

**SERPINB1 VE SERPINB2 PROTEAZ İNHİBİTÖRLERİNİN
BRONŞ EPİTEL HÜCRELERİNDEKİ İNFLAMATUVAR
CEVAPTAKİ ROLÜ**

**THE ROLE OF SERPINB1 AND SERPINB2 PROTEASE
INHIBITORS ON THE INFLAMMATORY RESPONSE IN
BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS**

ÖVGÜ ARAN

Doç. Dr. İ. Çağatay KARAASLAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

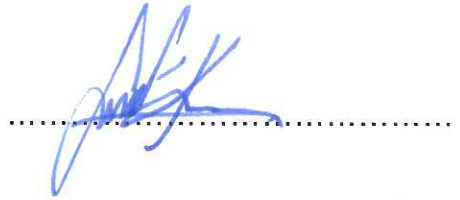
2018

ÖVGÜ ARAN'nın hazırladığı “**SERPİN B1 ve SERPİN B2 Proteaz İnhibitörlerinin Bronş Epitel Hücrelerindeki İnflamatuvar Cevaptaki Rolü**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mustafa Mert SÖZEN
Başkan



Doç. Dr. İ. Çağatay KARAASLAN
Danışman



Doç. Dr. Halil Murat AYDIN
Üye



Dr. Öğr. Üyesi Ekim TAŞKIRAN
Üye



Dr. Öğr. Üyesi Işıl GERÇEK BEŞKARDEŞ
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun 19.06.2019 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

19 / 06 / 2018



ÖVGÜ ARAN

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

19/06/2018



ÖVGÜ ARAN

ÖZET

SERPİN B1 VE SERPİN B2 PROTEAZ İNHİBİTÖRLERİNİN BRONŞ EPİTEL HÜCRELERİNDEKİ İNFLAMATUVAR CEVAPTAKİ ROLÜ

ÖVGÜ ARAN

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İ. ÇAĞATAY KARAASLAN

Haziran 2018, 98 sayfa

Astım, dünyada yaklaşık 300 milyon kişinin etkilendiği ciddi bir sağlık sorunudur. Astım görülme sıklığı ülkeler arasında değişkenlik olmakla birlikte aynı ülke içinde farklı coğrafi bölgelerde de değişiklik göstermektedir. Örneğin, Yeni Zelanda ve Avustralya'da sıklık %10-25 iken, Güneydoğu Asya ülkeleri, Kuzey Amerika Kızılderilileri ve Eskimolarda sıklık %1'den azdır. Avrupa ülkelerinde sıklık %5-10 olarak bildirilirken, Romanya (%1,5) ve Yunanistan (%1,9)'da sıklık oldukça düşüktür. Ülkemizde yapılan çalışmalarda çocuklarda %0,7-14,8, erişkinlerdeyse %0,3-7,6 oranı ile astım prevalansı yüksek olduğu görülmektedir.

Astım hava yollarının kronik bir hastalığıdır. Bronş daralması, hava yolu hiperreaktivitesi ve inflamasyonla karakterize edilir. Astım çeşitli fenotipik özellikleri bünyesinde barındıran, genetik ve çevresel faktörlerin etkili olduğu kompleks bir yapıya sahiptir. Astım patofizyolojisi hakkındaki kanı, epitel dokunun yıkımı ve yapımı arasındaki dengenin bozularak hava yolu yeniden yapılanmasına sebebiyet vermesidir.

Alerjenler, hava yolu iritanları, kimyasallar ve viral solunum yolu etkenleri, hava yolunda astım gelişim basamaklarını başlatan nedenlerdir. Bu etkenler, hava yolu epitelinde dökülme, inflamasyon, bronşiyal aşırı duyarlılık ve hava yolu daralmasına neden olur. Bu inflamatuvar yanıtın gelişmesine katkıda bulunan moleküller epitel hücrelerden sentezlenen, sitokin, kemokin, lipid mediatörler ve büyüme faktörleridir. Epitel hücreler hava yollarında alerjenle karşılaşan ilk hücrelerdir ve solunan hava ile gelen zararlı maddelere karşı fiziksel bir duvar oluşturur. Salgıladığı bu moleküllerle inflamatuvar yanıt oluşturarak hava yolu savunmasının ilk basamağında önemli bir rol oynar.

Havayolu epitelinin bütünlüğünün bozulmasına, sürekli soluduğumuz toksik ve oksidan maddelerin yanı sıra proteazlar da katkıda bulunur. Ev tozu akarları, polenler, funguslar, bakteriler ve virüsler gibi alerjenlerin çoğu proteaz aktivitesine sahiptir. Proteazların yıkıcı etkisine karşı, epitel hücreleri proteaz inhibitörleri sentezleyerek proteaz-antiproteaz dengesini korurlar. Alerjenle karşılaşma sonrasında epitel hücrelerden hangi proteaz inhibitörlerinin sentezlendiği ve sentez sırasında hangi metabolik yolların rol oynadığı sorusunun cevabı net olarak ortaya konulamamıştır.

Bu tez çalışmasında sistein proteaz *Dermatophagoides pteronyssinus* 1 (Der p 1) ile karşılaşma sonrasında, bronş epitel hücrelerinde ifadesi değişen serine protease inhibitör B1 (SERPINB1) ve serine protease inhibitör B2 (SERPINB2) proteaz inhibitörlerinin inflamatuvar cevaptaki rolü ve bu cevabın oluşmasında görev alan sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin etkileri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kullanarak RNA düzeyinde ve ELISA kullanılarak protein düzeyinde araştırılmıştır. Bu amaçla SERPINB1 ve SERPINB2 ifadeleri genlere özgü siRNA kullanılarak susturulmuştur.

SERPINB1 ve SERPINB2 proteaz inhibitörlerinin IL-6, IL-8, RANTES, GM-CSF, TSLP inflamatuvar mediatörlerin ifadesi üzerine etkili olduğu bulundu.

Anahtar Kelimeler: Bronş epitel hücresi, alerjen proteaz, Der p 1, SERPINB1, SERPINB2, proteaz inhibitörleri, astım, alerji.

ABSTRACT

THE INFLAMMATORY RESPONSE ROLE OF SERPINB1 AND SERPINB2 PROTEASES INHIBITORS EXPRESSED IN BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS

OVGU ARAN

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Assoc. Dr. I. CAGATAY KARAASLAN

June 2018, 98 pages

Asthma is a serious health problem affecting nearly 300 million people worldwide. Asthma frequency varies based on countries and even based on regions of same country. For example, Australia and New Zealand have a frequency of 10-25%, while Southeast Asian countries, North American Indians and Eskimos have a frequency of less than 1%. It is reported that frequency in European countries is between 5-10%, while that in Romania (1.5%) and Greece (1.9%) is relatively lower. The prevalence of asthma in Turkey is higher than the regional average. Studies conducted in our country have shown such a high prevalence that the frequency is between 0.7-14.8% in children and 0.3-7.6% in adults.

