



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AMFİZEMLİ İNSAN AKCİĞERİNDE E-KADERİN SENTEZ VE
YIKIMINDAKİ DEĞİŞİKLİKLER**

Ecem GÖĞÜŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Programı

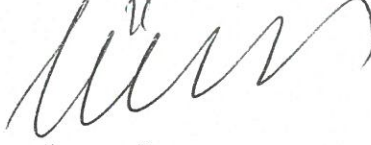
**DANIŞMAN
Prof. Dr. Füsün ÖZTAY**

Kasım, 2017

İSTANBUL

Bu çalışma, 17.11.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

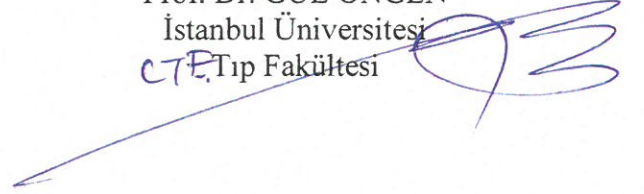


Prof. Dr. FÜSUN ÖZTAY(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. ŞEHNAZ BOLKENT
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. GÜL ÖNGEN
İstanbul Üniversitesi
CTE Tıp Fakültesi



Prof. Dr. CİHAN DEMİRCİ TANSEL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. FERİHA ERCAN
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi





20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 38341 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim ve “Amfizemli İnsan Akciğerinde E-Kaderin Sentez ve Yıkımındaki Değişiklikler” adlı tez çalışmam boyunca bilgilerini ve deneyimini benden esirgemeyen, tez çalışmam boyunca her an yanımda olan çok değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Füsün ÖZTAY’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin deneysel aşamasında insan akciğer biyopsilerimi temini konusunda bana yardımcı olan Sayın. Prof. Dr. Gül ÖNGEN, Dr. Ahmet DEMİRKAYA ve Dr. Ezel ERŞEN’e teşekkür ederim. Ayrıca bizlere laboratuvarında çalışma imkanı sağlayan değerli hocamız Prof. Dr. Nihal Ömür BULAN’a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince ilk günden bugüne kadar deneyimleri ve her türlü destekleriyle üzerimde büyük emekleri olan başta Uzman Biyolog Özgecan KAYALAR, Uzman Biyolog Öznur YILMAZ GÖKTAŞ ve Hale ÖVET KANBALOĞLU’na sonsuz teşekkür ederim. Tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım Uzman Biyolog Nezih BEŞİKTEPE, Biyolog Merve YILDIRIM ve Ezgi SARI’ya teşekkür ederim.

Yine tez çalışmam süresince her konuda yürekten yanımda olan, her daim azimli olmaya ve başarıya yönlendiren can dostum Nedim’e ve moral ve motivasyon kaynağım biricik arkadaşım Gülin’e ayrıca tüm laboratuvar 5 ailesi üyelerine çok teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca maddi ve manevi destek veren, anlayış ve yardımlarını esirgemeyerek her an yanımda olan tüm aileme; özellikle anneciğim Nilgün GÖĞÜŞ, babacığım Fethi GÖĞÜŞ, kardeşim Gizem GÖĞÜŞ ARSLANYÜREK ve teyzeciğim Sibel GÖKDERE’e çok teşekkür ederim.

Kasım 2017

Ecem GÖĞÜŞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	5
2.1. PULMONER AMFİZEM	5
2.2. ANATOMİK DAĞILIMINA GÖRE AMFİZEM ÇEŞİTLERİ	5
2.2.1. Sentriasinar (Sentrilobüler Amfizem)	5
2.2.2. Panasinar Amfizem	5
2.2.3. Paraseptal Amfizem.....	5
2.2.4. İrregular Amfizem	6
2.3. AMFİZEM PATOGENEZİ	6
2.4. ALVEOLAR EPİTEL VE ONARIMI	8
2.5. E-KADERİN	10
2.6. NEDD9.....	11
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	13
3.1. AKCİĞER BİYOPSİLERİNİN TOPLANMASI.....	13
3.2. ÇALIŞMA GRUPLARI.....	13
3.3. AKCİĞER DOKUSUNUN MİKROSKOBİK VE WESTERN EMDİRİM ANALİZLERİ İÇİN HAZIRLANMASI.....	13
3.4. ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ	14
3.4.1. Akciğer Örneklerinde Genel Histolojik İnceleme İle Amfizemli olmayan ve Amfizemli Dokuların Tespiti.....	14
3.4.2. Tip 2 Pnömositlerin, Çoğalan Hücrelerin ve E-Kaderin Yıkımında Görevli NEDD9 Proteininin İmmunohistokimyasal Yöntem ile İşaretlenmesi.....	14
3.4.3. Western Emdirimi analizleri ile akciğerde E-kaderin ve AGER proteinlerinin miktarının belirlenmesi	15

3.4.4. İstatiksel Analiz	16
4. BULGULAR.....	17
4.1. MİKROSKOPİK BULGULAR	17
4.1.1. Amfizemli ve Amfizemli Olmayan Biyopsilere Ait Yapısal Bulgular	17
4.1.2. Verhoff'un Elastik Fibril Boyası ile Boyanan Akciğer Kesitlerine Ait Bulgular	21
4.1.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	24
4.1.3.1. Anti-Ki67 İmmünreaktivitesi.....	24
4.1.3.2. Anti-ProSP-C İmmünreaktivitesi	26
4.1.3.3. Anti-NEDD9 İmmünreaktivitesi.....	28
4.2. WESTERN EMDİRİMİ BULGULARI.....	30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	32
KAYNAKLAR.....	40
ÖZGEÇMİŞ	45

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Amfizem tipleri (Kluver'den değiştirilerek çizilmiştir, 2014)	6
Şekil 2.2: Sigara ve olası bir amfizem gelişimi (Lee' den değiştirilerek hazırlanmıştır, 2012).	8
Şekil 2.3: E-kaderin ve sitoplazmik hücre adhezyon kompleksi (Mohamet'den değiştirilerek hazırlanmıştır, 2011).	11
Şekil 4.1: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerinde genel akciğer yapısı: A: Alveol, → :Hasara uğramış alveol duvarı, »: Antrakoz (Hematoksilin-Eozin).	18
Şekil 4.2: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerinde alveol lümenlerinde çok sayıda eritrosit ve çeşitli hücrelere rastlanmaktadır. A: Alveol, e: Eritrosit (Hematoksilin-Eozin).	18
Şekil 4.3: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerinde korunmuş alveolar yapı. ■: Alveolar lümen (Hematoksilin-Eozin).	19
Şekil 4.4: Amfizemli insan akciğeri kesidinin genel yapısal görüntüsü. A: Alveol, ➡: Alveol duvarında kopma, parçalanmalar, ★: Alveol duvarında incelmeler (Hematoksilin-Eozin).	20
Şekil 4.5: Amfizemli insan akciğeri kesitlerinde genişlemiş alveollere ait yakından bir görünüm: A: Alveol, ★: Alveol duvarında incelmeler ►: Alveol duvarında kopmalar (Hematoksilin-Eozin).	20
Şekil 4.6: Amfizemli insan akciğeri kesidi yapısal görüntüsü: e: Eritrosit, ➡ : Alveol duvarında kopma, parçalanmalar, ★ : Alveol duvarında incelmeler (Hematoksilin-Eozin).	21
Şekil 4.7: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerinde yaygın olarak bulunan siyah renkli elastik fibrilleri göstermektedir (Verhoff'un elastik fibril boyası).	22
Şekil 4.8: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerinde alveolar duvarda yer alan kıvrımlı ve uzun fibriller olarak görünen elastik fibriller görülmektedir. A: Alveol, ⇨: Elastik fibriller (Verhoff'un elastik fibril boyası).	22
Şekil 4.9: Amfizemli insan akciğeri kesitlerinde alveolar duvarda az miktarda elastik fibril bulunmaktadır. A: Alveol, ⇨: Elastik fibriller (Verhoff'un elastik fibril boyası).	23
Şekil 4.10: Amfizemli insan akciğeri kesitlerinde genişlemiş alveollerde elastik fibrillerin daha yakından görüntüsü. Elastik fibriller genişlemiş alveollerin	

duvarında daha ince, kesintili ve düz yapılar halinde görülmektedir. A: Alveol, ⇨: Elastik fibriller (Verhoff'un elastik fibril boyası).	23
Şekil 4.11: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerinde alveolar alandaki Ki67 immünreaktif hücreler ok başları ile işaretlenmiştir (Kesitlere Mayer's hematoksilin ile zıt boyama yapılmıştır).	25
Şekil 4.12: Amfizemli insan akciğeri kesitlerinde alveolar alandaki sayıca artmış Ki67 immünreaktif hücreler ok başları ile işaretlenmiştir (Kesitlere Mayer's hematoksilin ile zıt boyama yapılmıştır).	25
Şekil 4.13: Anti-Ki67 immünreaktif hücre sayım grafiği.	26
Şekil 4.14: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerinde alveolar alanda anti ProSP-C immünreaktif hücreler ok başları ile işaretlenmiştir (Kesitlere Mayer's hematoksilin ile zıt boyama yapılmıştır).	27
Şekil 4.15: Alveolar alanda amfizemli insan akciğeri kesitlerinde çok sayıda bulunan anti ProSP-C immünreaktif hücreler ok başları ile işaretlenmiştir (Kesitlere Mayer's hematoksilin ile zıt boyama yapılmıştır).	27
Şekil 4.16: Anti-ProSP-C immünreaktif hücre sayım grafiği.	28
Şekil 4.17: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerinde anti-NEDD9 immünreaktif hücreler oklarla gösterilmiştir (Kesitlere Mayer's hematoksilin ile zıt boyama yapılmıştır).	29
Şekil 4.18: Amfizemli akciğer dokularında anti-NEDD9 immünreaktif hücreler oklarla gösterilmiştir (Kesitlere Mayer's hematoksilin ile zıt boyama yapılmıştır).	29
Şekil 4.19: Amfizemli akciğer dokularında alveolar epiteldeki anti-NEDD9 immünreaktif hücreler oklarla gösterilmiştir (Kesitlere Mayer's hematoksilin ile zıt boyama yapılmıştır).	30
Şekil 4.20: KOAH hastalarının amfizemli ve sağlıklı akciğer örneklerinde E-kaderin protein miktarındaki değişiklikler (a) ve E-kaderin protein bantları (b) gösterilmiştir (K: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgeleri bireyler; A: Amfizemli bireyler).	31
Şekil 4.21: KOAH hastalarının amfizemli ve sağlıklı akciğer örneklerinde AGER protein miktarındaki değişiklikler (a) ve AGER protein bantları (b) gösterilmiştir (K: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgeleri bireyler; A: Amfizemli bireyler).	31

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Periferik havayollarında infiltrate olmuş inflamatuvar hücreler (Baraldo'dan değiştirilerek hazırlanmıştır, 2012).	7
---	---



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

μg	:mikrogram
μm	:mikrometre
$^{\circ}\text{C}$	:santigrat derece
kDa	:Kilodalton
mg	:miligram
rpm	:dakikada dönüş sayısı
W	:watt
β	:beta

Kisaltmalar	Açıklama
-------------	----------

AGER	:İleri glikolizasyon son ürünü özel reseptörü
CAS	:-Crk bağımlı substrat
HGF	:Hepatosit büyüme faktörü
Ki67	:Çoğalan hücre belirteci
KOAH	:Kronik obstruktif akciğer hastalığı
NEDD9	:Nöronal prekürsör hücrelerde gelişimsel olarak downregüle edilmiş protein 9
ProSP-C	:Prosürfaktan protein C

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AMFİZEMLİ İNSAN AKCİĞERİNDE E-KADERİN SENTEZ VE YIKIMINDAKİ DEĞİŞİKLİKLER

Ecem GÖĞÜŞ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Füsun ÖZTAY

Pulmoner amfizem, alveollerin aşırı hava ile dolması ve genişlemeleri, geri dönüşümsüz olarak ilerleyen alveol kaybı, alveolar epitel hasarı ve hasarın derecesine bağlı olarak solunum yüzey alanının azalması ile karakterize edilir. Hasar gören alveolar epitelin onarımı ve bütünlüğünün sağlanması solunum epitelinin işlevi açısından önemlidir. Alveolar epitel hücreleri birbirlerine E-kaderin proteinleri aracılığı ile bağlanırlar. Çalışmamızda E-kaderin protein miktarındaki ve yıkımındaki değişimlerin saptanması ve bu değişikliklerin pulmoner amfizem patogenezeine katkısının araştırılması amaçlanmıştır.

Kronik obstruktif akciğer hastalarından alınan akciğer örneklerinin amfizemli (n=7) ve amfizemli olmayan (n=6) bölgelerinde akciğer strüktüründeki değişiklikler, solunum epitelinin çoğalma indeksi, onarım kapasitesi, E-kaderin protein miktarı ve nöronal prekürsör hücrelerde gelişimsel olarak downregüle edilmiş protein 9 (NEDD9) immünoreaktivitesi mikroskopik ve biyokimyasal yöntemlerle değerlendirilmiştir. Amfizemli bölgeler büyük ve geniş alveoller, yer yer parçalanmış alveol duvarı, azalmış ve düzensiz elastik fibriller, alveolar epitel hasarı, bu hasara cevap olarak artmış hücre proliferasyonu ve tip 2 pnömosit sayısı ile karakterize edilirler. Ayrıca, amfizemli bölgelerde E-kaderin protein miktarında bir azalma gözlenirken, NEDD9 immünoreaktivitesinde artış belirlenmiştir.

Amfizematöz alanlarda E-kaderin protein miktarında azalmalar NEDD9 proteini tarafından koordine edilen, E-kaderin proteininin hücre içi yıkımı nedeniyle. E-kaderin miktarındaki azalma, alveolar epitel hücreleri arasındaki hücre bağlantılarının zayıf olmasına ya da bu bağlantıların kurulamamasına neden olarak epitel bütünlüğünün sağlanamamasına sebebiyet verebilir. Ayrıca E-kaderin protein miktarındaki azalma nedeniyle amfizematöz alanlarda tip 2 pnömositlerin sayıca artmalarına rağmen, bu hücreler tip 1 hücrelerine farklılaşamadıkları için fonksiyonel alveolar epitel onarımı tamamlanamamaktadır. Sonuç olarak, E-kaderin protein miktarındaki azalmalar, amfizem patogeneze katkı sağlayarak, akciğerde amfizematöz değişikliklere neden olmaktadır.

Kasım 2017, 59 sayfa.

Anahtar kelimeler: Pulmoner amfizem, E-kaderin, NEDD9, alveolar epitel, insan akciğeri



SUMMARY

M.Sc. THESIS

THE ALTERATIONS ON E-CADHERIN TURNOVER IN EMPHYSEMATOUS HUMAN LUNGS

Ecem GÖĞÜŞ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Füsün ÖZTAY

Pulmonary emphysema is characterized by over-filled with extra air and enlarged alveoli, irreversible and progressive loss of alveoli, the damage of alveolar epithelium, and the reduction of respiratory surface area depending on the degree of damage. The repair and integrity of the damaged alveolar epithelium are very important for the function of airway epithelium. Alveolar epithelial cells are linked to each other by E-cadherin proteins. In our study, we aimed to detect the alterations of E-cadherin protein levels and its destruction and to investigate the contribution of these alterations to pathogenesis of pulmonary emphysema.

The structural changes of lung, the proliferation index and repair capacity of respiratory epithelium, the content of E-cadherin protein, immunoreactivity of neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 9 (NEDD-9) were evaluated in emphysematous and non-emphysematous area of lung pieces taken from patients with chronic obstructive lung disease. Emphysematous areas are characterized by big and enlarged alveoli, the local disruption of the alveolar walls, the decreased and disorganized elastic fibers, the damage of alveolar epithelium and the increases at the cell proliferation as a respond to the present damage and the number of type 2 pneumocytes. Additionally, it was observed a decrease

at the level of E-cadherin proteins, whereas it was determined an increase at the immunoreactivity of NEDD9 in the emphysematous areas.

The reductions at the levels of E-cadherin proteins in emphysematous areas are due to the intracellular degradation of E-cadherin proteins by being coordinated of NEDD9 protein. The reductions at the level of E-cadherin proteins resulted in disintegration of epithelium by causing the presence of weakness cell connections or the absence of cell connections among cell. The function repair of alveolar epithelium could not complete due to the reductions of E-cadherin proteins, because type 2 pneumocytes could not differentiate into type 1 pneumocytes due to despite of the increases in the number of type 2 pneumocytes. In conclusion, the reductions at the level of E-cadherin proteins lead to emphysematous alterations in lungs by the contribution to pathogenesis of emphysema

November 2017, 59. pages.

Keywords: Pulmonary emphysema, E-cadherin, NEDD9, alveolar epithelium, human lung

1. GİRİŞ

Pulmoner amfizem, alveollerin aşırı hava ile dolması ve gerilip genişlemeleri, geri dönüşümsüz olarak ilerleyen alveol kaybı, alveolar epitel hasarı ve hasarın derecesine bağlı olarak solunum yüzey alanının azalması ile karakterize edilir. Alveolar alanda harabiyet, genellikle proteaz–antiproteaz dengesizliği, elastik fibril yıkımı ve dokunun elastikiyetini kaybetmesi nedenleri ile oluşabilmektedir. Pulmoner amfizemde alveol çaplarının aşırı miktarda artması, alveollerin genişlemelerine yol açar. Alveollerin aşırı genişlemesi alveolar epitelin incelmeye ve yer yer parçalanmasına, beraberinde dokuda inflamatuvar yanıtın gelişmesine ve alveolar epitelde hasara neden olur (Sharafkhaneh ve diğ., 2008).

Pulmoner amfizem, kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH) olan bireylerin %20'sinde görülmektedir. KOAH, sürekli ilerleyen ve geri dönüşümü olmayan alveol kaybı, akciğer parenşiminde anormal inflamatuvar yanıt, hava akışında sınırlanma ve dokuda remodelleme ile tanımlanan, ayrıca kronik bronşit ve amfizemi kapsayan nefes darlığı ve öksürük gibi semptomların meydana geldiği bir kronik akciğer hastalığıdır (Baraldo ve diğ., 2012). KOAH hastalığı, günümüzde tüm dünyada ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada yer alır; 2020 yılında ise üçüncü sıraya çıkacağı düşünülmektedir (Baraldo ve diğ., 2012). Dünya üzerinde 600 milyon KOAH'lı hasta vardır. Bunların her yıl 2.7 milyonu KOAH'dan ölmektedir. Bu hastalarda alveolar epitelin hasarına ve kaybına bağlı olarak gelişen solunum gazlarının taşınmasındaki kayıp, önemli ölüm nedenleri arasında gösterilmektedir (Küçükaltun, 2007). KOAH prevalansı erkeklerde 9.3/1000, kadınlarda 7.3/1000 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca KOAH prevalansı, morbiditesi ve mortalitesi de yaşa bağlı olarak artar. Örneğin 40 yaş ve üzeri kişilerde KOAH'lı hasta sayısı daha fazladır (Mannino ve Kiri, 2006). Ülkemizde ise KOAH prevalansı ile ilgili yeterli çalışma yoktur, ancak tahminlere göre Türkiye'de 2.5-3 milyon KOAH'lı hasta bulunur. Sağlık Bakanlığı 1997 yılı verilerine göre her yıl KOAH'lı hastaların 127 bininin hastanelere yatırıldığı, 1500'ünün hastanelerde öldüğü tespit edilmiştir. Pulmoner amfizem genellikle KOAH ile görülmekle birlikte, başka solunum yolu hastalıkları ile birlikte de görülebilmektedir. Örneğin, kronik bronşit veya astım gibi uzun süreden beri devam etmekte olan bazı hastalıklar pulmoner amfizeme neden olabilir. Ayrıca, yaşlılarda akciğerde yaygın

fibröz bağ doku alanının artması, akciğerde esneklik kaybına ve devamında amfizeme neden olabilmektedir (Sharafkhaneh ve diğ., 2008). Maden, ağaç, otomotiv, inşaat, boya ve yem sanayi gibi sektörlerde çalışan kişilerde gaz, duman, toz gibi mesleki faktörler, hijyenik koşulların olmadığı yerlerde yaşayan kişilerde sosyo ekonomik faktörler, daha önce geçirilen solunum yolu enfeksiyonları, bakteriyel ve viral ajanlar, hava kirliliği ve çevre kirliliği pulmoner amfizeme yol açabilmektedir (Tuder ve diğ., 2006; Jankowich ve Rounds, 2012).

