



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN YAPIMI NANOPARTİKÜLLERİN KRONİK OBSTRÜKTİF
AKCİĞER HASTALIĞI (KOAİ) OLAN BİREYLERİN BRONŞ
EPİTEL HÜCRE KÜLTÜR PERMABİLİTESİNE ETKİLERİ**

Sedat İLHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMEL SOLUNUM BİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANLAR

Prof. Dr. Hasan BAYRAM

Prof. Dr. Ayten FİLİZ

GAZİANTEP

2016

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

**İNSAN YAPIMI NANOPARTİKÜLLERİN KRONİK OBSTRÜKTİF AKCİĞER
HASTALIĞI (KOAİ) OLAN BİREYLERİN BRONŞ EPİTEL HÜCRE KÜLTÜR
PERMABİLİTESİNE ETKİLERİ**

Sedat İLHAN

Yüksek Lisans Tezi

Tez Savunma Tarihi:

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof.Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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

Prof. Dr. Hasan BAYRAM

Temel Solunum Biyolojisi Anabilim Dalı Başkanı

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

Tez Danışmanları

I. Prof.Dr. Hasan BAYRAM

II. Prof.Dr. Ayten FİLİZ

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

Tez Jürisi İmzası

Prof. Dr. Hasan BAYRAM

.....

Doç. Dr. İlker SAYGILI

.....

Yrd.Doç. Dr. Nazan BAYRAM

.....

BEYAN

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

20. 06. 2016

Sedat İLHAN

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında her daim bana destek olan, akademik olarak bilgisini sonsuz bir sabır ile paylaşan, fikirleri ile aydınlanmamı sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Hasan BAYRAM'a,

Katkılarından dolayı sayın hocam Prof.Dr. Ayten FİLİZ'e,

Tezime konu olan çalışmaların yürütülmesi için gerekli hasta ve akciğer dokularının sağlanmasında gösterdikleri işbirliği ve yardımlarından dolayı Göğüs Cerrahisi ve Patoloji Anabilim Dalları'na,

Tezin her aşamasında bana yol gösteren, zorlandığım her an desteğini esirgemeyen, işin mutfağını müthiş bir titizlikle bana öğreten çok kıymetli Uzman Dr. Demet TAŞDEMİR'e,

Berber çalışmaktan ve beraber öğrenmekten büyük zevk aldığım ekip arkadaşlarım Ufkun ÖZDEMİR, İbrahim Halil TOY ve Pınar YUMRUTAŞ'a,

Tezi bilimsel olarak desteğe değer bularak sağladığı fon ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK)(Proje No: 113S437),

Bana bu süreçte sabırla destek olan, her zaman yanımda olan aileme,

Sevgisi ile beni ayakta tutan sevgili eşim Pelin'e

Teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

KAPAK.....	i
TEZ ONAYI SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
RESİMLER LİSTESİ	xvii
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Nanopartiküllerin Genel Özellikleri	4
2.2. Nanopartiküllerin Kullanım Alanları.....	5
2.3. Nanopartiküllerin Sağlık Üzerine Etkileri ve Mekanizmaları	6
2.3.1. Nanopartiküllerin Vücuda Giriş Yolları ve Hedef Dokular.....	6
2.3.1.1. Nanopartiküllerin Akciğerde Alıkonulma Mekanizmaları	7
2.3.1.2. Nanopartiküllerin Solunum Sisteminden Uzaklaştırılma Mekanizmaları	8
2.3.2. Nanopartiküllerin Hücresel Etki Mekanizmaları	9
2.3.2.1. Nanopartiküllerin DNA Üzerine Etkileri.....	10

2.3.2.2. Nanopartiküller ve Oksidatif Stres	11
2.3.2.3. Nanopartiküller ve Permabilite	12
2.3.2.4. Nanopartiküller ve İnflamasyon	12
2.4. Çok Duvarlı Karbon Nanotüpler.....	13
2.4.1. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Yapısı, Özellikleri ve Kullanım Alanları	13
2.4.2. Kullanım Alanları	13
2.4.3. Sağlık Üzerine Etkileri.....	14
2.5. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı	15
2.5.1. Epidemiyolojisi	16
2.5.1.1. Mortalite.....	16
2.5.1.2. Prevalans ve Morbidite	16
2.5.2. Risk Faktörleri	17
2.5.2.1. Aktif ve Pasif Sigara Kullanımı	17
2.5.2.2. Mesleki Maruziyet	17
2.5.2.3. İç Ortam Hava Kirliliği.....	17
2.5.2.4. Genetik	18
2.5.3. Doğal Seyir ve Prognoz	18
2.5.4. Patolojisi	18
2.5.5. Patogenezi	19
2.5.6 KOAH Tedavisi	20
2.5.6.1. Hasta Eğitimi	20
2.5.6.2. Risk Faktörlerinin Azaltılması.....	20

2.5.6.3. Stabil KOAH Tedavisi	20
2.5.6.4. Alevlenme Tedavisi	20
2.5.6.5. Farmakolojik Tedavi	21
2.5.6.5.A. Roflumilast	21
2.5.6.5.B. Formoterol	22
2.5.7.6. Farmakolojik Olmayan Tedavi	22
2.6. Bronş Epitel Hücreleri ve Görevleri	22
2.6.1. Silyalı Hücreler	23
2.6.2 Salgı Hücreleri	23
2.6.2.1 Goblet Hücreleri	23
2.6.2.2 Klara Hücreleri	24
2.6.2.3 Seröz Hücreleri	24
2.6.3 Bazal Hücreler	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Çalışma Hastaları	26
3.2. Primer Bronş Epitel Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerleri	27
3.2.1. Taşıma Besiyeri (TM)	27
3.2.2. Fotal Buzağı Serumı (Fetal Calf Serum, FCS) Besiyeri	27
3.2.3 Nu Serum 4 Besiyeri	27
3.2.4. Serumsuz ('Serum Free', SF) Besiyeri	27
3.3. Doku Eksplantlarının Kültür İçin Hazırlanması	27
3.4. Bronş Epitel Hücre Kültürü	28
3.5 Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Hazırlanması	29

3.6. Transepitelyal Elektriksel Direnç Ölçümü.....	30
3.7. Laktat Dehidrogenaz Ölçümü	30
3.8. İstatistiksel Analiz.....	30
4.BULGULAR.....	31
4.1. Primer BEH Kültürü	31
4.2. ÇDKNT'nin Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi	32
4.2.1. ÇDKNT'nin Sigarasız Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi	32
4.2.2. ÇDKNT'nin KOAH' lı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi	33
4.2.3. ÇDKNT'nin Sigaralı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi	34
4.3. Roflumilastın ÇDKNT Varlığında BEH Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi.....	35
4.3.1. Roflumilastın ÇDKNT Varlığında Sigarasız BEH Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi	35
4.3.2 Roflumilastın ÇDKNT Varlığında KOAH'lı BEH Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi	36
4.3.3 Roflumilastın ÇDKNT Varlığında Sigaralı BEH Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi	37
4.4. Formoterolün ÇDKNT Varlığında BEH Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi	38
4.4.1. Formoterolün ÇDKNT Varlığında Sigarasız BEH Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi	38

4.4.2. Formoterolün ÇDKNT Varlığında KOAH'lı BEH Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi	39
4.4.3. Formoterolün ÇDKNT Varlığında Sigaralı BEH Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi	40
4.5. ÇDKNT'nin BEH Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi.....	41
4.5.1. ÇDKNT'nin Sigarasız BEH Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi.....	41
4.5.2. ÇDKNT'nin KOAH'lı BEH Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi	42
4.5.3. ÇDKNT'nin Sigaralı BEH Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi	43
4.6. Formoterolün ÇDKNT Varlığında BEH Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi	44
4.6.1. Formoterolün ÇDKNT Varlığında Sigarasız BEH Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi	44
4.6.2. Formoterolün ÇDKNT Varlığında KOAH'lı BEH Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi.....	45
4.6.3. Formoterolün ÇDKNT Varlığında Sigaralı BEH Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi.....	46
4.7. Roflumilastın ÇDKNT Varlığında BEH Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi.....	47
4.7.1. Roflumilast'ın ÇDKNT Varlığında Sigarasız BEH Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi.....	47

4.7.2. Roflumilastın ÇDKNT Varlığında KOAH'lı BEH Kùltürlerinden	
Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi.....	48
4.7.3. Roflumilastın ÇDKNT Varlığında Sigaralı BEH Kùltürlerinden	
Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi.....	49
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
7. KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	73

SİMGE ve KISALTMALAR

AAT	Alfa-1 Antitripsin
AP-1	Aktivator Protein 1
ATS	Amerikan Toraks Derneği ('American Thoracic Society')
BAL	Bronko Alveoler Lavaj
BEH	Bronş Epitel Hücresi
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat ('Cyclic adenosine monophosphate')
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat ('Cyclic guanosine monophosphate')
CD 8+	Küme Farklılaşması 8 Pozitif ('Cluster of differentiation 8 +')
ÇDKNT	Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
DALY	İşlev Kaybına Uğramış Yaşam Yılı ('Disability Adjusted Life Years')
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ECRHS	Avrupa Topluluğu Solunum Sağlığı Araştırması ('European Community Respiratory Health Survey')
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü ('Epidermal growth factor receptor')
ELISA	Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi ('Enzyme Linked Immunosorbent Assay')
ERS	Avrupa Solunum Derneği ('European Respiratory Society')
FCS	Fötal Buzağı Serumu ('Fetal Calf Serum')
FEV 1	Zorlu ekspirasyonun 1. saniyesinde atılan volüm

G-CSF	Granulosit- Koloni Sitümüle Edici Faktör ('Granulocyte colony-stimulating factor')
GM-CSF	Granulosit Makrofaj-Koloni Sitümüle Edici Faktör ('Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor')
GOLD	Obstrüktif akciğer hastalıkları için küresel girişim ('The Global Initiative for Obstructive Lung Disease')
IL	İnterlökin
KNT	Karbon Nanotüp
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LTB 4	Lökotrien B4
MAPK	Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
MMP	Matriks Metalloproteinazlar
NF-κB	Nükleer Faktör-kappa B
NP	Nanopartikül
NuS-IV	Nu Serum-IV
PDE	Fosfodiesteraz ('Phosphodiesterase')
PK	Protein Kinaz
ROS	Reaktif Oksijen Ürünü ('reactive oxygen species')
SABA	Kısa etkili Beta 2 Agonist ('Short Acting Beta2 Agonist')
SAMA	Kısa Etkili Muskarinik Antagonist ('Short Acting Muscarinic Antagonist')
SeO	Seryum Oksit
SF	Serumsuz Vasat
TDKNT	Tek Duvarlı Karbon Nanotüp

TiO₂ Titanyum Dioksit

TM Taşıyıcı Vasat

ZnO Çinko Oksit



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Çalışma hastalarının demografik özellikleri.....	26
--	----



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Nanopartiküllerin vücuda giriş yolları ve hedef organlar.....	7
Şekil 2. Nanopartiküller ve oksidatif stres arasındaki ilişki.....	11
Şekil 3. Çok duvarlı karbon nanotüp geometrik yapısı.....	13
Şekil 4. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Sigarasız Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi.....	32
Şekil 5. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin KOAH' lı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi.....	33
Şekil 6. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Sigaralı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi.....	34
Şekil 7. Roflumilastın Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin varlığında Sigarasız Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi	35
Şekil 8. Roflumilastın Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin varlığında KOAH'lı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi	36
Şekil 9. Roflumilastın Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin varlığında Sigaralı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi	37
Şekil 10. Formoterolün Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Varlığında Sigarasız Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi	38
Şekil 11. Formoterolün Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Varlığında KOAH'lı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi	39
Şekil 12. Formoterolün Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Varlığında Sigaralı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi	40
Şekil 13. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Sigarasız Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi.....	41

Şekil 14. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin KOAH'lı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi.....	42
Şekil 15. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Sigaralı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi.....	43
Şekil 16. Formoterolün Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Varlığında Sigarasız Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi.....	44
Şekil 17. Formoterolün Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Varlığında KOAH'lı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi.....	45
Şekil 18. Formoterolün Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Varlığında Sigaralı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi.....	46
Şekil 19. Roflumilastın Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Varlığında Sigarasız Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi.....	47
Şekil 20. Roflumilastın Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Varlığında KOAH'lı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi.....	48
Şekil 21. Roflumilastın Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Varlığında Sigaralı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi.....	49

RESİMLER LİSTESİ

- Resim 1.** Nanopartiküllerin tarihteki ilk kullanımı olduğu düşünölen kadeh.....5
- Resim 2.** Bronş epitelyumu elde edilmesi.....28
- Resim 3.** Bronş epitelyumu hücre kültürünün aşamaları.....29



ÖZET

İNSAN YAPIMI NANOPARTİKÜLLERİN KRONİK OBSTRÜKTİF AKCİĞER HASTALIĞI (KOAİ) OLAN BİREYLERİN BRONŞ EPİTEL HÜCRE KÜLTÜR PERMABİLİTESİNE ETKİLERİ

Sedat İLHAN

Yüksek Lisans Tezi, Temel Solunum Biyolojisi Anabilim Dalı

Danışmanlar:

Prof. Dr. Hasan BAYRAM ve Prof. Dr. Ayten FİLİZ

Haziran-2016, 73 sayfa

Nanoteknolojinin günlük hayatta yaygınlaşması, nanopartiküllerin (NP) kullanımının giderek artmasına yol açmıştır. Diğer yandan, in vivo ve in vitro çalışmalar NP'lerin sağlık üzerinde ciddi risk oluşturabileceklerini düşündürmektedir. Ancak, altta yatan mekanizmalar yeterince bilinmemektedir. Bu çalışmada çok duvarlı karbon nanotüplerin (ÇDKNT) KOAH' lı, sigara içen ancak KOAH gelişmeyen ve sigara içmeyen bireylerin bronş epitel hücre (BEH) kültürlerinin permabilitesi ve toksisitesi üzerine olan etkilerini araştırmayı amaçladık. BEH kültürlerini roflumilast (0.01, 0.1 ve 1µM) ve formoterol (0.01, 1 ve 100µM) yokluğunda ve varlığında ÇDKNT'lerin (0-100 µg/ml) 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde trans epitelyal elektriksel direnç (TEED) üzerine olan etkisini araştırdık. 24. saatte toplanan kültür vasatında laktat dehidrogenaz (LDH) analizi yapıldı. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre, ÇDKNT'ler BEH kültürlerinin permabilitesini etkilemedi. Roflumilast ve formoterol da anlamlı bir etkiye bulunmadı. Benzer şekilde, ÇDKNT'ler KOAH'lı ve sigara içen bireylerin BEH kültürlerinden LDH salınımını etkilemezken, 50 (ortanca= 0.5311 IU/µg hücre protein ve 1.413 IU/µg hücre protein, p= 0.0001) ve 100µg/ ml (ortanca: 0.5311 IU/µg hücre protein ve 3.357 IU/µg hücre protein, p<0.0001) ÇDKNT sigara içmeyen bireylerin BEH kültürlerinden LDH salınımını artırdı. ÇDKNT (100µg/ml)'e varlığında, formoterol (100µM) ve roflumilastın yüksek dozları (1µM) LDH salınımını artırırken, düşük dozları LDH salınımını baskıladı. Bulgularımız, ÇDKNT'lerin kullanılan dozlarda BEH kültürleri üzerinde sınırlı toksik etkiye sahip olduklarını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Bronş epitel hücresi, çok duvarlı karbon nanotüp, KOAH, laktat dehidrogenaz, transepitelyal elektriksel direnç.

ABSTRACT

EFFECTS OF ENGINEERED-NANOPARTICLES ON PERMEABILITY OF BRONCHIAL EPITHELIAL CELL CULTURES FROM SUBJECTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE (COPD)

Sedat İLHAN

Master Thesis, Department of Basic Respiratory Biology

Supervisors:

Prof. Dr. Hasan BAYRAM and Prof. Dr. Ayten FİLİZ

June-2016, 73 pages

Nanoparticles (NPs) have been widely used because of common use of nanotechnology. *In vivo* and *in vitro* studies reported detrimental effects of NPs at cellular level. However, the underlying mechanisms are not clear known enough. The objectives of the present study were to investigate the effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) on permeability and toxicity of bronchial epithelial cell (BEC) cultures of smokers with and without COPD, and non-smokers. We incubated BEC cultures with MWCNT (0-100 µg/ml) and studied trans-epithelial electrical resistance (TEER) at T0, T2, T4, T6 and T24 in the absence and presence of roflumilast (0.01, 0.1, 1 µM) or formoterol (0.01, 1, 100 µM). Cell culture supernatants, which collected at T24, were analysed for lactate dehydrogenase (LDH). MWCNT did not show any effect on TEER of BEC cultures. Likewise, formoterol and roflumilast did not affect TEER. Although MWCNT did not show any significant effect on LDH release from BECs from COPD patients and smokers, 50 µg/ml (median= 0.5311 IU/µg cellular protein v.s. 1.413 IU/µg cellular protein, p: 0.0001) and 100 µg/ml (median: 0.5311 IU/µg cellular protein v.s. 3.357 IU/µg cell protein, p<0.0001) MWCNT significantly induced LDH release from BECs of non-smokers. Higher concentrations of formoterol (100 µM) and roflumilast increased the LDH levels of BECs, whereas lower doses of both drugs decreased the LDH levels. Our findings suggest that MWCNT, at the concentrations studied, have limited toxic effects on BEC cultures.

Keywords: Bronchial epithelial cells, COPD, multi-walled carbon nanotubes, lactate dehydrogenase, trans-epithelial electrical resistance.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nanopartiküllerin (NP) hayatın pek çok alanında kullanımları giderek artarken, bu partiküllerin başta akciğerler olmak üzere insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olabileceğine dair ciddi endişeler bulunmaktadır (1). Bu konuda yapılan in vivo hayvan çalışmaları ve in vitro laboratuvar çalışmaları NP'lerin hava yollarında ve akciğer parankiminde inflamatuvar değişikliklere, fibrozise ve hücre düzeyinde toksik etkilere yol açtığını düşündürmektedir. Ancak altta yatan mekanizmalar yeterince açık değildir (2). NP'lerin nazal ve bronş epitel hücre canlılığını, apoptozisini ve bu hücrelerden inflamatuvar mediyatör salınımını etkileyebileceği gösterilmiştir (3). Ancak NP'lerin primer bronş epitel hücre (BEH) permabilitesini etkileyip etkilemediği ve altta yatan mekanizmalar bilinmemektedir. Diğer yandan, NP'lerin çağımızın önemli bir halk sağlığı tehditi olan kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) gelişiminde risk oluşturabilecekleri düşünülmektedir (4).

Bu çerçevede bu tez çalışmamızın amacı; sigara içmeyen gönüllüler, sigara içen ancak KOAH gelişmemiş (Sigaralı) bireyler ve KOAH'lı hastaların akciğer eksplantlarından primer BEH kültürleri elde ederek, insan yapımı NP'lerin bu hücrelerin, (i) permabiliteleri üzerine olan etkisini, kültürlerin trans epitelyal elektriksel direncini (TEED) ölçmek suretiyle araştırmak; (ii) hücre düzeyindeki toksik etkilerini laktat dehidrogenaz (LDH) salınımı ile değerlendirmek; (iii) formoterol gibi β_2 -agonistlerin ve roflumilast gibi fosfodiesteraz (PDE) 4 inhibitörlerinin bu sürece etkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Nanoölçekli materyallerle ilgili yapılan çalışmalar son zamanlarda önemli bir araştırma alanı olma yolunda hızla ilerlemektedir. Nano materyal olarak sınıflandırılan yapılar; nanokristaller, nanopartiküller, nanotüpler, nanoteller, nanoçubuklar ya da nano ince filmler gibi farklı gruplara ayrılmışlardır. Nanoölçekli malzemelere olan alakanın bu denli artmasının en büyük nedeni yapısında NP olan bu maddelerin farklı sıra dışı özellikler ve işlevsellik göstermeleridir (5, 6).

2.1. Nanopartiküllerin Genel Özellikleri

Boyutları 5 -100 nm arasında değişkenlik gösteren, doğal ya da yapay, genel olarak belirli bir şekle sahip olmayan ve yarı kristal özellik gösteren yapılardır (7). NP'lerden oluşan maddeler diğer ticari materyallerden genel olarak ayrı ve üstün kabul edilen bazı özellikler göstermektedirler. Sıklıkla vurgulanan nanopartikül özelliklerinin bu denli ilgi görmesinin nedenleri ise; kuantum-boyut etki mekanizmaları, elektronik doğasının boyutlarına bağımlılığı, yüzey atomlarının eşsiz özgüllükleridir. Ayrıca yüksek yüzey/hacim oranı da nanopartiküller için ön plana çıkan bir başka önemli özelliktir (8). Bunların yanı sıra son derece hafif olmaları, yüksek esneme kabiliyetleri ve bugüne kadar bilinen en mukavim fiber olmaları da diğer dikkat çekici özellikleridir. Grafenin kendisine has bal peteği örtülü simetrisi ve elektriksel yapısı, nanotüplerin elektriksel, fiziksel, özelliklerini çok önemli bir biçimde etkilemektedir. Nanotüplerin bu çok çeşitli ve sıra dışı özellikleri atomlarının dizilişi ile doğrudan alakalıdır (9).

Nanoölçekli boyutlar, manyetik tutumda gelişmeye neden olur. Bu yüzden, NP içerikten oluşan son derece yumuşak yapıda manyetik materyaller oluşabileceği gibi son derece sert yapıya sahip manyetik materyaller de bulunabilmektedir. NP'lerkimyasal yapı ve boyut, iyonik kapasiteleri veya elektron ilgisini kontrol ederler. Homojen olarak yayılım gösterdiklerinde, polimer yapılara yönelik metal nanoparçacıkların termal özelliklerinde önemli bir gelişim sağlanarak, işleme süresi azaltabilir. Erime sıcaklığı, azalan nanopartikül yüzey alanıyla beraber küçülür (10).

Tüm bunlarla birlikte NP'ler yüksek reaktiviteye sahip moleküllerdir (11). Partikülün yüzeyindeki bu reaktivite artışı NP'lerin biyolojik sistemler için yararlı olacağı yönündeki (antioksidan, farmakolojik ajanları taşıma kapasitesi, geçirgenlik artışı gibi)

eğilimini belirlediği gibi zararlı (toksikite, oksidatif stresin artması, reaktif oksijen ürünleri, hücrel fonksiyonların sekteye uğraması gibi) etkilerini de belirleyici rol oynar (12). Taşıdıkları özellikler nedeniyle çok çeşitli nanopartikül grupları mevcuttur. Metal NP'ler, gümüş NP'ler, kadmiyum sülfür NP'ler, bakır NP'ler, altın NP'ler ve karbon NP'ler gibi (13).

