

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

**SİGARANIN AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİNDE NEDEN  
OLDUĞU OKSİDATİF VE YANGISAL HASAR ÜZERİNE LİKOPEN  
TEDAVİSİNİN ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Ayşe KÜÇÜK

**Danışman**  
Prof. Dr. Suat ERDOĞAN

**HATAY – 2012**

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

**SİGARANIN AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİNDE NEDEN  
OLDUĞU OKSİDATİF VE YANGISAL HASAR ÜZERİNE LİKOPEN  
TEDAVİSİNİN ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Ayşe KÜÇÜK

**Danışman**  
Prof. Dr. Suat ERDOĞAN

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
1004 Y 0114 nolu proje olarak desteklenmiştir.

**HATAY - 2012**

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

**SİGARANIN AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİNDE NEDEN OLDUĞU  
OKSİDATİF VE YANGISAL HASAR ÜZERİNE LİKOPEN  
TEDAVİSİNİN ETKİLERİ**

Yüksek Lisans Tezi  
Ayşe KÜÇÜK

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 20/01/2012 günü sözlü olarak yapılan savunma sınavında oy çokluğu/oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi:** Jüri başkanı : Prof. Dr. Suat ERDOĞAN  
Üye : Prof. Dr. Deniz YILDIZ  
Üye : Yrd. Doç. Dr. Altuğ KÜÇÜKGÜL

Bu tez, Enstitümüz Biyokimya (VET) Anabilim dalında hazırlanmıştır.

06.02.2012  
Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezım süresince bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Suat ERDOĞAN'a, çalışmamda kullandığım etken maddeyi temin eden Prof. Dr. Kazım ŐAHİN'e, tezime yapmış olduğu katkılardan dolayı Yrd. Doç. Dr. Altuğ KÜÇÜKGÜL'e, laboratuvar arkadaşım Fırat Barış BARLAS ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sekreteri Zeynep MELEK'e, Laboratuvarlarının imkanlarını bize sundukları için Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim üyelerinden Doç. Dr. Mustafa ERAYMAN ve Öğr. Gör. Emre İLHAN'a teşekkür ederim. Ayrıca gösterdikleri maddi ve manevi destekten dolayı ailem, F.Sevim-Mustafa KÜÇÜK ve kardeşlerime teşekkürlerimi borç bilirim.

# İÇİNDEKİLER

|  | <b>Sayfa<br/>No</b> |
|--|---------------------|
| Kabul ve Onay.....   | II                  |
| TEŞEKKÜR.....  | III                 |
| İÇİNDEKİLER.....   | IV                  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....   | V                   |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....                          | VI                  |
| <b>ÖZET</b> .....  | <b>VII</b>          |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>VIII</b>         |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....  | <b>1</b>            |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....                               | <b>3</b>            |
| 2.1. Likopen.....  | 3                   |
| 2.2. Sigara Dumanı ve Oksidatif Stres.....                   | 4                   |
| 2.3. Antioksidan Savunma Sistemi ve Oksidatif Stres.....     | 6                   |
| 2.4. KOAH patogeneğinde rolü olan hücre ve mediyatörler..... | 7                   |
| 2.4.1. Makrofajlar.....                                      | 7                   |
| 2.4.2. Nötrofiller.....                                      | 8                   |
| 2.4.3. Lenfositler.....                                      | 8                   |
| 2.4.4. Epitel Hücreler.....                                  | 9                   |
| 2.5. KOAH'ta Yangı Medyatörleri.....                         | 9                   |
| 2.5.1. Kemokinler.....                                       | 10                  |
| 2.5.2. Sitokinler.....                                       | 10                  |
| 2.6. Matriks Metalloproteinazlar.....                        | 11                  |
| 2.7. Apoptoz.....  | 11                  |
| <b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....                              | <b>13</b>           |
| 3.1. Hücre Hattı.....  | 13                  |
| 3.2. Hücre Pasajı.....                                       | 13                  |
| 3.3. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar.....                 | 13                  |
| 3.3.1. Likopen.....  | 13                  |
| 3.3.2. Medyumun Sigara Dumanı ile Doyurulması.....           | 14                  |
| 3.4. Homojenat Hazırlama.....                                | 14                  |
| 3.5. Biyokimyasal Analizler.....                             | 15                  |
| 3.5.1. Bradford Yöntemiyle Protein Analizi.....              | 15                  |
| 3.5.2. Nitrik Oksit (NO) Analizi.....                        | 15                  |
| 3.5.3. Glutatyon (GSH) Düzeyinin Belirlenmesi.....           | 16                  |
| 3.5.4. Katalaz (CAT) Aktivitesi Analizi.....                 | 16                  |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.5.5. Tiazol Mavisi Tetrazolium Bromid (MTT) Viabilite Testi.....  | 17        |
| 3.5.6. Tripkan mavisi boyama metodu ile canlı ölü hücre sayımı.....                                       | 17        |
| 3.5.7. Malondialdehit (MDA) Konsantrasyonunun Tespiti.....  | 18        |
| 3.5.8. Total Oksidan Kapasite (TOK) Analizi.....  | 18        |
| 3.5.9. Total Antioksidan Kapasite (TAK) Analizi.....  | 18        |
| 3.6. RNA İzolasyonu.....  | 19        |
| 3.7. cDNA Sentezi ve Reverz Transkripsiyon (RT).....  | 19        |
| 3.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....   | 20        |
| 3.9. İstatistiksel Metod.....   | 20        |
| <b>4. BULGULAR.....</b>   | <b>22</b> |
| 4.1. Spektrofotometrik analizler.....   | 22        |
| 4.1.1. Farklı konsantrasyonlardaki sigara dumanının hücre viabilitesi üzerine etkisi.....                 | 22        |
| 4.1.2. Farklı konsantrasyonlardaki likopenin hücre viabilitesine etkisi.....                              | 23        |
| 4.1.3. Sigara dumanı içeriğinin neden olduğu hücresel kayıplar üzerine Likopen uygulanmasının etkisi..... | 23        |
| 4.1.4. Glutasyon düzeyi üzerine likopen ve sigara dumanının etkisi.....                                   | 25        |
| 4.1.5. Malondialdehit (MDA) düzeyi üzerine sigara dumanı ve likopen uygulamasının etkileri.....           | 25        |
| 4.1.6. Sigara dumanı ve likopenin nitrik oksit üzerine etkisi.....  | 26        |
| 4.1.7. Sigara dumanı maruziyeti ve likopenin katalaz aktivitesine etkisi.....                             | 27        |
| 4.1.8. Sigaranın azalttığı antioksidan kapasite (TAK) üzerine likopenin etkisi.....                       | 27        |
| 4.1.9. Total Oksidan Kapasite (TOK) üzerine likopen ve sigaranın etkisi.....                              | 28        |
| 4.2. Sigara duman içeriği ve likopenin hücre morfolojisi ve sayılarına etkisi.....                        | 29        |
| 4.3. RT-PCR Sonuçları.....  | 32        |
| 4.3.1. COX-2 mRNA transkripsiyonu.....  | 32        |
| 4.3.2. IFN- $\gamma$ mRNA transkripsiyonu.....  | 33        |
| 4.3.3. iNOS mRNA transkripsiyonu.....   | 34        |
| 4.3.4. TNF- $\alpha$ mRNA transkripsiyonu.....  | 35        |
| 4.3.5. IL-1 $\beta$ mRNA transkripsiyonu.....   | 35        |
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>   | <b>37</b> |
| <b>6. SONUÇ.....</b>  | <b>40</b> |
| <b>7. KAYNAKLAR.....</b>  | <b>41</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>  | <b>46</b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|  |    |
|--|----|
| Şekil 2.1. Likopenin kimyasal yapısı.....  | 3  |
| Şekil 2.2. Likopenin endotel hasara karşı koruyucu etkisi.....   | 4  |
| Şekil 2.3. Oksidatif stres ve doku hasarından kaynaklanan biyomolekül oksidasyonu.....                         | 5  |
| Şekil 2.4. Serbest radikallerin hasarı üzerine glutasyon mekanizmasının etkileri.....                          | 7  |
| Şekil 2.5. Sigara dumanının akciğer epitel hücrelerine verdiği zarar ve meydana gelen değişimler.....          | 9  |
| Şekil 2.6. Apoptozun şekillendiği ekstrinsik ve intrinsik yollar.....  | 12 |
| Şekil 3.1. Medyumun sigara dumanı ile doyurulma düzeneği.....  | 14 |
| Şekil 4.1. Sigara dumanının farklı konsantrasyonlarının hücre viabilitesine etkisi.....                        | 22 |
| Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan likopenin hücre viabilitesine etkileri.....                     | 23 |
| Şekil 4.3. Sigara duman içeriğinin neden olduğu hücre ölümlerine likopen uygulanmasının etkisi.....            | 24 |
| Şekil 4.4. Canlı hücre sayısına likopen uygulaması ve sigara içeriğinin etkisi.....                            | 24 |
| Şekil 4.5. Hücre içi glutasyon düzeyi üzerine sigara dumanı ve likopen muamelesinin etkileri.....              | 25 |
| Şekil 4.6. Sigara dumanı maruziyeti ve likopen kullanımının MDA düzeyi üzerine etkisi.....                     | 26 |
| Şekil 4.7. Sigara dumanının neden olduğu nitrik oksit üretimi üzerine likopen uygulamasının etkileri.....      | 26 |
| Şekil 4.8. Sigara içeriği ile likopen uygulamasının katalaz aktivitesine etkisi.....                           | 27 |
| Şekil 4.9. A 549 hücrelerine likopen ve SGR uygulanmasının TAK üzerine etkisi.....                             | 28 |
| Şekil 4.10. Akciğer epitel hücrelerinde TOK üzerine sigara duman içeriği ve likopen uygulanmasının etkisi..... | 28 |
| Şekil 4.11. Kontrol grubu A 549 hücreleri (3 saat inkübasyon) mikroskop görüntüleri.....                       | 29 |
| Şekil 4.12. Sigara duman içeriği ile doyurulan medyum eklenen A 549 hücreleri.....                             | 30 |
| Şekil 4.13. A 549 hücrelerine 100 ng likopen eklenen grupta mikroskop görüntüleri.....                         | 30 |
| Şekil 4.14. Likopen ve sigara duman içeriği eklenen grup mikroskop görüntüsü.....                              | 31 |
| Şekil 4.15. COX-2 mRNA transkripsiyonu.....  | 32 |
| Şekil 4.16. COX-2 mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrisi.....  | 33 |
| Şekil 4.17. IFN- $\gamma$ mRNA transkripsiyonu.....  | 33 |
| Şekil 4.18. iNOS mRNA transkripsiyonu.....   | 34 |
| Şekil 4.19. iNOS mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrisi.....   | 34 |
| Şekil 4.20. TNF- $\alpha$ mRNA transkripsiyonu.....  | 35 |
| Şekil 4.21. IL-1 $\beta$ mRNA transkripsiyonu.....   | 36 |

## KISALTMALAR DİZİNİ

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| APAF                          | : Apoptotik proteaz aktive edici faktör       |
| AP                            | : Aktivatör protein                           |
| BAL                           | : Bronkoalveolar lavaj                        |
| CAT                           | : Katalaz                                     |
| COX                           | : Siklooksijenaz                              |
| DEPC                          | : Dietilpirokarbonat                          |
| DISC                          | : Ölümü başlatan sinyalleşme kompleksi        |
| DMEM                          | : Dulbecco's Modified Eagle Medium            |
| DNA                           | : Deoksiribonükleik asit                      |
| DTNB                          | : 2-Nitrobenzoik asit                         |
| E-GPx                         | : Ekstraselüler glutatyon peroksidaz          |
| FCS                           | : Föetal buzağı serumu                        |
| GSH                           | : Glutatyon                                   |
| G-Px                          | : Glutatyon peroksidaz                        |
| GM-CSF                        | : Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | : Hidrojen peroksit                           |
| IL                            | : interlökin                                  |
| IK-B                          | : İnhibitör faktör kapa B                     |
| IFN                           | : İnterferon                                  |
| LTB                           | : Lökotrien                                   |
| MTT                           | : Thiazolil blue tetrazolium bromide          |
| MMP                           | : Matriks metalloproteinaz                    |
| MDA                           | : Malondialdehit                              |
| NF-kB                         | : Nüklear faktör kapa B                       |
| NO                            | : Nitrik oksit                                |
| O <sup>-2</sup>               | : Süperoksit                                  |
| PMN                           | : Polimorf nüklear lökosit                    |
| ROT                           | : Reaktif oksijen türleri                     |
| RAT                           | : Reaktif azot türleri                        |
| SGR                           | : Sigara dumanı içeriği ile doyurulmuş medyum |
| TNF                           | : Tümör nekroz faktör                         |
| TGF                           | : Tümör büyüme faktörü                        |
| TBA                           | : Tiyobarbitürik asit                         |
| TCAA                          | : Triklor asetik asit                         |
| TAK                           | : Total antioksidan kapasite                  |
| TOK                           | : Total oksidan kapasite                      |



## ÖZET

### **Sigaranın Akciğer Epitel Hücrelerinde Neden Olduğu Oksidatif ve Yangısal Hasar Üzerine Likopen Tedavisinin Etkileri**

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAHA) insanlarda dünya genelinde ölümlerin başlıca yaygın nedenleri arasında beşinci sırada yer alır. Hastalığın başlıca nedenleri arasında sigara kullanımı ve mesleki zararlı gazlar olup hastalık kronik, ilerleyici ve geri dönüşümsüzdür. Bu araştırmada sigara dumanına maruz bırakılan akciğer epitel hücrelerinde (A549) gelişen hücre kayıpları, oksidatif stres ve yangı üzerine likopen kullanımının etkinliği araştırıldı. Sigara dumanı ile doyurulan sıvı besi yeri ile 3 saat inkübasyona maruz bırakılan hücrelerin % 46'sının canlılığını kaybettiği tespit edildi. Ancak medyuma 100 ng/ml düzeyinde likopen ilavesi sigaranın neden olduğu hücre ölümlerini yaklaşık % 30'unu engelledi ( $p < 0,005$ ). Sigara duman içeriği hücrelerde nitrik oksit üretimini iNOS ekspresyonu üzerinden arttırdı, likopen uygulaması ise bu üretimi belirgin düzeyde azalttı ( $p \leq 0,001$ ). Sigara lipidlerde peroksidasyonu arttırarak MDA düzeyini arttırırken ( $p < 0,001$ ), likopen peroksidasyonu önemli düzeyde düşürdü ( $p < 0,001$ ). Sigara, hücre içi antioksidan moleküllerden glutatyon konsantrasyonu ( $p < 0,005$ ), katalaz ( $p < 0,001$ ) ve total antioksidan kapasiteyi baskılayarak, likopen bu parametrelerde koruyucu etki gösterdi. Diğer taraftan sigara total oksidan kapasiteyi yükseltirken, likopen bunun üzerine olumlu etki gösterdi. Kronik inflamasyon (yangı) dokularda çeşitli derecelerde hasarlara yol açabilir. Hücrelerin sigara duman içeriğine maruz bırakılması, yangısal prostaglandin sentezleyen siklooksijenaz-2 enzim ekspresyonu ile interferon gama, tümör nekroz faktör-alfa ve interlökin-1 beta transkripsiyon düzeylerini sırasıyla 12, 4, 6 ve 7 misli arttırarak yangıya neden olduğu saptandı. Bununla birlikte, likopen tedavisi bu artışları büyük oranlarda baskılayarak anti-enflamatuar etkili olduğunu ortaya koydu. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, likopenin akciğer epitel hücrelerinde sigaranın neden olduğu oksidatif stres, yangı ve toksik etkileri önemli düzeylerdegeriletebildiği ortaya çıkarıldı. *In vitro* çalışmanın *in vivo* araştırmalar ile desteklenmesi ve tedavi edici etki mekanizmalarının ileri teknikler ile analiz edilmesi faydalı olacaktır.

**Anahtar kelimeler:** KOAH, likopen, akciğer, oksidatif stres, yangı

## ABSTRACT

### **The Effects of Lycopene Treatment on Cigarette Induced Oxidative and Inflammatory Damage in Lung Epithelial Cells**

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is the fifth leading death problem for the human in the world. COPD is a progressive and chronic disease and the main causative factors are cigarette smoke and occupational exposure to fumes, chemicals and dusts. The smoke contains enormous amounts of reactive free radicals which can cause formation of chain reactions and inflammation in the lungs. In the present study, the lung epithelial cells (A549) were exposed to cigarette smoke using smoke contained medium for 3 hours with and without 100 ng/ml lycopene. It was found that smoke exposure killed about 46 % of the cells at the end of 3 h incubation ( $p < 0,001$ ). Addition of lycopene has reversed approximately 30 % of smoke damage which demonstrates the protection role of this agent ( $p < 0,005$ ). It was detected that cigarette smoke caused to significant increase in nitric oxide production. However, lycopene treatment decreased cigarette induced NO production ( $p \leq 0,001$ ). Lycopene application did decrease cigarette smoke caused lipid peroxidation ( $p < 0,001$ ). Depressed antioxidants such as glutathione level, catalase activity and total antioxidant capacity induced by cigarette smoke ( $p < 0,005$ ), significantly reversed by lycopene treatments. Chronic inflammation can cause severe damage to body cell and organs. Cigarette smoke exposure induced prostaglandin producing enzyme cyclooxygenase-2 enzyme, and selected cytokines such as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  mRNA expressions by 12, 4, 6 and 7-folds, respectively. But, lycopene treatments significantly decreased these cytokine levels demonstrating its anti-inflammatory effects. As a result of this study, it was shown that lycopene treatment has a potential affects against cigarette smoke induced cell toxicity, oxidative stress and inflammatory events. It was concluded that complementary *in vivo* study should be carried out with advanced technologies.

**Key words:** COPD, lycopene, lung, oxidative stress, inflammation

# 1. GİRİŞ

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH), akciğerlerin geri dönüşümsüz, genellikle ilerleyici ve hava akımının geçtiği yollarda daralma ile karakterize edilen bir hastalıktır. Bu hastalık başta sigara kullanımı olmak üzere, hava kirliliği, zararlı gaz ve partiküllere maruz kalınması ile ortaya çıkar (Rabe ve ark. 2007). KOAH'ın gelişimi ve ilerlemesinde sigara kullanımı en önemli risk faktörü olup, hastalık vakalarının yaklaşık % 90'ını oluşturur (Hogg 2004). KOAH hastalığı günümüzde insanlarda ölüm sebepleri arasında beşinci sırada yer almaktadır (Rabe ve ark. 2007). Bu hastalıkta akciğerlerin küçük solunum yollarına nötrofil, makrofaj ve T lenfositler gibi yangısal hücreler infiltre olur (Hogg 2004; Quint ve Wedzicha 2007). Hastalığın şiddeti yangının derecesiyle artar, kronik obstrüktif bronşit, fibröz doku, anfizem, akciğer paronşim dokusunun yıkımlanması, elastikiyetini kaybetmesi ve bronşiyollerin daralması ile sonuçlanır. Akciğer dokusunda proteinaz-antiproteinaz enzim ve oksidan-antioksidan sistemlerindeki dengesizlik de KOAH'ın patolojisinde önemli bir yer tutar (Macnee ve Rahman 1999; Turino 2002). Reaktif oksijen (ROT) ve azot (RAT) türlerinin antioksidan sistemin karşılayabileceğinden daha fazla üretilmesi sonucu oksidatif stres gelişir. Sigara dumanı 4000 den fazla kimyasal bileşiği yapısında bulundurur ve yüksek konsantrasyonlarda da serbest radikalleri ( $10^{14}$ /her nefes çekiminde) bulundurur. Yüksek oranda gaz fazında bulunan süperoksit anyonu ve nitrik oksit hızla reaksiyona girerek peroksinitriti oluşturur. Güçlü bir oksidan olan bu molekül karbonhidrat, protein, lipid ve DNA gibi moleküllerde hasara yol açarak oksidatif strese neden olur (Pryor ve Stone 1993). Serbest radikallerin etkisiyle araşidonik asitten üretilen izoprostanlar bronşlarda daralmaya neden olur. Reaktif oksijen türleri nükleer faktör-kB (NF-kB) ve aktivatör protein-1 (AP-1) aracılığı ile yangıyı güçlendirerek yangı başlatıcı sitokinlerin salınımına neden olur. Sigara dumanında bulunan oksidan moleküller antioksidan savunma üyelerini önemli düzeyde azaltarak hastalığın ilerlemesine de neden olur.