Pulmoner amfizeme neden olan etmenler arasında başlıca sigara alışkanlığı yer almaktadır. Görülen amfizem vakalarının %90'ından fazlası sigara içen hastalardır. Sigaranın yol açtığı ilk patolojik değişiklik, dokuda meydana gelen inflamatuvar reaksiyonlardır. Çünkü sigara ile epitelin geçirgenliği artar ve inflamatuvar hücreler dokuya nüfuz ederek, dokuda yerleşik inflamatuvar hücrelerle birlikte akciğer parenşiminde birikirler (Baraldo ve diğ., 2012). Sigara, en çok, akciğerde proteaz–antiproteaz dengesinin bozulmasında etkilidir. Amfizemli akciğerde aşırı proteaz salınması ve buna karşın antiproteazların yıkımı bağ dokuda elastik fibrillerin yıkımına neden olur. Amfizemde proteaz–antiproteaz dengesinin bozulması, epitel dokuda gelişen hasar ve hasarın onarılamamasına yol açar, bunun sonucunda epitel bütünlüğü sağlanamaz (Brusselle ve diğ., 2005). Ayrıca sigara, oksidatif stres ve apoptotik hücre ölümüne de neden olarak pulmoner amfizemi uyarabilmektedir. Oksidatif stresin artması ile alveolar hücrelerin apoptozu artar ve alveollerde geri dönüşümsüz bir genişleme meydana gelir (Lee ve diğ., 2012). Amfizem etiolojisinde sigara içimi yanı sıra bazı genetik bozukluklar da rol oynar (Martorana ve diğ., 2006; Baglione ve diğ., 2013). Örneğin, bir proteinaz inhibitörü olan alfa-1-antitripsinin dokudaki eksikliği amfizematöz değişikliklerin oluşumuna yol açar (Altınbaş ve diğ., 2012). Alfa-1-antitripsin eksikliği proteaz–antiproteaz dengesi bozulmasına neden olur. Böylece aktiviteleri artan proteazlar, alveolar alanda geri dönüşümsüz bir hasara neden olurlar (Bals, 2010).

Pulmoner amfizem oluşumunda etkili bir diğer olay da alveolar rejenerasyon sürecindeki bozukluklardır. Amfizemli hastalarda hasar gören, yer yer parçalanmış genişlemiş alveoller yenilenemez, alveolar epitel bütünlüğü sağlanamaz. Alveolar epitel hücrelerinin ölümü, alveolar epitel bütünlüğünün sağlanamaması, kronik inflamasyon ve alveolar epitel hasarı

sonrasında onarım mekanizmalarının bozulması sonucu pulmoner amfizem gelişmektedir. KOAH'da gözlenen parankimal hücre apoptozunun önlenememesi, bu apoptotik hücre artıklarının yeterince temizlenememesi ve doku onarım mekanizmasının bozulması akciğer dokusunda amfizematöz değişikliklere, küçük hava yollarının yapı ve fonksiyonlarında bozulmalara neden olmaktadır (Lee ve diğ., 2012). Yapılan çalışmalar, pulmoner amfizemde epitel bütünlüğünün korunamamasında alveolar epitel hücre apoptozunun önemli bir etmen olduğunu ortaya koymaktadır. Birkaç hayvan modelinde, alveol epitel veya endotel hücre apoptozisinin, inflamatuvar hücre birikimi olmaksızın direkt olarak pulmoner amfizeme yol açabileceği gösterilmiştir (Lee ve diğ., 2012). Plasental benzeri büyüme faktorünün aşırı üretiminin yapıldığı fare modellerinde tip 2 pnömositlerin apoptozunun uyarıldığı, endotelial hücrelerin sayısında bir azalma olduğu ve bu farelerde pulmoner amfizem geliştiği tespit edilmiştir (Po-Nien ve diğ., 2003). Yapılan bir başka çalışmada antioksidan gen anlatımı bozulmuş farelerde, artan oksidatif strese bağlı olarak alveollerdeki epitelial ve mezenşimal hücrelerin apoptozunun arttığı ve alveollerde genişleme meydana geldiği rapor edilmektedir. Araştırmacılar amfizematöz değişikliklerin, antioksidan bileşiklerin amfizemli farelere eksojen olarak verilmesi ile gerilediğini saptamışlardır (Küçükaltun, 2007). Yapılan deneysel çalışmalarda çeşitli moleküllerin alveol oluşumu ya da alveolar epitel hücrelerinin çoğalmasını uyararak amfizematöz lezyonların azalmasını sağladığını göstermektedir. Bir vazoaaktif peptid olan adrenomedulinin alveol oluşumu sürecinde mRNA seviyesinde pik yaptığı ve elastaz ile indüklenmiş amfizemli sıçanlarda amfizem morfometrisini ve akciğer fonksiyonlarını iyileştirdiği saptanmıştır (Murakami ve diğ 2005). Bir diğer çalışmada ise elastazla pulmoner amfizem oluşturulan sıçanlara alveolar rejenerasyonu uyardığı bilinen retinoik asit verilmesi, amfizemin gerilemesine neden olmuştur (Massaro ve Massaro, 1997). Fibroblast büyüme faktörü-7 de alveol oluşumunda etkili bir sinyal molekülüdür. Amfizemli hastalarda fibroblast büyüme faktörü-7'nin özellikle elastaz ile indüklenen amfizemi önlediği görülmüştür (Bonay ve diğ., 2005). Tip 2 pnömositler ve endotelial hücreler için güçlü bir mitojen olduğu gösterilen hepatosit büyüme faktörü (HGF) de alveolar rejenerasyonda etkili bir büyüme faktörüdür. Eksojen HGF'nin intranasal yol ile akciğerlere verilmesinin elastaz ile indüklenmiş pulmoner amfizemli farelerde amfizem bulgularını azalttığı gösterilmiştir (Crestani ve diğ., 2002, Hegab ve diğ., 2008). Patolojik koşullar altında, alveolar epitel hasar görür, bütünlüğü bozulur ve epitel hücrelerinin geçirgenliği artar. Örneğin astım gibi hastalık durumlarında E-

kaderin, zonula okludens ekspresyonu azalmış, bronşiyol epitel hücrelerin geçirgenliği artmıştır (Heijink ve diğ., 2010).

Pulmoner amfizem patogenezi ve tedavisine yönelik yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda, amfizemli akciğerde alveolar epitelin belirgin bir hasara uğradığını ve bu hasarın endojen onarımının gerçekleşemediğini açıkça görmekteyiz. Dolayısı ile alveolün ve alveolar keselerin yenilenmesine, alveolar epitel onarımına yönelik terapötik yaklaşımlar büyük önem taşımaktadır. Amfizem hastaları için alveolar epitel onarım ve bütünlüğünün korunmasında etkili olabilecek terapötik bir yaklaşım veya herhangi bir klinik uygulama bulunmamaktadır. Pulmoner amfizemde alveolar epitel hasarına ve onarım mekanizmalarının bozulmasına yol açan patogenezin aydınlatılması ve bu süreçte etkili moleküllerin saptanması gerekmektedir. Böylelikle, amfizemin tedavisine yönelik alveolar epitel onarım ve bütünlüğünün korunmasında yeni bir hedef molekül ve terapötik yaklaşımlar ortaya çıkabilecektir. E-kaderin molekülünün bu süreçte etkili olabileceğini düşünmekteyiz. E-kaderin molekülü epitel hücrelerinin birbirlerine bağlanmasında ve epitel bütünlüğünün korunmasında etkili bir proteindir. E-kaderin molekülündeki azalma, tip 2 pnömositlerin birbirlerine ve tip 1 pnömositlere bağlanamamasına ve alveolar epitel bütünlüğünün sağlanamamasına neden olabilir. Çalışmamızda akciğer kanseri tanısı alan KOAH hastalarının akciğerlerinin amfizemli bölgelerinde E-kaderin sentezindeki değişikliklerin saptanması ve bu değişikliklerin muhtemel nedenlerinin açıklanması hedeflenmiştir. Ayrıca, E-kaderin sentezinde bir azalma varsa, bu azalmanın alveolar epitel onarımında ve bütünlüğünün korunmasında bir aksamaya neden olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. PULMONER AMFİZEM

Amfizem alveollerin aşırı genişleyerek alveolar yapının geri dönüşümsüz hasarı olarak karakterize edilen patolojik bir durumdur. Alveoller, süregelen ve geri dönüşümsüz bir kayba uğrar. Böylelikle amfizemde gaz değişiminin yapıldığı yüzey alanı azalır ve alveol kaybı görülür (Hind ve Maden, 2011). Ayrıca proteaz-antiproteaz dengesizliği nedeni ile dokuda elastik fibril yıkımı gerçekleşir ve böylelikle akciğer esnekliğini iyice kaybetmiş olur. Akciğer alveollerine dolan hava orada kalır, soluk verme ile geri verilemez. Pulmoner amfizemli hastalarda soluk verme, soluk almadan daha zordur; nefes tıkanıklığı ve öksürme görülür. Kalp, böbrek gibi vücudun en önemli organlarına kan ile taşınan oksijen azalacağından bu organların işlevi sekteye uğrar. Kronik amfizemde soluk alırken göğüs sürekli genişler, akciğerler aşırı gerilir ve her soluk vermeden sonra rezidüel hacim ve total akciğer kapasitesi artar (Cooper ve diğ., 1996).

2.2. ANATOMİK DAĞILIMINA GÖRE AMFİZEM ÇEŞİTLERİ

2.2.1. Sentriasinar (Sentrilobüler Amfizem)

Amfizematöz değişiklikler asinüslerin merkezinde yani respiratör bronşiyollerde meydana gelir. Genellikle sigara ile indüklenen amfizem tipidir. Bronş ve bronşiyollerin çevresinde ve septumlarda iltihabi infiltrasyon görülür. Sentriasinar amfizeme kronik bronşitle beraber rastlanır. Bu tip amfizem, kömür işçilerinde sık görülür (Şekil 2.1; Kluver, 2014).

2.2.2. Panasinar Amfizem

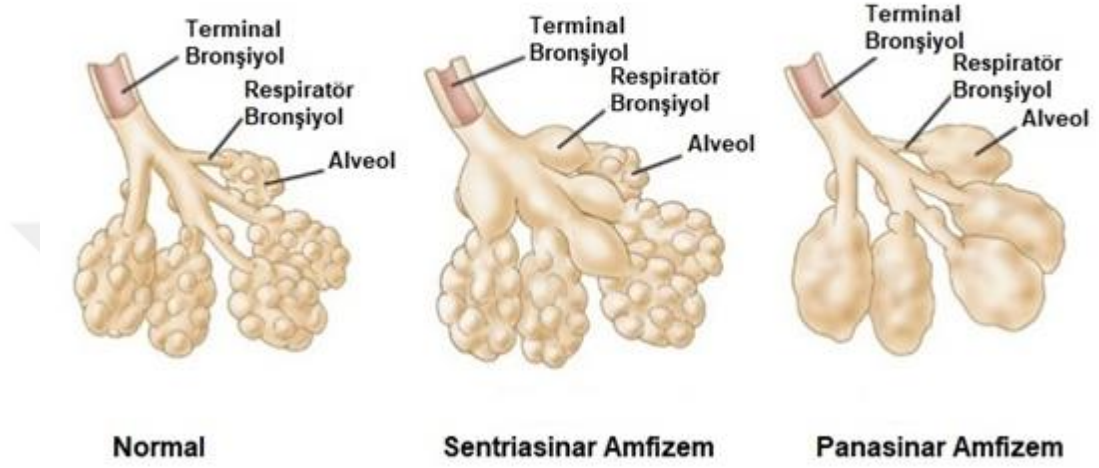
Amfizematöz değişiklikler respiratör bronşiyolden başlar ve alveolar kanal ve keseleri de içine alarak devam eder. Alfa-1-antitripsin eksikliği ile ilişkili amfizem tipidir (Şekil 2.1; Kluver, 2014).

2.2.3. Paraseptal Amfizem

Amfizematöz değişiklikler plöraya yakın kısımlarda, septumlarda ve lobül kenarlarında gelişir. Fibrozis, skar, atelektezi çevresinde ve akciğerin proksimalinde görülür (Kluver, 2014).

2.2.4. İrregular Amfizem

Asinüsler amfizematöz değişikliklere düzensiz olarak tutulmuştur. Fibrozis ile beraber görülen amfizem tipidir (Kluver, 2014).



Şekil 2.1: Amfizem tipleri (Kluver'den değiştirilerek çizilmiştir, 2014)

2.3. AMFİZEM PATOGENEZİ

Yapılan çalışmalar amfizem oluşumuna neden olan çok sayıda faktörün varlığını ortaya koymaktadır. Bu faktörler şu şekilde sıralanabilir: Proteaz–antiproteaz dengesizliği, solunum yolu inflamasyonu, oksidatif stres, alveolar rejenerasyon sisteminde bozukluk, alveolar hücre apoptozu, sürfaktan instabilitesi, beslenme bozukluğu ve histon deasetilaz inhibisyonu.

Sigara içen kişiler her bir nefeste 5.000 toksik bileşen, gaz fazında 105 serbest radikal, her bir gram katranda 1018 serbest radikal, hidrojen peroksit, hidroksil anyon gibi güçlü serbest radikaller ve organik radikalleri içeren dumanı akciğerlerine almış olur. Sigaranın yol açtığı ilk histolojik anormalite havayollarının periferinde meydana gelen inflamatuvar reaksiyonlardır (Baraldo ve diğ., 2012). Sigara aynı zamanda endoteliyal epitel geçirgenliğinin artmasına neden olur (Li ve diğ., 1996). Dokuda inflamatuvar ajanlar birikerek doku hasarına yol açarlar (Tablo 2.1; Baraldo ve diğ., 2012). Amfizemin indüklenmesinde sigaranın asıl rolü proteazlar ve onların inhibitörü olan antiproteazlar arasındaki dengenin bozulmasında etkili olmaktadır. Proteaz-antiproteaz dengesinin bozulması akciğerde bulunan makrofajlar ve diğer inflamatuvar

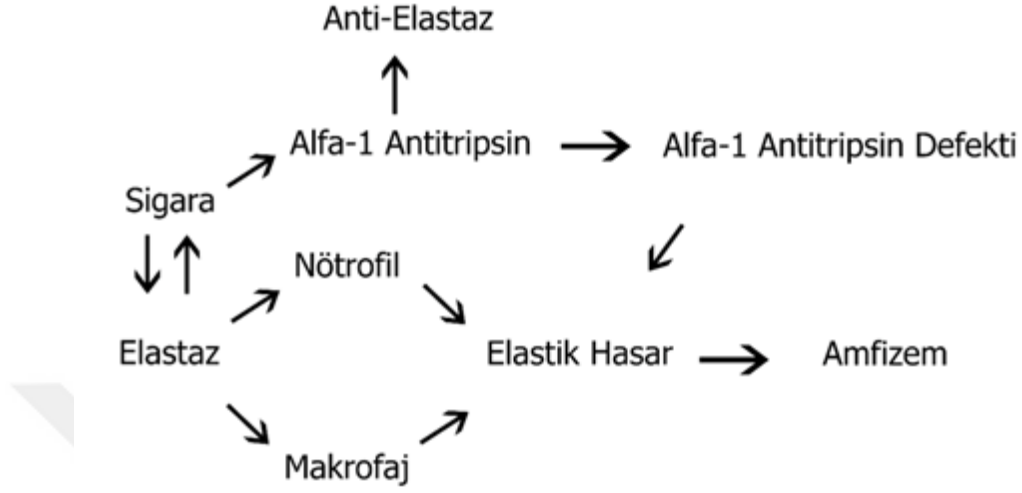
hücreler tarafından aşırı proteaz salınması veya antiproteaz sentezinin azalması ya da antiproteazların yıkımı ile olur (Brusselle ve diğ., 2005). Makrofajlar ve nötrofiller aynı zamanda akciğer proteazlarının ana kaynağıdır (Sharafkhaneh ve diğ., 2008). Aşırı proteaz aktivitesi amfizem hastalığında bir tetikleyici veya arabulucu olarak rol oynar. Proteazlar septal matriksi modifiye ederek ya da hücresel sinyalizasyonu değiştirerek hücrenin normal programlanmasında değişiklik yapabilirler. Ayrıca proteazlar elastin, kollagen gibi ekstrasellüler matriks bileşenlerini parçalayarak akciğer septal hücrelerinde apoptozu tetikleyebilir. Örneğin, elastaz endoteliyal hücre ölümüne, metalloproteinaz aktivasyonu ise in vitro'da düz kas hücrelerinin apoptozunun indüklenmesine neden olur (Tuder ve diğ., 2002). Sigara apoptotik hücre ölümüne neden olduğu gibi, oksidatif strese de neden olarak amfizemi indükleyebilir (Calabrese ve diğ., 2005). Aşırı reaktif oksijen türleri salınımı oksidan-antioksidan dengesini bozar. Bu da oksidatif strese neden olur. Oksidatif stres de inflamatuvar yanıtlara yol açabilir, apoptozu indükleyebilir, antiproteazların işlevini bozabilir (Brusselle ve diğ., 2005).

Tablo 2.1: Periferik havayollarında infiltrate olmuş inflamatuvar hücreler (Baraldo'dan değiştirilerek hazırlanmıştır, 2012).

İNFLAMATUVAR HÜCRELER	Sigara içen KOAH hastaları	Sigara içmeyen KOAH hastaları
CD8 ⁺ T lenfositler	+++	+
CD4 ⁺ T lenfositler	++	+
B lenfositler	+++	+
Makrofajlar	++	+
Nötrofiller	++	+
Mast hücreleri	++	+
Eozinofiller	+	+
Lenfoid folikülleri	++	

Amfizem etiyolojisinde rol oynayan en önemli genetik defekt ise alfa-1-antitripsin eksikliğidir. İnsanda alfa-1-antitripsini kodlayan gen 14. kromozomda yerleşmiştir. Alfa-1-antitripsin 52 kDa molekül ağırlığına sahip bir glikoproteindir. Bu molekülün protein kısmı 394 aminoasit dizisi büyüklüğündedir. Bu glikoprotein başlıca hepatositlerde, az miktarlarda da fagositler ve alveolar epitel hücrelerinde üretilir. Alveolar epitel hücreleri tarafından üretilen alfa-1-antitripsin akciğerde görevli bir proteinaz inhibitörüdür. Alfa-1-antitripsin eksikliği de proteaz-antiproteaz dengesinin bozulmasına yol açar. Amfizemli hastalarda serumdaki alfa-1-antitripsin

konsantrasyonunun azalması olası bir amfizem gelişiminin önemli bir bulgusudur (Şekil 2.2; Bals, 2010).



Şekil 2.2: Sigara ve olası bir amfizem gelişimi (Lee’ den değiştirilerek hazırlanmıştır, 2012).

Sürfaktan, alveolar yapının bütünlüğünün korunmasında görevli olduğundan amfizem etiyojisinde rol oynar. Amfizem ve inflamasyon ile ilgili remodelleme sürfaktan protein A, C ve D yokluğunda da gösterilmiştir (Yan ve Du., 2004). Histondeasetilaz miktarındaki azalma ile KOAH şiddeti arasındaki ilişki karşılaştırıldığında, KOAH’lı hastalarda hastalığın şiddetini belirleyen total histondeasetilazın giderek azaldığı görülmüştür. Histondeasetilaz, alveolar makrofajlarda proinflamatuvar sitokinlerin üretiminin baskılanmasında anahtar bir moleküldür (Ito ve diğ., 2005). Pek çok çalışma, yetersiz beslenme ve açlığın da amfizem gelişimine doğrudan katkısı olduğunu göstermiştir. Kalori kısıtlaması akciğerde hücre ve alveol kaybı ile sonuçlanabilir. Ancak artan beslenme ile alveollerin normal yapısı yeniden kazanılabilir. Örneğin İkinci Dünya Savaşı sırasında yapılan biyopsilerde açlık ve yetersiz beslenme sebebiyle amfizem belirtileri görülmüştür (Lee ve diğ., 2012).

