olmadığını gösterdi.

Daha önceki çalışmalarda değerlendirilen hayvan amfizem modellerinde MKH'lerin amfizemi iyileştirici etkileri olduğuna dair kanıtlar elde edilmesine karşın, bizim sonuçlarımız MKH'lerin böyle iyileştirici bir etkisi olmadığı görüşü lehine yorumlanabilir. Ancak biz, kuyruk veninden uyguladığımız adipoz doku kökenli MKH'lerin akciğer dokusundaki yoğunluklarını değerlendirmek üzere immünohistokimyasal çalışma yapmadık. Bu nedenle, uyguladığımız MKH'lerin akciğer dokusunda amfizem üzerine iyileştirici etki gösterecek düzeye ulaşp ulaşamadığını değerlendiremedik.

BALS ve serum MMP-9 düzeyleri ile ilgili sonuçlarımız da, genel olarak literatüre paralellik göstermemekteydi. Ancak, MMP-9 ile ilgili bulgularımız amfizem ile ilgili bulgularımıza paralellik göstermekteydi. Bu sonuçlara göre, MKH uygulamasının ne amfizem ne de serum ve BALS MMP-9 düzeyleri üzerine bir etkisi olmamıştı.

Daha sonra yapılacak çalışmalarda, kuyruk veninden uygulanan MKH'lerin akciğer dokusundaki yoğunluğunun immünohistokimyasal yöntemlerle belirlenmesi veya MKH'lerin intratrakeal olarak uygulanması daha güvenilir verilerin elde edilmesini sağlayabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Pauwels RA, Rabe KF. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Lancet* 2004;364(9434):613-20.
2. Kasahara Y, Tudor RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(3 Pt 1):737-44.
3. Voelkel NF, Gomez-Arroyo J, Mizuno S. COPD/emphysema: The vascular story. *Pulm Circ* 2011;1(3):320-6.
4. Corteling R, Wyss D, Trifilieff A. In vivo models of lung neutrophil activation. Comparison of mice and hamsters. *BMC Pharmacol* 2002;2:1.

5. Borzone GR, Liberona LF, Bustamante AP, Saez CG, Olmos PR, Vecchiola A, et al. Differences in lung glutathione metabolism may account for rodent susceptibility in elastase-induced emphysema development. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;296(4):R1113-23.
6. van de Lest CH, Versteeg EM, Veerkamp JH, van Kuppevelt TH. Digestion of proteoglycans in porcine pancreatic elastase-induced emphysema in rats. *Eur Respir J* 1995;8(2):238-45.
7. Inoue K, Koike E, Yanagisawa R, Takano H. Extensive Analysis of Elastase-Induced Pulmonary Emphysema in Rats: ALP in the Lung, a New Biomarker for Disease Progression? *J Clin Biochem Nutr* 2010;46(2):168-76.
8. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* 2010;28(3):585-96.
9. Zhen G, Liu H, Gu N, Zhang H, Xu Y, Zhang Z. Mesenchymal stem cells transplantation protects against rat pulmonary emphysema. *Front Biosci* 2008;13:3415-22.
10. Liu HM, Zhen GH, Zhang ZX, Zhang HL, Cao Y, Wang T, et al. [Effects of bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on the apoptosis of alveolar wall cells in papain and Co60-induced pulmonary emphysema rats]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi* 2008;24(2):210-4.
11. Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, Matthay MA. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol* 2007;179(3):1855-63.
12. Xu J, Woods CR, Mora AL, Joodi R, Brigham KL, Iyer S, et al. Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293(1):L131-41.
13. Song L, Xu J, Qu J, Sai Y, Chen C, Yu L, et al. A therapeutic role for mesenchymal stem cells in acute lung injury independent of hypoxia-induced mitogenic factor. *J Cell Mol Med* 2012;16(2):376-85.
14. Zhen G, Xue Z, Zhao J, Gu N, Tang Z, Xu Y, et al. Mesenchymal stem cell transplantation increases expression of vascular endothelial growth factor in papain-

- induced emphysematous lungs and inhibits apoptosis of lung cells. *Cytherapy* 2010;12(5):605-14.
15. Katsha AM, Ohkouchi S, Xin H, Kanehira M, Sun R, Nukiwa T, et al. Paracrine factors of multipotent stromal cells ameliorate lung injury in an elastase-induced emphysema model. *Mol Ther* 2011;19(1):196-203.
 16. D'Agostino B, Sullo N, Siniscalco D, De Angelis A, Rossi F. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin Biol Ther* 2010;10(5):681-7.
 17. Sun CK, Yen CH, Lin YC, Tsai TH, Chang LT, Kao YH, et al. Autologous transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells markedly reduced acute ischemia-reperfusion lung injury in a rodent model. *J Transl Med* 2011;9:118.
 18. Bonvillain RW, Danchuk S, Sullivan DE, Betancourt AM, Semon JA, Eagle ME, et al. A nonhuman primate model of lung regeneration: detergent-mediated decellularization and initial in vitro recellularization with mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 2012;18(23-24):2437-52.
 19. Antunes MA, Abreu SC, Cruz FF, Oliveira A, Xisto DG, Morales MM, et al. Mesenchymal Stem Cell Therapy Comparing Bone Marrow And Adipose Tissue- Originated Cells In A Murine Model Of Elastase-Induced Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185(Online Abstracts Issue).
 20. Guan XJ, Song L, Han FF, Cui ZL, Chen X, Guo XJ, et al. Mesenchymal stem cells protect cigarette smoke-damaged lung and pulmonary function partly via VEGF-VEGF receptors. *J Cell Biochem* 2013;114(2):323-35.
 21. Jeffrey PK. Remodelling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:28-38.
 22. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;350(26):2645-53.
 23. Fabri LM, Romagnoli M, Corbetta L. Differences in airway inflammation in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:418-24.