Akciğerde hava yollarının iç yüzeyi epitel hücrelerle örtülmüştür. Bu hücreler doku ile dış ortam arasında yalnızca bir bariyer oluşturmaz, aynı zamanda başta KOAH hastalığı olmak üzere, çeşitli patojenlere karşı koruyucu aracı molekülleri üreten önemli bir kaynaktır (Sarir ve ark. 2008). Sigara dumanı ve diğer toksik ajanlar hava yollarındaki epitel bariyer sisteminde bozulmalara neden olarak patojenlere karşı savunmasını azaltır. Sigara dumanı epitel hücrelerini uyararak tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ), interlökin-1

(IL-1) ve interlökin (IL-8) gibi yangısal sitokinler ile proteazların üretimine neden olur. KOAH tedavisinde sigaranın bırakılması yeterli olmayıp, akciğerlerde bronşları genişleticiler ve kortikosteroidler kullanılmaktadır. Ancak bunlar düşük düzeyde yangıyı baskılarken, yüksek düzeyde anti-inflamatuvar etki göstermemektedir.

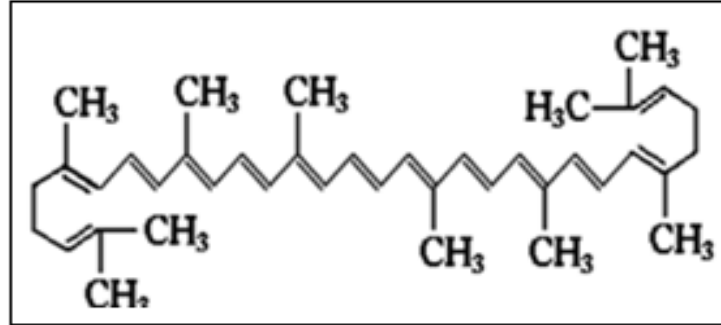
Likopen, 40 karbonlu, lipofilik ve çoklu doymamış çift bağ içeren düz hidrokarbon zincirli bir moleküldür (Rao ve Agarawal 2000). Likopenin taşıdığı konjuge çift bağlar moleküle güçlü bir antioksidan etkinlik kazandırır (Arab ve Steck 2000; Bhuvareswari ve ark. 2005). Bu çalışmada güçlü bir anti-enflamatuvar ve anti-oksidan molekül olan likopenin etkinliği sigara dumanı maruziyetiyle oluşturulan *in vitro* KOAH modelinde bazal akciğer epitel hücreleri (A549) üzerinde araştırıldı. Oksidan-antioksidan ve yangısal parametreler biyokimyasal ve moleküler biyoloji yöntemleri ile analiz edilerek, likopenin bu hastalıktaki rolü değerlendirildi.

## 2. GENEL BİLGİ

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) olan hastalar, kronik bronşit, anfizem ve/veya astımın baskın özelliklerini gösterirler. Patojenik belirleyicilerdeki benzerlik, genetik varyasyonlar ya da polimorfizmler KOA kaynaklı yangı, proteaz-antiproteaz dengesizlik ve oksidatif stresle ilişkilidir. Kronik obstrüktif akciğer hastalığındaki farklı moleküler ve biyolojik belirleyicilerdeki değişik özellikler yangı, proteazlar ve oksidanların patojenik ve mekanistik durumlarını yansıtır.

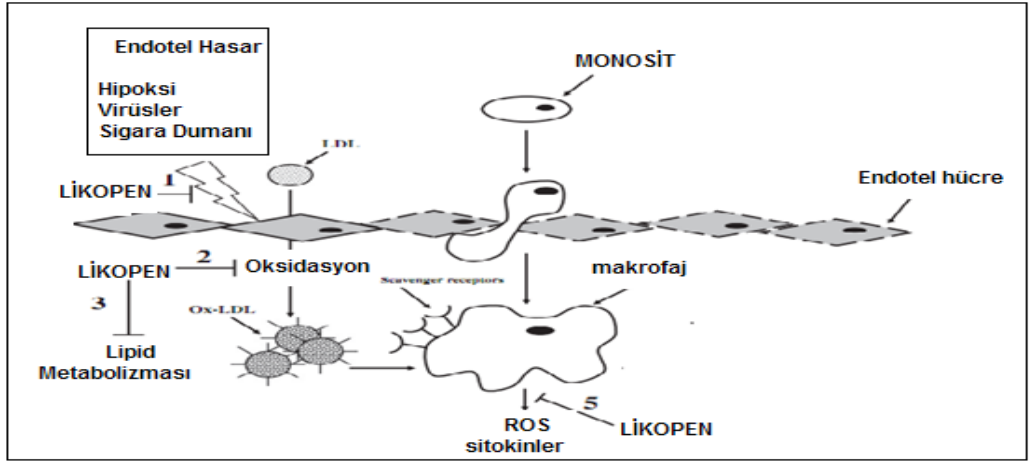
### 2.1. Likopen

Likopen domates, karpuz, greyfurt ve kayısı gibi pek çok kırmızı renkli meyve ve sebze de bulunan biyoaktif bir karotenoiddir (Nguyen ve ark. 1999). Moleküler formülü  $C_{40}H_{56}$  olan likopen, düz zincirli asiklik bir polien hidrokarbondur (Şekil 2.1). Likopen hayvanlar tarafından sentezlenemeyen, ancak bazı bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından üretilen ve provitamin A aktivitesi göstermeyen bir pigment maddesidir (Rao ve ark. 1999).



Şekil 2.1. Likopenin kimyasal yapısı

Karotenoidlerin önemli birer oksidan molekül temizleyicisi olduğu bilinmektedir (Di Mascio ve ark. 1989). Contrell ve ark. (2003) likopenin lipozom gibi biyolojik membran modellerinde güçlü bir oksidan temizleyicisi olduğunu belirtmişlerdir (Şekil 2.2.)



Şekil 2.2. Likopenin endotel hasara karşı koruyucu etkisi

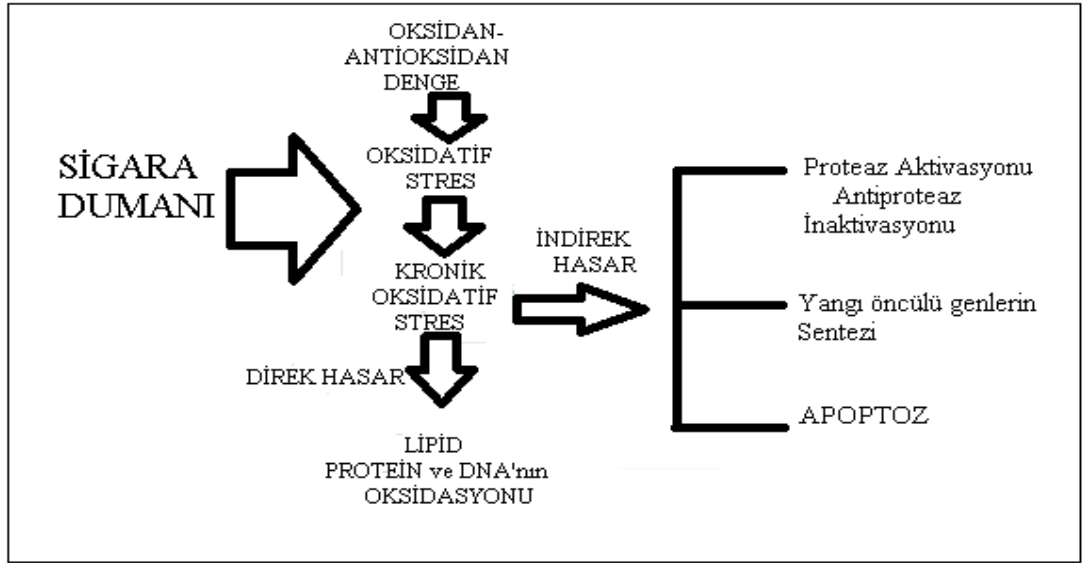
Likopenin sigara dumanı içeriğinin zararlılarından olan nitrojen dioksit radikali ( $\text{NO}_2^-$ ) ve hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) karşı korumada  $\beta$ -karotenden daha etkili olduğu rapor edilmiştir (Böhm ve ark. 2001). Likopenin *in vivo* ve *in vitro* olarak lipid, protein ve DNA'nın oksidatif yıkımına karşı koruyucu rol oynadığı da tespit edilmiştir (Rehmann ve ark. 1999). Antioksidan etkilerine ek olarak likopen hücre döngüsünün ilerlemesi, hücre bağlantıları ve sitokinler, hormonlar ve büyüme faktörlerinin koordine bir şekilde çalışması gibi önemli biyolojik süreçlerde etkin bir rol oynar (Wertz ve ark. 2004). Likopen siklooksijenaz ve lipooksijenazların aktivitelerini düzenleyerek yangı öncülü moleküllerden prostoglandin, prostasiklin, tromboksan ve lökotrien sentezini önleyerek yangının baskılanmasını sağlar (Pruthi ve ark. 2003).

Nükleer faktör kapa-B (NF-kB), DNA'da transkripsiyonu kontrol eden bir protein komplekslerinden biridir. Genelde sitoplazmada pasif halde bulunan inhibitör faktör kapa-B (Ik-B) ile birlikte bulunur ve yangı sırasında Ik-B'nin fosforilasyonla ayrılmasıyla aktif hale gelir. Likopen NF-kB'nin bağlanma aktivitesini inhibe ederek, matriks metalloproteinaz- 9 (MMP-9) enziminin salgılanmasına neden olur (Hung ve ark. 2008; Huang ve ark. 2007).

## 2.2. Sigara Dumanı ve Oksidatif Stres

Sigara dumanında bulunan çeşitli zararlı gaz ve diğer kimyasal içerikleri KOAH'ın gelişiminde en önemli faktörlerin başında yer alır (Barnes ve ark. 2003; Pauwels ve ark. 2001). Sigara dumanı gaz fazında yaklaşık  $10^{15}$  kadar serbest radikal içerirken, partikül fazında yaklaşık  $10^{17}$  adet serbest radikal bulunur (Valavanidis ve ark. 2009). Gaz fazında ise yüksek konsantrasyonlarda hidroksil radikali ( $\text{OH}^-$ ) ve süperoksit anyonu ( $\text{O}_2^-$ ) gibi

reaktif oksijen türleri (ROT) bulunur. Sigara dumanının partikül fazında bulunan semikinon radikaller ise akciğerlerde ROT ve RAT'ların üretiminden sorumludur. Bu serbest radikaller biyolojik önemi olan molekülleri yıkar ve antioksidan sistem üyelerini azaltır. Sigara dumanında bulunan krom, nikel, bakır ve demir gibi metaller reaktif oksijen türlerinin üretiminde artışa neden olurken; bakır, kadmiyum ve civa gibi metaller ise tiyol içerikli antioksidanları azaltır ve antioksidan enzim aktivitesini baskılar. Sigara dumanındaki ROT, hücre membranları ve solunum yollarında bulunan antioksidanlarla reaksiyona girer ve oksidanların üstünlüğü durumunda oksidatif stres oluşturarak akciğerlerde hücre harabiyetine neden olur. Sigara dumanı zararlıları apoptoz, yangı, hücre proliferasyonu ve gen ekspresyonu gibi pek çok yolla meydana gelen değişik hücresel olaylarda tetikleyici rolü oynar (Gumus ve ark. 2008)(Şekil 2.3). Aynı zamanda, ROT hücre membranlarına nüfuz eder ve böylece sirkülasyonu bozar (Afri ve ark. 2002; Brzezinka ve ark. 2005). Kronik obstrüktif akciğer hastalığının gelişiminde görülen oksidatif stres uyarımlı apoptotik ve nekrotik hücre ölümü, organ kayıplarında önemli rol oynar (Remels ve ark. 2007; Van der Toorn ve ark. 2007).



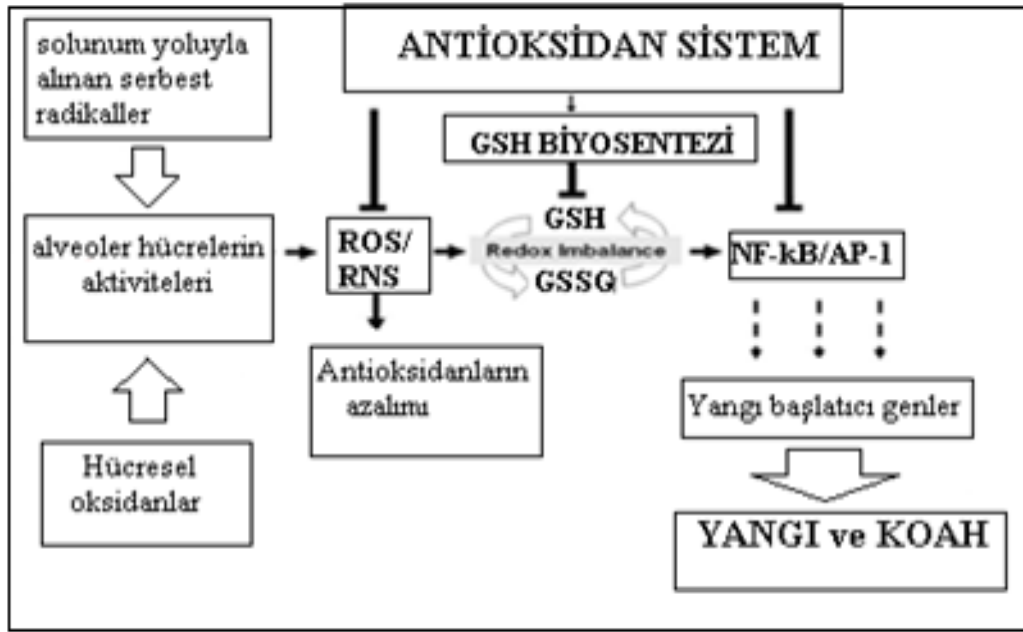
Şekil 2.3. Oksidatif stres ve doku hasarından kaynaklanan biyomolekül oksidasyonu

### 2.3. Antioksidan Savunma Sistemi ve Oksidatif Stres

Nitrik oksit ve hidroksil radikali gibi bazı reaktif oksijen türleri çeşitli fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynamakla birlikte aşırı miktarları zararlı etki gösterebilir (Conner ve Grisham 1999; Rahman ve MacNee 1999). Akciğerlerin normal fonksiyonlarını sürdürebilmesi için hücrelerde savunma amaçlı oluşturulan bu serbest radikallerle antioksidan moleküller arasında bir denge bulunmalıdır. Bu dengenin oksidanların lehine bozulması durumunda oksidatif stres meydana gelir.

Organizmada biyolojik moleküllerin oksidanlar tarafından yıkımını en aza indirmek için enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlardan oluşan bir savunma sistemi bulunmaktadır. Enzimatik antioksidan savunma sistemi elemanları süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) iken; enzimatik olmayanlar ise vitaminler (A,C,E), tiyol antioksidanlar (glutatyon, tiyoredoksin, lipoik asit gibi), doğal flavonoidler ve melatonin'dir (Mates ve ark. 1999). Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin artışı antioksidan sistem elemanları üzerine baskılayıcı etki yapar. Glutatyon sistemi ROT ve RAT'ni inaktive eden koruyucu bir role sahiptir ve solunum yolundaki en önemli antioksidan savunma sistemini oluşturur (Dekhuijzen 2004). Glutatyon (GSH), akciğerlerde hava boşluğu epitel bariyerinin bütünlüğünün korunmasında önemli rollere sahiptir. Glutatyon düzeyindeki azalma, epitel hücrelerin geçirgenliğini artırır ve bariyer fonksiyonunu bozar (Gao ve ark. 1999). Glutatyon ve GSH-Px solunum yollarında sigara dumanı, zararlı partikül ve gazlar gibi iritanların uyarımıyla oluşan ROT'lara karşı koruyucu etkilere sahiptir (şekil 2.4). Ekstraselüler glutatyon peroksidaz (e-GPx) da akciğerde lokalize olmuş makrofajlardan üretilir. Aynı zamanda yapılan bir araştırmaya göre e-GPx sigara dumanı gibi ekzojen oksidanlara maruz kalan astımlı bireylerde meydana gelen oksidatif stres sonucu epitel yüzeyinde upregüle edilmektedir (Comhair ve ark. 1999).





Şekil 2.4. Serbest radikallerin hasarı üzerine glutasyon mekanizmasının etkileri

## 2.4. KOAH Patogenezinde Rol Oynayan Hücreler ve Mediyatörler

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı patolojisinde pek çok hücre ve yangı mediyatörü merkezi bir role sahiptir. Sigara dumanından kaynaklanan oksidatif stres, aktivatör protein-1 (AP-1) ve nükleer faktör kappa B (NF-kB) (Baldwin 1996) gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri ve sinyal transdüksiyon sistemlerinin aktivasyonunu uyarır ve akciğerlerde yangı başlar (Rahman ve ark. 2004). Sigara içeriğinin akciğerlerde oluşturduğu yangısal cevap KOAH hastalığında önemli bir patogenetik faktördür (Pauwels ve ark. 2001). Alveolar makrofajlar, polimorf nükleer lökositler (PMN), T-lenfositler (CD8<sup>+</sup> ve CD4<sup>+</sup>), sitokinler gibi mediyatörler, oksidanlar ve matriks metalloproteinazlar (MMPs)'ı içeren yangısal hücre ve moleküller KOAH hastalığının gelişiminde ve kronikleşmesinde önemli rol oynar (Barnes 2000).

### 2.4.1. Makrofajlar

Alveolar makrofajlar, patojenlere karşı savunma, yangısal cevap gibi doğuştan ve sonradan kazanılan bağışıklıkta kritik bir rol oynar (Medzhitov ve Janeway 2000). Bu hücrelerin KOAH'ın yangısal sürecinin gelişmesinde önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Di Stefano ve ark. 1998). Sigara dumanı içeriği uyarımıyla hücrelerden salınan tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-8 (IL-8) gibi yangısal mediyatörler makrofajları aktive eder. Makrofajlar, tümör büyüme faktörü (TGF- $\beta$ ) ve MMPs'lerin doku inhibitörleri gibi

yangı karşıtı aracı moleküllerin hücrelerden salınımı ile yangının devam etmesinde önemli rol oynar (Shapiro 1999). Bununla birlikte, KOAH hastalarında yangı gelişimi ile meydana gelen makrofaj proliferasyonunun sigara içenlerle karşılaştırıldığında azaldığı tespit edilmiştir (Pons ve ark. 2005).

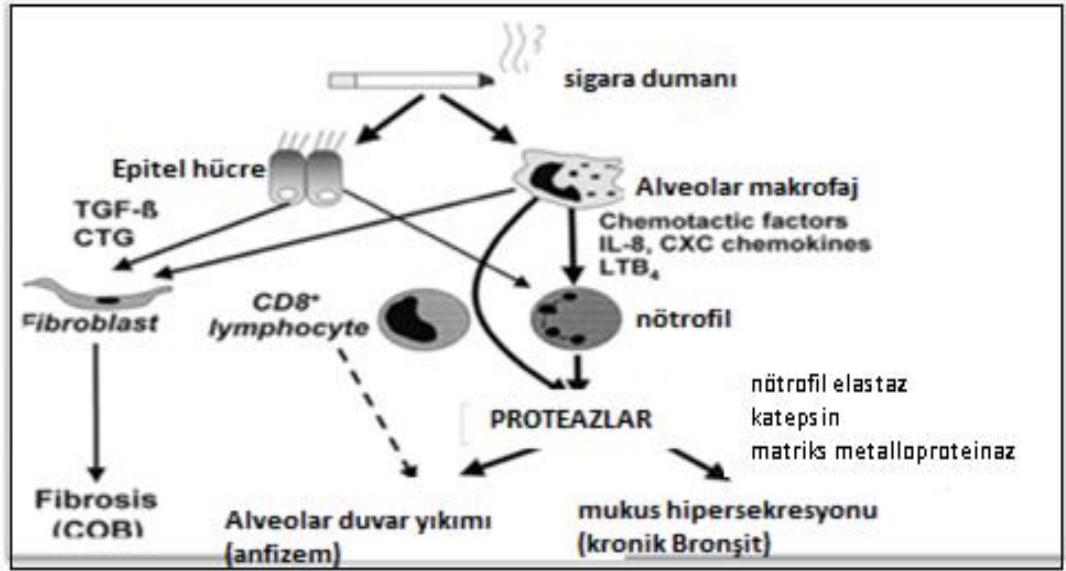
#### 2.4.2. Nötrofiller

KOAH'ta primer efektör hücreler olarak bilinen nötrofillerin varlığı yapılan araştırmalarda ortaya konulmuştur (Barnes 2007). Aktive edilmiş nötrofillerden salınan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksit anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ) gibi oksijen radikalleri ile matriks metalloproteinazlar ve nötrofil elastaz gibi enzimlerin etkisiyle doku yıkımı gerçekleşir (Henricks ve Nijkamp 2001). Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) olan hastaların bronkoalveolar lavaj sıvısında (BAL) ve balgamlarında nötrofil sayısının önemli derecede arttığı saptanmıştır (Keatings ve Barnes 1997).