2.2. Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

Nanopartiküller, nanoteknoloji ile birlikte hayatımıza dâhil etmek zorunda kaldığımız sanayileşme ürünleridir. Bu yüzden nanoteknolojinin var olduğu ilk andan bu güne varlıklarını sürdürmektedirler. Eski Mısır'da M.Ö 1200 yıllarında altının eritilmesi nanopartiküllerin insan hayatına karışmasının ilk adımıdır (14). Daha sonra cam ve mimari renklendirmelerinde çeşitli nanopartiküller kullanılmıştır (15).



Resim 1. Nanopartiküllerin tarihteki ilk kullanımı olduğu düşünülen kadeh (14)

Günümüzde ise pek çok alanda çok farklı kullanım amaçlarına hizmet etmek üzere kullanılan nanoteknoloji son yıllarda gelişmiş ve büyük yatırımlar almaktadır. Uygulamalar genel olarak pasif nanopartikül kullanımı ile sınırlı kalmaktadır. Bu nanopartiküller; güneş kremi, kozmetik ürünleri, yüzey kaplama malzemeleri ve bazı yiyecek ürünlerindeki TiO_2 içerir. Ayrıca yiyecek-içecek paketlemede, giyim, dezenfektanlar, boya gibi malzemelerde ve ev aletlerinde gümüş; kozmetik ve güneş kremindeki ZnO ve yakıt katalizörü olarak SeO de bu nanopartiküllere örnektir (16).

Başta elektronik ve bilişim teknolojileri olmak üzere, sağlık ve ilaç sektörü, enerji ve çevre sektörü, ulaşım sektörü, inşaat sektörü, gıda ve tarım sektörü, tekstil sektörü, havacılık ve uzay sektörü ve savunma sektörü nanoteknolojiden son derece fazlaca faydalanmaktadır. Tıp uygulamalarında nanopartiküller görüntüleme ve teşhis, ilaç taşınması, kanser tedavisi, gen terapisi gibi alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır (17).

Nanoteknolojinin ileri uygulamaları, tenis toplarının normal örneklerine göre çok daha uzun ömürlü olmasını, golf toplarının müthiş bir sürtünme kuvveti önleyen yüzeyleri ile havada daha uzun süre uçmasını, tüm dış kaplama unsurlarının çok daha dayanıklı ve daha sert yüzeye sahip olmasını sağlar. Çoraplardan pantolonlara hemen hemen tüm kıyafetlerin daha dayanıklı olması, yazın serin kışın sıcak tutan özel içeriklerin sağlanması yine NP' ler sayesinde mümkündür. Yara bantlarının yaraları çok daha çabuk iyileştirmelerinden tutun bilgisayarda bile artık NP' lerin izi vardır. Tüm bu uygulamalar ürünlerin daha ucuz, daha kolay ulaşılabilir olması adına da umut vericidir (18).

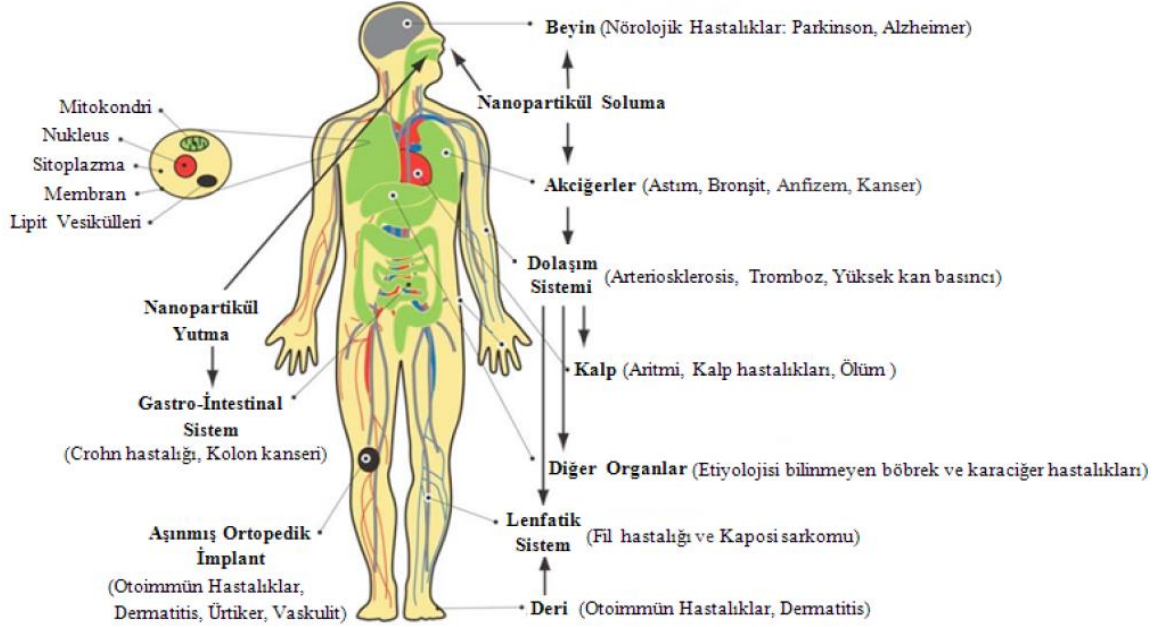
2.3. Nanopartiküllerin Sağlık Üzerine Etkileri ve Mekanizmaları

Nanoteknolojinin bu önüne geçilemez yükselişi nanopartikül içeren malzemelerin artmasına neden olmuş, bu yüzden insanların bu nanopartiküllerle solunum sistemi, sindirim sistemi ve deri yoluyla teması kaçınılmaz hale gelmiştir. Buna karşın nanoteknolojinin de sağlık üzerine etkileri henüz yeterince bilinmemektedir. Nanopartiküllerin potansiyel riskleri, zararları ve güvenilirliğinin tam olarak anlaşılması ve aktarılması gerekmektedir. Nanopartiküller solunan hava vasıtasıyla vücuda alındıklarında solunum sisteminde birikebilmektedirler (19, 20). Alınan nanopartiküllerin çok az miktarı epitel ve endotel hücreleri aşarak dolaşım sistemi vasıtasıyla kemik iliği, lenf nodü, dalak ve kalp gibi önemli dokulara ulaşabilirler. Nanopartiküllerin merkezi sinir sistemi ve gangliyonları geçerek sinir hücrelerine yerleştikleri tespit edilmiştir. Deri üzerinden vücuda giren nanopartiküller lenfatik kanallar vasıtasıyla vücuda dağılırlar (2).

2.3.1. Nanopartiküllerin Vücuda Giriş Yolları ve Hedef Organları

Nanoteknoloji ürünlerinin havaya saldığı partikül yoğunluğu kimi zaman yüzlerce mikrogram/ metreküp oranlarına kadar yükselebilmektedir (2). Özellikle iş ortamlarında solunun havanın içerisinde bulunan NP miktarının tam olarak bilinmesi henüz mümkün

değildir (2). NP'lerin hava yolu ile taşınıp taşınmadığı henüz bilinmemektedir. Ancak yapılan pek çok in vivo çalışma NP'lerin memeli solunum sistemine ciddi zararlar verdiğini göstermiştir. İnsan yapımı NP'lerin vücuda giriş yolları başta solunum sistemi olmak üzere sindirim sistemi ve deridir. Her ne kadar bu girişler birçok savunma mekanizması ile etkin olarak korunsun da bu savunma mekanizmaları her zaman etkili bir şekilde görevini yerine getirememektedir (2).



Şekil 1. Nanopartiküllerin vücuda giriş yolları ve hedef organlar (21)

2.3.1.1. Nanopartiküllerin Akciğerde Alıkonulma Mekanizmaları

İnsan solunum sisteminde, solunan NP'lerin mukozal yüzeyden bertaraf edilmesi için birçok savunma mekanizması bulunur (2). Solunan NP'lerin solunum sisteminde birikme oranı partikülün aerodinamik özelliklerine bağlı olmaksızın termodinamik özelliklere bağlı olarak değişebilir (22). NP'lerin akciğerlerde alıkonulması genel olarak beş mekanizma ile anlatılabilir. Bunlar eylemsizlik momentumu, sedimentasyon, sıkışma, difüzyon ve elektrostatik çökeltme şeklinde sıralanabilir (23). Eylemsizlik momentumu, NP yeterli kuvvete sahip olduğunda gerçekleşir. Hava ile taşınan NP'ler uzun ve kıvrımlı hava yollarında yol alırken akciğer duvarına çarparlar ve NP'ün momentumuna göre alıkonulurlar (23). Sedimentasyonda ise NP'ler zamana bağlı olarak yerçekimi ile birlikte çökerler. Bu nedenle nefes tutulması gibi nedenlerle NP'ler akciğerlerde alıkonulurlar (23). Solunum yoluyla alınan NP'lerin en önemli birikim mekanizması difüzyondur. Difüzyon, nispeten hava akımının az olduğu bronkoalveoler

alandaki gerçekleşir. Soluk ile alınan NP' ler bu bölgede daha derinlere doğru difüze olarak bronkoalveoler yüzeye doğrudan temas ederler (22, 23). NP' lerin genel olarak alıkonulma oranı NP' ün yüzey alanına, fizyolojik durumuna, çapına ve fiziko-kimyasal durumuna bağlı olarak değişir. Aynı zamanda solunan havanın kalitesi de bu oranı etkileyen başka bir faktördür (23). 2008 yılında yapılan bir çalışma 100 nm'lik karbon partiküle maruz bırakılan insanların havayollarında partikül çapı ile alıkonulma süresinin doğrudan bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Maruz kalınan partiküllerin % 25'lik kısmı ilk 24 saatlik dilimde mukosilier klirens ile bertaraf edilmiştir. Geri kalan % 75' lik kısmı ise 48 saatten daha uzun süre akciğer dokusunda kalmaya devam etmiştir (22). Bu çalışma solunan partiküllerin bir kısmının mukosilier klirens ile akciğerlerden uzaklaştırıldığını gösterirken, büyük çoğunluğunun ise perisilier klirens ile mukus tabakasının derinliklerine itilerek epitel hücreleri ile doğrudan temasa geçebilecek konuma geldiklerini savunmuştur. Başka bir yorum olarak da lipit, protein benzeri hücrel komplekslerle birleşip indirgenerek akciğer dokusunda alıkonulduğu belirtilmiştir (22). TiO₂ ile yapılan bir başka çalışmada ise nanopartiküllerin 1 saat gibi kısa bir süre içerisinde epitel dokusunun içine girerek akciğer dokusunun derinliklerine nüfuz ettiği gösterilmiştir (24).

NP'ler solunum sisteminde bir süreliğine de olsa depo edildikten sonra farklı yol ve mekanizmalarla farklı dokulara ulaşabilirler. Epitel dokusuna temas eden NP' ler buradan kan ve lenf dolaşımına geçebilirler. Kan dolaşımına ulaşan NP'lerin diğer dokulara geçmesi çok daha kolaydır (25). Aynı zamanda havayolu sinir hücrelerine temas eden NP'ler aksonlar boyunca yol kat ederek gangliyonlara veya merkezi sinir sistemine ulaşabilirler (2).

2.3.1.2. Nanopartiküllerin Solunum Sisteminden Uzaklaştırılma Mekanizmaları

Temel olarak NP'ler iki yolla solunum sisteminden uzaklaştırılırlar. Bunlardan birincisi fiziksel uzaklaştırma yöntemleri iken bir diğeri kimyasal uzaklaştırma yöntemleridir (2). Solunan hava ile vücuda giren NP'ler pek çok fiziksel yöntemle bertaraf edilebilir. Bu yöntemlerin belirlenmesinde etmen partikülün büyüklüğü ve giriş yaptığı bölümdür (2). Örneğin alveoler bölgeye giriş yapmış çözünabilir partiküller makrofajlar tarafından fagositoz ile bertaraf edilir (22). Alveollerin yüzeyinde bulunan komplemen komponenti protein 5a kemotaktik bir ajan olup, makrofajların NP'lere doğru yönelmesini sağlar (2). Makrofajlar tarafından fagosite edilen NP'ler mukosilier klirens

ile ilgili bölgeden uzaklaştırır (2). Yapılan çalışmalar gerçekten de makrofajların önemli bir savunma elemanı olduğunu gösterse de tam anlamıyla solunum sisteminin güvende olmadığını vurgulamıştır. 2008 yılında yapılan bir çalışmada, 20 nm TiO₂ konstrasyonuna maruz bırakılan ratların bronkoalveoler lavaj'larında 24 saat sonrasında %1,7 oranında NP tespit edilmiştir (22). Tüm bunlarla beraber çözünmeyen NP'lerin uzun süreler akciğerde kalabileceği düşünülmektedir (25). Bunların dışında epitelyal endositozis ve doku arasına translokasyon yöntemleri de fiziksel uzaklaştırma yöntemleri ile birlikte sayılabilir (2).

Kimyasal olarak bertaraf etme yönteminde ise NP'ler hücre içi veya dışı sıvıda ve lipitlerde çözünebilir forma getirilir (2). Çözünmüş partiküller difüzyonla ve/ veya emilme ile kan ve lenf sistemine ulaştırılarak bertaraf edilirler (2). Bunun yanı sıra filtreleme ve proteine bağlama gibi yöntemler de kullanılabilir (2).

2.3.2. Nanopartiküllerin Hücresel Etki Mekanizmaları

Hücreler için genotoksik etkiye sahip olabileceği düşünülen NP'lerin, karsinojenik etki göstermesi ihtimal harici değildir. NP'lerin insanlar için de sitotoksik ve genotoksik etkileri olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir. İn vitro ortamda hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda NP'lerin hücre düzeyindeki etki mekanizmaları anlaşılmaya çalışılmaktadır. Hücre toksisite çalışmaları, bu partiküllerin hücre canlılığını azalttığını, hücre proliferasyonunu yavaşlatırken, apoptozisini indüklediğini ve otofajiyi artırdığını göstermiştir (27). Bir insan bronkoalveolar kanser hücre dizisi olan A549 ve insan keratinosit hücreleri ile yapılan bir çalışmada tungsten carbide NP'lerinin bu hücrelerin canlılığını baskıladığı bulunmuştur (28). BEAS-2B hücreleri ile yapılan çalışmalarda, ÇDKNT'lerin bu hücrelerin canlılığını baskılayarak apoptozis ve nekrozunu artırdığı buna İL-8 düzeyindeki artışın eşlik ettiği gösterilmiştir (3). Azalmış hücre canlılığında hücre proliferasyonundaki değişimin rolünü araştıran bir çalışmada TDKNT ve C(60) fulleren'in fare akciğer epitel hücre siklusunu yavaşlattığı, G1 fazında dinlenen hücre oranını artırırken S fazında protein sentezleyen ya da G2/M bölünme fazındaki hücre sayısını azalttığını ortaya koymuştur (29). Li ve arkadaşları polyamidoamine dendrimer NP'lerin A549 hücrelerinde, hücre ölümünü indükleyen bir başka mekanizma olan otofajiyi artırdıklarını göstermişlerdir (27). Sağlıklı kontroller, allerjik rinitli ve nazal polipli hastalardan elde edilen nazal epitel hücreler ile yapılan çalışmalarda TiO₂ NP'lerin bu hücrelerden İnterlökin-8 (IL-8) granülosit makrofaj-koloni uyarıcı faktör

(GM-CSF) ve regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES) salınımını etkilemediğini bulunmuştur (30). Ancak, primer BEH ile yapılan çalışmalar, TiO₂ ve ÇDKNT'lerin bu hücrelerin canlılığını etkilediğini göstermiştir. Diğer yandan, TiO₂'in bu hücrelerden IL-8 salınımını artırırken, GM-CSF salınımını etkilemediği saptanmıştır. ÇDKNT'ler ise aynı hücrelerde IL-8 salınımını baskıladılar (3). Bu bulgular, özellikle primer hücrelerin NP'lerin etkilerine olan cevabının farklılık gösterebileceğini ve bazı NP'lerin diğerlerine göre daha farklı etkiye yol açabileceklerini göstermektedir.

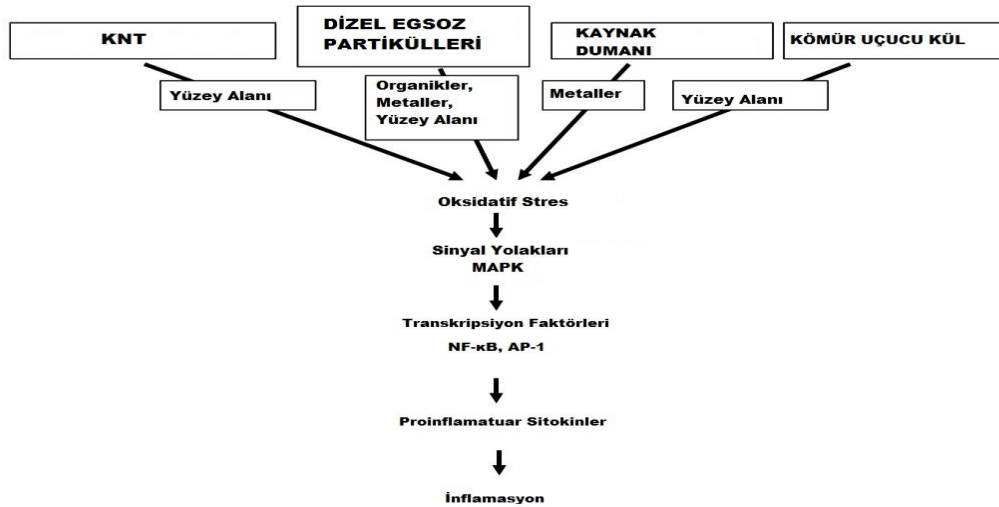
2.3.2.1. Nanopartiküllerin DNA Üzerine Etkileri

Çeşitli yollarla vücuda alınan NP'ler hücre içine giriş yaparak doğrudan veya dolaylı yollarla DNA'da negatif etkilere sebep olabilirler. Hücre içerisine giren NP kimi zaman hücre çekirdeğine bile ulaşabilirler (45). Hücre çekirdeğine ulaşan NP'ler DNA veya DNA'ya bağlanan proteinlerin yapısını etkileyerek fiziki hasarlar verebilirler (32). Çalışmaların büyük çoğunluğu NP konstrasyonundaki artışın DNA hasarı ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir (37, 38, 39). Doğrudan hücreye ve hücre çekirdeğine girebilen bazı NP'lerin hücre içi serbest radikal oluşumunu tetiklediği ve DNA'ya bağlanarak genotoksik etki gösterdikleri bildirilmektedir (40, 41, 42, 43). Pek çok memeli hücre kültürlerinde gerçekleştirilen ve içlerinde TiO₂, gümüş, altın, krom vb. birçok NP' e maruziyet sonucunda elde edilen veriler de genetik hasar konusunda mevcut olan fikri desteklemektedir (43). Kalça protezlerinde kullanılan kobalt-krom NP'lerin proteze yakın bölgelerdeki fibroblast hücrelerinde DNA çift zincir kırıklarına neden olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu hastaların kemik iliği hücrelerinde artmış kromozom anomalileri de görülmüştür (32, 42). Krom NP'lerin insan bronş hücre kültürlerinde DNA hasarına yol açtığı da bilinmektedir (43). Çalışmalar sonucunda elde edilen veriler; NP'lerin DNA zincir kırıklarına, yapısal ve sayısal kromozom anomalilerine sebep olduğunu ve DNA hasarını tetiklediğini göstermiştir. NP'ler doğrudan DNA'ya bağlanarak veya DNA'ya bağlı proteinlerle etkileşim girerek replikasyon, transkripsiyon ve translasyon olaylarını etkileyebilirler. Diğer hücre proteinlerine bağlanarak, hücre bölünme sürecini sekteye uğratabilecekleri ve oksidatif strese yol açabilecekleri de düşünülmektedir. Tüm bu etkiler sonucunda anormal sinyal oluşumuna ve anormal tepkiye sebep olabilecekleri ve nihayet hücre hasara yol açabilecekleri düşünülmektedir (36, 38). TiO₂ NP'lerin hücre çekirdeğine girdikleri bilinmekte olup, çekirdek proteinlerini etkileyerek replikasyon vb. süreçleri

baskıladıkları gösterilmiştir (45, 46, 47). Bir başka çalışmada da C60 fullerene ve TDKNT'lerin verildikten 24 saat sonra ratların akciğer ve karaciğerlerinde oksidatif DNA hasarının göstergesi olan 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) düzeyini artırdıkları bulunmuştur (31).

2.3.2.2. Nanopartiküller ve Oksidatif Stres

NP'lerin reaktif oksijen ürün (ROS) düzeyini arttırdıkları ve oksidatif strese yol açtıkları bildirilmektedir (2, 26, 32, 35). Bununla beraber NP'ler antioksidan seviyesini azaltarak hücre içi redoks dengesini bozabilir. Meydana gelen bu değişimler DNA çift zincir kırıklarına, çapraz bağlanmalara ve yanlış baz değişimlerine neden olabilir (32). Bazı NP'ler yüzeylerinde taşıdıkları titanyum, kobalt, çinko, demir gibi metalleri serbest bırakarak hücrenin oksijen seviyesini değiştirerek süperoksit anyon oluşumuna neden olurlar ve bu anyonlar oksidatif stresi tetikler. Süreç sonucunda DNA hasarı oluşabilir (32). Hücre çekirdeğine kadar ulaşabilen NP'lerin ROS üretimini daha fazla tetikleyebileceği gösterilmiştir (48). Bu sebeple küçük NP'lerin yüzey alanının artmasına bağlı olarak ROS seviyesini arttırdığı düşünülmektedir (49). NP'ler hücre üzerinde sebebiyet verdiği oksidatif stresi mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) ve nükleer faktör kappa B (NF- κ B), aktivatör protein-1 (AP-1) sinyal ileti yollarını kullanarak uyarırlar (50).



Şekil 2. Nanopartiküller ve oksidatif stres arasındaki ilişki. (50) (KNT: Karbon Nanotüp, MAPK: Mitojen Aktive Protein Kinaz, NF- κ B: Nükleer Faktör Kappa B, AP-1: Aktivatör Protein-1)

2.3.2.3 Nanopartiküller ve Permabilite

Akciğerlerin dış ortamdan inhalasyonla alınan zararlı iritanlardan korunmasında önemli bir bariyer işlevi gören hava yolu epitel hücrelerinin bütünlüklerini korumaları bu fonksiyonlarını yerine getirmede son derece önemlidir (33). A549 hücre dizileri ile yapılan çalışmalar seryum oksid (Ce) NP'lerin tight junction ekspresyonunu ve hücrelerin TEED'ini azalttığını göstermiştir (33). Calu-3 havayolu epitel hücre dizileri ile yapılan bir çalışmada TDKNT'lerin TEED'i etkilemediği, ancak ÇDKNT'lerin TEED'i anlamlı bir şekilde azalttığı rapor edilmiştir (34). Benzer şekilde, ZnO NP'lerin ratların primer alveol epitel hücre kültürlerinde TEED'i azalttığı gösterilmiştir. Buna mitokondriyal aktivitede azalma ve hasarlanan hücreler tarafından salınan LDH düzeylerinde artışın eşlik ettiği dolayısıyla NP'lerin bu etkisinin hücresel hasar ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (44). Ozon ve azot dioksitin sağlıklı ve astımlı bireylerden elde edilen BEH kültürlerinin permabilitelerine olan etkileri çalışılmış, sonuçta sağlıklı BEH kültürlerinde bir değişiklik gözlenmezken, astımlı BEH permabilitelerinin arttığı bulunmuştur (134).

