



TC  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖĞÜS HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**KRONİK OBSTRÜKTİF AKCİĞER HASTALIĞI'NDA  
HAVA YOLU EPİTEL HÜCRELERİ, LENFOSİT,  
NÖTROFİL VE MAKROFAJ APOPTOZİSİ**

**Dr. SEZEN SABANCI KÜÇÜKALTUN**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. ALİ KOCABAŞ**

**ADANA-2007**



TC  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖĞÜS HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**KRONİK OBSTRÜKTİF AKCİĞER HASTALIĞI'NDA  
HAVA YOLU EPİTEL HÜCRELERİ, LENFOSİT,  
NÖTROFİL VE MAKROFAJ APOPTOZİSİ**

**Dr. SEZEN SABANCI KÜÇÜKALTUN**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. ALİ KOCABAŞ**

**ADANA-2007**

## TEŞEKKÜR

Eğitimimde ve uzmanlık tezimin hazırlanmasında bilgisini, sabrını ve hoşgörüsünü esirgemeyen Prof. Dr. Ali Kocabaş'a, asistanlık eğitimime olan katkılarından dolayı Prof. Dr. Serap Hastürk'e eğitimime ve tezimin hazırlanmasına katkılarından dolayı Yrd. Doç. Sedat Kuleci'ye ve Trd. Doç. İsmail Hanta'ya, Patoloji Anabilim Dalından Doç. Dr. Aysun Uğuz'a, Doç. Dr. Şeyda Erdoğan'a, Biyoistatistik Anabilim Dalından Doç. Dr. Gülşah Seydaoğlu'na,

Asistanlığım boyunca pek çok acı-tatlı olayı birlikte yaşadığım ve tez süresince manevi desteklerini esirgemeyen asistan arkadaşlarıma, tüm Göğüs Hastalıkları Kliniği hemşire ve personeline,

Özellikle tezimin hazırlanma aşamasında tüm sıkıntılara ortak olan annem, babam ve tüm yakınlarıma,

Şu anda asker olan ve tüm asistanlık eğitimim boyunca sevgisini, manevi desteğini hissettiren ve tezimin her aşamasında bana yardımcı olan sevgili eşim Dr. Ejder Küçükaltun'a, sıkıntılarımı gülümsemesi ile bana unutturan biricik oğlum Umut Ejder'e sonsuz teşekkürler.

**Dr. Sezen Sabancı Küçükaltun**

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	I
İÇİNDEKİLER .....	II
TABLO LİSTESİ.....	IV
ŞEKİL LİSTESİ.....	V
KISALTMALAR.....	VI
ÖZET .....	VII
ABSTRACT .....	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı.....	3
2.1.1. Tanım .....	3
2.1.2. Epidemiyoloji.....	3
2.1.3. KOAH’da Risk Faktörleri .....	5
2.1.4. Patoloji .....	5
2.1.5. Patofizyoloji .....	6
2.1.5.1. Hava Akımı Kısıtlanması ve Hava Hapsi .....	7
2.1.5.2. Gaz Değişim Anormallikleri.....	7
2.1.5.3. Aşırı Mukus Yapımı .....	7
2.1.5.4. Pulmoner Hipertansiyon .....	8
2.1.5.5. Sistemik Etkiler.....	8
2.1.5.6. Klinik .....	8
2.1.5.7. Tanı.....	9
2.1.5.8. Tedavi .....	10
2.2. KOAH’da Patogenez.....	13
2.2.1. KOAH’da İnflamasyon .....	13
2.2.1.1. İnflamatuvar Hücreler.....	15
2.2.2. Proteinaz/Antiproteinaz Dengesizliği.....	20
2.2.3. Oksidatif Stres .....	21
2.2.4. Apoptozis .....	22
2.3. Apoptozis .....	23
2.3.2. Apoptozisin Moleküler Düzenleyicileri .....	24
2.3.2.1. Kaspazlar .....	24
2.3.2.2. Bcl-2 Ailesi.....	25
2.3.2.3. p53 .....	25
2.3.2.4. Tümör Nekrozis Faktör (TNF) Ailesi .....	26
2.3.3. Apoptozis Sürecinin Değerlendirilmesi.....	26
2.3.3.1. Apoptozis Sürecinin Zamana Göre Değerlendirilmesi .....	27
2.3.3.2. Apoptozis Sürecinin Hücre İçi veya Hücre Dışı Uyarımlarla Tetiklenmesine Göre Değerlendirilmesi .....	28
2.3.3.2.1. Ekstrinsik Yol (reseptör aracılı apoptozis) .....	28
2.3.3.2.2. İntrinsik Yol (mitokondri aracılı apoptozis) .....	29
2.3.3.3. Diğer Yollar .....	31
2.3.3.3. Apoptozisin, Apoptozis Sürecinde Görev Alan Hücre Organellerine Göre Değerlendirilmesi .....	33
2.3.3.4. Apoptotik Hücrelerin Tanınması ve Fagositozu .....	33
2.3.3.5. Apoptozis Belirleme Yöntemleri .....	34
2.3.3.5.1. Morfolojik Değişiklikler.....	34
2.3.3.5.2. DNA Parçalanması (fragmentasyonu).....	35
2.3.3.5.3. DNA Boyama Yöntemleri .....	36
2.3.3.5.4. Sonlandırıcı Kaspazların Hedeflerine Karşı Antikorlar.....	37
2.3.3.5.5. Apoptozis’in Spesifik Mediatorların Saptanması .....	38
2.3.3.5.6. Mikroarray Analizi .....	39

2.3.3.5.7. RNA karıştırma çalışmaları .....	40
2.4. KOAH'da Apoptozis.....	40
2.4.1. Giriş.....	40
2.4.2. Normal Hava Yolu Tamir Mekanizması .....	41
2.4.3. KOAH'da Apoptozis ve Etkileri .....	42
2.4.3.1 Apoptotik Hücre Artışı .....	42
2.4.3.1.1. Bronş Epitel Hücrelerinde .....	42
2.4.3.1.2. Alveoler Epitel ve Endotelial Hücrelerde .....	43
2.4.3.1.3. T Lenfositlerde .....	44
2.4.3.1.4. Makrofajlarda .....	44
2.4.3.1.5. Nötrofillerde .....	44
2.4.3.2. Apoptotik Hücrelerin Tanınması ve Sonuçları .....	44
2.4.3.3. KOAH'ta Fagositik Temizlenmede Azalma ve Sonuçları.....	45
2.4.4. KOAH'da Apoptozisin Değişik Patogenetik Yollarla İlişkisi.....	48
2.4.4.1. Apoptozis ve İnflamasyon .....	48
2.4.4.2. Apoptozis ve Proteinaz-Antiproteinaz Dengesizliği.....	48
2.4.4.3. Apoptozis ve Oksidatif stres .....	49
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	50
4. BULGULAR.....	59
5. TARTIŞMA.....	79
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	85
7. KAYNAKLAR .....	86
8. ÖZGEÇMİŞ.....	95

## TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 1. KOAH'da Risk Faktörleri.....	5
Tablo 2. Spirometrik Sınıflandırma .....	10
Tablo 3. Stabil KOAH Tedavisi (GOLD 2006).....	12
Tablo 4. Apoptozis ile Nekroz Arasındaki Farklar .....	27
Tablo 5. Çalışmaya Alınan Hastalar ve Özellikleri.....	60
Tablo 6. Çalışma Gruplarının Demografik ve Laboratuvar Özellikleri .....	62
Tablo 7. Çalışma Gruplarındaki Bireylerinklinik Özellikleri.....	63
Tablo 8. Çalışma Gruplarının Bronş Duvarı Biyopsi Örneklerinden Elde Edilen Lenfositlerin Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile Boyanma Dereceleri .....	64
Tablo 9. Çalışma Gruplarının Bronş Duvarı Biyopsi Örneklerinden Elde Edilen Nötrofillerin Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile Boyanma Dereceleri.....	65
Tablo 10. Çalışma Gruplarının Bronş Duvarı Biyopsi Örneklerinden Elde Edilen Makrofajların Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile Boyanma Dereceleri .....	66
Tablo 11. Çalışma Gruplarının Bronş Duvarı Biyopsi Örneklerinden Elde Edilen Epitel Hücrelerinin Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile Boyanma Dereceleri .....	67
Tablo 12. Çalışma Gruplarının Bronş Duvarı Biyopsi Örneklerinden Elde Edilen Epitel Hücreleri ve İnflamatuar Hücrelerin Hematoksilen Eozin İle Boyanma Dereceleri .....	68
Tablo 13. Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile Bronş Duvarındaki Lenfositlerde Pozitif Boyanma Derece Ortalamaları ve Derece Ortalamalarının Gruplar Arası Karşılaştırılması .....	69
Tablo 14. Fas, Bax ve Kaspaz ile Bronş Duvarı Nötrofillerinde Pozitif Boyanma Derece Ortalamaları ve Derece Ortalamalarının Gruplar Arası Karşılaştırılması .....	70
Tablo 15. Fas, Bax ve Kaspaz ile Bronş Duvarı Makrofajlarında Pozitif Boyanma Derece Ortalamaları ve Derece Ortalamalarının Gruplar Arası Karşılaştırılması .....	71
Tablo 16. Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile Bronş Epitel Hücrelerinde Pozitif Boyanma Derece Ortalamaları ve Derece Ortalamalarının Gruplar Arası Karşılaştırılması.....	72
Tablo 17. Hematoksilen Eozin ile Bronş Epitel ve İnflamatuar Hücrelerinde Pozitif Boyanma Derece Ortalamaları ve Derece Ortalamalarının Gruplar Arası Karşılaştırılması .....	73
Tablo 18. Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile Boyanan Lenfositlerde Fas, Bax ve Kaspaz 3'ün Boyama Derecelerinin Birbirleri İle Korelasyonu (r).....	77
Tablo 19. Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile Boyanan Nötrofillerde Fas, Bax ve Kaspaz 3'ün Boyama Derecelerinin Birbirleri İle Korelasyonu (r).....	78
Tablo 20. Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile boyanan makrofajlarda Fas, Bax ve Kaspaz 3'ün boyama derecelerinin birbirleri ile korelasyonu (r) .....	78
Tablo 20. Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile boyanan makrofajlarda Fas, Bax ve Kaspaz 3'ün boyama derecelerinin birbirleri ile korelasyonu (r) .....	78

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No:

Sayfa No:

- Şekil 1. KOAH patogenezinde yer alan hücreler ve mediyatörler.....14
- Şekil 2. Apoptoziste oluşan erken ve geç morfolojik değişiklikler.....27
- Şekil 3. Apoptozisin intrinsik ve ekstrinsik yolları. FAS trimer .....32
- Şekil 4. Apoptozisin hücre organellerine göre bölümlere ayrılışı.....33
- Şekil 5. Apoptozisin organellerde gerçekleşen süreçlere göre belirlenme yöntemleri.....34
- Şekil 6. Normal akciğerlerde ve KOAH'lıların akciğerinde apoptotik hücrelerin tanınması.....47
- Şekil 7. KOAH'da siyah epitel hücrelerinde apoptozise cevap olarak oluşan değişiklikler.....47
- Şekil 8. Sigara içen KOAH'lı hastanın bronş duvarında Hematoksilen eozin ile epitelde Grade 2, subepitelyal inflamatuvar hücrelerde Grade 3 boyanma paterni (H.E.x400).....55
- Şekil 9. Sigara içen sağlıklı bireyin bronş duvarında subepitelyal lenfositlerde, nötrofillerde ve makrofajlarda Fas ile Grade 3 boyanma paterni (İmmünohistokimiyax400). Kırmızı ok: lenfosit, kalın siyah ok: nötrofil, ince siyah ok: makrofaj.....55
- Şekil 10. Sigara bırakmış KOAH'lı hastanın bronş duvarında epitelde ve subepitelyal tüm inflamatuvar hücrelerde Fas ile Grade 3 boyanma paterni (İmmünohistokimiyax200)...56
- Şekil 11. Sigara bırakmış sağlıklı bireyin bronş duvarında Fas ile lenfositlerde Grade 2, nötrofillerde Grade 3 boyanma paterni (İmmünohistokimiyax400). Kalın kırmızı oklar: Fas pozitif lenfosit, kesikli kırmızı oklar: Fas negatif lenfosit, kalın siyah oklar: nötrofil.....56
- Şekil 12. Sigara içen sağlıklı bireyin bronş duvarında epitelde, subepitelyal lenfositlerde, nötrofillerde ve makrofajlarda kaspaz 3 ile Grade 3 boyanma paterni (İmmünohistokimiyax 400). Siyah ince ok: epitel, siyah kalın ok:makrofaj, kırmızı kalın ok: lenfosit, kırmızı ince ok: nötrofil.....57
- Şekil 13. Sigara içen KOAH'lı hastanın bronş duvarında kaspaz 3 ile lenfositlerde Grade 1, nötrofillerde Grade 2 boyanma paterni (İmmünohistokimiyax400). Kırmızı ok: kaspaz 3 pozitif nötrofil, kesiksiz siyah oklar: kaspaz 3 pozitif lenfosit, kesikli siyah oklar: kaspaz 3 negatif lenfosit.....57
- Şekil 14. Sigara içen sağlıklı bireyin bronş duvarında epitelde, subepitelyal lenfositlerde, nötrofillerde ve makrofajlarda Bax ile Grade 3 boyanma paterni (İmmünohistokimiyax400). Siyah ince ok: epitel, siyah kalın ok:lenfosit, kırmızı kalın ok: nötrofil, kırmızı ince ok: makrofaj.....58
- Şekil 15. Sigara içmeyi bırakmış sağlıklı bireyin bronş duvarında Bax ile epitelde Grade 3, lenfositlerde Grade 2,, nötrofillerde Grade 3, ve makrofajlarda Grade 3 boyanma paterni (İmmünohistokimiyax400). Siyah ince ok: nötrofil, siyah kalın ok:makrofaj, kesiksiz kırmızı ok: Bax pozitif lenfosit, kesikli kırmızı ok: Bax negatif lenfosit.....58
- Şekil 16. Sigara içme yoğunluğu (paket/yıl) ile lenfositlerin Kaspaz 3 ile boyanma derecesi arasındaki korelasyon.....74
- Şekil 17. Sigara içme yoğunluğu (paket/yıl) ile nötrofillerin Kaspaz 3 ile boyanma derecesi arasındaki korelasyon.....75
- Şekil 18. FEV1 yüzdesi ile lenfositlerin Kaspaz 3 ile boyanma derecesi arasındaki korelasyon ....76
- Şekil 19. FEV1 yüzdesi ile nötrofillerin Kaspaz 3 ile boyanma derecesi arasındaki korelasyon....77

## KISALTMALAR

<b>AIF (Apoptosis- inducing factor)</b>	: Apoptozisi tetikleyen faktör
<b>Apaf-1 (Apoptosis activating factor-1)</b>	: Apoptozisi aktive eden faktör-1
<b>APO-1 = Fas (Apoptosis- inducing reseptör-1)</b>	: Apoptozisi tetikleyen reseptör-1
<b>Bad (Bcl-2 antagonist of cell death)</b>	: Bcl-2 hücre ölüm antagonisti
<b>Bak (Bcl-2 antagonist/Killer)</b>	: Bcl-2 antagonist/katil
<b>Bax (Bcl-2 associated X protein)</b>	: Bcl-2 ilişkili X protein
<b>Bcl-2 (B cell lymphoma-2)</b>	: B hücreli lenfoma
<b>Bid (Bcl-2 interercting domain)</b>	: Bcl-2 etkileşim bölgesi
<b>Bim (Bcl-2 intercrting mediator of cell death)</b>	: Bcl-2 hücre ölümünün etkileşim mediatörü
<b>CARD (Caspase recruitment domain)</b>	: Kaspaz toplama bölgesi
<b>Caspase (Cysteinylnl aspartate-spesifik protease)</b>	: Aspartat spesifik sistein proteinaz
<b>DED (Death effector domain)</b>	: Efektör ölüm bölgesi
<b>DIABLO (Direct IAP binding protein with low pI)</b>	: Düşük pI ile direk olarak IAP bağlayan protein
<b>DISC (Death inducing signaling kompleks)</b>	: Ölüme sebep olan sinyal kompleksi
<b>FADD (Fass assosiated death domain)</b>	: Fas ilişkili ölüm bölgesi
<b>IAP (Inhibitor of apoptosis)</b>	: Apoptozis inhibitörü
<b>NF-<math>\kappa</math><math>\beta</math> (Nucleer factor kappa <math>\beta</math>)</b>	: Nükleer faktör kappa $\beta$
<b>NOXA (Name for damage)</b>	: Hasarın ismi
<b>SMAC/D (SMAC/DIABLO): second mitochondrial-derived activator)</b>	: Mitokondriden türetilen ikinci aktivatör
<b>PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase)</b>	: Poli (ADP-riboz) polimeraz
<b>PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis)</b>	: p53'ün ekspresyonunu arttırdığı apoptozis düzenleyicisi
<b>TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase)</b>	: Terminal deoksinükleotid transferaz
<b>TRADD (Tumor assosiated death domain)</b>	: Tümör ilişkili ölüm bölgesi
<b>TRAIL (Tumor necrosis factor- related apoptosis inducing ligand)</b>	: Tümör nekrozis faktör ile ilişkili apoptozise sebep olan ligand
<b>TUNEL (TdT- mediated dUTP-biotin nick end-labeling)</b>	: TdT aracılığıyla dUTP-biotin çentiğinin etiketlenmesi
<b>XIAP (X-linked IAP)</b>	: X-bağlanmış IAP

## ÖZET

### **Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı'nda Hava Yolu Epitel Hücreleri, Lenfosit, Nötrofil ve Makrofaj Apoptozisi**

**Amaç:** Son yıllarda Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH) patogenezinde apoptozisin rolü konusundaki yayınlar giderek artmaktadır. Fakat, elde edilen bilgiler çelişkili ve henüz yeterli düzeyde değildir. Bu çalışmada; Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı'nda havayolu epitel hücreleri ve subepitelyal inflamatuvar hücrelerde (lenfosit, nötrofil ve makrofaj) apoptozis varlığını araştırmak amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamızda, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalında 2007 Mart ile 2007 Haziran ayları arasında bronkoskopi yapılan 31 Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı'na sahip hastaların ve 44 sağlıklı bireyin bronşiyal biyopsi örnekleri incelenmiştir. Tüm bireylerin bronşiyal biyopsi örneklerinde apoptoz varlığı, biyopsi örneklerinin immünohistokimyasal olarak anti-Fas, anti-Bax ve anti-kaspaz 3 antikorları ile boyanma dereceleri değerlendirilerek araştırılmıştır.

**Bulgular:** Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı'na sahip hastalar ile sağlıklı bireyler arasında bronş epitel hücreleri ve inflamatuvar hücrelerin (lenfosit, nötrofil ve makrofaj) apoptozis yoğunluğu yönünden anlamlı fark saptanmamıştır. Buna ek olarak sigaranın bırakılmasının hem sağlıklı bireylerde hem de Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı'na sahip hastalarda apoptotik süreci etkilemediği ve benzer sigara içme özelliğine sahip sağlıklı bireyler ve Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı'na sahip hastalar arasında apoptotik epitel hücreleri ve inflamatuvar hücreler yönünden anlamlı farklılık bulunmadığı görülmüştür.

**Sonuç:** Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, büyük hava yolu düzeyinde elde edilen mukoza biyopsi örneklerinin akciğer parankimi ve küçük hava yolundaki apoptotik süreci yansıtmada yetersiz kalabileceğini ve konunun daha geniş gruplarda incelenmesi gerektiğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Bronkoskopik biyopsi, bronş epitel hücre apoptozisi, inflamatuvar hücre apoptozisi, KOAH

## ABSTRACT

### **Airway Epithelium, Lymphocyte, Neutrophil and Macrophage Apoptosis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease**

**Background:** In recent years, increasingly, many studies have been published about the role of apoptosis in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), the obtained data are still controversial and debating. In this study, the presence of apoptosis was aimed to evaluate at airway epithelial cells and subepithelial inflammatory cells (lymphocyte, neutrophil, and macrophage) in COPD.

**Method:** In this study, between March and June 2007, the bronchial biopsy specimens of 31 COPD patients and 44 healthy subjects, obtained by flexible bronchoscopy, at Çukurova University, School of Medicine, Department of Chest Diseases were evaluated in order to determine the presence of apoptosis in the airway epithelial cells and subepithelial inflammatory cells (lymphocyte, neutrophils and macrophages). The presence of apoptosis in the biopsy specimens of the subjects were demonstrated by evaluating the degree of staining immunohistochemically with anti-Fas, anti-Bax ve anti-caspase 3 antibodies.

**Results:** No statistical difference was found between patients with COPD and healthy subjects, when the intensity of the apoptosis of the airway epithelial cells and subepithelial inflammatory cells (lymphocyte, neutrophils and macrophages) was evaluated. In addition, by quitting smoking, the apoptotic cascade was not affected, and no significant difference was found in the manner of the apoptotic epithelial and inflammatory cells according to the current smoking status both in patients with COPD and healthy subjects.

**Conclusion:** We think that mucosal biopsy samples obtained from larger airways might not reflect the apoptotic process at small airways and lung parenchyma, and more studies with larger groups are needed for determining the apoptotic process in COPD.

**Key words:** bronchoscopic biopsy, bronchial epithelial cell apoptosis, inflammatory cell apoptosis, COPD

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

KOAH, tam olarak geri dönüşlü olmayan ilerleyici hava akımı kısıtlaması ve akciğerlerin zararlı partikül veya gazlara anormal inflamatuvar yanıtı ile karakterize bir klinik durumdur. Son yıllarda hastalığın prevalansı, morbidite ve mortalitesi giderek artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre günümüzde KOAH dünyada 4. ölüm nedeni haline gelmiştir. Hastalık gelişiminden büyük oranda sigara içimi sorumludur<sup>1</sup>. KOAH, yaygın bir halk sağlığı sorunu olmasına karşın hekimler ve bilim çevrelerince ihmal edilmektedir. Hastalığın moleküler, sitolojik ve genetik özellikleri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Günümüzde KOAH patogenezinin kronik inflamasyon, proteinaz/antiproteinaz dengesizliği ve oksidatif stres sorumlu tutulmaktadır. KOAH'ın gelişimi sırasında bu süreçler arasında etkileşim olmaktadır. Ancak, patogenezin sorumlu tutulan bu mekanizmalar ile hastalığın kronik niteliği hala tam olarak anlaşılammıştır. Son yıllarda apoptozisin KOAH patogenezinde rol oynadığına ilişkin kanıtlar giderek artmaktadır.

KOAH'da gözlenen parankimal hücre ölümünün (apoptozis), apoptotik hücrelerin yeterince temizlenememesinin yol açtığı sekonder sitolizin ve hücre onarım ve yenilenmenin bozulmasının KOAH'a özgü akciğer dokusunda harabiyet (amfizem) ve küçük hava yollarının yapı ve fonksiyonlarında bozulmaya yol açtığı ileri sürülmektedir<sup>2</sup>.

Yapılan çalışmalarda, KOAH'da hava yolu epitel hücrelerinde, alveoler epitel ve endotel hücrelerinde apoptozisin arttığı gösterilmiştir<sup>3</sup>. Materyal olarak KOAH'lı hastaların BAL, bronş fırçalama ve dolaşımdaki kan örneklerinin kullanıldığı çalışmalarda akciğer ve hava yolu T hücrelerinde de apoptozis artışı gösterilmiştir<sup>4,5,6,7</sup>. Nötrofillerin hava yolundaki yaşam süreleri ve apoptozisi konusundaki bilgiler oldukça yetersizdir. KOAH alevlenme dönemlerinde ise nötrofil apoptozisinin belirgin olarak azaldığı ve nötrofil sayısında belirgin artış olduğu gösterilmiştir.<sup>8,9,10</sup>. Buna karşın stabil KOAH'lı hastalarla yapılmış tek bir çalışmada, nötrofil apoptozisinde değişiklik olmadığı gösterilmiştir<sup>11</sup>. KOAH'lı hastaların hava yolu makrofaj apoptozisi konusunda yayınlanmış bir çalışma bulunamamıştır.

KOAH'lı hastalarda havayolu duvarında n6trofil, makrofaj ve lenfosit sayılarında artış g6sterilmiş olmasına rağmen bu artışı açıklayacak mekanizmalar hen6z kesin olarak bilinmemektedir. Aynı zamanda hava yolu inflamatuvar h6crelerinin apoptozisi ile ilgili bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu konuda sağlanacak bilgi birikimi KOAH patogenezi daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır.

Bu çalışmada, halen sigara içmekte olan ve sigarayı bırakmış olan KOAH'lı hastalar ve sağlıklı yetişkinlerden elde edilen bronşiyal biyopsi 6rneklerinde Fas, Bax ve kaspaz 3 antikorları kullanılarak havayolu epitel h6creleri ve subepitelyal inflamatuvar h6crelerdeki (lenfosit, n6trofil ve makrofaj) apoptozis seviyesini değerlendirmek amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı

#### 2.1.1. Tanım

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH), önlenebilir ve tedavi edilebilir bir hastalıktır ve akciğer dışı organlardaki bazı önemli etkileri hastalığın daha ağır seyretmesine katkıda bulunabilir. Hastalığın akciğerdeki etkisi hava akımı kısıtlılığıyla karakterizedir ve tam olarak geri dönüşümlü değildir. Hava akımı kısıtlılığı genellikle ilerleyicidir ve akciğerlerin zararlı partikül ya da gazlara anormal inflamatuvar yanıtıyla ilişkilidir<sup>1</sup>.

KOAH'ın karakteristiği olan hava akımı kısıtlaması, katkısı göreceli olarak kişiden kişiye değişen küçük havayolu hastalığı (obstrüktif bronşiolit) ve parankimal harabiyet (amfizem) sonucu oluşur<sup>1</sup>.

#### 2.1.2. Epidemiyoloji

KOAH, endüstrileşmiş dünyada erişkinler arasında yaygın olarak görülen morbidite ve mortalite nedenlerinden biridir. KOAH ciddi sosyal ve ekonomik yük oluşturmakta ve prevalansı gelişmekte olan ülkelerde artmaktadır. KOAH klinik olarak belirgin hale gelinceye ve orta derecede ilerleyinceye kadar genellikle teşhis edilemediği için hastalığın yükü hakkındaki bilgilerimiz, hastalığın neden olduğu toplam yükün küçük bir kısmını temsil etmektedir<sup>12</sup>.

Hastalığın tanımlanması ve tanısı ülkeler arasında farklılık gösterdiği ve prevalans ile ilgili bilgiler çoğulukla gelişmiş ülkelere elde edilebildiği için KOAH prevalansının hesaplanması ve farklı ülkeler ile karşılaştırılması zordur. 1990-2004 yılları arasında yayınlanmış olan prevalans çalışmalarının meta-analizine göre KOAH prevalansı; tüm yaş grupları (15-95 yaş) arasında % 7,5, 40 yaş üstündeki erişkinlerde % 9-10, spirometri kullanılarak KOAH tanısı konulanlarda % 8,9 olarak

bulunmuştur<sup>12,13</sup>. Yine bu meta-analize göre KOAH prevalansı, sigara içenlerde içmeyenlere göre, 40 yaş üstünde olanlarda 40 yaşın altında olanlara göre ve erkeklerde kadınlara göre daha fazla bulunmuştur. Amerika'da 1988-1994 yılları arası yapılan Ulusal Sağlık ve Beslenme çalışmasında KOAH prevalansı sigara içenlerde; erkeklerde % 14,2, kadınlarda %13,6, sigara içmeyi bırakmışlarda; erkeklerde % 6,9, kadınlarda % 6,8, hiç sigara içmemişlerde; erkeklerde % 3,3, kadınlarda % 3,1 oranında bulunmuştur<sup>14</sup>. 2001 yılında Amerika'da 12,1 milyon yetişkine KOAH tanısı konulduğu rapor edilmiş olup, 24 milyon kişide akciğer fonksiyon bozukluğunun gösterilmiş olması, KOAH tanısı konulabilme oranının belirgin olarak düşük olduğunu düşündürmektedir<sup>15</sup>.

KOAH prevalansının, önümüzdeki dekadlarda özellikle sigara gibi risk faktörlerine maruziyetin devam etmesi ve dünya popülasyonunun yaşlanmasına bağlı olarak artması beklenmektedir<sup>1</sup>. KOAH, tüm dünyada her yıl 2,75 milyon insanın (1,41 milyon erkek, 1,34 milyon kadın) ölümüne neden olarak tüm ölümlerin %4,8'ini oluşturmaktadır. Günümüzde KOAH, mortalite nedenleri arasında dördüncü sıradadır<sup>12</sup>. 2020 yılında morbidite nedenleri arasında beşinci, mortalite nedenleri arasında ise üçüncü sırayı alması beklenmektedir<sup>15</sup>.

Türkiye'de 1976 yılında Etimesgut bölgesinde yapılan bir çalışmada, 40 yaş üstündeki KOAH prevalansının % 13,6 olduğu (erkeklerde % 20,1, kadınlarda % 8,2) bildirilmiştir<sup>16</sup>. 2000 yılında Sağlık Bakanlığı ve Dünya Sağlık Örgütü'nün birlikte yürüttüğü Ulusal Hastalık Yüğü ve Maliyet Etkililik Çalışmasında KOAH Türkiye'de 3. ölüm nedeni olarak bulunmuştur<sup>17</sup>. 2003-2004 yılları arasında Adana ilinde yapılan BOLD çalışmasında KOAH prevalansı 40 yaşın üstünde % 19,2 (erkeklerde % 29,3, kadınlarda % 9,9) olarak bulunmuştur<sup>18</sup>.

KOAH, tüm dünyada, sık hastaneye yatırılma nedenlerinden ve hastalık nedeniyle işe devamlılığın kesilmesinden dolayı, önemli bir ekonomik yük oluşturmaktadır<sup>14</sup>.

### 2.1.3. KOAH'da Risk Faktörleri

**Tablo 1. KOAH'da Risk Faktörleri**

Genetik faktörler
Partikül maruziyeti
<ul style="list-style-type: none"><li>• Sigara içimi</li><li>• Mesleki maruziyet (organik ve inorganik tozlar)</li><li>• Ev içi hava kirliliği (havalandırması az olan ortamlarda ısınma veya yemek pişirmek için biomas kullanımı)</li><li>• Açık havada hava kirliliği</li></ul>
Akciğer büyüme ve gelişimi
Oksidatif stres
Cinsiyet
Yaş
Solunumsal enfeksiyonlar
Sosyoekonomik durum
Beslenme
Eşlik eden hastalıklar

### 2.1.4. Patoloji

KOAH'da gözlenen patolojik değişiklikler akciğerin dört farklı bölümünde (büyük hava yolları, küçük havayolları, akciğer parankimi, akciğer damarları) gerçekleşmekte ve her hastada bu değişiklikler değişik boyutlarda izlenmektedir.

**Büyük hava yolları:** İç çapı 2mm'den büyük kıkırdak içeren hava yollarıdır. Bronş bezlerinde hipertrofi ve goblet hücre metaplazisi görülür. Bu değişiklikler aşırı mukus yapımına veya kronik bronşite neden olurlar. Bezlerde inflamatuvar hücre infiltrasyonu oluşur. Hava yolu duvarında squamöz metaplazi, siliya kaybı ve siliyer fonksiyon bozukluğu ile düz kas ve bağ dokusunda artma görülür. Hava yolunun farklı bölümlerinde farklı inflamatuvar hücreler daha baskın olarak bulunurlar. Hava yolu duvarında lenfositler, özellikle CD8 T-lenfositler ve makrofajlar baskın olarak bulunurlar. Hava yolu boşluklarında ise lenfositlere ek olarak nötrofiller ve makrofajlar görülür.

**Küçük hava yolları:** İç çapı 2 mm'den küçük kıkırdak içermeyen hava yollarıdır. Hastalığın erken dönemlerinde periferik hava yollarında bronşiyolit bulunur. Patolojik olarak goblet hücre ve squamöz hücre metaplazisi izlenir. Hava yolu duvarı ve hava yolu boşluklarındaki inflamatuvar hücreler büyük hava yollarındaki gibidir. Hastalık ilerledikçe hava yolu duvarında fibrozis ve kollagen birikimi gelişir.

**Akciğer parankimi:** Respiratuvar bronşiyol, alveol ve kapillerden oluşur. KOAH'lı hastaların akciğer parankiminde amfizem gelişir. Amfizeme ikincil olarak da alveoler tutamalarda ciddi kayıp oluşur ve bu durum hava yolu kollapsına katkıda bulunur. Asinüs içindeki dağılıma göre sentrilobüler ve panlobüler amfizem olmak üzere iki tip amfizem gelişir. Sentrilobüler amfizem, respiratuvar bronşiyollerin dilatasyonu ve destruksiyonu ile karakterizedir ve KOAH'da en yaygın görülen amfizem tipi olup, genellikle üst lobları tutar. Panlobüler amfizem, tüm asinusu tutar, daha çok alfa-1 antitripsin enzim eksikliği bulunan kişilerde gelişir ve daha çok alt loblarda yer alır. Alveol duvarlarında ve hava boşluklarında hava yollarındakine benzer inflamatuvar hücre profili görülür ve hastalığın tüm seyri boyunca varlığını sürdürür.

**Akciğer damarları:** Akciğer damarlarındaki değişiklikler hastalığın erken döneminde başlar. Başlangıçta bu değişiklikler damar duvarında kalınlaşma ve endotel disfonksiyonu ile karakterize iken, daha sonra bunları damar düz kas kitlesinde artma ve damar duvarının makrofaj ve CD8+ T hücreleri gibi inflamatuvar hücrelerle infiltrasyonu izler. Hastalığın ileri aşamalarında kollagen birikimi ve kapiller yatağın amfizematöz harabiyeti gelişir. Sonuçta bu yapısal değişiklikler, pulmoner hipertansiyon ve sağ kalp fonksiyon bozukluğuna (kor pulmonale) neden olur<sup>14</sup>.

### 2.1.5. Patofizyoloji

Günümüzde KOAH hastalığının altında yatan sürecin, KOAH'ın karakteristiği olan fizyolojik anormalliklere ve semptomlara nasıl yol açtığı daha iyi anlaşılmıştır<sup>1</sup>. KOAH'da farklı patogenetik mekanizmalar değişik patolojik değişikliklere yol açarak fizyolojik anormalliklerin ortaya çıkmasına neden olur<sup>14</sup>. Bunlar, hava akımı kısıtlanması ve hava hapsi, gaz değişim anormallikleri, mukus hipersekresyonu, pulmoner hipertansiyon ve sistemik etkilerdir<sup>1,14</sup>.