Asthma is a chronic airway disease. It is characterized by bronchial contraction (narrowing), airway hyperreactivity and inflammation. Asthma has a complex structure which contains various phenotypic features and affected by genetic and environmental factors. The consensus on the pathophysiology of asthma is the disruption in the balance

between epithelial tissue deconstruction and construction which causes airway remodelling.

Allergens, airway irritants, chemicals and viral respiratory tract factors are initiative steps causing asthma. These factors lead to airway epitheliumdesquamation, inflammation, bronchial hyperresponsiveness, and airway contraction. The molecules that contribute to the development of this inflammatory response are cytokines, chemokines, lipid mediators and growth factors synthesized from epithelial cells. Epithelial cells are the first line defense cells that contact allergens in the airways and form a physical wall against harmful substances that come in through breathing. It plays an important role in the first step of airway defense by creating an inflammatory response with these secreted molecules.

In addition to continuous breathing of toxins and oxidants, proteases also contribute to deterioration in integrity of the airway epithelium. Most of the allergens such as house dust mites, pollen, fungus, bacteria and viruses have protease activity. Against this destructive effect of proteases, epithelial cells synthesize protease inhibitors and preserve the protease-antiprotease balance. Which protease inhibitors are synthesized from epithelial cells after allergen contact and which metabolic pathways play a role during synthesis remain unclear.

In this thesis study, role of serine protease inhibitor B1 (SERPINB1) and serine protease inhibitor B2 (SERPINB2) whose expressions are altered in bronchial epithelial cells after cysteine protease *Dermatophagoides pteronyssinus* 1 (Der p 1) exposure, in inflammatory response and the effects of cytokines, chemokines, and growth factors in this response were investigated via real time polymerase chain reaction at RNA level and ELISA at protein level. For this purpose, SERPINB1 and SERPINB2 expressions were silenced by using gene-specific siRNA.

SERPINB1 and SERPINB2 protease inhibitors were found to be effective on the expressions of IL-6, IL-8, RANTES, GM-CSF and TSLP inflammatory mediators.

Keywords: Bronchial epithelial cell, Allergen protease, Der p 1, SERPINB1, SERPINB2, protease inhibitors, asthma, allergy.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başlamamda büyük katkıları olan, deneylerimde ve tez çalışmam boyunca bilgisini paylaşan, sabrını, desteğini ve güvenini hissettiren, bilgi birikimi, çalışmaları ve hayata karşı duruşuyla her zaman örnek aldığım ve alacağım, bilime, çalışmaya ve araştırmaya teşvikiyle ufkumu genişleten ve her daim yol gösteren, gerçek bir bilim insanı, saygıdeğer danışmanım Doç.Dr. İ.Çağatay Karaaslan'a

Tez çalışmam boyunca, her ihtiyacım olduğunda yanımda olan, kendi işlerini bırakıp benim yardımına koşan, hafta içi hafta sonu gece gündüz demeden, deneylerimde ve tez yazım sürecimde bana gösterdikleri sonsuz sabır, fedakârlık, özveri ve yardımlar için, haklarını asla ödeyemeyeceğim Hayriye Akel Bilgiç ve Dilara Karagüzel'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini hep hissettiğim iş arkadaşlarıma,

Tez yazmanın en zor zamanlarında yanımda olan, desteklerini her zaman hissettiğim, en sevdiğim, kardeşten öte arkadaşım Özge Tanyeri ve Ahmet Cemil Özturhan'a,

Yüksek lisans dâhil olmak üzere, tüm eğitim öğretim hayatım boyunca; desteklerini, sevgilerini, güvenlerini, eğitimci olmalarından dolayı yardımlarını hep hissettiğim, bana her zaman güvenen, başarımda da başarısızlığımda da beni her koşulda seven, her zaman arkamda olup, güçlü ellerini sırtımda hissettiren; beni doğru, dürüst ve onurlu olmanın erdemiyle yetiştiren, bilime ve eğitime verdikleri onca katkıdan sonra, beni de bu konuda teşvik eden ve etmeye devam eden, sahip olunabilecek en iyi aileye, aileme, çok sevgili annem Sevim Aran'a, babam Orhan Aran'a, abim Özgün Aran ve eşi Seçil Aran'a,

içtenlikle, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|--|----|
| ÖZET | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| TEŞEKKÜR | 6 |
| İÇİNDEKİLER | 7 |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | 10 |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | 11 |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | 13 |
| 1. GİRİŞ | 13 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 22 |
| 2.1. Astım Tanımı | 22 |
| 2.2. Astım Prevalansı | 22 |
| 2.3. Astımın Ortaya Çıkış Ve Gelişmesinde Etkili Risk Faktörleri | 25 |
| 2.3.1. Çevresel Faktörler | 25 |
| 2.3.1.1. Alerjenler | 25 |
| 2.3.1.2. Sigara | 26 |
| 2.3.1.3. Hava Kirliliği..... | 27 |
| 2.3.1.4. Diyet | 27 |
| 2.3.2. Bireysel Faktörler..... | 27 |
| 2.3.2.1. Obezite | 28 |

| | |
|---|----|
| 2.3.2.2. Cinsiyet..... | 28 |
| 2.3.2.3. Genetik:..... | 28 |
| 2.4. Astım Patogenezi | 31 |
| 2.4.1. Astım ve Alerjide IgE'nin Rolü | 34 |
| 2.4.2. Erken faz reaksiyonu | 35 |
| 2.4.3. Geç faz reaksiyonu:..... | 35 |
| 2.4.4. Hava Yolu Epitelinin Rolü | 36 |
| 2.5. Astım Fenotipleri | 37 |
| 2.5.1. Alerjik Olmayan Astım | 38 |
| 2.5.2. Alerjik Astım | 38 |
| 2.6. Proteazlar | 39 |
| 2.6.1. Metalloproteazlar | 42 |
| 2.6.2. Aspartik Proteazlar | 42 |
| 2.6.3. Serin Proteazlar..... | 43 |
| 2.6.4. Sistein Proteazlar | 44 |
| 2.7. Proteaz İnhibitörleri | 45 |
| 2.7. Serin Proteaz İnhibitör..... | 46 |
| 2.7.1. SERPINB1..... | 48 |
| 2.7.2. SERPINB2..... | 49 |
| 2.8. Sitokin, Kemokin ve Büyüme Faktörleri..... | 50 |
| 2.8.1. İnterlökin 6 (IL-6) | 51 |
| 2.8.2. İnterlökin 8 (IL-8) | 52 |

