



T. C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GÖZ YAŞARTICI GAZLARIN KOAH'DA PRİMER BRONŞ  
EPİTEL HÜCRE FONKSİYONLARI, TOKSİSİTESİ VE  
İNFLAMATUAR PARAMETRELERE ETKİSİ**

Halil İbrahim TOY  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMEL SOLUNUM BİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Hasan BAYRAM

GAZİANTEP

2016

T. C.  
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TEMEL SOLUNUM BİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**GÖZ YAŞARTICI GAZLARIN KOAH'DA PRİMER BRONŞ EPİTEL HÜCRE  
FONKSİYONLARI, TOKSİSİTESİ VE İNFLAMATUAR PARAMETRELERE  
ETKİSİ**

Halil İbrahim TOY  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Savunma Tarihi:

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

**Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU**  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir "Yüksek Lisans" derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum

**Prof. Dr. Hasan BAYRAM**

**Temel Solunum Biyolojisi Anabilim Dalı Başkanı**

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir "Yüksek Lisans" tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

**Prof.Dr. Hasan BAYRAM**

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir "Yüksek Lisans" tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi İmzası

**Prof. Dr. Hasan BAYRAM**

.....

**Prof. Dr. Piraye KERVANCIOĞLU**

.....

**Yrd. Doç. Dr. Ayşegül ÇÖRT**

.....

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

26.10.2016

Halil İbrahim TOY

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca akademik bilgi, beceri ve deneyimlerini benden esirgemeyen, aynı zamanda kişisel tecrübeleri sayesinde hayatıma yön veren sayın hocam Prof. Dr. Hasan BAYRAM' a,

Tezimin projesinde, bilgi ve tecrübesiyle bana destek olan sayın hocam Prof. Dr. Öner DİKENSÖY' a,

Tezime konu olan çalışmaların yürütülmesi için gerekli hasta ve akciğer dokularının sağlanmasında gösterdikleri iş birliği ve yardımlarından dolayı Göğüs Cerrahisi ve Patoloji Anabilim Dallarına,

Tezime konu çalışmaların yürütülmesinde bana her basamakta titizlikle hem yardımcı olan hem de yol gösteren ve her zaman manevi desteğini esirgemeyen değerli Uzman Dr. Demet TAŐDEMİR'e,

Birlikte çalışmaktan ve zaman geçirmekten büyük tat aldığım çalışma arkadaşlarım Sedat İLHAN, Ufkun ÖZDEMİR ve Pınar YUMRUTAŐ' a,

Tezi bilimsel olarak desteğe değer bularak sağladığı fon ile destekleyen Türk Toraks Derneğine,

Bana bu süreçte uzaktan da olsalar sonsuz desteklerini sunan sevgili AİLEM'e,

Ayrıca, her daim sevgisine ihtiyaç duyduğum SEVGİLİM'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

KAPAK.....	i
TEZ ONAYI SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
RESİMLER LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2 GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 İsyan Kontrol Ajanları (Göz Yaşartıcı Gazlar).....	4
2.1.1 Biber Gazı.....	7
2.1.1.1 Kapsaisin.....	8
2.1.1.2 Kapsaisinin Etki Mekanizması.....	9
2.1.2 Biber Gazının Solunum Sistemi Üzerinde Etkileri.....	10
2.1.2.1 Kapsaisinin Solunum Sistemi Üzerine Etkileri.....	12
2.2 Solunum Yolu Epitel Hücreleri ve Görevleri.....	13
2.2.1 Silyalı Hücreler.....	15
2.2.1.1 Mukosiliyer Taşınım.....	15
2.2.2 Silya titreşimi.....	16
2.2.3 Sekretuar hücreler.....	18
2.2.3.1 Goblet Hücreler.....	18
2.2.3.2 Klara Hücreleri.....	18
2.2.4 Bazal Hücreler.....	19

2.3	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH).....	19
2.3.1	KOAH'ın Epidemiyolojisi.....	20
2.3.1.1	Mortalitesi.....	20
2.3.1.2	Morbidite-Prevalans.....	20
2.3.2	KOAH'ın Hüresel ve Moleküler Mekanizmaları.....	21
2.3.2.1	Patoloji.....	21
2.3.2.2	İnflamasyon Hücreleri.....	22
2.3.2.2.1	Epitel Hücreler.....	23
2.3.2.2.2	Makrofajlar.....	24
2.3.2.2.3	Nötrofiller.....	24
2.3.2.2.4	Dendritik Hücreler.....	25
2.3.2.2.5	T Lenfositler.....	25
2.3.2.3	Proteaz.....	26
2.3.2.4	Oksidatif Stres.....	26
2.3.3	KOAH Tedavisinde Kullanılan İlaçlar.....	27
2.3.3.1	Formoterol.....	27
2.3.3.2	Roflumilast.....	28
3	GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1	Çalışma Hastaları.....	29
3.2	Primer Bronş Epitel Hücre Kültüründe Kullanılan Besi yerleri ve Kültür Malzemesi.....	30
3.2.1	Taşıma Vasatı.....	30
3.2.2	Fotal Buzağı Serum Vasatı ('fetal calf serum', FCS).....	30
3.2.3	Nu Serum IV Vasatı.....	31
3.2.4	Serumsuz ('serum free', SF) Vasat.....	31
3.3	Bronş Dokusunun Diseksiyonu.....	31
3.3.1	Primer Bronş Epitel Hücre Kültürü ve Yürütülen Deneyler.....	32
3.3.1.1	Silya Titreşim Frekans Ölçümü.....	32
3.3.1.2	Trans Epitelyal Elektriksel Direnç Ölçümü.....	34
3.4	Kapsaisin Süspansiyonunun Hazırlanması.....	36
3.5	Formoterol ve Roflumilast Süspansiyonunun Hazırlanması.....	36
3.6	Total Protein Analizi.....	37
3.7	Laktat Dehidrogenaz (LDH).....	37

3.8	ELISA (Enzime Bağlı Immuno Sorbent Deneyi).....	37
3.9	İstatiksel Analiz .....	38
4	BULGULAR.....	39
4.1	İnsan Akciğer Bronş Epitel Hücre Kültürü .....	39
4.2	Kapsaisin'in Sigara İçmeyen, Sigara İçicisi ve KOAH'lı Hastaların Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi. .	39
4.3	Formoterol ve Roflumilast'ın Kapsaisinle İnkübe Edilen Sigara İçicisi Bireylerin Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektrik Direncine Etkisi.....	42
4.4	Kapsaisin'in Sigara İçmeyen, Sigara İçicisi ve KOAH Gelişen Hasta Gruplarının Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Silya Titreşim Frekansına Etkisi .....	44
4.5	Formoterol ve Roflumilast'ın Kapsaisinle İnkübe Edilen Sigara İçicisi Bireylerin Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Silya Titreşim Frekansına Etkisi .....	50
4.6	Kapsaisinin Sigara İçmeyen, Sigara İçicisi ve KOAH Gelişen Hasta Gruplarının Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi .....	52
4.7	Kapsaisinin Sigara İçmeyen, Sigara İçicisi ve KOAH Gelişen Hasta Gruplarının Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin GM-CSF Salınımına Etkisi .....	56
4.8	Kapsaisinin Sigara İçmeyen, Sigara İçicisi ve KOAH Gelişen Hasta Gruplarının Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin IL-8 Salınımına Etkisi.....	60
5	TARTIŞMA .....	64
6	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	68
7	KAYNAKLAR .....	70
	ÖZGEÇMİŞ.....	83

## SİMGE ve KISALTMALAR

BEH	Bronş Epitel Hücresi
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat (Cyclic Adenosine Monophosphate)
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat (Cyclic Guanosine Monophosphate)
CaM	Kalmodulin (Calmodulin)
CN	Klorasetofenon (Chloroacetophenone)
CS	Orto-klorobenziliden-malononitril (Chlorobenzylidenemalononitrile)
CD8 <sup>+</sup>	Küme Farklılaşması 8 Pozitif (Cluster of Differentiation 8 +)
CD4 <sup>+</sup>	Küme Farklılaşması 4 Pozitif (Cluster of Differentiation 4 +)
Ca <sup>2+</sup>	Kalsiyum
C	Kapsikum (Capsicum)
GOLD	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı için Küresel Girişim (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease)
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü yok
DALY	Sakatlığa Göre Düzeltmiş Yaşam Yılı (Disability Adjusted Life Years)
DM	Klorodihydrofenarsazin (Chlorodihydrophenarsazine)
ELISA	Enzime Bağlı Immuno Sorbent Testi ('Enzyme Linked Immunosorbent Assay')
FCS	Dana buzağı serumu (Fetal Calf Serum)



GM-CSF	Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor)
G-CSF	Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör (Granulocyte Colony Stimulating Factor)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
IL-8	İnterlökin-8
IL-6	İnterlökin-6
IL-1 $\beta$	İnterlökin-1beta
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LDH	Laktat Dehidrogenaz
Mg <sup>2+</sup>	Magnezyum
MUC	Müsin
MMP9	Matriks Metaloproteinaz
M199	Medium 199
NO	Nitrik Oksit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NGF	Sinir Büyüme Faktörü (Nerve growth factor)
NF-kB	Nükler Faktör Kappa B
Nu-SerIV	Nu serum IV
Na <sup>+</sup>	Sodyum
OC	Oleorecin Capsicum
ONOO <sup>-</sup>	Peroksitnitrit
PKA	Protein Kinaz A
PKG	Protein Kinaz G

PS	Kloropikrin
ROS	Reaktif Oksijen Ürünleri
SHR	Duyusal Hiperaktivite
STF	Silya Titreşim Frekansı
SOD	Süperoksit Dismutaz
SF	Serumsuz Vasat ('Serum Free Medium')
TRP	Geçici Reseptör Potansiyeli (Transient Receptor Potential)
TED	Transepitelyal Elektrik Direnci
TNF $\alpha$	Tümör Nekrozis Faktör alfa
TM	Taşıma Vasatı

## TABLULAR LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Yaygın isyan kontrol ajanlarının fiziko-kimyasal ve biyolojik özellikleri. ....	6
<b>Tablo 2.</b> Kapsaisinoidlerin bağıl oranları, keskinlik değerleri ve kimyasal yapıları. ....	8
<b>Tablo 3.</b> Hastaların demografik özellikleri .....	30
<b>Tablo 4.</b> Kapsaisinin sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH Kültürlerinde TED'e etkisi (Ortanca değerler). ....	40
<b>Tablo 5.</b> Formoterol ve roflumilastın kapsaisin ile inkübe edilen sigara içicisi bireylerin BEH Kültürlerinin TED'ine etkisi (ortanca değerler). ....	42
<b>Tablo 6.</b> Kapsaisinin sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH Kültürlerinde STF'ine etkisi (Ortanca değerler). ....	45
<b>Tablo 7.</b> Sigara İçmeyen, Sigara İçicisi ve KOAH Gelişen Hasta Gruplarının BEH Kültürlerinin STF'nin Bazal Düzeylerinin Karşılaştırılması (ortanca değerler). ....	48
<b>Tablo 8.</b> Formoterol ve roflumilastın kapsaisin ile inkübe edilen sigara içicisi bireylerin BEH Kültürlerinin STF'ine etkisi (ortanca değerler). ....	50
<b>Tablo 9.</b> Kapsaisinin sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH kültürlerinde LDH salınımına etkisi (Ortanca değerler). ....	52
<b>Tablo 10.</b> Sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH kültürlerinden LDH salınımının karşılaştırılması (ortanca değerleri). ....	54
<b>Tablo 11.</b> Kapsaisinin sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH'lı bronş epitel hücre kültürlerinden GM-CSF salınımına etkisi (ortanca değerler). ....	56
<b>Tablo 12.</b> Sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH kültürlerinden GM-CSF salınımının karşılaştırılması (ortanca değerleri). ....	58
<b>Tablo 13.</b> Kapsaisinin sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH'lı bronş epitel hücre kültürlerinden IL-8 salınımına etkisi (ortanca değerler). ....	60
<b>Tablo 14.</b> Sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH kültürlerinden IL-8 salınımının karşılaştırılması (ortanca değerleri). ....	62

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b> Kapsaisin'in sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH kültürlerinin transeptilyal elektrik direncine etkisi. ....	41
<b>Şekil 2.</b> Formoterol ve Roflumilastın Kapsaisinle İnkübe Edilen Sigara İçicisi Bireylerin Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transeptilyal Elektrik Direncine Etkisi. ....	43
<b>Şekil 3.</b> Kapsaisinin sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH kültürlerinin silya titreşim frekansına etkisi. ....	46
<b>Şekil 4.</b> Kapsaisinin sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH kültürlerinin 15.dk, 30.dk ve 1-24.saatlerde silya titreşim frekansına etkisi. ....	47
<b>Şekil 5.</b> Sigara İçmeyen, Sigara İçicisi ve KOAH Gelişen Hasta Gruplarının Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Silya Titreşim Frekansının Karşılaştırılması ....	49
<b>Şekil 6.</b> Formoterol ve Roflumilast'ın Kapsaisinle İnkübe Edilen Sigara İçicisi Bireylerin Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Silya Titreşim Frekansına Etkisi.....	51
<b>Şekil 7.</b> Kapsaisinin sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH kültürlerinin LDH salınımına etkisi. ....	53
<b>Şekil 8.</b> Sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının bronş epitel hücre kültürlerinin LDH salınımının karşılaştırılması.....	55
<b>Şekil 9.</b> Kapsaisinin sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH kültürlerinin GM-CSF salınımına etkisi. ....	57
<b>Şekil 10.</b> Sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH kültürlerinden GM-CSF salınımının karşılaştırılması. ....	59
<b>Şekil 11.</b> Kapsaisinin sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının bronş epitel hücre kültürlerinin IL-8 salınımına etkisi. ....	61
<b>Şekil 12.</b> Sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH kültürlerinden IL-8 salınımının karşılaştırılması. ....	63

## RESİMLER LİSTESİ

<b>Resim 1.</b> İsyen kontrol ajanlarının bölge fazla akut toksisitesi.....	5
<b>Resim 2.</b> Akciğer epitelinin önemli hücre tipleri .....	13
<b>Resim 3.</b> Solunum epitelindeki doğal bağışıklık.....	14
<b>Resim 4.</b> Havayolu mukusunun yapısı .....	16
<b>Resim 5.</b> Silya titreşim frekans (STF) düzenlenmesinde kalsiyumun değişik etkileri...	17
<b>Resim 6.</b> KOAH ile ilişkili inflamatuvar ve immün hücreler .....	23
<b>Resim 7.</b> KOAH'da oksidatif stres.....	27
<b>Resim 8.</b> Bronş epitel dokusunun elde edilmesi.....	32
<b>Resim 9.</b> Bronş epitelyumu hücre kültürünün aşamaları .....	34
<b>Resim 10.</b> 0,8 mm çaplı 24 gözlü, 0,4 µm por çaplı hücre kültür 'insert' diyagramı ...	36

## ÖZET

# GÖZ YAŞARTICI GAZLARIN KOAH'DA PRİMER BRONŞ EPİTEL HÜCRE FONKSİYONLARI, TOKSİSİTESİ VE İNFLAMATUAR PARAMETRELERE ETKİSİ

Halil İbrahim TOY

Yüksek Lisans Tezi, Temel Solunum Biyolojisi Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Hasan BAYRAM

Ekim-2016, 83 sayfa

Kitlesel gösterileri kontrol altına almak amacıyla yaygın olarak kullanılan biber gazı ile son yıllarda yapılan sınırlı sayıdaki çalışma, bu gazın solunum sistemi üzerine olan olumsuz etkilerini ortaya koymuşsa da altta yatan mekanizmalar ve bronş epitel hücrelerinin (BEH) rolü yeterince bilinmemektedir. Çalışmamızda kapsaisinın sigara içmeyen (Sigarasız), sigara içen KOAH'sız (Sigaralı) ve sigara içicisi KOAH'lı hastaların bronş eksplantlarından elde edilen BEH kültürleri üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık. BEH kültürleri formoterol (1 $\mu$ M) ve roflumilast (0,1 $\mu$ M) yokluğunda ve varlığında kapsaisinın 0, 50, 125, 250 ve 500  $\mu$ M konsantrasyonlarına 24 saat maruz bırakıldılar. Kültürlerin trans epitelyal elektriksel direnci (TED) ve silya titreşim frekansını (STF) 15. ve 30. dak., 1., 2., 4., 6., ve 24. saatlerde değerlendirilirken, laktat dehidrogenaz (LDH), interlökin (IL)-8 ve granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) düzeyleri 24. saatte ölçüldü. Kapsaisinın yüksek dozları (250-500 $\mu$ M) sigarasız (t2, t6, t24. saat), sigaralı (t24. saat) ve KOAH'lı (t2, t24. saat) BEH kültürlerinin TED'ni anlamlı olarak azalttı ( $p<0,05$ ).

Bu etki kısmen roflumilast tarafından önlendi. Kapsaisin (250 $\mu$ M) bütün gruplarda BEH kültürlerinin STF'nı 15. dak'dan itibaren anlamlı olarak azalttı ( $p<0,01$ ). Formoterol sigaralı gruptaki BEH kültürlerinin STF'da kapsaisine bağlı düşmeyi anlamlı olarak önledi, ancak roflumilast herhangi bir etki göstermedi. Kapsaisin (500 $\mu$ M) bütün kültürlerde LDH salınımını ( $p<0,05$ ) artırırken, genel olarak IL-8 ( $p<0,0001$ ) ve GM-CSF ( $p<0,05$ ) düzeylerini baskıladı. Sonuç olarak, bulgularımız biber gazının aktif bileşeni olan kapsaisinın primer insan BEH kültür permabilitesini ve LDH salınımını artırırken, silyer fonksiyonunu ve sitokin salınımını baskıladığı, bu etkilerin formoterol ve roflumilast tarafından kısmen önlenebildiğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** biber gazı, kapsaisin, bronş epitel hücreleri, KOAH, silya titreşim frekansı, trans-epitelyal elektriksel direnç, IL-8, GM-CSF, formoterol, roflumilast.

## ABSTRACT

### EFFECTS OF TEAR GASES ON TOXICITY, INFLAMMATORY PARAMETERS AND FUNCTIONS OF BRONCHIAL EPITHELIAL CELL CULTURES IN COPD

Halil İbrahim TOY

Master Thesis, Department of Basic Respiratory Biology

**Supervisor:** Prof. Dr. Hasan BAYRAM

October-2016, 83 pages

Although limited recent studies suggest that capsaicin, which is widely used in putting mass demonstrations under control, has negative effects on the respiratory system, the underlying mechanisms and role of bronchial epithelial cells (BEC) are not adequately known. We aimed to investigate effects of capsaicin on BEC cultures obtained from non-smokers, smokers and COPD patients. BEC cultures were incubated with 0, 50, 125, 250 ve 500 $\mu$ M capsaicin in the absence and presence of formoterol (1 $\mu$ M) and roflumilast (0.1 $\mu$ M) for 24 hours. Trans-epithelial electrical resistance (TEER) and ciliary beat frequency (CBF) were assessed at  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1, 2, 4, 6, and 24 hours, whereas release of lactate dehydrogenase (LDH), granulocyte macrophage - colony stimulating factor (GM-CSF) and interleukin (IL)-8 levels were measured at t24hrs. The highest concentrations of capsaicin (250-500 $\mu$ M) significantly decreased ( $p<0.05$ ) TEER of BEC cultures of non-smokers (t2, t6, t24hrs), smokers (t24hrs) and COPDs (t2 and t24hrs). This effect was partially prevented by roflumilast. Capsaicin significantly reduced CBF of BEC cultures of all study groups from 15 minutes onwards ( $p<0.05$ ). Formoterol significantly prevented the decrease in CBF, whereas roflumilast did not show any effect. Capsaicin (500 $\mu$ M) decreased release of IL-8 ( $p<0.0001$ ) and GM-CSF ( $p<0.05$ ), while inducing release of LDH in all culture groups ( $p<0.05$ ). In conclusion, our findings have demonstrated that capsaicin, the active component of tear gas, induces BEC culture permeability and LDH release, while inhibiting ciliary activity and cytokine release, and that these effects can be partially prevented by formoterol and roflumilast.

**Keywords:** Tear gas, capsaicin, bronchial epithelial cells, COPD, ciliary beat frequency, trans-epithelial electrical resistance, IL-8, GM-CSF, formoterol, roflumilast.

# 1 GİRİŞ ve AMAÇ

Toplumsal olaylara müdahale ajanı olarak bilinen biber gazı, kitlesel gösteri yapan grupları caydırmak, dağıtmak veya yüz yüze çatışmaları engellemek amacıyla sivil otoriteler, devlet kurumları ve askeri kuvvetler tarafından son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (1). Biber gazı maruziyetinin sonrası akciğer, deri, göz, burun ve diğer doku ve organlarda ciddi bir toksik etki ve inflamasyona neden olduğu bilinmektedir (2). Özellikle havayollarında yanma hissi, öksürük, konuşmada zorlanma, boğulma, göğüs sıkışması, mukus sekresyonu gibi klinik bulgular gözlenmesine rağmen havayollarındaki sistemik etkisi yeterince bilinmemektedir (3). Ayrıca kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) olan bireylerde biber gazının solunum yollarında nasıl bir etki gösterdiği yeterince bilinmemektedir (4).

Çalışmamızda sigara içicisi olmayan, sigara içicisi ancak KOAH gelişmeyen ve KOAH'lı hastaların primer bronş epitel hücre (BEH) kültürlerini kullanarak biber gazının etken maddesi kapsaisin bu hücrelerin permabiliteleri, silya titreşim frekansı (STF), inflamasyon parametreleri ve hücre hasarı üzerine etkilerini araştırmayı, formoterol ve roflumilastın bu etkileri önlemede etkili olup olmayacağını araştırmayı amaçladık.



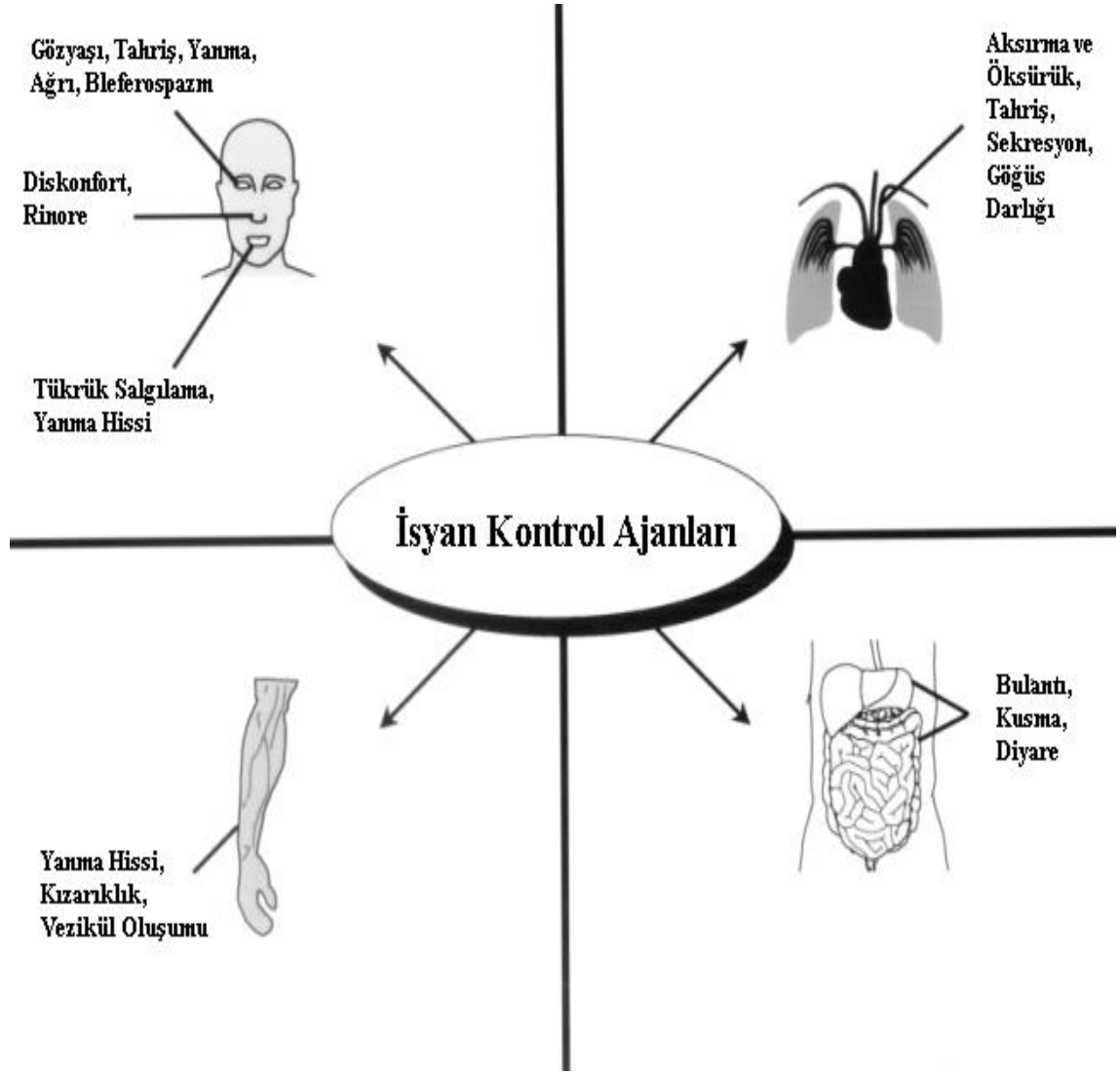
## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 İsyen Kontrol Ajanları (Göz Yaşartıcı Gazlar)

Toplumsal olaylara müdahale ajanları (taciz edici ajanlar, göz yaşartıcı ajanlar veya göz yaşartıcı gazlar) olarak bilinen kimyasallar sivil otoriteler, devlet kurumları ve askeri kuvvetler tarafından birçok nedenlerden dolayı toplanmış bireysel veya kitlesel gösteri yapan grupları caydırmak, dağıtmak veya yüz yüze çatışmaları engellemek amacıyla yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır (1).

Chloroacetophenone (CN), chlorobenzylidenemalonitrile (CS), chloropicrin (PS), bromobenzylcyanide, diphenylaminearsine (DM), dibenzoxazepine ve oleoresin capsicum (OC, “pepper spray”) ile kombinasyonları çeşitli zamanlarda isyan kontrol, taciz edici ya da göz yaşartıcı gazlar olarak kullanılmıştır. Etil bromoasetat, 1. Dünya Savaşı sırasında Fransız polisi tarafından kullanılan ilk savaş gazı oldu. Vietnam savaşında Amerika Birleşik Devletleri (ABD) CS gazını yoğun olarak kullandı ve daha sonra yürütme kararıyla kullanımını durdurdu. İsyen kontrol ajanları 1968’da Paris (Fransa), 1969’da Londonderry (Kuzey İrlanda) ve birçok kez Amerika’da iç karışıklıkları yönetmek için kullanılan araçlardı. Ayrıca Teksas Waco’da cezaevi ayaklanmalarında mahkûmları etkisiz hale getirmek için kullanıldı. CS gazı 1950 lerde yaygın olarak dağıtılana kadar, CN gazı askeri ve polis güçleri tarafından standart göz yaşartıcı gaz bombası olarak kullanıldı (5).