### **2.1.5.1. Hava Akımı Kısıtlanması ve Hava Hapsi**

Küçük havayollarındaki inflamasyon, fibrozis ve lümen içindeki eksuda, KOAH'ın karakteristiği olan FEV1 ve FEV1/FVC düşüşü ve muhtemelen FEV1'deki hızlı düşüş ile korelasyon gösterir. Amfizem, FEV1'deki düşüşten daha çok gaz değişim anormalliği ile ilişkilidir. Amfizem, alveoler tutamaların kaybına bağlı olarak ekspiryum sırasında oluşan hava hapsine katkıda bulunur. Periferik hava yolu obstrüksiyonu, ekspirasyon esnasında giderek artan miktarda hava hapsine, sonuç olarak hiperinflasyona neden olur. Hiperinflasyon, inspiratuar kapasiteyi azaltarak özellikle egzersiz esnasında fonksiyonel rezidüel kapasitenin artmasına (dinamik hiperinflasyon) ve sonuç olarak dispne ve egzersiz kapasitesinde kısıtlılığa neden olur. Günümüzde hiperinflasyonun hastalığın erken döneminde geliştiği ve egzersiz dispnesinin ana mekanizması olduğu düşünülmektedir<sup>1</sup>.

### **2.1.5.2. Gaz Değişim Anormallikleri**

KOAH'da birkaç mekanizma ile açıklanabilen gaz değişim anormalliği, hipoksemi ve hiperkapniye neden olur. Gaz transferi, hastalık ilerledikçe kötüleşir. Amfizemin şiddeti, arteriyel PO<sub>2</sub> ve ventilasyon-perfüzyon (V<sub>A</sub>/Q) dengesizliğinin belirteçleri ile korelasyon gösterir. Periferik hava yolu obstrüksiyonu, V<sub>A</sub>/Q dengesizliği ve ventilatuar kasların fonksiyonlarındaki bozukluk, ventilasyonun azalmasına ve böylece karbondioksit retansiyonuna neden olur.

### **2.1.5.3. Aşırı Mukus Yapımı**

Mukus hipersekresyonu, kronik bronşitin bir özelliğidir ve hava akımı kısıtlaması ile ilişkili olması zorunlu değildir. KOAH'lı hastaların hepsinde mukus hipersekresyonu yoktur. Mukus hipersekresyonu, sigara içimi ve diğer zararlı ajanların havayollarında neden oldukları kronik irritasyonuna cevap olarak oluşan submukozal bezlerin genişlemesi ve goblet hücre sayısındaki artış ile beraber müköz metaplaziye bağlı oluşur.

#### 2.1.5.4. Pulmoner Hipertansiyon

KOAH'ın seyri esnasında, küçük pulmoner arterlerin hipoksik vazokonstriksiyonu sonucu, hafif-orta derecede pulmoner hipertansiyon gelişebilir. Zaman içinde intimal hiperplazi ve daha sonra intimal hipertrofi/hiperplazi gibi yapısal değişiklikler oluşur. Amfizemde görülen pulmoner vasküler yatak kaybı, pulmoner sirkülasyondaki basınç artışına katkıda bulunabilir. İlerleyen pulmoner hipertansiyon, sağ ventrikül hipertrofisine ve sonunda sağ kalp yetmezliğine (Kor pulmonale) yol açabilir.

#### 2.1.5.5. Sistemik Etkiler

KOAH'da kaşeksi, osteoporoz, depresyon ve kronik anemiye yatkınlıkları artmıştır. Kaşeksi, kasların kullanılmamasına ve/veya artmış apoptozis sonucu oluşan iskelet kas kitlesi kaybına ikincil oluşabilir. Diğer sistemik etkilere, TNF- $\alpha$ , IL-6 ve serbest oksijen radikalleri gibi inflamatuvar mediatörlerin konsantrasyonundaki artış aracılık edebilir. C-reaktif protein artışı ile ilişkili olarak kardiyovasküler hastalık riski artmıştır<sup>1</sup>.

#### 2.1.5.6. Klinik

**Hikaye:** Kırk yaş üstünde nefes darlığı, kronik öksürük, balgam çıkarma ve/veya hastalık gelişimi için risk faktörlerine maruziyet öyküsü bulunan hastalarda KOAH tanısı düşünülmeli ve spirometre ile doğrulanmalıdır.

Hasta, öksürük, balgam çıkarma, nefes darlığı, hırıltılı solunum veya göğüste sıkışma hissi semptomlarından herhangi biri ile ilk kez başvurabilir. Öksürük sıklıkla ilk semptomdur. Başlangıçta arasıra olurken, daha sonra hergün ve gün boyu devam eder. Hastalar, öksürük nöbetinden sonra küçük miktarda ve yapışkan balgam çıkarırlar.

Balgam, başlangıçta sadece sabahları çıkarılırken daha sonra gün boyunca çıkarılır. Kronik balgam çıkarma, hızlanmış pulmoner fonksiyon kaybı ile ilişkili değildir. Nefes darlığı, başlangıçta eforla oluşur (merdiven çıkarken, yokuşta yürürken),

akciğer fonksiyonları daha da bozulunca, yaşlıları ile aynı hızda yürüyemezler veya bir aktiviteyi (pazar çantasını taşımak) gerçekleştirebilmek için aksesuar solunum kaslarını kullanmak zorunda kalırlar ve sonunda günlük aktiviteleri (giyinmek, yıkanmak) esnasında veya dinlenirken nefes darlığı oluşur. Sigara içimine eşlik eden herhangi bir semptom varlığı, pulmoner fonksiyonlarda erken ve hızlı bir düşüşe neden olur.<sup>1,12,14</sup>

**Fizik muayene:** KOAH'da fizik muayene nadiren tanısaldır. Hava akımı kısıtlanmasının fizik muayene bulguları, akciğer fonksiyonlarında önemli derecede bozukluk oluştuktan sonra ortaya çıkar. İncelemede; dakikada 20'den daha fazla ve yüzeysel solunum, büyük dudak solunumu, skalen ve sternokleidomastoid kas kullanımı, santral sianoz, mukozal membranlarda mavimsi renk değişikliği, pulmoner hiperinflasyonun göstergeleri olan horizontal kostalar, fıçı göğüs, inspirasyonda alt kostaların paradoksik hareketi gözlemlenebilir. Palpasyon ve perküsyonda; pulmoner hiperinflasyona bağlı olarak kalp tepe atımının sağa, karaciğerin aşağıya doğru yer değiştirmesi ve diyafragma hareketlerinde azalma tesbit edilebilir. Oskültasyonda ronküs, ral ve solunum seslerinde azalma duyulabilir. Sistemik muayenede, boyun venlerinde dolgunluk, karaciğerde büyüme, periferik ödem, kas kitlesinde azalma ve periferik kas güçsüzlüğü saptanabilir.<sup>1,14</sup>.

### 2.1.5.7. Tanı

**Spirometri:** KOAH düşünülen hastaların tanıları spirometre ile doğrulanmalıdır. KOAH tanısının doğrulanmasında ve hastalığın takibinde spirometre altın standarttır. Hava akımı kısıtlaması, bronkodilatör testi sonrası  $FEV_1/FVC < 0.70$  olması olarak tanımlanır. KOAH'ın şiddeti postbronkodilatör (pb) % FEV1 düzeyine göre sınıflandırılır (Tablo 2). Bronkodilatör reversibilite testi, en azından bir kez astımı dışlamak ve hastanın en iyi akciğer fonksiyon düzeyini belirlemek açısından tüm hastalara yapılmalıdır.<sup>1,14</sup>.

**Tablo 2. Spirometrik Sınıflandırma**

Şiddeti	Bronkodilatör sonrası FEV <sub>1</sub> /FVC	Beklenene göre FEV <sub>1</sub> (%)
Evre 1: Hafif	≤ 0.70	≥ 80
Evre 2: Orta	≤ 0.70	50-80
Evre 3 :Ağır	≤ 0.70	30-50
Evre 4: Çok ağır	≤ 0.70	< 30 veya <50 olup kronik solunum yetmezliği olanlar

**Akciğer Grafisi:** Nadiren tanı koydurucudur. Diğer tanıların dışlanması ve kalp yetmezliği gibi eşlik eden hastalıkların gösterilmesi açısından değer taşır. KOAH'daki radyolojik değişiklikler; hiperinflasyon bulguları (lateral grafide diafragma düzleşme ve retrosternal hava volümünde artış), akciğerlerin radyolüsensinde artış ve damarsal görünümün aniden incilmesi veya kaybolmasını içerir.

**Arteriyal kan gazı ölçümü:** Bu test, FEV<sub>1</sub><%50 (beklenenin) olduğunda, solunum veya kalp yetmezliği klinik bulgularının varlığında yapılmalıdır.

Seçilmiş bazı KOAH'lı hastalara, alfa-1 anti-tripsin düzeyi, statik akciğer volümleri, CO difüzyon testi, egzersiz testi, solunum kas fonksiyonu, polisomnografi, bilgisayarlı tomografi, pulmoner damar basıncı ölçümü gibi testler önerilmektedir.

### 2.1.5.8. Tedavi

KOAH'da tedavinin hedefleri; hastalığın ilerlemesini önlemek, semptomları iyileştirmek, egzersiz toleransının arttırmak, yaşam kalitesini arttırmak, komplikasyonlarını önlemek ve tedavi etmek, mortaliteyi azaltmaktır.

Tedavi programı

1. Risk faktörlerinin azaltılması
2. Stabil KOAH'ın tedavisi
3. Alevlenmelerin tedavisi

**1. Risk faktörlerinin azaltılması:** Sigara içiminin bırakılması, mesleki maruziyetin kontrolü, eviçi ve dış ortam hava kirliliğinin önlenmesini kapsar. Akciğer fonksiyonlarındaki azalmanın engellenmesinde tek etkili girişim sigara içiminin bırakılmasıdır.

**2. Stabil KOAH'ın tedavisi:** Stabil KOAH tedavisi, Tablo 3'de özetlenmiştir.

**Hasta eğitimi:** KOAH'lı hastalara uygun bir eğitim programı; sigaranın bırakılması, hastaların KOAH hakkında bilgilendirilmesi, inhaler ve diğer tedavilerin nasıl kullanılacağına öğretilmesi, atakların tanınması ve tedavisi, nefes darlığının minimize edilme stratejilerinin öğretilmesi, komplikasyonlar hakkında bilgilendirme, oksijen tedavisi konusunda bilgilendirme ve hayatın sonlandırılması konusunun tartışılmasını içerir.

**Farmakolojik tedavi:** Semptomları önlemek ve kontrol etmek, atak sıklığı ve şiddetini azaltmak, hastalık durumunu iyileştirmek ve egzersiz toleransını arttırmak için kullanılır. Var olan hiçbir ilaç tedavisi, akciğer fonksiyonlarındaki azalma üzerine uzun süreli olarak etkili değildir. **Bronkodilatörler**, havayolu düz kas tonusunu değiştirerek FEV<sub>1</sub>'de artışa ve ekspiratuar akımda iyileşmeye neden olurlar. Bu iyileşme; hava yollarının genişlemesine bağlı oluşur ve akciğerin elastik recoilinde oluşan herhangi bir değişiklikle ilişkili değildir. Bu ilaçlar, akciğerlerin ekspiryum sırasında boşalmasını sağlayarak dinlenme ve egzersiz esnasındaki dinamik hiperinflasyonu azaltırlar. Böylece egzersiz kapasitesini arttırırlar. Bronkodilatör ilaçlar;  $\beta_2$ -agonistler, antikolinergikler ve metilksantinleri içerir. İnhaler ve oral **glikokortikosteroidlerin** KOAH'daki etkileri astımda olduğu kadar iyi değildir ve stabil KOAH'da kullanımları spesifik endikasyonlar ile sınırlıdır. Oral glikokortikosteroidlerin faydaları konusundaki kanıtların yetersizliği ve yan etkileri konusundaki kanıtlardan dolayı KOAH'da uzun süre kullanımları önerilmemektedir. İnhaler glikokortikosteroid tedavisinin düzenli kullanımı, uzun vadede FEV<sub>1</sub>'deki düşüş üzerine etkili değildir. İnhaler steroidlerin düzenli kullanımı, semptomatik olan, aynı zamanda FEV<sub>1</sub><%50 (beklenenin) ve tekrarlayan atakları olan KOAH hastalarına önerilmektedir. Bu tedavinin, atak sıklığını azalttığı ve sağlık durumunu iyileştirdiği gösterilmiştir. Diğer farmakolojik tedaviler; **aşular, Alfa-1 antitripsin güçlendirici tedavi, antibiyotikler, mukolitik ajanlar, antioksidan ajanlar, immünomodülatörler, antitusifler, vazodilatörler ve narkotikleri kapsar**<sup>1,14</sup>.

## Farmakolojik Olmayan Tedaviler

Rehabilitasyon, oksijen tedavisi, ventilatuar destek ve cerrahi tedavilerdir.

**Tablo 3. Stabil KOAH Tedavisi (GOLD 2006)**

Evre1: Hafif	Evre 2: Orta	Evre 3: Ağır	Evre 4: Çok ağır
$FEV_1/FVC < 0.70$ $FEV_1 \geq \%80$ (beklenenin)	$FEV_1/FVC < 0.70$ $\%50 \leq FEV_1 < \%80$ (beklenenin)	$FEV_1/FVC < 0.70$ $\%30 \leq FEV_1 < \%50$ (beklenenin)	$FEV_1/FVC < 0.70$ $FEV_1 < \%30$ (beklenenin) veya $FEV_1 < \%50$ (beklenenin) ve kronik solunum yetmezliğinin varlığı
Risk faktör/faktörlerinin azaltılması; influenza aşısı $\longrightarrow$			
İhtiyaç durumunda kısa etkili bronkodilatör eklenmesi $\longrightarrow$			
Bir veya ihtiyaç halinde daha fazla uzun etkili bronkodilatörün düzenli olarak tedaviye eklenmesi; rehabilitasyonun eklenmesi			
Tekrarlayan ataklar varsa inhale glikokortikosteroidlerin eklenmesi			
Kronik solunum yetmezliği varlığında uzun süreli oksijen tedavisi ekle Cerrahi tedaviyi düşün			

**3. Alevlenme tedavisi:** KOAH'da atak, hastalığın doğal seyri esnasında hastanın var olan dispne, öksürük, ve/veya balgamında akut olarak gün içinde beklenenden daha fazla değişiklik olması ve bu değişikliğin hastanın düzenli olarak kullandığı tedaviyi değiştirmesini gerektirecek boyutta artması olarak tanımlanır. Atak, KOAH hastalarının en sık morbidite ve mortalite sebebidir<sup>30</sup>. Hastalığın şiddeti arttıkça, atak sıklığı da artar ve sağlık sistemi üzerine büyük yük getirirler<sup>31</sup>. Atağa sıklıkla trakeobronşiyal ağacın enfeksiyonu ve hava kirliliği neden olur. Ancak ağır atakların 1/3'ünün sebebi bulunamamaktadır. KOAH atağının tedavisinde, oksijen, inhale bronkodilatörler ve oral glikokortikosteroidler kullanılmaktadır. Nefes darlığı, balgam miktarı ve balgam pürülansında artış semptomlarından en az ikisinin bulunması, bakteriyel havayolu enfeksiyonunu düşündürür ve bu hastalar antibiyotik tedavisinden fayda görebilirler.

Atak esnasında noninvaziv mekanik ventilatör kullanımı; solunumsal asidozu düzeltir, endotrakeal entübasyon ihtiyacını azaltır, nefes darlığını, solunum hızını, arteriyel CO<sub>2</sub> basıncını (PaCO<sub>2</sub>), hastanede kalış süresini ve mortaliteyi azaltır<sup>1,14</sup>.

## **2.2. KOAH'da Patogenez**

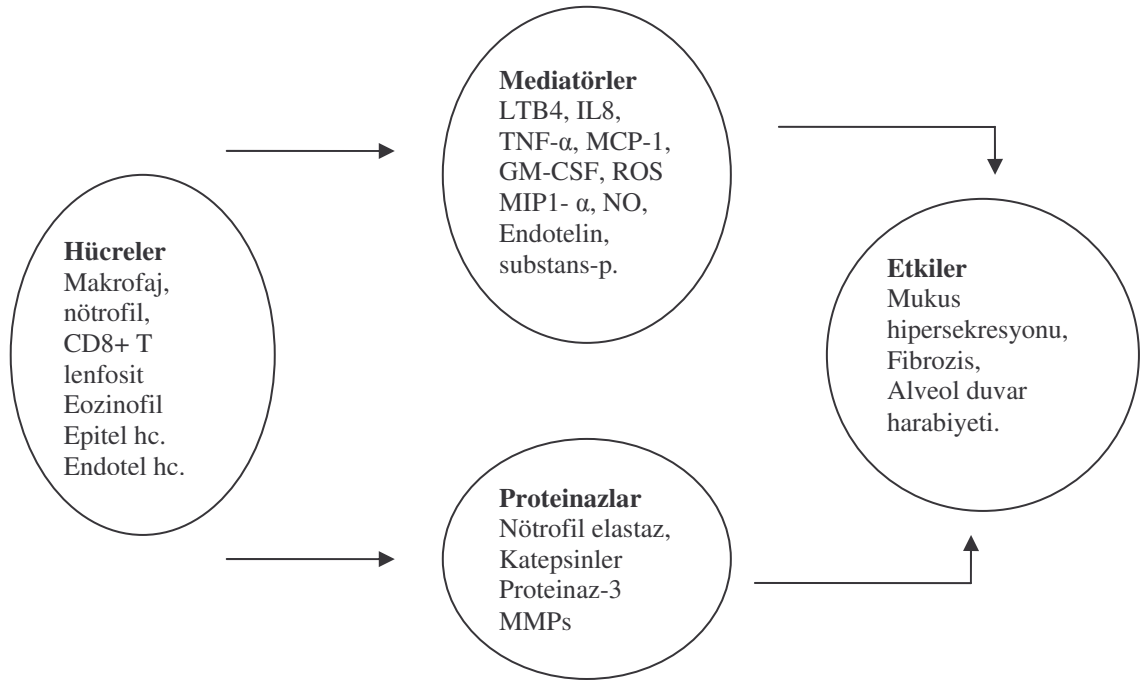
KOAH gelişimine yol açan başta sigara dumanı olmak üzere inhele edilen zararlı gaz ve partiküller akciğerlerde inflamasyona, savunma mekanizmalarına zarar vererek doku harabiyetinin tetiklenmesine ve onarım mekanizmalarında bozulmaya neden olur. Akciğerlerde oluşan doku hasarı sonucunda mukus hipersekresyonu, hava yolu daralması ve peribronşiyal fibrozis ile birlikte parankim harabiyeti ve damarsal değişiklikler ortaya çıkar<sup>19</sup>.

Hastalık gelişiminden birkaç patogenetik mekanizma sorumlu tutulmaktadır; akciğer ve havayollarında inflamatuvar hücre artışı, proteinaz/antiproteinaz dengesizliği ve oksidatif stres. Son zamanlarda önerilen dördüncü mekanizma; apoptozistir<sup>3</sup>.

### **2.2.1. KOAH'da İnflamasyon**

KOAH'ın karakteristik özelliği, inhale edilen zararlı gaz ve partiküllere karşı akciğerlerde oluşan kronik ve abartılı inflamatuvar cevaptır. Akciğerler için normalde koruyucu olan inflamatuvar yanıtın yoğun olarak gelişmesi, akciğer zararlanmasına neden olur<sup>20</sup>. Akciğer periferinde oluşan kronik inflamasyon; amfizem, küçük hava yollarında daralma ve yapısal değişikliklere neden olur. Hastalık ilerledikçe, küçük hava yolları ve akciğer parankiminde oluşan inflamatuvar cevap artmaktadır<sup>21</sup>.

KOAH'lı hastaların hava yolu ve akciğer parankiminde inflamatuvar hücreler ve inflamatuvar mediatörler artmıştır. İnflamatuvar mediatörler; inflamatuvar hücreler, akciğer ve hava yolu yapısal hücreleri tarafından üretilirler. KOAH patogenezinde sorumlu olduğu düşünülen hücreler ve mediatörler şematik olarak Şekil 1'de gösterilmiştir<sup>19</sup>.



**Şekil 1. KOAH patogeneğinde yer alan hücreler ve mediyatörler**

KOAH'da hava yolu ve akciğer parankiminde var olan inflamasyon; başlangıçta makrofaj ve T lenfosit, hastağın ilerlemesiyle B lenfosit ve nötrofil artışı ile karakterizedir. T lenfositlerden hem CD4+ T hücrelerinde hem de CD8+ T hücrelerinde artış vardır. Ancak CD8+ T lenfosit artışı daha fazladır. Sigara içen ancak KOAH gelişmeyen kişilerde de benzer inflamasyon izlenmektedir. Ancak KOAH 'lı hastalardaki inflamasyon daha fazladır ve inflamasyon atakları sırasında daha da artış gösterir.

KOAH'da görülen inflamasyon artışının moleküler temelleri henüz anlaşılabilir değildir ancak genetik nedenler sonucu oluşabileceği düşünülmektedir<sup>21</sup>. Sigara dumanı ve diğer zararlı gaz ve partiküller; hava yolunda bulunan makrofajları ve hava yolu epitel hücrelerini uyarabilirler ve bu uyarılmış hücreler dolaşımdaki lökositlerin akciğerlere çekilmelerini sağlayan kemokin ve lökotrien B4 (LTB4) gibi kemotaktik faktörlerin salınımına neden olabilirler. Kemotaktik faktörler arasında CXCL1 (growth related oncogene- $\alpha$ : GRO- $\alpha$ ), CXCL5 (ENA-78), CXCL8 (IL-8), CXCL9 (monokine induced by interferon- $\gamma$ ), CXCL10 (interferon- $\gamma$  inducible protein of 10 kDa), CXCL11 (interferon-inducible T-cell- $\alpha$  chemoattractant), CCL1, CCL2 (monocyte chemotactic protein-1: MCP-1), CCL5 gibi kemokinler daha ağırlıklı olarak bulunmaktadır ve bu

nedenle KOAH'daki kronik inflamasyonun yönetiminde kemokinlerin anahtar rol oynadıkları düşünülmektedir. Olasılıkla, tüm sigara içicilerde inflamatuvar olay başlamaktadır. Bununla beraber, sigara içip KOAH gelişenlerde bu inflamasyon ilerler ve T lenfositlerin, B lenfositlerin ve muhtemelen dentritik hücrelerin sitokinler ve diğer mediatörler ile etkileşime girmesiyle mevcut olan bu inflamasyon daha da karmaşıklaşır<sup>21</sup>.

### **2.2.1.1. İnflamatuvar Hücreler**

KOAH'lı hastaların küçük havayolları ve alveollerinde, makrofaj, T lenfosit, B lenfosit ve nötrofil artışı gösterilmiştir<sup>32,14,15</sup>. KOAH'lı hastalarda gözlenen bu inflamatuvar hücre artışı, sigara içimi bırakılsa bile zaman içinde artış gösterir ve hastalığın daha fazla şiddetlenmesine neden olur. Bu inflamatuvar hücre artışının sürekliliğinden sorumlu olan mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemektedir<sup>14,20,21</sup>.

#### **a. Nötrofiller**

KOAH'lı hastaların balgam ve bronkoalveoler lavajlarında (BAL) aktive nötrofil sayısında artış bulunmuştur<sup>22,23</sup>. Akciğer parankimi ve hava yolu duvarında nötrofil artışı daha azdır<sup>24</sup>. Bunun sebebi, bu hücrelerin akciğer parankimi ve hava yolu duvarından geçişlerinin hızlı olması olabilir<sup>25,26</sup>. Nötrofillerin KOAH patogenezindeki rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Dolaşımdaki nötrofil sayısı ile FEV1'deki düşüş arasında ilişki olduğu gösterilmiştir.<sup>27</sup> Bronşiyal biyopsi ve balgam örneklerindeki nötrofil sayısı ile KOAH şiddeti ve akciğer fonksiyonlarındaki azalma arasında korelasyon saptanmıştır<sup>28,29</sup>. Sigara içimi granülositlerin kemik ilginde sentez ve salınımı ve solunum yolundaki yaşam süreleri üzerine direk uyarıcı etkiye sahiptir. Aynı zamanda sigara içiminin nötrofillerin akciğerlere toplanmalarını arttırabileceği de düşünülmektedir<sup>30</sup>. Nötrofiller, hava yolu endotel hücreleri tarafından salınımı artmış olan E-selektin ile hava yoluna ve parankim endoteline yapışırlar<sup>31</sup>. Yapışmış olan nötrofillerin solunum yoluna toplanmaları, LTB4, CXCL8, CXCL1 ve CXCL5 gibi kemokinler aracılığıyla gerçekleşir. Bu mediatörler KOAH'da artmıştır ve alveoler makrofaj, T hücreleri ve epitel hücreleri tarafından salınabilirler, ancak CXCL8'in ana kaynağı nötrofillerdir<sup>32,33,34</sup>.

Nötrofiller, nötrofil elastaz, katepsin G ve proteinaz-3 gibi serin proteinazlar, matriks metalloproteinaz (MMP)-8, MM-9 gibi matriks metalloproteinazlar ve oksidanlar salgılayarak doku zararlanmasına katkıda bulunurlar<sup>35</sup>. Serin proteinazlar, aynı zamanda epiteldeki submukozal bezlerden ve goblet hücrelerinden mukus sekresyonunu da uyarırlar.

KOAH atakta nötrofil sayısında belirgin artış olduğu gösterilmiştir.<sup>36,37</sup>.

### **b. Makrofajlar**

Makrofajlar, KOAH patogeneğinde önemli bir role sahiptir. KOAH'lı hastaların havayolları, akciğer parankimi, BAL ve balgamlarında makrofaj sayıları 5-10 kat artmıştır. Makrofajlar, amfizemli hastalarda duvar harabiyetinin olduğu alanlarda yerleşmişlerdir<sup>24,38,39</sup>. Parankim ve havayolu makrofaj sayısı ile amfizem ve KOAH şiddeti arasında korelasyon vardır<sup>24</sup>.

Sigara dumanı, makrofajları aktive ederek makrofajlar tarafından inflamatuvar mediatörlerin salınımına neden olur. Bu mediatörler; TNF- $\alpha$ , CXCL8 ve CCL2 (monosit kemotaktik protein-1) gibi CXC kemokinleri, LTB<sub>4</sub> ve reaktif oksijen radikalleridir. Alveoler makrofajlar aynı zamanda MMP2, MMP9, MMP12, katepsin K, L, S ve elastolitik enzimleri sekrete eder<sup>32-55,56</sup>. KOAH'da özellikle atak sırasında birçok inflamatuvar proteinin salınımı makrofajlar tarafından artırılır ve bu olay, makrofajlar tarafından aktive edilen transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa  $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) aracılığıyla gerçekleştirilir.

Sigara içenler ve KOAH'lı hastaların akciğerlerinde görülen makrofaj sayısındaki artış, monositlerin monosit kemotaktik kemokinlere cevap olarak dolaşımdan çekilmelerine bağlı olabilir. Bu kemokinler, CCL2 ve CXCL1' dir. KOAH'lı hastaların balgam ve BAL sıvılarında CCL2 ve CXCL1 artışı gösterilmiştir<sup>33-31,32</sup>. Ayrıca makrofajlar tarafından CXCL9, CXCL10, CXCL11 kemokinleri de salınır ve bu kemokinler, CD8+ Tc1 ve CD4+ Th1 lenfositler için kemotaktiktirler.

KOAH'lı hastaların akciğerlerindeki makrofaj sayısında gözlenen artış, makrofajların akciğerlerde çoğalmalarının artışına ve yaşam sürelerinin uzamasına bağlı da olabilir. Makrofajların yaşam süreleri ve aktivasyonlarındaki artış, muhtemelen T lenfositler aracılığıyla gerçekleşir<sup>21</sup>.

Aktive makrofajlar, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve kısa ömürlü lipid meditörleri aracılığıyla inflamasyonun ilerlemesinde ve organizmaların daha etkin olarak imha edilmesinde rol oynarlar. Aktive makrofajların bir başka fonksiyonu ise T lenfositlerin çoğalmalarını ve farklılaşmalarını uyarmaktır<sup>21</sup>.

### **c. T lenfositler**

KOAH'lı hastaların akciğer parankimi ile küçük ve büyük havayollarında, T lenfosit (CD8+ ve CD4+ T lenfosit) sayılarının arttığı gösterilmiştir. CD8+ T lenfosit artışı, CD4+ T hücre artışından daha fazladır<sup>21</sup>. KOAH'da CD4+ ve CD8+ T hücre oranları tersine çevrilmiştir. KOAH'da akciğerlerdeki baskın T hücreler Tc1 ve Th1 subtipleridir<sup>40,41</sup>. T hücre sayısı ile alveoler yıkım miktarı ve hava akımı kısıtlanmasının derecesi arasında korelasyon bulunmaktadır. Sağlıklı sigara içenlere göre sigara içen KOAH'lı hastalarda tüm inflamatuvar hücreler arasında sadece T-lenfositlerde, özellikle CD8 T lenfositlerde anlamlı farklılık tespit edilmiştir<sup>42,43</sup>.

KOAH'lı hastaların akciğer parankimi ve hava yollarında görülen CD8+ ve CD4+ T hücre artışının mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır<sup>44</sup>. Bununla beraber T hücrelerinin akciğere göç etmeleri; ancak aktive olan T hücreleri antijenik ürünün kaynağı olan organa göç edebileceği için başlangıç aktivasyonunu, daha sonra da adhezyon ve kemotaksisi gerektirir. KOAH'lı hastaların akciğerlerinde CD4+ ve CD8+ T hücreleri CXCR3 reseptör sunumunu arttırırlar ve bu reseptör CXCL9, CXCL10 ve CXCL11 kemokinleri tarafından aktive edilir. KOAH'luların bronşiyal epitel hücreleri tarafından T hücrelerin akciğerlere toplanmalarına katkıda bulunan CXCL10 kemokin salınımının arttığı gösterilmiştir<sup>40</sup>.

Yapılan bazı çalışmalarda, sigara içmeyen KOAH'lı hastaların dolaşımında CD8+ hücrelerde artış ve sigara içen KOAH'lı hastalarda ise Th1 tip CD4+ hücre artışı gösterilmiştir<sup>41,44</sup>. Bu durum, antijenler yoluyla kronik immün stimülasyon olabileceğini düşündürmektedir. Bu antijenleri, havayollarından bölgesel lenf nodlarına göç eden dentritik hücreler HLA class I ve class II aracılığıyla sunarlar. HLA class I aracılığıyla CD8+ ve HLA class II aracılığıyla da CD4+ hücreler aktive olur. Hava yolu enfeksiyonlarında tipik olarak CD8+ T hücreleri artar ve bu antijenik uyarıdan KOAH'lı hastaların alt solunum yollarında kronik olarak kolonize olan bakteriyel ve viral patojenler sorumlu olabilir<sup>45</sup>.

Sigaranın neden olduğu akciğer zararlanması, daha önceden proteinazlar aracılığı ile oluşan ve ortaya çıkması engellenmiş olan otoantijenlerin ortaya çıkmasını sağlayabilir veya sigara dumanının kendisi akciğerlerin interstisyel ve yapısal hücrelerinde zararlanma oluşturarak onların antijenik olmasını sağlayabilir<sup>46</sup>. CD4+ hücre artışının özellikle ağır KOAH'daki rolü bilinmemektedir. Ancak bu hücreler sitotoksik T hücre cevabının tetiklenmesi, CD8+ hafıza T hücrelerinin korunması ve CD8+ T hücrelerinin yaşamlarının güvence altına alınması için gereklidir<sup>47</sup>. Bu nedenle CD4+ hücrelerin varlığı, CD8+ hücre inflmasyonunun devamı ve bu hücrelerin fonksiyonlarının gerçekleşmesi için şarttır. Ayrıca CD4+ hücrelerinin immünolojik hafızaya sahip olmaları, sigara dumanı yokluğunda inflamatuvar olayın sürekliliğinden sorumlu olabilir.

CD8+ hücreler, perforinler, granzim B ve TNF - $\alpha$  salgılayarak alveoler epitel hücrelerinde sitoliz ve apoptozise neden olarak akciğerlerde büyük zararlanma oluşturma potansiyeline sahiptirler<sup>48,49</sup>. Amfizemde gözlenen alveoler hücre apoptozisi ile CD8+ hücreler arasında ilişki vardır<sup>42</sup>. Apoptotik hücreler güçlü antijen kaynağıdır ve dentritik hücrelere ulaşarak T hücre cevabının sürekliliğini sağlarlar. T hücrelerinin Tc1 tipi, inflamatuvar reaksiyonu arttıran TNF - $\alpha$  , lenfotoksin (TNF- $\beta$ ) ve IFN- $\gamma$  gibi sitokinleri de salgılar.

Aktive olan T hücreleri, akciğerlere göç ederler ve ürettikleri TNF - $\alpha$ , kemokinler, lökosit adhezyon molekülü için ligandlar, vazodilatör maddeler (VEGF, prostosiklin) ve koagülasyon faktörleri aracılığıyla zararlanan bölgeye lökositlerin toplanmasını sağlarlar. Th1 ve Tc1 T hücrelerinin ana fonksiyonlarından biri de IFN- $\gamma$  ve CD40 ligand sunumu ile makrofajları aktive etmektir.

#### **d. Eozinofiller**

KOAH'lı hastalarda eozinofillerin rolü belli değildir. Yapılan bazı çalışmalarda stabil KOAH'da havayolu ve BAL sıvısında eozinofil sayısında artış gösterilmişken, bazı çalışmalarda gösterilmemiştir<sup>50</sup>. KOAH'lı hastalarda eozinofil varlığı, KOAH'ın astımla birlikteliğini gösterebilir. Stabil KOAH'lı hastaların balgam örneklerinde, artmış sayıda eozinofil gösterilemese de eozinofil katyonik protein ve eozinofil peroksidaz düzeylerinde artış olduğu saptanmıştır. Bu durum degranüle eozinofillerin

ışık mikroskopisinde görülmemeleri ile açıklanmıştır<sup>51</sup>. Degranülasyondan, nötrofil elastazın sorumlu olduğu düşünülmektedir<sup>52</sup>.

#### **e. Epitelyal hücreler**

KOAH'da alveoler ve havayolu epitel hücreleri, sigara dumanına karşı oluşan doğal immün yanıtın başlaması ve sürdürülmesinden sorumludur ve birçok inflamatuvar mediatör ve proteinazın önemli kaynağıdır. Sigara dumanı ile aktive olan epitel hücrelerinden TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), ve CXCL8 gibi inflamatuvar mediatörler salgılanır<sup>53,54,55</sup>. Küçük havayolu epitel hücrelerinin, lokal fibrozise neden olan transforming growth faktör-  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) için önemli bir kaynak olabileceği düşünülmektedir<sup>56</sup>. Epitel hücreleri havayolu savunmasında önemlidir. Goblet hücreleri tarafından salgılanan mukus, bakteri ve inhale edilen partikülleri hapsederek, konak savunmasında görev alır. Epitel hücreleri defansin ve antimikrobyal etkisi olan katyonik peptitler salgılayarak doğal immunitede<sup>57</sup>, antioksidanlar, antiproteinazlar ve transport immunglobulin- $\alpha$  salgılayarak kazanılmış immünitede rol alabilirler<sup>20</sup>. Sigara içimi epitel hücrelerinin doğal ve kazanılmış immün cevaplarını bozabilir ve enfeksiyon artışına neden olabilir<sup>20</sup>.