| | |
|--|----|
| 2.8.3. İnterlökin 25 (IL-25) | 52 |
| 2.8.4. İnterlökin 33 (IL-33) | 52 |
| 2.8.5. Timik Stromal Lenfopoietin (TSLP)..... | 53 |
| 2.8.6. RANTES..... | 53 |
| 2.8.7. Granülosit / Makrofaj Koloni Stimüle Eden Faktör (GM-CSF)..... | 53 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER..... | 54 |
| 3.1. Hücre Kültürü | 54 |
| 3.1.1. Beas-2b Hücrelerinin Çoğaltılması ve Air Liquid Interface (ALI) Kültürü | 54 |
| 3.1.1.1. Transwellerin Kolajenle Kaplanması | 54 |
| 3.1.2. Tek Tabaka Kültür | 55 |
| 3.2. SERPINB1 ve SERPINB2 Genlerinin siRNA İle İfadelerinin Susturulması..... | 55 |
| 3.3. Proteaz İle Uyarı..... | 56 |
| 3.4. RNA İzolasyonu..... | 56 |
| 3.5. Komplementer DNA (cDNA) Eldesi | 57 |
| 3.6. Gerçek Zamanlı PZR..... | 57 |
| 3.7. ELISA Metodu | 59 |
| 3.7.1. İnsan İnterlökin 8 ELISA..... | 59 |
| 3.7.1.1. Standartların seyreltilmesi: | 59 |
| 3.7.1.2. 1X Streptavidin - HRP solüsyonu hazırlanması:..... | 60 |
| 3.7.2. İnsan İnterlökin 6 ELISA Metodu | 60 |
| 3.7.2.1. Standartların seyreltilmesi | 60 |
| 3.7.2.2. 1X Streptavidin - HRP solüsyonu hazırlanması:..... | 61 |

| | |
|---------------------------------|----|
| 3.8. İstatistiksel Analiz | 59 |
| 4. BULGULAR..... | 62 |
| 5. SONUÇ VE TARTIŞMA | 81 |
| 6. KAYNAKLAR | 85 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 98 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Çizelge 2.1. İç ortamda ve dış ortamda bulunan bazı alerjenler | 24 |
| Çizelge 2.2. Astım ve alerji ile ilişkilendirilmiş genler | 28 |
| Çizelge 2.3. Havadaki proteaz alerjenler. | 39 |
| Çizelge 3.1. PZR reaksiyonunda kullanılmak üzere dizayn edilen primer dizileri..... | 56 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 2.1. Dünyadaki 13-14 yaş arası astım belirtileri prevalans | 22 |
| Şekil 2.2. 70 ülkede 18 ila 45 yaş arasındaki kişilerde astım semptomlarının yaygınlığı | 23 |
| Şekil 2.3. B hücre ile T hücre etkileşimi ve IgE sentezi..... | 31 |
| Şekil 4.1. Bronş epitel hücrelerinin Th2 tip sitokinlerin bulunduğu ve bulunmadığı ortamda artan konsantrasyonlarda Der p 1 ile uyarımı sonucu SERPINB1 ifadesindeki değişiklikler..... | 60 |
| Şekil 4.2. Bronş epitel hücrelerinin Th2 tip sitokinlerin bulunduğu ve bulunmadığı ortamda artan konsantrasyonlarda Der p 1 ile uyarımı sonucu SERPINB2 ifadesindeki değişiklikler | 60 |
| Şekil 4.3. siRNA ile transfekte edilmiş bronş epitel hücrelerinde 12 (A), 24 (B), 36 (C) ve 48 (D) saat sonunda SERPINB1, 24 saat sonunda (E) SERPINB2 geninin ifadesi..... | 62 |
| Şekil 4.4. Negatif kontral siRNA ile transfekte edilmiş bronş epitel hücrelerinde 12 saat sonunda SERPINB1 (A) ve SERPINB2 (B) genlerinin ifadeleri | 63 |
| Şekil 4.5. Negatif kontral siRNA ile transfekte edilmiş bronş epitel hücrelerinde 24 saat sonunda SERPINB1 (A) ve SERPINB2 (B) genlerinin ifadeleri | 64 |
| Şekil 4.6. Negatif kontral siRNA ile transfekte edilmiş bronş epitel hücrelerinde 36 saat sonunda SERPINB1 (A) ve SERPINB2 (B) genlerinin ifadeleri | 64 |
| Şekil 4.7. Negatif kontral siRNA ile transfekte edilmiş bronş epitel hücrelerinde 48 saat sonunda SERPINB1 (A) ve SERPINB2 (B) genlerinin ifadeleri | 65 |
| Şekil 4.8. Der p 1 ve SERPINB1 siRNA'nın IL-6 (A), IL8 (B), TSLP (C), RANTES (D), GM-CSF (E) ve PDGF- β (F) ifadesi üzerine 12. saatteki etkileri..... | 68 |
| Şekil 4.9. Der p 1 ve SERPINB1 siRNA'nın IL-6 (A), IL8 (B), TSLP (C), RANTES (D), GM-CSF (E) ve PDGF- β (F) ifadesi üzerine 24.saatteki etkileri | 70 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.10. Der p 1 ve SERPINB1 siRNA'nın IL-6 (A), IL8 (B), TSLP (C), RANTES (D), GM-CSF (E) ve PDGF- β (F) ifadesi üzerine 36. saatteki etkileri | 73 |
| Şekil 4.11. 48 saatte Der p 1 ve SERPINB1 siRNA'nın IL-6 (A), IL8 (B), TSLP (C), RANTES (D), GM-CSF (E) ve PDGF- β (F) ifadesi üzerine 48.saatteki etkileri | 75 |
| Şekil 4.12. Der p 1 ve SERPINB2 siRNA'nın IL-6 (A), IL8 (B), TSLP (C), RANTES (D), GM-CSF (E) ve PDGF- β (F) ifadesi üzerine 24.saatteki etkileri | 78 |
| Şekil 4.13. 12 saat Der p 1 (5 μ g/mL) ve SERPINB2 siRNA'nın IL-6 (A) ve IL8 (B) protein düzeyine etkisi | 79 |
| Şekil 4.14. 24 saatte Der p 1 (5 μ g/mL) ve SERPINB1 siRNA'nın IL-6 (A) ve IL8 (B) protein düzeyine etkisi | 80 |
| Şekil 4.15. 36 saat Der p 1 (5 μ g/mL) ve SERPINB1 siRNA'nın IL-6 (A) ve IL8 (B) protein düzeyine etkisi | 81 |
| Şekil 4.16. 48 saat Der p 1 (5 μ g/mL) ve SERPINB1 siRNA'nın IL-6 (A) ve IL8 (B) protein düzeyine etkisi | 82 |
| Şekil 4.17. Der p 1 (5 μ g/mL) ve SERPINB2 siRNA'nın IL8 protein düzeyine etkisi | 83 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

| | |
|-----------------|------------------|
| °C | Santigrat derece |
| µL | Mikrolitre |
| µm | Mikrometre |
| m | Metre |
| cm | Santimetre |
| g | Gram |
| m ³ | Metreküp |
| mL | Mililitre |
| mm ³ | Milimetreküp |

