

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

**SİGARA DUMANI ZARARLILARININ AKCİĞER EPİTEL
HÜCRELERİNE VERDİĞİ YANGISAL VE OKSİDATİF HASAR
ÜZERİNE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER'İN (CAPE) ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fırat Barış BARLAS

Danışman

Prof. Dr. Suat ERDOĞAN

HATAY/2011

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

**SİGARA DUMANI ZARARLILARININ AKCİĞER EPİTEL
HÜCRELERİNE VERDİĞİ YANGISAL VE OKSİDATİF HASAR
ÜZERİNE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER'İN (CAPE) ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fırat Barış BARLAS

Danışman

Prof. Dr. Suat ERDOĞAN

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
1004Y0115 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY/2011

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

**SİĞARA DUMANI ZARARLILARININ AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİNE
VERDİĞİ YANGISAL VE OKSİDATİF HASAR ÜZERİNE KAFEİK ASİT
FENETİL ESTER'İN (CAPE) ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fırat Barış BARLAS

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 30/06/2011 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oy birliğiyle kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri Başkanı: Prof. Dr. Suat ERDOĞAN.....
Üye: Prof. Dr. Deniz YILDIZ.....
Üye: Yrd. Doç. Dr. Zafer YÖNDEN.....

Bu tez enstitümüz Biyokimya (VET) Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim KÜLTÜR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora tezim süresince bilgilerini ve deneyimini benden esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Suat ERDOĞAN'a, tezime yapmış olduğu katkılardan dolayı Biyokimya Ana Bilim Dalı hocalarım Yrd. Doç. Dr. Altuğ KÜÇÜKGÜL'e, Yrd. Doc. Dr. Vesile DÜZGÜNER'e, laboratuvar arkadaşlarım Ayşe KÜÇÜK'e, ve. Filiz KAZAK'a Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sekreteri Zeynep MELEK'e Laboratuvarlarının imkanlarını bize sundukları için Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Mustafa ERAYMAN ve Öğr. Gör. Emre İLHAN'a teşekkür ederim. Ayrıca gösterdikleri maddi ve manevi destek ile anlayıştan dolayı ailem, İsmet-Şükran BARLAS ve kardeşlerime ve ev arkadaşım uzman biyolog Serhat ÖZÇUBUKÇU'ya teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ÖZET.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	2
2.1 Propolis ve Kafeik asit fenetil ester.....	2
2.2 Sigara dumanı ve Oksidatif Stres.....	4
2.3 Antioksidan savunma sistemi ve KOAH.....	6
2.4. KOAH'ın patolojisi.....	7
2.4.1. Epitel hücreler.....	7
2.4.2. Nötrofiller.....	8
2.4.3 Makrofajlar.....	8
2.4.4. T-lenfositler ve CD+8 hücreler.....	9
2.4.5. Yangı araçları.....	9
2.4.5.1. Kemokinler.....	9
2.4.5.2. sitokinler.....	9
2.4.6. Metalloproteazlar (MMPs).....	10
2.4.7. Apoptoz.....	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1 Hücre Hattı.....	13
3.2 Hücre Pasajı.....	13
3.3 Denemede kullanılan kimyasallar.....	13
3.3.1 Kafeik asit fenetil ester (CAPE).....	13
3.3.2 Mediumun sigara dumanı ile doyurulması.....	14
3.4 Homojenat hazırlama.....	14
3.5 Tripan mavisi boyasıyla canlı-ölü hücre değerlendirilmesi ve hücre sayımı.....	14
3.6 Biyokimyasal Analizler.....	15
3.6.1 Bradford Yöntemi ile Protein Analizi.....	15
3.6.2 Nitrik oksit (NO) Düzeylerinin Belirlenmesi.....	15
3.6.3 Glutatyon (GSH) Analizi.....	16
3.6.4 Katalaz (CAT) Aktivitesi Analizi.....	16
3.6.5 Tiazol Mavisi Tetrazolyum Bromid (MTT) Viabilite Testi.....	17
3.6.6 Malondialdehit (MDA) analizi.....	18
3.7 RNA İzolasyonu.....	18
3.8 cDNA Sentezi ve Reverz Transkripsiyon (RT-PCR).....	19
3.9 Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	19
3.10. İstatistiksel Metod.....	20
4. BULGULAR.....	22
4.1. Spektrofotometrik analiz ve hücre sayımı sonuçları.....	22

4.1.1. Farklı konsantrasyonlardaki CSE'nin hücre viabilitesi üzerine etkisi.....	22
4.1.2. Farklı konsantrasyonlardaki CAPE'in hücre viabilitesi üzerine etkisi.....	23
4.1.3. CAPE uygulamasının sigara dumanının neden olduğu hücre ölümleri üzerine etkisi.....	23
4.1.4. Sigara dumanına maruz bırakılan hücrelerde CAPE'in katalaz aktivitesi üzerine etkisi.....	25
4.1.5. Sigara dumanının neden olduğu NO üretimi üzerine CAPE'in etkisi.....	25
4.1.6. glutatyon (GSH) düzeyi üzerine Kafeik asit fenetil ester ve CSE uygulamasının etkileri.....	26
4.1.7. Kafeik Asit Fenetil Ester ve CSE uygulamalarının Malondialdehit (MDA) düzeyi üzerine etkileri.....	27
4.2. Akciğer epitel hücrelerinin morfolojisine sigara dumanı ve CAPE'in etkileri.....	28
4.3. RT-PCR sonuçları.....	30
4.3.1 TNF- α mRNA transkripsiyonu.....	30
4.3.2 IL-1 β mRNA transkripsiyonu.....	32
4.3.3 COX-2 mRNA transkripsiyonu.....	33
4.3.4 IFN- γ mRNA transkripsiyonu.....	35
4.3.5 iNOS mRNA transkripsiyonu.....	36
4.3.6 CAS-3 mRNA transkripsiyonu.....	37
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇ.....	43
7. KAYNAKLAR.....	44
8. ÖZGEÇMİŞ.....	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Kafeik asit fenetil esterin kimyasal yapısı.....	2
Şekil 2.2. Nitrik oksitin hücre içi sinyal iletim yolağı.....	3
Şekil 2.3. Serbest radikallerin transkripsiyon üzerine etkileri.....	5
Şekil 2.4. Enzimatik antioksidan savunma sistemi.....	5
Şekil 2.5. Sigara dumanının oluşturduğu oksidatif stres üzerine glutasyonun etkisi.....	6
Şekil 2.6. CAPE’ın proinflamatuvar uyarımlı NF- κ B blokajı.....	10
Şekil 2.7. TNF- α hücre içi sinyal iletim yolağı.....	12
Şekil 4.1. CSE’nin farklı konsantrasyonlarının hücre viabilitesi üzerine etkisi	22
Şekil 4.2. Farklı CAPE konsantrasyonlarının hücre viabilitesi üzerine etkisi.....	23
Şekil 4.3. CSE ile birlikte farklı CAPE konsantrasyonlarının hücre viabilitesi üzerine etkileri.....	24
Şekil 4.4. CSE ile CAPE uygulamasının canlı hücre sayısı üzerine etkisi.....	24
Şekil 4.5. CSE ile CAPE uygulamasının katalaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	25
Şekil 4.6. CSE ile birlikte CAPE uygulanmasının nitrit ve nitrat düzeyine etkisi	26
Şekil 4.7. CSE ile birlikte CAPE uygulanmasının glutasyon üretimi üzerine etkisi	26
Şekil 4.8. CSE ile birlikte CAPE uygulanmasının Malondialdehit üretimi üzerine etkisi.....	27
Şekil 4.9. A549 hücreleri kontrol grubu 3. saat mikroskop görüntüleri.....	28
Şekil 4.10. A549 hücreleri CSE eklenen grupta 3 saat sonrası mikroskop görüntüleri.....	29
Şekil 4.11. A549 hücrelerine CAPE eklenen grupta 3 saat sonrası mikroskop görüntüleri.....	29
Şekil 4.12. A549 hücrelerine CAPE ön muamesi sonrası CSE eklenen grupta 3 saat sonrası mikroskop.....	30
Şekil 4.13. TNF- α mRNA transkripsiyon seviyeleri.....	31
Şekil 4.14. Gerçek zamanlı PCR’da TNF- α geni mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrileri.....	31
Şekil 4.15. IL-1 β mRNA transkripsiyon seviyeleri.....	32
Şekil 4.16. Gerçek zamanlı PCR’da IL-1 β geni mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrileri.....	33
Şekil 4.17. COX-2 mRNA transkripsiyon seviyeleri.....	33
Şekil 4.18. Gerçek zamanlı PCR’da COX-2 geni mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrileri.....	34
Şekil 4.19. IFN- γ mRNA transkripsiyon seviyeleri.....	35
Şekil 4.20. Gerçek zamanlı PCR’da IFN- γ geni mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrileri.....	35
Şekil 4.21. iNOS mRNA transkripsiyon seviyeleri.....	36
Şekil 4.22. Gerçek zamanlı PCR’da iNOS geni mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrileri.....	37
Şekil 4.23. CAS-3 mRNA transkripsiyon seviyeleri.....	37
Şekil 4.24. Gerçek zamanlı PCR’da CAS-3 geni mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrileri.....	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. RT-PCR analizlerinde kullanılan primer baz dizgeleri ve PCR koşulları.....21

KISALTMALAR DİZİNİ

CAPE	: Kafeik asit fenetil ester
CSE	: Sigara dumanı içeriği
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
O ₂ ⁻	: Süperoksit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
OH ⁻	: Hidroksil
GSH	: Glutatyon
NO	: Nitrik oksit
TNF	: Tümör nekroz faktör
NF- κ B	: Nükleer faktör kapa B
İk- β	: İnhibitör faktör kappa B
IL	: Interlökin
XO	: Ksantin oksidaz
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
MPO	: Myeloperoksidaz
ROO ⁻	: Peroksil radikali
LOO ⁻	: Lipid peroksit
MDA	: Malondialdehit
IFN	: İnterferon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
GST	: Glutatyon-S-transferaz
iNOS	: Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FCS	: Föetal buzağı serumu
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DEPC	: Dietilpirokarbonat
NAC	: N asetil sistein
DTNB	: 2-Nitrobenzoik asit
TCA	: Triklor asetik asit
TGF	: Tümör büyüme faktörü
COX	: Siklooksijenaz
MTT	: Thiazolil blue tetrazolyum bromid
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
MMP	: Metalloproteinaz

ÖZET

Sigara Dumanı Zararlılarının Akciğer Epitel Hücrelerine Verdiği Yangısal ve Oksidan Hasarı Üzerine Kafeik Asit Fenetil Ester Etkisi

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAİ), başta sigara kullanımı, mesleki gazlar ve hava kirliliği olmak üzere gelişen kronik ve ilerleyici özellikte bir akciğer hastalığıdır. İnsanlarda ölüm sebepleri arasında beşinci sırada yer alan KOAİ'nin henüz etkin bir tedavisi bulunmamaktadır. Bu araştırmada hücre kültürü ortamında akciğer epitel hücrelerinde (A549) sigara duman içeriği ile oluşturulan KOAİ modelinde kafeik asit fenetil ester'in (CAPE) gelişen oksidatif hasar ve yangı şiddeti üzerine etkisi araştırıldı. Çalışmada kullanılacak uygun CAPE düzeyi yapılan doz çalışması ile belirlendi. Buna göre 2,5 µM düzeyinin sitotoksik etkisinin bulunmadığı tespit edildi. Araştırmada bir adet filtresiz sigara dumanı özel bir düzenekle 20 ml hücre medyumundan (DMEM) geçirilerek içeriğinin medyumda kalması sağlandı (SGR). Hücrelerin 3 saat süresince CSE içeren medyum ile inkübasyonu viabilitelerinde % 46 düzeyinde kayba neden olurken, (p<0.001). CAPE'in hücre kayıplarını % 21 oranına indirdiği belirlendi (p<0,001). Sigara içeriğinin nitrik oksit düzeyini iNOS ekspresyonu ile arttırdığı (p<0,001). CAPE uygulamasının iNOS gen transkripsiyon düzeyini düşürerek nitrik oksit miktarını azalttığı saptandı (p<0,001). Sigara içeriğinin düşürdüğü antioksidan katalaz aktivitesini (P<0.05). CAPE tedavisinin anlamlı derecede iyileştirdiği belirlendi (P<0,05). Önemli bir hücre içi antioksidan olan glutatyon düzeyinin sigara içeriği tarafından azaltıldığı (P<0.05). CAPE kullanımı bu durumu anlamlı derecede düzelttiği saptandı. Sigara içeriği yangısal sitokinlerden tümör nekroz faktör alfa, interlökin-1 beta, interferon gama ve siklooksijenaz-2 genleri transkripsiyon düzeylerini sırasıyla 3, 2, 65 ve 26 misli artırırken CAPE tedavisinin bu artışları önemli ölçüde azalttığı saptandı. Ayrıca artan kaspaz-3 gen transkripsiyon seviyesi ölçülerek sigara içeriğinin apoptoza neden olduğu. CAPE tedavisinin kaspaz-3 transkripsiyonunu anlamlı derecede baskıladığı saptandı. Sonuç olarak, CAPE'in sigaranın yol açtığı yangı ve oksidatif hasar üzerine önemli düzeyde baskılayıcı etkisi, bu farmakolojik ajanın sigara zararlarının önlenmesinde kullanılabilme potansiyelini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: KOAİ, CAPE, Yangı, Oksidatif stres, Akciğer, Epitel hücreler, Sigara

ABSTRACT

The Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Cigarette Smoke Induced Oxidative and Inflammatory Damage in Lung Epithelial Cells

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a chronic and progressive lung disease which is contributed by cigarette smoke, air pollution and occupational exposures. COPD is currently the fifth leading cause of death worldwide and there is no efficient treatment yet. In the present study, the effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on cigarette smoke induced oxidative and inflammatory damage is investigated in lung epithelial cells (A549). Dose response study demonstrated that 2.5 μ M CAPE has no cytotoxicity in the cells. Cigarette Smoke Extract (CSE) was prepared by bubbling the smoke from filterless cigarette through 20 ml of serum-free cell culture medium. Cell viability was reduced by 46 % after 3 hours incubation with CSE ($p < 0.001$). CAPE treatment prevented about 25 % cellular loss induced by CSE exposure ($p < 0.001$). It was detected that CSE caused to increase nitric oxide production by iNOS expression ($p < 0.001$). After CAPE treatment, nitric oxide transcription level was decrease via down regulation of inducible nitric oxide synthase ($p < 0.001$). It was indicated that CSE caused to decrease of antioxidant katalaz activity ($p < 0.05$). But CAPE application did decrease the transcription level. Antioxidant glutathione level was decreased by CSE ($p < 0.05$). However CAPE treatment restored glutathione concentration ($p < 0.05$). mRNA transcription analyses demonstrated that CSE was increase level of inflammatory cytokine production such as TNF- α , IL-1 β and IFN- γ , and COX-2. (3, 2, 65 and 26 fold respectively). CAPE treatment significantly decreased the level of cytokine transcriptions. CSE also induced apoptotic protease, caspase-3, expression. in spite of that CAPE decreased caspase-3 transcription level. As a result of the study, significant protective effect of CAPE against to cigarette smoke caused oxidative and inflammatory damage is demonstrated. Therefore this pharmacological agent may have a high potential for the protective role induced by cigarette damage.

Keywords: COPD, CAPE, Inflammation, Oxidative stress, Lung, Epithelial cells, Cigarette

1.GİRİŞ

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH), solunum yollarının daralması ve başta sigara dumanı olmak üzere zararlı gaz ve partiküllere karşı anormal yangı ile karakterize olan önemli küresel sağlık sorunundan biridir (WHO. 2009). Son 60 yılda yapılan araştırmalar sigara dumanının KOAH'ın temel nedeni olduğunu ortaya koymuştur (Shapiro ve ark. 2010). KOAH dünya genelinde en fazla ölüme neden olan kronik, bir hastalık olup, insanlarda beşinci ölüm sebebidir (Pauwels ve Rabe 2004).

KOAH'ın patolojisinde bilinen 3 mekanizma yer almaktadır (Barnes ve ark. 2003). Başta sigara dumanı olmak üzere zararlı gazların solunması ile yangısal hücrelerin (makrofajlar, nötrofiller, CD8+ ve T-lenfositler) akciğere ve solunum yollarına infiltre olmasıdır. Bu da kronik yangının başlangıcını oluşturur (Ingel ve ark. 2006). ikincisi artan proteolitik aktivite sonucu proteolitik ve antiproteolitik dengenin bozulmasıdır. Bunun sonucunda sağlıklı akciğer parankima hücreleri yıkılır ve anfizem gelişir (Demedts ve ark. 2005). Bir diğer neden ise, reaktif oksijen (ROS) ve serbest nitrojen (RNS) türlerinin antioksidan sistemin karşılayabileceğinden fazla üretilmesi ya da vücuda dışarıdan alınması durumudur. Serbest radikaller vücuda, başta sigara dumanı olmak üzere zararlı gaz ve partiküllerce alınır veya makrofajlar gibi vücut savunma hücreleri ve epitel hücreler tarafından üretilir (Barnes ve ark. 2003). Serbest radikaller hücre fonksiyon kaybı ve apoptoza sebep olabilir. Ayrıca, proteolitik-antiproteolitik dengeyi ve proteazların aktivitelerini artırıp antiproteaz aktivitesini azaltarak bozabilirler. Serbest radikaller yangı sitokinlerinin sentezlenmesinde anahtar rol oynayan Nükleer faktör kapa B'yi (NF-kB) aktive ederek yangı hücrelerinin, akciğere göçünü sağlarlar. Bu olaylar, üç mekanizmanın da birbirine bağlı olduğunu ve temelinde oksidatif stres bulunduğuna işaretir (Ingel ve ark. 2006).

Propolis bal arılarının bitkilerden topladığı reçineli bir maddedir. Bileşiminde, % 30-40 balmumu, % 10-15 esansiyel ve aromatik yağlar, % 5 polen ve % 5 oranında da organik artıkları içerir (Monti ve ark. 1983; Cirasino ve ark. 1987). Kafeik asid fenetil ester (CAPE) bal arısı propolisinin aktif bileşeni olup eski çağlardan beri ilaç olarak kullanılan antimitojenik, antikanserojenik, yangı giderici ve immün sistemi destekleyici özellikleri olan fenolik yapılı bir bileşiktir (Frenkel ve ark. 1993; Ahn ve ark. 2004).

İnsan kökenli akciğer alveolar bazal epitel (A549) hücre hattının kullanıldığı bu deneysel araştırmada, hücrelerde sigara dumanı kullanılarak oluşturulan KOAH hücre kültürü modelinde, CAPE'in oksidatif stresi önleyici ve yangı giderici etkinliği biyokimyasal ve moleküler teknikler kullanılarak araştırıldı.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Propolis ve Kafeik Asit Fenetil Ester

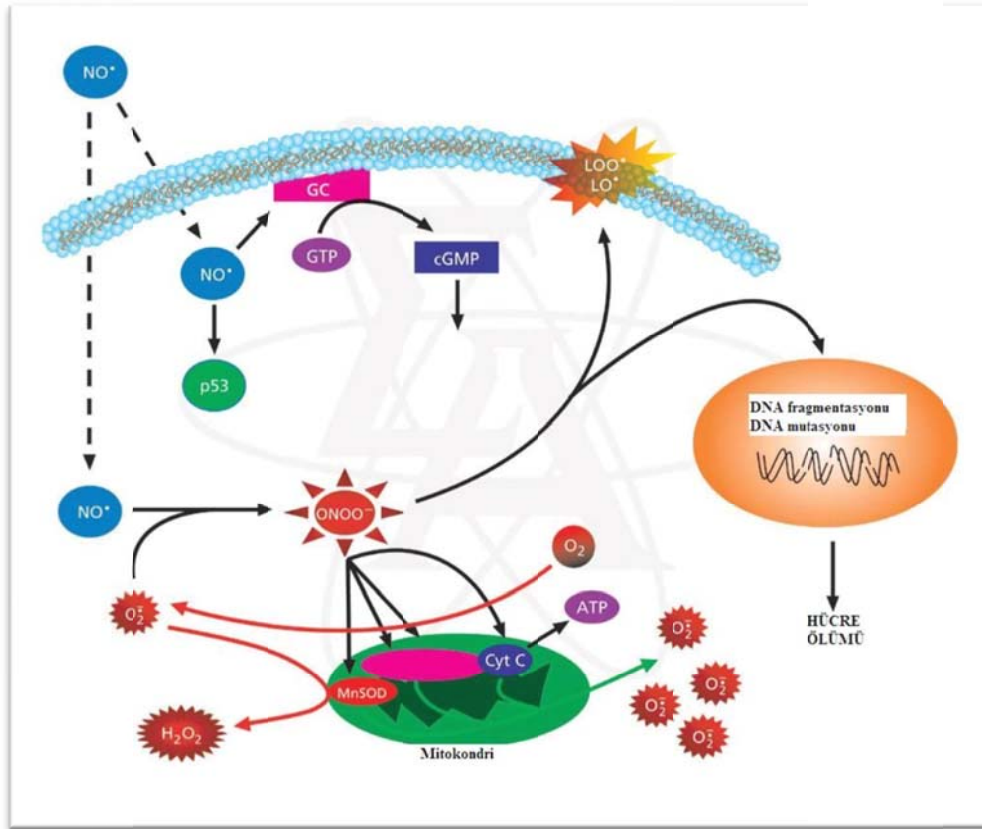
Propolis bal arılarının bitkilerden toplandığı reçineli bir maddedir. Arılar propolisi, kovan açıklarının kaplanmasında, mikroorganizmalara karşı savunmada, ısı ve su izolasyonunda kullanırlar (Sonmez ve ark. 2005). İçeriğinde % 30-40 balmumu, % 10-15 esansiyel ve aromatik yağlar, % 5 polen ve % 5 oranında ise organik artıklar bulunur. Ayrıca magnezyum, kalsiyum, demir, nikel ve çinko gibi iz elementleri de yapısında ihtiva eder. Propolisin biyolojik aktif maddeleri fenolik asitlerin, esterlerin, fenolik aldehit ve ketonların bulunduğu polifenollerdir (Castaldo ve Capasso 2008). Propolisin antibakteriyel, antifungal, anti-inflamatuvar, antioksidant ve immün stimulan etkileri vardır (Borrelli ve ark. 2002; Johnston ve ark. 2005).