İsyen kontrol ajanları genellikle düşük toksisite gösteren, son derece güçlü duyuşal tahriş edici bileşiklerdir. Bu bileşiklerin öldürücü etkisinin olmadığı tarif edilmiştir. İsyen kontrol ajanlarının öncelikli hareketi hedef organ olan gözlerdir. Bu bileşikler lokalize rahatsızlık veya ağrıya birleşmiş refleksle sonuçlanan mukoza yüzeyleri ve derideki temas yerlerinde duyu sinir reseptörleri ile farmakolojik etkileşime girerler. Bu biyolojik tepki gözde aşırı derecede sulanma, ağrı, göz seğirmesi ve tahriş gibi sonuçlar ortaya çıkarır. Bu yanıtlar kimyasalların konsantrasyonuna ve ortamdan uzaklaştırılmasına bağlıdır. Bununla birlikte bu bileşiklerin büyük çoğunluğu deri, sindirim ve solunum sistemi tahrişini etkileyecektir (Resim 1) (6).



**Resim 1.** İsyan kontrol ajanlarının bölge fazlı akut toksisitesi (6).

İsyan kontrol ajanlarının ortak özellikleri hızlı başlangıç etkisi, maruziyet sonrası kısa süreli etki ve nispeten yüksek güvenlik marjlarıdır. İdeali, bu bileşiklerin nispeten iyi huylu ve düşük zayıat oranları sunmalarıdır. Toksikolojik ve kimyasal özellikleri asgari risk içermelidir. Bu ajanlar düşük akut toksisiteye sahip olmalıdır. Yaygın kullanılan isyan kontrol ajanlarının fiziko-kimyasal ve biyolojik özellikleri Tablo 1’de vurgulanmıştır (6).

**Tablo 1.** Yaygın isyan kontrol ajanlarının fiziko-kimyasal ve biyolojik özellikleri.

Bileşik	Kimyasal İsim	Çözünürlük	Eylem Hızı	Başlangıç Konst. (mg/m <sup>-3</sup> )	Kabul Edilemez Konst. (mg/m <sup>-3</sup> )	Letal Konst. (mg/m <sup>-3</sup> )
CN	2-Chloroacetophenone	Suda çözünmez	Anlık	1	5	850
CR	dibenz[b, f ]1: 4-oxazepine	Suda çözünürlükleri sınırlı; Organik çözücüde çözünür	Anlık	0.002	1	10,000
CS	o-chlorobenzylidene malononitrile	Suda biraz çözünür; Organik çözücüde çözünür	Anlık	0.004	3	2,500
DM	10-Chloro-5,10-dihydro-phenarsazine	Suda çözünmez; Organik çözücüde çözünür	Hızlı	1	5	650
Kapsaisin, (OC)	8-methyl-6-trans-nonenoil-vanillylamide	Suda biraz çözünür; Organik çözücüde çözünür	Hızlı	-	-	-

### 2.1.1 Biber Gazı

Biber gazının aktif bileşeni olan Oleoresin Capsicum (OC), Solanaceae ailesine ait olup Capsicum annum, C. Frutescens ve C. Chinense türlerine ait acı biber bitkilerinin tohumlarından elde edilen yoğunlaştırılmış yağlı bir özüttür (7, 8). Doğal olarak oluşan beş değişik kapsaisinoid vardır: Kapsaisin, Dihidroksapsaisin, Nordihidroksapsaisin, Homodihidroksapsaisin ve Homokapsaisin. OC içerisinde en keskin kapsaisinoid analogları kapsaisin ile dihidroksapsaisini bulundurur. Bu iki analog biber gazı ürünlerinin total konsantrasyonunun %80-90'ını oluşturmaktadır. Sadece kapsaisin yaklaşık %70 oranını oluşturmaktadır (9, 10). Amerika'daki biber gazı imalatçıları biber gazı içerisindeki OC konsantrasyonunun %1-10 oranında üretildiğini rapor etmişlerdir (11).

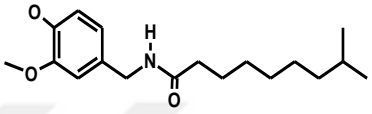
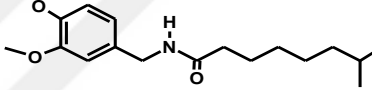
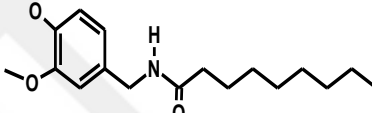
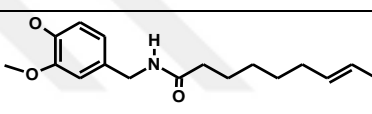
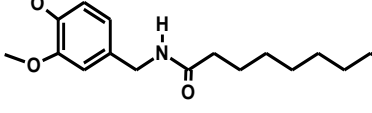
Bu bitkilerin anavatanı Latin Amerika'dır. Acı biberin tarihsel süreci Azteklere kadar uzanmaktadır. Aztek yazıtlarında acı biberlerin antimikrobiyal ve antihemolitik amaçlarla yemeklerde kullanıldıklarına arşivlerde rastlanmaktadır. Ayrıca İnkâ İmparatorluğunun, İspanyollarla savaşlarında öğütülmüş acı biberleri yakarak gözde kısa süreli körlük oluşturmak amacıyla kullandıkları bilinmektedir. ABD 1928 yılında biber gazını (kapsaisin) askeri amaçlı kullanım için envanterine alıp patentlendirerek ihracatına başlamıştır. Günümüzde biber gazı, şiddet suçlarını bastırmak için kolluk kuvvetleri tarafından kullanılmaktadır. Ayrıca Kaliforniya'da kendini savunma ürünü olarak marketlerde pazarlanmaktadır (12).

Eski zamanlarda acı biber yani kapsaisinin ağrı kesici ilaç olarak kullanımı mevcuttur. Yerli Amerikalılarda diş ağrısını dindirmek için biber içeren sakızların kullanıldığı bilinmektedir. Daha sonra bu uygulama Avrupa halk hekimliğinde popülerite kazanmıştır. Acı biberin ilginç kullanım örneklerinden biri; Çin İmparatorluğu döneminde insanları hadım etmek için testis torbası biber özütüyle defalarca ovalanarak hadım işlemi gerçekleştirilmiştir. Yerli Amerikalılar ayrıca acı biber özütünü afrodisyak olarak kullanmışlardır (12).

Kapsaisinoidlerin keskinliği (acılık), 1912 yılında Wilbur Scoville tarafından geliştirilen Organoleptik Test yöntemi ile yapılmaktadır. Acı biberde bulunan kapsaisinoidlerin kimyasal yapıları (Jurenitsch ve ark., 1979), bağıl oranları (Bennett ve Kirby, 1968) ve

keskinlik dereceleri (Govindarajan ve Sathyanarayana, 1991) çeşitli araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (Tablo2)(13).

**Tablo 2.** Kapsaisinoidlerin bağıl oranları, keskinlik değerleri ve kimyasal yapıları.

Kapsaisinoid	Bağıl Oran %	Keskinlik Derecesi (SHU)	Kimyasal Yapı
Kapsaisin	69	16.000.000	
Dihidro-kapsaisin	22	16.000.000	
Nordihidro-kapsaisin	7	9.100.000	
Homodihidro-kapsaisin	1	8.600.000	
Homokapsaisin	1	8.600.000	

### 2.1.1.1 Kapsaisin

Acı biberin tasviri ilk 1542 yılında Fuchs'un kitabında ortaya çıktı. Bu bitkiye Latince ismini Fransız botanikçi Tournefort tarafından Capsicum ismi verildi. Bu bitkilerin aktif bileşeni ilk kez 1846 yılında Trash tarafından izole edilmiştir. Trash bu bileşiğe kapsaisin adını vermiştir. Kapsaisin ile vanilin yapılarının yakından ilişkili olduğunu öngördü. Bu erken keşfe rağmen kapsaisin kimyasal yapısını 1919'da Nelson tespit etse de sentezi on yıl sonra 1930'da Spath ve Darling tarafından yapılmıştır (12).

Kapsaisin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide), biber bitkilerinin meyvelerinden elde edilen doğal olarak oluşan alkaloiddir. Yapısal olarak vanilloidlere benzer. Yapısında bir

benzen halkası ve hidrofobik karbon kuyruğu ile polar amit grubu içermektedir. Kapsaisin yağda çözünen, kokusuz, acılık hissi veren, renksiz, 62–65°C erime noktasına ve 305,41 g/mol molekül ağırlığına sahip bir bileşiktir. Kapsaisin suda çözünmeyen fakat alkoller ve organik çözücüler içerisinde çözülebilen bir yapıdadır (14).

Kapsaisinoidler sitokrom P450 enzimleri tarafından metabolize edilirler. Dihidro kapsaisin kapsaisinın temel metabolitidir. Dihidro kapsaisin ve metabolitleri ile kapsaisin böbrek yoluyla atılırlar (15).

### **2.1.1.2 Kapsaisin Etki Mekanizması**

Kapsaisin ve vanilloidlerin etki mekanizması son on yıl içerisinde kapsamlı olarak çalışılmıştır (16). Kapsaisin nosiseptif afferent nöronlarda P maddesini serbest bırakır. Kapsaisin bu nöronları aktive ederek yanma sıcaklığındaki değişen hissi uyandırır. Kapsaisin P maddesinin tükenmesine aracılık eder ve bunun sonucunda küçük duyuusal nöronların hassasiyetini azaltmasına yol açar (14).

Kapsaisin ve diğer vanilloidler özgül bir sinir membran reseptörü olan TRP (Transient Receptor Potential) bağlanır. TRP reseptörleri ayrıca sıcaklık, asidoz, ağırlı uyaranlar ve osmolariteye cevap vermektedir (17). Kapsaisin, protonlar, sıcaklık (>43°C), endojen yağ bileşikleri ve endovanilloidler gibi maddeler bu reseptörlere direk veya dolaylı olarak etki ederler (18). TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid-1) termal nosisepsiyon ve inflamasyon hiperaljezide merkezi bir rol oynamaktadır (19).

TRPV1, küçük fiber periferel nosiseptif nöronların hücre zarlarında ağırlıklı olarak bulunmaktadır. Endovanilloidler bu kanalları hem düzenleyebilir hem de aktive edebilir. TRPV1 sadece hücresel membranlar üzerinde değil, aynı zamanda endoplazmik retikulum üzerinde de bulunur. Bu TRPV1 endoplazmik reseptörleri hücre içi kalsiyum düzeylerini düzenler ve endovanilloidler tarafından aktive edilirler (20, 21).

Yapısal olarak kapsaisine benzeyen doymamış N-acyldopamines, arakidonik asit ve anandamid lipoksigenaz gibi ürünler TRPV1 reseptörlerinin endojen agonistleridir ve bunlar endovanilloidler olarak adlandırılır. Reseptörlerin desensitizasyonunun düzenlenmesinde endovanilloidler önemli rol oynayabilirler. Kapsaisin bu reseptörleri uyarmasıyla dokularda inflamasyon ve inflamatuvar ağrı meydana getirir (22).

İnflamasyon durumlarında proton ve endovanilliod salınımları hiperaljeziye neden olur. İnflamasyonlu dokuda TRPV1 regülasyonunun arttığı ispat edilmiştir. Ayrıca  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ve  $Na^+$  gibi ekstraselüllerdeki katyonlar TRPV1 reseptörünü aktive edebilir (23). Kapsaisin defosforilasyonu kalsiyum kanallarının regülasyonunu bozmaktadır (24).

### **2.1.2 Biber Gazının Solunum Sistemi Üzerinde Etkileri**

Son yıllarda tüm dünyada biber gazı, kolluk kuvvetleri tarafından kitlesel ayaklanmaları veya gösteri yapan grupları dağıtmak ve etkisiz hale getirmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca siviller tarafından da kendini koruma amaçlı kullanılmaktadır. Gözde aniden oluşan yanma ve göz kapama refleksi sayesinde kişileri kolay bir şekilde kontrol altına alınmaktadır. Hava yollarındaki tahriş kişilerin dayanıklılığını azaltmaktadır. ABD polisi tarafından kullanımı kişilerin saldırganlığını azaltmada faydalı olmuştur. Biber gazının akut fiziksel zarar vermede küçük riskler taşıdığı ve nispeten güvenli silah olduğu ileri sürülmüştür. Buna rağmen ABD’de biber gazının kullanımından sonra birkaç ölümlerle sonuçlanan durumlar rapor edilmiştir. Ancak bu ölümlerin sadece biber gazından dolayı değil, biber gazı ile birlikte ilaç kullanımı veya kişinin elininin kolununun bağlanması gibi diğer faktörlerin beraberinde etkili olduğu bildirilmiştir. Yaygın kullanımına rağmen biber gazının uzun süreli sağlık etkileri yeteri kadar çalışılmamıştır. Çünkü biber gazı başta solunum sisteminde ve diğer sistemlerde birtakım sorunlara yol açabilir. Ayrıca sivil halkın da biber gazını alabiliyor ve kullanabiliyor olması endişeleri gittikçe artırmaktadır (25-28).

Tartışmaların çoğunluğu biber gazı maruziyeti ile ilgili potansiyel sağlık risklerine odaklanmıştır. OC deride tahrişe, kornea ve vokal kort hasarına, astımlılar arasında nefes almada zorlanma ve insanlarda kansorejen veya mutajen potansiyele sahip olabilir. Bir diğer sorun, OC’nun etkisi dışında bireylerdeki ilaç kullanımı, mağdurlarda pozisyona bağlı asfeksi ve önceden varolan sağlık sorunları gözaltındaki ölümleri artırabilmektedir. Bir raporda OC maruziyet sonrası alıkonulan 2 ölüm vakası bildirilmiştir. Otopsi sonuçlarında, vakalardan birisinde kalp hastalığıyla birlikte madde bağımlısı olduğu diğer vakada ise alkolle beraber astım hastası olduğu ve 10-15 defa OC maruziyetine kaldığı görülmüştür (29).

Tartışmaları artıran diğerk bir unsur ise kullanım mesafesidir. Kolluk kuvvetleri ve sivil halk tarafından kullanılan biber gazının önerilen püskürtme mesafesi 120-150 cm arasında olması gereklidir. Fakat yapılan incelemede, kolluk kuvvetleri tarafından kullanılan biber gazı %60 oranında 60 cm'in altında püskürtülmüştür. Bu da biber gazının olumsuz etkilerini daha da artırmaktadır (30, 31).

Diğerk bir etki unsuru da biber gazı üreticileri OC ürünlerinde biber özütü dışında, alkol, organik çözücüler, hidrokarbon gibi maddeleri katkı maddesi olarak kullanmaktadırlar. Biber özütü dışındaki bu maddelerin solunması bile ani kalp, solunum ve sinir sistemi etkilenmelerine, ritim bozukluklarına ve ölümlere yol açmaktadır. Biber gazının insan üstündeki etkileri Amerika'da çeşitli araştırmaların konusu olmuştur. Yaklaşık 6000 emniyet görevlisinden 61'inde solunum güçlüğünden bilinç kaybına uzanan hayatı tehdit eden sonuçlarla karşılaşmıştır (32).

Biber gazı ile yapılan çalışmalara bakıldığında; Karagama ve arkadaşlarının yürüttüğü bir çalışmada CS gazıyla direk ve dolaylı karşılaşmadan 10 ay sonra, dolaylı karşılaşmada dahi solunum fonksiyonunun bozulduğu bildirilmiştir (33). Gaziantep'te 2001-2002 yılları arasında yapılan köy tarama çalışmalarında köylü kadınlara acı biber salçası yaptıkları dönemde cilt, göz ve solunum sistemi problemleri yaşayıp yaşamadıklarına dair bir anket yapılmış ve bu kadınlarda astım benzeri semptomların daha sık görüldüğü bulunmuştur (34).

Yapılan hayvan deneylerinde, S. Delamanche ve ark. 2001 yılında ortho-klorobenzilidenmalonitrilin (CS) ve OC gazlarının, fare trakeal silyer titreşim frekansı (STF) üzerine olan etkisini araştırdıkları çalışmada %0.05 OC ve %0.01 CS' ye maruz bırakıldıktan 30 dakika sonra farelerde STF' nin progresif olarak azaldığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada yazarlar dışarıdan metilen mavisi ve H7 verilmesi durumunda OC' nin bu etkisinin inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Ancak, bu ajanlar CS' nin etkisini inhibe etmemiştir. Yazarlar, OC' nin STF üzerinde inhibe edici etkisinin guanilatsiklaz-bağımlı yol, ya da protein kinaz C-bağılı fosforilasyon ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir (35). Reilly ve ark 'nın 2003 yılında yaptıkları çalışmada, otörler biber spreyine (kapsanoidler) maruz kalan farelerde akut inflamasyon oluştuğunu ve doza bağılı olarak nazal, trakeal, bronşiyol hücrelerin zarar gördüğünü bildirdiler (36). Kafkas Üniversitesinde yapılan bir çalışmada kapalı ortamda farklı dozlarda OC gazıyla karşılaşan farelerin kanlarında asit yöne kayış, karbondioksit artışı



gözlendiği bildirilmiştir. Araştırmanın sonucunda hayvanların solunum güçlüğü ve göz yangısı bulguları gösterdiği bildirilmiştir (37).

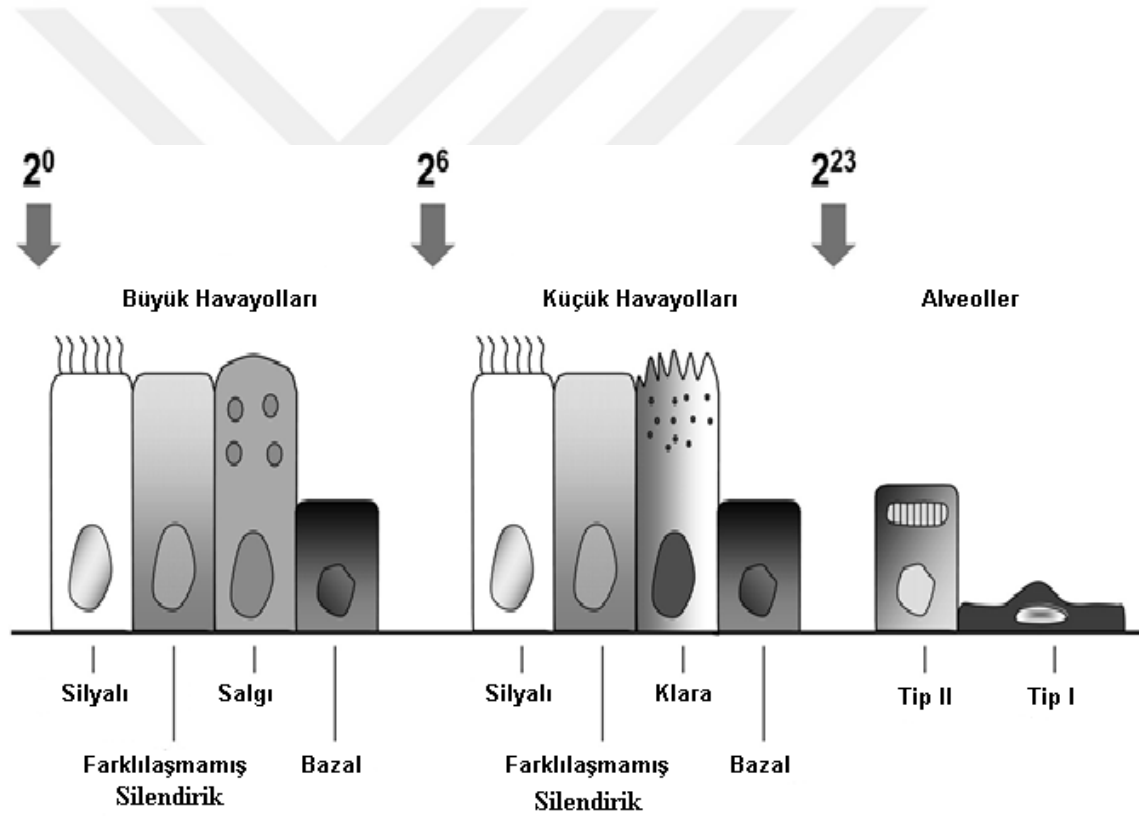
### **2.1.2.1 Kapsaisinin Solunum Sistemi Üzerine Etkileri**

Kapsaisin ile yapılan çalışmalara bakıldığında; Guo ve arkadaşları kapsaisin ratların trakeası üzerindeki uzun dönemli maruziyet etkisini araştırmışlar; goblet hücre sayılarında azalma ancak, mukus granüllerin doldurulmasıyla hipertrofiye uğradığı ve buna bağlı olarak sekresyon salınım oranında artış olduğunu tespit etmişlerdir. Kapsaisin maruziyetinden 12 dk. sonra endotel gapların neredeyse tamamının kapandığı saptanmıştır. Yine maruziyetten 5 dk. sonra trakeanın subepitelyal bölgelerinde %60 oranında ödem görülmüştür. Plazma ekstrasvazasyonu ve goblet hücre sekresyonunun artışı trakeadaki ödemin nedeni olarak gösterilmiştir (38).

Diğer bir çalışmada kapsaisinin çeşitli dozları (1, 10, 100 µg) gönüllüler üzerine nazal sprey olarak verildiğinde, doz ve zamana bağlı lökosit sayılarında, albümin ve lizozim düzeylerinde artış görülmüştür. Bu veriler insan üst solunum yollarında nörojenik inflamasyona kanıt olarak değerlendirilmiştir (39). Kapsaisine maruz kalmış duyuşal hiperaktivite hastalarının nazal lavaj sıvılarından sinir büyüme faktörü ('Nerve Growth Factor' NGF) ve bu hastaların öksürük refleksi artmıştır. Artan NGF ile öksürük refleksi birbiriyle ilişkili olduğu gözlenmiştir (40). Reilly ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptığı çalışmada biber spreylere içerisinde bulunan kapsanoidlere maruz bırakılan insan akciğer hücre dizileri (BEAS-2B ve A549) ve karaciğer hücre dizilerinde (HepG2) enflamasyon parametreleri ve hücre ölümü araştırılmıştır. Bu hücre dizilerinde kapsaisin maruziyeti sonucu IL-6 salınımı ve hücre ölümünün arttığı, nekrotik hücre ölümünde akciğer hücre dizilerinin karaciğer hücre dizisine nazaran daha duyarlı olduğu belirlenmiştir (36). Southall ve arkadaşları kapsaisin tarafından aktive edilmiş TRPV1 reseptörü interlekün-8 (IL-8) ve prostaglandin E2 salınımı artırdığını gözlemişlerdir (41).

## 2.2 Solunum Yolu Epitel Hücreleri ve Görevleri

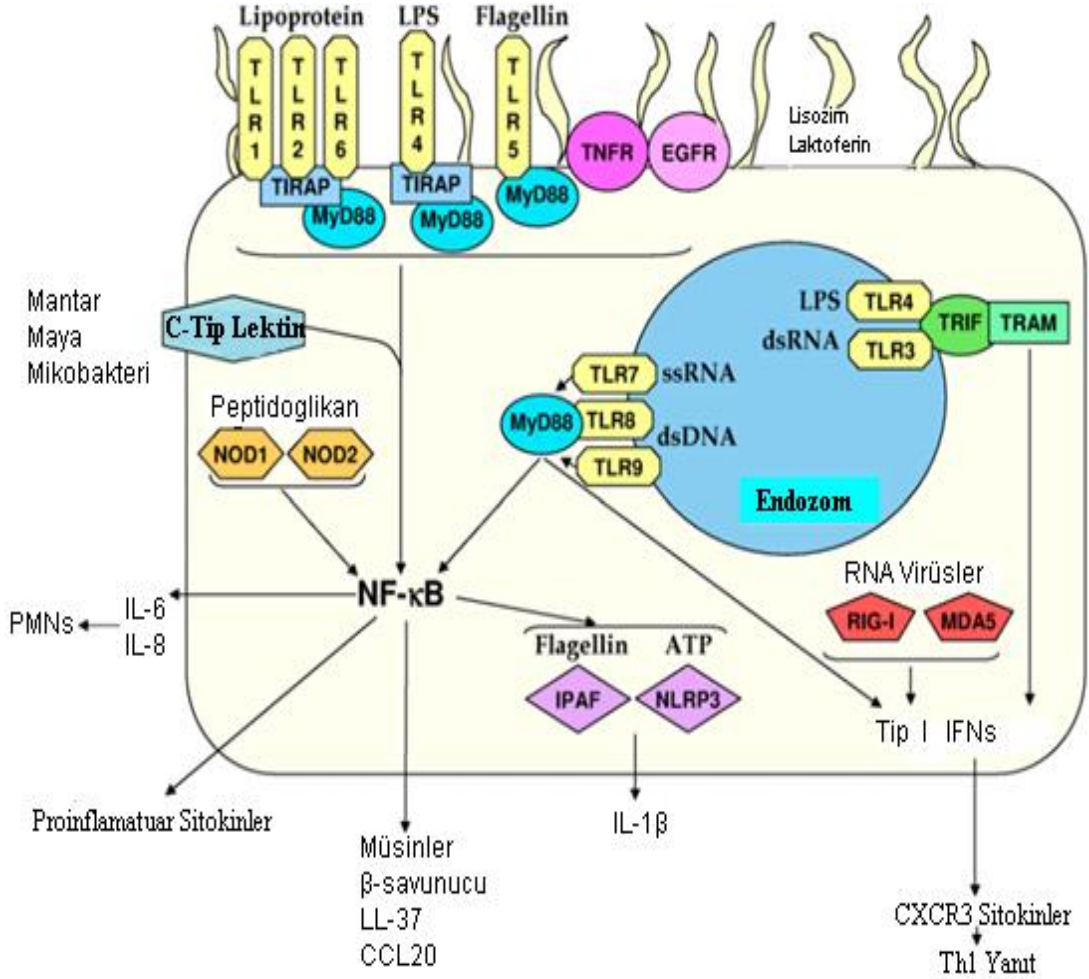
Hava yolu epitelyumu büyük hava yollarında yalancı çok katlı ve küçük havayollarında kübik ve silindirik yapıdadır. Başlıca hücre tipleri silyalı, silindirik, farklılaşmamış, salgı ve bazal hücrelerdir (Resim 2). Normal yetişkin bir insanda, epitel hücre popülasyonları havayolu seviyesinin bir fonksiyonu olarak değişir. Büyükten küçük hava yollarına doğru havayolu dalları olarak kıkırdak hücrelerin, submukozal bezlerin ve klara salgı hücrelerinin sayıları azalır. Havayolu boyunca daha az sıklıkla görülen hücre tipleri vardır. Bunlardan nöroendokrin hücresi en çok ilgi çeken hücre tipi olmuştur (42).