Kısaltmalar

| | |
|---------|---|
| AAT | alfa-1 antitripsin |
| AFGF | Fibroblast büyüme faktörü |
| APC | Adenomatöz Polipozis Koli |
| B-FGF | Temel fibroblast büyüme faktörü |
| BEAS-2B | Bronş epitel hücre hattı |
| Bla g 1 | <i>Blatella germanica</i> alerjeni grup 1 |
| Bla g 2 | <i>Blatella germanica</i> alerjeni grup 2 |
| BPD | Bronkopulmoner displazi |

| | |
|--------|--|
| CatG | Katepsin G |
| CD14 | Farklılaşma grubu 14 |
| CD40 | Farklılaşma grubu 40 |
| cDNA | Komplementer Deoksiribonükleik Asit |
| CSF | Koloni stimüle edinic faktör |
| Derp1 | <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> alerjeni 1 |
| DNA | Deoksiribonükleik Asit |
| ECP | Eozinofil katyonik protein |
| EDTA | Etilendiamin tetra asetik asit |
| EGF | Epidermal büyüme faktörü |
| FcεRI | Yüksek afiniteli IgE reseptörü |
| FGF | Fibroblast büyüme faktörü |
| GINA | Küresel Astımı Önleme ve Tedavi Girişimi |
| GM-CSF | Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör |
| HCN | Hidrosiyonik asit |
| HDM | Ev tozu akarı |
| HeLa | Henrietta Lacks hücreleri |
| ICAM-1 | Hücre içi yapışma molekülü 1 |
| IFN-γ | İnterferon gama |
| IgE | İmmünoglobülin E |
| IGF-1 | İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 |
| IGF-2 | İnsülin benzeri büyüme faktörü 2 |

| | |
|--------------|-------------------------------------|
| IL-1 β | İnterlökin 1 beta |
| IL-4 | İnterlökin 4 |
| IL-5 | İnterlökin 5 |
| IL-6 | İnterlökin 6 |
| IL-8 | İnterlökin 8 |
| IL-10 | İnterlökin 10 |
| IL-13 | İnterlökin 13 |
| IL-25 | İnterlökin 25 |
| IL-33 | İnterlökin 33 |
| KF | Kistik fibrozis |
| KOAH | Kronik obstrüktif akciğer hastalığı |
| LIF | Lösemi inhibitör faktör |
| LPS | Lipolisakkarit |
| LTC4 | Lökotrien C4 |
| MBP | Miyelin temel proteini |
| MCP-3 | Monosit kemotaktik protein 3 |
| MCP-4 | Monosit kemotaktik protein 4 |
| MDCK | Madin-Darby Canine Kidney |
| MEROPS | Peptidaz veri tabanı |
| MHC | Majör Doku Uygunluk kompleksi |
| MHC-II | Majör Doku Uygunluk Kompleksi 2 |
| MMP-9 | Matriks metalloproteaz 9 |

| | |
|-----------|---|
| NE | Nötrofil elastaz |
| NGF | Sinir büyüme faktörü |
| NO | Nitrik oksit |
| NSP | Nötrofil serin proteaz |
| PAI-2 | Plazminojen aktivatör inhibitör 1 |
| PAMP | Patojen ilişkili moleküler kalıp |
| PDGF | Platelet kaynaklı büyüme faktörü |
| Pen ch 13 | <i>Penicillium chrysogenum</i> alerjisi grup 13 |
| PGD2 | Prostaglandin D2 |
| PR3 | Proteinaz 3 |
| PRR | Kalıp tanıma reseptörü |
| RANTES | Aktivasyon ile regüle olan eksprese ve sekrete edilen T hücreleri |
| RNA | Ribonükleik Asit |
| SARP | Ağır Astım Araştırma Programı |
| SERPINA1 | Serin proteaz inhibitörü A1 |
| SERPINA6 | Serin proteaz inhibitörü A6 |
| SERPINA7 | Serin proteaz inhibitörü A7 |
| SERPINA8 | Serin proteaz inhibitörü A8 |
| SERPINC1 | Serin proteaz inhibitörü C1 |
| SPINK5 | Serin Proteaz İnhibitör Kazal-tip 5 |
| TCR-1 | T hücre reseptörü 1 |
| TCR-6 | T hücre reseptörü 6 |

| | |
|---------------|---|
| TCR-9 | T hücre reseptörü 9 |
| TGF- α | Transforme edici büyüme faktörü- α |
| TGF- β | Transforme edici büyüme faktörü- β |
| Th0 | Yardımcı T hücre 0 |
| Th1 | Yardımcı T hücre 1 |
| Th2 | Yardımcı T hücre 2 |
| TJ | Sıkı bağlantı |
| TNF | Tümör Nekrozis Faktör |
| TNF- α | Tümör Nekrozis Faktör Alfa |
| TSLP | Timik stromal lenfopoetin |
| TÜİK | Türkiye İstatistik Kurumu |
| UV | Ultraviyole |
| VCAM-1 | Vasküler sellüler adezyon molekülü |
| VLA-4 | Çok geç antijen |
| ZO-1 | Zonula okludens-1 |
| ZO-2 | Zonula okludens-2 |
| ZO-3 | Zonula okludens-3 |

1. GİRİŞ

Astım, dünya çapında yaklaşık 300 milyon insanı etkileyen bir solunum yolu hastalığıdır. Global bir problem olan astım, gelişmekte olan ülkelerde tüm yaş gruplarında artış eğilimi göstermektedir. Kronik hava yolu hastalığı olan astımın farklı ülkelerdeki sıklığı %1-8 arasında değişiklik göstermektedir. Havayolu inflamasyonunun astım patogeneziine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Ancak inflamasyon ve hava yolu aşırı duyarlılığı arasındaki doğrudan ilişki hala aydınlatılamamıştır.