24. GOLD. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. In; 2010.
25. Lopez AD, Murray CC. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* 1998;4(11):1241-3.
26. Halbert RJ, Isonaka S, George D, Iqbal A. Interpreting COPD prevalence estimates: what is the true burden of disease? *Chest* 2003;123(5):1684-92.
27. Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2006;28(3):523-32.
28. Mannino DM. Chronic obstructive pulmonary disease: definition and epidemiology. *Respir Care* 2003;48(12):1185-91.
29. Baykal Y. KOAH üzerinde epidemiyolojik bir araştırma. *Tüberküloz ve Toraks* 1976;24:3-18.
30. Dörtbudak Z, Erkan F. İstanbul'da bir ilçede kronik bronşit semptom prevalansı. In: *Toraks Derneği 1. Yıllık Kongresi. Nevşehir: Toraks Derneği 1. Yıllık Kongresi Bildiri Özet Kitabı; 1996. p. 55.*
31. Bakanlığı TCS. Türkiye Hastalık Yüğü Çalışması: Türkiye'de Ölümler 2004. Ankara: SB, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Hıfzıssıhha Mektebi Müdürlüğü; 2006.
32. Tzanakis N, Anagnostopoulou U, Filaditaki V, Christaki P, Siafakas N. Prevalence of COPD in Greece. *Chest* 2004;125(3):892-900.
33. Balkissoon R, Lommatzsch S, Carolan B, Make B. Chronic obstructive pulmonary disease: a concise review. *Med Clin North Am* 2011;95(6):1125-41.
34. Yıldırım N. KOAH patogenezi. In: Umut S, Yıldırım N, editors. *Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH); 2005. p. 41-57.*
35. Toraks Derneği. *Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı tanı ve tedavi rehberi. Toraks Dergisi* 2000;1:1-25.
36. Gülbay BE, Acıcan T. Patogenez ve inflamasyon. In: Saryal S, Acıcan T, editors. *Güncel bilgiler ışığında Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı; 2003. p. 21-33.*

37. Stockley RA. Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:49-52.
38. Wright DT, Cohn LA, Li H, Fischer B, Li CM, Adler KB. Interactions of oxygen radicals with airway epithelium. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 10:85-90.
39. Blanc PD, Iribarren C, Trupin L, Earnest G, Katz PP, Balmes J, et al. Occupational exposures and the risk of COPD: dusty trades revisited. *Thorax* 2009;64(1):6-12.
40. Task force on the phenotype of the polycystic ovary syndrome of the Androgen Excess Society. Position statement: The Androgen Excess Society evidence-based criteria for defining the polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:9237-9245.
41. Lee MH, Hancox RJ. Effects of smoking cannabis on lung function. *Expert Rev Respir Med* 2011;5(4):537-46; quiz 547.
42. Ko FW, Hui DS. Outdoor air pollution: impact on chronic obstructive pulmonary disease patients. *Curr Opin Pulm Med* 2009;15(2):150-7.
43. Han MK. Update in chronic obstructive pulmonary disease in 2010. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183(10):1311-5.
44. Nakamura H. Genetics of COPD. *Allergol Int* 2011;60(3):253-8.
45. Seibold MA, Schwartz DA. The lung: the natural boundary between nature and nurture. *Annu Rev Physiol* 2011;73:457-78.
46. Pillai DR, Shahinas D, Buzina A, Pollock RA, Lau R, Khairnar K, et al. Genome-wide dissection of globally emergent multi-drug resistant serotype 19A *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Genomics* 2009;10:642.
47. Pillai SG, Ge D, Zhu G, Kong X, Shianna KV, Need AC, et al. A genome-wide association study in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of two major susceptibility loci. *PLoS Genet* 2009;5(3):e1000421.
48. Guerra S. Overlap of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* 2005;11(1):7-13.
49. Camp PG, O'Donnell DE, Postma DS. Chronic obstructive pulmonary disease in men and women: myths and reality. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6(6):535-8.

50. Sin DD, Cohen SB, Day A, Coxson H, Pare PD. Understanding the biological differences in susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease between men and women. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4(8):671-4.
51. Tam A, Morrish D, Wadsworth S, Dorscheid D, Man SF, Sin DD. The role of female hormones on lung function in chronic lung diseases. *BMC Womens Health* 2011;11:24.
52. Spurzem JR, Rennard SI. Pathogenesis of COPD. *Semin Respir Crit Care Med* 2005;26(2):142-53.
53. Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther* 2006;111(2):476-94.
54. Gosselink JV, Hayashi S, Elliott WM, Xing L, Chan B, Yang L, et al. Differential expression of tissue repair genes in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181(12):1329-35.
55. Georgopoulos D, Anthonisen NR. Symptoms and Signs of COPD. In: Chaniak NS, editor. *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Philadelphia: WB Saunders Company; 1991. p. 357-363.
56. Romagnoli I, Rhcheldi L, Fabbri LM. Asthma and COPD. In: Bapnes P, Diazen J, Rannard S, Thomson L, editors. *Diagnosis*. Amsterdam: Academic Press; 2002. p. 447-455.
57. Irwin RS, Richter JE. Gastroesophageal reflux and chronic cough. *Am J Gastroenterol* 2000;95(8 Suppl):S9-14.
58. Chhabra SK. Pulmonary hypertension associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 2010;52(1):29-40.
59. van Ede L, Yzermans CJ, Brouwer HJ. Prevalence of depression in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review. *Thorax* 1999;54(8):688-92.
60. Shaphiro SD, Snider GL, Rennard S. Obstructive disease (chronic bronchitis and emphysema). Laboratory findings (chest radiography). In: Mason RJ, Mumiy JF, Broaddus VC, Nadel JA, editors. *MUITay and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine*. 4 th ed. Philadelphia: Elsevier; 2005. p. 1118.

61. Seemungal TA, Donaldson GC, Paul EA, Bestall JC, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(5 Pt 1):1418-22.
62. Buist AS, Sexton GJ, Nagy JM, Ross BB. The effect of smoking cessation and modification on lung function. *Am Rev Respir Dis* 1976;114(1):115-22.
63. Yıldız F. Spirometrik testler ve dinamik akciğer volumleri. In: Mirici NA, Yıldız F, editors. *Göğüs Hastalıklarında Tanı Yöntemleri*. İstanbul: Turgut Yayıncılık; 2003. p. 59-72.
64. Erturan S. Spirometrik inceleme. In: Yıldırım N, editor. *Akciğer Fonksiyon Testleri*. İstanbul: Turgut Yayıncılık; 2004. p. 35-40.
65. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). *Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD (Updated 2013)*. In; 2013.
66. Demir T. KOAH'ta Solunum fonksiyon testleri. In: Umut S, Yıldırım N, editors. *Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı*. İstanbul: Turgut Yayıncılık ve Ticaret A.Ş; 2005. p. 74-82.
67. Wagner PD. Effects of COPD on gas exchange. In: NS C, editor. *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Philadelphia: WB Saunders Co; 1991. p. 73-79.
68. Osma E. Solunum Sistemi Radyolojisi (Normal ve Patolojik). In: *Havayolu hastalıkları*. İzmir: Çağdaş Ofset; 2000. p. 159-172.
69. O'Brien C, Guest PJ, Hill SL, Stockley RA. Physiological and radiological characterisation of patients diagnosed with chronic obstructive pulmonary disease in primary care. *Thorax* 2000;55(8):635-42.
70. Naeije R, MacNee W. Pulmonary circulation. In: MacNee W, Pride N, Rennard SI, editors. *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2 nd ed. London: Chapman and Hall; 2003. p. 228-242.
71. Glaab T, Vogelmeier C, Buhl R. Outcome measures in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): strengths and limitations. *Respir Res* 2010;11:79.
72. Sethi S, Evans N, Grant BJ, Murphy TF. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2002;347(7):465-71.