#### 2.4.3. Lenfositler

KOAH'lı hastaların akciğerlerinde T lenfositlerin arttığı gözlenmiştir (Hogg 2001). T lenfositler indirek ya da direk olarak  $CD8^+$  T lenfositlerden  $TNF-\alpha$ 'yı ve aktive  $CD4^+$  T lenfositlerinden interferon gamma ( $IFN-\gamma$ ) gibi sitokinlerin salınımı ile akciğer alveollerinde harabiyete neden olabilir (Cosio ve ark. 2002).  $CD8^+$  hücreleri akciğer parenşimindeki granzim ve perforinlerin salınımı yolu ile parenşimal yıkıma neden olabilir (Saetta ve ark. 2001). T lenfositler, ya fagositik hücreleri ve B hücrelerini aktive eden yangı öncülü mediyatörlerin salınması yolu ile ya da direk sitolitik aktivite ile doku hasarına neden olabilir (Monaco ve ark. 2004).

Aktive olan akciğer lenfositleri KOAH'ın patogenezinde önemli olan aracı molekülleri salgılatır (Sullivan ve ark. 2005; Grumelli ve ark. 2004). Bu hastalardaki T lenfositleri (özellikle  $CD8^+$ ) çok fazla aktive edildiklerinden pek çok aracı molekülün üretimini artırır ve hastalığın şiddetiyle paralellik gösterir (Gadgil ve ark. 2006).  $CD8^+$  T-lenfositlerinin aynı zamanda yangının indüklenmesinde kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (Maeno ve ark. 2007)(Şekil 2.5.).  $CD8^+$  T lenfositleri bir apoptotik yol uyarıcısı olan Fas-ligand proteinlerinde aktivasyon yaparak da sitolitik etki gösterebilir (Henkart 1994; Kojima ve ark. 1994).



Şekil 2.5. Sigara dumanının akciğer epitel hücrelerine verdiği zarar ve meydana gelen değişimler

#### 2.4.4. Epitel hücreler

Akciğer epitel hücreleri sigara dumanı veya diğer zararlı partikül ve gazlardan ekzojen olarak, fagositlerden ve diğer hücrelerden endojen olarak üretilen oksidanlara sürekli maruz kalır. Epitel hücreler bu oksidatif strese karşı enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistemler tarafından koruma altına alınmıştır (Halliwell 1996). Ancak oksidanların baskın gelmesi ve antioksidan sistemin zayıflaması durumunda akciğer epitel hücrelerinde yangıyı başlatan moleküler mekanizmalar aktive olur (Rahman ve Macnee 1998).

Epitel hücreler antimikrobiyal ve doku onarıcı etkisi olan defensin gibi katyonik peptidleri sentezleyerek savunma sisteminde görev alır (Aarbiou ve ark. 2002). Sigara duman içeriği akciğer epitel hücrelerinde TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi yangı öncülü sitokinlerin salınımına neden olur (Hellerman ve ark. 2002; Takizawa ve ark. 2001)

#### 2.5. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı'ndaki Yangı Mediyatörleri

Kemokinler, yangısal sitokinler, büyüme faktörleri, ROT ve RAT, lipid peroksidler gibi pek çok farklı yangısal mediyatör KOAH'ın patofizyolojisinde kritik rollere sahiptir (Barnes 2004).

### 2.5.1 Kemokinler

Yangısal ve bağışıklık cevabının düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Olson ve Ley 2002). Kemokinlerin en önemlileri interlökinler ve lökotrienler (özellikle LTB<sub>4</sub>) dir (Sarir ve ark. 2008). Bir kemokin olan IL-8, oksidatif hasar ve yangıda etkisi olan aktive edilmiş nötrofillerin infiltrasyonunda merkezi bir rol oynar. IL-8 aynı zamanda nötrofiller için güçlü bir parakrin ve kemotaktik bir etkiye sahiptir (Weathington ve ark. 2006). IL-8 makrofajlar, nötrofiller ve solunum yolu epitel hücrelerinden salınırlar (Mukaida 2003). IL-8 üretiminin artışı TNF- $\alpha$ , oksidatif stres ve sigara dumanı zararlılarının neden olduğu belirtilmiştir (Mortaz ve ark. 2008).

### 2.5.2 Sitokinler

Kemokinlere ek olarak KOAH'ın patolojisinde pek çok sitokin de rol oynar. Sitokinler; epitel ve endotel hücreler, fibroblastlar, T lenfositler, makrofajlar ve monositleri kapsayan farklı hücrelerden üretilen küçük protein yapılı mediyatörlerdir (Chung 2001). Tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ), IFN- $\gamma$  ile IL-1 $\beta$  ve granüosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) gibi pek çok mediyatör KOAH'ın patogenezi ile ilişkilidir (Barnes 2004).

Tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) yangı başlatıcı özelliği olan önemli bir sitokindir. T ve B lenfositler gibi diğer hücrelerde önemli düzeylerde üretilmesine rağmen, en fazla makrofajlar ve monositlerden üretilirler. Tümör nekroz faktör- $\alpha$ ; p38 MAP kinaz (mitojen tarafından aktive edilen kinaz) ve NF-kB'nin aktivasyonu aracılığı ile yangısal genlerin transkripsiyonuna neden olur ve makrofajların aktivasyonu sonucu MMP ekspresyonu ve diğer yangısal etkilere sahiptir (Barnes 2004). *In vivo* şartlarda KOAH'lı hastaların bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısında TNF- $\alpha$ 'nın önemli düzeyde arttığı gözlenmiştir (Makris ve ark. 2009).

İnterlökin-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ile fonksiyonel olarak benzerliğe sahip olup alveoler makrofajların önemli bir uyarıcısıdır. Bu mediyatör TNF- $\alpha$ , interferon gama (IFN- $\gamma$ ) ve granüosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF)'ü kapsayan KOAH patogeneziinde yer alan proinflamatuvar mediyatörlerin üretimini uyarır (Chung 2001). Aynı zamanda anfizem gelişiminde rolü bulunan MMP-9'u içeren elastolitik proteazların salınımının düzenlenmesinde de önemlidir.

Interferon- $\gamma$ , doğal öldürücü hücreler (NK) ve yardımcı ile sitotoksik T (T<sub>H</sub>1/T<sub>C</sub>1) hücrelerinden üretilen yangının devamından sorumlu olan bir sitokindir. Bu etkilerin

yanında epitel hücreler ve alveoler makrofajlar için önemli bir uyarıcıdır. Grumelli ve ark. (2004) IFN- $\gamma$  nın anfizemli akciğer doku örneklerinden izole edilen lenfositlerde yoğun miktarda üretildiğini rapor etmişlerdir. Interferon- $\gamma$ 'nın aynı zamanda BAL sıvısı ve periferal kanda da (Majori ve ark. 1999) aşırı düzeyde arttığı belirtilmiştir. Bu araştırmalar IFN- $\gamma$ 'nın KOAH'ın gelişmesinde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir.

## **2.6. Matriks metalloproteinazlar**

KOAH'ta doku yıkımının en iyi göstergesi matriks metalloproteinazlar (MMPs)'dir (Barnes 2004). Matriks metalloproteinazlar oksidatif stres ve sigara içeriği gibi pek çok farklı faktör tarafından aktive edilirler (Rahman ve Adcock 2006). Bunlardan özellikle MMP-8, MMP-9 ve MMP-12 KOAH patogenezinde önemli rol oynarlar (Elkington ve ark. 2006). Oksidatif stres, yangı hücrelerinin aktivasyonu ve yangı bölgesine toplanması kronik sigara içicilerinde MMP'lerin aktivasyonu sonucu meydana gelir.

## **2.7. Apoptoz**

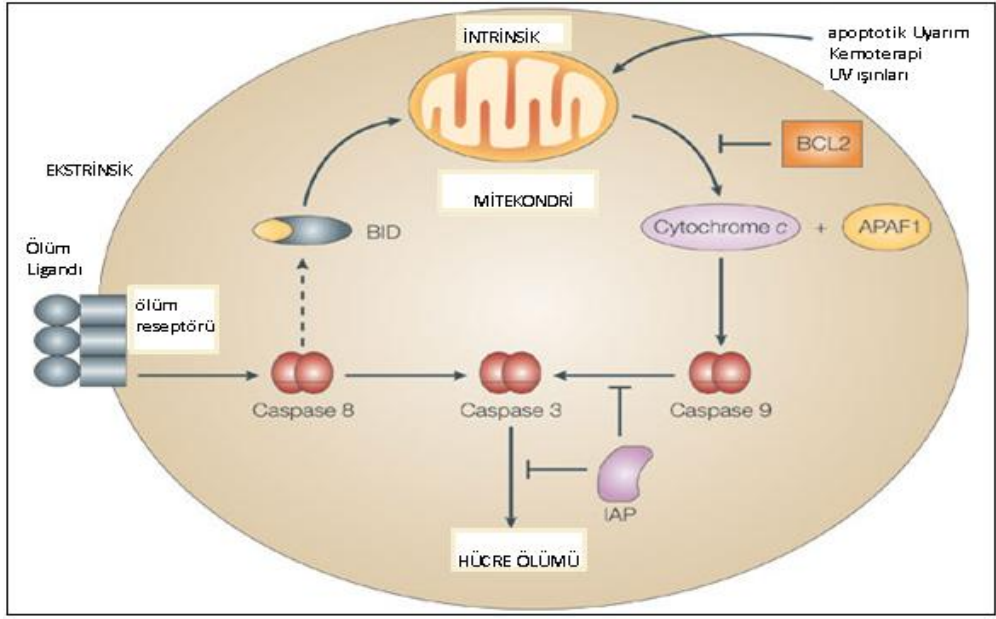
Apoptoz (programlı hücre ölümü), istenmeyen, hasarlı ve hastalıklı hücrelerin ortadan kaldırılmasını düzenleyen bir savunma mekanizmasıdır. Bu nedenle fizyolojik ve patolojik süreçlerde oldukça önemlidir (Mohan 2010; Merckle 2009). Kaspazlar apoptozun başlatıcısı ve sonlandırıcısı olarak bu mekanizmada merkezi bir rol üstlenmektedir. Hücrelerde kaspazların aktive olması ve hücrelerin apoptoz sürecine girmesinde 3 mekanizma bulunur. Bunlar ekstrinsik, intrinsik (mitokondriyal) ve endoplazmik retikulum yolaklarıdır (şekil 2.6.).

Ekstrinsik ölüm reseptör yolağı, ölüm ligandları ölüm reseptörüne bağlandığında gerçekleşir. Bu ölüm yolağı kaspaz 8 gibi sistin proteazların yanı sıra faz (FADD) ve TNF ilişkili ölüm bölgesi (TRADD) gibi adaptör proteinleri toplayan bir hücre içi ölüm bölgesine sahiptir (Schneider ve Tschopp 2000). Apoptoz sürecinin başlamasına neden olan ölüm reseptörüne ligandının bağlanması ölümü başlatan sinyalleşme kompleksinin (DISC) şekillenmesiyle sonuçlanır (O' Brien ve Kirby 2008). DISC daha sonra prokaspaz 8 'in aktivasyonuna neden olur (Karp 2008). Pro kaspaz 8'de kaspaz 3'ü aktive ederek (Muzio ve ark. 1998) DNaz'ların salgılanmasına neden olur ve böylece DNA'da kırıklar meydana gelir.

Intrinsik yolağın tetikleyicileri ise oksidatif stres, serbest radikaller gibi uyarıcılardır. Bu yolak mitokondriden sitokrom-c gibi proapoptotik moleküllerin salınımı

ve mitokondriyal geçirgenliğin artmasıyla sonuçlanır (Daniel ve Korsmayer, 2004). Sitokrom-c'nin salınımı apoptotik proteaz aktive edici faktör (APAF-1) ve kaspaz 9'un aktif haliyle bir araya gelerek kaspaz 3' ü aktive eder ve apoptoz şekillenir (Kroemer ve ark. 2007).

Endoplazmik retikulum uyarımlı apoptoz yolağı ise hipoksi gibi hücrel stres durumlarında ER'nin yanlış katlanmalarla zarar görmesi ve kaspaz 12 nin aktivasyonu ile kendini gösterir (Szegezdi ve Fitzgerald 2003). Bu yolakta ise kaspaz 3 granzim B tarafından uyarılır ve apoptoz gerçekleşir.



Şekil 2.6. Apoptozun şekillendiği intrinsik ve ekstrinsik yollar

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Hücre Hattı**

Yapılan bu araştırmada insan menşeyli akciğer alveolar hücre hattı (A549) kullanıldı. Akciğer alveollerinin iç yüzeyini örten ve skuamoz görünüme sahip bu hücreler, difüzyondan sorumlu olmakla birlikte akciğer alveollerini dış etkilerden de korumaktadırlar. Akciğer epitel hücreleri Dr. Mazella tarafından Paris/FRANSA'dan temin edildi.

#### **3.2. Hücre Pasajı**

Alveol hücreleri (A549) DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium-Sigma), % 10'luk ısı ile inaktive edilmiş fetal buzağı serumu (FCS-Sigma) ve 100 IU/ml penisilin/streptomisin (Sigma) içeren sıvı besiyerinde 37° C, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 hava bulunduran steril inkubatörde (Hera-Cell 150, Thermo) inkübe edildi. Hücrelerin çoğaltılması için yaklaşık 1x10<sup>6</sup> /ml sayıda hücre 10 ml medyum bulunan 75 cm<sup>2</sup> steril kültür kabına (flask) (Nunc, USA) konularak iki günde bir medyum değiştirilmek üzere inkübasyona bırakıldı. 3-4 gün süreyle hücre üremesi yeterli yoğunluğa ulaştığında hücreler 1/3 oranında pasajlandı. Çalışma grupları oluşturulurken flask tabanına yapışan hücreler 1-2 ml/75 cm<sup>2</sup> flask %0,025 tripsin/EDTA (Sigma) ile kaldırıldı. Sonra hücreler toplanarak oda ısısında 400 g ve 5 d süreyle santrifüj edildi. İşlem sonunda medyum atılarak tüpün alt kısmında kalan hücre peleti 1 ml taze komple medyumla kaldırıldı. Hücrelerin nazıkçe al-ver yöntemiyle homojen olmaları sağlandı. Mikroskop (Olympus-CKX41) altında hücre sayımı tripan mavisi ile bir hemositometre (Neubauer Assistent) yardımıyla belirlenerek deneme grupları için ihtiyaç duyulan hücre sayısı kültür kaplarına eklendi.

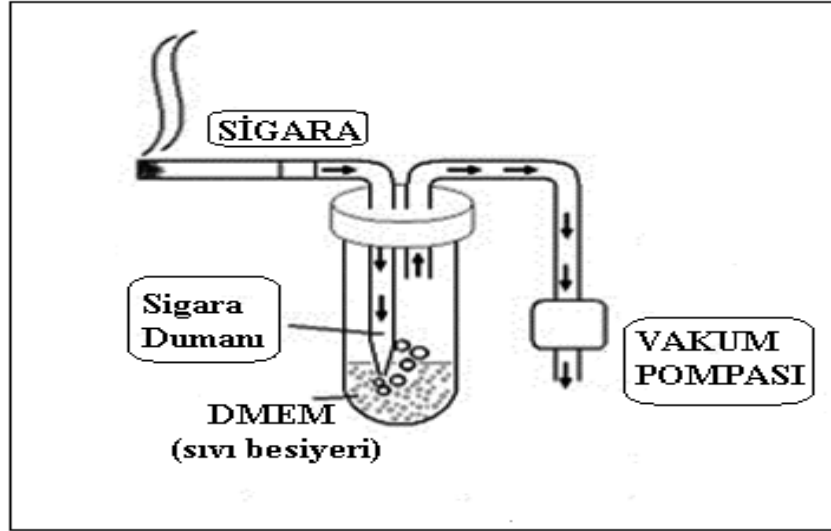
#### **3.3. Araştırmada Kullanılan Kimyasal Maddeler**

##### **3.3.1. Likopen**

Araştırmada kullanılan likopen (% 10 FS, Redivivo-Roche, DSM İstanbul), izopropil alkolde (Merck, Germany) çözdürüldü. Çalışma boyunca kullanılan likopen konsantrasyonu elde edilen canlılık kontrollerine göre 100 ng/ml olarak belirlendi. Her uygulamada likopen eklenmesi, sigara dumanı içeren medyum eklenmesinden 30 d önce yapılarak, 3 saat süreli inkübasyon periyodu bundan sonra başlatıldı.

### 3.3.2. Medyumun Sigara Dumanı ile Doyurulması

Laboratuvar koşullarında KOAH modeli oluşturmak ve akciğer hücrelerinin sigara dumanının bileşenlerine maruz bırakılması amaçlı bir düzenek hazırlandı. İçerisinde DMEM bulunan 50 ml falkon tüpün kapağına açılan çift boru sisteminin bir ucuna filtresiz sigara yerleştirilip, diğer ucuna ise vakum pompası bağlandı. Tüp içerisinde bulunan serumsuz medyum (20 ml sıvı için 1 adet 10 mm sigara) ticari sigara (Marlboro, Philips Morris, Inc., Richmond, VA; her sigara 12 mg zifir ve 0.9 mg nikotin içerir) dumanı ile doyuruldu. Daha sonra, pH'sı 7,4'e ayarlanıp 0.22 µm gözenekli enjektör filtreden (Millipore) geçirilip hücrelerin bulunduğu kültür kaplarına eklendi. Bu işlemler uygulanmış medyum her çalışmada taze olarak hazırlanıp, 30 d içinde kullanıldı.



Şekil 3.1. Medyumun sigara dumanı ile doyurulma düzeniği

### 3.4. Homojenat Hazırlama

Hücreleri yapışmış oldukları hücre kültür zemininden kaldırmak için flasklara 1-2 ml tripsin (%0,025) eklenerek 2-3 d beklenildi. Hafif çırpma hareketiyle flask tabanından kalkmaları sağlandı. Kültür kabı tabanından kalkan hücreler pipet ile toplanarak 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı ve daha sonra oda ısısında 400 g 5 d süreyle santrifüj edilerek hücre peletleri elde edildi. Homojenatlar hazırlanmadan önce hücreler PBS ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - pH:7) ile iki kez yıkandıktan sonra tekrar santrifüj edildi ve üzerlerine içerisinde %1 triton X-100 (Merck), 50 mM HEPES pH 7,2 10 mM EDTA, 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve %0,5 oranında proteaz inhibitör kokteyli [(aprotinin, fenilmetansülfonilflorid (PMSF),



leupeptin, sodyum florid)] bulunan lizis bafır eklendi. Deterjanla çözünmeyen hücresel proteinler 12000 g, 4° C de 10 d süreyle santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Süpernatantların protein düzeyleri Bradford yöntemiyle tespit edilerek kaydedildi.