#### **f. Dentritik hücreler**

Hava yolları ve akciğerler yaygın bir dendritik hücre ağına sahiptir ve bu ağ yüzeye yakın yerlerde olup inhale edilen yabancı maddelere karşı sinyal görevini görmektedir. Dendritik hücrelerin doğal ve kazanılmış immün yanıtın başlamasında temel rol oynadığı düşünülmektedir<sup>21</sup>. Bu hücreler T lenfositler, B lenfositler, nötrofiller ve makrofajlar gibi inflamatuvar ve immün hücreleri aktive edebilirler. Sigara dumanı ve diğer zararlı gazlara karşı akciğerlerde oluşan cevapta bu hücrelerin önemli rolleri vardır. Sigara dumanının hangi mekanizma ile immün sistemi uyardığı anlaşılamamıştır. Sigara içiciliği ile alt solunum yollarındaki dentritik hücre artışı arasında ilişki olduğu<sup>58</sup> ve sigara içicilerin alveoler duvar ve hava yollarında matür olan dentritik hücre sayısında artış olduğu gösterilmiştir<sup>59</sup>.

### 2.2.2. Proteinaz/Antiproteinaz Dengesizliği

Proteinaz-antiproteinaz hipotezine göre KOAH'da konnektif doku komponentlerini yıkan proteinazlar ile bunlara karşı koruyucu olan antiproteinazlar arasında dengesizlik mevcuttur. Sigara dumanı ve muhtemelen diğer risk faktörleri epitel hücreleri, makrofaj ve nötrofil gibi inflamatuvar hücrelerden serin proteinaz salgılanmasına yol açar. Buna ek olarak birçok antiproteinazın oksidasyon yoluyla azalması veya inaktivasyonuna neden olur.

KOAH patogenezinde katılan major proteinazlar; serin proteinazlar (nötrofil elastaz, katepsin G ve protienaz-3), sistein proteinazlar (katepsin B,K,L,ve S) ve matriks metalloproteinazlardır (MMP8, MM9, MM12). KOAH patogenezinde rol oynayan major antiproteinazlar ise,  $\alpha$ 1-antitripsin ( $\alpha$ 1-AT), sekretuar lkoproteinaz inhibitör (SLI), sistatinler ve MMP'ların doku inhibitörleridir (TIMPI-4)<sup>1</sup>.

Proteinaz aracılığıyla akciğer parankimi konnektif dokusunun en önemli komponenti olan elastin yıkımı amfizemin en önemli özelliğidir ve muhtemelen geri dönüşümsüzdür. Elastin sentez ve onarımındaki anormalliklerin amfizem patogenezinde yeri olabileceğine dair bazı kanıtlar vardır. Yapılan hayvan çalışmasında hasar sonrası gerçekleşen elastin sentezinin, akciğerlerin elastin içeriğini yenilediği, ancak akciğerin yapısal olarak normale dönmediği gösterilmiştir<sup>60</sup>.

Amfizemli hastaların BAL sıvısında katepsin L tespit edilmiş<sup>61</sup> ve KOAH' lı hastalardaki alveoler makrofajların sağlıklı sigara iicilere ve içmeyenlere göre daha fazla katepsin salgıladıkları tespit edilmiştir<sup>62</sup>.

MMP'lerin KOAH' taki rolüne duyulan ilgi giderek artmaktadır. KOAH hastalarının BAL sıvılarında MMP-1 ve MMP-9 konsantrasyonunun yüksek olduğu ve amfizemli hastaların akciğer parenkiminde MMP-9 aktivitesinin artığı gösterilmiştir<sup>63,64</sup>. Amfizemli hastaların akciğerlerinde özellikle tip II pnmositlerin MMP-1 salgılamalarında artış olduğu da gösterilmiştir<sup>65</sup>. Sigara içenlerde alveoler makrofajlar içmeyenlere göre daha fazla MMP-9 salgılamak<sup>66</sup> KOAH hastalarında artış daha da fazladır<sup>67</sup>. TGF- $\beta$ , MMP-9 tarafından aktive edilir. Bu mekanizma MMP-9' un elastolitik aktiviteyi arttırması ve TGF-  $\beta$  tarafından fibrozis aktivasyonunun sağlanması arasında ilişki kurulmasını sağlar<sup>68</sup>.

Yapılan çalışmalarda sigara içenlerde içmeyenlere göre  $\alpha$ 1-AT fonksiyonunun yaklaşık % 40 oranında azaldığı gösterilmiştir<sup>69</sup>. Bu fonksiyonel  $\alpha$ 1-AT eksikliğine sigara dumanındaki oksidanların neden olduğuna inanılmaktadır. Yinede sigara içicilerindeki  $\alpha$ 1-AT aktivitesi proteinazlara karşı yeterli korunmayı sağlayacak düzeyde kalır.

KOAH lı hastalarda makrofajlar, TIMPI salgılamaları yönündeki uyarılara zayıf yanıt verirler. Bu da elastolizisin artışına neden olabilir<sup>12</sup>.

### 2.2.3. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, reaktif oksijen radikallerinin üretimi, antioksidan savunmadan daha fazla olduğu zaman gerçekleşir. Sigara dumanı, yüksek konsantrasyonda serbest radikaller ve diğer oksidanlar da dahil olmak üzere, 4700 kimyasal madde içerir. Reaktif oksijen radikallerinin bir diğer kaynağı makrofajlar ve nötrofiller gibi inflamatuvar hücrelerdir. Ayrıca hüresel solunum sırasında ve dış ortamdaki partikül ve hava kirleticilerin inhalasyonu gibi durumlarda da ortaya çıkarlar<sup>20</sup>. Oksidatif stres belirteçleri; hidrojen peroksit, nitrik oksit ve isoprostane isoprostane F2a-III gibi lipid peroksidasyon ürünleridir. Oksidatif stres, birçok biyolojik molekülü okside edip hücrelerde fonksiyon bozukluğu ve ölüme neden olarak, hücre dışı matriksi harap ederek, temel antioksidan savunmayı inaktive ederek, proteinazları aktive ederek veya NF- $\kappa$ B gibi transkripsiyon faktörlerini aktive edebilen ve histon asetilasyonunu kolaylaştırabilen gen ifadesini artırarak KOAH patogenezine katkıda bulunabilir<sup>14</sup>. Oksidatif stres sonucu lipid, protein ve DNA zararlanması oluşur<sup>70</sup>.

KOAH'lılarda ve sigara içenlerde oksidatif stresin arttığını gösteren pekçok kanıt vardır<sup>71</sup>.

AC matriksinin komponentlerinden olan elastin ve kollajen, sigara dumanındaki oksidanlardan direk olarak zarar görebilir<sup>72</sup> ve sigara dumanı elastin sentez ve onarımını bozarak amfizem gelişimine yol açabilir<sup>73</sup>. Sigara dumanı özellikle oksidanlar aracılığı ile alveol epitelyal hücre fonksiyonlarını bozar.

Ekspirasyon havası soluk yoğunlaşmalarında oksidan seviyesinin yüksek olduğu gösterilmiştir<sup>74</sup>. KOAH hastalarının ekspiryum havasında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu

artmıştır<sup>75</sup> ve hava akımı kısıtlaması ile lipid peroksidasyonu arasında korelasyon gözlenmiştir<sup>76</sup>.

Solunum yolu duvarındaki sıvıda en çok bulunan antioksidanlar; müsin, indirgenmiş glutatyon, ürik asit, protein (en çok albumin) ve askorbik asittir<sup>77</sup>. Sigara içicileri ve KOAH'lıların antioksidan savunmaları ile ilgili pek az şey bilinmektedir. Bu konuda yapılmış olan çalışmalarda çelişkili sonuçlar bildirilmiştir<sup>78,79,80,81,82,83</sup>.

#### **2.2.4. Apoptozis**

Günümüzde, KOAH patogenezinde apoptozisin rolü daha fazla anlaşılmaya başlamıştır. Yapılan çalışmalarda havayolu epitel hücrelerinde, alveoler epitelyal ve endotelial hücrelerde ve havayolu ile alveoler T hücrelerinde apoptozis artışı gösterilmiştir.

KOAH hastalarının akciğerlerinde apoptotik temizleme mekanizmalarının etkinliğinin azaldığı ve makrofajların apoptotik hücreleri tanıyıp temizlemesinde bir yetersizlik olduğu yönünde kanıtlar mevcuttur<sup>84,85,86</sup>. Apoptotik hücrelerin yeterince temizlenememesi; bu hücrelerin post-apoptotik sitolize (sekonder nekroz) uğramalarına ve apoptotik yapısal hücrelerin yerlerinin yeni hücrelerce doldurulmasında engellenmeye neden olabilir. Postapoptotik sitoliz ise; TNF- $\alpha$ , IL1, IL6, IL8 gibi proinflamatuvar mediatörlerin salınımlarında artış sonucu oluşan inflamasyona, proteinazlar ve proimmünojenik maddelerin salınımlarında artışa yol açabilir.

KOAH'da gözlenen parankimal hücre ölümünün (apoptozis), apoptotik hücrelerin yeterince temizlenememesinin neden olduğu sekonder sitolizin ve hücreyel onarım ve yenilenmenin bozulmasının KOAH'a özgü akciğer dokusunda harabiyet (amfizem) ve küçük hava yollarının yapı ve fonksiyonlarında bozulmaya yol açtığı ileri sürülmektedir<sup>2</sup>.

## 2.3. Apoptozis

### 2.3.1. Tanım

Apoptozis, gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür. Apoptozis, embriyo döneminden ölüme kadar pek çok fizyolojik veya patolojik olayda izlenir. Apoptozis fizyolojik olarak doku gelişimi, hücre ölümü ve yerine yeni hücre yapımı (remodelling), normal hücre sirkülasyonu (turnover) ve immün cevap regülasyonu gibi süreçlerde rol alarak doku homeostazisinin devamlılığını sağlar. İnsanlarda normal apoptotik hücre ölümü ve yerine yeni hücre yapımının günde yaklaşık  $1 \times 10^{11}$  hücreyi bulduğu hesaplanmaktadır<sup>88,89,90</sup>.

#### **Apoptozisin homeostazis içindeki yeri:**

1. Metamorfoza uğramış veya yaşlanmış ve bu nedenle fonksiyonlarını kaybetmiş hücrelerin ortadan kaldırılması,
2. Prostat, endometrium ve meme dokusu hücreleri gibi hormona bağımlı dokularda hormon yokluğunda oluşan gerileme,
3. Gastrointestinal sistem ve deri gibi sürekli çoğalan hücre gruplarının azaltılması,
4. Sitokinlerin azalmasına bağlı B ve T lenfositlerin ortadan kaldırılması<sup>89</sup>.

#### **Apoptozisin patolojik süreçlerdeki rolü:**

1. Tümörlerde hem büyüme hem de kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi nedeniyle veya kendiliğinden oluşan küçülme sırasında gerçekleşen hücre ölümü,
2. Hormona bağımlı dokularda patolojik atrofi,
3. Karaciğer gibi parankimatöz organlarda duktus tıkanmasına bağlı oluşan patolojik atrofi,
4. Sitotoksik T lenfositleri ile oluşturulan hücre ölümü,
5. HIV, HCV, Adenovirüs gibi bazı viral hastalıklarda oluşan hücre ölümü,
6. Hipertermi, radyasyon, sitotoksik kemoterapi ve hipoksi gibi çeşitli zedeleyici etkenlerle oluşan hücre ölümü.

### 2.3.2. Apoptozisin Moleküler Düzenleyicileri

Apoptozisin her basamağı bir çok proteinin birlikte çalışmasını gerektirir. Bu proteinler, kaspazlar, Bcl-2 ailesi, p53 ve TNF ailesidir. En etkili proteinler, kaspazlardır.

#### 2.3.2.1. Kaspazlar

Sistein proteinazlardır ve aspartik asitten sonraki peptit bağımlıdır. 14 farklı kaspaz tanımlanmıştır ve çoğu apoptoziste rol alır. Kaspazlar, tek polipeptit zinciri halinde sentez edilirler ve üç tane bölgesi vardır: efektör ölüm bölgesi (death effector domain: DED), kaspaz toplama bölgesi (caspase recruitment domain: CARD) ve ölüm bölgesidir (death domain: DD). Tüm kaspazlar hücre içinde inaktif olarak bulunurlar ve proteolitik işlemle kırılarak aktif olurlar. İnaktif kaspazın aktivasyonu; granzim B aracılığıyla, sitotoksik T hücre granüllerinde bulunan aspartata özgü serin proteinazlar aracılığıyla veya aktif olan kaspaz proteininin inaktif olan kaspaz ile etkileşimi sonucu gerçekleşebilir. Kaspazlar, yapısal özelliklerine ve fonksiyonlarına göre üç grupta sınıflandırılırlar; inflamatuvar kaspazlar olarak adlandırılan grup I kaspazlar (kaspaz 1, kaspaz 4, kaspaz 5), başlatıcı kaspazlar olarak bilinen grup II kaspazlar (kaspaz 2, kaspaz 8, kaspaz 9, kaspaz 10) ve efektör kaspazlar olarak adlandırılan grup III kaspazlar (kaspaz 3, kaspaz 6, kaspaz 7). Ölüm reseptörleri aracılığıyla tetiklenen apoptotik sinyal, kaspaz 8 veya kaspaz 10 gibi başlatıcı kaspazların aktivasyonunu sağlarken mitokondriyal apoptotik sinyaller kaspaz 9'u aktif hale getirir. Daha sonra bu kaspazlar diğer kaspazları aktiveleştirerek proteolitik bir kaskada neden olurlar. Bu kaskad sonunda efektör kaspazlar olan kaspaz 3, 6 veya 7 aktive olur. Bu aktivasyon, nükleaz inhibitörü, hücre iskeleti ve önemli hücre proteinlerinde bölünmeye yol açarak DNA'da parçalanmaya ve tipik morfolojik değişikliklere neden olur<sup>88,91</sup>.

Yaşayan hücrelerde kaspaz aktivasyonu apoptozis inhibitör proteinleri (IAP) adı verilen hücresel proteinler aracılığıyla kontrol altında tutulurlar<sup>92,93</sup>. İnsanlarda altı tane IAP tanımlanmıştır; NAIP, c-IAP1 (HIAP2), c-IAP2 (HIAP-1), XIAP, survivin ve BRUCE<sup>94</sup>. IAP proteinlerinin aşırı salınımı pro-apoptotik Bcl-2 ailesinin tetiklediği apoptozisi inhibe eder.

### 2.3.2.2. Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 proteinleri apoptozis regülasyonunda; hücre yüzeyi ile hücre içi ölüm sinyalleri arasında denetim noktası olarak, apoptozom oluşum safhasında ve kaspaz kaskadının aktivasyonunda önemli rol oynar<sup>95,96</sup>. Bcl-2 ailesi iki düzineden daha fazla üyeye sahiptir ve birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri apoptozisi tetikleyici (en iyi olarak bilinenler: bax, bid, bcl-Xs, bad, bim, bak, bok, PUMA, NOXA), diğeri ise apoptozisi baskılayıcı (en iyi olarak bilinenler: bcl-2, bcl-X1, Mcl-1) etkiye sahiptir<sup>88</sup>. Bcl-2 ailesinin üyeleri BH1, BH2, BH3, BH4 bölgelerinden en az birisini içerirler. , Apoptozisi tetikleyen üyeler kendi aralarında; BH1, BH2, BH3 bölgelerinden her üçünü içerenler (Bax, Bak) ve sadece BH3 içerenler (bid, bad, bim, PUMA, NOXA) olmak üzere ikiye ayrılırlar. Apoptozisi baskılayan üyelerin hepsi bölgelerin dördünü içerirler. Ölüm sinyali olmadığı zaman Bcl-2 proteinleri hücre içinde ayrı kompartmanlarda bulunurlar. Ölüm sinyali alındığı zaman, apoptozisi indükleyen üyeler değişime uğrarlar, daha sonra mitokondrinin dış membranına entegre olurlar ve mitokondriden apoptozisi başlatıcı bir faktör olan sitokrom c'nin salıverilmesine neden olurlar. Bu olaylar gerçekleşirken apoptozisi baskılayan üyeler ise inaktif olurlar<sup>97</sup>.

### 2.3.2.3. p53

p53; apoptozisi tetikleyen birçok farklı gen ürününün sentezini arttıran transkripsiyon faktörüdür. p53'ün sentezlerini arttırdığı apoptozisi tetikleyen gen ürünleri; hücre döngü gelişim inhibitörleri, p53 aktivitesini kontrol eden düzenleyiciler, oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stres mediatörleri, ölüm reseptör sinyal yolunun komponentleri ve bcl-2 ailesinin apoptozisi tetikleyen proteinleridir. p53 aynı zamanda transkripsiyondan bağımsız olarak da apoptozisi tetikleyebilir<sup>98</sup>. p53, hücrede bir şekilde DNA hasarı olduğu zaman hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA tamiri için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse Bax'ın sentezini arttırarak apoptozisi tetikler.

#### **2.3.2.4. Tümör Nekrozis Faktör (TNF) Ailesi**

TNF, bir sitokindir ve apoptozis, hücre proliferasyonu, immünomodülasyon, inflamasyon, allerji ve otoimmün hastalıklara aracılık eder. TNF, transmembran proteini olarak sentez edilir. TNF'nin membrana entegre formu (mem-TNF) proteolitik bölünme ile soluble TNF halini alır. TNF, biyolojik fonksiyonlarını iki farklı reseptör aracılığıyla gerçekleştirir; tip 1 (TNF-R1) ve tip2 (TNF-R2)<sup>99</sup>.

Hücrenin ölüm sinyalinin aktarımı, TNF-R1'in stoplazmik ölüm bölgesi aracılığıyla gerçekleşir. Bu durum kaspaz 8 aktivasyonuna veya mitokondri bağımlı döngünün aktivasyonuna, sonuç olarak da apoptozise neden olur.

#### **2.3.3. Apoptozis Sürecinin Değerlendirilmesi**

Apoptozis süreci, hücre ölümüne neden olan uyarı ile başlar ve enerji bağımlı kaskad ile sona erer. Bu süreç, 4 faz halinde özetlenebilir:

1. Erken veya başlangıç fazı: Apoptozis, apoptotik cevaba neden olan uyarı ile başlar. Apoptotik cevap, hücre dışı bir sinyalin hücre yüzey reseptörlerini uyarmasıyla tetiklenebileceği gibi, ilaçlar, radyasyon veya toksinlerin neden olduğu hücre içi uyarılar ile de tetiklenebilir,

1. Sinyal transferi fazı: Sinyal veya metabolik durumun algılanması ve bu algılanan sinyal veya metabolik durumun hücre ölüm efektör sistemine iletilmesi,
2. Efektör faz: Kaspaz sisteminin aktivasyonu,
3. Hücre ölümünden sonraki faz: Hücrelerin kromatin veya DNA'larının sindirimini ve ölen hücrelerin fagositik hücreler tarafından tanınarak yok edilmelerini içerir<sup>91</sup>.

Diğer bir hücre ölüm şekli olan nekroz ile apoptozis arasındaki farklar, apoptozis sürecinin daha iyi algılanmasına neden olabilir.

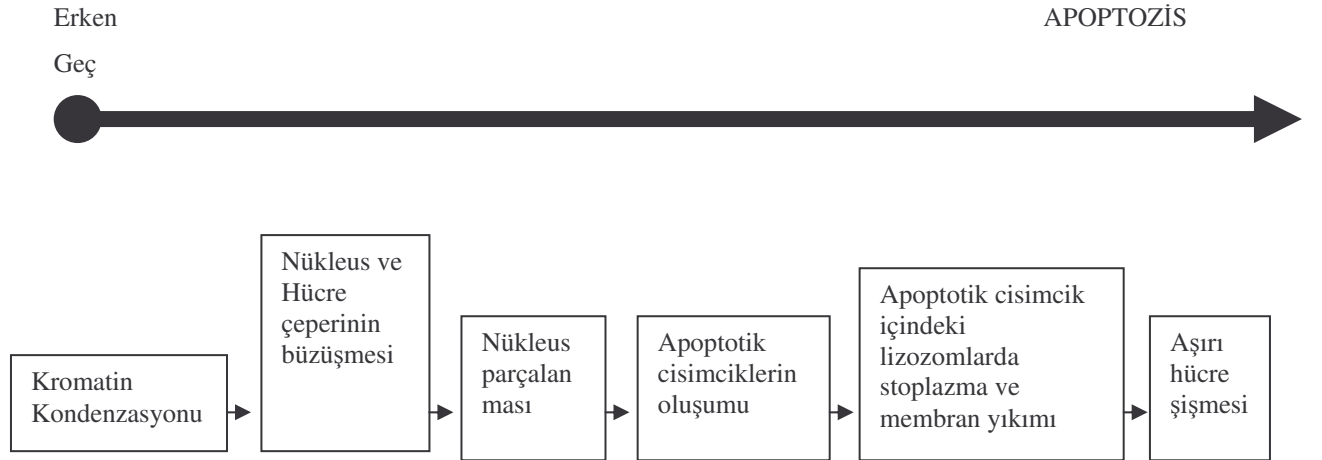
**Tablo 4. Apoptozis ile Nekroz Arasındaki Farklar**

Özellik	Nekroz	Apoptozis
Nedenler	Her zaman patolojik	Fizyolojik/patolojik
Dağılım	Hücreler gruplar halinde ölür	Hücreler tek tek veya birkaçı bir arada ölür
İnflamasyona neden olma	Evet	Hayır
Işık mikroskopi	Bazofili, piknoz, karyoreksis, karyolizis	Kresentik görünüm, eozinofilik partikül
Elektron mikroskopi	Hücrede şişme, membranda yırtılma, kromatinde erime,	Volüm kaybı, apoptotik cisimcikler
Fagositoz	Mononükleer hücreler	Komşu hücreler veya makrofajlar
Biyokimyasal özellikler	Bozulmuş iyon homeostazisi,  ATP gerekmez DNA rastgele parçalanır  Postlitik DNA parçalanması	İyi kontrollü bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması, ATP gereklidir, DNA internükleozomal alanlarda 180-200 bp (baz çifti) büyüklüğünde kırılır, Prelitik DNA parçalanması

Apoptozis süreci, birbirinden farklı bölümlere ayrılarak değerlendirilebilir:

### 2.3.3.1. Apoptozis Sürecinin Zamana Göre Değerlendirilmesi

Erken ve geç olarak değerlendirilebilir. Şekil 2’de, apoptoziste oluşan erken ve geç morfolojik değişiklikler özetlenmiştir.



**Şekil 2. Apoptoziste oluşan erken ve geç morfolojik değişiklikler**

Apoptoziste ana morfolojik olay, nükleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Kromatin, normalde mikst kondens bir yapıda olup diffüz görünümde dir. Apoptoziste süperkondens bir hal alarak nükleus zarı altında kresentik görünüm oluşur. Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, birkaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar (blebler) oluşur ve hücre, stoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir. Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma membranında oluşan değişiklikler aracılığıyla gerçekleşir. Plazma membranında oluşan bu değişiklikler; normalde hücre membranının iç tabakasında bulunan fosfatidil serinin (PS), membranın dış tabakasına göç etmesi ile oluşur. Fagositik hücrelerin reseptörleri, PS ile bağlanır ve böylece fagositoz uyarılmış olur<sup>89</sup>.

### **2.3.3.2. Apoptozis Sürecinin Hücre İçi veya Hücre Dışı Uyanlarla Tetiklenmesine Göre Değerlendirilmesi**

Hücreler, hücre içi veya hücre dışı çevrede meydana gelen büyüme faktörü eksikliği, hücre yaşlanması, HIV, kemoterapi, radyasyon, yüksek doz glikokortikoid, Fas ve TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu ve oksidatif stres gibi hücre ölüm uyanları ile tetiklenerek iki ayrı yol ile apoptozise giderler. Bu yollardan birisi ekstrinsik yol; hücre dışı ölüm uyanları ile tetiklenen reseptör aracılı apoptozis, diğeri ise intrinsik yol; hücre içi uyanlar ile tetiklenen mitokondri aracılı apoptozistir. Bu iki ana apoptozis yoluna ek olarak başka apoptozis yolları da vardır.

#### **2.3.3.2.1. Ekstrinsik Yol (reseptör aracılı apoptozis)**

Ekstrinsik yolda apoptozis, hücre ölüm reseptörleri olan Fas ve TNF-R1'in kendi ligandları ile etkileşime girmesi sonucu başlar (şekil 2). Fas ligandı (Fas L), sitotoksik T lenfositlerde ve doğal öldürücü (natural killer) hücrelerde bulunur<sup>88,90</sup>. TNF-R1'in ligasyonu, TNF-R1'e TNF'nin bağlanması ile gerçekleşir<sup>90</sup>. Fas ve TNF-R1 kendi ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olurlar. Fas reseptörü, birbirine

komşu iki Fas ligandının birbirleriyle bağlanması sonucu trimer kompleks halinden hexamer kompleks haline dönüşür. Daha sonra, Fas reseptörü kendisinin intrastoplazmik ölüm bölgesi olan FADD (Fas associated death domain) ile, TNF-R1 ise kendi intrastoplazmik ölüm bölgesi olan TRADD (TNF-R1 associated death domain) ile etkileşime girer. Böylece ölüme sebep olan sinyal kompleksi (death-inducing signalling complex: DISC) oluşur. Bu kompleks, prokaspaz 8'in efektör ölüm bölgesi (death effector domain:DED) ile birleşerek prokaspaz 8'in aktif formu olan kaspaz 8'in oluşumuna neden olur. Kaspaz 8; ya prokaspaz 3'ü aktive ederek hücre ölümüne sebep olur ya da Bcl-2 ailesinin üyesi olan Bid'in c-terminal bölgesini keserek aktif formu olan tBid'in oluşmasına ve böylece apoptozisin intrinsik yola doğru ilerlemesine neden olur. Hücreler, bu iki yoldan birisine daha fazla yatkındırlar. Tip 1 hücreler (lenfositler), kaspaz 3 aktivasyon yolunu tercih ederken, Tip 2 hücreler (hepatositler), intrinsik yola doğru ilerlemeyi tercih ederler<sup>90</sup>.

#### **2.3.3.2.2. İntrensik Yol (mitokondri aracılı apoptosis)**

Sitotoksik ilaçlar, oksidatif stres, iyonize radyasyon, DNA hasarı, büyüme faktör eksikliği gibi nedenlerle oluşabilen ölüm sinyali, Bcl-2 ailesinin sadece BH3 bölgesini içeren üyeleri (bid, bad, bim, PUMA, NOXA) tarafından mitokondriye taşınır (şekil 2). İntrensik yolun en önemli bölümü, mitokondri dışı membran geçirgenliğinde oluşan artıştır (MOMP: mitochondrial outer membrane permeabilization).

MOMP'un Bcl-2 ailesinin sadece BH3 bölgesini içeren üyeleri tarafından oluşum mekanizmaları;

**a)** Timusta bulunan otoreaktif T hücrelerin ortadan kaldırılmaları, T hücre reseptörünün (TCR: T cell reseptor) uyarılması ile başlar. Uyarılmış olan TCR, inaktif halde bulunan Bim'in aktif hale gelmesine neden olur. Aktifleşen Bim; Bax ve Bak'ın birbirleriyle etkileşime girerek oligomerik hal almalarını sağlar. Bax/Bak oligomerizasyonu MOMP'u oluşturur<sup>38-60</sup>. T lenfositlerde sitokin eksikliğinde IL-2 reseptörünün uyarılmasına bağlı olarak gözlenen apoptozis de bu yol ile gerçekleşir<sup>90</sup>.

**b)** Aktif kaspaz 8 eksikliği, Bid'in c-terminal bölgesinin kesilmesine ve aktif formu olan tBid'in oluşmasına neden olur. Oluşan tBid, Bim ile aynı yolu izleyerek MOMP'a neden olur.

c) Sitotoksik T hücreleri ve doğal öldürücü (naturel killer:NK) hücreler, hedef aldıkları hücreleri FasL/Fas reseptörü aracılığıyla öldürürler. Bunu başaramadıkları zaman degranüle olarak perforin ve granzim B salınımına neden olurlar. Perforin, hedef hücre membranında por oluşumunu sağlayarak Granzim B'nin hücre içine girişini sağlar. Granzim B, kaspaz 3, 8 ve Bid'i hedef alır. Granzim B, prokaspaz3 ile başlayan süreci başlatabilir ancak tamamlayamaz. En sonunda granzim B, Bid'i aktif formu olan tBid haline dönüştürerek tBid aracılığıyla oluşan MOMP'u gerçekleştirir<sup>100</sup>.

d) DNA hasarında p53; PUMA ve NOXA'nın sentezini artırır. PUMA ve NOXA proapoptotik proteinler olan Bax ve Bak aracılığıyla MOMP'un oluşumunu sağlar<sup>91</sup>. PUMA ve NOXA, Bax ve Bak'ı direk olarak aktive edemezler. Antiapoptotik Bcl-2 veya Bcl-X<sub>L</sub>, Bim veya Bid'i bağlayarak Bim ve Bid'in Bax/Bak oligomerizasyonunu tetiklemelerini engelleyebilirler. İşte PUMA ve NOXA; Bcl-2 veya Bcl-X<sub>L</sub>'nin bağlayıcı bölgeleri için Bim ve Bid ile yarışır. Böylece serbestleşen Bim ve Bid, Bax ve Bak'ın birbirleriyle etkileşime girerek oligomerik hal almalarına ve MOMP oluşumuna neden olurlar<sup>101</sup>.

Hangi yol ile olursa olsun ölüm sinyalinin, MOMP oluşumunu gerçekleştirebilmesi, mitokondriden apoptozisin aktivasyonuna neden olan başta sitokrom-c olmak üzere Smac/diablo (second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI), AIF (apoptosis inducing factor), endonükleaz G ve Omi (homologue of bacterial HtrA) gibi maddelerin salınımına neden olur.

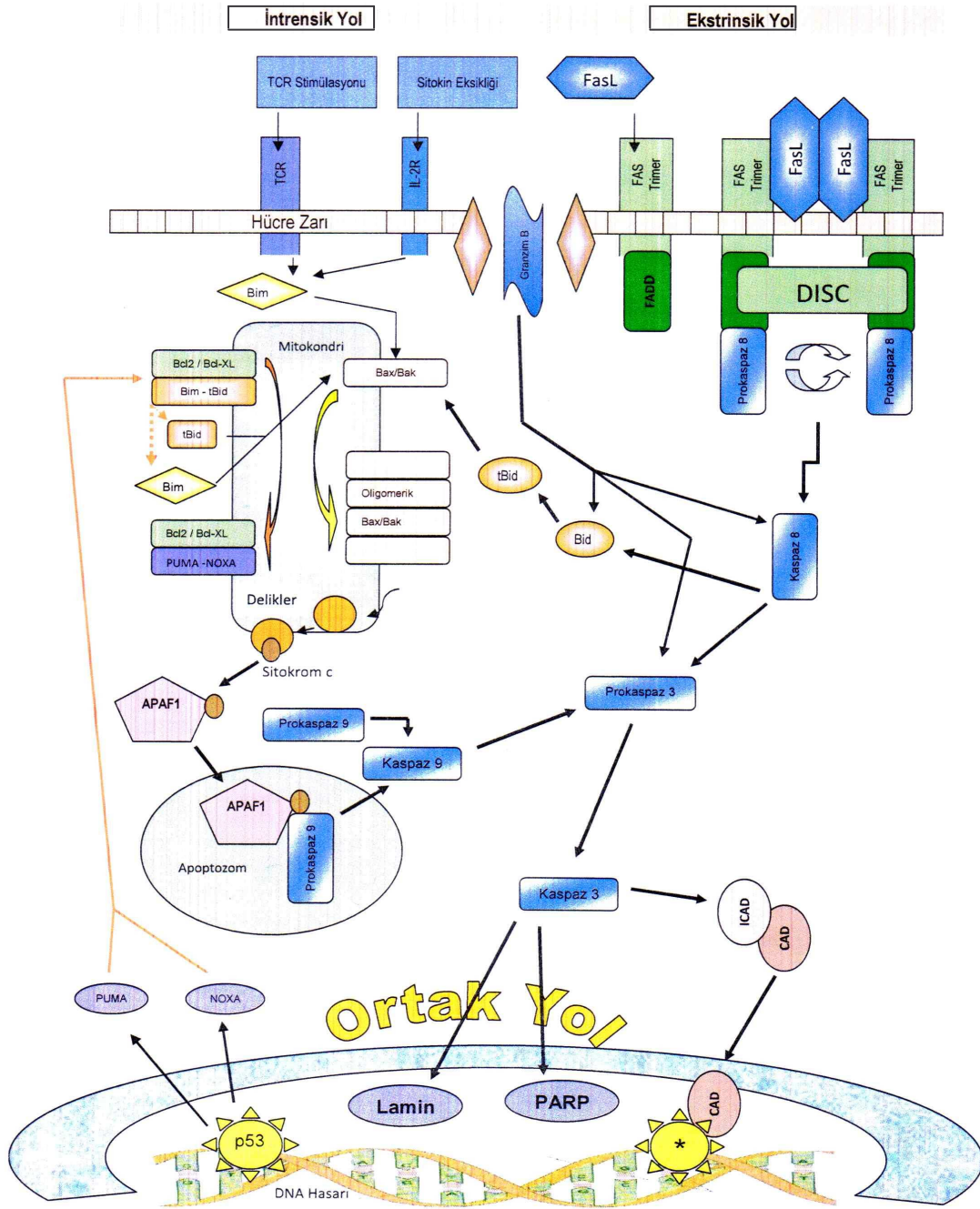
Sitokrom-c; Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) ve pro-kaspaz 9'a bağlanarak apoptozom adı verilen oligomerik Apaf-1 kompleksi (7 Apaf-1 + 7 sitokrom-c + 7ATP + 7 Prokaspaz 9 )'nin oluşumunu sağlar. Aktifleşen kaspaz 9, pro-kaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü ( ICAD: inhibitor of caspase- activated deoxyribonuclease) inaktifleştirir. Böylece ICAD'ın bağladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD: caspase-activated deoxyribonuclease) serbestleşir. CAD, apoptozisin karakteristik bulgularından olan kromatin yoğunlaşmasına ve oligonükleozomal DNA parçalanmasına neden olur. Ayrıca aktif kaspaz 3, ilgili proteinleri (hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli (ADP-riboz) polimerazı (PARP)) parçalayarak, apoptotik hücre morfolojisinin oluşmasını da sağlar.

Smac/diablo; kaspazlara bağlanarak kaspaz inhibisyonuna yol açan IAP'ın (inhibitors of apoptosis) yerini değiştirerek, Omi ise IAP'ı geri dönüşümsüz olarak inhibe ederek kaspaz aktivasyonunu sağlarlar, AIF; direkt olarak nükleusa giderek kromatin yoğunlaşmasını başlatır ve endonükleaz G; kaspaz aktivasyonundan bağımsız olarak nükleustaki parçalanmaya katılır.