**Resim 2.** Akciğer epitelinin önemli hücre tipleri (42).

Havayolu epitelyumu akciğerlerin ilk savunma hattını oluşturur. Bu hücreler mekanik bariyer sağlamanın dışında kemokinler ve sitokinler (IL-6, CXCL8, IL-1b, GM-CSF ve G-GSF gibi) üretirler (Resim 3). Ayrıca enfekte hücreleri ve organizmaları yok etmek

için fagosittik hücreleri toplar ve aktive ederler. Çünkü akciğer normalde steril olduğundan mikroorganizmalarla etkileşimleri genellikle inflamatuvar yanıtı neden olur (43).



**Resim 3.** Solunum epitelindeki doğal bağışıklık. Bu incelemede havayolu epitel hücre ile doğal molekülleri gösterilmiştir. Ayrıca bunların ligandları, yüzey reseptörleri (Toll-benzeri reseptör (TLR) 1,-2,-4,-5,-6; TNF reseptör (TNFR); Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR); Endozomal reseptörler (TLR3, -4, -7, -8, -9); Sitolizik reseptörler (Retinoik asit uyarılabilir gen [RIG]-I, Melanom farklılaşması ile ilgili protein [MDA]5; Nükleotid oligomerizasyon domain [NOD]1, [NOD]2, IL-1β; Proteaz aktive edici faktör [IPAF]; NOD-benzeri reseptör pirin domain [NLRP3]) ve antimikrobiyal proteinler bulunmaktadır (43).

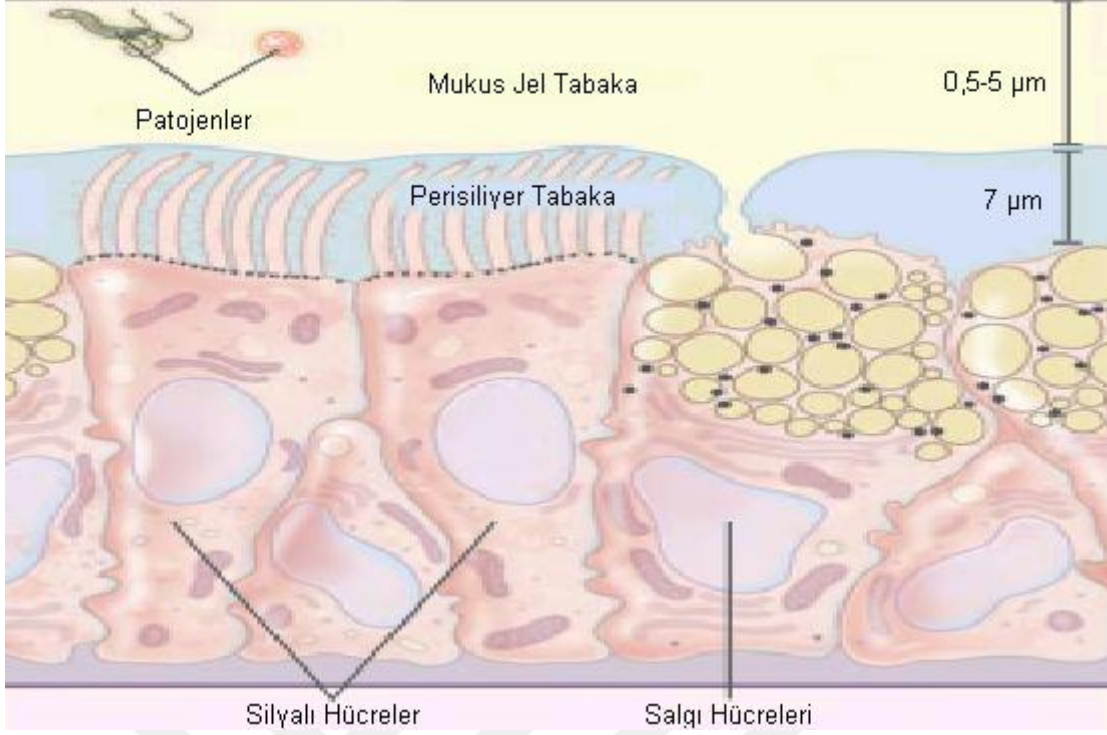
### 2.2.1 Silyalı Hücreler

Hava yolu epitelyumun en baskın hücre tipi olan havayolu silyalı hücreler, bazal membran üzerine bir sütun şeklinde yayılmış yapıya sahiptir. Havayolu dallarında silyalı hücre sayı yüzdesi artar. Trakeada  $47\pm 2$  iken küçük havayolları epitelyumunda  $73\pm 1$  oranında yayılmışlardır. Silyalı hücreler üzerindeki silyalar (hücre başına 200-300 silya) sayesinde lümen üzerindeki diğer hücrelerden kolayca ayırt edilebilir. Her biri 0,2-0,3  $\mu\text{m}$  çapında olup üst solunum yollarında 6-7  $\mu\text{m}$  ve küçük hava yollarında 4  $\mu\text{m}$  arasında değişen boylardadır. Ayrıca silyalı hücrelerin apikal yüzeyleri sıvı ve elektrolitlerin transepitelyal hareketinde rol oynayan birçok mikrovillusler içerir (44).

Silyalı hücrelerin temel fonksiyonu mukus jel tabakasını sürekli olarak başa doğru itmektir. Karşılıklı birçok silya hücrelerinin son derece koordineli vuruşuyla hücreler bir dalga hareketi üretip epitel yüzeyi boyunca mukusun iletimini sağlamaktadırlar (45).

#### 2.2.1.1 Mukosilyer Taşınım

Havayolu epitelyumu inhale edilmiş patojenlere ve partiküllere karşı ana bariyerdir ve solunum yolları için birincil savunma mekanizması olarak hizmet vermektedir. Mukus inflamasyonu önlemek için patojenlerle epitelyum arasında mekanik bir bariyerdir (46). Normal mukus %97 su ve %3 katı (müsinler, müsin olmayan proteinler, tuzlar, lipitler ve hücre kalıntıları) içerir (Resim 4) (47). Silya vuruşu sırasında, silya pençeleri mukuslu jel tabakaya ulaşır ve orofarinks yönüne doğru iter. Koordineli silyer vuruş, mukus örtüsüyle nispeten hızlı kırpm oranı için küçük kuvvet sağlar. Bu nedenle vuruş frekansı orofarinkse doğru mukus taşınımı için elverişli reolojik durumlar yaratır. Periferden merkezi havayollarına doğru total havayolları yüzeyinin azalması silyalı hücrelerin sayısındaki düşüş ile ilişkilidir. Bu yüzden merkezi havayollarında mukosilyer taşınım periferik havayollarından daha düşüktür. Merkezi havayollarındaki biraz yüksek vuruş frekansı ile telafi edilir fakat merkezi havayollarındaki hava akımı mukus taşınımının temel mekanizmasıdır (48).



**Resim 4.** Havayolu mukusunun yapısı (47).

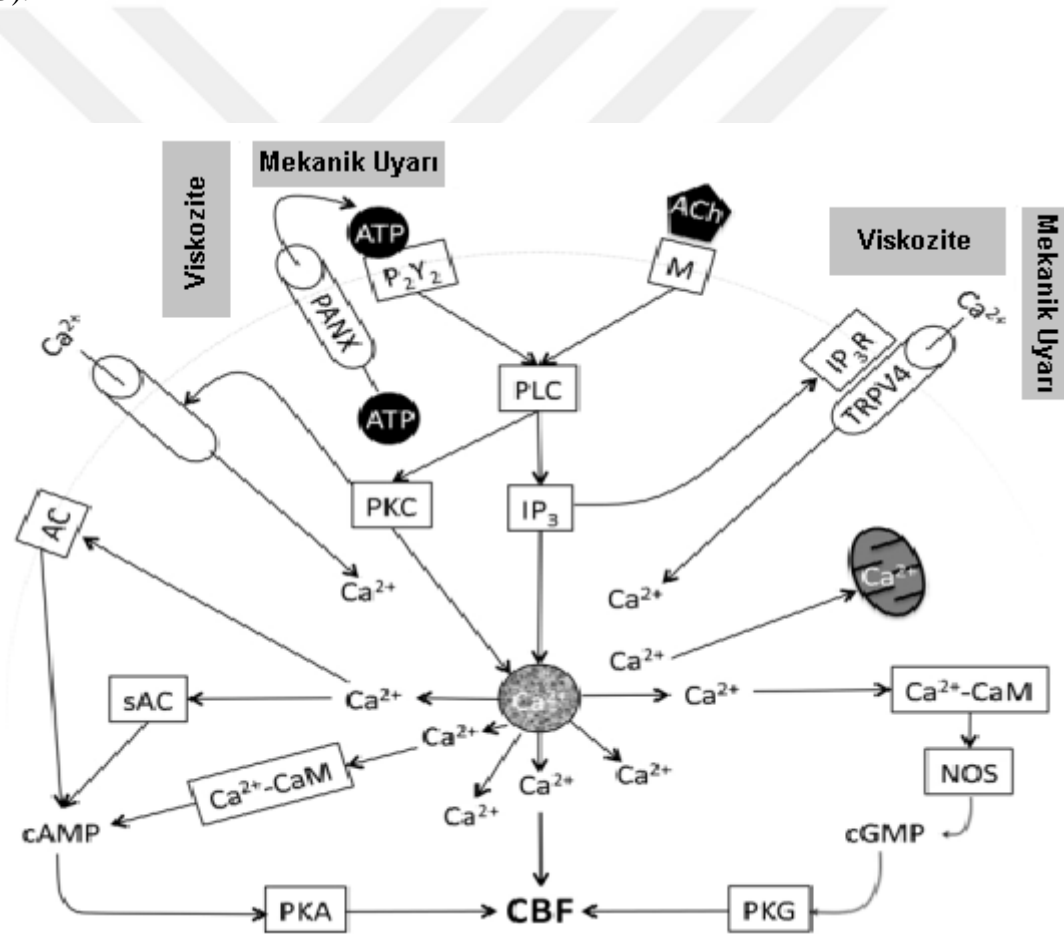
### 2.2.2 Silya titreşimi

Hareketli silyalar normal şartlar altında havayollarında mukus ve atıkların temizlenmesinde çok önemli rol oynar. Her hareketli silya yaklaşık 6–7 µm uzunluğunda ve 0,2–0,3 µm çapındadır. Silya aksenomunun yapısını oluşturan ana bileşen mikrotübüllerdir. Siliyer mikrotübüllerin enine kesitleri elektron mikroskopunda 9+2 konumunda dizilidir. Bu 9+2 konfigürasyon hareketli silyaların gelişim süreci boyunca muhafaza edilmiştir ve aslında hareketi sağlamak için gerekli olduğuna inanılmaktadır. Mikrotübüller  $\alpha$ - ve  $\beta$ -tübinin heterodimerleri tarafından inşa edilirler (49).

Her bir silya kolu 4 adet dış dynein kol, üç adet iç dynein kol, bir adet spoke grup ve bir çift interdoublet linklerinden oluşur. Memeli trekea silyalarındaki dış dynein kolu 1-2 milyon Da molekül büyüklüğü olan 2 kafalı buket benzeri moleküldür. Her kafa 400,000-500.000 Da ATPaz ağır zinciri içerir. Siliyer vuruş sırasında bu ağır dynein zinciri komşu mikrotübüller ile karşılıklı etkileşime girerler ve mikrotübüller birbirine

doğru hareket eder (49). Chlamydomonas mutantları kullanılan bir çalışmada, dış dynein kolları STF'nin ayarlanmasında ve iç dynein kolların da, bükme oluşumunu ve vuruş formundan sorumlu olduğu tespit edilmiştir (50).

Normal silya hücresi saniyede 12-15 defa vuruş yaparak 1 dakikada jel tabakasının yaklaşık 1mm'lik hareketini sağlar (47). cAMP, Ca<sup>2+</sup>, cGMP, nitrik oksit ve progesteron içeren multi sinyal molekülleri havayolu silya titreşim frekansını düzenler (49, 51-53). Mekanik uyarılı ve yüksek viskoziteli durum pannexin sayesinde ATP salınımı ile P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> uyarımı ve bu sayede TRPV4 aktivasyonu intraselüler Ca<sup>2+</sup>u artırır. Serbest Ca<sup>2+</sup> kalmoduline (CaM) bağlanır ve cAMP ve cGMP üretiminin artmasına yol açar. Dynein kollarının fosforilasyonu sayesinde PKA ve PKG üzerinden STF artmaktadır (Resim 5) (53).



**Resim 5.** Silya titreşim frekans (STF) düzenlenmesinde kalsiyumun değişik etkileri: AC, adenilat siklaz; ACh, asetilkolin; Ca<sup>2+</sup>-CaM, kalsiyum-kalmodulin kompleksi; IP<sub>3</sub>, inositol trifosfat; IP<sub>3</sub>R, inositol trifosfat reseptörü; M, muskarinik reseptör; NOS, nitrik oksit sintaz; PANX, pannexin; PKA, protein kinaz A; PKC, protein kinaz C; PKG, protein kinaz G; PLC, fosfolipaz C; sAC, çözümlü adenilat siklaz; TRPV4, transeit reseptör potansiyelli katyon kanal alt aile V üye 4 (53).

### **2.2.3 Sekretuar hücreler**

#### **2.2.3.1 Goblet Hücreler**

Goblet hücreleri alt ve üst solunum yollarının yüzey epitelinde bulunurlar. Bu hücreler günlük alınan havanın içerisinde bulunan tozları, duman, mikroorganizmalar ve diğer kalıntıları epitel tabakayı korumak için glikoprotein yapıdaki yüksek molekül ağırlıklı mukusu hızlı bir şekilde salgılar. Seyreltilmiş sulu çözelti içerisinde müsin karışımı ile diğer proteinler, lipitler ve glikokonjugat bileşenleri içeren karışım mukus olarak tanımlanmaktadır. Mukus silya uçlarıyla itilerek ağıza doğru taşınımı sağlanır. Mukusun elastikiyet ve viskozitesi silyanın mukusa bağlanmasının verimini belirler. Parçacıklar mukus içerisine sıkışıp böylece mukosilyer temizleme sayesinde solunum yollarından uzaklaştırılır. Astım veya kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) gibi patofizyolojik durumlarda mukosilyer klirens yardımcı olmak amacıyla bu hücreler tarafından mukus salgınımı artırılır ve inhalasyon ile alınan iritanların solunum yollarından öksürükle uzaklaştırılmasına yardımcı olunur. Bu hastalıklarda goblet hücre sayısında ve mukus sekresyonunda artış gözlemlenir (54).

Goblet hücreler klasik kadeh şekline benzeyen bazalda nukleusu olan uzun sütunlu hücrelerdir. Hava yolu lümenine bazal membranla uzanan uç kısmında çok sayıda çıkıntıları bulunmaktadır. Hücrelerin bir karakteristik özelliği büyük yuvarlak şekilde salgı granüllerin sitoplazmayı doldurmasıdır (55). Goblet hücreler granüllü olmayan progenitör hücrelerin ve bazal hücrelerin farklılaşmasıyla ortaya çıkarlar. Goblet hücre sayısındaki artış, MUC (müsin) gen ifadesi ve mukus üretimi ile ilişkilidir (54).

#### **2.2.3.2 Klara Hücreleri**

Klara hücreleri küçük havayolları ve trakeadaki silyalı olmayan sekretuar hücrelerdir (56). Bu hücreler bazal membranla örtülü çok göze çarpan apikal çıkıntılarla havayolu lümenine uzanmıştır. Çok sayıda küçük apikal granülleri mevcuttur (55).

Klara hücreleri, akciğeri koruyucu bazı özelliklere sahiptir. Ksenobiotikler ve oksidan gazları detoksifiye etmek, çevresel ajanlara karşı mukosilyer klirens katılmak ve

çoğalmak, inflamasyon derecesini kontrol etmek ve silyalı hücre popülasyonunu korumak için farklılaşmak gibi özellikleri mevcuttur. Klara hücreleri klara hücresi sekretuar protein ('clara cell secretory protein', CCSP) salgırlar. Ayrıca hava boşluklarındaki ekstraselüler sıvının salgılanmasına katkıda bulunur. Örnek olarak: yüzey aktif apoproteinler, proteazlar, çeşitli sitokinler ve kemokinler, antimikrobiyal peptidler ve müsiner verilebilir (56).

#### **2.2.4 Bazal Hücreler**

Bazal hücreler havayolu bazal laminanın çoğunu kapsayan ayrı hücreler katmanında bulunmaktadır. Bulunduğu merkezi konum itibarı ile silendirik epitel hücreleri, nöronlar, bazal membran ve altta yatan mezenkimal hücrelerle ilişki içerisindedir. Buna ek olarak, inflamatuvar hücreler ile lenfosit ve dentritik hücreler arasında etkileşimi sağlarlar (57).

Havayolu bazal hücreleri bazal lamina ile silendirik epitel hücreler arasında adezyon molekülleri (dezmozom, hemidezmozom ve keratin filamentleri) sayesinde bir birine bağlanmasını sağlar (58). Ayrıca bazal hücrelerin normal şartlar altında havayolunda progenitör hücre olarak hareket ettiği sonucuna varılmıştır. Bazal hücrelerin aynı zamanda havayolunun fizyolojik ve inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde de önemli bir rolü bulunmaktadır (57).

### **2.3 Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAİ)**

KOAİ başta sigara olmak üzere, zararlı gaz ve partiküllerin yanı sıra diğer çevresel ve kişiyeye bağlı risk faktörlerinin etkisi ile ortaya çıkan, kısmen geri dönüşümlü olan, hava yolu inflamasyonu ve parankim hasarı sonucu gaz alışverişinde bozulmayla giden ilerleyici bir hastalıktır (4, 59). Sonuçta akciğer fonksiyonlarında bozulma ve bunun sonucunda hipoksemi ve hiperkapni ortaya çıkar (4).

KOAİ'nin en büyük nedeni olduğu mortalite ve morbidite ile ekonomik yük artmaktadır. Dünya sağlık örgütü 65 milyon kişide orta şiddetli KOAİ geliştiği ve küresel ölümlere %5 katkı sunduğunu tahmin etmektedir (4). KOAİ halen ölüm



nedenleri arasında dördüncü sırada iken, dünya sağlık örgütü tarafından 2030 yılında üçüncü sırayı alabileceği tahmin edilmektedir (60).

Kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, metabolik hastalıklar ve akciğer kanseri KOAH'ın en sık görülen komorbiditeleridir. Bu yüzden birçok tedaviye farklı yanıtlar veren ve anlaşılamayan fenotiplere sahiptir (61).

### **2.3.1 KOAH'ın Epidemiyolojisi**

#### **2.3.1.1 Mortalitesi**

Dünya sağlık örgütünün 2012'de yayınladığı rapora göre, tüm dünyada yılda 3 milyon insan KOAH nedeniyle ölmektedir, bu da küresel ölümlerin %6'nı oluşturmaktadır. KOAH'lı ölümlerin %90'ından fazlası düşük ve orta gelir düzeyli ülkelerde meydana gelmektedir. KOAH 'ın birinci nedeninin tütün ve tütün mamulleri kullanımı olduğu bildirilmektedir (62).

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı tarafından 2000 yılında yapılan Türkiye Ulusal Düzeyde Ölüme Neden Olan Hastalıklar çalışmasında, KOAH ölüm nedenleri içerisinde iskemik kalp hastalığı ve serebrovasküler hastalıktan sonra %5.8 ile 3. sırada bulunmaktadır. Erkek ölüm nedenlerinde %7,8 ile 3. sırada iken, kadınlarda %3,5 oran ile 5. sırada yer almaktadır (63).

#### **2.3.1.2 Morbidite-Prevalans**

KOAH tüm dünyada morbiditenin de yaygın nedenidir. Bu progresif hastalık olarak toplum için endişe kaynağıdır. Artan hastalık ve sonucunda oluşan sakatlık toplumda maddi ve manevi ağır yük oluşturmaktadır (64).

Yaş, cinsiyet, sigara içimi, eğitim düzeyi, sosyoekonomik durum ve farklı coğrafi bölgeler KOAH prevalansında rol oynamaktadır. Aaron ve arkadaşlarının 2016 yılında 41 ülkede yayınlanan 80 makalede değişik yaş, cinsiyet ve sigara kullanımı gibi risk faktörlerin KOAH prevalans üzerindeki değişken oranlarını analiz ettiklerinde; bu risk

faktörleri KOAH prevalansının %64'üne ve ülke düzeyi risk faktörlerinin açıklayıcı gücünün %72'ine sahip olduklarını tespit etmişlerdir (65). Lindberg ve arkadaşlarının 2005 yılındaki yayımlanan araştırmasında, İngiliz Toraks Derneği (BTS), Avrupa Solunum Derneği (ERS), Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalıkları için Küresel Girişim (GOLD) ve Amerikan Toraks Derneğine (ATS) göre KOAH prevalansı sırasıyla %7,6, 14,0, 14,1 ve 12,2 oranlarındadır (64).

Türkiye'de KOAH prevalansına yönelik 1976 yılında Ankara Etimesgut bölgesinde yapılmış ilk çalışma, 40 yaş ve üstü bireylerde KOAH prevalansını erkeklerde %20,1, kadınlarda %8,2 ve total oranı %13,6 olarak bildirmiştir (66). Diğer bir çalışmada, Konak bölgesinde yaşayan 40-69 yaşındaki bireylerde GOLD kriterlerine göre prevalansı %10,2 olarak tespit edilmiştir (67).

KOAH morbidite değerlendirmesinde genel olarak DALY (sakatlığa göre düzeltilmiş yaşam yılları) değişkeni kullanılmaktadır. DSÖ tarafından KOAH, 1990 yılında en yaygın görülen DALY nedenleri arasında 12. sırada iken, 2020 yılında 5. sırada olacağı görülmektedir (66).

### **2.3.2 KOAH'ın Hücresel ve Moleküler Mekanizması**

KOAH akut alevlenmelerinin artışı sırasında özellikle periferik hava yollarında ve parankiminde inflamasyon artar. Buna genellikle sistemik inflamasyon da eşlik eder. KOAH için gelecekte anti inflamatuvar tedavi geliştirebilmek için inflamasyon doğasını iyi anlamak gerekir (68). KOAH'ın gelişiminde genetik, epigenetik ve konağa ait faktörler rol oynamaktadır (70).

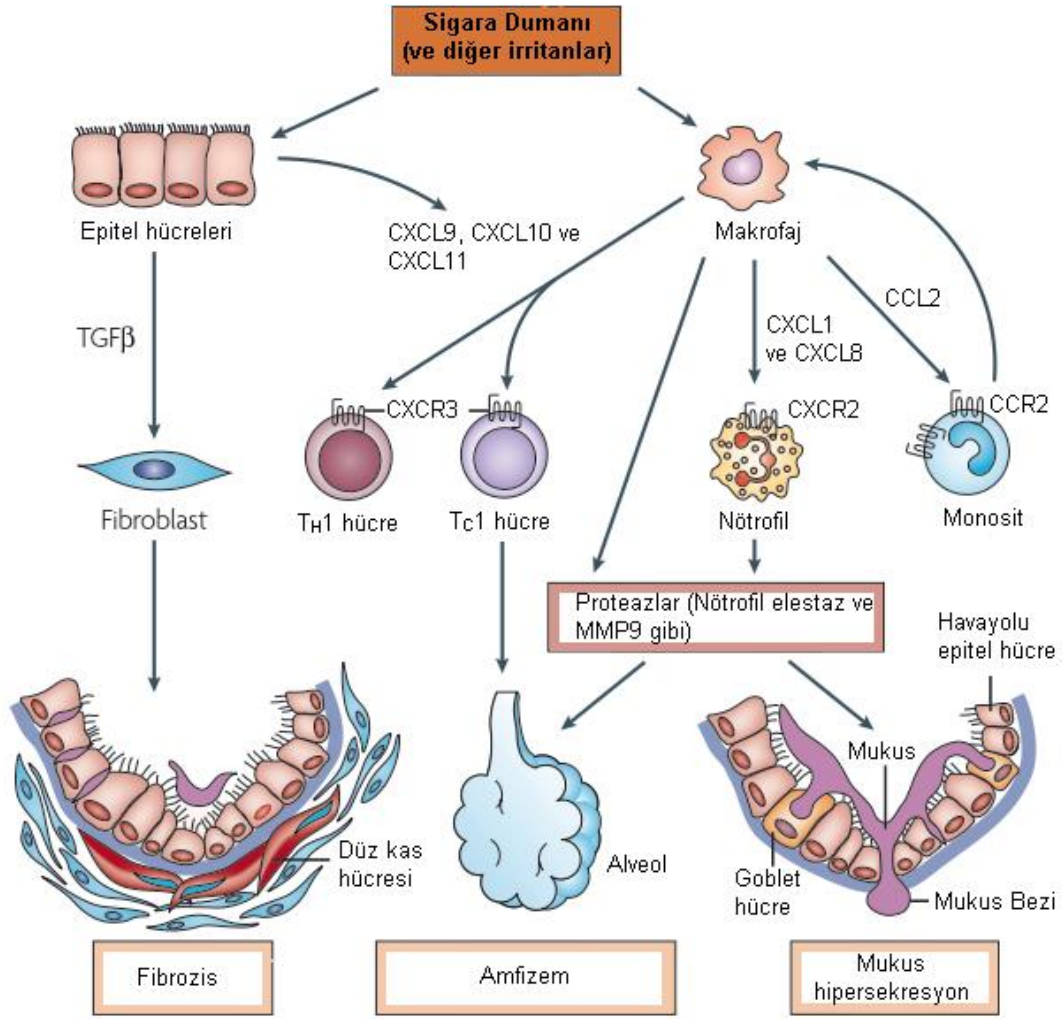
#### **2.3.2.1 Patoloji**

KOAH'ta ilerleyici hava akımı kısıtlılığına iki önemli patolojik süreç neden olur. Küçük hava yollarının daralması ve yeniden şekillenmesi ile alveol bileşenlerinin ve akciğer parankiminin hasarı temel patolojik olayları oluşturur. Bu patolojik değişiklikler akciğer periferinde inflamasyona neden olur ve hastalık süreci ilerledikçe artar (70). Hafif hastalarda bile küçük hava yolları tıkanması ve kaybı bulunmaktadır (71). Küçük hava

yolu tıkanıklığı ve alveol bağlantılarının ortadan kalkması hava yolu kapanmasına, hava hapsine ve hiper-enflasyona neden olur. Bu yapısal değişiklikler KOAH'ın en önemli göstergeleridir (72).