73. Celli BR, MacNee W. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004;23(6):932-46.
74. Wu J, Sin DD. Improved patient outcome with smoking cessation: when is it too late? *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2011;6:259-67.
75. Cahill K, Stead LF, Lancaster T. Nicotine receptor partial agonists for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev* 2011(2):CD006103.
76. Jorenby DE, Hays JT, Rigotti NA, Azoulay S, Watsky EJ, Williams KE, et al. Efficacy of varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs placebo or sustained-release bupropion for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006;296(1):56-63.
77. Eisenberg MJ, Filion KB, Yavin D, Belisle P, Mottillo S, Joseph L, et al. Pharmacotherapies for smoking cessation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *CMAJ* 2008;179(2):135-44.
78. Wu P, Wilson K, Dimoulas P, Mills EJ. Effectiveness of smoking cessation therapies: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 2006;6:300.
79. Ries AL, Bauldoff GS, Carlin BW, Casaburi R, Emery CF, Mahler DA, et al. Pulmonary Rehabilitation: Joint ACCP/AACVPR Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2007;131(5 Suppl):4S-42S.
80. Rice KL, Dewan N, Bloomfield HE, Grill J, Schult TM, Nelson DB, et al. Disease management program for chronic obstructive pulmonary disease: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182(7):890-6.
81. Umut S. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığında Oksijen Tedavisi. In: Umut S, Erdinç E, editors. Tanımdan Tedaviye Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı. 6th ed. İstanbul: Toraks Kitapları; 2008. p. 177-84.
82. Nannini L, Cates CJ, Lasserson TJ, Poole P. Combined corticosteroid and long acting beta-agonist in one inhaler for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;3.

83. Sin DD, McAlister FA, Man SF, Anthonisen NR. Contemporary management of chronic obstructive pulmonary disease: scientific review. *JAMA* 2003;290(17):2301-12.
84. Wise RA, Tashkin DP. Optimizing treatment of chronic obstructive pulmonary disease: an assessment of current therapies. *Am J Med* 2007;120(8 Suppl 1):S4-13.
85. National Heart Lung and Blood Institute. Morbidity and mortality: 2009 chart book on cardiovascular, lung, and blood diseases. Bethesda: National Heart, Lung, and Blood Institute; 2009.
86. Dorinsky PM, Reisner C, Ferguson GT, Menjoge SS, Serby CW, Witek TJ, Jr. The combination of ipratropium and albuterol optimizes pulmonary function reversibility testing in patients with COPD. *Chest* 1999;115(4):966-71.
87. van Noord JA, Aumann JL, Janssens E, Smeets JJ, Verhaert J, Disse B, et al. Comparison of tiotropium once daily, formoterol twice daily and both combined once daily in patients with COPD. *Eur Respir J* 2005;26(2):214-22.
88. Alsaeedi A, Sin DD, McAlister FA. The effects of inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review of randomized placebo-controlled trials. *Am J Med* 2002;113(1):59-65.
89. Hanania NA, Darken P, Horstman D, Reisner C, Lee B, Davis S, et al. The efficacy and safety of fluticasone propionate (250 microg)/salmeterol (50 microg) combined in the Diskus inhaler for the treatment of COPD. *Chest* 2003;124(3):834-43.
90. Tashkin DP. Budesonide and formoterol in a single pressurized metered-dose inhaler for treatment of COPD. *Expert Rev Respir Med* 2010;4(6):703-14.
91. Rennard SI, Tashkin DP, McElhattan J, Goldman M, Ramachandran S, Martin UJ, et al. Efficacy and tolerability of budesonide/formoterol in one hydrofluoroalkane pressurized metered-dose inhaler in patients with chronic obstructive pulmonary disease: results from a 1-year randomized controlled clinical trial. *Drugs* 2009;69(5):549-65.
92. Tashkin DP, Rennard SI, Martin P, Ramachandran S, Martin UJ, Silkoff PE, et al. Efficacy and safety of budesonide and formoterol in one pressurized metered-dose inhaler in patients with moderate to very severe chronic obstructive pulmonary disease: results of a 6-month randomized clinical trial. *Drugs* 2008;68(14):1975-2000.

93. Qaseem A, Wilt TJ, Weinberger SE, Hanania NA, Criner G, van der Molen T, et al. Diagnosis and management of stable chronic obstructive pulmonary disease: a clinical practice guideline update from the American College of Physicians, American College of Chest Physicians, American Thoracic Society, and European Respiratory Society. *Ann Intern Med* 2011;155(3):179-91.
94. Aaron SD, Vandemheen KL, Fergusson D, Maltais F, Bourbeau J, Goldstein R, et al. Tiotropium in combination with placebo, salmeterol, or fluticasone-salmeterol for treatment of chronic obstructive pulmonary disease: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007;146(8):545-55.
95. Singh D, Brooks J, Hagan G, Cahn A, O'Connor BJ. Superiority of "triple" therapy with salmeterol/fluticasone propionate and tiotropium bromide versus individual components in moderate to severe COPD. *Thorax* 2008;63(7):592-8.
96. Ford PA, Durham AL, Russell RE, Gordon F, Adcock IM, Barnes PJ. Treatment effects of low-dose theophylline combined with an inhaled corticosteroid in COPD. *Chest* 2011;137(6):1338-44.
97. Bestall JC, Paul EA, Garrod R, Garnham R, Jones PW, Wedzicha JA. Usefulness of the Medical Research Council (MRC) dyspnoea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999;54(7):581-6.
98. Jones PW, Harding G, Berry P, Wiklund I, Chen WH, Kline Leidy N. Development and first validation of the COPD Assessment Test. *Eur Respir J* 2009;34(3):648-54.
99. Anthonisen NR, Manfreda J, Warren CP, Hershfield ES, Harding GK, Nelson NA. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med* 1987;106(2):196-204.
100. Connors AF, Jr., Dawson NV, Thomas C, Harrell FE, Jr., Desbiens N, Fulkerson WJ, et al. Outcomes following acute exacerbation of severe chronic obstructive lung disease. The SUPPORT investigators (Study to Understand Prognoses and Preferences for Outcomes and Risks of Treatments). *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(4 Pt 1):959-67.
101. Ram FS, Rodriguez-Roisin R, Granados-Navarrete A, Garcia-Aymerich J, Barnes NC. WITHDRAWN: Antibiotics for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2011(1):CD004403.