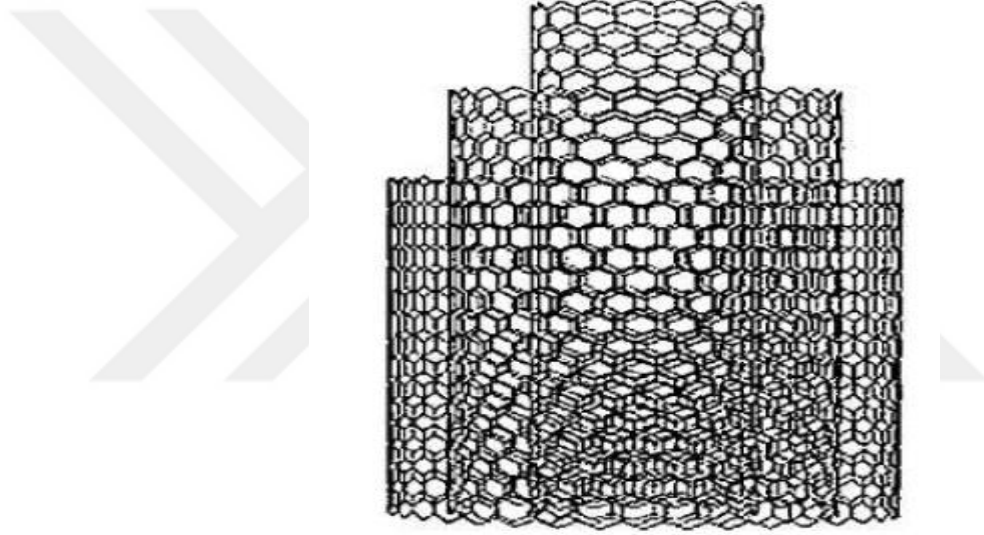
2.3.2.3. Nanopartiküller ve İnflamasyon

İnflamasyon; canlı dokuların çeşitli yaralanmalara, hasarlanmalara karşı gelişen bir reaksiyonudur. İnflamasyon koruyucu bir yanıttır ve hücreleri korurken aynı zamanda ortaya çıkan nekrotik hücre ve doku artıklarını uzaklaştırma eğilimindedir. Sitokin, kemokin, nitrojen türevleri ve ROS salınımı ile karakterizedir. İnflamasyon kromozom kırıklarında, DNA'ya bağlanan ajanlarda, nokta mutasyonlarında DNA hasarını tetikler ve DNA tamirinin gelişmesini baskılar (52, 53).

NP'lerin yüzey alanı, boyutu, yüzeyin sahip olduğu içerikler, fizikokimyasal yapısı inflamasyonun şiddetini değiştirebilir (54). In vitro çalışmalarda NP içeriğine bağımlı olarak hava yolu epitel hücrelerinde inflamasyonun arttığı, ancak bazı NP'lerin ise (nikel, demir) inflamasyonu azalttığı belirlenmiştir (55).

2.4. Çok Duvarlı Karbon Nanotüpler

Karbon nanotüpler (KNT), grafit levhaların sarılarak silindirik bir hale getirilmesi ile elde edilen biçimleridir. Karbon nanotüpler ilk olarak, 1991 yılında, NEC laboratuvarlarında çalışan Dr. Iijima ve ekibi tarafından çok duvarlı karbon nanotüpler olarak adlandırılmıştır. Çok duvarlı karbon nanotüpler iki-elli arasında eşeksizli grafit karbon plakalarından meydana gelmiştir. Küçük iç çapları yaklaşık 2 nm ve uzunlukları ise yaklaşık 1 µm dir (56).



Şekil 3. Çok duvarlı karbon nanotüp geometrik yapısı. (56)

2.4.1. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Yapısı, Özellikleri ve Kullanım Alanları

ÇDKNT'ler son derece özel elektriksel yapıya sahip maddelerdir. Diğer materyallere göre üstün dayanıklılık gösterirler. Yapılarına göre iletken veya yarı iletkenlerdir. Standart bir bakır tele kıyasla yaklaşık 1000 kat daha fazla elektriksel akımı aktarma yeteneğine sahiptirler. Elmasın iki-üç katı termal iletkenlik kapasiteleri vardır. Dayanıklılığı çelikten 100 kat daha fazla, buna karşın ağırlığı yaklaşık 1/6'sı kadardır (56). İnsan saç telinden 1/10000 kat ince olan çok duvarlı karbon nanotüpler, mekanik olarak son derece sağlam, kovalent bağ ile bağlı maddelerdir. Birbirinden farklı

yarıçaplarda, çok katlı, kararlı yapıya sahip, çok yüksek elastik özellik taşıyan, yüksek gerilme kuvvetine dayanabilen ve sahip olduğu esnek yapı sebebiyle istenilen hemen hemen her şekli alabilen yapılardır (57). Bu özellikler sayesinde ÇDKNT' ler genetik ya da diğer moleküler anomalilerin tespitinde, doku yenilenme, onarımı ve hücrelerin büyümesinde substrat olarak, tanı veya tedavi amacıyla ilaç verilmiş mekanizmalarında uygulamaları mevcuttur (58). KNT'ler, elektronik materyal olarak manyetik ve optik nanocihaz yapımında sıklıkla kullanılırlar. Bununla birlikte bilgisayarlar için hafıza elemanı, mantık devresi ve elektronik anahtar yapımında da kullanımı son zamanlarda giderek artmaktadır. KNT'ler, bu zamana kadar bilinen en sağlam materyal olma özelliğini taşımaktadırlar. KNT, çelikten 10 kat daha dayanıklı, elmadan ise çok daha serttir (59). KNT materyal içerisinde bulunan suyun olağandan farklı davranarak sıfırın altındaki sıcaklıklarda dahi donmadığı tespit edilmiştir ki bu bitkilerin suyu topraktan yukarıya doğru taşımaya çok benzemektedir. KNT' lerin benzersiz fiziksel özellikleri ve geniş uygulama alanları vardır. Gerilme dirençleri yüksektir, esnektirler, yüksek elektriksel ve fiziko-kimyasal özellikleri vardır ve bu nedenle çok değişik uygulama alanları bulunmaktadır (60).

2.4.2. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Sağlık Etkileri

Karbon nanotüplerin yaygın kullanım alanları ve özelliklerine karşın moleküler özellikleri sebebiyle dolaşım sistemi, solunum sistemi, sinir sistemi, sindirim sistemi ve deri üzerindeki olası zararlı etkileri pek çok kez araştırılmıştır. Karbon nanotüplerin işlem görmemiş formda çok hafif olduklarından atmosferde asılı halde kalarak akciğerlere kolayca ulaşma olasılığı taşıdığı bilinmektedir (61). Karbon nanotüplerin insan vücudu için en potansiyel giriş yolu ve hedef organı akciğerlerdir. Soluk alışla akciğerlere giren karbon nanotüpler paryetal plevraya kadar ulaşabilirler. Diğer üyelerine nazaran kısa veya sarmal yapıda olanlar makrofajlar vasıtasıyla yok edilirler. Buna karşın boyut olarak büyük olan karbon nanotüpler asbest benzeri bir etki göstererek birikime neden olurlar. Makrofajlar, bu lifsi şekilleri sebebiyle nanotüpleri fagosite edemezler. Hücresel ortama mezotel hücreleri tarafından genotoksik, pro-inflamatuvar, mitojenik mediatörler salınır. Oluşacak etkinin büyüklüğünde maruz kalınan karbon nanotüplerin yüzey alanı ve boyutları çok önemlidir. Boyutları 100 nm' den küçük karbon nanotüplerin solunan havada ve vücut sıvılarında çok daha fazla biriktikleri bilinmektedir. Bu küçük karbon nanotüplerin epitel dokusunda,

lenfatiklerde, dolaşım sisteminde, merkezi sinir sisteminde ve ikincil hedef organlarda daha fazla biriktiği de tespit edilmiştir. Bununla beraber büyük karbon nanotüplerin ise karaciğer tarafından alınılarak hedef organlara ulaşmadan bertaraf edildiği bildirilmektedir (62). Karbon nanotüplerin neden olduğu akciğer hasarının ana mekanizmalarından biri, farklı transkripsiyon faktörlerinin aktive olmasıyla pro-inflamatuvar protein sentezinin uyarılması ve oluşan oksidatif stresin sebep olduğu hasardır. Karbon nanotüplerin yüzey alanı ile sebep olduğu inflamasyonun doğru orantılı olduğu bilinmektedir (63).

Karbon nanotüplerin akciğerlerde granülasyon ve inflamasyon oluşturucu etkileri çoğunlukla hayvan deneyleriyle gösterilmiştir. ÇDKNT'ler ile rodentler üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda olası karsinojen madde olarak sınıflandırılmışlardır (64). Bunun dışında ÇDKNT'lerin A549 hücreleri üzerinde toksik etki gösterdiği ve DNA hasarına neden olduğu bildirilmektedir (65).

Karbon NP'lerin solunum sistemi haricindeki diğer organlara ve sistemlere verebileceği zararlar da araştırılmıştır. Nanofarmakolojide kullanılan karbon NP'lerinin platelet birikimi üzerine etkilerini araştıran bir çalışmada tek duvarlı karbon nanotüpler, ÇDKNT'ler, mikst karbon nanotüpler, C60 fullerenesinin etkileri ile geleneksel partikülün (SRM1648) olası etkileri karşılaştırılmıştır. Çalışma sonuçları karbon NP'lerin (C60 fullerenes hariç) geleneksel partiküllerden daha fazla miktarda platelet birikimini tetiklediğini göstermiştir (66).

2.5. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAİ)

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAİ) büyük oranda geri dönüşümsüz ve ilerleyici hava akımı kısıtlaması (obstrüksiyon) ile karakterize kronik bronşit ve amfizem içeren bir klinik tabloyu ifade eder (68). Tüm dünyada yaklaşık 200 milyon insanı etkileyen KOAİ'nin, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün verilerine göre 2020 yılında ölüm nedenleri arasında 3. sıraya yükselmesi beklenmektedir. KOAİ önlenemez ve tedavi edilmesi mümkün olan bir hastalık olup tekrar eden ataklar ve akut alevlenme ile karakterizedir (67). Korunma ve tedavide bireyin risk faktörlerinden uzaklaştırılması, erken tanı ve tedavi, bireylerde komplikasyonların önlenmesi gibi basamaklar bulunmaktadır (67). KOAİ'li bireylerde adele erimesi, kardiovasküler hastalıklar,

majör defresif bozukluklar, osteosit kaybı, kronik infeksiyonlar gibi sistemik bozukluklar da sıkça görülür (69).

2.5.1. KOAH Epidemiyolojisi

2.5.1.1. Mortalitesi

Tüm Dünyada KOAH sebebiyle 2008 yılında 3.278.000 hayat kaybı olmuştur ki bu sayı tüm ölümlerin %5,8' ini ifade ederken, kronik solunum sistemi hastalıklarından ölümlerin ise %78'i anlamına gelmektedir (71). Türkiye'de yapılan mortalite çalışma sayısı çok fazla değildir. Yapılan bir çalışmada toplam 427 KOAH hastası değerlendirilmiştir. Ortalama dört yıllık süreç sonrasında mortalite oranı %17,3 olarak bulunmuştur. KOAH'lı hastaların ölüm sebepleri arasında pulmoner kaynaklı ölümler ilk sırayı alırken, ikinci sırayı kardiovasküler kaynaklı hastalıklar almaktadır (73).

2.5.1.2. Prevalans ve Morbidite

KOAH prevalansı, bireyin yaşam alanına, irkına, hayat tarzına, sosyoekonomik ve kültürel yapıya, yaşa ve cinsiyete göre değişimler gösterebilmektedir (75). Ülkemizde yapılan çalışmalarda farklı rakamlar bildirilmiştir. Bir çalışmada 40 yaş ve üzerindeki KOAH prevalansı %13,6 olarak aktarılmıştır (76). Bir başka çalışmada 30 yaş ve üstünde KOAH prevalansı, GOLD (The Global Initiative for Obstructive Lung Disease) ölçütlerine göre % 0,98, ATS ölçütlerine göre %2,8 olarak bulunmuştur. Cinsiyete bağlı olarak bakıldığında ise GOLD'a göre erkeklerde %1,7, kadınlarda ise % 0,3 oranı çıkmıştır (76). "European Community Respiratory Health Study (ECRHS)" anketi ile gerçekleştirilen bir çalışmada kronik bronşit oranı % 13,5 olarak bulunmuştur. Erkekler için bu oran % 17,8 iken kadınlarda % 10 olarak bildirilmiştir (77).

İtalya'da yapılan bir çalışmada yaklaşık 2,6 milyon KOAH'lı birey olduğu (nüfusun yaklaşık % 5'i) ve her sene KOAH sebebiyle 18 bin ölümün gerçekleştiği rapor edilmiştir (79). 12 merkezli, 9425 hastalı bir çalışmada ise KOAH prevalansı % 10,1 iken erkeklerde bu oran % 11,8, kadınlarda ise % 8,5 bulunmuştur (80).

KOAH tanısı almış 40 yaş üzeri hastalarda, semptomlar hafif seyirli olsa dahi yaşam kalitesi düşmektedir (81). 2011 yılında ERS tarafından yayımlanan Beyaz Kitap'a göre KOAH tedavisi ve bakımının yıllık maliyeti yaklaşık 38,7 milyar dolar olarak tahmin edilmiştir. Bu maliyetin % 73' u iş görmemezlik doğan maliyettir (82). Sadece Fransa

için KOAH maliyeti birey başına 4.366 dolar olarak hesaplanmıştır. Bu bütçenin %41' i doğrudan tıbbi bakıma giderken yaklaşık %34'luk oran KOAH ilişkili diğer hastalıklara harcanmaktadır (83). Türkiye Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1965 ila 1997 yılları arasında KOAH tanısıyla hastaneye yapılan yatış sayısının 100 bin nüfusta 202,9 oranında olduğu bildirilmiştir (84). KOAH, Sağlık Bakanlığı Ulusal Hastalık Yükü Çalışmasında, hastalık yükü (DALY) nedenleri içinde 8. sırada yer almaktadır (84).

KOAH'lı 1003 bireyde yapılan çalışmada hastaların %55'inde hipertansiyon, %52' sinde hiperlipidemi, %37' sinde depresyon, %31' inde ise katarakt rapor edilmiştir (85).

2.5.2. Risk Faktörleri

2.5.2.1. Aktif ve Pasif Sigara Kullanımı

Aktif sigara kullanımı KOAH için en önemli risk faktörüdür. Aktif sigara kullanımı için atfedilen risk ülkeye göre % 40 ila % 70 arasında değişmektedir (84). Sigara içen bireylerde, içmeyen bireylere göre solunum semptomları ve akciğer fonksiyon bozuklukları daha fazladır, FEV1'deki yıllık azalma hızı daha büyüktür, KOAH mortalite hızı daha fazladır (85). Hamilelik sürecinde sigara içimi fetal akciğer gelişimini değiştirme ve çocukların astıma yatkınlığını artırabileceği bildirilmiştir (86). Pasif içiciliğin fetüsü olumsuz etkilediği düşünülebilir.

2.5.2.2. Mesleki Maruziyet

Sigara içen bireylerde gelişen KOAH'ın %15-19'u mesleki maruziyet ile ilişkilendirilebilir (87). Hiç sigara kullanmamış bireylerde bu oran %30' lara kadar çıkabilmektedir (88). Genellikle toz ya da dumana bağlı maruziyetin bulunduğu pek çok meslek dalının (kadmiyum, asbest, silika, toz, duman, eritici kömür tozu, hayvan yemi maruziyeti mümkün olan meslekler) KOAH gelişimi ile bağlantılı olduğu rapor edilmiştir (89).

2.5.2.3. İç Ortam Hava Kirliliği

Isınma ihtiyacı ya da pişirme amacıyla odun, kömür, tezek gibi yakıtların kullanılması ve kullanılan meskenin iyi havalandırılmaması ortamda çok yüksek oranda kirlenmeye neden olur (90, 91, 92). Gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde sigara içmeyen kadınlarda görülen yüksek KOAH prevalansının sebebinin yemek pişirmek için kadınlar tarafından kullanılan biyomass yakıtlar olduğu bilinmektedir. Bu yakıtların

kullanımın yılda yaklaşık 2 milyon kadının ve çocuğun ölümüne neden olduğu tahmin edilmektedir (93).

2.5.2.4. Genetik

Ebeveynlerin her ikisinin de solunum fonksiyonları çocuğun solunum fonksiyonu üzerinde etkilidir. Her iki ebeveyni düşük solunum fonksiyonuna sahip çocukların % 37 oranında nispeten daha düşük solunum fonksiyonuna sahip olduğu bulunmuştur (94). En çok bahsedilen genetik risk unsuru alfa-1 antitripsinin (AAT) ağır kalıtsal eksikliğidir. Ancak AAT eksikliği çok sık rastlanan bir durum değildir. Bütün KOAH'lı hastaların yaklaşık %3'ünde AAT eksikliğine bağımlı KOAH gelişiminden söz edilebilir (95). Epidemiyolojik çalışmalarda KOAH'ın bir poligenik hastalık olduğunu göstermektedir. SERPINA 1 geninin AAT eksikliğinde dolayısıyla KOAH oluşumunda rolü önemlidir (96). Akciğerlerde antioksidan mekanizmalarından glutation metabolizması, katalaz, tioredoksin sisteminde tanımlanan SOD3, GCL, GSTP1 genlerinin KOAH ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (97). Hayvan ve insan deneyleri, MMP-1 (interstisyel kollejenaz), MMP-9 (jelatinaz B), MMP-12 (insan makrofaj elastaz)'in amfizem gelişimi ve hava yolu inflamasyonunda önemli rol oynadığına ilişkin bulgular mevcuttur (98).

2.5.3. Doğal Seyir ve Prognoz

KOAH'lı bireylerde FEV1 değeri bireyden bireye değişmekle beraber, çoğunlukla yılda 50 ml'den fazla düşer. Sağlıklı bireylerde ise bu düşüş 18-30 ml arasındadır. Yapılan bir çalışma, sigara içenlerin yalnızca %10 ila 20'sinin sigaraya duyarlı olduğunu göstermiştir. Günlük içilen sigara sayısı arttıkça mortalite de yükselmektedir. Sigaranın bırakılma durumunda, FEV1 düşüş hızı sağlıklı bireylere yaklaşmaktadır (99).

2.5.4. Patolojisi

KOAH'da epitel dokusundaki goblet hücre sayısında artış ve hava yollarındaki submukozal bezlerde kalınlaşma mevcuttur. Bununla beraber epitel hücrelerinde çoğalma, yerel skuamöz metaplazi, silyalı hücrelerin sayısında azalma ve silyalı hücrelerde kısalma gözlenir. İç çapı 2 mm'den küçük bronş ve bronşiolardan meydana gelen periferik hava yollarında, mukoz tıkaçlar, goblet hücre metaplazisi, hava yolu duvarında inflamasyon, peribronşiyal fibrozis ve düz kas büyümesi mevcuttur. Bu değişimler, hava yolu duvarında kalınlaşmaya sebebiyet vererek lümeninde daralmaya

neden olmaktadır. Sonunda tüm bu süreç, hava yolu obstrüksiyonu doğurmaktadır. KOAH'da inflamasyondan T lenfositler (özellikle CD8+), nötrofiller ve makrofajlar sorumludur. KOAH alevlenmelerinde inflamasyona eozinofiller de katılmaktadır. Amfizem, akciğer parankiminde meydana gelen en önemli değişimdir. Enzimatik hasar sonucunda amfizem gelişir. Amfizem neticesinde elastik geri çekilim kapasitesinin düşmesi veya kaybı hava yolu obstrüksiyonuna neden olur. İntrapulmoner hava yolları soluk vermede erken evrede kapanır. KOAH'da amfizemin, bronşiyol-alveol bağlantılarının kaybına neden olarak kronik havayolu obstrüksiyonuna sebebiyet veren en önemli mekanizmayı meydana getirdiği bilinmektedir. KOAH'ta akciğer damarlarındaki değişimler hastalığın doğal seyrinin erken dönemlerinde başlayan damar duvar kalınlaşması ile karakterizedir (100).

2.5.5. Patogenezi

KOAH, hava yollarındaki, kronik inflamasyonu ile tanımlanmıştır. Nötrofiller, CD8+ gibi T lenfositler ve makrofajlar akciğerlerin ilgili bölümlerinde sayıca artış göstermiştir. Sayıca artan ve aktive olan bu inflamatuvar hücreler, IL-8, Lökotrien B4 (LTB4), Tümör nekroz faktör alfa (TNF- alfa) gibi bir dizi mediyatör salgılayarak akciğerlerde doku hasarına yol açabilirler (74). İnflamasyonla birlikte akciğerlerdeki proteinaz-antiproteinaz dengesizliğinin ve oksidatif stresin de KOAH patogenezinde anlamlı bir yeri olduğu düşünülmektedir. Akciğerlerdeki inflamasyonun temel nedeni solunan zararlı gazlar ve partiküllerdir. Diğer unsurlar gibi sigara dumanı da inflamasyona sebep olarak akciğerlerde direkt olarak harabiyet oluşturabilir. Herhangi bir şekilde solunum yoluna giren yabancı maddeler ve sigara dumanı duyuşal sinirleri uyarak mukus salınımını arttırır. Bununla beraber akciğer parankiminde inflamasyona sebep olurlar. Bu inflamasyonun, anti proteaz, antioksidan tamir mekanizmaları gibi mekanizmalarla ortadan kaldırılamaması sonucunda akciğerlerde doku hasarı meydana gelebilir. Sonuç olarak tüm bu süreç esnasında ve sonrasında, mukus aşırı salgılanması, fibrozis, hava yolu daralması, amfizem ve damarlarda yapısal değişimler oluşmaktadır (67).

2.5.6. KOAH Tedavisi

2.5.6.1. Hasta Eğitimi

KOAH'ta hastalığın önüne geçilmesi amaçlanmakla birlikte, tanı almış hastaların eğitimi de çok önemli bir yöntemdir. İlaç kullanım ve hastalık konusunda eğitim verilen hastaların verilmeyen hastalara göre daha olumlu tedavi yanıtı verdiği gösterilmiştir (101).