Kafeik asit fenetil ester gibi flavonidler propolisin yapısında bulunan aktif fenolik bileşiklerdir (Viuda-Martos ve ark. 2008) (Şekil 2.1). Yapılan çalışmalarda CAPE'in antibakteriyel, antioksidan, yangı giderici, immün sistemi destekleyici, antikanserojenik, nöroprotektif ve anti aterosklerotik etkileri olduğu rapor edilmiştir (Orsolice ve ark. 2005). Kafeik asit fenetil ester, spesifik bir NF-kB inhibitörü olup (Natarajan ve ark. 1996) bu genellikle sitoplazmada aktif olmayan bir biçimde Inhibitör Protein Kapa β (Ik- β) ile birlikte bulunur. Yangı sırasında Ik- β fosforile olmasıyla NF-kB aktifleşir. NF-kB, ROS gibi stresör moleküllerin etkisiyle sitokinlerin, nitrik oksit sentataz (NOS) gibi enzimlerin, adezyon moleküllerinin ve akut faz proteinlerinin bulunduğu yangı ile ilgili genlerin ekspresyonunu artırır. Bundan dolayı NF-k β , birçok yangısal hastalığın tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde birincil hedef haline gelmiştir (Makarov 2000).



Şekil 2.1. Kafeik asit fenetil ester kimyasal yapısı

Nitrik oksitin (NO) başta damar genişlemesi, sinir iletimi ve mikroorganizmalar gibi canlıyı tehdit eden etkenlere karşı koruma olmak üzere birçok etkileri vardır (MacMicking ve ark. 1997). Memelilerde NO sentezleyen enzimlerin; endotelial nitrik oksit sentetaz (eNOS), nöronal nitrik oksit sentetaz (nNOS) ve indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. Kafeik asit fenetil ester iNOS gen ekspresyonunu baskılayarak NO üretimini önemli düzeyde azaltır (Çelik ve Erdoğan 2008) (Şekil 2.2). Siklooksijenaz (COX)'lar araşidonik asitten prostaglandinlerin sentezinden sorumlu enzimlerdir. Siklooksijenazların COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki izomeri vardır. Bu moleküller bölgesel yangı oluşumunu ve uyarılmasını sağlarlar (Hawkey 1999). CAPE yangı önleyici etkisini, hücre membranlarından araşidonik asit salınımını önleyip, COX aktivitesin inhibe ederek gerçekleştirir (Büyükberber ve ark. 2009).

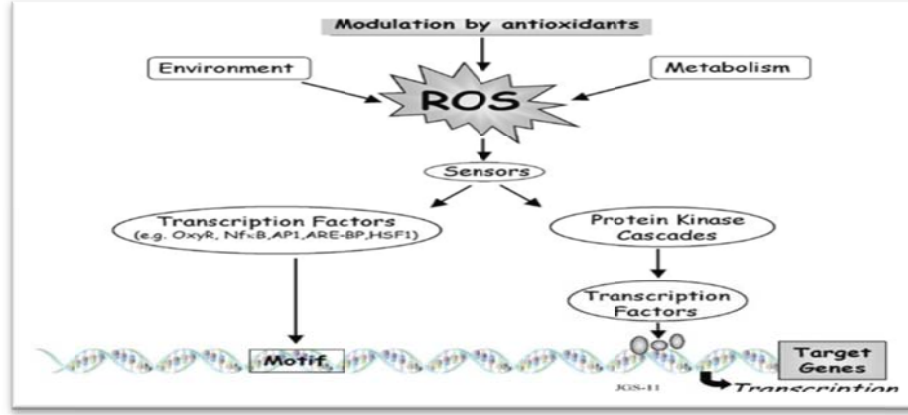


Şekil 2.2. NO'nin hücre içi sinyal iletim yolağı

Oksijenin mitokondriyal metabolizması sırasında reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan birçok ürün meydana gelir. Bunlar süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil (OH^-) gibi radikallerdir. ROS'ü ksantin oksidaz (XO), sitokrom P450 redüktaz ve glukoz oksidaz gibi mitokondriyal enzimlerin aktiviteleri sonucu elektron taşıma zincirinde açığa çıkarlar (Paramo ve ark. 2010). Antioksidan savunma sistemi; oksidatif strese karşı enzimatik olan ve enzimatik olmayan moleküllerden oluşur. Enzimatik olmayan moleküller; indirgenmiş glutatyon (GSH), askorbik asit, ürik asit ve tokoferollerdir. Enzimatik olanlardan süperoksit dismutaz (SOD), O_2^- anyonunu, katalaz (CAT) ise H_2O_2 'i hidrolize ederken, glutatyon bağımlı enzimler [(GSH peroksidaz (GSH-Px), GSH redüktaz, GSH-S-transferaz)] hem H_2O_2 'i hem de organik hidroperoksitleri detoksifiye ederler (Hermes-Lima 2004). Kafeik asit fenetil ester, glutatyon peroksidaz, katalaz ve süper oksit dismutaz gibi antioksidan enzim sistemlerini destekleyerek oksidatif strese karşı etkinlik gösterir (Parlakpınar ve ark. 2005).

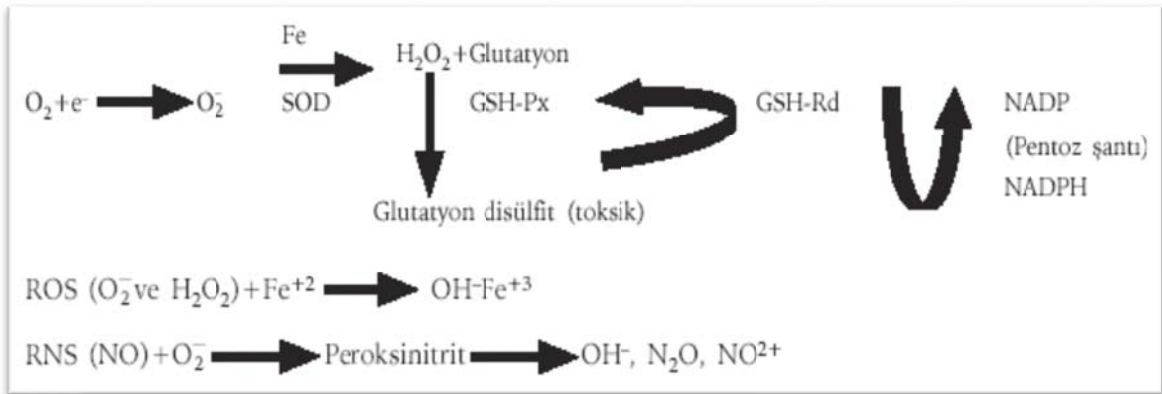
2.2. Sigara dumanı ve oksidatif stres

Oksidatif stres, oksidan-antioksidan dengenin oksidan sistemin lehine değiştiği durumlarda ortaya çıkar. KOAH gibi kronik ve yangısal hastalıklarda serbest radikal molekülleri lipidlere, proteinlere ve DNA'ya zarar verebilir (Henricks ve Nijkamp 2001). Başlıca serbest radikaller; mitokondriyal elektron transport zinciri, otooksidasyon reaksiyonları, NADPH bağımlı oksidazlar (ksantin oksidaz, sitokrom P450 redüktaz ve glukoz oksidaz gibi), redoks tepkimeleri ve araşidonik asit metabolizması sonucu meydana gelirler. Yangıda fagositik hücreler ROS üretimini oksijen moleküllerini indirgeyerek gerçekleştirir (Seshiah ve ark. 2002). Reaktif oksijen türleri, normal oksijen metabolizması sırasında meydana gelen O_2^- , H_2O_2 , OH^- ve $HOCl^-$ radikallerinden oluşur (Valko ve ark. 2004). Oksidatif stresin en önemli sonuçlarından biri de araşidonikasitin oksidasyonudur (Morrow 2000). Oluşan ürünler, bronşların daralmasına ve hücre içeriğinin ekstrasellüler ortama verilmesine neden olur (Janssen 2001) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Serbest radikallerin transkripsiyon üzerine etkileri

Akciğerler normal fonksiyonlarını sürdürebilmeleri için, solunum yoluyla alınan (sigara dumanı ve asbest tozları gibi) veya hücrelerde savunma mekanizması amaçlı oluşturulan serbest radikaller ile antioksidan sistem arasında bir denge olması şarttır. Oksidanların üstünlüğü durumunda, oksidatif stres meydana gelir. Kronik yangısal akciğer hastalıklarının patogenezinde oksidatif stres ve reaktif oksijen ile nitrojen türlerinin önemli rol oynadığı birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (MacNee 2001). Sigara dumanı ile akciğerlerde oluşan serbest radikaller barındırarak ilk olarak epitel hücrelere zarar vermeye başlar ve bu hücrelerin geçirgenliği artırır. Bu hücrelerde redoks tepkimelere neden olarak kısa bir süre içerisinde birçok serbest radikalın oluşumunu uyarır. Sigara içenlerin akciğerlerindeki oksidan yük makrofaj ve nötrofiller tarafından arttırılabilir. Sigara dumanı özellikle O_2^- ve H_2O_2 sentezinin artışına neden olur (Morrison ve ark. 1999) (Şekil 2.4).

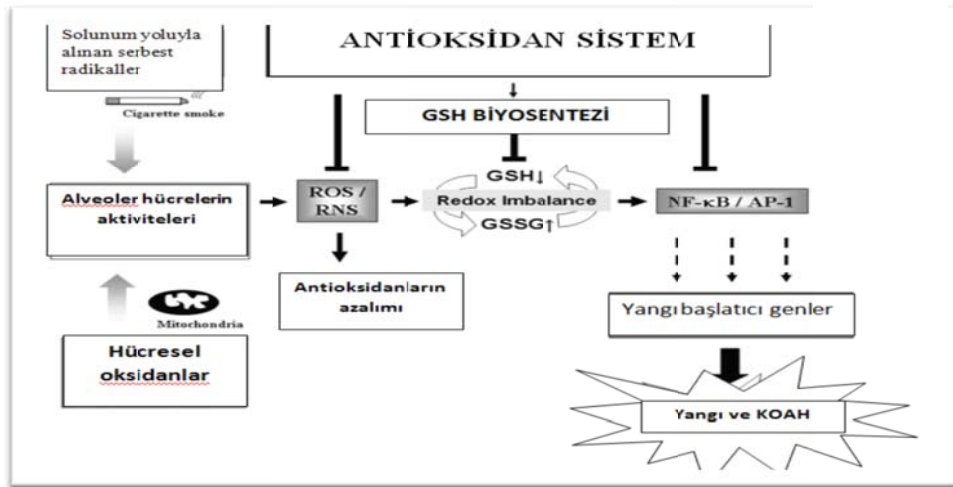


Şekil 2.4. Serbest radikaller ve enzimatik antioksidan savunma sistemi.

2.3. Antioksidan Savunma Sistemi ve Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı

Süperoksit dismutaz, katalaz, GSH-redüktaz ve GSH-peroksidaz enzimatik antioksidanlar, vitaminler (Vitamin E, C ve karotenoidler), tiyol antioksidanlar (glutasyon, tiyoredoksin, lipoik asit gibi), doğal flavonoidler, melatonin gibi moleküller non-enzimatik antioksidanları oluşturur (Mates ve ark. 1999). İyi bir antioksidan serbest radikalleri belirli bir şekilde ortadan kaldırır, redoks tepkime veren metalleri tutar, diğer antioksidanların aktivitelerini tetikler, gen ekspresyonunu pozitif etki eder, organizmada kolayca emilir, membran ve sulu ortamlarda da oldukça fonksiyoneldir (McCall ve Frei 1999).

Solunum yollarındaki en önemli antioksidanlar: katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyondur. KOAH'a karşı hücre içi antioksidan sistem çok yetersiz olup ROS'lar tarafından da yeterince uyarılmazlar. Bu nedenle hastalığın ilerlemesinde önemli role sahip serbest radikallere karşı savunmayı temel olarak hücre dışı antioksidanlar oluşturur (Comhair ve Erzurum 2002). Glutasyon ve glutasyon peroksidaz, solunum yollarında sigara dumanı gibi iritanların uyarımıyla oluşan ROS'lara karşı etkili en önemli antioksidan moleküllerdir. KOAH hastalarının epitel doku yüzeyi sıvılarında normal sigara kullanıcılarına oranla yoğun miktarda indirgenmiş glutasyon olduğu belirtilmiştir (Cantin ve ark. 1990). Ekstraselüler glutasyon peroksidaz (eGPx) özellikle epitel hücreleri ve akciğerde lokalize olmuş makrofajlardan üretilir (Avissar ve ark. 1996). Ekstraselüler glutasyon peroksidaz, özellikle H_2O_2 , O^{2-} ve reaktif nitrojen türleri gibi radikalleri bertaraf ederek etkinlik gösterir (Comhair ve Erzurum 2002) (şekil 2.5).



Şekil 2.5. Sigara dumanının oluşturduğu oksidatif stres üzerine glutasyonun etkisi.

Serbest radikallerin solunum yolları üzerine olumsuz etkileri arasında yangı gelişmesi de vardır. Yangı seviyesini ise ya doğrudan hücrelere zarar vererek veya dolaylı yönden transkripsiyon faktörlerini aktive ederek artırır. ROS'ların yangının başlamasında ve gelişmesinde kilit rol oynayan NF-kB'yi aktive ettikleri çoğu çalışmada gösterilmiştir (Barnes ve Karin 1997). NF-kB'yi hangi oksidatif stres etkeninin aktive ettiğinin moleküler mekanizması henüz çözümlenememiştir (Janssen-Heininger ve ark. 2000). Çoğu çalışma ROS'ların özellikle H₂O₂'nin epitelyum hücrelerde NF-kB'yi aktive ettiği gösterilmiştir (Adcock ve ark. 1994). Ve bunun sonucunda epitelyum hücrelerden yangı öncüllerinin sentezlendiği rapor edilmiştir (Rusznak ve ark. 1996). Oksidatif stres sonucunda histon asetiltrensferazlar salgılanır histon proteinleri açılıp gen yazılımı başlar (Tomita ve ark. 2003) ROS'lar ayrıca mitogen-activated protein (MAP) kinaz yolagında aktive ederler. H₂O₂ potansiyel bir kinaz ve P38 MAP kinaz yolu regülatörüdür ve bu regülasyon çoğu yangı genini aktive eder ve makrofajların dağılımını kontrol eder (Ogura ve Kitamura 1998).

2.4.KOAH'ın Patolojisi

Gelişmekte olan ülkelerde KOAH etiyojisinin en büyük sebebi sigara kullanımudur. Ayrıca hava kirliliği, yetersiz beslenme ve egzersiz gibi koşullar da KOAH oluşumunda önemli role sahip etmenlerdir. KOAH akciğer fonksiyon kaybı ile karakterize olup ilerleyici bir prognoza sahiptir. KOAH ile astım'ın ikisi de solunum yollarında yangı oluşmasıyla ortaya çıkar. Ancak bu iki hastalığın farkı yangıya katılan hücrelerin cinsi ve dolayısıyla yangıya karşı verilen cevaptan kaynaklanır (Barnes 2000).

Kronik obstrüktif akciğer hastalığında çok sayıda hücre ve yangı medyatörü, hastalığın patolojisinde rol oynar. Alveoller ve bronşiyoller incelendiğinde makrofajların, T-lenfositlerin, CD8+ ve nötrofillerin sayılarının artmış olduğu görülür (Retamales ve ark. 2001).

2.4.1 Epitel Hücreler

Kronik obstrüktif akciğer hastalığında, solunum yolları ve alveolar epitel hücreleri beklide en önemli sitokin ve proteaz kaynağıdır. Epitel hücreler sigara dumanıyla uyarıldığında TNF- α , IL-1 β ve IL-8'in içinde bulunduğu yangı araçlarını üretirler (Mio ve ark. 1997; Floreani ve ark. 2003). Solunum yollarındaki epitel hücreler vücut savunmasında da önemli rol oynarlar. Goblet hücrelerinden salgılanan mukus inhalasyon yoluyla alınan

zararlı gaz ve partikülleri tutar (Adler ve Li 2001). Ayrıca epitel hücreleri antimikrobiyal ve doku onarıcı etkisi olan defensin gibi katyonik peptidleri salgırlar (Aarbiou ve ark. 2002). Bir diğer özellikleri de immünoglobulin A taşıyıcılığı yaparak immün sistemi uyarmaktır (Pilette ve ark. 2001). Epitel hücreleri yangı esnasında savunma hücreleri (makrofaj, nötrofil, B ve T Lenfosit) ile birlikte lenfoid folüküllerin yapısında yer alır (Kelsen ve ark. 2009).

2.4.2 Nötrofiller

Nötrofillerin KOAH'taki rolü tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda KOAH hastalarının tükürük ve balgam örneklerinde nötrofil miktarının önemli derecede artış yaptığı gösterilmiştir (Lacoste ve ark. 1993; Keatings ve ark. 1996). Nötrofiller serine proteazları, nötrofil elestazları (NE), kathepsin G, proteinaz 3 ve matriks metaloproteazları (MMP-8 ve 9) salgılayarak alveolar yıkıma sebep olurlar. Ayrıca serin proteazları mukus salgılatıcı olarak da görev yaprlar (Di Stefano ve ark. 1994).

2.4.3 Makrofajlar

KOAH'ta makrofajlar alveolar duvara yerleşir ve yıkımlarına sebep olarak anfizem oluşumuna neden olurlar (Meshi 2002). Makrofaj sayısı ile hastalığın seyirindeki ilerleme arasında doğru bir ilişki vardır (Di Stefano ve ark. 1998). Makrofajlarda sigara dumanının uyarımıyla TNF-alfa, IL-8, LTB4 ve ROS sentezi ve salınımı artar. Bunların yanında MMP-2, MMP-9, MMP-12 ve kathepsin gibi elastik dokuları parçalayan enzimleri de salgırlar (Russell ve ark. 2002). Makrofajlarda, çoğu yangısal protein NF-kB yoluyla üzerinden sentezlenir ve KOAH'ta yangı süresince aktiftir (Caramori ve ark. 2003).

2.4.4 T-lenfositler ve CD8+ hücreler

T-hücrelerinin KOAH'taki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. CD8+ hücreleri TNF- α , granzim B ve perforinler salgılayarak epitel hücrelerde sitolize ve apoptoza neden olurlar (Hashimoto ve ark. 2000). KOAH'ta T-lenfositlerin sayısı (özellikle CD8+ hücreleri) akciğer parankimasında ve solunum yollarında hastalık süresince artış gösterir (Lofdahl ve ark. 2008). T-lenfositlerin sayısı ile solunum yollarının daralması doğru orantılı olarak değişir. KOAH'lı hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda sigara kullananlarda CD8⁺,

kullanmayanlarda ise CD4+ yüzey reseptörlerine sahip T lenfositlerinde daha fazla artış olduğu tespit edilmiştir (Tsuda ve ark. 2009).