### **3.5. Biyokimyasal Analizler**

#### **3.5.1. Bradford Protein Analizi**

Bu yöntemin prensibi, boya olarak kullanılan Comassie Brilliant Blue G-250'nin negatif yüke sahip olması nedeniyle protein üzerindeki pozitif yüke bağlanmasıdır. Bu boyanın kırmızı ( $\lambda_{\max} = 465 \text{ nm}$ ) ve mavi ( $\lambda_{\max} = 595 \text{ nm}$ ) olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Protein bağlanmasının göstergesi, kırmızı formun mavi forma dönüşüdür. Homojenat örneklerinden 20  $\mu\text{l}$  alınarak üzerine 200  $\mu\text{l}$  Bradford ayıracağı ve 580  $\mu\text{l}$  distile su ilave edilerek test tüplerinin hazırlandı. Tüpler oda ısısında 10 d bekletildikten sonra, spektrofotometre'nin (Shimadzu, UVmini-1240) 595 nm ışık dalga boyunda absorbans değeri ölçüldü. Sığır serum albümininin farklı standart konsantrasyonları hazırlanarak elde edilen standart eğriden örneklerin absorbans değer verileri yerleştirilerek protein düzeyleri hesaplandı (Bradford 1976).

#### **3.5.2. Nitrik Oksit (NO) Analizi**

Deneylerde hücrelerin bulunduğu flaklardan 3 saat inkübasyon sonrası alınan medyumlardaki NO seviyeleri ölçüldü. NO üretimi nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) ve nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) düzeylerinin saptanmasıyla hesaplanmaktadır. Bu amaçla çalışmada, Costas ve Wakid (1990) tarafından geliştirilen Griess metodu uygulama için kullanıldı. Bu metoda göre; kadmiyum granülleri (2-25 g), süzgeç kağıdından süzdürülerek 3 kez deiyonize su ile yıkandı. Daha sonra granüller glisin-NaOH tampon II (15 g/L pH 9,7) içinde 5 mmol/L  $\text{CuSO}_4$  solusyonunda 5 d karıştırılarak aktifleştirildi. Her test grubundan 300  $\mu\text{l}$  miktarında alınarak, üzerlerine 250  $\mu\text{l}$  75mmol/L  $\text{ZnSO}_4$  ve 350  $\mu\text{l}$  55 mmol NaOH eklendi. Bu karışım 10000 g rotor hızında 4 °C de 3 d süreyle santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlardan 750  $\mu\text{l}$  pipetlenerek farklı ependorflara alındı ve üzerlerine 250  $\mu\text{l}$  glisin tampon I (45 g/L pH 9,7) ilave edildi. Bu tüplere yukarıda belirtildiği gibi aktifleştirilen kadmiyum granüllerinden her tüpe birer tane olacak şekilde eklendi. 10 d karıştırıldıktan sonra hazır hale gelen örneklerden 300  $\mu\text{l}$  alınıp üzerlerine 1125  $\mu\text{l}$  ayıraç 1 (N-naftil etilen diamin) ve 1200  $\mu\text{l}$  ayıraç 2 (sülfanilik asit, 3mmol/L HCl) eklendi. Örnekler, spektrofotometrenin 546 nm dalga boyunda köre karşı okutulularak ölçüldü. Elde edilen veriler  $\mu\text{mol/ml}$  cinsinden hesaplanıp kaydedildi.

### 3.5.3 Glutasyon (GSH) Düzeyinin Belirlenmesi

İndirgenmiş glutasyon düzeylerinin ölçümü, Sedlak ve Lindsay (1968) tarafından geliştirilen metoda göre yapıldı. Bu yöntemin prensibi, reaksiyona ilave edilen DTNB (Merck)'in ortamda bulunan sülfidril grupları tarafından indirgenmesi sonucu, 1 mol sülfidriyle karşılık 1 mol 2-nitro-5-merkaptobenzoik asit oluşumuna dayanmaktadır. Özetle, elde edilen hücre süpernatantlarından 250 µl alınıp aynı miktarda %10 triklor asetik asit (TCAA-Sigma) ile karıştırılarak 8600 rpm rotor hızında 15 d santrifüj edildi. Deproteinize edilen örneklerden 250 µl alınıp temiz tüplere aktarılıp üzerine 2 ml 0,3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ilave edildi. Karışımların üzerine DTNB [5,5-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)] eklenip vorteksle karışmaları sağlandıktan sonra 5 d oda ısısında bekletildi ve spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda distile suya karşı okunarak µmol /ml protein olarak hesaplandı ve kaydedildi.

### 3.5.4. Katalaz Aktivitesi Analizi

Farklı test gruplarından inkübasyonlar sonrası elde edilen hücre homojenatlarında katalaz aktivite analizi Luck (1965) tarafından geliştirilen metoda göre yapıldı. Bu yöntemin prensibi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin ışık spektrumunun ultraviyole dalga boyunun azalmasıyla artan bir absorbans vermesine dayanır. Uygun bir tampon içerisinde (PBS gibi) bulunan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin örnekte bulunan katalaz aktivitesi ile suya yıkılması sonucu 240 nm absorbansta azalma görülür. Absorbansta gözlenen azalma hızı katalaz aktivitesi ile doğru orantılı olarak değişir.

Bu amaçla fosfat tamponu (1/15 mmol/L; pH 7) için 3,522 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 14,61 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> distile suda çözüldü ve 1 L'ye tamamlanarak pH 7'ye ayarlandı. Fosfat tamponunda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi (10 mM, %30)'nden 0,16 ml alınarak fosfat tamponunun 100 ml'sinde seyreltildi. Her örneğin analizinden önce örnekte bulunabilecek maddelerin neden olabileceği absorbans yükselmesini saptamak ve sadece örnekten kaynaklı farkın elde edilmesi amacıyla kör deney tüpleri hazırlandı. Kör deney tüpü için quartz küvete 2,95 ml fosfat tamponu üzerine 50 µl numune eklendi. Spektrofotometre her örneğin kendisine ait kör deney olarak kabul edilen bu küvete göre sıfırlandı. Test işaretli quartz küvetlere ise 2,95 ml fosfat tampon içinde hazırlanmış H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi kondu ve üzerlerine 50 µl örnek eklenerek tam karışım sağlanması için küvetler alt üst edilerek spektrofotometreye yerleştirildi. 240 nm ışık dalga boyunda 30 s içinde absorbanslarda meydana gelen

azalmalar takip edilerek “k” hız sabiti elde edildi. Okunan değerler metoddaki formüle yerleştirilerek µmol/ml protein cinsinden hesaplanarak kaydedildi.

### **3.5.5. Tiazol Mavisi Tetrazolyum Bromid (MTT) ile Canlılık Testi**

Tiazol mavisi tetrazolyum bromid kullanılarak hücrelerdeki canlılık oranı kolorimetrik yöntemle nicel olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem canlı hücrelerde, mitokondrial redüktazlar tarafından MTT'nin tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanır. Bu reaksiyon mitokondrial bir enzim olan süksinat dehidrogenaz aktivitesine bağlıdır. Tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir (McGahon ve ark. 1995). Bu amaçla 24 kuyucukluk kültür kaplarında deneme grupları oluşturuldu. İnkubasyonlar sonrası kuyucuklardan süpernatantlar alınarak yerlerine PBS'de çözdürülmüş MTT ayırıcı eklendi. İnkübatörde %5 CO<sub>2</sub> ve 37 °Cn şartlarında 90 d beklenildi. Daha sonra her bir kuyucuğa 1 ml izopropil alkol/HCl ayırıcından eklenerek ve 5 d bekletildi ve oluşan formazan ürünlerinin çözdürülmesi sağlandı. Kuyucuklardaki süpernatant ependorflara alınarak 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunarak kaydedildi.

### **3.5.6. Tripan mavisi boyama metodu ile canlı ölü hücre sayımı**

Tripan mavisiyle ölü hücreler boyanırken canlı hücreler boyanmaz. Çünkü canlı hücrelerde membran bütünlüğü bozulmadığından boya sitoplazmaya geçemez (Leszczynski ve ark. 2001). Seyreltilmiş hücre süspansiyonundan 20 µl alınarak, üzerine aynı miktarda tripan mavisi solüsyonu eklendi. Al-ver yöntemiyle pipet yardımıyla homojen olarak karışmaları sağlandı. Hemositometre lamının (Neubauer Assistent-Germany) her iki bölümüne, hücre- tripan mavisi karışımından 1'er damla damlatıldı ve bir lamelle yayılması sağlandı. Lam üzerindeki bulunan dört karedeki hücreler invert mikroskop altında sayıldı ve ortalama sayıyı belirlemek için dörde bölündü. Elde edilen hücre sayıları '5x10<sup>3</sup>' olarak ifade edildi. Görüntüler özel ataçmanlı bir aparata sahip dijital fotoğraf makinesi (Olympus C-7070) ile fotoğraflandı.

### **3.5.7. Malondialdehit konsantrasyonunun tespiti**

Aerobik şartlarda pH 3,4'te tiyobarbitürük asit (TBA) ile serumun 95 °C'de inkubasyonu sonucu, ortamda lipid peroksidasyonu varsa sekonder bir ürün olarak oluşan MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks yapar. Bu kompleks spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçülür (Ohkawa ve ark. 1979). Elde edilen hücre homojenatından 10 ml'lik cam tüplere 0,5 ml ilave edildi. Üzerlerine 2,5 ml TCAA ve birer ml TBA eklendi (kör deney tüpüne hücre homojenatı yerine 0,5 ml TCAA eklendi). Test tüpleri su banyosunda 30 d 95 °C'de inkübe edildikten sonra hızlı bir şekilde buz içerisinde soğutuldu ve üzerlerine ikişer ml n-bütanol eklendi. Daha sonra tüpler 3000 rpm'de 10 d santrifij edildi. N-bütanol tabakası spektrofotometre kuvvetlerine pipetlenerek 535 nm de absorbansları elde edildi.

### **3.5.8. Total Oksidan Kapasite (TOK) Analizi**

Bu yöntemin prensibi örneklerde bulunan oksidanların ferröz iyon şelatör kompleksini ferrik iyon okside etmesidir. Ferrik iyon kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülen renk yoğunluğu örnekte var olan oksidan molekülün total miktarıyla ilişkilidir. Bu testte kalibratör olarak hidrojen peroksit kullanılır. Sonuçlar her litredeki eşdeğer mikromolar hidrojen peroksit göre belirlenir (Erel 2005). Örneklerdeki TOK düzeyleri yukarıda belirtilen prensibe dayanan ticari kitler (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak analiz edildi. Bu amaçla ependorflara 500 µl ayıraç-1, 75 µl hazırlanan solüsyon ya da örnekler eklendi. İlk absorbans için 530 nm de ölçüm yapıldı. Daha sonra ependorflara 25 µl ayıraç 2 eklendi ve 10 d oda ısısında ya da 37 °C 5 d inkübe edildikten sonra 530 nm de ikinci ölçüm yapıldı.

### **3.5.9. Total Antioksidan Kapasite (TAK) Analizi**

Oksidatif stres gibi zorlanımlar altında oksidan kapasitede artma ya da antioksidan kapasitede azalma gerçekleşebilir. Antioksidan moleküller bu zararlı reaksiyonları inhibe edebilir ya da önleyebilir. Demir-2-o-dianisidine kompleksi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile Fenton tipi reaksiyon ile OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü düşük pH'da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidil radikallerini meydana getirirler. Dianisidil radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumunu arttırmaktadır (Halliwell ve Gutteridge 2000). Araştırmada TAK kapasitesi yukarıda belirtilen prensiplere dayanan ticari kitler (Rel Assay Diagnostics, Türkiye)

kullanılarak analiz edildi. Total antioksidan kapasiteyi belirlemek için kullanılan yöntem: Ependorflara önce 500 µl ayıraç 1, 30 µl örnek ya da standart konuldu. İlk absorbans için 660 nm de başlangıç absorbansı ölçüldü. Daha sonra 75 µl ayıraç 2 eklendi ve oda ısısında 10 d ya da 37 °C de 5 d inkübe edildi ve 660 nm de ikinci absorbans ölçümü yapıldı.

### **3.6. RNA İzolasyonu**

RNA izolasyonu için yapılan deneysel inkubasyonlar sonucu test gruplarının bulunduğu 25 cm<sup>2</sup> flasklardaki medyumlar atıldı ve hücreler steril bir kazıyıcı yardımıyla kaldırılarak steril endorf tüplere alındı. Üzerlerine 1 ml RNA izolasyon reaktifi (Tiazol Reagent, Sigma) eklendi ve vorteksle karıştırıldı. Tüpler oda ısısında 5 d bekledikten sonra 12000 g de 4 °C de 10 d santrifüj edildi. Süpernatantlar yeni endorf tüplere aktararak oda ısısında 5 d bekletildi. Sonra tüplere 0,2 ml kloroform ilave edilip, 15 saniye vortekste karıştırıldı. Daha sonra oda ısısında 15 d bekletilen örnekler 12000 g ve 4° C'de 15 d santrifüj edildi. Santrifüj sonrası meydana gelen üç fazdan üstteki renksiz fazlar (RNA içerir) yeni endorflara alınıp, üzerlerine 0,5 ml izopropanol (Merck) ilave edildi. Tüpler oda ısısında 5-10 d tutulduktan sonra 12000 g de 10 d santrifüj edilerek RNA peletlerinin oluşması sağlandı. Peletler üzerindeki süpernatantlar alınıp RNA % 75 etil alkol (Merck) ile yıkandıktan sonra 7500 g'de 5 d tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alkol atıldıktan sonra RNA'lar 10-15 d süreyle hava ile kurutulmaya bırakıldı. Her tüpteki RNA peletleri üzerine 25-30 µl su (DEPC su - dietilpirokarbonatlı su) ilave edilip, birkaç kez al-ver yöntemiyle pipetle çözümleri sağlandı.

Total RNA miktarları ve saflıkları spektrofotometrede 260 nm (OD<sub>260</sub>) ve 280 nm (OD<sub>280</sub>) ışık dalga boylarında absorbanslar alınarak belirlendi. RNA/DNA oranları 1,7-2.0 aralığında olan örneklerin saflığı yüksek kabul edilip cDNA (komplementer/tamamlayıcı) sentezinde kullanıldı.

### **3.7. cDNA Sentezi ve Reverz Transkripsiyon (RT)**

Elde edilen total RNA'lardan tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi için otoklav edilmiş 0,2 ml endorf tüplere her bir örnekten 1 µg total RNA alınıp üzerlerine 1 µl oligo (dT-18) (Fermentas/Germany) primer eklendi. Daha sonra bu tüpler DEPC su ile 12 µl'ye tamamlandı. Karışım 3-5 saniye 13000 g'de santrifüj edilip termal saykırda (Toshiba) 70 °C'de 5 d reaksiyona tabi tutuldu. Süre sonunda karışım buz içinde soğutuldu ve santrifüj edilerek tüpün dibinde toplanması sağlandı. Tüpün üzerine 4 µl 5x reaksiyon

tamponu, 1 µl revert Aid m-multi-v transkriptaz, 1 µl ribolock ribonükleaz inhibitör (20 U/ µl) ile 2 µl dNTP (2mM) karışımı konulup karıştırıldı (Fermentas, Germany). Kısa süreli santrifüj sonrası test tüpleri termal saykılara yerleştirilerek 42° C’de 60 d süreyle RNA’lar cDNA’lara dönüştürüldü. cDNA sentezinin tamamlanması için tüpler ilave olarak 70 °C’de 10 d inkübe edildikten sonra PCR kullanımına hazır hale getirildi ve kullanılıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

### 3.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) için örneklerden elde edilen cDNA’lardan 1’er µl alınarak, üzerine 0.5 U DNA *Taq* polimeraz içeren Syber Green PCR mastermiks (Fermentas, Germany) ve mRNA üzerinde çoğaltılmak istenen genlere spesifik bir çift primer (oligonükleotid) ilave edildi. Reaksiyonda 100 ng düzeyinde TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX-2 IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  spesifik primerleri literatürde belirtilen baz dizgeleri sentezi yaptırılarak kullanıldı (Tablo 1). DNA amplifikasyonu PCR yöntemiyle anlık PCR sistemi (Real-Time PCR, Stratagene, USA) kullanılarak yapıldı. Amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait kopya eşiği (Ct) değerleri karşılaştırılarak, hedef genlerin mRNA transkripsiyon düzeylerinin nisbi değişimleri  $2^{-DDCt}$  metodu ile hesaplandı (Paffl, 2001). Bu hesaplamada;  $DDCt = (Ct_{hedef\ gen} - Ct_{GAPDH})_{denek\ grubu} - (Ct_{hedef\ gen} - Ct_{GAPDH})_{kontrol\ grubu}$  formülü uygulandı; hesaplanan değer her bir gen için  $2^{-DDCt}$  formülünde yerine konularak mRNA transkripsiyon düzeyi misli olarak down- ya da up-regüle şeklinde belirlendi. Her örnek için kontrol gen olarak kabul edilen GAPDH geni (housekeeping gen) düzeltme faktörü amaçlı her RNA örneği için reaksiyona tabi tutuldu. Real Time-PCR sisteminde Syber Green (Fermentas, Germany) boyası çift ilikçikli DNA parçasına bağlanarak elektriksel impuls ile birlikte floresan ışımaya yapar ve bu ışımaya sistemin lazer dedektörü tarafından alınarak bilgisayar ortamında grafik formatına çevirilir. Ölçülen floresan şiddeti PCR ürünün miktarı ile doğru orantılıdır. Daha sonra gruplar arasındaki farklar misli cinsinden grafiklerde verildi.

### 3.9. İstatistiksel Metod

Araştırmada elde edilen veriler SPSS 20 (Statistical Package for Social Sciences) programında, One-way Anova varyans analizi yöntemi kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar Duncan testi ile belirlendi. İstatistiksel olarak  $p < 0.05$  ve altı önemli kabul edildi. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata (S.E) şeklinde belirtildi.

Çizelge 1. RT-PCR analizlerinde kullanılan primer baz dizgeleri ve PCR koşulları

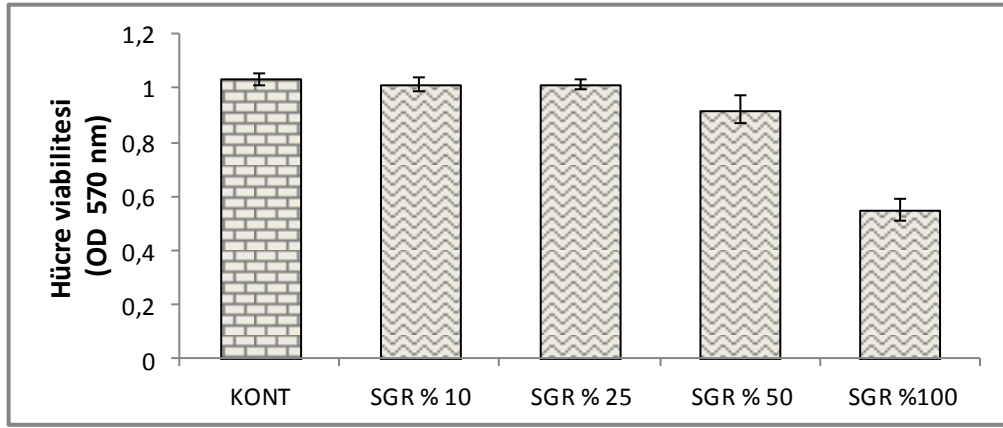
| Transkript                     | Primer sekansları |   | PCR programları  |
|--------------------------------|-------------------|---|--|
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | R<br>F            | 5' CCT TGG TCT GGT AGG AGA CG 3'<br>5' CAG AGG GAA CAG TTC CCC AG 3'              | Başlangıç 95 <sup>0</sup> C 10d<br>95 <sup>0</sup> C 45sn<br>60 <sup>0</sup> C 1d<br>72 <sup>0</sup> C 45sn<br>35 siklus |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | R<br>F            | 5' GGG TTG GGG GTG TGG TGA TGT 3'<br>5' TCC GAG GCA AAC AGC ACA TTC A 3'          | Başlangıç 95 <sup>0</sup> C 10d<br>95 <sup>0</sup> C 15sn<br>58 <sup>0</sup> C 1d<br>72 <sup>0</sup> C 30sn<br>35 siklus |
| <b>iNOS</b>                    | R<br>F            | 5' TCC ATG CAG ACA ACC TT 3'<br>5' GGC CTC GCT CTG GAA AGA 3'                     | Başlangıç 95 <sup>0</sup> C 10d<br>95 <sup>0</sup> C 45sn<br>56 <sup>0</sup> C 1d<br>72 <sup>0</sup> C 45sn<br>35 siklus |
| <b>IL- 1<math>\beta</math></b> | R<br>F            | 5' GGT CAT TCT CCT GGA AGG TCT GTG GGC 3'<br>5' GCA AGC GCT TCA GGC AGG CGG CG 3' | Başlangıç 95 <sup>0</sup> C 10d<br>95 <sup>0</sup> C 45sn<br>55 <sup>0</sup> C 1d<br>72 <sup>0</sup> C 45sn<br>35 siklus |
| <b>COX-2</b>                   | R<br>F            | 5' TCA TCA GGC ACA GGA GGA AG 3'<br>5' TGA AAC CCA CTC CAA ACA CAC AG 3'          | Başlangıç 95 <sup>0</sup> C 10d<br>95 <sup>0</sup> C 45sn<br>54 <sup>0</sup> C 1d<br>72 <sup>0</sup> C 45sn<br>35 siklus |
| <b>GAPDH</b>                   | R<br>F            | 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA 3'<br>5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3'              | Başlangıç 95 <sup>0</sup> C 10d<br>95 <sup>0</sup> C 45sn<br>60 <sup>0</sup> C 1d<br>72 <sup>0</sup> C 90sn<br>35siklus  |

## 4.BULGULAR

### 4.1. Spektrofotometrik analizler

#### 4.1.1. Farklı konsantrasyonlardaki sigara dumanının hücre viabilitesi üzerine etkisi

Bir gece önceden 24 kuyucuklu kültür kaplarına eklenen akciğer epitel hücrelerine (A549) sigara duman içeriği ile doyurulan medyumun farklı konsantrasyonları (%10-100) uygulandı ve 3 saat inkübasyona bırakıldı. Hücrelerde süre sonunda MTT metoduyla canlılık kontrolleri yapıldı. Buna göre %100 (1 adet 10 mm sigara dumanı ile doyurulmuş 20 ml medyum) eklenen grupta, canlı hücre sayısının kontrol grubuna göre anlamlı bir düzeyde azaldığı tespit edildi (Şekil 4.1).



