

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ GÖĞÜS HASTALIKLARI ve YOĞUN BAKIM

ANABİLİM DALI

**ASTIM HASTALARINDA STATİN KULLANIMININ
HAVA YOLU İNFLAMASYON ve YENİDEN YAPILANMA
BELİRTEÇLERİ ile ASTIM KLİNİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. ŞEHNAZ OLGUN TANDOĞDU

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2011

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ GÖĞÜS HASTALIKLARI ve YOĞUN BAKIM

ANABİLİM DALI

**ASTIM HASTALARINDA STATİN KULLANIMININ
HAVA YOLU İNFLAMASYON ve YENİDEN YAPILANMA
BELİRTEÇLERİ ile ASTIM KLİNİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. ŞEHNAZ OLGUN TANDOĞDU

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN: Prof. Dr. BERRİN BAĞCI CEYHAN

İSTANBUL 2011

ÖNSÖZ

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde asistanlığım boyunca oluşturduğu farklı bilimsel ortam ile eğitimimde ve kişisel gelişimimde emeği olan başta Prof.Dr. Turgay ÇELİKEL olmak üzere;

Tez çalışmamın planlanması ve gerçekleşmesinde özverisi, fikirleri ve katkılarıyla araştırmamın başından tez yazımı sonuna kadar çok büyük emeği olan Prof. Dr. Berrin Bağcı CEYHAN'a,

Yedi gün yirmidört saat yorulmadan ve bıkmadan eğitimimize katkı sağlayan ve destekleyen Prof. Dr. Sait KARAKURT'a,

İç Hastalıkları rotasyonu esnasında eğitimimde emeği geçen tüm hocalarıma,

Asistanlık yıllarımı birlikte geçirmekten büyük mutluluk duyduğum ve her zaman yanımda olan çok değerli Dr. Emel Eryüksel'e ve Dr. Derya Kocakaya'ya, intörlüğünden itibaren beraber çalıştığımız ve tüm kritik noktalarda yanımda olan sevgili Dr. Baran Balcan'a, birlikte çok severek ve isteyerek çalıştığım kıdemlilerim Dr. Yasin Abul ve Dr. Merih Kalamanoğlu Balcı'ya, birlikte çalışma fırsatı bulduğum Dr. Seda Sağmen ve Dr. Hüseyin Arıkan'a, tezimin yapım aşamasında emeklerini ve yardımlarını esirgemeyen Hemş. Hatice Şenol ve Seval Acar'a, personelimiz Alişan Karataş'a,

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmunoloji BD'dan Prof. Dr. Emel Demiralp'e, laboratuvarın değerli çalışanları Gülten Çolak, Aysın Tolunay, Yeşim Elbir Kulaksız, Nebiye Sofu ve çalışanları Turan İnan'a,

Çalıştığım süre içerisinde gerek iş gerek sosyal hayatımda yanımda olan Dr. Aslı Tufan, Dr. Ozan Kocakaya, Dr Pegah Golabi, Dr Buket Ertürk Şengel, Dr. Akif Öztürk, Dr. Zeynep Kubilay Bozkurt'a,

Tüm hayatım boyunca bana her zaman destek olan eşime ve aileme içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Şehnaz Olgun TANDOĞDU

ÖZET

Giriş: Astım kronik hava yolu inflamasyonu ve bunun bir sonucu olarak hava yolunda gelişen yeniden yapılanma ile seyreden bir hastalıktır.

Amaç: Astım tanısı olan olgularda, statin kullanımının hava yolu inflamasyon ve yeniden yapılanmasında rol oynayan hücresel ve inflamatuvar belirteçler ile astım kliniği üzerine olan etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

Metod: Hastanemizde astım tanısı ile izlenen LDL ≥ 130 mg/dL olarak saptanan 25 hasta ve bunlar ile cinsiyet ve yaş eşdeğer olan LDL < 130 mg/dL olan 26 hasta çalışmaya alındı. Başlangıçta olgulara solunum fonksiyon testi (SFT) yapılarak ardından metakolin ile bronş provokasyon testi, periferik yayma ile eosinofili oranı, kanda total IgE ve spesifik IgE alt gruplarına bakıldı, cilt allerji testi, balgam indüksiyonu uygulanarak Astım Kontrol Anketi (ACQ) ve Astım Yaşam Kalitesi Anketi (AQLQ) dolduruldu. Bu değerler 0. gün olarak kaydedilerek LDL ≥ 130 mg/dL olan 25 hastaya Rosuvastatin 40 mg tb günde 1 defa almakta oldukları mevcut tedaviye 8 hafta boyunca eklendi, diğer 26 astımlı hasta ise kontrol grubu olarak mevcut tedavi ile 8 hafta izlendi. 8. hafta sonunda olgulara tekrar aynı incelemeler yapıldı. Hastalardan alınan indükte balgam süpernatantında ELİSA yöntemi ile inflamasyon belirteçleri olarak IL-2,IL-4, IL-5,IL-6,IL-8,IL-10, TNF-alfa ve bronş yeniden yapılanmasını gösteren VEGF bakıldı. 8. hafta sonundaki değerler başlangıç değerleri ile karşılaştırıldı.

Bulgular: Statin kullanan hasta grubunda 8. hafta kontrolde SFT parametrelerinden FEV₁/FVC (%) (başlangıç: 85.8 $\pm$ 11.1 – 8.hafta:90.2 $\pm$ 8.8, p<0.004), MEF(L/s)

(başlangıç: 3.51 ± 0.4 – 8. hafta 4.1 ± 0.4 , $p < 0.05$) ve MEF (% beklenen) (başlangıç: 63.6 ± 7.8 – 8. Hafta: 74.6 ± 8.4 , $p < 0.0001$) değerlerinde artış, periferik eosinofil oranında azalma (başlangıç: $\%3.7 \pm 1.2$ – 8. Hafta: $\%2.2 \pm 1.1$, $p < 0.0001$), total IgE (başlangıç: 215.3 ± 334 – 8. Hafta: 182.6 ± 320 , $p < 0.01$) ve pozitif spesifik IgE allerjen sayısında (başlangıç: 1.1 ± 1.3 – 8.hafta: 0.8 ± 0.9 , $p < 0.04$) düşüş ve indüklenmiş balgam örneklerinde IL6 ile (başlangıç: 18.7 ± 23.4 – 8. Hafta: 9.9 ± 37.2 , $p < 0.000$), TNF-alfa'da (başlangıç: 0.91 ± 1.1 – 8. hafta: 0.22 ± 0.7 , $p < 0.000$) düşüş istatistiksel anlamlı düzeyde bulundu. Statin kullanmayan hastalarda sadece VEGF düzeylerinde anlamlı düzeyde artış gözlenmiştir (başlangıç: 0 – 8. Hafta: 18.3 ± 63 , $p < 0.04$). Astım kontrol anketi (ACQ) ve astım yaşam kalitesi anketi (AQLQ)'da 8. hafta sonunda anlamlı değişim olmamıştır.

Sonuç: Statin kullanan astım hastalarında solunum fonksiyon testi parametrelerinden MEF(% beklenen), MEF (L/sn) ve FEV₁/FVC (%)'de artış, balgam süpernatantında IL-6 ve TNF-alfa düzeylerinde azalma saptanmış, statin kullanmayanlarda ise VEGF düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. Mevcut bulgular statin kullanımı ile astımlı hastaların hava yolunda temel inflamatuvar belirteçlerde baskılanma meydana gelirken solunum fonksiyon testi parametrelerinin de düzeldiğini göstermektedir, ancak angiogeneze karşı stabilize edici etkisi varken semptomlar üzerine etkisi olmamıştır. Klinik olarak anlamlı sonuçların ortaya çıkması için daha fazla hasta üzerinde ve uzun süreli randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

KISALTMALAR

- MCP-1: Monosit kemoataktan protein-1
- TNF-alpha: Tümör nekroz faktor
- TARC: Timus aktifleyen regulatuar kemokinler
- MDC: Makrofaj kökenli kemokinler
- GM-CSF: Granülosit Makrofaj stimule edici faktör
- EGFR: Epitelyal büyüme faktör reseptörü
- TGF-beta: Tümör büyüme faktörü – beta
- EGF: epidermal büyüme faktörü
- ECM: Ekstrasellüler matriks
- MMPs: Matriks metalloproteinazları
- ASM: Hava yolu düz kası
- VEGF: Vasküler epitelyal büyüme faktörü
- VEGFR: Vasküler epitelyal büyüme faktörü reseptörü
- CTGF: Konnektif doku büyüme faktörü
- NO: Nitrik oksit
- FGF-2: Fibroblast büyüme faktörü-2
- FeNO: Ekshale nitrik oksit
- FeCO: Ekshale karbonmonoksit
- CCR: eosinofil selektif kemokin reseptör
- TLR: Toll-like reseptör

- MHCII: Major histocompatibility class II
- CIITA: Class II transaktivator
- NK: Natural killer
- VLA-4: Very late antijen
- ICAM-1: İntrasellüler adezyon molekülü 1
- VCAM-1: Vasküler adezyon molekülü-1
- LFA-1: Lenfosit fonksiyonu ilişkili antijen-1
- eNOS: Nitrik oksit sentaz
- PPAR-alfa-gama: Peroksizom proliferoaktiveted reseptor- alfa- gama
- NF KappaB: Nükleer faktör kappaB
- EPCs: Endotelyal progenitör hücreler

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Astım	4
2.1.1. Astım gelişimini ve hastalığın tetiklenmesini etkileyen faktörler.....	5
2.1.2. Astım patofizyolojisi.....	6
2.2. Hava Yolu Yeniden Yapılanması.....	13
2.3. Astım Kliniği, Tanı Yöntemleri ve Tedavi.....	20
2.4. Statinler.....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	47
3.1. Hasta Seçimi	47
3.2. Çalışma Planı:	48
3.3. Solunum Fonksiyon Testi ve Bronş Provokasyon Testi, Cilt Prick Testi , Periferik Eosinofili, IgE Analizleri ve Anketler	49
3.6. İstatistiksel Analiz.....	52
4. BULGULAR.....	53
4.1. Demografik Özellikler	53
4.2. Solunum Fonksiyon Testi Sonuçları.....	54
4.3. Periferik Eosinofili Sonuçları.....	59
4.4. Statin Kullanımının Bronş Provokasyon Testine Olan Etkisi	60
4.5. Statin Kullanımının Allerji Parametreleri Üzerine Olan Etkisi.....	60
4.6. Statin Kullanımının İnflamatuar Belirteçler Üzerine Etkisi.....	63
4.7. Statin Kullanımının Astım Kontrol Anketi (ACQ) ve Astım Yaşam Kalitesi Anketi (AQLQ) Skorları Üzerine Etkisi	66
5. TARTIŞMA	69
6. KAYNAKLAR	82
7. EKLER.....	96
Apendiks	96
7.1. Periferik Yayma	96
7.2. Prick Test.....	96
7.3. ACQ ve AQLQ Anketlerinin doldurulması.....	97

7.3.2.	AQLQ.....	102
7.4.	Solunum Fonksiyon ve Bronş Provokasyon Testi.....	106
7.5.	ELİSA İncelenmesi	109

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Astım kendiliğinden veya tedavi ile geri dönebilen hava yolunun daralması ile seyreden kronik bir hastalıktır [1]. Hastalık temelinde hava yollarında devam eden sürekli bir inflamasyon söz konusudur [1]. Astım klinikte kendini öksürük, nefes darlığı, göğüste sıkışma hissi olarak gösterebilir. Semptomlar ilaç tedavisi altında kısmen veya tamamen gerilemekle beraber devam eden inflamasyon mevcut tedaviler ile gerileme göstermekte ancak tamamen engellenememektedir [1].

Dünya genelinde yaklaşık olarak üç yüz milyon astım hastası olduğu tahmin edilmektedir [2]. Batı toplumlarında gelişmekte olan ülkelerde hastalığın prevalansı %5-10 olarak kabul edilmektedir [2]. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise cinsiyet farkı gözetmeksizin prevalans %2-8 arasında değişmekte olduğu bildirilmiştir [3].

Astım patogenezinde hava yolları üzerinde birbirleri ile etkileşim içerisinde çok sayıda mediyatör rol oynamaktadır. İnterlökinler (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10) özellikle inflamasyonun temel hücresi olan Th2'nin aktivasyonu, Th2 farklılaşması, diğer sitokinlerin salınımı, eosinofillerin uyarılma ve farklılaşması, eosinofil sitotoksik etkileri, makrofajların aktivasyonu gibi kilit görevlerde yer alırlar. TNF-alfa yine birden fazla fonksiyonu olan bir sitokin olup eosinofiller ve epitelyal doku üzerindeki sitotoksik etkiden sorumludurlar [4]. Diğer interlökinlerin salgılanmasında, hücre uyarılmasında görev alırlar ve doku üzerindeki adezyon molekülleri salınımını artırırırlar. Ayrıca hava yolu düz kasında kasılmayı kuvvetlendirici etkisi bulunmaktadır. VEGF astımlı hava yolunun yeniden yapılanmasında yeni damar gelişimini sağlayan molekül olup bilinen en potent anjiogenik moleküldür. Astımda hava yolunun yeniden

yapılanmasında son zamanlarda en çok üzerinde durulan konu olan yeni damar gelişiminin en önemli molekülü olarak tanımlanmaktadır [5-6]. İnterlökünler, TNF-alfa ve VEGF hava yolu inflamasyon ve yeniden yapılanmasını değerlendirme açısından çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadırlar.

Statinler serum kolesterol seviyesini düşüren ve bu nedenle hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan geniş bir ilaç grubudur. Kolesterol sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan 3Hidroksi-3Metilglutaril Koenzim A (HMG-CoA) Redüktazı kompetitif olarak inhibe ederler [7]. Yapılan birçok çalışmada statinlerin kolestrol düşürücü özelliklerinden bağımsız olarak immünmodülatuar [8] ve antiinflamatuvar [9] etkileri de gösterilmiştir.

Statin kullanımı ve astım ile yapılmış az sayıda klinik çalışmada statinlerin TNF-alfa düzeyi [10], solunum fonksiyon testi parametreleri ve semptom skorlarında düzelme ile [11], inhale steroid ihtiyacında yarattığı değişkenlik [12] araştırılmıştır. Ancak klinik ile beraber inflamasyon ve yeniden yapılanma parametrelerini inceleyen geniş kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı hiperlipidemisi olan astım hastalarında statin kullanımının hava yolu inflamatuvar ve yeniden yapılanma belirteçleri ile astım kliniği üzerine olan etkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Astım

Astım kendiliğinden veya tedavi ile geri dönüşümlü bir çok hücre ve hücresel elemanın rol aldığı kronik inflamatuvar bir hava yolu hastalığıdır. Kronik inflamasyon hava yolunun artmış cevabına yol açarak tekrar eden öksürük, nefes darlığı, göğüste sıkışma hissi, hışıltılı solunum gibi klinik bulgular oluşturmaktadır [1, 13].

Allerjenler dışında infeksiyonlar, egzersiz, metakolin gibi kimyasal ajanlar, soğuk ve kirli hava, emosyonel durum ve hava değişiklikleri gibi etkenler hava yolu hiperreaktivitesine neden olabilmektedir [14].

Dünya genelinde tahmini olarak yaklaşık 300 milyon astım hastası olduğu düşünülmektedir [1]. Hastaların büyük bölümünü hafif ve orta astım hastaları oluşturmaktadır, geriye kalan küçük bir grup da ciddi astım tanısına sahiptir [15]. Toplumlar arasında astım prevalansın %1-18 arasında değiştiği saptanmıştır [16].

Ülkemizde yapılan çalışmalarda çocuklarda belirtilen astım prevalansı %2.8-9.8 arasında değişmektedir. Erişkinlerde ise prevalans çalışmalarına bakıldığında erkeklerde %2.1-6.9 kadınlarda %2.8-7.5 bulunmuştur [3].

2.1.1. Astım gelişimini ve hastalığın tetiklenmesini etkileyen faktörler

Astım riskini etkileyen faktörler hastalığın gelişimine yatkınlığı sağlayan ve astım atağının tetiklenmesini sağlayan çevresel faktörler olarak iki başlık altında incelenebilir. Çevresel ve konağa bağlı değişkenler etkileşim içindedir. Konağa bağlı faktörler genetik (atopiye veya artmış hava yolu cevabına eğilim), obezite ve cinsiyet; çevresel faktörler ise ev tozları, akarlar, küfler, hayvan tüyleri, solunum yolu enfeksiyonları, aktif veya pasif sigara kullanımı, hava kirliliği ve diyet olarak sayılabilir.

Astım genetiği ile ilgili son veriler hastalığın gelişiminde birden fazla genin etkili olduğunu göstermektedir, genetik yapı ırklar arasında da değişiklik göstermektedir [17-18]. Genetik araştırmalar özellikle dört ana mekanizma üzerine yoğunlaşmaktadır, IgE spesifik antikorların üretimi, hava yolu artmış cevabı, immün mediatörlerin (sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri) üretimi, Th1 ve Th2 arasında etkileşimin sağlanması (astımda hijyen teorisi) [18] olarak sayılabilir. Genetik yapı aynı zamanda hastalarda lökotrien antagonistleri, kortikosteroidler ve beta2 agonistlere olan cevap farklılığını da belirleyebilir [19-21].

Konağa ait diğer faktörlerden olan cinsiyet için yapılan çalışmalarda yaşamın ilk yıllarında erkek cinsiyette astım sıklığı fazla iken yaşla beraber bu farkın ortadan kalktığı ve erişkin yaşta kadın cinsiyette sıklığın arttığı izlenmiştir. Doğum esnasında erkek cinsiyette akciğer kapasitesi kadın cinsiyete oranla daha az gelişmiş olmasına rağmen yaşla beraber bu oran da tersine dönmektedir [22]. Yine obez olan astım

hastalarında yapılan çalışmalarda leptin molekülünün artmış hava yolu cevabında rol oynadığı ve obezitenin de astım için bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir [23].

Çevresel faktörlere bakıldığında polenler, ev tozu, akarlar, kedi ve köpek tüyü, küf mantarları en çok allerjik sentizasyona yol açan maddelerdir. Mesleksel maruziyet ise plastik imalatı, temizlik malzemeleri, boyacılık vs olarak sayılabilir.

Diyet ile ilişkili yapılan araştırmalarda ise bebeklik çağında inek sütü ve soya sütü ile beslenen bebeklerin anne sütüyle beslenenlere oranla daha fazla wheezing semptomu olduğu gösterilmiştir [24]. Batı tipi beslenme ile (azalmış antioksidanlar, doymuş yağ oranın yüksek olması ve doymamış yağ oranındaki azalma) astım ve atopi gelişiminin ilişkili olduğunu gösteren yayınlar da mevcuttur [25].

2.1.2. Astım patofizyolojisi

Astımda hava yolunda meydana gelen değişiklikler hücresel ve inflamatuvar mediyatörler aracılığıyla olmaktadır [26]. Mekanizmalar tam olarak açıklanamamakla beraber bu inflamasyonun hava yolu artmış cevabına sebep olduğu düşünülmektedir.

Semptomlar epizodik olmasına rağmen hava yolu inflamasyonu persistan bir süreçtir. İnflamasyon paterni tüm yaş grupları, allerjik- allerjik olmayan, aspirin ile ilişkili astımda da benzerlik göstermektedir.

2.1.2.1. Erken ve Geç Faz Reaksiyon

Allerjenle provoke olmuş mast hücrelerinin aktivasyonu astım için iyi bir örnek model oluşturmaktadır. Allerjen uyarısı sonrasında erken dönem faz başlar, bu süreç bir kısım olguda geç faz olarak devam edebilir. Temasın erken fazında karşılaşılan allerjene karşı

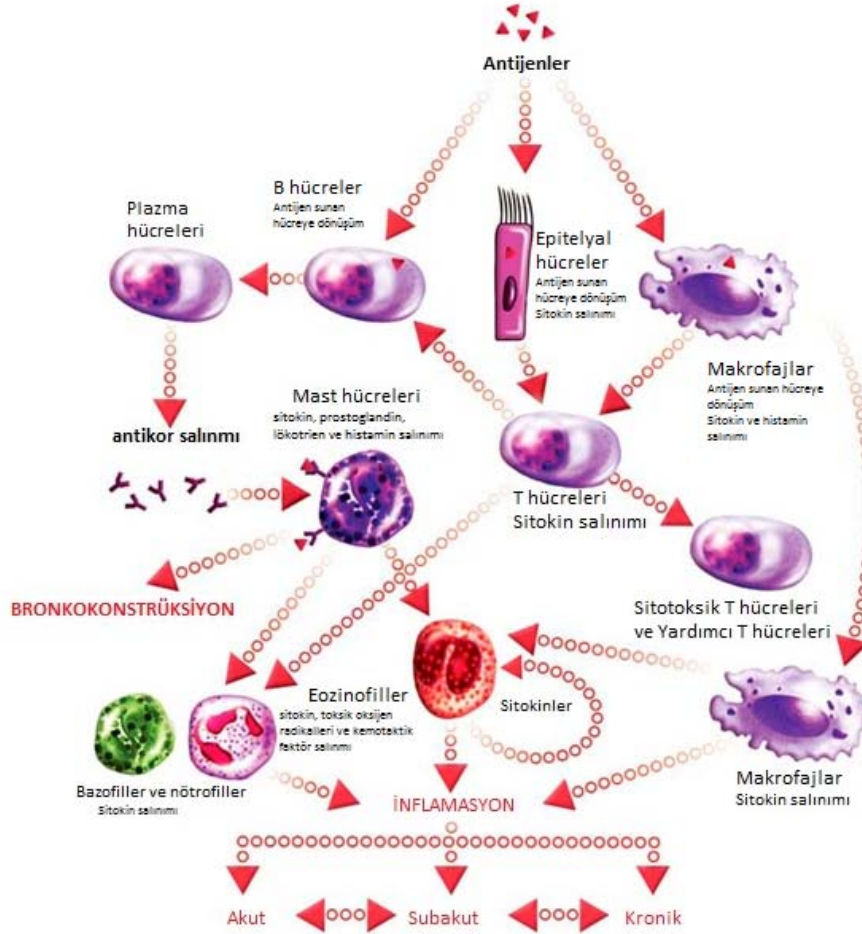
vücutta spesifik IgE antikorlarında artış izlenmektedir. Plazma hücreleri tarafından sentezlenen ve salgılanan IgE antikorları mast hücre ve bazofillerdeki yüksek afiniteli reseptörlere bağlanırlar. Allerjenle sonraki karşılaşmada mukozal mast hücreleriyle temas sonucu mast hücresi yüzeyindeki allerjen spesifik IgE antikorları ile çapraz reaksiyon gelişir ve kalsiyum bağımlı hızlı degranülasyon ve mediyatör ilişkili reaksiyon başlamaktadır.

İnsanlarda yapılan allerjen-bronkoprovasyon çalışmalarında sentisize olmuş bir allerjenin bronkoprovokasyonu ile dakikalar içerisinde bronkokonstriksiyon meydana geldiği kanıtlanmıştır. Bu süreç erken faz reaksiyon olarak tanımlanır ve mast hücre mediyatörlerinin aşırı duyarlılık yanıtıdır [27]. Salınan histamin, prostoglandin D2 ve sistenil lökotrienler, hava yolu düz kasını (ASM) etkileyerek refleks nöral mekanizmaları harekete geçirmektedirler [27-28].

Erken faz bazen bronkokonstriksiyonun devam etmesi ile geç faz yanıt olarak takip edilebilir. Geç faz yanıt hafıza T lenfositler, eosinofiller, bazofiller gibi inflamasyon hücrelerinin ortamda birikmesi ile oluşur [27]. Dendritik hücreler de bu yolak üzerinde inflamasyon bölgesine göç ederler ve inflamasyonun düzenlenmesine yardımcı olurlar. Mediyatörlerin bu hücrelerce yeniden salgılanması ile hava yolu düz kas hücrelerinde yeniden kasılma ve bronkospazm gelişir [29].

2.1.2.2. İnflamatuvar hücreler

Aktive olmuş mast hücreleri, aktive olmuş eosinofiller, T helper (yardımcı) ve natural killer (NK) T hücrelerin reseptörlerinde artış astım inflamasyonunun karakteristik özellikleridir (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1, Astım patogenezinde yer alan inflamatuvar hücreler

Mast Hücreleri : Mast hücreleri CD34+ hematopoetik kök hücrenin myeloid olmayan parçası olan granülosit kaynaklı hücreleridir. Hücreler matürleşmemiş olarak periferik dolaşıma katılırlar ve farklılaşmaya uğrayarak epitelyal yüzey, cilt, akciğer ve gastrointestinal sisteme lokalize olurlar. Bulundukları doku ve taşıdıkları biyokimyasal özelliklere göre, mukozal mast hücreleri (atipik hücreler) ve konnektif doku mast hücreleri (tipik hücreler) olarak iki alt gruba ayrılırlar. Mast hücreleri astmatik hava yolu ve düz kasında sayıca artmış olarak bulunurlar [30]. Aktive olmuş mast hücreleri bronkokonstriktör histamin, sistenil lökötrienler, prostoglandin D2 salgılanmasına ek olarak TNF-alfa'nın depolanması ve salınımından sorumludurlar [31-32]. Ancak TNF-alfa reseptör blokerleri ve monoklonal antikorlar ile yapılan çalışmalarda atak sayısında ve hastalık şiddetinde azalma saptanmamıştır [10, 33-34]. Bu hücreler IgE reseptörlerine yüksek afinitesi olan allerjen ve osmotik uyarı (egzersiz uyarılı astım) ile aktive olurlar [35]. Düz kasta ise artmış mast hücresi sayısının artmış hava yolu cevabı ile ilişkili olduğu öngörülmektedir [36].

Eosinofiller: Eosinofiller de mast hücreleri ile aynı hematopoetik kökenden kaynaklanırlar ancak matürasyonunda etkin olan sitokinler IL-3, IL-5, GM-CSF olarak saptanmıştır. Özellikle IL-5'in eosinofil farklılaşma ve göçüne katkısı büyüktür. Allerjene maruziyet sonrasında eotaxin yardımıyla periferik kandan hava yoluna göç ederler. Astımlı olan ve olmayan olgulara ait yapılan otopsi serilerinde hafif –orta derece astımı olanlarda bile kontrol gruba oranla anlamlı periferik eosinofili saptanmıştır. Astımlı hava yolunda artmış olarak bulunan eosinofillerin miktarı ve hastalık ciddiyeti arasındaki ilişki belli çalışmalarda gösterilmiştir [37]. Aktive olmuş eosinofiller lökötrienler gibi lipid mediyatörlerin ve pıhtı aktive edici faktörün üretimini

sağlamaktadır. Bu mediyatörlerin üretimi ile düz kas kontraksiyonunu, toksik granülasyon ürünlerinin (major basic protein, eosinofil ilişkili eotoksin, eosinofil peroksidaz, eosinofil katyonik protein) salınımını sağlar ve hava yolu epiteli ve sinirlerine zarar verir. Eosinofiller aynı zamanda GM-CSF, TNF-alfa ve beta salınımı ile hava yolu yeniden yapılanmasında önemli rol oynamaktadırlar [38]. Eosinofiller IL-5, Eosinofil selektif kemokin reseptörü (CCR3) ve Toll like reseptör (TLR) ile aktive olmaktadır [39].

T lenfositler: Astmatik inflamatuvar yanıtın primer hücreleridir ve temel olarak sitokin salınımından sorumludurlar. IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 aynı zamanda eosinofilik inflamasyonu da yöneterek B lenfositler tarafından IgE üretimini denetlerler [40]. Yapılan çalışmalarda BAL'da artmış T hücre popülasyonunun aynı zamanda eosinofil sayısında artış ve hava yolu artmış cevabı ile beraber olduğu kanıtlanmıştır. Th2 artışı bir yandan Th1 üretimini tetiklerken diğer yandan Th2'yi suprese etme özelliğine sahiptir [41]. T hücreler kemokin reseptör (CCR4 ve CCR8) üretimi yapar, kemoattraktan reseptör (CR), prostoglandin D2, mast hücreleri ve eosinofiller arasındaki ilişkiyi kurarak inflamasyonun süreklilik kazanmasını sağlar [42-44]. Lökotrienler ve sitokinlerin inflamasyondaki bu önemli görevlerine rağmen rekombinant yolla yapılan biyolojik ajan çalışmalarında tek başına IL-4 [45-46] ve IL-5 [47-48] inhibisyonunun eosinofiliyi %50 oranında azaltmasına rağmen klinik veya moleküler fayda sağladığı gösterilememiştir.

Dendritik Hücreler: Hava yolu yüzeyinden bölgesel lenf noduna göç ederek T (regulatuvar) düzenleyici hücreler ile etkileşir, naif T hücrelerinden Th2 oluşumunu tetikler [40].

Makrofajlar: Havayollarında artmış sayıda bulunurlar. İnflamatuar hücreler ve sitokinlerin salınımından sorumludurlar [49].

Nötrofiller: Birden fazla lobu olan çekirdek içermeleri ve normal hava yolu ve periferik kanda bulunmaları ile diğer hücrelerden farklılık gösterirler. Terminal olarak farklılaşmış hücrelerdir ve morfolojik olarak granüllerin varlığı ile fark gösterirler. Bu granüller primer (azurofilik) veya sekonder (spesifik) olarak ikiye ayrılırlar.

Eosinofillerden farklı olarak normal akciğer parankiminde bulunabilirler. Beklenenden fazla olan nötrofil miktarı genellikle viral enfeksiyonlar, noktürnal astım veya antijene maruz kalan akciğer dokusuyla (ilk 4 ile 24 saat arasında) ilişkilendirilirler. Özellikle ciddi astmatik ve sigara içen astım hastalarının balgamlarında daha yoğunurlar. Ancak patofizyolojik rolleri ve önemi tam olarak bilinmemektedir, glukokortikoid kullanımına sekonder arttığına dair yayınlar da bulunmaktadır [50].

2.1.2.3. İnflamatuar Mediyatörler:

Astım patogenezinde temel hücreler arasında sayılan Th2 (T helper 2) hücreler hava yolu artmış cevabı, kronik eosinofilik inflamasyon, immünsekresyon ve bronkokonstriksiyonu yönlendiren hücrelerdir. Bununla beraber bu patogeneizde çok sayıda sitokin de görev yapmaktadır. Astım ve hava yolu kompleks inflamatuvar yanıtından sorumlu 100 den fazla mediyatör tanımlanmıştır.