2.5.6.2. Risk Faktörlerinin Azaltılması

Sigara içmeyi sürdüren KOAH'lı hastalarda sigarayı bırakmak çok önemli bir girişimdir. Sigaranın bırakılması solunum kapasitesindeki kayıpların telafi edilmesini sağlarken, hastalığın seyrini de olumlu etkiler (102). Mesleki maruz kalmanın önüne geçilmesi de anlamlı bir önlemdir. Çalışan bireylerin büyük bir kısmı uygunsuz çalışma şartları ve çalışma ortamından dolayı büyük risk altındadır (103). İşyerlerinde direkt olarak ortamda solunabilir toz, partikül, duman ve gaz formunda organik ya da inorganik maddelere uzun süreli maruz kalma, KOAH oluşumu ve gelişiminde önemli rol oynamaktadır (104). Bireyleri bu maruziyetlerde uzaklaştırmak ya da maruziyetin oluşmasını engellemek solunum fonksiyon kayıplarını önleyebilir (105).

2.5.6.3. Stabil KOAH Tedavisi

Semptomatik KOAH'lı hastalarda tedavinin çoğunluğunu oluşturan bronkodilatörler; hastanın sağlık durumuna göre düzenli ya da gerektiğinde kullanılabilir. Bronkodilatör tedavisi sonrası FEV1`de küçük çapta iyileşmeye yol açmasına karşın, çoğunlukla akciğer kapasitelerinde daha büyük iyileşmeler gözlenebilir. Bu iyileşme hali hissedilen nefes darlığı şikâyetinde azalmayı sağlar (106).

2.5.6.4. Alevlenme Tedavisi

Alevlenmelerde hastanın uygulamakta olduğu bronkodilatörlerin dozu ve sıklığı artırılabilir (107). Stabil KOAH tedavisinde kısa etkili beta 2 agonistlerin (SABA) ve kısa etkili anti-kolinergik (SAMA)'ların birlikte kullanılması halinde, FEV1`de ilaçların tek başına gösterdiği etkiden daha fazla etki gösterdiği belirlenmiştir. Alevlenmelerde kombine kullanımın daha verimli olduğuna dair yeterli veri mevcut değildir (108).

2.5.6.5. Farmakolojik Tedavi

KOAH'ın progresyonunu azaltacak veyahut seyrini değiştirebilecek herhangi bir farmakolojik tedavi henüz bulunamamıştır. Tedaviler çoğunlukla semptomları azaltmak, bireyin egzersiz kapasitesini arttırarak sağlık durumunu iyileştirmeyi hedefler. Günümüzde KOAH'ın farmakolojik tedavisinde sıklıkla başvurulan tedavi bronkodilatörlerdir. Kısa ve uzun etkili β_2 agonistler, kısa ve uzun etkili antikolinergikler, metil ksantinler, kombine inhaler uzun etkili β_2 agonist + glikokortikoidler, fosfodiesteraz inhibitörleri, kortikosteroidler, aşılar, sentetik verilmesi, antibiyotikler, mukolitik ilaçlar KOAH'ın farmakolojik tedavisinin temel bileşenleridir (109).

2.5.6.5.A. Roflumilast

Roflumilast, 2010 yılı GOLD güncellemesinde alternatif bir tedavi olarak rehber girmiştir. Ağırlaşmış KOAH vakalarında uzun etkili bronkodilatörlerle beraber kullanılmasının kronik bronşit ve atakları azalttığı belirtmiştir (110). Roflumilast özel bir PDE-4 inhibitörü olup sitokrom P450 enzimleri aracılığıyla aktif metaboliti olan roflumilast N-okisit' e dönüşür (111).

PDE' ler, hücre içi sekonder habercil moleküller olan siklik adenosin monofosfat (cAMP) ve siklik guanosin monofosfatı (cGMP) hidrolize ederek parçalanmalarına sebep olan enzimlerdir. Yüksek konsantrasyonları Protein Kinaz A (PKA) ve Protein Kinaz B (PKB)' yi aktive ederek düz kas gevşemelerine neden olmaktadır. Birçok immün ve inflamatuvar hücrenin aktive olmasının önüne geçebilmektedir. PKA aktivasyonunu tetikleyerek lenfosit, eozinofil, mast hücre, monosit, lenfosit gibi immün ve inflamatuvar hücrenin aktivasyonunu baskılamaktadır. Bu süreç sonunda hava yolu düz kas dokusunun gevşemesine sebep olarak kas hücrelerinin mitogenesini durdurmaktadır (112). Selektif PDE-4 inhibitörlerinin inflamasyon dışında, KOAH'da progresif fonksiyon kayıplarına katkısı olan fibrotik skar ve hava yolu duvarı yeniden yapılanma sürecine de etkileri bilinmektedir. İn vitro araştırmalarda, PDE-4 inhibisyonunun, fibroblast kemotaksisini ve fibroblast bağlantılı ekstrasellüler matriks kasılmasını azalttığı gösterilmiştir (113). Orta ve ağır KOAH'lı hastalarda gerçeleştirilen araştırmalarda, roflumilast'ın inflamatuvar hücreleri % 30- 50 oranında azaltırken; CD8, T lenfosit ve CD68 makrofajlarını ise %40- 50 oranda azalttığı saptanmıştır (114, 115).

2.5.6.5.B. Formoterol

Formoterol son derece kuvvetli ve selektif uzun etkili bir β_2 -agonisttir. Adenilat siklazın aktivasyonunu sağlayarak cAMP düzeylerini artırır. Bu artış düz kaslarda gevşemeye neden olur. Araştırmalar formoterolün alınmasını takip eden 3 dakika içerisinde bronkodilatör etkisini gösterdiğini belirlemiştir. Yaklaşık 10 dakika içinde maksimum etkiye ulaşması beklenmektedir. Bu etki solunum fonksiyon testlerinde yükselişe katkıda bulunmaktadır (116). Formoterol, post-kapiller venüllerdeki endotel hücrelerindeki β_2 -reseptörler vasıtasıyla hava yollarına plazma geçişini bloke edici bir role sahiptir. Sağlıklı bireylerde histamin ile hava yollarında ödem oluşumu tetiklendikten sonra alınan balgam numunelerinde α_2 - makroglobulin seviyesinin formoterol ile azalabildiği belirlenmiştir (117). Bu sonuç formoterolün kapiller geçirgenliği baskıladığını doğrular niteliktedir. Aynı zamanda formoterol mast hücrelerinden mediatör salınımını da baskılar. Bu etkinin mast hücre yüzeyinde bulunan β_2 - reseptörlerin çalışmasının β_2 agonistler ile inhibe edilmesi ile karakterizedir (117, 118). Nötrofil yüzeyinde de β_2 - reseptörler mevcuttur. Formoterol etkisiyle beta-agonistler reaktif oksijen radikallerinin salınımını önler. Yapılan araştırmalarda β_2 -agonistlerin akciğerlerde nötrofil birikimini önleyici bir etkilerinin de olduğu tespit edilmiştir (119, 120). Hafif astımlı bireylerde formoterol ile indüklenmiş balgamda nötrofil ve IL-8 seviyesinde düşüş olduğu saptanmıştır (119).

2.5.6.6. Farmakolojik Olmayan Tedavi

Pulmoner Rehabilitasyon, uzun süreli oksijen tedavisi, evde uzun süreli mekanik ventilasyon, cerrahi tedavi KOAH tedavisinde başvurulan nonfarmakolojik tedavi yöntemleridir (70).

2.6. Bronş Epitel Hücreleri ve Görevleri

Havayolu epiteli, yavaş fakat sürekli fizyolojik rejenerasyon gösteren hareketli bir doku grubudur. Solunum mukozası, trakeadan alveollere çok katmanlı psödostratifye epitelden meydana gelirken alveol bölgesinde tek katlı küboid epitele dönüşür (122,123). Havayolu epiteli çeşitli farklılıklar gösteren, fonksiyonel olarak görevleri ayrılan hücrelerden oluşmuştur. Bu hücreler silyalı, salgı ve bazal hücreler olarak üç temel grupta incelenir (124). Silyalı epitel hücreler, tüm epitel hücre ailesinin yaklaşık %50'sini kapsarlar. Silyalı epitel hücrelerinin sayıları alveollere doğru gittikçe

azalmaktadır. Ritmik siliyer aktiviteyle mukosilyer klirenste rol oynarlar. Diğer epitel hücrelerin farklılaşmasıyla oluşan silyalı epitel hücrelerinin en komplike hücre grubu olduğu kabul edilir (124,125). Salgı hücrelerden olan goblet hücreleri, trakeadan bronşiyollere kadar uzanırlar. Salgıladıkları mukusla solunum yollarına giren yabancı madde ve patojenleri tutarlar. Bu hücreler silyalı epitel hücrelere dönüşebilirler ve gerektiğinde kendilerini yenileyebilirler. KOAH, astım ve kronik bronşit gibi inflamatuvar hastalıklarda miktarları artarak mukus hücre hiperplazisi ve metaplazisi oluştururlar (126).

2.6.1. Silyalı Hücreler

Silyum, Latince’de “kirpik” anlamına gelen bir kelimedir ve çoğul hali silyadır. Silya yaklaşık 360 proteinden oluşmuş, ileri derecede özelleşmiş kompleks organellerdir (127). Bazal ya da salgı hücrelerinden kökenlenen bu hücrelerin apikal yüzeyinde yer alan tüy yapıları, zararlı partikülleri akciğerlerden uzaklaştıran mukosilyer klirenste başrol oynarlar (126). Nükleus bazalda yer alır. Apikal membranda hareketli (motil) silyalar bulunur. Apikal sitoplazma mitokondri açısından zengindir. Golgi kompleksi, granüllü endoplazmik retikulum ve az sayıda ribozom yer alır. Mukusu nazofarenkse doğru süpürür. Bu süpürme işlemi sonucunda zararlı partikülleri akciğerlerden uzaklaştırmış olurlar (127).

2.6.2. Salgı Hücreleri

Hava yolu epitelinde mukus sekresyonundan sorumlu üç farklı hücre grubu vardır. Bu hücre grupları Goblet, Klara ve Seröz hücreleridir. Yapısı glikoprotein olan musinin dehidrasyonu ile mukus oluşur. Mukus salgısı solunum sisteminde önemli bir koruyucu mekanizmadır. Zararlı partiküllerin solunum sisteminden mukosilyer klirens ile uzaklaştırılmasını sağlar (34).

2.6.2.1. Goblet Hücreleri

Goblet hücreleri, salgıladıkları salgı maddeleri ile hava yollarına giren zararlı ve yabancı partikülleri yakalarlar. Mukus sialik asit içerikli glikoprotein kökenli olduğundan visko-elastik bir yapıya sahiptir. Bu elastik yapı silyaların hareketini kolaylaştırır (128). Mukus salgılayan goblet hücreleri solunum yollarını kaplayan epitelyum içinde yoğun olarak bulunan, yenilenebilir hücrelerdir (129). Goblet hücrelerinin görevi solunum yollarındaki su dengesini sağlamak, kayganlaşma sağlamak

ve hava yollarına sızan partikül ve patojenleri bertaraf etmede katkı sunmak olarak sıralanabilir. Akciğer goblet hücreleri hava yollarının üst katmanlarında mukus sekresyonundan görevli hücrelerdir (130). Goblet hücreleri insan hava yolu epitelinde bazal hücrelere dönüşebilirler (131). Bu hücreler hava yolu epitelinin %30'unu oluşturur ve glikoprotein yapıya sahip musin salgırlar. Nükleusları alt tarafta yerleşiktir. Apikal sitoplazma müsin içeren salgı granülleri ile kaplıdır (132).

2.6.2.2. Klara Hücreleri

Klara hücreleri, küçük hava yollarında bulunan, sil barındırmayan, sekretuar hücrelerdir. Kubbe şeklindeki morfolojileri vardır. Klara hücreleri, akciğeri koruyucu pek çok fonksiyona sahiptir. Birincil olarak akciğer homeostazının dengede tutulmasında görev alan Klara hücreleri, immün sistemin regülasyonunda ve ksenobiyotik metabolizmasında da görev alırlar (132). Bronşial epitelde yerleşik bulunan Klara hücrelerinin önemli fizyolojik rolleri mevcuttur. Bunlar ksenobiyotik bileşiklerin sitokrom-p450 mono oksijenaz yoluyla metabolize edilmesi, bronşial sekresyon ürünlerinin sentezi, sıvı ve iyon dengesinin sağlanmasıdır. Ayrıca bu hücreler gerektiğinde diğer hücre tiplerine de dönüşerek epitel hücre kaybını da dengelerler (133). Aynı zamanda inflamasyon alanını kontrol ederek çevresel ajanların mukosilyer klirensine katılırlar. Ayrıca silyalı hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlarlar. Histokimyasal enzim çalışmaları, Klara hücrelerinin yüksek metabolik aktiviteye sahip olduklarını göstermektedir (135).

2.6.2.3. Seröz Hücreler

Seröz hücreler morfolojik açıdan goblet hücrelerine benzemektedirler. Granül içerikleri açısından değişiklik gösterirler (135). Seröz hücreler elektronca yoğun sitoplazmalı, sayıca yüksek granüllü endoplazmik retikuluma sahiplerdir (135). Seröz hücreler insanlarda küçük bronşlarda ve bronşiolde bulunurlar. Seröz hücrelerin pek çoğu nötral mukus ve lipit olan mukus benzeri salgı maddeleri içerirler (136).

2.6.3. Bazal Hücreler

Bazal hücreler, bazal membranda tek sıra halinde bulunan konik ya da küre şeklindeki hücrelerdir. Nükleusları koyudur. Mitozla destek hücrelerine dönüşebilirler. Burunda, koku alma hücrelerinin bulunduğu bölgenin kapiller kan ve lenf damarları açısından

zengin gevşek bağ dokusu yapısındadır (137). Bazal hücreler solunum yollarında kök hücre olarak davranış göstererek silyalı hücelere ya da klara hücrelerine dönüşebilirler. Bazal hücreler, hava yolları epitel dokusunun bazal membrana tutunmasından da sorumludur (137). Bazal hücreler bazal lamina ve silindirik epitel hücreleri arasında temel bir çatı işlevi görerek desmozom ve hemidesmozom bağlantılarını kullanırlar (138).



3.GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması Kasım 2014 - Aralık 2015 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'na bünyesindeki Hücre Kültür Laboratuvarı'nda yürütüldü. Bu tez çalışması için Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 19.02.2013 tarih ve 19.02.2013/78 numarası ile izin alınmıştır.

3.1. Çalışma Hastaları

Çalışmada, Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Uygulama ve Araştırma Hastanesi Göğüs Cerrahisi Kliniğine başvuran ve tümör gibi çeşitli sebeplerle lobektomi veya pnömonektomi uygulanan hastaların dokuları kullanıldı. Obstrüktif akciğer hastalığı için obstrüktif akciğer hastalıkları için küresel girişim ("Global Initiative for Obstructive Lung Disease", GOLD) kılavuzu baz alınarak hastaların KOAH evreleri belirlendi. GOLD kılavuzuna göre orta-ağır KOAH'lı ve sigara içen 4 hasta KOAH'lı hasta grubu olarak çalışma gruplarına dahil edilirken, yine benzer sebeplerle operasyon uygulanan, herhangi bir obstrüktif akciğer hastalığı tanısı almamış ve sigara içen 9 hasta "Sigara İçen" hasta grubuna dahil edildi. Daha önce sigara içmemiş ve herhangi bir obstrüktif hastalığı bulunmayan 4 hasta ise "Sigara İçmeyen" grup olarak çalışmaya alındı (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışma hastalarının demografik özellikleri

Hastalar	Sayı	Ortalama Yaş	Cinsiyet
KOAH' lı	4	65.33 ± 8.98	4 Erkek
Sigara İçen	9	54.26 ± 1.73	9 Erkek
Sigara İçmeyen	4	29.00 ± 9.96	3 Kadın- 1 Erkek

3.2. Primer Bronş Epitel Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerleri

Hücre kültürü aşamasında kullanılan besi yerleri, içeriğindeki kimyasallar aksi belirtilmediği takdirde Sigma, firmasından (İnterlab, Türkiye) temin edilmiştir.

3.2.1. Taşıma Besiyeri (TM)

50 ml Medium 199 üzerine 40µl Gentamisin (80mg/ml) eklenerek hazırlandı.

3.2.2. Fotal Buzağı Serum (Fetal Calf Serum, FCS) Besiyeri

374 ml Medium 199, 4 ml bovine pankreatik insülin, 4 ml antibiyotik-antimikotik solüsyonu, 10 ml fotal buzağı serumu (fetal calf serum', FCS), 4 ml insan transferrin, 4 ml hidrokortizon, 120 µl epidermal büyüme faktörü (Beckton Dickinson, Türkiye) ile toplamda 400 ml son hacim olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan besiyeri 0,25 µm por çaplı filtreden vakum sistemi yardımıyla (Thermo, İnterlab, Türkiye) filtre edilerek steril edildi.

3.2.3. Nu Serum 4 Besiyeri

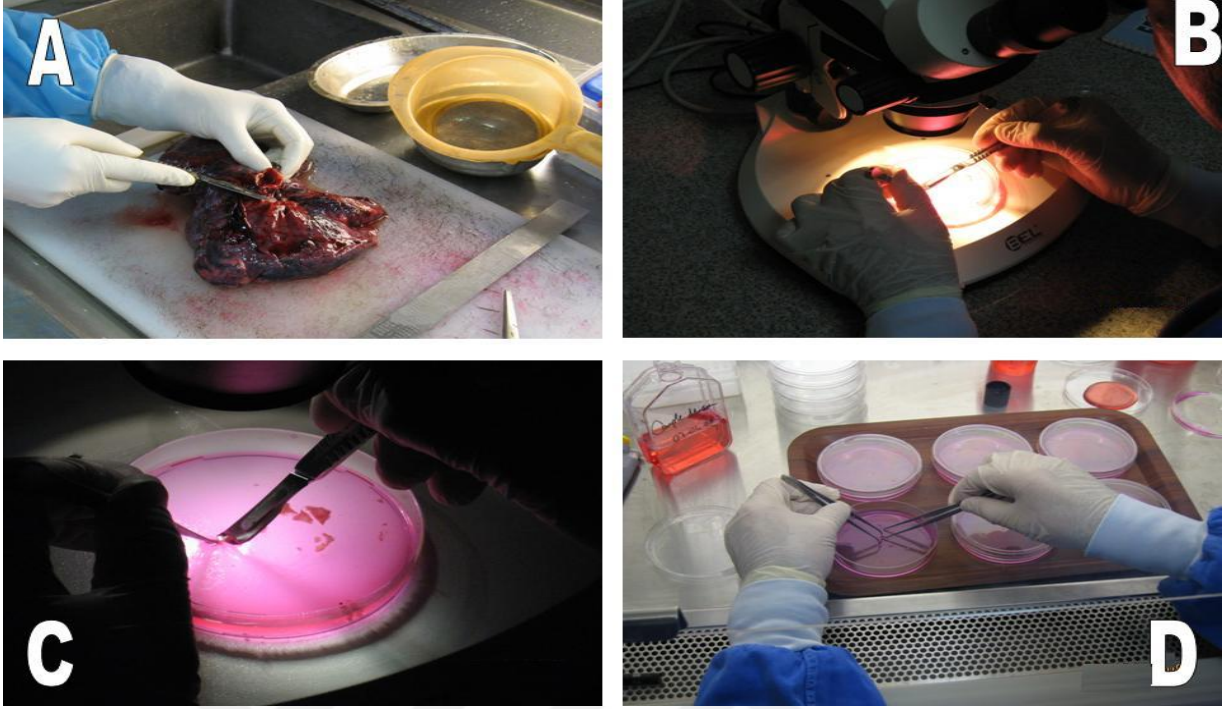
Nu Serum 4 besiyerinin bileşenleri ve miktarları FCS' li besiyerinin içeriği ile FCS dışında aynıdır. FCS yerine aynı miktarda (5 ml) Nu Serum 4 (Becton Dickinson, Türkiye) ilave edilmiştir.

3.2.4. Serumsuz ('Serum Free', SF) Besiyeri

396 ml Medium 199 ve 4 ml antibiyotik-antimikotik solüsyon ile hazırlandı.

3.3. Doku Eksplantlarının Kültür İçin Hazırlanması

BEH kültürleri göğüs cerrahları tarafından lobektomi veya pnömonektomi uygulanan hastaların akciğer eksplantları ameliyathaneden alınarak Patoloji Laboratuvarı'na götürüldü. Burada bir patolog yardımıyla, klinik işlemler için kullanılmayan, tümörden bağımsız uygun doku örnekleri alınarak TM içerisinde Hücre Kültür Laboratuvarına getirildi. Laboratuvara getirilen örnek TM içinde yıkanarak dokunun üzerindeki bronş dokusu dışındaki kısımlar uzaklaştırıldı. Elde kalan materyal diseksiyon mikroskobu altında incelenerek, epitelyum alttaki dokulardan ayrılarak 1-2 mm²'lik parçalara ayrıldı. Elde edilen doku parçacıkları 2-3 defa TM ile yıkanarak inkübasyon için hazır hale getirildi.