### 2.3.3.3. Diğer Yollar

Ekstrinsik ve intrinsik yolların dışında apoptoze neden olan birkaç yol daha tanımlanmıştır;

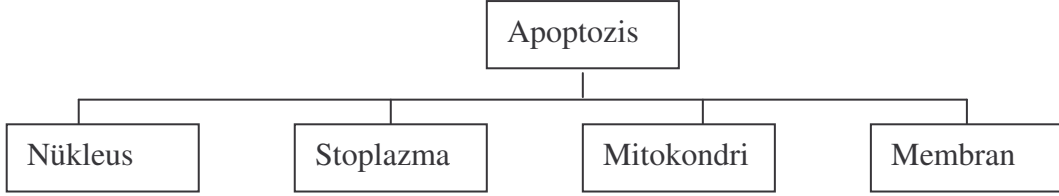
- a) Stresin neden olduğu kaspaz 2 aktivasyonu MOMP oluşumuna neden olabilir,
- b) Endoplazmik retikulum ile ilişkili apoptozis: Stres nedeniyle endoplazmik retikulumda kalsiyum homeostazisinde oluşan bozukluk, kaspaz 12 vasıtasıyla mitokondri aracılıklı apoptoze neden olabilir. Ayrıca kaspaz 12, pro-kaspaz 9'u sitokrom-c salınımı olmaksızın direk olarak da aktive edebilir,
- c) Reaktif oksijen radikalleri kaspaz aktivasyonundan bağımsız olarak mitokondriden AIF salınımına neden olabilir<sup>38</sup>,
- d) İnflamasyon alanlarındaki lenfosit apoptozisinden sorumlu olan Bcl-2 ailesinin sadece BH3 bölgesini taşıyan atipik proapoptotik proteini BNIP3'ün (Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3) aracılık ettiği apoptozis: T lenfosit yüzey reseptörü olan CD47, hipoksi gibi durumlarda uyarılır. CD47 reseptörünün mediatörü olan BNIP3, Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub>'nin antiapoptotik etkilerini baskılar, mitokondride fonksiyon bozukluğu ve plazma membranında hasarlanma oluşturur. Bunların sonucu olarak oluşan apoptozis, kaspaz aktivasyonu ve sitokrom-c salınımından bağımsız olarak gerçekleştirir<sup>102</sup>.



**Şekil 3. Apoptozisin intrinsik ve ekstrinsik yolları.** **FAS** reseptörü ( APO-1: Apoptosis- inducing reseptör-1), **FasL**: Fas ligandı, **FADD**: Fas associated death domain (Fas ilişkili ölüm bölgesi), **DISC**: Death inducing signaling complex (Ölüme sebep olan sinyal kompleksi), **Bid**: Bcl-2 intercting domain (Bcl-2 etkileşim bölgesi), **Bim**: Bcl-2 intercting mediator of cell death (Bcl-2 hücre ölümünün etkileşim mediatörü), **Bak**:Bcl-2 antagonist/Killer (Bcl-2 antagonist/katil), **Bax**: Bcl-2 associated X protein (Bcl-2 ilişkili X protein),**TCR**: Tcell reseptörü ( T hücre reseptörü), **NOXA**:Name for damage( Hasarın ismi), **PUMA**: p53 up-regulated modulator of apoptosis (p53'ün ekspresyonunu arttırdığı apoptozis düzenleyicisi) **Apaf-1**: Apoptosis activating factor-1 (Apoptozisi aktive eden faktör-1), **ICAD**: Inhibitor of caspase- activated deoxyribonucleaz( kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü), **CAD**: Caspase- activated deoxyribonucleaz( kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz), **PARP**: Poly(ADP-ribose) polymerase (Poli (ADP-riboz) polimeraz)  
 \*: internükleozomal DNA kesilmesi

### 2.3.3.3. Apoptozisin, Apoptozis Sürecinde Görev Alan Hücre Organellerine Göre Değerlendirilmesi

Apoptozisin, apoptozis sürecinde görev alan hücre organellerine göre bölümlere ayrılması Şekil 4’de özetlenmiştir:



Şekil 4. Apoptozisin hücre organellerine göre bölümlere ayrılışı

Apoptozis sürecinde;

- a) Nükleusta: kromatin kondenzasyonu, nükleus zarının büzüşmesi ve nükleusta parçalanma,
- b) Stoplazmada; apoptozisin aktivasyonunu sağlayan bcl-2 ailesinin üyelerinde ve kaspazlarda aktivasyon, apoptozisi inhibe eden enzimlerde ve bcl-2 ailesi üyelerinde inhibisyon ve apoptozom oluşumu,
- c) Mitokondride; dış membran geçirgenliğinde artış, sitokrom c'nin mitokondriden stoplazmaya salınımı,
- d) Membranda; normalde hücre membranının iç tabakasında bulunan PS'nin membranın dış tabakasına göç etmesi ve hücre membranında tomurcuklanmaların ( bleb) oluşumu olayları gerçekleşir.

### 2.3.3.4. Apoptotik Hücrelerin Tanınması ve Fagositozu

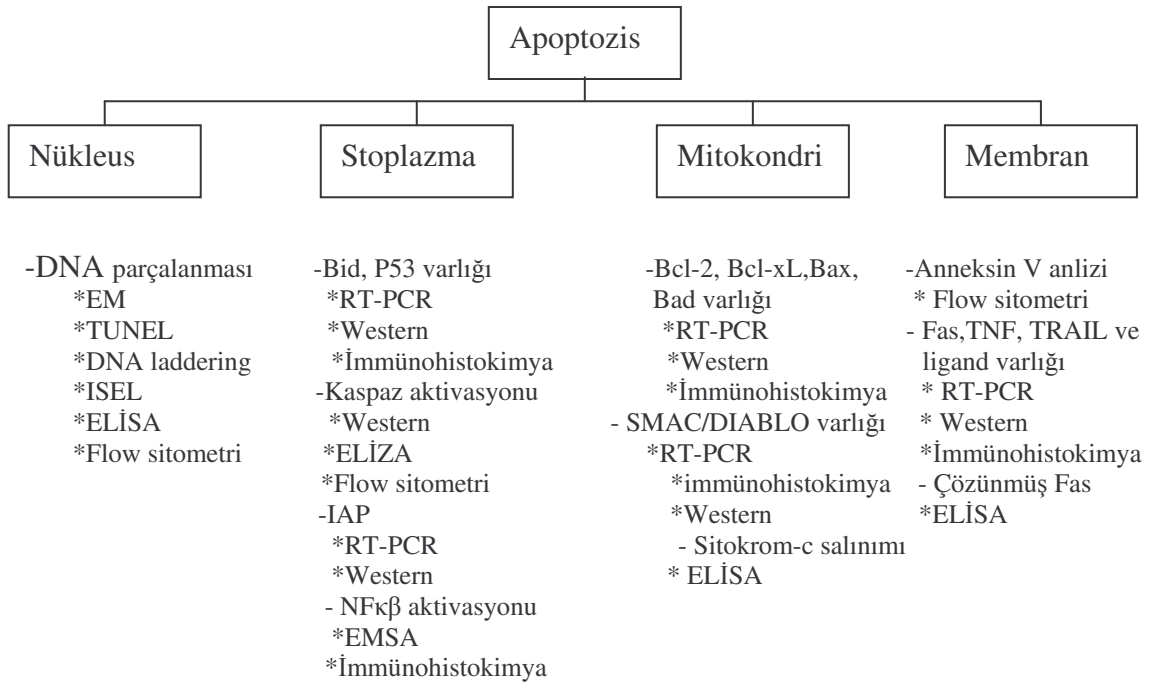
Apoptozis sonunda çevresi plazma membranı ile çevrili içinde hücre parçalarının bulunduğu apoptotik cisimcikler oluşur. Apoptotik cisimciklerin iç membranında bulunan fosfolipid tabakası dış tarafa doğru yer değiştirerek plazma membranının dış katmanlarında fosfatidilserinin (PS) açığa çıkmasını sağlarlar. Bazı apoptozis tiplerinde trombospondin, calreticulin ve adheziv glikoproteinler de apoptotik cisimcik yüzeyine doğru hareket ederler. PS, fagositozun oluşması için "beni ye" sinyali oluşturur.

Fagositler, apoptotik hücre yüzeyindeki PS ile ya PS reseptörü ya da sekrete ettikleri opsonin adı verilen köprü proteinleri aracılığıyla etkileşir.

Apoptotik hücrelerin fagositoz ile temizlenmeleri, anti-inflamatuar sitokinlerin üretimi ve proinflamatuar sitokinlerin baskılanması ile karakterizedir. Böylece apoptotik hücrelerin temizlenmesi hızlı, etkin ve sessiz olarak gerçekleşir.

### 2.3.3.5. Apoptozis Belirleme Yöntemleri

Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler; morfolojik görüntüleme yöntemleri, immünohistokimyasal yöntemler, biyokimyasal yöntemler, immünojenik yöntemler ve moleküler biyoloji yöntemleridir<sup>88</sup>. Her bir yöntemin, apoptozis sürecinde görev alan organellere göre dağılımı, Şekil 5’de gösterilmiştir<sup>103</sup>.



Şekil 5. Apoptozisin organellerde gerçekleşen süreçlere göre belirlenme yöntemleri

#### 2.3.3.5.1. Morfolojik Değişiklikler

**Elektron mikroskopisi (EM):** Apoptozisin belirlenmesinde, elektron mikroskopi yöntemi, yüksek oranda spesifik ve sensitif bir yöntemdir. Bu yöntem ile apoptozisin erken ve geç döneminde gözlenen tüm spesifik morfolojik değişiklikler tespit edilebilir.

**Işık mikroskobu (IM) ve floresan mikroskobu (FM):** Hematoksilen eozin ile boyanan ve hücre içerisinde yer alan yoğunlaşmış nükleus ve apoptotik cisimlerin gösterilmesinde ışık mikroskobu kullanılır. Işık mikroskobu , apoptotik hücreleri saptamada zayıftır. Ancak nekrotik hücrelerin ayrılmasını sağlayan ve hücre çekirdeğini boyayan propidium iyodür (PI) ile etkinliği artırılabilir. Ayrıca floresan maddelerin kullanımı ile ışık mikroskobunun gücü artırılabilir. Hoechst 33258 gibi floresan boyalar çekirdekdeki değişiklikleri belirlemek için kullanılabilir. Bu mikroskopik teknikler sadece apoptozisin geç dönemlerini tespit edebilmek için kullanılırlar ve çok sayıdaki örneğin gösterilmesinde yetersizdirler.

#### **2.3.3.5.2. DNA Parçalanması (fragmentasyonu)**

**TUNEL:** Apoptosis çalışmalarında kullanılan en yaygın test haline gelmiştir. Tunel yöntemi, parçalanmış DNA'nın 3-OH ucuna deoksinükleotidil transferaz (TdT)ın spesifik olarak bağlanması prensibine dayanır. Histolojik kesitlerin proteolitiklerle muamelesinden sonra, DNA kırıklarının olduğu bölgelerde TdT, X-dUTP (X= biotin, DIG veya floresan olabilir) ile birleşir. Uçları modifiye edilmiş nükleotidlerde avidin peroksidaz, sinyalin güçlenmesini sağlar ve işaretlenmiş hücrelerin ışık veya floresan mikroskobu, flow sitometri veya immünohistokimyasal yöntemlerle incelenebilmesini sağlar. Tunel, apoptosise spesifik değildir; herhangi bir şekilde gerçekleşmiş olan hücre ölümü veya nekroz durumlarında da ortaya çıkan DNA kırıkları bu teknikle işaretlenebilir. Yine bu teknikle apoptozise uğrayan hücreler normal hücrelere oranlanarak apoptozis oranı belirlenebilir (apoptotik indeks= AI). Tunel yöntemi, kültürde çoğaltılmış hücrelerde, donmuş kesitlerde ve parafin bloklarda apoptozis tespitinde kullanılabilir.

**In situ end labeling (ISEL) yöntemi:** Tunel yönteminin modifikasyonudur ve tünele göre sensitivitesi daha düşük olup uygulama süresi daha uzundur. ISEL yönteminde, DNA'nın 3-OH ucuna TdT yerine DNA polimeraz I bağlanır.

**Flow sitometri ve ELİSA:** DNA kırıkları, nükleozomlar arasındaki kırıkları tespit edebilen B-F6 monoklonal antikorunun kullanıldığı flow sitometri yöntemi ile belirlenebilir. Aynı prensiple, histon ile ilişkili DNA parçacıkları ELİSA kitleri kullanılarak tespit edilebilir. Bu yöntem genellikle çoğalmayan ve işaretlenmiş

nükleotidleri içlerine almayan hücrelerde kullanışlıdır. ELİSA yöntemi, birbirine yapışmış hücrelerde, kültürdeki hücrelerde, serum, plasma ve ex vivo elde edilmiş hücrelerde kullanılabilir.

**DNA laddering:** Apoptoziste DNA, internükleozomal bölgelerden 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan kırılır. Hücreler veya homojenize dokulardan standart DNA çıkarılma teknikleri kullanılarak bu nükleik asitler çıkarılır. Daha sonra elektroforez agaroz jel yöntemi ile karakteristik merdiven görüntüsü ( ladder patern) gösterilir. Bu yöntem, çok miktarda apoptozise gitmiş hücre gerektirdiği için düşük sensitiviteye sahiptir ve bu yöntem ile apoptozis oranı ölçülemez.

**DNA fragmentasyonunun ölçülmesi:** Apoptotik hücrelerde düşük molekül ağırlıklı (LMW) DNA oranı fazla iken, non-apoptotik hücrelerde yüksek molekül ağırlıklı (HMW) DNA oranı fazladır. Filtreleme ve santrifüj ile LMW DNA ve HMW DNA yı birbirinden ayırmak mümkündür. Bu teknikte, replikasyona uğrayan hücreler BrdU gibi bir nükleotid analogu ile işaretlenir ve apoptozis indüklenir. LMW DNA'nın HMW DNA'ya oranı belirlenir. Bu teknik bir nükleotid analogunun birleşmesini temel aldığı için, sadece in vitro olarak replikasyona uğrayan hücrelerde apoptozisin tespitini sağlar.

**APO ssDNA:** Isı ile denatüre olan apoptotik hücrelerde çok sayıda tek iplikli DNA (ssDNA) ortaya çıkması prensibinden faydalanılan yeni bir yöntemdir. APO ssDNA yönteminde hasar görmüş DNA ya spesifik antikolar kullanılır. Hızlı ve kullanımı kolay bir yöntemdir. Kalitatif ve kantatif sonuçlar elde edilebilir. Flow sitometri veya floresan mikroskobu ile analiz edilebilir

### 2.3.3.5.3. DNA Boyama Yöntemleri

**Boya dışlama yöntemi:** Ölü hücrelerin hücre membranları boyalara geçirgendir ve boyanabilir. Plasma membranı sağlam olan canlı hücreler ise boya geçirmez. Tripan mavisi ışık mikroskobunda canlı ve ölü hücrelerin ayrımında kullanılan bu tip bir boyadır. Ölü hücreler mavi boyanırken, canlı hücreler boyayı almaz.

**DNA' ya bağlanan boyalar:** Floresan bir boya olan propidium iyodür (PI), DNA'ya bağlandıktan sonra güçlü şekilde parlar. PI sadece canlı olmayan hücreleri boyar. Boyanan ve boyanmayan hücreler flow sitometri ile sayılabilir. Bu yöntemin ana

dezavantajı G1 ile G2 fazındaki DNA'yı ayırt edememesidir. Hücrelerin azalmış G2 DNA içeriği yanlışlıkla apoptozise uğrayan hücreler gibi algılanmalarına yol açabilir. Bundan dolayı bu test apoptozis için çok spesifik bir test değildir.

Hoechst 33342, DAPI ve YOPRO-1, canlı hücrelerde DNA'ya bağlanarak güçlü biçimde ışırılar. Bu DNA belirteçleri yoğunlaşmış kromatini floresan mikroskobu(FM) ile görünebilir hale getirirler ve apoptozisteki morfolojik değişikliklerin tespitini kolaylaştırırılar.

**Annexin V:** Apoptozis sırasında, normalde hücre zarının iç yüzüne yerleşmiş olan fosfatidilserinin (PS), hücre zarının dış yüzüne translokasyonu prensibine dayanan bir yöntemdir. Annexin V fosfatidilserine yüksek affinite ile bağlanarak apoptotik hücrelerin belirlenmesini sağlar. FM, IM ve EM için Annexin V nin kullanılmasını sağlayan boyalar mevcuttur. Anneksin V, biyotine bağlanabilir ve flow sitometrik yöntem ile apoptozisin tüm evrelerini saptayabilir.

#### **2.3.3.5.4. Sonlandırıcı Kaspazların Hedeflerine Karşı Antikorlar**

**PARP:** Sonlandırıcı kaspaz 3 ve 7 nin aktivasyonu DNA tamir mekanizmasında yer alan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) proteininin parçalanmasına ve inaktivasyonuna yol açar. PARP spesifik DNA kırıklarına bağlanan 113 kDa ağırlığında bir proteindir. PARP ın enzimatik bölünmesi ile 89 ve 24 kDa lık iki parça oluşur. 89 kDa lık parçayı tanıyan bir monoklonal antikor mevcuttur. Bu monoklonal antikor western veya immünohistokimyasal analizlerde ve flow sitometride kullanılabilir.

**MP30:** MP30, sonlandırıcı kaspazların bir başka hedef molekülü olan sitokeratin-18'e spesifik olarak bağlanan monoklonal bir antikordur. Bu antikor tek hücrede veya doku kesitlerinde immünohistokimyasal yöntemlerle apoptozisin belirlenmesinde faydalıdır.

**Flow sitometri:** Flow sitometri, apoptozisin erken dönemindeki değişikliklerin tespit edilmesinde yaygın olarak kullanılır. Apoptozisin belirlenmesi için PI boyama ile hücrenin DNA içeriği ölçülebilir. Floresan madde olan FITC ile pek çok antikor işaretlenerek flow sitometri ile değerlendirilebilir. Bu antikorlar arasında aktif kaspazlar, annexin V yer alır.

### 2.3.3.5.5. Apoptozis'in Spesifik Mediatörlerin Saptanması

#### 2.3.3.5.5.1. Plazma Membranında Bulunan Spesifik Mediatörler

**Fas, FasL, TRAIL-L, TRAIL-R, TNF- $\alpha$ :** Fas/TRAIL aracılı apoptozis, monoklonal agonist antikolar olan CH-11 ve solubl rekombinant TRAIL/Ap2L (rTRAIL) tarafından indüklenebilir. Benzer şekilde TNF- $\alpha$ 'nın rekombinant formu TNF aracılı apoptozisi başlatmak için kullanılabilir. Membrana bağlı reseptörler olan Fas, TRAIL ve TNF' ye karşı monoklonal antikolar ticari olarak mevcuttur ve immünohistokimyasal yöntemde veya FITC ile konjuge olarak flow sitometride kullanılabilirler. Immünohistokimyasal yöntemler hücrelerin membranları üzerinde yer alan bu antikoların varlığının tespitinde kullanılabilir.

**Fosfatidil serin:** Apoptozisin erken safhasında, PS plazma membranının iç yüzünden dış yüzüne doğru hareket ederek fagositik hücrelerin apoptotik hücreyi tanımasını sağlar. Annexin V, PS'yi bağlayarak flow sitometri veya floresan mikroskopu ile apoptotik hücrenin tespit edilmesini sağlar.

**Seramid:** Seramid, sfingomiyelinin katalitik hidrolizinin bir yan ürünüdür. Seramid, DNA parçalanmasına ve hücre ölümüne yol açan ikinci mesajcıdır. Bu işlem ,en azından kısmen, plazma membranında TNF- $\alpha$ 'nın sfingomiyelinaz ile birleşmesiyle olur. Seramid ayrıca nukleer faktor kappa B (NF $\kappa$ B) aktivitesini artırır.

#### 2.3.3.5.5.2. Mitokondride Bulunan Spesifik Mediatörler

**Mitokondri potansiyeli:** Mitokondriyal disfonksiyon apoptozisin erken safhalarında ortaya çıkar ve azalmış membran potansiyeli eşlik eder. Mitokondri potansiyelindeki değişiklikler katyonik lipofilik boya CMTRos ve diğer floresan maddelerle değerlendirilebilir.

**Sitokrom-c:** Sitokrom-c'nin tespit edilebilmesi için monoklonal antikolar mevcuttur.

**SMAC/DİABLO:** Monoklonal antikolar mevcuttur

## **Seramid**

**Bcl-2 ailesi:** Bcl-2 ailesinin tüm üyeleri standart laboratuvar tetkikleri ile belirlenebilir ve western blot analizi ve immünohistokimyasal yöntemler için ticari monoklonal antikorlar mevcuttur.

**Apoptozis indükleyici faktör:** AIF ye karşı immünohistokimyasal yöntemler ve western blot analizinde kullanılabilen monoklonal antikorlar mevcuttur.

### **2.3.3.5.5.3. Stoplazmada Bulunan Spesifik Mediatörler**

**Kaspazlar:** Tüm kaspazlara yönelik monoklonal antikorlar ticari olarak mevcuttur. Sonlandırıcı kaspazlar için bir başka hedef molekül sitokeratin 18 (CK-18) dir. Ticari olarak mevcut M30 antikoruna, CK-18 içerisindeki spesifik kaspaz ayrılma bölgesini tanıır. Bu antikor tek bir hücrede ve doku kesitlerinde immünohistokimyasal yöntemlerle apoptozisin gösterilmesine olanak sağlar.

**Apoptozom:** Apoptozom içinde yer alan Apaf-1 130 kDa lık bir proteindir ve ticari olarak monoklonal antikoruna mevcuttur.

**Apoptozis inhibitörleri:** Apoptozis inhibitör protein (AIP) ailesine karşı monoklonal antikorlar mevcuttur.

**Isı şok proteinleri:** spesifik ısı şok proteinlerine karşı otoantikorlar mevcuttur.

**NFκB:** Tespiti için antikorlar mevcuttur. NFκB nin hücre içinde bulunduğu yer önemlidir. Eğer nükleusta tespit edilirse bu aktive olduğunu gösterir. NFκB nin apoptozisteki rolünün belirlenmesinde immünohistokimyasal yöntemler, western blot analizine üstündür.

**Proteozom:** Farklı proteozom parçalarının saptanmasına yönelik monoklonal antikorlar mevcuttur.

### **2.3.3.5.6. Mikroarray Analizi**

Mikroarray analizi tek bir deneyde binlerce genin ekspresyon derecelerinin (mRNA'larının) tespitini yapma olanağı sunan güçlü bir yöntemdir. Apoptozis yolundaki pek çok gen mikroarray analizi için deneysel çalışmalara alınma kriterlerini karşılayamaz ancak RT-PCR ve western blot analizleri ile apoptozis süreci sırasında

biyolojik olarak aktif genler tespit edilmiştir. Bununla beraber mikroarray analizi spesifik malignensilerde apoptotik genlerin tanımlanmasında kullanılır.

### **2.3.3.5.7. RNA karıştırma çalışmaları**

RNA karıştırma çalışmaları ile apoptozis sürecinde yer alan spesifik genler üzerinde çalışılabilmesi olanaklı kılınmıştır. RNA karıştırma çalışması protein sentezinin kromatinin yeniden şekillendirilmesi ile mRNA'nın susturulmasına bağlı olarak engellenmesine dayanır. Bu teknik, FLIP, Bcl-2, Bcl-xL, survivin, ve XIAP gibi apoptotik proteinlerin çalışılmasında kullanılmıştır. Kitleri ticari olarak mevcuttur. Kullanılacak kit susturulacak RNA'ya bağlı olarak değişir. Mikroarray yöntemi ile siRNA (short interfering RNA) beraberce kolon kanserindeki önemli genlerin tespitinde kullanılmıştır<sup>103</sup>.

## **2.4. KOAH'da Apoptozis**

### **2.4.1. Giriş**

Apoptozis sürecindeki bozukluğun KOAH patogenezindeki rolü artan bir biçimde araştırılmaktadır. KOAH başladıktan sonra, sigara bırakılsa bile alveol epitel hücrelerinde ve T hücrelerinde apoptozisin artarak devam etmesi, sigara dumanından başka bazı faktörlerin de KOAH'da gözlenen apoptoziste etkili olduğunu akla getirmektedir<sup>3,8</sup>. KOAH'ta kronik inflamatuvar yanıtın devam etmesini sağlayan faktörlerin, artmış apoptozise de katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. KOAH'ta kronik inflamatuvar yanıtın devam etmesini sağlayan faktörlerin, artmış apoptozise de katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Bu faktörler arasında artmış nötrofil sayısı, sitotoksik T-hücreleri, Fas aktivasyonu, TNF- $\alpha$  ve TGF $\beta$ 'nın neden olduğu oksidatif stres ve poteolitik enzimlerin salınımında artış ve hava yollarında bakteri kolonizasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan inflamatuvar yanıtlar yer almaktadır<sup>104,105,106,107,108</sup>. Ayrıca, apoptotik stimulusu hücre cevabında genetik olarak oluşan değişikliklerin de KOAH'da gözlenen apoptozis artışına katkıda bulunabileceği ileri sürülmektedir<sup>109</sup>.

KOAH'da broş epitel hücrelerinde, alveol epitel ve endotel hücrelerinde, bronşiyal ve alveoler T lenfositlerde apoptozis artışı saptanmışken<sup>3</sup>, hava yollarındaki nötrofil apoptozisinde değişiklik olmadığı yapılan tek bir çalışmada gösterilmiştir<sup>11</sup>. KOAH'lı hastaların hava yolu makrofaj apoptozisi konusunda yayınlanmış bir çalışma bulunamamıştır.

KOAH'da akciğerlerin apoptotik temizleme mekanizmalarının etkinliğinin azaldığı ve makrofajların apoptotik hücreleri tanıyıp temizlemesinde bir yetersizlik olduğu yönünde kanıtlar mevcuttur<sup>84,85,86</sup>. Apoptotik hücrelerin yeterince temizlenememesi; bu hücrelerin post-apoptotik sitolize (sekonder nekroz) uğramalarına ve apoptotik yapısal hücrelerin yerlerinin yeni hücrelerce doldurulmasında engellenmeye neden olabilir. Postapoptotik sitoliz ise; TNF- $\alpha$ , IL1, IL6, IL8 gibi proinflamatuvar mediatörlerin salınımlarında artış sonucu oluşan inflamasyona, proteinazlar ve proimmünojenik maddelerin salınımlarında artışa yol açabilir.

KOAH'da gözlenen parankimal hücre ölümünün (apoptozis), apoptotik hücrelerin yeterince temizlenememesinin neden olduğu sekonder sitolizin ve hücre sel onarım ve yenilenmenin bozulmasının KOAH'a özgü akciğer dokusunda harabiyet (amfizem) ve küçük hava yollarının yapı ve fonksiyonlarında bozulmaya neden olduğu ileri sürülmektedir<sup>2</sup>.

#### **2.4.2. Normal Hava Yolu Tamir Mekanizması**

Akciğer hasarı epitelde fiziksel değişikliklere yol açar. Bazal membranın üzerinde yer alan hücrelerin kaybı, bazal membranın, hasar sonucu oluşan inflamasyona maruz kalmasına sebep olur. Normal hava yolunda hasarlı epitelin onarımı oldukça düzenli bir işlemdir. Fibrin ve fibronektin içeren plasma proteinlerinden türeyen geçici matriks hızla oluşur. Rezidüel bazal hücrelerden inflamatuvar yanıtı başlatan sitokinler (örn: IL-8 ve TNF- $\alpha$ ) ve fibronektin ile kollajen oluşumunu arttıran sitokinler ( TGF- $\beta$ ) salınır. Aynı zamanda, EGF, MCP-1, GM-CSF gibi sitokinler hasarlı bölge sınırındaki havayolu epitel hücrelerinin farklılaşma ve çoğalmalarını sağlarlar. Epitel hücreleri düzleşerek hasarlı bölgenin üzerini örtmek üzere geçici matriks boyunca göç ederler ve daha sonra çoğalan epitel hücreleri bu bölgede birikir (epitel hücre hiperplazisi). TGF- $\beta$ 'nın havayolu epitel hücre kültürlerinde fenotipik değişiklikleri başlatabileceği rapor

edilmiş ve in vivo olarak da bu değişikliklere yol açabileceği öne sürülmüştür. Normal epitelyal yapının sağlanması, birikmiş olan farklılaşmış epitel hücrelerinin normal görünüm kazanmaları ile olur.

Hasar sınırlı olduğu zaman onarım süreci hızlıdır. Epitel hasarının hemen ardından hasarlı bölge sınırındaki sekretuar ve silyalı epitel hücreleri farklılaşır, düzleşir ve bazal membran üzerine hızla göç ederler (2-3 mikron/dk). 8-15 saat içerisinde hasarlı bölgenin tamamı düzleşmiş epitel ile kaplanır. 30 saatte sağlam bir epitel bariyeri oluşur ve 5 gün içerisinde epitel tamamen normale döner.

Onarım mekanizmasında rol oynayan anahtar işlemlerden birisi de hiperplastik fazda aşırı biriken hava yolu epitel hücrelerinin uzaklaştırılmasıdır. Fazla olan hava yolu epitel hücrelerinin uzaklaştırılmalarının altında yatan hücresel mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. Ancak, bu hücrelerin uzaklaştırılmaları, büyük olasılıkla, bazal membrana tutunamayan hücrelerin apoptozisi ve daha sonra apoptotik parçaların komşu makrofajlar tarafından tanınarak fagositoz ile ortadan kaldırılmalarıyla gerçekleşmektedir.

### **2.4.3. KOAH'da Apoptozis ve Etkileri**

#### **2.4.3.1 Apoptotik Hücre Artışı**

##### **2.4.3.1.1. Bronş Epitel Hücrelerinde**

Yapılan tek bir çalışmada KOAH'lı hastalarda kontrol grubuna göre apoptotik bronş epitel hücrelerinin hem yüzdesinin hem de sayısının daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada kullanılan teknikler ile epitelyal hücre apoptozisinde ortalama artış yaklaşık % 87 olarak bulunmuştur. KOAH'lı hastaların BAL ve 2-4 mm. çapındaki hava yollarından elde edilen bronş fırçalama materyallerinin kullanıldığı bu çalışmada bronş epitel hücrelerinde apoptozisin arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada apoptotik hava yolu epitel hücre artışı ile beraber nekrozun göstergesi olan LDH artışı da gösterilmiştir<sup>4</sup>. KOAH'da apoptotik bronş epitel hücrelerinin yeterince temizlenememesi, bu hücrelerin sekonder nekroza uğramalarına ve nekroza bağlı

inflamasyon artışına neden olarak hava yollarının yapı ve fonksiyonlarında bozukluğa neden olabilir<sup>2</sup>.

#### **2.4.3.1.2. Alveoler Epitel ve Endotelyal Hücrelerde**

Yapılan bir çalışmada, KOAH hastaları ile kontrol grubunun akciğer doku parçaları karşılaştırılmış ve endotel hücre apoptozisinin KOAH'lı grupta daha fazla arttığı gösterilmiştir<sup>110</sup>. Amfizemli hastalar ile amfizemi olmayan kontrol grubunun akciğer dokularının karşılaştırıldığı çalışmalarda amfizemli hasta grubunun alveoler epitel hücre apoptozisinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğu gösterilmiştir.<sup>111,112,113,114</sup>.

Amfizemli hastalar ile amfizemi olmayan kontrol grubunun karşılaştırıldığı bazı çalışmalarda alveoler hücre apoptozisi ile beraber hücre çoğalması da değerlendirilmiştir. Bu çalışmalarda alveolar hücre çoğalmasında artış olduğu veya değişiklik olmadığı bildirilmiştir<sup>111,112,113</sup>.

Bazı otörler, endotel devamlılığını sağlayan vasküler endotel büyüme faktörü gibi faktörlerin (VEGF: vascular endothelial growth factor) eksikliğinin, alveol septalardaki endotel hücre apoptozisine neden olarak amfizem patogenezinde katkıda bulunabileceği hipotezini öne sürmüşlerdir<sup>3</sup>. Yapılan çalışmalarda, amfizemli hastaların akciğer dokusunda VEGF salınımında ve vasküler endotel büyüme faktörü reseptör (VEGFR) proteini sunumunda azalma olduğu<sup>3</sup> ve KOAH'lı hastaların indükte balgamlarında hastalığın şiddeti ile paralel olarak VEGF seviyesinin azaldığı gösterilmiştir<sup>115</sup>. Buna karşılık VEGF plazma seviyesinde düşüşe yol açan VEGF gen polimorfizminin KOAH gelişimi ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir<sup>116</sup>.

KOAH'da alveoler yapısal hücrelerdeki hücre çoğalması, bu hücrelerde meydana gelen apoptozisi dengeleyebilecek kadar çok olmamaktadır. Bu durum, akciğer dokusunda harabiyet ve amfizem gelişimine neden olmaktadır<sup>3</sup>.

#### **2.4.3.1.3. T Lenfositlerde**

KOAH'lı hastaların BAL, bronş fırçalama ve dolaşımdaki kan örneklerinin kullanıldığı çalışmalarda hava yolları ve alveollerde T hücrelerinde apoptozisin arttığı gösterilmiştir<sup>4,5,6,7</sup>.

Yapılan bir çalışmada, KOAH'ta BAL sıvısındaki apoptotik T-hücre sayısındaki artışın yaklaşık %103 olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada KOAH hastalarında sekonder nekrozun göstergesi olan LDH düzeyinin yükseldiği de gösterilmiştir<sup>4</sup>. Akciğerlerde artmış sayıda bulunan apoptotik T hücreleri etkin biçimde temizlenmezlerse sekonder nekroza giderek KOAH'taki kronik inflamatuvar yanıtta katkıda bulunabilirler. Ek olarak T hücre apoptozisinin artması ile immün yanıtta değişiklikler meydana gelebileceği ve bu değişikliklerin KOAH' ta enfeksiyon sıklığının artmasına yol açabileceği de düşünülebilir<sup>8</sup>.

#### **2.4.3.1.4. Makrofajlarda**

KOAH'lı hastaların akciğerlerindeki makrofaj apoptozisi konusunda yayınlanmış bir çalışma bulunamamıştır.

#### **2.4.3.1.5. Nötrofillerde**

KOAH'lı hastaların akciğerlerindeki nötrofil apoptozisinde değişiklik olmadığı yapılan tek bir çalışmada gösterilmiştir<sup>11</sup>. KOAH alevlenme dönemlerinde ise nötrofil apoptozisinin belirgin olarak azaldığı ve nötrofil sayısında belirgin artış olduğu gösterilmiştir<sup>10,36</sup>. Nötrofil apoptozisinde gözlenen bu durum, KOAH alevlenmelerinin gelişiminde nötrofil apoptozisinin rolü olabileceğini düşündürmektedir<sup>8</sup>.

#### **2.4.3.2. Apoptotik Hücrelerin Tanınması ve Sonuçları**

Apoptotik hücrelerin efferositozis adı verilen fagositoz yoluyla uzaklaştırılmaları, tek bir reseptör ve sinyal yolu kullanılarak gerçekleşir. Apoptozise uğrayan hücreler; makrofaj ve dentritik hücreler gibi fagositik sistemin profesyonel fagositleri yanında

fibroblastlar, endotel, epitel, düz kas ve stromal hücreler gibi değişik doku tipleri tarafından fagositoz yoluyla hızla uzaklaştırılırlar.