Astım görülme sıklığı İskoçya'da %18,4, İngiltere'de %15,3 ve Avustralya'da %14,7 sıklıkla son derece yüksek iken Endonezya'da %1,1, Romanya'da %1,5 ve Yunanistan'da %1,9 sıklıkla oldukça düşüktür. Balkan ülkeleri ve Kafkasya bölgesinde yer alan ülkelerde astım prevalansı geniş bir yelpazede dağılım göstermektedir. Türkiye'de astım prevalansın çocuklarda % 0,7-14,8, erişkinlerdeyse % 0,3 -7,6 oranı ile yüksek olduğu görülmektedir.

Astım, çok sayıda uyarana karşı, çeşitli inflamatuvar hücrelerin artan infiltrasyonu, epitel hasarı, hava yolu düz kas hipertrofisi ve bronş duvarlarında mukoza hipersekresyonu ile karakterize edilmiştir. Astımlı bireylerde hırıltı, nefes darlığı, göğüs sıkışması ve öksürme gibi semptomlar vardır. Astımlı bireyde bu belirtilerin ortaya çıkmasında çevresel faktörler ve bireysel faktörler rol oynamaktadır. Çevresel faktörler; yaşam ya da çalışma ortamında yer alan tetikleyiciler, tütün dumanıyla karşılaşma, hava kirliliği, diyet ve alerjenler şeklinde sayılabilir. Bireysel faktörler ise obezite, cinsiyet ve genetik faktörlerdir.

Astımın klinik olarak tanımlanmış farklı formları olmasına rağmen son 30 yılda tedavi ve araştırmanın hedefinde alerjik astım olmuştur. Çocukluk çağı astım olgularının %60-90'ı; erişkinlerin ise %50'si alerji ile ilişkilidir. Alerjenle karşılaşma sonrasında yatkınlığı olan kişiler duyarlı hale gelirler. Duyarlanmanın başlaması solunum, oral, deri ya da enjeksiyon yoluyla alerjen moleküllerinin alınmasıyla gerçekleşir.

Hava yollarında alerjenlerle karşılaşan ilk hücreler epitel hücrelerdir. Epitel hücreleri fiziksel bariyer oluşturarak virüsler, bakteriler ve alerjenlerin zarar verici etkilerine karşı hava yollarını korur. Epitel hücreleri salgıladıkları çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler yoluyla doğal ve kazanılmış immünite arasında adeta bir köprü görevi görür. Epitel hücreler sahip oldukları oldukça düzenli yarı geçirgen bariyer yapıyı protein kompleks yapıları ile sağlarlar. Apikal–bağlanma kompleksleri (ABK) olarak isimlendirilen bu yapılar silindirik yapıdaki hücrelerin lümene bakan yüzeylerinde bulunan sıkı bağlantı molekülleri (Tight Junctions-TJs), alt ve yan yüzeylerinde yer alan çeşitli tutunma (adhesion) molekülleri ve desmezomlardan oluşur.

Alerjenlerin büyük çoğunluğu proteaz aktivitesine sahiptir ve sahip oldukları proteaz aktivitesi yoluyla epitel hücrelerdeki bağlantı molekülleri üzerinde etkili olurlar. Proteazları serin, sistein, aspartik ve metallo proteazlar olmak üzere dört sınıfa ayırmak mümkündür.

Ev-tozu akarı alerjenlerinin ve polen alerjenlerinin proteazları proteolitik aktiviteleriyle sıkı bağlantı proteinlerini doğrudan ekstraselüler parçalanma yoluyla hasara uğratarak epitel bütünlüğü bozarlar. Bu proteolitik alerjenlerin asıl olarak hücre hasarı ya da ölümüne değil hücreler arası (paracelluler) yollara etki ettiği görülmektedir. Astımda rastlanan Th2 (yardımcı T hücre 2) sitokinlerin hâkim olduğu ortamın epitel bariyer fonksiyonunu olumsuz etkilediği gözlenmiştir. IL-4 (İnterlökin 4) ya da IL-13 (İnterlökin 13) ile karşılaşma sonrasında epitel hücrede ZO-1 (Zonula okludens-1) ve okkludin ifadesinde anlamlı olarak düşüşün gerçekleştiği; bunu geçirgenlikteki artışın izlediği bulunmuştur. Astımda hava yolu epitelinin bütünlüğünün bozulduğu ve geçirgenliğinin arttığı hem *in vitro* hem de *in vivo* sistemlerde gösterilmiştir. Bunların dışında epitel hücrelerdeki çeşitli uyaranların etkisiyle ICAM–1 (Hücre içi yapışma molekülü 1) başta olmak üzere, hücre – hücre etkileşiminde rol oynayan adhezyon moleküllerinin, MHC I (Majör Doku Uygunluk kompleksi 1) ve MCH II (Majör Doku Uygunluk kompleksi 2) antijenlerinin ifadesi arttığı gösterilmiştir.

Epitel bütünlüğünün bozulması enfeksiyöz ajanların, alerjenlerin submukozal dokulara geçişine neden olur. Bu da inflamatuvar yanıtın gelişmesine katkıda bulunur. Proteaz alerjenler yalnızca epitel bütünlüğünü bozmakla kalmaz, aynı zamanda epitel hücrelerden IL-6 (İnterlökin 6), IL-8 (İnterlökin 8), MCP-1 (Monosit kemotaktik protein 1), GM-CSF (Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör), RANTES (Aktivasyon ile regüle olan eksprese ve sekrete edilen T hücreleri), IL-25 (İnterlökin 25), IL-33 (İnterlökin 33) ve TSLP (Timik stromal lenfopoetin) gibi sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin ifadesinde artışa sebep olur.

Alerjik astım gibi alerjik hastalıkların sıklığının artmasına katkı yapan alerjenlerin başında ev tozu akarları gelir. İki baskın ev tozu akarı türünde, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1) ve *Dermatophagoides farinae* (Der f 1), bugüne kadar en az on yedi alerjen grubu tanımlanmıştır. Der p 1 ve Der f 1 in bulunduğu grup 1 sistein proteaz aktivitesine; grup 3, 6 ve 9 ise serin proteaz aktivitesine sahiptir.

Hücreler, proteazların yıkıcı etkilerine karşı proteaz inhibitörleriyle donatılmıştır. Hücrede proteaz ve proteaz inhibitör dengesindeki bozulma KOAH, bronkopulmoner displazi ve astım gibi hastalıklara yol açmaktadır.

Proteaz inhibitörleri substratlarına ve inhibisyon mekanizmalarına göre iki farklı şekilde sınıflandırılabilir. İnhibe ettikleri proteazlara göre proteaz inhibitörleri serin, sistein, aspartik ve metalloproteaz inhibitörleri şeklinde sınıflandırılırken; inhibisyon mekanizmalarına göre intihar tipi inhibitörler (suicide), geçiş durumu inhibitörler (transition state), protein proteaz inhibitörler ve şelat ajanları (chelating agents) şeklinde sınıflandırılırlar.