### **2.3.2.2 İnflamasyon Hücreleri**

KOAH'ın akciğer inflamasyonu hem doğal bağışıklık (nötrofiller, makrofajlar, eozinofiller, mast hücreleri, doğal öldürücü hücreler, gama delta T hücreleri ve dendritik hücreler) hem de adaptif bağışıklık (T ve B lenfositler) ve aynı zamanda solunum ve alveoller epitel hücreleri, endotelial hücreler ve fibroblastlar gibi yapısal hücrelerin aktivasyonunu kapsamaktadır (Resim 6) (72, 73).



**Resim 6.** KOAH ile ilişkili inflamatuvar ve immün hücreler (72).

### 2.3.2.2.1 Epitel Hücreler

Sigara dumanı ve biyomas yakıt dumanı gibi diğer irritanlar tarafından aktif hale getirilen epitel hücreleri tümör nekrozis faktör ('tumor necrosis factor', TNF) alfa, interlökin (IL)-1 beta, IL-6, GM-CSF ve CXCL8 (IL-8) gibi inflamatuvar mediyatörleri üretir (74). Küçük hava yollarındaki epitel hücreler lokal fibrozise sebep olan dönüştürücü büyüme faktörü ('transformin growth factor', TGF)-β'nın önemli bir kaynağı olabilir. Hava yolu epitel hücreleri ayrıca antioksidanlar, antiproteazlar ve defensinlerin salgılanması ile goblet hücrelerinden mukus üretimi sayesinde hava yolu

savunmasında önemli rol oynar. Kronik bronşit ve KOAH'ta havayolu epiteli genellikle skuamöz metaplazi gösterir (75).

### **2.3.2.2.2 Makrofajlar**

KOAH'lı hastaların hava yollarında, akciğer parankiminde, bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvısında ve balgamında solunum yolları makrofajlarının artışı vardır. Makrofajlar amfizemli hastaların hasarlı havayolları duvarlarında yerleşmişlerdir ve parankimadaki makrofaj sayısı ile amfizem şiddeti arasında ilişki vardır (76). Sigara dumanı tarafından aktive edilen makrofajlar TNF-a, CXCL1, CXCL8, CCL2 (MCP-1), LTB4 ve reaktif oksijen türleri ('reactive oxygen species', ROS) gibi inflamatuvar mediyatörleri serbest bırakırlar. Alveoler makrofajlar ayrıca MMP-2, MMP-9, MMP-12, katepsinler (K, L ve S) ve nötrofil elastaz gibi elastik enzimleri salgılar (77). Makrofajlar birçok inflamatuvar proteinleri salgırlar. KOAH'ta inflamatuvar sürecini organize edebilir. Nötrofiller; CXCL8, CXCL1 ve lökotrien B4 (LTB4) tarafından, monositler; CCL2 tarafından, Tc1 ve Th1 lenfositler; CXCL10, CXCL11 ve CXCL12 tarafından çekilebilirler. Matriks metaloproteinaz (MMP) ve katepsinler gibi elastolitik enzimlerin salınımı elastolizise neden olurlar. Sitotoksik T hücreleriyle birlikte amfizeme katkı sunarlar. TGF-β1 salınımını uyararak küçük havayollarında fibrozisine sebep olurlar. Makrofajların ürettiği ROS ve nitrik oksit ('nitric oxide', NO) ile birlikte peroksinitrit ('peroxynitrite', ONOO) kortikosteroid direncine katkıda bulunurlar. Bozulmuş bakteri fagositozu bakteri kolonizasyonunu artırabilir (74).

### **2.3.2.2.3 Nötrofiller**

KOAH'lı hastaların balgam ve BAL sıvılarında aktif nötrofillerin artışı gözlenir. Ayrıca hava yolu duvarı ve parankiminde de az miktarda bulunurlar (78). KOAH'ta adherent nötrofiller çeşitli kemotaktik nötrofil faktörler (LTB4, CXCL1, CXCL5 (ENA-78), ve CXCL8) sayesinde solunum bölgelerine doğru hareket ederler (79). Bu kemotaktik mediyatörleri alveoler makrofajları, T hücreleri ve epitel hücreleri üretebilir fakat IL-8 (CXCL8)'in majör kaynağı nötrofildir (80). KOAH'lı hastalarda nötrofillerin sayısının

önemli derecede arttığını ve IL-8 ve TNF $\alpha$  konsantrasyonunda arttığı belirtilmiştir. KOAH inflamasyonunda bu iki sitokinin önemli derecede rol oynadığı bildirilmektedir (78).

#### **2.3.2.2.4 Dendritik Hücreler**

Dendritik hücreler uyarılmış immün yanıtın doğal olarak bağlanmasında önemli rol oynar. Hava yolları ve akciğer zengin bir dendritik hücre ağı içermektedir. Bu hücreler genellikle yüzeye yakın bölgelere yerleşmiş durumdadırlar. Yabancı maddelerin solunması durumunda anında sinyal oluştururlar ve bu sayede makrofajları, nötrofilleri, T ve B lenfositlerini aktive ederler. Bu şekilde pulmoner yanıtta önemli rol oynarlar (81).

#### **2.3.2.2.5 T Lenfositler**

T hücrelerin sayısı ile havayolu obstrüksiyon şiddeti ve alveoler yıkım miktarı arasında ilişki vardır. Ayrıca, sigara içicisi ve KOAH'lı hastalarda T hücre (CD8<sup>+</sup> ve CD4<sup>+</sup>) sayılarında artış söz konusu olduğunu belirtmişlerdir. Bu hücrelerin ekspresyonu transkripsiyon faktörü olan STAT-4'ü aktive eder (82). CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücreleri KOAH'lı hastaların akciğerinde CXCL9, CXCL10 ve CXCL11 gibi kemokinlerin aktivatörü olan CXCR3 ekspresyonunun arttığı ve bu kemokinlerin KOAH hastalarında arttığı bildirilmiştir (83). Özellikle sigaradan dolayı hasar görmüş akciğer, öncelikle münzevi oto antijenleri ortaya çıkarır.(84). Bu antijenler oksidatif stresi uyabilirler. Şiddetli KOAH'lı hastalarda bu antijenlere yönelik antikorlar bulunmuştur (85). CD8<sup>+</sup> hücrelerden perforinler, graenzim-B ve TNF-a serbest bırakılması sayesinde alveoller epitel hücrelerin apoptozisine ve sitolizine sebep olur. Amfizemli hastalarda alveol hücrelerin apoptozis ile CD8<sup>+</sup> hücrelerin sayıları arasında ilişki gösterilmiştir (86).

### 2.3.2.3 Proteaz

Pro-Gly-Pro ('Matrikinler', PGP) gibi kemotaktik peptidlerin üretilmesi sayesinde KOAH'lı hastalarda elastaz aktivitesi artışı amfizemin gelişimine ve nötrofilik inflamasyona katkıda bulunur. İnsan nötrofil elastazlar elastolitik aktiviteye katılırken aynı zamanda hava yollarında mukus salgılanmasının güçlü bir uyarıcısıdır. Makrofajlardan, nötrofillerden ve epitel hücrelerden salgılanan matriks metaloproteinaz (MMP9) KOAH'ta baskın elastolitik enzim olarak görülür. MMP9 N-asetil-PGP üretilmesi sayesinde nötrofilik inflamasyonu teşvik eder (87).

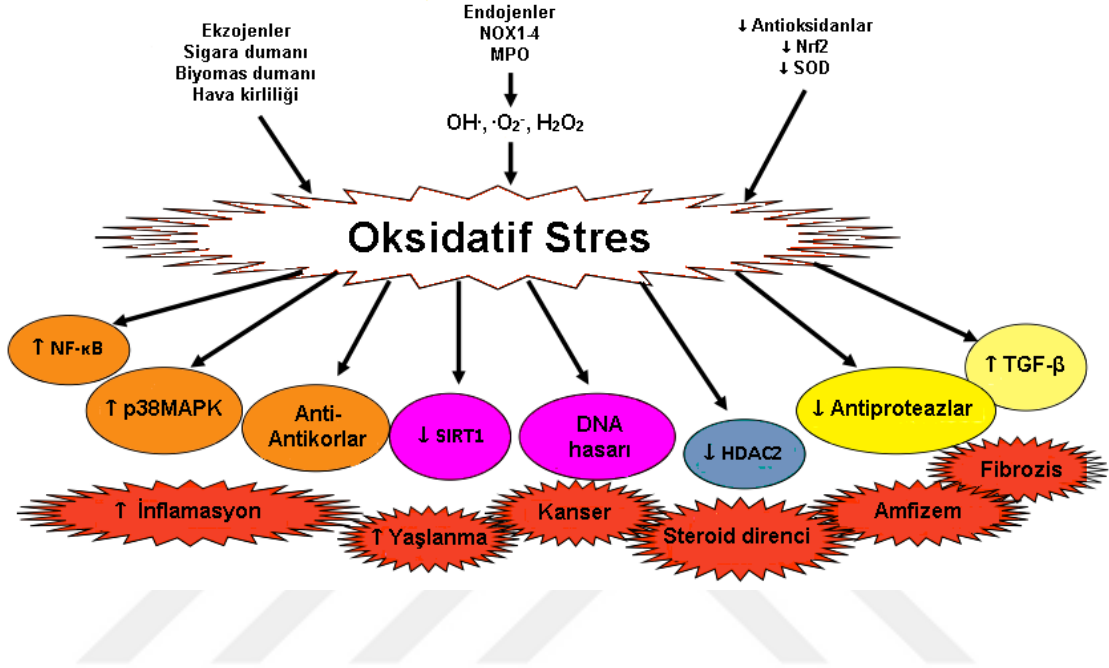
### 2.3.2.4 Oksidatif Stres

KOAH'lı hastaların hava yollarında aktivasyon sonrasında epitel hücreler, makrofajlar ve nötrofiller ROS üretirler. Süperoksit anyon ( $O_2^-$ ) nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) tarafından oluşturulur ve süperoksit dismutazlar tarafından hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )'e dönüştürülür.  $H_2O_2$ , katalaz tarafından suya dönüştürülür.  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  serbest demirin mevcudiyeti sayesinde yüksek reaktifli hidroksil radikal (OH) oluşturabilir.  $O_2^-$  ayrıca NO ile birleşip peroksitnitrit oluşturabilir. Oksidatif stres arakidonik asit oksidasyonu ve izoprostanların oluşmasına yol açarlar. Bunlar bronkokonstrüksiyon ve plazma eksüdayonu gibi önemli fonksiyonel etkiler gösterirler (88).

İnsan solunum yolları normal oksidan oluşumlarına karşı katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon gibi antioksidan mekanizmalarıyla engel olmaya çalışırlar. Önemli antioksidanlar; özellikle glutatyon peroksidaz, C vitamini (askorbik asit) ve Vitamin E (alfa-tokoferol), ürik asit, laktoferrin ve hücre dışı SOD3 gibi ekstraselüler antioksidanlardır (74).

Transkripsiyon faktörü Nrf2 azalması, NADPH oksidaz aktivasyonu, miyeloperoksidaz (MPO) ve SOD'ın azalması gibi durumlar KOAH'da oksidatif stresi artırabilir. KOAH'da oksidatif stresi hareket ettirici mekanizmalar; pro-enflamatuar transkripsiyon faktör nükleer faktör-kappa B (NF-kB) aktivasyonu, p38 mitojen aktive protein kinaz (MAPK), karbonilatlı proteinler için oto antikorların üretimi, düşük Sirtuin-1 (SIRT1),

DNA hasarı, düşük histon deasetilaz (HDAC) -2, indirgenmiş antiproteazlar ve artmış TGF- $\beta$  gibi olaylar sonucunda birçok fonksiyonel bozukluk meydana gelir (Resim 7) (74).



Resim 7. KOAH'da oksidatif stres (74).

### 2.3.3 KOAH Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

#### 2.3.3.1 Formoterol

Formoterol selektif bir  $\beta_2$ - adreno reseptör agonistidir. Geri dönüşümlü obstrüktif solunum yolu hastalığı olan hastalarda etkili doz sayesinde 12 saate kadar bronkodilatasyon sağlar (89).

$\beta_2$ - adreno reseptör agonistleri son zamanlarda astımda hava yolu tıkanıklığını gidermek için kullanılan bronkodilatör ilaçların en yaygın olarak kullanılan grubudur. Bu  $\beta_2$ - agonistleri cAMP düzeylerinin yükselmesini uyarmaktadır. Bu sayede dokularda adenilat siklaz aktivasyonu üzerinden uyarıcı G protein (Gs) artışı gerçekleşmektedir. Havayolu düz kasında artmış hücresel cAMP birikimi, cAMP bağımlı protein kinaz



A'yı (PKA) uyararak düz kasların gevşemesini sağlar (90). Ayrıca PKA uyarılması silyalı hücrelerdeki silyaların hareketini artırmaktadır (53).

### **2.3.3.2 Roflumilast**

Tarihsel olarak KOAH tedavisi için bronkodilatörler ( $\beta$ 2-agonistler, antikolinergikler ve metilksantin) ve anti-inflamatuar ajanlar (inhale ve oral kortikosteroidler) kullanılmaktadır. İnhal kortikosteroid tedavisi şiddetli KOAH ( $FEV_1 < \%60$ ) hastaların semptomlarını, akciğer fonksiyonlarını ve yaşam kalitelerini iyileştirmek ve ataklarını azaltmak için verilmektedir. Fosfodiesteraz-4 (PDE-4) inhibitörü roflumilast, KOAH ile ilişkili kademeli ve kalıcı hava akımı kısıtlılığında sorumlu inflamatuvar hücreleri baskılayarak yeni tedavi olanakları sunmaktadır (91). Peter ve ark 'nın yaptığı bir çalışmada, bir yıl içerisinde 1,513 (ortalama post-bronkodilatör  $FEV_1$ 'i %41) hastaya oral olarak günde 500  $\mu$ g roflumilast verildikten sonra kontrol gruplarına göre post-bronkodilatör  $FEV_1$  39ml artmış ve alevlenmelerde anlamlı düşüş gerçekleşmiştir (92).

Fosfodiesteraz (PDE) enzimleri cAMP ve cGMP' nin yıkılmasını katalize etmektedir. Roflumilast ise PDE4 enziminin güçlü ve kompetitif inhibitörüdür (93). PDE4 inhibitörleri, PKA aktivasyonunu sağlayan cAMP 'nin yıkımını engellemektedir (91). cAMP ve cGMP hücre içerisinde ikincil habercilerdir. Bunlar hücre poliferasyonu ve farklılaşmasını, metabolizmayı, damar ve hava yolu düz kas gevşemesini, salgı ve inflamatuvar mediyatörlerin salınmasını düzenlemektedir (94).

### **3 GEREÇ ve YÖNTEM**

Bu tez çalışması Mart 2015-Ağustos 2016 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Eğitim ve Araştırma Hastanesi bünyesinde faaliyet gösteren Hücre Kültür Laboratuvarında yürütüldü. Tez çalışmasında Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göğüs Cerrahisi Servisinde çeşitli nedenlerden dolayı lobektomi veya pnömonektomi uygulanmış hastaların cerrahi eksplantlarından elde edilen primer bronş epitel hücreleri kullanıldı. Hücreler Kapsaisine 24 saat maruz bırakılarak 0., 15dk., 30dk., 1., 2., 4., 6. ve 24. saatlerdeki silya titreşim frekansı (STF) ve transepitelyal elektrik direnç (TED) ölçümleri gerçekleştirildi. Yirmi dördüncü saatin sonunda toplanan hücre kültür vasatında laktat dehidrogenaz (LDH), IL-8 ve GM-GSF analizi yapıldı. Çalışma için Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 10.11.2014 tarihli ve 2014/346 kararı ile izin alındı.

#### **3.1 Çalışma Hastaları**

Bu çalışmaya Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Uygulama ve Araştırma Hastanesi Göğüs Cerrahisi Kliniğine tümör gibi çeşitli nedenlerden dolayı başvuran ve KOAH için küresel girişim ('Global Initiative for Obstructive Lung Disease', GOLD) rehberine göre KOAH evreleri belirlenen KOAH'lı (7 hasta), sigara içen fakat KOAH gelişmeyen (13 hasta) ve kontrol grubu olarak sigara içmeyen ve KOAH gelişmeyen gönüllüler (5 hasta) alındı. Hastaların 4'i kadın, 18'i ise erkekti. Dokuların elde edildiği bireylerin demografik özellikleri Tablo 3'de verilmiştir.

**Tablo 3.** Hastaların demografik özellikleri

	<b>SİGARA İÇMEYEN</b>	<b>SİGARA İÇEN</b>	<b>KOAH</b>
<b>Cinsiyet</b>	4K+1E	13E	7E
<b>Yaş (ortalama)</b>	53	66	66
<b>Sigara Öyküsü (paket/yıl)</b>	-	55.9± 7,8**	67.1± 16**
<b>FEV<sub>1</sub></b>	96.2± 14,7	94.2± 4,2	61.9± 4,5** <sup>#</sup>
<b>FVC</b>	98.2± 14,4	99.7± 3,7	84.9± 8
<b>FEV<sub>1</sub>/FVC</b>	80.2± 1,7	76.5± 2	56.6± 5,1** <sup>#</sup>

Sigara içmeyen grup ile karşılaştırıldığında \*p<0,05 ve \*\*p<0,01; KOAH'lı hasta grubu ile sigaralı grup karşılaştırıldığında <sup>#</sup>p<0,01 ve <sup>#</sup>p<0,001. FEV<sub>1</sub>: Birinci saniyedeki zorlu ekspiratuar volüm, FVC: Zorlu vital kapasite.

### **3.2 Primer Bronş Epitel Hücre Kültüründe Kullanılan Besi yerleri ve Kültür Malzemesi**

#### **3.2.1 Taşıma Vasatı**

50 ml Medyum 199 (M199) (Sigma, İnterlab, Türkiye) üzerine 50 µl gentamisin (80 mg/ml) eklenerek hazırlandı.

#### **3.2.2 Fotal Buzağı Serumlu Vasatı ('fetal calf serum', FCS)**

374 ml M199 (Sigma), 10 ml Fetal Calf Serum (Sigma), 4 ml bovine pankreatik insülin (25 mg/100 ml) (Sigma), 4 ml hidrokortizon (3,6 mg/100 ml) (Sigma), 4 ml insan transferrin (25 mg/100 ml) (Sigma) 120 µl epidermal büyüme faktörü (0,1 mg/2 ml)

(Becton Dickinson, Starmed, Türkiye) ve 4 ml Antibiyotik (Sigma) eklendi. Bu karışım 0,25 µm por çaplı filtreden vakum sistemi (Thermo, İnterlab, Türkiye) kullanılarak filtre edildi.

### **3.2.3 Nu Serum IV Vasat**

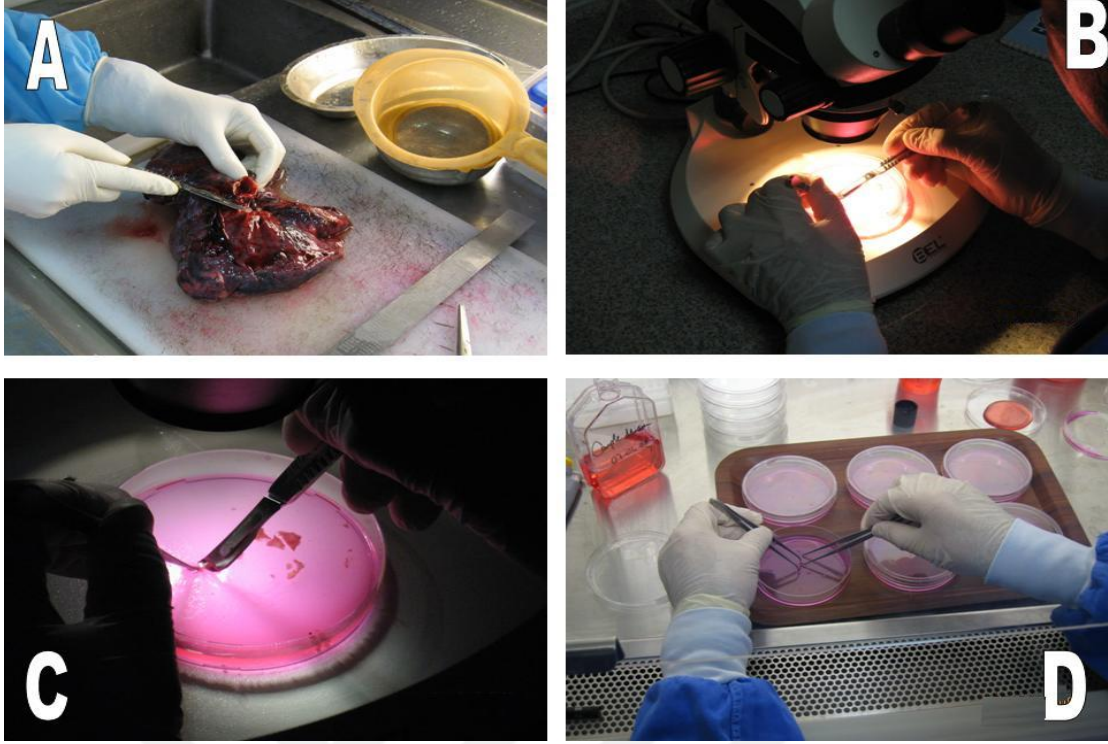
NS vasat ile FCS'li vasat hazırlanma işlemi büyük oranda benzer. Farklı olarak kültür vasatına FCS yerine 10 ml Nu-S IV (Becton Dickinson) eklendi.

### **3.2.4 Serumsuz ('Serum Free', SF) Vasat**

396 ml M199 ve 4 ml antibiyotik-antimikotik solüsyon (Gibco, Medsantek, Türkiye) karışımıyla elde edildi.

## **3.3 Bronş Dokusunun Diseksiyonu**

Göğüs cerrahi uzmanları tarafından lobektomi veya pnömonektomi uygulanan hastalardan cerrahi olarak alınan kesitler Patoloji Laboratuvarına götürüldü. Uzman patolog tarafından bronş dokusu cerrahi sınır dışında kalan sağlıklı bölgeden alınarak taşıma vasatı içerisinde Hücre Kültür Laboratuvarına getirildi. Getirilen doku steril ortam sağlayan kabin içerisinde taşıma vasatı (TV) ile yıkanarak diseksiyon mikroskopunda epitel sub-epitelyumdan ayrıştırıldı. Ayrılan bronş epitel dokusu, tekrar TV ile yıkanarak, 1-2 mm<sup>3</sup> lik parçalara bölündü.



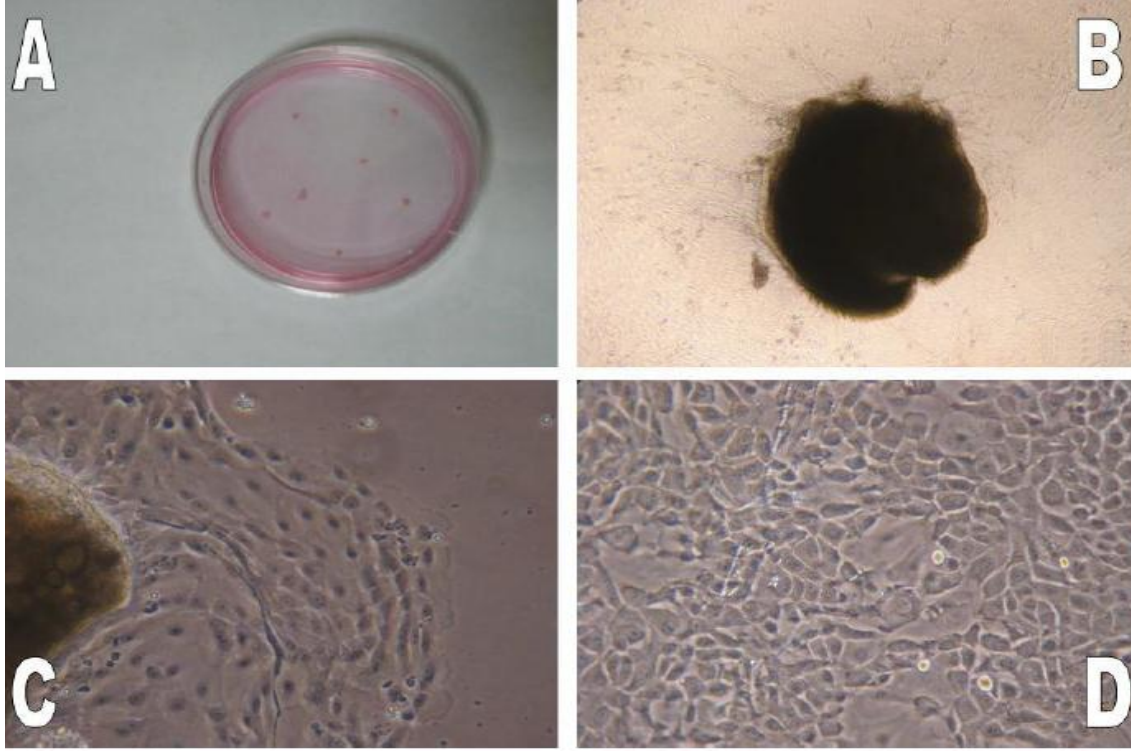
**Resim 8.** Bronş epitel dokusunun elde edilmesi: Lobektomi veya pnömonektomi uygulanmış hastanın akciğer dokusundan bronş dokusunun alınması; (A). Diseksiyon mikroskobu altında bronş dokusundan epitel tabakasının ayrılması; (B). Epitelyum dokusunun küçük parçalara bölünmesi; (C). Bölünen epitelyum eksplantlarının hücre kültür ortamına ekimi; (D)(95).

### 3.3.1 Primer Bronş Epitel Hücre Kültürü ve Yürütülen Deneyler

#### 3.3.1.1 Silya Titreşim Frekans Ölçümü

Bronş epitel eksplantları, içinde 1,5 ml FCS vasat bulunan primer hücre kültür kaplarına (60X15 mm) (BD) her kaba 3-5 adet eksplant (1-2mm<sup>3</sup>) gelecek şekilde konuldu. Kültürler 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub>’li koşullar altında 5 gün boyunca inkübe edildiler. Beşinci günde kültürlerdeki vasat NS’lu vasat ile değiştirildi. Besiyeri değişimi silyaların tespit edilmesine kadar haftada 3 defa yapıldı. Silyalar 10-14 gün arasında tespit edildikten sonra deney için yerleri işaretlenip eksplantlar penset yardımı ile dikkatli biçimde uzaklaştırıldı.