102. Fishman A, Martinez F, Naunheim K, Piantadosi S, Wise R, Ries A, et al. A randomized trial comparing lung-volume-reduction surgery with medical therapy for severe emphysema. *N Engl J Med* 2003;348(21):2059-73.
103. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274(31):21491-4.
104. Devarajan P, Johnston JJ, Ginsberg SS, Van Wart HE, Berliner N. Structure and expression of neutrophil gelatinase cDNA. Identity with type IV collagenase from HT1080 cells. *J Biol Chem* 1992;267(35):25228-32.
105. Schwingshackl A, Duszyk M, Brown N, Moqbel R. Human eosinophils release matrix metalloproteinase-9 on stimulation with TNF-alpha. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104(5):983-9.
106. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491.
107. Huhtala P, Tuuttila A, Chow LT, Lohi J, Keski-Oja J, Tryggvason K. Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells. *J Biol Chem* 1991;266(25):16485-90.
108. Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res* 2005;31(6):599-621.
109. Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 1992;267(6):3581-4.
110. Maeda H, Okamoto T, Akaike T. Human matrix metalloproteinase activation by insults of bacterial infection involving proteases and free radicals. *Biol Chem* 1998;379(2):193-200.
111. Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28(1):12-24.
112. Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, et al. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 2001;69(6):851-9.

113. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33(10):960-70.
114. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;2:737.
115. Delclaux C, Delacourt C, D'Ortho MP, Boyer V, Lafuma C, Harf A. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;14(3):288-95.
116. Legrand C, Gilles C, Zahm JM, Polette M, Buisson AC, Kaplan H, et al. Airway epithelial cell migration dynamics. MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodeling. *J Cell Biol* 1999;146(2):517-29.
117. Vermaelen KY, Cataldo D, Tournoy K, Maes T, Dhulst A, Louis R, et al. Matrix metalloproteinase-9-mediated dendritic cell recruitment into the airways is a critical step in a mouse model of asthma. *J Immunol* 2003;171(2):1016-22.
118. Voelkel NF. Historical overview of emphysema. In: Voelkel NF, Macnee W, editors. *Chronic Obstructive Lung Diseases*: Hamilton: BC Decker; 2002. p. 1-6.
119. Burrows B, Fletcher CM, Heard BE, Jones NL, Woolliff JS. The emphysematous and bronchial types of chronic airways obstruction. A clinicopathological study of patients in London and Chicago. *Lancet* 1966;1(7442):830-5.
120. Izquierdo-Alonso JL, Rodriguez-Gonzalez-moro JM, de Lucas-Ramos P, Unzueta I, Ribera X, Anton E, et al. Prevalence and characteristics of three clinical phenotypes of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Respir Med* 2013.
121. Snider GL, Kleinerman J, Thurlbeck WM, Bangali ZH. The definition of emphysema. Report of a National Heart, Lung, and Blood Institute, Division of Lung Diseases workshop. *Am Rev Respir Dis* 1985;132(1):182-5.
122. Barnes PJ. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Med* 2003;54:113-29.
123. Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V, et al. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with

- airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(6):1945-50.
124. Hogg JC, Senior RM. Chronic obstructive pulmonary disease - part 2: pathology and biochemistry of emphysema. *Thorax* 2002;57(9):830-4.
 125. Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, et al. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26(5):602-9.
 126. Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K, Tanino M, Venge P, Xu S, et al. Neutrophil granule proteins in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(6):1985-91.
 127. Beatty K, Bieth J, Travis J. Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha-1-proteinase inhibitor and alpha-1-antichymotrypsin. *J Biol Chem* 1980;255(9):3931-4.
 128. Ohlsson K. Alpha1-antitrypsin and alpha2-macroglobulin. Interactions with human neutrophil collagenase and elastase. *Ann N Y Acad Sci* 1975;256:409-19.
 129. Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, Satomi S, Kontinen YT. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest* 1998;78(9):1077-87.
 130. Lomas DA, Parfrey H. Alpha1-antitrypsin deficiency. 4: Molecular pathophysiology. *Thorax* 2004;59(6):529-35.
 131. Rahman I, van Schadewijk AA, Crowther AJ, Hiemstra PS, Stolk J, MacNee W, et al. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(4):490-5.
 132. MacNee W, Rahman I. Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Trends Mol Med* 2001;7(2):55-62.
 133. Szilasi M, Dolinay T, Nemes Z, Strausz J. Pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Pathol Oncol Res* 2006;12(1):52-60.

134. Husein AN, Kumar V. The Lung. In: Kumar AV, Abbas AK, Fausto N, editors. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed: Elsevier Saunders; 2005. p. 711-72.
135. Wright JL, Churg A. Advances in the pathology of COPD. *Histopathology* 2006;49(1):1-9.
136. Chung KF. The role of airway smooth muscle in the pathogenesis of airway wall remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2(4):347-54; discussion 371-2.
137. Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004;364(9435):709-21.
138. Siafakas NM, Antoniou KM, Tzortzaki EG. Role of angiogenesis and vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2007;2(4):453-62.
139. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease * 12: New treatments for COPD. *Thorax* 2003;58(9):803-8.
140. Shapiro SD. Proteinases in chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem Soc Trans* 2002;30(2):98-102.
141. MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2(1):50-60.
142. Curtis JL, Freeman CM, Hogg JC. The immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: insights from recent research. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4(7):512-21.
143. Willemsse BW, ten Hacken NH, Rutgers B, Lesman-Leegte IG, Postma DS, Timens W. Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur Respir J* 2005;26(5):835-45.
144. Ito K, Barnes PJ. COPD as a disease of accelerated lung aging. *Chest* 2009;135(1):173-80.
145. Karrasch S, Holz O, Jorres RA. Aging and induced senescence as factors in the pathogenesis of lung emphysema. *Respir Med* 2008;102(9):1215-30.