Apoptotik hücrelerin tanınması, şu sonuçları doğurur;

1. Apoptotik hücrelerin uzaklaştırılmalarını sağlar,
2. Antiinflamatuvar mediatörlerin ( TGF- $\beta$ , IL10, PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated reseptör gama), prostoglandin (PG) E<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) salınımına neden olarak bu işlemin dokularda en az zarara neden olarak sessizce yapılabilmesini sağlar,
3. SLPI (lökosit proteinaz sekresyon inhibitörü) gibi antiproteinazların salınımını tetikler,
4. Hasarlanmış olan endotel ve epitel hücrelerinin yenilenmelerini, normal yapı ve fonksiyon kazanmalarını sağlar. Bunları, apoptotik hücrelerin fagositler tarafından tanınması sonucu salınımı artan HGF (hepatocyte growth factor), TGF- $\beta$  ve VEGF (vascular endothelial growth factor) gibi büyüme faktörleri ve apoptotik hücre tanınması sonucu artan anjiyogenezis aracılığıyla gerçekleştirir<sup>2</sup>.

#### **2.4.3.3. KOAH'ta Fagositik Temizlenmede Azalma ve Sonuçları**

KOAH hastalarının akciğerlerinde apoptotik temizleme mekanizmalarının etkinliğinin azaldığı ve makrofajların apoptotik hücreleri tanıyıp temizlemesinde bir yetersizlik olduğu yönünde kanıtlar mevcuttur. Bu defektlere yol açabilecek potansiyel mekanizmalar arasında apoptotik hücrelerin tanınmasındaki veya efferosit sinyal yolundaki bozulmalar düşünülebilir; Bu bozukluklara, proteinazlar, kollektinler, TNF- $\alpha$ , oksidanlar ve sigara dumanı aracılık edebilir.

Proteinazlar (nötrofil elastaz ve MMP12) apoptotik hücrelerin tanınmasını; apoptotik hücre yüzeyinde veya makrofajlar üzerinde bulunan sorumlu reseptörlerin yapısını bozarak engelleyebilir<sup>117</sup>. Nötrofil elastazın kistik fibrozisteki yetersiz apoptotik hücre temizlenmesinde rolü olduğu gösterilmiştir.

Doğal immun sistemin kollektin ailesinden olan akciğer kollektinlerinin (sürfaktan protein (SP)-A ve SP-D), efferositler üzerindeki lipoprotein reseptör ilişkili proteini (LRP) aktive ederek apoptotik hücrelerin uzaklaştırılmasını desteklediği gösterilmiştir. Sp-A ve SP-D'nin, akciğerlerde önemli antiinflamatuvar fonksiyonları da vardır. Antiinflamatuvar etkilerini; membran sinyal inhibitör alfa'yı (SIRP  $\alpha$ ) aktive

etmeleri sonucunda oluşan inflamatuvar mediatör salınımının baskılanması aracılığıyla gerçekleştirirler. İn vivo olarak SP-D -/- farelerde akciğerlerdeki apoptotik hücre temizlenmesinde bozukluk olduğu gösterilmiştir. Yine sigara içenlerin akciğerinde SP-A ve SP-D düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir.

KOAH'ta TNF- $\alpha$  düzeyinin serumda ve balgamda arttığı gösterilmiştir. TNF- $\alpha$ 'nın makrofajların apoptotik hücreleri almasını in vitro olarak ve akciğerlerden apoptotik hücrelerin uzaklaştırılmasını ise in vivo olarak inhibe ettiği bazı yayınlanmamış çalışmalarda gösterilmiştir.

Oksidanlardaki artış veya TNF- $\alpha$ 'nın neden olduğu hücre içi oksidan artışının efferositozu inhibe ettiği ve aynı zamanda amfizeme neden olabildiği gösterilmiştir.

Sigara dumanı, in vitro olarak apoptotik hücre alımını direk olarak inhibe eder. İyi bilinen proamfizematöz etkileri olan sigara dumanı ve proteinazlara ek olarak, SP-D -/- veya TNF- $\alpha$  üretimi çok fazla olan farelerin akciğerlerinde alveoler genişleme gösterilmiştir.

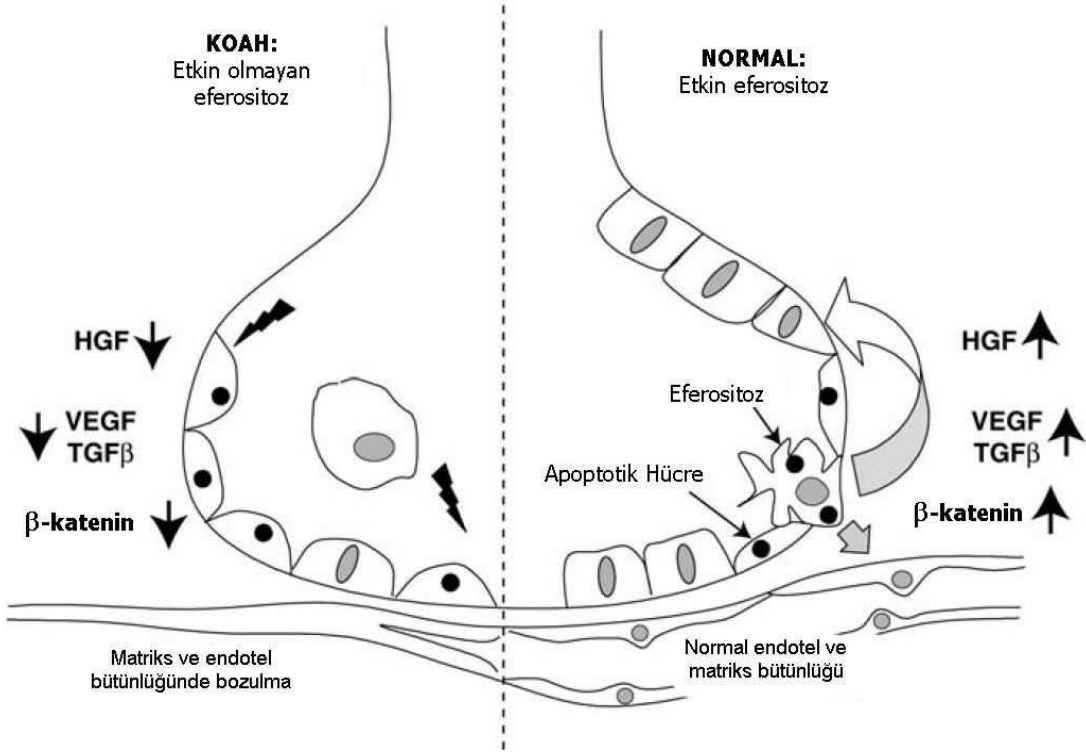
Apoptotik hücre temizleme defekti, sigara bırakıldıktan uzun süre sonra da devam eder. Bu, apoptotik hücrelere karşı hücreyel yanıtta genetik değişiklikler meydana gelmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Bozulmuş olan apoptotik hücre tanınması, KOAH patogenezinde öneme sahip pek çok duruma yol açabilir; Apoptotik hücrelerin etkin biçimde uzaklaştırılmamaları, sekonder nekroz ile sonuçlanabilir ve bu durum bazı proteolitik enzimlerin, TNF- $\alpha$ , IL1, IL6, IL8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve hatta proimmünojenik maddelerin salınımına neden olabilir. Ayrıca, zarar görmüş endotel veya epitel hücrelerin uzaklaştırılmalarındaki yetersizlik, apoptotik hücrelerin yenilenmelerini de engeller

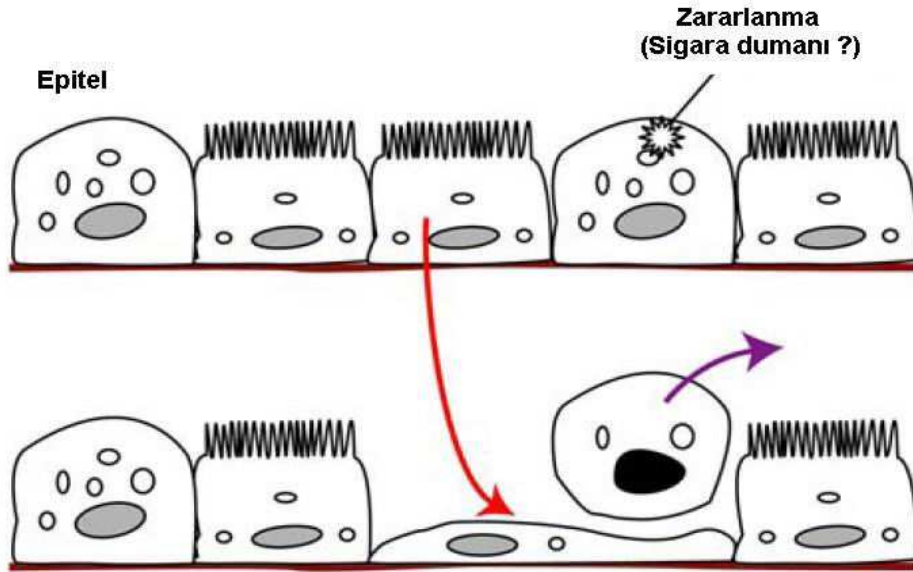
Bozuk efferositoz ve apoptotik hücre tanınmasının alveollerde amfizematöz değişikliklere yol açmasının muhtemel mekanizması şekil 6 'da gösterilmiştir. Apoptotik hücrelerin tanınması, daha çok HGF ve VEGF aracılığıyla hasarlanmış olan endotel ve epitel hücrelerinin yenilenmelerini, normal yapı ve fonksiyon kazanmalarını sağlar. HGF'nin proteinazlarla indüklenen alveol hasarı olan hayvanlara verildiğinde alveol yapısını onardığı ve HGF ile VEGF düzeyinin KOAH hastalarının akciğerlerinde azaldığı gösterilmiştir.

Eldeki verilerin çoğu küçük hava yolu değişikliklerinden çok akciğer parenkimi ve amfizem ile ilişkilidir . Küçük hava yollarında da benzer süreçlerin ve değişikliklerin

olduğu öne sürülsede bununla ilişkili direkt kanıtlar yetersizdir. Yapılan iki çalışmada, küçük hava yolu epitel hücrelerindeki hasarın, silyalı epitel hücreleri tarafından; silyalı epitel hücrelerin intermediate evre olan squamöz hücre duruma kadar farklılaşması ile onarıldığı ve hasarlı hücrenin altına yerleştiği gösterilmiştir<sup>2,117</sup> (Şekil 6).



Şekil 6. Normal akciğerlerde ve KOAH'lıların akciğerinde apoptotik hücrelerin tanınması



Şekil 7. KOAH'da silyalı epitel hücrelerinde apoptozise cevap olarak oluşan değişiklikler.

#### **2.4.4. KOAH'da Apoptozisin Değişik Patogenetik Yollarla İlişkisi**

KOAH gelişiminde farklı patogenetik mekanizmalar rol oynar: inflamasyon, proteinaz/anti-proteinaz imbalansı ve oksidatif stres. Apoptozis, hastalığın daha da kompleks hale gelmesine yol açacak şekilde bu mekanizmalar ile etkileşime girer.

##### **2.4.4.1. Apoptozis ve İnflamasyon**

Birkaç hayvan modelinde, alveol duvarı veya endotel hücre apoptozisinin, inflamatuvar hücre birikimi olmaksızın direk olarak pulmoner amfizeme yol açabileceği gösterilmiştir. Bunun yanında, KOAH hastalarının akciğerlerinde inflamatuvar hücreler belirgin olarak artmıştır ve inflamatuvar ve apoptotik mekanizmalar arasında etkileşim olasılığı oldukça fazladır.

KOAH'da kontrol grubuna göre alveoler makrofajlar, apoptotik hava yolu epitel hücrelerinin fagositozunda daha etkisizdirler. Bu durum KOAH'taki artmış aktive nötrofil sayısı ile ilişkili olabilir. Nötrofil elastazın; makrofaj üzerindeki fosfatidil serin reseptöründe bölünmeye yol açarak apoptotik hücrelerin temizlenmesinde yetersizliğe yol açtığı gösterilmiştir.

Nötrofil ve makrofajlara ek olarak, KOAH'lı hastaların akciğerlerinde CD8+ T-lenfositlerde de artış vardır. Bu sitotoksik CD8+ T-hücreleri perforinler, granzim-B ve TNF- $\alpha$  salgılayarak alveol epitel hücrelerinde apoptozise yol açarlar<sup>3</sup>.

##### **2.4.4.2. Apoptozis ve Proteinaz-Antiproteinaz Dengesizliği**

KOAH hastalarının akciğerlerindeki proteolitik aktivite artışı, apoptozis ile pek çok farklı şekilde etkileşebilir. Bazal membran, hücrelerin canlılığını devam ettirebilmeleri için gerekli bazı sinyaller içerir ve MMP'ler tarafından bazal membranın yıkımı sonucunda bu sinyallerde oluşan kayıp, apoptozise yol açabilir. Uygun hücre-matriks temasının kaybına bağlı olarak görülen apoptozis, sirkülasyonu yüksek olan epitelyal dokulardaki hücrelerin sabit sayıda kalmasını sağlayarak doku homeostazında görev alır. Apoptozis, ölüm indükleyici sinyallerin direkt olarak proteolizinden de etkilenebilir. MMP-7' nin epitel hücreleri tarafından üretilen Fas ligandını aktive ettiği,

böylece apoptozise aracılık ettiği gösterilmiştir. Son olarak, MMP-8 in inflamatuvar hücre apoptozisini düzenleyerek hava yolu inflamasyonu üzerinde anti-inflamatuvar etkileri olduğu öne sürülmüştür<sup>3</sup>.

#### **2.4.4.3. Apoptozis ve Oksidatif stres**

Oksidatif stresin yoğun olduğu akciğer alanlarında apoptozisin fazla olduğu ve deneysel olarak apoptozisin bloke edilmesi ile oksidatif stres belirteçlerinin salınımında belirgin azalma olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Yine, antioksidan bir bileşiğin uygulanması ile alveol hücre apoptozisinin ve hava yolu genişlemesinin önlendiğinin gösterilmesi, oksidatif stres ile apoptozis arasında pozitif geri bildirim olduğunu düşündürmektedir. Antioksidan gen sentezi bozulmuş farelerde apoptotik alveoler septal hücre sayısında artış olduğu ve sigara dumanına bağlı olarak erken ve yaygın amfizem geliştiği gözlenmiştir. Oksidatif stres düzeyinde artış ile KOAH hastalarının balgam örneklerindeki VEGF düzeylerindeki azalma arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Bu değişikliğin hastalığın ciddiyeti ile arttığı gösterilmiştir. Bu bulgular oksidan-antioksidan dengesizliği ile KOAH hastalarının akciğerlerindeki VEGF bağımlı alveol duvar homeostazisi arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Sonuçta, oksidatif stresin yol açtığı epitel hücre hasarının akciğer VEGF düzeyini azaltarak KOAH gelişimine yol açtığı hipotezi öne sürülmüştür.

Bu veriler, apoptozisin KOAH gelişiminde tek etken olmadığını ve altta yatan başka mekanizmalar ile etkileştiğini açıkça ortaya koymaktadır<sup>3</sup>.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

KOAH'da havayolu epitel hücrelerinin ve inflamatuvar hücrelerin (lenfosit, nötrofil ve makrofaj) apoptozisini araştırmak amacıyla Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalında 2007 Mart ile 2007 Haziran ayları arasında bronkoskopi yapılan sigarayı bırakmış ve hala içmekte olan sağlıklı ve KOAH'lı bireyler incelenmiştir.

Semptomları nedeniyle Göğüs Hastalıkları Anabilimdalı polikliniğine başvuran ve yapılan incelemeler sonucu, kronik öksürük etyolojisi, hemoptizi etyolojisi veya akciğer kanseri kuşkusunu ile bronkoskopi yapılmasına karar verilen hastaların bronkoskopi işlemi sırasında sağlam akciğer tarafından endobronşiyal mukoza örnekleri alınmıştır. Bronkoskopik işlem için tüm hastalardan onam alınmıştır.

Bronkoskopi yapılanlardan son dört hafta içerisinde üst ya da alt solunum yolu enfeksiyonuna ait belirtiler olanlar, deri testinde atopi, IgE yüksekliği, periferik kan eozinofilisi, astım, egzema ve alerjik rinit öyküsü olan bireyler çalışma dışı bırakılmıştır. Buna ek olarak KOAH'ı bulunanlardan son dört hafta içinde şikayetlerinde artma veya ilaç dozunda artmış kullanım olanlar ve son bir ay içinde inhale steroid kullanıyor olanlar da çalışmaya alınmamıştır. Bronkoskopiye tolere edemeyenler ve işlem sırasında yeterince biyopsi alınamayanlar da çalışma dışı bırakılmıştır.

#### **İncelenen çalışma grupları ve özellikleri:**

Bronkoskopi işlemi yapılan hastalar , sigara içme öyküleri ve geri dönüşümsüz hava akımı kısıtlaması varlığına göre dört grupta incelenmiştir.

a) Sigara içmeyi bırakmış sağlıklı yetişkinlerden oluşan grup (grup- 1): En az 20 paket yıl sigara içme öyküsü olan ve en az bir yıldır sigara içmeyen, solunum fonksiyon testleri normal 11 yetişkinden oluşmuştur.

b) Sigara içen sağlıklı yetişkinlerden oluşan grup (grup- 2): En az 20 paket yıl sigara içme öyküsü olan ve halen sigara içmeye devam eden, solunum fonksiyon testleri normal 33 yetişkinden oluşmuştur.

c) KOAH'lı ve sigara içmeyi bırakmış hasta grubu (grup- 3): En az 20 paket yıl sigara içme öyküsü olan ve en az bir yıldır sigara içmeyen, uygun klinik özelliklerin

yanında solunum fonksiyon testinde bronkodilatasyon sonrası FEV<sub>1</sub>/ FVC değeri < % 70 olan 11 yetişkinden oluşmuştur

d) KOAH'lı sigara içmeye devam eden hasta grubu (grup- 4): En az 20 paket yıl sigara içme öyküsü olan ve halen sigara içen, uygun klinik özelliklerin yanında solunum fonksiyon testinde bronkodilatasyon sonrası FEV<sub>1</sub>/ FVC değeri < % 70 olan 20 yetişkinden oluşmuştur.

Çalışmaya katılan tüm bireylerin demografik özellikleri, hastalıkla ilgili bilgileri, kullandıkları ilaçlar kaydedilmiş, fizik muayene, PA akciğer grafisi, solunum fonksiyon testi, deri testi, serum total Ig E düzeyi, hemogram ve kan biyokimyasal testleri yapılmıştır.

Çalışmaya katılan hastaların solunum fonksiyon testleri, cilt testi ve bronkodilatasyon testi Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi (ÇÜTF) Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Solunum Fonksiyon Testi (SFT) laboratuvarında yapılmıştır. Solunum fonksiyon testi ATS kriterlerine uygun olarak Jeager marka spirometre cihazı ile yapılmıştır. Bronkodilatasyon testinde, hava haznesi ile 4 puff salbutamol (400 mcq) inhalasyonunu takiben 15 dakika sonra FEV<sub>1</sub>/ FVC (%), FEV<sub>1</sub> (%), FVC (%), FVC (%), lt) değerlerine bakılmıştır.

Hemogram,biyokimyasal testler, total IgE düzeyi incelemeleri Ç.Ü.T.F Merkez laboratuvarında yapılmıştır.

### **Bronkoskopi:**

Bronkoskopi işlemi, Ç.Ü.T.F. Göğüs Hastalıkları Polikliniği Bronkoskopi laboratuvarında yapılmıştır. Tüm bireylere bronkoskopi işlemi detaylı bir şekilde anlatılmış ve bireylerin onamı alınmıştır. Bireyler bronkoskopi günü sabahı son 12 saattir oral alımı keserek gelmişler, bronkoskopi işleminden 1 saat önce, 1 ampül atropin im. ve 1 ampül diazem i.m. yapılmıştır. işlemden ½ saat önce ise hastaya nebülize salbutamol ve nebülize lidokain inhale ettirilmiştir.

Orofarinkse lidokain ile lokal anestezi yapıldıktan sonra bronkoskopi işlemi Olympus LUCERA CV-260 (Japan) model fiberoptik bronkoskop ile yapılmıştır. Hastalar işlem süresince pulse oksimetre ile monitörize edilmişlerdir. Bronkoskopik biyopsiler lezyon olmayan akciğerlerden, sağda üst lob-intermedier bronş ayırım karinasından, solda ise üst lob-alt lob ayırım karinasından, rastgele seçilen 4-6 alandan alınmıştır. Alınan parçaların uygun büyüklükte ve kalitede olup-olmadığı kontrol

edilmiştir. Alınan parçalar formalin solüsyonu içinde fikse edilerek patoloji laboratuvarına ulaştırılmıştır.

### **Patolojik incelemeler:**

Yüzde onluk formalin solüsyonu içinde Patoloji Anabilim Dalına gönderilen biyopsi örnekleri, materyal toplama işlemi tamamlanana kadar aynı solüsyon içinde oda ısısında bekletildi. Daha sonra mevcut örneklerden parafin bloklar hazırlandı. Parafin doku bloklarından beş mikron kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Buna ek olarak kesitlere Avidin-Biotin kompleks immunoperoksidaz yöntemi ile Fas (Santa Cruz Biotechnology sc-715), Bax (Santa Cruz Biotechnology sc-7480) ve kaspaz 3 ( NCLL- CPP32 novocastra) antikorları uygulandı. Hazırlanan kesitler Nikon marka Optiphot-2 model ışık mikroskopu ile değerlendirildi.

H.E. ile boyalı preparatlarda apoptotik bronş epitel hücreleri ve epitel altındaki inflamatuvar hücreler değerlendirildi. Apoptotik inflamatuvar hücrelerin ışık mikroskopundaki morfolojik görünümleri benzer özellikler gösterdiği için H.E. boyama yöntemi ile bu hücrelerin alt grupları belirlenemedi. Bu nedenle H.E ile boyalı preparatlarda epitel altı lamina propriadaki apoptotik inflamatuvar hücreler (lenfosit, nötrofil, makrofaj, mast ve eozinofil) alt grupları belirlenmeksizin toplu olarak değerlendirildi. İmmunoperoksidaz yöntemi ile Fas, Bax ve kaspaz 3 antikorlarının uygulandığı preparatlarda ise bronş epitel hücrelerinin ve epitel altı lamina propriada bulunan lenfosit, nötrofil ve makrofaj ile sitomorfolojik olarak uyumlu hücrelerin bu antikorlar ile boyanma dereceleri değerlendirildi. Her üç antikor için de sitoplazmik boyanma paterni pozitif olarak kabul edildi. Hücreler gözleniyor, ancak boyanmıyorsa; grade 0, % 10 'dan daha az boyanma varsa; grade 1, % 10-% 50 arası boyanma varsa grade 2, >% 50 boyanma varsa grade 3 olarak değerlendirildi. Fas, Bax ve kaspaz 3 için pozitif oranların belirlenmesi amacıyla doku örneklerinde üç farklı 40 büyük büyütme alanı incelendi. Her alanda pozitif boyanmış bronş epitel hücreleri ve inflamatuvar hücrelerin alt grupları (lenfositler, nötrofiller ve makrofajlar) ayrı ayrı sayıldı ve sayılan her hücre tipi, alandaki toplam sayısına oranlanarak her hücre tipinin pozitif boyanma yüzdesi belirlendi. Üç alanda ayrı ayrı hesaplanan pozitif boyanma yüzdelerinin ortalaması alınarak gradeleme işlemi tamamlandı. H.E. için pozitif oranların belirlenmesi de benzer olarak yapıldı.

### **İmmunhistokimyasal işlem:**

1. Yüzde onluk formalinde tesbit edilen dokular, doku takip işleminden sonra bloklanarak 5 mikron kalınlığında kesilerek, 50 °C lik sıcaklıktaki su banyosuna kondu ve dokular özel polileyzinli lamlara alındı.

2. Hazırlanan kesitler 60 °C lik etüvde 45'-60' arası (parafin eriyene kadar) bekletildi, etüv içerisindeki ksilolde 10-15 dakika tutuldu. Daha sonra oda ısısında 3 ayrı ksilol şalelerinde her birinde ayrı, ayrı 5'şer dakika tutuldu, daha sonra oda ısısındaki 3 ayrı alkol şalelerinde, her birinde 5'er dakika tutularak deparifinize işlemi tamamlandı, distile suda iyice yıkandı.

3. Yüzde üç H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrojen peroksida) indistile sudaki solüsyonunda 6 dakika inkübe ederek endojen peroksidaz aktivitesi bloke edilmiş olundu.

4. İki ayrı şaledaki distile suda 1-2 dakika yıkandı.

5. 1µM EDTA (pH 8) Buffer solüsyonu içerisine mikrodalgaya dayanıklı şale içerisine slaytlar düzenli bir şekilde sıralanarak Beko 1550 model mikrodalga fırında medium konumunda 10'ar dakika iki kez inkübe edildi. Daha sonra oda ısısında buffer soğumaya bırakıldı.

6. Slaytlar pH'sı 7.2 ile 7.4 arası olan PBS (0.01M phosphate buffer saline) de 2-3 dakika yıkanarak doku çevresi, dokular kurutulmadan silindi. Bu slaytlar;

7. Nemli bir ortamda, düzgün bir şekilde yerleştirilerek; primer antikorlar damlatılarak üzeri kapatıldı. Oda ısısında 60 dakika tutuldu. (ortam ısısına göre bu süre uzatılabilir, 90 dakika).

8. PBS' de 2-3 dakika 2 ayrı şalede yıkandı. Doku çevresi dokular kurutulmadan tekrar silinerek nemli ortama düzgünce konuldu.

9. Biotin (second antibody) damlatılarak ağzı kapalı bir şekilde nemli ortamda 30 dakika inkübe edildi.

10. PBS'de 2 ayrı şekilde şalede 2-3 dakika yıkandı.

11. Doku çevresi silindikten sonra Strepte Aridin-HRİ damlatılarak oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. (nemli ortamda)

12. PBS'de 2 ayrı şalede 2-3 dakika yıkandı.

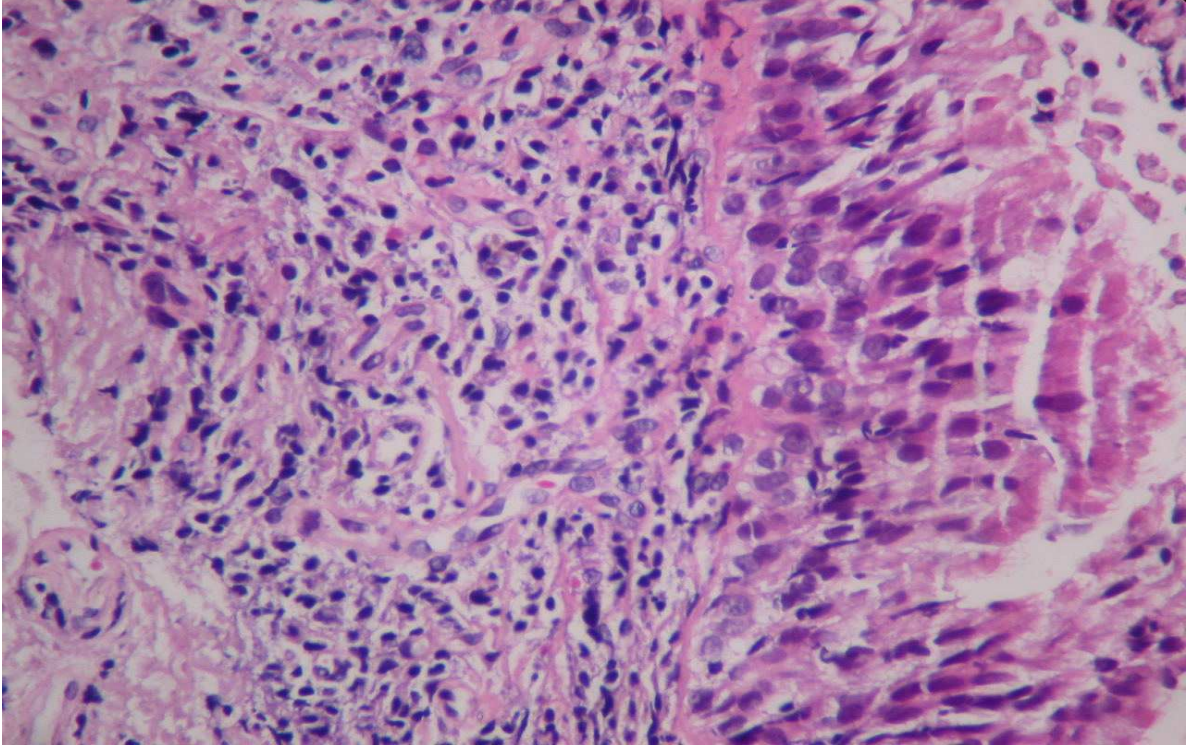
13. Doku çevresi silindikten sonra AEC Chromogen damlatılarak 5 ila 20 dakika arası mikroskopta boyanma olup olmadığı kontrol edilerek, buffer solüsyonuna alındı. Distile suda iyice yıkandı.

14. Mayer hematoksilen solüsyonu ile 5 dakika zıt boyama işlemi yapıldı.5-10 dakika musluk suyunda yıkandı, dokunun etrafı kurulanıp su bazlı kapama maddesi ile kapatıldı.

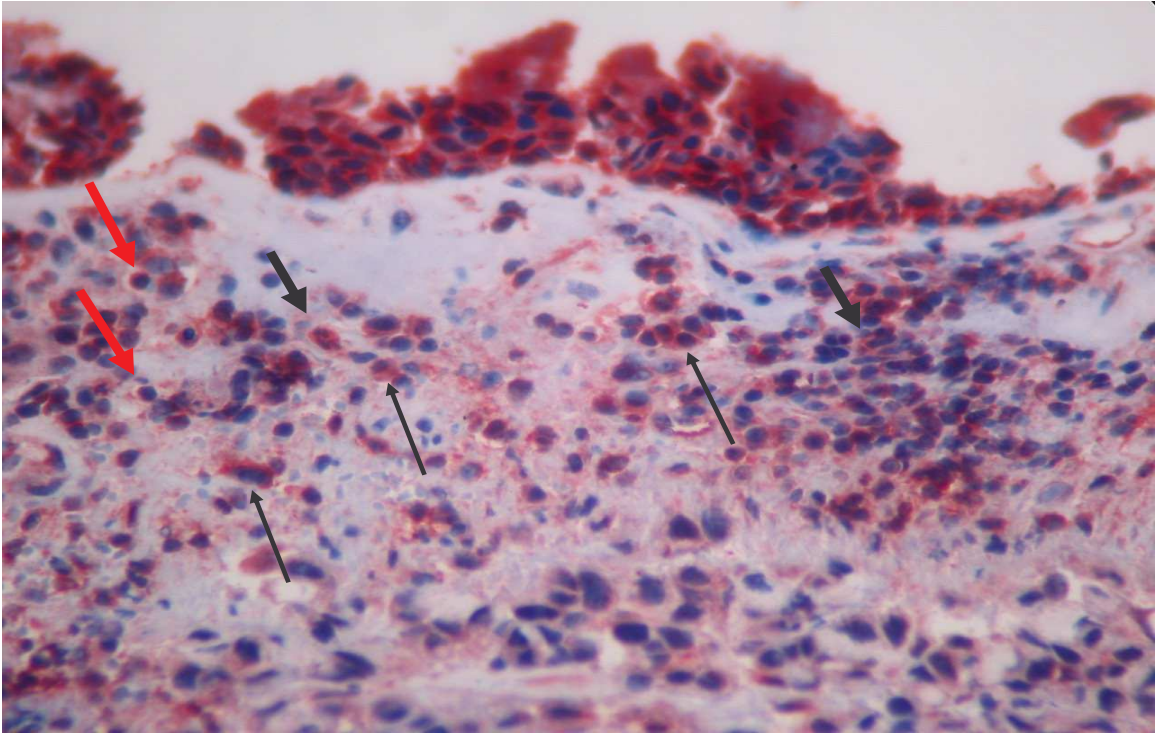
**Not:** Bax ve kaspaz 3 boyalarının ikisi de bu düzende çalışıldı. Fas için 5.sıradaki EDTA buffer yerine sitrat buffer [pH: 6] kullanılarak aynı işlem yapıldı ve sonra 6. aşamadan devam edildi. 7. sırada primer antikor olarak Fas için; 1/400 oranında dilüe edilmiş Fas (c-20) (Santa Cruz Biotechnology sc715); Bax için 1/700 oranında dilüe edilmiş Bax (B-9) ( Santa Cruz Biotechnology sc-7480); Kaspaz 3 için ise Caspase 3 (CPP32) (NCL-CPP32 Novocastra) kullanılmıştır.

### **İstatistiksel analiz**

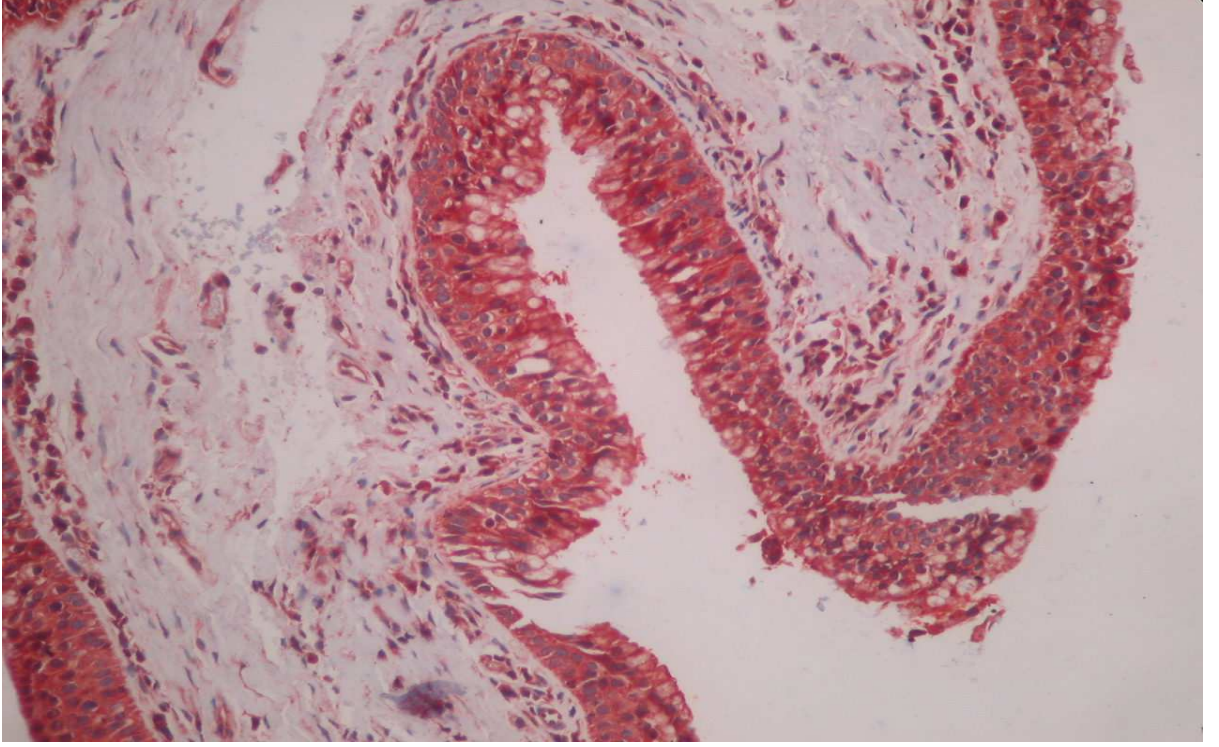
Verilerin normal dağılıma uygunluğu test edilmiş, normal dağılım gösteren sürekli değişkenlerin analizinde bağımsız gruplarda t testi ve tek yönlü varyans analizi, normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenlerin analizinde ise Mann whitney U veya Kruskall Wallis testi kullanılmıştır. Kategorik değişkenlerin analizinde ise ki-kare testi kullanılmıştır. Sürekli değişkenler arasındaki ilişki Spearman Rank testi ile analiz edilmiştir. Sonuçlar ortalama±standart sapma veya ortalama±SH (Standart Hata), medyan, n ve yüzde olarak ifade edilmiştir. p değerinin <0,05 olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalarda Bonferroni düzeltmesi yapılmıştır ve  $p < 0.017$  anlamlı olarak kabul edilmiştir ( $p < 0,10/n$ ; n= karşılaştırma sayısı).