Eksplantları alınmış bronş epitel kültürlerindeki NS vasat alınarak SF'li vasat ile değiştirildi. Kùltürler aynı koşullarda 24 saat inkübe edildikten sonra, 0 (%0,028 etanol içeren), 50, 125 ve 250 µM kapsaisin içeren vasata maruz bırakıldılar. Başlangıçta, 15. dak, 30. dak, 1., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde STF ölçüldü. Bundan başka, paralel deneylerde, formoterol ve roflumilastın kapsaisinden etkilenen STF'ı üzerinde koruyucu bir etkisinin olup olmadığını anlamak için, bir grup kültür 250µM kapsaisin ile birlikte 1µM formoterol veya 0,1µM roflumilasta maruz bırakıldılar. Formoterol ve roflumilasta çözdürmede kullanılan %0,015 DMSO'a maruz bırakılan kùltürler kontrol olarak kullanıldı. STF 0., 15. dak, 30. dak, 1., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde kaydedildi. STF ölçümünde Sisson-Ammons görüntü analiz sistemi (SAVA) (Ammons Engineering, Clio, MI, ABD) kullanıldı. Kısaca, faz-kontrast mikroskopunda (Nikon Eclipse TS100) X10 büyütme ile elde edilen görüntüler dijital bir video kamera tarafından bilgisayar monitörüne transfer edildi. İşaretlenen alanlardaki STF hızı, saniyede 30 kare, sıcaklık  $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , alan sayısı 64, büyütme X1, frekans netliği 0.469 ve video uzunluğu 2,1 saniye seçilerek kaydedildi. Görüntülenen silya sayısı, video görüntüsü, standart hata, sıcaklık ve silyaların saniyedeki ortalama titreşim frekans (Hertz, Hz) verileri de bilgisayara kaydedildi. Sonuçta, her kùltür için Hz cinsinde bir değer elde edildi. Kùltürler arasındaki varyasyon nedeniyle istatistiksel analizlerde STF'deki değişim dikkate alındı. Zaman içindeki STF değişimi de her zaman diliminde elde edilen değerler bazal değere (0. dak) bölünerek % değişim oranları elde edilmek suretiyle hesaplandı.



**Resim 9.** Bronş epitelyumu hücre kültürünün aşamaları: Küçük parçalara ayrılan bronş epitelyum dokusunun hücre kültür kaplarına ekimi, (A). Ekimden sonraki birinci haftada doku parçasından çevreye doğru üremeye başlayan bronş epitel hücrelerinin faz-kontrast mikroskopundaki görüntüsü (X40) (B) ve (X100) (C). 2. haftada hücrelerin kültür ortamındaki görünüşü (X100), (D) (95).

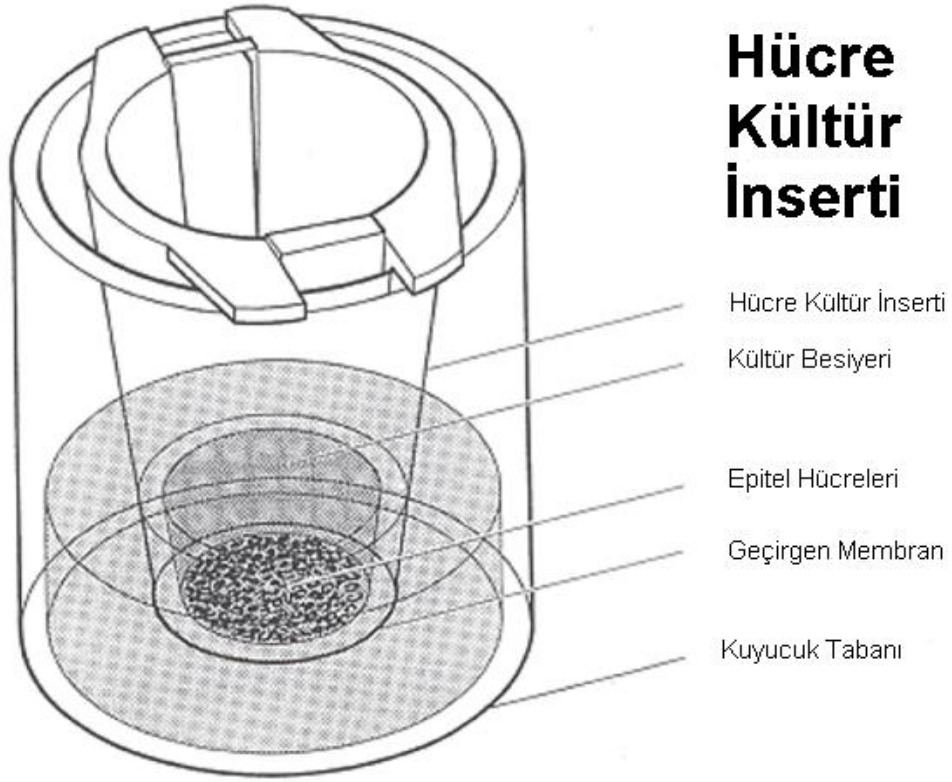
### 3.3.1.2 Trans Epitelyal Elektriksel Direnç Ölçümü

Trans Epitelyal Elektriksel Direnç (TED) ölçümü için hava-sıvı ara yüz ('air-liquid interface', ALI) kültür yöntemi ile primer BEH kültürleri elde edildi. ALI kültür yönteminde hücreler apikal yönde hava ile temas ederken, bazo-lateral yönde kültür vasatı ile temas etmekte, böylece in vivo ortamda epitel hücrelerinin içinde buldukları ortam sağlanmaktadır (Şekil 1). ALI kültürleri elde edilirken kısaca, 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına (Corning, SYS Medikal, Türkiye) 400'er µl, bu kuyucuklar içine yerleştirilen içine 2-3 adet bronş epitel eksplantı konan hücre kültür insertlerine (Corning) 200'er µl FCS'li vasat eklendi. Kültürler 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 5 gün inkübe edildiler. Daha sonra, kuyucuklarda ve insertlerdeki FCS' li vasat aspire edilerek, insertler vasatsız bırakılırken, kuyucuklara 400 µl NS içeren vasat kondu. Besiyeri değişimi hücreler membranının yüzeyini tamamen kaplayıncaya kadar gün aşırı

yapıldı. 3-4 haftanın sonunda kültürler deneylerde kullanılmaya hazır hale geldiler ve kültürlerdeki eksplantlar bir penset yardımı ile dikkatli biçimde uzaklaştırıldı. Kültürler, eksplantların bıraktığı boşluklar kapanıncaya kadar 3-4 gün daha inkübatörde sürdürüldüler.

Kültürler deneye alınmadan önce 24 saat SF içinde inkübe edildiler. Daha sonra STF deneylerinde ayrıntılı olarak anlatıldığı üzere, 0, 50, 250, 500 $\mu$ M kapsaisine maruz bırakılarak 0., 1., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde TED ölçümü yapıldı. STF deneylerinde olduğu gibi paralel deneylerde, hazırlanan kültürler 500 $\mu$ M kapsaisin varlığında 1 $\mu$ M formoterol veya 0,1 $\mu$ M roflumilasta maruz bırakılarak TED 0., 1., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde ölçüldü. TED ölçümü, EVOM<sup>2</sup> (WPI World Precision Instruments, Almanya) cihazı ile STX2 elektrotlarının kısa olan insert içerisine, uzun olan kuyucuk içerisine uygulanmak suretiyle gerçekleştirildi. Ölçüm yapılmadan önce hücreler oda sıcaklığında 5 dk bekletilerek ortam şartlarına adaptasyonu sağlandı. Kültürler arasındaki varyasyon nedeniyle, STF deneylerinde yapıldığı gibi, istatistiksel analizlerde TED'deki değişim dikkate alındı. Her zaman diliminde elde edilen TED değerleri bazal değere (0. dak) bölünerek % değişim oranları hesaplandı. 24. Saatteki ölçümden sonra, insert ve kuyucukların içindeki vasat toplanarak GM-CSF, IL-8 ve LDH analizlerinde kullanılmak üzere -80°C'de saklandı. İntert membranları da yerinden kesilmek suretiyle alınarak, total protein analizi için -80°C'de saklandı.





**Resim 10.** 0,8 mm çaplı 24 gözlü, 0,4 µm por çaplı hücre kültür 'insert' diyagramı (96).

### 3.4 Kapsaisin Süspansiyonunun Hazırlanması

Kapsaisin etanol (Sigma, İnterlab, Türkiye) içerisinde çözünüp SF'li vasat ile 50, 125, 250 ve 500 µM derişimlerinde hazırlandı ve deneylerde kullanıldı. Ayrıca negatif kontrolde kullanılmak üzere en yüksek kapsaisin konsantrasyonunda (500 µM) bulunan etanol oranını (%0,028) içeren solüsyon hazırlandı.

### 3.5 Formoterol ve Roflumilast Süspansiyonunun Hazırlanması

Formoterol ve roflumilast Tocris firmasından (Medsantek, Türkiye) temin edilerek, DMSO içinde çözdürüldü. Kullanılan en yüksek DMSO konsantrasyonunu (%0,015) içeren bir solüsyon da negatif kontrol olarak kullanıldı. Formoterol (1µM) ve

roflumilast (0.,1 $\mu$ M) 250 $\mu$ M (STF deneyleri) veya 500 $\mu$ M (TED deneyleri) kapsaisin içeren solüsyonlarda hazırlanarak söz konusu çalışmalarda kullanıldılar.

### **3.6 Total Protein Analizi**

İnsertlerin üzerinde bulunan hücrelerdeki total protein miktarı protein analiz kiti (total protein kit) (İnvitrogen, Medsantek, Türkiye) üreticinin önerdiği protokol kullanılmak suretiyle çalışıldı. Hazırlanan örnekler Qubit florometrede (İnvitrogen, Medsantek, Türkiye) 260-280 nm dalga boyları arasında okutulup total protein miktarları belirlendi. LDH (I.U), IL-8 (pg) ve GM-CSF (pg) düzeyleri her kültürdeki toplam protein miktarına ( $\mu$ g) oranlanmak suretiyle ifade edildi.

### **3.7 Laktat Dehidrogenaz (LDH)**

TED deneyleri sonunda toplanan kültür vasatında LDH düzeyleri uygun kitler (Sigma) kullanılmak suretiyle üretici firmanın önerdiği protokole göre çalışıldı. LDH düzeyi örnekler spektrofotometrede (Bio- Tek Instrument Ins., ABD), 540-570 nm dalga boyları arasında okutulup, KC-Junior (Bio- Tek Instrument Ins., ABD) yazılımı kullanılmak suretiyle hesaplandı. Kültürlerdeki LDH düzeyi, belirlenen protein düzeyi ile standardize edilerek I.U. LDH/ $\mu$ g hücresel protein olarak ifade edildi.

### **3.8 ELISA (Enzime Bağlı Immuno Sorbent Deneyi)**

IL-8 ve GM-CSF düzeyleri TED deneylerinin sonunda saklanan hücre kültür vasatı ELISA kitleri (R&D System Duoset, Starmed, Türkiye) kullanılmak üzere, üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı. Sitokinlerin düzeyi örnekler spektrofotometrede (Bio-Tek Instruments Inc., ABD), 540-570 nm dalga boyları arasında okutulup, KC-Junior (Bio- Tek Instruments Inc., ABD) yazılımı kullanılmak suretiyle hesaplandı. Kültürlerdeki sitokin düzeyi, belirlenen protein düzeyi ile standardize edilerek pg sitokin/ $\mu$ g hücresel protein olarak ifade edildi.

### 3.9 İstatiksel Analiz

İlk aşamada, hücre geçirgenliği, siliyer aktivite, toksisite ve inflamatuvar verilerin normal dağılımlı olup olmadıklarına "D'Agostino & Pearson omnibus normality test" kullanılarak bakıldı. Non-parametrik veriler için Kruskal-Wallis testi ile Dunnett's çoklu karşılaştırma testi (Dunnett's Multiple Comparison Test) yapıldı. Parametrik veriler için; tek yönlü varyans analizinin (One-way analysis of variance, ANOVA) tek yönlü olağan, basit (Ordinary one-way ANOVA) ile Dunnett's çoklu karşılaştırma testi (Dunnett's Multiple Comparison Test) uygulandı. Aynı verilerin hasta grupları arasındaki analizleri aynı yöntem doğrultusunda analiz edildi. Her test grubu uygun kontrol gruplarıyla karşılaştırılıp, 0.05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hatanın ortalaması veya ortanca ile %25-75 yüzdeler (persentil) değerleri ile ifade edildi. Elde edilen tüm verilerin değerlendirmeleri GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc. USA) yazılımı kullanılarak yapıldı.

## 4 BULGULAR

### 4.1 İnsan Akciğer Bronş Epitel Hücre Kültürü

Uygun kültür şartlarına alınan doku parçalarının 6-7. günün sonunda kültür kaplarına veya insert'lere tutunup çoğalmaya başladıkları gözlemlendi. Ortalama 2 haftanın sonunda silya oluşumu gösteren kültürler ve 4. hafta içerisinde %100 çoğalmayı tamamlayan insert kültürleri deneylerde kullanıldı. Bu şartları sağlamayan kültürler deneylerde kullanılmadı.

### 4.2 Kapsaisin'in Sigara İçmeyen, Sigara İçicisi ve KOAH'lı Hastaların Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi.

Kapsaisinin 250 µM dozu sigara içmeyen bireylerin BEH kültürlerinin TED'ni kontrol grubuna göre 1. ve 6. saatte anlamlı olarak artırırken 24. saatte anlamlı olarak azalttı. Kapsaisinin 500 µM dozu ise TED'i 1. saatte anlamlı olarak artırdı ve 24. saatte anlamlı olarak azalttı (Şekil 1A; Tablo 4).

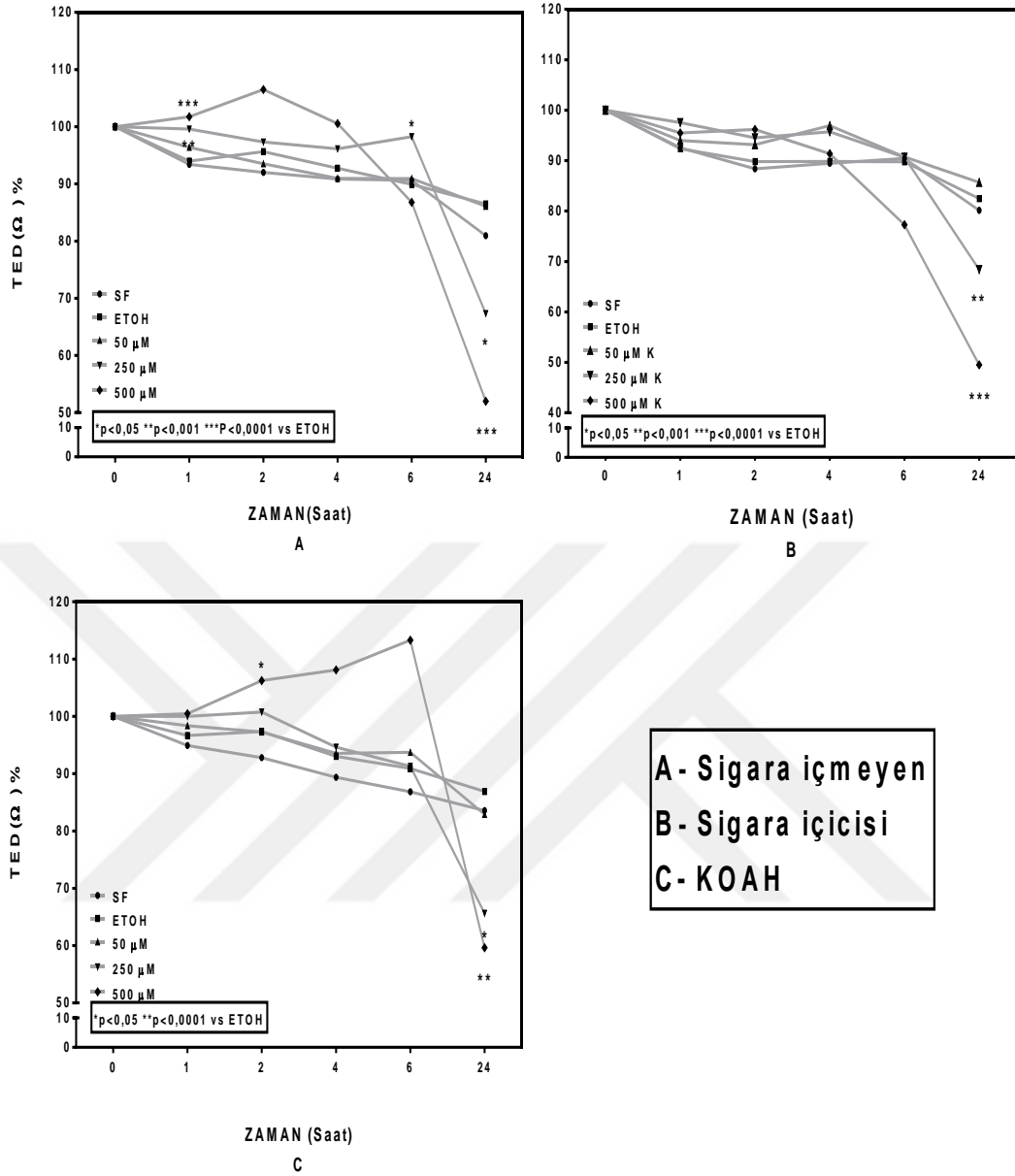
Kapsaisinin 250 ve 500 µM gibi yüksek dozları sigara içicisi bireylerin BEH kültürlerinin TED'ni kontrol grubuna göre 24. saatte anlamlı olarak azalttı (Şekil 1B; Tablo 4).

Kapsaisinin 250 µM dozu KOAH'lı bireylerin BEH kültürlerinin TED'ni kontrol grubuna göre 24. saatte anlamlı olarak azalttı. Kapsaisinin 500 µM dozu ise TED'i 2. saatte anlamlı olarak artırdı ve 24. saatte anlamlı olarak azalttı (Şekil 1C; Tablo 4). Bunların haricinde bulunan dozlar ve saat dilimlerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi.

**Tablo 4.** Kapsaisinın sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH Kültürlerinin TED'e etkisi (Ortanca değerler).

	<b>Kapsaisin (<math>\mu</math>M)</b>	<b>T0 (%)</b>	<b>T1 (%)</b>	<b>T2 (%)</b>	<b>T4 (%)</b>	<b>T6 (%)</b>	<b>T24(%)</b>
<b>S İ G A R A S I Z</b>	<b>0</b>	100,0	93,42	92,02	89,58	89,63	80,95
	<b>Etanol</b>	100,0	93,99	94,67	92,75	89,94	86,50
	<b>50</b>	100,0	95,80	93,67	91,13	89,83	85,91
	<b>250</b>	100,0	99,35**	98,75	99,14	96,61*	79,43*
	<b>500</b>	100,0	101,5***	97,12	93,24	86,80	56,23****
<b>S İ G A R A L I</b>	<b>0</b>	100,0	92,56	88,40	89,48	90,43	80,16
	<b>Etanol</b>	100,0	92,38	89,80	89,84	89,78	82,47
	<b>50</b>	100,0	93,98	93,15	96,95	90,72	85,69
	<b>250</b>	100,0	97,53	94,52	95,73	90,67	68,41**
	<b>500</b>	100,0	95,50	96,19	91,36	77,28	49,52****
<b>K O A H</b>	<b>0</b>	100,0	94,92	93,04	89,37	86,84	83,57
	<b>Etanol</b>	100,0	96,17	97,29	93,02	90,75	86,37
	<b>50</b>	100,0	98,20	97,28	93,56	92,43	83,72
	<b>250</b>	100,0	101,1	100,2	97,13	94,89	74,47*
	<b>500</b>	100,0	100,0	106,3*	99,83	105,7	57,56****

Kontrol grubuna(etanol) göre kıyaslandığında; \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.



**Şekil 1.** Kapsaisin'in sigara içmeyen (A), sigara içicisi (B) ve KOAH gelişen (C) hasta gruplarının BEH kültürlerinin transepitelyal elektrik direncine etkisi.

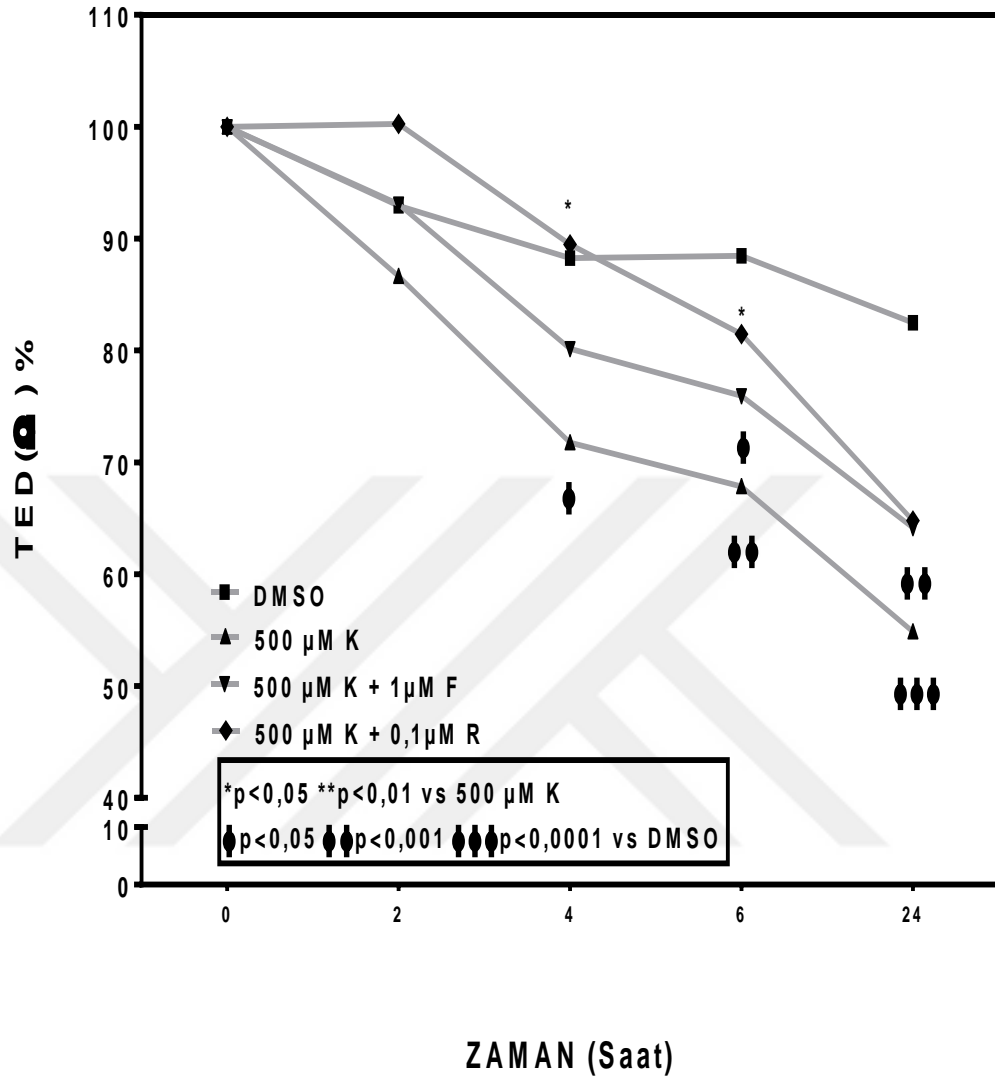
#### 4.3 Formoterol ve Roflumilastın Kapsaisinle İnkübe Edilen Sigara İçicisi Bireylerin Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektrik Direncine Etkisi

Kapsaisin 500 µM dozu sigara içicisi bireylerin BEH kültürlerinin TED'ni kontrol grubuna göre 4., 6. ve 24. saatlerde anlamlı olarak azalttı (Şekil 2; Tablo 5). Kapsaisin (500 µM) roflumilast (0,1 µM) varlığında da sigara içicisi bireylerin BEH kültürlerinin TED direncini kontrol grubuna göre 24. saatte anlamlı olarak azalttı (Şekil 2; Tablo 5). Ancak 500µM kapsaisin uygulanan kontrol grubuyla kıyaslandığında, roflumilastın (0,1 µM) kapsaisininin 4. ve 6. saatlerde TED'de yol açtığı düşüşü anlamlı olarak önlediği görüldü (Şekil 2; Tablo 5). Buna karşın formoterol kapsaisininin (500µM) TED'de yol açtığı düşüşü önleyemedi ve formoterol (1 µM) varlığında, bu ajan TED direncini kontrol grubuna göre 6. ve 24. saatlerde anlamlı olarak azalttı (Şekil 2; Tablo 5).

**Tablo 5.** Formoterol ve roflumilastın kapsaisin ile inkübe edilen sigara içicisi bireylerin BEH Kültürlerinin TED'ine etkisi (ortanca değerler).

	Kapsaisin (µM)	T0 (%)	T2 (%)	T4 (%)	T6 (%)	T24 (%)
S İ G A R A L I	DMSO	100,0	91,85	86,74	92,83	85,26
	500 K	100,0	85,16	70,08 <sup>φ</sup>	69,06 <sup>φφφ</sup>	51,66 <sup>φφφφ</sup>
	500 K + 1 F	100,0	89,65	79,62	78,86 <sup>φ</sup>	63,77 <sup>φφφ</sup>
	500 K + 0,1 R	100,0	98,05	88,74*	84,38*	63,86 <sup>φφφ</sup>

R; Roflumilast, F; Formoterol, K; Kapsaisin, DMSO: Dimetilsülfoksit, DMSO ile kıyaslandığında; <sup>φ</sup>p<0,05, <sup>φφφ</sup>p<0,001, <sup>φφφφ</sup>p<0,0001; Kapsaisin (500µM) ile kıyaslandığında; \*p<0,05.



**Şekil 2.** Formoterol ve Roflumilastın Kapsaisinle İnkübe Edilen Sigara İçicisi Bireylerin Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektrik Direncine Etkisi.