*Kemokinler :*Hava yolu epitel hücrelerinden salgılanırlar, diğer inflamatuvar hücrelerin hava yoluna yönlendirilmesinden sorumludurlar [51]. Eotaksin eozonofiller

için özgülken, TARC (Timus aktifleyen ve reglatuar kemokinler) ve MDC (makrofaj kökenli kemokinler) Th2 hücreleri ile ilişkilidir.

Sistenil Lökotrienler: Mast hücreleri ve eosinofillerden salgılanan en potent bronkokonstriktörlerdir. Kemokinler içinde inhibisyonu ile akciğer fonksiyonları ve astım semptomlarında en belirgin düzelme sağlayan ajandır [52].

Sitokinler: Sitokinler inflamatuvar yanıt ve hastalık ciddiyetini belirleyen mediyatörlerdir. Yapılan çalışmalarda IL-1 beta ve TNF-alfa'nın anahtar sitokinler olduğu ve inflamasyonu tetikledikleri gösterilmiştir. GM-CSF hava yollarında eosinofil ömrünü uzatmaktadır. Th2'den salgılanan IL-5'in eosinofil disfonksiyonu ve sürvisini artırmada, IL-4'ün Th2 farklılaşmasında, IL-13'ün IgE farklılaşmasında etkili olduğu gösterilmiştir [53]. Mekanizmaların düzenlenmesinde IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13'ün önemli rolü bilinmekle beraber son zamanlarda TNF-alfa ile yapılan çalışmalarda önemi giderek artmaktadır [54]. TNF-alfa multifonksiyonel bir inflamatuvar sitokindir, T hücreler, nötrofil ve eosinofillerin aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır [55]. Aynı zamanda eosinofillerin epitel hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini artırmaktadır [56], epitel adezyon moleküllerinin ekspresyonunda (ICAM-1) ve (VCAM-1) miktarında artışa neden olmaktadır [57], düz kasların kontraksiyon kuvvetini artırmaktadır [58]. Astımlı olgularda yapılan çalışmalar da BAL sıvısında TNF-alfa miktarındaki artışın ciddi astımla ilişkisini göstermektedir [33]. TNF-alfa'yı bloke eden terapilerin hastalarda semptom skoru, akciğer fonksiyonları, yaşam kalitesinde düzelme yarattığını bildiren yayınlar mevcuttur [10, 34]. TNF-alfa'nın kendisi aynı zamanda IL-8 salınımını da artırır ki bu T hücrelerin aktivasyon ve sekresyon özelliğini tetiklemekte, epitelyal hücrelerden GM-CSF, ICAM-1, VCAM-1 ekspresyonunu artırmaktadır. Bu moleküller

aynı zamanda astım ataklarında artmış TNF-alfa düzeyiyle korele yüksek olarak bulunmaktadır [59]. Har-Seong Nam ve ekibinin farelerde TNF-alfa inhibisyonu ile yapmış olduğu çalışmada hava yolu inflamasyon markerleri IL-4, IL-5, IL-6, IL-10' da azalma saptamışlardır. IL-4, Th2 için büyüme faktörüdür aynı zamanda allerjik inflamasyonda IgE ve antijen arasında bağlantı kurarak inflamasyonda rol oynamaktadır. Th2'ler aktive olduktan sonra bir miktar IL-4'ü kendileri de salgılamaya devam ederler, Th2 hücrelerde farklılaşma yine IL-4 sayesinde olur.

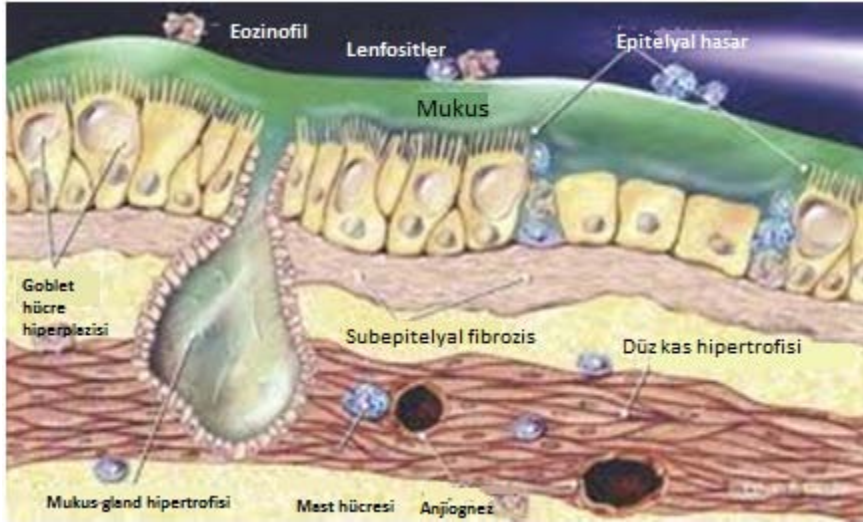
Histamin-Prostaglandin D2: Mast hücrelerinden salgılanarak bronkokonstriksiyona sebep olmaktadır.

Nitrik Oksit: Hava yolu epitelinden salgılanarak güçlü bronkokonstriksiyona sebep olurlar. Yapılan son çalışmalarda astım tedavisinin etkinliğini değerlendirme ve inflamasyonun varlığını göstermede ekshale edilen havada ölçümünün kullanılabileceğine dair kanıtlar vardır [53, 60].

2.2. Hava Yolu Yeniden Yapılanması

Astımda küçük ve büyük hava yollarındaki sağlıklı bireylerde görülmeyen yapısal değişiklik hava yolu yeniden yapılanması (airway remodelling) olarak adlandırılır. Yeniden yapılanmanın tanımı ilk defa 1922'de Hubert ve Koessler tarafından fatal astımlı olgularda tanımlanmıştır [61]. Günümüzde yeniden yapılanmanın tüm yaş gruplarında ve hafif-orta – ağır astımda da görüldüğü bilinmektedir [62]. Yapısal değişiklikler epitelyal bütünlüğün bozulması [63], bazal membranda kalınlaşma [64], subepitelyal fibrozis [65], goblet hücreleri ve submukozal glandlarda genişleme [66-

67], artmış düz kas kitlesi [66], azalmış kıkırdak yoğunluğu [68] ve artmış hava yolu vaskülaritesi [5, 69] olarak sayılabilir (Şekil 2.2). Yeniden yapılanmanın inflamasyon süreci içerisinde CD4+ T hücreleri, eosinofil, nötrofil ve mast hücrelerinin birbiriyle olan etkileşimleri sonucu ortaya çıktığı gösterilmiştir [70-72]. Hastalığın seyri esnasında ortaya çıkan akciğer fonksiyonlarında bozulma, hava yolu artmış cevabında artış, astım semptomlarında kötüleşme ve ilaç ihtiyacında artış yeniden yapılanma sürecinin sonuçları olarak ortaya çıkmaktadır [73].



Şekil 2. 2 Hava yolu yeniden yapılanması

2.2.1. Epitelial Değişim

Astımlı hava yolunda epitelial değişim epitelial dökülme, silyalı epitel hücre kaybı, goblet hücre hiperplazisi, growth faktör salınımında artış ve bu reseptörlerin (EGFR

gibi) upregulasyonu olarak sıralanabilir [63, 66, 74-75]. Sağlam hava yolu allerjenlere karşı koruyucu bir bariyer görevi yapmaktadır, bu tabakanın hasarı ile koruyucu etki ortadan kalkmaktadır.

Epitelyal hasar sonrasında tamir için göç eden hücreler geçici bir bariyer görevi görür. İyileşme için salgılanan TGF-beta ve Epidermal growth faktör (EGF) epitelyal dokudan mesenkimal dokuya dönüşüme neden olur. Astımda meydana gelen epitel dökülmesi ve kaybı tamir mekanizmasının fibrozise doğru kayması ile bozulur [76-77]. Diğer bir deyişle anormal tamir gerçekleşir.

İnsan bronş epitelinde epitelyal mezenkimal dönüşümde önemli ajan olarak kabul edilen TGF-beta'yı tetikleyen en önemli faktörlerin TNF-alfa ve IL-1 beta olduğu gösterilmiştir [78].

2.2.2. Subepitelyal Fibrozis

İkinci diğer önemli yapısal değişiklik subepitelyal tabakada meydana gelen fibrozistir. Yeniden yapılanma 1922'de ilk defa tanımlandığında subepitelyal fibrozisin tüm ciddiyetteki astım gruplarında olduğu, atopik rinitli olgular ve çocukluk çağında tedavisi zor grup astımda da izlendiği belirtilmiştir [79-80].

Subepitelyal fibrozis bazal membran tabakasının hemen altında yer alan lamina retikularis tabakasında meydana gelir ve bu aynı zamanda bazal membranda kalınlaşmaya sebep olur. Fibrozis fibroblastlar tarafından üretilen ekstrasellüler matriks (ECM) proteinleri olan kolajen I-III-IV, fibronektin, tenaskin, laminikan ve biglikanın artmış üretim ve depolanması ile ilgilidir [81-83]. Hava yollarında kollajen I-II' ün

artmış depolanmasının hava yolu artmış cevabının şiddeti, astım ciddiyeti ve atak skoru ile ilişkisi arasında korelasyon bulunduğunu ve yine fibrozis derecesi hava yolu duvar kalınlığı ve astım ciddiyeti ilişkisini gösteren çalışmalar olmuştur [84-87]. Matriks metalloproteinazları (MMPs) kollajen yıkımında rol oynayan bir proteaz ailesidir. MMP-2, MMP-3, MMP-8 ve MMP-9 astımla ilişkili olan gruptur [88-90]. Özellikle MMP-9'un astımlı olguların balgamında sağlam gruba oranla daha yüksek olduğu gösterilmiştir [90]. Lambert ve meslektaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda aslında duvar kalınlaşmasının bronkokonstriksiyonu engellenmek için bir savunma mekanizması olduğu ileri sürülmüştür. Subepitelyal tabakada kollajen depolanması hava yolu duvarında sertleşmeye neden olarak düz kaslar için ek bir yük oluşturmaktadır.

2.2.3. Düz Kas Hipertrofisi

Hava yolu düz kası hava yolu tonusunu belirleyen en önemli faktördür. Astımlı hava yolunda düz kaslarda hem sayıca artış (hiperplazi) hem de boyutta artış (hipertrofi) meydana gelmektedir. Bu hücreler aynı zamanda kemokin, sitokin, ECM salınımından da sorumludurlar [91-92]. Astımda meydana gelen düz kas hipertrofisi ile hava yolu daralması hem kas kitlesi artışından hem de hiperplazi ve hipertrofiye uğramış kitlenin kasılma kapasitesindeki artıştan olmaktadır.

Hava yolu yeniden yapılanmasında fiziksel olarak en çok daralmaya yol açan etken kas kitlesindeki artıştır, bu matematiksel olarak yapılan çalışmalarda ortaya konulduğu gibi aynı zamanda kitlesel artışla beraber kasılma kuvvetindeki artış da kanıtlanmıştır [93-94]. Bu bilgiden yola çıkılarak yapılan bronşiyal termoplasti çalışmasında termal hasarla dökülen eski hava yolundan sonra hava yolu çapında azalma ve astım kliniğinde düzelme gösterilmiştir. Astmatik ASM'lerden bol miktarda

proinflamatuvar, proanjiogenik, yeniden yapılanma öncüsü faktörler salgılandığı gösterilmiştir. Bu faktörlerden en fazla gösterileni eotaksin, VEGF ve Konektif doku Growth Faktör (CTGF) olmuştur [95-97]. Yine bununla ilişkili olarak bu dokuların kültürlerdeki hızlı büyümesini salgılanan büyüme faktörlerinin mitokondrial aktivite ve biyogenez üzerinde yaptıkları değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hava yolu parasempatik sinir sistemi ve ASM hipertrofi ve hiperplazisi son dönemlerde incelenen güncel konular arasındadır. Hava yolu parasempatik sinir sisteminin primer nörotransmitteri asetilkolindir, hava yolu sekresyonu ve bronkospazm üzerinde primer etkilidir [98-99]. Yapılan hayvan çalışmalarında asetilkolinin muskarinik reseptörler üzerinden ASM fenotipi ve yeniden yapılanmayı etkilediği gösterilmiştir [100].

2.2.4. Goblet ve Mukus Hiperplazisi

Çocuk ve erişkinlerde yapılan çalışmalarda yeniden yapılanmanın bir parçası olarak glandüler hiperplazi saptanmıştır. Bu değişiklik hava yolunu daha çok fonksiyonel olarak etkilemektedir. Sonuçta balgam miktarında artış koyulaşmış sekresyonla hava yolunda obstrüksiyon ve artmış hava yolu duvar kalınlığı gösterilmiştir [66-67].

2.2.5. Anjiogenez

Vasküler değişiklikler kendini hava yolu damarlarının genişliğinde artış veya yeni damar gelişimi olarak göstermektedir [5] (Şekil 2.3). Daha önceleri yapılan çalışmalarda kan damarlarının dilate olduğu ve konjesyonlu hava yolu olan kişilerde hastalığın daha mortal seyrettiği gösterilmiştir [101]. Vaskülaritenin normal mukozaya oranla 2-3 kat arttığı saptanmıştır ve bu oran astım ciddiyeti ile doğru orantılı olarak

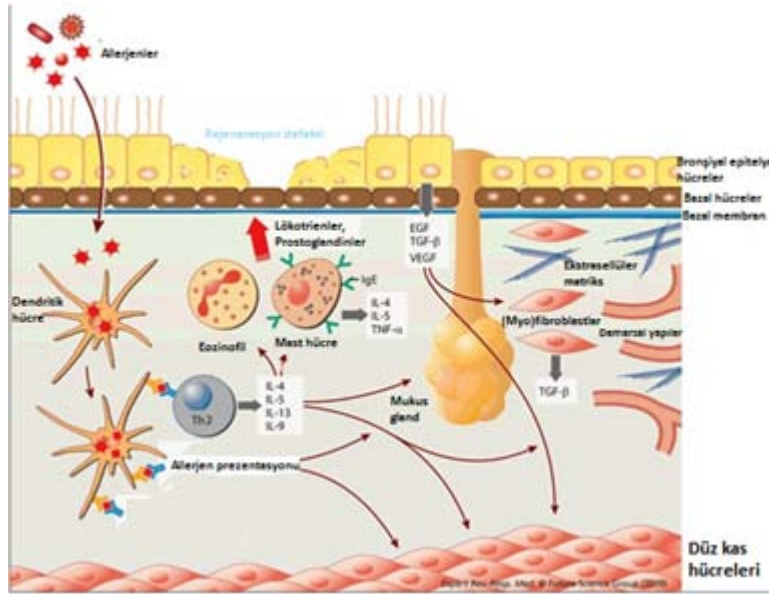
değerlendirilmiştir [6]. Hastalarda vaskülaritenin artmasına bağlı olarak ekshale edilen hava sıcaklığında ve NO seviyesinde yükselme olduğu kanıtlanmıştır [102]. Tanaka ve arkadaşlarının yaptığı endobronşiovizüalizasyon çalışmasında erişkin kronik astımının erken fazında bile vaskülarizasyonda anlamlı artış olduğu saptanmıştır [69].

Trakeobronşiyal ağacın mikrosirkülasyonundaki bu artışın vazodilatasyon-neovaskülarizasyon-hiperpermabilite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [102]. Çocuklarda yapılan çalışmalarda hafif ve orta astımlı olgularda bile neovaskülarizasyonun gözlenmesi değişimin erken fazlarda olduğunu düşündürmektedir [103]. Hava yolundaki bu yeni damar gelişimi ve konjesyonda artışın direkt zararlı mı olduğu yoksa korunma mekanizması olarak ortaya mı çıktığı halen tartışma konusudur.

Anjiogeneze proanjiogenik ve antianjiogenik faktörlerin dengesi ile gerçekleşir. Bu düzenek içerisinde endotelial hücre kontrollü tirozin kinaz reseptör ligandı, Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF), fibroblast growth faktör-2 (FGF-2), sitokinler ,kemokinler IL-6 , IL-8 rol oynamaktadırlar. En potent anjiogenik molekül VEGF olarak bilinmektedir. İnsanda etkili bilinen dört formu olmasına rağmen akciğer çalışmalarında en etkili olan varyantın VEGF121 olduğu gösterilmiştir [104]. Astımlı olgulara çocuklar dahil hava yolundan alınan sıvılarda normal olgulara oranla oldukça fazla oranda VEGF ve reseptörleri VEGF1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR/Flk-1), FGF-2, Anjiogenin ve monosit kemoattaktan protein -1 tespit edilmiştir. Bu gözlemlerin aynı zamanda artmış hava yolu vasküler alanı, hastalık ciddiyeti, hava yolu obstrüksiyonu ve kalibrasyonu ile ilişkisi belirtilmiştir [105-108]. Feltis ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada astımlı olgularda hava yolundan alınan endobronşiyal biyopsilerde artmış VEGFR1 ve VEGFR2 saptanmıştır. VEGFR1’de artış belirgindir. VEGFR2 oranındaki

artışların VEGFR1/VEGFR2 oranı ile orantılı olduğu tespit edilmesi üzerine VEGFR' in astımlı hava yolunda bir frenleme mekanizması olduğu VEGF-VEGFR2 ilişkisini düzenlediği ileri sürülmüştür [105].

Bir metalloproteinaz ve integrin olarak görev yapan ADAM33 submukozadaki fibroblastları ve düz kas hücrelerini de etkileyerek vasküler yeniden yapılanmaya yardım eder [109]. Yeniden yapılanmaya sebep olan anjiyogenik faktörlerin sadece epitelyal hücrelerden değil inflamasyona sebep olan diğer hücrelerde salgılandığı gösterilmiştir [102, 107]. CD34 + hücreler, eosinofiller, makrofajlar ve mast hücrelerinin sayısının anjiogenezin artmış olduğu bölgelerde arttığı tespit edilmiştir [110] .



Şekil 2. 3 Hava yolu yeniden yapılanması

2.2.6. Kıkırdak bütünlüğünde bozulma

Kıkırdak hava yolunun iskeleti görevini görmektedir. Sertlik ve yoğunluğu sağlar. Azalmış kartilaj volümü ve artmış proteoglikan yıkımı hava yolunda gelişen bronkospazmın daha uzun süre etkili olmasını sağlar [111].

2.3. Astım Kliniği, Tanı Yöntemleri ve Tedavi

2.3.1. Astım kliniği ve sınıflama

Astım hastaları nefes darlığı, wheezing, öksürük, göğüste daralma hissi ile başvurabilirler [112]. Semptomlar genellikle allerjen maruziyeti ile ortaya çıkarlar ve mevsimsel iyileşme ve kötüleşme gösterebilirler. Semptomların şiddeti ve iritanlar kişiden kişiye değişebilmekle beraber en sık duman, is, keskin kokular (yemek kokuları, parfüm, kimyasallar), egzersiz semptom uyarıcı olarak tanımlanmaktadır. Hastaların çoğunda noktürnal semptomlar ve sabaha karşı olan nefes darlığı daha belirgindir. Daha sık olarak çocuklarda rastlanmasına rağmen bazı erişkinler de astımın tek semptomu olarak öksürük ile doktora başvurabilmektedir (öksürük varyant astım). Böyle olgularda şikayetler daha çok geceleri ortaya çıkar. En sık eosinofilik bronşitle karışabilmektedirler, ayrıca tanı için balgamda eosinofil sayısı ve solunum fonksiyon testleri (SFT) gerekmektedir [113]. Hastaların belli bir kısmında da egzersiz semptomları ortaya çıkaran bir provakatör olabilir veya mevcut semptomları kötüleştirebilir, bu egzersiz ile uyarılan astım olarak tanımlanmaktadır. Egzersiz ile uyarılan astımda semptomlar genellikle egzersizden 5-10 dk sonra ortaya çıkmaktadır, soğuk ve kuru hava da semptom şiddetini artırabilmektedir [114]. Semptomsuz

zamanlarda hastalarda fizik muayne bulgusu yoktur, ataklar veya provakasyonla beraber solunum seslerinde kabalaşma, wheezing, ronkus, ciddi ataklarda ciltte siyanoz ve solunum güçlüğüne eşlik eden yardımcı solunum kası kullanımı olabilmektedir.

Hastalığın sınıflaması gün içi semptomlar, aktivasyon kısıtlaması, gece veya sabah semptomları, kurtarıcı ilaç kullanımı, PEF veya FEV₁ değerine göre aldıkları puana göre yapılmaktadır (Tablo 2.1). Buna göre gün içi semptomları haftada ikiden az, PEF değeri beklenen aralıkta, kurtarıcı ilaç kullanımı iki veya daha az, gece-gündüz semptomu ve aktivasyon kısıtlaması olmayan olgular kontrollü olgular olarak tanımlanırken kurtarıcı ilaç kullanımı üçten fazla, gece-gündüz semptomlarının varlığı ve aktivasyon kısıtlamasının fazla olduğu olgular kontrolsüz olarak tanımlanırlar. İki grup arasındaki hastalar ise kısmi kontrollü sınıfına girmektedirler. Astım ciddiyeti kavramı ise sınıflamadan farklı olarak semptomların şiddeti ve havayolunun kısıtlamasına göre intermitan, hafif persistan, orta persistan ve ciddi persistan olarak dört grupta toplanır [115]. Ciddiyet sınıflaması tedaviye başlama seçeneği, değiştirilen tedaviyi değerlendirme açısından yol gösterici iken kişinin tedaviye vereceği yanıtı ön görme açısından zayıf ön görüye sahiptir [116].

Nitelikler	Tam kontrol (Hepsi)	Kısmi kontrol (herhangi biri)	Kontrolsüz
Gündüz semptomu	Haftada ≤ 2	Haftada > 2	Bir hafta içinde üç veya daha fazla kısmi kontrol bulgusunun olması
Aktivite kısıtlaması	Yok	Var	
Gece semptomları	Yok	Var	
Kurtarıcı ilaç iht.	Haftada ≤ 2	Haftada >2	
PEF veya FEV ₁	Normal	$< \% 80$ beklenen	

Tablo 2.1 Astım kontrolü

2.3.2. Astımda Tanı Yöntemleri

Solunum fonksiyon testi (SFT): Astımda tanı genellikle klinikle konulmaktadır, ancak diğer yöntemler tanıya yardımcı olmaktadır. Solunum fonksiyon testinde obstrüksiyon saptanması ve saptanan obstrüksiyonun geri dönüşümlü olması anlamlı bir bulgudur [117]. SFT’de obstrüksiyon derecesinin yanı sıra reversibilite ve değişkenlik de saptanabilir. Reversibilite inhaler ajanlar karşısında hızla gelişen cevabın gösterilmesidir. FEV₁ de %12 lik ve > 200 ml artış reversibl yanıt olarak kabul edilmektedir. Değişkenlik ise kişinin mevcut SFT’sinde takipte gelişen değişikliklerdir, hastalık takibinde ve ilaç tedavisinin düzenlenmesinde kullanılmaktadır.

Zirve Akım Hızı: PEF (Peak Expiratory Flow): Tepe akımın ölçüsüdür. Tanı koymada ve takipte kullanılabilir. Günümüzde PEF metrelerin hafif taşınabilir,

ergonomik ve ucuz olmaları sayesinde daha çok hastanın evde takibi için kullanılmaktadırlar.

Hava yolu artmış yanıtının ölçümü (bronş provokasyon testleri): Astım yakınmaları olan ancak SFT'si normal olan olgularda hava yolu yanıtı provokasyon testleri ile yapılır. Testler direkt olarak histamin ve metakolinle veya indirekt olarak mannitolle, aspirin, lökotrien veya adenozin ile de yapılabilmektedir [118]. Bu rutin testler dışında egzersiz de astım provokasyonunda kullanılabilmektedir. İndüksiyon testlerinde provokatif doz semptomları tetikleyerek FEV₁'de %20 den fazla düşüşe sebep olan dozdur. Testler her ne kadar astım için sensitif olsa da spesifiteleri yüksek değildir, negatif prediktif değeri yüksektir [119].

Hava yolu inflamasyonunun invazif olmayan belirteçleri: Hava yolu inflamasyonunu değerlendirmek için hipertonic saline ile indükte balgam çıkartmak lenfositik, eosinofilik ve nötrofilik inflamasyonu tespit etmek açısından anlamlıdır [120]. Aynı analiz invaziv bir yöntem olan bronkoskobik lavaj ile yapılabilir. Ekshalenir oksit (FeNO) ve karbon monoksit (FeCO) havayolunun ölçülebilen inflamasyon belirteçleridir. FeNO'nun astımlı hastalarda yüksekliği spesifik olmasa da inflamasyon lehine bir bulgudur. Yine balgamda eosinofili ile beraber FeNO'da artış astım tanısını desteklemektedir [53, 121]. Günümüzde hava yolundaki oksidatif stres ürünlerinin ekspire edilen havada ölçümü invazif olmayan bir metod olmakla beraber pahalı olması nedeniyle geniş kullanım alanı bulamamıştır [122-123].

Allerjik durumun tespiti: Çevresel bir takım etkenler astım patogenezinde rol oynamaktadır, son 20 yıl içinde endüstriyel gelişimle beraber tüm dünya genelinde allerjik hastalıkların oranında %30 oranında bir artış görülmüştür. Çevresel allerjenler

ve IgE birlikteliği bu mekanizmanın temelini oluşturmaktadır. Yapılan son serilerde erişkin 3317 olgu üzerinde çevresel allerjen pozitifliğine bakılmış bu oran astım hastalarında %57, allerjik rinit olgularında %67, astım ve allerjik rinit tanısı olanlarda %71 oranında pozitif olarak saptanmıştır [124]. Allerjen ve IgE arasındaki ilişki hayvan ve insanda astmatik olgularda çalışılmış ve bu olguların allerjenle karşılaşma sonrası bakılan bronkoalveolar lavaj sıvılarında prostoglandin, GM-CSF ve IL-5 seviyelerinde artma saptanmıştır. Yapılan deneysel modellerde IL-5'in bu mekanizmada yer alan temel sitokin olduğu gösterilmiştir. IL-5, T ve B lenfositler, mast hücreleri, eosinofiller arasında ilişki sağlayarak allerjik aktivasyona katkıda bulunmaktadır.

Klinikte astımda allerjik komponenti belirlemek için hikaye, cilt veya in vitro allerji testleri veya allerjen ile provakasyon yöntemleri uygulanmaktadır. Tanıda kullanılan testlerin tek başlarına pozitif olarak saptanmalarının klinik olarak anlamı yoktur, bu pozitiflik mutlaka hikaye ile beraber değerlendirilmelidir. Cilt testleri klinikte uygulaması kolay, hassas, güvenilir testlerdir. Uygulama esnasında nadiren aşırı duyarlılığı olanlarda anaflaksiyi tetikleme riski vardır. Cilt testlerinde allerjen hastanın cildine temas ettiğinde kutanöz mast hücreleri aktivasyona geçer ve allerjen spesifik IgE'ler allerjene doğru yönelir. Allerjene temas ettiğinde mast hücresi aktive olarak degranülasyonu başlatır. Degranülasyonla beraber diğer vazoaktif mediyatörler de (histamin, kimaz, karboksipeptidazlar) salınır. Buradaki temel inflamatuvar madde histamindir, histamin salınımında maruz kalınan allerjen miktarının önemi yoktur. Bu zincirleme olarak devam eden olaylar ciltte eritem, ödem ve endürasyona sebep olur ve allerjik reaksiyon olarak adlandırılır. Bazı olgularda uzamış reaksiyon gelişir ve test sonrasında 48 saate kadar kaşıntı, kızarıklık ve ısı artışı görülebilir. Testlerde bakılan

allerjenler genellikle ağaç- bitki polenler, küf mantarı ve penisilinler, hayvansal atıklar ve tüyler , hamamböceği ve diğer kitinli hayvan ekstreleri, ev tozu, akarlarıdır. Kapsamlı testler gıda allerjenleri de içerirler. Testler pozitif olarak saptanır ise buna sensitizasyon denir, eğer sentize olunan allerjene karşı klinik hikaye varsa allerjik durum olarak tanımlanır. Her pozitif sensitizasyona karşı allerjik reaksiyon saptanmamış olabilir ya da allerjenler arası farklılık gösterebilir. Gıda allerjenlerinde hastalarda allerji hikayesi olmasına karşın testlerde %50 oranında yalancı negatiflik olabilir, çevresel allerjenlerde ise durum tam tersidir, testlerde pozitiflik olmasına rağmen klinik hikaye olmayabilir.

2.3.2.1. Hava yolu inflamasyonu ve yeniden yapılanmasının değerlendirilmesinde balgam indüksiyonu

Astımda hava yolu inflamasyonunun değerlendirilmesinde bilinen en iyi yöntem bronş biyopsisi almaktır. Ancak invazif ve maliyetin yüksek olması nedeniyle tekrarlayan kullanıma uygun değildir. Yine BAL sıvısında hücre sayımı ve inflamasyon belirteçleri bakılmaktadır, ancak daha az invazif ve pratik olarak uygulanacak yöntem arayışı devam etmektedir. Balgam indüksiyonu alt solunum yollarından elde edilen materyalin değişik amaçlarla incelenmesine olanak tanır, basit ve invazif olmayan bir tanı yöntemidir. Sarkoidoz, astım, KOAH ve HIV(+) hastalarda Pneumocystis Carinii pnömonisi tespitinde yapılan bir çok çalışmada BAL ve indükte balgamı karşılaştırılmış ve sensitivite ile spesifiteleri eş değer olarak saptanmıştır [125-127]. Ön planda hava yolu inflamasyonunu incelemek amacı ile kullanılsa da solunum yolu enfeksiyonlarının saptanması, tüberküloz [128], akciğer kanseri [129], HIV hastalarında Pneumocystis Carinii pnömonisi tanısı ve intersitisyel akciğer hastalıklarının tespitinde kullanılmıştır. İlk olarak 1890 yılında Osler ve Galash tarafından hava yolu inflamasyonunu tespit

etmek amacı ile uygulanmıştır. Efektif olarak 1920’li yıllardan bu yana uygulanmaya girmiş ve 1989 yılında Gibson ve ekibi astım ve KOAH’ta kullanım kolaylığını göstermişlerdir [130]. Günümüzde kullanımı halen yaygın olarak devam etmektedir. Spontan balgam incelemesine kıyasla indüklenmiş balgamda ultrasonik nebulizer ile hipertonic solüsyon verilerek balgamın daha rahat çıkarılması sağlanmakta ve içine konan dithiothreitol kullanımı ile balgamda hücrelerin daha iyi dağılımı mümkün olmaktadır. Balgam indüksiyonu için iki tür metod kullanılmaktadır [131-132]. Birinci yöntem sabit zaman aralığında üç defa yedi dakikalık sürelerde sabit dozda (%3 ve %4.5) veya giderek artan (%3, %4, %5) konsantrasyonda salin inhalasyonudur. İkinci yöntemde ise sabit konsantrasyondaki %4.5’lik salin solüsyonunu 30 saniyeden 8 dakikaya kadar değişen süre içinde inhale ettirilmesidir.