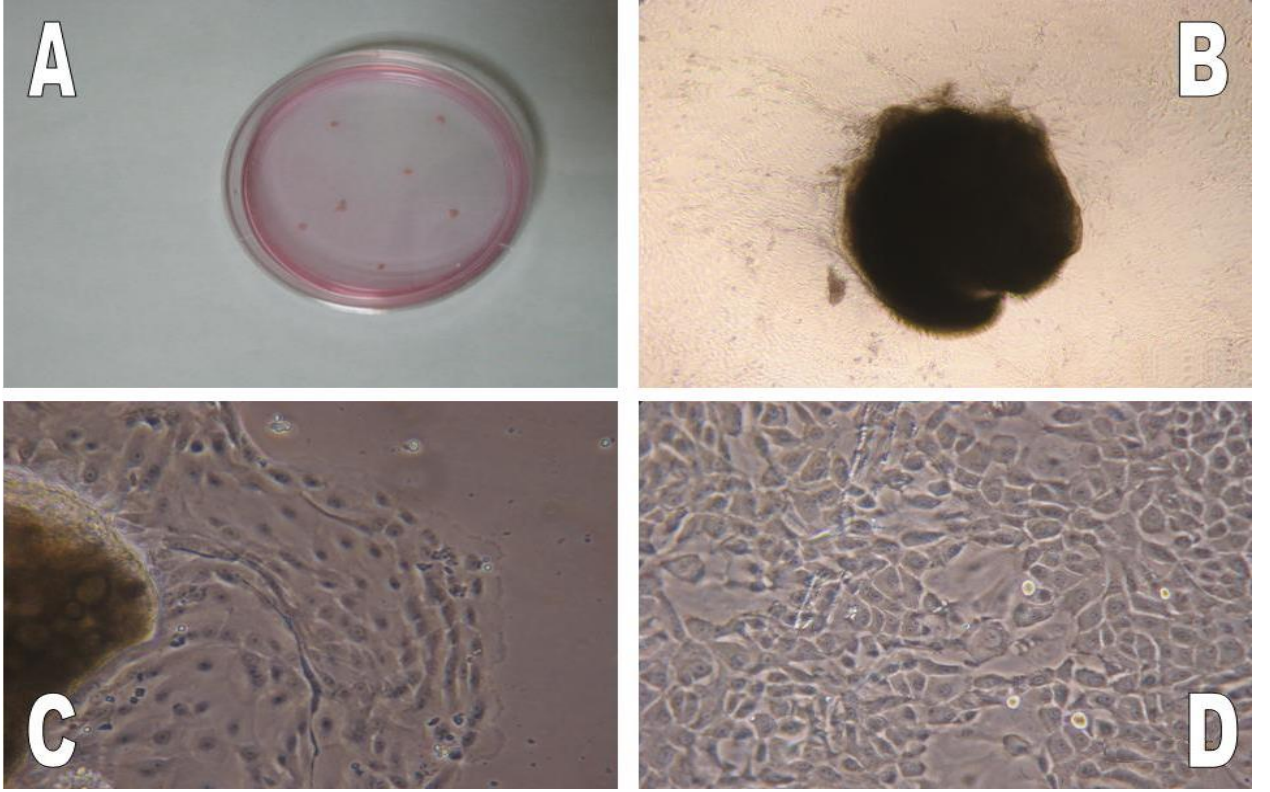


Resim 2. Bronş epitelyumu elde edilmesi: Lobektomi yapılmış hastanın akciğer dokusundan bronş dokusunun alınması; (A). Bronş dokusundan epitel tabakasının ayırma mikroskobu eşliğinde ayrılması; (B). Ayrılan epitelyum dokusunun küçük parçalara ayrılması; (C). Epitelyum dokusunun hücre kültür ortamına ekimi; (D) (3)

3.4. Bronş Epitel Hücre Kültürü

Parçalara ayrılan epitel dokusu içinde 200 µl FCS olan primer hücre kültürü için özel olarak kullanılan 0.45 µm çapındaki mikropor membranlardan oluşan 9mm'lik Falcon® hücre kültür "insert"leri (Becton Dickinson, Türkiye) üzerine 2-3 adet 1-2 mm çapındaki eksplant konmak suretiyle yerleştirildi. İnsertlerin yerleştirildiği kültür kaplarına ('plate') her bir kuyucukta 400 µl FCS olacak şekilde besiyeri eklendi. Platelere 37°C ve %5 CO₂'li ortamda 5 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. 5. gün plate ve insert içindeki FCS'li besiyeri aspire edilerek plate içine 400 µl Nu Serum 4'lü besiyeri eklendi. İnsertler hava-sıvı arayüzü ("Air Liquid Interface") metoduna uygun şekilde besiyeri olmaksızın inkübe edilmeye devam edildi. Besiyeri değişim işlemi hücreler insert yüzeyinde %80-90 oranında yayılıma ulaşana kadar haftada 3 kere olarak devam etti. Hücreler bu orana yaklaşık 28-30 gün sonunda ulaştı. Kültürler deney için kullanılmadan önce ekilen epitel dokuları pensetle dikkatli biçimde uzaklaştırıldı. Hücrelerin dokunun yerini dolduruncaya ve yüzeyini tamamen kaplayıncaya kadar yaklaşık 24 saat beklendi. Deneyden bir gün önce her bir inserte 200 µl SF ve her bir

kuyucuğa 400 µl SF olacak şekilde besiyeri eklendi. SF ile 12 saatlik inkübasyondan sonra kültürler roflumilast (0; 0.01; 0.1; 1 µl) ve formoterol (0; 0.1; 0.01; 100 µl) yokluğunda ve varlığında ÇDKNT (0, 10, 50, 100 µl), ile inkübasyona tabi tutuldular. Kültürlerin Trans Epitelyal Elektriksel Direnci (TEED) 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde ölçüldü. Daha sonra insert ve kuyucuklardan toplanan kültür supernatantı LDH analizi için - 20°C’de saklandı.



Resim 3. Bronş epitelyumu hücre kültürünün aşamaları: Küçük parçalara ayrılan bronş epitelyum dokusunun hücre kültür kaplarına ekilmesi (A); Ekimden sonraki ilk haftada doku parçasından çevreye doğru üremeye başlayan bronş epitel hücrelerinin faz-kontrast mikroskopundaki görüntüsü (X100) C; (B) (X40) ve (D) (X100) 30. günde hücrelerin kültür ortamındaki görünüşü (3)

3.5. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan ÇDKNT’ler Dr. Günter Oberdörster’den (Director, Ultrafine Particle Center Rochester, University of Rochester, ABD) ücretsiz olarak temin edilmiştir. Bu ÇDKNT’ler Mitsui&Co, Ltd tarafından üretilerek ticari olarak ‘MITSUI-7’ adı verilen nanomateryaldir. Uzun, iğnemsî yapılıdır. İçeriğinin %99’dan fazlası karbondan oluşmaktadır. Uzunluğu: 13 µm, optik dansitesi 50 nanometrenin üstündedir.

Primer BEH'leri için serumsuz 'medium 199' vasatı (serum free medium, SF) içinde 10, 50 ve 100 µg/ml dozlarında hazırlanarak deneylerde kullanıldı.

3.6. Transepitelyal Elektriksel Direnç Ölçümü

Bu çalışma için insertlerde üretilmiş ve insert yüzeyini tamamen kaplamış hücrelere SF içerisinde roflumilast (0; 0.01; 0.1; 1 µM) veya formoterol (0; 0.1; 0.01; 100 µM) yokluğunda ve varlığında ÇDKNT (0; 10; 50; 100 µg/ml) verildi. Bu işlemin akabinde 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde EVOM™ microvolt-ohm meter (World Precision Instruments, Berlin, Almanya) cihazı kullanılarak TED ölçüldü. Ohm (Ω) olarak elde edilen değerler kaydedilerek analiz edildi.

3.7. Laktat Dehidrogenaz Ölçümü

LDH analizi ticari olarak satın alınan kitler kullanarak (Roche Applied Science, Türkiye) üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda bir spektrofotometre (Biotek, µQuant model, ABD) cihazı ile KC-Junior (Bio-Tek Instrument Inc. ABD) programı kullanılarak 450 ve 570 nm dalga boylarında okunarak gerçekleştirildi. I. U cinsinden elde edilen sonuçlar LDH assay kiti için önerilen formülasyon ile hesaplanarak supernatantların her biri için toksisite değeri bulundu. Daha sonra bu değerler yine her bir numune için Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak hesaplanan toplam protein miktarına (µg) oranlanarak standardize edildi. Sonuçlar LDH (I.U)/µg hücresel protein olarak belirtildi.

3.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc. USA) programı kullanılarak yapıldı. İlk olarak elde edilen verilerin normal dağılımlı olup olmadığı "D' Agostino & Pearson omnibus normality test" kullanılarak tespit edildi. Elde edilen sonuçlara göre ÇDKNT, formoterol ve roflumilast'ın etkileri tek yönlü varyans analizi (ANOVA- Kruskal Wallis Test) ve çoklu karşılaştırma testi (Dunn's ya da Dunnett's Multiple Comparison Test) uygulanarak test edildi. Her test grubu uygun kontrol grubu ile karşılaştırılarak 0.05' ten küçük *p* değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Primer Bronş Epitel Hücre Kültürü

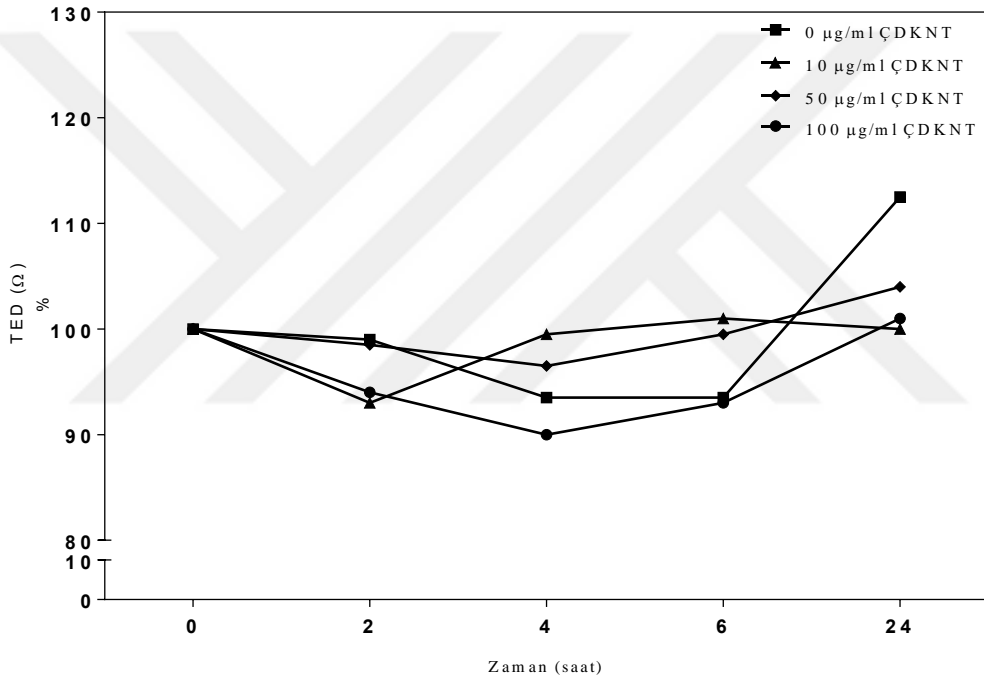
Uygun kültür ortamına alınan dokuların 4-5. günün sonunda insertlere tutunarak yayılım göstermeye başladıkları gözlemlendi. Yaklaşık olarak 3. Haftanın sonunda yeterli yayılımı sağlayan (%90- 100) hücreler deneylerde kullanıldı. Hedeflenen yayılımı yakalamayan insertler deney dışı bırakıldı.



4.2. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi

4.2.1. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Sigarasız Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi

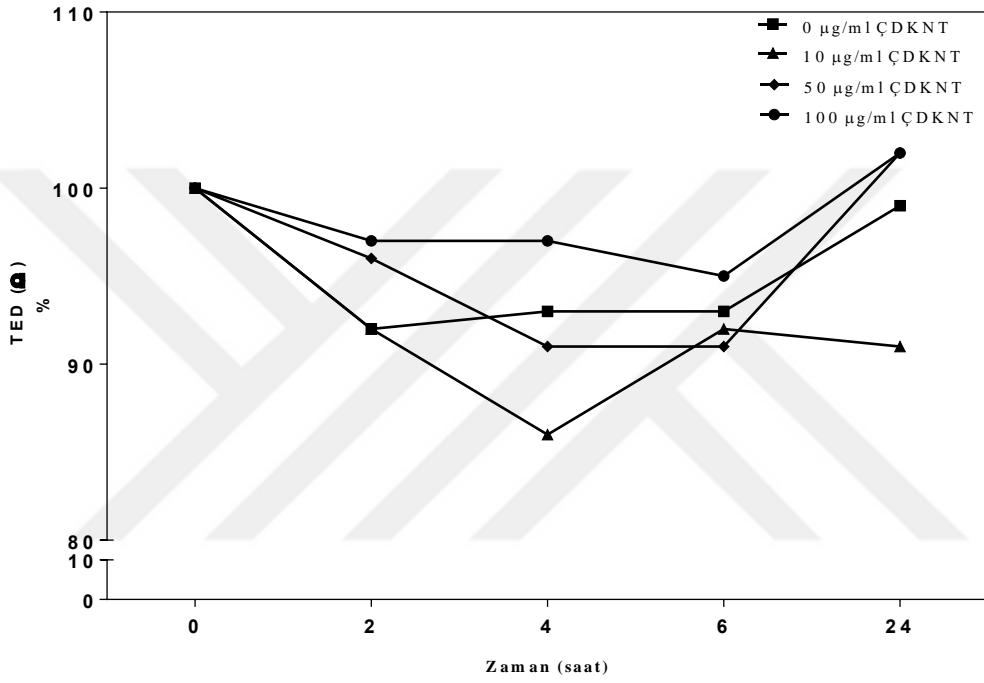
ÇDKNT'lerin, sigara içmeyen bireylerin BEH kültürlerinin TEED üzerine etkilerine bakıldığında bu partiküllerin 10, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı gözlemlendi (Şekil 4).



Şekil 4. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Sigarasız Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi

4.2.2. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin KOAH' lı Bronş Epitel Hücre Kùltürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi

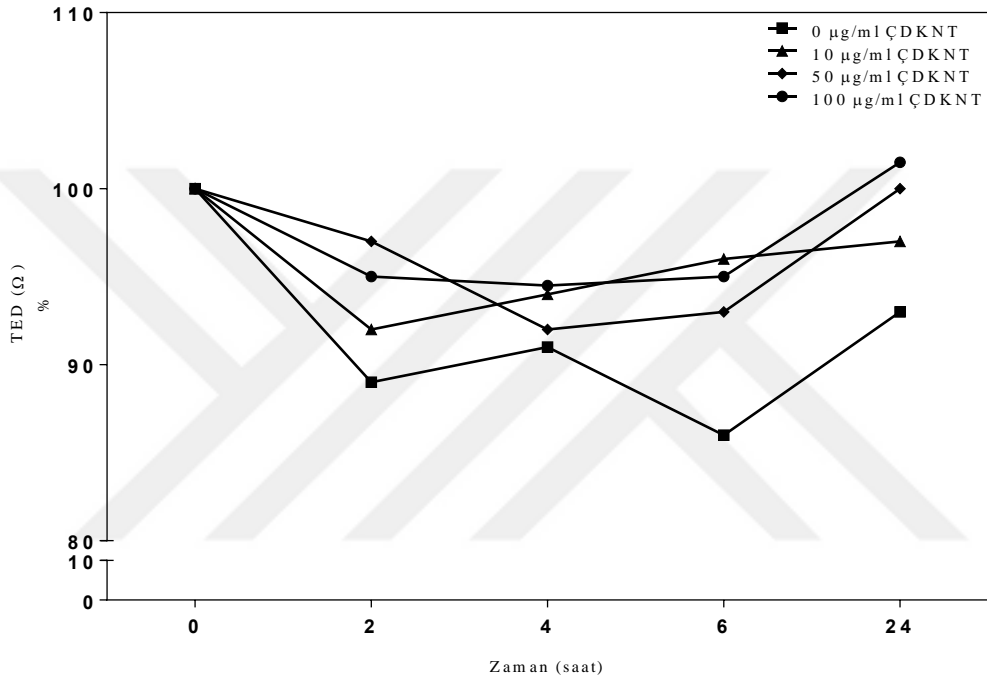
ÇDKNT'lerin, KOAH gelişen bireylerin BEH hücrelerinin TEED üzerine etkilerine bakıldığında da bu partiküllerin 10 , 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı gözlemlendi (Şekil 5).



Şekil 5. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin KOAH' lı Bronş Epitel Hücre Kùltürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi

4.2.3. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Sigaralı Bronş Epitel Hücre Kùltürlerinin Transeptilyal Elektriksel Direncine Etkisi

ÇDKNT'lerin, sigara içen bireylerin BEH hücrelerinin TEED üzerine etkilerine bakıldığında bu partiküllerin 10, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı gözlemlendi (Şekil 6).

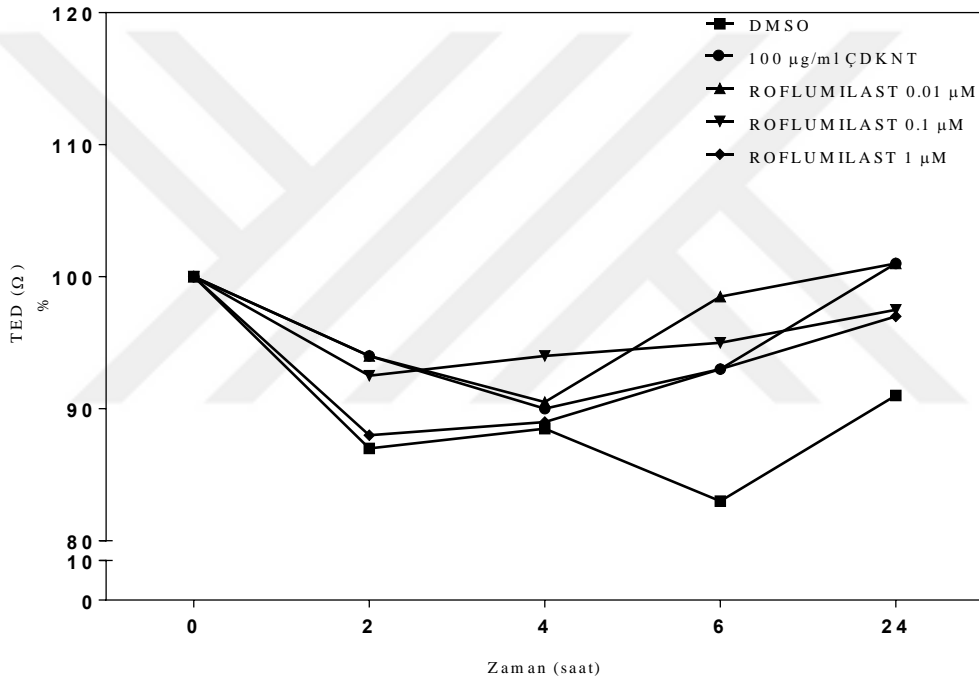


Şekil 6. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Sigaralı Bronş Epitel Hücre Kùltürlerinin Transeptilyal Elektriksel Direncine Etkisi

4.3. Roflumilastın Çok Duvarlı Karbon Nanotüp varlığında Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transeptilyal Elektriksel Direncine Etkisi

4.3.1 Roflumilastın Çok Duvarlı Karbon Nanotüp varlığında Sigarasız Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transeptilyal Elektriksel Direncine Etkisi

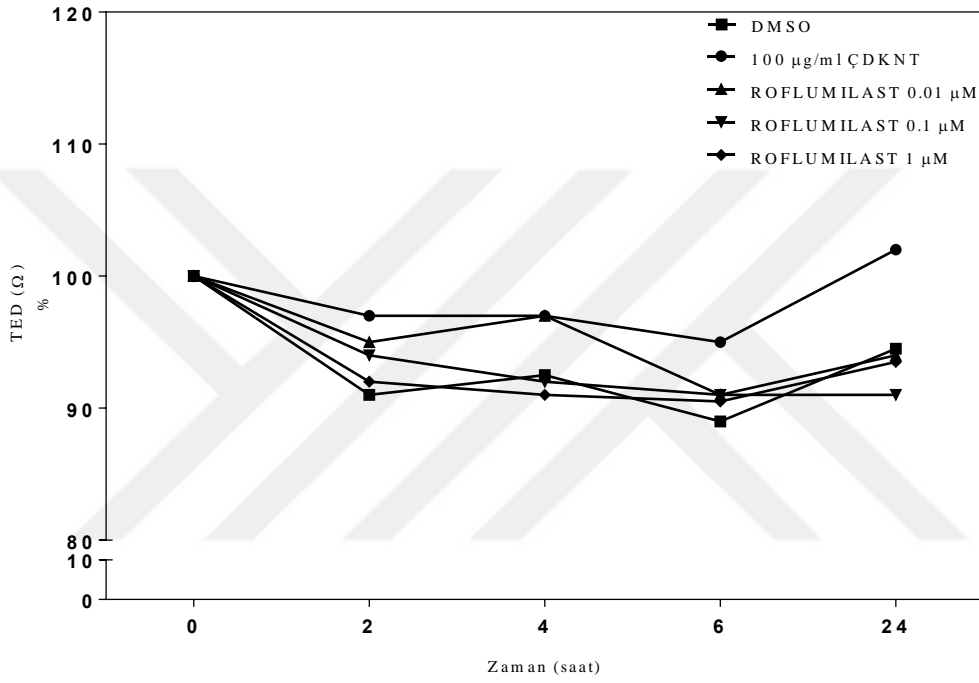
Roflumilast varlığında (0.01 μM , 0.1 μM ve 1 μM) 100 $\mu\text{g/ml}$ ÇDKNT konsantrasyonunun, sigara içmeyen bireylerin BEH TEED'i üzerinde 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı belirlendi (Şekil 7).



Şekil 7. Roflumilast'ın Çok Duvarlı Karbon Nanotüp varlığında Sigarasız Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transeptilyal Elektriksel Direncine Etkisi

4.3.2. Roflumilastın Çok Duvarlı Karbon Nanotüp varlığında KOAH'lı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transeptilyal Elektriksel Direncine Etkisi

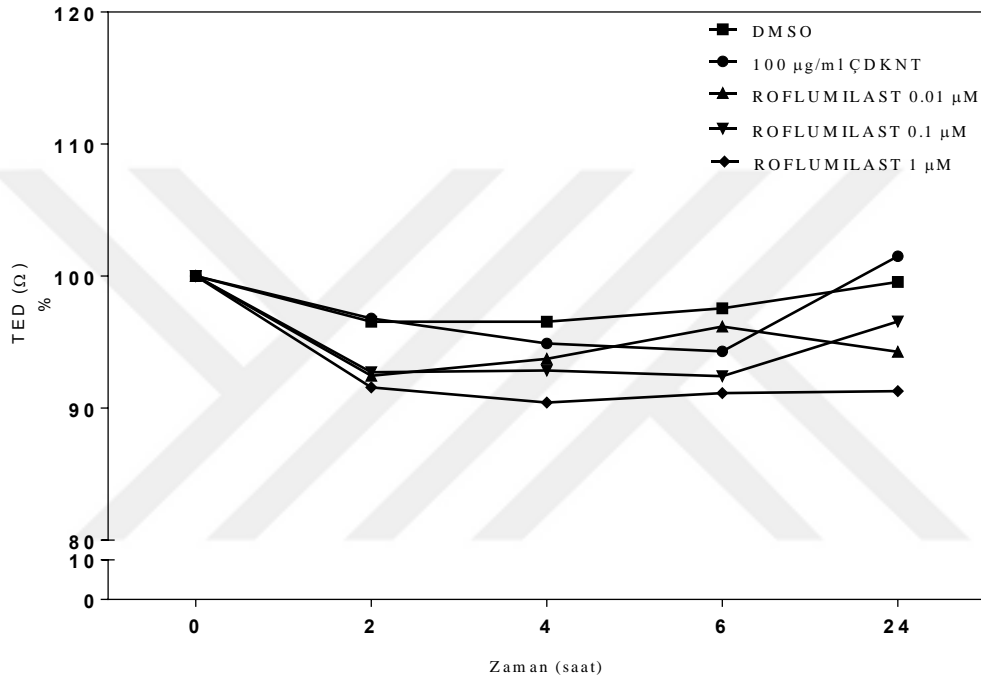
Roflumilast (0.01 μ M, 0.1 μ M ve 1 μ M) 100 μ g/ml ÇDKNT varlığında KOAH'lı bireylerin BEH kültürlerinin TEED'i üzerinde 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde anlamlı bir değişikliğe neden olmadı (Şekil 8).