#### **4.4 Kapsaisinın Sigara İçmeyen, Sigara İçicisi ve KOAH Gelişen Hasta Gruplarının Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Silya Titreşim Frekansına Etkisi**

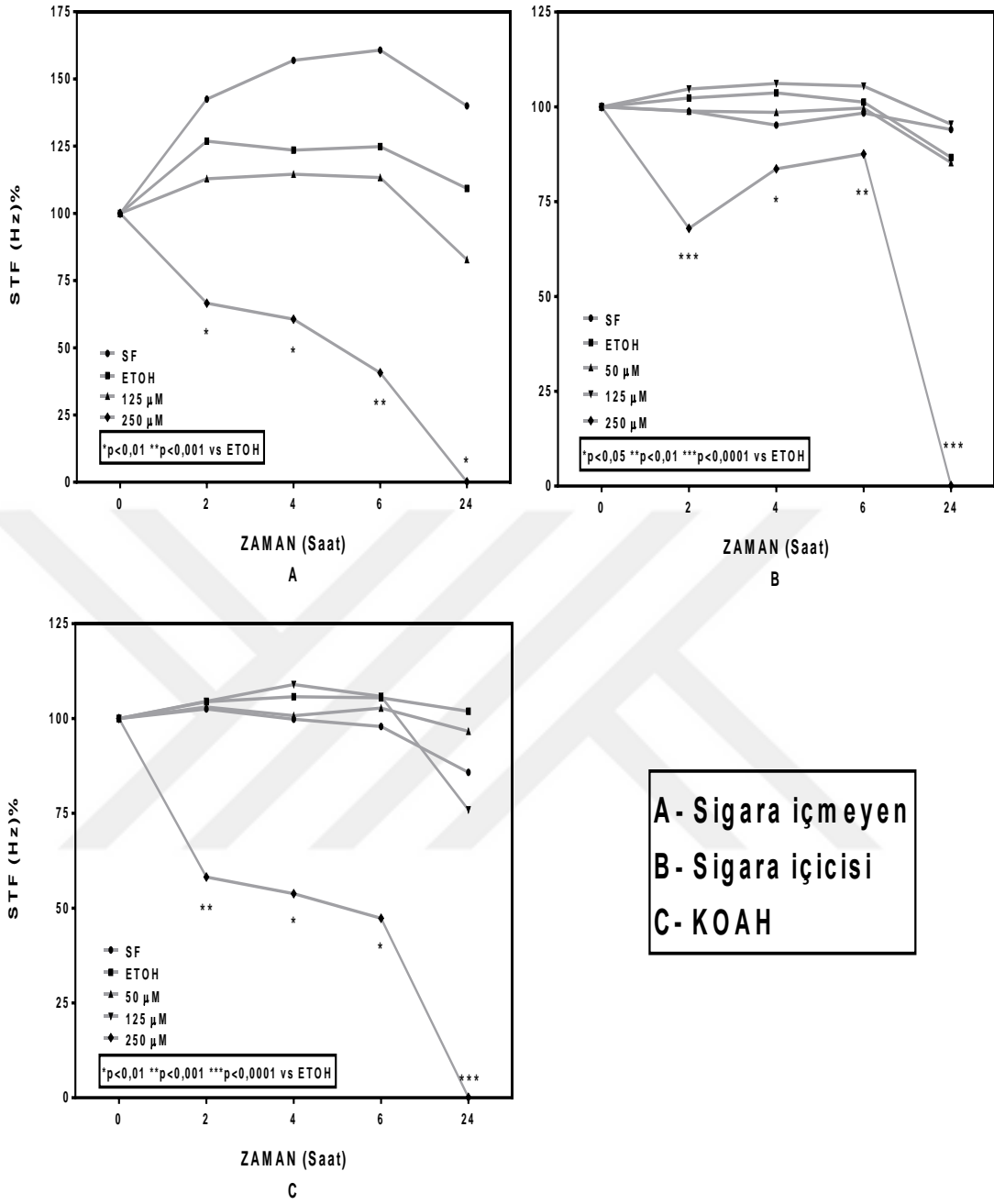
Kapsaisinın 250µM dozu sigara içmeyen bireylerin BEH kültürlerinin STF'ni kontrol grubuna göre 30. dak, 1., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde anlamlı olarak azalttı (Şekil 3A; Tablo 6). Benzer şekilde kapsaisin (250µM) sigara içicisi bireylerin BEH kültürlerinin STF'ni de kontrol grubuna göre 15., 30. dak ile 1., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde anlamlı olarak azalttı (Şekil 3B) (Tablo 6). Bundan başka, aynı doz kapsaisin KOAH'lı kültürlerin STF'nı çalışılan tüm zaman birimlerinde (15. dak-24. saat) anlamlı olarak azalttı (Tablo 6; Şekiller 3A, 3B, 3C, 4A, 4B, 4C).

Her 3 gruptaki BEH'nin bazal düzeyleri karşılaştırıldığında, sadece KOAH'lı hücrelerin STF'nin sigarasız gruba göre 0. ve 2. saatlerde anlamlı ölçüde yüksek olduğu görüldü (Şekil 5; Tablo 7).

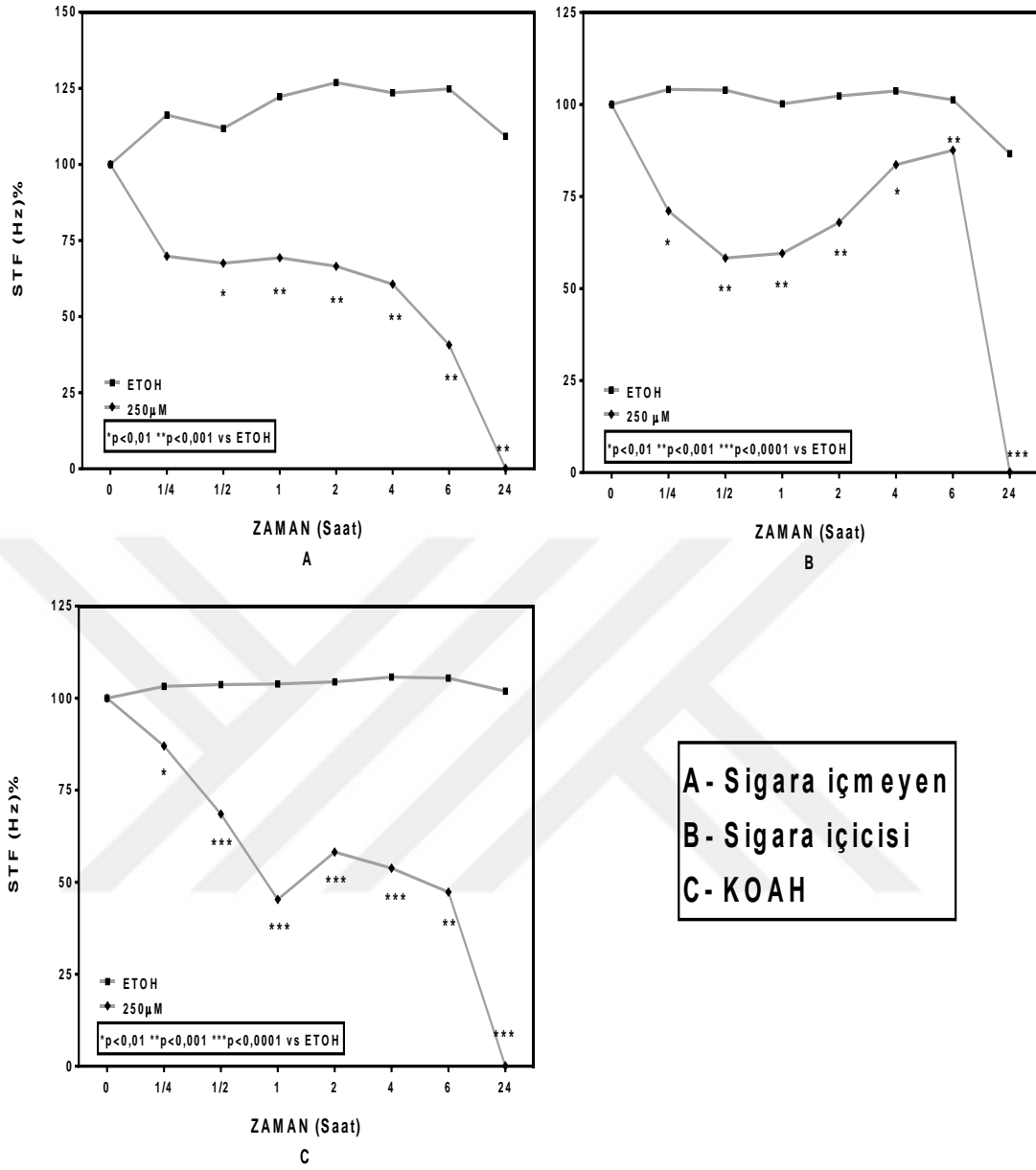
**Tablo 6.** Kapsaisinın sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH Kültürlerinde STF'ine etkisi (Ortanca değerler).

Kapsaisin ( $\mu\text{M}$ )		T0 (%)	T15.dk (%)	T30.dk (%)	T1s (%)	T2s (%)	T4s (%)	T6s (%)	T24s (%)
<b>S İ G A R A S I Z</b>	<b>0</b>	100			142,5	156,9	160,7	140,0	142,5
	<b>Etanol</b>	100	116,2	111,8	122,2	126,9	123,5	124,8	109,3
	<b>125</b>	100			112,9	114,6	113,3	82,79	112,9
	<b>250</b>	100	69,87	67,57**	69,32***	66,55**	60,65***	40,70***	0,1376**
<b>S İ G A R A L I</b>	<b>0</b>	100			98,85	95,17	98,38	94,03	100,0
	<b>Etanol</b>	100	104,1	103,9	100,2	102,3	103,7	101,3	86,64
	<b>50</b>	100			98,88	98,55	99,65	85,29	98,88
	<b>125</b>	100			104,7	106,1	105,5	95,43	104,7
<b>250</b>	100	71,09**	58,30***	59,57***	67,96****	83,65*	87,58**	0,174****	
<b>K O A H</b>	<b>0</b>	100			102,5	99,83	97,88	85,79	102,5
	<b>Etanol</b>	100	103,2	103,7	103,9	104,4	105,7	105,5	101,9
	<b>50</b>	100			103,0	100,7	102,7	96,63	103,0
	<b>125</b>	100			104,5	108,9	105,8	75,92	104,5
<b>250</b>	100	87,00**	68,55****	45,32****	58,19***	53,80**	47,33**	0,109****	

Kontrol grubuna(etanol) göre kıyaslandığında; \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.



**Şekil 3.** Kapsaisinin sigara içmeyen (A), sigara içicisi (B) ve KOAH gelişen (C) hasta gruplarının BEH kültürlerinin silya titreşim frekansına etkisi.

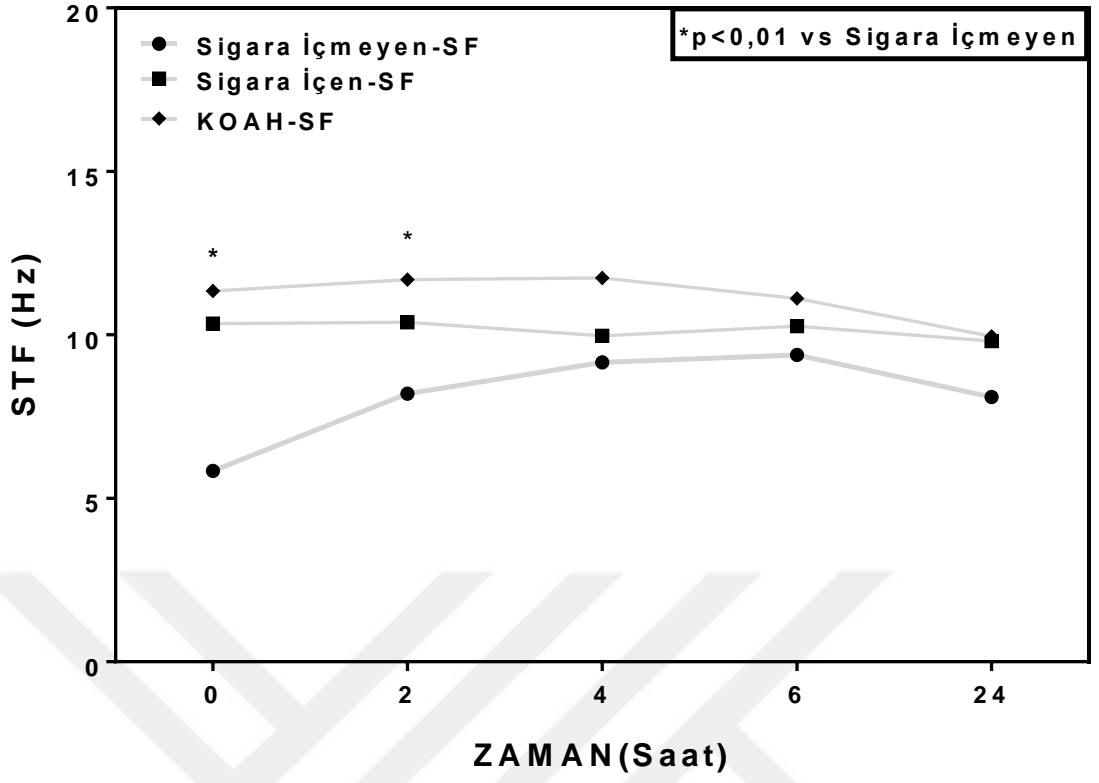


**Şekil 4.** Kapsaisinin sigara içmeyen (A), sigara içicisi (B) ve KOAH gelişen (C) hasta gruplarının BEH kültürlerinin 15.dk, 30.dk ve 1-24.saatlerde silya titreşim frekansına etkisi.

**Tablo 7.** Sigara İçmeyen, Sigara İçicisi ve KOAH Gelişen Hasta Gruplarının BEH Kùltürlerinin STF'nin Bazal Dùzeylerinin Karşılaştırılması (ortanca değerler).

<b>Hasta Grubu</b>	<b>T0 (Hz)</b>	<b>T2s (Hz)</b>	<b>T4s (Hz)</b>	<b>T6s (Hz)</b>	<b>T24s (Hz)</b>
<b>Sigarasız SF</b>	5,835	8,200	9,155	9,385	8,100
<b>Sigaralı SF</b>	10,09	9,680	9,780	10,23	9,785
<b>KOAH'lı SF</b>	11,79*	12,16*	11,77	11,54	9,970

SF: Serumsuz vasat, Hz: Hertz, Kontrol grubuna (Sigarasız) ile kıyaslandığında; \*p<0,05.



**Şekil 5.** Sigara İçmeyen, Sigara İçicisi ve KOAH Gelişen Hasta Gruplarının Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Silya Titreşim Frekansının Karşılaştırılması

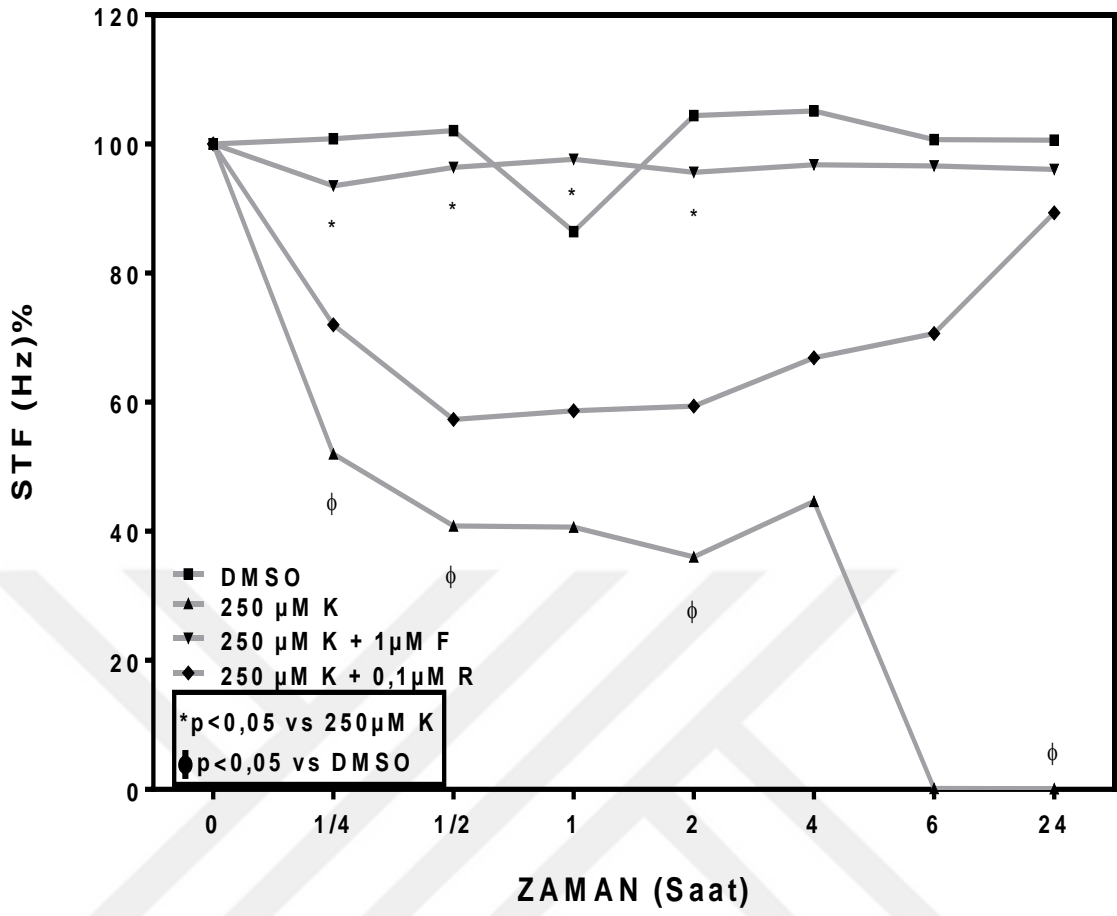
#### 4.5 Formoterol ve Roflumilastın Kapsaisinle İnkübe Edilen Sigara İçicisi Bireylerin Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Silya Titreşim Frekansına Etkisi.

Kapsaisinin 250 µM dozu sigara içicisi bireylerin BEH kültürlerinin STF'ni kontrol grubuna göre 15dk., 30dk., 2. ve 24. saatlerde anlamlı olarak azalttı. Formoterol (1µM) kapsaisinin (250µM) sigara içicisi bireylerin BEH kültürlerinin STF'da yol açtığı düşüşü 15dk., 30dk., 1. ve 2. saatlerde anlamlı olarak önledi. Ancak roflumilast herhangi bir etkide bulunmadı (Şekil 6; Tablo 8).

**Tablo 8.** Formoterol ve roflumilastın kapsaisin ile inkübe edilen sigara içicisi bireylerin BEH Kültürlerinin STF'ine etkisi (ortanca değerler).

Kapsaisin (µM)		T0s (%)	T15.dk (%)	T30.dk (%)	T1s (%)	T2s (%)	T4s (%)	T6s (%)	T24s (%)
S İ G A R A L I	DMSO	100	100,8	102,1	86,42	104,4	105,1	100,6	100,6
	250K	100	51,98 <sup>ϕ</sup>	40,83 <sup>ϕ</sup>	40,65	36,04 <sup>ϕ</sup>	44,61	0,136	0,126 <sup>ϕ</sup>
	250K + 1F	100	93,48*	96,35*	97,59*	95,57*	96,74	96,58	96,04
	250K + 0,1R	100	71,99	57,30	58,67	59,35	66,87	70,62	89,33

R; Roflimülast, F; Formoterol, K; Kapsaisin, DMSO: Dimetilsülfoksit, Kontrol grubu (DMSO) ile kıyaslandığında; <sup>ϕ</sup>p<0,05; 250 µM kapsaisin ile göre kıyaslandığında; \*p<0,05.



Şekil 6. Formoterol ve Roflumilast'ın Kapsaisinle İnkübe Edilen Sigara İçicisi Bireylerin Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Silya Titreşim Frekansına Etkisi



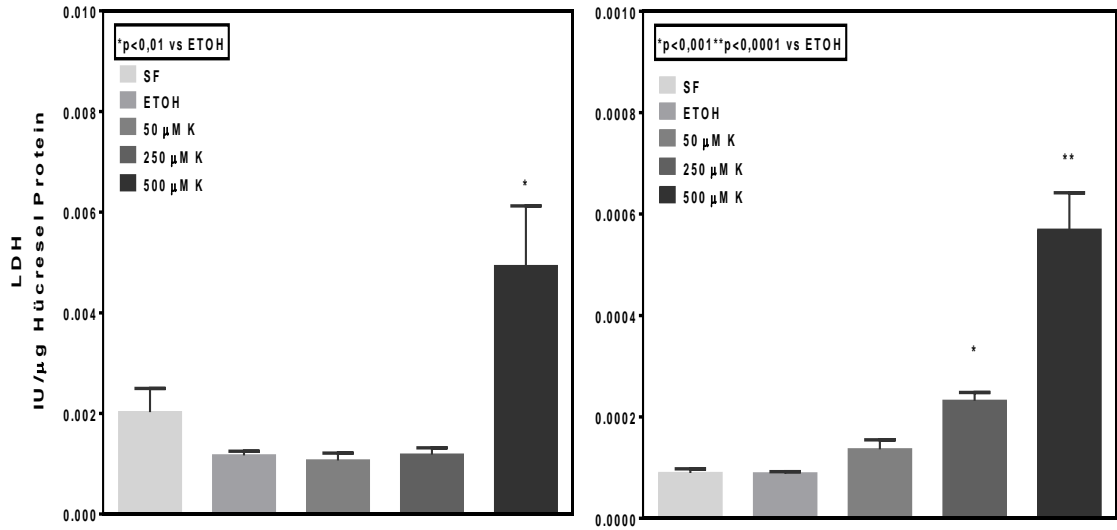
#### 4.6 Kapsaisinın Sigara İçmeyen, Sigara İçicisi ve KOAH Gelişen Hasta Gruplarının Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz (LDH) Salınımına Etkisi

Kapsaisinın sadece 500 µM dozu sigara içmeyen bireylerin ve KOAH'lıların BEH kültürlerinin LDH salınımını artırırken (Şekil 7A, 7C; Tablo 9), sigara içen bireylerde hem 250 hem de 500µM kapsaisin LDH salınımını artırdı (Şekil 7B; Tablo 9). Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, genel olarak sigara içen gruptaki LDH değerleri diğer gruplara göre düşüktü (Şekil 8; Tablo 10).

**Tablo 9.** Kapsaisinın sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH kültürlerinde LDH salınımına etkisi (Ortanca değerler).

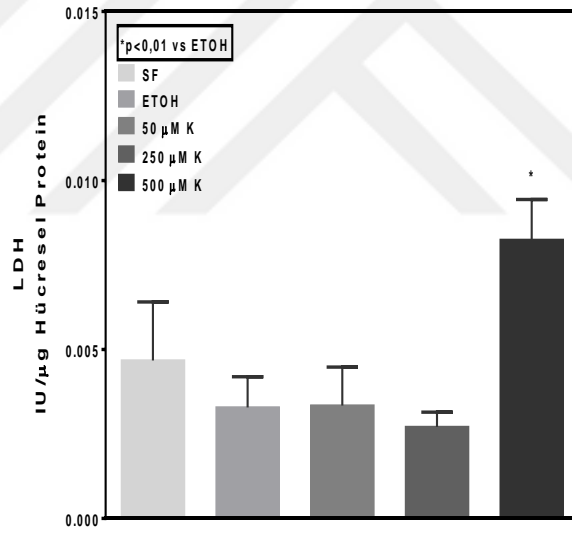
Kapsaisin (µM)	Sigarasız (IU/µg HP)	Sigaralı (IU/µg HP)	KOAH (IU/µg HP)
0	0,001309	0,000086	0,002289
Etanol	0,001154	0,0000905	0,002521
50	0,0009245	0,000100	0,002020
250	0,001030	0,0002175**	0,001937
500	0,004673*	0,000528***	0,007791*

HP: Hücresel protein, Kontrol grupları (etanol) ile kıyaslandığında \*p<0,01, \*\*p<0,001 ve \*\*\*p<0,0001.



A

B



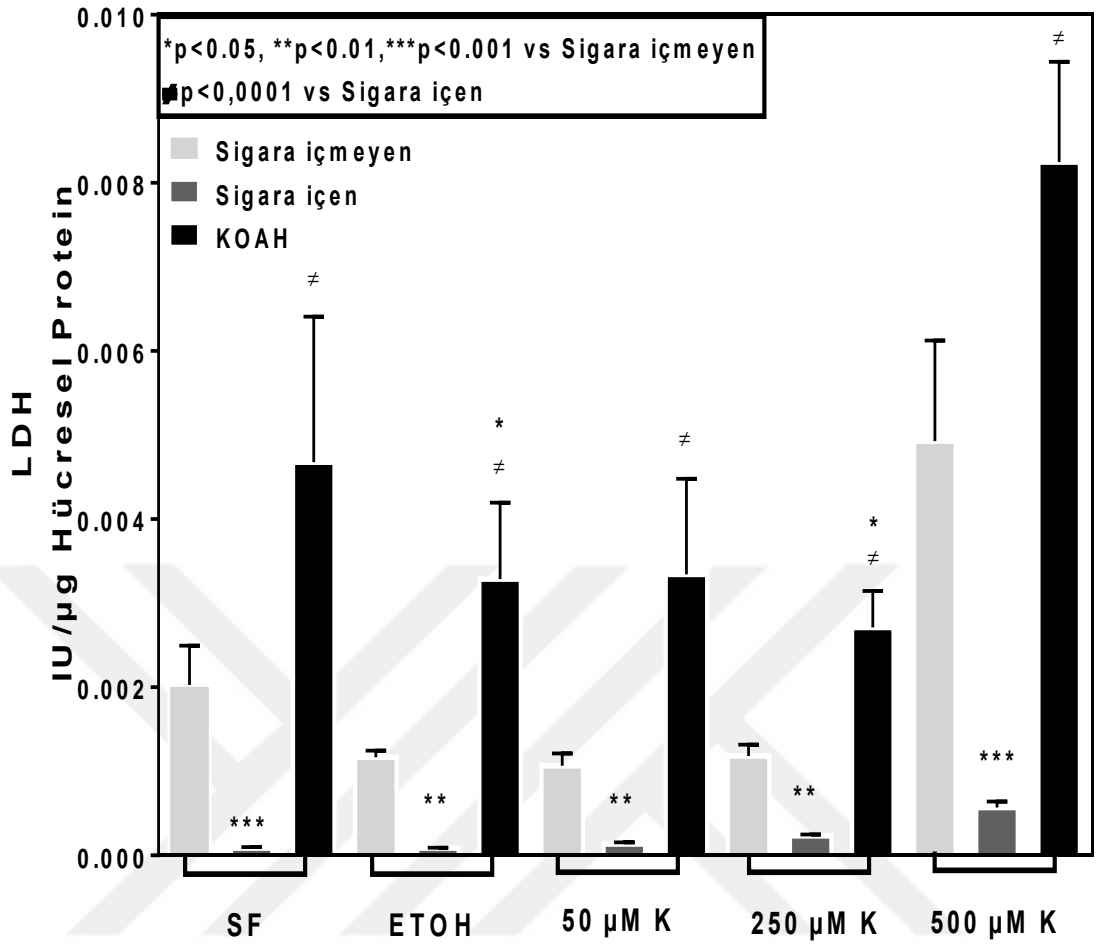
C

**Şekil 7.** Kapsaisinın sigara içmeyen (A), sigara içicisi (B) ve KOAH gelişen (C) hasta gruplarının BEH kültürlerinin LDH salınımına etkisi.

**Tablo 10.** Sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH kültürlerinden LDH salınımının karşılaştırılması (ortanca değerleri).

<b>Kapsaisin (µM)</b>	<b>Sigarasız (IU/µg HP)</b>	<b>Sigaralı (IU/µg HP)</b>	<b>KOAH (IU/µg HP)</b>
<b>0</b>	0,001309	0,000086***	0,002289 <sup>‡</sup>
<b>Etanol</b>	0,001154	0,0000905**	0,002521* <sup>‡</sup>
<b>50</b>	0,0009245	0,000100**	0,002020 <sup>‡</sup>
<b>250</b>	0,001030	0,0002175**	0,001937* <sup>‡</sup>
<b>500</b>	0,004673	0,000528***	0,007791 <sup>‡</sup>

HP: Hücresel protein, Kontrol grupları (sigarasız) ile kıyaslandığında \*p<0,05; \*\*p<0,01 ve \*\*\*p<0,001, sigara içen grup ile kıyaslandığında <sup>‡</sup>p<0,0001.