Astımda indüklenmiş balgam kullanımı hava yolu inflamasyonunun tipini ve derecesini saptamaya yardımcı olur. Eosinofilik inflamasyon astımın karakteristik özelliği olarak kabul edilmektedir, eosinofilik inflamasyon astım semptomları, FEV₁ düzeyi, FEV₁/FVC (%), PEF ve PD20 metakolin ölçümü ile ters orantılı olduğu çalışmalarda saptanmıştır. [133-134].

2.3.3. Astım Hastaların Takibi:

Günümüzdeki astım rehberlerinde astım tedavisinin ana amacı, astım kontrolünün sağlanması olarak kabul edilmektedir. Bu rehberlerde gündüz ve gece semptomlarının sıklığı, kurtarıcı ilaç kullanma sıklığı, günlük aktivitelerde sınırlanma ve en iyi solunum fonksiyon testleri (SFT) dikkate alınarak astım kontrolünün değerlendirilmesi önerilmektedir. Astım takibinde Cockcroft ve Swystun 1996 yılında “astım şiddeti”

“astım kontrolü” kavramlarının hekimler arasında da karmaşaya yol açtığını fark etmiş ve bu kavram karışıklığını gidermek için yeni anket sistemi geliştirmişlerdir. Yapılan çalışmalar, hastaların ve doktorların astım kontrol algılamaları arasında farklılıklar bulunduğunu göstermektedir [135-137]. Astım kontrolünün tanımlanmasında uluslararası “Global Initiative for Asthma (GINA)”astım tanı ve tedavi rehberi kullanılmaktadır .

Astım kontrolünün değerlendirilmesinde kullanılmak üzere Juniper ve arkadaşları tarafından geliştirilen anket ihtiyaçları karşılamış ancak güncel uygulamada yoğun olan merkezlerde uygulanma sıkıntısı yaratmıştır. Bu nedenle yaşam kalitesi anketi hasta değerlendirmesini daha objektif hale getirmek için araştırmalarda kullanılmaktadır. Bu testler klinik parametrelerin (semptom skorları, gündüz nefes darlığı, gece solunumsal yakınmalarla uykudan uyanma sıklığı, bronkodilatör ihtiyacı gibi), solunum fonksiyon testi parametreleri (zirve ekspiratuvar akım (PEF) ve birinci saniyedeki zorlu ekspiratuvar volüm (FEV₁)), bronş aşırı duyarlılığı, indükte balgamda eozinofili düzeyi gibi parametreleri içermektedir. Günümüzde en sık uygulanan testler; 1. Astım Kontrol Anketi “Asthma Control Questionnaire (ACQ)”, 2. Astım Yaşam Kalitesi Anketi “Asthma Quality of Life Questionnaire (AQLQ)”, 3. Astım Tedavi Değerlendirme Anketi “Asthma Therapy Assessment Questionnaire (ATAQ)”, 4. Astım Kontrol Testi (AKT), 5. “Astım etki araştırması (AIS-6)”, 6. Astım Kontrol Skorlama Sistemi “Asthma Control Scoring System (ACSS) olarak sayılabilir. Bunlardan ACQ ve AQLQ daha sık olarak kullanılmaktadır. Türkiye’de astıma spesifik olarak hastaların günlük yaşam kalitelerini yansıtan Türkçe uyarlaması yapılmış anketler kullanılmalıdır. Bu testler klinisyen tarafından hasta

takibini kolaylaştırmakta ve tedaviye yön verebilmektedir [138-140]. Günümüzde klinik araştırmalar dışında da rutin takipte kullanılmaya başlanmış olan taslaklar inflamasyon takibi açısından da kullanılmaktadır.

Juniper ve ekibi tarafından yapılmış ve üç büyük sorgulamayı değerlendiren çalışmada sorgulamada mutlaka gündüz ve gece semptom değerlendirmelerinin ayrı puanlanması ve hava yolu kalibrasyonu için standart bir değerlendirme yapılması önerilmektedir. Yine Kraft- Mark'ın çalışmasında aynı sonuçlara yer verilmiş ve kurtarıcı ilaç sorgulamasının önemi gösterilmiştir [141]. Pinnock ve grubunun yaptığı meta analizlerde Juniper'in 'Astım yaşam kalitesi anketi' (AQLQ)'nin astımın klinik değerlendirmesinde diğer anketlere üstün olduğu gösterilmiştir [142]. Juniper'in kendisinin yaptığı bir meta analizde ise eskiden kullanımı daha yaygın olan astım günlüğü ile anketler karşılaştırılmış ve sonucunda anketler ve günlükler korele olmasına rağmen hastaların kendilerini anketlerde daha objektif yansıttığını ve değerlendirmede standardizasyon sağladığını göstermişlerdir [138].

Kanada'da son GINA klavuzunun ardından 183 doktor ve 856 hasta ile yapılan çalışmada anket doldurulması astım semptomlarını değerlendirme açısından konvansiyonel yöntemle göre üstün çıkmıştır [143].

2.3.3.1. Astım Kontrol Anketi (ACQ)

Juniper ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş bir ankettir [9]. Anket altı soru ve ek olarak FEV₁ değerinden oluşmaktadır. Hastaya:

1. Son bir haftada astımdan dolayı kaç kez uykudan uyandığı, (0: Hiçbir zaman-6: Astımdan dolayı uyuyamama)
 2. Son bir haftada kaç kez sabah uyandığında astım belirtilerinin bulunduğu, (0: Belirti yok-6: Çok ciddi belirtiler)
 3. Astımdan dolayı günlük aktivitelerde ne sıklıkta engellenme olduğu, (0: Sınırlanma yok-6: Tümüyle sınırlanmış)
 4. Kaç kez nefes darlığı olduğu, (0: Yok-6: Çok fazla)
 5. Kaç kez hırıltılı solunum olduğu, (0: Hiçbir zaman-6: Her zaman)
 6. Bir günde kaç puf kısa etkili bronkodilatatör (örneğin; ventolin) sıkıldığı, (0: Hiç-6: Çoğu gün 16 puf'tan fazla)
- sorulmaktadır.

Her bir sorunun yanıtlarına 0 ila 6 arasında puan verilmektedir. Yedinci soruda FEV₁ değeri de 0 ile 6 arasında puanlanmıştır (0= > beklenenin %95'i, 6=< beklenenin %50'si). Anket skoru 7 soru puanının ortalamasıdır ve bu nedenle "0" tam kontrol, "6" kontrolsüz olarak kabul edilmektedir, takipte testler arasındaki >2.5 puanlık değişkenlik anlamlı kabul edilmektedir [9]. Stabil ve kontrolsüz astım gruplarında ACQ'nun astım kontrolünde ortaya çıkan değişiklikleri (düzelmeye ya da bozulma) anlamlı oranda ayırt edebildiği gösterilmiştir. "Asthma Quality of Life Questionnaire", "Medical Outcomes Survey Short Form-36 (SF-36)" anketleri ve klinisyenlerin değerlendirmeleri ile ACQ arasında anlamlı korelasyon olduğu saptanmıştır [144].

2.3.3.2. Astım Yaşam Kalitesi Anketi (AQLQ)

Standart AQLQ-(S) 32 sorudan oluşan, hastalığa özgü bir ankettir. Astımlı erişkinlerde, fonksiyonel bozulmanın ölçümünde Türkçe uyarlaması yapılmış bir ankettir. Son iki hafta süresince 7 puanlık (1: Ağır bozulma, 7: Bozulma yok) bir skala ile yanıtlar değerlendirilir. Standart AQLQ-(S) semptomlarla ilgili 12, aktivitelerde sınırlanmayla ilgili 11, emosyonel durumla ilgili beş ve çevresel uyaranlarla ilgili dört sorudan oluşur. Toplam skor ve farklı başlıklar için ortalama yanıtlar hesaplanır. Skor değişimi 0.5 puan olduğunda klinik olarak önemli kabul edilir ve “minimal önemli fark” olarak adlandırılır. Günlük pratik uygulamalarda AQLQ uygulaması uzun zaman aldığından ve genellikle ek personel ihtiyacı gerektiğinden dolayı Pinnock ve arkadaşları tarafından ‘Mini-AQLQ’ oluşturulmuştur. Bu anket dört başlıktan oluşur: Nefes darlığı, ruh hali, sosyal yaşamda kısıtlılık ve üzüntü. Anket sonucunda toplam skor hesaplanır. Bu ankette 20 soru vardır ve yanıtlar “0: Hiçbir şey yok, 1: Hafif, 2: Orta derecede, 3: Ağır, 4: Çok ağır” şeklinde skorlanmaktadır. Anket sonuçları AQLQ testi ile korele olarak değerlendirilmiştir [142]

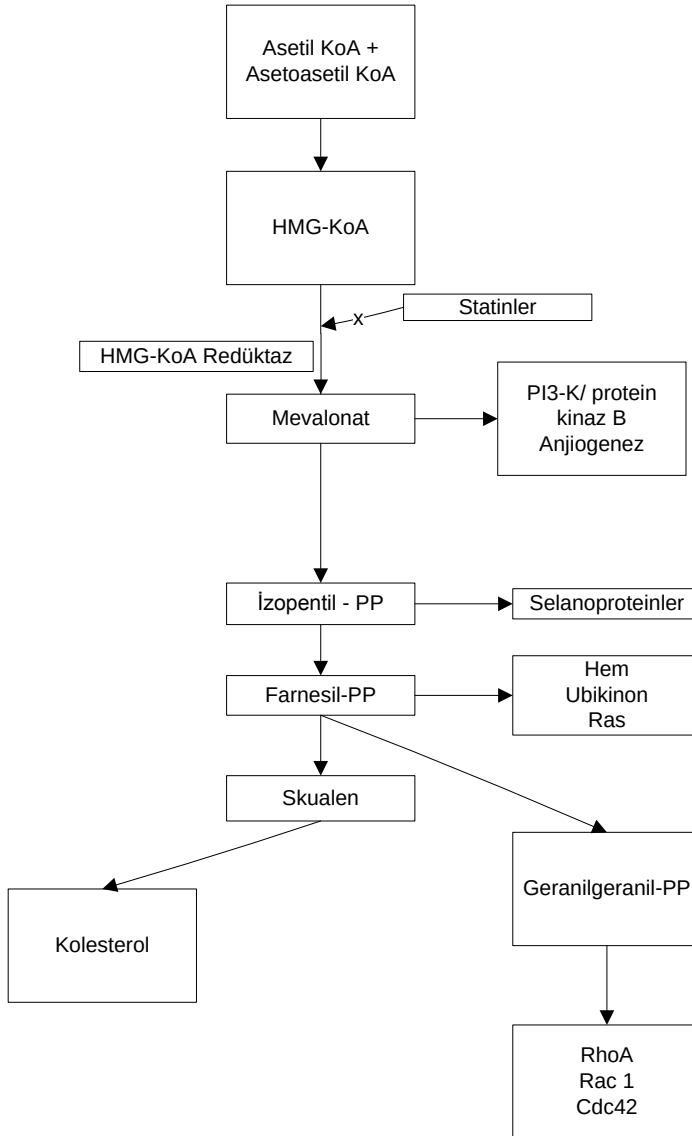
2.4. Statinler

Statinler serum kolesterol seviyesini düşüren hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan geniş bir ilaç grubudur. Doğal olarak lovastatin, simvastatin, pravastatin ve mevastatin bulunurken atorvastatin ve fluvastatin sentetik preparatlar olarak piyasaya sürülmüşlerdir, ardından rosuvastatin ve pitavastatin geniş klinik araştırmalardan sonra kullanıma sokulmuştur [7, 145-146]. Statinler 3Hidroksi-3Metilglutaril Koenzim A (HMG-CoA) Redüktazı kompetitif olarak inhibe ederler. Enzimin aktif kısmına bağlanarak substrat oluşumunu inhibe ederler. Bu enzim karaciğer ve diğer dokularda kolesterol sentezinin hız kısıtlayıcı basamağıdır [7]. HMG-CoA'nın inhibisyonu ile kan kolesterol seviyelerinde düşme sağlandığı gibi hücre içi farnesil pirofosfotaz ve geranil geranil pirofosfotaz gibi izoprenoidlerin de düzeyinde düşme sağlanır. İzoprenoidler bir takım proteinlerin post translasyonel lipid modifikasyonunu (pirenilasyon) sağlamakla görevlidir ve bu işlem proteinin hücre membranı ile birleşmesinde rol oynamaktadır [147]. İzoprenoidlerin son ürünleri arasında Ras, Rho, Rac ve Rock yer almaktadır (Şekil 2.4). Bu proteinler guanosine triphosphate (GTP) bağlayıcı proteinler olan grubu hedef alırlar ki bunlar da hücre farklılaşması, sinyal transdüksiyonu, veziküler transport ve apoptozda rol oynamaktadır [147]. Bu kolesterol düşürücü etkinin yanında pleotropik olarak sayılabilecek kemik kaybını engelleyici [148], immünmodülatuar [8] ve antiinflamatuvar [149] etkileri de vardır.

Statinler lipofilik özellikler, yarı ömür ve potentlik açısından sınıflara ayrılırlar [150]. Sınıflamada ekstra hepatik özellik taşıyan moleküller de bulunmaktadır ve bu özelliklerin pleotrofik etki mekanizmasını aydınlatmaya yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Simvastatin ve fluvastatin diğer moleküllere oranla daha lipofilik olup

vasküler dokuya pasif transfüzyonla geçerken pravastatin ve rosuvastatin diğer ajanlara göre daha hidrofilik olup ana etki mekanizmalarını karaciğer üzerinden göstermektedirler. Yapılan çalışmalarda rosuvastatin ve pravastatinin kuvvetli pleotrofik özellik göstermesi nedeniyle pleotrofik etki mekanizmasının HMG-CoA redüktaz inhibisyonu dışında başka mekanizmayla olma ihtimali kuvvet kazanmaktadır.

Şekil 2. 4 Kolesterol sentezi.



2.4.1. Statinlerin hücre içi etki mekanizmaları (Şekil 2.5)

2.4.1.1. Rho/Rho kinaz (ROCK) baskılanması

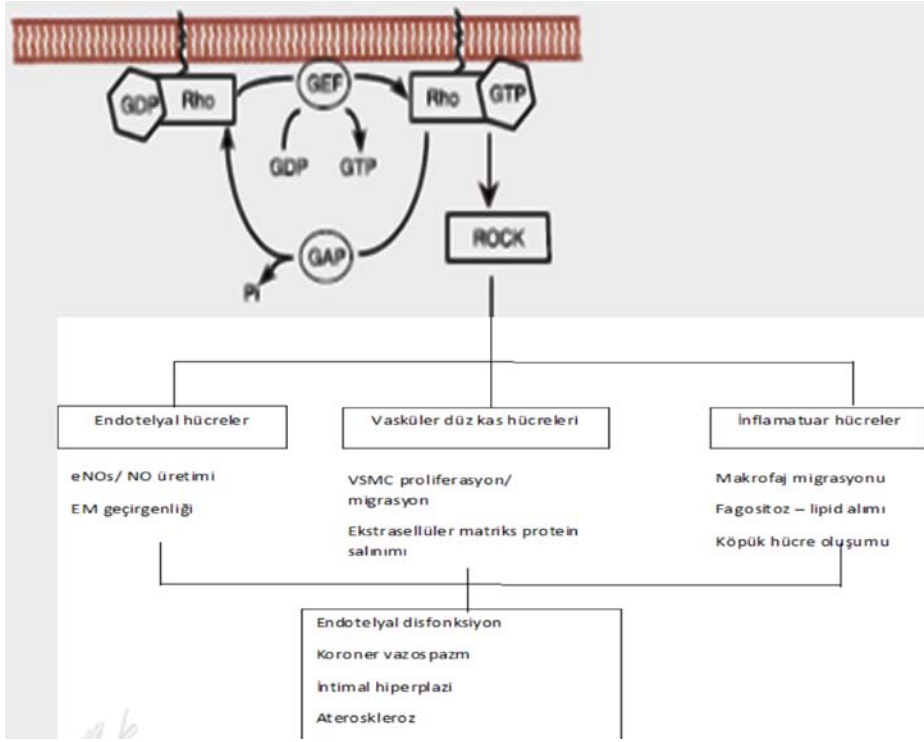
ROCK olarak adlandırılan grup serin/tirozin kinaz sınıfı transpeptidazlardır. Hücre içi trafiğinde özellikle izoprenoidlerin translasyonu sonrası modifikasyonunda rol oynamaktadırlar [151]. Mevalonat sentez inhibisyonu ile bu aşama bloke olmaktadır. Klinik olarak LDL düşmesine yol açan statin dozlarının Rho/ROCK aktivitesini tamamen baskıladığı gözlenmiştir [152].

2.4.1.2. Rac Baskılanması

Rac 20-39 kDa dan oluşan monomerik G proteinleridir ve GTPaz ailesinin alt grubu arasında yer alır. Rac yolağı hücre aktin sitoskeleton ve reaktif oksijen türevleri (ROS) oluşumunda etkilidir. Myokardiyal hipertrofi ve ventriküler yeniden yapılanmada artmış oksidatif stres suçlanmaktadır. Rac ise kardiyak hipertrofinin önemli bir mediyatörüdür [153]. Hayvan çalışmalarında Rac-1 baskılanmasının hipertansiyona bağlı ventriküler hipertrofiyi engellediği gösterilmiştir [154-155].

2.4.1.3. PPAR(peroxisome proliferator activated receptor) artışı

Statinlerin makrofaj PPAR-gama transkripsiyonunu artırması TNF-alfa, MCP-1 (monosit kemoataktan protein-1) salgısını inhibe etmektedir. Bu özellik ateroskleroz gelişimin engellenmesi ve aterosklerotik plak regresyonunun sağlanmasında etkilidir [156].



Şekil 2.5. Statinlerin hücre içi mekanizması

2.4.2. Statinler ve immünmodülatuar etkileri

Statinlerin immünmodülatuar etkilerini ilk olarak tanımlayan Francois Mach ve arkadaşları olmuştur. Makrofaj ve endotel hücreleri gibi antijen sunan hücrelerde MHCII'nin (Major Histocompatibility Class II) İnterferon-Gama'ya bağlı ekspresyonunu azaltır. Bu etki CIITA (Class II transactivator) gen ekspresyonunun baskılanması ile başlamaktadır. MHCII dışında LFA-1 (lenfosit fonksiyon ilişkili antijen-1) baskılanması, lökositlerin vasküler adhezyon ve ekstrasvazasyonunun engellenmesi, NK (natural killer) hücre aktivitesinin üzerine ve TNF-alfa, IL-1 beta, IL-6 salınımının engellenmesi gibi etkileri de vardır [8].

 n vitro yapılan çalışma sayısı arttıka lökosit adezyon kaskadının statinlerin antiinflamatuvar etkisinin hedef noktası olduğu doğrulanmaktadır. Bu etkiyle beraber transendotelial migrasyon ve endotelial adezyon baskılanmaktadır. Genel olarak kabul gören modellere bakıldığında selektin grubuna ait reseptörler (E,P,L selektin) dolaşımdaki lökositleri hasar veya inflamasyonun olduğu damar duvarına çekmektedir [157]. İşaretlenen lökositler daha sonra endotelial hücrelerden salgılanan kemokinler (MCP-1 gibi) yardımı ile aktive olurlar. Bu aktivasyon intrasellüler birtakım sinyal yolakları yardımı ile lökositleri düşük afiniteli durumdan yüksek afiniteli duruma çevirir. LFA-1 ve VLA-4 (very late antigen 4) lökositler üzerindeki iki major integrindir, bu integrinlerin ligandları ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) ve VCAM-1 (vascular adhesion molecule 1) olarak bilinir. ICAM-1 ve VCAM-1 immünglobülin süper ailesinin üyeleridir ve endotelde IL-1beta ve TNF-alfa salgısı ile indüklenirler. ICAM-1 ve VCAM-1 yine endotelial hücrelerce CRP ile upregüle olabilirler [158]. Lökosit integrinleri ve adezyon moleküllerinin ilk birleşmeleri damar

duvarına transmigrasyon ve adezyonu başlatan hareket olarak bilinir ki bu da inflamasyonun ilk basamağıdır [157]. Statinlerin HMG-CoA redüktaz bağımlı ve daha güncel olarak bağımsız olarak da bahsedilen antiinflamatuvar etkisi bu yollar üzerinde olmaktadır.

İnsanlarda yapılan kompleks klinik çalışmaların aksine hayvanlarda yapılan çalışmalarda statinlerin antiinflamatuvar etkileri ve lipid düşürücü etkileri birbirlerinden bağımsız olarak incelenebilmiştir. Diomedea ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada deney hayvanlarında inflamasyon yaratıldıktan sonra oral kısa süreli statin ile lökosit birikiminde azalma saptanmış ve inflamasyonda baskılanma izlenmiştir. Bakılan HMG-CoA redüktaz aktivitesinde azalma saptansa bile kan lipid düzeylerine etkisi saptanmamıştır. Lökosit migrasyonundaki bu baskılanma monosit kemotaktik protein 1(MCP-1), RANTES (normal T hücre ekspresyon ve sekresyonunda regülasyon ve aktivasyon) ve IL-6 reseptörlerindeki downregülasyonla açıklanmıştır [159]. Buna benzer olarak Kimura ve arkadaşları hiperkolesterolemik farelerde fluvastatin tedavisi ile postkapiler venlerde trombosit aktive edici faktör ve Lökotrien B4 yanıtına sekonder gelişmiş lökosit adezyonunda azalma sağlamışlardır. Bu etkiyi tamamen lipid düşürücü özellikten bağımsız olarak göstermişlerdir [160]. Stalker ve grubunu rosuvastatini sistemik olarak normokolesterolemik farelere vermiş ve trombinle indüklenen lökosit göçü, adezyon ve transmigrasyonda düzelme saptamışlardır. Bu modelde rosuvastatinin iyileştirici etkisi endotelden NO salınımının düzenlenmesi ve endotelyal-P selektinin downregüle olması ile açıklanmıştır [161]. Direkt antiinflamatuvar etkinin gösterilmesi için yapılan diğer bir çalışmada inflamatuvar ayak ödemi yapılmış hayvan grubuna simvastatin tedavisi (3-10mg/kg) verilmiş ve ödem formasyonunda azalma sağlanmıştır,

aynı grup için ilacın antihiperkolesterolemik etkileri incelendiğinde Apolipoprotein E2 baskılanması için gerekli ilaç düzeyinin (100mg/kg) olduğu kanıtlanmıştır. Bu da göstermektedir ki, antiinflamatuvar etki lipid düşürücü etkiden bağımsız olarak daha düşük dozlarda da meydana gelmektedir [162]. Transplantlarda rejeksiyonun engellemesi açısından yapılan modelde Maggard ve grubu kardiyak transplant yapılmış farelere pravastatin vererek graftta azalmış makrofaj infiltrasyonu gözlemlemişlerdir [163]. Deneysel olarak ensefalopati yapılmış farelere intraperitoneal olarak uygulanan lovastatininin spinal korda mononükleer hücre infiltrasyonunu engellediği yine bir hayvan çalışmasında gösterilmiştir. Bu etkinin beta-2 integrinin LFA-1 inhibisyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [164].

İn vitro olarak statinler adezyon kaskadını lökositler ve endoteli etkileyerek bir çok noktada inhibe edebilirler. En potent etki kemokin ekspresyonu yani MCP'nin endotel ve lökositlerden salınımının inhibisyonu ile olmaktadır [165]. Dahası integrin ekspresyonunun LFA-1, Mac-1, VLA-4 inhibisyonu ,ek olarak lökositlerdeki VLA-4 integrinin aktivasyonunun blokajıdır [166-168]. Son yapılan çalışmalar statinlerin stimule olmuş endotel ve monositlerden ICAM-1 ekspresyonunu azalttığı, IL-1 beta ve IL-6'nın baskılandığı yönündedir [169-172]. Bütün bu etkilerin yanında HMG-CoA redüktaz inhisiyonu ile ortaya çıkan bu etkiler ortama mevalonat ve izoprenoidlerin eklenmesi ile geri dönüşümlü hale gelmektedir [169]. Etkilerin bir kısmı hücre içi kolesterol veya proteinlerin azalmış prenilasyonuna da bağlanabilir. Statinlerin temel etki mekanizmalarının belli bölümlerinin prenilasyon yolağının inhibisyonu olduğuna dair kuvvetli kanıtlar vardır. Prenilasyon yolağı üzerindeki etkiler Rho ailesi ve GTPaz'ları da etkilemektedir. Örneğin integrin aktivasyonunun statinlerce bloke

edilmesi Rho'nun gerilgeranilasyonunu azaltır [168]. Ek olarak ICAM-1 ekspresyonu ile ilgili etkileri yine Rho GTPaz aktivitesinin blokajı ile olmaktadır [173]. Statinlerin RhoGTPaz'ın gerilgeranilasyonunu inhibe etmesinin bir sonucu olarak bazı çalışmalarda endotelial NO sentaz (eNOS) ekspresyonunda indüklenme meydana gelir [174-175]. eNOS indüksiyonu NO miktarının artışı ile sonuçlanır ve bu da E-selektin, P-selektin gibi selektin ailesinin yanı sıra VCAM-1, ICAM-1 gibi immünglobülin süper ailesinin de ekspresyonunda azalmaya yol açar [161]. Statinler bunlardan da öte hücre içindeki reseptörleri de etkilerler. PPAR-alfa-gama (peroxisome proliferatoractivated receptor alpha-gama) ilginç olarak bu yolda Rho yolağı ile ilişkilidir. Rho GTPaz'ların aktive ettiği ve sitokin, kemokin, adezyon molekülleri ve CRP'nin transkripsiyonunda yer alan NFkappaB (nuclear factor kappaB) statinlerin Rho inhibisyonu ile bloke olurlar [176-178].

Statinlerin antiinflamatuvar etkilerinin HMG-CoA redüktaz'dan bağımsız kısmını açıklamak için yapılan çalışmalarda ilk olarak lovastatin kullanılmış ve LFA-1'in ekstrasellüler inhibisyonunu yaptığı gözlenmiştir. LFA-1 ilişkili ICAM-1 ve T hücre stimülasyonunu baskılamasına rağmen LFA-1'e yüksek spesifisitesi olması nedeniyle Mac-1 ve VLA-4 üzerinde etkisi gösterilememiştir. Bu moleküllerin daha düşük dozlarda da HMG-CoA redüktazın inhibisyonunu sağlamadan LFA-1 inhibisyonu yaptığı hayvan çalışmalarında gösterilmiş ve özellikle kimyasal peritonit yapılmış farelerde en potent inhibisyonun bu mekanizma üzerinden olduğu kanıtlanmıştır.

2.4.3. Statinlerin Farklı Dokulardaki Etkileri

2.4.3.1. Statinler ve endotel

Güncel olan bir çok çalışma kolesterolden bağımlı ve bağımsız olarak statinlerin endotel fonksiyonlarını düzelttiğini göstermektedir [179-180]. Endotel kaynaklı NO endotel fonksiyonlarının en önemli belirteçleridir. Statinler birden fazla mekanizma ile eNOS sentezini kontrol etmektedir. Birinci yol Rho/ROCK yoludur, bu yol eNOS'un mRNA yapımını artırmaktadır [174-175]. İkinci yol statinlerin serin/tironin protein kinazı aktive etmesi ile olur. Bu yol ile eNOS fosforilasyonunu artırmaktadır. Üçüncü yol ise Caveolin-1 adı verilen bir integral membran proteini ile olur ki, bu eNOS membran bağlantısını sağlayarak NO sentezinin baskılanmasını sağlamaktadır [181]. Bunların dışında statinler aynı zamanda EPCs (endothelial progenitor cells) mobilizasyonu ile endotel üzerindeki etkilerini göstermektedirler.

2.4.3.2. Statinler ve düz kas

Vasküler alanda yapılan çalışmalarda statinlerin damar düz kasındaki patolojik oluşumları engellediği görülmüştür. Özellikle fare deneylerinde hasar ile ilişkili damar düz kas nötrofil birikimi ve hücre apoptozu statinlerle bloke edilmektedir. Bu etkiler ilacın antihiperlipidemik etki dozundan aşağıda meydana gelmektedir [182]. Düz kas üzerinde Rho yolağının etkili olduğu düşünülmektedir.

2.4.3.3. Statinler ve trombosit fonksiyonları

Statinler ve trombositlerin ilişkisi ilk olarak koroner hastalıkların incelenmesi esnasında tanımlanmıştır. Özellikle dolaşımdaki trombositlerin mural trombus

formasyonu, plak rüptürü ve vasküler hasar ile yakından ilişkili olduğu kanıtlanmıştır [183]. Her ne kadar statinlerin antitrombotik etkileri kan lipid seviyelerinin düşmesinden sonra gerçekleşse de güncel bilgiler bu etkinin kolesterol seviyesinden bağımsız olarak da görülebileceğini göstermektedir. JUPITER (Justification for the use of statins in primary prevention: An interventional trial evaluating rosuvastatin) çalışmasında ilaç kullanımının azalmış venöz tromboemboli ile ilişkisi gösterilmiştir [184]. İlacın trombositlerdeki eNOS aktivitesini artırması ile trombosit fonksiyonları azalmaktadır. Yine son çalışmalar PPAR aktivitesinin antitrombotik özelliklerinden bahsetmektedir [185].