Şekil 8. Roflumilastın Çok Duvarlı Karbon Nanotüp varlığında KOAH'lı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transeptilyal Elektriksel Direncine Etkisi

4.3.3 Roflumilastın Çok Duvarlı Karbon Nanotüp varlığında Sigaralı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi

Roflumilast (0.01 μ M, 0.1 μ M ve 1 μ M) 100 μ g/ml ÇDKNT varlığında, Sigara içen bireylerin BEH kültürlerinin TEED'i üzerinde 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde anlamlı bir farklılığa sebep olmadığı gözlemlendi (Şekil 9).

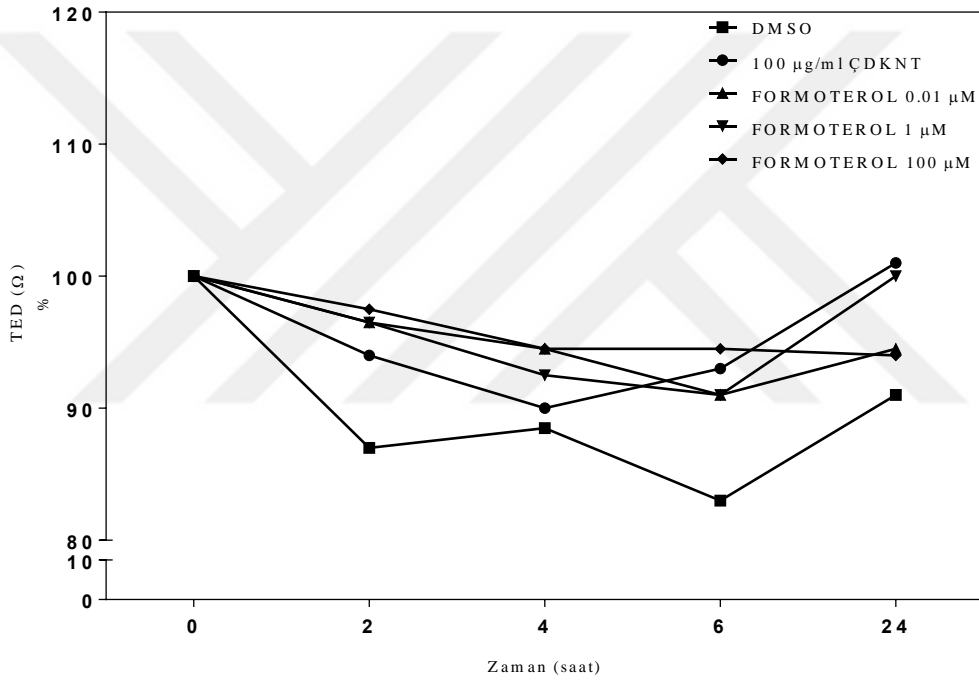


Şekil 9. Roflumilastın Çok Duvarlı Karbon Nanotüp varlığında sigaralı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi

4.4. Formoterolün Çok Duvarlı Karbon Nanotüp varlığında Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi

4.4.1. Formoterolün Çok Duvarlı Karbon Nanotüp varlığında Sigarasız Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi

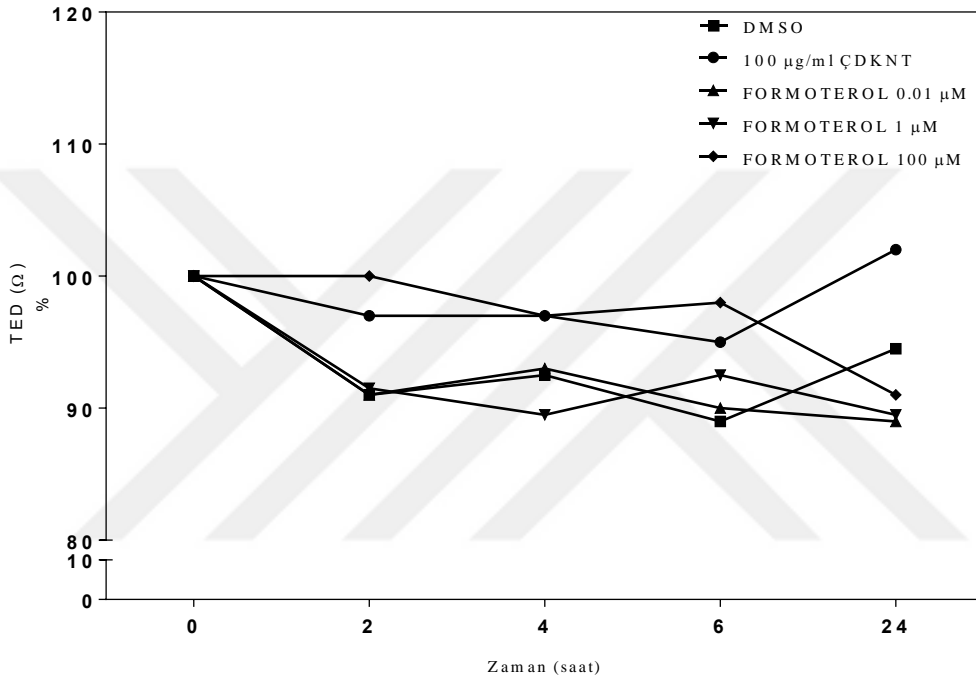
Formoterol varlığında (0.01 μM , 1 μM ve 100 μM) 100 $\mu\text{g/ml}$ ÇDKNT konsantrasyonunun, sigara içmeyen bireylerin BEH kültürlerinin TEED'i üzerinde 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde anlamlı bir farklılığa sebep olmadığı gözlemlendi (Şekil 10).



Şekil 10. Formoterolün Çok Duvarlı Karbon Nanotüp varlığında sigarasız Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi

4.4.2. Formoterolün Çok Duvarlı Karbon Nanotüp varlığında KOAH'lı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transeptilyal Elektriksel Direncine Etkisi

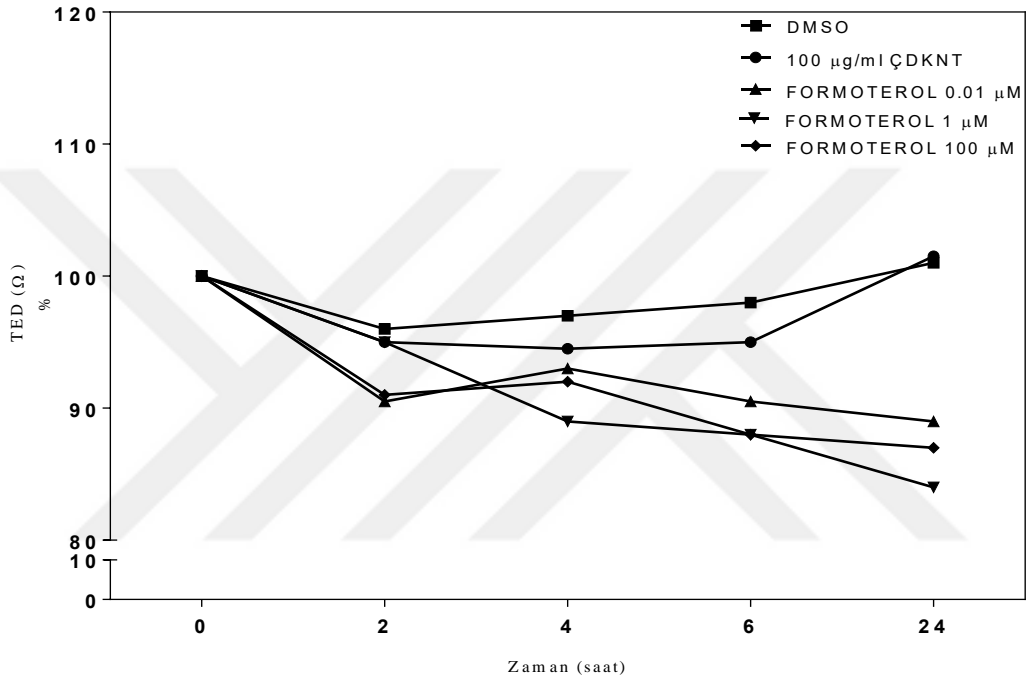
Formoterol varlığında (0.01 μ M, 1 μ M ve 100 μ M) 100 μ g/ml ÇDKNT konsantrasyonunun, KOAH'lı bireylerin BEH kültürlerinin TEED'i üzerinde 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı gözlemlendi (Şekil 11).



Şekil 11. Formoterol'un Çok Duvarlı Karbon Nanotüp varlığında KOAH'lı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transeptilyal Elektriksel Direncine Etkisi

4.4.3. Formoterolün Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Varlığında Sigaralı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi

Formoterol varlığında (0.01 μ M, 1 μ M ve 100 μ M) 100 μ g/ml ÇDKNT konsantrasyonunun, sigara içen bireylerin BEH kültürlerinin TEED'i üzerinde 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı gözlemlendi (Şekil 12).

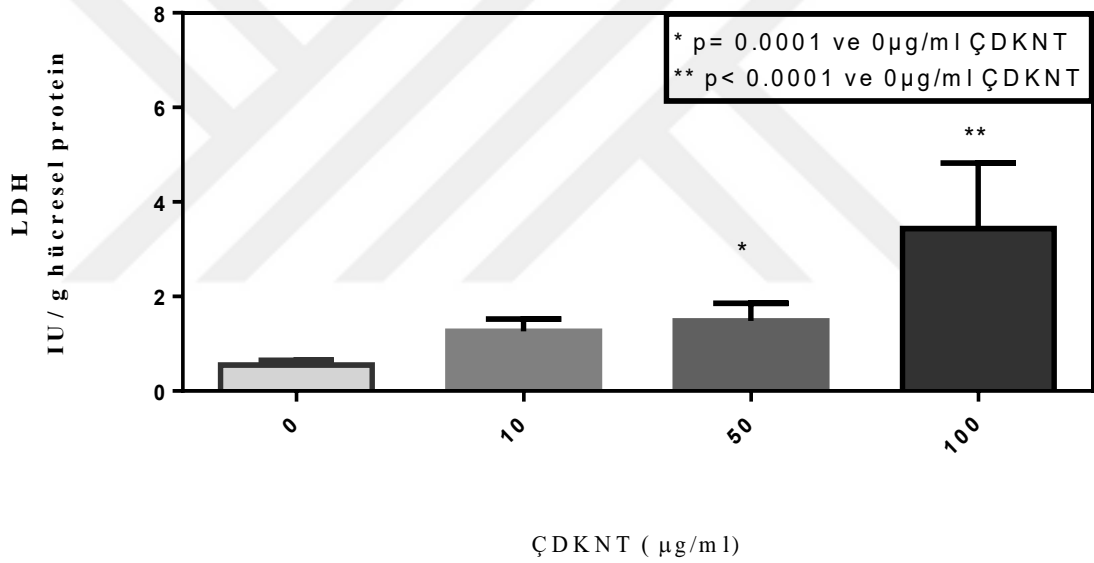


Şekil 12. Formoterolün Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Varlığında Sigaralı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinin Transepitelyal Elektriksel Direncine Etkisi

4.5. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

4.5.1. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Sigarasız Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

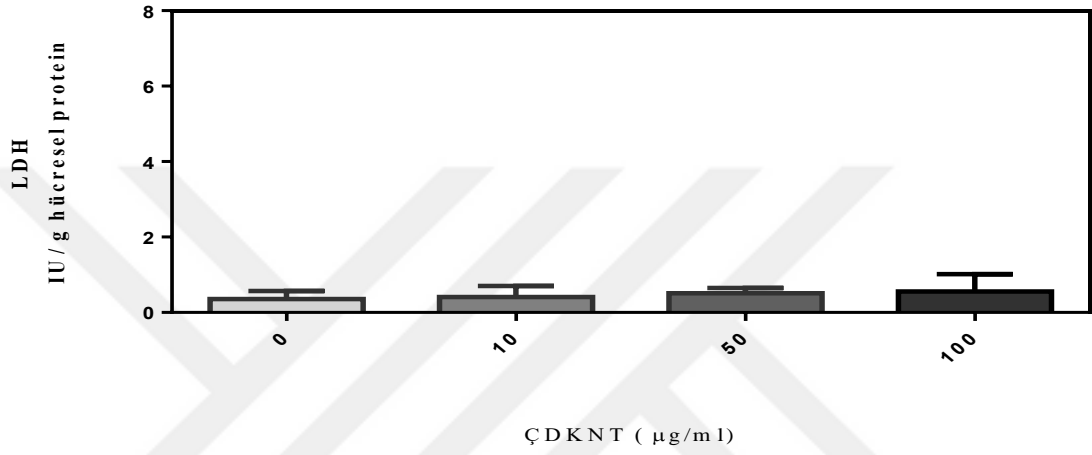
ÇDKNT'lerin, sigara içmeyen bireylerin BEH kültürlerinin LDH salınımı üzerine etkileri incelendiğinde partiküllerin, 24. Saatte 0 µg/ml ÇDKNT'e karşı 50 µg/ml ($p=0.0001$) ve 100 µg/ml ($p<0.0001$) konsantrasyonları LDH miktarı anlamlı olarak arttırdı. Buna karşın 10 µg/ml konsantrasyonunda anlamlı bir değişim görülmedi (Şekil 13).



Şekil 13. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Sigarasız Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

4.5.2. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin KOAH'lı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

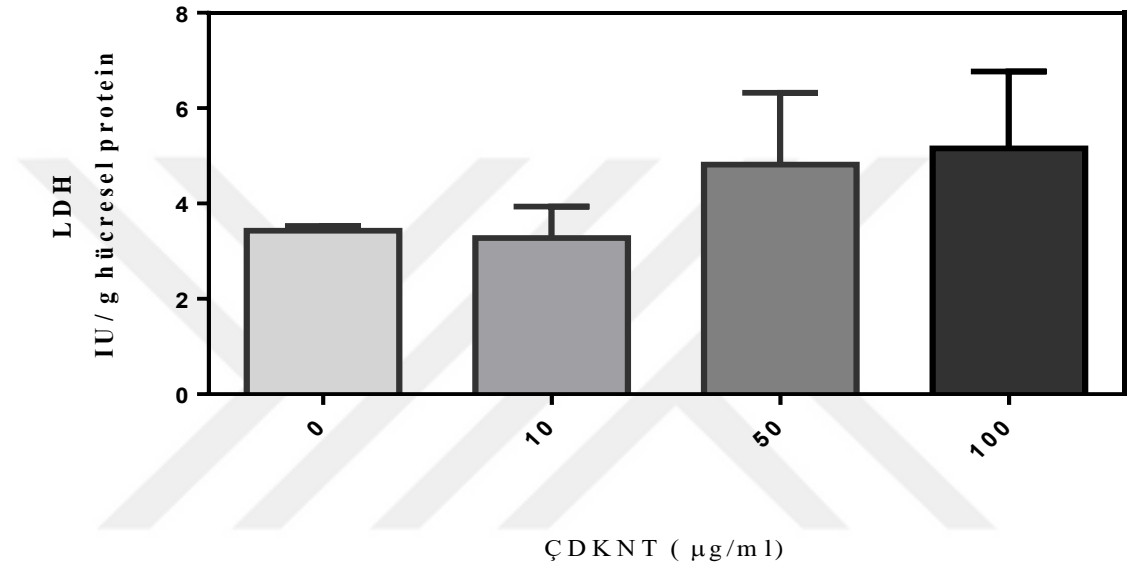
ÇDKNT'lerin, KOAH gelişen bireylerin BEH kültürlerinin LDH salınımına etkileri incelendiğinde partiküllerin, 24. Saatler sonucunda anlamlı bir değişime yol açmadığı belirlendi (Şekil 14).



Şekil 14. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin KOAH'lı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

4.5.3. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Sigaralı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

ÇDKNT'lerin, sigara içen bireylerin BEH hücrelerinin toksisitesi üzerine etkilerine bakıldığında bu partiküllerin, 24. saatler sonucunda anlamlı bir değişime yol açmadığı gözlemlendi (Şekil 15).

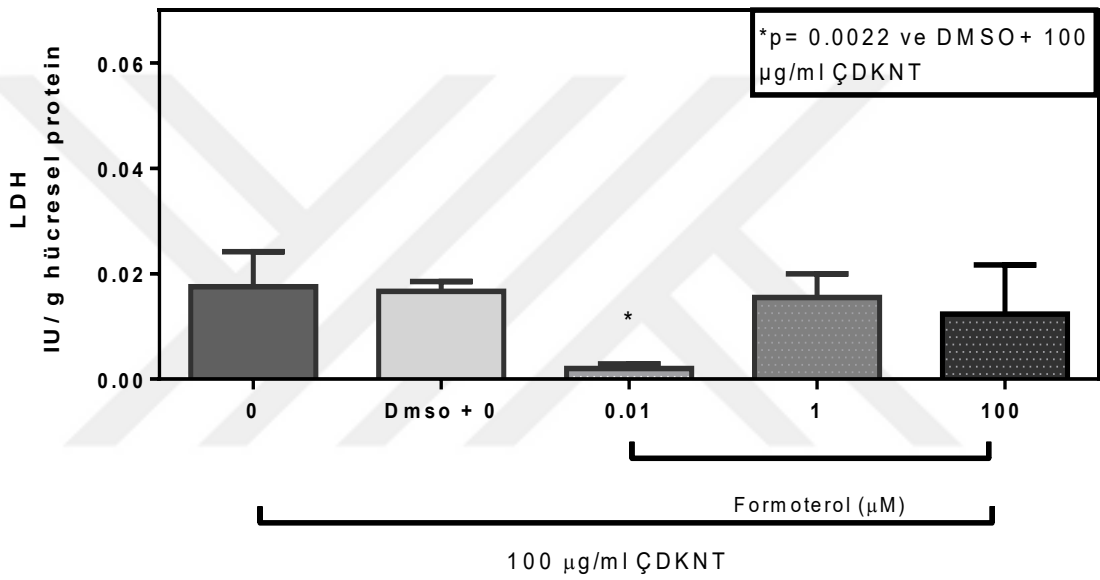


Şekil 15. Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Sigaralı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

4.6. Formoterolün Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Varlığında Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

4.6.1. Formoterolün Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Varlığında Sigarasız Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

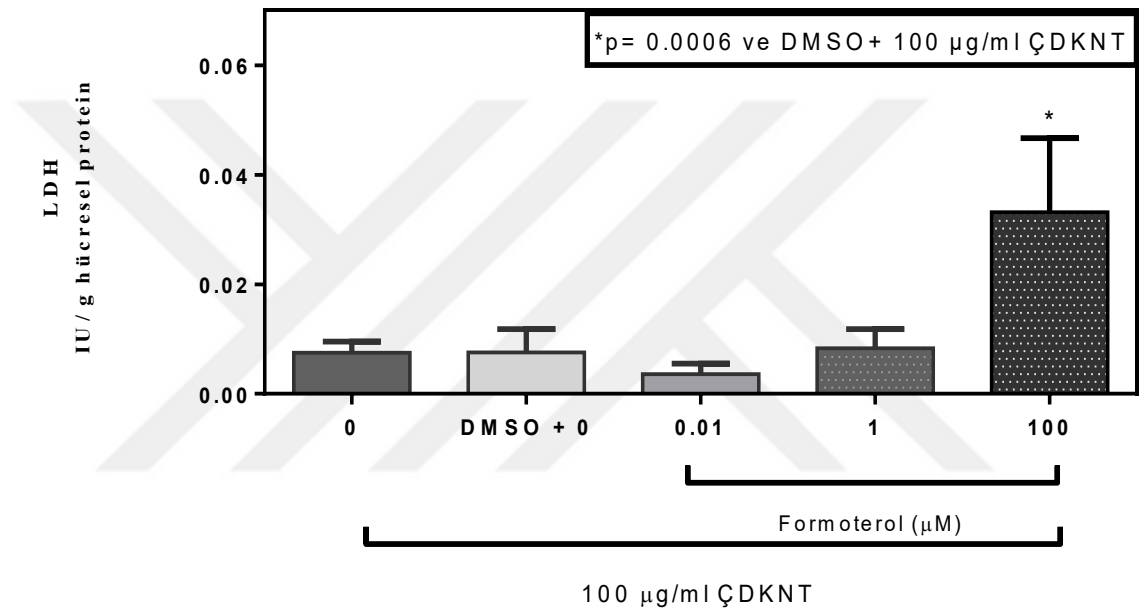
Formoterol (0.01 μM) 100 $\mu\text{g/ml}$ ÇDKNT varlığında, sigara içmeyen bireylerin BEH kültürlerinin LDH seviyesini 24. saatte anlamlı olarak baskıladı ($p= 0.0022$, Şekil 16).



Şekil 16. Formoterolün Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Varlığında Sigarasız Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

4.6.2. Formoterolün Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Varlığında KOAH'lı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

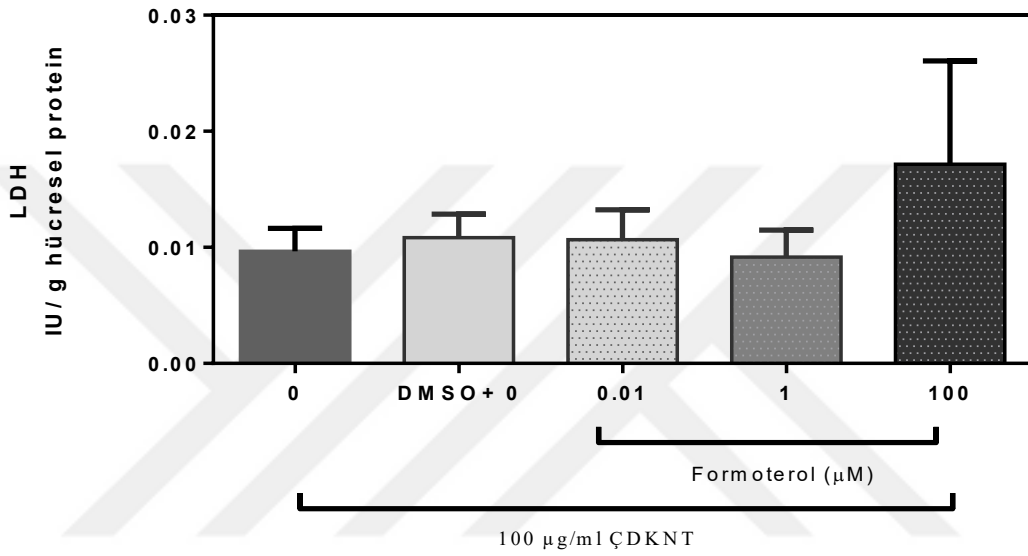
Formoterolün düşük dozları (0.01 μ M, 1 μ M) ve 100 μ g/ml ÇDKNT varlığında KOAH'lıların BEH kültürlerinin LDH düzeyinde anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, 100 μ M formoterol varlığında LDH seviyesinin anlamlı olarak arttığı saptandı (p= 0.0006; Şekil 17).