Bu tez çalışmasında SERPINB1 ve SERPINB2 proteaz inihibörlerinin epitel hücrede ifade olan inflamatuvar sitokin, kemokin ve büyüme faktörleri üzerine etkisi RNA ve protein düzeyinde araştırılmıştır.

SERPINB1, monosit nötrofil elastaz (NE) inhibitörü olarak da bilinen, serpin süper ailesinden bir proteindir ve NE, kathepsinG (Cathepsin G (CG)) ve proteinaz-3'ün en

etkili inhibitörlerinden biridir. Serpin ailesine ait bir proteaz inhibitör olan SERPINB1, ailenin diğer üyelerinde olduğu gibi yüksek oranda sentezlenen proteazlara karşı homeostazdan sorumludur. SERPINB1' in fonksiyonunun bozulması, aktive olmuş nötrofillerin infiltrasyonu ve daha sonra proteaz salımı ile ilişkilendirilerek havayolu inflamasyonu ve akciğer doku hasarına neden olur.

SERPINB2, serin proteaz inhibitör ailesinin diğer bir üyesidir ve plazminojen aktivatör inhibitörü tip 2 ve ürokinaz inhibitör olarak da adlandırılır. SERPINB2 proteaz inhibitörünün plasenta, monosit ve makrofajlarda ifade olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir. SERPINB2, plazminojen aktivatörlerini inhibe etmesi sebebiyle plazminin aktivasyonunu önleyen bir serin proteaz inhibitörüdür. Plazmin, hücre dışı matrisi, doğrudan glikoproteinleri kaldırarak ya da metalloproteinazları aktive ederek çözebilir.

Astımda olduğu gibi epitel bariyer bütünlüğün bozulduğu durumlarda, farklı proteazlara karşı verilen proteaz inhibitör cevabı bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında epitel hücrelerde alerjen proteaz Der p 1 ile karşılaşma sonrasında ifadesi değişen SERPINB1 ve SERPINB2 proteaz inhibitörlerinin inflamatuvar cevaptaki rolü araştırılmıştır. Bu amaçla SERPINB1 ve SERPINB2 proteaz inhibitörlerine özgü siRNA'lar ile genler susturularak sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin değişen ifadeleri, gerçek zamanlı PZR yöntemiyle RNA düzeyinde ve ELİSA yöntemiyle protein düzeyinde araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Astım Tanımı

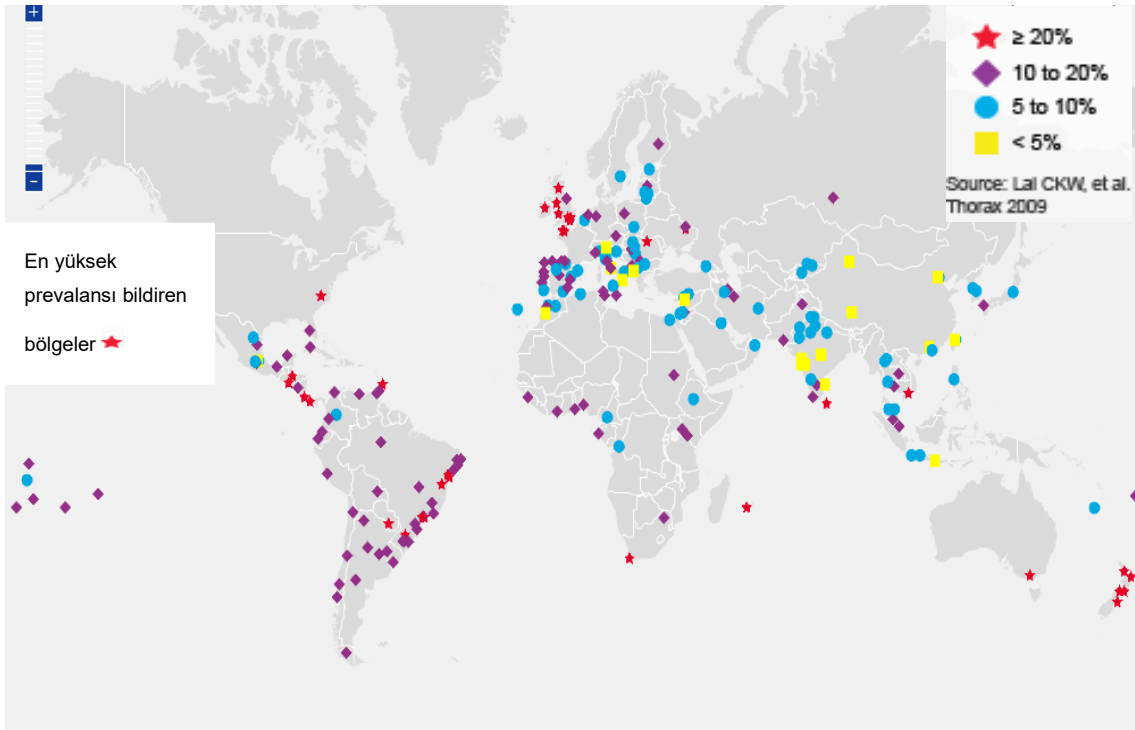
Astım, hava yolunda aşırı duyarlılık ile karakterize kronik inflamatuvar bir hava yolu hastalığıdır [1]. Astım genel olarak; değişken semptomlu, geri dönüşümlü hava yolu obstrüksiyonu, bronşiyal hiperreaktivite ve kronik hava yolu inflamasyonu ile karakterize edilir [2]. Hava yollarının inflamasyonu nedeni ile tekrarlanan ataklar şeklinde nefes darlığı, hırıltılı solunum, göğüste sıkıntı hissi ve genellikle geceleri görülen öksürük şikayetleri oluşur. Bu şikayetlere, tedavi ile geri dönüşlü ya da kendiliğinden gerileyen hava yolu obstrüksiyonu da eklenir [3, 4].

Astımın ortaya çıkması ve gelişmesini etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır. Bunlar temel olarak çevresel ve bireysel faktörler şeklinde ikiye ayırabiliriz. Çevresel faktörler; alerjenler (ev tozu, polen, moled sporlar, mantarlar, hayvanlar, böcekler vs.), gıda ve gıda katkı maddeleri, ilaçlar (antibiyotik, aspirin, ağrı kesici vb), hiperventilasyon ve fiziksel güç ve parazitik enfeksiyonlar sayılabilir. Bireysel faktörler ise; obezite, cinsiyet ve temelde genetik faktörlerdir [4, 5].