2.4. ALVEOLAR EPİTEL VE ONARIMI

Akciğerde solunum yollarının iç yüzeyini örten çeşitli tipte epitel hücreleri, akciğer parenşiminde bulunan fibroblast, miyofibroblast, düz kas hücreleri, yağ dokusu hücreleri, nöral hücreler gibi çeşitli doku tiplerine ait hücreler, lenfosit, makrofaj nötrofil, eozinofil, bazofil, mast hücreleri gibi inflamatuvar hücreler, damar iç yüzeyini döşeyen endotel hücreleri, plöranın mezotel hücreleri ve doku onarımından sorumlu çeşitli tipte kök hücreler olmak üzere

farklı hücre tipleri yer almaktadır. Her bir çeşit hücre, doku homeostasinin sağlanmasından, onarımdan, akciğer sıvı dengesinin regülasyonundan veya akciğer metabolizmasından sorumludur. Akciğerin asıl görevi olan solunum gazlarının değişiminin yapıldığı kısım alveolar epiteldir. Alveolar epitel, iki farklı tip hücreye sahiptir: tip 1 ve tip 2 pnömositler. Tip 1 pnömositler yassı şekilli hücrelerdir ve solunum yüzeyinin %95 ini kaplarlar. Kan gaz bariyerinde kan ile hava arasında solunum gazlarının değişiminden sorumlu olan hücrelerdir. Tip 2 pnömositler ise solunum epitelinin geri kalanını oluşturan kübik şekilli hücrelerdir ve dörtlü beşli gruplar halinde alveol köşelerinde yer alırlar. Soluk alıp-verme sırasında alveollerin kollabe olmamasından sorumlu sürfaktanı tip 2 pnömositler üretir. Tip 2 pnömositler aynı zamanda alveolar epitel hasarı sonrasında, epitelin onarımında da görev alır. Bazal membran da alveolar epitel bütünlüğünün sağlanmasında kritik role sahiptir. Epitel hücrelerini bağlar, epitel hücrelerinin adhezyonunu ve göçünü kolaylaştırır. Epitel tabaka ile bağ doku arasında bariyer görevi görür. Bazal membran epitel hücrelerinin fenotipinin düzenlenmesi için esastır, onların doğru polarizasyonunun kurulması ve muhafaza edilmesini sağlar (Banerjee ve diğ., 2011).

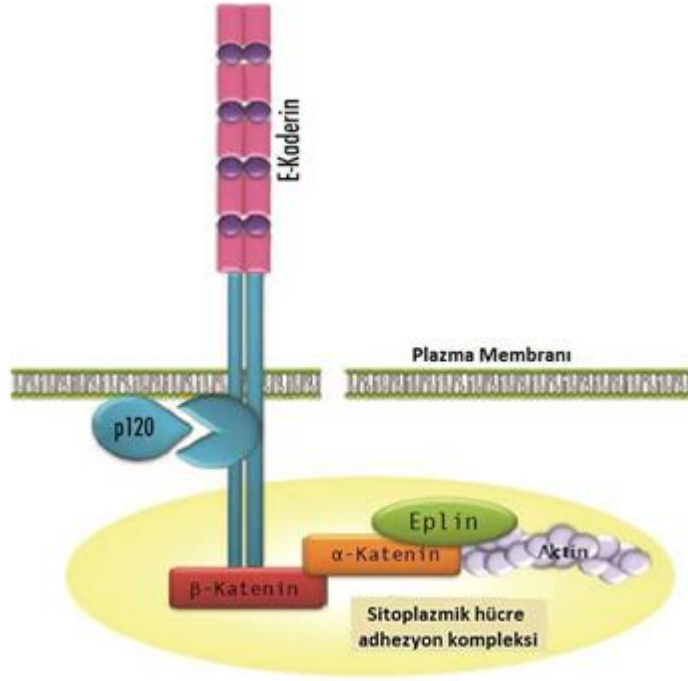
Akciğer, doku yaralanmasından sonra kendisini bir onarma kapasitesine sahip organdır. Ancak bu onarım oldukça yavaştır. Akciğerde doku onarımı integrinler ve büyüme faktörleri tarafından üretilen lokal sinyaller tarafından KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgeleri edilir (Banerjee ve diğ., 2011). Alveol onarımında en önemli görevi alveolar epitel hücreleri üstlenirler. Tip 2 pnömositler sürfaktan proteinini ürettiği gibi alveolar homeostasinin korunmasında ve doku hasarından sonra yeniden onarılmasında da önemli rol oynar. Tip 2 pnömositler, tip 1 pnömositlerin progenitörüdür. Alveolar epitel hasarı sonrası tip 2 pnömositler çoğalırlar ve ölen tip 1 ve tip 2 pnömositlere farklılaşarak alveolar epitelin yeniden oluşturulmasını sağlarlar (Fujino ve diğ., 2012).

Sağlıklı bir akciğerde alveolar epitel, solunan zararlı maddelere, allerjenlere, sigara dumanı ve diğer bütün patojenlere karşı fiziksel bir bariyer olma özelliklerini epitel hücreleri arasındaki sıkı ve adherens bağlantılar ile gerçekleştirir. Alveolar epitel hücreleri birbirlerine hücre hücre bağlantıları ile sıkıca tutunmuş halde bulunurlar. Bunlardan tip 1 pnömositler birbirlerine çoğunlukla zonula okludens bağlantıları ile, tip 2 pnömositler ise kendi aralarında veya tip 1 pnömositlere zonula adherens (E-kaderin protein içerir) aracılığı ile bağlanırlar. Hasar gören alveolar epitelin yeniden oluşturulması amacıyla alveolar epitel rejenerasyonu başlar ve tip 2

pnömositler, ölen tip 1 ve tip 2 pnömositlerin yenilerini vermek üzere çoğalırlar. Çoğalan yeni hücrelerin alveolar epiteli yeniden oluşturması için yeni oluşan bu hücrelerin bazal membrana oturmuş olması ve aralarında hücre hücre bağlantılarının yeniden kurulmuş olması gerekir (Baum ve Georgiou., 2011). Alveolar epitel onarımında meydana gelen herhangi bir aksama da amfizematöz değişikliklerle sonuçlanabilir.

2.5. E-KADERİN

Kaderin ailesi proteinleri, fonksiyonu hücre-hücre adhezyonu olan, kalsiyum bağımlı hücre yüzey glikoproteinleridir. Tip 1, tip 2, protokaderinler ve kaderin ilişkili moleküller olmak üzere dört alt gruba ayrılırlar. Tip 1 kaderinler öncelikli olarak epitel hücrelerinde sentez edilirler. E-kaderin, tip 1 alt tipinde karakterize edilen tek geçişli bir transmembran proteinidir. E-kaderin, adherens bağlantılarının oluşturulmasında ve sürekliliğinin sağlanmasında görevlidir. E-kaderin 150 aminoasitlik bir intrasellular parça ve 550 aminoasitlik bir ekstrasellüler parça içerir. İki komşu epitel hücresi birbirlerine E-kaderin moleküllerinin ekstrasellular parçaları arasında kurulan kimyasal bağlar ile bağlanırlar. İntrasellular parça ise E-kaderinin hücre membranındaki stabilizasyonundan sorumludur. İntrasellular parça jukstamembran domain (proksimal sitoplazmik domain) ve beta-katenin (β -katenin) bağımlı domain içerir. β -katenin bağımlı domain, sitoplazmik hücre adhezyon kompleksi ile E-kaderinin aktin hücre iskeletine bağlanmasını kolaylaştırır. Sitoplazmik aktin hücre adhezyon kompleksi ise β -katenin, α -katenin ve muhtemelen eplin, formin, vinkulin gibi aracı proteinleri içerir. P120 katenin adı verilen bir diğer molekül ise sitoplazmik hücre adhezyon kompleksine bağlanır ve klatrin aracılı endositoz ile sitoplazmik hücre adhezyon kompleksinin stabilizasyonunu sağlar (Şekil 2.3; Mohamet ve diğ., 2011).



Şekil 2.3: E-kaderin ve sitoplazmik hücre adhezyon kompleksi (Mohamet'den değiştirilerek hazırlanmıştır, 2011).

E-kaderin stabilizasyonunun sağlanması sırasında sitoplazmik hücre adhezyon kompleksinde meydana gelen bir bozulma, E-kaderinin aktin ile olan bağlantısını koparır. E-kaderinin hücre içine alınımını uyarır. Örneğin P120 katenin, E-kaderinin intrasellüler parçasına bağlanamazsa, bu parça da sitoplazmik hücre adhezyon kompleksine bağlanamaz ve E-kaderin-aktin bağlantısı kopmuş olur. Böylelikle E-kaderinin hücre içi yıkımı uyarılır (Baum ve ve Georgiou, 2011). E-kaderinin hücre içi yıkımında rol oynayan başka faktörler de mevcuttur. Bu faktörlerden biri de nöronal prekürsör hücrelerde gelişimsel olarak downregüle edilmiş protein 9 (NEDD9)'dur. Birçok kanser konulu çalışmalarda NEDD9 geni susturulduğunda, E-kaderin gen ekspresyonunda artış gözlenmiştir (Tikhmyanova ve Golemis, 2011).

2.6. NEDD9

NEDD9, hücre iskeleti proteini gibi davranan, Crk-bağımlı substrat (CAS) ailesine ait diğer adı HEF1 olan bir proteindir (Law ve diğ., 1996). Normal ve patolojik hücre biyolojisinde önemli bir rol oynar (Tikhmyanova ve Golemis, 2011). NEDD9'un bilinen herhangi bir enzimatik fonksiyonu olmamasına rağmen, protein etkileşimi için birçok işlevsel modül içerir. CAS ailesi üyeleri memeli hücrelerinde protein komplekslerinin yerleşimini, hücrelerin birbirine tutunmasını, farklılaşmasını, hücre döngüsünü ve hücrelerin sağ kalım sinyalini düzenler

(Singh ve diğ., 2007; Tikhmyanova ve Golemis, 2011). Ayrıca sağlıklı insanlarda NEDD9 hem mRNA hem de protein seviyesinde en fazla akciğer dokusunda bulunmaktadır (Kumar ve diğ., 1992; Law ve diğ., 1996). Yapılan alışmalar NEDD9'un E-kaderin proteinin hücre içi lizozomal yıkımında görev aldığını göstermektedir.



3. MALZEME VE YÖNTEM

Proje, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından incelendi ve 01.10.2013 tarihli ve a-15 nolu kararı ile Etik Kurul İlkeleri'ne uygun bulundu.

3.1. AKCİĞER BİYOPSİLERİNİN TOPLANMASI

Çalışmada akciğer adenokarsinomu teşhisi konulan, yaşları 42-74 arasında değişen, sigara içimi geçmiş olan (20-40 paket/yıl) KOAH'lı erkek hastalar kullanılmıştır. KOAH tanısı, 2016 GOLD kriterlerine göre yapılmıştır. Akciğer kanseri nedeniyle ameliyat edilen ve akciğer rezeksiyonu yapılan hastalarda çıkartılmış akciğer dokusundan, amfizemli (makroskopik olarak büller içeren) ve amfizemli olmayan bölgelerden doku örnekleri alınmıştır. Örnekler, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı'nda görevli Op. Dr. Ezel ERŞEN tarafından tarafımıza sağlanmıştır.

3.2. ÇALIŞMA GRUPLARI

Otuz dokuz hastadan toplanan biyopsi örnekleri mikroskopik olarak incelenerek bu örneklerden amfizemli ve amfizemli olmayan doku bölgeleri belirlenmiştir ve örneklerden “Amfizemli Olmayan Doku Örnekleri (n=6, KOAH hastalarının sağlıklı akciğer bölgeleri) ve “Amfizemli Doku Örnekleri (n=7)” olmak üzere 2 çalışma grubu oluşturulmuştur. Doku genelinde amfizematöz alanların yüzdesi %15 ve aşağısı olan doku örnekleri KOAH hastalarının sağlıklı akciğer bölgeleri, %80 ve üzeri olan doku örnekleri ise amfizemli doku örnekleri olarak kabul edildi.

3.3. AKCİĞER DOKUSUNUN MİKROSKOBİK VE WESTERN EMDİRİM ANALİZLERİ İÇİN HAZIRLANMASI

Akciğer örneklerinin her biri ikiye bölündü. Bölünen parçaların bir yarısı mikroskopik analizler, diğer yarısı ise Western emdirimi analizleri için kullanıldı. Mikroskopik gözlemlerde kullanılacak parçalar, fosfatla tamponlanmış tuzlu suda (PBS, 0.01 M, pH 7.4) hazırlanan %10 nötral formalin fiksatif ile +4°C'de 24 saat süresince tespit edildi. Fiksatifin dokudan uzaklaştığında emin olununcaya kadar her gün %70 alkol ile yıkandılar. Fiksatifin

uzaklaştırılmasından sonra, tespit edilen akciğer örnekleri yükselen alkol serilerinde dehidre edildiler. Daha sonra parçalar ksilolde şeffaflandırılmalarını takiben parafine gömüldüler.

Western emdirimi analizi için kullanılacak akciğer doku parçaları ise için sıvı azotta hızlı dondurma yöntemiyle dondurulup incelemelerin yapılacağı güne kadar -86°C'deki derin dondurucuda saklandılar. İncelemelerden hemen önce 200 mg doku örneği, radyoimmünopresipitasyon lizis tamponu ile +4°C'de tamamıyla homojenize oluncaya kadar homojenize edildiler. Lizat +4°C'de 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatantlar, -20 °C derin dondurucuda saklandılar ve daha sonar Western emdirimi yönteminde kullanıldılar.

3.4. ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

3.4.1. Akciğer Örneklerinde Genel Histolojik İnceleme İle Amfizemli olmayan ve Amfizemli Dokuların Tespiti

Parafine gömülü akciğer biyopsilerinden 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Genel histolojik inceleme için kesitlerin bir kısmı albumin mayer kaplı lamlara 100 µm'de bir kesit alınacak şekilde yapıştırıldı. Bu kesitlerin bir kısmı dokudaki genel yapısal özellikleri saptamak üzere Hematoksilin-eozin ile boyanarak ışık mikroskobunda incelendi. Kesitlerin diğer kısmı ise Verhoff'un elastik fibril boyası (Scytek Elastic Stain Kit/Modified Verhoff's, ETS-2) ile boyanarak akciğerdeki elastik fibriller ışık mikroskobunda araştırıldı.

3.4.2. Tip 2 Pnömositlerin, Çoğalan Hücrelerin ve E-Kaderin Yıkımında Görevli NEDD9 Proteininin İmmunohistokimyasal Yöntem ile İşaretlenmesi

Işık mikroskobu düzeyinde bir immünoenzimatik yöntem olarak kullanılan Streptavidin-Biyotin-Peroksidaz kompleksi yöntemi kullanılmıştır. Parafine gömülü biyopsilerden alınan 5 µm kalınlığındaki seri kesitler, her 100 µm ara ile poly-L-lizin kaplı lamlara kesitler yapıştırıldı. Kesitler deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra saf suda çalkalanıp, antijen iyileştirmesi için sitrat tamponunda (pH 6,0) mikrodalgada (650W) 15 dakika boyunca tutuldular. Daha sonra 20 dakika oda ısısında bırakıldılar. Dokudaki endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için kesitler, metanolde hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 30 dakika süresince bekletildiler. Daha sonra Histostatin-Plus kiti (Invitrogen, life technologies, 85-9043) için verilen yönleme göre, kesitler sırasıyla tavşandan elde edilmiş

anti-Ki67 (çoğalan hücre belirteci, Milipore-AB9260, 1:50 seyreltme oranında Triton'lu PBS'de hazırlanarak) 1 saat oda sıcaklığında; anti-pro-sürfaktan-C (ProSP-C, Tip 2 pnömosit belirteci, Milipore-AB3786, 1:500 seyreltme oranında PBS'de hazırlanarak) 1 gece +4°C'de ve anti-fosfoS369 NEDD9 (Abcam-ab110854, 1:100 seyreltme oranında, PBS'de hazırlanarak) 1 gece +4°C'de inkübe edildiler. Daha sonra da biyotinlenmiş sekonder antikor ve streptavidin peroksidaz enzim konjugatında 15'er dakika oda ısısında nemli bir kap içerisinde bekletildiler. Peroksidaz reaksiyonu aminoetilkarbazol substrat kiti (Thermo, CA, USA, TA-060-HA) ile geliştirildi. Kesitler daha sonra Mayer's Hematoksilin zıt boyası ile boyandı. Kesitler her bir inkübasyon basamağında PBS'de (Ki67'de antikor sonrası yıkama aşamaları için PBS-T'de) 10'ar dakika yıkandı. İmmünohistokimyasal işaretlemelerin doğruluğunu KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgeleri etmek üzere negatif kontrol kesitleri primer antikor basamağında primer antikor yerine PBS ile inkübe edildi.

Komşu akciğer kesitlerinden her bir birey için rastgele seçilen 1 mm²'lik 10 farklı bölgede (bronşiyolsüz ve büyük kan damarlarının olmadığı alveolar alanlarda) 400X büyütmede anti-Ki67 ve –ProSP-C immünreaktif hücreler sayıldı. Sayım işlemi Olympus CX41 sayım kamerası eşliğinde DP Manager görüntü programı kullanılarak Olympus DP71 ışık mikroskopu ile yapıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki formül aracılığıyla değerlendirildi ve immünreaktif hücrelerin sayısı % olarak ifade edildi.

İmmünoreaktif hücrelerin sayısının % değeri:

$$(\text{İmmünoreaktif hücrelerin sayısı} / \text{Alandaki tüm hücre sayısı}) \times 100 \quad (3.1)$$

3.4.3. Western Emdirimi analizleri ile akciğerde E-kaderin ve AGER proteinlerinin miktarının belirlenmesi

Elde edilen süpernatantlarda Bradford yöntemiyle total protein miktarı belirlendi (Bradford, 1976). Her bir bireyden alınan 80 µg protein örneği, %10'luk jelde yürütüldü. Elektroforez ile jelde ayrımı yapılan protein bantları yarı-kuru aktarım ile jelden nitroselüloz membrana aktarıldı. Membran aktarım işlemi sonrasında protein bantları Ponceau S boyama solüsyonu ile görüntülendi. Membranlar %4'lük formalin ile muamelelerinin ardından yağsız süt tozu (Santa Cruz, CA, USA, sc-2324) ile hazırlanan bloklama solüsyonuyla 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Membranlar, bloklama işlemi sonrası uygun sulandırma oranıyla hazırlanan ve insana karşı geliştirilen "E-kaderin (1:500 seyreltme oranı, Abcam-ab152102) ve ileri glikolizasyon

son ürünü özel reseptörü (AGER, type 1 pnömosit marker; 1:500 seyreltme oranında Novus, NBP1-42612) antikorları ile +4°C de 1 gece inkübe edildiler. Daha sonra membranlar, peroksidaz işaretli keçi anti-tavşan sekonder antikor (Santa Cruz, CA, USA, sc-2004) ile 1 saat süreyle oda ısısında muamele edildi. Sekonder antikor ile muamele işlemi sonrası membranlar, tekrar yıkama solüsyonu ile yıkanarak saf su ile çalkalandılar. Sonrasında protein bantları kemilüminesans substrat kullanılarak protein jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi ve bantların densitometrik analizleri yapıldı. Protein örneklerine ait band yoğunlukları, β -aktin proteininin yoğunluğuna göre normalize edilerek gruplar arasındaki farklılıklar belirlendi.