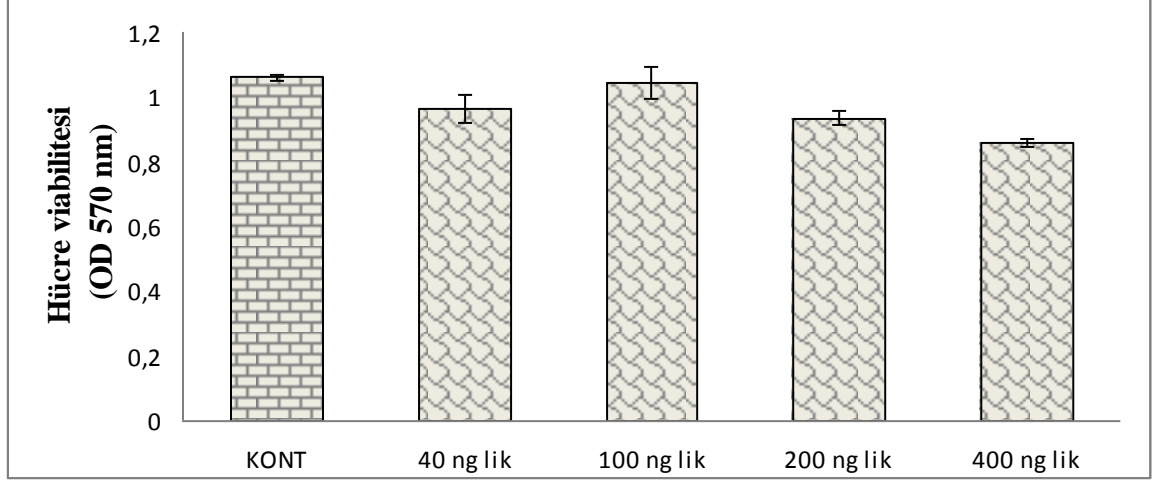
Şekil 4.1. Sigara dumanının farklı konsantrasyonlarının hücre viabilitesi üzerine etkileri

İnkübasyon sonrası % 100 sigara duman içeriği (SGR) eklenen gruptaki ( $0,478 \pm 0,008$ ) hücre kayıpları kontrol grubuna ( $1,030 \pm 0,02$ ) göre yaklaşık % 46,4 oranında azalma gösterdiği tespit edildi ( $p < 0,001$ ). SGR'nin %100 konsantrasyonu araştırma süresince çalışmalarda kullanıldı (KONT: kontrol grubu, SGR: sigara içeriği bulunan medyum ile muamele edilen hücreler).



#### 4.1.2. Farklı konsantrasyonlardaki likopenin hücre viabilitesine etkileri

Hücre kültür kaplarında (24 kuyucuklu) çalışma grupları oluşturulan hücelere farklı konsantrasyonlarda (40-400 ng/ml) likopen eklenip çalışma süresinde kullanılacak etkili konsantrasyonunu belirlemek için MTT testi yapıldı.

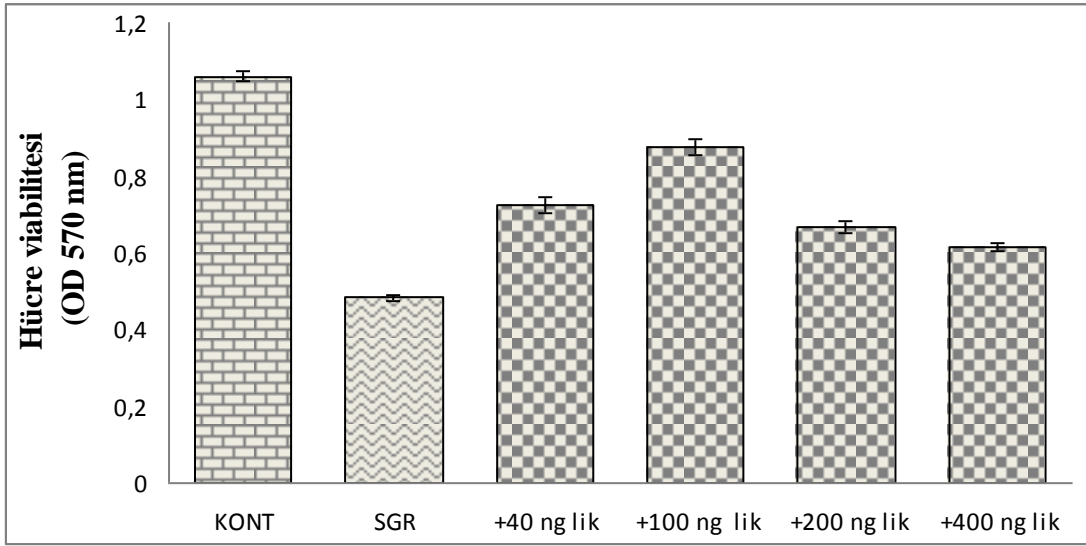


Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan likopenin hücre viabilitesi üzerine etkisi

Üç saat inkübasyon sonrası 100 ng/ml likopen uygulanan grupta ( $1,04\pm 0,051$ ) kontrol grubuna göre ( $1,06\pm 0,011$ ) hücre viabilitesinde istatistiksel bir farkın olmadığı ( $p>0,005$ ) ancak likopenin artan konsantrasyonlarının toksik etki yaptığı tespit edildi. Şekil 4.2.) (Lik: Likopen)

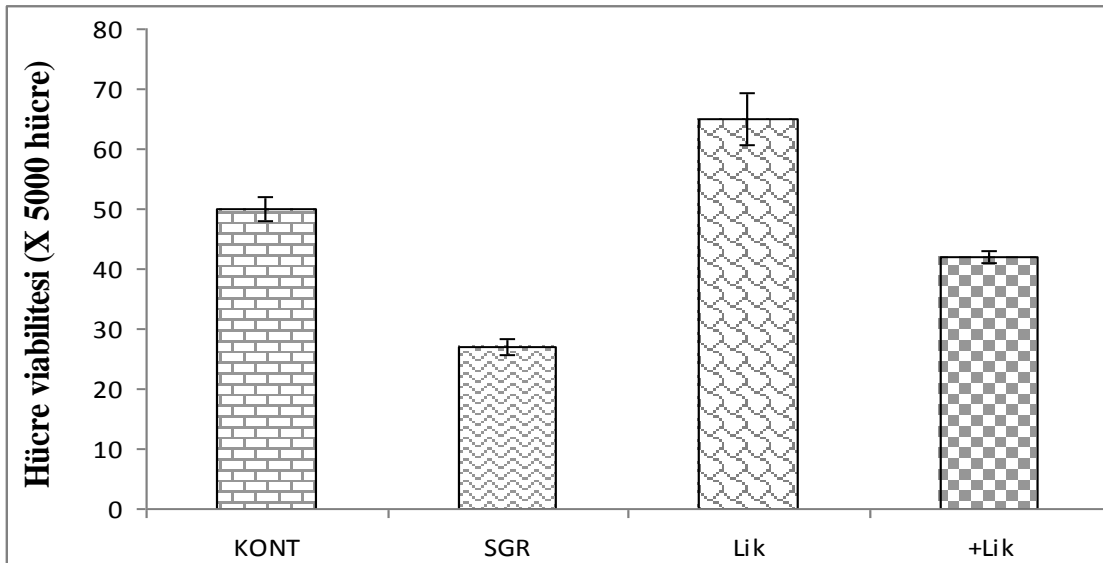
#### 4.1.3. Sigara dumanı içeriğinin neden olduğu hücresel kayıplar üzerine likopen uygulanmasının etkisi

Hücre kültür kaplarında (24 kuyucuklu) bulunan A549 hücreleri üzerine likopenin farklı konsantrasyonları yarım saatlik ön muameleyle uygulandı. Daha sonra ilgili kültür kaplarına sigara duman içeriği ile doyurulmuş medyum eklenerek 3 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda likopenin etkin dozu MTT (viabilite) yöntemi ve tripan mavisi (canlı hücre boyama) metodu ile tespit edildi.



Şekil 4.3. Sigara duman içeriğinin neden olduğu hücre ölümleri üzerine likopen uygulanmasının etkileri

İnkübasyon sonrası kontrol grubuna göre ( $1,06\pm 0,011$ ) SGR grubunda meydana gelen yaklaşık %30 düzeyindeki hücre kayıplarının ( $0,48\pm 0,007$ ) likopen uygulanmasıyla ( $0,87\pm 0,022$ ) %32 oranında iyileştirdiği saptandı ( $p < 0,005$ ) (Şekil 4.3.).

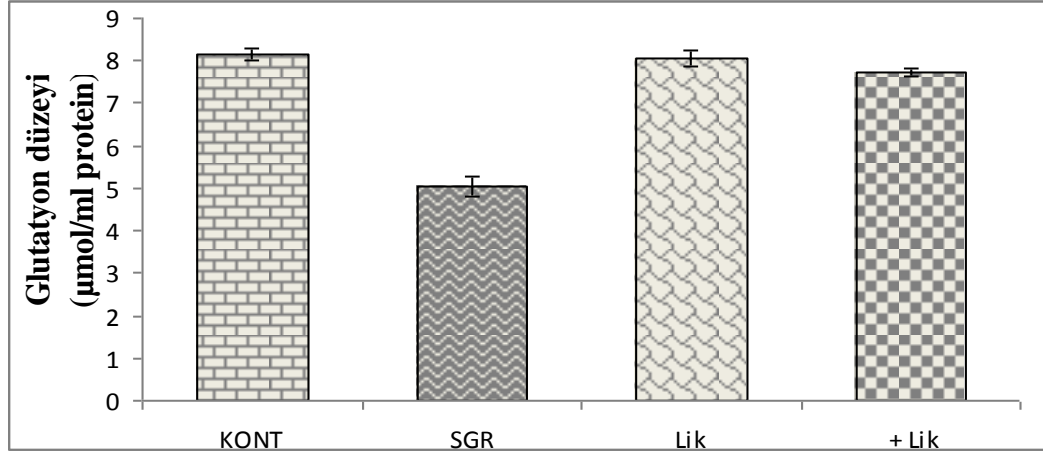


Şekil 4.4 Canlı hücre sayısına likopen uygulaması ve sigara içeriğinin etkisi

Sigara dumanının önemli derecede azalttığı ( $27 \times 10^4 \pm 1,45$ ) hücre sayısını, likopen uygulanmasının anlamlı düzeyde arttırdığı ( $65 \times 10^4 \pm 4,36$ ) tespit edildi.

#### 4.1.5. Glutasyon düzeyi üzerine likopen ve sigara dumanının etkisi

A549 hücreleri bulunan ilgili kültür kaplarına 100 ng likopen ilave edilerek yarım saat ön işleme tabi tutuldu. Daha sonra ilgili hücrelere sigara duman içeriği ile doyurulmuş medyum (SGR) eklenerek inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası elde edilen homojenatlardan glutasyon analizi yapıldı.

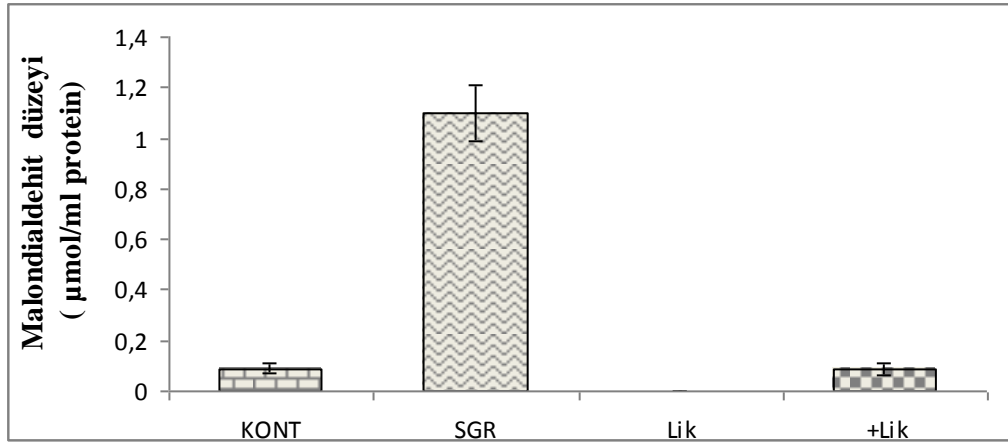


Şekil 4.5. Hücre içi glutasyon düzeyi üzerine sigara dumanı ve likopen muamelesinin etkileri

Buna göre; sigara dumanı içeriği eklenen hücrelerde glutasyon düzeyi ( $5,06\pm 0,24$ ) kontrol grubuna ( $8,15\pm 0,12$ ) göre anlamlı derecede azaldı ( $p<0,001$ ). Likopen muamelesinden sonra sigara dumanı (SGR) maruziyetine bırakılan grupta ( $7,95\pm 0,18$ ) ise GSH seviyesinin anlamlı derecede arttığı saptandı ( $p<0,001$ )(Şekil 4.5.)

#### 4.1.6. Malondialdehit (MDA) düzeyi üzerine sigara duman içeriği ve likopen uygulanmasının etkileri

Ekimi yapılan flasklardaki A549 hücreleri üzerine 100 ng/ml likopen ilave edildi ve yarım saat inkübasyona tabi tutuldu. Daha sonra hücreler sigara duman içeriği ile doyurulan medyum ile 3 saat süresince muamele edildi. Elde edilen homojenatlarda test gruplarındaki MDA seviyeleri ölçüldü.

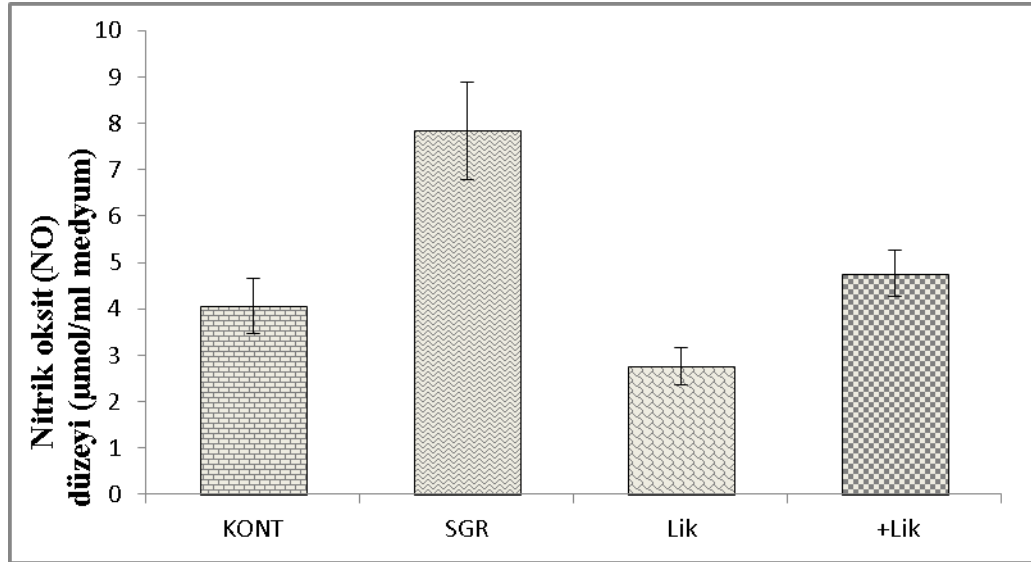


Şekil 4.6. Sigara dumanı maruziyeti ve likopen kullanımının MDA düzeyleri üzerine etkileri

Sigara duman içeriği (SGR) eklenen hücrelerde üç saatlik inkübasyon sonrası MDA düzeyi ( $1,1\pm 0,109$ ) kontrol grubuna göre ( $0,09\pm 0,017$ ) anlamlı derecede artış gösterirken ( $p<0,001$ ); likopen muamelesinden sonra sigara (SGR) maruziyetine bırakılan grupta ( $0,09\pm 0,023$ ) ise MDA düzeyinin anlamlı derecede azaldığı saptandı ( $p<0,001$ ) (Şekil 4.5.).

#### 4.1.7. Sigara dumanı ve likopenin nitrik oksit üretimi üzerine etkisi

Akciğer epitel hücrelerine 100 ng/ml konsantrasyonunda likopen yarım saat süreyle uygulandı. Sonra sigara duman içeriği bulunan medyum (SGR) eklenerek 3 saat inkübasyona bırakıldı. Alınan medyum örneklerinde nitrik oksit (NO) düzeyi ölçüldü.

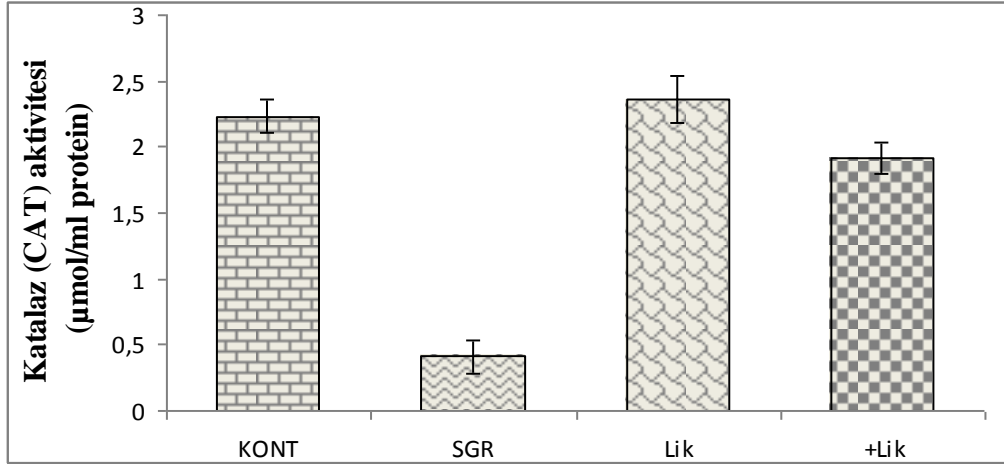


Şekil 4.7. Sigara dumanının neden olduğu nitrik oksit üretimi üzerine likopenin etkisi

Buna göre SGR grubunda meydana gelen ( $7,84\pm 1,05$ ) NO üretiminin likopenin etkisiyle ( $4,76\pm 0,5$ ) azaltıldığı saptandı ( $p\leq 0,001$ ) (Şekil 4.7.).