Şekil 17. Formoterolün Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Varlığında KOAH'lı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

4.6.3. Formoterolün Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Varlığında Sigaralı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

Formoterol varlığında (0.01 μ M, 1 μ M ve 100 μ M) 100 μ g/ml ÇDKNT konsantrasyonunun, sigara içen bireylerin BEH kültürlerinin LDH seviyelerinde 24. saatte anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı gözlemlendi (Şekil 18).

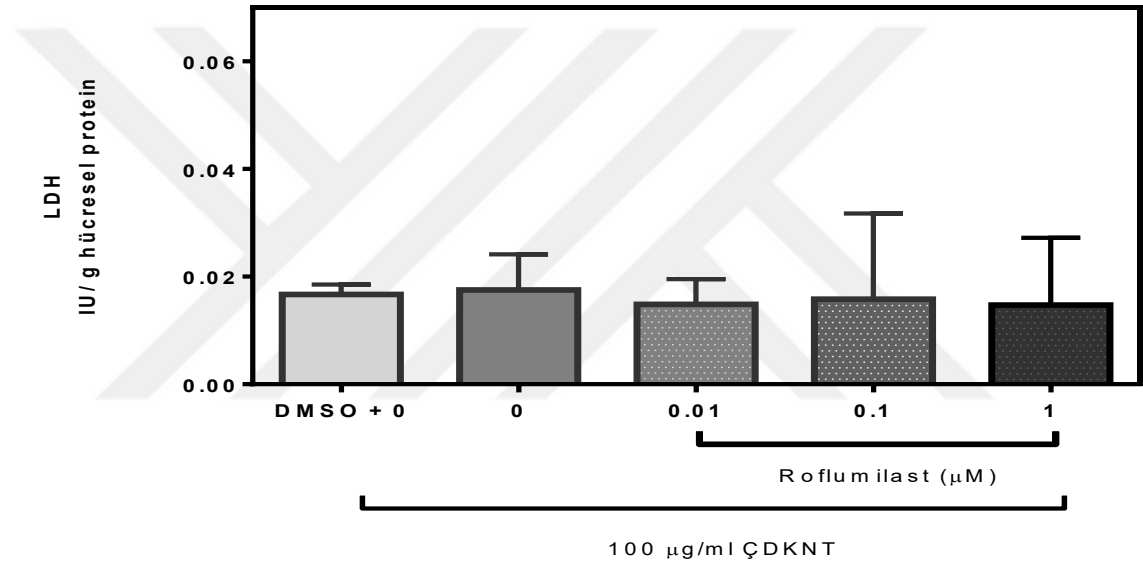


Şekil 18. Formoterolün Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Varlığında Sigaralı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

4.7. Roflumilastın Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Varlığında Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

4.7.1. Roflumilastın Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Varlığında Sigarasız Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

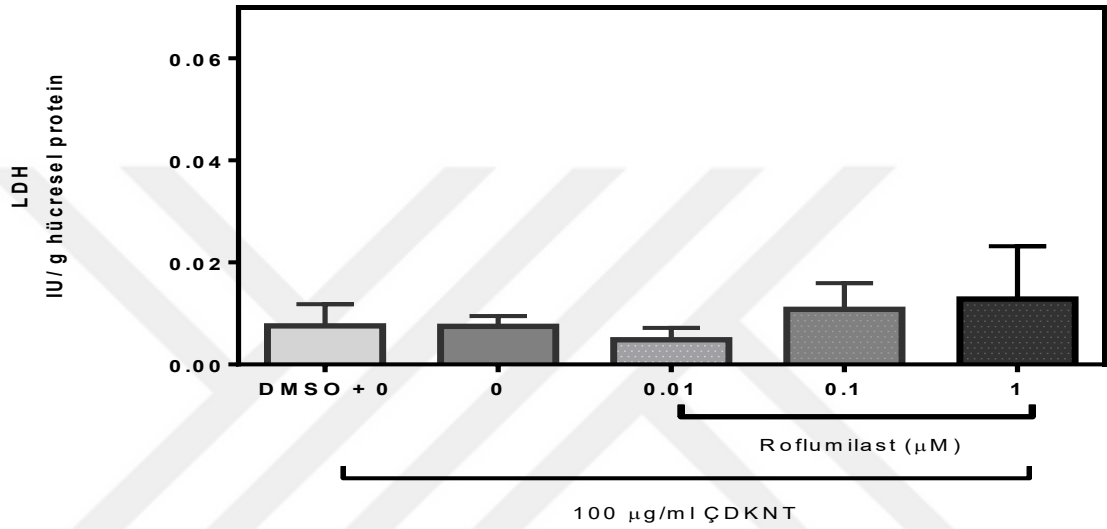
Roflumilast varlığında (0.01 μM , 0.1 μM ve 1 μM) 100 $\mu\text{g/ml}$ ÇDKNT konsantrasyonunun, sigara içmeyen bireylerin BEH LDH salınımı üzerinde 24. saatte anlamlı bir farklılığa sebep olmadığı gözlemlendi (Şekil 19).



Şekil 19. Roflumilastın Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Varlığında Sigarasız Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

4.7.2. Roflumilastın Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Varlığında KOAH'lı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

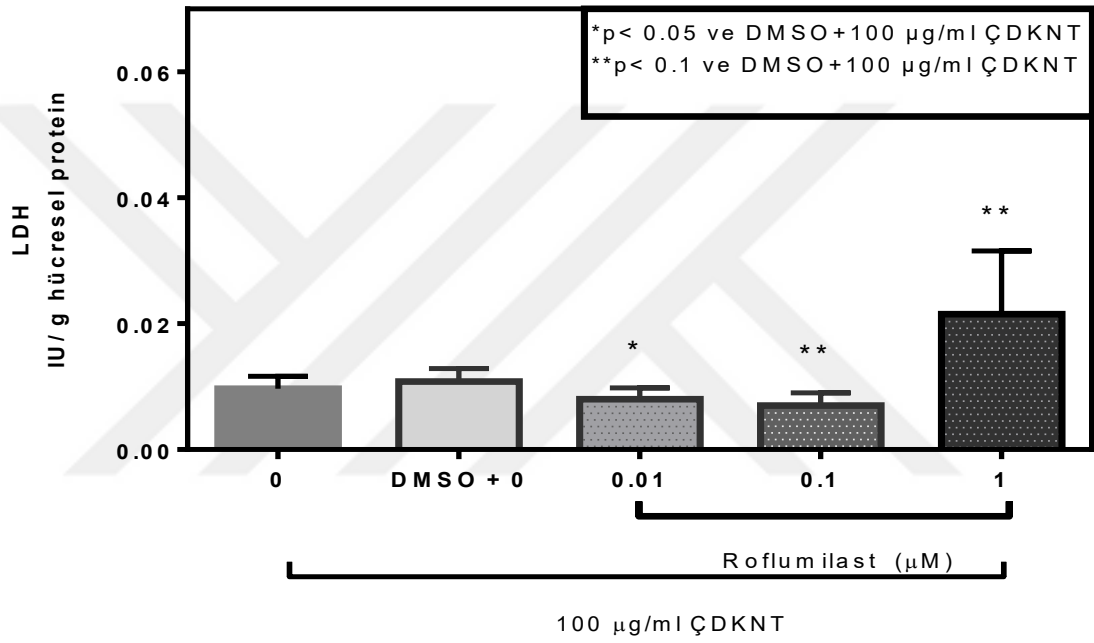
Roflumilast varlığında (0.01 μM , 0.1 μM ve 1 μM) 100 $\mu\text{g/ml}$ ÇDKNT konsantrasyonunun, KOAH'lı bireylerin BEH kültürlerinin LDH salınımı üzerinde 24. saatte anlamlı bir farklılığa sebep olmadığı gözlemlendi (Şekil 20).



Şekil 20. Roflumilastın Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Varlığında KOAH'lı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

4.7.3. Roflumilastın Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Varlığında Sigaralı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

Sigara içen bireylerin BEH LDH salınımı üzerinde, 100 µg/ml ÇDKNT varlığında, 24. saatte roflumilastın 0.01 µM ve 0.1 µM dozları LDH seviyesini anlamlı olarak azaltırken, 1 µM Roflumilast dozu LDH seviyesini anlamlı olarak arttırdı (*p< 0.05, **p< 0.1; şekil 21).



Şekil 21. Roflumilastın Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Varlığında Sigaralı Bronş Epitel Hücre Kültürlerinden Laktat Dehidrogenaz Salınımına Etkisi

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında sigara içen, sigara içmeyen ve KOAH'lı bireylerden alınan bronş dokularından primer BEH kültürleri başarılı bir şekilde gerçekleştirilerek ÇDKNT'lerin bu hücrelerin TEED ve LDH salınımına olan etkileri araştırıldı. Daha sonra formoterol ve roflumilastın ÇDKNT'lerin etkilerini değiştirip değiştirmediğine bakıldı. Çalışmamızda, ÇDKNT'ler BEH kültürlerinin TEED'ne veya LDH salınımına bir etkide bulunmadı. Ne roflimulast, ne de formoterol ÇDKNT varlığında TEED üzerinde anlamlı bir etki göstermedi. Bununla birlikte iki ajanın yüksek dozları hücrelerden LDH salınımını artırırken, düşük dozları sınırlı da olsa LDH salınımını baskıladılar. Bulgularımız, ÇDKNT'lerin çalışılan dozlarda BEH kültür permabilitesini ve toksisitesini etkilemeyeceğini, ancak roflumilast ve formoterolün yüksek dozlarının hücrelerde toksik etkiye yol açabileceklerini düşündürmektedir.

Çalışmamızda primer BEH'leri sigara içmeyen, sigara içen ancak KOAH gelişmeyen ve sigara içen KOAH'lılardan cerrahi olarak elde edilen bronş eksplantlarından hava-sıvı ara yüzü kültürlerinde ('air liquid interface') başarılı bir şekilde üretildiler. Çalışmalar bu metod ile üretilen kültürlerin in vivo ortama en uygun şekilde proliferasyon ve başkalaşım geçirdiklerini göstermektedir (143). Dolayısıyla, çalışmamızda kullandığımız hücre kültürü yöntemi verilerimizi geçerliliğini artırmaktadır.

Hava yolu epitel tabakası, hava yollarının korunmasında, inhalasyon ile alınan çeşitli formlardaki (gaz, partikül vs) inorganik ve organik irritan ve allerjenlerin, sub-epitelyuma geçmeden mukosilyer temizlenme ile elimine edilmesinde son derece önemli bir rol oynamaktadır (67). Epitel tabakasının bu görevini gereği gibi yapabilmesi için intakt bir bariyer özelliğini koruması zorunludur (67). İn vitro ortamda, hava yolu epitel kültürlerinin yeterince intakt olup olmadıkları ve bütünlüklerinin bozulup bozulmadığı, kültürlerin permabilitesi değerlendirilmek suretiyle analiz edilmektedir (138). Epitel permabilitesini belirlemede, ¹⁴C ile işaretli bovin serum albümini (BSA) veya mannitol gibi moleküllerin parasellüler aralıkta geçiş oranı ile değerlendirme yapılmasının yanında, çalışmamızda kullandığım gibi doğrudan TEED deki değişimler de permabilitenin göstergesi olarak kullanılmaktadırlar (134).

Söz konusu yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalarda inhalasyon ile alınan çeşitli gazların (ozon, NO₂), iritanlar ve allerjenlerin BEH kültürlerinin TEED’de düşmeye ve ¹⁴C-BSA geçirgenliğinde artışa yol açmak suretiyle epitel permabilitesini artırdıkları gösterilmiştir (134, 146). Ancak, son yıllarda kullanımı hızla artan insan yapımı NP’lerin primer insan BEH kültür permabilitesini etkileyip etkilemedikleri bilinmemektedir.

Bildiğimiz kadarıyla, çalışmamız literatürde ÇDKNT’lerin doğrudan hasta dokusundan elde edilen primer BEH kültürlerinin permeabilitesi ve toksisitesi üzerine etkilerini araştıran ilk çalışmadır. Bulgularımız, ÇDKNT’lerin kullanılan konsantrasyonlarda (10, 50 ve 100 µg / ml) BEH kültürlerinin TEED’ni etkilemediğini göstermiş olup, sonuçlarımız, Thompson ve ark’ nın primer BEH kullanarak yaptığı çalışmada elde ettiği veriler ile uyuşmamaktadır (139). Söz konusu çalışmada, ticari olarak elde edilen “normal” primer BEH kültürleri 10µg/cm² dozunda ÇDKNT’e maruz bırakılmış, sonuçta kültürlerin TEED’de anlamlı bir düşüş gözlenmiştir (139). İki çalışma arasındaki uyumsuzluğun nedeni, farklı hücre tipleri olabilir. Zira, ilgili çalışmada karakterizasyonu iyi bilinmeyen hazır ticari hücreler kullanılırken, bizim çalışmamızda iyi derecede karakterize edilmiş hücreler kullanılmıştır. Bir diğer neden, iki çalışmada kullanılan partiküller arasındaki doz farklılığı olabilir. Diğer yandan bizim çalışmamızda metal içermeyen NP’ler kullanılırken adı geçen çalışmada kullanılan partiküllerin % 5’lik Fe katalizör içerdikleri bildirilmektedir.

Bununla birlikte Banga ve ark. nın Calu-3 akciğer kanser hücre hatları ile elde ettikleri sonuçlar, TEED ile ilgili verilerimizi teyid etmektedir. Adı geçen çalışmaya göre kısa süreli maruziyetler kültürlerin TEED’ni etkilemezken, maruziyet süresi arttıkça TEED’in azaldığı belirtilmektedir (140). Bu nedenle, çalışmamızda TEED’de değişme olmamasının nedeni 24 saatlik kısa maruziyet süresi olabilir, bunu anlamak için gelecek çalışmalarda maruziyet süresinin artırılması uygun olur. Bu tezi doğrular nitelikte, Rotoli ve arkadaşlarının Calu-3 hücre hatlarında 7 günlük ÇDKNT maruziyetinin TEED’i anlamlı olarak düşürdüğü bildirilmektedir (141, 142).

Formoterol ve roflumilast ile ilgili olarak ÇDKNT varlığında permabiliteye etkilerini doğrudan araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda iki ajan da ÇDKNT varlığında BEH’lerin TEED’de bir değişikliğe yol açmamıştır. Ancak, herhangi bir nedenle azalmış TEED’de bu ajanların etki edip etmeyeceklerinin ayrıca araştırılması

gerekir. 2014 yılında Javier Milara ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada roflumilastın primer bronş epitel hücrelerinde oksidatif stresi ve NOX4 ifadesini baskılayarak KOAH oluşumunu baskılayabilecekleri belirtilmektedir (143).

Hasara uğrayan veya toksik bir madde ile karşılaşan hücrede LDH salınımı artmaktadır, dolayısıyla söz konusu test gerek rutin olarak, gerekse de araştırma amaçlı çalışmalarda hücre toksisitesinin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda ÇDKNT'lerin hücre düzeyindeki olası toksik etkileri LDH salınımı ile değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre ÇDKNT'ler gerek sigara içen, gerekse de KOAH'lıların hücrelerinden LDH salınımını etkilememiştir. Dolayısıyla, söz konusu hücrelerin ÇDKNT'lerin etkilerine daha dirençli olabileceklerini düşündürmektedir. Bunda, adı geçen kültürlerin elde edildiği donörlerin sigara içmiş olmaları, dolayısıyla gerçek hayatta yoğun olarak sigara dumanı içindeki karbon partiküllerine maruz kalmış olmalarının ve hücrelerinde yapısal bir direnç (epigenetik bir değişim) oluşup olmadığının araştırılması gerekir.

ÇDKNT'lerin yüksek dozları (50 ve 100µg/ml) sadece sigara içmeyen bireylerin BEH kültürlerinden LDH salınımını artırmış olup bu sonuçlar, sigaraya maruz kalmamış hücrelerin söz konusu partiküllerin toksik etkilerine daha duyarlı olacaklarını düşündürmektedir. Bulgularımız, daha önce Tsukahara ve Haniu'nun çalışmalarında elde ettikleri sonuçları teyid eder niteliktedir (144). Adı geçen çalışmada BEAS-2B bron epitel hücreleri 24 saat boyunca ÇDKNT'lerin farklı konstrasyonlarına maruz bırakılmış ve konstrasyon arttıkça LDH seviyesinin de doğru orantılı olarak arttığı rapor edilmiştir. Yine yakın zamanda, Lucia ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, düşük konstrasyonlardaki ÇDKNT herhangi bir etki göstermemesine karşın, ÇDKNT konstrasyonları arttıkça hücrelerden LDH salınımının anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir (145).

Roflumilast ve formoterolün LDH salınımı ile ilgili etkilerine baktığımızda, ÇDKNT'lere maruz kalan hücrelerde, bu ajanların düşük dozlarının LDH salınımını azalttıkları, bir anlamda hücre toksisitesini azalttıkları, yüksek dozlarının ise hücrede toksisiteye yol açtığını göstermiştir. Her ne kadar in vitro olarak elde edilen bulgularımız doğrudan kliniğe uyarlanamasa da, çalışmamız yine de klinikte obstrüktif hava yolu hastalıklarının (astım ve KOAH) tedavisinde yaygın olarak kullanılan bu ajanların yüksek dozlarının kullanımında dikkatli olunması gerektiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızın en önemli kısıtlılığı, ÇDKNT'lerin daha yüksek konsantrasyonlarının test edilmemiş olmasıdır. Zira, literatürde de gösterildiği gibi ÇDKNT'lerin yüksek konsantrasyonları gerek hücrelerin TEED'ini, gerekse de LDH salınımını artırabilir. Diğer yandan tek bir maruziyet zamanı (24 saat) seçilmesi de bir diğer kısıtlılıktır. Oysa, daha önce yapılan çalışmalar daha uzun maruziyet zamanının bu partiküllerin toksisitesini artırabileceğini göstermiştir. Bundan başka TEED sonuçlarının hücre kültür permabilitesinin bir diğer göstergesi olan 14C-BSA geçirgenliği ile teyid edilmesi uygun olurdu. Yine, hücre toksisitesini gösteren MTT gibi yöntemler de LDH sonuçlarını test etmede kullanılabilir.

Sonuç olarak, çalışmamızın bulguları ÇDKNT'lerin kullanılan doz ve sürelerde iyi derecede karakterize edilmiş primer BEH kültür permabilitesini etkilemediğini ve hücre düzeyinde ciddi bir toksisiteye yol açmadığını göstermektedir. Artan maruziyet süresinin veya ÇDKNT'lerin artan dozlarının bir etkisinin olup olmadığının daha ileri çalışmalarda araştırılması uygun olacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Tezime konu olan bu çalışmada, bildiğimiz kadarıyla literatürde ilk kez ÇDKNT'nin direkt insandan elde edilen primer BEH'lerin permabilitesi üzerindeki etkisi çalışılmış oldu.
2. Çalışmamızda, 24. saat sonrasında 0 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml ÇDKNT varlığının KOAH'lı, sigara içen ve sigara içmeyen bireylerin BEH kültürlerinin TEED'ne anlamlı bir etkisinin olmadığını belirledik.
3. Roflumilast (0.01, 0.1 ve 1µM) ve formoterolün (0.01, 1 ve 100µM) ÇDKNT varlığında TEED'i değiştirmedini gözlemledik.
4. ÇDKNT KOAH'lı ve sigara içen bireylerin BEH kültürlerinin LDH seviyesinde bir değişikliğe yol açmazken, sigara içmeyen bireylerde LDH salınımını 50 ve 100 µg/ml dozlarında anlamlı olarak arttırdılar.
5. Formoterol 100 µM dozunda KOAH'lı bireylerin BEH kültürlerinden LDH salınımını artırırken, 0.01 µM konsantrasyonunda sigara içmeyen bireylerin kültürlerinde LDH düzeyini artırmıştır.
6. Roflumilastın 0.01 µM ve 0.1 µM'lık konsantrasyonları sigara içen bireylerde LDH salınımını baskımlarken, 1 µM'lık konsantrasyonda ise LDH düzeyini artırmıştır.

Bu veriler eşliğinde gelecekte şu çalışmaların yapılması uygun olur:

- a. Çalışmamızda maksimum maruziyet süresi olarak 24 saat seçilmişti. Bu sürenin NP'lerin uzun süreli etkisini anlayabilmek için 48 veya 72 saate çıkarılması uygun olur.
- b. Her ne kadar kültür pemabilitesinin önemli bir göstergesi olan TEED'de bir değişiklik gözlenmemişse de, bu sonucun permabiliteyi değerlendiren ¹⁴C ile işaretli bovin serum albümin (BSA) veya mannitol gibi makromoleküllerin geçirgenliği esasına dayanan yöntemler ile teyid edilmesi yararlı olur.

- c. Aynı şekilde epitel hücrelerde bütünlüğü sağlayan “tight junction” ve occludin gibi proteinlerin ekspresyonunun etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesi kesin bir fikir sahibi olmak açısından yararlı olur.
- d. Çalışmamız esnasında gönüllülerin hücrelerine sadece NP verilerek sonuçlar elde edildi. Doğada sadece tek bir NP’ e ya da partiküle maruz kalmak neredeyse imkânsızdır. Bu yüzden birlikte solunması muhtemel NP’lerin ve hava kirleticileri (ozon, azot oksitleri) ile ev tozu akar allerjeni gibi allerjenler ile kombinasyon halinde etkilerinin araştırılması yararlı olur.
- e. ÇDKNT’lerin akciğerlerin alveol bölgesinde biriktikleri ve burada çeşitli olumsuz etkilere yol açtıkları gösterilmiştir. Dolayısıyla, primer alveol epitel hücre permabilitesinin de çalışılması yararlı olur.
- f. Her ne kadar LDH çalışmalarımız ÇDKNT’lerin hücre üzerinde toksik bir etkide bulunmadığını gösterdiyse de daha yüksek dozların ve daha uzun süreli maruziyetin etkisinin araştırılması gerekir.
- g. LDH ile elde edilen verilerin, hücre toksisitesini belirleyen MTT gibi boyama yöntemleri ve hücre apoptozisi gibi yöntemlerle teyid edilmesi gerekir.

7. KAYNAKLAR

1. Tetley TD. Health effects of nanomaterials. *Biochem Soc Trans* 2007;35 (Pt 3):527-531.
2. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005;113(7):823-839.
3. Göğebakan B., İnsan yapımı nanopartiküllerin kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan bireylerin bronş epitel hücrelerinin inflamasyonu, hücre yaşam döngüsü ve apoptozisine etkisi. 2012, Gaziantep Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora tezi, 92 sayfa, Gaziantep (Prof. Dr. Ahmet Arslan).
4. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: Gold executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176(6):532-555.
5. Goldstain A. Handbook of nanophase materials, Marcel Dekker Inc, 1997 New York.
6. Rao CN, Müller A, Cheetham AK. The chemistry of nanomaterials 2005; volume 1, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim.
7. Robert PA, Guogang R. Potential impact of nanotechnology on the control of infectious diseases *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2008;102, 1-2.