T lenfositleri (CD8+) interferon gama (IFN-gama), interferon uyarıcı protein 10, granzim ve perforin gibi sitotoksik araçlar ve FAS-ligand sentezi yaparlar (Gadgil ve Duncan 2008; Grumelli ve ark. 2004). Granzim B ve perforinler apoptozu uyarabilirler veya anfizem oluşumuna sebebiyet verebilirler (Lofdahl ve ark. 2008).

2.4.5 Yangı araçları

Kronik obstrüktif akciğer hastalığında sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, reaktif oksijen ve nitrojen türleri gibi yangının başlaması, gelişmesi ve devamında görevli çok sayıda aracı molekül vardır (Mortaz ve ark. 2008).

2.4.5.1. Kemokinler

Kemokinlerin önemlileri; interlökinler (özellikle IL-8) ve lökotrienler (özellikle LTB₄)'dir (Sarir ve ark. 2008). KOAH'ta IL-8 yangının başlamasında ve gelişmesinde önemli rol oynar. Solunum yollarında başlıca epitel hücrelerden, makrofajlardan ve nötrofillerden sentezlenip salınırlar (Gadgil ve Duncan 2008). IL-8 makrofaj ve nötrofil için kemotaktik etkilidir (Gadgil ve Duncan 2008). KOAH'ta yangının şiddetlenmesi ve anfizem oluşumunda önemli bir role sahiptir (Simpson ve ark. 2009). Makrofajlardan salınan lökotrien B₄, diğer bir nötrofil kemotaktik moleküldür. KOAH hastalarındaki düzeyi nötrofil miktarıyla doğru orantılı olarak artar (Profita ve ark. 2005).

2.4.5.2. Sitokinler

Sitokinler yangının başlaması ve devamından sorumlu polipeptidlerdir. Sitokin sekresyonu, bakteriyel ürünler, immün kompleksler, toksinler ve fiziksel etmenler tarafından uyarılabilir (Drenth ve ark. 1995).

Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) yangı öncülü bir sitokin olup, genel olarak makrofajlardan, T ve B lenfositlerden salgılanır. TNF- α , mitojen tarafından aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) ve NF-kB gibi hücre içi sinyal yollarını uyararak, nötrofil degranülasyonuna ve bunun yanında makrofajlardan ise MMP üretimine neden olur (Renda

ve ark. 2008). KOAH'lı hastaların balgam ve tükürük örneklerinde TNF- α düzeyleri önemli miktarda artar (Makris ve ark 2009) (Şekil 2.6).

İnterferon gama (İFN- γ) yangının devamından sorumlu bir sitokin olup, başlıca lenfosit ve doğal öldürücü hücrelerden salınırlar. Makrofajları uyarmada özellikle virüsler olmak üzere patojenlerin öldürülmesinde önemli bir görev üstlenirler. KOAH'lı hastaların tükürüklerinde, alveollerinde ve anfizem oluşmuş akciğer dokularında düzeyi önemli derecede arttığı birçok araştırmada ortaya konulmuştur (Tzanakis ve ark. 2004).

İnterlökin-1 (IL-1) ise başlıca antijen sunan hücreler [monosit ve makrofajlar, langerhans hücreleri, dendritik hücreler, endotelial hücreler, T lenfositleri, doğal öldürücü hücreler (NK), astrositler ve keratinositler] olmak üzere tüm çekirdekli hücrelerden sentezlenebilir (Gardner ve ark. 2003). İnterlökin-1 (IL-1 α ve IL-1 β) aynı zamanda siklooksijenaz-2 (COX-2), fosfolipaz A2 ve iNOS'un aktivatörüdür. Kafeik asit fenetil ester, IL-1 ve IL-18 gibi yangı başlatıcı sitokinlerin uyardığı NF-kB hücre içi sinyal iletim yolağını bloke ederek yangının devamlılığını önler (Kyungsun ve Chulhee 2008). İnterlökin-1'e maruz kalan hücreler yüksek miktarda protaglandin 2 (PGE-2) ve NO üretimi yapar (Witowski ve ark. 2004) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. CAPE'in proinflamatuvar sitokin uyarımlı NF-kB blokajı.

IL-18, IL-1 ailesinin bir üyesi olup Th1 hücrelerinin olgunlaşmasında düzenleyici bir göreve sahiptir (Hoshino ve ark. 2007). Yapılan çalışmalarda KOAH oluşumunun önemli belirteçlerinden olan anfizemde IL-18 gen ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu ortaya konulmuştur (Imaoka ve ark. 2008).

2.4.6. Metalloproteinazlar (MMPs)

Metalloproteinazlar KOAH'ta akciğer dokusunu harabiyete uğratan proteolitik enzimlerdir (Shapiro ve Senior 1999). KOAH'lı hastalar da özellikle MMP-1 (kollajenaz) ve

MMP-9 (jelatinaz-B) enzimleri anlamlı bir şekilde artış gösterir (Finlay ve ark. 1997). Genellikle KOAH'lı hastalarda akciğer parankimasında MMP-9, tip-II pönomositlerde ise MMP-1 artışı meydana gelir (Imai ve ark. 2001). KOAH'lı sigara içenlerin makrofajları sigara içen sağlıklı insanlara oranla daha fazla MMP-9 sentezi yaptığı belirtilmiştir (Lim ve ark. 2000). Ayrıca elastolitik etki gösteren hücrelerin sayısında da bir artış söz konusudur (Russell ve ark. 2002).

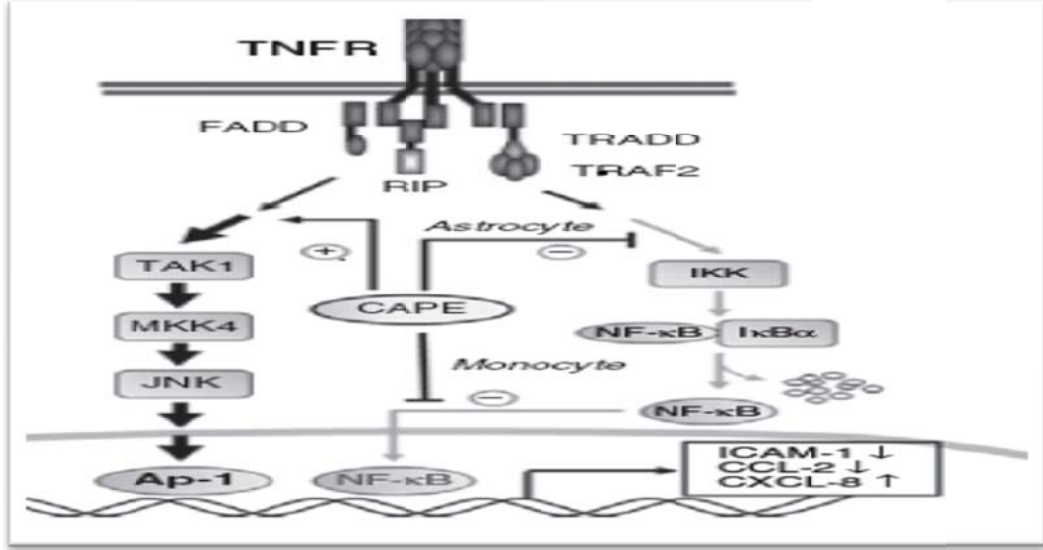
2.7. Apoptoz

Apoptoz programlı hücre ölümüdür. İstenmeyen, hasarlı ve hastalıklı hücrelerin ortadan kaldırılmasını düzenleyen bir savunma mekanizmasıdır. Organizmalar üç farklı apoptoz yolağı geliştirmişlerdir (Degterev ve ark. 2003).

İlk yolak, TNF- α dışarıdan gelen uyarılar ile hücre zarında bulunan ölüm reseptörlerine (TNF-DR) bağlanmasıyla aktive olur (Şekil 2.7). Sonra içinde Fas ilişkili ölüm vericisinin (FADD) de bulunduğu ölüm içerikli sinyal kompleksler (DISC) aktive olarak pro-kaspaz 8'i aktive eder, pro-kaspaz 8 de kaspaz-3 aktive eder (Muzio M ve ark. 1998). Kaspaz 3'te kaspaz-uyarıcı DNaz'ları salgılatarak DNA'da kırıklara neden olur. Bu yolağa çevre uyarımlı reseptör yolağı denir (Tang ve Kidd 1998).

İkinci yolak içsel uyarımlı mitokondri yolağıdır. Fiziksel ve kimyasal strese cevap olarak mitokondrilerden sitokrom c salınımı artar, Sitokrom c apoptotik proteaz aktive edici faktörü (APAF-1) bu da kaspaz 9'u aktive eder (Li ve ark. 1997). Kaspaz 9 ise kaspaz 3'ü aktive ederek apoptozu gerçekleştirir (Slee ve ark. 1999).

Üçüncü yolak ise endoplazmik retikulum yolağıdır. Kaspaz 12'nin hipoksi gibi stres faktörlerince uyarılması sonucu oluşur (Rao ve ark. 2001). Bu yolakta kaspazlar birbirini aktive etmez, kaspaz 3 granzim B tarafından uyarılır ve apoptoz gerçekleşir (Darmon ve ark. 1995).



Şekil 2.6. TNF- α hücre içi sinyal iletimi yolağı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Hattı

Araştırmada insan alveoler bazal epitel hücre hattı (A549) kullanıldı. Akciğer alveollerini kaplayan Skuamoz tip görünüşe sahip bu hücreler, su ve elektrolitler gibi maddelerin difüzyonundan sorumlu olmakla birlikte sürfektan madde salınımıyla akciğer alveollerini dışsal etkenlerden korumaktadır. Akciğer epitel hücreleri Dr. Mazella C. tarafından Paris Fransa'dan temin edildi.

3.2. Hücre Pasajı

İnsan akciğer alveol hücreleri DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium-Sigma) besi medyumunda (%10 oranında ısı ile inaktif edilmiş fetal sığır serumu (FBS-Sigma) ve 100 IU/ml penisilin/streptomisin (Sigma) içeren 37°C, %5 CO₂ ve %95 hava bulunduran siteril inkübatörde (Hera-Cell 150, Thermo) inkübe edildi. Hücrelerin çoğaltılması için yaklaşık 1x10⁶/ml sayıda hücre 10 ml medyum bulunan 75 cm² siteril kültür kabına (flask) (Nunc, USA) konarak iki günde bir medyum değiştirilmek şartıyla inkübasyona bırakıldı. 3-4 gün süreyle hücre üremesi yeterli yoğunluğa ulaştığında 1/3 oranında pasajlandı. Çalışma grupları oluşturulurken flask tabanına yapışan hücreler 1-2 ml/75 cm² flask % 0,025 Tripsin/EDTA (Sigma) kullanılarak kaldırıldı. Sonra hücreler toplanarak oda ısısında 400 g ve 5 d süreyle santrifüj edildi. İşlem sonunda medyum atılarak dipte kalan hücre peleti 1ml taze komple medyumla kaldırıldı. Hücreler nazikçe al-ver yöntemiyle homojen olmaları sağlandı. Mikroskop (Olympos-CKX41) altında hücre sayımı tripan mavisi ile bir hemositometre (Neubauer Assistent) yardımıyla belirlenerek deneme grupları için ihtiyaç duyulan hücre sayısı flaslara eklendi.

3.3. Araştırmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.3.1. Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)

Araştırmada kullanılan kafeik asit fenetil ester (CAPE), (Sigma - Germany) etil alkol ile çözdürüldü. Çalışma süresince kullanılan CAPE konsantrasyonu elde edilen canlılık (viabilite) kontrollerine göre 2,5 um/ml olarak belirlendi. Her uygulamada CAPE eklenmesi,

sigara dumanı içeren kültür mediumu eklenmesinden 1 saat önce yapılarak, inkübasyon periyodu bu süreden sonra başlatıldı.

3.3.2. Medyumun sigara dumanı ile doyurulması

Laboratuar koşullarında KOAH modeli oluşturmak ve tütün bileşiklerine akciğer hücrelerinin maruz bırakılması amaçlı basit düzenek hazırlandı. İçerisinde DMEM bulunan kabın kapağına açılan çift boru sisteminin bir ucuna sigara yerleştirilip diğer ucuna ise vakum yapabilen bir aparat bağlandı. Kap içerisinde bulunacak sıgır serum albümin içermeyen medyum (20 ml sıvı için 1 adet 10 mm sigara) ticari sigara (Marlboro, Philips Morris, Inc., Richmond, VA; her sigara 12mg zifir ve 0.9 mg nikotin içerir) dumanı ve içeriği ile doyuruldu. Daha sonra, pH sı 7.4 ayarlanıp 0.22 µm gözenek açıklığına sahip filtreden (Millipore) geçirilip hücelere uygulandı. Bu işlemler uygulanmış medyum her çalışmada taze olarak hazırlanıp, 30 d içinde kullanıldı.

3.4. Homojenat hazırlama

Hücreleri yapışmış oldukları hücre kültürü zemininden kaldırmak için flasklara 300 µl tripsin (% 0,025) eklenerek 1-2 d beklendi. Hafif çırpma hareketiyle flask tabanından hücrelerin kalkmaları sağlandı. Suspanse hücreler pipet ile toplanarak ependorf tüplere aktarıldı. Sonrasında oda ısısında 400 g devir 5 d süreyle santrifüj edilerek, hücre pelletleri elde edildi. Homojenatlar hazırlanırken PBS (KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4^-$ pH:7) ile 2 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 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve % 0,5 oranında proteaz inhibitor kokteyli [aprotinin, fenilmetansülfonilflorid (PMSF), leupeptin, sodyum florid] bulunan lizis bafır eklendi. Deterjanla çözünmeyen hücresel proteinler 12 000 g, 4 °C'de 10 d süreyle santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Süpernatantların protein miktarları Bradford metodu ile ölçüldü.

3.5. Tripan mavisi boyasıyla canlı-ölü hücre değerlendirilmesi ve 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 karışımları sağlandı. Hemositometre laminın (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 5×10^3 olarak ifade edildi. Görüntüler özel ataçmanlı bir aparata sahip dijital fotoğraf makinesi (Olympus C-7070) ile fotoğraflandı.

3.6. Biyokimyasal Analizler

3.6.1. Bradford Yöntemi ile Protein Analizi

Bu yöntemin prensibi, boya olarak kullanılan Coomassie 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. Yöntem: test gruplarındaki hücrelerin flasklardan bir kazııcı aparat yardımıyla toplanması ve homojenize edilmesini takiben örneklerden 20 μl alınarak üzerine 200 μl Bradford ayırıcı ve 580 μl distile su ilave edilerek test tüpleri hazırlandı. Tüpler oda ısısında 10 d bekletildikten sonra, spektrofotometre (Shimadzu)'nin 595 nm ışık dalga boyunda absorbans değeri ölçüldü. Sığır serum albumininin farklı standart konsantrasyonları hazırlanarak elde edilen standart eğriden örneklerin protein düzeyleri hesaplandı (Bradford, 1976).

3.6.2. Nitrik oksit (NO) Düzeylerinin Belirlenmesi

Akciğer epitel hücrelerinin bulunduğu flasklardan 3 saat inkubasyon sonucu elde edilen medyumlardaki NO seviyeleri ölçüldü. Nitrik oksit yarı ömrü çok kısa olan bir moleküldür. Bu nedenle NO üretimi, nitrik oksitin öncül molekülleri olan nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) düzeylerinin saptanmasıyla hesaplanmaktadır. Bu amaçla çalışma da, Costas ve Wakid (1990) tarafından geliştirilen Griess metodu uygulama için kullanıldı. Bu metod'a 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

CuSO₄ solüsyonunda 5 d karıştırılarak aktifleştirildi. Her test grubundan 300 µl miktar alınarak, üzerlerine 250 µl 75 mmol/L ZnSO₄ ve 350 µl 55mmol/L NaOH eklendi. Bu karışım 10000 x g rotor hızında 4°C'de 3 d santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlardan 750 µl pipetlenerek farklı ependorf tüplere alındı ve üzerlerine 250 µl glisin tampon I (45 gr/L pH: 9,7) ilave edildi. Bu tüplere yukarıda belirtildiği gibi aktifleştirilen kadmiyum granüllerinden her tüpe bir granül olacak şekilde eklendi. 10 d karıştırıldıktan sonra hazır hale gelen örneklerden 300 µl alınıp üzerlerine 1125 µl ayıraç 1 (N-naftil etilen diamin) ve 1200 µl ayıraç 2 (sülfanilik asit, 3 mmol/L HCL) eklendi. Örnekler, köre karşı spektrofotometrenin 546 nm ışık dalga boyunda absorbans ölçümleri yapıldı. Elde edilen veriler µmol/ml protein cinsinden hesaplanıp kaydedildi.

3.6.3. Glutasyon (GSH) Analizi

İndirgenmiş glutasyon (GSH) düzeylerinin ölçümü, Sedlak ve Lindsay (1968) tarafından geliştirilen metodu ile yapıldı. Bu yöntemin prensibi, reaksiyona ilave edilen 5,5-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (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'luk triklor asetik asit (TCA, Sigma) ile karıştırılarak 8600 rpm rotor hızında 15 d santrifüj edildi. Deproteinize edilen örneklerden 250 µl alınıp temiz tüplere aktarılıp üzerlerine 2 ml 0,3 M'lık Na₂HPO₄ ilave edildi. Karışımların üzerine bis(2-Nitrobenzoic Acid) eklenip vorteksle karışımları sağlandıktan sonra 5 d oda ısısında bekletildi ve daha sonra spektrofotometrenin 410 nm ışık dalga boyunda distile suya karşı okunarak umol/mg protein olarak haesaplandı ve kaydedildi.

3.6.4. Katalaz Aktivitesi Analizi

Farklı test gruplarından 3 saat inkübasyon sonucu elde edilen hücre homojenatlarında katalaz aktivite tayini Luck (1965) tarafından geliştirilen metod kullanılarak yapıldı. Bu yöntemin prensibi H₂O₂'nin ışık spektrumunun ultraviyole dalga boyunun azalmasıyla artan bir absorbans vermesine dayanır. Uygun bir tampon içinde (PBS) bulunan H₂O₂'nin örnekte bulunan katalaz etkisiyle yıkılması sonucu 240 nm absorbansta azalma görülür. Absorbansta gözlenen azalma hızı katalaz aktivitesi ile doğru orantılı olarak kabul edilir.

Fosfat tamponu (1/15 mmol/L; pH=7) için 3,522g KH_2PO_4 ve 14,61g Na_2HPO_4 distile suda çözüldü ve 1 L'ye tamamlanarak pH 7'ye ayarlandı. Fosfat tamponunda H_2O_2 çözeltisi (10 mM), % 30'luk H_2O_2 çözeltisinden 0,16 ml alınarak daha önce hazırlanmış olan fosfat tamponunun 100 ml'sinde seyreltilti. Her örneğin analizinden önce örnekte bulunabilecek maddelerin neden olabileceği absorbans yükselmesi 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_2O_2 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 µmol/mg protein cinsinden hesaplanarak kaydedildi.

3.6.5. Tiazol Mavisi Tetrazolyum Bromid (MTT) Viabilite Testi

Tiazol Mavisi Tetrazolyum Bromid kullanılarak bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle nicel olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem canlı hücrelerde, mitokondrial redüktazlar tarafından MTT'nin tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon mitokondrial bir enzim olan süksinat dehidrogenaz aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir (McGahon ve ark. 1995). Bu amaçla 24 kuyucuklu kültür kaplarında deneme grupları oluşturuldu. 3 saatlik inkübasyon sonucu kuyucuklardan süpernatantlar alınarak yerlerine PBS'te çözdürülmüş MTT ayırıcı eklendi. %5 CO_2 ve 37 °C'lik inkübatörde 90 d, bekletildi. Daha sonra her bir kuyucuğa 1 ml izopropil alkol/HCL ayırıcından eklenerek 5 d beklendi. Oluşan formazan ürünlerinin çözdürülmesi sağlandı. Kuyucuklardaki süpernatant ependorflara alınarak inkübatörde her bir deneme grubu kuyucuklarındaki süpernatantlar alınarak ependorflara alındı. Örnekler spektrofotometrenin 595 nm ışık dalga boyunda okunarak kaydedildi.