2.4.4. Statinlerin antiinflamatuvar etkilerinin klinik bulguları

2.4.4.1. Koroner Arter Hastalarında Etkileri

WOSCOPS (Overlap analysis of the West Scotland Coronary Prevention Study) grubunun statinlerin koroner arter hastalığında antiinflamatuvar etkisini göstermek için yapılan geniş kapsamlı plasebo kontrollü çalışmada hiperkolestrolemisi olan LDL-C seviyeri eşit olan erkeklere pravastatin 40mg verilmiştir, çalışmada pravastatinin ek kardiyovasküler koruma gösterdiği saptanmıştır [186-187]. PRINCE (pravastatin/İnflammation/CRP evaluation) çalışması sonucunda gelecekteki kardiyak riski gösteren CRP seviyesinde %15'lik bir azalma meydana gelmiştir [188].

Kou-Gi ve arkadaşları atorvastatinle yaptıkları çalışmada adiposit farklılaşmasında rol oynayan ve ateroskleroz gelişiminde basamak olduğu kabul edilen proinflamatuvar resistin molekülünü baskıladığını ve hücre kültürlerinde makrofajlardan salgılanan TNF-alfa düzeyinde düşme olduğunu saptamışlardır [189].

JUPİTER çalışmasında kolesterol seviyesi normal olan populasyonda inflamasyon ilişkili vasküler hastalıkları önleme açısından değerlendirme yapılmış ve normal kolesterol seviyesi (LDL<130 ve hs-CRP seviyeleri yüksek grup) olanlara uzun dönemde 20 mg rosuvastatin verilerek major kardiyovasküler olay oranındaki azalma saptanmıştır. İlave olarak inme, miyokard enfarktı, instabil anjina ve arteriyal revaskülarizasyon için hastaneye başvuruda azalma saptanmıştır.

Klinik çalışmalar göstermektedir ki koroner arter hastalığı olanlarda kolesterol seviyesi yüksek olsun veya olmasın statin kullanımı kolesterol düşürücü etkisinden bağımsız olarak kardiyovasküler olaylara bağlı mortaliteyi azaltmaktadır, bu etki 1-2 yılda ortaya çıkmaktadır [149, 190-193].

Rosuvastatinin atorvastatin ile karşılaştırıldığında ROCK aktivitesinin baskılanmasını ve brakial arter genişlemesinin daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Buna karşın LDL-C düzeyi anlamlı fark sınırında kalmıştır. Yazarlar pleotrofik etki yoluyla endotelial etkilerin ortaya çıktığını savunmuşlardır [194].

2.4.4.2. Kalp Yetmezliği ve Hipertansiyonda Etkileri:

Günümüzde statinler ile kardiyovasküler alanda olduğu kadar kesin olmasa da izole arteriyal hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği (KKY), atrial fibrilasyon (AF) ve kronik böbrek yetmezliğinde (KBY) olumlu sonuçlar elde edilmiştir [195].

Elimizdeki bilgilerde statinlerin dozlarının her iki katına çıkarıldığında LDL-C düzeyinde %5 total kolesterol düzeyinde %7 lik ek düşüş olmaktadır. Ancak pleotrofik özellik açısından yapılan çalışmalarda kolesterol seviyesindeki düşüşten bağımsız olduğu ve KBY, KKY, AF ve HT'deki etki mekanizmalarının bu yolla olduğu

savunulmaktadır [195-196]. Hipertansiyon olsun olmasın kardiyak ölümü %20-25 oranında azalttığı izlenmiştir [197]. Miyokard fonksiyonunda azalma olan olgularda NADPH oksidaz ilişkili rac1 aktivitesinde artma gözlenmiş ve statinlerin (NADPH oksidaz yolunu inhibe ederek) kolesterol seviyesinden bağımsız olarak kalp yetmezliğinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Avrupa Hipertansiyon Topluluğu ve Avrupa Kardiyoloji Derneği de 2009 yılından itibaren izole arteriyal hipertansiyon tedavisinde statin kullanımını önermektedir [198-199].

2.4.4.3. Renal yetmezlikte etkileri:

Bu alanda yapılan ilk büyük çalışma 4D Trial (Deutche Diabetes Dialyse Studie) çalışması diyalize giren hastalarda 20 mg atorvastatin tedavisini incelemiş ve statin alan grupta LDL-C seviyesinde %42 lik azalma olmasına rağmen mortalite ve diğer sonlanım noktaları açısından istatistiksel belirgin farklılık olmamıştır [200]. AURORA (A Study to Evaluate the Use of Rosuvastatin in Subject on Regular Heomodialysis: An Assesment of Survival and Cardiovascular Events) çalışması 10 mg rosuvastatin ile 4D çalışmasından daha belirgin olarak LDL-C ve total kolesterol sevilerinde düşme, HDL'de yükselme, CRP'de düşme izlenmiştir. Geniş randomize ve küçük prospektif çalışmalar statin kullanan KBY hastalarında renal fonksiyon kaybı sürecinde yavaşlama ve proteinüri miktarında azalma saptamışlardır [201-204]. Son dönem renal yetmezliği olan hastalara statin verilmesi ile relatif ölüm riskinde %32 azalma olduğu saptanmıştır [205].

Renal transplantlı hastalarda akut rejeksiyonda azalma ve kardiyovasküler olaylarda belirgin azalma saptanmıştır [206-207].

2.4.4.4. Nörolojik hastalıklarda etkileri:

Hiperkolesteroleminin inme için bir risk faktörü oluşturmadığı kabul edilmekle beraber statinlerin bu riski azalttığı gösterilmiştir. Bu etki genel olarak statinlerin antiinflamatuvar ve antitrombotik etkileri ile açıklanmaktadır. Hayvan çalışmalarında iskemi ile meydana gelen perfüzyon hasarını düzeltmeye yardımcı olduğu ve bu koruyucu etkinin eNOS sentezinde artış ile düzelmiş kan akımı etkisinden olduğu ortaya konulmuştur. [208]

[208] Deneysel olarak yapılmış otoimmün ensefalit, kronik nöroinflamatuvar hastalıklar ve multipl sklerozda statin kullanımının olumlu etkileri bulunmaktadır [209-210].

MIRACL (Myocardial Ischemia reduction with aggressive cholesterol lowering) çalışmasında akut koroner sendromu olan olgulara 80 mg atorvastatin tedavisi 16 hafta boyunca verilmiştir. 16 haftanın sonunda olgularda inme oranında %50 azalma saptanmıştır.

İnme sonrası statin kullanan ve kullanmayan olgularda, kullanan grupta lezyonların düzelme süresinin kısaldığı ve iyileşmenin daha kusursuz olduğu yönündedir [211-212].

FASTER (Fast assesment of stroke and transient iskemic attack to prevent early recurrence) çalışmasında statinlerin sadece inme riskini azaltmadığı aynı zamanda herhangi bir olaya karşı gelişecek beyin hasarını da azalttığını ortaya koymaktadır [213].

Bu nedenle AHA (American Heart Association) inme ile ilgili olarak statin kullanımını geçici iskemik atak ve daha önce inme hikayesi olan olgulara önermektedir.

2.4.4.5. Transplantta Etkileri:

Kardiyak transplant yapılan hastalarda statin kullanımını rejeksiyon insidansını azalttığı ve vaskülopatiyi engellediği uzun dönem surviyi arttırdığı saptanmıştır, bu etkilerin hiçbiri sadece kolesterol düşürücü etki ile açıklanamamıştır [214-215] [216]. Yine akciğer transplantı yapılmış hastaların statin kullanan grubunda 6 yıllık izlemde BAL sıvısında nötrofil oranlarının düşük olduğu ve akut rejeksiyonun standart tedaviye göre daha düşük olduğu izlenmiştir. Transplantlı olgularda etkin mekanizmanın nötrofil fonksiyonlarındaki baskılanma ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Son çalışmalarda nötrofil fonksiyonlarının Rho üzerinden baskılandığı görüşü ön plana çıkmıştır.

2.4.4.6. KOAH'ta kullanımı:

Kardiyovasküler hastalık oranının KOAH'lı hasta popülasyonunda artmış olması sigara, obezite ve diyabet gibi ortak hikaye ile ilişkilendirildiği gibi kardiyovasküler olaylarla ilişkili pulmoner inflamasyon olarak da değerlendirilmiştir [217]. Ortak inflamasyon teorisi nedeniyle statinlerin antiinflamatuvar özellikleri KOAH'ta sınırlı sayıda da olsa bir takım çalışmalarda gösterilmiştir [218]. Lee ve arkadaşlarının ilk kez 2005 yılında yapmış olduğu hayvan çalışmasında sigara inhale etmiş farelerde simvastatin ile MMP-9 indüksiyonunu ve inflamasyonun baskılanmasını bildirmişlerdir [219]. Ardından yapılan çalışmalarda KOAH'lı hastalarda ilacın antiinflamatuvar, antioksidan, antitrombojenik özellik taşıdığı gösterilmiştir [220-222]. Teramoto ve arkadaşları KOAH'ta artmış CRP, TNF-alfa, IL-6 ve VEGF düzeylerinin diğer kardiyak damarsal hastalıklarla ilişkisini göstermiş ve statinlerin bu konuda faydalı olabileceğini savunmuşlardır [223]. Young ve ekibi ise KOAH'ta hem sistemik hem pulmoner

inflamasyonda Guanozin Trifosfat ve Nükleer Faktör Kappa'nın önemli rol oynadığı savunı ileri sürmüş ve olası mekanizmalar olarak IL-6, IL-8 ve TNF-alfa inhibisyonu, küçük hava yollarında fibrotik aktivitenin baskılanması, epitelyal mezenkimal dönüşümün baskılanması olduğunu savunmuşlardır[224] KOAH'da olumlu etkisi nedeniyle sepsis ve pnömonide de çalışmalar yapılmış ve olumlu sonuçları gösterilmiştir [225]. Yine Keddisi ve arkadaşları statin kullanan hastaların FEV₁ ve FVC değerlerinde istatistiksel olarak anlamsız düzelme trendi saptamışlar, bu hastalarda alevlenme sıklığı ve hastane yatışında azalma tespit etmişlerdir. KOAH'da bazal CRP' nin normal popülasyona oranla yüksek olması inflamasyon teorisini desteklemektedir, CRP düzeyi ile KOAH ve statin kullanımını inceleyen araştırmalar da statin kullanımı ile bu hastalarda CRP düzeylerinde düşme ve egzersiz kapasitesinde artma göstermişlerdir.

2.4.4.7. Astımda kullanımı:

Astımda kullanımı ile yapılmış klinik çalışma sayısı kısıtlı olmakla beraber yol gösterici yayınlar bulunmaktadır. Berry ve Erin kendi grupları ile refrakter astımlı ve normal astımlı olguları incelemiş ve statin kullananlarda TNF-alfa blokajı ile solunum fonksiyon testi ve semptom skorunda düzelme göstermişlerdir [10]. Hothersall ve arkadaşları ise 54 atopik astımlı olguda 8 haftalık 40 mg atorvastatin tedavisinin etkileri incelemişlerdir. Randomize, çift kör crossover olarak yapılmış olan çalışmada 8 hafta sonundaki incelemelerde astım semptom skorunda ve sabah PEF değerlerinde düzelme gösterilememiş, balgam makrofaj ve lökotrien B4 düzeyinde azalma saptanmıştır [11]. Cowan ve ekibi ise statin kullanımı ile inhale steroid dozu ihtiyacı arasında ilişkiyi

araştırmış, çalışma sonunda simvastatin kullanan olgularda ACQ ve FEV₁ değerlerinde düzelmeye karşın inhale steroid dozu ihtiyacında azalma saptamamışlardır [12].

2.4.4.8. Diğer Hastalıklarda kullanımı:

Romatooid Artrit (RA) : RA ile yapılan çalışmalarda eklemler dışında vasküler tutulumun sistemik inflamatuvar yanıtı ikincil geliştiği gösterilmiştir [226].

Hiperlipidemisi olan hastalarda yapılan bir çalışmada statin kullanımının RA gelişimini engellediğine dair kanıtlar bulunmaktadır [227]. RA tanısı olan olgularda statin kullanımının endotelial fonksiyon bozukluğunda azalma, eklem sertliğinde azalma, hastalık aktivasyonunda azalma, CRP ve sedimentasyonda azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir [228].

Sistemik Lupus Eritamatozus (SLE): Shimazu ve arkadaşları SLE tanısı olanlarda statinlerin redüktaz inhibitörü olarak davrandığını, otoantikor ve otoreaktif lenfositlerin meydana getirdiği hasarda azalmaya yol açtığını göstermişlerdir [229]. Oksidize olmuş lipidlerin romatolojik ve vaskülitik tutulum manifestasyonlarını artırdığı yönünde kuvvetli yayınların olması bu lipidlerin organizmadan uzaklaştırılması ile inflamasyon kontrolünün sağlanabileceğini düşündürmektedir [230-231].

Diyabetes Mellitus (DM): DM tanısı olan hastalarda hiperlipidemi kontrolü açısından statin kullanımı yaygın olmakla beraber antihiperlipidemik etki dışında diyabete bağlı gelişen sinir hasarı, retinopatiyi azalttığı ve kan şekeri regülasyonunda kontrolü sağlamayı kolaylaştırdığına dair yayınlar bulunmaktadır [232-233].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi

Bu çalışma 2009-2010 yılları arasında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları Ana Bilim Dalı'nda takip edilmekte olan astımlı hastalarda yapılmıştır. Çalışmaya alınan hastalar başlangıçta iki gruba ayrılmıştır.

1. Grup: Astım tanısı almış olan olgular; MÜTFH Göğüs Hastalıkları Astım Polikliniği'nde izlenmekte olan ve GİNA kriterleri ile astım tanısı alıp tedavi altında stabil olan, yeni bakılan açlık kanında LDL $\geq$ 130mg/dl olan hastalar ve antihiperlipidemik tedavi almayanlar. Bu gruptaki hastalara antihiperlipidemik tedavi başlanmıştır.
2. Grup Astım tanısı almış olan olgular; MÜTFH Göğüs Hastalıkları Astım polikliniğine izlenmekte olan ve GİNA kriterleri ile astım tanısı alıp tedavi altında stabil olan, yeni bakılan açlık kanında LDL < 130 mg/dL olup antihiperlipidemik kullanmayan hastalar.

Çalışmaya Alınmama Kriterleri:

18 yaşın altında olanlar

Gebeler

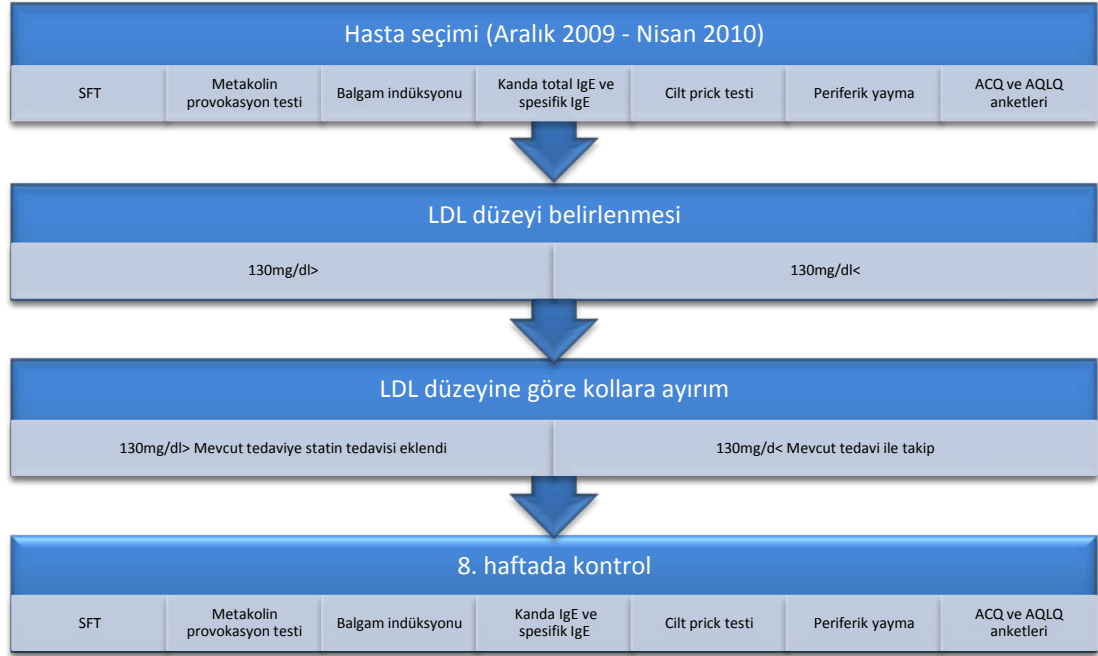
80 yaşın üzerindeki hastalar

Statin kullanmaya engel durumu olanlar (kronik karaciğer hastalığı olanlar, kas hastalığı olanlar, ilaca karşı bilinen hipersensivitesi olanlar) olarak belirlenmiştir.

Çalışma için Marmara Üniversitesi Etik Kurul komitesinden onay alınmıştır. (MAR-YÇ-2009-0009 protokol no ile 03.04.2009 tarihinde) Çalışma kriterlerine uyan olgular araştırma hakkında bilgilendirildikten sonra imzalı onamları alınmış ve araştırmaya dahil edilmişlerdir.

3.2. Çalışma Planı:

Astım tanısı ile poliklinikten izlenen ve LDL $\geq$ 130mg/dL olarak saptanan ve saptanmayan eş sayıda yaş ve cinsiyet açısından eşitlendirilmiş olgulara SFT (Solunum Fonksiyon Testi) yapılarak ardından FEV₁ değerleri uygun olanlara ‘Metakolin’ ile bronş provokasyon testi uygulanmış ve içlerinde metakolin testi pozitif olarak saptanan olgulara takip eden günlerde periferik yayma ile eosinofili oranı, kanda total IgE ve spesifik IgE alt grupların bakılması, cilt allerji testi (ev tozu, akar, mantar, ot-ağaç paneli, hamamböceği, kedi-küpek tüyü, meyva paneli, fındık, fıstık, süt), balgam indüksiyonu uygulanarak Astım Kontrol Anketi (ACQ) ve Astım Yaşam Kalitesi Anketi (AQLQ) doldurulmuştur. Bu değerler 0. gün olarak kaydedilerek LDL $\geq$ 130mg/dL olan 25 hastaya Rosuvastatin 40 mg tb günde 1 defa almakta oldukları mevcut tedaviye eklenmiş 15. günde karaciğer fonksiyon testleri (KCFT) kontrolüne çağrılarak değerleri normal olarak saptanan hastalar (hiçbir hastada KCFT’de yükselme izlenmemiştir) 8 hafta tedaviye devam etmişlerdir, diğer 26 astımlı hasta ise mevcut tedavi ile 8 hafta izlenmiştir. 8. hafta sonunda kontrole çağrılan olgulara tekrar aynı şekilde SFT, metakolin bronş provokasyonu, periferik yayma, kan Total IgE ve spesifik IgE alt grupları bakılması, cilt allerji testi, balgam indüksiyonu uygulanmış ve ACQ ve AQLQ anketleri (Bkz appendiks7.3) tekrar doldurulmuştur. (Şekil 3.1)



Şekil 3. 1 Çalışma protokolünün şematik açıklaması.

3.3. Solunum Fonksiyon Testi ve Bronş Provokasyon Testi, Cilt Prick Testi , Periferik Eosinofili, IgE Analizleri ve Anketler

Solunum fonksiyon testleri MIR Spirolab (149491103403) marka akım duyarlı spirometri cihazı ile yapılmıştır. Bronş provokasyon testi Koko dozimetri (DeVilbiss 626) ile uzun yöntem kullanılarak metakolin 0.001, 2, 4, 8, 16, 32, 64 mg/mL dozlarında yapılmıştır. Bronş provokasyon testi standartlara uygun olarak yapılmıştır [234] (Bkz apendiks 7.5.1).

Periferik yayma standartlara uygun olarak yapılmıştır.(Bkz apendiks 7.1). Prick testler (Alyostal, Say İlaç) standartlara uygun olarak yapıp >3mm üzerindeki cilt reaksiyonu pozitif olarak kabul edilmiştir [235] (Bkz apendiks 7.2).

Total IgE (Biosupply, UK), Spesifik IgE (Biosupply, UK), Yaşam kalitesi (AQLQ) ve semptom skoru (ACQ) anketlerinin ayrıntıları 7.3 no'lu appendikte yer almaktadır [236-237].

3.4. Balgam indüksiyonu

ERS klavuzu önerileri ile balgam indüksiyonu aşağıda özetlendiği gibi yapılmıştır. [238]

1. Salbutamol 200mcg inhalasyon yolu ile verildikten 10 dk sonra ölçülen FEV₁ değeri bazal alınmıştır.
2. Ultrasonik nebulizatör ile 9 cc %3 lük hipertonic salin solüsyonu burun klipi ve ağız parçasında valv olmaksızın 7-10 dakika inhale ettirilmiştir.
3. Postnazal akıntı ve tükürük kontaminasyonunu önlemek amacıyla ekspektorasyondan önce hastanın ağzını suyla çalkalaması istenmiştir.
4. İnhalasyon esnasında ve sonrasında hastanın balgam çıkarması istenmiştir. Eğer balgam çıkaramazsa ikinci inhalasyondan önce FEV₁ ölçümü yapılarak
 - a. FEV₁ de %10'dan az düşme varsa %4 lük solüsyon inhalasyonuna geçilmiştir
 - b. FEV₁'deki düşüş %10-19 arasında ise %3 lük solüsyonla devam edilmiştir
 - c. FEV₁'deki düşüş %20 den fazla ise işlem sonlandırılarak bronkodilatör tedavi verilmiştir.

Eğer hasta %4 lük solüsyon ile balgam çıkaramamış ise FEV₁ deki düşüş oranına göre %5 lik salin solüsyonu ile inhalasyona geçilmiştir. İndüksiyon yöntemi ile elde edilen balgam en geç iki saat içinde incelemeye alınmıştır. Uygulanan inceleme basamakları aşağıda verilmiştir.[238]

5. Petri kabı içindeki balgam örneği plastik forsepsler ile önceden ağırlığı alınmış polistren tüp içine konulmuştur.
6. Bu tüpte içindeki materyalin dört katı kadar distile su ile sulandırılarak elde edilen %0.1 lik dihidroetol (DTT) (Sigma CA) eklenerek vortexte 15 sn kadar karıştırılmıştır.
7. Karışım oda sıcaklığında 15 dakika Bench-Rocker'da çalkalanmıştır.
8. Bunun üzerine DTT ile eşit miktarda Dulbecco phosphate- buffered saline (D-PBS) eklenmiştir.
9. Materyal 4 kat steril gazlı bez (veya 48 mikonluk süzgeç kağıt) ile süzüldükten sonra santrifüjde +4^o C de 3000g de 10 dakika çevrilmiştir.
10. Süpernatant aspire edilerek Eppendorf tüplere konularak -80^o C de saklanmıştır.

3.5. İnflamatuvar belirteç analizleri

Balgam süpernatantında IL-2 (Dia Source KAP1241), IL-4 (Dia Sorce KAP1281), IL-5 (İnvitrogen KHC0052), IL-6 (Dia Source KAP1261), IL-8 (Dia Source KAP1301), IL-10 (Dia Source KAP 1321), TNF-alfa (Dia Sorce KAP1715), VEGF (İnvitrogen KHG0111)) çalışılmıştır. (Bkz appendiks 7.6)

3.6. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS16.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Datalar $\bar{x}$ standart sapma olarak verilmiştir. Her grupta başlangıca göre 8. haftada oluşan değişim eşleştirilmiş iki grup arasındaki farkların t-testi (paired sample t-test) ile test edilmiştir. Statin alan ve almayan grupta 8. haftada başlangıca göre olan değişimlerin arasında fark olup olmadığı two sample t-test ile tespit edilmiştir. Statin alan ve almayan gruplar arasında ACQ ve AQLQ skorlarında minimal klinik anlamlı puana erişen bireylerin sayıları arasında fark olup olmadığına Ki-kare testi ile bakılmıştır. Metakolin'in statine bağlı değişip değişmediğini anlamak için hastaların indüklendikleri metakolin PD20 değerleri geniş ranj nedeni ile logaritmik değerlere dönüştürülerek incelenmiştir (log10). Tüm testlerde $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Özellikler

Çalışmaya olgu alımı Aralık 2009-Mart 2010 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Toplam 84 hastaya solunum fonksiyon testi ve metakolin ile provokasyon testi yapıldı. Yirmi sekiz hasta metakolin negatif olduğu için, 3 hasta ilacı yanlış kullandığı için, 2 hasta kendi isteği ile çalışma dışı bırakıldı. Geri kalan 51 astım tanılı hastanın 25 tanesi hiperlipidemik olup statin tedavisi başlanmış, toplam 26'sı ise hiperlipidemisi olmayan kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Hastaların %3.9'u (2 olgu) ağır astım, %33.7'si (17 olgu) orta astım, %62.7'si (32 olgu) hafif astım olarak sınıflandırılmıştır, statin alan ve almayan gruplardaki dağılım eşittir. Çalışmaya dahil edilen hasta grubunun demografik özellikleri Tablo 4.1'de özetlenmiştir.

Tablo 4. 1. Olguların demografik özellikleri

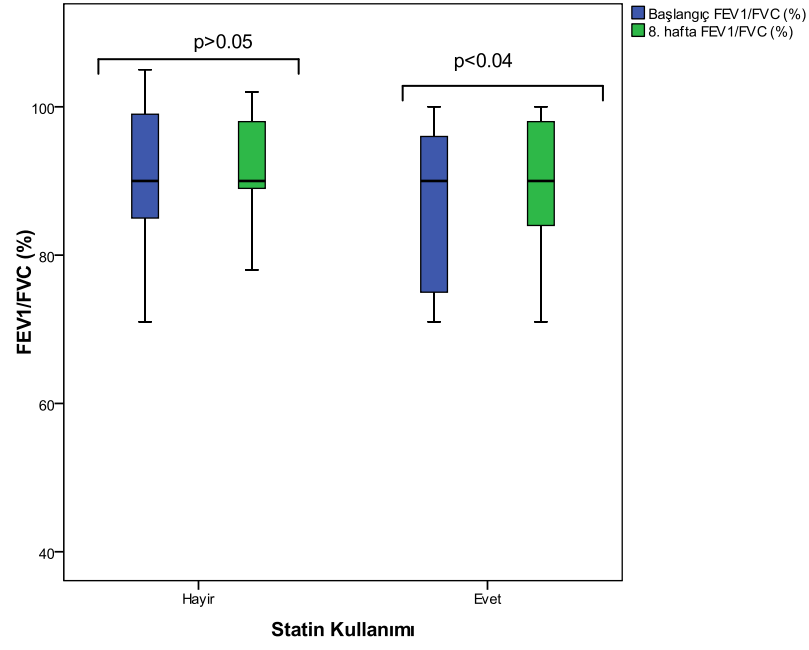
	Statin alan grup	Statin almayan grup	p değeri
Yaş	45.6 ± 9.1	42.8±9.4	AD
Kadın/Erkek	23/2	24/2	AD
Hasta sayısı	25	26	AD

*AD: istatistiksel olarak anlamlı değil

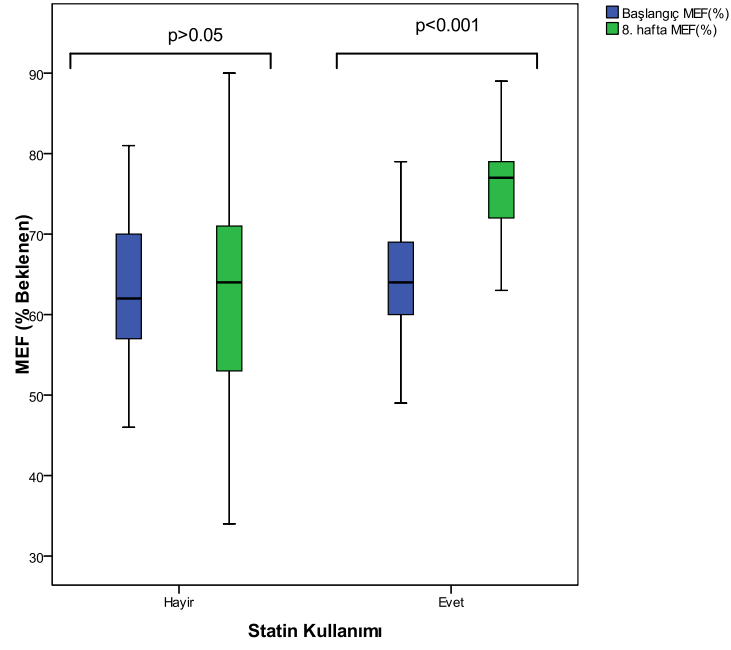
($\bar{x} \pm SD$)

4.2. Solunum Fonksiyon Testi Sonuçları

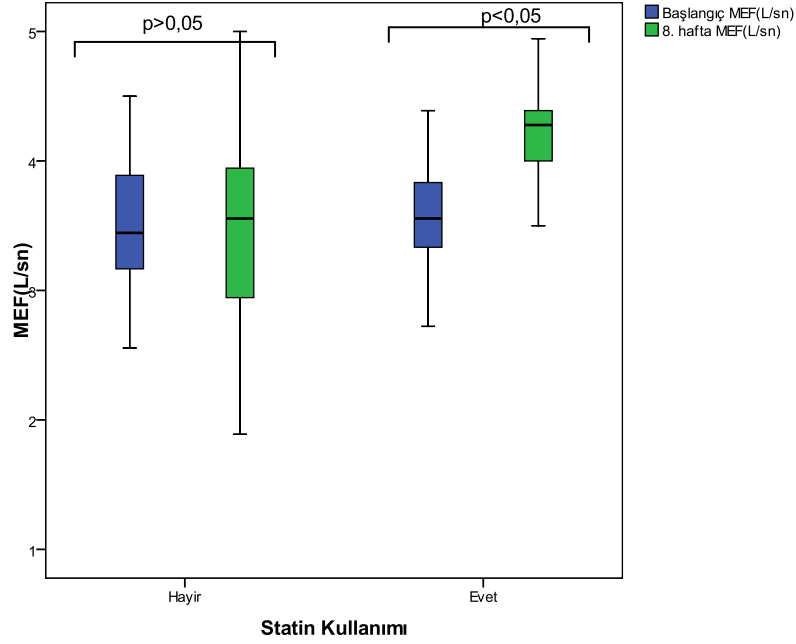
Çalışma başlangıcında statin kullanan ve kullanmayan olguların SFT parametreleri arasında anlamlı fark tespit edilmedi (Tablo 4.2). Statin kullanımı ile birlikte ilaç alan grupta FEV₁/FVC (%), MEF (% beklenen) ve MEF (L/sn) değerinde anlamlı düzeyde artış gözlemlendi ($p<0.04$, $p<0.0001$ ve $p<0.05$) (Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3). Diğer SFT parametrelerinde, (FEV₁(L/sn) ve FVC(L)) gözlenen artış anlamlı düzeye ulaşmadı. Statin kullanımına bağlı SFT parametrelerindeki değişim Tablo 4.3’de özetlenmiştir. Statin kullanmayan olgularda çalışma sonunda herhangi bir SFT parametresinde istatistiksel olarak anlamlı düzeye erişen değişim gözlenmemiştir. Statin kullanan ve kullanmayan gruplardaki değişimler karşılaştırıldığında ise sadece MEF(L/sn) ve MEF (% beklenen)`de istatistiksel olarak anlamlı fark oluşmuştur ($p<0.0001$ ve $p<0.001$) , (Tablo 4.3).