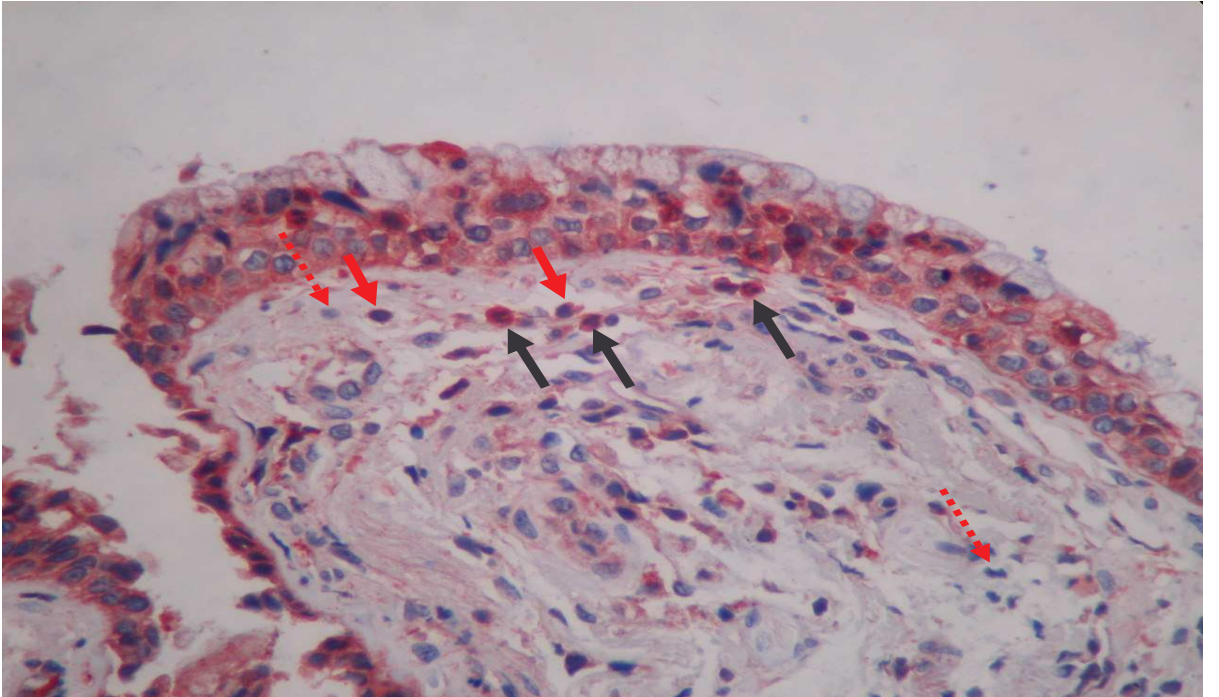
Şekil 8. Sigara içen KOAH'lı hastanın bronş duvarında Hematoksilen eozin ile epitelde Grade 2, subepitelyal inflamatuvar hücrelerde Grade 3 boyanma paterni (H.E.x400).



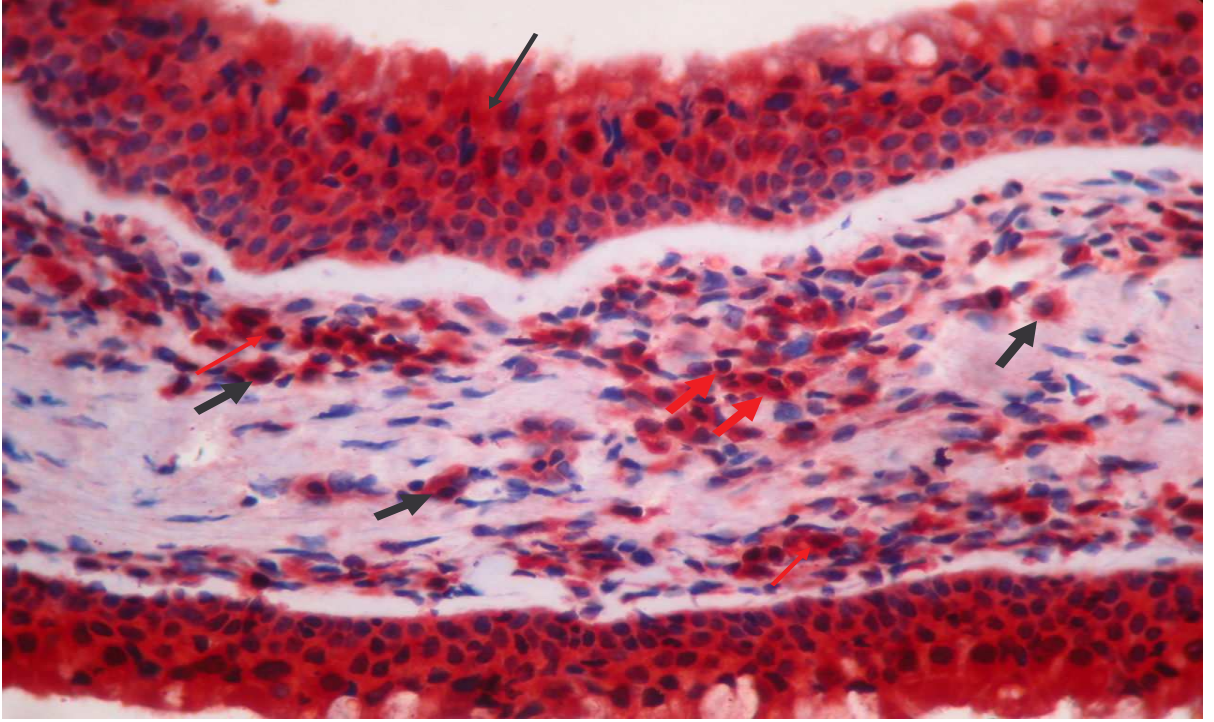
Şekil 9. Sigara içen sağlıklı bireyin bronş duvarında subepitelyal lenfositlerde, nötrofillerde ve makrofajlarda Fas ile Grade 3 boyanma paterni (İmmünohistokimya x400). Kırmızı ok: lenfosit, kalın siyah ok: nötrofil, ince siyah ok: makrofaj



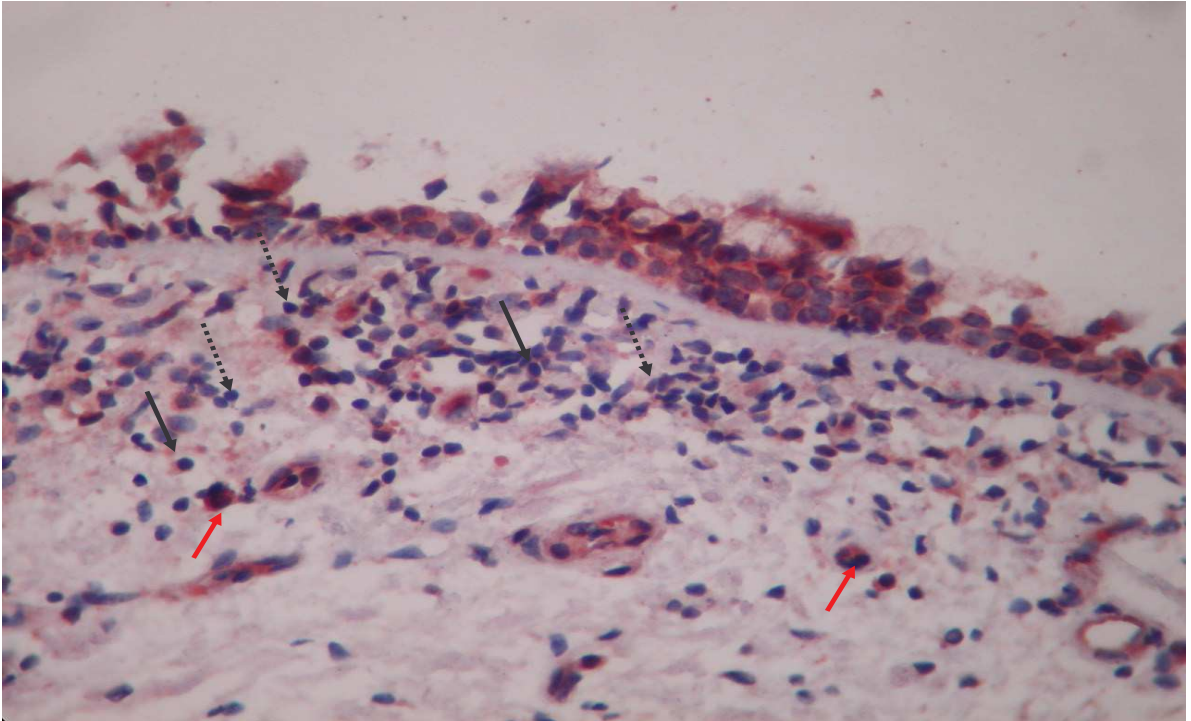
**Şekil 10.** Sigara bırakmış KOAH'lı hastanın bronş duvarında epitelde ve subepitelyal tüm inflamatuvar hücrelerde Fas ile Grade 3 boyanma paterni (İmmünohistokimiyax200).



**Şekil 11.** Sigara bırakmış sağlıklı bireyin bronş duvarında Fas ile lenfositlerde Grade 2, nötrofillerde Grade 3 boyanma paterni (İmmünohistokimiyax400). Kalın kırmızı oklar: Fas pozitif lenfosit, kesikli kırmızı oklar: Fas negatif lenfosit, kalın siyah oklar: nötrofil.



Şekil 12. Sigara içen sağlıklı bireyin bronş duvarında epitelde, subepitelyal lenfositlerde, nötrofillerde ve makrofajlarda kaspaz 3 ile Grade 3 boyanma paterni (İmmünohistokimya x 400). Siyah ince ok: epitel, siyah kalın ok:makrofaj, kırmızı kalın ok: lenfosit, kırmızı ince ok: nötrofil



Şekil 13. Sigara içen KOAH'lı hastanın bronş duvarında kaspaz 3 ile lenfositlerde Grade 1, nötrofillerde Grade 2 boyanma paterni (İmmünohistokimya x400). Kırmızı ok: kaspaz 3 pozitif nötrofil, kesiksiz siyah oklar: kaspaz 3 pozitif lenfosit, kesikli siyah oklar: kaspaz 3 negatif lenfosit



## 4. BULGULAR

Bu çalışmada; KOAH'da havayolu epitel hücreleri ve inflamatuvar hücrelerde (lenfosit, nötrofil ve makrofaj) aptozis varlığını araştırmak amacıyla Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalında 2007 Mart ile 2007 Haziran ayları arasında bronkoskopi yapılan 31 KOAH'lı ve 44 sağlıklı bireyin bronş mukoza biyopsi örnekleri incelenmiştir. Bronş mukoza biyopsi örneklerinde; bronş epitel hücreleri ve inflamatuvar hücrelerden lenfosit, nötrofil ve makrofajların apoptozis süreci iki farklı boyanma yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Önce Hematoksilen Eozin boyalı preparatlarda, daha sonra immünohistokimyasal yöntem ile anti-Fas, anti-Bax ve anti-kaspaz 3 antikörlerinin uygulandığı preparatlarda bronş epitel hücreleri, lenfosit, nötrofil ve makrofajlardaki apoptozis varlığı değerlendirilmiştir.

Çalışmada incelenen bireylerin özellikleri ve laboratuvar sonuçları toplu olarak Tablo 5'de gösterilmiştir. İncelenen bireyler sigara içme özelliklerine ve hava akımı obstruksiyonu varlığına göre 4 grupta değerlendirilmiştir. Bu çalışma gruplarının demografik ve klinik özellikleri ise Tablo 6'da gösterilmiştir.

Sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında KOAH'lı hastaların yaşları daha yüksek, akciğer fonksiyonları daha düşük bulunurken, diğer parametreler yönünden her iki grup arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Halen sigara içen ve sigarayı bırakmış olan sağlıklı bireyler arasında ve KOAH'lı hastalar arasında demografik ve laboratuvar sonuçları yönünden anlamlı farklılık saptanmazken, sigara içen sağlıklı bireyler ve KOAH'lı hastalar, sigarayı bırakan sağlıklı bireyler ve KOAH'lı hastalar arasında da farklılık saptanmamıştır. Çalışmada incelenen 4 grup arasında, ortalama yaş, sigara içme süresi ve tüm biyokimyasal parametreler yönünden anlamlı farklılık izlenmemiştir.

**Tablo 5. Çalışmaya Alınan Hastalar ve Özellikleri**

Hasta No	Hasta Adı	Yaş	Cinsiyet	Sigara bırakma süresi(ay)	Sigara içme süresi (paketx yıl)	FEV1/FVC	*Lenfosit / Fas	*Lenfosit / Bax	*Lenfosit / Kaspaz	*Nötrofil / Fas	*Nötrofil / Bax	*Nötrofil / Kaspaz	*Makrofaj / Fas	*Makrofaj / Bax	*Makrofaj / Kaspaz	*Epitel hc. / Fas	*Epitel hc. / Bax	*Epitel hc. / Kaspaz	*Epitel hc. / H.E	*inflamatuvar hc./H.E
1	A.K	62	E	60	25	56,0	3	2	3	4	4	4	3	3	3	3	3	3	1	3
2	Y.A	49	E	12	35	59,0	3	3	2	3	3	3	3	3	2	3	3	3	1	1
3	B.E	65	E	24	60	61,4	0	2	3	4	4	4	3	2	3	3	3	3	1	2
4	Ş.D	49	E	24	20	40,7	0	3	3	4	4	4	2	2	4	3	3	3	1	3
5	S.K	79	E	24	50	59,8	1	2	0	0	4	4	2	3	3	3	3	3	1	2
6	M.Y	63	E	18	30	48,5	2	1	1	2	3	3	2	1	1	2	3	3	2	3
7	U.K	68	E	60	90	49,9	1	3	3	1	3	3	1	3	3	3	3	3	2	3
8	M.B	67	E	72	50	56,1	2	3	3	4	2	2	3	2	2	3	3	3	2	3
9	F.Ü	57	K	72	20	65,9	3	2	3	4	4	4	3	3	1	3	3	3	2	2
10	M.K	73	E	36	50	56,0	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2
11	A.B	60	E	24	60	46,3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3
12	C.A	50	E	2	20	65,1	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2
13	H.G	52	E	1	30	55,4	3	3	3	3	3	4	3	3	2	3	3	3	1	3
14	N.B	50	E	.	25	61,8	3	1	1	4	4	2	3	3		3	3	3	2	3
15	A.T	59	E	.	40	60,9	3	3	3	3	3	4	3	3	3	3	3	3	2	3
16	A.K	71	E	.	50	49,0	3	3	2	3	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2
17	O.K	48	E	.	75	64,8	2	2	3	4	4	2	3	3	3	3	3	3	1	3
18	R.D	69	E	.	100	57,8	3	3	3	3	3	2	3	3	2	3	3	3	1	3
19	H.A	54	E	.	30	60,5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3
20	A.V	59	E	.	40	67,1	2	2	1	4	4	4	3	3	2	3	3	3	1	2
21	H.Ö	54	E	.	35	69,0	2	1	1	2	3	2	3	3	2	3	3	3	2	1
22	H.K	54	E	.	80	38,4	3	3	2	3	3	3	3	3	4	3	3	3	2	3
23	A.A	64	E	.	50	50,0	3	3	3	1	3	3	3	2	2	3	3	3	2	3
24	M.Ö	65	E	.	150	62,1	2	0	0	2	1	4	3	0	0	2	3	3	1	1
25	A.K	64	E	.	40	68,6	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3
26	H.A	77	E	.	280	60,0	2	3	2	2	2	4	2	2	1	3	3	3	2	2
27	Z.A	58	E	.	30	50,2	2	1	1	4	3	3	2	1	1	3	3	3	1	2
28	G.S	64	E	.	80	66,7	3	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	1	2
29	A.G	70	E	.	27	65,4	2	1	1	2	1	1	4	3	3	3	3	3	1	2
30	A.A	73	E	.	60	65,3	3	2	0	4	4	4	3	1	0	3	3	3	1	2
31	K.N	55	E	.	60	53,6	2	2	1	4	4	2	3	3	1	3	3	3	1	1
32	B.İ	53	E	72	25	75,0	2	2	1	4	4	1	2	2	3	3	3	3	1	2
33	A.B	56	E	24	40	90,0	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2
34	A.M	53	E	72	70	75,9	1	3	1	3	3	3	2	3	3	3	3	3	1	3
35	MG	46	E	60	30	73,4	3	3	3	4	4	1	3	3	3	3	3	3	1	1
36	İ.S	58	E	24	40	77,2	3	3	0	4	4	4	3	3	3	3	3	3	2	3
37	M.Ü	66	E	60	30	80,4	3	2	2	4	4	4	3	2	2	3	3	3	1	2
38	M.Ü	85	E	60	75	72,0	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1

Tablo 5 devamı

Hasta No	Hasta Adı	Yaş	Cinsiyet	Sigara bırakma süresi(ay)	Sigara içme süresi (paketyıl)	FEV1/FVC	*Lenfosit / Fas	*Lenfosit / Bax	*Lenfosit / Kaspaz	*Nötrofil / Fas	*Nötrofil / Bax	*Nötrofil / Kaspaz	*Makrofaj / Fas	*Makrofaj / Bax	*Makrofaj / Kaspaz	*Epitel hc. / Fas	*Epitel hc. / Bax	*Epitel hc. / Kaspaz	*Epitel hc. / H.E	*Inflamatuvar hc./H.E
39	M.Y	61	E	18	80	74,0	2	3	1	4	4	4	3	3	2	3	3	3	2	3
40	N.K	40	K	18	20	89,4	1	1	1	1	4	4	1	4	4	2	3	3	2	3
41	R.A	56	E	12	30	80,3	3	0	2	3	4	4	3	0	3	3	3	3	1	3
42	M.G	60	E	12	20	82,8	2	2	2	2	3	3	3	4	4	3	3	3	1	3
43	A.Y	53	E	3	45	70,9	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	1	3
44	S.Ö	51	E	.	45	74,0	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	2
45	M.A	64	E	.	35	72,2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3
46	D.K	62	E	.	30	80,1	3	3	3	4	4	4	3	3	3	3	3	3	1	3
47	A.A	57	E	.	35	71,3	2	2	3	4	4	4	2	2	2	3	3	3	2	3
48	A.H	54	E	.	50	70,6	2	2	2	4	4	2	3	3	3	3	3	3	1	3
49	A.G	50	E	.	25	71,0	2	2	2	4	4	4	3	3	3	3	3	3	1	2
50	H.B	55	E	.	55	77,0	2	2	1	4	4	4	3	3	4	3	3	3	2	2
51	L.U	48	E	.	20	86,0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2
52	Ç.B	50	E	.	30	80,0	3	3	2	4	4	2	3	3	2	3	3	3	1	2
53	M.Ş	53	E	.	100	71,3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2
54	S.Ö	53	E	.	45	70,0	3	3	3	3	3	2	3	3	2	3	3	3	1	1
55	H.G	67	E	.	45	70,2	4	4	3	4	4	4	3	3	2	3	3	3	1	3
56	E.Y	53	E	4	60	76,1	2	1	1	2	3	2	3	3	3	3	3	3	2	2
57	T.D	51	E	.	35	82,3	1	3	1	1	3	3	2	2	0	2	3	3	2	2
58	M.Ö	49	E	.	70	78,2	3	1	1	2	4	4	3	0	0	3	3	3	2	3
59	H.B	55	E	.	40	75,8	2	3	3	3	3	2	3	3	2	3	3	3	1	3
60	M.G	58	E	.	40	76,1	3	2	3	3	1	2	3	2	3	2	3	3	2	2
61	D.Ö	42	E	.	20	76,6	2	2	1	4	2	3	1	2	1	3	3	3	1	2
62	S.A	67	E	1	90	78,4	1	2	0	0	1	4	2	0	2	3	3	3	1	2
63	A.Ö	43	E	1	25	73,6	3	2	3	3	4	4	3	4	4	3	3	3	1	2
64	C.S	55	E	6	90	77,0	2	1	1	4	2	2	3	3	2	2	3	3	1	2
65	T.K	66	E	.	50	71,7	3	3	3	4	3	3	4	4	4	3	3	3	2	3
66	K.B	68	E	.	165	74,1	3	3	2	3	3	3	3	3	1	3	3	3	2	2
67	N.Ö	53	K	3	20	79,5	2	0	0	4	4	1	1	3	3	2	3	3	1	2
68	S.H	65	E	1	50	83,0	3	2	2	2	2	2	3	2	2	3	3	3	1	1
69	N.Ç	49	K	9	25	75,0	3	2	2	2	4	4	3	1	2	3	3	2	2	2
70	M.D	51	E	.	35	72,5	3	1	3	2	4	4	2	1	1	2	3	3	2	3
71	M.D	66	E	.	50	73	2	3	3	1	4	4	3	3	3	3	3	3	1	2
72	A.E	52	E	.	40	71,5	2	1	1	4	4	4	2	3	3	3	3	3	2	2
73	O.K	56	E	.	30	76,5	3	2	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	1	3
74	E.Ç	62	E	6	45	76,0	2	2	1	4	4	4	2	2	3	3	3	3	1	3
75	C.A	69	E	1	50	72,6	3	1	1	4	3	3	3	4	4	2	3	3	2	1

\*: İlgili hücrenin H:E, Fas, Bax veya kaspaz yöntemi ile değerlendirilen apoptozis derecesi

**Tablo 6. Çalışma Gruplarının Demografik ve Laboratuvar Özellikleri**

	SAĞLIKLI			KOAİ		
	Grup-1 Sigara bırakmış n:11	Grup-2 Sigara içen n:33	Toplam n:44	Grup-3 Sigara bırakmış N:11	Grup-4 Sigara içen n:20	Toplam n:31
Yaş(yıl)* (aralık)	57,6±11,5 (40-85)	56,0±7,3 (43-69)	56,4±8,5 (40-85)	62,9±9,2 (49-79)	60,5±8,5 (48-77)	61,4±8,7 (48-79)
Cinsiyet(E/K)(n)	10/1	31/2	41/3	10/1	20/0	30/1
Sigara içme yoğunluğu (paketx yıl)* (aralık)	41,3±21,7 (20-80)	48,2±28,7 (20-165)	46,5±27,1 (20-165)	44,5±21,2 (20-90)	65,1±59,5 (20-280)	57,8±49,9 (20-280)
Sigara içme yoğunluğu (n)						
20-39 paketx yıl	6	14	20	5	7	12
40-59 paketx yıl	2	13	15	3	5	8
60-79 paketx yıl	2	2	4	2	3	5
80-100 paketx yıl	1	4	5	1	5	6
Sigara bırakma süresi(ay)* (aralık)	39,2±25,1 (12-72)	4,1±2,7 (1-9)	24,5±25,9 (1-72)	38,7±22,7 (12-72)	1,3±0,6 (1-2)	30,7±25,5 (1-72)
Sigara bırakma süresi (n)						
0-6 ay	0	9	9	0	3	3
6-12 ay	0	1	1	0	0	0
12-60 ay	9	0	9	9	0	9
>60 ay	2	0	2	2	0	2
Hastalık şiddeti (n)						
GOLD 1						
GOLD 2	0	0	0	0	3	3
GOLD 3	0	0	0	7	13	20
GOLD 4	0	0	0	3	4	7
	0	0	0	1	0	1
FEV1/FVC*	75,1±6,2	75,3±4,0	76,2±4,9	54,5±7,4	59,5±7,9	57,8±8,1
FEV1(lt)	2,5±0,8	2,5±0,5	2,5±0,6	1,5±0,8	1,8±0,5	1,7±0,6
FEV1(%)*	85,8±23,6	78,4±13,3	80,3±16,5	50,2±14,2	64,0±17,6	59,2±17,6
FVC (lt)*	3,2±1,1	3,3±0,7	3,3±0,8	2,6±0,9	3,1±0,6	2,9±0,8
FVC (%)*	87,8±26,0	84,0±16,3	84,9±18,9	71,8±15,1	85,6±18,0	80,7±18,1
CRP(mg/L)*	31,0±38,3	27,7±29,3	31,4±15,0	30,2±25,0	32,4±29,2	31,6±27,4
IgE(IU/ml)*	100,2±39,9	90,0±47,0	92,6±45,1	61,7±28,4	93,7±41,5	82,4±40,1

GOLD 1: FEV1/FVC<70, FEV1>% 80; GOLD 2: FEV1/FVC<70, % 50<FEV1< %80;

GOLD 3: FEV1/FVC<70, % 30<FEV1< %50; GOLD 4: FEV1/FVC<70, FEV1< %30

\* ortalama ± standart sapma

İncelenen gruptaki bireylerin klinik özellikleri Tablo 7'de verilmiştir. Sağlıklı yetişkinlerden oluşan grup-1 ve grup-2'deki yetişkinlerin 9'una kronik öksürük, 1'ine hemoptizi etiolojisi saptamak amacıyla, 34'ünde ise malignite kuşkusuna ile bronkoskopi yapılmıştır. KOAH'lı hasta grubunda ise bu rakamlar sırasıyla 2, 0, 29'dur. Solunumsal semptomların görülme oranları KOAH'lı hastalarda daha yüksek bulunmuştur. Sağlıklı

bireylerin hiçbirisi bronkodilatör ilaç kullanmazken, KOAH'lı hastalarda bronkodilatör kullananların oranı % 45.2'dir. Bronkodilatör kullanan hastalar ağırlıklı olarak (%22.6) kısa etkili beta 2 agonist+uzun etkili beta agonist kullanmaktadırlar.

**Tablo 7. Çalışma Gruplarındaki Bireylerin Klinik Özellikleri**

	SAĞLIKLI			KOAH		
	Grup-1 Sigara bırakmış n:11	Grup-2 Sigara İçen n:33	Toplam n:44	Grup-3 Sigara Bırakmış n:11	Grup-4 Sigara İçen n:20	Toplam n:31
<b>Bronkoskopi Nedeni *</b>						
a. Kronik öksürük	2 (18,2)	7(21,2)	9(20,5)	1(9,1)	1(5)	2 (6,5)
b. Malignite	8 (72,7)	26(77,8)	34(77,3)	10(90,9)	19(95)	29 (93,5)
c. Hemoptizi etiyo	1 (9,1)	0(0)	1(2,3)	0(0)	0(0)	0
<b>Semptomlar*</b>						
a. kronik öksürük	6 (54,5)	13(39,4)	19(43,2)	9(81,8)	16(80)	25 (80,6)
b. kronik balgam	6 (54,5)	15(45,5)	21(47,7)	9(81,8)	15(75)	24 (77,4)
c.öksürük+balgam	6 (54,5)	9(27,3)	15(34,1)	9(81,8)	14(70)	23 (74,2)
d.istirahat dispne	0	1(3)	1(2,3)	3(27,3)	1(5)	4 (12,9)
e.efor dispne	3 (27,3)	5(15,2)	8(18,2)	9(81,8)	14(70)	23 (74,2)
f. hırıltı	0	1(3)	1(2,3)	3(27,3)	10(50)	13 (41,9)
<b>Son 1 ayda düzenli kullandığı ilaç*</b>						
a.kısa etkili B2	0	0	0	2(18,2)	1(5)	3 (9,7)
b.kısa etk B2+uzun etk. B2	0	0	0	3(27,3)	4(20)	7 (22,6)
c.kısa etk.B2+uzun etkB2+ uzun etk antikolin.	0	0	0	2(18,2)	2(10)	4 (12,9)
d.yok	11 (100)	33(100)	11(100)	4(36,4)	13(65)	17 (54,8)

\* n

Çalışmada incelenen grupların bronş duvarı hücrelerinin (lenfosit, nötrofil, makrofaj ve epitel hücreleri) Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile boyanma dereceleri sırasıyla Tablo 8, Tablo 9, Tablo 10 ve Tablo 11 'de gösterilmiştir. Bu hücreler ayrı ayrı değerlendirilmiş ve boyanma dereceleri yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

**Tablo 8. Çalışma Gruplarının Bronş Duvarı Biyopsi Örneklerinden Elde Edilen Lenfositlerin Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile Boyanma Dereceleri**

Lenfosit	SAĞLIKLI			KOAİ		
	Grup-1 Sigara bırakmış n:11	Grup- 2 Sigara içen n:33	Toplam n:44	Grup-3 Sigara bırakmış n:11	Grup-4 Sigara içen n:20	Toplam n:31
Fas*						
Hücre yok	0(0)	1(3,0)	1 (2,3)	0(0)	0(0)	0 (0)
Grade 0	0(0)	0(0)	0 (0)	1(9,1)	0(0)	1 (3,2)
Grade 1	2(18,2)	2(6,1)	4 (9,1)	2(18,2)	0(0)	2 (6,5)
Grade 2	3(27,3)	12(36,4)	15 (34,1)	2(18,2)	8(40)	10 (32,3)
Grade 3	6(54,5)	18(54,5)	24 (54,5)	6(54,5)	12(60,0)	18 (58,1)
Bax*						
Hücre yok	0(0)	1(3,0)	1(2,3)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 0	1(9,1)	1(3,0)	2(4,5)	0(0)	1(5)	1(3,2)
Grade 1	1(9,1)	6(18,2)	7(15,9)	1(9,1)	4(20)	5(16,1)
Grade 2	3(27,3)	12(36,4)	15(34,1)	4(36,4)	5(25,0)	9(29,0)
Grade 3	6(54,5)	13(39,4)	19(43,2)	6(54,5)	10(50,0)	16(51,6)
Kaspaz3*						
Hücre yok	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 0	1(9,1)	2(6,1)	3(6,8)	1(9,1)	2(10,0)	3(9,7)
Grade 1	4(36,4)	9(27,3)	13(29,5)	1(9,1)	6(30,0)	7(22,6)
Grade 2	4(36,4)	7(21,2)	11(25,0)	2(18,2)	5(25,0)	7(22,6)
Grade 3	2(18,2)	15(45,5)	17(38,6)	7(63,6)	7(35,0)	14(45,2)

Grade 0: Hücre var, boyanma yok, Grade 1: Boyanma < %10, Grade 2: % 10<Boyanma<% 50,  
Grade 3: % 50<Boyanma<% 80

\*: n (%)

**Tablo 9. Çalışma Gruplarının Bronş Duvarı Biyopsi Örneklerinden Elde Edilen Nötrofillerin Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile Boyanma Dereceleri**

Nötrofil	SAĞLIKLI			KOAİ		
	Grup-1 Sigara bırakmış n:11	Grup- 2 Sigara içen n:33	Toplam n:44	Grup-3 Sigara bırakmış n:11	Grup-4 Sigara içen n:20	Toplam n:31
Fas*						
Hücre yok	5(45,5)	14(42,4)	19(43,2)	5(45,5)	6(30,0)	11(35,5)
Grade 0	0(0)	1(3,0)	1(2,3)	1(9,1)	0(0)	1(3,2)
Grade 1	1(9,1)	2(26,1)	3(6,8)	1(9,1)	1(5,0)	2(6,5)
Grade 2	1(9,1)	6(18,2)	7(15,9)	1(9,1)	5(25,0)	6(19,4)
Grade 3	4(36,4)	10(30,3)	14(31,8)	3(27,3)	8(40,0)	11(35,5)
Bax*						
Hücre yok	7(63,6)	15(45,5)	22(50,0)	5(45,5)	5(25,0)	10(32,3)
Grade 0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 1	0(0)	2(6,1)	2(4,5)	0(0)	2(10,0)	2(6,5)
Grade 2	0(0)	4(12,1)	4(9,1)	1(9,1)	2(10,0)	3(9,7)
Grade 3	4(36,4)	12(36,4)	16(36,4)	5(45,5)	11(55,0)	16(51,6)
Kaspaz3*						
Hücre yok	5(45,5)	13(39,4)	18(40,9)	5(45,5)	6(30,0)	11(35,5)
Grade 0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 1	2(18,2)	1(3,0)	3(6,8)	0(0)	1(5,0)	1(3,2)
Grade 2	1(9,1)	8(24,2)	9(20,5)	1(9,1)	8(40,0)	9(29,0)
Grade 3	3(27,3)	11(33,3)	11(31,8)	5(45,5)	5(25,0)	10(32,3)

Grade 0: Hücre var, boyanma yok, Grade 1: Boyanma <%10, Grade 2: % 10<Boyanma<% 50,  
Grade 3: % 50<Boyanma<% 80

\*: n (%)

**Tablo 10. Çalışma Gruplarının Bronş Duvarı Biyopsi Örneklerinden Elde Edilen Makrofajların Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile Boyanma Dereceleri**

Makrofaj	SAĞLIKLI			KOAH		
	Grup-1 Sigara bırakmış n:11	Grup- 2 Sigara içen n:33	Toplam n:44	Grup-3 Sigara bırakmış n:11	Grup-4 Sigara içen n:20	Toplam n:31
Fas*						
Hücre yok	0(0)	1(3,0)	1(2,3)	0(0)	1(5,0)	1(3,2)
Grade 0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 1	1(9,1)	2(6,1)	3(6,8)	1(9,1)	0(0)	1(3,2)
Grade 2	2(18,2)	6(18,2)	8(18,2)	3(27,3)	2(10,0)	5(16,1)
Grade 3	8(72,7)	24(72,7)	32(72,7)	7(63,6)	17(85,0)	24(77,4)
Bax*						
Hücre yok	2(18,2)	3(9,1)	5(11,4)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 0	1(9,1)	2(6,1)	3(6,8)	0(0)	1(5,0)	1(3,2)
Grade 1	0(0)	2(6,1)	2(4,5)	1(9,1)	2(10,0)	3(9,7)
Grade 2	2(18,1)	6(18,2)	8(18,2)	3(27,3)	2(10,0)	5(16,2)
Grade 3	6(54,5)	20(60,6)	26(56,1)	7(63,6)	15(75,0)	22(75,0)
Kaspaz3*						
Hücre yok	2(18,2)	4(12,1)	6(13,6)	1(9,1)	1(%5,0)	2(6,5)
Grade 0	0(0)	2(6,)	2(4,5)	0(0,0)	2(%10,0)	2(6,5)
Grade 1	0(0)	3(9,1)	3(6,8)	2(18,2)	4(%20,0)	6(19,4)
Grade 2	2(18,2)	10(30,3)	12(27,3)	2(18,2)	5(25,0)	7(22,6)
Grade 3	7(63,6)	14(42,4)	21(47,7)	6(54,5)	8(%40,0)	14(45,2)