3.6.6. Malondialdehit (MDA) Analizi

Aerobik şartlarda pH 3.4'te tiobarbutürİKasit TBA ile serumun 95°C'de inkübasyonu sonucu, eğer lipid peroperoksidasyonu varsa sekonder bir ürün olarak oluşan MDA, TBA ile pempe renkli bir kompleks yapar. Bu kompleks spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçülür (Ohkawa ve ark. 1979). Elde edilen hücre homejenatından 10ml'lik cam tüplere 0,5ml ilave edildi. Üzerine 2,5ml TCAA ve 1ml TBA eklendi (kör tüpe hücre homejenatı yerine 0,5ml TCAA eklendi). Su banyosunda 30 d inkübe edildikten sonra hızlı bir şekilde buz ile soğutuldu ve üzerlerine 4'er ml n-bütenol eklendi. Daha sonra tüpler 3000 rpm'de 10d santrifüj edilir. n-bütenol tabakası spektrofotometre küvetlerine pipetlenerek 535 nm'de okuma yapılır.

3.7. RNA İzolasyonu

İnkübasyonlar sonucu test gruplarının bulunduğu 75 cm²'lik flasklardaki medyumlar atıldı. ve hücreler steril bir kazıyıcı yardımıyla kaldırılarak endorff tüplere alındı. Üzerlerine 1 ml RNA izolasyon reaktifi (Trizol Reagent, Sigma) eklendi ve vorteksle karıştırıldı. Tüpler oda ısısında 5 d bekletildikten sonra 12000 g, 4° C'de 10 d santrifüj edildi. Süpernatantlar otoklav edilmiş 1,5ml'lik endorfflara aktararak oda ısısında 5 d bekletildi. Sonra tüplere 0,2 ml kloroform ilave edilip, 15 saniye süreyle 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 endorff tüplere alınıp, üzerlerine 0,5 ml izoprapanol (Merck) ilave edildi. Tüpler oda ısısında 5-10 d süreyle tutulduktan sonra 12000 g 10 d süreyle santrifüj edilerek RNA peletlerinin oluşması sağlandı. Peletler üzerindeki süpernatantlar alınıp RNA % 75'lik etil alkol (Merck) ile yıkanması sağlandı. RNA vorteks edilip, 7500 g'de 5 d süreyle tekrar santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlar atıldıktan sonra RNA'lar 10-15 d süreyle hava akımında kurutulması sağlandı. Her tüpteki RNA peletleri üzerine 25-30 µl su (DEPC water-dietilpirokarbonatlı su) ilave edilip, birkaç kez al-ver muamelesiyle pipetlenerek çözünmeleri sağlandı.

Total RNA miktarları ve saflıkları spektrofotometrede 260 nm (OD₂₆₀) ve 280 nm (OD₂₈₀) ışık dalga boylarında değerler alınarak belirlendi. RNA/DNA oranları (OD₂₆₀/ OD₂₈₀)

1,7-2,0 aralığındaki olan örneklerin saflığı yüksek kabul edilip, cDNA (komplementer-tamamlayıcı DNA) sentezinde kullanıldı.

3.8. cDNA Sentezi ve Reverz Transkripsiyon (RT-PCR)

Elde edilen total RNA'lardan komplementer DNA (cDNA) sentezi eldesinde şu metod takip edildi. Otoklavdan geçirilmiş 0,2 ml ependorf tüplere herbir örnek tüpünden 1-2 µg total RNA alınıp üzerlerine 1 µl oligo (dT-18) primer eklendi. Daha sonra bu tüpler DEPC uygulanmış su ile 12 µl'ye tamamlandı. Karışım 3-5 saniye 13000 g'de santriüj edilip termal saykılarda (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 revertAid m-multi-v reverz transkriptaz, 1 µl ribolock ribonücleaz inhibitör (20 U/µl) ile 2 µl dNTP (2 mM) karışımı konulup karıştırıldı (Fermentas, Germany). Kısa süreli santrifüj sonrası test tüpleri termal saykılara yerleştirilerek 42° C'de 60 d süre ile RN'lar cDNA'lara dönüştürüldü. cDNA sentezinin tamamlanması için tüpler 70°C'de 10 d inkübe edildikten sonra PCR kullanımına hazır hale getirildi ve kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi, genetik materyaller (DNA ve RNA) üzerinde seçilmiş bir bölgenin *in vitro* şartlar altında ilgili gen bölgelerine spesifik oligonükleotid primerler ve *Taq* polimeraz enzim kullanılarak bir otomatik termal saykılarda çoğaltılması metodudur. PCR reaksiyonunda temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır. Birincisi denatürasyon (DNA çift zincirinin açılması), ikincisi primerlerin spesifik oldukları gen bölgesine yapışması (annealing) ve üçüncüsü ise zincir uzaması (extention)'dır. Spesifik olmayan yapışmaların olmaması için döngü sayısı genellikle 30-40 olacak şekilde sınırlandırılır. Kısaca PCR reaksiyonu için test tüpler şu şekilde hazırlandı. Örneklerden elde edilen cDNA'lardan 1 µl alınarak, üzerlerine 0.5 U DNA *Taq* polimeraz içeren Syber Green PCR mastermiks (Fermentas) ve mRNA üzerinde çoğaltılmak istenen genlere spesifik bir çift primer (oligonükleotid) ilave edildi.

Reaksiyonda 100 ng düzeyinde TNF- α , IFN- γ , COX-2, IL-1 β , CAS-3 ve iNOS spesifik primerleri literatürde belirtilen baz dizgeleri sentezi yaptırılarak kullanıldı (Tablo 1). DNA amplifikasyonu PCR yöntemi ile 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; $DDCt = (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{beta actin}})_{\text{denek grubu}} - (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{beta actin}})_{\text{kontrol grubu}}$ 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 beta aktin geni (housekeeping gen) düzeltme için kullanılarak transkripsiyon seviyesi istenilen genlerdeki transkripsiyon seviyeleri hesaplanarak kaydedildi. Real Time PCR sisteminde Syber Green (Fermentas, Germany) boyası çift iplikçikli DNA parçasına bağlanarak elektriksel impuls ile birlikte floresan ışımaya yapar ve bu ışımaya sistemin lazer dedektörü tarafından alınarak bilgisayar ortamında grafik formatına çevrilir. Ölçülen floresans şiddeti PCR ürününün miktarı ile doğru orantılıdır. Daha sonra gruplar arasındaki farklar misli (katı) cinsinden tablolarda verildi.

3.10. İstatistiksel Metod

Araştırmada elde edilen veriler, SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Sciences) programında, One-way ANOVA varyans analizi yöntemi kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar Duncan testi ile belirlendi. $p < 0.05$ ve altı istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Değerler ortalama \pm standart hata (S.E) şeklinde verildi.

Çizelge 3. 1. RT-PCR analizlerinde kullanılan primer baz dizgeleri ve PCR koşulları

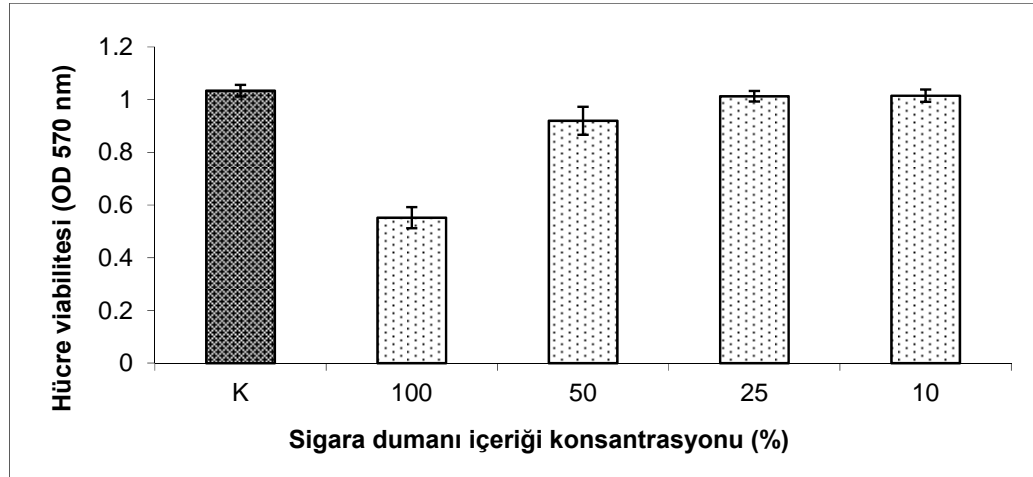
Transkript	Primer sekansları		PCR programları
TNF-α	Geri primer İleri primer	5' CCT TGG TCT GGT AGG AGA CG 3' 5' CAG AGG GAA CAG TTC CCC AG 3'	Başlangıç 95 ⁰ C 10d 95 ⁰ C 45sn-60 ⁰ C 1d 72 ⁰ C 45sn (35 siklus)
IFN-γ	Geri primer İleri primer	5' GGG TTG GGG GTG TGG TGA TGT 3' 5' TCC GAG GCA AAC AGC ACA TTC A 3'	Başlangıç 95 ⁰ C 10d 95 ⁰ C 15sn-58 ⁰ C 1d 72 ⁰ C 30sn (35 siklus)
iNOS	Geri primer İleri primer	5'TCC ATG CAG ACA ACC TT 3' 5' GGC CTC GCT CTG GAA AGA 3'	Başlangıç 95 ⁰ C 10d 95 ⁰ C 45sn-56 ⁰ C 1d 72 ⁰ C 45sn (35 siklus)
Kaspaz-3	Geri primer İleri primer	5' CAC AAA AGA ACT GGA TGA AC 3' 5'ACA TGG CGT GTC ATA AAA TAC 3'	Başlangıç 95 ⁰ C 10d 95 ⁰ C 45sn-60 ⁰ C 1d 72 ⁰ C 45sn (40 siklus)
IL- 1β	Geri primer İleri primer	5'GGT CAT TCT CCT GGA AGG TCT GTG GGC 3' 5' GCA AGC GCT TCA GGC AGG CGG CG 3'	Başlangıç 95 ⁰ C 10d 95 ⁰ C 45sn-55 ⁰ C 1d 72 ⁰ C 45sn (35 siklus)
COX-2	Geri primer İleri primer	5' TCA TCA GGC ACA GGA GGA AG 3' 5' TGA AAC CCA CTC CAA ACA CAC AG 3'	Başlangıç 95 ⁰ C 10d 95 ⁰ C 45sn-54 ⁰ C 1d 72 ⁰ C 45sn (35 siklus)
β-actin	Geri primer İleri primer	5' CGT GGC CAT CTC TTG CTC GAA G 3' 5' CAT CGT CAC CAA CTG GGA CGA C 3'	Başlangıç 95 ⁰ C 10d 95 ⁰ C 45sn-55 ⁰ C 1d 72 ⁰ C 45sn (35 siklus)

4. BULGULAR

4.1. Spektrofotometrik analiz ve hücre sayımı sonuçları

4.1.1. Farklı konsantrasyonlardaki CSE'nin hücre viabilitesi üzerine etkisi

Bir gece önceden 24 kuyucuklu kültür kaplarına eklenen akciğer epitel hücrelerine (A549) sigara dumanı içeriğinin farklı konsantrasyonları (%10-100) uygulandı ve 3 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda MTT metoduyla viabilite kontrolleri yapıldı. Buna göre %100 (20 ml mediyuma 1 adet 10mm sigaranın içirilmesiyle elde edilen sigara dumanı içeriği %100 olarak kabul edildi) eklenen grupta, canlı hücre sayısı kontrol grubuna göre anlamlı bir düzeyde azaldığı tespit edildi (Şekil 4.1).

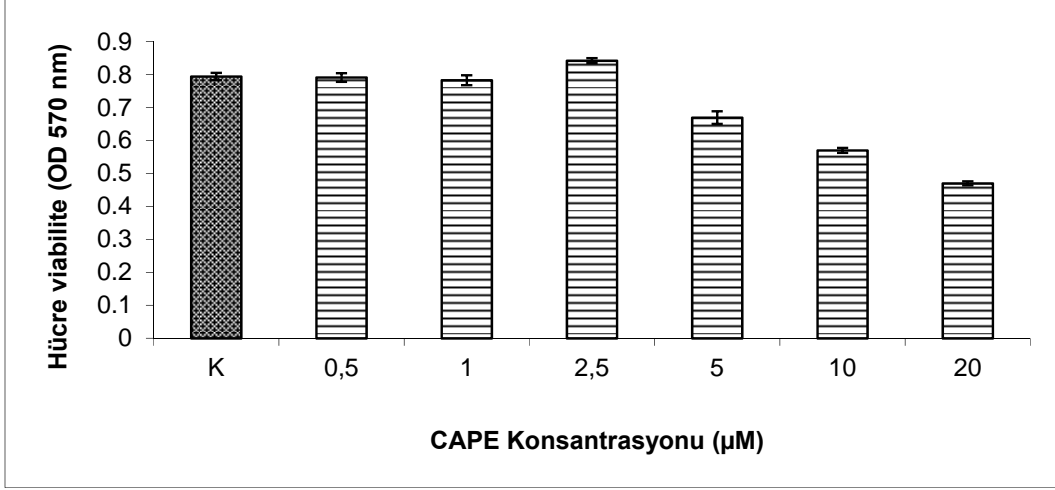


Şekil 4.1. CSE'nin farklı konsantrasyonlarının hücre viabilitesi üzerine etkisi

İnkübasyon sonrası %100 CSE 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 ($p < 0,001$). CSE'nin % 100 konsantrasyonu Araştırma süresince hücrelerde stres oluşturmak amacıyla kullanıldı. K: Kontrol

4.1.2. Farklı konsantrasyonlardaki CAPE'in hücre viabilitesi üzerine etkisi

Yirmi dört kuyucuklu hücre kültür kaplarında çalışma grupları oluşturulan hücrelere farklı konsantrasyonlarda (0,5-20 µm) CAPE eklenip, çalışmada kullanılacak etkili konsantrasyon tespiti MTT metoduyla değerlendirildi.

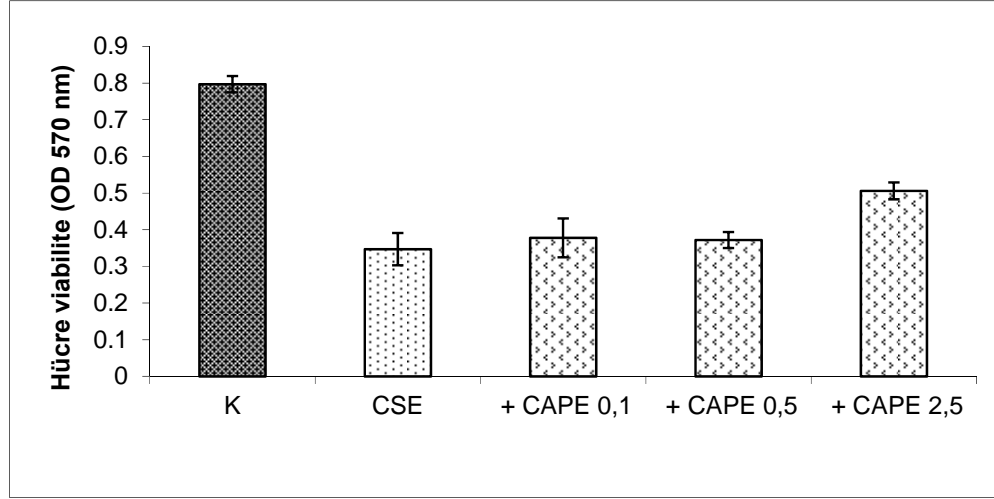


Şekil 4.2. Farklı CAPE konsantrasyonlarının hücre viabilitesi üzerine etkisi

Üç saat inkübasyon sonrası 2,5 µm CAPE grubunda kontrol grubuna ($0,794 \pm 0,019$) göre hücre viabilitesinde belirgin düzeyde ($0,840 \pm 0,013$) azalma olmadığı (Şekil 4.2) tespit edildi ($p < 0,001$). Daha yüksek dozlarının ise hücreler için toksik olduğu belirlendi.

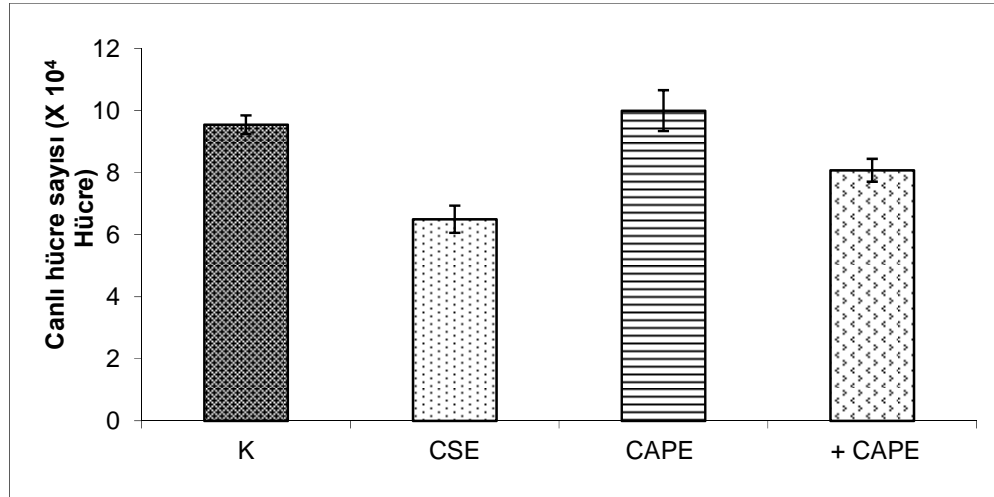
4.1.3. CAPE uygulamasının, Sigara dumanının neden olduğu hücre ölümleri üzerine etkisi

Akciğer epitel hücrelerine 24 kuyucuklu kültür kaplarında CAPE'in farklı dozları 1 saatlik ön uygulama yapıldı. Daha sonra sigara dumanı içeriği taşıyan (CSE) mediyum eklenerek 3 saat inkübasyon süresi başlatıldı. Süre sonunda CAPE'in etkin dozu MTT metodu ve tripan blue canlı hücrelerin sayımı ile tespit edildi.



Şekil 4.3. CSE ile birlikte farklı CAPE konsantrasyonlarının hücre viabilitesi üzerine etkileri.

İnkübasyon sonrası kontrol grubuna göre ($0,794 \pm 0,019$) CSE grubunda meydana gelen yaklaşık %46'lık hücre kayıplarının ($0,341 \pm 0,069$) CAPE tedavisi ile %25 ($0,794 \pm 0,04$) oranında iyileştirildiği saptandı ($p < 0,001$). K: Kontrol, CSE: Sigara dumanı içeriği +CAPE: CSE+CAPE

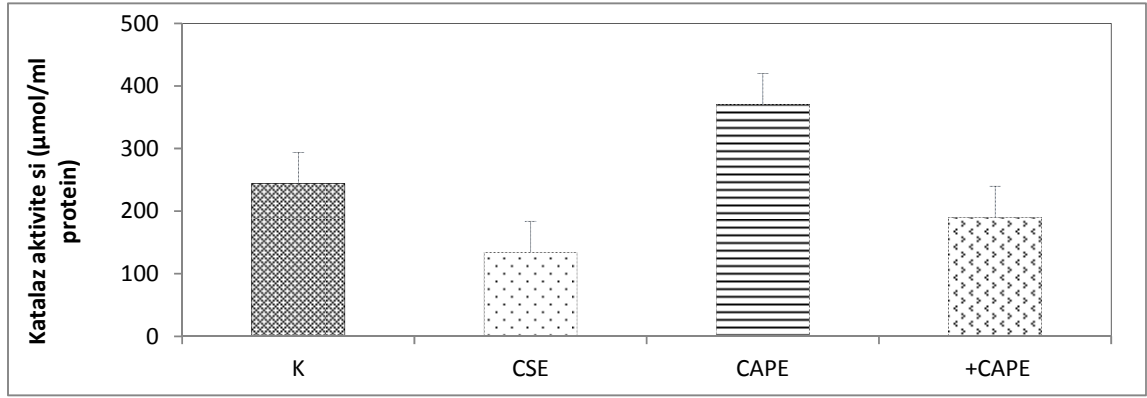


Şekil 4.4. CSE ile birlikte CAPE uygulanmasının canlı hücre sayısına etkisi.