Şekil 4.1. Statin kullanımının FEV₁/FVC(%) üzerine etkisi.



Şekil 4.2. Statin kullanımının MEF (% beklenen) üzerine etkisi.



Şekil 4.3. Statin kullanımının MEF(L/sn) üzerine etkisi.

Tablo 4. 2. Başlangıçta statin alan ve almayan grupların SFT parametrelerinin karşılaştırması

Tedavi öncesi	Statin alan	Statin almayan	p değeri
FVC (L/sn)	3,02±0,6	2,8±0,9	AD
FEV ₁ (%)	90.4±11,1	89±18	AD
FEV ₁ (L/sn)	1,85±0,21	1,83±0,37	AD
FEV ₁ /FVC(%)	85,8±11,1	89,3±13	AD
MEF (%)	63,6 ±7,8	61,7±13	AD
MEF (L/sn)	3,51±0,44	3,42±0,51	AD

*AD: istatistiksel olarak anlamlı değil

Tablo 4.3. 8 haftalık izlem sonrasında SFT parametrelerindeki değişimin karşılaştırması

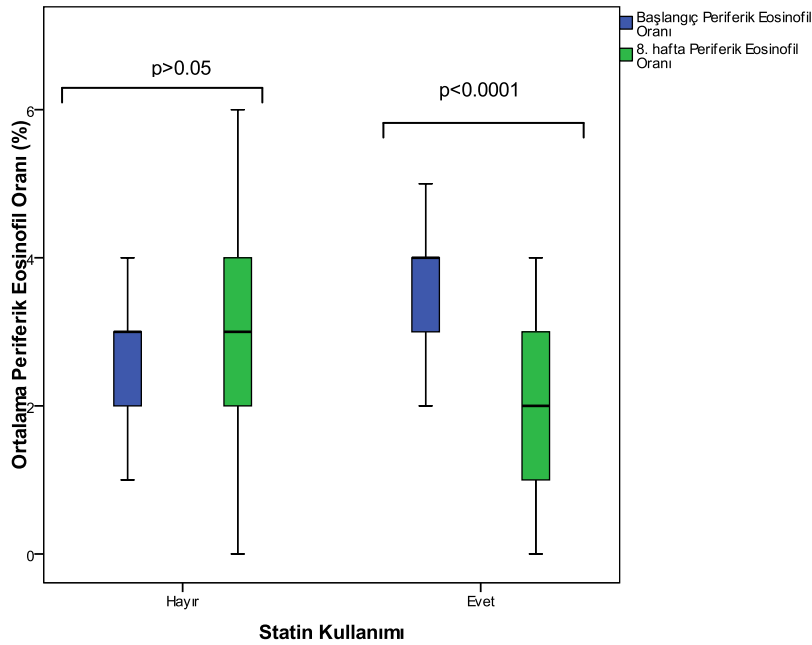
	Statin kullanan olgular				Statin kullanmayan olgular				p değeri
	Tedavi Öncesi	Tedavi Sonrası	Δ Değişim	p değeri*	Tedavi Öncesi	Tedavi Sonrası	Δ Değişim	p değeri *	
FVC (L)	3,02±0,6	3,04±0,6	1,6±9,8	0,4	2,8±0,9	2,8±0,9	0,02±0,1	0,4	0.2
FEV ₁ (%)	90,4±11,1	89,8±10,7	-0,5±6,6	0,6	80±18	80,2±20,8	0,1±6,1	0,9	0.6
FEV ₁ (L/sn)	1,85±0,2	1,82±0,2	-0,1±1,1	0,5	1,83±0,37	1,82±0,4	-0,1±0,9	0,6	0.6
FEV ₁ /FVC (%)	85,8±11,1	90,2±8,8	4,3±10,1	0,043	89,3±13	88,8±12,5	-0,4±10,6	0,8	0.1
MEF(% beklenen)	63,6±7,8	74,6±8,4	11±6,6	0,0001	61,7±13	60,8±13,5	-0,8±12,8	0,7	0,000
MEF(L/sn)	3,51±0,4	4,1±0,4	0,4±1,1	0,05	3,42±0,51	3,39	-0,1±1,4	0,6	0,001

*Paired sample t-Test (Başlangıç ve 8. Hafta karşılaştırılması)

** Two sample t-Test (Her iki gruptaki değişimlerin karşılaştırılması).

4.3. Periferik Eosinofili Sonuçları

Statin kullanan olgularda tedavi öncesi ortalama 3.7 ± 1.2 olarak bulunan periferik eosinofili oranı tedavi sonrası ortalama 2.2 ± 1.1 'ye geriledi ($p < 0.0001$), statin kullanmayan olgularda ise ortalama 2.9 ± 1.2 olan başlangıç değeri 8 hafta sonra 3.0 ± 1.5 saptandı ($p < 0.7$). Statin kullanımıyla gelişen ortalama 1.5 ± 1.4 'lük periferik eozinofil düzeyinde düşüşe karşın, kullanmayan olgularda 0.7 ± 1.3 'lük artış saptandı ve iki gruptaki değişimler birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark bulunmuştur ($p < 0.0001$). Statin kullanımının periferik eosinofili üzerine etkisi Şekil 4.4'de gösterilmektedir.



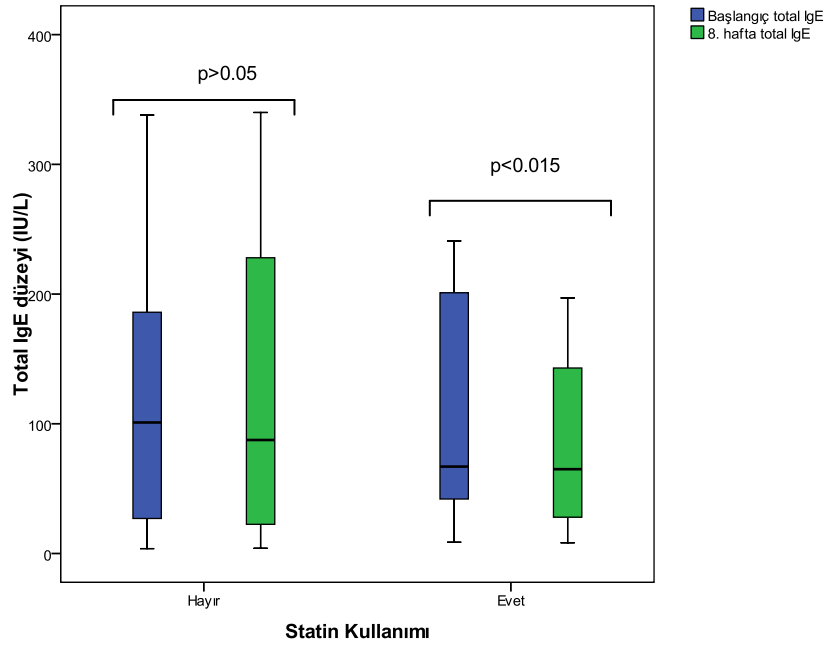
Şekil 4.4. Statin kullanımının periferik eosinofiliye etkisi

4.4. Statin Kullanımının Bronş Provokasyon Testine Olan Etkisi

Statin kullanan olgularda tedavi öncesi metakolin testinde ortalama PD20 uyarılma dozu $4,1 \pm 2,8$ pg/ml iken tedavi sonrasında $5,1 \pm 3,4$ pg/ml'ye arttığı tespit edilmiştir. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmamıştır ($p > 0,05$). Statin kullanmayan olgularda ise ortalama metakolin ile indüklenme dozu 8. hafta kontrolünde istatistiksel olarak anlamsız düşüş göstermiştir ($6,4 \pm 3,7$ pg/ml'den $5,2 \pm 3$ pg/ml'ye) ($p > 0,05$).

4.5. Statin Kullanımının Allerji Parametreleri Üzerine Olan Etkisi

Statin kullanan olgularda total IgE düzeyi ve spesifik IgE ile tayin edilen pozitif allerjen sayısı anlamlı düzeyde düşüş göstermiştir ($p < 0,01$ ve $p < 0,04$), (Şekil 4.5). Statin kullanmayan olguların total IgE düzeyinde tedavi öncesi ve sonrası karşılaştırmada bir değişim görülmedi ancak spesifik IgE ile tayin edilen pozitif allerjen sayısında anlamlı düzeyde artış gözlemlendi ($p < 0,04$) (Tablo 4.4). Statin ile cilt prick allerji testlerinde de anlamlı değişiklik olmazken tedavi olmayan grupta yine anlamlı olmayan artış olmuştur (Tablo 4.4). İki gruptaki total IgE ve spesifik IgE pozitif allerjen sayılarının başlangıca göre oluşan değişimleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark gözlenmiştir ($p < 0,015$ ve $p < 0,004$), (Tablo 4.4). Ancak cilt prick testi düzeylerindeki değişim iki grup arasında benzerlik göstermektedir ($p > 0,05$).



Şekil 4.5. Statin kullanımının Total IgE düzeyi üzerine etkisi

Tablo 4.4. Statin kullanımının total IgE düzeyleri ve allerjen sayısı üzerine olan etkisi.

	Statin kullanan olgular				Statin kullanmayan olgular				p değeri
	Başlangıç	Tedavi sonrası 8. hafta	Δ Değişim	p değeri*	Başlangıç	8. hafta	Δ Değişim	p değeri*	
Total IgE (IU/L)	215,3±334,0	182,6±320,0	- 32,6±233	0,01	125,9±117,0	135,3±142	9,4±40,7	0,7	0,015
Spesifik IgE (+) allerjen sayısı	1,12±1,3	0,8±0,9	-0,3±0,7	0,04	1,19±1,4	1,5±1,7	0,3±0,7	0,04	0,004
Cilt prick testi (+) allerjen sayısı	0,52±1,1	0,6±1,2	0,1±1,2	0,6	0,57±1,1	1,2±2,0	0,6±1,6	0,06	0,2

*Paired sample t-Test (Başlangıç ve 8. Hafta karşılaştırılması)

** Two sample t-Test (Her iki gruptaki değişimlerin karşılaştırılması).

4.6. Statin Kullanımının İnflamatuvar Belirteçler Üzerine Etkisi

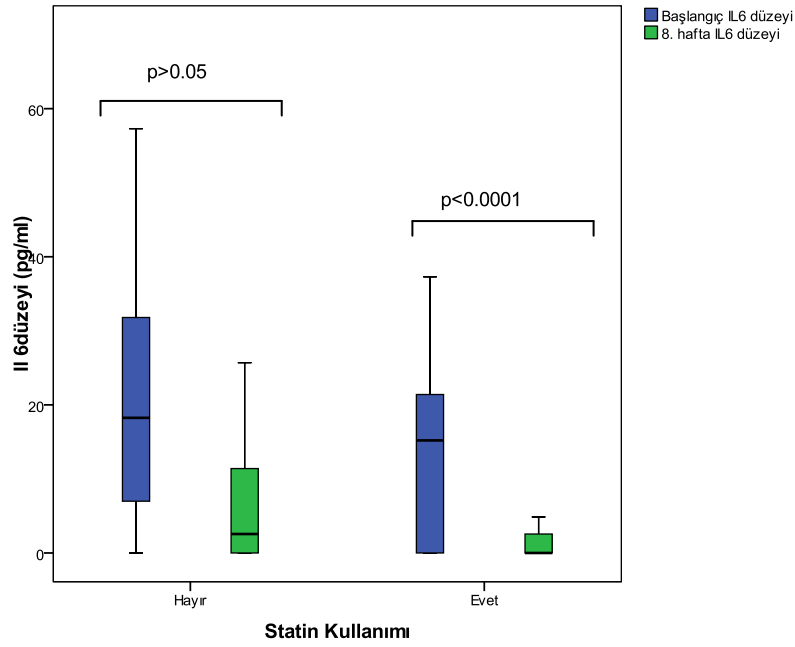
İndüklenmiş balgam örneklerinde 8 haftalık statin tedavisi ile IL-6 ve IL-2 düzeylerinde düşüş ($p<0,000$ ve $p<0,000$) gözlenirken TNF-alpha $0,9 \pm 1.1$ pg/ml'den $0,2 \pm 0.7$ pg/ml ($p<0,000$) seviyesine inmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.7). Statin kullanmayan olgularda da IL-2'de istatistiksel olarak anlamlı düşüş ($p<0,009$) ve VEGF'te artış ($p<0,04$) gözlenmiştir. IL-2'nin başlangıçta 0 bulunması şüphe ile karşılanmıştır. Statin kullanan olgularda gözlenen TNF-alpha düzeyindeki düşüş ve kullanmayan olgulardaki artış değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark gözlenmiştir ($p<0,007$). Statin kullanımıyla birlikte gözlenen VEGF düzeylerindeki azalma, kullanmayan olgulardaki artış ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık oluşturmuştur ($p<0,02$). Belirtilen farklar dışındaki değişimler iki grup arasında istatistiksel farklılığa yol açmamıştır. (Tablo 4.5)

Tablo 4.5. Statin kullanımının inflamatuvar markerlar üzerine etkisi.

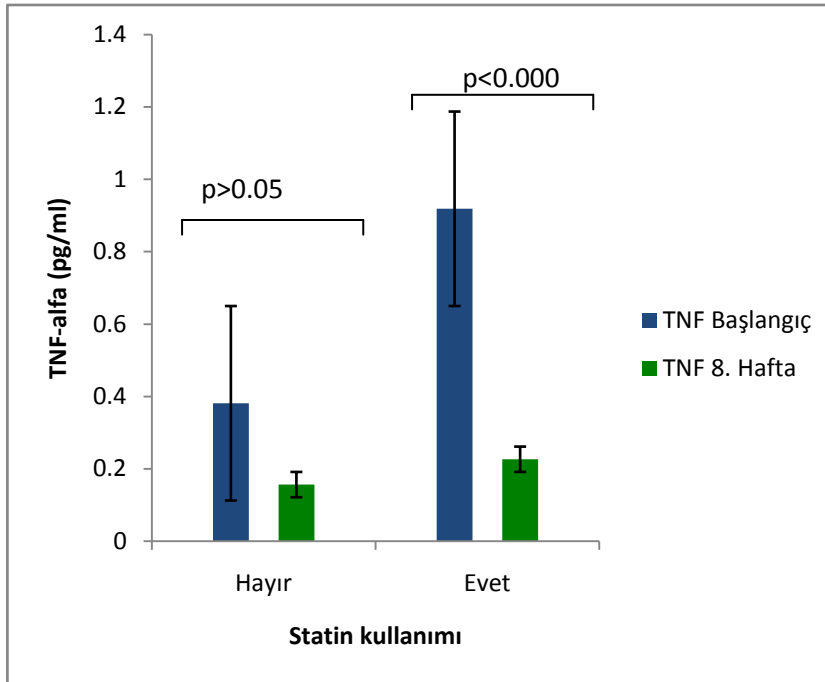
	Statin kullanan olgular				Statin kullanmayan olgular				p değeri**
	Başlangıç	8 hafta statin sonrası	Δ Değişim	p değeri*	Başlangıç	8. hafta	Δ Değişim	p değeri*	
IL6(pg/ml)	18,7 ± 23.4	9,9 ± 37.2	-8,7±40,5	0,000	24,3 ± 23.5	6,7 ± 8.7	-17,5±24	0,09	0,3
VEGF(pg/ml)	18,4 ± 45.3	1,86 ± 3.5	-16,5±45,7	0,1	0	18,3 ± 63.5	18,3±63,5	0,04	0,02
IL5 (pg/ml)	5,2 ± 10.6	8,5 ± 21.5	3,2±19,9	0,2	10,5 ± 32.8	4,4 ± 14.5	-6±31,9	0,6	0,2
IL2 (pg/ml)	0,2 ± 0.3	0	-0,3±0,3	0,000	0,5 ± 1.3	0,03 ± 0.09	-0,5±1,3	0,009	0,4
IL8 (pg/ml)	187,3 ± 131	295,3 ± 339	107,9±356	0,4	272,2 ± 321	272,9 ± 257	,8±395	0,3	0,3
IL4 (pg/ml)	106,9 ± 40.9	140,5 ± 104.2	33,1±112,9	0,8	113 ± 38.4	142,6 ± 74.8	29,5±78,9	0,3	0,8
IL10 (pg/ml)	20,8 ± 26.7	13 ± 19	-8,0±32,3	0,5	14,6 ± 21.6	14,4 ± 23.5	-0,2±27,2	0,7	0,3
TNF (pg/ml)	0,91 ± 1.1	0,22 ± 0.7	-0,7±0,8	0,000	0,38 ± 1.2	0,15 ± 0.4	- 0,22±1,37	0,5	0,007

*Paired sample t-Test (Başlangıç ve 8. Hafta karşılaştırılması)

** Two sample t-Test (Her iki gruptaki değişimlerin karşılaştırılması).



Şekil 4.6. Statin kullanımının IL-6 düzeyine etkisi



Şekil 4.7. Statin kullanımının TNF-alfa düzeyine etkisi

4.7. Statin Kullanımının Astım Kontrol Anketi (ACQ) ve Astım Yaşam Kalitesi Anketi (AQLQ) Skorları Üzerine Etkisi

Statin kullanan ve kullanmayan grupta 8 hafta sonraki kontrollerde hastaların doldurduğu anket sonuçlarında başlangıca göre fark saptanmamıştır ayrıca iki gruptaki değişimler karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6.Statin kullanımın ACQ ve AQLQ anket skorları üzerine etkisi.

	Statin kullanan olgular				Statin kullanmayan olgular				p değeri**
	Başlangıç	8. hafta statin sonrası	Δ Değişim	p değeri*	Başlangıç	8. hafta	Δ Değişim	p değeri*	
ACQ	1±0,9	1±0,7	-0,06±1	0,7	1,3±0,7	1±1,6	-0,2±0,9	0,2	0,4
AQLQ (total skor)	127,7±31,5	130,1±28,4	2,4±22	0,5	122,6±25	124,8±29	3±16	0,3	0,9
Duygusal işlev	21,8±8,3	21,5±7,9	-0,3±5,3	0,7	21,6±7	21,8 ±7,1	0,4±5,1	0,7	0,6
Belirtiler	48,6±11,2	51,1±11,7	2,4±9,5	0,2	46,3±9,7	47 ±10,8	1,1±6,1	0,3	0,5
Çevresel uyarı	14,2 ±5,1	14,4±4,7	0,2±4,6	0,7	13,2±3,3	13,3 ±3,8	0,1±3,1	0,8	0,9
Faaliyet kısıtlaması	40,9 ±12,4	44,3 ±9,8	3,4±15	0,2	40,3 ±8,5	41,4 ±10,2	1,4±6,4	0,2	0,5

*Paired sample t-Test (Başlangıç ve 8. Hafta karşılaştırılması)

** Two sample t-Test (Her iki gruptaki değişimlerin karşılaştırılması).

Tablo 4.7 ve 4.8’da görüldüğü gibi statinler klinik olarak anlamlı minimal puanlarda da değişim yaratmamıştır.

Tablo 4.7. Statin kullanımının ACQ’da klinik anlamı.

	ACQ’da 8. Hafta sonunda gelişen değişimi		p Değeri*
Klinik minimal anlamlı puan	<2,5 puan	>2,5 puan	
Statin kullanan olgular	17 (%68)	8 (%32)	0,09
Statin kullanmayan olgular	12 (%46)	14 (%54)	

*Ki-kare testi

Tablo 4.8. Statin kullanımının AQLQ’da klinik anlamı.

	AQLQ’da 8. Hafta sonunda gelişen değişimi		p Değeri*
Klinik minimal anlamlı puan	<0,5 puan	>0,5 puan	
Statin kullanan olgular	11(%44)	14(56%)	0.5
Statin kullanmayan olgular	12 (%46)	14 (%54)	

*Ki-kare testi

5. TARTIŞMA

Astımlı hastalar ile gerçekleştirilen bu çalışmada, astım tanısı olan ve hiperlipidemisi saptananlarda statin tedavisi ile izlemin statin kullanmayan normolipidemik astımlılarla karşılaştırması yapılmıştır. Her iki grupta başlangıç evresinde havayolu inflamasyonu ve klinik değerlendirme yapılarak arada fark olmadığı görüldükten sonra hiperlipidemik olan gruba 8 haftalık statin tedavisi verilmiş ve tüm hastalarda 8. haftanın sonunda başlangıçta incelenen parametreler tekrar değerlendirilmiştir. Statin tedavisi alan astımlı olgularda yapılan SFT’de MEF (L/sn), MEF (% beklenen) ve FEV₁/FVC (%) oranında artış, periferik eosinofili değerlerinde düşme, cilt testinde pozitif allerjen sayısında azalma, total IgE seviyesinde düşme, inflamatuvar belirteçlerden IL-6, TNF-alfa seviyelerinde düşme saptanırken kullanmayan olgularda VEGF düzeyinde artma dışında istatistiksel anlama ulaşan değişim saptanmamıştır.

Statinlerin astımlı hastalarda semptom ve solunum fonksiyon testi parametreleri üzerinde etkilerini inceleyen çalışmalar tartışmalı sonuçlar ortaya koymaktadır. Cowan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada inhale steroid tedavisi alan astımlı hastaların simvastatin kullanımı ile semptomlarında düzelme ve inhale steroid ihtiyacında azalma etkisi incelenmiştir. Çalışmaya alınma kriteri olarak inhale steroid kullanmadan önce bakılan balgam eosinofilisi > %2 olan 51 hastaya kullanmakta oldukları fluticasone yanına 40 mg simvastatin eklenerek inhale steroid dozu kademeli olarak düşürülmüştür. Hastaların semptomlarının ortaya çıktığı ve hastalığın kontrolsüz aşamaya geldiği noktada fluticasone dozu yavaşça yükseltilerek optimum doz titre edilmiştir. Toplam 43 hasta çalışmayı bitirebilmiştir. Sonuçlara bakıldığında tedaviye statin eklenmesi ile

beraber fluticason dozunun azaltıldığı görülmüş ve semptomların ortaya çıktığı doz ile statin kullanılmayan dönemde minimum ihtiyaç duyulan inhale fluticasonun dozu arasında fark saptanmamıştır. Hastaların ACQ anketleri incelendiğinde ACQ skorunda düzelme ve solunum fonksiyon testi parametrelerinden FEV₁’de düzelme gösterilmiştir [12]. 2008 yılında Hothersall’ın yaptığı çalışmada ise 54 atopik astımlı olguda 8 haftalık 40 mg atorvastatin tedavisinin etkileri incelenmiştir. Randomize, çift kör, crossover olarak yapılmış olan çalışmada 8 hafta sonundaki incelemelerde astım semptom skorunda ve sabah PEF değerlerinde düzelme gösterilememiştir. Hothersall bu çalışma ile kısa vadede orta ve hafif persistan astımda statin tedavisinin ek bir yararı olmadığı kanısına varmıştır [11]. Menzies ve arkadaşları statinlerin astımdaki antiinflamatuvar etkisini incelemek amacı ile bir ay süre ile tüm antiinflamatuvar tedavisi kesilmiş 16 astım hastasına statin vererek SFT ve semptom skorlarına bakmışlar ancak birinci ay sonunda kan kolesterol seviyelerinde düşmeye karşı SFT ve semptom skorlarında düzelme gösterememişlerdir [239]. Bizim çalışmamızda statin kullanımı ile ACQ ve AQLQ skorlarında düzelme gösterilememiştir. Yine AQLQ alt grup skorları incelendiğinde istatistiksel fark gösteren değişim saptanmamıştır ancak statin kullanımıyla beraber obstrüksiyonu ve küçük hava yollarını gösteren SFT değerlerinde artış olmuştur. FEV₁’de artış gözlenmemiştir. Bizim çalışmamızdaki semptom skorları ve anket sonuçları daha çok Hothersall ve Menzies’in çalışmalarını desteklemekle beraber Menzies ve Hothersall SFT parametrelerinin hiçbirinde anlamlı değişim saptayamamıştır. Buna karşın Cowan FEV₁ değerinde ve ACQ’da düzelme saptamıştır. Bu üç çalışma karşılaştırıldığında kullanılan statinlerin farklı olması ve yine Menzies ve

ekibinin statin tedavisini 1 ay gibi kısıtlı bir süre için vermiş olması ortaya çıkan farklı sonuçları açıklayabilir.

Hava yolu hiperreaktivitesindeki etkiyi saptamak amacı ile bakılan metakolin yanıtları arasında çalışmamızda fark saptanmamıştır. Benzer şekilde Hothersall ve Menzies'in çalışmalarında baktıkları metakolin yanıtlarında da statin kullanımı ile düzelme gösterememişlerdir.

Astımda hava yollarında kronik bir inflamasyon süreci yaşanmaktadır. İnflamasyonun tetiklenmesinde ve sürecin devamında bugüne kadar tanımlanan sitokinlerden en öne çıkanları IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 , IL-10, IL-13 olmakla beraber son zamanlarda TNF-alfa ile yapılan çalışmalar daha çarpıcı sonuçlar göstermiştir. TNF-alfa özellikle nötrofil ve eosinofil aktivasyonunda rol oynamakta ve eosinofillerin sitotoksik etkilerini artırmaktadır, yine düz kas hücrelerinde kasılma kuvvetini artırdığına yönelik çalışmalar mevcuttur [58]. Howarth ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada astım ataklarında BAL'da TNF-alfa miktarında artış göstermişlerdir [33]. Berry ve Erin'in kendi grupları ile yaptığı çalışmalarda ise refrakter astım ve normal astımlı olgularda TNF-alfa blokajı ile solunum fonksiyon testi ve semptom skorunda düzelme gösterilmiştir [10]. Har Seong Nam ve ekibinin hayvan çalışmalarında TNF-alfanın biyolojik etkileşimi incelenmiş ve TNF-alfa blokajı ile IL-4, IL-5, IL-6'da baskılanma saptanmıştır. Camara ve Gabari'nin insan bronş epitelinde yapmış olduğu çalışmada epitelial dönüşümü tetikleyen en önemli ajanın TNF-alfa ve IL-1 olduğu gösterilmiştir [240]. Statinlerin antiinflamatuvar etkileri hücresel düzeyde de birçok alanda çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [149]. Yapılan yayınlarda statinlerin makrofaj

ve endotel gibi antijen sunan hücrelerde LFA-1 ve MHC II baskılanması yaparak lökositlerin ekstrasvazasyonunun engellenmesi, NK aktivitesinde baskılanma ve TNF-alfa, IL-6 ve IL-1 seviyelerinde düşme sağladığı gösterilmiştir [8]. Shyu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada hücre kültürlerinde atorvastatinin etkisi incelenmiş ve atorvastatinin makrofajlardan salgılanan TNF-alfa seviyelerinde düşmeye yol açtığı gösterilmiştir [189]. Benzer bir çalışmanın daha günceli Awad ve Sharif tarafından yapılmış rosuvastatinin immünmodülatuar etkileri incelenmiştir, bu çalışmada iskemik reperfüzyon hasarı geliştirilmiş fare modelinde başta iskemik hepatit olmak üzere kalp, akciğer ve böbrek dokuları incelenmiş ve reperfüzyon hasarı ile beraber rosuvastatin alan fare grubunda TNF-alfa, IL-6, monosit kemoataktan protein-1 (MCP-1) düzeylerinde azalma saptanırken IL-10 seviyelerinde artış gösterilmiş ve IL-10' daki artış IL-10'un antiinflamatuvar özellikleri ile ilişkilendirilmiştir [241]. Bizim çalışmamızda 8 hafta boyunca 40 mg rosuvastatin tedavisi almış olguların 8. hafta sonunda TNF-alfa ve IL-6 düzeylerinde azalmanın olması Shaafsma ve Awad'ın yapmış olduğu çalışmaları desteklemektedir. Ancak Awad'ın deneysel modelde saptadığı IL-10 düzeyinde düşme bizim çalışmamızda saptanmamıştır. Berry ve Erin'in yapmış olduğu çalışmadakine benzer olarak inflamasyon belirteçleri azalırken solunum fonksiyon testi parametrelerinden MEF ve FEV₁/FVC'de düzelme saptanmıştır. Ancak beklenin dışında hastaların yaşam kalitesi anketlerinde semptom skoruna yönelik düzelme gösterilememiştir. Bu etkinin ortaya çıkması için daha uzun süreli izlem gerekebilir.