3.4.4. İstatiksel Analiz

Westen emdirim bulgularının istatistiksel değerlendirmeleri Graphpad Prism 5,0 adlı yazılım programı ile yapıldı. İki grup arasındaki karşılaştırmalar “Student T-testi” testleri kullanılarak yapıldı. Hesaplamaların sonuçlarında p değeri 0,05’ten küçük olan farklılıklar ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

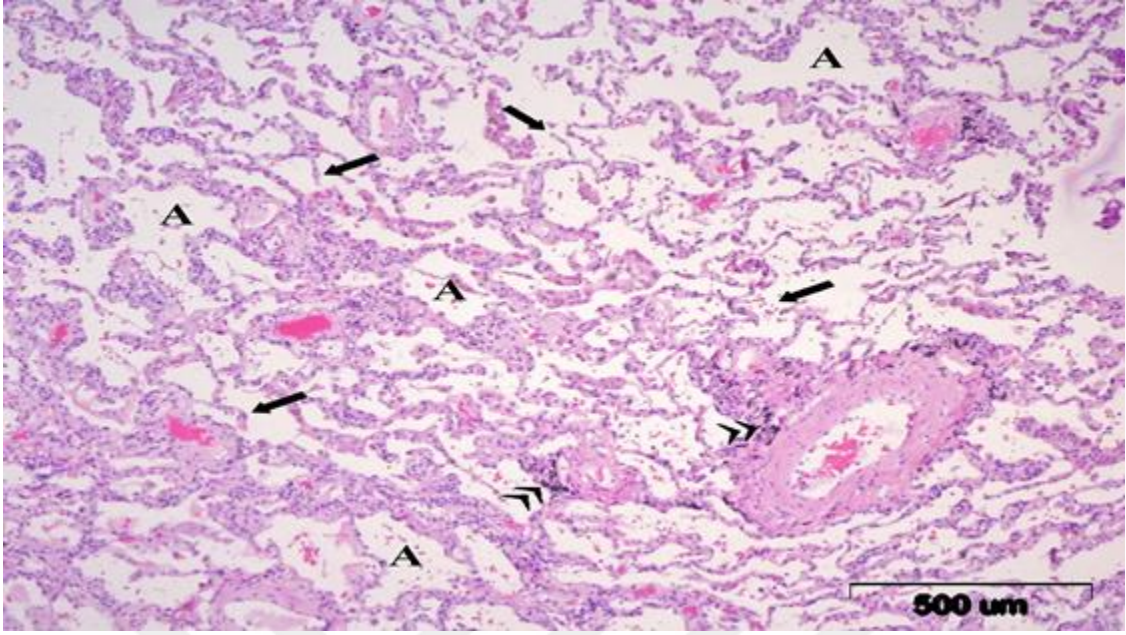
İmmünohistokimyasal bulgularının istatistiksel değerlendirmeleri Graphpad Prism 5,0 adlı yazılım programı ile yapıldı. İki grup arasındaki karşılaştırmalar “Mann Whitney U-2 kuyruklu” testleri kullanılarak yapıldı. Hesaplamaların sonuçlarında p değeri 0,05’ten küçük olan farklılıklar ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

4. BULGULAR

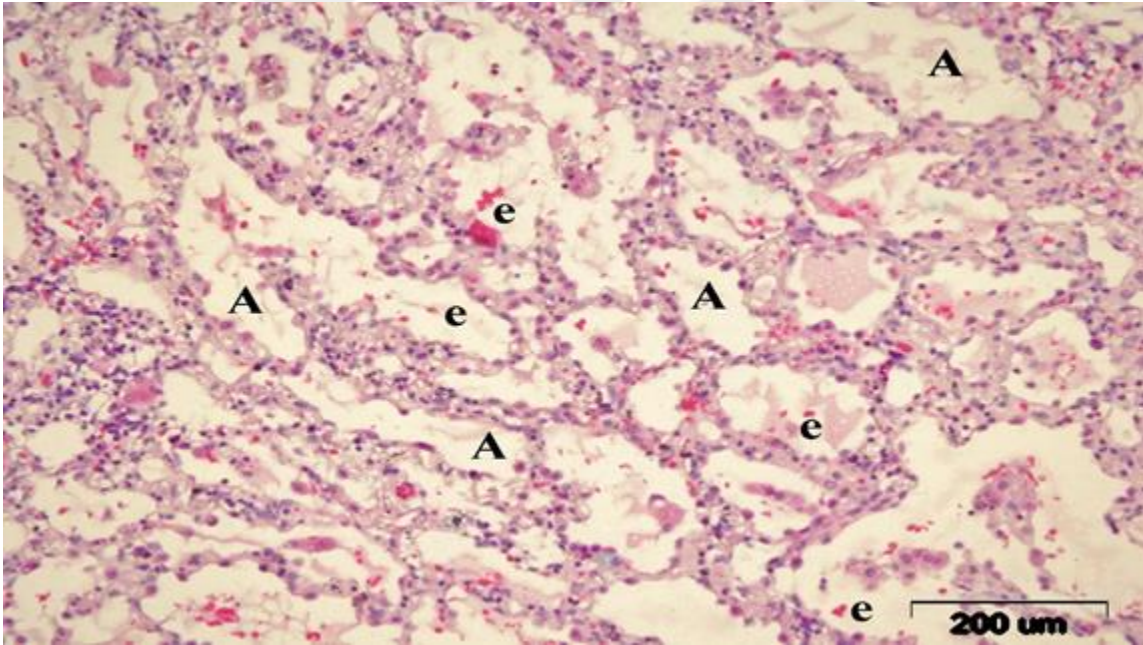
4.1. MİKROSKOPİK BULGULAR

4.1.1. Amfizemli ve Amfizemli Olmayan Biyopsilere Ait Yapısal Bulgular

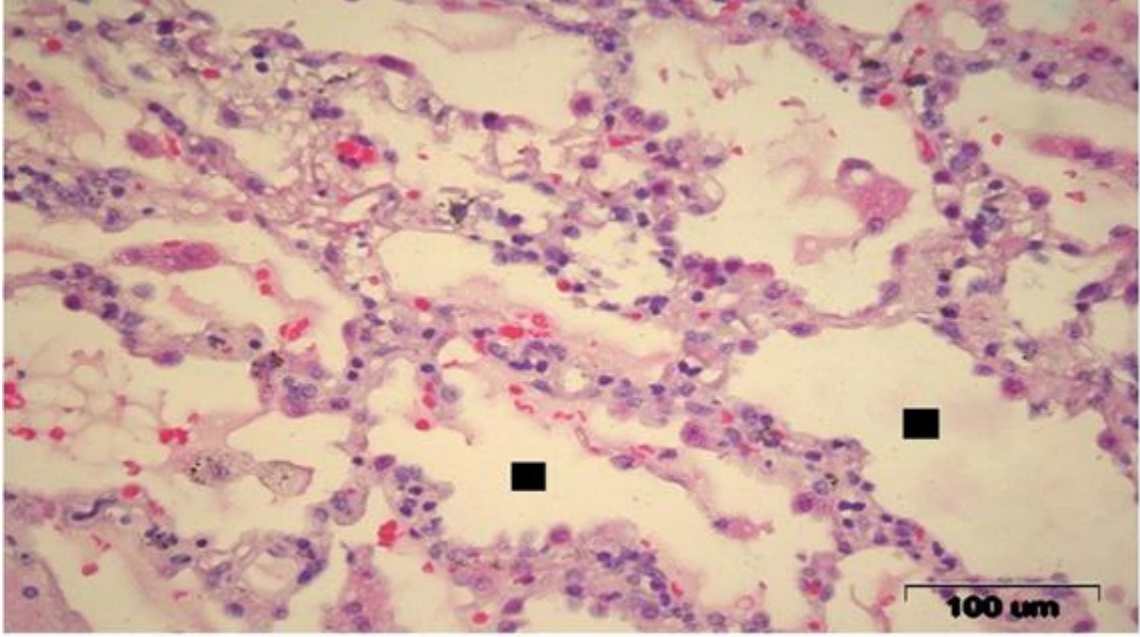
Amfizemli olmayan akciğer dokularında (KOAİ hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgeleri grup) özellikle periferde, interstisiyel alanda çok olmak üzere, doku genelinde antrokoz bulunmaktadır. Biyopsiler hava yollarının distal bölgelerinden alındığı için, kesitlerde bronş ve bronşiyollere nadiren rastlanmıştır. Grubun tüm bireylerinde tam olarak sağlıklı bir akciğer yapısı gözlemlenmese de genel olarak alveolar yapı korunmuş durumdadır ve genişlemiş alveollere nadiren rastlanılmaktadır. Alveolar duvarda genelde epitel bütünlüğünün korunduğu, incelmeler ve kopmaların olmadığı tespit edilmiştir. Alveollerin lümenlerinde makrofaj, nötrofil infiltrasyonları yaygın olarak gözlemlenmektedir. Bazı alveollerde yer yer eritrosit birikimine de rastlanmıştır (Şekil 4.1:-4.3:).



Şekil 4.1: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerinde genel akciğer yapısı: A: Alveol, → :Hasara uğramış alveol duvarı, »: Antrakoz (Hematoksilin-Eozin).

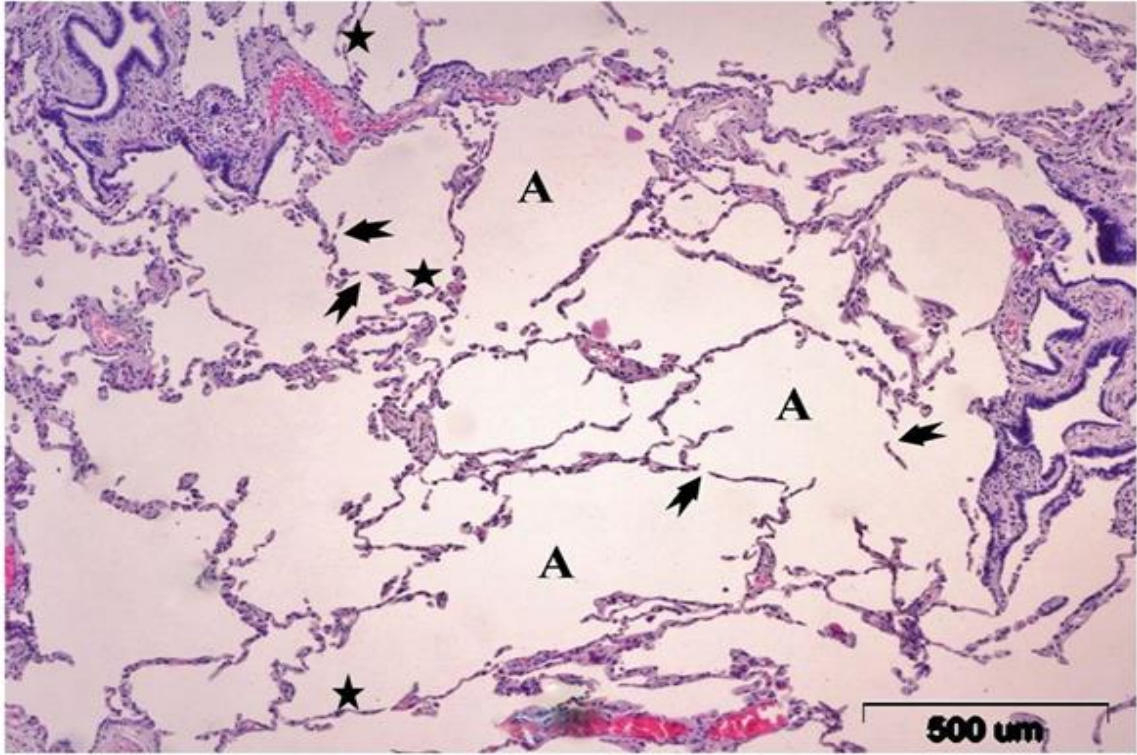


Şekil 4.2: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerinde alveol lümenlerinde çok sayıda eritrosit ve çeşitli hücrelere rastlanmaktadır. A: Alveol, e: Eritrosit (Hematoksilin-Eozin).

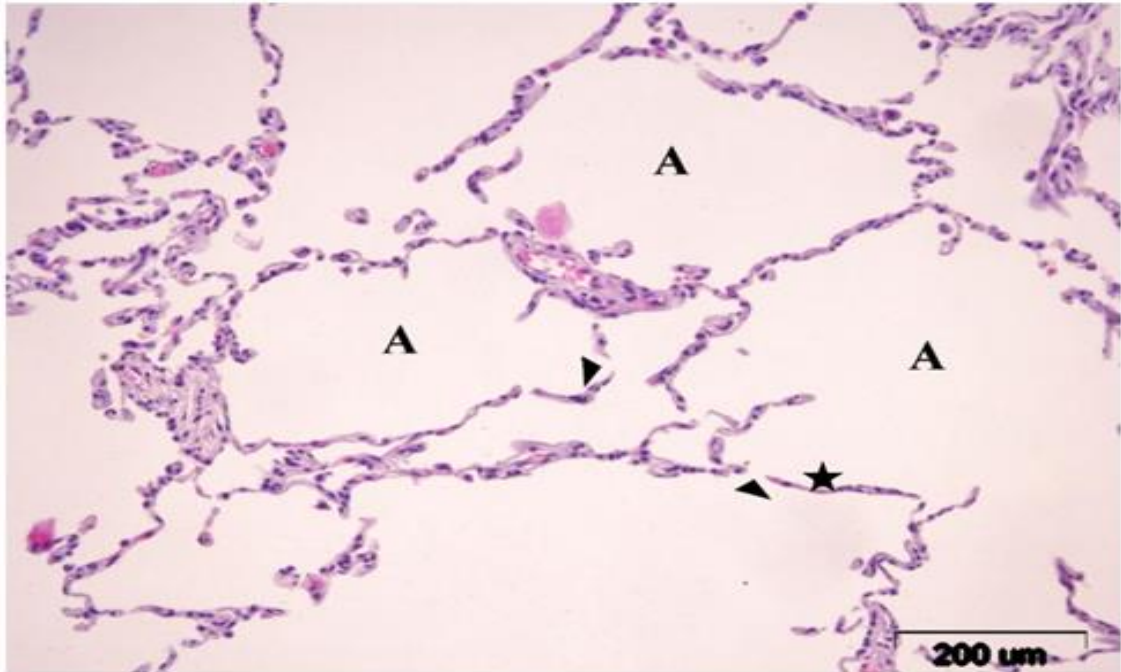


Şekil 4.3: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerinde korunmuş alveolar yapı. ■: Alveolar lümen (Hematoksilin-Eozin).

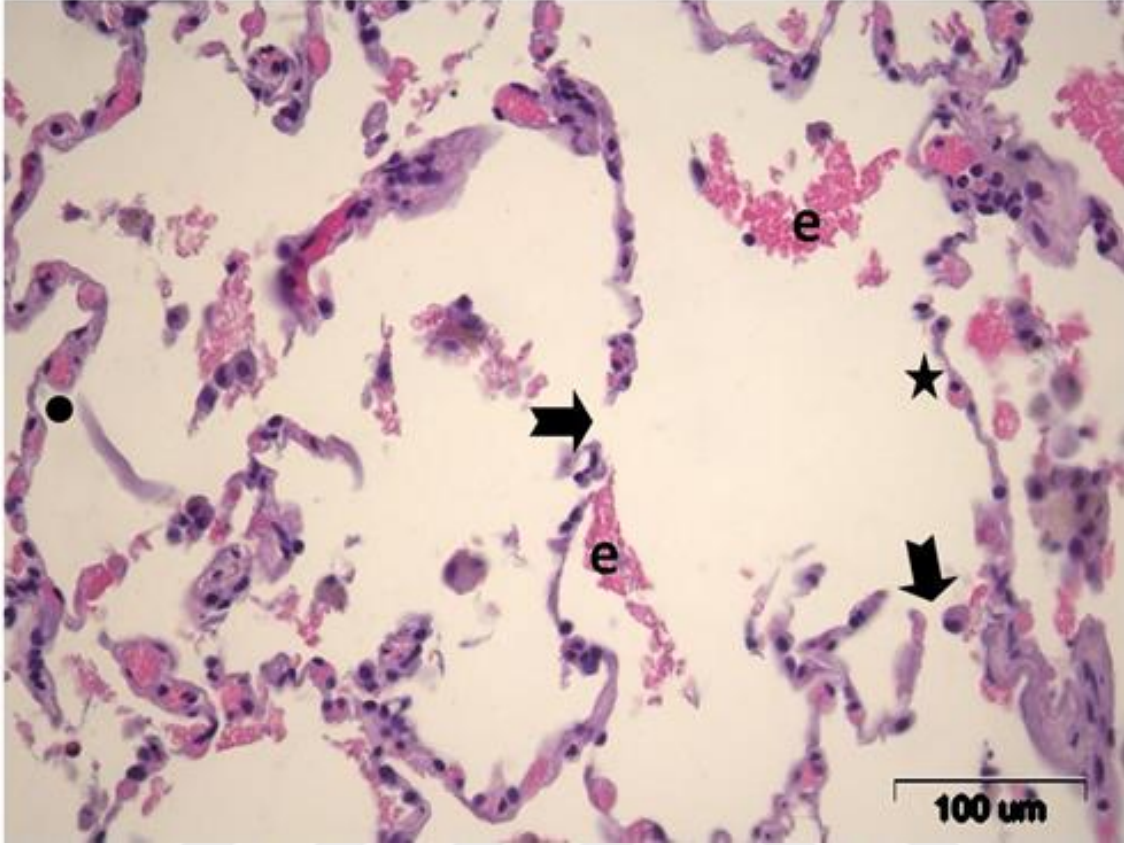
Amfizemli doku örneklerinde ise akciğer yapısının belirgin bir şekilde bozulduğu dikkati çekmektedir. Bronşiyollerde yer yer bronkokonstriksiyonun varlığı görülmüştür. Bazı bireylerde nadiren kollabe alanların varlığı dikkat çekmektedir. KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgeleri bireylerde olduğu gibi doku genelinde antrokoz gözlemlenmiştir. Bu grubun tüm bireylerinde, KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgeleri bireylerde gözlemlenen küçük normal büyüklükteki alveoller yerine, alveolar duvarın kopması nedeniyle birbiriyle birleşen daha büyük alveoller tespit edilmiştir. Bu geniş alveollere yaygın olarak rastlanmıştır. Genişlemiş alveollerin duvarlarında incelme ve kopmalar söz konusudur. Dolayısıyla bu bireylerde alveolar epitel bütünlüğü korunamamıştır. KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgeleri bireylerle benzer şekilde alveol lümenlerinde kümelenmiş hücreler ve nötrofil hücrelerin varlığı tespit edilmiştir. Bazı alveollerde yer yer eritrosit birikimine de rastlanmıştır (Şekil 4.4:- 4.6:).



Şekil 4.4: Amfizemli insan akciğeri kesidinin genel yapısal görüntüsü. A: Alveol, ➡: Alveol duvarında kopma, parçalanmalar, ★: Alveol duvarında incelmeler (Hematoksilin-Eozin).



Şekil 4.5: Amfizemli insan akciğeri kesitlerinde genişlemiş alveollere ait yakından bir görünüm: A: Alveol, ★: Alveol duvarında incelmeler ►: Alveol duvarında kopmalar (Hematoksilin-Eozin).

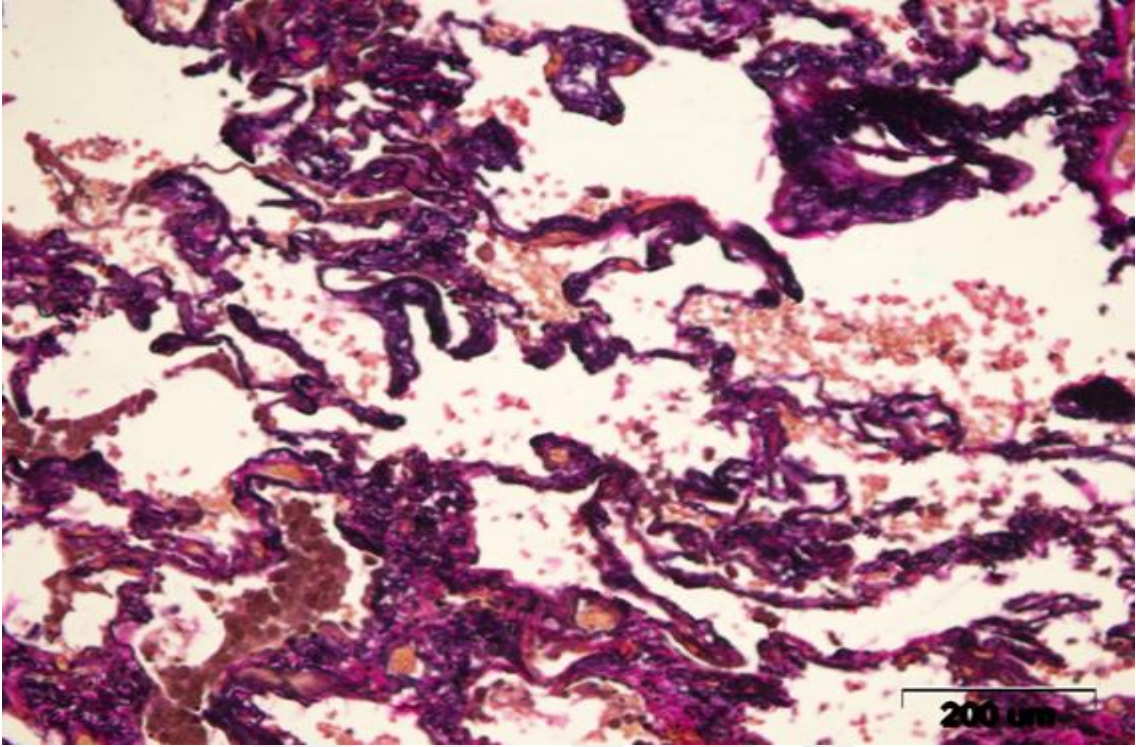


Şekil 4.6: Amfizemli insan akciğeri kesidi yapısal görüntüsü: e: Eritrosit, → : Alveol duvarında kopma, parçalanmalar, ★ : Alveol duvarında incelmeler (Hematoksilin-Eozin).