İnkübasyon sonrası kontrol grubuna göre ($98 \times 10^3 \pm 0,75 \times 10^3$) CSE grubunda meydana gelen hücre kayıplarının ($65 \times 10^3 \pm 1,09$) CAPE ön muamelesiyle ($80 \times 10^3 \pm 0,75$) oranında iyileştirildiği saptandı ($p < 0,05$). K: Kontrol, CSE: Sigara dumanı içeriği, CAPE: $2,5 \mu\text{M}$, +CAPE: CSE+ $2,5 \mu\text{M}$ CAPE.

4.1.4. Sigara dumanına maruz bırakılan hücrelerde CAPE'in katalaz aktivitesi üzerine etkisi

Pleytlerdeki (24 kuyucuklu) akciğer epitel hücrelerine $2,5 \mu\text{M}$ CAPE 1 saat süresince ön uygulamaya tabi tutuldu. Daha sonra CSE eklenerek 3 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örneklerden elde edilen hücre homojenatlarında katalaz aktivitesi analiz edildi.

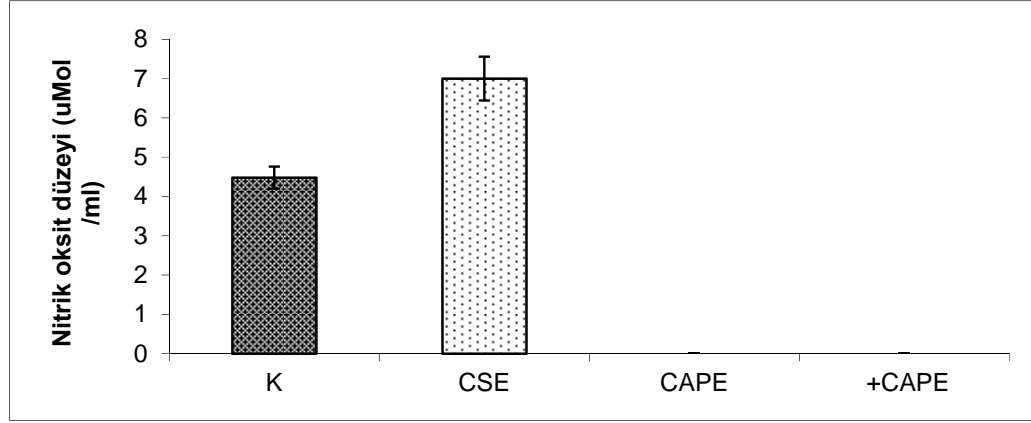


Şekil 4.5. CSE ile CAPE uygulamasının katalaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.

İnkübasyon sonrası CAPE eklenmiş grupta kontrol grubuna göre katalaz aktivitesinin anlamlı derecede arttığı saptandı. CSE eklenen hücrelerde katalaz aktivitesi kontrol grubuna göre azalırken, CAPE ön muamelesi sonrası CSE eklenen hücreler de CSE eklenmiş gruba göre katalaz aktivitesinin önemli düzeyde arttığı ($56 \pm 44,89$) saptandı ($p < 0,05$). K: Kontrol, CSE: Sigara dumanı içeriği, CAPE: $2,5 \mu\text{M}$, +CAPE: CSE+ $2,5 \mu\text{M}$ CAPE.

4.1.5. Sigara dumanının neden olduğu NO üretimi üzerine CAPE'in etkisi

Kültür kaplarında akciğer epitel hücrelerine $2,5 \mu\text{M}$ CAPE'in bir saatlik ön uygulaması sonrası CSE eklenerek 3 saat inkübasyona bırakıldı ve alınan medyum örneklerindeki nitrit ve nitrat düzeyi Griess yöntemine göre belirlendi.

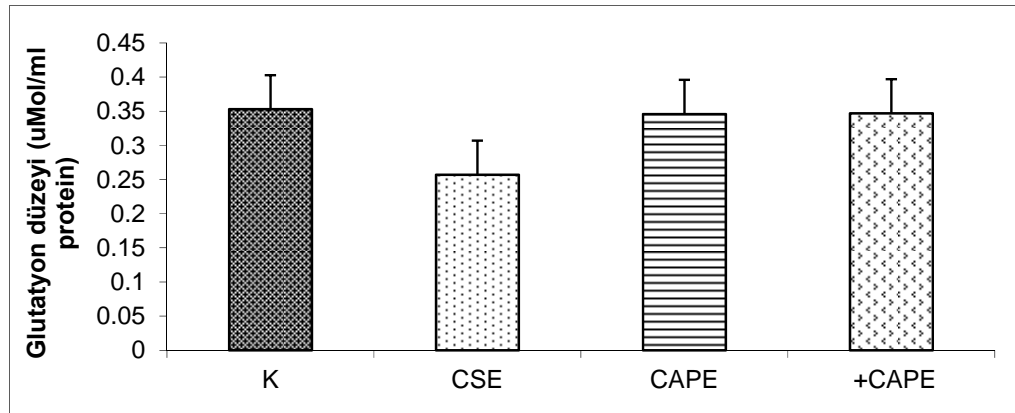


Şekil 4.6. CSE ile birlikte CAPE tedavisinin nitrik oksit düzeyine etkisi.

İnkübasyon sonrası kontrol grubuna göre ($4,48 \pm 0,48$) CSE grubunda meydana gelen ($7 \pm 0,96$) NO üretiminin CAPE uygulaması ile bu artışın engellendiği saptandı ($p < 0,001$). K: Kontrol, CSE: Sigara dumanı içeriği, CAPE: $2,5\mu\text{M}$, +CAPE: CSE+ $2,5\mu\text{M}$ CAPE.

4.1.6. Glutasyon (GSH) düzeyi üzerine kafeik asit fenetil ester ve CSE uygulamasının etkileri.

Çalışmadan yaklaşık 16-17 saat önce hazırlanan flakslarda sigara dumanı içeriği maruziyetinden 1 saat önce $2,5\mu\text{M}$ CAPE ön tedavisi uygulandı. Daha sonra flakslara CSE'li medyum ilave edilerek üç saat inkübasyona bırakıldı inkübasyon sonrası elde edilen hücre homejenatlarında GSH düzeyi ölçüldü.

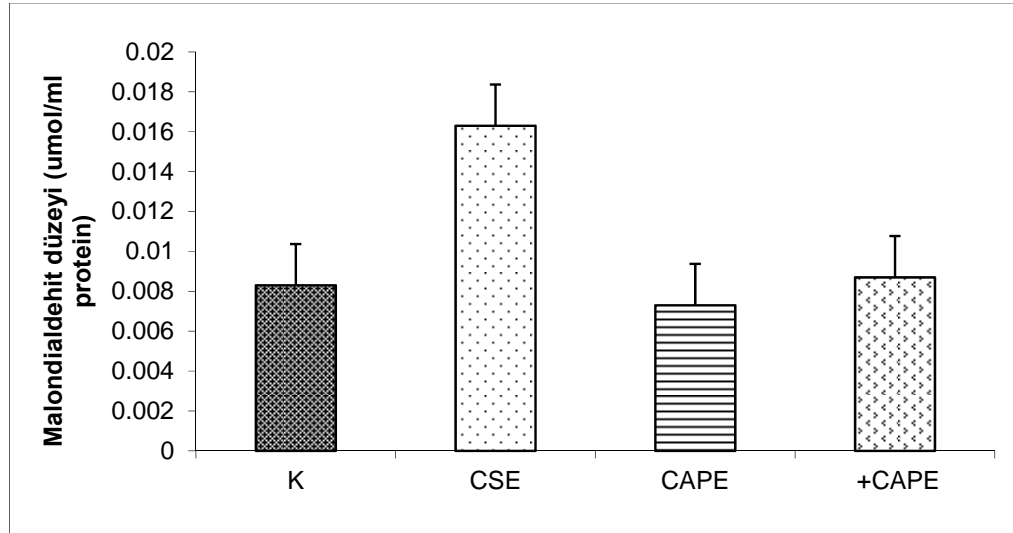


Şekil 4.7. CSE ile birlikte CAPE uygulanmasının glutasyon üretimi üzerine etkisi.

CSE eklenen hücrelerde Glutasyon üretimi ($0,257 \pm 0,0011$) kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldı ($P<0.001$). CAPE ön muamelesinden sonra CSE maruziyetine bırakılan grupta ($0,347 \pm 0.0015$) ise GSH düzeyini anlamlı derecede arttırdığı saptandı ($P<0.005$). K: Kontrol, CSE: Sigara dumanı içeriği, CAPE: $2,5\mu\text{M}$, +CAPE: CSE+ $2,5\mu\text{M}$ CAPE.

4.1.7. Kafeik asit fenetil ester ve CSE uygulamasının malondialdehit (MDA) düzeyi üzerine etkileri

Flasklardaki (25 cm^2) hücelere $2,5 \mu\text{M}$ CAPE, sigara dumanı içeriği bulunduran medyundan 1 saat önce eklendi. Daha sonra flasklara CSE eklenerek 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda elde edilen hücre homojenatlarında MDA düzeyi ölçüldü.

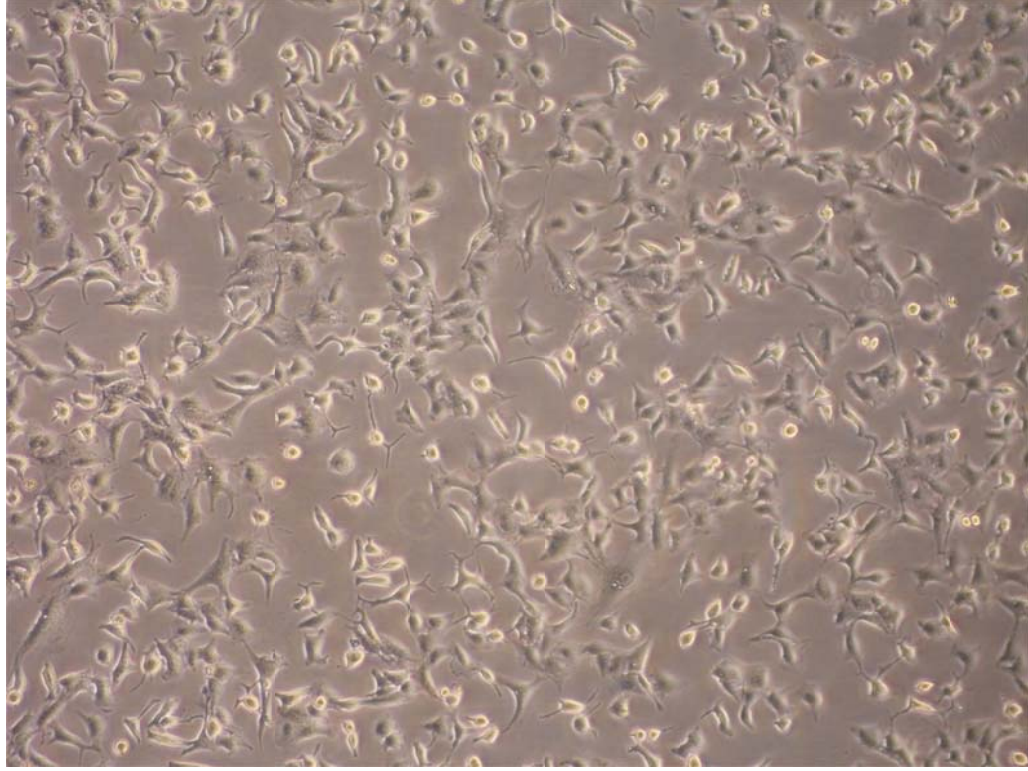


Şekil 4.8. CSE ile birlikte CAPE uygulanmasının malondialdehit üretimi üzerine etkisi.

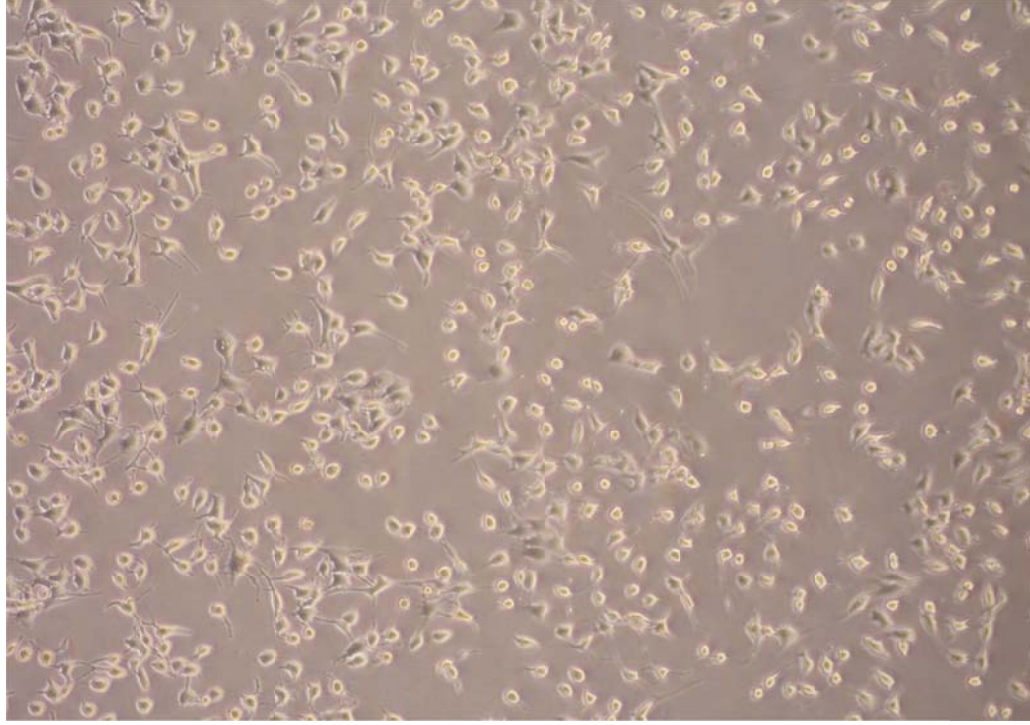
Sigara dumanı içeren medyum eklenen hücrelerde malondialdehit oluşumu ($0,0163 \pm 0,0153$) kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış gösterirken ($P<0.05$) CAPE ön tedavisi ile CSE maruziyetine bırakılan grupta ($0,087 \pm 0,0058$) ise malondialdehit düzeyini anlamlı derecede azaldığı saptandı ($P<0.05$). K: Kontrol, CSE: Sigara dumanı içeriği, CAPE: $2,5\mu\text{M}$, +CAPE: CSE+ $2,5\mu\text{M}$ CAPE.

4.2. Akciğer epitel hücrelerinin morfolojisine sigara dumanı ve CAPE'in etkileri

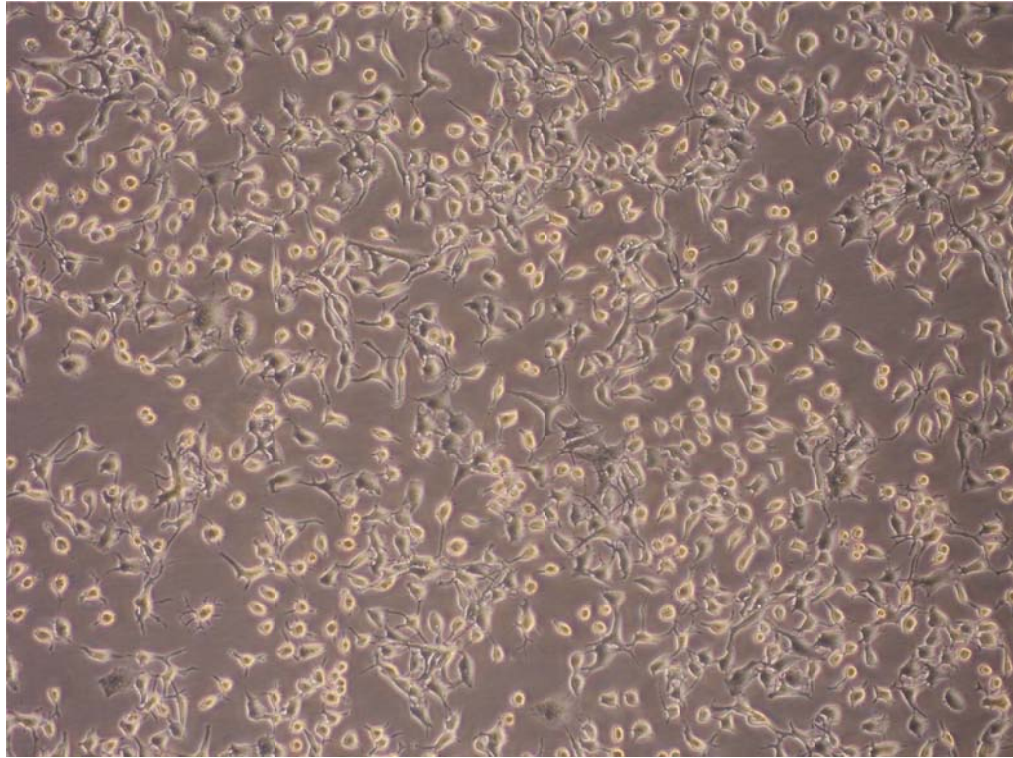
Akciğer epitel hücrelerine CAPE'in 1 saatlik ön uygulamasını takiben CSE eklenerek 3 saat maruziyeti sağlandı. Süre sonunda elde edilen hücre örneklerinden invert mikroskopun 40X büyütme objektifi ile çekilen fotoğraflar incelendiğinde, hücre ölümlerinin CSE uygulanan grupta (Şekil 4.10) kontrol grubuna (Şekil 4.9) göre önemli oranda arttığı, ancak CAPE tedavisinin (Şekil 4.12) CSE'nin neden olduğu hücre ölümlerini ise azalttığı saptandı.



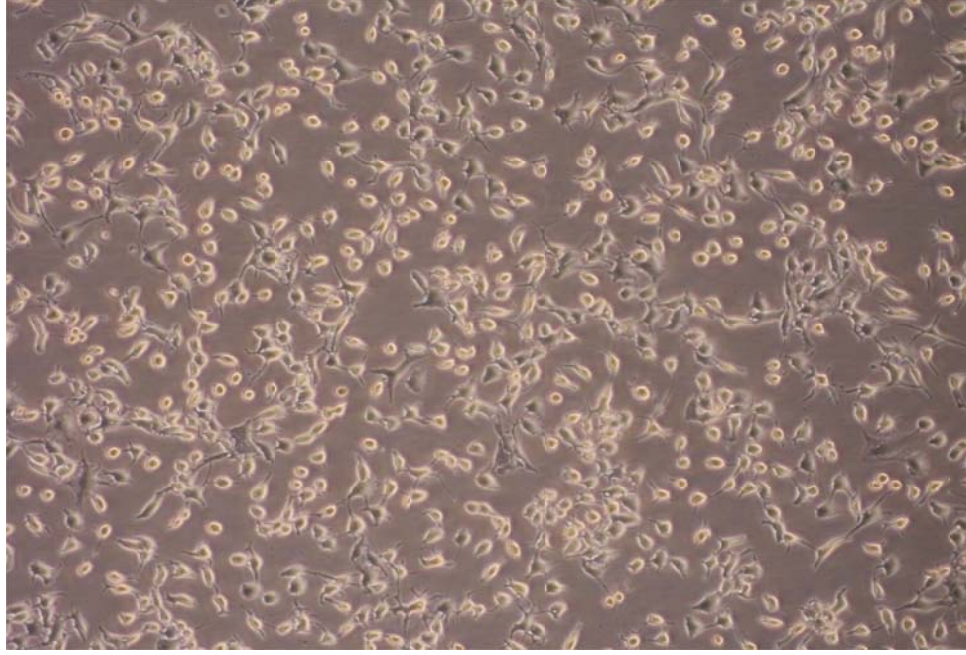
Şekil 4.9. Kontrol grubu Akciğer epitel hücreleri (10x40 büyütme).



Şekil 4.10. Sigara duman taşıyan medyum uygulanan hücreler (10x40 büyütme).



Şekil 4.11. Epitel hücrelerine 2,5µM CAPE eklenen grup (10x40 büyütme).