Hava yolu yeniden yapılanmasında hava yolu tonusunu belirleyen en önemli etkenlerden birisi de havayolu düz kası olarak bilinmektedir. Astımlı hava yolundaki düz kas hücrelerinde hem sayıca artma hem de hacimce artma meydana gelmektedir ve

migratuar özelliği olan bu hücrelerden kemokin, sitokin aynı zamanda ekstrasellüler matriks salgılanması olmaktadır [91]. Simcock ve arkadaşları vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ile düz kas ilişkisini incelemişler ve düz kas yeniden yapılanmasında rol aldıklarını göstermişlerdir [97]. VEGF aynı zamanda yeniden yapılanan hava yolunda damar genişliğinde artış ve yeni damar gelişimini sağlayarak etkili olmaktadır. Hashimoto ve ekibi astımlı olgularda havayolu damar yapısını incelemişler ve vasküleritenin normal olgulara oranla arttığını saptamışlardır, vasküler artışla ilişkili olarak astımlılarda eksale edilen havanın sıcaklığında artış ve NO seviyelerinde yükselme gösterilmiştir [6]. Bu değişim içinde neovaskülarizasyon, hiperpermabilite ve vazodilatasyon birbirleriyle ilişkili kavram olarak kabul edilmiştir. Koumondouros ve arkadaşları mikroçevre ve hava yolu ilişkisini koyunlarda incelemiş ve sürekli ev tozu akarlarına maruz kalan hayvanlarda düz kas hipertrofisi ve vaskülarizasyonda artış saptamışlardır. Bu değişimin öncelikle alt ve orta seviyedeki hava yollarında gözlenmiş olması olgularda meydana gelen küçük hava yolu hastalığı ile ilişkilendirilmiş, astımlı olguların hava yolundan alınan sıvılarda kontrol gruba göre daha fazla VEGF ve anjiogenin saptanmış ve artmış vasküler alanın hava yolu hastalığı ciddiyeti, hava yolu obstrüksiyonun derecesi ve hava yolu kalibrasyonunda artışa yol açtığı ileri sürülmüştür [242]. Daha güncel olarak Sziksz ve arkadaşlarının yapmış olduğu hayvan çalışmasında allerjen maruziyetinin akciğer immün hücrelerinden salgılanan VEGF miktarında artışa neden olduğu ve bunun genetik yapıdan bağımsız bir mekanizma ile gerçekleştiği gösterilmiştir [243]. VEGF salınımının sadece endotelyal kaynaklı olmadığını, eosinofil, makrofaj ve mast hücrelerinden de VEGF salgısı olabileceği gösterilmiştir. Puxeddu ve ekibi astımlı olgularda hava yolunda anjiogenezin

fazla olduğu bölgelerde alınan dokulardaki eosinofillerin normal hava yolu kültürüne ekilmesi ile normal olan dokuda yeni damar gelişimini göstermişlerdir [244]. Fadini ve arkadaşlarının statinlerin antiinflamatuvar etki mekanizmasını incelemek için yapmış oldukları hayvan çalışmasında rosuvastatin verilmiş farelerde endotelial progenitor hücreler (EPC) incelenmiştir. Vasküloproliferatif ve rejenarasyonu düzenleme etkisi olan hücrelerin statin alan grupta ürettikleri inflamatuvar molekül düzeyinde azalma ve EPC hücrelerin vasküloproliferatif özelliklerinde baskılanmaya yol açtığı izlenmiştir [245]. Statinler ile yapılan deneysel modellerde simvastatin ile yapılmış iki güncel çalışmada da özellikle hava yolundaki yeniden yapılanma üzerine etkilerden bahsetmektedir. Shaafsma ve ekibinin çalışmasında mevalonat kaskadı blokajı ile hava yolu yeniden yapılanmasında meydana gelen değişiklikleri incelemek için astım modeli oluşturulmuş farelere simvastatin verilerek hava yolu dokusu incelenmiştir. Hava yolunda meydana gelen fibroproliferatif dengenin ekstrasellüler matriks depolanmasında artış ile sonuçlanması hipotezinden yola çıkılarak bu değişimi tetikleyen tümör growth faktör –beta1 (TGF-beta1)’i salınımını etkileyen TNF-alfa ve IL-1 seviyelerinde simvastatin ile anlamlı düşme olduğu gözlenmiştir. Bu etki simvastatinin hücre içi posttranslasyonel sinyal molekül blokajı ile RhoA ‘yı bloke etmesine bağlanmıştır [246]. Wright ise altı ay boyunca sigara dumanı inhale ettirilmiş domuzlarda bir gruba 4 hafta boyunca simvastatin vermiş ve daha sonra akciğer dokularını incelemiştir. Simvastatin alan grupta sigaraya bağlı amfizemde ve makrofaj birikiminde azalma saptanmış ancak küçük hava yollarında yeniden yapılanmaya ait değişiklikte fark gösterilememiştir [247].

Bizim çalışmamızda indüklenmiş balgam süpernatantında bakılan VEGF düzeylerinde 8 hafta sonunda statin kullanmayan grupta anlamlı düzeyde yükselme saptanmıştır. Her ne kadar statin kullananlarda istatistiksel anlama ulaşan düşme izlenmesi de azalma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Koumoundouros ve arkadaşlarının çalışmasında saptanmış olan orta ve alt hava yolunun öncelikli tutulumu açısından VEGF'in azalma eğiliminde olduğu grubunun solunum fonksiyon testinde küçük havayolu değerlerinde düzelme dikkati çekmektedir ve bu görüşü desteklemektedir. Statin kullanmayan grupta VEGF'te istatistiksel yükselme olması, statinlerin hava yolunda anjiogeneze stabilize edici etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

IgE düzeyi ve statinler üzerine yapılmış çalışmalara bakıldığında bu fikir ilk defa 1991 yılında Deanin'in hayvan çalışmasında ortaya atılmıştır. İsoprenoid ve IgE reseptör ilişkisini incelemek amacı ile farelere lovastatin vermiş ve IgE sekretuar fonksiyonlarında azalma ve IgE reseptörlerinde morfolojik değişim saptamıştır [248]. Buna benzer bir çalışma Roche ve ekibi tarafından yapılmış, statinler ve mast hücre fonksiyonlarını incelemek için peritonit geliştirilmiş farelere lovastatin verilmiştir, bu farelerde anti-IgE aktivitesinde artış ve sonucunda mast hücre degranülasyonunda azalma saptamışlardır [249]. Shakarjian ise statinler ve IgE ilişkisineki mekanizmayı açıklamak üzere lovastatin verilen fareleri incelemiş ve statinlerin indirekt mekanizma ile tirozin fosforilasyonunda inhibisyon yapması nedeniyle IgE'ye bağlı Fc epsilon RI bağımlı sinyal mekanizmasında bozulma tespit etmiştir. Bu reseptörün bozulması ile allerjenle temasta mast hücrelerine antijen sunumu IgE tarafından gerçekleştirilmeyip bakılan serotonin seviyelerinde yükselme gözlenmemiştir [250]. Kim ve arkadaşları allerjik fare modelinde simvastatinin antiinflamatorik ve immünmodulator etkilerini

incelemek için yaptıkları çalışmada astımlı farelerin serum IgE düzeyine bakılmış ve simvastatin tedavisi ile serum IgE ve spesifik IgE'ler düzeyinde düşme bildirmişlerdir [251]. Statinlerin IgE düzeyine ve fonksiyonuna dair insan çalışması 2006'da Krauth ve arkadaşları tarafından yapılmış ve dört farklı statin ile insan kordon kanından izole edilmiş mast hücrelerini akciğer dokusunda 24 saat boyunca statinle inkübe ederek histamin salgısını incelemişlerdir. Çalışmada cerivastatin ve atorvastatinin IgE blokajı yaparak histamin salgısını bloke ettiğini ancak simvastatin ve pravastatin ile bu değişimi saptamadıklarını bildirmişlerdir [252].

Statin ve IgE konusunda literatürde kısıtlı yayın olmasına karşın karşıt görüş bildiren yayın sayısı daha azınlıktadır. Menzies'in yayınına ek olarak Fossa ve arkadaşları statin kullanımı ile gelişebilecek yan etkiler üzerine yazdıkları yazıda statin kullanıma ait bildirilmiş hava yolu hiper reaktivitesi ile beraber artmış serum IgE ve eosinofili gelişimi bildirmişlerdir, bu reaksiyonlar dozdan bağımsız olarak gerçekleşmiş, ilacın kesilmesiyle beraber 24-48 saat içinde gerilemiştir. Bizim çalışmamızda ise 8. hafta sonunda statin kullanan 10 hastada PD20 değeri azalırken istatistiksel anlamlı değişiklik yaratmamıştır. Menzies'in çalışmasında hasta grubunda serum eosinofil düzeylerinde düzelme olmamıştır. Bizim çalışmamızda statin alan grubun sekizinci hafta sonunda serum eosinofil düzeylerinde düşme gösterilmiştir, ancak bu çelişki Menzies'in hastalarında kullanılan tüm antiinflamatuvarların çalışma süresince kesilmesi nedeniyle gelişmiş bir etki olarak yorumlanabilir.

Literatürde statinlerin cilt testi üzerine olan etkisini inceleyen direkt bir çalışma bulunmamakla beraber Yılmaz ve arkadaşlarının nasal polip gelişimine etki eden faktörleri inceledikleri çalışmalarında 200 statin kullanan ve 200 statin kullanmayan

olguda endoskopik nasal polip taraması yapılırken beraberinde cilt testi ve serum IgE seviyelerine bakılmış ve çalışma sonunda statin kullanan ve kullanmayan gruplar arasında serum IgE düzeyi, prick testi ve nasal polip gelişimi açısından fark gösterilememiştir. Bizim çalışmamızda hastaların başlangıç ve 8. hafta sonunda bakılan cilt testlerinde statin kullanan grupta anlamlı değişim olmazken statin kullanmayanlarda pozitif allejen sayısında artış saptanmış ancak istatistiksel anlamlılık sınırında kalmıştır ($p > 0,06$). Serum total IgE ve pozitif saptanan spesifik IgE sayıları incelendiğinde statin kullananlarda total IgE düzeyinde ve pozitif spesifik IgE sayısında anlamlı azalma sağlanırken statin kullanmayanlarda total IgE’de değişiklik olmazken spesifik IgE sayısında istatistiksel anlamlı artış saptanmıştır. Kim’in yaptığı çalışmada statin alan astımlı fare grubunda BAL’da inflamatuvar hücre sayısı ve IgE düzeylerinde azalma göstermiştir, bu sonuçlar Kim’in çalışmasını desteklemektedir [251]. Ancak bizim çalışmamız bu konuda insanda yapılan ilk klinik çalışmadır.

Deneysel modellerle çalışmalar güncel olarak devam etse de statinlerin astımda yararı konusunda karşıt görüşler de belirmiştir. Bu görüşlerin temel dayanağı deneysel modellerde antijen sensitizasyonu ile oluşturulan astım modellerinin aslında insanlardaki modellerden oldukça farklı olduğu yönündedir [253]. Yine hayvan modellerinde kullanılan dozların insanlardakine oranla daha yüksek oluşu da başka bir itiraz noktasıdır. Hayvanlarda kısa süreli statin tedavisi ile gerek hava yolunda gerekse moleküler düzeyde iyileşmenin saptanması da yine bu yüksek dozun etkisi olarak değerlendirilmektedir. Tartışılmakta olan bir diğer nokta ise tüm bu inflamatuvar yanıtın aslında hiperlipidemiye sekonder mi geliştiği sorusudur. Bu konuya ait en yeni büyük çalışmalardan biri Fessler ve arkadaşlarının 6854 kişi üzerinde yapmış olduğu

taramadır. Hiperlipidemik farelerde Th2 aktivitesinin tetiklenerek inflamatuvar ve allerjik hastalıklara zemin hazırladığı tezinden yola çıkılan çalışmada trigliserid, HDL ve atopi arasındaki korelasyona bakmıştır. Çalışma sonuçlarına göre İspanyol olmayan beyazlarda atopi ve HDL düzeyleri korele olarak saptanırken İspanyol olmayan siyah ırkta atopi ve HDL korelasyonu ters orantılı olarak saptanmıştır. Yine aynı çalışmada CRP ve vücut-kitle endeksi (BMI)'nin atopi ile ilişkisi gösterilememiştir ki bu nedenle atopinin daha çok kalıtsal yolla geliştiğini savunmuşlardır [254]. Bizim çalışmamızda ise hiperlipidemik olan ve olmayan grupta başlangıçta SFT, PD20, total IgE, spesifik IgE, eosinofili ve prick testler açısından anlamlı fark bulunmamıştır.

Çalışmanın kısıtlayıcı yönleri olarak hasta sayısının az olması, astım ağırlığının dağılımının daha çok hafif –orta persistan nitelikte olması, cinsiyet olarak kadın baskınlığının olmasının yanı sıra üniversite etik kurulunun onaylamaması nedeniyle hiperlipidemik olmayıp statin alan bir grupta karşılaştırma yapılamaması sayılabilir. Şimdiye kadar yapılmış olan çalışmalarda statinlerin antiinflamatuvar etkilerinin antihiperlipidemik özelliklerinden önce ortaya çıktığı görüşü ağır basmakla beraber astımla ilgili olarak hava yolu üzerine olan etkilerinin ortaya çıkması için kesin bir süre bildirimi yapılmamıştır. Ancak çalışmaların çoğunda ortaya çıkan sonuç kısa süreli tedavilerin yetersiz olacağı yönündedir. Bizim çalışmamızda verilen statin dozu 40 mg yeterli doz olmasına karşın 8 hafta yetersiz bir süre olabilir, daha uzun süreli izlemin yapılması ek fayda sağlayabilir. Çalışmada inflamatuvar yanıt değerlendirmesi invazif olmayan bir yöntem olan indükte balgam süpernatantında bakılan sitokinler ve interlökinler aracılığı ile yapılmıştır ancak hava yolundan alınan doku incelemeleri bu tür çalışmaların değerini artıracaktır. Hiperlipidemisi saptanmayan astımlı olguların

statin almamaları nedeniyle iki grup arasında ki karşılaştırmalar sınırlı olarak yapılabilmektedir. Hiperlipideminin kendisinin de inflamatuvar bir sebep olabileceği ihtimali nedeniyle hiperlipidemisi olmayan astımı olan olgulara statin verilerek yapılan klinik çalışmalar daha değerli olacaktır.

Sonuç olarak çalışmamızda astımı olan hastalarda statin kullanımına bağlı olarak küçük hava yolu hastalığında , periferik eosinofilisinde, total IgE düzeyi ve pozitif spesifik IgE sayısında azalma, hava yolu inflamatuvar markerlarından IL-6, TNF-alfa seviyesinde düşme saptanmış, statin almayan grupta VEGF’te artış saptanmıştır. Bu sonuçlar hava yolundaki inflamatuvar yanıtta sitokinlerin baskılanması ile uyumludur. Buna karşın metakolin yanıtı ve astım semptomlarına yönelik klinik ACQ ve AQLQ testlerinde statin kullanımı ile değişim saptanmamıştır. Bu çalışmanın sonucunda statinlerin hava yolu inflamasyonunu azalttığını ve solunum fonksiyon testi parametrelerini düzelttiğini ancak klinik etkilerin değerlendirilebilmesi için daha uzun süreli fazla sayıda hasta ile yapılmış çalışmalara ihtiyaç olduğu söylenebilir.

6. ABSTRACT

Introduction: Asthma is a disease that has been characterized with airway inflammation and as a result with remodeling of the airway.

Aim: To define the effects of statin treatment on cellular and inflammatory markers responsible in airway inflammation and remodeling of the airway and clinical indices in asthmatic patients.

Method: Asthmatic patients, with a LDL level of ≥ 130 mg/dl (n:25) and LDL of < 130 mg/dl (n:26) with similar distribution of age and sex, followed-up at our institution were included in the study. Pulmonary function tests (PFT), metacholine bronchoprovocation test, eosinophilia ratio in peripheral blood smear, blood total IgE value and IgE specific sub-groups, skin allergy tests, sputum induction, asthma control questionnaire and asthma quality of life questionnaire were evaluated at the baseline. These values were recorded as the 0th day and daily single dose 40 mg Rosuvastatin treatment was administered to patients with a LDL level of ≥ 130 mg/dl for the following 8 weeks in addition to the existing treatment. The remaining 26 patients with a LDL level below 130mg/dl were included in the control group and followed-up for 8 weeks with the existing asthma treatment and no other additional drugs. At the end of 8 weeks, the patients were re-evaluated with the same studies. The supernatant was evaluated for IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-alfa and VEGF levels with ELISA (in the induced sputum specimen). Values gained at the 8th week evaluation were compared with the initial evaluation (0th day) results.

Results: 8 week treatment with Rosuvastatin resulted in improvement of MEF(L/s) (initial: 3.51 ± 0.4 – 8th week: 4.1 ± 0.4 , $p < 0.05$), MEF (% predicted) (initial: 63.6 ± 7.8 – 8th week: 74.6 ± 8.4 , $p < 0.0001$) and FEV₁/FVC(%) (initial: 85.8 ± 11.1 – 8th week: 90.2 ± 8.8 , $p < 0.004$). Additionally, decrease in peripheral eosinophilia ratio (initial: $\%3.7 \pm 1.2$ – 8th week: $\%2.2 \pm 1.1$) ($p < 0.0001$), total IgE (initial: 215.3 ± 334 – 8th week: 182.6 ± 320 , $p < 0.01$), positive specific IgE allergen numbers (initial: 1.1 ± 1.3 – 8th week: 0.8 ± 0.9 , $p < 0.04$), induced sputum TNF-alpha (initial: 0.91 ± 1.1 – 8th week: 0.22 ± 0.7 pg/ml) ($p < 0.0001$), IL-6 (initial: 18.7 ± 23.4 pg/ml – 8th week: 9.9 ± 37.2 pg/ml) ($p < 0.0001$) was observed in the same group of patients. Control group had a significant increase in only the VEGF values (initial: 0 – 8th week: 18.3 ± 63 , $p < 0.04$). The questionnaire results did not change at the end of 8 weeks.

Conclusion: A statistically significant increase of MEF (% expected), MEF (L/sn) and FEV₁/FVC(%) and a decrease in the IL-6, TNF-alpha levels within the sputum supernatant were observed in asthmatic patients been treated with statins. On the other hand, a statistically significant increase in VEGF levels of the sputum supernatant in control group was observed. The results of the current study has shown that statin treatment, while suppressing the level of airway inflammatory markers has also improved the airway function tests; however no effect was observed in symptoms while stabilizing angiogenesis. Clinically significant results may be obtained by conducting long term randomized control studies that include a larger number of patients.

6. KAYNAKLAR

1. *Global Strategy For Asthma Management and Prevention* 2009. 2.
2. Masoli, M., et al., *The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report*. Allergy, 2004. **59**(5): p. 469-78.
3. Turktas, I., Z.T. Selcuk, and A.F. Kalyoncu, *Prevalence of asthma-associated symptoms in Turkish children*. Turk J Pediatr, 2001. **43**(1): p. 1-11.
4. Zhang, S., et al., *Growth factors secreted by bronchial epithelial cells control myofibroblast proliferation: an in vitro co-culture model of airway remodeling in asthma*. Lab Invest, 1999. **79**(4): p. 395-405.
5. Li, X. and J.W. Wilson, *Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(1): p. 229-33.
6. Hashimoto, M., H. Tanaka, and S. Abe, *Quantitative analysis of bronchial wall vascularity in the medium and small airways of patients with asthma and COPD*. Chest, 2005. **127**(3): p. 965-72.
7. Corsini, A., F.M. Maggi, and A.L. Catapano, *Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase*. Pharmacol Res, 1995. **31**(1): p. 9-27.
8. Kwak, B., et al., *Statins as a newly recognized type of immunomodulator*. Nat Med, 2000. **6**(12): p. 1399-402.
9. Simes, R.J., et al., *Relationship between lipid levels and clinical outcomes in the Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID) Trial: to what extent is the reduction in coronary events with pravastatin explained by on-study lipid levels?* Circulation, 2002. **105**(10): p. 1162-9.
10. Berry, M.A., et al., *Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma*. N Engl J Med, 2006. **354**(7): p. 697-708.
11. Hothersall, E.J., et al., *Effects of atorvastatin added to inhaled corticosteroids on lung function and sputum cell counts in atopic asthma*. Thorax, 2008. **63**(12): p. 1070-5.
12. Cowan, D.C., et al., *Simvastatin in the treatment of asthma: lack of steroid-sparing effect*. Thorax, 2010. **65**(10): p. 891-6.
13. Busse, W.W., et al., *Mechanisms of persistent airway inflammation in asthma. A role for T cells and T-cell products*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **152**(1): p. 388-93.
14. Peat, J.K., C.M. Salome, and A.J. Woolcock, *Factors associated with bronchial hyperresponsiveness in Australian adults and children*. Eur Respir J, 1992. **5**(8): p. 921-9.
15. Carlo, T. and B.D. Levy, *Chemical mediators and the resolution of airway inflammation*. Allergol Int, 2008. **57**(4): p. 299-305.
16. Ignacio-Garcia, J.M. and P. Gonzalez-Santos, *Asthma self-management education program by home monitoring of peak expiratory flow*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **151**(2 Pt 1): p. 353-9.
17. Wiesch, D.G., D.A. Meyers, and E.R. Bleeker, *Genetics of asthma*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**(5): p. 895-901.
18. Strachan, D.P., *Hay fever, hygiene, and household size*. BMJ, 1989. **299**(6710): p. 1259-60.

19. Israel, E., et al., *Use of regularly scheduled albuterol treatment in asthma: genotype-stratified, randomised, placebo-controlled cross-over trial*. Lancet, 2004. **364**(9444): p. 1505-12.
20. Ito, K., K.F. Chung, and I.M. Adcock, *Update on glucocorticoid action and resistance*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(3): p. 522-43.
21. Tattersfield, A.E. and I.P. Hall, *Are beta2-adrenoceptor polymorphisms important in asthma--an unravelling story*. Lancet, 2004. **364**(9444): p. 1464-6.
22. Martinez, F.D., et al., *Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates*. N Engl J Med, 1995. **332**(3): p. 133-8.
23. Shore, S.A. and J.J. Fredberg, *Obesity, smooth muscle, and airway hyperresponsiveness*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(5): p. 925-7.
24. Friedman, N.J. and R.S. Zeiger, *The role of breast-feeding in the development of allergies and asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(6): p. 1238-48.
25. Devereux, G. and A. Seaton, *Diet as a risk factor for atopy and asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(6): p. 1109-17; quiz 1118.
26. Busse, W.W., C. Lenfant, and R.F. Lemanske, Jr., *Asthma guidelines: a changing paradigm to improve asthma care*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(5): p. 703-5.
27. Liu, M.C., et al., *Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics. Cellular, mediator, and permeability changes*. Am Rev Respir Dis, 1991. **144**(1): p. 51-8.
28. Riccio, M.M. and D. Proud, *Evidence that enhanced nasal reactivity to bradykinin in patients with symptomatic allergy is mediated by neural reflexes*. J Allergy Clin Immunol, 1996. **97**(6): p. 1252-63.
29. Peebles, R.S., Jr., S. Permutt, and A. Togias, *Rapid reversibility of the allergen-induced pulmonary late-phase reaction by an intravenous beta2-agonist*. J Appl Physiol, 1998. **84**(5): p. 1500-5.
30. Brightling, C.E., et al., *Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma*. N Engl J Med, 2002. **346**(22): p. 1699-705.
31. Nakae, S., et al., *Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(1): p. 48-55.
32. Stewart, A.G., et al., *Tumor necrosis factor alpha modulates mitogenic responses of human cultured airway smooth muscle*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **12**(1): p. 110-9.
33. Howarth, P.H., et al., *Tumour necrosis factor (TNFalpha) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma*. Thorax, 2005. **60**(12): p. 1012-8.
34. Erin, E.M., et al., *The effects of a monoclonal antibody directed against tumor necrosis factor-alpha in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **174**(7): p. 753-62.
35. Nakae, S., et al., *Mast cells enhance T cell activation: Importance of mast cell-derived TNF*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(18): p. 6467-72.
36. Robinson, D.S., *The role of the mast cell in asthma: induction of airway hyperresponsiveness by interaction with smooth muscle?* J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(1): p. 58-65.
37. Bousquet, J., et al., *Eosinophilic inflammation in asthma*. N Engl J Med, 1990. **323**(15): p. 1033-9.
38. Kay, A.B., S. Phipps, and D.S. Robinson, *A role for eosinophils in airway remodelling in asthma*. Trends Immunol, 2004. **25**(9): p. 477-82.

39. Wong, C.K., et al., *Intracellular signaling mechanisms regulating toll-like receptor-mediated activation of eosinophils*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **37**(1): p. 85-96.
40. van Rijt, L.S., et al., *Essential role of dendritic cell CD80/CD86 costimulation in the induction, but not reactivation, of TH2 effector responses in a mouse model of asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(1): p. 166-73.
41. Akbari, O., et al., *CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma*. N Engl J Med, 2006. **354**(11): p. 1117-29.
42. Mikhak, Z., et al., *Contribution of CCR4 and CCR8 to antigen-specific T(H)2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(1): p. 67-73 e3.
43. Xue, L., et al., *Prostaglandin D2 causes preferential induction of proinflammatory Th2 cytokine production through an action on chemoattractant receptor-like molecule expressed on Th2 cells*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6531-6.
44. Gyles, S.L., et al., *A dominant role for chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on T helper type 2 (Th2) cells (CRTH2) in mediating chemotaxis of CRTH2+ CD4+ Th2 lymphocytes in response to mast cell supernatants*. Immunology, 2006. **119**(3): p. 362-8.
45. Borish, L.C., et al., *Interleukin-4 receptor in moderate atopic asthma. A phase I/II randomized, placebo-controlled trial*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(6): p. 1816-23.
46. Borish, L.C., et al., *Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(6): p. 963-70.
47. Kips, J.C., et al., *Effect of SCH55700, a humanized anti-human interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma: a pilot study*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(12): p. 1655-9.
48. Flood-Page, P.T., et al., *Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(2): p. 199-204.
49. M, p.-G., *The Alveolar macrophage, The forgotten cell in asthma*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **31**(1): p. 3-7.
50. Wenzel, S., *Mechanisms of severe asthma*. Clin Exp Allergy, 2003. **33**(12): p. 1622-8.
51. Lukacs, N.W., A.L. Miller, and C.M. Hogaboam, *Chemokine receptors in asthma: searching for the correct immune targets*. J Immunol, 2003. **171**(1): p. 11-5.
52. Leff, A.R., *Regulation of leukotrienes in the management of asthma: biology and clinical therapy*. Annu Rev Med, 2001. **52**: p. 1-14.
53. Smith, A.D., et al., *Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma*. N Engl J Med, 2005. **352**(21): p. 2163-73.
54. Meiler, F., et al., *T-cell subsets in the pathogenesis of human asthma*. Curr Allergy Asthma Rep, 2006. **6**(2): p. 91-6.
55. Lukacs, N.W., et al., *TNF-alpha mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation*. J Immunol, 1995. **154**(10): p. 5411-7.
56. Slungaard, A., et al., *Tumor necrosis factor alpha/cachectin stimulates eosinophil oxidant production and toxicity towards human endothelium*. J Exp Med, 1990. **171**(6): p. 2025-41.

57. Lassalle, P., et al., *Modulation of adhesion molecule expression on endothelial cells during the late asthmatic reaction: role of macrophage-derived tumour necrosis factor-alpha*. Clin Exp Immunol, 1993. **94**(1): p. 105-10.
58. Pennings, H.J., et al., *Tumour necrosis factor-alpha induces hyperreactivity in tracheal smooth muscle of the guinea-pig in vitro*. Eur Respir J, 1998. **12**(1): p. 45-9.
59. Kobayashi, T., et al., *Elevation of serum soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and sE-selectin levels in bronchial asthma*. Clin Exp Immunol, 1994. **96**(1): p. 110-5.
60. Ricciardolo, F.L., et al., *Nitric oxide in health and disease of the respiratory system*. Physiol Rev, 2004. **84**(3): p. 731-65.
61. Redington, A.E. and P.H. Howarth, *Airway wall remodelling in asthma*. Thorax, 1997. **52**(4): p. 310-2.
62. James, A.L., et al., *The relationship of reticular basement membrane thickness to airway wall remodeling in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(12 Pt 1): p. 1590-5.
63. Naylor, B., *The shedding of the mucosa of the bronchial tree in asthma*. Thorax, 1962. **17**: p. 69-72.
64. Roche, W.R., et al., *Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics*. Lancet, 1989. **1**(8637): p. 520-4.
65. Elias, J.A., et al., *Airway remodeling in asthma*. J Clin Invest, 1999. **104**(8): p. 1001-6.
66. Carroll, N., et al., *The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma*. Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(2): p. 405-10.
67. Aikawa, T., et al., *Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack*. Chest, 1992. **101**(4): p. 916-21.
68. Haraguchi, M., S. Shimura, and K. Shirato, *Morphometric analysis of bronchial cartilage in chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(3): p. 1005-13.
69. Tanaka, H., et al., *Increased airway vascularity in newly diagnosed asthma using a high-magnification bronchovideoscope*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(12): p. 1495-9.
70. Mekori, Y.A., et al., *Characterization of a mast cell line that lacks the extracellular domain of membrane c-kit*. Immunology, 1997. **90**(4): p. 518-25.
71. Kroegel, C., et al., *Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I)*. Eur Respir J, 1994. **7**(3): p. 519-43.
72. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
73. Boulet, L.P., et al., *Bronchial subepithelial fibrosis correlates with airway responsiveness to methacholine*. Chest, 1997. **112**(1): p. 45-52.
74. Laitinen, L.A., et al., *Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma*. Am Rev Respir Dis, 1985. **131**(4): p. 599-606.
75. Ordonez, C., et al., *Epithelial desquamation in asthma: artifact or pathology?* Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(6): p. 2324-9.
76. Holgate, S.T., et al., *Bronchial epithelium as a key regulator of airway allergen sensitization and remodeling in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(3 Pt 2): p. S113-7.