146. von Zglinicki T, Burkle A, Kirkwood TB. Stress, DNA damage and ageing -- an integrative approach. *Exp Gerontol* 2001;36(7):1049-62.
147. Lou Z, Chen J. Cellular senescence and DNA repair. *Exp Cell Res* 2006;312(14):2641-6.
148. Fraga MF, Agrelo R, Esteller M. Cross-talk between aging and cancer: the epigenetic language. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1100:60-74.
149. Boukamp P. Ageing mechanisms: the role of telomere loss. *Clin Exp Dermatol* 2001;26(7):562-5.
150. Friguet B. Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *FEBS Lett* 2006;580(12):2910-6.
151. Muller KC, Welker L, Paasch K, Feindt B, Erpenbeck VJ, Hohlfield JM, et al. Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro. *Respir Res* 2006;7:32.
152. Tsuji T, Aoshiha K, Nagai A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174(8):886-93.
153. Szulakowski P, Crowther AJ, Jimenez LA, Donaldson K, Mayer R, Leonard TB, et al. The effect of smoking on the transcriptional regulation of lung inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174(1):41-50.
154. Rajendrasozhan S, Yang SR, Kinnula VL, Rahman I. SIRT1, an antiinflammatory and antiaging protein, is decreased in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(8):861-70.
155. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, et al. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2005;352(19):1967-76.
156. Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 2005;366(9486):662-4.
157. Morla M, Busquets X, Pons J, Sauleda J, MacNee W, Agusti AG. Telomere shortening in smokers with and without COPD. *Eur Respir J* 2006;27(3):525-8.

158. Liu X, Engelhardt JF. The glandular stem/progenitor cell niche in airway development and repair. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5(6):682-8.
159. Lajtha LG. Stem cell concepts. *Differentiation* 1979;14(1-2):23-34.
160. Schittny JC, Mund SI, Stampanoni M. Evidence and structural mechanism for late lung alveolarization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294(2):L246-54.
161. Narayanan M, Owers-Bradley J, Beardsmore CS, Mada M, Ball I, Garipov R, et al. Alveolarization continues during childhood and adolescence: new evidence from helium-3 magnetic resonance. *Am J Respir Crit Care Med*;185(2):186-91.
162. Nakajima C, Kijimoto C, Yokoyama Y, Miyakawa T, Tsuchiya Y, Kuroda T, et al. Longitudinal follow-up of pulmonary function after lobectomy in childhood - factors affecting lung growth. *Pediatr Surg Int* 1998;13(5-6):341-5.
163. Hsia CC, Herazo LF, Fryder-Doffey F, Weibel ER. Compensatory lung growth occurs in adult dogs after right pneumonectomy. *J Clin Invest* 1994;94(1):405-12.
164. Takeda S, Hsia CC, Wagner E, Ramanathan M, Estrera AS, Weibel ER. Compensatory alveolar growth normalizes gas-exchange function in immature dogs after pneumonectomy. *J Appl Physiol* 1999;86(4):1301-10.
165. Ding BS, Nolan DJ, Guo P, Babazadeh AO, Cao Z, Rosenwaks Z, et al. Endothelial-derived angiocrine signals induce and sustain regenerative lung alveolarization. *Cell*;147(3):539-53.
166. Massaro GD, Massaro D. Retinoic acid treatment abrogates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Nat Med* 1997;3(6):675-7.
167. Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Numasaki M, Ueda S, et al. Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema. *FEBS Lett* 2004;556(1-3):249-52.
168. Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Suzuki T, Mizuno S, et al. Hepatocyte growth factor induces angiogenesis in injured lungs through mobilizing endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324(1):276-80.
169. Hegab AE, Kubo H, Yamaya M, Asada M, He M, Fujino N, et al. Intranasal HGF administration ameliorates the physiologic and morphologic changes in lung emphysema. *Mol Ther* 2008;16(8):1417-26.

170. Murakami S, Nagaya N, Itoh T, Iwase T, Fujisato T, Nishioka K, et al. Adrenomedullin regenerates alveoli and vasculature in elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172(5):581-9.
171. Takahashi S, Nakamura H, Seki M, Shiraishi Y, Yamamoto M, Furuuchi M, et al. Reversal of elastase-induced pulmonary emphysema and promotion of alveolar epithelial cell proliferation by simvastatin in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294(5):L882-90.
172. Malpel S, Mendelsohn C, Cardoso WV. Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development* 2000;127(14):3057-67.
173. McGowan S, Jackson SK, Jenkins-Moore M, Dai HH, Chambon P, Snyder JM. Mice bearing deletions of retinoic acid receptors demonstrate reduced lung elastin and alveolar numbers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23(2):162-7.
174. Liu B, Harvey CS, McGowan SE. Retinoic acid increases elastin in neonatal rat lung fibroblast cultures. *Am J Physiol* 1993;265(5 Pt 1):L430-7.
175. Kubo H. Lung repair and regeneration: Animal models. In: Polak DJ, editor. *Cell Therapy for Lung Disease*. London: Imperial College Press; 2010. p. 199 -235.
176. Mao JT, Goldin JG, Dermand J, Ibrahim G, Brown MS, Emerick A, et al. A pilot study of all-trans-retinoic acid for the treatment of human emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165(5):718-23.
177. Roth MD, Connett JE, D'Armiento JM, Foronjy RF, Friedman PJ, Goldin JG, et al. Feasibility of retinoids for the treatment of emphysema study. *Chest* 2006;130(5):1334-45.
178. Mao JT, Tashkin DP, Belloni PN, Baileyhealy I, Baratelli F, Roth MD. All-trans retinoic acid modulates the balance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with emphysema. *Chest* 2003;124(5):1724-32.
179. Stolk J, Stockley RA, Stoel BC, Cooper BG, Piitulainen E, Seersholm N, et al. Randomised controlled trial for emphysema with a selective agonist of the gamma-type retinoic acid receptor. *Eur Respir J* 2010;40(2):306-12.