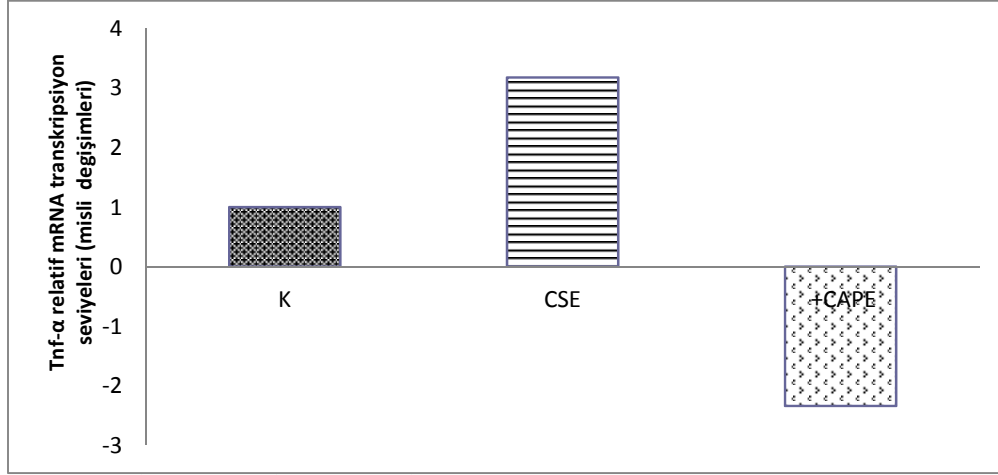
Şekil 4.12. Sigara duman içeriğine 3 saat süresince maruz bırakılan hücelere 2,5 μM CAPE'in etkisi (10x40 büyütme).

4.3. RT-PCR sonuçları

Akciğer alveol hüceleri 75 cm² flasklarda kültür ortamına ekildi. Kafeik asit fenil ester (2,5 μM) ön muamalesini takiben CSE hücelere uygulandı. İnkübasyon süresi sonunda elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezleri yapılarak belirli genlerin (TNF- α , IL-1 β , kaspaz-3, COX-2, İFN- γ ve iNOS) spesifik primerlerle mRNA transkripsiyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle araştırıldı.

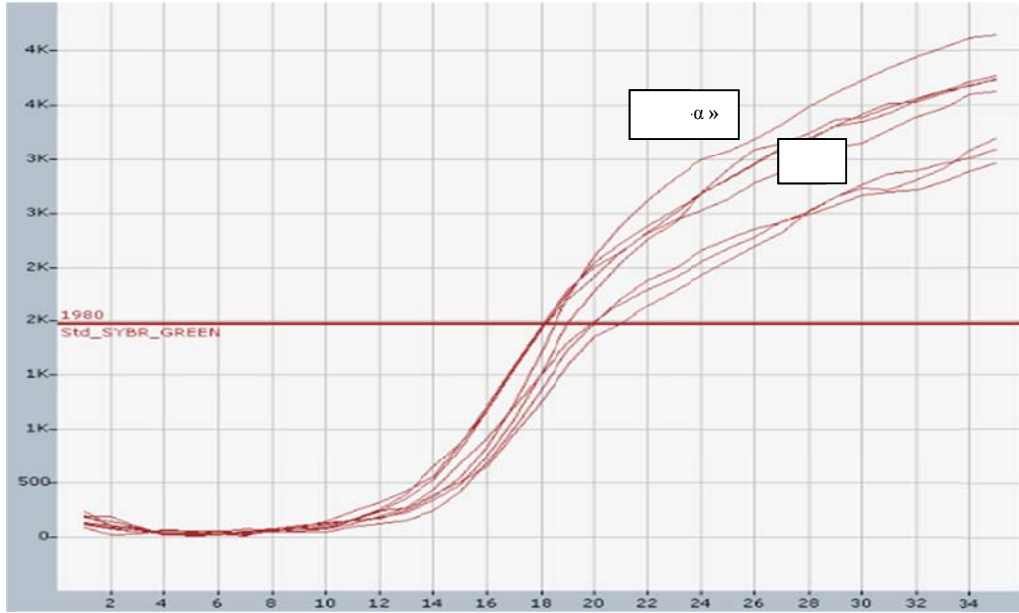
4.3.1. TNF- α mRNA transkripsiyonu

Flasklara ekilen A549 hücre medyumlarına 2,5 μM CAPE eklenerek. 1 saatlik ön inkübasyona bırakıldı. Daha sonra CSE ilave edilerek 3 saatlik inkübasyona tabi tutuldu. Süre sonunda elde edilen RNA örneklerinden yangı öncülü sitokin TNF- α mRNA transkripsiyon düzeyi RT-PCR yöntemiyle araştırıldı.



Şekil 4.13. TNF- α mRNA transkripsiyon düzeyleri (3 saat).

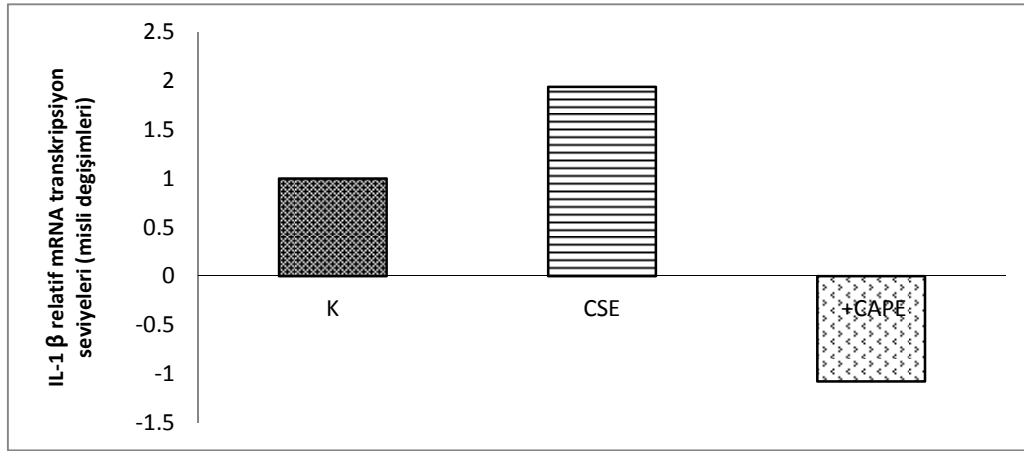
TNF- α mRNA transkripsiyon düzeyinin CSE eklenen hücrelerde kontrol grubuna göre uyarıldığı (yaklaşık 3,18 misli), ancak CAPE tedavisinin bu uyarılmayı durduğu saptandı (Şekil 4.13). K: Kontrol, CSE: Sigara dumanı içeriği +CAPE: CSE+2,5 μ M CAPE



Şekil 4.14. Gerçek zamanlı PCR'da TNF- α mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrisi. K: Kontrol

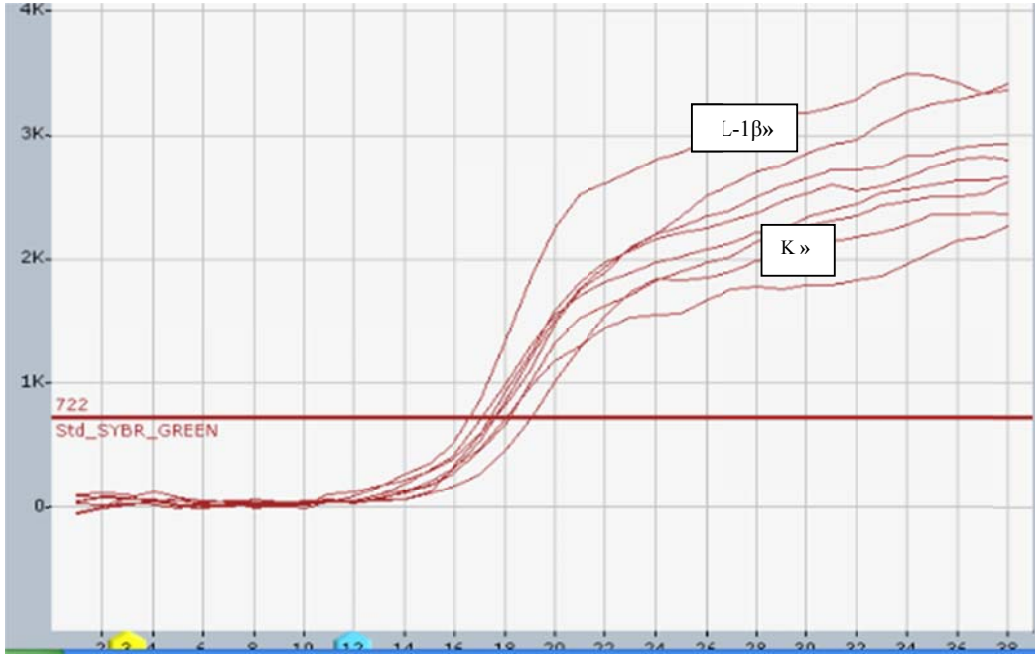
4.3.2. IL-1 β mRNA transkripsiyonu

Alveol hücreleri CSE'ye maruz bırakılmadan bir saat önce 2,5 μ M CAPE tedavisine bırakıldı. Daha sonra kültür kaplarına CSE ilave edilerek 3 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda elde edilen RNA örneklerinden IL-1 β mRNA transkripsiyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle araştırıldı.



Şekil 4.15. IL-1 β mRNA transkripsiyon düzeyleri (3 saat).

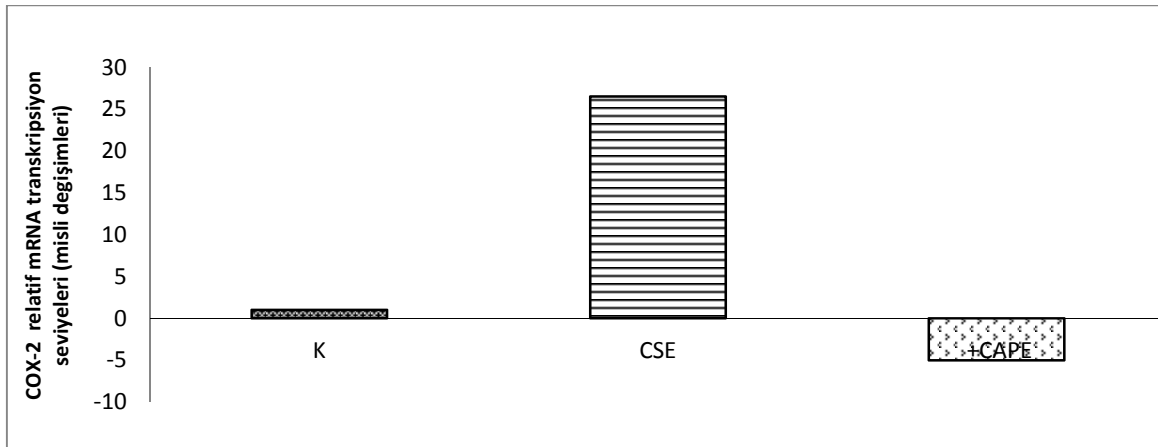
Buna göre; IL-1 β mRNA transkripsiyon seviyeleri, CSE eklenen grupta kontrol grubuna göre uyarıldığı (yaklaşık 1,94 misli), ancak CAPE'in CSE'nin meydana getirdiği bu olumsuz tabloyu tamamen iyileştirildiği saptandı (Şekil 4.15). K: Kontrol, CSE: Sigara dumanı içeriği +CAPE: CSE+2,5 μ M CAPE



Şekil 4.16. Gerçek zamanlı PCR’da IL-1 β mRNA transkripsiyon seviyelerinin amplifikasyon eğrisi. K: Kontrol

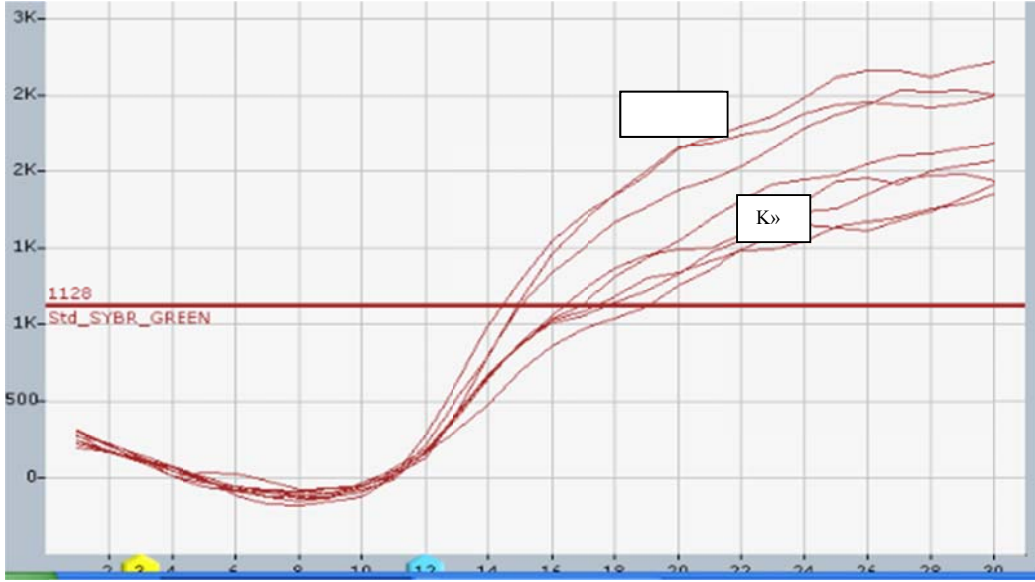
4.3.3. COX-2 mRNA transkripsiyonu

Epitel hücrelere bir saat 2,5 μ M CAPE tedavisi yapıldı. Daha sonra 3 saatlik CSE maruziyetine bırakıldı. Süre sonunda elde edilen RNA örneklerinden COX-2 mRNA transkripsiyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle araştırıldı.



Şekil 4.17. COX-2 mRNA transkripsiyon seviyeleri (3 saat).

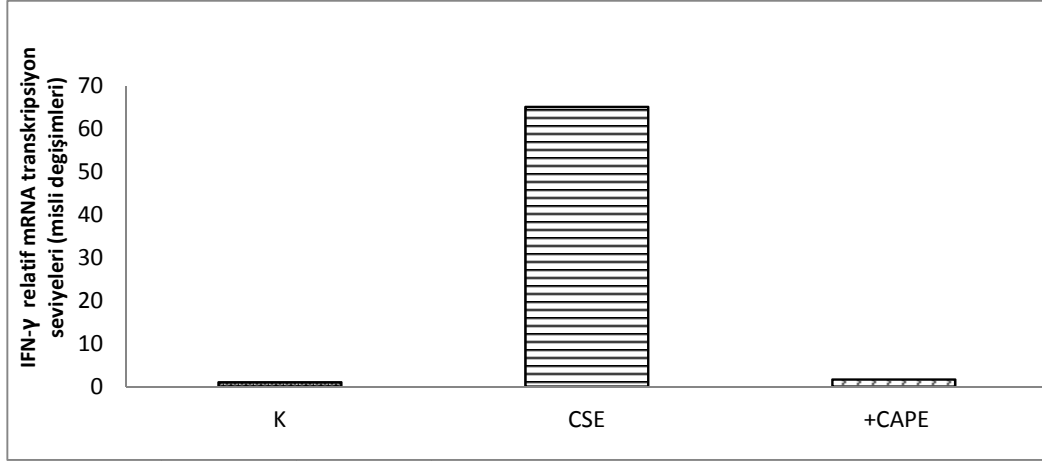
Buna göre; COX-2 mRNA transkripsiyon düzeyi, CSE eklenen grupta kontrol grubuna göre uyarıldığı (yaklaşık 26,5 misli), ancak CAPE tedavisi ile bu artışın azaltıldığı saptandı (Şekil 4.17). K: Kontrol, CSE: Sigara dumanı içeriği +CAPE: CSE+2,5 µM CAPE



Şekil 4.18. Gerçek zamanlı PCR’da COX-2 mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrisi. K: Kontrol

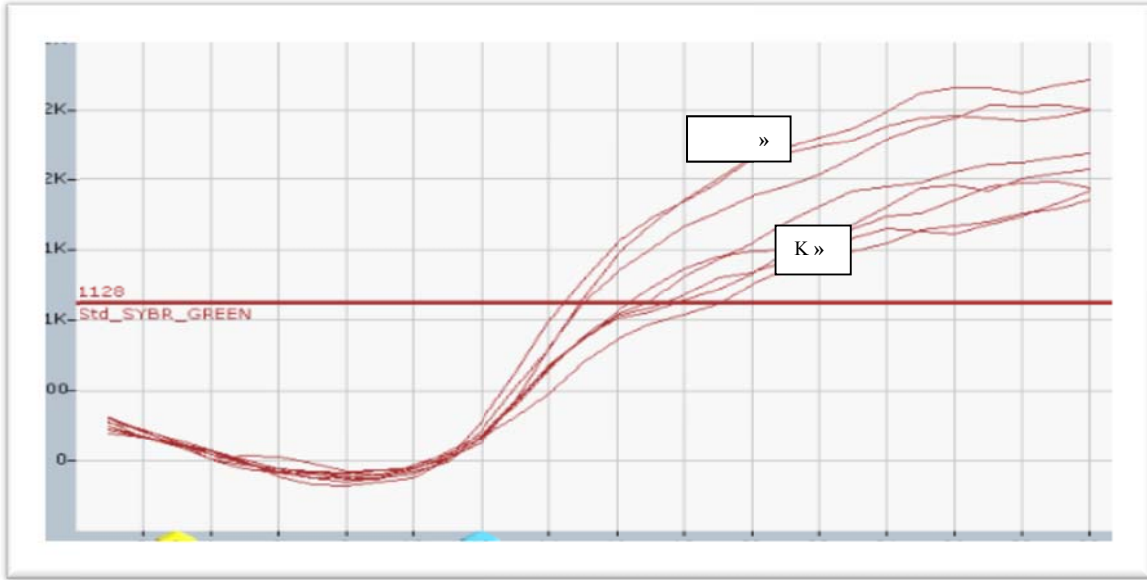
4.3.4. IFN- γ mRNA transkripsiyonu

Akciğer epitel hücreleri CAPE ile 1 saat muamele edildikten sonra CSE eklendi. Üç saat inkübasyon sonrası elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. Yangının başlaması ve devamında büyük öneme sahip olan IFN- γ geni mRNA transkripsiyon düzeyleri gerçek zamanlı PCR yöntemiyle analiz edildi.



Şekil 4.19. İFN-γ mRNA transkripsiyon seviyeleri (3 saat).

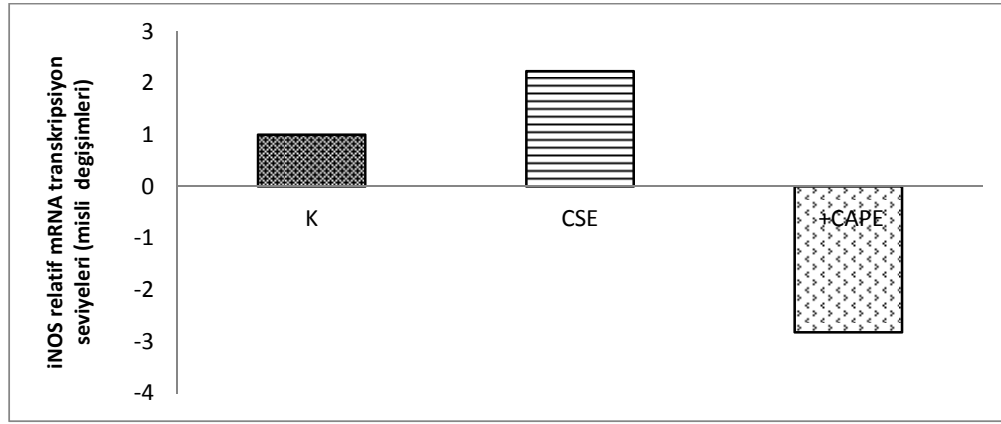
Buna göre; İFN-γ geni mRNA transkripsiyon seviyesi CSE'nin eklenen grupta kontrol grubuna göre uyarıldığı (65,1 misli), CAPE tedavisi sonrası CSE eklenen grupta bu artışı baskılandığı belirlendi (Şekil 4.19). K: Kontrol, CSE: Sigara dumanı içeriği +CAPE: CSE+2,5 μM CAPE.