**Şekil 8.** Sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının bronş epitel hücre kültürlerinin LDH salınımının karşılaştırılması.

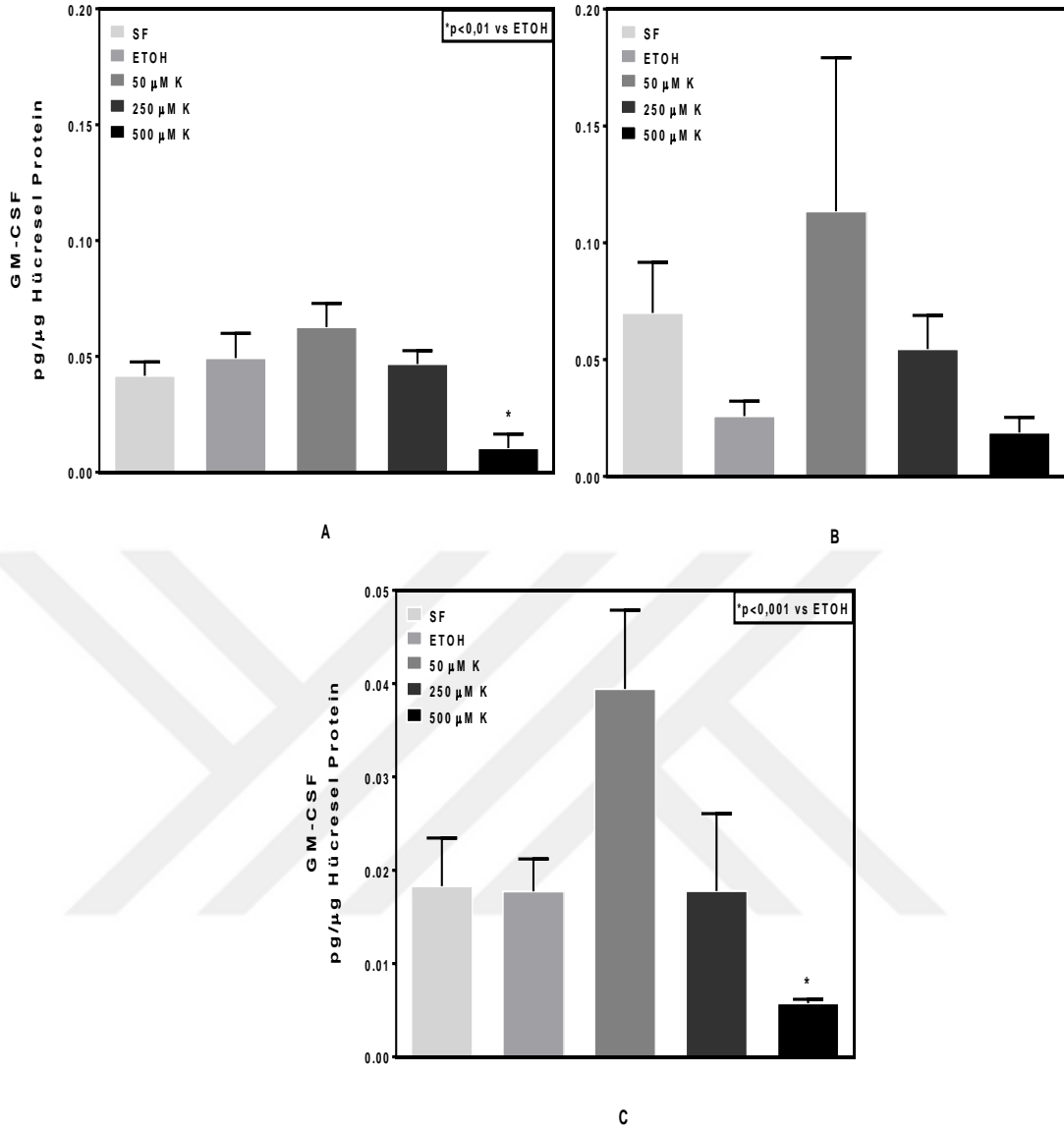
#### 4.7 Kapsaisinın Sigara İçmeyen, Sigara İçicisi ve KOAH'lı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden GM-CSF Salınımına Etkisi

Kapsaisinın 500 $\mu$ M dozu KOAH'lı ve sigara içmeyen bireylerin BEH kültürlerden GM-CSF salınımını anlamlı olarak azaltırken, diğer dozlarda anlamlı bir değişiklik görülmedi (Şekil 9; Tablo 11).

**Tablo 11.** Kapsaisinın sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH'lı bronş epitel hücre kültürlerinden GM-CSF salınımına etkisi (ortanca değerler).

<b>Kapsaisin (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Sigarasız (pg/<math>\mu</math>g HP)</b>	<b>Sigaralı (pg/<math>\mu</math>g HP)</b>	<b>KOAH (pg/<math>\mu</math>g HP)</b>
<b>0</b>	0,033760	0,04050	0,011080
<b>Etanol</b>	0,038430	0,01514	0,016520
<b>50</b>	0,057920	0,02959	0,029600
<b>250</b>	0,044500	0,03634	0,009280
<b>500</b>	0,002282*	0,01595	0,005229**

HP: Hücresel protein, Kontrol grubuna (etanol) göre kıyaslandığında \*p<0,01 ve \*\*p<0,001.



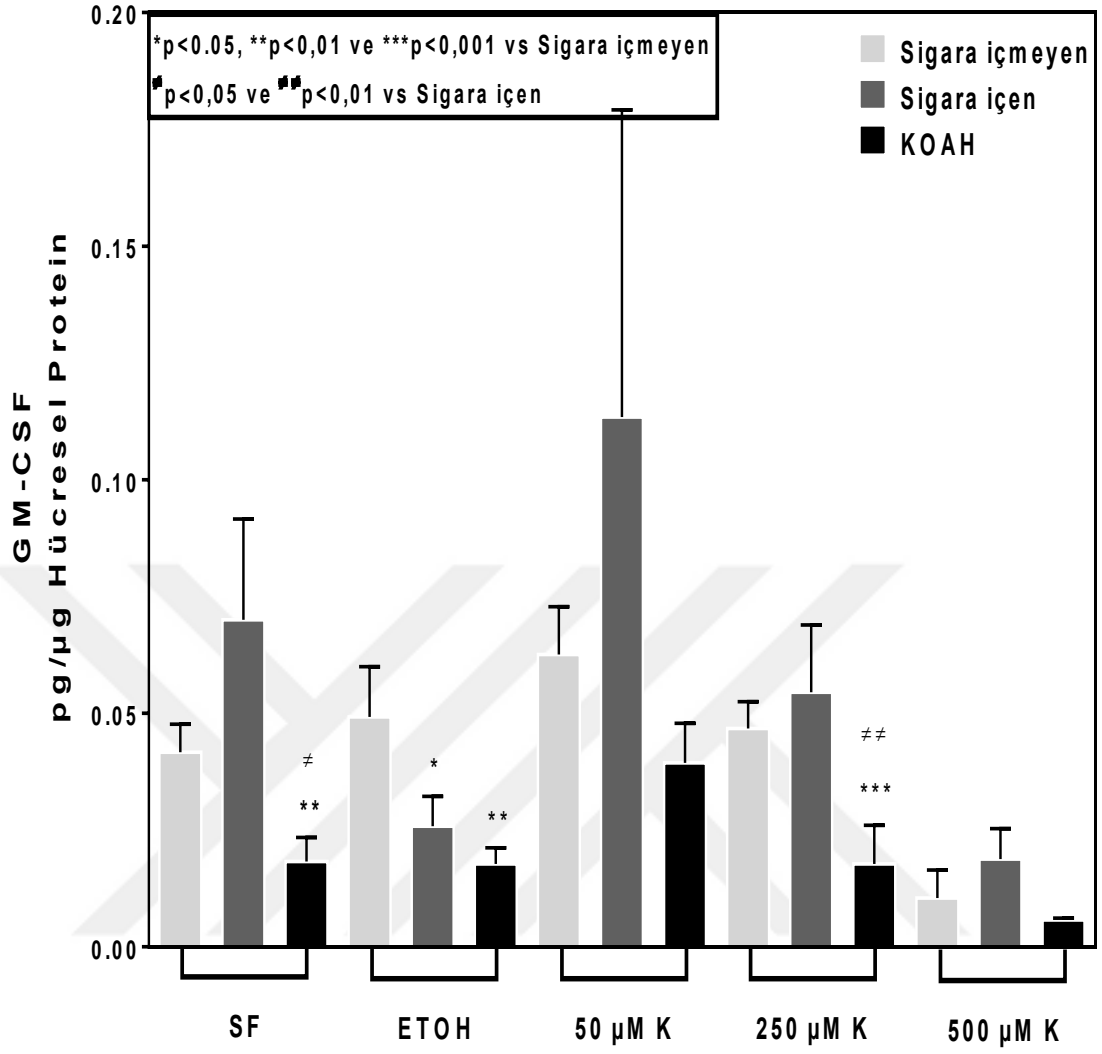
**Şekil 9.** Kapsaisinın sigara içmeyen (A), sigara içicisi (B) ve KOAH gelişen (C) hasta gruplarının BEH kültürlerinin GM-CSF salınımına etkisi.

Kapsaisin uygulanan (250 $\mu$ M) ve uygulanmayan KOAH'lı hücrelerden GM-CSF salınımı sigara içmeyen gruba göre anlamlı olarak düşüktü. Bundan başka, etanol uygulanan KOAH'lı ve sigaralı BEH'den GM-CSF salınımı sigara içmeyen gruba göre daha düşüktü (Şekil 10; Tablo 12).

**Tablo 12.** Sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH kültürlerinden GM-CSF salınımının karşılaştırılması (ortanca değerleri).

<b>Kapsaisin (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Sigarasız (pg/<math>\mu</math>g HP)</b>	<b>Sigaralı (pg/<math>\mu</math>g HP)</b>	<b>KOAH (pg/<math>\mu</math>g HP)</b>
<b>0</b>	0,033760	0,04050	0,011080** <sup>#</sup>
<b>Etanol</b>	0,038430	0,01514*	0,016520**
<b>50</b>	0,057920	0,02959	0,029600
<b>250</b>	0,044500	0,03634	0,009280*** <sup>#</sup>
<b>500</b>	0,002282	0,01595	0,005229

HP: Hüresel protein, kontrol grubuna (sigarasız) göre kıyaslandığında \*p<0,05, \*\*p<0,01 ve \*\*\*p<0,001; sigara içen gruba göre kıyaslandığında <sup>#</sup>p<0,05 ve <sup>#</sup>#p<0,01.



**Şekil 10.** Sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH kültürlerinden GM-CSF salınımının karşılaştırılması.



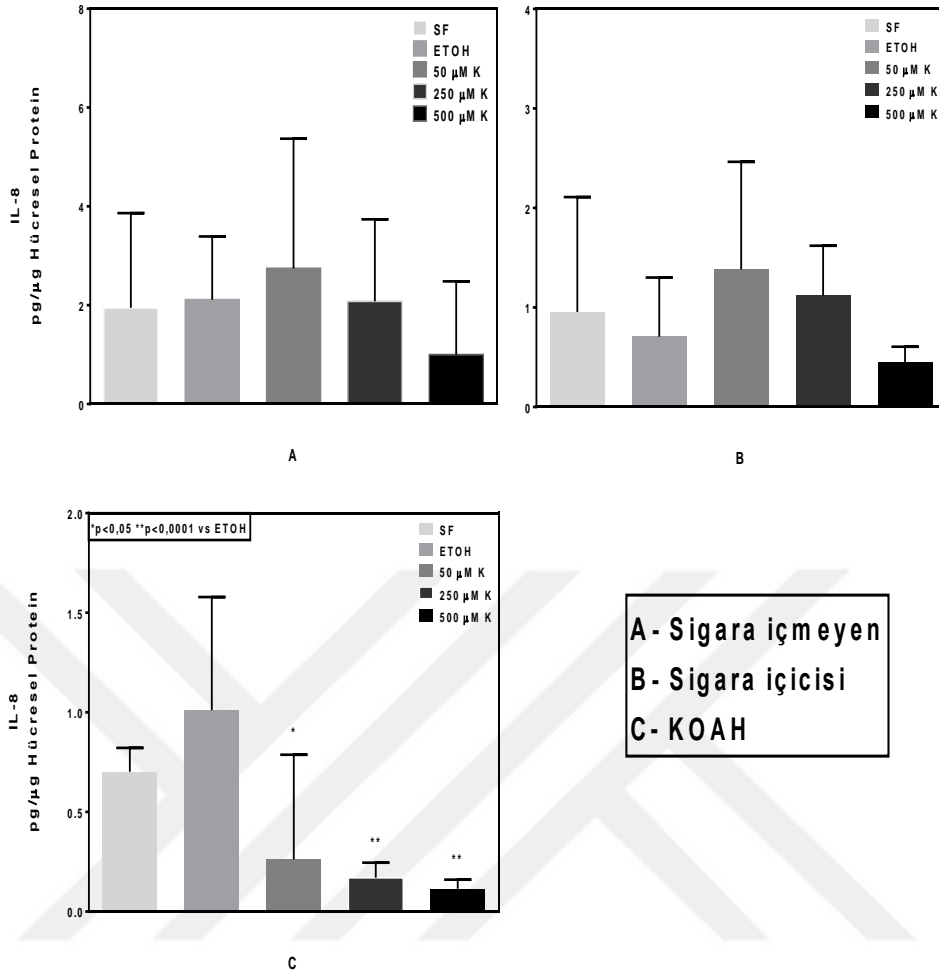
#### 4.8 Kapsaisinın Sigara İçmeyen, Sigara İçicisi ve KOAH'lı Hastaların Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden IL-8 Salınımına Etkisi

Kapsaisinın 50, 250 ve 500  $\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonları KOAH'lı BEH kültürlerinden IL-8 salınımının kontrol grubuna göre anlamlı olarak baskımlarken, diğer gruplarda anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 11C; Tablo 13).

**Tablo 13.** Kapsaisinın sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH'lı bronş epitel hücre kültürlerinden IL-8 salınımına etkisi (ortanca değerler).

<b>Kapsaisin (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Sigarasız (pg/<math>\mu\text{g}</math> HP)</b>	<b>Sigarah (pg/<math>\mu\text{g}</math> HP)</b>	<b>KOAH (pg/<math>\mu\text{g}</math> HP)</b>
<b>0</b>	1,947	0,9537	0,7023
<b>Etanol</b>	2,111	0,7059	1,0110
<b>50</b>	2,745	1,3820	0,2620*
<b>250</b>	2,079	1,1210	0,1698**
<b>500</b>	1,001	0,4468	0,1149**

HP: Hüresel protein, kontrol grubuna (etanol) göre kıyaslandığında \*p<0,05 ve \*\*p<0,0001.



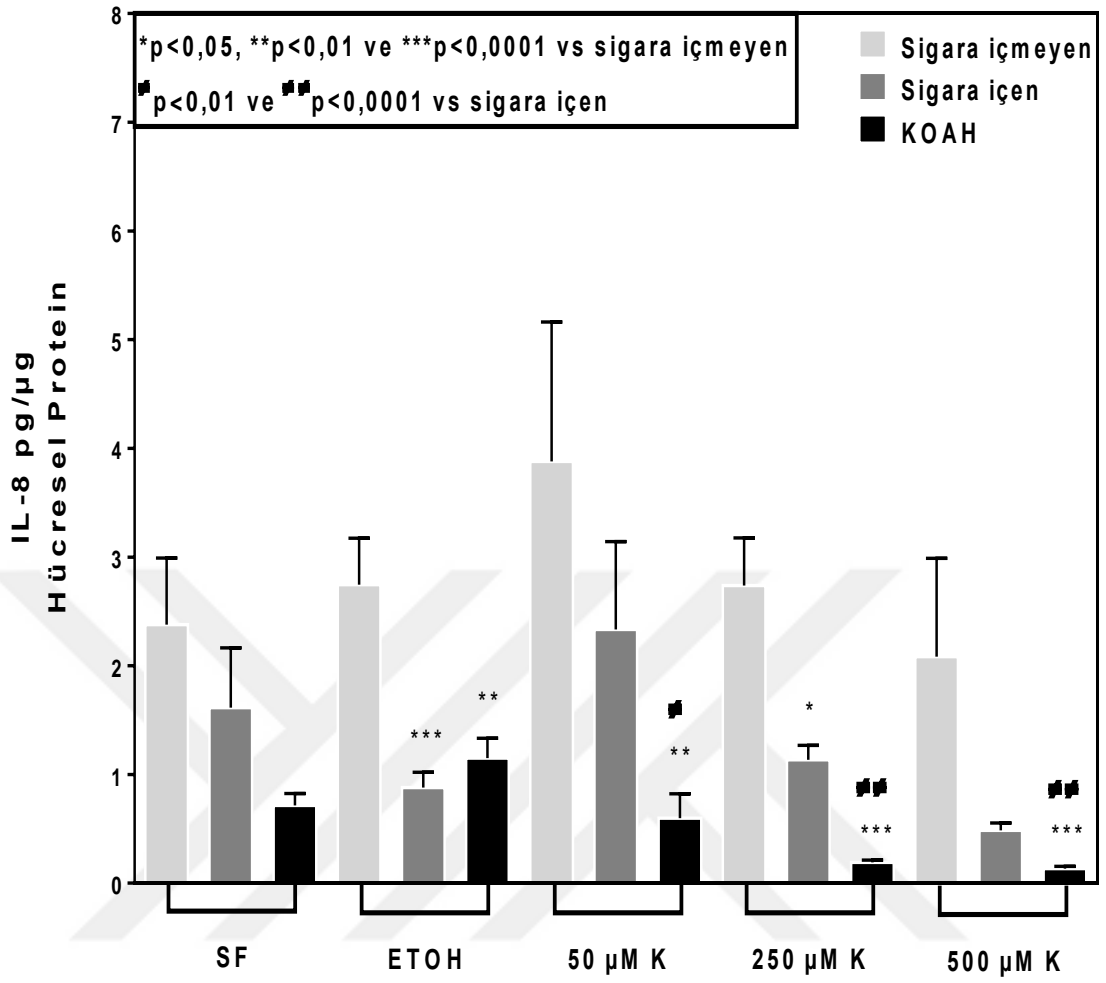
**Şekil 11.** Kapsaisinın sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAHA gelişen hasta gruplarının bronş epitel hücre kültürlerinden IL-8 salınımına etkisi.

Üç hücre grubu kıyaslandığında, etanol maruziyeti sonrası sigara içen ve KOAHA'lı hastaların BEH IL-8 salınımı sigara içmeyen gruba göre anlamlı düşüktü. Benzer şekilde, 250μM kapsaisine maruz kalan sigaralı BEH ile 50-500μM kapsaisin verilen KOAHA'lı BEH'den IL-8 salınımı sigara içmeyen gruba göre anlamlı olarak azalmıştı (Şekil 12; Tablo 14).

**Tablo 14.** Sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH kültürlerinden IL-8 salınımının karşılaştırılması (ortanca değerleri).

<b>Kapsaisin (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Sigarasız (pg/<math>\mu</math>g HP)</b>	<b>Sigaralı (pg/<math>\mu</math>g HP)</b>	<b>KOAH (pg/<math>\mu</math>g HP)</b>
<b>0</b>	1,947	0,9537	0,7023
<b>Etanol</b>	2,111	0,7059***	1,0110**
<b>50</b>	2,745	1,3820	0,2620*** <sup>‡</sup>
<b>250</b>	2,079	1,1210*	0,1698*** <sup>‡</sup>
<b>500</b>	1,001	0,4468	0,1149*** <sup>‡</sup>

HP: Hücresel protein, sigarasız gruba göre kıyaslandığında \*p<0,05, \*\*p<0,01 ve \*\*\*p<0,0001, sigara içen grup ile KOAH'lı grup kıyaslandığında <sup>‡</sup>p<0,01 ve <sup>##</sup>p<0,0001.



**Şekil 12.** Sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hasta gruplarının BEH kültürlerinden IL-8 salınımının karşılaştırılması.

## 5 TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında gönüllü sigara içicisi olmayan, sigara içicisi ancak KOAH gelişmeyen ve KOAH'lı hastaların bronş dokuları kullanılarak primer BEH kültürleri başarılı bir şekilde elde edildi. Kapsaisin farklı dozlarının bu kültürlerin TED, STF, LDH, IL-8 ve GM-CSF salınımına olan etkileri araştırıldı. İlave olarak, formoterol ve roflumilastın kapsaisin TED ve STF'e etkilerini değiştirip değiştirmediği test edildi. Çalışmamızda, kapsaisin yüksek dozları BEH kültürlerinde STF, TED, GM-CSF ve IL-8 salınımını düşürüp, LDH salınımını artırdı. Formoterol kapsaisin STF'ni düşürücü etkisini önlerken, roflumilast bir etki göstermedi. Bulgularımız, kapsaisin bronş epitel hücrelerinin siliyer fonksiyonunu baskılayabileceğini, bronş epitel permabilitesini artırırken hücre düzeyinde toksik olabileceğini, formoterolün bu etkiyi kısmen azaltabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda KOAH'ı olan ve olmayan gönüllülerden elde edilen bronş dokusundan, eksplant kültür yöntemi kullanılarak gerek hücre kültür kaplarında gerekse de ALI ortamında hücre kültürleri başarılı bir şekilde elde edildiler. Özellikle son yıllarda kullanımı giderek artan ALI kültürlerinin çalışmamızda kullanılması, verilerimizin geçerliliği ve güvenilirliğini artırmaktadır. Zira bu yöntem ile elde edilen hücreler, morfolojik yapıları, silya oluşumu, kendi aralarında oluşturdukları 'tight junction' ve desmosomal yapılar açısından, hem de geçirdikleri başkalaşım itibarıyla in vivo ortama en yakın özellikleri sergilemektedirler (96, 97).

Mukosilyer klirens hava yollarının temizlenmesinden, inhalasyon ile alınan iritanların uzaklaştırılmasında önemli bir işleve sahiptir. Mukosilyer klirenste epitel hücrelerin yüzeyindeki silyaların ileri doğru düzenli bir vuruşla mukusu yüzeyinde tuttuğu iritanlar ile birlikte taşınması kritik öneme sahiptir (47). Siliyer fonksiyonun bozulması hava yollarında ciddi sorunlara yol açmakta, yapısal olarak görülen silya disfonksiyonu hayatı tehdit eden sağlık sorunlarına yol açmaktadır (47). Çalışmamızda, bildiğimiz kadarıyla literatürde ilk kez, kapsaisin nispeten yüksek dozlarının insan bronş epitel hücrelerinin STF'ni in vitro kültür ortamında baskıladığını bulduk. Bulgularımız, Eljamal ve ark'nın köpek trakeasında kapsaisin neden olduğu siliyer baskılanmayı

bildiren verilerini teyid eder niteliktedir (103). Bir başka çalışmada da, Hameister ve ark anestezi uygulanmış maymunlara kapsaisin uygulandığında 80 dk. sonrasında STF'nin düştüğü görülmüştür (104). Bu çalışmalar, kapsaisinin gerek hayvan gerekse de insan hava yollarını döşeyen epitel hücrelerinin siliyer fonksiyonunu inhibe edebileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda eş zamanlı olarak uygulanan bir selektif  $\beta_2$  reseptör agonisti olan ve adenil siklaz enzimini aktive ederek hücre içinde cAMP düzeyini yükselten formoterol (106), kapsaisinin STF'nı baskılayıcı etkisini önledi. Diğer yandan selektif PDE4 inhibitörü olan roflumilast (91) herhangi bir etki göstermedi. Bu da kapsaisinin, STF'nı baskılayıcı etkisini hücre içinde cAMP sentezine yol açan adenil siklaz enziminin aktivitesini baskılamak suretiyle gerçekleştirdiğini düşündürmektedir. Diğer yandan roflumilastın etkisiz olması, kapsaisinin silya üzerindeki inhibe edici etkisinin PDE4 enzim aktivitesi ile ilişkili olmadığını düşündürmektedir. Benedetto ve ark 'nın yaptığı bir çalışmada, yetişkin bireylerin burun alt nazal konkasından alınmış hücrelere cAMP solüsyonu verildiğinde STF'nin anlamlı olarak arttığı bulunmuştur (107). Sonuçta altta yatan mekanizma ne olursa olsun, bulgularımız  $\beta_2$  agonistlerin kapsaisinin STF'ı üzerindeki olumsuz etkisini önleyebileceğini, dolayısıyla obstrüktif hava yolu hastalıklarının tedavisinde aktif olarak kullanılan bu ajanların kapsaisine maruz kalınan durumlarda terapötik etki için değerlendirilebileceklerini düşündürmektedir.

Hava yollarının bütünlüğünün korunmasında, epitel tabakasının yapısal özelliklerini koruması bariyer fonksiyonunu yerine getirmesinde oldukça önemlidir. Epitelin geçirgenliğindeki istenmeyen artış, inhalasyon ile alınan irritanların subepitelyuma geçmesine ve zararlı etkilerini gerçekleştirmesine zemin hazırlamaktadır (96, 98). In vitro ortamda epitel kültürlerinin permabilitelerinin değerlendirilmesinde TED yöntemi yaygın olarak kullanılmakta olup, TED'de düşme epitel permabilitesinde artışın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (96). Epitelyal permabilitenin değerlendirilmesinde kullanılan bir başka yöntemde de kültürlerin apikal yüzeyine uygulanan  $^{14}\text{C}$  işaretli bovin serum albüminin (BSA) paraselüler aralıktan geçme oranına bakılmaktadır (96, 99). Çalışmamızda, literatürde ilke kez kapsaisinin (250 ve 500  $\mu\text{M}$ ) insan primer BEH kültürlerinin TED'ni baskıladığı gösterilmiş oldu. Söz konusu etki sigara içmeyen,

sigara içen ve KOAH gelişen bireylerin BEH kültürlerinde benzer olarak bulundu. Bu da kapsaisinın TED düşürücü etkisinin spesifik olmadığını ve herhangi bir patolojisi olsun olmasın BEH kültürlerinin permabilitelerinin kapsaisinden etkilendiğini göstermektedir. Tsukura ve ark 'nın, bağırsak epitelyum hücre dizisinin (Caco-2 hücre) kapsaisin dozlarına (100, 200 ve 300µM) maruz bırakıldıktan 2 saat sonra permabilitelerinin anlamlı şekilde azaldığını göstermişlerdir. Yine Shiobara ve ark 'nın Mandin Darby Köpek Böbrek (MDCK) hücre dizilerinde kapsaisin (100 ve 300µM) ile inkübasyonun 30, 60, 90 ve 120. dakikalarında paraselüler permabiliteyi artırıcı etkide bulunduğunu göstermişlerdir. Bulgularımız yapılan bu iki çalışmanın sonuçları ile örtüşmektedir (101, 102).