Grade 0: Hücre var, boyanma yok, Grade 1: Boyanma <% 10, Grade 2: % 10<Boyanma<% 50,  
Grade 3: % 50<Boyanma<% 80

\*: n(%)

**Tablo 11. Çalışma Gruplarının Bronş Duvarı Biyopsi Örneklerinden Elde Edilen Epitel Hücrelerinin Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile Boyanma Dereceleri**

Epitel hücreleri	SAĞLIKLI			KOAİ		
	Grup-1 Sigara bırakmış n:11	Grup- 2 Sigara içen n:33	Toplam n:44	Grup-3 Sigara bırakmış n:11	Grup-4 Sigara içen n:20	Toplam n:31
Fas*						
Hücre yok	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 1	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 2	1(9,1)	6(18,2)	7(15,9)	1(9,1)	1(5,0)	2(6,5)
Grade 3	10(90,9)	27(81,8)	37(84,1)	10(90,9)	19(95,0)	29(93,5)
Bax*						
Hücre yok	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 1	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 2	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 3	11(100)	33(100)	44(100)	11(100)	20(100)	31(100)
Kaspaz3*						
Hücre yok	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 1	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 2	0(0)	1(3,0)	1(2,3)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 3	11(100)	32(97,0)	43(97,7)	11(100)	11(100)	31(100)

Grade 0: Hücre var, boyanma yok, Grade 1: Boyanma <%10, Grade 2: % 10<Boyanma<% 50,  
Grade 3: % 50<Boyanma<% 80

\*: n (%)

Çalışmada incelenen sağlıklı bireyler ve KOAH'lı hastalar, sigara içme özelliklerine göre gruplandırıldığında her bir grubun bronş mukoza biyopsi örneklerinden elde edilen epitel hücreleri ve inflamatuvar hücrelerin (lenfosit, nötrofil, makrofaj, mast ve eozinofil) Hematoksilen eozin ile boyanma dereceleri Tablo 12'de gösterilmiştir. Epitel hücreleri ve toplu olarak değerlendirilen inflamatuvar hücrelerin boyanma dereceleri yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

**Tablo 12. Çalışma Gruplarının Bronş Duvarı Biyopsi Örneklerinden Elde Edilen Epitel Hücreleri ve İnflamatuar Hücrelerin Hematoksilen Eozin İle Boyanma Dereceleri**

	SAĞLIKLI			KOAİ		
	Grup-1 Sigara bırakmış n:11	Grup-2 Sigara içen n:33	Toplam n:44	Grup-3 Sigara bırakmış n:11	Grup-4 Sigara içen n:20	Toplam n:31
<b>Epitel hc.</b>						
<b>HE</b>						
Hücre yok	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 1	8(72,7)	18(54,5)	26(59,1)	6(54,5)	13(65,0)	19(61,3)
Grade 2	3(27,3)	15(45,5)	18(40,9)	5(45,5)	7(35,0)	12(38,7)
Grade 3	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<b>İnfl. hc.</b>						
<b>HE</b>						
Hücre yok	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Grade 1	2(18,2)	3(9,1)	5(11,4)	1(9,1)	3(15,0)	4(12,9)
Grade 2	3(27,3)	18(54,5)	21(47,7)	4(36,4)	8(40,0)	12(38,7)
Grade 3	6(54,5)	12(36,4)	18(40,9)	6(54,5)	9(45,0)	15(48,4)

Grade 0: Hücre var, boyanma yok, Grade 1: Boyanma <% 10, Grade 2: %10<Boyanma<%50,  
Grade 3: % 50<Boyanma<% 80

\*: n (%)

Çalışmada incelenen grupların bronş duvarındaki lenfositlerin Fas, Bax ve Kaspaz 3 antikoları ile pozitif boyanma derece ortalamaları Tablo 13’de gösterilmiştir. Sigarayı bırakmış sağlıklı grup (Grup 1) ile sigarayı bırakmış KOAH’lı grup (Grup 3) kaspaz 3 ile boyanan lenfosit derece ortalamaları yönünden karşılaştırıldığında sigarayı bırakmış KOAH’lı grubun derece ortalamasının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ancak bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Sigarayı bırakmış sağlıklı grup (Grup 1) ile sigarayı bırakmış KOAH’lı grup (Grup 3) Fas ve Bax ile bronş duvarındaki lenfositlerde pozitif boyanma derece ortalamaları yönünden karşılaştırıldığında heriki boyama yönteminde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Diğer tüm gruplar Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile bronş duvarındaki lenfositlerde pozitif boyanma derece ortalamaları yönünden karşılaştırıldığında her üç boyama yönteminde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

**Tablo 13. Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile Bronş Duvarındaki Lenfositlerde Pozitif Boyanma Derece Ortalamaları ve Derece Ortalamalarının Gruplar Arası Karşılaştırılması**

GRUP	Fas (Lenfosit)	Bax (Lenfosit)	Kaspaz (Lenfosit)
Grup 1*	2,36±0,24 (3,0)	2,27±0,30 (3,0)	1,64±0,28 (2,0)
Grup 2*	2,50±0,11 (3,0)	2,16±0,15 (2,0)	2,06±0,17 (2,0)
Grup 1+ Grup 2*	2,46±0,10 (3,0)	2,19±0,13 (2,0)	1,95±0,15 (2)
Grup 3*	2,18±0,33 (3,0)	2,45±0,21 (3,0)	2,36±0,31 (3,0)
Grup 4*	2,60±0,11 (3,0)	2,20±0,21 (2,5)	1,85±0,23 (2,0)
Grup 3+ Grup 4*	2,45±0,14 (3,0)	2,29±0,16 (3)	2,03±0,19 (2)
P değerleri			
Grup 1 – Grup 2	0,75	0,57	0,22
Grup 1 – Grup 3	0,85	0,85	0,08
Grup 2 – Grup 4	0,66	0,74	0,46
Grup 3 – Grup 4	0,48	0,61	0,18
Grup1+Grup 2- Grup 3+ Grup 4	0,90	0,58	0,68

\*: ortalama grade±standart hata (median)

Grup 1: Sağlıklı sigara bırakmış Grup 2: Sağlıklı sigara içen

Grup 3: KOAH sigara bırakmış Grup 4: KOAH sigara içen

Grup 1+ Grup 2: Sağlıklı bireyler

Grup 3+ Grup 4: KOAH'lı bireyler

Çalışmada incelenen grupların bronş duvarındaki nötrofillerin Fas, Bax ve Kaspaz 3 antikorları ile pozitif boyanma derece ortalamaları Tablo 14'de gösterilmiştir. Tüm gruplar; Fas, Bax ve Kaspaz ile bronş duvarı nötrofillerinde pozitif boyanma derece ortalamaları yönünden birbirleriyle karşılaştırıldığında her üç boyama yönteminde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

**Tablo 14. Fas, Bax ve Kaspaz ile Bronş Duvarı Nötrofillerinde Pozitif Boyanma Derece Ortalamaları ve Derece Ortalamalarının Gruplar Arası Karşılaştırılması**

GRUP	Fas (Nötrofil)	Bax (Nötrofil)	Kaspaz (Nötrofil)
Grup 1*	2,50±0,34 (3,0)	3,00±0,00 (3,0)	2,17±0,40 (2,5)
Grup 2*	2,32±0,20 (3,0)	2,56±0,17 (3,0)	2,50±0,14 (3,0)
Grup 1+ Grup 2*	2,36±0,17 (3)	2,64±0,14 (3)	2,42±0,14 (3)
Grup 3*	2,00±0,52 (2,5)	2,83±0,17 (3,0)	2,83±0,17 (3,0)
Grup 4*	2,50±0,17 (3,0)	2,60±0,19 (3,0)	2,29±0,16 (2,0)
Grup 3+ Grup 4*	2,35±0,20 (3)	2,67±0,14 (3)	2,45±0,14 (2,5)
P değerleri			
Grup 1 – Grup 2	0,69	0,34	0,53
Grup 1 – Grup 3	0,59	0,76	0,31
Grup 2 – Grup 4	0,65	0,75	0,29
Grup 3 – Grup 4	0,55	0,68	0,09
Grup1+Grup 2- Grup 3+ Grup 4	0,97	0,82	0,98

\*: ortalama grade±standart hata (median)

Grup 1: Sağlıklı sigara bırakmış Grup 2: Sağlıklı sigara içen

Grup 3: KOAH sigara bırakmış Grup 4: KOAH sigara içen

Grup 1+ Grup 2: Sağlıklı bireyler

Grup 3+ Grup 4: KOAH'lı bireyler

Çalışmada incelenen grupların bronş duvarındaki makrofajların Fas, Bax ve Kaspaz 3 antikoru ile pozitif boyanma derece ortalamaları Tablo 15'de gösterilmiştir. Tüm gruplar; Fas, Bax ve Kaspaz ile bronş duvarı makrofajlarında pozitif boyanma derece ortalamaları yönünden birbirleriyle karşılaştırıldığında her üç boyama yönteminde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

**Tablo 15. Fas, Bax ve Kaspaz ile Bronş Duvarı Makrofajlarında Pozitif Boyanma Derece Ortalamaları ve Derece Ortalamalarının Gruplar Arası Karşılaştırılması**

GRUP	Fas (Makrofaj)	Bax (Makrofaj)	Kaspaz (Makrofaj)
Grup 1*	2,64±0,20 (3,0)	2,71±0,07 (3,0)	2,78±0,15 (3,0)
Grup 2*	2,69±0,10 (3,0)	2,47±0,16 (3,0)	2,24±0,17 (2,0)
Grup 1+ Grup 2*	2,67±0,09 (3)	2,46±0,15 (3)	2,37±0,14 (3)
Grup 3*	2,55±0,21 (3,0)	2,55±0,21 (3,0)	2,40±0,27 (3,0)
Grup 4*	2,89±0,07 (3,0)	2,55±0,20 (3,0)	2,00±0,24 (2,0)
Grup 3+ Grup 4*	2,77±0,09 (3)	2,55±0,15 (3)	2,14±0,18 (2)
P değerleri			
Grup 1 – Grup 2	0,90	1,00	0,14
Grup 1 – Grup 3	0,75	1,00	0,45
Grup 2 – Grup 4	0,19	0,61	0,45
Grup 3 – Grup 4	0,23	0,73	0,38
Grup1+Grup 2- Grup 3+ Grup 4	0,55	0,71	0,36

\*: ortalama grade±standart hata (median)

Grup 1: Sağlıklı sigara bırakmış Grup 2: Sağlıklı sigara içen

Grup 3: KOAH sigara bırakmış Grup 4: KOAH sigara içen

Grup 1+ Grup 2: Sağlıklı bireyler

Grup 3+ Grup 4: KOAH'lı bireyler

Çalışmada incelenen grupların bronş duvarındaki bronş epitel hücrelerinin Fas, Bax ve Kaspaz 3 antikoları ile pozitif boyanma derece ortalamaları Tablo 16'da gösterilmiştir. Tüm gruplar; . Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile bronş epitel hücrelerinde pozitif boyanma derece ortalamaları yönünden birbirleriyle karşılaştırıldığında her üç boyama yönteminde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

**Tablo 16. Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile Bronş Epitel Hücrelerinde Pozitif Boyanma Derece Ortalamaları ve Derece Ortalamalarının Gruplar Arası Karşılaştırılması**

GRUP	Fas (Epitel)	Bax (Epitel)	Kaspaz (Epitel)
Grup 1*	2,91±0,09 (3,0)	3,00±0,00 (3,0)	3,00±0,00 (3,0)
Grup 2*	2,82±0,07 (3,0)	3,00±0,00 (3,0)	2,97±0,03 (3,0)
Grup 1+ Grup 2*	2,84±0,56 (3)	3,00±0,00 (3,0)	2,98±0,02 (3,0)
Grup 3*	2,91±0,09 (3,0)	3,00±0,00 (3,0)	3,00±0,00 (3,0)
Grup 4*	2,95±0,05 (3,0)	3,00±0,00 (3,0)	3,00±0,00 (3,0)
Grup 3+ Grup 4*	2,94±2,45 (3,0)	3,00±0,00 (3,0)	3,00±0,00 (3,0)
P değerleri			
Grup 1 – Grup 2	0,67	1,00	0,89
Grup 1 – Grup 3	1,00	1,00	1,00
Grup 2 – Grup 4	0,17	1,00	0,44
Grup 3 – Grup 4	0,86	1,00	1,00
Grup1+Grup 2- Grup 3+ Grup 4	0,22	1,00	0,40

\*: ortalama grade±standart hata (median)

Grup 1: Sağlıklı sigara bırakmış Grup 2: Sağlıklı sigara içen

Grup 3: KOAH sigara bırakmış Grup 4: KOAH sigara içen

Grup 1+ Grup 2: Sağlıklı bireyler

Grup 3+ Grup 4: KOAH'lı bireyler

Çalışmada incelenen grupların bronş duvarındaki epitel ve inflamatuvar hücrelerin H.E. ile pozitif boyanma derece ortalamaları Tablo 17'de gösterilmiştir. Tüm gruplar; Hematoksilen eozin ile bronş epitel ve inflamatuvar hücrelerinde pozitif boyanma derece ortalamaları yönünden birbirleriyle karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

**Tablo 17. Hematoksilen Eozin ile Bronş Epitel ve İnflamatuar Hücrelerinde Pozitif Boyanma Derece Ortalamaları ve Derece Ortalamalarının Gruplar Arası Karşılaştırılması**

GRUP	HE (Epitel)	HE (İnflamatuar hc.)
Grup 1*	1,27±0,14 (1,0)	2,36±0,24 (3,0)
Grup 2*	1,45±0,09 (1,0)	2,27±0,11 (2,0)
Grup 1+ Grup 2*	1,41±0,07 (1,0)	2,30±0,10 (2,0)
Grup 3*	1,45±0,16 (1,0)	2,45±0,21 (3,0)
Grup 4*	1,35±0,11 (1,0)	2,30±0,16 (2,0)
Grup 3+ Grup 4*	1,39±0,89 (1,0)	2,35±0,13 (2,0)
P değerleri		
Grup 1 – Grup 2	0,38	0,61
Grup 1 – Grup 3	0,48	0,90
Grup 2 – Grup 4	0,46	0,78
Grup 3 – Grup 4	0,64	0,61
Grup1+Grup 2- Grup 3+ Grup 4	0,85	0,65

\*: ortalama grade±standart hata (median)

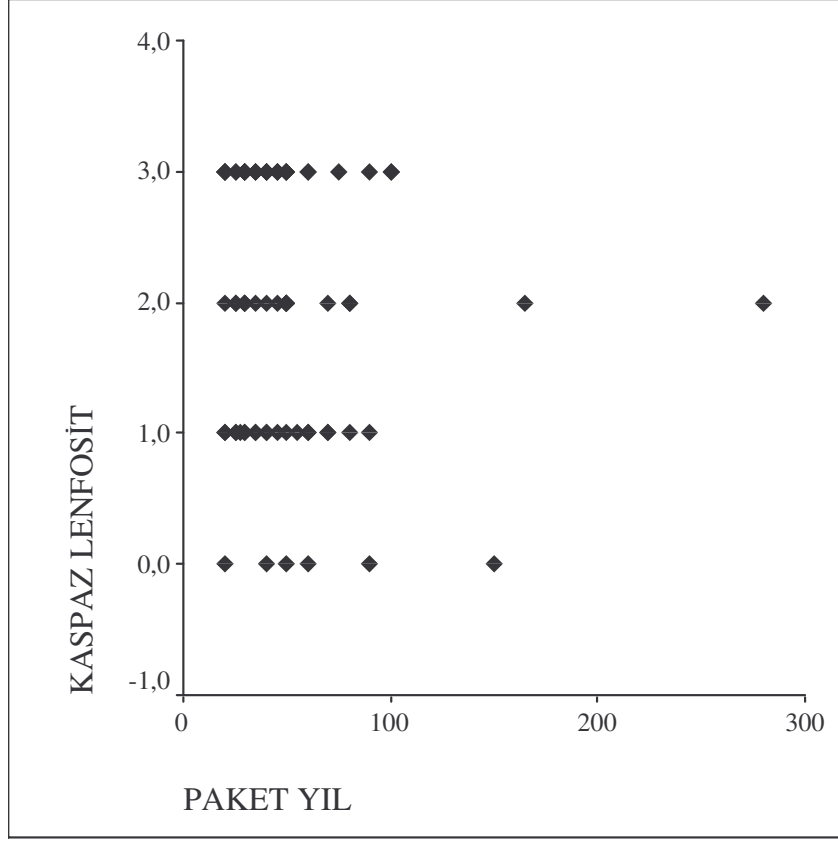
Grup 1: Sağlıklı sigara bırakmış Grup 2: Sağlıklı sigara içen

Grup 3: KOAH sigara bırakmış Grup 4: KOAH sigara içen

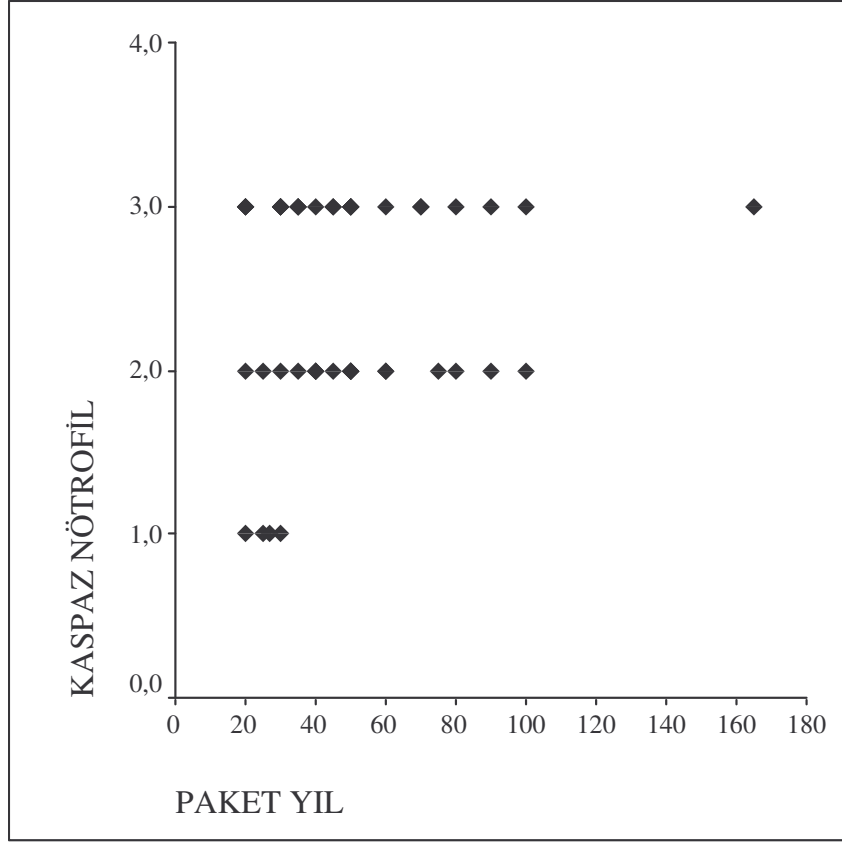
Grup 1+ Grup 2: Sağlıklı bireyler

Grup 3+ Grup 4: KOAH'lı bireyler

Sigara içme yoğunluğu (paket/yıl) ile lenfosit, nötrofil, makrofaj ve epitel hücrelerin Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile boyanma dereceleri arasında korelesyon saptanmamıştır. Sigara içme yoğunluğu (paket/yıl) ile inflamatuvar hücrelerin ve epitel hücrelerinin H.E. ile boyanma dereceleri arasında da korelasyon saptanmamıştır. Sigara içme yoğunluğu (paket/yıl) ile lenfosit, nötrofil, makrofaj ve epitel hücrelerinin Kaspaz 3 ile boyanma dereceleri arasındaki korelesyon sırasıyla Şekil 19, Şekil 20, Şekil 21 ve Şekil 22'de gösterilmiştir.

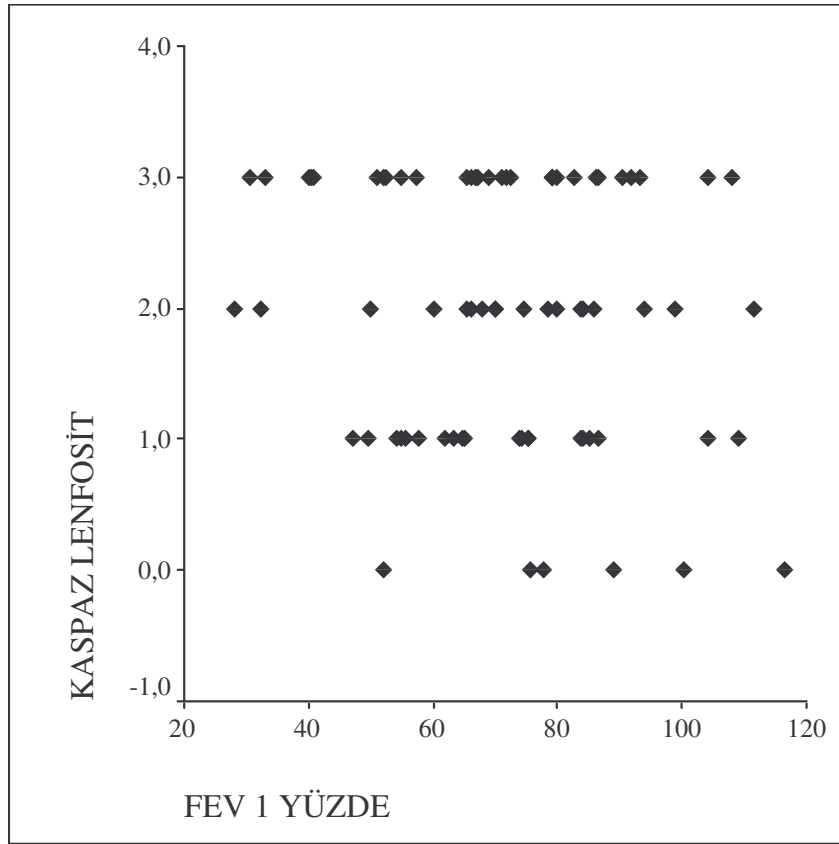


Şekil 16. Sigara içme yoğunluğu (paket/yıl) ile lenfositlerin Kaspaz 3 ile boyanma derecesi arasındaki korelasyon

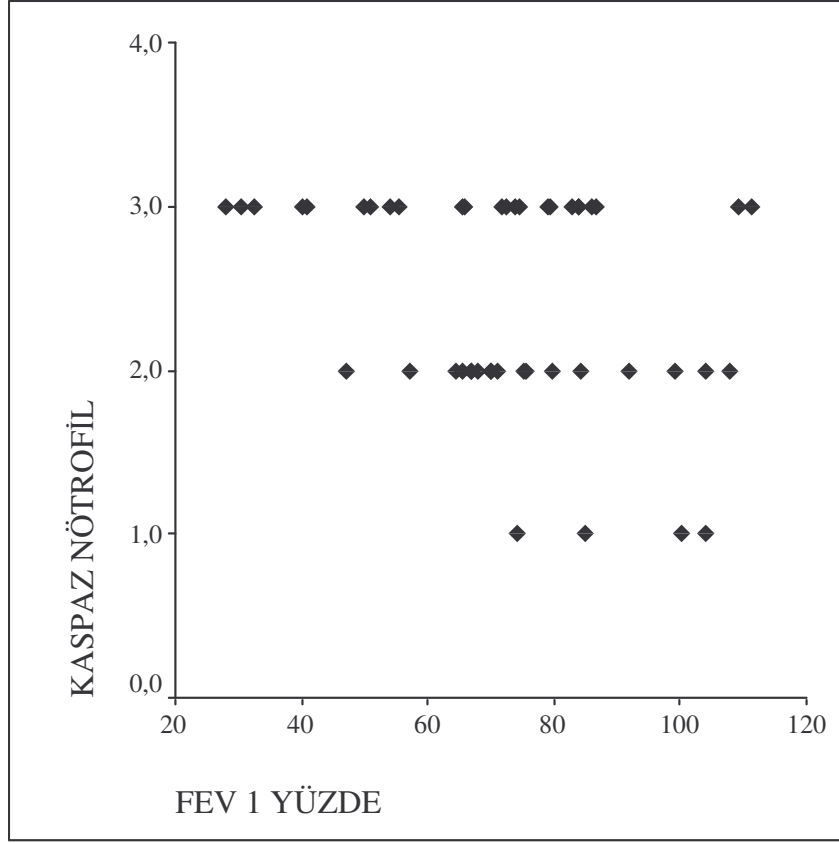


Şekil 17. Sigara içme yoğunluğu (paket/yıl) ile nötrofillerin Kaspaz 3 ile boyanma derecesi arasındaki korelasyon

FEV1 (beklenenin yüzdesi ve lt olarak) düzeyi ile lenfosit, nötrofil, makrofaj ve epitel hücrelerin Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile boyanma dereceleri arasında korelesyon saptanmamıştır. FEV1 (beklenenin yüzdesi ve lt olarak) düzeyi ile inflamatuvar hücrelerin ve epitel hücrelerinin H.E. ile boyanma dereceleri arasında da korelesyon saptanmamıştır. FEV1 yüzdesi ile lenfosit, nötrofil, makrofaj ve epitel hücrelerinin Kaspaz 3 ile boyanma dereceleri arasındaki korelesyon sırasıyla Şekil 23, Şekil 24, Şekil 25 ve Şekil 26’da gösterilmiştir.



Şekil 18. FEV1 yüzdesi ile lenfositlerin Kaspaz 3 ile boyanma derecesi arasındaki korelesyon



Şekil 19. FEV1 yüzdesi ile nötrofillerin Kaspaz 3 ile boyanma derecesi arasındaki korelesyon

Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile boyanan lenfositlerde Fas boyama derecesi ile Bax boyama derecesi, Fas boyama derecesi ile kaspaz boyama derecesi ve Bax boyama derecesi ile kaspaz 3 boyama derecesi arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır ( $r > 0.70$  mükemmel,  $r = 0.50-0.70$  iyi,  $r < 0.50$  zayıf korelasyon) (Tablo 18).

Tablo 18. Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile Boyanan Lenfositlerde Fas, Bax ve Kaspaz 3'ün Boyama Derecelerinin Birbirleri İle Korelasyonu (r )

	Bax lenfosit	Kaspaz 3 lenfosit
Fas lenfosit	0,32**	0,47**
Bax lenfosit		0,54**

\*\*  $p < 0.01$

\*  $p < 0.05$

Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile boyanan nötrofillerde Fas boyama derecesi ile Bax boyama derecesi, ve Bax boyama derecesi ile kaspaz 3 boyama derecesi arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır (Tablo 19).

**Tablo 19. Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile Boyanan Nötrofillerde Fas, Bax ve Kaspaz 3'ün Boyama Derecelerinin Birbirleri İle Korelasyonu (r )**

	Bax nötrofil	Kaspaz 3 nötrofil
Fas nötrofil	0,46**	0,00
Bax nötrofil		0,40**

\*\* p< 0.01

\* p< 0.05

Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile boyanan makrofajlarda Fas boyama derecesi ile Bax boyama derecesi, ve Bax boyama derecesi ile kaspaz 3 boyama derecesi arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır (Tablo 20).

**Tablo 20. Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile boyanan makrofajlarda Fas, Bax ve Kaspaz 3'ün boyama derecelerinin birbirleri ile korelasyonu (r )**

	Bax makrofaj	Kaspaz 3 makrofaj
Fas makrofaj	0,35**	0,13
Bax makrofaj		0,56**

\*\* p< 0.01

\* p< 0.05

Fas, Bax ve Kaspaz 3 ve H.E. ile boyanan epitel hücrelerinde boyama yöntemlerinin boyama dereceleri yönünden birbirleriyle aralarında korelasyon saptanmamıştır.

**Tablo 20. Fas, Bax ve Kaspaz 3 ile boyanan makrofajlarda Fas, Bax ve Kaspaz 3'ün boyama derecelerinin birbirleri ile korelasyonu (r )**

	Fas epitel	Kaspaz epitel
Fas epitel hc.		-0,43
H.E epitel	-0,20	-0,14

\*\* p< 0.01

\* p< 0.05

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, büyük hava yollarından bronkoskopi ile elde edilen bronş mukoza biyopsi örneklerinde sigarayı bırakan ve halen içen sağlıklı bireyler ve KOAH'lı hastalarda apoptotik bronş epitel hücreleri ve subepitelyal inflamatuvar hücreler (lenfosit, nötrofil ve makrofaj) yönünden anlamlı fark saptanmamıştır. Çalışmada apoptozis varlığı, apoptozis sürecinin değişik basamaklarında rol oynayan üç değişik molekülün (Fas, Bax ve Kaspaz 3) immünohistokimyasal olarak boyanma dereceleri ile araştırılmıştır. Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, KOAH'lı hastaların büyük hava yollarında bulunan epitel ve inflamatuvar hücrelerdeki apoptozis varlığını araştıran ilk çalışmadır.

İlk kez 2000 yılında Segura-Valdez ve arkadaşları tarafından KOAH'lı hastaların akciğer dokusunda bulunan endotel ve epitel hücrelerinde apoptozis varlığı gösterilmiştir<sup>110</sup>. Daha sonraki yıllarda KOAH'lı veya amfizemli hastaların periferik kan, BAL veya akciğer doku örneklerinin kullanıldığı çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir<sup>111,112,114,118,119</sup>. 2005 yılında S.Hodge ve arkadaşlarının yayınladığı bir çalışmada KOAH'lı hastaların 2-4 mm çapındaki hava yollarından bronş fırçalama yöntemi ile elde edilen bronş epitel hücrelerindeki ve BAL ile elde edilen T lenfositlerdeki apoptozisin KOAH'lı hasta grubunda, hiç sigara içmemiş kontrol grubuna göre daha fazla olduğu gösterilmiştir<sup>4</sup>. KOAH'lı hastalarla yapılmış tek bir çalışmada, nötrofil apoptozisinde değişiklik olmadığı gösterilmişken<sup>11</sup>, makrofaj apoptozisinin değerlendirildiği herhangi bir çalışma bulunamamıştır. KOAH hastalarının akciğerlerinde apoptotik temizleme mekanizmalarının etkinliğinin azaldığı ve makrofajların apoptotik hücreleri tanıyıp temizlemesinde bir yetersizlik olduğu yönünde kanıtlar mevcuttur<sup>84,85,86</sup>. Apoptotik hücrelerin yeterince temizlenememesi; bu hücrelerin post-apoptotik sitolize (sekonder nekroz) uğrayarak proinflamatuvar mediatörlerin salınımında artışa, buna ikincil olarak inflamasyona, proteinazlar ve proimmünolojik mediatörlerin salınımına, ayrıca apoptotik yapısal hücrelerin yerlerinin yeni hücrelerce doldurulmasında engellenmeye neden olabileceği ileri sürülmektedir. Elde edilen bu bulgularla apoptozisin akciğer dokusunda harabiyet (amfizem) ve küçük

hava yollarının yapı ve fonksiyonlarının bozulmasına neden olarak KOAH patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada halen sigara içen ve sigarayı bırakan sağlıklı bireyler arasında ve halen sigara içen ve sigarayı bırakan KOAH'lılar arasında, apoptotik bronş epitel hücreleri ve inflamatuvar hücreler (lenfosit, nötrofil ve makrofaj) yönünden anlamlı fark saptanmamıştır. Sağlıklı bireylerin cerrahi doku örnekleri ile yapılan çalışmalarda sigarayı bırakan ve halen içmeye devam eden bireylerin alveolar epitel hücreleri ve subepitelyal lenfositlerindeki apoptozis seviyelerinin benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir<sup>112,114,119</sup>. Sigara bırakılsa bile apoptozisin aynı yoğunlukta devam etmesi, sigara dumanından başka bazı faktörlerin de apoptoziste etkili olabileceğini düşündürmektedir. Sağlıklı bireylerin bronşial biyopsi örneklerinin kullanıldığı bir çalışmada, sigara içen sağlıklı bireylerin sigarayı bıraktıktan sonra mast hücre sayısında azalma, B lenfosit sayısında artma saptanırken, CD3, CD4, CD8, makrofaj, nötrofil ve eozinofil sayılarında değişiklik saptanmamıştır<sup>120</sup>. Sigara içmeye devam eden ve bırakmış olan sağlıklı bireylerin balgam ve BAL örneklerinin kullanıldığı çalışmaların bir kısmında sigaranın bırakılmasıyla nötrofil, lenfosit, makrofaj ve eozinofil sayısında azalma, bir kısmında nötrofil, lenfosit, makrofaj, eozinofil, bazofil sayısında ve inflamatuvar mediatör (IL8) seviyesinde sabit kalma, bir kısmında ise lenfosit sayısında artma tespit edilmiştir.<sup>121,122,123,124,125</sup>. Bizim çalışmamızdaki sağlıklı bireyler arasında sigarayı bırakmanın hava yolu epitel hücreleri ve subepitelyal inflamatuvar hücre apoptozisleri üzerine etkili olmamasının muhtemel nedeni sigara bırakıldıktan sonra da inflamasyonun devam etmesi ve süregen inflamasyonun apoptozise direnç oluşturması olabilir.