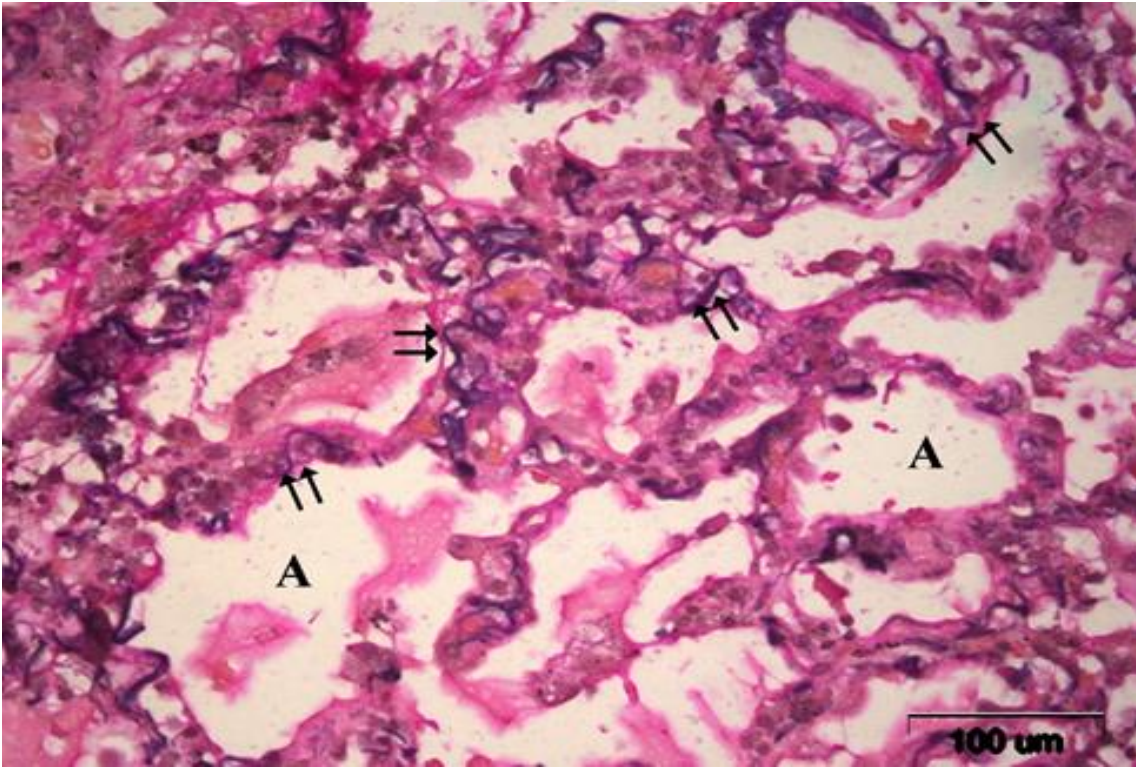
4.1.2. Verhoff'un Elastik Fibril Boyası ile Boyanan Akciğer Kesitlerine Ait Bulgular

Elastik fibriller baskın olarak alveolar duvarda, interstisiyel alanlarda ve pulmoner arterler ve arteriyollerin duvarlarında bulunmaktadır. Amfizemli olmayan insan akciğerlerinde bu bölgelerde elastik fibriller çok kıvrımlı ve uzun fibriller olarak görülmektedir (Şekil 4.7:-4.8:).

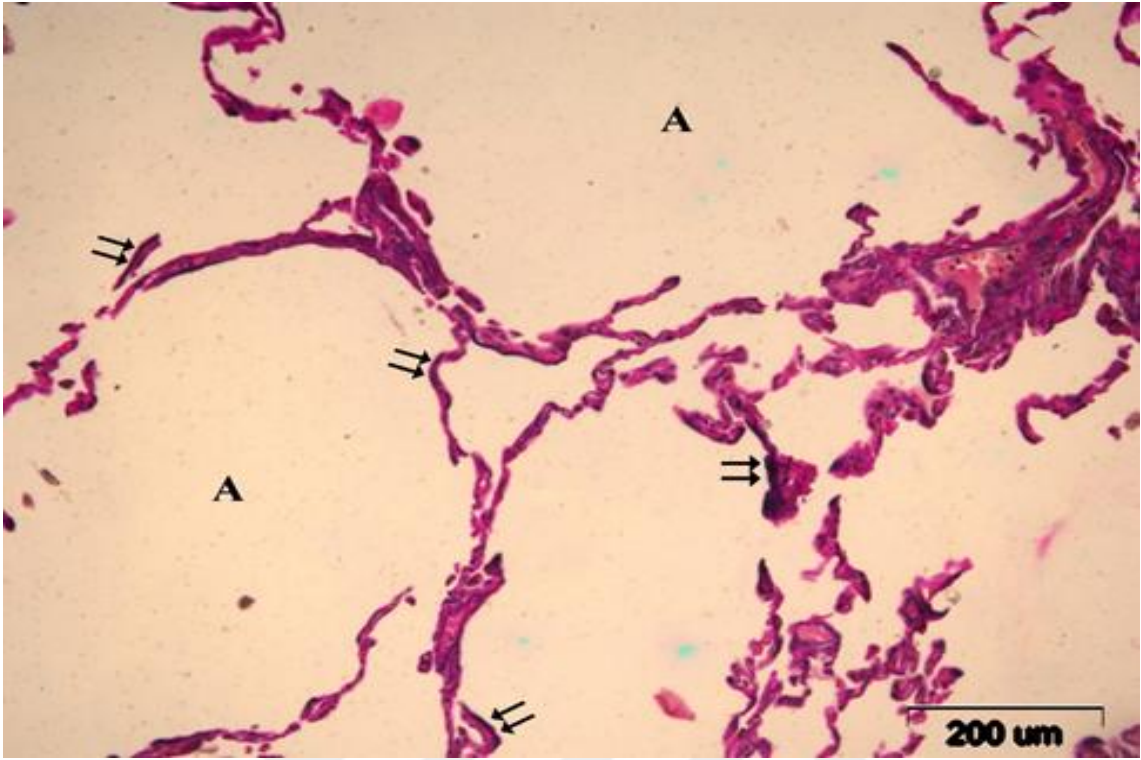
Amfizemli insan akciğerleri kesitlerinde sağlıklı bölgelerden farklı olarak alveol duvarındaki elastik fibrillerin miktarında belirgin bir azalma tespit edilmiştir. Bu bölgelerdeki elastik fibrillerin KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerindekilerle karşılaştırıldığında çok daha az belirgin, daha düz ve kesintili biçimde olduğu saptanmıştır. KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerinde gözlemlenen elastik fibrillerin kıvrımlı yay benzeri yapısı amfizemli insan akciğerinde düz yapılar halindedir (Şekil 4.9:-4.10:).



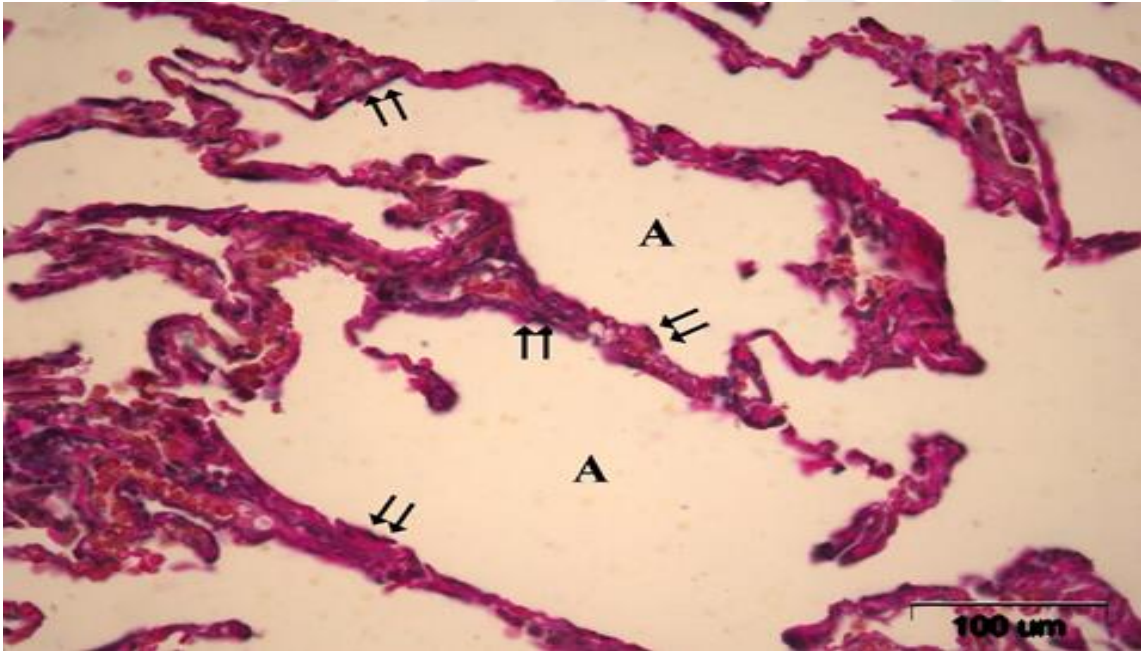
Şekil 4.7: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerinde yaygın olarak bulunan siyah renkli elastik fibrilleri göstermektedir (Verhoff'un elastik fibril boyası).



Şekil 4.8: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerinde alveolar duvarda yer alan kıvrımlı ve uzun fibriller olarak görünen elastik fibriller görülmektedir. A: Alveol, ⇨: Elastik fibriller (Verhoff'un elastik fibril boyası).



Şekil 4.9: Amfizemli insan akciğeri kesitlerinde alveolar duvarda az miktarda elastik fibril bulunmaktadır. A: Alveol, ⇨: Elastik fibriller (Verhoff'un elastik fibril boyası).

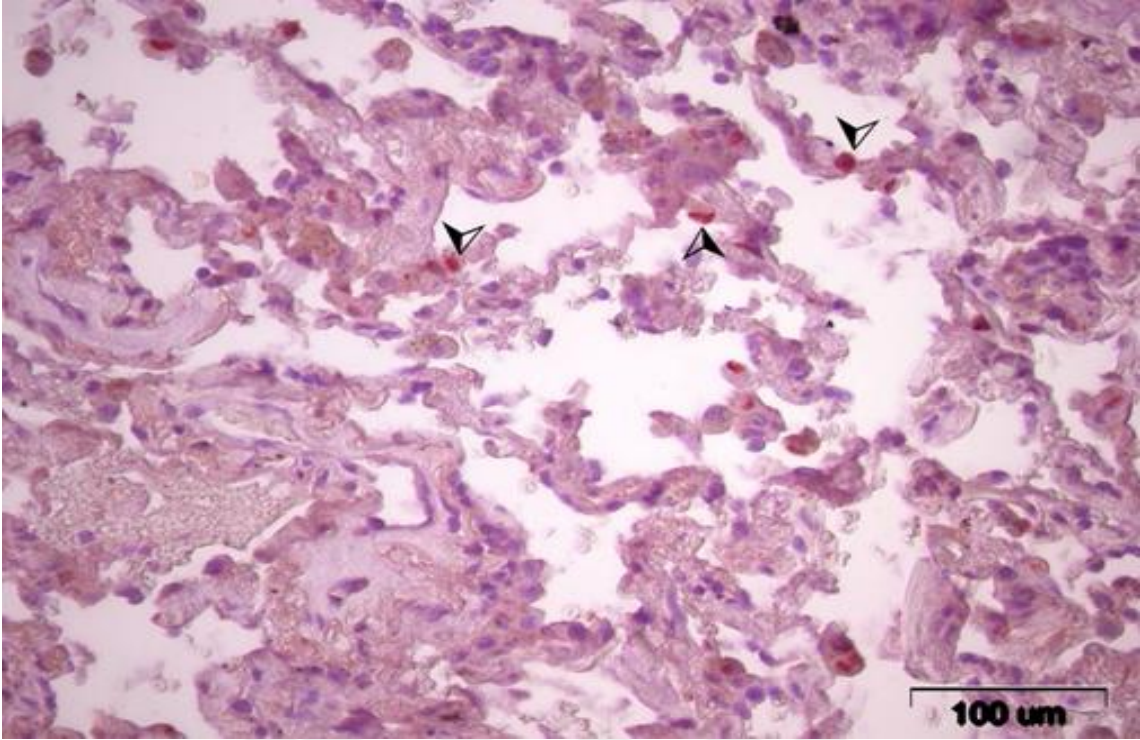


Şekil 4.10: Amfizemli insan akciğeri kesitlerinde genişlemiş alveollerde elastik fibrillerin daha yakından görüntüsü. Elastik fibriller genişlemiş alveollerin duvarında daha ince, kesintili ve düz yapılar halinde görülmektedir. A: Alveol, ⇨: Elastik fibriller (Verhoff'un elastik fibril boyası).

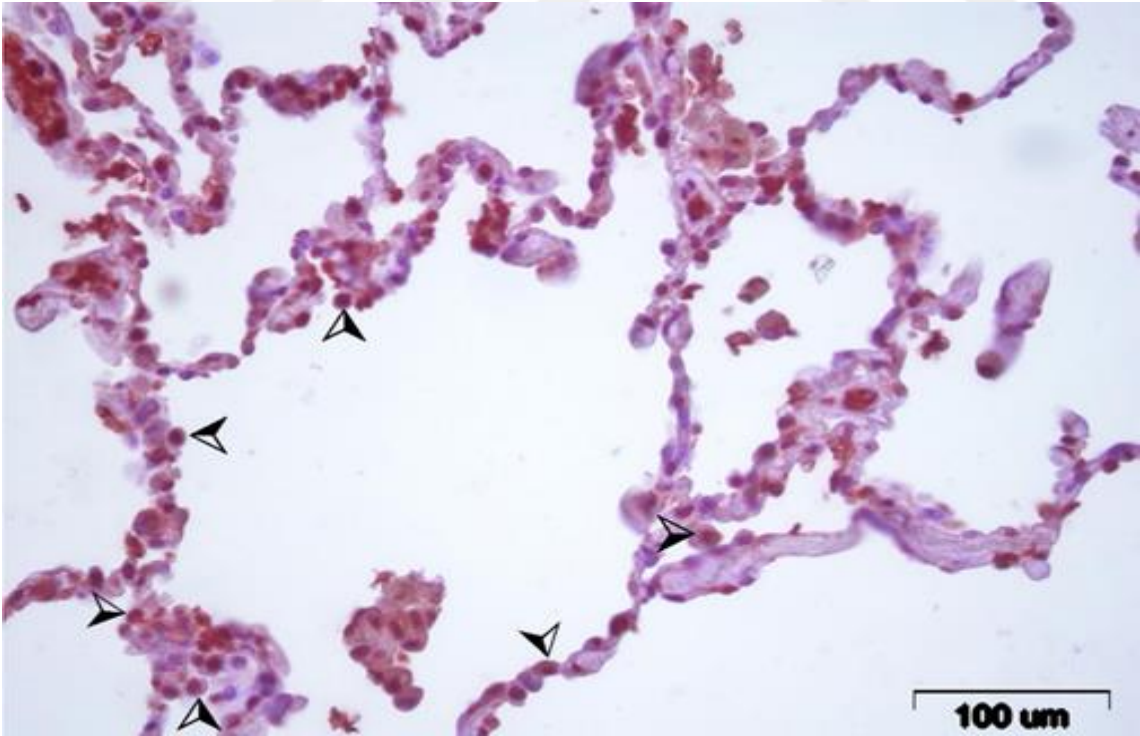
4.1.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.1.3.1. Anti-Ki67 İmmünreaktivitesi

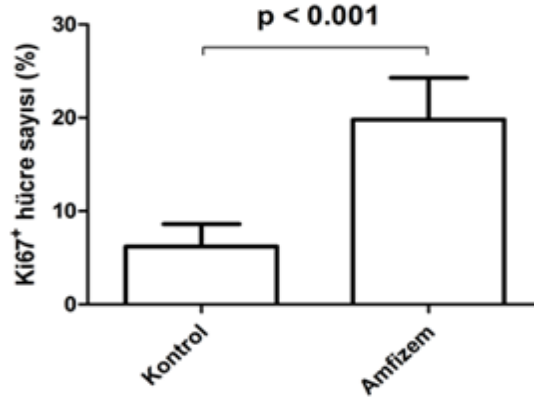
Bir proliferasyon belirteci olan anti-Ki67 antikoru kullanılarak yapılan immünohistokimya yöntemi sonucunda kesitlerde bronşiyol ve alveolar epitel hücreleri ile bağ doku hücrelerinin nükleuslarında Ki67 pozitif reaksiyonlar gözlemlendi. Sadece alveolar alandaki Ki67 immünreaktif hücreler dikkate alınarak yapılan hücre sayımında, KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerine ait kimi kesitlerde immünreaktif hücrelere rastlanmazken, kimi kesitlerde immünreaktif hücrelerin sayıca az olduğu ve immünreaktivitenin de zayıf olduğu tespit edildi. Buna karşın amfizematöz alanlarda Ki67 immünreaktif hücre sayısının diğer gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı, özellikle alveolar epitelde çok sayıda hücrenin immünreaktivite gösterdiği saptandı (Şekil 4.11:- 4.13).



Şekil 4.11: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerinde alveolar alandaki Ki67 immünreaktif hücreler ok başları ile işaretlenmiştir (Kesitlere Mayer's hematoksilin ile zıt boyama yapılmıştır).



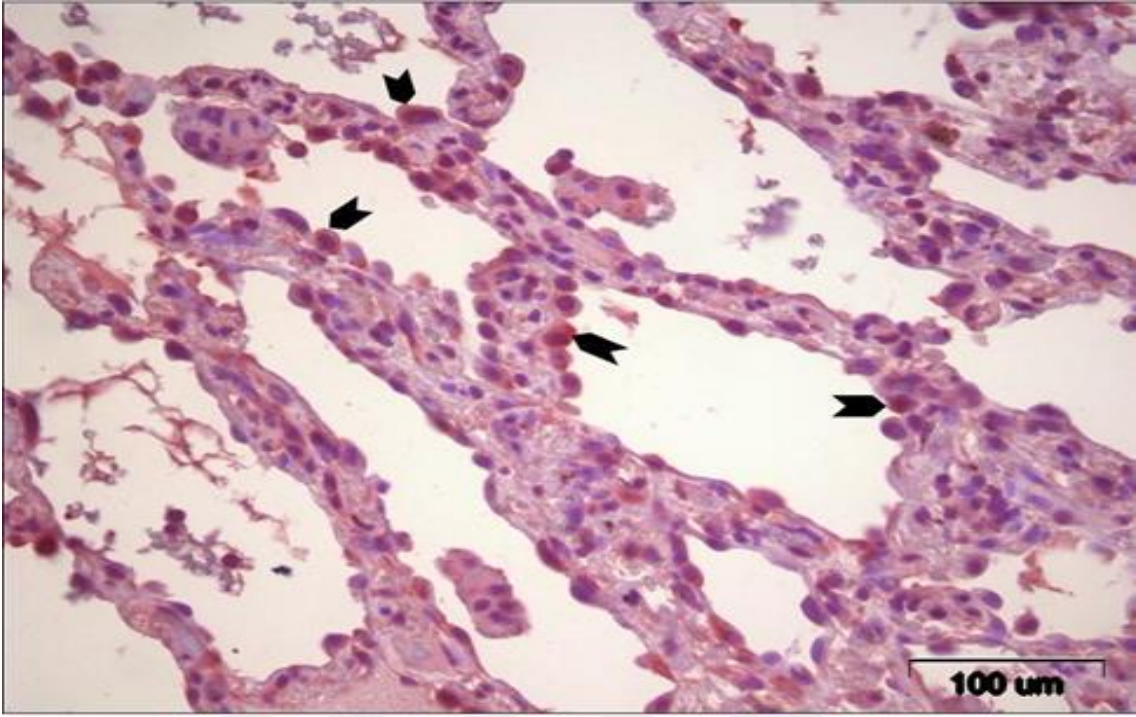
Şekil 4.12: Amfizemli insan akciğeri kesitlerinde alveolar alandaki sayıca artmış Ki67 immonreaktif hücreler ok başları ile işaretlenmiştir (Kesitlere Mayer's hematoksilin ile zıt boyama yapılmıştır).