77. Holgate, S.T., et al., *Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(2 Pt 1): p. 193-204.
78. Zhang, M., et al., *TGF-beta1 induces human bronchial epithelial cell-to-mesenchymal transition in vitro*. Lung, 2009. **187**(3): p. 187-94.
79. Chakir, J., et al., *Lower airways remodeling in nonasthmatic subjects with allergic rhinitis*. Lab Invest, 1996. **75**(5): p. 735-44.
80. Payne, D.N., et al., *Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(1): p. 78-82.
81. Huang, J., et al., *Enhanced proteoglycan deposition in the airway wall of atopic asthmatics*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(2): p. 725-9.
82. Laitinen, A., et al., *Tenascin is increased in airway basement membrane of asthmatics and decreased by an inhaled steroid*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(3 Pt 1): p. 951-8.
83. Wilson, J.W. and X. Li, *The measurement of reticular basement membrane and submucosal collagen in the asthmatic airway*. Clin Exp Allergy, 1997. **27**(4): p. 363-71.
84. Minshall, E., et al., *IL-11 expression is increased in severe asthma: association with epithelial cells and eosinophils*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(2 Pt 1): p. 232-8.
85. Chetta, A., et al., *Airways remodeling is a distinctive feature of asthma and is related to severity of disease*. Chest, 1997. **111**(4): p. 852-7.
86. Chu, H.W., et al., *Collagen deposition in large airways may not differentiate severe asthma from milder forms of the disease*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(6): p. 1936-44.
87. Little, S.A., et al., *High resolution computed tomographic assessment of airway wall thickness in chronic asthma: reproducibility and relationship with lung function and severity*. Thorax, 2002. **57**(3): p. 247-53.
88. Lemjabbar, H., et al., *Contribution of 92 kDa gelatinase/type IV collagenase in bronchial inflammation during status asthmaticus*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(4 Pt 1): p. 1298-307.
89. Sepper, R., et al., *Collagenase-2 and -3 are inhibited by doxycycline in the chronically inflamed lung in bronchiectasis*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **878**: p. 683-5.
90. Vignola, A.M., et al., *Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(6): p. 1945-50.
91. Panettieri, R.A., Jr., *Airway smooth muscle: an immunomodulatory cell*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(6 Suppl): p. S269-74.
92. Hakonarson, H., et al., *Regulation of TH1- and TH2-type cytokine expression and action in atopic asthmatic sensitized airway smooth muscle*. J Clin Invest, 1999. **103**(7): p. 1077-87.
93. Lambert, R.K., et al., *Functional significance of increased airway smooth muscle in asthma and COPD*. J Appl Physiol, 1993. **74**(6): p. 2771-81.
94. Oliver, M.N., et al., *Airway hyperresponsiveness, remodeling, and smooth muscle mass: right answer, wrong reason?* Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **37**(3): p. 264-72.
95. Burgess, J.K., et al., *Expression of connective tissue growth factor in asthmatic airway smooth muscle cells*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(1): p. 71-7.
96. Chan, V., et al., *Extracellular matrix regulates enhanced eotaxin expression in asthmatic airway smooth muscle cells*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **174**(4): p. 379-85.

97. Simcock, D.E., et al., *Induction of angiogenesis by airway smooth muscle from patients with asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **178**(5): p. 460-8.
98. Belmonte, K.E., *Cholinergic pathways in the lungs and anticholinergic therapy for chronic obstructive pulmonary disease*. Proc Am Thorac Soc, 2005. **2**(4): p. 297-304; discussion 311-2.
99. Racke, K., U.R. Juergens, and S. Matthiesen, *Control by cholinergic mechanisms*. Eur J Pharmacol, 2006. **533**(1-3): p. 57-68.
100. Gosens, R., et al., *Protective effects of tiotropium bromide in the progression of airway smooth muscle remodeling*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **171**(10): p. 1096-102.
101. Dunnill, M.S., *The pathology of asthma, with special reference to changes in the bronchial mucosa*. J Clin Pathol, 1960. **13**: p. 27-33.
102. Chetta, A., et al., *Vascular remodelling and angiogenesis in asthma: morphological aspects and pharmacological modulation*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2007. **6**(1): p. 41-5.
103. Barbato, A., et al., *Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **174**(9): p. 975-81.
104. Tudor, R.M. and J.H. Yun, *Vascular endothelial growth factor of the lung: friend or foe*. Curr Opin Pharmacol, 2008. **8**(3): p. 255-60.
105. Feltis, B.N., et al., *Increased vascular endothelial growth factor and receptors: relationship to angiogenesis in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **173**(11): p. 1201-7.
106. Asai, K., et al., *Imbalance between vascular endothelial growth factor and endostatin levels in induced sputum from asthmatic subjects*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(4): p. 571-5.
107. Hoshino, M., M. Takahashi, and N. Aoike, *Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(2): p. 295-301.
108. Simcock, D.E., et al., *Proangiogenic activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(2): p. 146-53.
109. Puxeddu, I., et al., *The soluble form of a disintegrin and metalloprotease 33 promotes angiogenesis: implications for airway remodeling in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(6): p. 1400-6, 1406 e1-4.
110. Detoraki, A., et al., *Vascular endothelial growth factors synthesized by human lung mast cells exert angiogenic effects*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(5): p. 1142-9, 1149 e1-5.
111. Noble, P.B., D.J. Turner, and H.W. Mitchell, *Relationship of airway narrowing, compliance, and cartilage in isolated bronchial segments*. J Appl Physiol, 2002. **92**(3): p. 1119-24.
112. Levy, M., et al., *The efficacy of asthma case management in an urban school district in reducing school absences and hospitalizations for asthma*. J Sch Health, 2006. **76**(6): p. 320-4.
113. Gibson, P.G., M. Fujimura, and A. Niimi, *Eosinophilic bronchitis: clinical manifestations and implications for treatment*. Thorax, 2002. **57**(2): p. 178-82.

114. Tan, W.C., C.H. Tan, and P.C. Teoh, *The role of climatic conditions and histamine release in exercise-induced bronchoconstriction*. Ann Acad Med Singapore, 1985. **14**(3): p. 465-9.
115. Taylor, D.R., et al., *A new perspective on concepts of asthma severity and control*. Eur Respir J, 2008. **32**(3): p. 545-54.
116. Cockcroft, D.W. and V.A. Swystun, *Asthma control versus asthma severity*. J Allergy Clin Immunol, 1996. **98**(6 Pt 1): p. 1016-8.
117. Killian, K.J., et al., *Symptom perception during acute bronchoconstriction*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(2 Pt 1): p. 490-6.
118. Pavord, I.D., et al., *Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma*. Lancet, 1999. **353**(9171): p. 2213-4.
119. Cockcroft, D.W., et al., *Sensitivity and specificity of histamine PC20 determination in a random selection of young college students*. J Allergy Clin Immunol, 1992. **89**(1 Pt 1): p. 23-30.
120. Pizzichini, M.M., et al., *Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(4 Pt 1): p. 866-9.
121. Hoepfner, V.H., et al., *Severe acute "occupational asthma" caused by accidental allergen exposure in an allergen challenge laboratory*. Ann Allergy, 1985. **55**(1): p. 36-7.
122. Wilson, N., *Measurement of airway inflammation in asthma*. Curr Opin Pulm Med, 2002. **8**(1): p. 25-32.
123. Kips, J.C., *[The relation between morphologic and functional airway changes in bronchial asthma]*. Verh K Acad Geneesk Belg, 2003. **65**(4): p. 247-65; discussion 265-9.
124. Bousquet, J., et al., *Nasal challenge with pollen grains, skin-prick tests and specific IgE in patients with grass pollen allergy*. Clin Allergy, 1987. **17**(6): p. 529-36.
125. Pizzichini, E., et al., *Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared*. Eur Respir J, 1998. **11**(4): p. 828-34.
126. Moodley, Y.P., et al., *Correlation of CD4:CD8 ratio and tumour necrosis factor (TNF)alpha levels in induced sputum with bronchoalveolar lavage fluid in pulmonary sarcoidosis*. Thorax, 2000. **55**(8): p. 696-9.
127. Silva, R.M., M.L. Bazzo, and A.A. Borges, *Induced sputum versus bronchoalveolar lavage in the diagnosis of pneumocystis jiroveci pneumonia in human immunodeficiency virus-positive patients*. Braz J Infect Dis, 2007. **11**(6): p. 549-53.
128. Bickerman, H.A., E.E. Sproul, and A.L. Barach, *An aerosol method of producing bronchial secretions in human subjects: a clinical technic for the detection of lung cancer*. Dis Chest, 1958. **33**(4): p. 347-62.
129. Berlin, N.I., et al., *The National Cancer Institute Cooperative Early Lung Cancer Detection Program. Results of the initial screen (prevalence). Early lung cancer detection: Introduction*. Am Rev Respir Dis, 1984. **130**(4): p. 545-9.
130. Hargreave, F.E., *Induced sputum and response to glucocorticoids*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **102**(5): p. S102-5.
131. Kips, J.C., et al., *Methods for sputum induction and analysis of induced sputum: a method for assessing airway inflammation in asthma*. Eur Respir J Suppl, 1998. **26**: p. 9S-12S.

132. Hargreave, F.E., E. Pizzichini, and M. Pizzichini, *Induced sputum examination*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **101**(4 Pt 1): p. 569-70.
133. Shoji, S., et al., *Clinical implication of protein levels of IL-5 in induced sputum in asthmatic patients*. J Asthma, 1998. **35**(3): p. 243-9.
134. Murrell, G.A., D. Jang, and R.J. Williams, *Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **206**(1): p. 15-21.
135. Rabe, K.F., et al., *Clinical management of asthma in 1999: the Asthma Insights and Reality in Europe (AIRE) study*. Eur Respir J, 2000. **16**(5): p. 802-7.
136. Sekerel, B.E., B. Gemicioglu, and J.B. Soriano, *Asthma insights and reality in Turkey (AIRET) study*. Respir Med, 2006. **100**(10): p. 1850-4.
137. Bellamy, D. and T. Harris, *Poor perceptions and expectations of asthma control: results of the International Control of Asthma Symptoms (ICAS) survey of patients and general practitioners*. Prim Care Respir J, 2005. **14**(5): p. 252-8.
138. Juniper, E.F., et al., *Measuring quality of life in asthma*. Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(4): p. 832-8.
139. Marks, G.B., S.M. Dunn, and A.J. Woolcock, *A scale for the measurement of quality of life in adults with asthma*. J Clin Epidemiol, 1992. **45**(5): p. 461-72.
140. Hyland, M.E., S. Finnis, and S.H. Irvine, *A scale for assessing quality of life in adult asthma sufferers*. J Psychosom Res, 1991. **35**(1): p. 99-110.
141. Kraft, M., et al., *The effect of salmeterol on nocturnal symptoms, airway function, and inflammation in asthma*. Chest, 1997. **111**(5): p. 1249-54.
142. Pinnock, H., A. Sheikh, and E.F. Juniper, *Evaluation of an intervention to improve successful completion of the Mini-AQLQ: comparison of postal and supervised completion*. Prim Care Respir J, 2004. **13**(1): p. 36-41.
143. Boulet, L.P., et al., *Evaluation of asthma control by physicians and patients: comparison with current guidelines*. Can Respir J, 2002. **9**(6): p. 417-23.
144. Juniper, E.F., et al., *Measuring asthma control. Clinic questionnaire or daily diary?* Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(4 Pt 1): p. 1330-4.
145. Istvan, E.S. and J. Deisenhofer, *Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase*. Science, 2001. **292**(5519): p. 1160-4.
146. Aoki, T., et al., *Pharmacological profile of a novel synthetic inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase*. Arzneimittelforschung, 1997. **47**(8): p. 904-9.
147. Zhang, F.L. and P.J. Casey, *Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences*. Annu Rev Biochem, 1996. **65**: p. 241-69.
148. Mundy, G., et al., *Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins*. Science, 1999. **286**(5446): p. 1946-9.
149. Simes, J., et al., *Effects of pravastatin on mortality in patients with and without coronary heart disease across a broad range of cholesterol levels. The Prospective Pravastatin Pooling project*. Eur Heart J, 2002. **23**(3): p. 207-15.
150. Illingworth, D.R. and J.A. Tobert, *HMG-CoA reductase inhibitors*. Adv Protein Chem, 2001. **56**: p. 77-114.
151. Hall, A., *G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch*. Science, 1998. **280**(5372): p. 2074-5.
152. Takemoto, M., et al., *Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase*. Circulation, 2002. **106**(1): p. 57-62.

153. Brown, J.H., D.P. Del Re, and M.A. Sussman, *The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits*. Circ Res, 2006. **98**(6): p. 730-42.
154. Takemoto, M., et al., *Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy*. J Clin Invest, 2001. **108**(10): p. 1429-37.
155. Wassmann, S., et al., *Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac1 GTPase*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(3): p. 646-54.
156. Corti, R., et al., *The selective peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma agonist has an additive effect on plaque regression in combination with simvastatin in experimental atherosclerosis: in vivo study by high-resolution magnetic resonance imaging*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(3): p. 464-73.
157. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. **76**(2): p. 301-14.
158. Pasceri, V., J.T. Willerson, and E.T. Yeh, *Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells*. Circulation, 2000. **102**(18): p. 2165-8.
159. Diomedede, L., et al., *In vivo anti-inflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(8): p. 1327-32.
160. Kimura, M., et al., *Effects of fluvastatin on leukocyte-endothelial cell adhesion in hypercholesterolemic rats*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(8): p. 1521-6.
161. Stalker, T.J., A.M. Lefer, and R. Scalia, *A new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, exerts anti-inflammatory effects on the microvascular endothelium: the role of mevalonic acid*. Br J Pharmacol, 2001. **133**(3): p. 406-12.
162. Sparrow, C.P., et al., *Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(1): p. 115-21.
163. Maggard, M.A., et al., *Effects of pravastatin on chronic rejection of rat cardiac allografts*. Transplantation, 1998. **65**(2): p. 149-55.
164. Stanislaus, R., A.K. Singh, and I. Singh, *Lovastatin treatment decreases mononuclear cell infiltration into the CNS of Lewis rats with experimental allergic encephalomyelitis*. J Neurosci Res, 2001. **66**(2): p. 155-62.
165. Romano, M., et al., *Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins*. Lab Invest, 2000. **80**(7): p. 1095-100.
166. Yoshida, M., et al., *Hmg-CoA reductase inhibitor modulates monocyte-endothelial cell interaction under physiological flow conditions in vitro: involvement of Rho GTPase-dependent mechanism*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(7): p. 1165-71.
167. Niwa, S., T. Totsuka, and S. Hayashi, *Inhibitory effect of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on the expression of adhesion molecules on human monocyte cell line*. Int J Immunopharmacol, 1996. **18**(11): p. 669-75.
168. Liu, L., et al., *Integrin-dependent leukocyte adhesion involves geranylgeranylated protein(s)*. J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33334-40.
169. Inoue, I., et al., *Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of mRNA levels for interleukin-1beta, interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in primary endothelial cells*. Life Sci, 2000. **67**(8): p. 863-76.
170. Ikeda, U. and K. Shimada, *Statins and monocytes*. Lancet, 1999. **353**(9169): p. 2070.

171. Grip, O., S. Janciauskiene, and S. Lindgren, *Atorvastatin activates PPAR-gamma and attenuates the inflammatory response in human monocytes*. *Inflamm Res*, 2002. **51**(2): p. 58-62.
172. Zelvyte, I., et al., *Modulation of inflammatory mediators and PPARgamma and NFkappaB expression by pravastatin in response to lipoproteins in human monocytes in vitro*. *Pharmacol Res*, 2002. **45**(2): p. 147-54.
173. Takeuchi, S., et al., *Cerivastatin suppresses lipopolysaccharide-induced ICAM-1 expression through inhibition of Rho GTPase in BAEC*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **269**(1): p. 97-102.
174. Laufs, U., et al., *Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors*. *Circulation*, 1998. **97**(12): p. 1129-35.
175. Laufs, U. and J.K. Liao, *Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(37): p. 24266-71.
176. Ortego, M., et al., *Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells*. *Atherosclerosis*, 1999. **147**(2): p. 253-61.
177. Cammarano, M.S. and A. Minden, *Dbl and the Rho GTPases activate NF kappa B by I kappa B kinase (IKK)-dependent and IKK-independent pathways*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(28): p. 25876-82.
178. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. *Oncogene*, 1999. **18**(49): p. 6853-66.
179. Liu, S., et al., *Inhibition of rho-associated kinase signaling prevents breast cancer metastasis to human bone*. *Cancer Res*, 2009. **69**(22): p. 8742-51.
180. Landmesser, U., et al., *Simvastatin versus ezetimibe: pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans*. *Circulation*, 2005. **111**(18): p. 2356-63.
181. Plenz, G.A., O. Hofnagel, and H. Robenek, *Differential modulation of caveolin-1 expression in cells of the vasculature by statins*. *Circulation*, 2004. **109**(2): p. e7-8; author reply e7-8.
182. Chen, Z., et al., *Simvastatin reduces neointimal thickening in low-density lipoprotein receptor-deficient mice after experimental angioplasty without changing plasma lipids*. *Circulation*, 2002. **106**(1): p. 20-3.
183. Libby, P., *Molecular bases of the acute coronary syndromes*. *Circulation*, 1995. **91**(11): p. 2844-50.
184. Glynn, R.J., et al., *A randomized trial of rosuvastatin in the prevention of venous thromboembolism*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(18): p. 1851-61.
185. Wu, X., et al., *Statins decrease the aberrant HLA-DR expression on thyrocytes from patients with Hashimoto's thyroiditis*. *Horm Metab Res*, 2008. **40**(12): p. 838-41.
186. Ridker, P.M., et al., *Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men*. *N Engl J Med*, 1997. **336**(14): p. 973-9.
187. Willerson, J.T. and P.M. Ridker, *Inflammation as a cardiovascular risk factor*. *Circulation*, 2004. **109**(21 Suppl 1): p. II2-10.
188. Albert, M.A., et al., *Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study*. *JAMA*, 2001. **286**(1): p. 64-70.
189. Shyu, K.G., et al., *Mechanism of inhibitory effect of atorvastatin on resistin expression induced by tumor necrosis factor-alpha in macrophages*. *J Biomed Sci*, 2009. **16**: p. 50.

190. Carnon, A.G., et al., *Relation between socioeconomic deprivation and pathological prognostic factors in women with breast cancer*. BMJ, 1994. **309**(6961): p. 1054-7.
191. Downs, J.R., et al., *Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study*. JAMA, 1998. **279**(20): p. 1615-22.
192. Vaughan, C.J., M.B. Murphy, and B.M. Buckley, *Statins do more than just lower cholesterol*. Lancet, 1996. **348**(9034): p. 1079-82.
193. Buchwald, H., et al., *Effective lipid modification by partial ileal bypass reduced long-term coronary heart disease mortality and morbidity: five-year posttrial follow-up report from the POSCH. Program on the Surgical Control of the Hyperlipidemias*. Arch Intern Med, 1998. **158**(11): p. 1253-61.
194. Meijer, P., et al., *Rosuvastatin increases extracellular adenosine formation in humans in vivo: a new perspective on cardiovascular protection*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(6): p. 963-8.
195. Banach, M., et al., *Statins in the prevention of postoperative atrial fibrillation: is there really no effect?* Am Heart J, 2008. **155**(6): p. e53; author reply e55-6.
196. Aydin, U., et al., *Effects of atorvastatin on vascular intimal hyperplasia: an experimental rodent model*. Angiology, 2009. **60**(3): p. 370-7.
197. Messerli, F.H., et al., *Impact of systemic hypertension on the cardiovascular benefits of statin therapy--a meta-analysis*. Am J Cardiol, 2008. **101**(3): p. 319-25.
198. Safar, M.E., A.D. Protogerou, and J. Blacher, *Statins, central blood pressure, and blood pressure amplification*. Circulation, 2009. **119**(1): p. 9-12.
199. Mancia, G., et al., *Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document*. Blood Press, 2009. **18**(6): p. 308-47.
200. Krane, V., et al., *Effect of atorvastatin on inflammation and outcome in patients with type 2 diabetes mellitus on hemodialysis*. Kidney Int, 2008. **74**(11): p. 1461-7.
201. Athyros, V.G., et al., *The effect of statins versus untreated dyslipidaemia on renal function in patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the Greek atorvastatin and coronary heart disease evaluation (GREACE) study*. J Clin Pathol, 2004. **57**(7): p. 728-34.
202. Campese, V.M., M.K. Nadim, and M. Epstein, *Are 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors renoprotective?* J Am Soc Nephrol, 2005. **16 Suppl 1**: p. S11-7.
203. Douglas, K., P.G. O'Malley, and J.L. Jackson, *Meta-analysis: the effect of statins on albuminuria*. Ann Intern Med, 2006. **145**(2): p. 117-24.
204. Bianchi, S., et al., *A controlled, prospective study of the effects of atorvastatin on proteinuria and progression of kidney disease*. Am J Kidney Dis, 2003. **41**(3): p. 565-70.
205. Seliger, S.L., et al., *HMG-CoA reductase inhibitors are associated with reduced mortality in ESRD patients*. Kidney Int, 2002. **61**(1): p. 297-304.
206. Hariparshad, S.P., N.D. Madala, and A.G. Assounga, *Statin therapy ameliorates renal allograft function*. Transplant Proc, 2009. **41**(10): p. 4178-80.
207. Kanbay, M., et al., *Statin treatment for dyslipidemia in chronic kidney disease and renal transplantation: a review of the evidence*. J Nephrol, 2009. **22**(5): p. 598-609.

208. Endres, M., et al., *Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8880-5.
209. Stanislaus, R., et al., *Amelioration of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats by lovastatin*. Neurosci Lett, 1999. **269**(2): p. 71-4.
210. Youssef, S., et al., *The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease*. Nature, 2002. **420**(6911): p. 78-84.
211. Bosel, J. and H. Amiri, *The utility of cardiovascular drugs in the treatment of cerebrovascular disease*. Curr Opin Investig Drugs, 2010. **11**(9): p. 1015-24.
212. Guluma, K.Z. and P.A. Lapchak, *Comparison of the post-embolization effects of tissue-plasminogen activator and simvastatin on neurological outcome in a clinically relevant rat model of acute ischemic stroke*. Brain Res, 2010. **1354**: p. 206-16.
213. Kennedy, J., et al., *Fast assessment of stroke and transient ischaemic attack to prevent early recurrence (FASTER): a randomised controlled pilot trial*. Lancet Neurol, 2007. **6**(11): p. 961-9.
214. Kobashigawa, J.A., et al., *Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation*. N Engl J Med, 1995. **333**(10): p. 621-7.
215. Wenke, K., et al., *Simvastatin reduces graft vessel disease and mortality after heart transplantation: a four-year randomized trial*. Circulation, 1997. **96**(5): p. 1398-402.
216. Aliabadi, A.Z., et al., *Safety and efficacy of statin therapy in patients switched from cyclosporine a to sirolimus after cardiac transplantation*. Transplantation, 2008. **86**(12): p. 1771-6.
217. Sin, D.D. and S.F. Man, *Why are patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of cardiovascular diseases? The potential role of systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease*. Circulation, 2003. **107**(11): p. 1514-9.
218. Barnes, P.J., S.D. Shapiro, and R.A. Pauwels, *Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms*. Eur Respir J, 2003. **22**(4): p. 672-88.
219. Lee, J.H., et al., *Simvastatin inhibits cigarette smoking-induced emphysema and pulmonary hypertension in rat lungs*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(8): p. 987-93.
220. Palinski, W., *New evidence for beneficial effects of statins unrelated to lipid lowering*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(1): p. 3-5.
221. Bonetti, P.O., et al., *Statin effects beyond lipid lowering--are they clinically relevant?* Eur Heart J, 2003. **24**(3): p. 225-48.
222. Davignon, J. and L.A. Leiter, *Ongoing clinical trials of the pleiotropic effects of statins*. Vasc Health Risk Manag, 2005. **1**(1): p. 29-40.
223. Teramoto, S. and S. Akashi, *[Chronic respiratory diseases and atherosclerosis]*. Nippon Rinsho, 2011. **69**(1): p. 158-62.
224. Young, R.P., R. Hopkins, and T.E. Eaton, *Pharmacological actions of statins: potential utility in COPD*. Eur Respir Rev, 2009. **18**(114): p. 222-32.
225. Mortensen, E.M., et al., *The effect of prior statin use on 30-day mortality for patients hospitalized with community-acquired pneumonia*. Respir Res, 2005. **6**: p. 82.
226. Ridker, P.M., et al., *Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men*. Circulation, 2000. **101**(15): p. 1767-72.

227. Jick, S.S., et al., *Hyperlipidaemia, statin use and the risk of developing rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(4): p. 546-51.
228. Paraskevas, K.I., *Statin treatment for rheumatoid arthritis: a promising novel indication*. Clin Rheumatol, 2008. **27**(3): p. 281-7.
229. Shimazu, H., et al., *Effect of combining ACE inhibitor and statin in lupus-prone mice*. Clin Immunol, 2010. **136**(2): p. 188-96.
230. Bielinska, A. and P. Gluszko, *[Statins--are they potentially useful in rheumatology?]*. Pol Arch Med Wewn, 2007. **117**(9): p. 420-5.
231. Malcom, G.T., et al., *Associations of arterial tissue lipids with coronary heart disease risk factors in young people*. Atherosclerosis, 2009. **203**(2): p. 515-21.
232. Gurpinar, T., et al., *Statin treatment reduces oxidative stress-associated apoptosis of sciatic nerve in diabetes mellitus*. Biotech Histochem, 2010.
233. Chew, E.Y., et al., *Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2010. **363**(3): p. 233-44.
234. Chai, H., et al., *Standardization of bronchial inhalation challenge procedures*. J Allergy Clin Immunol, 1975. **56**(4): p. 323-7.
235. Dreborg, S., *The skin prick test in the diagnosis of atopic allergy*. J Am Acad Dermatol, 1989. **21**(4 Pt 2): p. 820-1.
236. Juniper, E.F., et al., *Development and validation of the Mini Asthma Quality of Life Questionnaire*. Eur Respir J, 1999. **14**(1): p. 32-8.
237. Juniper, E.F., et al., *Development and validation of a questionnaire to measure asthma control*. Eur Respir J, 1999. **14**(4): p. 902-7.
238. Efthimiadis, A., et al., *Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation*. Eur Respir J Suppl, 2002. **37**: p. 19s-23s.
239. Menzies, D., et al., *Simvastatin does not exhibit therapeutic anti-inflammatory effects in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(2): p. 328-35.
240. Camara, J. and G. Jarai, *Epithelial-mesenchymal transition in primary human bronchial epithelial cells is Smad-dependent and enhanced by fibronectin and TNF-alpha*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2010. **3**(1): p. 2.
241. Awad, A.S. and A.E. Sharif, *Immunomodulatory effects of rosvastatin on hepatic ischemia/reperfusion induced injury*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2010. **32**(4): p. 555-61.
242. Koumoundouros, E., et al., *Chronic airway disease: deteriorating pulmonary function in sheep associated with repeated challenges of house dust mite*. Exp Lung Res, 2006. **32**(7): p. 321-30.
243. Sziksz, E., et al., *Increased synthesis of vascular endothelial growth factor in allergic airway inflammation in histidine decarboxylase knockout (HDC(-/-)) mice*. Exp Lung Res, 2010. **36**(7): p. 420-30.
244. Puxeddu, I., et al., *Human peripheral blood eosinophils induce angiogenesis*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(3): p. 628-36.
245. Fadini, G.P., et al., *Rosuvastatin stimulates clonogenic potential and anti-inflammatory properties of endothelial progenitor cells*. Cell Biol Int, 2010. **34**(7): p. 709-15.
246. Schaafsma, D., et al., *The Mevalonate Cascade as a Target to Suppress Extracellular Matrix Synthesis by Human Airway Smooth Muscle*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010.
247. Wright, J.L., et al., *Statin Reverses Smoke-induced Pulmonary Hypertension and Prevents Emphysema but not Airway Remodeling*. Am J Respir Crit Care Med, 2010.

- 248. Deanin, G.G., et al., *Role of isoprenoid metabolism in IgE receptor-mediated signal transduction*. J Immunol, 1991. **146**(10): p. 3528-35.
- 249. Roche, C.M., E.R. Trimble, and M. Ennis, *Effect of in vivo and in vitro lovastatin treatment on mast cell activation*. Int Arch Allergy Immunol, 1995. **108**(3): p. 240-6.
- 250. Shakarjian, M.P., et al., *3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition in a rat mast cell line. Impairment of tyrosine kinase-dependent signal transduction and the subsequent degranulation response*. J Biol Chem, 1993. **268**(20): p. 15252-9.
- 251. Kim, D.Y., et al., *Anti-inflammatory mechanism of simvastatin in mouse allergic asthma model*. Eur J Pharmacol, 2007. **557**(1): p. 76-86.
- 252. Krauth, M.T., et al., *Effects of various statins on cytokine-dependent growth and IgE-dependent release of histamine in human mast cells*. Allergy, 2006. **61**(3): p. 281-8.
- 253. Rubin, B.K., *Statins for the treatment of asthma: a discovery well, dry hole or just snake oil*. Thorax, 2009. **64**(1): p. 4-5.
- 254. Fessler, M.B., et al., *Relationship of serum cholesterol levels to atopy in the US population*. Allergy, 2010. **65**(7): p. 859-64.

7. EKLER

Apendiks

7.1. Periferik Yayma

1. İki adet lam, alkol ve lanset kullanılır
2. Parmak alkol ile temizlendikten sonra lanset yardımı ile delinir
3. Lamlardan birinin üzerine bir damla kan damlatılır
4. İkinci lam 30 derece açı ile tutularak damlanın olduğu taraftan diğer tarafa doğru hızla çekilerek mum alevi şeklinde yayılır
5. Oda sıcaklığında kurutulur
6. Kurutulan lamaların üzerine taşmayacak biçimde Wright boyası eklenir 7 dakika beklenir
7. Ardından boya akıtılmadan distile su lamdan taşmayacak biçimde eklenir 7 dakika daha beklenir
8. Lamalar musluk suyu altında bol su ile yıkanır ve oda sıcaklığında kurutulur

7.2. Prick Test

Hastaların kullanmakta olduğu antihistaminik varsa tercihen işlemden 48 saat önce kesilmesi uygundur.

1. Ön kol iç yüzeyi ıslak temiz bez ile temizlenip kurulandır
2. Kullanılacak allerjenlerin damlatılacağı alanlar pozitif ve negatif kontrolde dahil olmak üzere numaralandırılır

3. Sırası ile antijenler ön kol iç yüzünde bir damla damlatılır.
4. Lanset veya kite ait özel plastik çubuklar yardımı ile allerjenin damlatıldığı noktada cilde kanatmayacak biçimde batırılır
5. Her antijen sonrasında kullanılan çubuk veya lanset pamuk ile temizlenir antijenlerin karışmamasına özen gösterilir.
6. 15 dakika beklenir.
7. Bencard evreleme sistemine göre eritem ve endürasyon ölçülür.
8. > 3mm üzerindekiiler pozitif olarak kabul edilir.