180. Jones PW, Rames D. TESRA (Treatment of Emphysema with a Selective Retinoid Agonist) study results. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:6418.
181. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192(2):553-60.
182. Tokunaga N, Nagaya N, Shirai M, Tanaka E, Ishibashi-Ueda H, Harada-Shiba M, et al. Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic angiogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia: benefits of a novel nonviral vector, gelatin. *Circulation* 2004;109(4):526-31.
183. Martinez A, Miller MJ, Catt KJ, Cuttitta F. Adrenomedullin receptor expression in human lung and in pulmonary tumors. *J Histochem Cytochem* 1997;45(2):159-64.
184. Tokunaga T, Ikegami T, Yoshizumi T, Imura S, Morine Y, Shinohara H, et al. Beneficial effects of fluvastatin on liver microcirculation and regeneration after massive hepatectomy in rats. *Dig Dis Sci* 2008;53(11):2989-94.
185. Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Ohtsu Y, Ishida M, Yutani C, et al. G-CSF promotes bone marrow cells to migrate into infarcted mice heart, and differentiate into cardiomyocytes. *Cell Transplant* 2004;13(7-8):741-8.
186. Takagi Y, Omura T, Yoshiyama M, Matsumoto R, Enomoto S, Kusuyama T, et al. Granulocyte-colony stimulating factor augments neovascularization induced by bone marrow transplantation in rat hindlimb ischemia. *J Pharmacol Sci* 2005;99(1):45-51.
187. Ulich TR, Yi ES, Longmuir K, Yin S, Biltz R, Morris CF, et al. Keratinocyte growth factor is a growth factor for type II pneumocytes in vivo. *J Clin Invest* 1994;93(3):1298-306.
188. Fehrenbach H, Kasper M, Tschernig T, Pan T, Schuh D, Shannon JM, et al. Keratinocyte growth factor-induced hyperplasia of rat alveolar type II cells in vivo is resolved by differentiation into type I cells and by apoptosis. *Eur Respir J* 1999;14(3):534-44.
189. Plantier L, Marchand-Adam S, Antico Arciuch VG, Boyer L, De Coster C, Marchal J, et al. Keratinocyte growth factor protects against elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293(5):L1230-9.

190. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005;121(6):823-35.
191. Chapman HA, Li X, Alexander JP, Brumwell A, Lorizio W, Tan K, et al. Integrin alpha6beta4 identifies an adult distal lung epithelial population with regenerative potential in mice. *J Clin Invest*;121(7):2855-62.
192. Blaisdell CJ, Gail DB, Nabel EG. National Heart, Lung, and Blood Institute perspective: lung progenitor and stem cells--gaps in knowledge and future opportunities. *Stem Cells* 2009;27(9):2263-70.
193. McQualter JL, Bertoncetto I. Concise review: Deconstructing the lung to reveal its regenerative potential. *Stem Cells*;30(5):811-6.
194. Fujino N, Kubo H, Suzuki T, Ota C, Hegab AE, He M, et al. Isolation of alveolar epithelial type II progenitor cells from adult human lungs. *Lab Invest* 2011;91(3):363-78.
195. Kajstura J, Rota M, Hall SR, Hosoda T, D'Amario D, Sanada F, et al. Evidence for human lung stem cells. *N Engl J Med* 2011;364(19):1795-806.
196. Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A. Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 2004;125(2):626-32.
197. Chang KT, Rajadurai VS, Walford NQ, Hwang WS. Alveolar capillary dysplasia: absence of CD117 immunoreactivity of putative hemangioblast precursor cells. *Fetal Pediatr Pathol* 2008;27(3):127-40.
198. Suzuki T, Kubo H, Fujino N. Dynamic and multilineage expression of c-kit in developing human lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:4898.
199. Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D, Shivakrupa R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells* 2005;23(1):16-43.
200. Lindsey JY, Ganguly K, Brass DM, Li Z, Potts EN, Degan S, et al. c-Kit is essential for alveolar maintenance and protection from emphysema-like disease in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183(12):1644-52.
201. GOLD. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD In; 2009.

202. Anversa P, Kajstura J, Leri A, Loscalzo J. Tissue-specific adult stem cells in the human lung. *Nat Med* 2011;17(9):1038-9.
203. Suzuki T, Kondo T, Kubo H. Evidence for human lung stem cells. *N Engl J Med* 2011;365(5):465; author reply 465-6.
204. Osiris. Osiris Therapeutics Reports interim data for COPD stem cell study 2009. In; 2012.
205. Matthay MA, Thompson BT, Read EJ, McKenna DH, Jr., Liu KD, Calfee CS, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for severe acute lung injury. *Chest*;138(4):965-72.
206. Hegab AE, Kubo H, Fujino N, Suzuki T, He M, Kato H, et al. Isolation and characterization of murine multipotent lung stem cells. *Stem Cells Dev* 2010;19(4):523-36.
207. Baber SR, Deng W, Master RG, Bunnell BA, Taylor BK, Murthy SN, et al. Intratracheal mesenchymal stem cell administration attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292(2):H1120-8.
208. Weiss DJ, Kolls JK, Ortiz LA, Panoskaltis-Mortari A, Prockop DJ. Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5(5):637-67.
209. Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33(2):145-52.
210. Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, Ishizawa K, Numasaki M, Ueda S, et al. Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Immunol* 2004;172(2):1266-72.
211. Fadini GP, Avogaro A, Ferraccioli G, Agostini C. Endothelial progenitors in pulmonary hypertension: new pathophysiology and therapeutic implications. *Eur Respir J* 2010;35(2):418-25.
212. Fadini GP, Schiavon M, Cantini M, Baesso I, Facco M, Miorin M, et al. Circulating progenitor cells are reduced in patients with severe lung disease. *Stem Cells* 2006;24(7):1806-13.

213. Takahashi T, Suzuki S, Kubo H, Yamaya M, Kurosawa S, Kato M. Impaired endothelial progenitor cell mobilization and colony-forming capacity in chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology* 2011;16(4):680-7.
214. Kenzaki K, Sakiyama S, Kondo K, Yoshida M, Kawakami Y, Takehisa M, et al. Lung regeneration: implantation of fetal rat lung fragments into adult rat lung parenchyma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;131(5):1148-53.
215. Andrade CF, Wong AP, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. Cell-based tissue engineering for lung regeneration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292(2):L510-8.
216. Naunheim KS, Wood DE, Mohsenifar Z, Sternberg AL, Criner GJ, DeCamp MM, et al. Long-term follow-up of patients receiving lung-volume-reduction surgery versus medical therapy for severe emphysema by the National Emphysema Treatment Trial Research Group. *Ann Thorac Surg* 2006;82(2):431-43.
217. Nijjar MS, Thurlbeck WM. Alterations in enzymes related to adenosine 3',5'-monophosphate during compensatory growth of rat lung. *Eur J Biochem* 1980;105(2):403-7.
218. Cowan MJ, Crystal RG. Lung growth after unilateral pneumonectomy: quantitation of collagen synthesis and content. *Am Rev Respir Dis* 1975;111(3):267-77.
219. Chess PR, Toia L, Finkelstein JN. Mechanical strain-induced proliferation and signaling in pulmonary epithelial H441 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279(1):L43-51.
220. Waters CM, Chang JY, Glucksberg MR, DePaola N, Grotberg JB. Mechanical forces alter growth factor release by pleural mesothelial cells. *Am J Physiol* 1997;272(3 Pt 1):L552-7.
221. Landesberg LJ, Ramalingam R, Lee K, Rosengart TK, Crystal RG. Upregulation of transcription factors in lung in the early phase of postpneumonectomy lung growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281(5):L1138-49.
222. Berg JT, Fu Z, Breen EC, Tran HC, Mathieu-Costello O, West JB. High lung inflation increases mRNA levels of ECM components and growth factors in lung parenchyma. *J Appl Physiol* 1997;83(1):120-8.