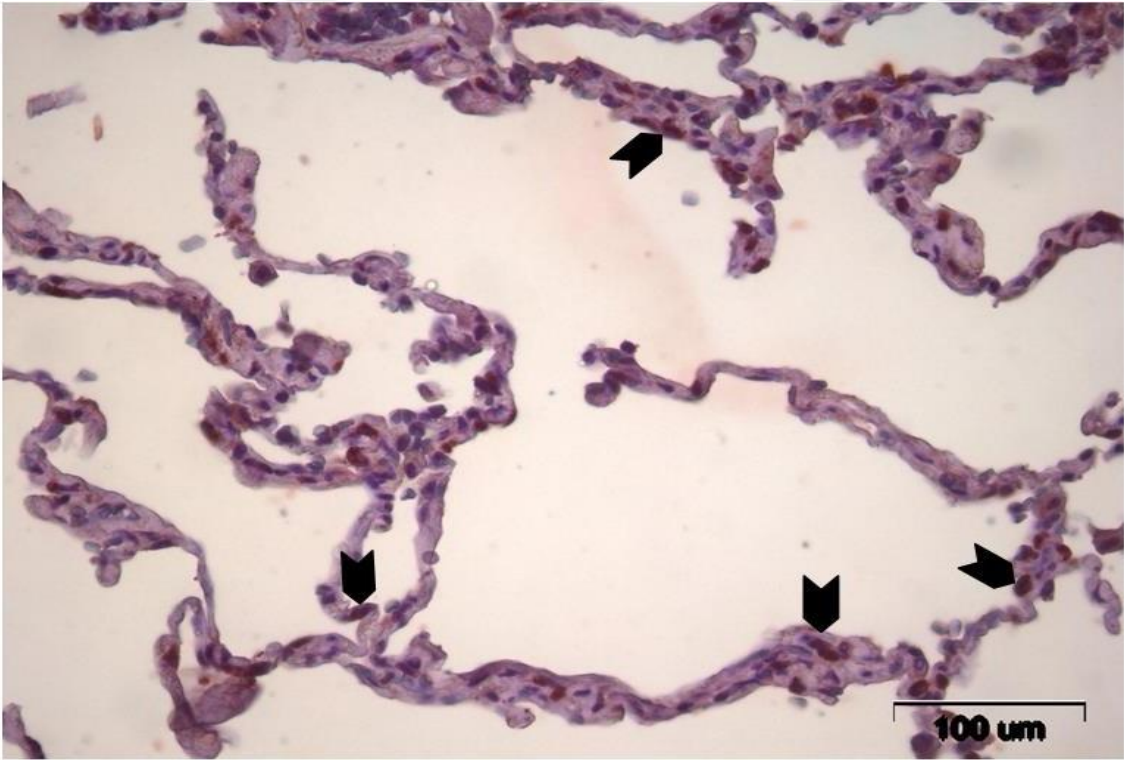
Şekil 4.13: Anti-Ki67 immünreaktif hücre sayım grafiği.

4.1.3.2. Anti-ProSP-C İmmünreaktivitesi

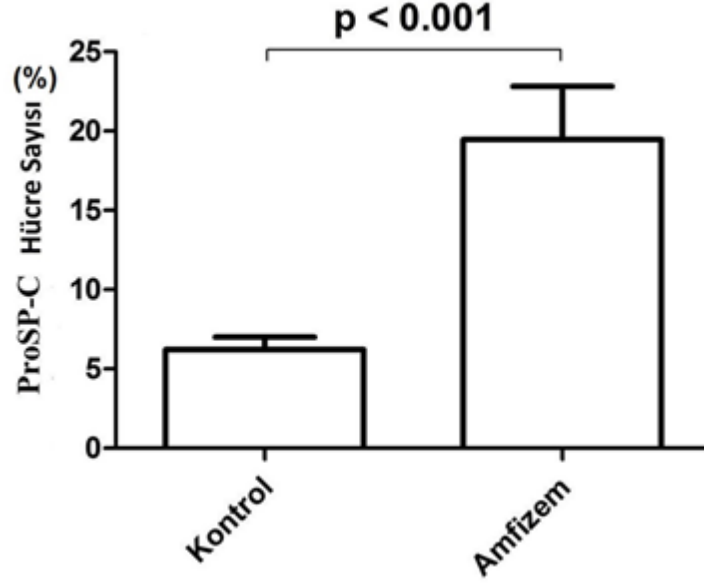
Anti-ProSP-C immünreaktivitesi doku genelinde bazı alveolar epitel hücrelerinin sitoplazmasında gözlemlendi. Her iki grubun alveolar alanlarında yapılan anti-ProSP-C immünreaktif hücre sayımına göre, amfizematöz alanlarda kuvvetli reaksiyon veren çok sayıda anti-ProSP-C pozitif epitel hücresine rastlandı (Şekil 4.14:- 4.16).



Şekil 4.14: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerinde alveolar alanda anti ProSP-C immünreaktif hücreler ok başları ile işaretlenmiştir (Kesitlere Mayer's hematoksinin ile zıt boyama yapılmıştır).



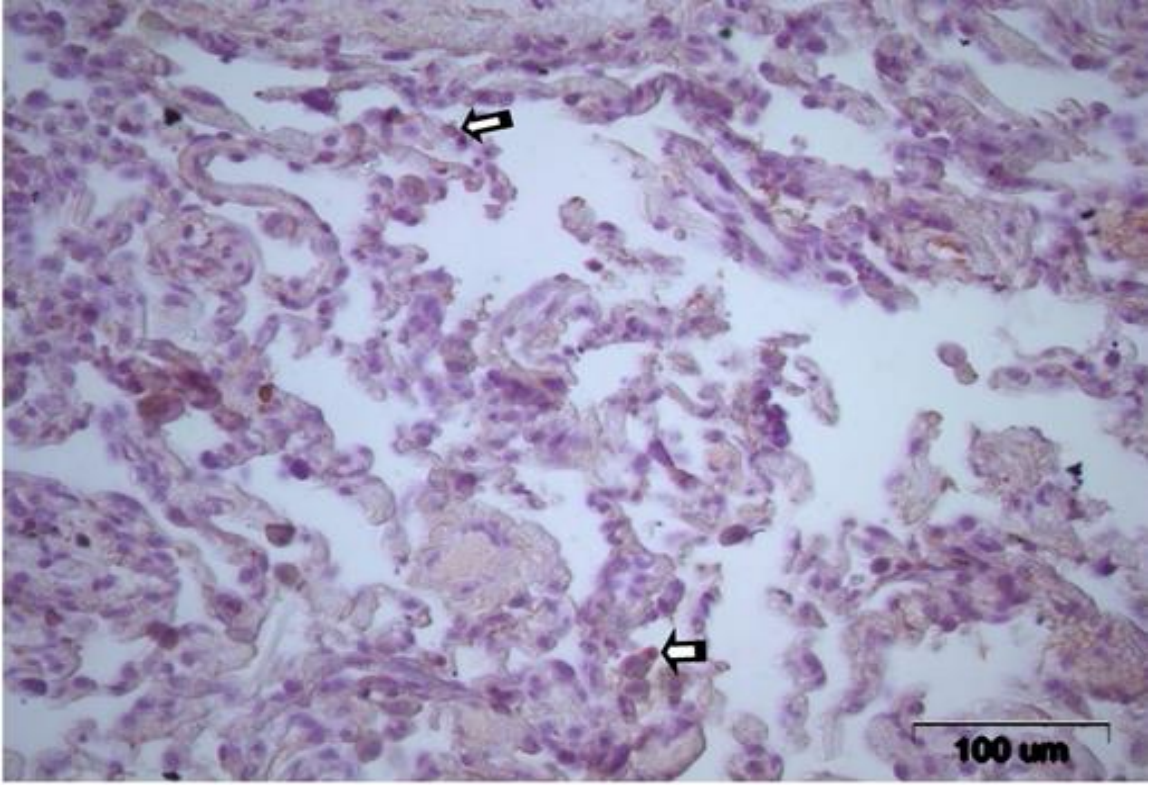
Şekil 4.15: Alveolar alanda amfizemli insan akciğeri kesitlerinde çok sayıda bulunan anti ProSP-C immünreaktif hücreler ok başları ile işaretlenmiştir (Kesitlere Mayer's hematoksinin ile zıt boyama yapılmıştır).



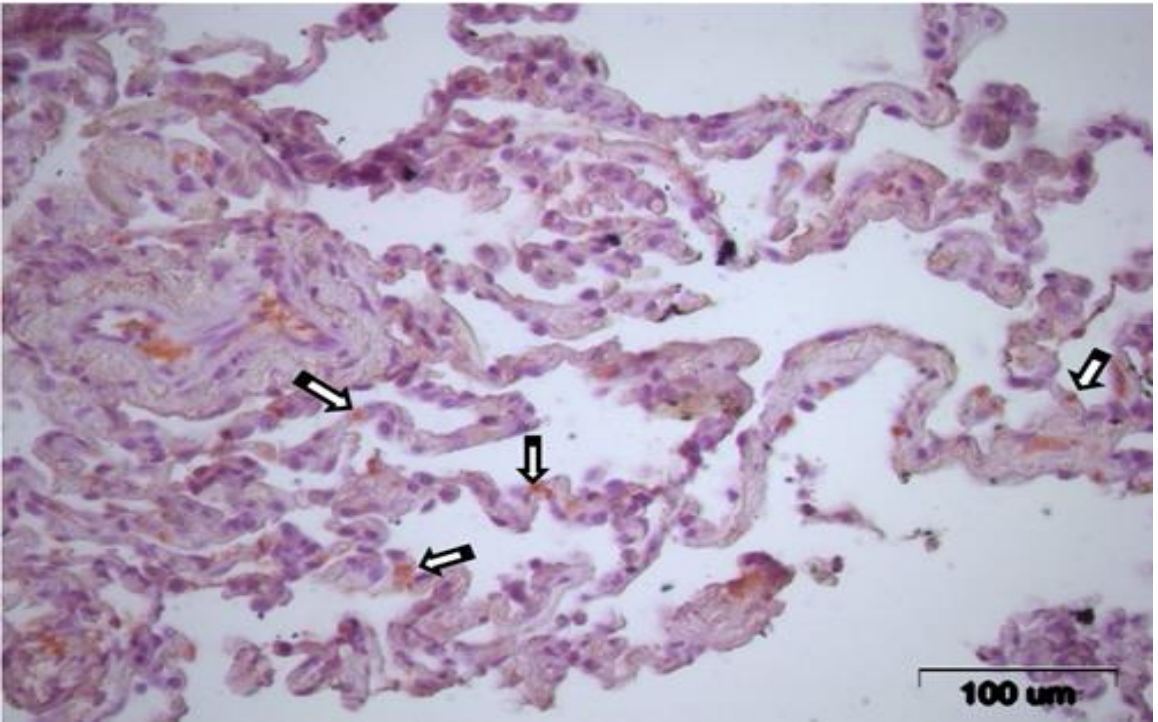
Şekil 4.16: Anti-ProSP-C immünreaktif hücre sayım grafiği.

4.1.3.3. Anti-NEDD9 İmmünreaktivitesi

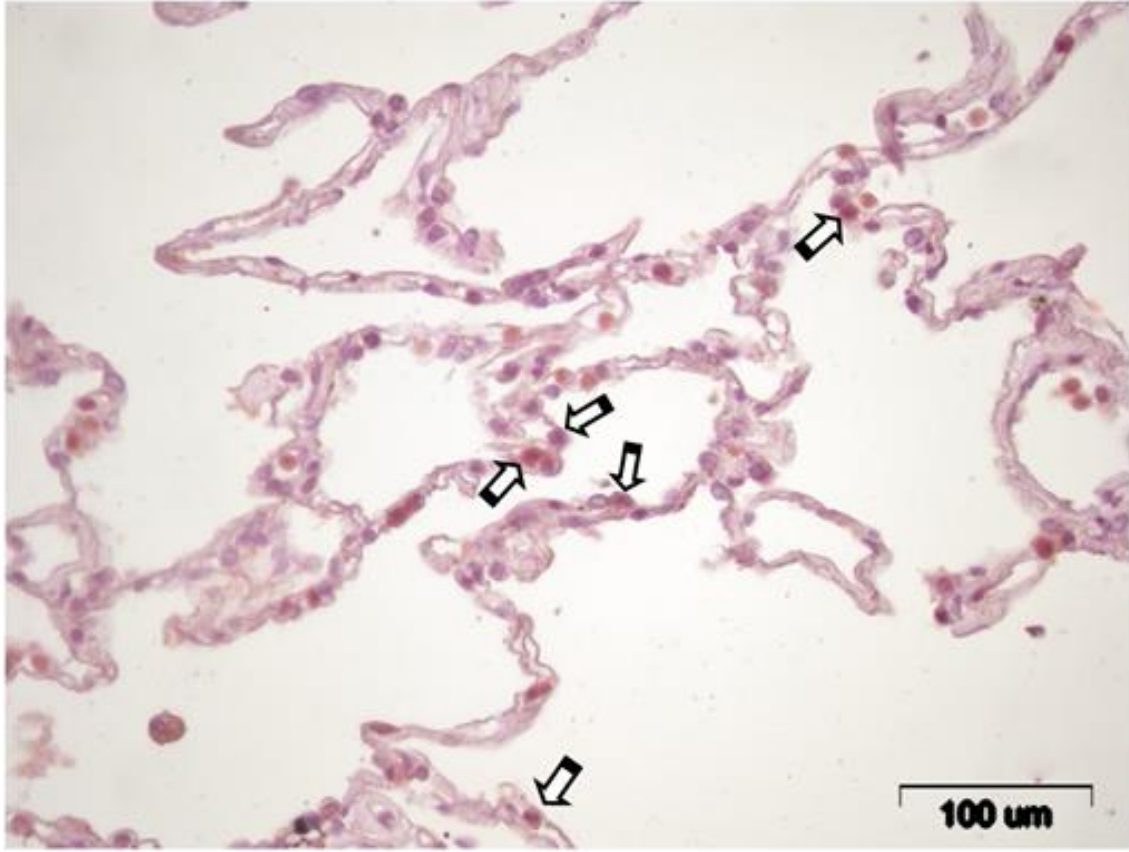
E-kaderinin hücre içi yıkımında rol oynayan NEDD9 proteinleri immünohistokimya yöntemi ile işaretlenmiştir. NEDD9, bronşiyollerde, alveolar epitelde ve bağ doku hücrelerinde çoğunlukla sitoplazmada olmak üzere, hücrelerin nükleuslarında da gözlemlenmiştir. Sadece alveolar alandaki NEDD9 immünreaktif hücreler dikkate alınarak yapılan gözlemlerde, amfizemli olmayan akciğerlerde NEDD9 immünreaktif hücrelere nadiren rastlanmıştır. Oysaki amfizemli akciğerlerde amfizematöz alanlarda alveolar epitelde NEDD9 immünreaktivitesi gösteren çok sayıda hücre belirlenmiştir. Bu hücrelerin sayısı KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerle kıyasla oldukça fazladır ve bu hücreler genellikle alveollerin köşelerinde gruplar halinde bulunmaktadır (Şekil 4.17:- 4.19).



Şekil 4.17: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerinde anti-NEDD9 immünreaktif hücreler oklarla gösterilmiştir (Kesitlere Mayer's hematoksilin ile zıt boyama yapılmıştır).



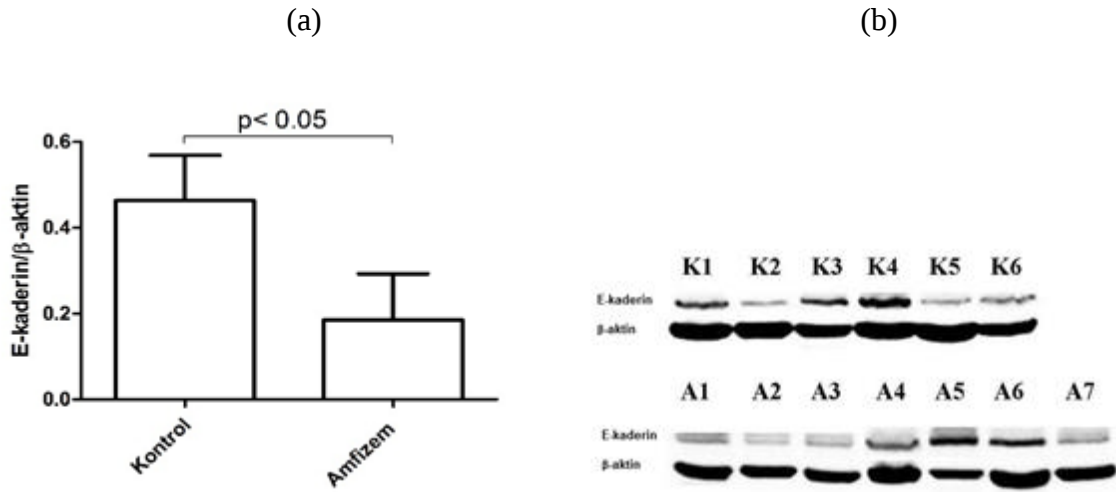
Şekil 4.18: Amfizemli akciğer dokularında anti-NEDD9 immünreaktif hücreler oklarla gösterilmiştir (Kesitlere Mayer's hematoksilin ile zıt boyama yapılmıştır).



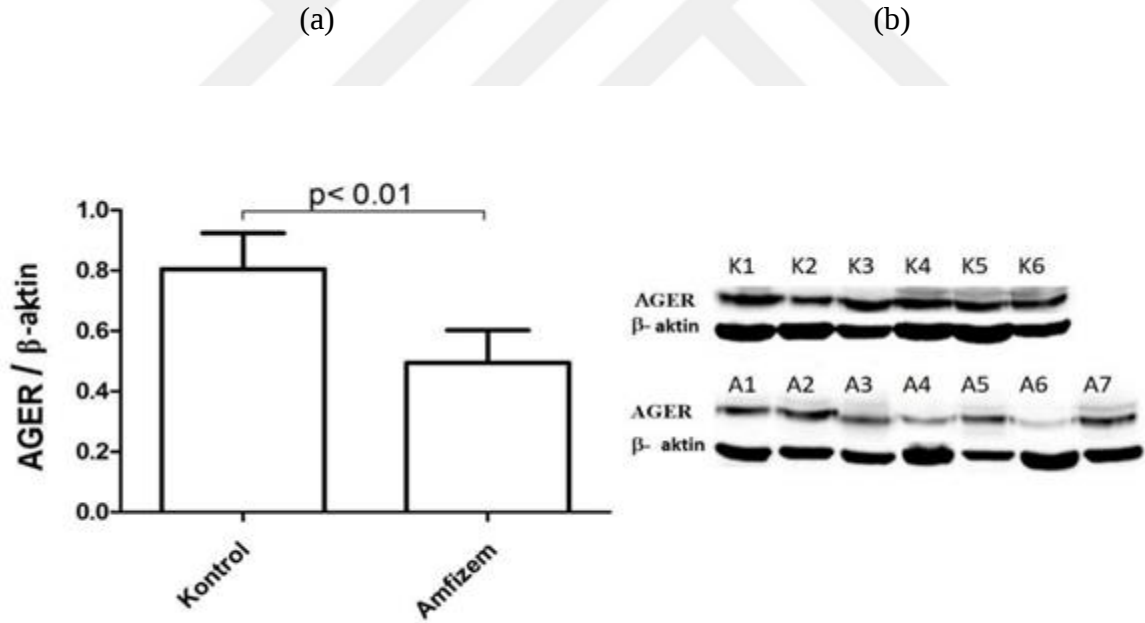
Şekil 4.19: Amfizemli akciğer dokularında alveolar epiteldeki anti-NEDD9 immünreaktif hücreler oklarla gösterilmiştir (Kesitlere Mayer's hematoksilinile zıt boyama yapılmıştır).