#### 4.1.8. Sigara dumanı maruziyeti ve likopenin katalaz aktivitesi üzerine etkisi

Flasklardaki (25 cm<sup>2</sup>) A549 hücrelerine likopenin yarım saatlik muamelesi sonrası sigara duman içeriği eklenerek 3 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra elde edilen homojenatlardan katalaz aktivitesi ölçüldü.

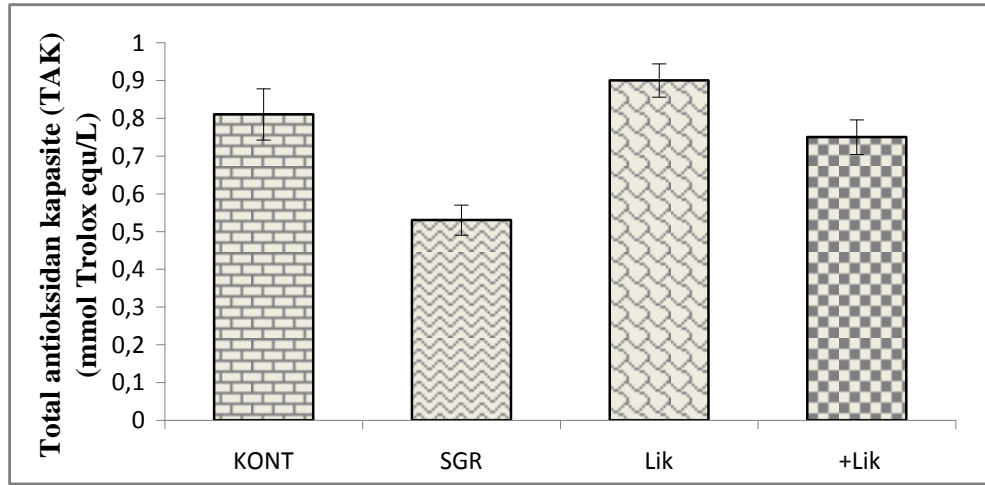


Şekil 4.8. Sigara içeriği (SGR) ile likopen (lik) uygulamasının katalaz aktivitesi üzerine etkisi

Üç saatlik inkübasyon sonrası likopen eklenen grupta (2,36±0,175) kontrol grubuna göre (2,23±0,127) anlamlı derecede arttığı tespit edildi (p<0,001). Sigara dumanı içerikli medyum (SGR) eklenen grupta katalaz aktivitesi (0,41±0,125) kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalırken (p<0,001), likopenin SGR grubuna göre katalaz aktivitesini anlamlı derecede arttırdığı (1,92±0,119) saptandı (p<0,005).

#### 4.1.9. Sigaranın azalttığı antioksidan kapasite (TAK) üzerine likopenin etkisi

Akciğer epitel hücreleri bulunan ilgili kültür kaplarına likopenin yarım saatlik muamelesini takiben sigara içeriği (SGR) eklenerek 3 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda alınan örneklerden elde edilen homojenatlardan TAK seviyeleri ticari kit kullanılarak tespit edildi.

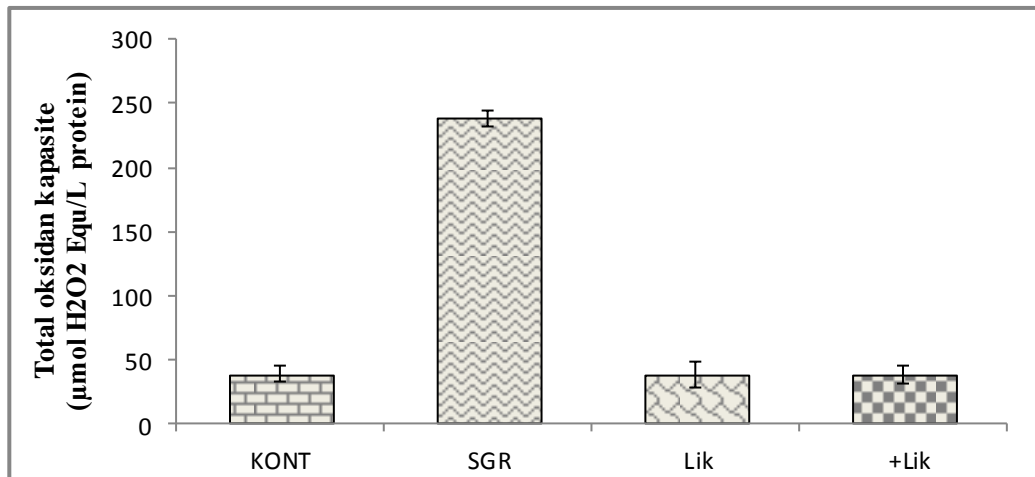


Şekil 4.9. A549 hücrelerine likopen ve SGR uygulamasının TAK üzerine etkisi

Sigara duman içeriği eklenen grupta ( $0,53\pm 0,04$ ) TAK kontrol grubuna göre ( $0,81\pm 0,068$ ) azaldığı ( $p < 0,005$ ), ancak likopen uygulamasının sigara dumanının neden olduğu bu azalmayı ( $0,75\pm 0,046$ ) anlamlı derecede arttırdığı tespit edildi ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.9.).

#### 4.1.10. Total oksidan kapasite (TOK) üzerine likopen ve sigaranın etkisi

Araştırmada kullanılan akciğer epitel hücreleri üzerine likopen eklenerek yarım saatlik muamelesi sağlandı. Daha sonra sigara duman içeriği içeren medyum (SGR) eklenerek 3 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası elde edilen homojenatlardan TOS seviyeleri araştırıldı.

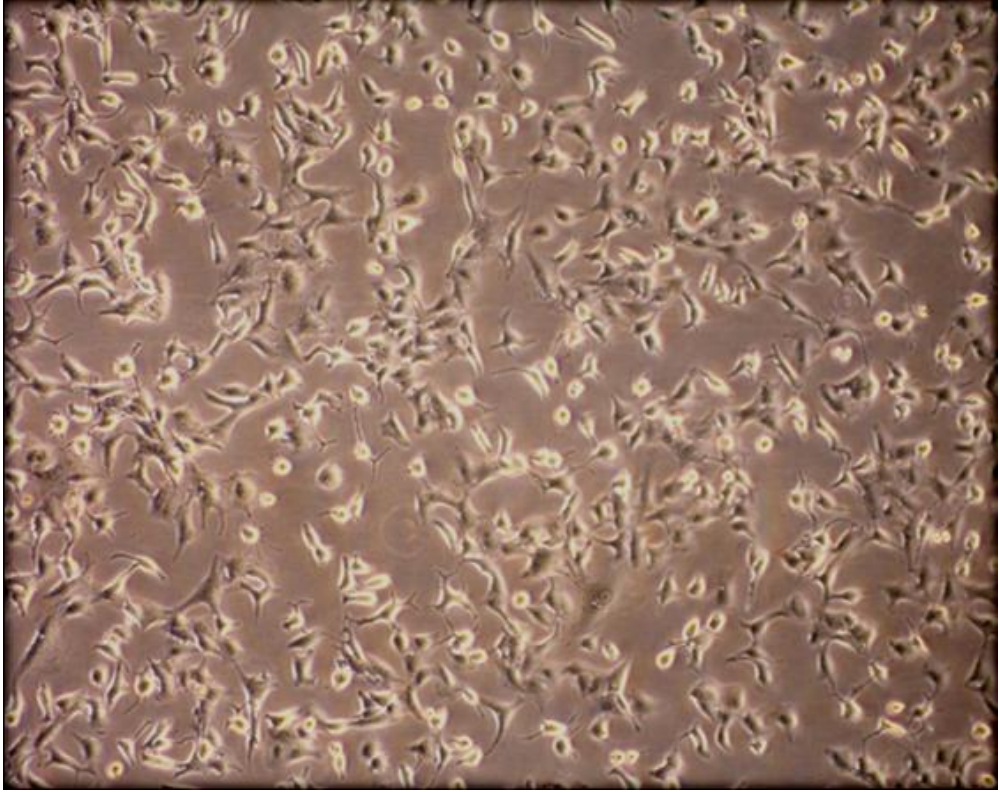


Şekil 4.10. Akciğer epitel hücrelerinde TOK üzerine sigara duman içeriği ve likopen uygulanmasının etkisi

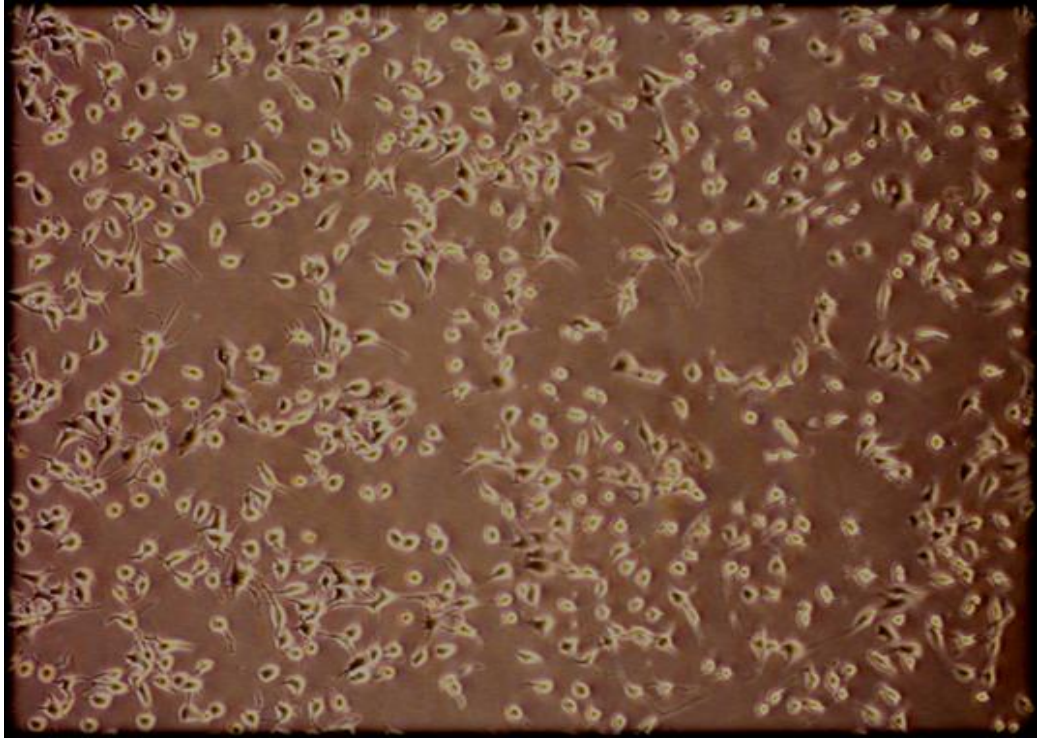
Total oksidan kapasite SGR eklenen grupta ( $238,47 \pm 5,92$ ) kontrol grubuna ( $38,03 \pm 6,49$ ) göre önemli düzeyde arttığı saptandı ( $p < 0,001$ ). Ancak ilgili gruba likopen muamelesinden sonra SGR eklenen grupta ( $37,66 \pm 7,53$ ) bu artışın likopen tarafından anlamlı derecede iyileştirildiği tespit edildi ( $p < 0,001$ ) (Şekil 4.9).

#### 4.2. Sigara dumanı içeriği ve likopenin hücre morfolojisi ve sayılarına etkisi

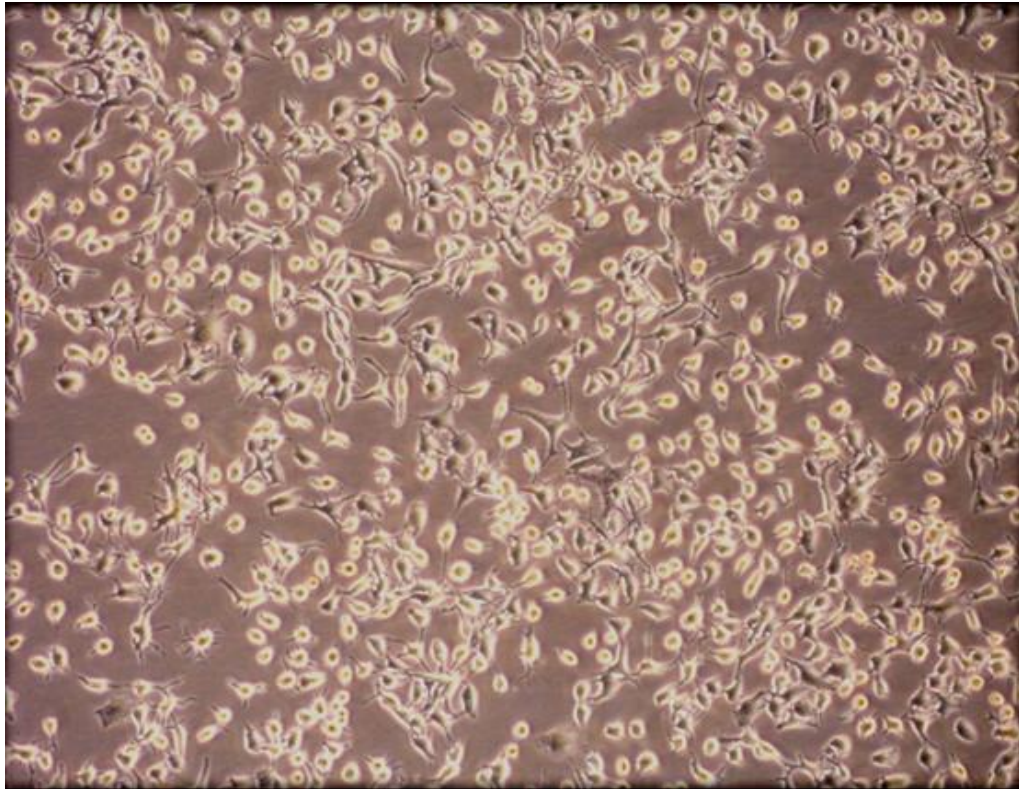
Skuamoz tipteki akciğer epitel hücrelerine likopen muamelesinin ardından sigara dumanı ile doyurulan medyum (SGR) eklenerek 3 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda elde edilen hücre örneklerinden 40 X büyütme mikroskopta çekilen fotoğraflar incelendiğinde hücre ölümlerinin SGR eklenen grupta (Şekil 4.11), kontrol grubuna göre (Şekil 4.10) önemli miktarda arttığı ancak likopen tedavisinin (Şekil 4.13) bu hücre ölümlerini anlamlı derecede azalttığı gözlemlendi.



Şekil 4.11 Kontrol grubu A 549 hücreleri (3 saat inkübasyon ) mikroskop görüntüleri (40X büyütme)

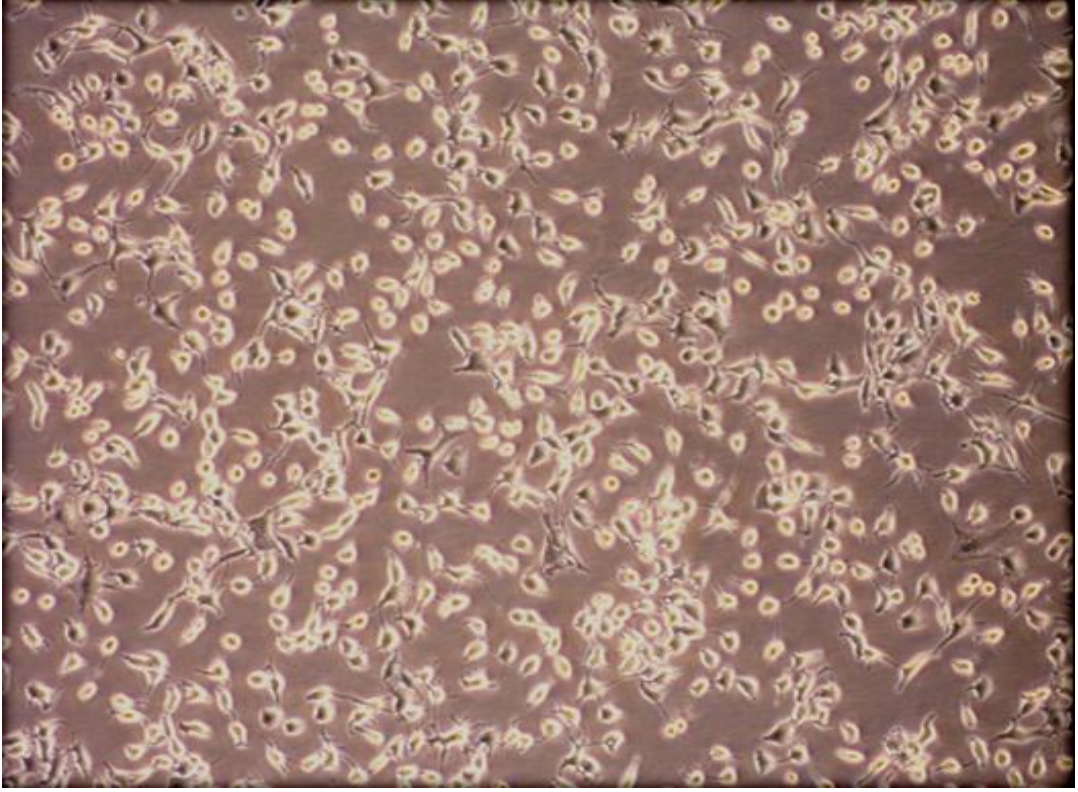


Şekil 4.12. Sigara duman içeriği ile doyurulan medyum eklenen A 549 hücreleri(40X büyütme)



Şekil 4.13. A 549 hücrelerine 100 ng likopen eklenen grupta mikroskop görüntüleri (40 X büyütme)





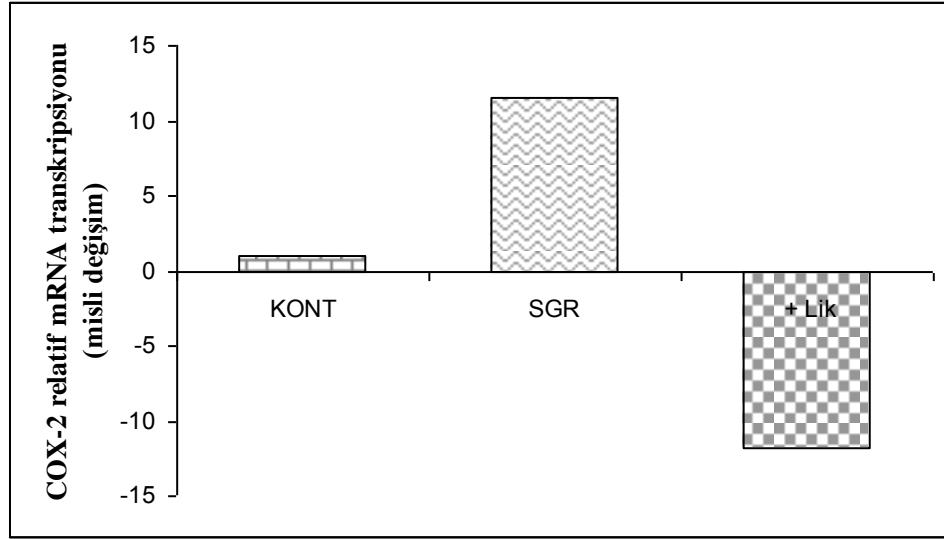
Şekil 4.14. Likopen ve sigara duman içeriği eklenen grup mikroskop görüntüsü (40 Xbüyütme)

### 4.3. RT-PCR Sonuçları

Akciğer alveoler hücreleri 25 cm<sup>2</sup> lik flasklara bir gece önceden ekildi. Likopen 100 ng/ml ön muamelesinin ardından sigara dumanı ile doyurulmuş medyum (SGR) hücelere uygulandı. İnkübasyon sonunda elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapılarak TNF- $\alpha$ , COX-2, IFN- $\gamma$ , iNOS ve IL-1 $\beta$  gibi yangısal sitokinlerin spesifik primerler kullanılarak mRNA transkripsiyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle araştırıldı.