223. Haworth SG, McKenzie SA, Fitzpatrick ML. Alveolar development after ligation of left pulmonary artery in newborn pig: clinical relevance to unilateral pulmonary artery. *Thorax* 1981;36(12):938-43.
224. Shigemura N, Sawa Y, Mizuno S, Ono M, Minami M, Okumura M, et al. Induction of compensatory lung growth in pulmonary emphysema improves surgical outcomes in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171(11):1237-45.
225. Price AP, England KA, Matson AM, Blazar BR, Panoskaltsis-Mortari A. Development of a decellularized lung bioreactor system for bioengineering the lung: the matrix reloaded. *Tissue Eng Part A* 2010;16(8):2581-91.
226. Ott HC, Clippinger B, Conrad C, Schuetz C, Pomerantseva I, Ikonomidou L, et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med* 2010;16(8):927-33.
227. Petersen TH, Calle EA, Zhao L, Lee EJ, Gui L, Raredon MB, et al. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science* 2010;329(5991):538-41.
228. Wang YH, Bai CX, Hong QY, Chen J. Anti-inflammatory effect of methoxyphenamine compound in rat model of chronic obstructive pulmonary disease. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24(12):1324-7.
229. Finsnes F, Skjonsberg OH, Tonnessen T, Naess O, Lyberg T, Christensen G. Endothelin production and effects of endothelin antagonism during experimental airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(4):1404-12.
230. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, et al. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet* 2007;370(9589):741-50.
231. Stockley RA, Mannino D, Barnes PJ. Burden and pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6(6):524-6.
232. Yao H, de Boer WI, Rahman I. Targeting lung inflammation: novel therapies for the treatment of COPD. *Curr Respir Med Rev* 2008;4(1):57-68.
233. Tudor RM, Yoshida T, Arap W, Pasqualini R, Petrache I. State of the art. Cellular and molecular mechanisms of alveolar destruction in emphysema: an evolutionary perspective. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3(6):503-10.

234. Tudor RM, Petrache I, Elias JA, Voelkel NF, Henson PM. Apoptosis and emphysema: the missing link. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28(5):551-4.
235. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003;22(4):672-88.
236. Hoffman AM, Shifren A, Mazan MR, Gruntman AM, Lascola KM, Nolen-Walston RD, et al. Matrix modulation of compensatory lung regrowth and progenitor cell proliferation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;298(2):L158-68.
237. Rubio ML, Martin-Mosquero MC, Ortega M, Peces-Barba G, Gonzalez-Mangado N. Oral N-acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Chest* 2004;125(4):1500-6.
238. Ito S, Ingenito EP, Brewer KK, Black LD, Parameswaran H, Lutchen KR, et al. Mechanics, nonlinearity, and failure strength of lung tissue in a mouse model of emphysema: possible role of collagen remodeling. *J Appl Physiol* 2005;98(2):503-11.
239. Luthje L, Raupach T, Michels H, Unsold B, Hasenfuss G, Kogler H, et al. Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model. *Respir Res* 2009;10:7.
240. Snider GL. Emphysema: the first two centuries--and beyond. A historical overview, with suggestions for future research: Part 2. *Am Rev Respir Dis* 1992;146(6):1615-22.
241. Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1986;133(1):149-69.
242. Sawada M, Ohno Y, La BL, Funaguchi N, Asai T, Yuhgetsu H, et al. The Fas/Fas-ligand pathway does not mediate the apoptosis in elastase-induced emphysema in mice. *Exp Lung Res* 2007;33(6):277-88.
243. Rangasamy T, Misra V, Zhen L, Tankersley CG, Tudor RM, Biswal S. Cigarette smoke-induced emphysema in A/J mice is associated with pulmonary oxidative stress, apoptosis of lung cells, and global alterations in gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;296(6):L888-900.
244. Kawakami M, Matsuo Y, Yoshiura K, Nagase T, Yamashita N. Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema. *Biol Pharm Bull* 2008;31(7):1434-8.

245. Janoff A. Elastases and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. *Am Rev Respir Dis* 1985;132(2):417-33.
246. Lieberman J. Elastase, collagenase, emphysema, and alpha1-antitrypsin deficiency. *Chest* 1976;70(1):62-7.
247. Otto-Verberne CJ, Ten Have-Opbroek AA, Franken C, Hermans J, Dijkman JH. Protective effect of pulmonary surfactant on elastase-induced emphysema in mice. *Eur Respir J* 1992;5(10):1223-30.
248. Finlay GA, O'Donnell MD, O'Connor CM, Hayes JP, FitzGerald MX. Elastin and collagen remodeling in emphysema. A scanning electron microscopy study. *Am J Pathol* 1996;149(4):1405-15.
249. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105(3):369-77.
250. Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 2001;128(24):5181-8.
251. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105(4):1815-22.
252. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006;107(1):367-72.
253. Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Opin Pharmacol* 2006;6(4):435-41.
254. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 2006;36(10):2566-73.
255. Huh JW, Kim SY, Lee JH, Lee JS, Van Ta Q, Kim M, et al. Bone marrow cells repair cigarette smoke-induced emphysema in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011;301(3):L255-66.

256. Kim SY, Lee JH, Kim HJ, Park MK, Huh JW, Ro JY, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned media recovers lung fibroblasts from cigarette smoke-induced damage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;302(9):L891-908.
257. Kermani AJ, Fathi F, Mowla SJ. Characterization and genetic manipulation of human umbilical cord vein mesenchymal stem cells: potential application in cell-based gene therapy. *Rejuvenation Res* 2008;11(2):379-86.
258. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;371(9624):1579-86.
259. Sueblinvong V, Weiss DJ. Cell therapy approaches for lung diseases: current status. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9(3):268-73.
260. Iyer SS, Co C, Rojas M. Mesenchymal stem cells and inflammatory lung diseases. *Panminerva Med* 2009;51(1):5-16.
261. Weiss DJ, Casaburi R, Flannery R, Leroux-Williams M, Tashkin DP. A Placebo-Controlled Randomized Trial of Mesenchymal Stem Cells in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chest* 2012.
262. Ribeiro-Paes JT, Bilaqui A, Greco OT, Ruiz MA, Marcelino MY, Stessuk T, et al. Unicentric study of cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease/pulmonary emphysema. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2011;6:63-71.
263. Ingenito EP, Tsai L, Murthy S, Tyagi S, Mazan M, Hoffman A. Autologous lung-derived mesenchymal stem cell transplantation in experimental emphysema. *Cell Transplant* 2012;21(1):175-89.
264. Sethi JM, Rochester CL. Smoking and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med* 2000;21(1):67-86, viii.
265. Yoshida T, Tuder RM. Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Physiol Rev* 2007;87(3):1047-82.
266. Ishikawa T, Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Macrophage colony-stimulating factor aggravates rather than regenerates emphysematous lungs in mice. *Respiration* 2006;73(4):538-45.