4.2. WESTERN EMDİRİMİ BULGULARI

Amfizemli akciğer örneklerinde E-kaderin ve AGER protein miktarlarının KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgelerine kıyasla anlamlı ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.20: ve Şekil 4.21:).



Şekil 4.20: KOAH hastalarının amfizemli ve sağlıklı akciğer örneklerinde E-kaderin protein miktarındaki değişiklikler (a) ve E-kaderin protein bantları (b) gösterilmiştir (K: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgeleri bireyler; A: Amfizemli bireyler).



Şekil 4.21: KOAH hastalarının amfizemli ve sağlıklı akciğer örneklerinde AGER protein miktarındaki değişiklikler (a) ve AGER protein bantları (b) gösterilmiştir (K: KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgeleri bireyler; A: Amfizemli bireyler).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Pulmoner amfizemin akciğer hacminin genişlemesi ve alveolar epitelin harabiyeti ile karakterize edilen ciddi bir hastalık olduğu iyi bilinmektedir. Klinik ve deneysel çalışmalar amfizem sürecinde birçok faktörün etkili olduğunu göstermektedir. Bu faktörlerin nasıl amfizeme neden olduğunu tezin giriş bölümünde bahsetmiştik. Yaş, cinsiyet, çeşitli solunum hastalıkları, sigara içimi, çevresel faktörler ve mesleki maruziyetler amfizeme neden olan etmenlerin başında yer almaktadır (Needham ve Stockley, 2004). Yapılan araştırmalarda normal fizyolojik yaşlanma ile alveollerin genişlediği ve akciğer elastikiyetinin kaybolduğu ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca yaşlı bireylerde alveol duvarlarının daha belirgin bir yıkıma uğradığı gözlemlenmiştir. Böylelikle yaşla birlikte amfizemin görülme olasılığının doğru orantılı olarak arttığı yargısına varılmıştır (Banerjee ve diğ., 2011). Klinik veriler pulmoner amfizemin sıklıkla erkeklerde görüldüğünü de göstermektedir. Diğer yandan, KOAH hastalarının %20'sinde pulmoner amfizeme rastlanmaktadır. Yapılan bir araştırmaya göre yılda 20 paket ve üzerinde sigara kullananlarda KOAH olma olasılığının hiç sigara kullanmayanlara göre 8,2 kat daha fazla olduğu ileri sürülmektedir. Yaşları 45 ile 60 arasında değişen ve sigara içicisi olan bu hastalarda amfizematöz alanlar distal hava yollarından bronşiyollere ve alveollere kadar olan bölgelerde solunum yollarının ve alveollerin genişlemesi şeklinde tanımlanmışlardır (Emam ve diğ. 2010). Bu hastalarda sigara içiminin pulmoner amfizem oluşumunda önemli bir risk faktörü olduğu belirtilmektedir. Yapılan bir başka çalışmada da sigaraya maruz kalmış insan akciğer biyopsilerinde amfizemi karakterize eden genişlemiş alveoller, incelmış ve yer yer kopmuş alveolar epitel, alveolar alan ve parenşim dokuda inflamasyon gibibenz bulguları rapor edilmiştir (Bals, 2010). Sigara dumanının pulmoner amfizeme neden olduğunu gösteren çok sayıda deneysel çalışma vardır. Yapılan bir çalışmada 1, 3, 6, 12 ay gibi farklı süreler boyunca haftada 5 gün, günde 10 sigaranın dumanına maruz bırakılan kobaylarda akciğer fonksiyon anormallikleri ve kademeli olarak pulmoner amfizem görülmüştür. Bu hayvanlarda sigara maruziyeti durdurulmuş, ancak hava yollarının genişlemesinde bir geriye dönüş veya bir iyileşme gözlemlenmemiştir (Meshi ve diğ., 2002). Altı ay süren bir sigara maruziyeti ile de genişlemiş alveoller açıkça gözlemlenmiştir. Yine aynı çalışmada sigara maruziyeti sonucu fare akciğerlerinde bağ doku yıkımı olduğu belirtilmiştir (Shapiro, 2000). Ayrıca KOAH hastalarında sigara içiminin, bu hastalarda yüksek oranda akciğer kanserine de neden olabileceği ileri sürülmektedir (Li ve diğ., 1996). Çalışmamızda biyopsilerini değerlendirmeye aldığımız bireylerin çoğu 50 yaşın üzerinde, akciğer kanseri

tanısı konulmuş, sigara geçmişi olan, erkek KOAH hastalarıdır. Bu hastalardan alınan akciğer biyopsilerinde amfizematöz alanlar yukarıdaki çalışmalarda da belirtildiği gibi genişlemiş alveoller, alveolar epitelde incelme ve yer yer kopmalar ile inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu gibi amfizemin karakteristik özellikleri ile ayırt edilmişlerdir.

Amfizemin gelişmesinde en önemli faktörün sigara içiciliği olduğu pek çok çalışmayla ortaya konmuştur. Sigara içiciliğinin makrofaj, nötrofil ve CD8+ T-lenfositleri gibi inflamasyonla ilişkili hücrelerin parenşim dokuya infiltrasyonuna ve kronik pulmoner inflamasyona neden olduğu gösterilmiştir. Yapılan fare deneylerinde sigara dumanının, epitel permeabilitesindeki artışa bağlı olarak hava yolları ve akciğer parenşiminde inflamatuvar hücrelerin birikimini uyardığı görülmüş ve bu hücrelerin amfizem patogenezinin gelişiminde etkili oldukları ortaya çıkarılmıştır (Ofulue ve Ko, 1999). KOAH'lı hastalar ile yapılan çalışmada özellikle genişlemiş küçük hava yolları çevresinde makrofaj ve nötrofillerin birikimi gösterilmiştir (Brusselle ve diğ., 2005). Çalışmamızda da, amfizematöz alanlarda alveol lümeninde çok sayıda eritrosit, nötrofil ve makrofaj benzeri hücreye rastlanması, alveolar epitel geçirgenliğinin arttığının kanıtı olarak gösterilebilir. Mahadeva ve diğ. (2002) yaptıkları çalışmada sigara içiminin uyardığı kronik inflamasyonun akciğerde terminal hava yollarında geri döndürülemez bir hasara ve alveollerde genişlemeye yol açtığını belirtmişlerdir. İnflamatuvar hücrelerden özellikle makrofaj ve nötrofiller, salgıladıkları çeşitli proteazlarla solunum yolu epiteli, pulmoner epitel ve akciğer parenşiminin hasarına, kollagen ve elastik fibriller gibi ekstrasellular matriks elemanlarının yıkımına neden olurlar. Yapılan bir çalışmada elastin fragmentlerinin etrafında çeşitli inflamatuvar hücrelerin toplandığı saptanmıştır (Küçükaltun, 2007). Makrofaj ve nötrofillerin ekstrasellular matriks ana proteinlerinden kollagen ve elastini sindiren kollagenaz ve elastaz enzimlerini üretilip salgıladıkları iyi bilinmektedir. Bu durum proteaz-antiproteaz dengesinin bozulması ve aktiviteleri normalden daha fazla artan proteazların alveolar alanda geri dönüşümü olmayan bir hasara neden olduğu şeklinde yorumlanmıştır (Brusselle ve diğ., 2005). Elastik fibril yıkımının pulmoner amfizemin başlıca nedeni olduğu, elastik fibrilleri sindiren çeşitli enzimlerin fare, sıçan, tavşan gibi kemirgenlere intratrakeal yol ile verildiği deneysel çalışmalarda açık bir şekilde gösterilmiştir. Kopan alveolar epitel nedeniyle genişlemiş olan alveollerin elastik fibrillerin yıkımıyla da elastikiyetlerini neredeyse tamamen kaybettikleri söylenebilir (Brusselle ve diğ., 2005). Bir bitki proteazı olan papainin intratrakeal

olarak sıçanlara verilmesi sıçan akciğerlerinde elastik fibrillerin yıkımına bağlı olarak gelişen amfizematöz değişiklikler ile sonuçlanmıştır (Pastor ve diğ., 2006). Biz de çalışmamızda amfizematöz alanlarda elastik fibrillerin miktarının azaldığını, yay gibi kıvrımlı yapılarını kaybedip düzleştiklerini ve kısa fibriller halinde alveolar duvarda yer aldıklarını gözlemledik. Ayrıca sigara içimi kronik inflamasyonun yanı sıra proteaz-antiproteaz dengesizliğine de neden olarak pulmoner amfizeme yol açan biyolojik süreçleri tetiklemektedir. İnsanlarda bir antiproteaz olan alfa-1-antitripsinin eksikliğinin de amfizem ile sonuçlanması ile proteaz-antiproteaz dengesizliğinin amfizeme neden olduğunu belirtmiştir (Pastor ve diğ., 2006). Bir antiproteaz olan alfa-1-antitripsin eksikliği pulmoner amfizem için başlıca risk faktörüdür (Bals, 2010). Alfa-1-antitripsin eksikliği insanlarda hem genetik olarak hem de çevresel faktörler etkisiyle sonradan görülebilir. Çalışmalarda sigara içen KOAH'lı hastalarda serumdaki alfa-1-antitripsin seviyesinde ve akciğer fonksiyonlarındaki azalmalara artan proteaz aktivitesi ile oluşan pulmoner amfizemin eşlik ettiği saptanmıştır (Janus ve diğ., 1985; Seersholm ve diğ., 1995). Besiktepe ve diğ. (2017) KOAH hastalarının amfizematöz alanlarında alveol lümenlerinde çok sayıda makrofaj ve nötrofil hücresinin bulunduğunu göstermiştir. Çalışmamızda da sigara içicisi olan KOAH'lı hastaların amfizematöz alanlarında, amfizematöz olmayan bölgelere kıyasla hem akciğer parenşiminde hem de alveol lümeninde nötrofil yanı sıra büyük gruplar halinde hücrelere rastlanmıştır. Bu hücrelerin Besiktepe ve diğ. (2017)'nin tariflediği hücrelerle benzer görünüşte olduklarından makrofaj oldukları düşünülmektedir. Dolayısıyla yukarıdaki veriler ışığında, sigara içimiyle uyarılan kronik inflamasyonun ve makrofaj ile nötrofil hücrelerinden salınan elastaz gibi proteazların KOAH hastalarının akciğerlerindeki amfizematöz alanlarda elastik fibril yıkımına ve alveolar alanda yapısal hasara neden olarak pulmoner amfizem gelişimine neden olabileceğini söyleyebiliriz. Histolojik incelemelerde amfizematöz alanlarda daha az miktarda elastik fibrillere rastlamamız bunun bir kanıtı olarak gösterilebilir.

Pulmoner amfizemde geniş alveollerin oluşumundan sorumlu mekanizmalar arasında, alveolar epitel hasarına bağlı olarak, alveolar epitel bütünlüğünün bozulması ve yer yer kopması olayları bulunmaktadır. Alveolar epitel, hava ile solunan toksinlere, zehirli gazlara, toz parçacıklarına, akciğerde artan oksidatif strese ve çeşitli proteazlara karşı oldukça hassastır. Özellikle pulmoner amfizem çalışmaları verileri doğrultusunda sigara dumanı maruziyeti sonucunda

meydana gelen inflamasyon ve inflamatuvar hücrelerden salınan ajanlar ve dokuda gelişen proteaz-antiproteaz dengesizliği, doku elastikiyetinin kaybedilmesi yanı sıra alveolar epitelin hasarına da neden olur (Hind ve Maden, 2011). Hasar gören alveolar epitelde onarım mekanizmaları devreye girer. Alveolar epiteldeki tip 1 pnömositler, hasar ajanlarından en çok etkilenen ve zayıf antioksidan sistemleri nedeniyle hasar sonrasında ölen hücrelerdir. Sigara dumanı, elastaz, papain gibi maddeler ile deneysel olarak uyarılan pulmoner amfizem çalışmalarında alveolar epitel hücrelerinin ölümüne işaret edilmektedir (Shapiro, 2000; Henson ve diğ. 2006; Heijink ve diğ., 2010). Tip 2 pnömositler ise tip 1 pnömositlere göre daha dayanıklı hücrelerdir ve alveolar epitelin onarımında bizzat görev almaktadırlar. Hasar sonrası alveolar epitel hücrelerinin ölmesi ile meydana gelen tip 1 ve tip 2 pnömosit kayıpları, geride kalan tip 2 pnömositlerin çoğalıp hem tip 1 hem de tip 2 hücrelerini vermeleri ile karşılanır (Kayalar ve Oztay, 2014). Hiperoksik şartlar altında tutulan farelerin akciğerleri ile yapılan bir çalışmada, alveolar epitel hasarının geliştiği, özellikle tip 1 pnömositlerde bir kayıp gözlemlendiği, alveol epitel bütünlüğünün yer yer kopmalarla bozulduğu ve genişlemiş alveollerin bulunduğu rapor edilmektedir. Aynı çalışmada alveolar epitelde gelişen bu hasara karşı, alveolar epitelin bir onarım cevabı olarak ProSP-C-immünreaktif olan tip 2 pnömositlerin sayıca arttığı ileri sürülmüştür. Bu çalışmada tip 2 pnömositlerin sayıca artmasının alveolar epitelde Ki67 immünreaktif hücrelerin (çoğalan hücreler) sayısındaki artışla paralellik gösterdiği tespit edilmiştir (Kayalar ve Oztay, 2014). Biz çalışmamızda sigara içicisi olan KOAH hastalarında amfizematöz alanlarda alveolar epitel bütünlüğünün bozulduğunu, alveolar epitelde yer yer kopmaların olduğunu tespit ettik. Ayrıca amfizemli akciğer örneklerinin amfizematöz alanlarında alveolar epitelde ProSP-C ve Ki67 immünreaktif hücrelerin sayıca arttığını belirledik. Buna göre ProSP-C ve Ki67 immünreaktif hücrelerin sayıca artışının, pulmoner amfizem ile sonuçlanan alveolar epitel hasarına ve kaybına karşı epitelin bir reperatif yanıtı olarak meydana geldiğini düşünmekteyiz.

Pulmoner amfizem KOAH hastalarının %20'sinde görülmektedir. Bu hastalarda alveolar epitelin hasarına ve kaybına bağlı olarak gelişen solunum gazlarının taşınmasındaki kayıp, başlıca ölüm nedenleri arasında gösterilmektedir. Yapılan çalışmalarda pulmoner amfizemde alveolar epitel hasarının geri dönüşümsüz olarak meydana geldiği ve alveolar epitel onarımının yapılamadığı ileri sürmektedir (Henson ve diğ., 2006). Bu görüş dikkate alınarak, pulmoner

amfizemde alveolar epitel hasarı ve özellikle onarımın bozulmasının altında yatan mekanizmaların çözümlenmesi, pulmoner amfizem patogenezinin aydınlatılması için gerekmektedir. Alveolar epitel hücre proliferasyonu, farklılaşması, alveolar epitel onarımı ve bütünlüğünün sağlanmasının amfizem patogenezinin iyileştirilmesinde etkili bir yaklaşım olabileceği dile getirilmektedir (Martorana ve diğ., 2006). Bu amaç doğrultusunda, çalışmamızda, KOAH'lı hastaların amfizemli ve amfizemli olmayan alanlarında hücre-hücre bağlantılarının kurulmasını sağlayan ve epitel bütünlüğünün oluşumuna katkıda bulunan E-kaderin proteinin miktarındaki değişimler saptanmıştır. Ayrıca e-kaderin miktarındaki değişimlerin, alveolar epitel onarımı ve bütünlüğü üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Bir adhezyon molekülü olarak bildiğimiz E-kaderin, özellikle epitel hücreleri arasında hücre-hücre bağlantılarının kurulmasında görevlidir. E-kaderin proteini sıkı bağlantılar dışında tüm epiteliyal hücre-hücre bağlantılarının başlıca proteinidir. E-kaderin molekülü sayesinde birbirlerine sıkıca bağlanan epitel hücreleri, epitel tabakanın bütünlüğünü ve devamlılığını sağlarlar. Sağlıklı insan akciğerinde alveolar yüzeyde tip 1 ve tip 2 pnömositler alveolar epitel boyunca uzanmaktadır. Alveolar epitel hücreleri birbirleri ile çeşitli sıkı ve adherens bağlantılar ile bağlıdırlar. Sağlıklı bir insan akciğerinde, bu hücre-hücre bağlantıları, alveolar epitel bütünlüğünün korunmasında ve epitelin alveolar lümen ile akciğer parankimi arasında bir bariyer vazifesi görmesinde etkilidirler (Brusselle ve diğ., 2005). Sağlıklı bir akciğerde alveolar epitel bütünlüğünün korunması etkili miktarda E-kaderin proteinin varlığına bağlıdır. Yapılan bir çalışmada, sigara dumanına maruz bırakılmış fareler ile normal havaya maruz kalan fareler arasında E-kaderinin molekülünün ekspresyonunu karşılaştırmak için immünofloresan yöntemler kullanılmış ve E-kaderin ekspresyonunun sigara dumanına maruz kalan farelerin olduğu grupta çok daha az olduğu gösterilmiştir (Shaykhiev ve diğ., 2011). Sigaranın, zonula okludens-1 ve E-kaderin de dahil olmak üzere hücre-hücre bağlantı proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonunu azalttığı ve akciğerde epiteliyal bariyeri bozan yapısal değişiklikleri indüklediği bildirilmektedir (Shaykhiev ve diğ., 2011). Oldenburger ve diğ (2014), KOAH hastalarının akciğerlerinde KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgeleri bireylere kıyasla E-kaderin protein miktarının azaldığını saptamışlardır. Aynı araştırmada sigara ekstraktı uygulanan insan bronşiyol epitel hücrelerinde, E-kaderin protein miktarının azalmasının hücrelerin epitel bariyer fonksiyonlarında azalmaya neden olduğu deneysel olarak

gösterilmiştir. Hava yolu ve alveolar epitel permeabilitesindeki artış ve uyarılmış inflamatuvar yanıt KOAH'da önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Sigara dumanı maruziyeti sonrasında A549 hücrelerinde epitel permeabilitesinin arttığı ve nötrofil infiltrasyonunun gerçekleştiği saptanmıştır (Aggarwal ve diğ., 2013). KOAH hastalarından alınan bronşiyolo alveolar sıvı örneklerinde nötrofil ve elastaz miktarının arttığı ve bu sıvıda sindirilmiş E-kaderin protein artıklarının bulunduğu tespit edilmiştir (Boxio ve diğ., 2016). Bu sonuçlara dayanarak yapılan bir yorumda, inflamasyonlu insan akciğerinde nötrofil kaynaklı elastazın E-kaderin yıkımına neden olabileceği ileri sürülmektedir. Biz de çalışmamızda amfizematöz alanlarda çok sayıda nötrofile rastladık. Dolayısıyla bu hücreler saldıkları elastazlar ile E-kaderin yıkımına neden olmuş olabilirler. Diğer yandan E-kaderin proteinin hücre içi yıkımında etkili moleküllerden biri de NEDD9 proteinidir. NEDD9 proteininin aşırı ekspresyonunun akciğer adenokarsinom dokunun evreleme, farklılaşma ve tümör boyutu artışı ile kuvvetli bir korrelasyona sahip olduğu da belirtilmiştir. Neoplastik olmayan akciğer örneklerinde NEDD9'un zayıf ekspresyonu, akciğer adenokarsinom örneklerde ise artan regülasyonu rapor edilmiştir (Chang ve diğ., 2012). Yapılan çalışmalarda, kanserli hücrelerde NEDD9'un hücrelerin tutunmasına engel olarak metastazı teşvik ettiği bildirilmiştir (Mani ve diğ., 1997). NEDD9 ve ailesi ile ilgili bir başka araştırmada bu aileye ait proteinlerin ekspresyonundaki değişikliklerin α -katenin, β -katenin, p120 katenin ekspresyonlarını olumsuz etkilediğini, ancak E-kaderinin membrana lokalizasyonunu negatif yönde KOAH hastalarının akciğerlerinin sağlıklı bölgeleri ettiği ve E-kaderin yıkımını uyardığı gösterilmiştir (Tikhmyanova ve Golemis, 2011). NEDD9 E-kaderinin lizozomlara taşınmasında etkili bir proteindir. Bu nedenle E-kaderinin lizozomal yıkımını düzenler (Tikhmyanova ve Golemis, 2011). Çalışmamızda amfizematöz olmayan alanlarda alveolar epitelde çok nadir olarak NEDD9 immünreaktivitesi gözlenirken, amfizematöz alanlarda alveolar epitelde NEDD9 immünreaktif hücre sayısında belirgin bir artış olduğunu belirlenmiştir. Dolayısıyla, amfizematöz alanlarda E-kaderin miktarındaki azalmadan, NEDD9 tarafından uyarılan E-kaderinin hücre içi sindiriminin etkili olduğunu düşünmekteyiz. Bu veri amfizematöz alanlarda NEDD9 aracılı E-kaderin yıkımı ile E-kaderin miktarının azaldığını gösteren ilk veridir. Dolayısıyla bu açıdan çalışmamızın özgünlüğüne katkı sağlamıştır.