KOAH'lı hastalardan bronş fırçalama yöntemi ile elde edilen bronş epitel hücreleri ve BAL yöntemi ile elde edilen T lenfosit apoptozislerinin değerlendirildiği bir çalışmada sigarayı bırakmış ve halen içen hastalar arasında bronş epitel hücresi ve T lenfosit apoptozis yoğunluğu yönünden farklılık tespit edilmemiştir<sup>4</sup>. Bu çalışmanın sonuçları, bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumludur. KOAH'lı hastalar ile yapılan çeşitli çalışmalarda sigara bırakıldıktan sonra da hava yolu mukozasındaki inflamasyonun devam ettiği gösterilmiştir<sup>120,122,126,127</sup>. KOAH'lı hastaların bronşiyal biyopsi örneklerinin kullanıldığı çalışmalarda sigarayı bırakmış ve halen içen hastalar arasında hava yolu CD4+, CD8+ T lenfosit, nötrofil, makrofaj,

eozinofil ve mast hücre sayısı yönünden anlamlı farklılık saptanmamıştır<sup>120,122,127</sup>. Materyal olarak KOAH'lı hastaların balgamının kullanıldığı çalışmalardan birisinde sigarayı bırakmış ve halen içen hastalar arasında lenfosit, nötrofil, makrofaj ve eozinofil sayıları yönünden farklılık saptanmazken<sup>126</sup>, başka bir çalışmada sigara bırakan hastaların nötrofil ve lenfosit sayısında artış gösterilmiştir<sup>120</sup>. KOAH'ta kronik inflamatuvar yanıtın devam etmesini sağlayan faktörlerin, artmış apoptozise de katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Bu faktörler arasında artmış nötrofil sayısı, sitotoksik T-hücreleri, Fas aktivasyonu, TNF- $\alpha$  ve TGF $\beta$ 'nın neden olduğu oksidatif stres ve poteolitik enzimlerin salınımında artış ve hava yollarında bakteri kolonizasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan inflamatuvar yanıtlar yer almaktadır<sup>104,105,106,107,108</sup>. Ayrıca, apoptotik stimulusu hücre cevabında genetik olarak oluşan değişikliklerin de KOAH'da gözlenen apoptozis artışına katkıda bulunabileceği ileri sürülmektedir<sup>109</sup>.

Bu çalışmada halen sigara içen ve sigarayı bırakmış sağlıklı bireyler ve KOAH'lı hastalar arasında büyük hava yollarındaki apoptotik bronş epitel hücreleri ve inflamatuvar (lenfosit, nötrofil ve makrofaj) hücreler yönünden anlamlı fark saptanmamıştır. Buna ek olarak sigarayı bırakan sağlıklı bireyler ve KOAH'lı hastalar arasında ve halen sigara içen sağlıklı bireyler ve KOAH'lı hastalar arasında da apoptotik hücreler yönünden anlamlı farklılık bulunamamıştır. Oysa KOAH'lı veya amfizemli hastaların akciğer parankimini yansıtan cerrahi doku örneklerinin kullanıldığı çalışmaların çoğunda alveoler epitel hücrelerindeki apoptozis seviyesi, hem hiç sigara içmemiş hem de halen sigara içen kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur<sup>111,112,114</sup>. KOAH'lı hastaların 2-4 mm genişlikteki hava yollarını yansıtan bronş fırçalama örneklerindeki bronş epitel hücrelerinin apoptozis seviyesinin araştırıldığı başka bir çalışmada da benzer sonuçlar bulunmuştur<sup>4</sup>. KOAH'lı hastaların inflamatuvar hücre apoptozisleri ile ilgili yapılan iki çalışmanın birisinde BAL örneği kullanılmış ve KOAH'lı hastalarda T lenfosit apoptozisinin hiç sigara içmeyen kontrol grubuna göre arttığı gösterilmişken<sup>4</sup>, diğer çalışmada balgam örneği kullanılmış ve nötrofil apoptozisinin hiç sigara içmeyen kontrol grubuna göre değişiklik göstermediği saptanmıştır<sup>11</sup>. Bizim çalışmamızda da nötrofil apoptozisi yönünden benzer sonuçlar bulunmuştur. Çalışmamızdaki sağlıklı bireyler ve KOAH'lı hastalar arasında apoptotik hücreler yönünden farklılık saptanmamasının nedeni, incelediğimiz kontrol grubunun özelliği ve aldığımız örneğin yeri ile ilişkili olabilir.

Diğer çalışmalarda kontrol grubu olarak genellikle sigara içmemiş sağlıklı bireyler alınmışken bizim çalışmamızdaki kontrol grubunun tümünün sigarayı bırakmış ve halen sigara içen bireylerden oluşması çalışma sonuçlarımızı etkilemiş olabilir. Çünkü, sigara içimi bırakılsa dahi inflamasyonun devam ediyor olması, sigarayı bırakan grupta apoptozisi tetikleyebilir ve çalışma grupları arasında apoptozis seviyesi yönünden farklılık çıkmamasına neden olmuş olabilir.

1967 yılında Fletcher ve arkadaşlarının yaptığı epidemiyolojik çalışmada kronik mukus hipersekresyonu varlığının KOAH'a ilerlemediği gösterilmişken<sup>128</sup>, daha sonra yapılan epidemiyolojik çalışmalarda kronik mukus hipersekresyonunun ileri evre KOAH'lılarda FEV1 düşüşüne katkıda bulunabileceği gösterilmiştir<sup>129</sup>. FEV1 azalması esas olarak periferik hava yollarındaki daralmadan ve ağır amfizemden kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalarda KOAH'lı hastaların küçük hava yollarındaki inflamasyon, fibrozis ve lüminal eksudasyon derecesi ile FEV1'deki azalma arasında ilişki olduğu gösterilmiştir<sup>1</sup>. Amfizem şiddeti ile FEV1'deki azalma arasında ilişki olduğu da yapılan çalışmalarda saptanmıştır<sup>130</sup>. Bu nedenle, çalışmamızda büyük hava yollarından aldığımız bronş mukoza biyopsi örnekleri, KOAH'da asıl etkilenmenin olduğu akciğer parankimi ve küçük hava yollarındaki apoptotik süreci yansıtmamış olabilir.

Astımlı hastaların büyük hava yollarından alınan bronş mukoza örneklerinin kullanıldığı bir çalışmada astımlı hastaların lenfosit, makrofaj ve eozinofil sayılarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olmasına karşın apoptozislerinin kontrol grubu kadar düşük olduğu ve anti-apoptotik molekül olan Bcl-2 seviyesinin kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir<sup>131</sup>. Yapılan başka bir çalışmada astımlı hastaların büyük hava yollarındaki T lenfosit sayısının kontrol grubuna göre daha fazla olduğu, apoptozislerinin ise daha az olduğu saptanmıştır<sup>132</sup>. Astımlı hastaların balgam örneklerinin kullanıldığı bir başka çalışmada, astımlı hastalarda kontrol grubuna göre eozinofil sayısının arttığı, apoptozisinin ise azaldığı tespit edilmiştir<sup>133</sup>. Astımlı hastaların apoptotik inflamatuvar hücre sayılarının az olması, apoptotik hücrelerin çok hızlı bir şekilde fagositik hücrelerce temizlenmesine, GM-CSF nedeniyle inflamatuvar hücrelerin yaşam sürelerinin uzamasına, anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyonunun artışına veya T lenfositlerde apoptozise neden olan IFN- $\gamma$  üretiminde azalma olmasına bağlanmıştır<sup>134</sup>. IPF'li (idiyopatik pulmoner fibrozis)

hastaların büyük hava yollarındaki ve alveollerdeki epitel hücre apoptozisinin araştırıldığı çalışmalarda IPF'li hastalarda apoptotik epitel hücrelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir<sup>135</sup>. IPF'li hastaların epitel hücre apoptozis artışının, proapoptotik (bax, kaspaz 3, p53, p21) ve antiapoptotik (Bcl-2) moleküllerin ekspresyonları arasındaki dengenin proapoptotikler lehine bozulması ile açıklanabileceği ve apoptozis artışının epitelizasyonda gecikme veya yetersizliğe neden olarak fibroblastik aktivite artışına katkıda bulunabileceği düşünülmüştür<sup>135</sup>. Yaptığımız çalışmada KOAH'lı hastalar ile kontrol grubu arasında apoptotik bronş epitel ve inflamatuvar hücreler yönünden farklılık saptamamızın nedeni, KOAH ve inflamasyonla ilişkili diğer akciğer hastalıklarındaki hava yolu inflamasyon süreçlerinin birbirlerinden farklılık göstermesi ile ilişkili olabilir.

Hava yolu epitel hücreleri; viral ve bakteriyel enfeksiyon, hücre iskeletinde meydana gelen bozukluk, aşırı oksijen maruziyeti, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , Fas, TGF- $\beta$  ve kortikosteroidler nedeniyle oluşan hasarlı hücrelerin temizlenmesi, sigara dumanı ve allerjenlerin yol açtığı hiperplastik değişikliklerin düzeltilmesi ve inflamasyonun kontrolü gibi birçok durumda apoptozise uğrarlar. Bizim çalışmamızda hiç sigara içmemiş sağlıklı kontrol grubunun bulunmayışı hem sigara içiminin hem de KOAH'ın hava yolu epitel hücre ve subepitelyal inflamatuvar hücre apoptozisi üzerindeki etkilerini değerlendirmemizi güçleştirmiştir.

Bu çalışmada kontrol grubunun tümünün eskiden ve halen sigara içen bireylerden oluşmuş olması, lokal anestezide lidokain kullanılmış olması, sigara içme durumunun objektif testler yerine kişilerin ifadelerine dayanması, immünohistokimyasal boyanma yöntemi olarak apoptozis mekanizmasının son basamağı olan aktif kaspaz 3 yerine prokaspaz 3'ün kullanılmış olması, boyanmış hücrelerin değerlendirilmesinde sayısal yöntem yerine yarısayısallaştırma yönteminin kullanılmış olması, çalışmada kullanılan immünohistokimyasal boyanma yönteminin daha ileri moleküler yöntemler ( flow sitometri, ISEL, ss DNA vb.) ile desteklenmemiş olması elde edilen sonuçları olumsuz etkilemiş olabilir.

Fas, Bax veya Kaspaz 3 ile boyanma dereceleri apoptozis ile iyi korelasyon göstermesine rağmen, bu boyalar ile boyanmış hücrelerde boyanma derecelerinin yüksek bulunmuş olması bu hücrelerin mutlaka apoptozise gideceklerini göstermez. Çünkü oldukça kompleks bir olay olan apoptozisin düzenlenmesine bir çok molekül

katılmaktadır. Bu moleküllerden bir kısmı pro-apoptotik etkiye sahipken, diğerleri anti-apoptotik etkiye sahiptir ve hücrenin kaderini belirleyen; pro-apoptotik ve anti-apoptotik moleküller arasındaki dengedir. Bu nedenle immünohistokimyasal yöntem ile çalışılırken proapoptotik moleküllerin artışı ile beraber anti-apoptotik moleküllerin de durumunun saptanması gerekebilir. Ayrıca apoptozisin değerlendirildiği çalışmalarda immünohistokimyasal boyanma yöntem ile elde edilen sonuçlar diğer yöntemler ile elde edilen sonuçlarla her zaman örtüşmediği için immünohistokimyasal yöntemin diğer yöntemler ile de desteklenmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak bronş duvarında immünohistokimyasal olarak anti-Fas, anti-Bax ve anti-kaspaz 3 ile boyanan lenfosit, nötrofil, makrofaj ve epitel hücrelerinin boyanma derece ortalamaları yönünden incelenen sağlıklı bireyler ve KOAH'lı hastalar arasında anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Bu sonuç, çalışmamızdaki sağlıklı grubun sigarayı bırakmış ve halen içmekte olan bireylerden oluşmuş olması ile ve büyük hava yollarından elde edilen biyopsi örneklerinin akciğer parankimi ve küçük hava yollarındaki apoptotik süreci yansıtmaması ile ilişkili olabilir. Bu konu ile ilgili yapılmış çalışma sayısının oldukça yetersiz olması ve elde edilen sonuçların çelişkili olması, daha geniş çalışma gruplarında apoptozisin değişik yöntemlerle değerlendirildiği (immünohistokimya, flow sitometri, ISEL, ssDNA vb.) çalışmalara gereksinim olduğunu düşündürmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

KOAH'da havayolu epitel hücreleri ve subepitelyal inflamatuvar hücrelerde (lenfosit, nötrofil ve makrofaj) aptozis varlığını araştırmak amacıyla KOAH'lı hastalar ve sağlıklı bireylerin bronşiyal biyopsi örnekleri immünohistokimyasal yöntemle değerlendirilmiştir.

1. Halen sigara içenler ile sigarayı bırakmış olan KOAH'lılar arasında, apoptotik bronş epitel hücreleri ve inflamatuvar hücreler (lenfosit, nötrofil ve makrofaj) yönünden anlamlı farklılık olmadığı gösterilmiştir. Sigara bırakılsa bile apoptozisin aynı yoğunlukta devam etmesi, sigara dumanından başka mekanizmaların da hava yolu apoptozisinde rolü olduğunu düşündürmektedir.

2. Sağlıklı bireyler ve KOAH'lı hastalar arasında büyük hava yollarındaki apoptotik bronş epitel hücreleri ve inflamatuvar (lenfosit, nötrofil ve makrofaj) hücreler yönünden anlamlı fark saptanmaması, çalışmamızdaki kontrol grubunun sigarayı bırakan ve halen içmekte olan bireylerden oluşmuş olması ile ve büyük hava yollarından elde edilen biyopsi örneklerinin akciğer parankimi ve küçük hava yollarındaki apoptotik süreci yansıtmaması ile ilişkili olabilir.

KOAH'da büyük hava yolu hücrelerindeki aptozis varlığının ve bunun KOAH patogenezi ile ilişkisinin daha iyi anlaşılması için, daha geniş çalışma gruplarında büyük hava yollarıyla birlikte küçük hava yolları ve/veya akciğer parankim örneklerinin de alındığı, apoptozisin değişik yöntemlerle değerlendirildiği (immünohistokimya, flow sitometri, ISEL, ssDNA vb.) çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease: Global strategy for diagnosis, management, and prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease updated **2006**. ([www.goldcopd.org./Guidelineitem.asp?/2](http://www.goldcopd.org./Guidelineitem.asp?/2))
2. **Peter M. Henson, R. William Vandivier and Ivor S. Douglas.** Cell Death, Remodeling and Repair in Chronic Obstructive Pulmonary Disease? *Proc Am Thorac Soc* **2006**; 3:713-717.
3. **Ingel K Demedts, Tine Demoor, Ken R Bracke, Guy F Joos and Guy G Brusselle.** Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respiratory Research* **2006**; 7:1-10.
4. **Hodge S, Hodge G, Holmes M, Reynolds PN.** Increased airway epithelial and T-cell apoptosis in COPD remains despite smoking cessation. *Eur Respir J* **2005**; 25:447-454.
5. **Hodge SJ, Hodge GL, Reynolds PN, Scicchitano R, Holmes M.** Increased production of TGF-beta and apoptosis of T lymphocytes isolated from peripheral blood in COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2003**; 285:492-499.
6. **Hodge S, Hodge G, Scicchitano R, Reynolds PN, Holmes M.** Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol* **2003**; 81:289-96.
7. **Hodge S, Hodge G, Holmes M, Reynolds P. N.** Flow-cytometric characterisation of cell populations in bronchoalveolar lavage (BAL) and bronchial brushings from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cytometry* **2004**; 61:27-34.
8. **Hodge S, Hodge G, Holmes M, Reynolds PN.** Apoptosis in COPD. *Current Respiratory Medicine* **2005**; 1:33-41.
9. **Crooks SW, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA.** Bronchial inflammation in acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis: the role of leukotriene B4. *Eur Respir J* **2000**; 15:274-280.
10. **Meshi B, Vitalis TZ, Ionescu D, et al.** Emphysematous lung destruction by cigarette smoke. The effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2002**; 26:52-57.
11. **Ryttila P, Plataki M, Bucchieri F, Uddin M, Nong G, Kinnula VL, Djukanovic R.** Airway neutrophilia in COPD is not associated with increased neutrophil survival. *Eur Respir J* **2006**; 28:1163-1169.

12. **Maesano A.** Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Mon* **2006**; 38:41-70.
13. **Rabe KF, Beghe B, Luppi F and Fabbri LM.** Update in Chronic Obstructive Pulmonary Disease **2006**. *Am J Respir Crit Care Med* **2007**; 175:1222-1232.
14. **Celli BR, MacNee W.** Standarts for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* **2004**; 23: 932-946.
15. **Skrepnek GH, Skrepnek SV.** Epidemiology, Clinical and Economic Burden and Natural History of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Asthma. *The American Journal of Managed of Care* **2004**; 10:129-138.
16. **Kocabaş A.** KOAH'da doğal gelişim.Umut S, Yıldırım N. *Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı (KOAH)* . İstanbul, Turgut Yayıncılık ve Ticaret Anonim Şirketi **2005**; B2:10-27.
17. Sağlık Bakanlığı RSHMB Hıfzısıhha Mektebi Müdürlüğü Ulusal Hastalık Yüğü ve Maliyet Etkinlik Çalışması. Hastalık yüğü final raporu **2004** Ankara.
18. **Buist AS, Mcburnie MA, Vollmer MW, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, Menezes AMB, Sullivan SD, Lee TA, Weis KB, Jensen RL, Marks GB, Gulsvik A, Nizankowska E, BOLD Collaborative Research Grup.** International variation in the prevalence of COPD ( The BOLD Study ): a population-based prevalence study *Lancet* **2007**; 370:741-50.
19. **Gülbay BE, Acıcan T.** Patogenez ve İnflamasyon. In: Saryal SB, Acıcan T. *Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı*. Ankara, Bilimsel tıp yayınevi, **2003**; 2:21-33.
20. **William MacNee.** Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonar Disease. *Proc Am Thorac Soc* **2005**; 2:258-266.
21. **Barnes PJ, Cosio MG.** Cells and mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Mon* **2006**; 38:130-158.
22. **Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ.** Differences in interleukin-8 and tumour necrosis factor-a in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **1996**; 153:530–534.
23. **Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P.** Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* **1993**; 92:537–548.
24. **Finkelstein R, Fraser RS, Ghezze H, Cosio MG.** Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* **1995**; 152:1666–1672.
25. **Selby C, MacNee W.** Factors affecting neutrophil transit during acute pulmonary inflammation: minireview. *Exp Lung Res* **1993**; 19:407–428.
26. **O'Donnel R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R.** Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax* **2006**; 61:448-454.
27. **Stanescu D, Sanna A, Veriter C, et al.** Airways obstruction, chronic expectoration and rapid decline in FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax* **1996**; 51:267–271.
28. **Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF, Sietta M.** Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* **1998**; 158:1277–1285.

29. **Stanescu D, Sanna A, Veriter C, Kostianev S, Calcagni PG, Fabbri LM, Maestrelli P.** Airways obstruction, chronic expectoration and rapid decline in FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax* **1996**; 51:267–271.
30. **Macnee W, Wiggs B, Belzberg AS, Hogg JC.** The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs. *N Engl J Med* **1989**; 321:924–928.
31. **Di Stefano A, Maestrelli P, Roggeri A, et al.** Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* **1994**; 149:803–810.
32. **Traves SL, Culpitt S, Russell REK, Barnes PJ, Donnelly LE.** Elevated levels of the chemokines GRO-a and MCP-1 in sputum samples from COPD patients. *Thorax* **2002**; 57:590–595.
33. **Tanino M, Betsuyaku T, Takeyabu K, et al.** Increased levels of interleukin-8 in BAL fluid from smokers susceptible to pulmonary emphysema. *Thorax* **2002**; 57:405–411.
34. **Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, Ceska M, Dewald B, Baggiolini M.** Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J Exp Med* **1991**; 173: 771–774.
35. **Condliffe AM, Kitchen E, Chilvers ER. Neutrophil priming:** Pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clin Sci (Lond)* **1998**; 94:461–471.
36. **Aaron SD, Angel JB, Lunau M, et al.** Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **2001**; 163:349–355.
37. **Biernacki WA, Kharitonov SA, Barnes PJ.** Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax* **2003**; 58:294–298.
38. **Barnes PJ.** Macrophages as orchestrators of COPD. *J COPD* **2004**; 1:59–70.
39. **Meshi B, Vitalis TZ, Ionescu D, et al.** Emphysematous lung destruction by cigarette smoke. The effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2002**; 26:52–57.
40. **Saetta M, Mariani M, Panina-Bordignon P.** Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **2002**; 165:1404–1409.
41. **Grumelli S, Corry DB, Song L-X, et al.** An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med* **2004**; 1:75–83.
42. **Majo J, Ghezzi H, Cosio MG.** Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* **2001**; 17:946–953.
43. **Saetta M, Baraldo S, Corbino L, et al.** CD8+ cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **1999**; 160:711–717.
44. **Barnes PJ, Cosio MG.** Characterization of T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS Med* **2004**; 1:25–27.
45. **Hill AT, Campbell EJ, Hill SL, Bayley DL, Stockley RA.** Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *Am J Med* **2000**; 109:288–295.

46. **Cosio MG, Majo J.** Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells. *Chest*, **2002**; 121:160-165.
47. **Cosio MG.** T-lymphocytes. In: Barnes PJ, ed. *Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Cellular and Molecular Mechanisms*. New York, Taylor & Francis Group **2005**; pp321–325.
48. **Hashimoto S, Kobayashi A, Kooguchi K, Kitamura Y, Onodera H, Nakajima H.** Upregulation of two death pathways of perforin/granzyme and FasL/Fas in septic acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* **2000**; 161:237–243.
49. **Chrysofakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D.** Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD. *Chest* **2004**; 125:71–76.
50. **Turato G, Zuin R, Saetta M.** Pathogenesis and pathology of COPD. *Respiration* **2001**; 68:117–128.
51. **Keatings VM, Barnes PJ.** Granulocyte activation markers in induced sputum: Comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* **1997**; 155:449–453.
52. **Liu H, Lazarus SC, Caughey GH, Fahy JV.** Neutrophil elastase and elastase-rich cystic fibrosis sputum degranulate human eosinophils in vitro. *Am J Physiol* **1999**; 276:28–34.
53. **Mio T, Romberger DJ, Thompson AB, Robbins RA, Heires A, Rennard SI.** Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* **1997**; 155:1770–1776.
54. **Hellermann GR, Nagy SB, Kong X, Lockey RF, Mohapatra SS.** Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respir Res* **2002**; 3:22.
55. **Floreani AA, Wyatt TA, Stoner J, et al.** Smoke and C5a induce airway epithelial ICAM-1 and cell adhesion. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2003**; 29:472–482.
56. **Takizawa H, Tanaka M, Takami K, et al.** Increased expression of transforming growth factorbeta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am J Respir Crit Care Med* **2001**; 163:1476–1483.
57. **Aarbiou J, Rabe KF, Hiemstra PS.** Role of defensins in inflammatory lung disease. *Ann Med* **2002**; 34: 96–101.
58. **Casolaro MA, Bernaudin JF, Saltini C, Ferrans VJ, Crystal RG.** Accumulation of Langerhans cells on the epithelial surface of the lower respiratory tract in normal subjects in association with cigarette smoking. *Am Rev Respir Dis* **1988**; 137:406–411.
59. **Soler P, Moreau A, Basset F, Hance AJ.** Cigarette smoking-induced changes in the number and differentiated state of pulmonary dendritic cells/Langerhans cells. *Am Rev Respir Dis* **1989**; 139:1112–1117.
60. **Kuhn C, Yu SH, Chraplyvy M, Linder HE, Senior RM.** The induction of emphysema with elastase. II. Changes in connective tissue. *Lab Invest* **1976**; 34:372–380.
61. **Takeyabu K, Betsuyaku T, Nishimura M, Yoshioka A, Tanino M, Miyamoto K, Kawakami Y.** Cysteine proteinases and cystatin C in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Eur Respir J* **1998**; 12:1033–1039.

62. **Russell RE, Thorley A, Culpitt SV, Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, Fitzgerald M, Barnes PJ.** Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2002**; 283:867–873.
63. **Culpitt SV, Maziak W, Loukidis S, Nightingale JA, Matthews JL, Barnes PJ.** Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines, and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **1999**; 160:1635–1639.
64. **Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, O'Connor CM.** Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* **1997**; 156:240–247.
65. **Imai K, Dalal SS, Chen ES, Downey R, Schulman LL, Ginsburg M, D'Armiento J.** Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* **2001**; 163:786–791.
66. **Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, Barnes PJ.** Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2002**; 26:602–609.
67. **Lim S, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ, Fan CK.** Balance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers, regulation by interleukin-10. *Am J Respir Crit Care Med* **2000**; 162:1355–1360.
68. **Lanone S, Zheng T, Zhu Z, Liu W, Lee CG, Ma B, Chen Q, Homer RJ, Wang J, Rabach LA.** Overlapping and enzyme-specific contributions of matrix metalloproteinases-9 and -12 in IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Clin Invest* **2002**; 110:463–474.
69. **Gadek J, Fells GA, Crystal RG.** Cigarette smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans. *Science* **1979**; 206:1315–1316.
70. **Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA.** Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* **2003**; 22:672–688.
71. **MacNee W.** Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol* **2001**; 429:195–207.
72. **Cantin A, Crystal RG.** Oxidants, antioxidants and the pathogenesis of emphysema. *Eur J Respir Dis* **1985**; 66:7–17.
73. **Laurent P, Janoff A, Kagan HM.** Cigarette smoke blocks cross-linking of elastin *in vitro*. *Am Rev Respir Dis* **1983**; 127:189–192.
74. **Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ.** Analysis of expired air for oxidation products. *Am J Respir Crit Care Med* **2002**; 166:31–37.
75. **Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I, Aarts LP, Wielders PL, van Herwaarden CL, Bast A.** Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **1996**; 154:813–816.
76. **Rahman I, Schadewijk AA, Crowther AJ, Hiemstra PS, Stolk J, MacNee W, De Boer WI.** 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **2002**; 166:490–495.
77. **Cantin AM, Fells GA, Hubbard RC, Crystal RG.** Antioxidant macromolecules in the epithelial lining fluid of the normal human lower respiratory tract. *J Clin Invest* **1990**; 86:962–971.

78. **Linden M, Hakansson L, Ohlsson K, Sjodin K, Tegner H, Tunek A, Venge P.** Glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from smokers is related to humoral markers of inflammatory cell activity. *Inflammation* **1989**; 13:651–658.
79. **Pacht ER, Kaseki H, Mohammed JR, Cornwell DG, Davis WR.** Deficiency of vitamin E in the alveolar fluid of cigarette smokers. Influence on alveolar macrophage cytotoxicity. *J Clin Invest* **1988**; 77:789–796.
80. **Bui MH, Sauty A, Collet F, Leuenberger P.** Dietary vitamin C intake and concentrations in the body fluids and cells of male smokers and nonsmokers. *J Nutr* **1992**; 122:312–336.
81. **Gilks CB, Price K, Wright JL, Churg A.** Antioxidant gene expression in rat lung after exposure to cigarette smoke. *Am J Pathol* **1998**; 152:269–278.
82. **Rahman I, MacNee W.** Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radic Biol Med* **2000**; 28:1405–1420.
83. **Morrison D, Rahman I, Lannan S, MacNee W.** Epithelial permeability, inflammation and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am J Respir Crit Care Med* **1999**; 159:473–479.
84. **Vandivier RW, Fadok VA, Hoffmann PR.** Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. *J Clin Invest* **2002**; 109:661–670.
85. **Ferrara F, D’Adda D, Falchi M.** Thymic macrophagic activity of patients affected by pneumonia or chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Tissue React* **1996**; 18:109–114.
86. **Hodge S, Hodge G, Scicchitano R.** Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol* **2003**; 81:289–296.
87. **Prieto A, Reyes E, Bernstein ED.** Defective natural killer and phagocytic activities in chronic obstructive pulmonary disease are restored by glycoprophosphopeptical (immunoferon). *Am J Respir Crit Care Med* **2001**; 163:1578–1583.
88. **Ulukaya E.** Apoptozis Ders Notları. **2003** ([www20.uludag.edu.tr/~eulukaya](http://www20.uludag.edu.tr/~eulukaya))
89. **Öktem S, Özhan MH, Özol D.** Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi* **2001**; 2:91-95.
90. **Hung RWY, Chow AW.** Dissecting the “end game”: clinical relevance, molecular mechanisms and laboratory assesment of apoptosis. *Clin Invest Med* **2004**; 27:324-44.
91. **Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK.** Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited. *Cellular and molecular biology letters* **2006**; 11:506-525
92. **Roy N, Mahadevan,MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Benser A, Lefebvre C, Kang X, Salih M, Aubry H, Tamai K, Ioannou P, Crawford O, Surh L, Ikeda J, Korneluk RG, Mac Kenzie A.** The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* **1995**; 80:167-178.
93. **Salvesen, GS, Duckett CS.** IAP proteins: blocking the road to death’s door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**; 3:401-410.
94. **Deveraux QL, Reed JC.** IAP family proteins: suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **1999**; 13:239-252.
95. **Sato T, Irie S, Krajewski S, Reed JC.** Cloning and sequencing of a cDNA encoding the rat Bcl2 protein. *Gene* **1994**; 140:291-292.

96. **Burlacu A.** Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cel Mol Med* **2003**; **7**:249-257.
97. **Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, Dive C, Hickman JA.** Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak *in-vivo* precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* **1999**; **144**:903-914.
98. **Erster S, Moll UM.** Stress induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**; **331**:843-850.
99. **Aggarwal BB.** Tumor necrosis factor receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kB. *Ann Rheum Dis* **2000**; **59**:6-16.
100. **Sutton VR, Davis JE, Cancilla M, Johnstone RW, Puefli AA, Sedelies K.** Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme mediated caspase activation. *J Exp Med* **2000**; **192**:1403-14.
101. **Moore VDG, Brown JR, Certo M, Love TM, Novina CD, Letai A.** Chronic lymphocytic leukemia requires Bcl2 to sequester prodeath Bim, explaining sensitivity to Bcl2 antagonist Abt-737. *J. Clin. Invest* **2007**; **117**:112-121.
102. **Lamy L, Tichioni M, Jazdanian AK, Samson M, Deckert M, Greenberg AH, Bernard A.** CD47 and the BH3-only protein BNIP3 in T cell apoptosis. *J Biol Chem* **2003**; **278**:3915-3921
103. **Huerta S, Goulet EJ, Yopez S, Livingston EH.** Screening and Detection of Apoptosis. *Journal of Surgical Research* **2007**; **139**:143-156.
104. **Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M.** Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* **1993**; **364**:806-809.
105. **Vandivier RW, Fadok VA, Ogden CA.** Impaired clearance of apoptotic cells from cystic fibrosis airways. *Chest* **2002**; **121**:89.
106. **Frisch SM, Francis H.** Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* **1994**; **124**:619-26.
107. **Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P.** Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* **1993**; **92**:537-548.
108. **Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ.** Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **1996**; **153**:530-534.
109. **Park JW, Ryter SW, Choi AM.** Functional significance of apoptosis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* **2007**; **4**:347-353.
110. **Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M.** Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* **2000**; **117**:684-694.
111. **Imai K, Mercer BA, Schulman LL, Sonett JR, D'Armiento JM.** Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *Eur Respir J* **2005**; **25**:250-258.
112. **Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A.** Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest* **2004**; **125**:626-632.

113. **Calabrese F, Giacometti C, Beghe B, Rea F, Loy M, Zuin R, Marulli G, Baraldo S, Saetta M, Valente M.** Marked alveolar apoptosis/proliferation imbalance in end-stage emphysema. *Respir Res* **2005**; 6:1-14.
114. **Kasahara Y, Tudor RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF.** Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* **2001**; 163:737-744.
115. **Kanazawa H, Yoshikawa J.** Elevated Oxidative Stress and Reciprocal Reduction of Vascular Endothelial Growth Factor Levels With Severity of COPD. *Chest* **2005**; 128:3191-3197.
116. **Sakao S, Tatsumi K, Hashimoto T, Igari H, Shino Y, Shirasawa H, Kuriyama T.** Vascular endothelial growth factor and the risk of smoking-related COPD. *Chest* **2003**; 124:323-327.
117. **Henson PM, Cosgrove GP, Vandivier RW.** Apoptosis and cell homeostasis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* **2006**; 3:512-518.
118. **Hodge SJ, Hodge GL, Reynolds PN, Scicchitano R, Holmes M.** Increased peripheral blood T cell apoptosis and decreased Bcl 2 in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Immunology and Cell Biology* **2005**; 83:160-166
119. **Majo J, Ghezzi H, Cosio MG.** Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* **2001**; 17:946-953.
120. **Willemse BW, Hacken NH.** Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur Respir J*, **2005**; 26:835-845
121. **Willemse BW, Postma DS.** The impact of smoking cessation on respiratory symptoms, lung function, airway hyperresponsiveness and inflammation. *Eur Respir J* **2004**; 23:464-476.
122. **Turato G, Di Stefano A.** Effect of smoking cessation on airway inflammation in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*, **1995**; 152:1262-1267.
123. **Vernooy JH, M Kucukaycan.** Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am J Respir Crit Care Med*, **2002**; 166:1218-1224.
124. **Swan GE, Hodgkin JE.** Reversibility of airways injury over a 12 month period following smoking cessation. *Chest*, **1992**; 101:607-612.
125. **Capelli A, Di Stefano A.** Increased MCP-1 and MIP-1 beta in bronchoalveolar fluid of chronic bronchitis. *Eur Respir J*, **1999**; 14:160-165.
126. **Domagala-Kulawik J, Maskey-Warzechowska M, Kraszewska I, Chazan R.** The cellular composition and macrophage phenotype in induced sputum in smokers and ex-smokers with COPD. *Chest* **2003**; 123:1054-1059.
127. **Gamble E, Grootendorst DC, Hattotuwa K, O'Shaughnessy T, Qiu Y, Zhu J, Vignola AM, Morell F, Pavord I, Rabe KF, Jeffery PK, Barnes NC.** Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: a pooled analysis. *Eur. Respir J* **2007**; 30:467-471.
128. **Vestbo J, Hogg JC.** Convergence of the epidemiology and pathology of COPD. *Thorax* **2006**; 61:86-88.
129. **Barnes PJ.** Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. **2000**; 343:269-280.
130. **Nagai A.** Pathology and Pathophysiology of Chronic obstructive pulmonary disease. *Internal Medicine* **2002**; 41:265-269.

131. **Druilhe A, Wallaert B, Tsiopoulos A, Lapa e silva J, Leblond I, Pretolani M.** Apoptosis, Proliferation and expression Bcl-2, Fas and Fas ligand in Bronchial biopsies from Asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1998**; 19:747-757.
132. **Lamb JP, James A, Carroll N, Siena L, Elliot J, Vignola AM.** Reduced apoptosis of memory T cells in the inner airway wall of mild and severe asthma. *Eur Respir J* **2005**; 26:265-270.
133. **Duncan CJA, Lawrie A, Blaylock MG, Douglas JG, Walsh GM.** Reduced eosinophile apoptosis in induced sputum correlates with asthma severity. *Eur Respir J* **2003**; 22:484-490.
134. **Vignola AM, Chanez P, Chiappara, G, Siena L, Merendino A, Reina C, Gagliardo R, Profita M, Bousquet J, Bansignore G.** Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophage and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* **1999**; 103:563-73.
135. **Plataki M, Koutsopoulos AV, Darivianaki K, Delides G, Siafakas NM, Bouros D.** Expression of apoptotic and antiapoptotic markers in epithelial cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* **2005**; 127:266-274.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sezen Sabancı Küçükaltun  
Doğum Tarihi ve Yeri : 1978- Adana  
Medeni Durumu : Evli  
Adres : Reşatbey mah. Fuzuli cad. Dotaş Apt. K:9, D:24 Adana  
Telefon : 03224588577  
E-mail : skucukaltun@yahoo.com  
Mezun olduğu Tıp Fakültesi : Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Görev Yerleri : Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adana  
Dernek Üyelikleri : Toraks Derneği  
Alınan Burslar : -  
Yabancı Dil : İngilizce