7.3. ACQ ve AQLQ Anketlerinin doldurulması

ACQ hasta ve hekimin beraber , AQLQ ise hastanın kendi kendine yanıtladığı standardize edilmiş anket formlarıdır

ACQ toplam yedi sorudan oluşmaktadır. Gündüz ve gece semptomları aktivite kısıtlanması, beta agonist kullanımı ilk altı soruyu oluşturur, 0 puan tam kontrollü semptomu, 6 puan ise tam kontrolsüz semptomu ifade eder. Yedinci soru FEV₁ değerine göre puanlanmaktadır FEV₁ beklenenin > %95 ise 0 puan <%95 ise 6 puan verilir. Skor toplanır ve soru sayısı olan yediye bölünür. Elde edilen puan testin skorlaması gibi değerlendirir. Testin tamamlanma süresi ortalama 10 dakikadır.

7.3.1. ACQ

Lütfen 1 den 6 ya kadar soruları cevaplandırınız.

Geçtiğimiz 7 gün boyunca nasıl olduğunuzu en iyi anlatan cevabın numarasını daire içine alınız.

1. Geçtiğimiz 7 gün boyunca, gece süresince ortalama olarak kaç defa astımınız tarafından uyandırıldınız?

0 Hiç

1 Hemen hemen hiç

2 Bir - iki kez

3 Bir kaç kez

4 Çok kez

5 Pek çok kez

6 Astım yüzünden hiç uyuyamadım

2. Geçtiğimiz 7 gün boyunca, sabahlari uyandığınızda, astım belirtileriniz ortalama olarak, ne kadar ciddiydi?

0 Belirti yok

1 Çok hafif belirtiler

2 Hafif belirtiler

3 Orta düzeyde belirtiler

4 Oldukça ciddi belirtiler

5 Ciddi belirtiler

6 Çok ciddi belirtiler

3. Genel olarak, geçtiğimiz 7 gün boyunca, astımınız yüzünden günlük faaliyetleriniz ne kadar kısıtlandı?

0 Hiç

1 Çok hafif

2 Hafifçe

3 Orta derecede

4 Aşırı derecede

5 Çok fazla

6 Tamamen

4. Genel olarak, geçtiğimiz 7 gün boyunca, astımınız yüzünden ne kadar nefes darlığı yaşadınız?

0 Hiç

1 Çok az

2 Az

3 Orta düzeyde

4 Oldukça

5 Büyük ölçüde

6 Çok büyük ölçüde

5. Genel olarak, geçtiğimiz 7 gün boyunca, ne kadar süre ile hırıltılı soludunuz?

0 Hiç

1 Hemen hemen hiç

2 Kısa bir zaman

3 Orta uzunlukta zaman

4 Zamanın çoğunda

5 Zamanın büyük kısmında

6 Sürekli

6. Geçtiğimiz 7 gün boyunca, her gün ortalama kaç puf nefes açıcı fisfis (örn.

Ventolin/Bricanyl) kullandınız?

(Eğer bu soruya nasıl cevap verileceğinden emin değilseniz lütfen yardım isteyin.)

0 Hiçbir zaman kullanmadım

1 Günde ortalama 1 – 2 puf

2 Günde ortalama 3 – 4 puf

3 Günde ortalama 5 – 8 puf

4 Günde ortalama 9 – 12 puf

5 Günde ortalama 13 – 16 puf

6 Günde ortalama 16 puftan fazla

Klinik ekibin elemanlarından birisi tarafından doldurulacaktır

7. Bronkodilatör Öncesi FEV₁:

Öngörülen FEV₁ :.....

Öngörülen FEV₁%' si:.....

(Noktalı çizgilere gerçek değerleri kaydediniz ve yandaki sütunda FEV₁'in öngörülen % değerini işaretleyiniz)

0 > 95%

1 95 - 90%

2 89 - 80%

3 79 - 70%

4 69 - 60%

5 59 - 50%

6 < 50%

AQLQ fonksiyonel bozulmayı değerlendirir. 12 soru semptomlar, 11 soru aktivite sınırlanması, 5 soru emosyonel durum, 4 soru çevresel uyaranları değerlendirir. Her sorunun puanı 1 ile 7 arasındadır, 1 puan ağır bozulma 7 puan bozulma yok anlamına gelir. Testin toplam puanı ve her grubun puanları ayrı olarak toplanır. Önceki ve sonraki testlerle 0.5 puanlık fark minimal anlamlı değişimi ifade eder. Testin tamamlanma süresi ortalama 30 dakikadır.

7.3.2. AQLQ

1. Sizin için önemli beş faaliyeti seçerek son 2 haftada astımınız yüzünden faaliyetlerinizde ne kadar kısıtlanma olduğunu belirtiniz (beş faaliyet seçilir 1-5 arası sorular olarak puanlanır.)
 1. Bütünüyle kısıtlandı
 2. Çok fazla kısıtlandı
 3. Fazla kısıtlandı
 4. Orta derecede kısıtlandı
 5. Hafif derecede kısıtlandı
 6. Oldukça az kısıtlandı
 7. Hiç kısıtlanmadı
6. Son iki hafta boyunca göğöste sıkışma nedeniyle ne kadar sıkıntı ve rahatsızlık duydunuz?

1. Çok büyük ölçüde
2. Çok fazla
3. Oldukça fazla
4. Orta derecede
5. Hafif derecede
6. Oldukça az
7. Hiç

Aşağıdaki soruları puanlandırınız

7. Son 2 hafta içinde astımlı olmaktan dolayı kaygı duyma
8. Son 2 hafta içinde astım nedeniyle nefes darlığı çekme
9. Sigara dumanı maruziyeti ile astım belirtileri yaşama
10. Göğiste hırıltı duyma
11. Sigara dumanı nedeniyle bir yerden veya ortamdan uzaklaşma ihtiyacı duyma
 1. Her zaman
 2. Hemen hemen her zaman
 3. Genellikle
 4. Ara sıra
 5. Zaman zaman
 6. Çok nadir
 7. Hiç bir zaman
12. Son 2 hafta boyunca öksürük nedeniyle kadar sıkıntı ve rahatsızlık duydunuz?
 1. Büyük ölçüde
 2. Çok fazla

3. Oldukça fazla

4. Orta derecede

5. Hafif derecede

6. Oldukça az

7. Hiç duymadım

13. Son 2 hafta boyunca astımınız yüzünden sinirli ve gergin hissetme

14. Son 2 hafta boyunca göğsünüzde ağırlık hissi

15. Son 2 hafta boyunca astım ilacı kullanmanızdan dolayı kaygı duyma

16. Son 2 hafta boyunca boğazınızı temizleme gereksinimi duyma

17. Son 2 hafta boyunca toza maruz kalma sonucunda astım belirtileri yaşama

18. Son 2 hafta boyunca soluk alma ve soluk verme güçlüğü yaşama

19. Son 2 hafta boyunca toz nedeniyle bulunduğunuz ortamdan uzaklaşma

20. Son 2 hafta boyunca sabah uykusundan stım belirtileri ile uyanma

21. Son 2 hafta boyunca astım ilaçlarını el altında bulamama korkusu

22. Son 2 hafta boyunca solunum güçlüğü ile rahatsız olma

23. Son 2 hafta boyunca dışarı çıktığınızda hava durumu ve hava kirliliği nedeniyle
astım belirtileri yaşama

24. Son 2 hafta boyunca astım nedeniyle gece uykusundan uyanma

25. Son 2 hafta boyunca hava durumu veya kirliliği nedeniyle dışarı çıkamama
veya sınırlı çıkma

26. Son 2 hafta boyunca ağır parfüm veya kokuya maruz kalma sonucu astım
belirtileri yaşama

27. Son 2 hafta boyunca nefessiz kalma korkusu duyma

28. Son 2 hafta boyunca ağır parfüm kokusu nedeniyle ortamdan uzaklaşma

29. Son 2 hafta boyunca astım nedeniyle gece iyi uyumanızın engellenmesi

30. Son 2 hafta boyunca havasız kalmaya karşı mücadele etme

1. Her zaman
2. Hemen hemen her zaman
3. Genellikle
4. Ara sıra
5. Zaman zaman
6. Çok nadir
7. Hiç bir zaman

31. Son 2 hafta boyunca yapmış olmayı istediğiniz faaliyetlerin hepsini birden düşününüz , bu faaliyetler astımınız nedeniyle ne kadar kısıtlandı?

32. Son iki hafta boyunca yapmış olduğunuz tüm faaliyetler astımınız yüzünden ne kadar kısıtlandı?

1. Çok şiddetli ölçüde – çoğu faaliyetleri yürütemedim
2. Çok fazla
3. Fazla kısıtlama
4. Orta derecede
5. Hafif derecede kısıtlanma
6. Oldukça az kısıtlandı
7. Hiç kısıtlanmadı

Belirtilere yönelik sorular: 6, 8, 10, 12, 16, 18, 20, 22, 24, 29, 30

Faaliyet kısıtlamasına yönelik sorular: 1, 2, 3, 4, 5, 11, 19, 25, 28, 31, 32

Duygusal İşleve yönelik sorular: 7, 13, 15, 21, 27

Çevresel uyaranlar:9, 17, 23, 26

7.4. Solunum Fonksiyon ve Bronş Provokasyon Testi

Solunum fonksiyon testleri MIR Spirolab (149491103403) marka akım duyarlı spirometri cihazı ile yapılmıştır. Bronş provokasyon testi Koko dozimetri (DeVilbiss 626) ile uzun yöntem kullanılarak metakolin 0.001, 2, 4, 8, 16, 32, 64 mg/mL dozlarında yapılmıştır. Bronş provokasyon testi standartlara uygun olarak yapılmıştır. [234]

1. Hastaların test sabahı kafein içeren yiyecek ve içecek almaları önlenmiştir.
2. Testten 24 saat önce uzun etkili inhaler ajan alınımları kesilmiştir.
3. Test günü teste başlamadan 30 dk önce metakolinler dolaptan çıkarılmıştır.
4. Hasta oturur pozisyonda SFT yapılmıştır.
5. İlk dilüsyonda %0.9 NaCl kullanılmıştır.
6. Hastaya nebulizatörü uygun biçimde tutması öğretildi
7. İki dakikalık süre tamamlanınca en geç 60-180 sn sonra üç kez FEV₁ ölçümü yapılarak en iyi değer kabul edilmiştir.
8. Metakolin solüsyonu nebulizatöre konularak 5 kez her seferinde dozimetre ile standart doz verilerek nefes tutması söylenmiştir.

9. Her bir dozdan sonra yapılan SFT de en yüksek FEV₁ değeri kabul edilmiştir. Eğer FEV₁ de %20 den az bir düşme varsa bir sonraki metakolin dozuna geçilmiştir. Eğer FEV₁ de %20 den fazla düşüş olursa metakolin verilmesi kesilerek provokasyon işlemi sonlandırılmış ve 200mcg Salbutamol inhalasyonu yaptırılarak 15 dakika sonra spirometri tekrarlanmıştır. Hastanın solunum fonksiyonu bazal değerine ulaşınca laboratuvarı terk etmesine izin verilmiştir.

7.4.1. Balgam indüksiyonu

ERS klavuzu inerileri ile balgam indüksiyonu aşağıda özetlendiği gibi yapılmıştır.

[238]

5. Salbutamol 200mcg inhalasyon yolu ile verildikten 10 dk sonra ölçülen FEV₁ değeri bazal alınmıştır.
6. Ultrasonik nebulizatör ile 9 cc %3 lük hipertonic salin solüsyonu burun klipi ve ağız parçasında valv olmaksızın 7-10 dakika inhale ettirilmiştir.
7. Postnazal akıntı ve tükürük kontaminasyonunu önlemek amacıyla ekspektorasyondan önce hastanın ağzını suyla çalkalaması istenmiştir.
8. İnhalasyon esnasında ve sonrasında hastanın balgam çıkarması istenmiştir. Eğer balgam çıkaramazsa ikinci inhalasyondan önce FEV₁ ölçümü yapılarak
 - d. FEV₁ de %10 dan az düşme varsa %4 lük solüsyon inhalasyonuna geçilmiştir
 - e. FEV₁ deki düşüş %10-19 arasında ise %3 lik solüsyonla devam edilmiştir
 - f. FEV₁ deki düşüş %20 den fazla ise işlem sonlandırılarak bronkodilatör tedavi verilmiştir.
9. Eğer hasta %4 lük solüsyon ile balgam çıkaramamış ise FEV₁ deki düşüş oranına göre %5 lik salin solüsyonu ile inhalasyona geçilmiştir.

7.4.2. Balgam İncelemesi

İndüksiyon yöntemi ile elde edilen balgam en geç iki saat içinde incelemeye alınmıştır.

Uygulanan inceleme basamakları aşağıda verilmiştir.[238]

1. Petri kabı içindeki balgam örneği plastik forsepsler ile önceden ağırlığı alınmış polistren tüp içine konulmuştur.
2. Bu tüpte içindeki materyalin dört katı kadar distile su ile sulandırılarak elde edilen %0.1 lik dihidroetol (DTT) (Sigma CA) eklenerek vortexte 15 sn kadar karıştırılmıştır.
3. Karışım oda sıcaklığında 15 dakika Bench-Rocker da çalkalanmıştır.
4. Bunun üzerine DTT ile eşit miktarda Dulbecco phosphate- buffered saline (D-PBS) eklenmiştir.
5. Materyal 4 kat steril gazlı bez (veya 48 mikonluk süzgeç kağıt) ile süzildükten sonra santrifüjde +4 C de 3000g de 10 dakika çevrilmiştir.
6. Süpernatant aspire edilerek Eppendorf tüplere konularak -80 C de saklanmıştır.
7. Kalan bölüm 1 ml D-PBS ile sulandırılarak Shandon III sitosantrifüj tüplerinde 450rpm’de altı dakika çevrildikten sonra iki adet sitospin preparat hazırlanmıştır.
8. Preparatlar Wright ve Papanicole ile boyanarak ışık mikroskopunda en az 400 hücre sayılarak hücre tiplendirmesi yapılmıştır.

7.5. ELİSA İncelenmesi

7.5.1. IL-2 Düzeyi Ölçümü

Örneklerde IL-2 düzeyi ölçümü solid faz Enzyme Amplified Sensitivity İmmunassay yöntemi ile Dia Source KAP1241 (Nivelles- Belgium) kitleri kullanılarak bakıldı. .

Daha önce 2-8C derecede beklemekte olan mikropalaklar oda ısına çıkarılar örnek

sayısında hazırladı. -80C derecede saklanmakta olan balgam süpernatantları işlemiden 24 saat ince 2-8 C dereceye alındı. Tüm gözlere 100 mikrolitre İnkübasyon bufferı (bovine serum albümin, timol ve fosfat buffer) konuldu. İlk sıraya sırası ile 100 mikrolitre kalibratör 0 (benzamidin, timol ve insan serumu) kalibratör 1-5 (değişen konsantrasyonlarda benzamidin, timol ve insan serumu), diğer gözlere ise 100 mikrolitre örnek konuldu. Tüm gözlere 50 mikrolitre anti IL-2 HRP konjugatı (Tris maleat buffer, timol, bovine serum albümin içerisinde HRP işaretli anti IL-2 (monoklonal antikorlar)) ilave edilerek oda ısısında 700 +/- 100 Rpm de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu (Tris HCL) ile otomatik yıkayıcıda 3 defa yıkandı. Yıkama ardından yeni hazırlanmış olan kromojenik solüsyon 100 mikrolitre gözlere konularak 15 dakika 700 Rpm de karanlıkta inkübasyona bırakıldı. 200 mikrolitre stop solüsyon eklenerek 450-490 nm de okundu. Ölçümde 0 pg/mL ve 23.8 pg/mL değerleri arasında standart eğri oluşturuldu, örneklerdeki IL-2 düzeyi logit transformasyondan uygulanmış standart eğrinin doğrusal regresyonundan elde edilen denklem ile hesap edildi. Değerler pg/mL olarak kaydedildi.

7.5.2. IL-4 Düzeyi Ölçümü

Örneklerde IL-4 düzeyi ölçümü solid faz Enzyme Amplified Sensitivity İmmunassay yöntemi ile Dia Source KAP1281 (Nivelles- Belgium) kitleri kullanılarak bakıldı. . Daha önce 2-8C derecede beklemekte olan mikropalaklar oda ısına çıkarılar örnek sayısında hazırladı. -80C derecede saklanmakta olan balgam süpernatantları işlemiden 24 saat ince 2-8 C dereceye alındı. Tüm gözlere 100 mikrolitre İnkübasyon bufferı (bovine serum albümin, timol ve fosfat buffer) konuldu. İlk sıraya sırası ile 100

mikrolitre kalibratör 0 (benzamidin, timol ve insan serumu) kalibratör 1-5 (değişen konsantrasyonlarda benzamidin, timol ve insan serumu), diğer gözlere ise 100 mikrolitre örnek konuldu. Tüm gözlere 50 mikrolitre anti IL-4 HRP konjugatı (Tris maleat buffer, timol, bovine serum albümin içerisinde HRP işaretli anti IL-4 (monoklonal antikorlar)) ilave edilerek oda ısısında 700 +/- 100 Rpm de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu (Tris HCL) ile otomatik yıkayıcıda 3 defa yıkandı. Yıkama ardından yeni hazırlanmış olan revalüsyon solüsyonu (dimetil formamid içinde tetrametilbenzidinve sitrat buffer) 200 mikrolitre gözlere konularak 30 dakika 700 Rpm de karanlıkta inkübasyona bırakıldı. 50 mikrolitre stop solüsyon eklenerek 450-490 nm de okundu. Ölçümde 0 pg/mL ve 1696 pg/mL değerleri arasında standart eğri oluşturuldu, örneklerdeki IL-4 düzeyi logit transformasyondan uygulanmış standart eğrinin doğrusal regresyonundan elde edilen denklem ile hesap edildi. Değerler pg/mL olarak kaydedildi.

7.5.3. IL-5 Düzeyi Ölçümü

IL-5 ölçümü için solid faz sandviç Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay Human IL-5 kiti İnvitrogen KHC0052 (Camarillo - CA) kullanıldı. Daha önce 2-8C derecede beklemekte olan mikropaklar oda ısısına çıkarılar örnek sayısında hazırladı. -80C derecede saklanmakta olan balgam süpernatantları işlemde 24 saat önce 2-8 C dereceye alındı . Mikropakta ilk sıraya standart solüsyon (15 mM sodyum Azide) 6 göze 375, 187.5, 93.7, 46.8, 23.4, 11.7 pg/mL konsantrasyonlarında hazırlanarak koyuldu. Diğer gözlere 100 mikrolitre örnek sulandırılmadan eklendi. Oda ısısında üzerleri kapatılarak 2 saat 700 Rpm' de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası otomatik yıkayıcıda 4

defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Ardından 100 mikrolitre Biotin konjugate (15 mM soyum azide içeren biotin işaretli anti IL-5) eklenerek 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Yıkama solüsyonu ile 4 defa yıkamanın ardından 100 mikrolitre Streptavidin HRP (3.3 mM timol) koyularak 30 dakika inkübe edildi tekrar 4defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkama sonrasında 100 mikrolitre stabilize kromojen (tetramethlybenzidine (TMB)) eklenerek 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Son olarak 100 mikrolitre stop solüsyon eklenerek 450 nm de okundu. Ölçümde 0 pg/mL ve 375 pg/mL değerleri arasında standart eğri oluşturuldu, örneklerdeki IL-5 düzeyi logit transformasyondan uygulanmış standart eğrinin doğrusal regresyonundan elde edilen denklem ile hesap edildi. Değerler pg/mL olarak kaydedildi.

7.5.4. IL-6 Düzeyi Ölçümü

IL-6 incelemesi için solid faz Enzyme Amplified Sensitivity İmmunassay yöntemi ile Dia Source KAP1261 (Nivelles- Belgium) kitleri kullanılarak bakıldı. Daha önce 2-8C derecede beklemekte olan mikropalaklar oda ısına çıkarılar örnek sayısında hazırladı. - 80C derecede saklanmakta olan balgam süpernatantları işlemiden 24 saat ince 2-8 C dereceye alındı .Tüm mikropalaklara 50 mikrolitre inkbasyon bufferı (bovine serum albümin, benamidin, timol ve borat buffer karışımı) konuldu. Mikropalak ilk sıraya hazır olarak bulunan kalibratörler 0-5 (bovine serum albumin, timol , benamidine ile sırası ile değişik miktarlarda karıştırılmış insan serumu) ve kontroller 1-2 (timol ile karıştırılmış insan serumu) 100 mikrolitre eklendi. Sırası ile örnekler diğer gözler sulandırılmadan 100 mikrolitre olarak eklendi. Oda ısısında 1 saat 700 rpm de yatay karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası her göz 0.4 ml yıkama solüsyonu

(Tris-HCL) ile otomatik yıkayıcıda 3 defa yıkandı. 100 mikrolitre anti IL-6 HRP konjugate (borat buffer, bovine serum albümin ve timol ile karıştırılmış HRP işaretli anti IL-6 monoklonal antikoru) ve 50 mikrolitre spesimen çözeltisi (bovine serum albümini, benzamidin, timol ile hazırlanmış insan serumu) konularak oda ısısında 1 saat 700 rpm de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası otomatik yıkayıcıda yıkama solüsyonu ile üç defa yıkama yapıldı. Ardından 200 mikrolitre kromojenik TMB solüsyonu eklenerek 15 dakika inkübasyon ardından 50 mikrolitre stop solüsyonu ilave edildi (HCL 2N) ve 450-650nm de bikromatik okuma yapıldı. Ölçümde 0 pg/mL ve 2560 pg/mL değerleri arasında standart eğri oluşturuldu, örneklerdeki IL-6 düzeyi logit transformasyondan uygulanmış standart eğrinin doğrusal regresyonundan elde edilen denklem ile hesap edildi. Değerler pg/mL olarak kaydedildi.

7.5.5. IL-8 Düzeyi Ölçümü

IL-8 incelemesi için solid faz Enzyme Amplified Sensitivity İmmunassay yöntemi ile Dia Source KAP1301 (Nivelles- Belgium) kitleri kullanılarak bakıldı. Daha önce 2-8C derecede beklemekte olan mikropalaklar oda ısına çıkarılar örnek sayısında hazırladı. - 80C derecede saklanmakta olan balgam süpernatantları işlemiden 24 saat ince 2-8 C dereceye alındı .Tüm mikropalaklara 100 mikrolitre inkübasyon bufferı (bovine serum albümin, benzamidin, timol karışımı) konuldu. Kalibratör 0-5 (değişen konsantrasyonlarda insan serum, benzamidine ve timol karışımı) kontrol 1-2 (timol ve insan serumu) ilk sıraya konuldu, diğer gözlere 100 mikrolitre örnek konuldu. Ardından 50 mikrolitre anti IL-8 HRP (TRIS maleat buffer, bovine serum albümin, timol içerisine konmuş HRP işaretli anti IL-8) eklenerek 2 saat oda ısısında 700RPM de

inkübe edildi. İnkübasyon sonunda otomatik yıkayıcıda yıkama solüsyonu (Tris HCL) ile 3 defa yıkandı. Dimetil formamid iöinde tetrametilbenzidin ve sitrat buffer karışımı olarak hazırlanmış solüsyondan 200 mikrolitre her göze eklendi ve 30 dakika 700 Rpm de oda ısısında karanlık inkübasyona bırakıldı. 50 mikrolitre stop solüsyon (HCL 2N) eklenerek ve 450-650nm de bikromatik okuma yapıldı. Ölçümde 0 pg/mL ve 1845 pg/mL değerleri arasında standart eğri oluşturuldu, örneklerdeki IL-8 düzeyi logit transformasyondan uygulanmış standart eğrinin doğrusal regresyonundan elde edilen denklem ile hesap edildi. Değerler pg/mL olarak kaydedildi.

7.5.6. IL-10 Düzeyi Ölçümü

IL-10 incelemesi için solid faz Enzyme Amplified Sensitivity İmmunassay yöntemi ile Dia Source KAP1321 (Nivelles- Belgium) kitleri kullanılarak bakıldı. Daha önce 2-8C derecede beklemekte olan mikropalaklar oda ısına çıkarılar örnek sayısında hazırladı. - 80C derecede saklanmakta olan balgam süpernatantları işlemde 24 saat ince 2-8 C dereceye alındı. Tüm mikropalaklara 100 mikrolitre inkübasyon bufferı (bovine serum albümin, fosfat buffer, timol karışımı) konuldu, kalbratörler 0-5 (benzamidin, timol ve insan plazması değişen konsantrasyonlarda), kontroller 1-2 (timol ile hazırlanmış insan plazması) ilk sıra gözlere, örnekler diğer gözlere 100 mikrolitre olarak eklendi. Oda ısısında 2 saat 700 Rpm de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası otomatik yıkayıcı ile yıkama solüsyonu (Tris-HCL) ile üçer defa yıkandı. Yıkama sonrasında 100 mikrolitre spesmen çözeltisi (benzamidin, timol ve insan plazması) ve 50 mikrolitre anti IL-10 HRP konjugat (TRIS maleat buffer, bovine serum albümin ve timol içinde hazırlanmış HRP işaretli anti IL-10 (monoklonal antikor)) konuldu. Oda ısısında 700

Rpm de 2 saat inkübasyonun ardında yıkama solüsyonu ile otomatik yıkayıcıda 3 defa yıkanarak 200 mikrolitre revalüsyon solüsyonu (dimetilformamid içinde hazırlanmış tetrametilbenzidin ve sitrat buffer karışımı) eklendi. Oda ısısında karanlık ortamda 700 Rpm de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. 50 mikrolitre stop solüsyonu (HCL 2N) eklenerek ve 450-650nm de bikromatik okuma yapıldı. Ölçümde 0 pg/mL ve 1976 pg/mL değerleri arasında standart eğri oluşturuldu, örneklerdeki IL-10 düzeyi logit transformasyondan uygulanmış standart eğrinin doğrusal regresyonundan elde edilen denklem ile hesap edildi. Değerler pg/mL olarak kaydedildi

7.5.7. TNF Alfa Düzeyi Ölçümü

TNF Alfa incelemesi için solid faz Enzyme Amplified Sensitivity İmmunassay yöntemi ile Dia Source KAP1751 (Nivelles- Belgium) kitleri kullanılarak bakıldı. Daha önce 2-8C derecede beklemekte olan mikropklaklar oda ısına çıkarılar örnek sayısında hazırladı. -80C derecede saklanmakta olan balgam süpernatantları işlemiden 24 saat ince 2-8 C dereceye alındı .Tüm mikropklaklara 50 mikrolitre inkübasyon bufferı (bovine serum albümin, TRIS maleat buffer,EDTA, timol karışımı) konuldu, kalbratörler 0-5 (benzamidin, timol ve insan plazması değişen konsantrsyonlarda), kontroller 1-2 (timol ile hazırlanmış insan plazması) ilk sıra gözlere, örnekler diğer gözlere 200 mikrolitre olarak eklendi ve oda ısısında 700 Rpm de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon ardından otomatik yıkayıcı ile 3 defa yıkama solüsyonu (Tris HCL) ile yıkandı. 100 mikrolitre sıfır kalibratörü (benzamidin, timol ve insan serumu) konuldu, üzerine 50 mikrolitre anti TNF Alfa HRP konjugatı (TRIS Maleat buffer,bovine serum ve timol içinde hazırlanmışHRP içaretlianti TNF Alfa (monoklonal antikor)) konularak oda ısısında 2 saat 700 Rpm de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon ardından 3 defa yıkama solüsyonu ile otomatik yıkayıcı ile yıkanarak 200 mikrolitre revalüsyon solüsyonu (dimetilformamid içinde hazırlanmış tetrametilbenzidin ve sitrat buffer karışımı) eklendi. Oda ısısında karanlık ortamda 700 Rpm de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. 50 mikrolitre stop solüsyonu (HCL 2N) eklenerek ve 450-650nm de bikromatik okuma yapıldı. Ölçümde 0 pg/mL ve 518 pg/mL değerleri arasında standart eğri oluşturuldu, örneklerdeki IL-10 düzeyi logit transformasyondan uygulanmış standart eğrinin doğrusal regresyonundan elde edilen denklem ile hesap edildi. Değerler pg/mL olarak kaydedildi

7.5.8. VEGF Ölçümü

Örneklerdeki VEGF miktarı solid faz sandviç Enzyme Linked İmmuno Sobent Assay tekniği ile İnvitrogen KHG0111 (Camarillo CA) kitleri kullanılarak ölçüldü. Daha önce 2-8C derecede beklemekte olan mikropalaklar oda ısına çıkarılar örnek sayısında hazırladı. -80C derecede saklanmakta olan balgam süpernatantları işlemden 24 saat ince 2-8 C dereceye alındı. Mikropalakta ilk sıraya standart buffer çözeltisinden (15 mM sodyum azide) hazırlanan 750, 375, 188,93.8,46.9, 23.4, 0 pg/mL standartlar konuldu. Tüm gözlere 50 mikrolitre inkübasyon bufferı (8 mM sodyum Azide) eklendi. Standartlar dışındaki diğer gözlere 50 mikrolitre örnek ve 50 mikrolitre standart dilüsyon buffer (15 mM sodyum azide) konularak 2 saat oda ısısında 700 Rpm de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon ardından otomatik yıkayıcıda 4 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her göze 100 mikrolitre biyotin konjugat (biotin ile kaplı anti-VEGF ve 15 mM sodyum azide) eklendi ve 1 saat 700 Rpm de oda ısısında inkübasyona konuldu. Otomatik yıkayıcıda dört defa daha yıkanarak ardından 100 mikrolitre Streptavidin HRP (streptavidin peroksidaz ve 3 mM timol) eklendi ve 700 Rpm de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Yıkama solüsyonu ile 4 defa yıkama yapıldı. 100 mikrolitre stabilize kromojen (Tetrametilbenzidin (TMB)) ilave edilerek 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 100 mikrolitre stop solüsyonu eklenek 450 nm de bikromatik okuma yapıldı. Ölçümde 0 pg/mL ve 750 pg/mL değerleri arasında standart eğri oluşturuldu, örneklerdeki VEGF düzeyi logit transformasyondan uygulanmış standart eğrinin doğrusal regresyonundan elde edilen denklem ile hesap edildi. Değerler pg/mL olarak kaydedildi.