E-kaderin proteininin birkaç yol ile pulmoner amfizem patogenezinin katkı sağladığını düşünmekteyiz. Bunlardan ilk ikisi, yukarıdaki paragraflarda da detaylı olarak tartışıldığı üzere, E-kaderin proteininin azalması sonrasında epitel permeabilitesindeki artışa bağlı olarak oluşan inflamatuvar yanıt ve hücre-hücre bağlantılarının kurulamaması nedeniyle epitel bütünlüğünün sağlanamamasıdır. Üçüncü yol ise, E-kaderin proteinindeki azalma nedeniyle epitel onarımının başarıyla tamamlanamamasıdır. Hasarlı bir dokuda, eğer rezerv hücreler varsa veya hücreler bölünme yeteneğine sahipse önce hücreler çoğalırlar ve ihtiyaç duyulan doku hücrelerine farklılaşarak onarım sürecini tamamlarlar. Yapılan çalışmalar, E-kaderin miktarıyla hücre çoğalması arasında bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. E-kaderin molekülünün sitoplazmik parçası, aracı proteinler ile sitoplazmik β -katenine bağlanarak E-kaderin molekülünün hücre membranında yerleşimini ve stabil kalmasını sağlar. E-kaderinin sitoplazmik β -katenin ile kopması, β -kateninin serbest kalmasına ve sitoplazmadan nükleusa geçerek hücre proliferasyonu ile ilgili genlerin transkripsiyonu uyarmasına, yani hücre çoğalmasına neden olur (Mohamet ve diğ., 2011). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, alveolar epitelin hasar gördüğünü, alveolar duvarda yer yer kopmalar meydana geldiğini açıkça göstermektedir. Mikroskopik verilerimiz, amfizematöz alanlarda alveolar epitelde aslında bir onarım mekanizmasının öncelikli olarak devreye girdiği yönündedir. Çalışmamızda E-kaderin proteininin azaldığını saptadığımız amfizematöz alanlarda, alveolar epiteldeki tip 2 pnömositlerin alveolar epitel hasarına yanıt olarak sayıca arttığını belirledik. Doğru bir şekilde gerçekleşen alveolar epitel onarımında, çoğalan tip 2 pnömositler, tip 1 ve tip 2 pnömositlere farklılaşırlar. Böylelikle alveolar epitel onarımı tamamlanır. Ancak, çalışmamızda E-kaderin miktarındaki azalma ile birlikte amfizematöz alanlarda tip 2 hücre sayısında bir artış saptanmasına karşın, tip 1 pnömosit hücrelerinin belirteci olan AGER protein miktarında bir azalma olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, bize, E-kaderin miktarındaki azalmanın hücre proliferasyonunu uyararak tip 2 pnömosit sayısında artışa neden olmasına rağmen, bu hücrelerin tip 1 pnömositlere farklılaşmalarını sağlayamadıklarını göstermektedir. Bu durumda tamamlanmış bir epitel onarımından bahsedilemez. Nagaoka (2013), epitelial hücre farklılaşması ve polarizasyonunda görev alan bir genin çıkarıldığı epitelial hücre hattında, E-kaderinin azaldığını Western Blot yöntemi ile belirlemiştir. Bu veriden yola çıkarak, E-kaderin molekülünün epitel hücre farklılaşması ve polarizasyonunda etkili olduğu söylenebilir. KOAH hastalarının akciğerlerindeki amfizematöz alanlarda E-kaderin molekülündeki azalmanın, bu bölgelerde alveolar epitel hücre farklılaşmasında aksamalara neden olarak pulmoner amfizem

patogenezine katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Bu veri ilk olması nedeniyle çalışma özgünlüğüne katkı sağlamaktadır. Bu durum, amfizemin geri dönüşümsüz alveol strüktüründeki kayıp olarak karakterize olmasının nedenini açıklamaktadır.

Çalışmamızın sonuçları ve çıktıları şöyle özetlenebilir:

1- KOAH hastalarının akciğerlerindeki amfizematöz alanlarda alveolar epitel hasar görür, epitel bütünlüğü bozulur, epitel geçirgenliği artar ve alveolar duvarda yer yer kopmalar gerçekleşir. Bu hasara yanıt olarak hücre proliferasyonu uyarılır ve tip 2 pnömositler, alveolar epiteli onarmak üzere sayıca artarlar.

2- Amfizematöz alanlarda E-kaderin protein miktarında bir azalma vardır. Bu azalma, NEDD9 proteini tarafından koordine edilen, E-kaderin proteininin hücre içi yıkımı nedeniyledir.

3- Amfizematöz alanlarda E-kaderin miktarındaki azalma alveolar epitel hücreleri arasındaki hücre bağlantılarının zayıf olmasına ya da bu bağlantıların kurulamamasına neden olarak epitel bütünlüğünün sağlanamamasına sebebiyet verir. Ayrıca E-kaderin protein miktarındaki azalma nedeniyle amfizematöz alanlarda tip 2 pnömositlerin sayıca artmalarına rağmen bu hücreler tip 1 hücrelerine farklılaşamadıkları için fonksiyonel alveolar epitel onarımı tamamlanamamaktadır.

E-kaderin protein miktarındaki azalmalar, pulmoner amfizem patogenezine katkı sağlayarak, akciğerde alveolar alanlarda amfizematöz değişikliklere neden olur. KOAH hastalarında pulmoner amfizem tedavisinde, alveolar alanda, epitel permeabilitesinin azaltılması, epitel bütünlüğünün korunması ve epitel onarımının tamamlanabilmesi için E-kaderin proteinin sentezinin arttırılmasına ya da yıkımının azaltılmasına yönelik yaklaşımlar denenebilir

KAYNAKLAR

- Aggarwal, N.R., Chau, E., Garibaldi, B.T., Mock, J.R., Sussan, T., Rao, K., Rao, K., Menon, A.G., 2013, Aquaporin 5 regulates cigarette smoke induced emphysema by modulating barrier and immune properties of the epithelium, *Tissue Barriers*, e25248.
- Altınbaş, A., Ekiz, F., Çoban, Ş., Yüksel, O., 2012, Alfa 1 Antitripsin Eksikliği, *Yeni Tıp Dergisi*, 29(3), 138-141 .
- Baglolle, C.J., Bushinsky, S.M., Garcia, T.M., Kode, A., Rahman, I., Sime, P.J., Phipps, R.P., Garcia, M., Kode, A., Rahman, I., 2013, Differential induction of apoptosis by cigarette smoke extract in primary human lung fibroblast strains: implications for emphysema, *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 291, 19-29.
- Bals, R., 2010, Alpha-1-antitrypsin deficiency, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 24, 629–633.
- Banerjee, B., Ling, K.M., Sutanto, E.N., Musk, M., Yerkovich, S.T., Hopkins, P.M.A., 2011, The airway epithelium is a direct source of matrix degrading enzymes in bronchiolitis obliterans syndrome, *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 30, 1175-1185.
- Baraldo, S., Turato, G., Saetta, M., 2012, Pathophysiology of the Small Airways in Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *Respiration*, 84, 89–97.
- Barnes, P.J., 2004, Mediators of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *Mediators of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 56, 515-548.
- Baum, B., Georgiou, M., 2011, Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling, *The Journal Of Cell Biology*, 153, 907–917.
- Besiktepe, N., Kayalar, O., Ersen, E., Oztay, F., 2017, The copper dependent-lysyl oxidases contribute to the pathogenesis of pulmonary emphysema in chronic obstructive pulmonary disease patients, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 47, 247-255.
- Boxio, R., Wartelle, J., Raby, B.N., Lagrange, M., Malleret, L., Hirche, T., 2016, Neutrophil elastase cleaves epithelial cadherin in acutely injured lung epithelium, *BioMed Central*, 10.1186/12931-13016
- Bonay, M., Boutten, A., Malas, M.L., Marchal, J., Soler, P., Fournier, M., Leseche, G., Dehoux, M., Crestani, B., 2005, Hepatocyte and keratinocyte growth factors and their receptors in human lung emphysema, *Pulmonary Medicine*, 5-13.
- Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

- Brusselle, G.G., Bracke, K.R., Maes, T., D'hulst, A.I., Moerloose, K.B., Joos, G.F., Pauwels, R.A., 2005, Murine models of COPD, *Pulmonary Pharmacology&Therapeutics*, 19, 155–165.
- Calabrese, F., Giacometti, C., Beghe, B., Rea, F., Loy, M., Zuin, R., Marulli, G., Baraldo, S., Saetta, M., 2005, Marked Alveolar apoptosis/proliferation imbalance in end-stage Emphysema, *Respiratory*, 6-14.
- Chang, J.X., Gao, F., Zhao, G.O., Zhang, G.J., 2012, Expression and clinical significance of NEDD9 in lung tissues, *Medical Oncology*, 29,2654–2660.
- Cooper, J.D., Patterson, G.A., Sundaresan, R.S., Trulock, E.P., Yusem, R.D., Pohl, M.S., Lefrak, S.S., 1996, Results of 150 Consecutive Bilateral Lung Volume Reduction Procedures in Patients with Severe Emphysema, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 5, 1319-1330.
- Crestani, B., Dehoux, M., Hayem, G., Leçon,V., Hochedez, F., Marchal, J., Jaffré, S., Stern, J.B., Durand,G., Valeyre,D., Fournier, Aubier, M., 2002, Differential Role of Neutrophils and Alveolar Macrophages in Hepatocyte Growth Factor Production in Pulmonary Fibrosis, *Laboratory Investigation*, 8, 1015-1022.
- Emam, M., Renaud, J.F., Gharbi, N., 2010, Characterization of Lung's Emphysema Distribution: Numerical Assessment of Disease Development, <https://www.researchgate.net/publication/224146958>, [26 Temmuz 2017], establishment, maintenance, and remodeling, *The Journal Of Cell Biology*, 6 ,907–917.
- Fujino,N., Ota,C., Takahashi, T., Suzuki, T.,Suzuki, S., Yamada,M., Nagatomi,R., Kondo,T., Yamaya, M., Kubo, H., , 2012, Gene expression profiles of alveolar type II cells of chronic obstructive pulmonary disease: a case–control study, *BMJ Open Accessible Medical Research*, 2:e 001553
- Hegab, A, E., Kubo, H., Yamaya, M., Asada, M., He, M., Fujino, N., Mizuno, S., Nakamura, T., 2008, Intranasal HGF Administration Ameliorates the Physiologic and Morphologic Changes in Lung Emphysema, *Molecular Therapy*, 16(8), 1417–1426.
- Heijink, IH., Brandenburg, S.M., Noordhoek, J.A., Postma, D.S., Slebos, D.J., Oosterhout, A.J.M., 2010, Characterisation of cell adhesion in airway epithelial cell types using electric cell–substrate impedance sensing, *European Respiratory Journal*, 35, 894–903.
- Henson, P,M., Vandivier,R,W., Douglas., I.S., 2006, Cell Death, Remodeling, and Repair in chronic obstructive pulmonary disease?, *Proceedings of the American Philosophical Society*, 3(8):713-7
- Hind, M., Maden, M., 2011, Is a regenerative approach viable for the treatment of COPD?, *British Journal of Pharmacology*, 163(1):106-15

- Ito, K., Ito, M., Elliott, W.M., Cosio, B., Caramori, G., Kon, O.M., Barczyk, A., Hayashi, S., Hogg, J.C., 2005, Decreased Histone Deacetylase Activity in Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *The new england journal of medicine*, 352,1967-1976.
- Jankowich, M.D., Rounds, S., 2012, Combined Pulmonary Fibrosis and Emphysema Syndrome, *Recent Advances in Chest Medicine*, 141(1), 222–231.
- Janus ED, Phillips NT, Carrell RW, 1985, Smoking, lung function, and alpha 1-antitrypsin deficiency, *Lancet*, 1,152–154.
- Kayalar, O., Oztay, F., 2014, Retinoic Acid Induced Repair In The Lung Of Adult Hyperoxic Mice, Reducing Transforming Growth Factor-Beta1 Mediated Abnormal Alterations, *Acta Histochemica*, 116, 810-819.
- Kluver, W., 2014, Disorders of Ventilation and Gas Exchange, <https://www.slideshare.net/stanbridge/chapter023-39301675>, [29 Eylül 2017]
- Kumar, S., Tomooka, Y., Noda, M., 1992, Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 185, 1155–1161.
- Küçükaltun, S.S., 2007, Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığında Hava Yolu Epitel Hücreleri, Lenfosit, Nötrofil ve Makrofaj Apoptozisi, <http://library.cu.edu.tr/tezler/6571.pdf>, [2 Eylül 2017], Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Ana Bilim Dalı
- Law, S.F., Estojak, J., Wang, B., 1996, Human enhancer of filamentation (HEF1/NEDD9/CAS-L), a novel p130Cas-Like docking protein, associates with FAK, and induces pseudohyphal growth in yeast, *Molecular Cell Biology*, 16, 3327–3337.
- Lee, J.H., Hanaoka, M., Kitaguchi, Y., Kraskauskas, D., Shapiro, L., Voelkel, N.F., Stewart, L.T., 2012, Imbalance of Apoptosis and Cell Proliferation Contributes to the Development and Persistence of Emphysema, *Lung*, 69-82.
- Li, X.Y., Rahman,I., Donaldson, K., MacNee, W., 1996, Mechanisms of cigarette smoke induced increased airspace permeability, *Thorax*, 51, 465-471.
- Mahadeva, R., Shapiro, S.D., 2002, Chronic obstructive pulmonary disease 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema, *Thorax*, 57, 908–914.
- Mannino, D.M., Kiri, V.A., 2006, Changing the burden of COPD mortality, *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 1(3), 219–233.
- Martorana, P.A., Cavarra,E., Lucattelli,M., Lungarella, G., 2006, Models for COPD involving cigarette smoke, *Drug Discovery Today Disease Models*, 3, 225-230.
- Massaro, G.D.C., Massaro, D., 1997, Retinoic acid treatment abrogates elastase induced pulmonary emphysema in rats, *Nature Medicine* 3, 675 – 677.

- Meshi, B., Vitalis, T.Z., Ionescu, D., Elliott, W.M., Liu, C., Wang, X.D., Hayashi, S., Hogg, J.C., 2002, Emphysematous lung destruction by cigarette smoke. The effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 26(1),52-57.
- Mohamet, L., Hawkins, K., Ward, C.M., 2011, Loss of Function of E-Cadherin in Embryonic Stem Cells and the Relevance to Models of Tumorigenesis, *Journal of Oncology*, 352616, 19.
- Murakami, S., Nagaya, N., Itoh, T., Iwase, T., Fujisato, T., Nishioka, K., Hamada, K., Kangawa, K., Kimura, H., 2005, Adrenomedullin regenerates alveoli and vasculature in elastase-induced pulmonary emphysema in mice, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 172, 581–589.
- Nagaoka, K., Zhang, H., Watanabe, G., Taya K., 2013, Epithelial Cell Differentiation Regulated by MicroRNA-200a in Mammary Glands, 2013, *PLoS ONE*, 8(6), e65127
- Needham, M., Stockley, R.A., 2004, α 1-Antitrypsin deficiency?: Clinical manifestations and natural history, *Thorax*, 59,441–445. of COPD?, *Themed Issue: Respiratory Pharmacology*, 163,106–115.
- Ofulue, A.F., Ko, M., 1999, Effects of depletion of neutrophils or macrophages on development of cigarette smoke-induced emphysema, *American Journal of Physiology*, 277,97-105.
- Oldenburger, A., Poppinga, W.J., Kos, F., Bruin, H.G., Rijks, W.F., Heijink I.H., Timens, W., 2014, A-kinase anchoring proteins contribute to loss of E-cadherin and bronchial epithelial barrier by cigarette smoke, *American Physiological Society*, 0363-6143/14
- Pastor, L.M., Gascón, F.S., Girona, J.C., Bernal-Mañas, C.M., Morales, E., 2006, Morphogenesis of rat experimental pulmonary emphysema induced by intratracheally administered papain: changes in elastic fibres, *Histology Histopathology*, 21, 1309-1319.
- Po-Nien Tsao, Yi-Ning Su, Hung Li, Pei-Hsin Huang, Chiang-Ting Chien, Yih-Loong Lai, Chien-Nan Lee, Chi-An Chen, Wen-Fang Cheng, Shu-Chen Wei, Chong-Jen Yu, Fon-Jou Hsieh, and Su-Ming Hsu, 2003, Overexpression of Placenta Growth Factor Contributes to the Pathogenesis of Pulmonary Emphysema, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 169(4),505-511.
- Seersholm N, Kok-Jensen A, Dirksen A., 1995, Decline in FEV1 among patients with severe hereditary alpha 1-antitrypsin deficiency type Pi Z, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 152:1922–1925.
- Shapiro, S.D., 2000, Animal Models for Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology*, 22, 4–7.
- Sharafkhaneh, A., Hanania, N.A., Kim, V., 2008, Pathogenesis of Emphysema, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5, 475-477.

- Shaykhiev, R., Otaki, F., Bonsu, P., Dang, D.T., Teater, M., Strulovici-Barel, Y., Salit, J., Harvey, B.G., Crystal, R.G., 2011, Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular architecture in the human airway epithelium in vivo, *Cell Molecular Life Science*, 68(5):877-92.
- Singh, M., Cowell, L., Seo, S., O'Neill, G., Golemis, E., 2007, Molecular basis for HEF1/NEDD9/Cas-L action as a multifunctional co-ordinator of invasion, apoptosis and cell cycle, *Cell Biochemical Biophysic* 48, 54–72.
- Tikhmyanova, N., Golemis, E.A., 2011, NEDD9 and BCAR1 Negatively Regulate E-Cadherin Membrane Localization, and Promote E-Cadherin Degradation, *PLoS ONE*, 6, (7), e22102 .
- Tuder, R.M., McGrath, S., Neptune, E., 2002, The pathobiological mechanisms of emphysema models: What do they have in common, *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 16, 67–78.
- Tuder, R.M., Yoshida, T., Arap, W., Pasqualini, R., Petrache, I., 2006, Cellular and Molecular Mechanisms of Alveolar Destruction in Emphysema, *Annals of the American Thoracic Society*, 3- 503–511.
- Tuder, R.M., Janciauskiene, S.M., Petrache, I., 2010, Lung Disease Associated with α 1-Antitrypsin Deficiency, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 7, 381–386.
- Vlahovic, G., Russell, M.L., Mercer, R.R., Crapo, J.D., 1999, Cellular and Connective Tissue Changes in Alveolar Septal Walls in Emphysema, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160, 2086–2092.
- Yan, C., Du, H., 2004, Alveolus formation: what have we learned from genetic studies?, *Journal of Applied Physiology*, 97, 1543–1548.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ecem Göğüş
Doğum Yeri	Üsküdar - İstanbul
Doğum Tarihi	14.08.1990
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	533 487 45 59
E-Posta Adresi	gogusecem@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	08.06.2012

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Moleküler Biyoloji
Mezuniyet Tarihi	17.11.2017