Şekil 4.20. Gerçek zamanlı PCR'da İFN-γ mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrisi. K: Kontrol

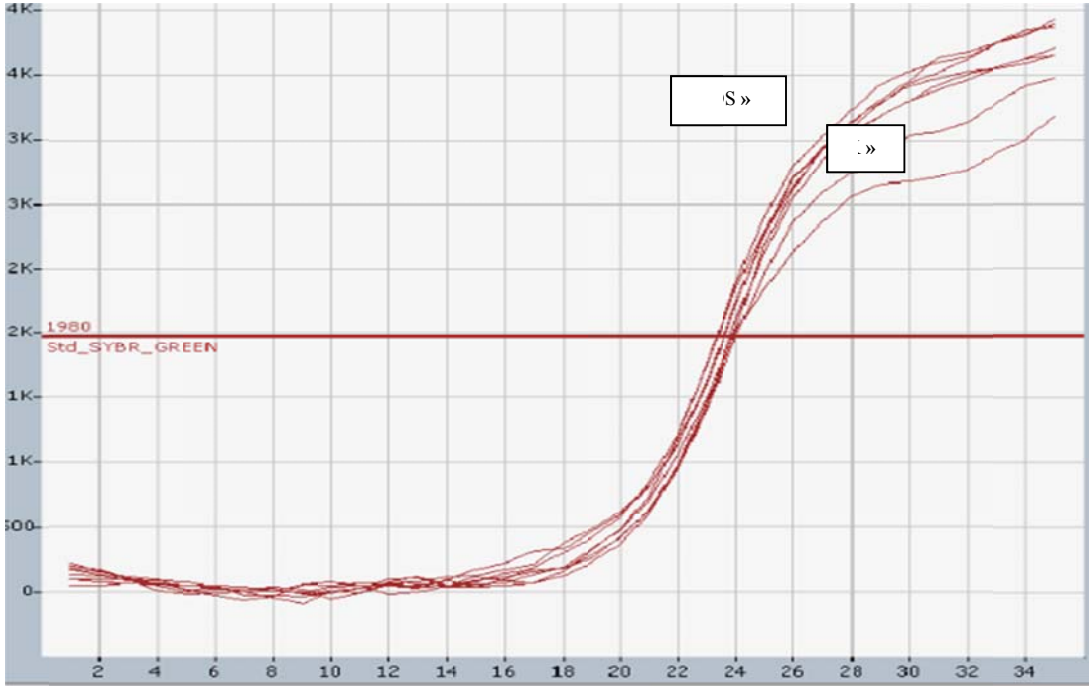
4.3.5. iNOS mRNA transkripsiyonu

Akciğer epitel hücrelerine (25 cm²'lik flasklarda) 1 saatlik 2,5 µM CAPE ön tedavisini takiben CSE eklenerek üç saat inkübasyona bırakıldı. Nitrik oksit üretiminden sorumlu enzimlerden birisi olan iNOS geninin mRNA transkripsiyon düzeyi RT-PCR yöntemiyle analiz edildi.



Şekil 4.21. iNOS mRNA transkripsiyon seviyeleri (3 saat).

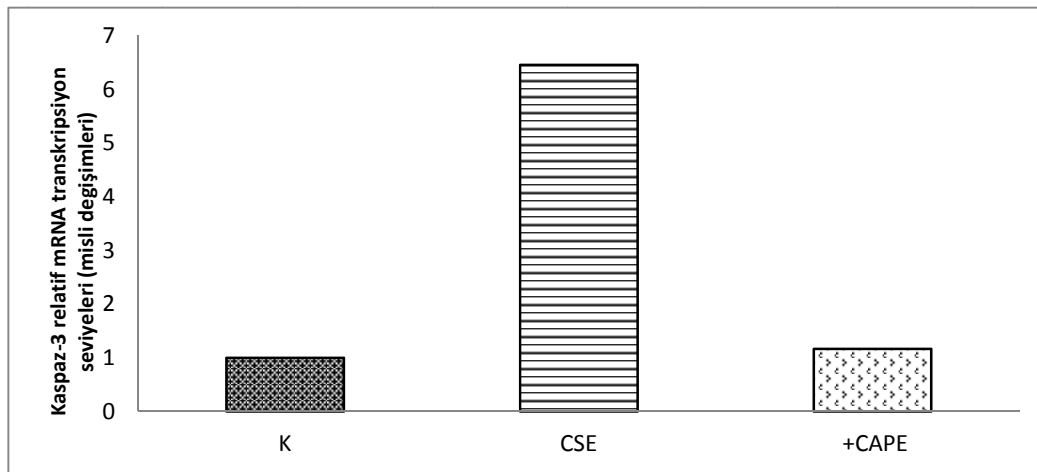
Nitrik oksit ürettiren iNOS mRNA transkripsiyon düzeyi sigara dumanı içeriği eklenen grupta kontrol grubuna göre uyarıldığı (yaklaşık 2,2 misli), ancak CAPE'in bu transkripsiyon artışını geriletmediği saptandı (Şekil 4.21). K: Kontrol, CSE: Sigara dumanı içeriği +CAPE: CSE+2,5 µM CAPE.



Şekil 4.22. Gerçek zamanlı PCR’da iNOS mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrisi. K: Kontrol

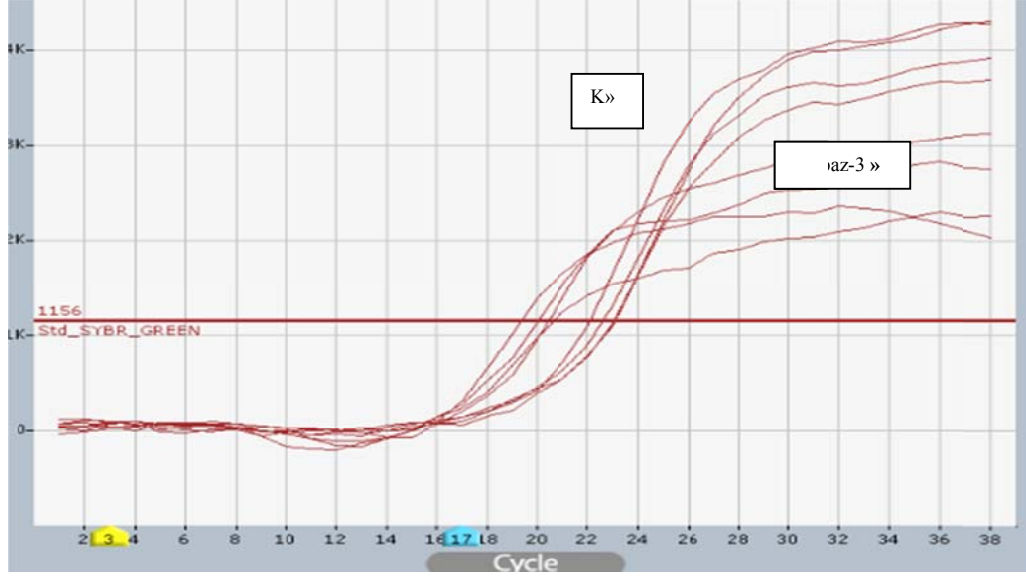
4.3.6. Kaspaz-3 mRNA transkripsiyonu

75 cm²’lik flaslara bölünen A549 hücrelerine 2,5 µM CAPE eklendi. bir saatlik ön inkübasyon sonrası üzerine CSE içeren medyum ilave edilerek üç saatlik inkübasyona tabi tutuldu. Süre sonunda elde edilen RNA örneklerinden apoptozisten sorumlu bir proteaz olan kaspaz-3 mRNA transkripsiyon düzeyleri RT-PCR yöntemiyle araştırıldı.



Şekil 4.23. Kaspaz-3 mRNA transkripsiyon seviyeleri (3 saat).

Kaspaz-3 mRNA transkripsiyon seviyesinin CSE eklenen grupta kontrol grubuna göre uyarıldığı (yaklaşık 6,45 misli), ancak CAPE ön uygulamasının bu uyarılmayı baskıladığı saptandı (Şekil 4.23). K: Kontrol, CSE: Sigara dumanı içeriği +CAPE: CSE+2,5 µM CAPE



Şekil 4.24. Gerçek zamanlı PCR’da kaspaz-3 mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrisi. K: Kontrol

5. TARTIŞMA

Kronik ve ilerleyici seyir gösteren ve insanlarda ölümcül bir hastalık olan Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı'nın (KOAH) gelişmesinde en önemli etmen sigara ve diğer tütün mamüllerinin kullanımınıdır. Sigara ve tütün kullanımı, solunum yolları üzerine etkisini yangı seviyesini artırarak gösterirler. Sigara ve tütün mamülleri bu olumsuz etkilerini direk olarak akciğer hücrelerinin yapısını bozarak veya dolaylı yoldan yangısal genlerin transkripsiyon seviyelerini artırarak sağlarlar (Henricks ve Nijkamp 2001). Kafeik asit fenetil ester, propolisin yapısında bulunan biyolojik aktif bileşenlerden biridir. Arıların yuva yapımında kullandıkları bu bileşimin yangı giderici, antioksidan, antikanserojenik ve antiviral etkileri vardır (Banskota ve ark. 2001). Kafeik asit fenetil ester bu etkisini NF-kB yolağını (Natarjan ve ark. 1996), lipid peroksidasyonu (Sudina ve ark. 1993) ve/veya lipoksigenaz aktivitesini (Laranjinha ve ark. 1995) inhibe ederek gösterir. Yapılan literatür araştırmalarında CAPE'in sigara dumanı zararları üzerine etkileri henüz ortaya konulmamıştır. Bu tez çalışmasında akciğer epitel hücreleri (A549) kullanılarak sigara dumanıyla oluşturulan oksidatif stres, hücre kayıpları ve yangıya karşı CAPE'in etkinliği *in vitro* koşullarda araştırıldı.

Sigara dumanı her nefeste yaklaşık olarak 10^{17} adet oksidan ve serbest radikal içerir. Sigara dumanı içeriği (CSE), A549 ve fibroblast kokültüründe apoptozu tetikleyerek anti-proliferatif etki gösterir (Liu ve ark. 2010). Sigara içenlerin akciğerlerinin yüzeylerinde bulunan oksidan yükü makrofaj ve nötrofiller artırabilir. Sigara dumanı içeriği alveolar hücrelerde oksidatif stres etkisiyle hücre çoğalmalarını önleyip yangı öncülü genleri aktifleştirir. Sonucunda yangı gelişir ve hücre harabiyeti başlar (Liu ve ark. 2009). Bu çalışmada sigara dumanı kaynaklı oksidatif stres ve yangı uyarımlı hücre ölümlerine karşı CAPE'in etkinliği araştırıldı. Bu amaçla sigara dumanıyla KOAH modeli oluşturularak hücre canlılık (viabilite) testleri yapıldı. A549 hücrelerinin 3 saatlik CSE inkübasyonu sonrası hücre viabilite kontrolleri incelendiğinde, CSE eklenen grupta kontrol grubuna göre %46 oranında hücre ölümleri şekillendiği, ancak CAPE'in 1 saatlik ön uygulamasını takiben CSE maruziyeti sağlanan grupta ise bu hücre kayıplarının %25 oranında giderildiği gösterildi. Bu sonuca göre CAPE'in A549 hücrelerinde sigara dumanı içeriği zararlılarına karşı hücreleri ölümden koruyucu etkisi olduğu düşünülebilir.

Sigara dumanı ekstraktının oksidatif stresi, sadece oksidan üretmek değil antioksidan sisteme de önemli zararlar vererek oluşturduğu gösterilmiştir (Jansen ve ark. 1993). Glutasyon solunum yolu hücreleri için önemli bir antioksidan moleküldür. Sigara dumanı, antioksidan

enzim sistem elemanlarının (GSH-Px, Katalaz ve SOD gibi) aktivitelerini önemli düzeyde azaltır (Ritola ve ark. 2002). Yapılan araştırmalarda, sigara dumanının hücre içi bir antioksidan moleköl olan glutasyon düzeyini önemli derecede azalttığı rapor edilmiştir (Ramesh ve ark. 2008; Bernhard ve Wang 2007). Sigara dumanının solunum yollarındaki hücrelerde arttırdığı ROS'lar hücre membranı yapısında bulunan doymamış fosfolipitleri peroksidasyona uğratar ve sonucunda lipid peroksidasyonu gelişir ve malondialdehit (MDA) gibi aldehit ürünler açığa çıkar (Hallıwell ve Chırıco 1993). Petruzzelli ve ark. (1990) yaptığı çalışmada, sağlıklı sigara kullanıcılarında, kronik bronşit hastalarında ve KOAH'lı hastalarda lipid peroksidasyonunun yüksek düzeyde olduğunu rapor etmişlerdir. Hücre içi antioksidan enzimlerden katalaz H_2O_2 'i moleköler oksijen ve suya hidrolize eder. Husain ve ark. (2001), nikotinin katalaz aktivitesini önemli derecede azalttığını rapor etmişlerdir. Bu çalışma da A549 hücrelerinde CSE ile oluşturulan oksidatif stres modelinde, CAPE'in antioksidan kapasite etkinliği araştırıldı. Bu amaçla inkübasyon süreleri sonunda, GSH üretimi ile Katalaz aktivitesi ve MDA düzeyleri araştırıldı. Sigara dumanının, GSH düzeyinde ve Katalaz aktivitesinde anlamlı derecede azalmaya neden olduğu, MDA düzeyini ise istatıksel olarak arttırdığı saptandı. Ancak CAPE ön muamelesinin sigara dumanının meydana getirdiği olumsuz tabloyu anlamlı derecede iyileştirdiği tespit edildi. Daha önceki çalışmalarda Çelik ve Erdoğan (2008) diyabet uyarımlı oksidatif stres modelinde, azalan hücreiçi GSH düzeyinin CAPE tarafından anlamlı derecede iyileştirildiğini göstermişlerdir. Özyurt ve ark. (2006) sigara dumanıyla oksidatif stres oluşturdukları ratların testislerinde yaptıkları çalışmada CAPE'in sigara dumanı maruziyetinin düşürdüğu GSH-Px, katalaz aktivitesini ve neden olduğu lipid proksidasyonunu normal seviyeye geriletteğini göstermişlerdir. Elde edilen bu sonuçlara bakılarak, CAPE'in KOAH gibi kronik ve ilerleyici solunum yolu hastalıklarında antioksidan sistemi etkin bir şekilde uyardığı düşünölebilir.

Alveoler keseciklerdeki epiteller, sigara kullanımı gibi durumlarda NO üretiminden sorumlu hücrelerdendir (Coleman 2002). Nitrik oksit O_2^- ile birleşerek peroksinitratı oluşturarak OH^- radikali üretimine neden olur. Hidroksil molekölü güçlü bir serbest radikal olup, hücre içerisindeki protein ve nükleikasitler gibi makromoleköllerde önemli yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olur (Cho ve ark. 2009). Bu çalışmada sigara dumanının akciğer epitel hücrelerinde NO düzeyini anlamlı derecede arttığı saptandı. Yapılan PCR analizleri sonucu sigara dumanı uyarımıyla artan NO üretiminin, iNOS enzimini kodlayan genlerdeki ekspresyon artışına bağlı olduğu tespit edildi. CAPE sigara dumanının meydana getirdiği bu artışları anlamlı derecede baskıladı. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer

olarak, Özyurt ve ark. (2006) sigara dumanı modeliyle oksidatif stres oluşturdukları *in vivo* çalışmada artan NO düzeyinin CAPE tarafından anlamlı düzeyde önlendiğini rapor etmişlerdir. Yine bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer olarak, Çelik ve Erdoğan (2008) diyabet uyarımlı oksidatif stres modelinde, iNOS mRNA transkripsiyon artışının CAPE tarafından baskılandığını rapor etmişlerdir. Wei ve ark. (2004) iskemi modeli üzerinde yaptıkları çalışmada artan iNOS gen transkripsiyon düzeyini CAPE tedavisinin engellediğini göstermişlerdir. Elde edilen verilere göre, sigara dumanı kaynaklı NO artışına bağlı ortaya çıkan oksidatif stresin, meydana getirdiği olumsuz durumların CAPE tarafından etkin bir şekilde önlenebileceği kanısına varıldı.

Yangı organizmanın patojenlere, hasarlı hücelere ve iritanlara karşı verdiği biyolojik cevaptır (Ferrero-Miliani ve ark. 2007). Sigara dumanı alveoler hücelerde yangı oluşumunu sağlayan genlerde ekspresyon artışına neden olur (Liu ve ark. 2009). TNF- α yangı öncülü bir sitokin olup genel olarak epitel hücelere, makrofajlar, T ve B lenfositlerden salgılanırlar. Makris ve ark (2009) yaptıkları çalışmada KOAH hastalarının balgam ve tükürük örneklerinde TNF- α ekspresyonunun arttığını rapor etmişlerdir. Çoğu akut enfeksiyon ve bazı kronik hastalıklarda diğer önemli bir yangı başlatıcı sitokin olan IL-1 β gen ekspresyonunda, önemli düzeyde artış görülür (Dinarello 2000). Yapılan araştırmalarda sigara kullanıcılarının tükürük ve balgamlarında sigara kullanımının IL-1 β düzeyini artırdığı tespit edilmiştir (Chung 2006). Zeidel ve ark. (2002) *in vitro* çalışmalarında sigara dumanının IL-1 β gen ekspresyonunda artışa neden olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada A549 hücrelerinin sigara dumanı ile uyarımıyla TNF- α ve IL-1 β mRNA transkripsiyon düzeyleri araştırıldı. Sigara dumanının bu genlerde artışlara yol açtığı, ancak kafeik asit fenetil ester'in bu transkripsiyon artışlarını baskıladığı tespit edildi. Elde edilen sonuçlara benzer olarak Mushfiquddin ve ark. (2007) *in vivo* iskemi modelinde yaptıkları çalışmada CAPE'in artan IL-1 β ve TNF- α gen ekspresyon düzeylerini anlamlı derecede baskıladığını rapor etmişlerdir. Toyoda ve ark. (2009) *in vitro* ve *in vivo* ortamda yaptıkları araştırmada *Helicobacter pylori* uyarımıyla artan artan IL-1 β ve TNF- α gen transkripsiyon düzeylerini CAPE tedavisinin baskıladığını tespit etmişlerdir. IFN- γ yangının şiddetlenmesi ve devamından sorumlu bir sitokindir (Linder ve ark. 2007). Tzanakis ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada KOAH'lı hastaların alveollerinde ve anfizem gelişmiş akciğer dokularında IFN- γ gen ekspresyon düzeyinin arttığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada sigara dumanının akciğer epitel hücrelerinde IFN- γ gen transkripsiyon düzeyini anlamlı derecede arttığı saptandı. CAPE uygulamasının sigara dumanının neden olduğu bu artışları anlamlı derecede baskıladı. Bu

çalışmaya benzer olarak Kim ve ark. (2006) *in vitro* şartlardada CAPE'in IFN- γ gen ekspresiyon düzeyini önemli derecede baskıladığını göstermişlerdir. Tüm bu sonuçlar, CAPE uygulamasının yangının azaltılması veya inhibe edilmesinde önemli bir farmakolojik ajan olabileceğini göstermektedir

Siklooksijenazlar (COX) araşidonik asitten prostoglandinleri sentezleyen enzimlerdir. Sigara dumanı solunum yollarında irritasyona neden olarak tip 2 siklooksijenazların (COX-2) gen ekspresyonunda artışa neden olurlar (Ristimäki 2004). Yapılan bu çalışmada akciğer epitel hücrelerinin sigara dumanı ile uyarımıyla COX-2 mRNA transkripsiyon düzeyini uyardığı ancak kafeik asit fenetil ester tedavisinin bu transkripsiyon artışları baskıladığı tespit edildi. Bu sonuca benzer olarak Büyükberber ve ark. (2009) CAPE'in COX-2 gen ekspresyonunu anlamlı derecede baskıladığını rapor etmişlerdir. Bu sonuçlara göre CAPE tedavisinin yangı oluşumunda önemli bir rolü olan prostoglandinlerin transkripsiyon düzeylerini azalttığını söyleyebiliriz.

Apoptoz, istenmeyen hasarlı ve hastalıklı hücrelerin bertaraf edilmesini sağlayan bir savunma sistemidir (Degterev ve ark. 2003). Jianli ve ark. (2011) sigara dumanı ile yaptıkları *in vitro* çalışmada kaspaz-3 gen ekspresyonunda artışlara neden olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada sigara dumanının akciğer epitel hücrelerinde kaspaz-3 mRNA düzeyini arttırdığı ve CAPE tedavisinin ise bu olumsuz etkiyi giderdiği tespit edildi. Jiangning ve ark. (2005) akut myokardial iskemi/reperfusion modelinde, CAPE'in mitokondriden kalsiyum kaynaklı sitokrom c çıkışını önleyerek kaspaz-3 aktivasyonunu bloke ettiğini ve DNA kırık oluşumunu önlediğini rapor etmişlerdir. Bu verilere göre CAPE'in sigara ile gelişen oksidatif stres uyarımlı yangıyı ve apoptozu önlediği sonucuna varıldı.