2.2. Astım Prevalansı

Astım hastalığının dünyada 334 milyon kişiyi etkilediği tahmin edilmektedir. Yaklaşık olarak her 250 ölümden birinin astıma bağlı olduğu bildirilmiştir [3, 6] (Şekil 2.1). Astım üzerinde en çok araştırma ve çalışma yapılan hastalıklardan biri olmasına rağmen, herkes tarafından kabul edilmiş, kesin bir tanımı yoktur. Çocuklarda ve erişkinlerde astım prevalansını ölçmek için uygulanan standartlaştırılmış yöntemler referans alınarak, prevalansın dünyanın farklı ülkelerinde ki toplumlarda %1-18 arasında değiştiği gösterilmiştir [3, 6, 7].

Ülkemizde yapılan çalışmalarda, astım prevalansı çocuklarda %0,7-14,8 arasında, erişkinlerde ise %0,3-7,6 arasında olduğu bildirilmiştir [8]. Bu hesaplama göz önüne alındığında yaklaşık olarak 3 – 4 milyon astım hastası olduğu tahmin edilmektedir. Türkiye’de de Dünya’daki gözlemlere paralel olarak prevalanslar bölgeden bölgeye farklılık göstermiş, erişkinlerde %2-6, çocuklarda %5-10 aralığında veriler elde edilmiştir. Sağlık Bakanlığı’nın 2011 Sağlık İstatistikleri Yıllığı’nda yer alan 2010 yılı TÜİK Sağlık Araştırması verilerinde, 15 yaş ve üzeri bireylerde hekim tarafından teşhis edilen hastalık-sağlık sorunları dağılımlarında, alerjik astım dahil, astım hastalığının kadınlarda daha çok olmak üzere popülasyonun %4,8’inde görüldüğü açıklanmıştır [8].

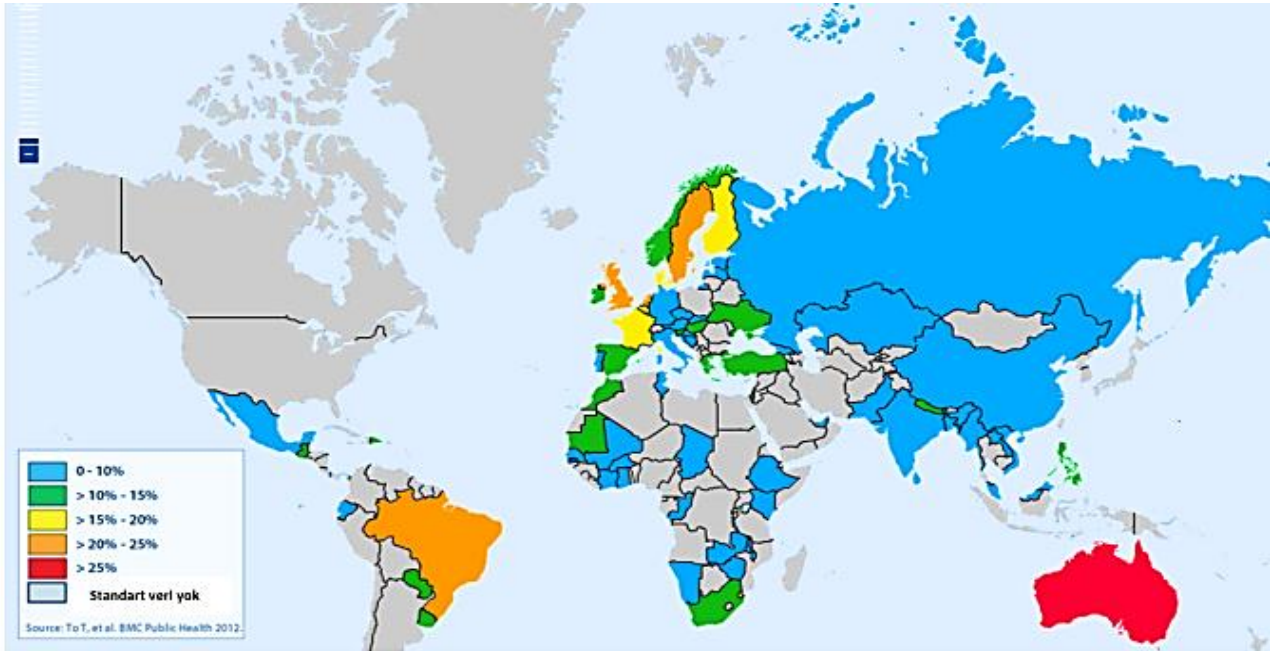


Şekil 2.1. Dünyadaki 13-14 yaş arası astım belirtileri prevalansı (GINA 2014) [9]

Kırmızı ile gösterilen bölgelerdeki astım prevalansı %20 den fazla, astım sıklığı oldukça yüksek olan bölgelerdir. Mor ile gösterilen bölgeler %10-20, mavi ile gösterilen bölgeler

%5-10 oranlarında orta derecede, sarı ile gösterilen bölgeler de ise %5 in altında daha seyrek astım gözleendiği, GINA 2014 raporunda belirtilmektedir.

Dünya genelinde astım görülme sıklıkları arasında büyük farklılık bulunmaktadır. Papua Yeni Gine'de neredeyse hiç astım vakası bulunmazken, Batı Pasifik'te bulunan Karolin adalarında astım sıklığı %50 civarındadır. Asya'da prevalans Çin'de %0.7-3.8 olarak, Malezya'da ise %8 bulunmuştur [10]. İskandinav ülkelerinde astım prevalansı ortalama %4-5 aralığındadır. İngiltere'deki oran ise %10-15 arasındadır. En yüksek astım prevalansı Avustralya ve Yeni Zelanda'da bulunmaktadır %10-25. En düşük prevalanslar ortalama %5 ve daha az oranda, Doğu Avrupa ülkeleri, Yunanistan, Çin, Endonezya, Hindistan, Özbekistan, Habeşistan ve Tayvan'da saptanmaktadır [8, 11].



Şekil 2.2. 70 ülkede 18 ila 45 yaş arasındaki kişilerde astım semptomlarının yaygınlığı, Dünya Sağlık Araştırması 2002-2003 [6]

GINA 2014 raporunda gösterilen, 2002-2003 yıllarında Dünya Sağlık Araştırması'nın yaptığı çalışma verilerine göre, yukarıdaki haritada kırmızı ile belirtilen bölgede %25 ve üzeri bir oranda astım sıklığının en sık görüldüğü, bunu takiben turuncu ile belirtilen yerlerde %20-25 arasında astım sıklığının yüksek olduğu bölgeler gösterilmektedir. %15-20 ile sarı ile boyanmış bölgeler ile %10-15 oranında yeşil bölgelerin astım sıklığı belirtilmiştir. Astım prevalansının diğer bölgelere oranla daha az olduğu mavi bölgelerde ise oranın %10 ve daha altında olduğu tespit edilmiştir. Gri boyalı bölgelerde ise standart bir veriye ulaşılamamıştır.