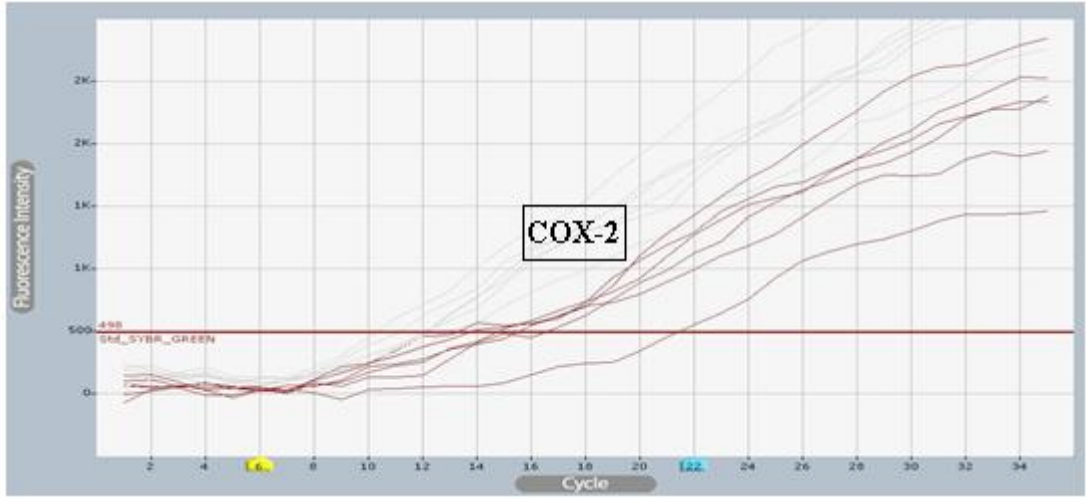
#### 4.3.1. COX-2 mRNA Transkripsiyonu

Bir gece önceden flasklara konulan A549 hücrelerine 100 ng likopen eklendikten sonra (yarım saat inkübasyon) sigara dumanı ile doyurulmuş medyum eklenerek 3 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda elde edilen RNA örneklerinden COX-2 mRNA transkripsiyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle analiz edildi.



Şekil 4.15 COX-2 mRNA transkripsiyonu

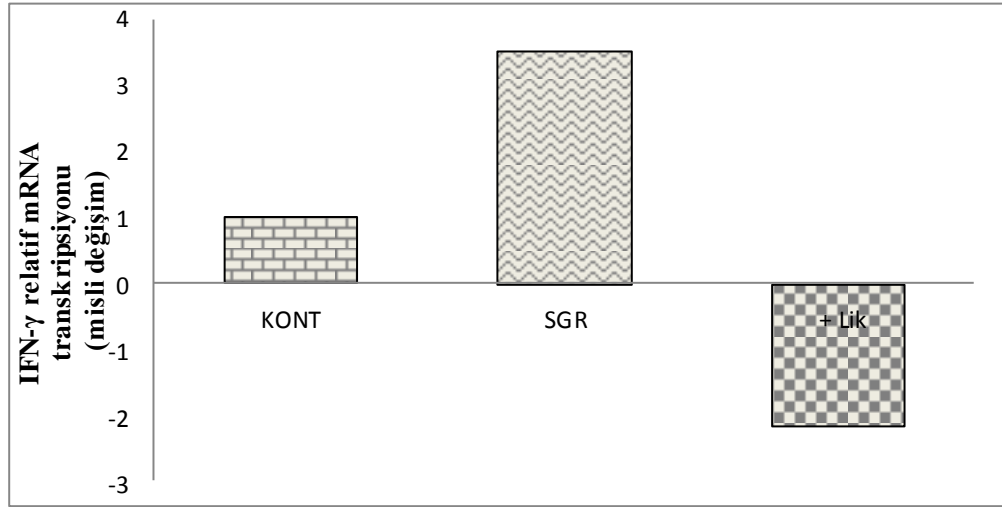
Buna göre COX-2 mRNA gen transkripsiyon seviyeleri, SGR eklenen grupta kontrol grubuna göre (11,51 misli) uyarıldığı, ancak likopen muamelesinin bu artışı tamamen iyileştirdiği saptandı (Şekil 4.15).



Şekil 4.16 COX-2 mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrisi

### 4.3.2 IFN- $\gamma$ mRNA Transkripsiyonu

Akciğer epitel hücrelerine likopenin yarım saatlik muamelesi sonrası SGR eklendi. Üç saat inkübasyon sonrası elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. Yangının başlaması ve devamından sorumlu olan IFN-  $\gamma$  geni mRNA transkripsiyon seviyeleri gerçek zamanlı PCR yöntemiyle analiz edildi.

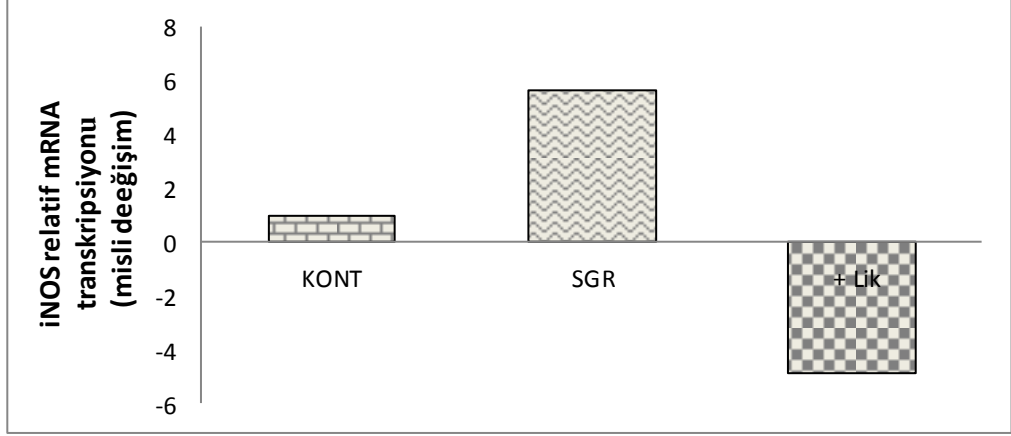


Şekil 4.17 IFN-  $\gamma$  mRNA transkripsiyonu

Buna göre IFN- $\gamma$  geni mRNA transkripsiyon seviyeleri sigara dumanı eklenen grupta kontrol grubuna göre (3,51 misli) uyarıldığı, likopen muamelesi sonrası SGR eklenen grupta bu artışın tamamen baskılandığı görüldü (şekil 4.17).

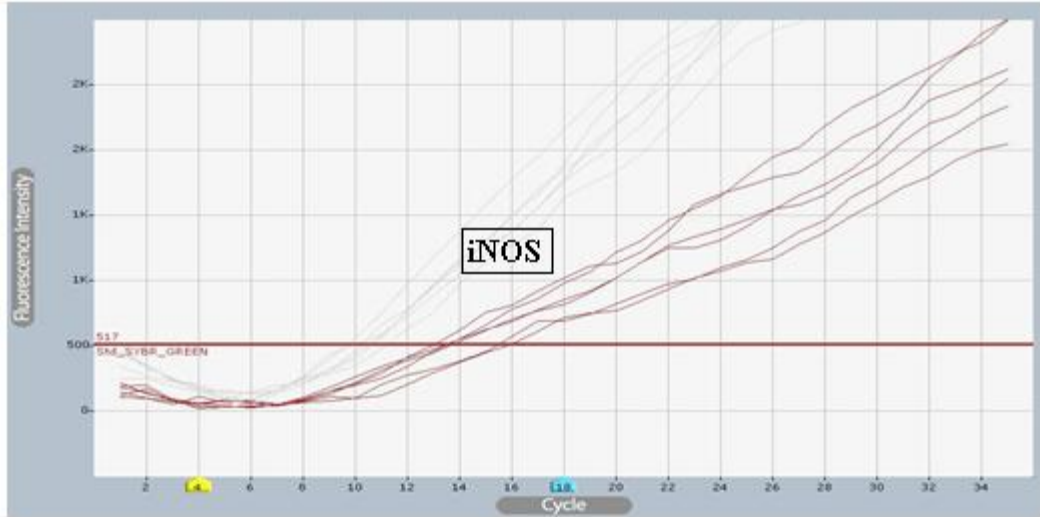
### 4.3.3. iNOS mRNA transkripsiyonu

Akciğer epitel hücrelerine 100 ng/ml likopen muamelesinin ardından SGR ile 3 saat inkübasyona bırakıldı. Nitrik oksit üretiminden sorumlu enzimlerden biri olan iNOS geninin mRNA transkripsiyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle analiz edildi.



Şekil 4.18 iNOS mRNA transkripsiyonu

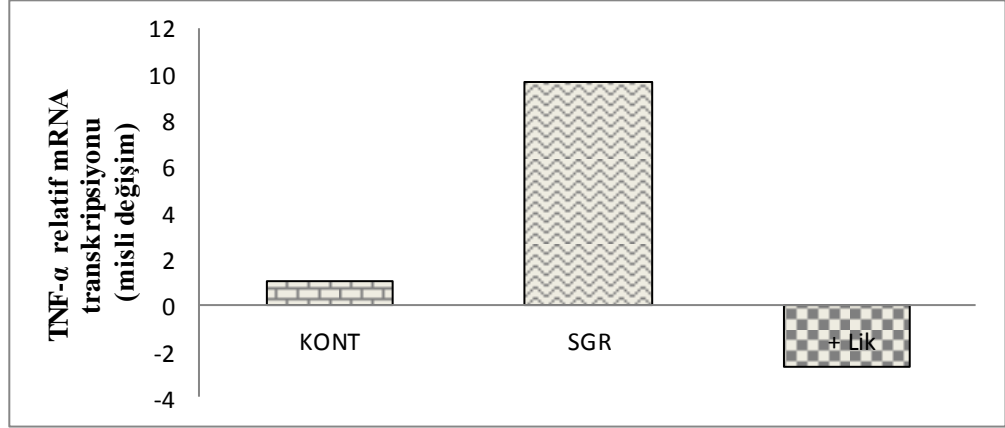
Buna göre; iNOS mRNA transkripsiyon seviyesi SGR eklenen grupta kontrol grubuna göre (yaklaşık 5,69 misli) uyarıldığı, ancak likopen uygulamasının bu uyarılmayı tamamen iyileştirdiği saptandı (Şekil 4.18)(KONT: kontrol hücreleri, SGR: sigara dumanı içirilmiş medyumlu hücreler +Lik:sigara dumanı ile birlikte likopen eklenen hücreler).



Şekil 4.19 iNOS mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrisi

#### 4.3.4. TNF- $\alpha$ mRNA Transkripsiyonu

Alveoler hücreler sigara dumanına maruz bırakılmadan 30 d önce 100 ng likopen tedavisi uygulandı. Daha sonra kültür kaplarına sigara içeriği bulunan medyum ilave edilerek 3 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda elde edilen RNA örneklerinden TNF- $\alpha$  mRNA transkripsiyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle araştırıldı.

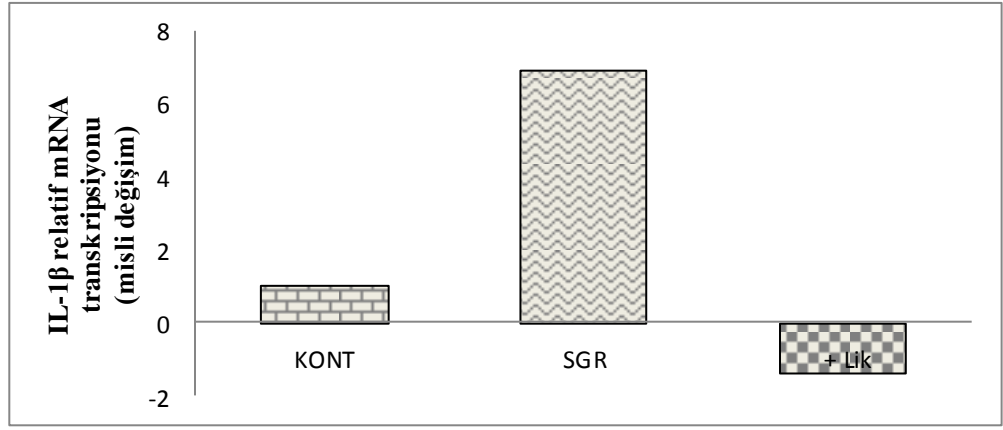


Şekil 4.20 TNF- $\alpha$  mRNA transkripsiyonu

Buna göre TNF- $\alpha$  mRNA transkripsiyon düzeyinin SGR eklene hücrelerde kontrol grubuna göre uyarıldığı (yaklaşık 9,71 misli), ancak likopen tedavisinin bu uyarılmayı durdurduğu saptandı (Şekil 4.20)

#### 4.3.5 IL-1 $\beta$ mRNA transkripsiyonu

Epitel hücreleri SGR'ye maruz bırakılmadan 30 d önce 100 ng likopen tedavisine bırakıldı. Daha sonra kültür kaplarına SGR ilave edilerek 3 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda elde edilen RNA örneklerinden IL- $\beta$  mRNA transkripsiyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle araştırıldı.



Şekil 4.21 IL-1 $\beta$  mRNA transkripsiyonu

Buna göre; IL-1 $\beta$  geni mRNA transkripsiyon seviyesi sigara dumanı ile doyurulmuş medyumda kontrol grubuna göre uyarıldığı (yaklaşık 6,96 misli), likopen tedavisi sonrası sigara içeriği eklenen grupta bu artışın baskılandığı belirlendi (Şekil 4.21).

## 5. TARTIŞMA

Sigara içiciliği KOAH gelişiminde en önemli risk faktörüdür. Sigara dumanı 4000'den fazla kimyasalı içinde bulundurduğu gibi  $O_2^-$  ve  $OH^-$  gibi reaktif oksijen türlerini de gaz fazında barındırır. Sigara dumanı zararlıları vücut hücrelerine kanserojenik, mutajenik ve toksik etkili olup; reaktif oksijen ve azot türleri ise antioksidan sistemi zayıflatır, çeşitli molekülleri okside ederek başta akciğerlerde kalıcı ve ilerleyici hasarlar verir (Hoshino ve ark. 2001). Yürütülen bu çalışmada akciğer epitel hücrelerinin üç saat süresince sigara duman içeriği bulduran medyum ile inkübe edilmesinin hücrelerde öldürücü etkiye neden olduğu tespit edildi. Literatürde sigaranın hücre viyabilitesini mitokondrial hasar sonucu öldürücü etkide olduğuna dair benzer çalışmalar bulunmaktadır (Ramage ve ark. 2006). Bununla birlikte, tedavi amaçlı kullanılan likopenin sigaranın neden olduğu hücre ölümlerini belirgin düzeyde (ölümlerin %30'u) engellediği saptandı. Likopenin düşük düzeylerinin anti-oksidan sistemi destekleyerek hücreleri koruyucu etkileri Di Tomo ve ark. (2011) ve Qu ve ark. (2011) araştırmacıların daha önce elde ettikleri veriler ile uyumludur.

Vitaminler hücre ve doku koruyucu etkilerini genelde antioksidan özellikleri ile ortaya koyar. Bu çalışmada, sigara dumanı ile doyurulmuş besi sıvısı ile muamele edilen akciğer epitel hücrelerinde hücre içi antioksidan molekül olan indirgenmiş GSH düzeyinin belirgin düzeyde azaltıldığı saptandı. Buna benzer olarak toplam antioksidan kapasite düzeyinin de düşürüldüğü tespit edildi. Bu sonuç sigaranın hücre sel antioksidan gücü zayıflattığına işaret eder. Van der Toorn ve ark. (2007) A549 epitel hücrelerinde sigara duman içeriğinin GSH düzeyini geri dönüşümsüz olarak azaltarak oksidatif stresin geliştiğini rapor etmişlerdir. Bu sonucun KOAH gelişiminin biyokimyasal mekanizmasından biri olabileceği sonucunu ortaya atmışlardır. GSH düzeyindeki azalma ile birlikte epitel hücrelerinin bariyer fonksiyonlarını kaybederek permeabilitenin arttığı da varılan sonuçlar arasındadır (Morrison ve ark. 1999). Antioksidan enzimlerden biri olan katalaz aktivitesi sigara dumanı etkisiyle inhibe edilirken, likopen kaybolan aktiviteyi kontrol grubu seviyesine kadar geri kazandırabilmektedir. Bu sonuç da likopenin güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğuna işaret eder.

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan hastaların plazma GSH ve vitamin C düzeyleri sağlıklı sigara kullananlara göre daha düşük iken, lipid peroksidasyon ürünü

MDA seviyesinin yüksek oluşu sigaranın sistemik etkilerini de ortaya koymaktadır (Calikoglu ve ark. 2002; Tkacova ve ark. 2007).

Bu sistemik oksidatif stres akciğerlerde olduğu kadar diğer dokularda da apoptoz ve nekroz yoluyla doku hasarına, organ yetmezliğine, yangı ve KOAH hastalığına neden olabilir. Yürütlen mevcut araştırmamızda sigara duman içeriğinin akciğer epitel hücrelerinde şiddetli düzeyde lipid peroksidasyonuna neden olduğu saptandı. Tedavi amaçlı kullanılan 100 ng likopen ise 3 saatlik inkübasyon sonrası gelişen sigara kaynaklı lipid peroksidasyonu engellediği tespit edildi. Leal ve ark. (1999)'nın kanatlılarda yaptıkları bir araştırmada mikotoksinin neden olduğu lipid peroksidasyonu sonuçlarımıza benzer olarak azalttığı, düşen plazma GSH düzeyini ise arttırdığı tespit edilmiştir. Hidrojen peroksit ile endotel hücrelerinde oksidatif stresin geliştirildiği bir başka araştırmada da (Tang ve ark. 2009) hücrelerdeki lipid peroksidasyonu 0,2 µM likopen tedavisi istatistiksel olarak önemli düzeyde engelleyebildiği rapor edilmiştir. Aynı araştırmacılar, sonuçlarımıza benzer olarak oksidatif stres sonucu gelişen hücre ölümünün likopen tarafından belirgin oranda azaltılabildiğini saptamışlardır.

Nitrik oksit (NO) aktive edilen yangısal ve epitel hücreler dahil birçok hücreden sentez edilen, akut ve kronik enflamatuvar hastalıkların patogeneze karışan gaz yapısında önemli bir moleküldür. Biyolojik sistemlerde fonksiyonları bulunan bu molekülün yüksek düzeyleri ise zararlıdır. Sigara duman içeriği ile muamele edilen epitel hücrelerinde NO düzeyinin kontrol grubuna göre belirgin düzeyde arttığı, bu artışta iNOS enzim ekspresyonunun da rolü bulunduğu tespit edildi. Yukihiro ve ark. (2011) yaptıkları bir araştırmada sigara etkisiyle üretilen NO'nun hücre ölümüne neden olduğunu ortama ilave ettikleri NO temizleyici kimyasal bir ajanla göstermişlerdir. Nitrik oksitin ortamdaki uzaklaştırılması ile sigaranın hücre öldürücü etkisini büyük oranda kaybettiği ortaya konulmuştur. Edirisinghe ve ark. (2010) endotel hücrelerde yürüttükleri bir araştırmada, ortama katılan spesifik inhibitörlerin oksijen ve NO radikalleri üretimini durdurmasıyla sigaranın neden olduğu fonksiyon bozukluklarını büyük oranda azalttığını tespit etmişlerdir. Bu sonuç, sigaranın sebep olduğu hücre hasarında NO ve diğer oksijen kökenli serbest radikallerin önemini ortaya koymaktadır. Bu tez çalışmasında sigaranın neden olduğu NO üretimi ve reaktif oksijen molekülleri (total oksidan kapasite-TOK-artışı) likopen tedavisi ile geriletebilmiştir. NO üretiminin azaltılması, iNOS ekspresyonunun baskılanması, TOK düzeyinin düşürülmesi ve total antioksidan kapasitenin (TAK) ise likopen etkisi ile güçlendirilmesi bu karotenin KOAH modelinde etkili bir molekül olabileceğine işarettir.