8. Liveri VT. Controlled synthesis of nanoparticles in microheterogeneous systems, 2006, Springer Science+Business Media, Inc. New York.
9. Zhang YB, Li CH, Jia DZ, Experimental study on the effect of nanoparticle concentration on the lubricating property ofnanofluids for MQL grinding of Ni-based alloy, Journal of materials processing technology. 2016;232, p.100-115.
10. Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J. The potential risks of nanomaterials: A review carried out for ecetoc. Part Fibre Toxicol 2006;3:11
11. Saltan M, Terzi S, Sargin Ş, Morova M, Serin S. Yol agregalarında nanoteknoloji kullanımı, SDU International Technologic Science, Vol. 5, No 1, 2013 p. 12-21.
12. Dong TY, Wu HH, Lin MC. Superlattice of octanethiol-protected copper nanoparticles. Langmuir, 2006;22, 6754-6756.
13. Balbus J, Denison R, Florini K, Walsh S. Getting nanotechnology right the first time. Science and Technolog y Summer 2005, p. 65-71.
14. British Museum Highlights; Freestone, 270-273
15. Daniel MC, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. Chem. Rev. , 2004;104 , 293 – 346
16. Huang Z. International nanotechnology development in 2003: country, institution and technology field analysis based on uspto patent database. Journal of Nanoparticle Research 6, 2004: 325–354.
17. Erdoğan A, Özkan A. Kanser tedavisinde ve tümör görüntülemesinde nanoteknolojik uygulamalar. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi 2013; 22(3):426-440.

18. Fiorino DJ. Voluntary initiatives, regulation, and nanotechnology oversight: charting a path. Project on Emerging Nanotechnologies Publication 19.
19. Prakash YS, Matalon S. Nanoparticles and the lung: friend or foe?. *American Journal Of Physiology-Lung Cellular And Molecular Physiology* 2014;1;306(5):L393-6.
20. Carvalho TC, Peters JI, Williams RO, 3rd. Influence of particle size on regional lung deposition--what evidence is there? *Int J Pharm* 2010;406(1-2):1-10.
21. Şekeroğlu Z. Nanoteknolojiden nanogenotoksikolojiye: kobalt-krom nanopartiküllerinin genotoksik etkisi, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2013;1;p.33-42.
22. Geiser M, Kreyling WG. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 2010;7.2.
23. Carvalho TC, Peters JI, Williams RO, 3rd. Influence of particle size on regional lung deposition--what evidence is there? *Int J Pharm* 2010;406(1-2):1-10.
24. Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect* 2005;113(11):1555-1560.
25. Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J. The potential risks of nanomaterials: A review carried out for ecetoc. *Part Fibre Toxicol* 2006;3:11.

26. Muller L, Riediker M, Wick P, Mohr M, Gehr P, Rothen-Rutishauser B. Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: Differences between human lung cell monocultures and an advanced threedimensional model of the human epithelial airways. *J R Soc Interface* 2010;7 Suppl 1:p:27-40.
27. LI C, Liu H, Sun Y, Wang H, Guo F, Rao S, Deng J, Zhang Y, Miao Y, Guo C, Meng J, Chen X, Li L, Li D, Xu H, Li B, Jiang C. PAMAM Nanoparticles promote acute lung injury by inducing autophagic cell death through the akt-tsc2-mtor signaling pathway. *J Mol Cell Biol.* 2009;1, p.37-45.
28. Bastian S, Busch W, Kuhnel D, Springer A, Meissner T, Holke R, Scholz S, Iwe M, Pompe W, Gelinsky M, Potthoff A, Richter V, Ikonomidou C, Schirmer K. Toxicity of tungsten carbide and cobalt-doped tungsten carbide nanoparticles in mammalian cells in vitro. *Environ Health Perspect.* 2009;117,p.530-536.
29. Jacobsen NR, Pojana G., White P, Moller P, Cohn CA, Korsholm KS, Vogel U, Marcomini A, Loft S, Wallin H. Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and c(60) fullerenes in the fe1-mutatrade markmouse lung epithelial cells. *Environ Mol Mutagen* 2008;49, 476-487.
30. Öztürk AB, Bayraktar R, Gögebakan B, Mumbuc S, Bayram H. Effects of diesel exhaust particles and TiO₂ nanoparticles on release of inflammatory cytokines from human nasal epithelial cells. *European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress, Geneva, Switzerland 2012; p: P1532.*
31. Folkmann JK, Risom L, Jacobsen NR, Wallin H, Loft S, Moller P. Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to c60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes. *Environ Health Perspect.* 2009;117, 703-708.

32. Singh N, Manshian B, Jenkins GJ, Griffiths SM, Williams PM, Maffei TG, Wright CJ, Doak SH. Nanogenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 2009;30(23-24):3891-3914.
33. Rotoli BM, Bussolati O, Bianchi MG, Barilli A, Balasubramanian C, Bellucci S, Bergamaschi E. Non-functionalized multi-walled carbon nanotubes alter the paracellular permeability of human airway epithelial cells. *Toxicol Lett.* 2008 May 5;178(2):95-102. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.02.007. Epub 2008 Mar 4.
34. Göğebakan B, Bayram H. Havayolu epiteli, solunum sistemi ve hastalıkları: Özlü T, Karadağ M, Kaya A (Editörler). İstanbul Tıp Kitapevi, 2010.p:35-39.
35. Li N, Xia T, Nel AE. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic Biol Med* 2008;44(9):1689-1699.
36. Donaldson K, Poland CA, Schins RPF. Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies. *Nanotoxicol*, 2010; 4 (4): 414-20.
37. Xie H, Mason MM, Wise Sr, JP. Genotoxicity of metal nanoparticles. *Rev Environ Health*, 2011; 26 (4): 251-68.
38. Revell PA. The biological effects of nanoparticles. *Nanotechnol Percept*, 2006; 2: 283–98.
39. Gonzalez L, Sanderson BJS, Kirsch-Volders M. Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. *Mutagenesis*, 2011; 26 (1): 185–91.
40. Syed S, Zubair A, Frieri M. Immune response to nanomaterials: implications for medicine and literature review. *Curr Allergy Asthm Rep*, 2013; 13 (1): 50-7.

41. Gonzalez L, Lison D, Kirsch-Volders M. Genotoxicity of engineered nanomaterials: a critical review. *Nanotoxicol*, 2008; 2 (4): 252-73.
42. Doherty AT, Howell RT, Ellis LA, Bisbinas I, Learmonth ID, Newson R. Increased chromosome translocations and aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of patients having revision arthroplasty of the hip. *J Bone Joint Surg*, 2001; 83: 1075-81.
43. Xie H, Wise SS, Holmes AL, Xud B, Wakemand TP, Pelsue SC. Carcinogenic lead chromate induces DNA double-strand breaks in human lung cells. *Mutat Res*, 2005; 586: 160–72.
44. Rothen-rutishauser B, Grass RN, Blank F, Limbach LK, Muhlfield C, Brandenberger C, Raemy DO, Gehr P, Stark WJ. Direct combination of nanoparticle fabrication and exposure to lung cell cultures in a closed setup as a method to simulate accidental nanoparticle exposure of humans. *Environ Sci Technol*. 2009;43, 2634-2640.
45. Andersson PO, Lejon C, Ekstrand-Hammarstrom B, Akfur C, Ahlinder L, Bucht A, Osterlund L. Polymorph- and size-dependent uptake and toxicity of tio nanoparticles in living lung epithelial cells. *Small* 2011;7(4):514-523.
46. Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect* 2005;113(11):1555-1560.
47. Chen M, von Mikecz A. Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to sio2 nanoparticles. *Exp Cell Res* 2005;305(1):51-62.
48. Park EJ, Yi J, Chung KH, Ryu DY, Choi J, Park K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett* 2008;180(3):222-229.

49. Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: A role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;175(3):191-199.
50. Bonvallet V, Baeza-Squiban A, Baulig A, Brulant S, Boland S, Muzeau F, Barouki R, Marano F. Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1a1 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25(4):515-521.
51. Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, MacNee W, Stone V. Combustion-derived nanoparticles: A review of their toxicology following inhalation exposure, *Particle and Fibre Toxicology* 2005;2:10.
52. Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ, Gores GJ. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res* 2000;60(1):184-190.
53. Valinluck V, Sowers LC. Inflammation-mediated cytosine damage: A mechanistic link between inflammation and the epigenetic alterations in human cancers. *Cancer Res* 2007;67(12):5583-5586.
54. Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Moller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles--a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett* 2009;188(2):112-118.
55. Park EJ, Yi J, Chung KH, Ryu DY, Choi J, Park K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured beas-2b cells. *Toxicol Lett* 2008;180(3):222-229.
56. Dai H. Carbon Nanotubes: Synthesis, integration, and properties. *Acc. Chem. Res.* 2002, 35, 1035-1044

57. Szeleifer I, Yerushalmi R. Polymers and carbon nanotubes dimensionality, interactions and nanotechnology. *Polymer* 2005; 46: 7803–7818.
58. Lacerda L, Bianco A, Prato M, Kostarelos K. Carbon nanotubes as nanomedicines: from toxicology to pharmacology. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58(14): 1460-70.
59. Mongillo J. *Nanotechnology 101*. Westport Conn.: Greenwood Press, 2007.
60. Yu MF, Files BS, Arepalli S, Ruoff RS, Tensile loading of ropes single wall carbon nanotubes and their mechanical properties. *Phys Rev Lett*. 2000; 84(24): 5552-5554.
61. Tejral G, Panyala NR, Havel J. Carbon nanotubes: toxicological impact on human health and environment. *J Appl Biomed* 2007; 7: 1–13.
62. Oberdörster G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *J Intern Med* 2010; 267: 89-105.
63. Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 175: 191-99.
64. Oraki KM, Mirzaie S, Zeinali M, Amin M, Said HM, Jalili A, Mosaveri N, Jamalani M. Ablation of breast cancer cells using trastuzumab-functionalized multi-walled carbon nanotubes and trastuzumab-diphtheria toxin conjugate, *Chem Biol Drug Des*. 2014 Mar;83(3):259-65. doi: 10.1111/cbdd.12244.
65. Karlsoon HL, Cronholm P, Gustafsson J, Moller L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic.

66. Radomski A, Jurasz P, Alonso-Escolano D, Drews M, Morandi M, Malinski T. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 882-93.
67. Gao W, Li L, Wang Y, Zhang S, Adcock IM, Barnes PJ, Huang M, Yao X. Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Respirology*. 2015 Jul;20(5):722-9
68. Mannino DM, Calverley P. GOLD 2011.
69. Agusti AG. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*; 2:367–70. 2005.
70. Türk Toraks Derneği Uzlaşma Raporu, 2010.
71. WHO reports. Global Burden Diseases. 2012.
72. Kim YH, Fazlollahi F, Kennedy IM, Yacobi NR, Hamm-Alvarez SF, Borok Z, Kim KJ, Crandall ED. Alveolar epithelial cell injury due to zinc oxide nanoparticle exposure. *Am J Respir Crit Care Med*. 182, 1398-1409, (2010).
73. Tertemiz KC, Komus N, Ellidokuz H, Sevinc C, Cimrin AH. Mortality and factors affecting mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Tuberk Toraks* 60: 114-22.
74. Hogg JC, Timens W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu. Rev. Pathol*. 2009; 4: 435–59.
75. Raheerison C, Girodet PO. Epidemiology of COPD. *Eur Respir Rev* 2009; 18: 213-21.

76. Baykal Y. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı üzerinde epidemiyolojik bir araştırma. *Tüberküloz ve Toraks* 1976; 24: 3-18.
77. Özlü T, Çetinkaya M, Öztuna F, Topbaş M, Bülbül Y. Trabzon'da 30 yaş ve üzeri nüfusta KOAH prevalansı. *Toraks Dergisi 7 Yıllık Kongresi Bildiri Özetleri Antalya*. Nisan 2004; 5: TP 628.
78. Cetinkaya F, Gulmez I, Aydın T, Ozturk Y, Ozesmi M, Demir R. Prevalence of chronic bronchitis and associated risk factors in a rural area of Kayseri, Central Anatolia, Turkey. *Monaldi Arch Chest Dis* 2000; 55: 189-93.
79. Dal Negro R1, Rossi A, Cerveri I. The burden of COPD in Italy: results from the Confronting COPD survey.
80. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet* 2007; 370: 741-750.
81. Carrasco GP, de Miguel DJ, Rejas GJ. Negative impact of chronic obstructive pulmonary disease on the health-related quality of life of patients. Results of the EPIDEPOC study. *Health Qual Life Outcomes* 2006; 4: 31.
82. Loddenkemper R, Gibson GJ, Sibille Y. The burden of lung disease in Europe: why a European White Book on lung disease? *Eur Respir J* 2003; 22: 86.
83. Detournay B, Pribil C, Fournier M. The SCOPE study: health-care consumption related to patients with chronic obstructive pulmonary disease in France. *Value Health* 2004; 7: 168-174.
84. Sağlık İstatistikleri 1964-1994. Sağlık Bakanlığı APK Dairesi yayınları, Ankara 1995.

85. Barr RG, Celli BR, Mannino DM. Comorbidities, patient knowledge, and disease management in a national sample of patients with COPD. *Am J Med* 2009; 122: 348–355.
86. Postma DS, Siafakas N. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. Management of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Mon* 1998; 7: 41–73.
87. Gilliland FD, Li YF, Dubeau L. Effects of glutathione S-transferase M1, maternal smoking during pregnancy, and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 457–463.
88. MacNee W, Rahman I. Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Trends Mol Med* 2001; 7: 55–62.
89. Jindal SK, Aggarwal AN, Chaudhry K. A multicenter study on epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease and its relationship with tobacco smoking and environmental tobacco smoke exposure. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 2006; 48: 23-9.
90. Hnizdo E, Sullivan PA, Bang KM. Association between chronic obstructive pulmonary disease and employment by industry and occupation in the US population: a study of data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 738–746.
91. Blanc PD, Iribarren C, Trupin L, et al. Occupational exposures and the risk of COPD: dusty trades revisited. *Thorax* 2009; 64: 6–12.
92. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease 2006. www.goldcopd.org.

93. Ezzati M. Indoor air pollution and health in developing countries. *Lancet* 2005; 366: 104-6.
94. Mannino DM, Watt G, Hole D. The natural history of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 27: 627–643.
95. Annesi-Maesano I. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Mon* 2006; 38: 41-70.
96. Chappell S, Daly L, Morgan K. Cryptic haplotypes of SERPINA1 confer susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Mutat* 2006; 27: 103–109.
97. Bentley AR, Emrani P, Cassono PA. Genetic Variation and Gene Expression in Antioxidant-Related Enzymes and Risk of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Systematic Review. *Thorax* 2008;63(11):956-961.
98. D'Armiento J, Dalal SS, Okada Y. Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell*. 1992;71:955–61.
99. Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J* 1977, 1:1645- 1648.
100. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*. 2003;22(4):672–688.
101. Gallefoss F, Bakke P. How Does Patient Education and Self-management among Asthmatics and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Affect Medication?, *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:2000–2005.
102. Aytemur SZ, Kaçmaz BÖ, Erdinç E. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı olgularında sigarayı bırakma başarısı. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 2006: 54: 43-50.

103. Occupational Health: Ethically Correct, Economically Sound. WHO Fact Sheet No 84, 2000.
104. Blanc PD, Toren K. Occupation in chronic obstructive pulmonary disease and chronic bronchitis: an update. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11: 251-7.
105. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease 2009. www.goldcopd.org.
106. Salvi SS, Bames PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet* 2009;374:733-43.
107. Calverley PMA. Respiratory failure in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 22: 26-30.
108. Roisin RR. COPD exacerbations 5:Management. *Thorax* 2006; 61:535-44.
109. Yıldız Ö. Kronik obstrüktif akciğer hastalığında farmakolojik tedaviler. *İç Hastalıkları Dergisi*, 2005, 21-28.
110. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease 2010 www.goldcopd.org.
111. Torphy TJ, Barnette MS, Underwood DC. Ariflo, a second generation phosphodiesterase-4 inhibitor for the treatment of asthma and COPD: From concept to clinic. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* 1999; 12: 131-5.
112. Kohyama T, Liu X, Wen FQ. Cytokines modulate cilomilast response in lung fibroblasts. *Clin Immunol* 2004; 11: 297-302.

113. Grootendorst DC, Gauw SA, Verhoosel RM, Sterk PJ, Hospers JJ, Brendenbroeker D. Reduction in sputum neutrophil and eosinophil numbers by the PDE4 inhibitor roflumilast in patients with COPD. *Thorax* 2007; 62: 1081-7.
114. Hohlfeld JM, Schoenfeld K, Lavae-Mokhtari M, Schaumann F, Muller M, Brendenbroeker D. Roflumilast attenuates pulmonary inflammation upon segmental endotoxin challenge in healthy subjects: a randomized placebocontrolled trial. *Pulm Pharmacol Ther* 2008; 21: 616- 23.
115. Gamble E, Grootendorst DC, Brightling CE, Troy S, Qiu Y, Zhu J. Antiinflammatory effects of the phosphodiesterase-4 inhibitor cilomilast (Ariflo) in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 976- 82.
116. Mc Cormack PL, Lyseng-Williamson KA. Budesonide/formoterol a review of its use as maintenance and reliever inhalation therapy in asthma. *Drugs* 2007; 67: 2407-31.
117. Balanag VM, Yunus F, Yang PC, Jorup C. Efficacy and safety of budesonide/formoterol compared with salbutamol in the treatment of acute asthma. *Pulmon Pharmacol Ther* 2006; 19: 139-47.
118. Barnes PJ. Scientific rationale for using a single inhaler for asthma control. *Eur Respir J* 2007; 29: 587-95.
119. Greiff L, Wollmer P, Andersson M, Svensson C, Persson CG. Effects of formoterol on histamine induced plasma exudation in induced sputum from normal subjects. *Thorax* 1998; 53: 1010-3.
120. O'Connor BJ, Fuller RW, Barnes PJ. Non-bronchodilator effects of inhaled β 2-agonists. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 381-7.

121. Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Differential effect of formoterol on adenosine monophosphate and histamine reactivity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1786-90. 24.
122. Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology* 2003;8:432-46.
123. Puchelle E, Zahm JM, Tournier JM, Coraux C. Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:726-33.
124. Lumsden AB, McLean A, Lamb D. Goblet and Clara cells of human distal airways: evidence for smoking induced changes in their numbers. *Thorax* 1984;39:844-9.
125. Pazour GJ, Agrin N, Leszyk J, Witman GB. Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *J Cell Biol* 2005;170:103-113.
126. Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology* 2003;8(4):432-446.
127. Ibañez-Tallon I, Heintz N, Orman H. To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease. *Hum Mol Genet.* 2003;12(1):R27-35.
128. Davis CW, Dickey BF. Regulated airway goblet cell mucin secretion. *Annu Rev Physiol* 2008;70:487-512.
129. Snyder JC, Teisanu RM, Stripp BR. Endogenous lung stem cells and contribution to disease. *J Pathol* 2009;217:254-64.
130. Reynolds SD, Malkinson AM. Clara Cell Progenitor for the Bronchiolar Epithelium. *Int J of Biochem Cell Biol* 2010; 42: 1-4. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.09.002.

131. Oreffo VC, Morgan A, Richards RJ. Isolation of Clara Cells from the Mouse Lung. *Environ Health Perspectives* 1990; 85: 51-64.
132. Devereux TR. Alveolar Type 2 and Clara Cells. Isolation and Xenobiotic Metabolism. *Environ Health Perspectives* 1984; 56: 95-101.
133. Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 2000-6.
134. Bayram H. The effect of air pollutants on functional and biochemical changes in bronchial epithelial cells from atopic patients with mild asthma and non-atopic non-asthmatic volunteers. 1998, Londra Üniversitesi, Doktora Tezi, 268 sayfa, Londra, (Prof. Dr. Robert J. Davies).
135. Jeffery PK, Li D. Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *Eur Respir J* 1997;10:1655-62.
136. Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. *Text-Atlas of histology*. 1998;Canada, WB Saunders Com.
137. Snyder JC, Teisanu RM, Stripp BR. Endogenous lung stem cells and contribution to disease. *J Pathol* 2009;217:254-64.
138. Evans MJ, Cox RA, Shami SG. The role of basal cells in attachment of columnar cells to the basal lamina of the trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989;1:463-9.
139. Thompson LC, Holland NA, Snyder RJ, Luo B, Becak DP, Odom JT, Harrison BS, Brown JM, Gowdy KM, Wingard CJ. Pulmonary instillation of MWCNT increases lung permeability, decreases gp130 expression in the lungs, and initiates cardiovascular IL-6 transsignaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016 Jan 15;310(2):L142-54.

140. Banga A, Witzmann F, Petrache H, Blazer-Yost B. Functional Effects of Nanoparticle Exposure on Calu-3 Airway Epithelial Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2012 Feb; 29(1-2): 197–212.
141. Rotoli BM, Guidi P, Bonelli B, Bernardeschi M, Bianchi M, Esposito S, Frenzilli G, Lucchesi P, Nigro M, Scarcelli V, Tomatis M, Zanello P. Imogolite: An Aluminosilicate Nanotube Endowed with Low Cytotoxicity and Genotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, 2014, 27 (7): 1142–1154.
142. Rotoli BM, Gatti R, Movia D, Bianchi MG, Di Cristo L, Fenoglio I, Sonvico F, Bergamaschi E, Prina-Mello A, Bussolati O. Identifying contact-mediated, localized toxic effects of MWCNT aggregates on epithelial monolayers: a single-cell monitoring toxicity assay. *Nanotoxicology.* 2015 Mar;9(2):230-41.
143. Milara J, Peiró T, Serranoc A, Guijarro R, Zaragozá C, Tenori H, Cortijo J. Roflumilast N-oxide inhibits bronchial epithelial to mesenchymal transition induced by cigarette smoke in smokers with COPD. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.* 2014, 28 (2), 138–148.
144. Tsukahara T, Haniu H. Cellular cytotoxic response induced by highly purified multi-wall carbon nanotube in human lung cells. *Mol Cell Biochem.* 2011 Jun;352(1-2):57-63.
145. Lucia UC, Delia C, Aureliano C, Maria FA, Raffaele M, Buresti G, Casciardi S, Iavicoli S. Cytotoxic, Genotoxic and Proinflammatory Response of Human Bronchial Cells to Pristine and Functionalized MWCNTs. *Materials Today: Proceedings 2.* 2015;126-133.
146. Rusznak C, Sapsford RJ, Devalia JL, Shah SS, Hewitt EL, Lamont AG, Davies RJ, Lozewicz S. Interaction of cigarette smoke and house dust mite allergens on inflammatory mediator release from primary cultures of human bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy.* 2001 Feb;31(2):226-38.

ÖZGEÇMİŞ

Sedat İLHAN; 1988 yılında Gaziantep’te doğdu. İlköğretim, ortaöğretim eğitimini Gaziantep’te tamamladı. Lisans Eğitimini 2011 yılında Ege Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde tamamladı.