267. Shiomi T, Okada Y, Foronjy R, Schiltz J, Jaenish R, Krane S, et al. Emphysematous changes are caused by degradation of type III collagen in transgenic mice expressing MMP-1. *Exp Lung Res* 2003;29(1):1-15.
268. Hu J, Van den Steen PE, Sang QX, Opdenakker G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6(6):480-98.
269. Imai K, Dalal SS, Chen ES, Downey R, Schulman LL, Ginsburg M, et al. Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(3 Pt 1):786-91.
270. Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 2000;117(3):684-94.
271. Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, et al. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(1):240-7.
272. Atkinson JJ, Lutey BA, Suzuki Y, Toennies HM, Kelley DG, Kobayashi DK, et al. The role of matrix metalloproteinase-9 in cigarette smoke-induced emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183(7):876-84.
273. Foronjy R, Nkyimbeng T, Wallace A, Thankachen J, Okada Y, Lemaitre V, et al. Transgenic expression of matrix metalloproteinase-9 causes adult-onset emphysema in mice associated with the loss of alveolar elastin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294(6):L1149-57.
274. D'Armiento JM, Goldklang MP, Hardigan AA, Geraghty P, Roth MD, Connett JE, et al. Increased Matrix Metalloproteinase (MMPs) Levels Do Not Predict Disease Severity or Progression in Emphysema. *PLoS One* 2013;8(2):e56352.
275. Wallace AM, Sandford AJ, English JC, Burkett KM, Li H, Finley RJ, et al. Matrix metalloproteinase expression by human alveolar macrophages in relation to emphysema. *COPD* 2008;5(1):13-23.
276. Navratilova Z, Zatloukal J, Kriegova E, Kolek V, Petrek M. Simultaneous up-regulation of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, 7, 8, 9 and tissue inhibitors of

- metalloproteinases 1, 4 in serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology* 2012;17(6):1006-12.
277. Jung K, Lein M, Laube C, Lichtinghagen R. Blood specimen collection methods influence the concentration and the diagnostic validity of matrix metalloproteinase 9 in blood. *Clin Chim Acta* 2001;314(1-2):241-4.
278. Jung K, Lein M, Roemer A, Lichtinghagen R. Circulating gelatinase B (MMP-9)--the impact of the preanalytical step of blood collection. *Matrix Biol* 2002;21(5):381-2.
279. Gerlach RF, Demacq C, Jung K, Tanus-Santos JE. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clin Biochem* 2007;40(1-2):119-23.
280. Churg A, Wang R, Wang X, Onnervik PO, Thim K, Wright JL. Effect of an MMP-9/MMP-12 inhibitor on smoke-induced emphysema and airway remodelling in guinea pigs. *Thorax* 2007;62(8):706-13.
281. Kirschvink N, Vincke G, Fievez L, Onclinx C, Wirth D, Belleflamme M, et al. Repeated cadmium nebulizations induce pulmonary MMP-2 and MMP-9 production and emphysema in rats. *Toxicology* 2005;211(1-2):36-48.
282. Korytina GF, Tselousova OS, Akhmadishina LZ, Victorova EV, Zagidullin Sh Z, Victorova TV. [Association of the MMP3, MMP9, ADAM33 and TIMP3 genes polymorphic markers with development and progression of chronic obstructive pulmonary disease]. *Mol Biol (Mosk)* 2012;46(3):487-99.
283. Li H, Cui D, Tong X, Ma N, Gao Y, Cui X, et al. [The role of matrix metalloproteinases in extracellular matrix remodelling in chronic obstructive pulmonary disease rat models]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2002;41(6):393-8.
284. Ramos C, Cisneros J, Gonzalez-Avila G, Becerril C, Ruiz V, Montano M. Increase of matrix metalloproteinases in woodsmoke-induced lung emphysema in guinea pigs. *Inhal Toxicol* 2009;21(2):119-32.
285. Liu J, Wang Y, Tang F, Yu C, Huang M, Zhao X, et al. [Effect of spearmint oil on lipopolysaccharide induced emphysema-like changes and expression of matrix metalloproteinase-9]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2011;36(8):1054-9.

286. Cheng SL, Wang HC, Yu CJ, Tsao PN, Carmeliet P, Cheng SJ, et al. Prevention of elastase-induced emphysema in placenta growth factor knock-out mice. *Respir Res* 2009;10:115.
287. Schols AM, Slangen J, Volovics L, Wouters EF. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(6 Pt 1):1791-7.
288. Bolton CE, Ionescu AA, Shiels KM, Pettit RJ, Edwards PH, Stone MD, et al. Associated loss of fat-free mass and bone mineral density in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(12):1286-93.
289. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(2):530-4.
290. Eid AA, Ionescu AA, Nixon LS, Lewis-Jenkins V, Matthews SB, Griffiths TL, et al. Inflammatory response and body composition in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(8 Pt 1):1414-8.
291. Di Francia M, Barbier D, Mege JL, Orehek J. Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150(5 Pt 1):1453-5.
292. Takabatake N, Nakamura H, Abe S, Inoue S, Hino T, Saito H, et al. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(4 Pt 1):1179-84.
293. Langen RC, Schols AM, Kelders MC, van der Velden JL, Wouters EF, Janssen-Heininger YM. Muscle wasting and impaired muscle regeneration in a murine model of chronic pulmonary inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35(6):689-96.
294. Lewis MI, Zhan WZ, Sieck GC. Adaptations of the diaphragm in emphysema. *J Appl Physiol* 1992;72(3):934-43.
295. Marchand E, De Leyn P, Gayan-Ramirez G, Palecek F, de Bock V, Dom R, et al. Lung volume reduction surgery does not improve diaphragmatic contractile properties

or atrophy in hamsters with elastase-induced emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(3 Pt 1):1052-7.

296. Degens H, Swisher AK, Heijdra YF, Siu PM, Dekhuijzen PN, Alway SE. Apoptosis and Id2 expression in diaphragm and soleus muscle from the emphysematous hamster. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293(1):R135-44.