Oksidatif stres ile enflamasyon arasında bir etkileşim bulunduğu bilinmektedir. Sigara kullanımına bağlı olarak reaktif oksijen ve azot türlerinin üretiminin artması akciğerlerde NF-kB ve AP-1 transkripsiyon aracılığı ile sinyal iletimi ve yangı öncülü enflamatuvar ajanların sentezi sonucu enflamasyon gelişir (Hesslinger ve ark. 2009; Faux ve ark. 2009). NK-kB ise redoks-duyarlı bir nükleer faktör olup, sigara dumanına maruziyet sonucu akciğerlerde enflamatuvarik olayların başlamasından birinci derecede sorumludur (Sizemore ve ark. 2002). Bu araştırmada da sigara duman içeriğine maruz bırakılan akciğer epitel hücrelerinde ortaya çıkan oksidatif stres sonucu yangı başlatıcı mediyatörlerden IL-1 $\beta$  ve IFN- $\gamma$  ekspresyonlarında önemli düzeylerde artış olduğu yapılan qPCR analizlerinde saptandı. Bu sonuç yukarıda verilen araştırma sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Ayrıca, tedavi amaçlı kullanılan likopen, yangı mediyatörlerinin üretimini baskılayarak anti-enflamatuvar bir molekül olabileceğini ortaya koydu. Yapılan araştırmalarda sigara kullanıcılarının tkrük ve balgamlarında sigara kullanımının IL-1 $\beta$  düzeyini arttırdığı tespit edilmiştir (Chung ve ark. 2006) Elde edilen bu sonuç, Simone ve ark. (2011) makrofajlarda sigara duman içeriği ile yaptıkları çalışmalarında, ROS üretimi ve IL-8 sentezindeki artışın 2  $\mu$ M likopen ile 3 saatlik tedavi sonrası kontrol grubuna yakın bir sonuç elde edilmesi ile benzerlik göstermektedir. Aynı araştırmacılar, sigara duman içeriği ile aktive edilen MAPK sinyal iletim yolunun likopen tedavisiyle inhibisyonu sonucu oksidatif stres ve yangının baskılandığını tespit etmişlerdir.

Siklooksijenazlar (örn. COX-2) araşidonik asitten prostaglandinleri (PGE) sentezleyerek akut ve kronik enflamasyonun gelişmesine katkıda bulunan enzimlerdir. Özellikle KOAH hastalarında sigara dumanı içeriği nötrofil ve makrofajlarda COX-2 gen ekspresyonu ve PGE sentezini uyardığı bilinmektedir (Profita ve ark. 2010). Talbot ve ark. (2011) A549 epitel hücrelerinde sigara duman içeriği ile yaptıkları çalışmada, bu araştırmada elde edilen bulgulara benzer olarak süperoksit anyon üretimi ile IL-1 $\beta$  ekspresyonundaki artışa rağmen TNF- $\alpha$  ve COX-2'da değişim saptanmamıştır. Ancak, Ratovitski (2010) düşük düzeyde sigara duman içeriği ile muamele edilen sağlıklı ve kanser akciğer hücre hattında COX-2 gen ekspresyonunun uyarıldığını rapor etmiştir. Yürütülen bu araştırmada ise sigara dumanı akciğer epitel hücrelerinde COX-2 gen ekspresyonunu uyarırken likopen bu artışı inhibe ederek anti-enflamatuvar etkisini bu yolla da göstermiştir.

## 6. SONUÇ

Glutasyon ve N-asetil sistein gibi tiyol molekülleri ile ergotiyonin ve bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre likopen gibi önemli antioksidan moleküller KOAH hastalığının çeşitli hücresele ve biyokimyasal özelliklerini düzenleyebilir. Bu antioksidan moleküller organizmaya zarar verebilen sigara kökenli serbest radikal ve oksidan molekülleri ortamdandan temizleyebilir, glutasyon biyosentezini düzenleyebilir veya hücre içi konsantrasyonunun korunmasına katkıda bulunabilir, lipid peroksidasyonunu engelleyebilir ve NF-kB'yi kontrol altına alarak enflamatuvar oluşturucu gen ekspresyonunu durdurabilirler. Bu sebeple, KOAH tedavisinde likopen gibi antioksidan moleküllerden destek alınabilir. Likopenin etki mekanizmaları ile insanlardaki etkilerinin tam olarak ortaya konulabilmesi için kapsamlı *in vivo* araştırmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Aarbiou J, Rabe KF, Hiemstra PS.** Role of defensins in inflammatory lung disease. *Ann. Med.* **2002**, 34: 96–101.
2. **Afri M, Gottlieb HE, Frimer AA.** Superoxide organic chemistry within the liposomal bilayer, part II: a correlation between location and chemistry. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, 32: 605–618.
3. **Agarwal S, Rao VA.** Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Canadian Medical Association Journal*, **2000**, 163: 739–744.
4. **Agarwal S, Rao AV.** Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. *Lipids*, **1998**, 33: 981–4.
5. **Arab L, Steck S.** Lycopene and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2000**, 1691–1695.
6. **Baldwin AS.** The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **1996**, 14: 649–681.
7. **Barnes PJ.** Alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cell Mol. Biol.* **2004**, 50: 627–637.
8. **Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA.** Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur. Respir. J.* **2003**, 22: 672–688.
9. **Barnes PJ.** New molecular targets for the treatment of neutrophilic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2007**, 119: 1055–1062.
10. **Barnes PJ.** Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol. Rev.* **2004**, 56: 515–548.
11. **Bhuvanewari V, Nagini S.** Lycopene: a review of its potential as an anticancer agent. *Current Medicine Chemical Anticancer Agents* **2005**, 5: 627–635.
12. **Böhm F, Edge R, Burke M, Troscott TG.** Dietary uptake of lycopene protects human cells from singlet oxygen and nitrogen dioxide-ROS components from cigarette smoke. *J. Photochem. Photobiol.* **2001**, 64: 176–8.
13. **Brzezinska AK, Lohr N, Chilian WM.** Electrophysiological effects of O<sub>2</sub><sup>-</sup> on the plasma membrane in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2005**, 289: 2379–2386.
14. **Calikoglu M, Unlu A, Tamer L, Ercan B, Bugdayci R, Atik U.** The levels of serum vitamin C, malonyldialdehyde and erythrocyte reduced glutathione in chronic obstructive pulmonary disease and in healthy smokers. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2002**, 40: 1028–1031.
15. **Cantrel A, McGarvey DJ, Truscott TG, Rancan F, Böhm F.** Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, 412: 47–54.
16. **Chung M.** Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* **2001**, 18: 50–59.
17. **Chung KF.** Cytokines as targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets* **2006**, 7:675–68.
18. **Comhair SA, Bhatena PR, Farver C, Thunnissen FB, Erzurum SC.** Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells. *FASEB J* **2001**, 15: 70–78.
19. **Conner EM, Grisham MB.** Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* **1996**, 12: 274–277.
20. **Cosio MG, Majo J, Cosio MG.** Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells. *Chest* **2002**, 121: 160–165.
21. **Danial NN, Korsmeyer SJ.** Cell death: critical control points. *Cell* **2004**, 116: 205–219.
22. **Dekhuijzen PN.** Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* **2004**, 23: 629–636.
23. **Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C ve ark.** Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1998**, 158: 1277–1285.

24. **Di Mascio P, Kaiser S, Sies H.** Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, 274:532–8.
25. **Di Tomo P, Canali R, Ciavardelli D, Di Silvestre S, De Marco A ve ark.**  $\beta$ -Carotene and lycopene affect endothelial response to TNF- $\alpha$  reducing nitro-oxidative stress and interaction with monocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, Dec 9. doi: 10.1002/mnfr.201100500. [Epub ahead of print]
26. **Elkington PT, Friedland JS.** Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. *Thorax*, **2006**, 61: 259–66.
27. **Edirisinghe I, Arunachalam G, Wong C, Yao H, Rahman A ve ark.** Cigarette-smoke-induced oxidative/nitrosative stress impairs VEGF- and fluid-shear-stress-mediated signaling in endothelial cells. *Antioxid Redox Signal.* **2010**, 12(12): 1355-69.
28. **Faux SP, Tai T, Thorne D, Xu Y, Breheny D ve ark.** The role of oxidative stress in the biological responses of lung epithelial cells to cigarette smoke. *Biomarkers.* **2009**, 1: 90-96.
29. **Gadgil A, Zhu X, Sciruba FC, Duncan SR.** Altered T-cell phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2006**, 3: 487–8.
30. **Gao JJ, Zuvanich EG, Xue Q, Horn DL, Silverstein R ve ark.** Cutting edge: bacterial DNA and LPS act in synergy in inducing nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *J. Immunol.* **1999**, 163: 4095–4099.
31. **Grumelli S, Corry DB, Song L, Green L, Huh J ve ark.** An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med.*, **2004**, 1:e8.
32. **Gumus ZH, Du B, Kacker A.** Effects of tobacco smoke on gene expression and cellular pathways in a cellular model of oral leukoplakia. *Cancer Prev.* **2008**, 1: 100-11.
33. **Halliwell B.** Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* **1996**, 16: 33–50.
34. **Hellermann GR, Nagy SB, Kong X, Lockey RF, Mohapatra SS.** Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respir. Res.* **2002**, 3: 22.
35. **Henkart P.** Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules. *Immunity*, **1994**, 1: 343–6.
36. **Henricks PAJ, Nijkamp FP.,** Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2001**, 14: 409–420.
37. **Hesslinger C, Strub A, Boer R, Ulrich WR, Lehner MD ve ark.** Inhibition of inducible nitric oxide synthase in respiratory diseases. *Biochem. Soc. Trans.* **2009**, 37: 886-891.
38. **Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM ve ark.** Then nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* **2004**, 350: 2645–2653.
39. **Hogg JC.** Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* **2004**, 364: 709–721.
40. **Hogg JC,** Chronic obstructive pulmonary disease: an overview of pathology and pathogenesis. *Novartis Found Symp*, vol. **2001**, 234: 4–19. 19–26.
41. **Hoshino Y, Mio T, Nagai S, Miki H, Ito I ve ark.** Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2001**, L509-L516.
42. **Huang CS, Fan YE, Lin CY, Hu ML.** Lycopene inhibits matrix metalloproteinase-9 expression and down-regulates the binding activity of nuclear factor-kappa B and stimulatory protein-1. *J. Nutr. Biochem.* **2007**, 18: 449.
43. **Hung CF, Huang TF, Chen BH, Shieh JM, Wu PH ve ark.** Lycopene inhibits TNF- $\alpha$ -induced endothelial ICAM-1 expression and monocyte-endothelial adhesion. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, 586: 275.
44. **Karp G.** Cell and molecular biology: Concepts and experiments. 5th edition. John New Jersey: Wiley and Sons; **2008**, 653-657.
45. **Keatings VM, Barnes PJ.** Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma and normal subjects. *Am. Respir. Crit. Care Med.* **1997**, 155: 449-453.
46. **Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C.** Mitochondrial membrane permeabilisation in cell death. *Physiol. Rev.* **2007**, 87(1): 99–163.
47. **Kojima H, Shinohara N, Hanaoka S, Someya-Shirota Y, Takagaki Y ve ark.** Two distinct pathways of specific killing revealed by perforin mutant cytotoxic T-lymphocytes. *Immunity* **1994**, 1: 357–64.
48. **Macnee W, Rahman I.** Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1999**, 160: 58–65.

49. **MacNee W.** Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, 429: 195–207.
50. **Maeno T, Houghton AM, Quintero PA.** CD8+T cells are required for inflammation and destruction in cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J. Immunol.* **2007**, 178: 8090–8096.
51. **Majori M, Corradi M, Caminati A, Cacciani G, Bertacco S ve ark.** Predominant TH1 cytokine pattern in peripheral blood from subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **1999**, 103: 458–462.
52. **Makris D, Vrekoussis T, Izoldi M, Alexandra K, Katerina D ve ark.** Increased apoptosis of neutrophils in induced sputum of COPD patients. *Respir. Med.* **2009**, 103: 1130–113.
53. **Mannino DM.** COPD: epidemiology, prevalence, morbidity and mortality, and disease heterogeneity. *Chest*, **200**, 121: 121–6.
54. **Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN.** Antioxidant enzymes and human diseases, *Clin. Biochem.* **1999**, 32: 595-603.
55. **Medzhitov R, Janeway Jr C.** Innate immunity. *Innate immunity. N. Engl. J. Med.* **2000** 343, 338–344.
56. **Merckle CJ.** Cellular adaptation, injury, and death. In: *Pathophysiology: concepts of altered health states.* 8th edition. Edited by Porth CM, Matfin G. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams and Wilkins; **2009**, 94-111.
57. **Mohan H.** Textbook of pathology. 5th edition. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers; **2010**, 21-60.
58. **Monaco C, Andreacos E, Kiriakidis S.** T-cell mediated signaling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the cascade of events leading to inflammatory diseases. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* **2004**, 3: 35–42.
59. **Mortaz E, Redegeld FA, Sarir H, Karimi K, Raats D ve ark.** Cigarette smoke stimulates the production of chemokines in mast cells. *J. Leukoc. Biol.* **2008**, 83: 575–580.
60. **Morrison D, Rahman I, Lannan S, MacNee W.** Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* **1999**, 159(2):473-9.
61. **Mukaida N.** Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2003**, 284: 566–577.
62. **Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM.** An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273: 2926-2930.
63. **Nguyen ML, Schwartz SJ.** Lycopene: chemical and biological properties. *Food Tech.* **1999**, 53: 38–45.
64. **O'Brien MA, Kirby R.** Apoptosis: a review of pro-apoptotic and antiapoptotic pathways and dysregulation in disease. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* **2008**, 18: 572-585.
65. **Olson TS, Ley K.** Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2002**, 283: 7–28.
66. **Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS.** Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **2001**, 163: 1256–1276.
67. **Pons AR, Sauleda J, Noguera A, Pons J, Barcelo B ve ark.** Decreased macrophage release of TGF- $\beta$  and TIMP-1 in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* **2005**, 26: 60–66.
68. **Profita M, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Ferraro M ve ark.** Chronic obstructive pulmonary disease and neutrophil infiltration: role of cigarette smoke and cyclooxygenase products. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2010** Feb;298(2): L261-9.
69. **Pruthi RS, Derksen E, Gaston K.** Cyclooxygenase-2 as a potential target in the prevention and treatment of genitourinary tumors. *J. Urol.* **2003**, 169, 2352-9
70. **Quint JK, Wedzicha JA.** The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin. Immunol.* **2007**, 119:1065–71.
71. **Qu M, Li L, Chen C, Li M, Pei L ve ark.** Protective effects of lycopene against amyloid  $\beta$ -induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons. *Neurosci Lett.* 2011 Nov 21;505(3):286-90. Epub **2011** Oct 25.
72. **Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA ve ark.** Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2007**, 176: 532–555.
73. **Rahman I, Adcock IM.** Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur. Respir. J.*, **2006**, 28: 219–42.

74. **Rahman I, MacNee W.** Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am. J. Physiol.* **1999**, 277: 1067–88.
75. **Rahman I, MacNee W.** Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax* **1998**, 53: 601–612.
76. **Rahman I, MacNee W.** Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, 21: 669–681.
77. **Rahman I, MacNee W.** Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **1999**, 277: 1067–1088.
78. **Ramage L, Jones AC, Whelan CJ.** Induction of apoptosis with tobacco smoke and related products in A 549 lung epithelial cells in vitro. *Journal of Inflammation*, **2006**, 3:3.
79. **Rao VA, Agarwal S.** Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Canadian Medical Association Journal*, **2000**, 163: 739–744.
80. **Rao AV, Agarwal S.** Bioavailability and in vivo antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer. *Nutr. Cancer*, **1998**, 31: 199–203.
81. **Rao AV, Agarwal S.** Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. *Nutr. Res.* **1999**, 19: 305–323.
82. **Rehmann A, Bourne LC, Halliwell B, Rice-Evans CA.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 262: 828–831.
83. **Remels AH, Gosker HR, Van Der Velden J, Langen RC, Schols AM.** Systemic inflammation and skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: state of the art and novel insights in regulation of muscle plasticity. *Clin. Chest Med.* **2007**, 28: 537–552.
84. **Saetta M, Yurato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM.** Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2001**, 163: 1304-1309.
85. **Sarir H, Henricks PAJ, van Houwelingen AH.** Cells, mediators and Tolllike receptors in COPD. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, 585:346–353.
86. **Schneider P, Tschopp J.** Apoptosis induced by death receptors. *Pharm. Acta. Helv.* **2000**, 74: 281-286.
87. **Sizemore N, Lerner N, Dombrowski N, Sakurai H, Stark GR.** Distinct roles of the Ikappa B kinase alpha and beta subunits in liberating nuclear factor kappa B (NF-kappa B) from Ikappa B and in phosphorylating the p65 subunit of NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* **2002**, 8; 277(6): 3863-3869.
88. **Slebos DJ, Ryter SW, Van Der Toorn M, Liu F, Guo F ve ark.** Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2007**, 36: 409–417.
89. **Sin DD, Man SF.** Systemic inflammation and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Can J. Physiol. Pharmacol.* **2007**, 85: 141–147.
90. **Stahl W, Sies H.** Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1996**, 336, 1–9.
91. **Sullivan AK, Simonian PL, Falta MT, Mitchell JD, Cossgrove GP ve ark.** Oligoclonal CD4+T-cells in the lungs of patients with severe emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **2005**, 172: 590–6.
92. **Szegezdi E, Fitzgerald U.** Caspase-12 and ER stres mediated apoptosis: the story so far. *Ann. NY Acad. Sci.* **2003**, 1010: 186-194.
93. **Takizawa H, Tanaka M, Takami K, Ohtoshi T, Ito K ve ark.** Increased expression of transforming growth factor-β1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2001**, 163: 1476–1483.
94. **Talbot S, Lin JC, Lahjouji K, Roy JP, Sénécal J ve ark.** Cigarette smoke-induced kinin B1 receptor promotes NADPH oxidase activity in cultured human alveolar epithelial cells. *Peptides.* **2011 Jul**;32(7): 1447-56.
95. **Tkacova R, Kluchova Z, Joppa P, Petrasova D, Molcanyiova A.** Systemic imflamation and systemic oxidative stress in patients with acute exacerbations of COPD. *Respir. Med.* **2007**, 101: 1670-1676.
96. **Turino G.M.** The origins of a concept: the protease-antiprotease imbalance hypothesis. *Chest* **2002**, 122: 1058–60.
97. **Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K.** Tobacco Smoke: Involvement of Reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis

- and synergistic effects with other respirable particles. *J. Environ. Res. Public Health* **2009**, *6*: 445-462.
98. **Van der Toorn M, Slebos DJ, De Bruin HG, Leuvenink HG, Bakker SJ ve ark.** Cigarette smoke induced blockade of the mitochondrial respiratory chain switches lung epithelial cell apoptosis into necrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2007**, *292*: 1211-1218.
  99. **van der Toorn M, Smith-de Vries MP, Slebos DJ, de Bruin HG ve ark.** Cigarette smoke irreversibly modifies glutathione in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* **2007**, *293*: L1156-L1162.
  100. **Vernooy J.H., Lindeman J.H., Jacobs J.A.,** Increased activity of matrix metalloproteinase-8 and matrix metalloproteinase-9 in induced sputum from patients with COPD. *Chest*, **2004**, *126*: 1802-10.
  101. **Weathington NM, Van Houwelingen, AH, Noerager BD, Jackson PL, Kraneveld AD ve ark.** A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. *Nat. Med.* **2006**, *12*: 317-323.
  102. **Wertz K, Siler U, Goralczyk R.** Lycopene, modes of action to promote prostate health. *Arch. of Biochem. And Biophys* **2004**, *430*: 127-134.
  103. **Yukihiro M, Hiramatsu T, Kawano T.** Lethal impacts of cigarette smoke in cultured tobacco cells. *Tob. Induc. Dis.* **2011** *16*: 9:8.

## ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Hatay'ın Antakya ilçesinde doğdu. İlkokulu Hatay'ın Antakya ilçesindeki Bedii Sabuncu İlkokulu'nda, ortaokulu Atatürk Ortaokulu'nda, liseyi ise Atatürk Lisesi'nde okudu. Daha sonra 2003 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde eğitimine başladı. Mezun olduktan sonra 2009 yılında aynı üniversitenin Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Veteriner) Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.