Bundan başka, hava kirleticilerinden ozon ve NO<sub>2</sub> ile yapılan çalışmalarda bu gazların astımlı hastalardan, bizim de kullandığımız eksplant kültür yöntemi kullanılarak, elde edilen BEH kültürlerinde TED'i azalttığı, sağlıklı bireylerin hücrelerinin ise etkilendiği gösterilmiştir (96). Yine, sigara dumanına maruz bırakılan primer BEH kültürlerinin TED'inde azalma saptanmıştır (100). Söz konusu çalışmalarda, epitel permabilitesinin bir başka göstergesi olan <sup>14</sup>C-BSA geçişinin de TED'deki düşmeye paralel olarak arttığı saptanmış, böylece permabilite artışı iki yöntem ile de teyid edilmiştir.

LDH, hasara uğrayan hücrede salınımı arttığı için gerek rutin olarak gerekse de araştırma amaçlı çalışmalarda hücre hasarının bir belirteci olarak kullanılmaktadır. Araştırmamızda, kapsaisinın yüksek dozlarının (250 ve 500µM) tüm çalışma gruplarından elde edilen BEH kültürlerinden LDH salınımını artırdığını bulduk. Bu da kapsaisinın STF'nı baskılaması, epitelyal permabiliteyi artırması yanında doğrudan hücrede hasara yol açtığını göstermektedir. Benzer şekilde, bir başka çalışmada da Isoda ve ark'ı 200 µM kapsaisine maruz bırakılan bağırsak Caco-2 hücrelerinde LDH aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir.

Hava yolu epitel hücreleri, hava yollarını ve akciğerleri dış ortamdaki irritanlardan koruyan bariyer özelliği yanında, metabolik olarak oldukça aktif hücreler olup solunum yollarında cereyan eden inflamatuvar olayları etkilemede ve yönetmede son derece etkilidirler (96, 99). Çalışmamızda, kapsaisinın (500 µM) BEH kültürlerinde GM-CSF

salınımını baskıladığını, ancak IL-8 salınımında anlamlı bir değişikliğe yol açmadığını bulduk. Ahmed ve ark 'nın yaptığı bir çalışmada, kapsaisin konsantrasyonu ratların ayak bileği eklem yerlerindeki duyuşal nöropeptid P maddesini indirgemiş, kapsaisin dorsal kök gangliyonlarında ve ayak bilekleri eklemlerindeki duyuşal nöropeptidlerin düzeylerini düşürmesini yönettiğini, yüksek kapsaisin dozlarının inflamasyonu baskıladığı ileri sürülmüştür (105). Her ne kadar farklı hücre modelleri ve hayvan hücreleri kullanılmış olsa da söz konusu çalışmanın sonuçları bulgularımızı teyid etmektedir.

Çalışmamızın kısıtlılığı sigara içmeyen grupta nispeten az sayıda (5 hasta) donörden kültür elde edilebilmiş olmasıdır. Diğer yandan, formoterol ve roflumilast çalışmaları sadece sigara içen hastaların kültürlerinde yapıldı. Dolayısıyla, sigara içmeyen veya KOAH gelişen hastaların cevabının farklı olup olmayacağı bilinmemektedir. Her ne kadar TED, kültür permabilitesini değerlendirmede geçerliliği kabul görmüş bir yöntemse de sonuçların <sup>14</sup>C-BSA geçirgenliği ile teyid edilmesi yararlı olurdu. Ayrıca LDH ile gösterilen toksisite bulgularının doğrudan hücre canlılığını değerlendiren MTT gibi testler ile desteklenmesi verilerin gücünü daha da artırırdu. Bundan başka, STF'nin baskılanmasının altında yatan muhtemel mekanizmalar (hücre içi cAMP düzeyindeki değişiklikler gibi), ile TED'in azalması ile ilişkili morfolojik değişikliklerin ('tight junstion', desmozomal yapıların durumu) araştırılması yararlı olurdu.

Sonuç olarak çalışmamız, biber gazının aktif bileşeni olan kapsaisinin yüksek dozlarının primer insan BEH kültür permabilitesini anlamlı derecede artırdığını, siliyer fonksiyonunu baskıladığını ve hücresele düzeyde hasara yol açtığını göstermiştir. Bu etkiler formoterol tarafından kısmen de olsa önlenmektedir.



## 6 SONUÇ ve ÖNERİLER

- a) Sonuç olarak tezime konu olan bu araştırmada literatürde ilk kez kapsaisinin primer insan BEH kültürlerinde TED, STF, LDH ve GM-CSF salınımı üzerine olan etkileri araştırıldı.
- b) Araştırmamızda, 24 saatin sonunda kapsaisinin yüksek dozları (250 ve 500  $\mu$ M) sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH'lı hastaların BEH kültürlerinin TED'ini anlamlı olarak azalttı.
- c) Kapsaisin (50, 125 ve 250  $\mu$ M) sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH'lı hastaların BEH kültürlerinin STF'ni 15 ve 30.dk, 1, 2, 4, 6, 24. Saatlerde anlamlı olarak baskıladı.
- d) Formoterol (1  $\mu$ M) kapsaisinin sigara içicisi bireylerin BEH kültürlerinin STF ve TED'inde yol açtığı baskılanmayı önledi. Roflumilast herhangi bir etkide bulunmadı.
- e) Kapsaisinin (500  $\mu$ M) sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hastaların BEH kültürlerinden LDH salınımını anlamlı şekilde artırdı.
- f) Kapsaisin (500  $\mu$ M) sigara içmeyen, sigara içicisi ve KOAH gelişen hastaların BEH kültürlerinden GM-CSF salınımını baskıladı.

### Öneriler;

- a) Hücre permabilitesi göstergesi olan TED kullanılmış olsa da  $^{14}$ C-BSA geçirgenliği yöntemi ile teyit edilmesi uygun olur.
- b) Hücreler arası bağlantıları sağlayan ve epitel geçirgenliğini düzenleyen 'tight junction' ve desmosomal yapıların bu süreçte etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesi yararlı olur.
- c) Hücre canlılığının kapsaisinden etkilenip etkilenmediğinin araştırılması yararlı olur. Hücre canlılığında azalma varsa, altta yatan mekanizmaların (apoptozis vs) araştırılması gerekir.
- d) Formoterol ve roflumilastın, sigara içmeyen bireyler ve KOAH'lıların hücre kültürlerinde kapsaisinin etkilerini önleyip önlemediğinin araştırılması uygun olur.

- e) STF'nin baskılanmasının altında yatan muhtemel mekanizmaların (hücre içi cAMP düzeyindeki değişiklikler gibi) araştırılması yararlı olur.



## 7 KAYNAKLAR

1. Toprak S, Ersoy G, Hart J, Clevestig P. The pathology of lethal exposure to the Riot Control Agents: towards a forensics-based methodology for determining misuse. *J Forensic Leg Med*, 2015. 29: p. 36-42.
2. Archuleta MM. Sandia Report. Oleoresin Capsicum Toxicology Evaluation and Hazard Review. . 1995.
3. Geppetti P, Fusco BM, Marabini S, Maggi CA, Fanciullacci M, Sicuteri F. Secretion, pain and sneezing induced by the application of capsaicin to the nasal mucosa in man. *Br J Pharmacol*, 1988. 93(3): p. 509-514.
4. Li CH, Chen WC, Liao WC, Tu CY, Lin CL, Sung FC, Chen CH, Hsu WH. The association between chronic obstructive pulmonary disease and Parkinson's disease: a nationwide population-based retrospective cohort study. *QJM*, 2015. 108(1): p. 39-45.
5. Warden CR. Respiratory agents: Irritant gases, riot control agents, incapacitants, and caustics. *Crit Care Clin*, 2005. 21(4): p. 719-737, vi.
6. Olajos EJ, Salem H. Riot control agents: Pharmacology, toxicology, biochemistry and chemistry. *J Appl Toxicol*, 2001. 21(5): p. 355-391.
7. Al Othman ZA, Ahmed YB, Habila MA, Ghafar AA. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in Capsicum fruit samples using high performance liquid chromatography. *Molecules*, 2011. 16(10): p. 8919-8929.
8. Yeung MF, Tang WY. Clinicopathological effects of pepper (oleoresin capsicum) spray. *Hong Kong Med J*, 2015. 21(6): p. 542-552.

9. Reilly CA, Crouch DJ, Yost GS. Quantitative analysis of capsaicinoids in fresh peppers, oleoresin capsicum and pepper spray products. *J Forensic Sci*, 2001. 46(3): p. 502-509.
10. Reilly CA, Crouc DJ, Yost GS, Fatah AA. Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, and nonivamide in self-defense weapons by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2001. 912(2): p. 259-267.
11. Haas JS, Whipple RE, Grant PM, Andresen BD, Volpe AM, Pelkey GE. Chemical and elemental comparison of two formulations of oleoresin capsicum. *Sci Justice*, 1997. 37(1): p. 15-24.
12. Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*, 1999. 51(2): p. 159-212.
13. Yemiş O, Bakkalbaşı E, Artık N. Kapsaisinoit Kaynağı Olarak Kırmızıbiberler. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 2004. 18: p. 30-37.
14. Hayman M, Kam PCA. Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications. *Current Anaesthesia & Critical Care*, 2008. 19: p. 338–343.
15. Rains C, Bryson HM. Topical capsaicin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in post-herpetic neuralgia, diabetic neuropathy and osteoarthritis. *Drugs Aging*, 1995. 7(4): p. 317-328.
16. Bevan S, Szolcsanyi J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends Pharmacol Sci*, 1990. 11(8): p. 330-333.
17. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 2003. 426(6966): p. 517-524.
18. Tominaga M, Tominaga T. Structure and function of TRPV1. *Pflugers Arch*, 2005. 451(1): p. 143-150.

19. Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MJ, Harries MH, Duckworth DM, Cairns W, Harrison DC, Clarke CE, Ellington K, Prinjha RK, Barton AJ, Medhurst AD, Smith GD, Topp S, Murdock P, Sanger GJ, Terrett J, Jenkins O, Benham CD, Randall AD, Gloger IS, Davis JB. Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain*, 2000. 88(2): p. 205-215.
20. Cortright DN, Szallasi A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update. *Eur J Biochem*, 2004. 271(10): p. 1814-1819.
21. Van Der Stelt M, Di Marzo V. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur J Biochem*, 2004. 271(10): p. 1827-1834.
22. Baamonde A, Lastra A, Juarez L, Hidalgo A, Menendez L. TRPV1 desensitisation and endogenous vanilloid involvement in the enhanced analgesia induced by capsaicin in inflamed tissues. *Brain Res Bull*, 2005. 67(6): p. 476-481.
23. Ahern GP, Brooks IM, Miyares RL, Wang XB. Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. *J Neurosci*, 2005. 25(21): p. 5109-5116.
24. Wu ZZ, Chen SR, Pan HL. Transient receptor potential vanilloid type 1 activation down-regulates voltage-gated calcium channels through calcium-dependent calcineurin in sensory neurons. *J Biol Chem*, 2005. 280(18): p. 18142-18151.
25. Zollman TM, Bragg RM, Harrison DA. Clinical effects of oleoresin capsicum (pepper spray) on the human cornea and conjunctiva. *Ophthalmology*, 2000. 107(12): p. 2186-2189.
26. Steffee CH, Lantz PE, Flannagan LM, Thompson RL, Jason DR. Oleoresin capsicum (pepper) spray and "in-custody deaths". *Am J Forensic Med Pathol*, 1995. 16(3): p. 185-192.

27. Forrester MB, Stanley SK. The epidemiology of pepper spray exposures reported in Texas in 1998-2002. *Vet Hum Toxicol*, 2003. 45(6): p. 327-330.
28. Busker RW, van Helden HP. Toxicologic evaluation of pepper spray as a possible weapon for the Dutch police force: risk assessment and efficacy. *Am J Forensic Med Pathol*, 1998. 19(4): p. 309-316.
29. Kaminski RJ, Edwards SM, Johnson JW. Assessing the incapacitative effects of pepper spray during resistive encounters with the police. *An International Journal of Police Strategies & Management*, 1999. 22(1): p. 7-30.
30. Billmire DF, Vinocur C, Ginda M, Robinson NB, Panitch H, Friss H, Rubenstein D, Wiley JF. Pepper-spray-induced respiratory failure treated with extracorporeal membrane oxygenation. *Pediatrics*, 1996. 98(5): p. 961-963.
31. Edwards SM, Granfield J, Onnen J. Evaluation of Pepper Spray. *National Institute of Justice Research in Brief*, 1997.
32. Smith CG, Stopford W. Health hazards of pepper spray. *N C Med J*, 1999. 60(5): p. 268-274.
33. Karagama YG, Newton JR, Newbegin CJ. Short-term and long-term physical effects of exposure to CS spray. *J R Soc Med*, 2003. 96(4): p. 172-174.
34. Dörtbudak Z, Filiz A, Dikensoy Ö, Bayram N, Neas LM. Capsaicin exposure as a risk factor for asthma-Likesymptoms: Gaziantep ruralarea respiratory symptoms survey. *Epidemiology*, 2004. 15(4): p. 69.
35. Delamanche S, Desforges P, Morio S, Fuche C, Calvet JH. Effect of oleoresin capsicum (OC) and ortho-chlorobenzylidene malononitrile (CS) on ciliary beat frequency. *Toxicology*, 2001. 165(2-3): p. 79-85.

36. Reilly CA, Taylor JL, Lanza DL, Carr BA, Crouch DJ, Yost GS. Capsaicinoids cause inflammation and epithelial cell death through activation of vanilloid receptors. *Toxicol Sci*, 2003. 73(1): p. 170-181.
37. Seyhan E, Mert N, Mert H. The Effect of Pepper Gas (OC) on Some Biochemical Parameters in Rats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2012. 18(2): p. 259-266.
38. Guo JJ, Wang DS, Huang HT. Spontaneous remission of edema and regranulation of goblet cells in rat tracheae after capsaicin-induced acute inflammation. *Anat Embryol (Berl)*, 2003. 206(4): p. 301-309.
39. Sanico AM, Atsuta S, Proud D, Togias A. Dose-dependent effects of capsaicin nasal challenge: in vivo evidence of human airway neurogenic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 1997. 100(5): p. 632-641.
40. Millqvist E, Ternesten-Hasseus E, Stahl A, Bende M. Changes in levels of nerve growth factor in nasal secretions after capsaicin inhalation in patients with airway symptoms from scents and chemicals. *Environ Health Perspect*, 2005. 113(7): p. 849-852.
41. Southall MD, Li T, Gharibova LS, Pei Y, Nicol GD, Travers JB. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. 304(1): p. 217-222.
42. Crystal RG, Randell SH, Engelhardt JF, Voynow J, Sunday ME. Airway epithelial cells: Current concepts and challenges. *Proc Am Thorac Soc*, 2008. 5(7): p. 772-777.
43. Parker D, Prince A. Innate immunity in the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011. 45(2): p. 189-201.
44. Tilley AE, Walters MS, Shaykhiev R, Crystal RG. Cilia dysfunction in lung disease. *Annu Rev Physiol*, 2015. 77: p. 379-406.

45. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest*, 2002. 109(5): p. 571-577.
46. Bermbach S, Weinhold K, Roeder T, Petersen F, Kugler C, Goldmann T, Rupp J, Konig P. Mechanisms of cilia-driven transport in the airways in the absence of mucus. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014. 51(1): p. 56-67.
47. Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med*, 2010. 363(23): p. 2233-2247.
48. Van der Schans CP. Bronchial mucus transport. *Respir Care*, 2007. 52(9): p. 1150-1156; discussion 1156-1158.
49. Salathe M. Regulation of mammalian ciliary beating. *Annu Rev Physiol*, 2007. 69: p. 401-422.
50. Brokaw CJ, Kamiya R. Bending patterns of *Chlamydomonas* flagella: IV. Mutants with defects in inner and outer dynein arms indicate differences in dynein arm function. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1987. 8(1): p. 68-75.
51. Jain R, Ray JM, Pan JH, Brody SL. Sex hormone-dependent regulation of cilia beat frequency in airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012. 46(4): p. 446-453.
52. Jiao J, Wang H, Lou W, Jin S, Fan E, Li Y, Han D, Zhang L. Regulation of ciliary beat frequency by the nitric oxide signaling pathway in mouse nasal and tracheal epithelial cells. *Exp Cell Res*, 2011. 317(17): p. 2548-2553.
53. Schmid A, Salathe M. Ciliary beat co-ordination by calcium. *Biol Cell*, 2011. 103(4): p. 159-169.
54. Rogers DF. The airway goblet cell. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. 35(1): p. 1-6.



55. Lumsden AB, McLean A, Lamb D. Goblet and Clara cells of human distal airways: evidence for smoking induced changes in their numbers. *Thorax*, 1984. 39(11): p. 844-849.
56. Reynolds SD, Malkinson AM. Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010. 42(1): p. 1-4.
57. Evans MJ, Van Winkle LS, Fanucchi MV, Plopper CG. Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium. *Exp Lung Res*, 2001. 27(5): p. 401-415.
58. Evans MJ, Moller PC. Biology of airway basal cells. *Exp Lung Res*, 1991. 17(3): p. 513-531.
59. Katgı N, Erbaycu AE, Biçmen C, Uçar ZZ, Katgı A, Güçlü SZ. Hiperkapnik Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalarında Non-invazif Mekanik Ventilasyonun Serum Leptin Düzeyi Üzerindeki Etkisi. *Solunum Dergisi*, 2010. 12(2): p. 82-87.
60. Decramer M, Janssens W, Miravitlles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 2012. 379(9823): p. 1341-1351.
61. Kocabaş A, Temel Akciğer Sağlığı ve Hastalıkları.O. Arseven. Ankara: Toraks Kitapları, 2015: 123-167.
62. WHO reports. Global Burden Diseases. 2012.
63. T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI Ulusal Hastalık Yüğü ve Maliyet-Etkililik Projesi. 2000.
64. Lindberg A, Jonsson AC, Ronmark E, Lundgren R, Larsson LG, Lundback B. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease according to BTS, ERS, GOLD and ATS criteria in relation to doctor's diagnosis, symptoms, age, gender, and smoking habits. *Respiration*, 2005. 72(5): p. 471-479.

65. Aaron SD, Gershon AS, Gao Y, Yang J, Whitmore GA. Influence of country-level differences on COPD prevalence. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2016. 11: p. 2305-2313.
66. Kocabaş A, Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı.A. Zamani. Ankara: Toraks Kitapları, 2000: 8-25.
67. Albul Y, Özlü T. Türkiye’de KOAH Epidemiyolojisi. *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi*, 2013. 1(1): p. 7-12.
68. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease: effects beyond the lungs. *PLoS Med*, 2010. 7(3): p. e1000220.
69. Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *The Lancet*, 2009. 374: p. 733-743.
70. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Pare PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 2004. 350(26): p. 2645-2653.
71. McDonough JE, Yuan R, Suzuki M, Seyednejad N, Elliott WM, Sanchez PG, Wright AC, Gefter WB, Litzky L, Coxson HO, Pare PD, Sin DD, Pierce RA, Woods JC, McWilliams AM, Mayo JR, Lam SC, Cooper JD, Hogg JC. Small-airway obstruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 2011. 365(17): p. 1567-1575.
72. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(3): p. 183-192.
73. Gamble E, Grootendorst DC, Hattotuwa K, O’Shaughnessy T, Ram FS, Qiu Y, Zhu J, Vignola AM, Kroegel C, Morell F, Pavord ID, Rabe KF, Jeffery PK, Barnes NC. Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: a pooled analysis. *Eur Respir J*, 2007. 30(3): p. 467-471.

74. Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*, 2014. 35(1): p. 71-86.
75. Boer WId, Hau CM, Schadewijk Av, Stolk J, Krieken JHJMv, Hiemstra PS. Expression of Epidermal Growth Factors and Their Receptors in the Bronchial Epithelium of Subjects With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Clin Pathol*, 2006. 125: p. 184-192.
76. Meshi B, Vitalis TZ, Ionescu D, Elliott WM, Liu C, Wang XD, Hayashi S, Hogg JC. Emphysematous lung destruction by cigarette smoke. The effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002. 26(1): p. 52-57.
77. Russell RE, Thorley A, Culpitt SV, Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, Fitzgerald M, Barnes PJ. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002. 283(4): p. L867-873.
78. 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): p. 530-534.
79. Traves SL, Culpitt SV, Russell REK, Barnes PJ, Donnelly LE. Increased levels of the chemokines GRO $\alpha$  and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax*, 2002. 57(7): p. 590-595
80. Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997. 155(2): p. 449-453.
81. Freeman CM, Martinez FJ, Han MK, Ames TM, Chensue SW, Todt JC, Arenberg DA, Meldrum CA, Getty C, McCloskey L, Curtis JL. Lung dendritic cell expression of maturation molecules increases with worsening chronic

- obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. 180(12): p. 1179-1188.
82. Stefano AD, Caramori G, Capelli A, Gnemmi I, Ricciardolo FL, Oates T, Donner CF, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal* 2004. 24: p. 78-85.
  83. Costa C, Rufino R, Traves SL, Lapa ESJR, Barnes PJ, Donnelly LE. CXCR3 and CCR5 chemokines in induced sputum from patients with COPD. *Chest*, 2008. 133(1): p. 26-33.
  84. Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 2009. 360(23): p. 2445-2454.
  85. Kirkham PA, Caramori G, Casolari P, Papi AA, Edwards M, Shamji B, Triantaphyllopoulos K, Hussain F, Pinart M, Khan Y, Heinemann L, Stevens L, Yeadon M, Barnes PJ, Chung KF, Adcock IM. Oxidative stress-induced antibodies to carbonyl-modified protein correlate with severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011. 184(7): p. 796-802.
  86. Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J Suppl*, 2001. 17: p. 946-953
  87. O'Reilly P, Jackson PL, Noerager B, Parker S, Dransfield M, Gaggar A, Blalock JE. N-alpha-PGP and PGP, potential biomarkers and therapeutic targets for COPD. *Respir Res*, 2009. 10: p. 38.
  88. Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ, 2nd. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J*, 2004. 18(15): p. 1791-1800.

89. Bartow R, Brogden R. Formoterol: An update of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in the management of asthma. *ADIS DRUG EVALUATION*, 1998. 55(2): p. 303-322.
90. Karen E. McCrea, Hill SJ. Salmeterol, a long-acting  $\beta_2$ -adrenoceptor agonist mediating cyclic AMP accumulation in a neuronal cell line. *British Journal of Pharmacology*, 1993. 110(2): p. 619-626.
91. Lipari M, Benipal H, Kale-Pradhan P. Roflumilast in the management of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Health Syst Pharm*, 2013. 70(23): p. 2087-2095.
92. Calverley PM, Sanchez-Toril F, McIvor A, Teichmann P, Bredenbroeker D, Fabbri LM. Effect of 1-year treatment with roflumilast in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. 176(2): p. 154-161.
93. Giembycz MA, Field SK. Roflumilast: first phosphodiesterase 4 inhibitor approved for treatment of COPD. *Drug Des Devel Ther*, 2010. 4: p. 147-158.
94. Beavo JA, Brunton LL. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(9): p. 710-718.
95. Göğebakan B. İnsan Yapımı Nanopartiküllerin Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı Olan Bireylerin Bronş Epitel Hücrelerinin İnflamasyonu, Hücre Yaşam Döngüsü ve Apoptozisine Etkisi. 2012, Gaziantep Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 92 Sayfa,
96. Bayram H. The effect of air pollutants on functional and biochemical changes in bronchial epithelial cells from atopic patients with mild asthma and non-atopic non-asthmatic volunteers. 1998, University of London, Academic Department of Respiratory Medicine, PhD Thesis, 268 pages.

97. Abraham G, Zizzadoro C, Kacza J, Ellenberger C, Abs V, Franke J, Schoon HA, Seeger J, Tesfaigzi Y, Ungemach FR. Growth and differentiation of primary and passaged equine bronchial epithelial cells under conventional and air-liquid-interface culture conditions. *BMC Vet Res*, 2011. 7: p. 26.
98. Gao W, Li L, Wang Y, Zhang S, Adcock IM, Barnes PJ, Huang M, Yao X. Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Respirology*, 2015. 20(5): p. 722-729.
99. Evans MJ, Cox RA, Shami SG, Wilson B, Plopper CG. The role of basal cells in attachment of columnar cells to the basal lamina of the trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1989. 1(6): p. 463-469.
100. Rusznak C, Sapsford RJ, Devalia JL, Shah SS, Hewitt EL, Lamont AG, Davies RJ, Lozewicz S. Interaction of cigarette smoke and house dust mite allergens on inflammatory mediator release from primary cultures of human bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy*, 2001. 31(2): p. 226-238.
101. Shiobara T, Usui T, Han J, Isoda H, Nagumo Y. The reversible increase in tight junction permeability induced by capsaicin is mediated via cofilin-actin cytoskeletal dynamics and decreased level of occludin. *PLoS One*, 2013. 8(11): p. e79954.
102. Tsukura Y, Mori M, Hirotsani Y, Ikeda K, Amano F, Kato R, Ijiri Y, Tanaka K. Effects of capsaicin on cellular damage and monolayer permeability in human intestinal Caco-2 cells. *Biol Pharm Bull*, 2007. 30(10): p. 1982-1986.
103. Eljamal M, Wong LB, Yeates DB. Capsaicin-activated bronchial- and alveolar-initiated pathways regulating tracheal ciliary beat frequency. *J Appl Physiol* (1985), 1994. 77(3): p. 1239-1245.
104. Hameister WM, Wong LB, Yeates DB. Tracheal ciliary beat frequency in baboons: effects of peripheral histamine and capsaicin. *Agents Actions*, 1992. 35(3-4): p. 200-207.

105. Ahmed M, Bjurholm A, Srinivasan GR, Lundeberg T, Theodorsson E, Schultzberg M, Kreicbergs A. Capsaicin effects on substance P and CGRP in rat adjuvant arthritis. *Regul Pept*, 1995. 55(1): p. 85-102.
106. McCormack PL, Lyseng-Williamson KA. Budesonide/formoterol: a review of its use as maintenance and reliever inhalation therapy in asthma. *Drugs*, 2007. 67(16): p. 2407-2431.
107. Di Benedetto G, Manara-Shediac FS, Mehta A. Effect of cyclic AMP on ciliary activity of human respiratory epithelium. *Eur Respir J*, 1991. 4(7): p. 789-795.



## ÖZGEÇMİŞ

Halil İbrahim TOY; 1988 yılında Kahramanmaraş'ta doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini Kahramanmaraş'ta tamamladı. Lisans eğitimini 2012 yılında Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde tamamladı.