6. SONUÇ

Bu arştırmadan elde edilen sonuçlara göre sigara dumanının oksidatif streseneden olarak yoğun hücre ölümlerine ve yangıya sebep oldugunu tespit edildi. CAPE tedavisinin sigara dumanının bu zararlı etkilerini antioksidan sistemi destekleyerek ve yangı genlerinin ekspresyonunu baskılayarak önlediği saptandı. Buna göre CAPE tedavisi solunum yollarında meydana gelen oksidatif stres ve yangı kaynaklı hasarların giderilmesinde önemli bir potansiyel ajan olabileceği kanaatine varıldı. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, CAPE'in oksidatif stres ve yangı giderici özelliği üzerine yapılacak araştırmalar için kaynak olarak kullanılabileceği gibi, literatürdeki boşluğun doldurulmasına da katkılar sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. **Aarbiou J, Rabe KF, Hiemstra PS.** Role of defensins in inflammatory lung disease. *AnnMed* **2002**, 34: 96–101.
2. **Adcock IM, Brown CR, Kwon OJ, Barnes PJ.** Oxidative stress induces NF-kB DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**, 199: 1518–1524.
3. **Adler KB, Li Y.** Airway epithelium and mucus: intracellular signaling pathways for gene expression and secretion. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2001**, 25: 397–400.
4. **Ahn** of propolis collected in various areas of Korea. *J Agric Food Chem.* **2004**, 1.52(24):7286-92.
5. **Avissar N, Fin.kelstein JN, Horowitz S, ve ark.** Extracellular glutathione peroxidase in human lung epithelial lining fluid and in lung cells. *Am J Physiol* **1996**, 270: L173–L182.
6. **Bafadhel M, Saha S, Siva R, et al.** Sputum IL-5 concentration is associated with a sputum eosinophilia and attenuated by corticosteroid therapy in COPD. *Respiration* **2009**, 78:256–262.
7. **Banskota AH, Tezuka Y. and Kadota S.** Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* **2001**, 15, 561–571.
8. **Barnes PJ.** Chronic obstructive pulmonary disease. *New Engl J Med* **2000**, 343: 269–280.
9. **Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA.** Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* **2003**, 22:672-688.
10. **Barnes PJ.** Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev* **2004**, 56:515–548.
11. **Bernhard D, Wang XL.** Smoking, oxidative stress and cardiovascular diseases anti-oxidative therapies fail? *Curr Med Chem* **2007**, 14:1703-12.
12. **Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, Ialenti A.** *Fitoterapia* **2002**, 73(Suppl 1):53–63.
13. **Buyukberber M, Savaş M C, Bageci C, Koruk M, Gulsen M T, Tutar E, Bilgic T, Ceylan NÖ.** Therapeutic effect of caffeic acid phenethyl ester on cerulein-induced acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* **2009**, 7; 15(41): 5181-5185.
14. **Calabrese F, Baraldo S, Bazzan E, ve ark.** IL-32, a novel proinflammatory cytokine in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **2008**, 178:894–901.
15. **Caramori G, Romagnoli M, Casolari P, ve ark.** Nuclear localisation of p65 in sputum macrophages but not in sputum neutrophils during COPD exacerbations. *Thorax* **2003**, 58: 348–351.
16. **Castaldo S, Capasso F.** *Fitoterapia* **2002**, 1:S1–6.
17. **Celik S, Erdogan S.** Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects brain against oxidative stress and inflammation induced by diabetes in rats. *Mol. Cell. Biochem.* **2008**, 312: 39-46.
18. **Cho E.S., Jang Y.J., Hwang M.K., Kang N.J., Lee K.W., Lee H.J.** Attenuation of oxidative neuronal cell death by coffee phenolic phytochemicals. *Mutat Res.* **2009**. 661(1-2):18-24.
19. **Chung KF.** Cytokines as targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets* **2006**, 7:675–68
20. **Cirasino L, Pisati A, Fasani F,** Contact dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis.* **1987**, 16: 110-111.
21. **Coleman JW.** Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clin Exp Immunol* **2002**, 129:4-10.
22. **Comhair SA, Erzurum SC.** Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2002**, 283: L246–L255
23. **Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC.** Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* **1995**, 377:446-448
24. **Degterev A, Boyce M, Yuan J.** A decade of caspases. *Oncogene* **2003**, 22:8543-8567.
25. **Demedts IK, Brusselle GG, Bracke KR, Vermaelen KY, Pauwels RA.** Matrix metalloproteinases in asthma and COPD. *Curr Opin Pharmacol* **2005**, 5:257-263.
26. **Dinarello CA.** Proinflammatory cytokines. *Chest* **2000**, 118:503–508.

27. **Di Stefano A, Maestrelli P, Roggeri A, ve ark.** Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* **1994**, 149: 803–810.
28. **Di Stefano A, Caramori G, Capelli A, ve ark.** Increased expression of NF- κ B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J* **2002**, 20: 556–563.
29. **Duffield-Lillico AJ, Boyle JO, Zhou XK, Ghosh A, Butala GS, ve ark.** Levels of prostaglandin E metabolite and leukotriene E(4) are increased in the urine of smokers: evidence that celecoxib shunts arachidonic acid into the 5-lipoxygenase pathway, *Cancer Prev. Res. (Phila Pa)* **2009**, 322–329.
30. **Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE.** Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin. Exp. Immunol.* 147 (2): 227–35. doi:10.1111/j.1365-2249. **2007**, 03261.
31. **Floreani AA, Wyatt TA, Stoner J, ve ark.** Smoke and C5a induce airway epithelial ICAM-1 and cell adhesion. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2003**, (in press).
32. **Finlay GA, Driscoll LR, Russell KJ, ve ark.** Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* , **1997**, 156: 240–247.
33. **Frenkel K, Wei H, Bhimani R, Ye J, Zadunaisky JA, Huang MT, Ferraro T, ve ark.** *Cancer Res.*, 53, 1255—1261 **1993**,
34. **Gardner R.V., McKinnon E., Poretta C., Leiva L.** Hemopoietic function after use of IL-1 with chemotherapy or irradiation. *J. Immunol.* **2003**.171:1202-6.
35. **Giuntini C.** Pulmonary lipid peroxidation in cigarette smokers and lung cancer patients, *Chest*, **1990**, 98(4):930–935.
36. Global strategy for diagnosis. Management and Prevention of COPD. **2009**,
37. **Grumelli S, Corry DB, Song LZ, ve ark.** An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med* **2004**, 1:75–83.
38. **Halliwel B, Chirico S.** Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance, *Am J Clin Nutr*, **1993**, 57(5 Suppl):715S–725S
39. **Hashimoto S, Kobayashi A, Kooguchi K, Kitamura Y, Onodera H, ve ark.** Upregulation of two death pathways of perforin/granzyme and FasL/Fas in septic acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* **2000**. 161: 237–243.
40. **Hawkey C.J.** Cox-2 inhibitors. *Lancet* **1999**, 353:307–14.
41. **Henricks PA, Nijkamp FP.** Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* **2001**, 14: 409–420.
42. **Hoshino T, Kato S, ve ark.** Pulmonary inflammation and emphysema: role of the cytokines IL-18 and IL-13. *Am J Respir Crit Care Med* **2007**, 176:49–62.
43. **Husain K, Scott BR, Reddy SK, Somani SM.** Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defence system. *Alcohol* **2001**, 25 : 89-97.
44. **Imai K, Dalal SS, Chen ES, ve ark.** Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* **2001**, 163: 786–791.
45. **Imaoka H, Hoshino T, Takei S, ve ark.** Interleukin-18 production and pulmonary function in COPD. *Eur Respir J* **2008**, 31:287–297.
46. **Ingel KD, Tine D, Ken RB, Guy FJ, Guy GB.** Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respiratory Research* **2006**, 7:53
47. **Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA.** Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor κ B. *Free Radic Biol Med* **2000**, 28: 1317–1327.
48. **Janssen LJ.** Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2001**, 280: L1067–L1082.
49. **Jansen YMW, Haiten BV, Borm PJA, ve ark.** Biology of disease. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest.* **1993**, 69:261–274.
50. **JA, Roberts LJ II.** Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. *N Engl J Med* **1995**, 332:1198–1203.
51. **Jiangning T, Zhizhong M, Ling H, Ruyu D, Liming Z, ve ark.** Caffeic acid phenethyl ester possesses potent cardioprotective effects in a rabbit model of acute myocardial ischemia-reperfusion injury *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H2265–H2271, **2005**, doi:10.1152/ajpheart.

52. **Jianli N, Kangkai W, Pappachan EK.** Cerium oxide nanoparticles inhibits oxidative stress and NF- κ B activation in H9c2 cardiomyocytes exposed to cigarette smoke extract **2011**, as DOI:10.1124/jpet.111.179978
53. **Johnston JE, Sepe HA, Miano CL, Brannan RG, Alderton AL.** Meat Sci **2005**, 70:627–31.
54. **JR. Vane, JA. Mitchell, I Appleton, A. Tomlinson, D. Bishop-Bailey, J. Croxtall, DA. Willoughby.** Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91 **1994**, 2046–2050
55. **Kelsen SG, Aksoy MO, Georgy M, ve ark.** Lymphoid follicle cells in chronic obstructive pulmonary disease overexpress the chemokine receptor CXCR3. Am J Respir Crit Care Med **2009**, 179:799–805.
56. **Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ.** Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. Am J Respir Crit Care Med **1996**, 153: 530–534.
57. **Kim E, Seung Kim H, Kim S and Kim TS.** The Novel Cytokine p43 Induces IL-12 Production in Macrophages via NF- κ B Activation, Leading to Enhanced IFN- γ Production in CD4 + T Cells. J Immunol **2006**. 176;256-264
58. **Kim V, Kelemen SE, Abuel-Haija M, ve ark.** Small airway mucous metaplasia and inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. COPD **2008**, 5:329– 338.
59. **Kyungsun C. and Chulhee C.** Differential regulation of c-Jun N-terminal kinase and NF- κ B pathway by caffeic acid phenethyl ester in astroglial and monocytic cells journal of chemistry **2008**. 105:557–564.
60. **Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P.** Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. J Allergy Clin Immunol **1993**, 92: 537–548.
61. **Laranjinha J, Vieira O, Madeira V, Almeida L.** Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferrylmyoglobin: consumption vs regeneration. Arch Biochem Biophys **1995**, 323, 373–381
62. **Laurent P, Janoff A, Kagan HM.** Cigarette smoke blocks cross-linking of elastin *in vitro*. Am Rev Respir Dis **1983**, 127:189–192.
63. **Lim S, Groneberg D, Fischer A, ve ark.** Expression of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and asthmatic airways. Effect of inhaled corticosteroids. Am J Respir Crit Care Med **2000**, 162: 1912–1918.
64. **Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, ve ark.** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell **1997**, 91:479-489.
65. **Lofdahl MJ, Roos-Engstrand E, Pourazar J, ve ark.** Increased intraepithelial T-cells in stable COPD. Respir Med **2008**, 102:1812–1818.
66. **Liu Y, Gao W, Zhang D.** Effects of cigarette smoke extract on A549 cells and human lung fibroblasts treated with transforming growth factor- β 1 in a coculture system. Clin Exp Med **2010**, 10:159–167
67. **MacMicking J, Xie QW, Nathan C.** Nitric oxide and macrophage function. Annual Review of Immunology **1997**, 15:323–30.
68. **MacNee W.** Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. Eur J Pharmacol **2001**, 429:195–207.
69. **Makarov SS.** NF- κ B as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. Molecular Medicine Today **2000**, 6:441–8.
70. **Makris D, Vrekoussis T, Izoldi M, ve ark.** Increased apoptosis of neutrophils in induced sputum of COPD patients. Respir Med **2009**, 103:1130–1135
71. **Mates J.M., Perez-Gomez C., De Castro I.N.** Antioxidant enzymes and human diseases, Clin. Biochem. **1999**. 32: 595-603.
72. **Masaki K, Hidefumi F, Hitomi S, Shoei F.** Caffeic acid phenethyl ester reduces spinal cord injury-evoked locomotor dysfunction. biomedical research. **2011**, 32 (1) 1-7
73. **McCall M.R., Frei B.,** Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? Free Rad. Biol. Med. **1999**. 26: 1034-1105.

74. **Meshi B, Vitalis TZ, Ionescu D, ve ark.** Emphysematous lung destruction by cigarette smoke. The effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2002**, 26: 52–57.
75. **Mio T, Romberger DJ, Thompson AB, Robbins RA, Heires A, Rennard SI.** Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* **1997**, 155: 1770–1776.
76. **Monti M, Berti E, Carminati G, Cusini M.** Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis*. **1983**, 9: 163
77. **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**, 159:473–479.
78. **Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, ve ark.** *J Ethnopharmacol* **2005**, 102:371–6.
79. **Mortaz E, Redegeld FA, Sarir H.** Cigarette smoke stimulates the production of chemokines in mast cells. *J Leukoc Biol* **2008**, 83:575–580.
80. **Mushfiquddin K, Chinnasamy E, Mubeen AA, Inderjit S, Avtar KS.** Caffeic acid phenethyl ester reduces neurovascular inflammation and protects rat brain following transient focal cerebral ischemia *Journal of Neurochemistry*, **2007**, 102, 365–377
81. **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
82. **Natarajan K, Singh S, Burke Jr TR, Grunberger D, Aggarwal BB.** Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, 93:9090–5.
83. **Ogura M, Kitamura M.** Oxidant stress incites spreading of macrophages via extracellular signal-regulated kinases and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* **1998**, 161: 3569–3574.
84. **O'Reilly P, Jackson P, Noerager B, ve ark.** N-alpha-PGP and PGP, potential biomarkers and therapeutic targets for COPD. *Respir Res* **2009**, 10:38–45.
85. **Orsolic N, Terzic S, Mihaljevic Z, Sver L, Basic I.** Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2005**, 28:1928–33.
86. **Pauwels RA, Rabe KF.** Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **2004**, *Lancet* 364: 613–620.
87. **Parlakpınar H, Mortaz E, Redegeld FA, Sarir H.** Cigarette smoke stimulates the production of chemokines in mast cells. *J Leukoc Biol* **2008**, 83:575–580.
88. **Mushfiquddin K, Chinnasamy E, Mubeen AA, Inderjit S, Avtar KS.** Caffeic acid phenethyl ester reduces neurovascular inflammation and protects rat brain following transient focal cerebral ischemia *Journal of Neurochemistry*, **2007**, 102, 365–377
89. **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
90. **Natarajan K, Singh S, Burke Jr TR, Grunberger D, Aggarwal BB.** Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, 93:9090–5.
91. **Ogura M, Kitamura M.** Oxidant stress incites spreading of macrophages via extracellular signal-regulated kinases and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* **1998**, 161: 3569–3574.
92. **O'Reilly P, Jackson P, Noerager B, ve ark.** N-alpha-PGP and PGP, potential biomarkers and therapeutic targets for COPD. *Respir Res* **2009**, 10:38–45.
93. **Orsolic N, Terzic S, Mihaljevic Z, Sver L, Basic I.** Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2005**, 28:1928–33.
94. **Paramo B., Hernández-Fonseca K., Estrada-Sánchez A.M., Jiménez N, Hernández-Cruz A., Massieu L.** Pathways involved in the generation of reactive oxygen and nitrogen species during glucose deprivation and its role on the death of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*. **2010**. 2.167(4): 1057-69.

95. **Parlakpınar H., Tasdemir S., Polat A., Bay-Karabulut A., Vardi N., Ucar M., Acet A.** Protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Toxicology*. **2005**, 14;207(2):169-77.
96. **Pauwels RA, Rab Tasdemir S, Polat A, Bay-Karabulut A, Vardi N, ve ark.** Protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Toxicology*. **2005**, 14;207(2):169-77.
97. **Petruzzelli S, Hietanen E, Bartsch H, Camus AM, Mussi A, ve ark.** Oxidative stress in testicular tissues of rats exposed to cigarette smoke and protective effects of caffeic acid phenethyl ester. *Asian J Androl* **2006**, 8 (2): 189–193
98. **Pilette C, Ouadrhiri Y, Godding V, Vaerman JP, Sibille Y.** Lung mucosal immunity: immunoglobulin-A revisited. *Eur Respir J* **2001**, 18: 571–588.
99. **Profita M, Giorgi RD, Sala A, ve ark.** Muscarinic receptors, leukotriene B4 production and neutrophilic inflammation in COPD patients. *Allergy* **2005**, 60:1361–1369.
100. **Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W.** Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med* **1996**, 154:1055–1060
101. **Ramesh T, Mahesh R, Sureka C, and Begum VH.** Cardioprotective effects of *Sesbania grandiflora* in cigarette smoke-exposed rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **2008**, 52:338-43.
102. **Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM ve ark.** Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* **2001**, 276:33869-33874.
103. **Renda T, Baraldo S, Pelaia G, ve ark.** Increased activation of p38 MAPK in COPD. *Eur Respir J* **2008**, 31:62–69.
104. **Ristimäki A.** Cyclooxygenase 2: from inflammation to carcinogenesis, Novartis Found. Symp. 256 **2004**, 215–2218 discussion 221–226, 259–269.
105. **Ritola O, Peters LD, Livingstone DR, Lindström-Seppä P.** Effects of In vitro Exposure to Ozone and/or Hyperoxia on Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione and Lipid Peroxidation in Red Blood Cells and Plasma of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Aquac. Res.* **2002**, 33:165–175.
106. **Rusznak C, Devalia JL, Sapsford RJ, Davies RJ.** Ozone-induced mediator release from human bronchial epithelial cells in vitro and the influence of nedocromil sodium. *Eur Respir J* **1996**, 9: 2298–2305.
107. **Sarir H, Henricks PAJ, van Houwelingen AH.** Cells, mediators and Tolllike receptors in COPD. *Eur J Pharmacol* **2008**, 585:346–353.
108. **Sasaki N., Toda T., Kaneko T., Baba N., Matsuo M.,** Flavonoids suppress the cytotoxicity of linoleic acid hydroperoxide toward PC12 cells, *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25: 1093–1096.
109. **Shapiro SD, Senior RM.** Matrix metalloproteinases. Matrix degradation and more. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1999**, 20: 1100–1102.
110. **Shapiro SD, Reilly JJJ, Rennard SI, Mason R.J., Martin T.R., ve ark.** Chronic Bronchitis and Emphysema. In: Nadel Textbook of Respiratory Medicine, Vol. I. Saunders, Philadelphia **2010**, 919–967.
111. **Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, ve ark.** Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* **1999**, 144:281-292.
112. **Simpson JL, Phipps S, Gibson PG.** Inflammatory mechanisms and treatment of obstructive airway diseases with neutrophilic bronchitis. *Pharmacol Ther* **2009**, 124:86–95.
113. **Sud*ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, ve ark.** Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS* **1993**, Lett 329, 21–24.
114. **Tang D, Kidd VJ.** Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *J Biol Chem* **1998**, 273:28549-28552
115. **Tomita K, Barnes PJ, Adcock IM.** The effect of oxidative stress on histone acetylation and IL-8 release. *Biochem Biophys Res Comm* **2003**, 301: 572–577.

116. **Toyoda T, Tsukamoto T, Takasu S, Shi L, Hirano N, ve ark.** Anti-inflammatory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a nuclear factor- κ B inhibitor, on Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Int. J. Cancer* **2009**, 125, 1786–1795
117. **Tsuda Y, Noguchi T, Mochizuki H, ve ark.** Patients with mild-to-moderate asthma may develop clinically significant chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology* **2009**, 14:529–536.
118. **Tzanakis N, Chrysofakis G, Tsoumakidou M, ve ark.** Induced sputum CD8 γ T-lymphocyte subpopulations in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* **2004**, 98:57–65.
119. **Wei X, Zhao L, Ma Z, Holtzman D, Yan C.** Caffeic acid phenethyl ester prevents neonatal hypoxic–ischaemic brain injury. *Brain* **2004**, 127, 2629–2635
120. **Witowski J., Ksiazek K., Jorres A.** Interleukin-17: A mediator of inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* **2004**. 61:567-79.
122. **Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes C.J, Telser J.** Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* **2004**. 266:37-56
123. **Zeidel A, Beilin B, Yardeni I, Mayburd E, Smirnov G, Bessler H.** Immune response in asymptomatic smokers. *Acta Anaesthesiol Scand* **2002**, 46:959–964.

8. ÖZGEÇMİŞ

Fırat Barış BARLAS, 1986 yılında Şanlıurfa'nın Hilvan ilçesinde doğdu. ilkokulu Şair Nabi İlkokulunda ortaokulu İzmir'in Torbalı ilçesinde Cengiz Topel İlköğretim Okulunda okudu. Lise eğitimini Torbalı Anadolu Lisesinde tamamladıktan sonra 2004 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde eğitime başladı. Mezun olduktan sonra 2009 yılında aynı üniversitenin Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Veteriner) Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.