2.3. Astımın Ortaya Çıkışı ve Gelişmesinde Etkili Risk Faktörleri

Astımın ortaya çıkışında etkili olan faktörleri çevresel ve genetik faktörler altında iki ana grupta toplamak mümkündür.

2.3.1. Çevresel Faktörler

Astım, genetik ve çevre koşullarının bir arada rol oynadığı kompleks bir hastalıktır. Astımın ortaya çıkmasına yol açan çevresel faktörler Çizelge 2.1 de verilmiştir.

2.3.1.1. Alerjenler

Genetik olarak duyarlı bireylerde artmış alerjen maruziyeti, alerjik duyarlılığa yol açabilir. Alerjene maruz kalma, konakçının alerjik olarak duyarlanmasında çok önemlidir. Çocuklarda ve erişkinlerde astım belirtilerinin en önemli tetikleyicisi olarak bilinmektedir. Astım seyrinde, hedef organ akciğerdir ancak havayollarında var olan inflamasyon astımın kontrolünü güçleştirir. Ev tozu akarları, ağaçlar, otlar ve hayvan tüyleri gibi alerjenlere (aeroalerjenler) karşı antijen-özgül IgE antikorunun yapımı 2-3 yaşına kadar gerçekleşmez. Bu yüzden, aeroalerjenlerin tetiklediği astım, adölesan çağı öncesinde sık değildir. Fakat adölesan ve geç çocukluk çağı dönemlerinde, sıklık artarak pik yapar [12].

En yaygın alerjen duyarlılığı, iç ortam alerjenleri olan, ev tozu akarı, kedi, köpek ve iç mekan küfleridir. Dış ortam alerjenlerinden polenler ve mantarlar duyarlılık ve astım gelişimi açısından önem taşımaktadırlar (Çizelge 2.1.) [5]. Kişinin duyarlı olduğu alerjenle

karşılaşması astım belirtilerinin ortaya çıkmasına ve kalıcı hale gelmesine yol açmaktadır [13, 14].

Çizelge 2.1. İç ortamda ve dış ortamda var olan bazı alerjenler

| İç Ortam Alerjenleri |
|---|
| Akarlar (Ev tozu akarları, depo akarları) Mantarlar (Aspergillus, Penicillium) Hamamböceği Evcil hayvanlar |
| Dış ortam Alerjenler |
| Polenler (çayır, ağaç, yabani ot) Mantarlar (Alternaria, Cladosporium) |

2.3.1.2. Sigara

Aktif sigaranın astım gelişimi için risk faktörü olduğu gösterilmiştir, sigara kullanan kadınlar özellikle risk altındadır. Sigara içenlerin astımlılar arasında sıklığı, genel popülasyonda olduğu gibi hemen hemen aynıdır.

Sigara içmek oksidatif stresi artırır ve astımlı olmayanların akciğerleri üzerinde proinflamatuvar etkileri vardır, bunlar astım gelişimi için predispozan değişikliklerdir. Sigara, astım hastalarında hava yolu enflamatuvar hücrelerinin (nötrofiller, makrofajlar) yanı sıra inflamatuvar sitokin üretiminin sayısını artırır [15]. Havayolu epitelyumu sigara dumanı ile doğrudan temas halindedir ve nötrofil alımından IL-1 β ve IL-8 sorumludur [16]. Epitelyum ayrıca, geçirgenliğin artmasına ve bariyer fonksiyonunun değişmiş mitokondri yapısına ve işlevine, gen ekspresyon modellerinde değişikliklere ve sigara dumanına tepki olarak yaşlanmaya yol açan sıkı bağlantıların bozulması gibi birçok değişikliğe uğrar [17, 18]. Uzun dönemde akciğer fonksiyonlarında bozukluklara yol açarak, aktif

içiciliğin inhale ve sistemik steroid tedavilerine olan yanıtı azaltmasına sebep olduğu bilinmektedir [19, 20].

2.3.1.3. Hava Kirliliği

Trafik ve enerji üretimi kentsel hava kirliliğinin ana nedenlerindedir. Hava kirliliğinin mevcut astımı alevlendirdiği ve astım başlangıcını tetiklediği çalışmalarla kanıtlanmıştır. Hava kirlleticileri hava yollarında oksidatif hasara neden olur, bu da iltihaplanma, yeniden yapılanma ve hassasiyet riskini artırır [21]. Ek olarak, oksidatif stresin yollarında yer alan genlerin polimorfizmi, hava kirliliğine cevap olarak astıma duyarlılığı etkileyebilir. Bununla birlikte, hava kirliliği ve erişkin başlangıçlı astım arasındaki ilişkilerin yanı sıra mekanizmalar hala belirsizdir ve daha ileri çalışmalar gerektirir [22].

2.3.1.4. Diyet

Hem hastalık gelişiminde hemde öncesinde astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi hastalıklarda diyetin önemini gösteren önemli kanıtlar ortaya çıkmıştır [23]. Diyet antioksidanları solunum yollarının bir özelliği olan solunum yollarındaki oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı korunmada önemli bir diyet faktörüdür. Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif stres, hava kirliliği, havadaki iritanlar ve tipik hava yolu enflamatuvar hücre yanıtları gibi çeşitli maruziyetlerden dolayı akciğerlerde üretilir. Ayrıca, artan ROS seviyeleri, NF-κB aktivasyonu ve proinflamatuvar medyatörlerin gen ekspresyonu yoluyla hava yollarında daha fazla inflamasyon oluşturur [24]. Endotel hücre dizilerinden elde edilen in vitro veriler, C vitamininin, IL-1, TNF-a ile NF-KB aktivasyonunu inhibe edebileceğini ve C vitamininin antioksidan aktivitesine bağlı olmayan mekanizmalar yoluyla IL-8'in üretimini önleyebildiğini göstermiştir [25].

2.3.2. Bireysel Faktörler

Astımın ortaya çıkmasına neden olan ve gelişimini tetikleyen ikinci risk faktörleri grubunu bireysel faktörler olarak ana başlık altında toplamak mümkündür. Genetik faktörler, obezite ve cinsiyet en önemli bireysel risk faktörlerindedir.

2.3.2.1. Obezite

Epidemiyolojik verilere göre, yağlanmanın artmasıyla birlikte, astımın şiddetlendiği görülmektedir. Obeziteye bağlı astım, artan morbidite ve astım tedavilerine verilen farklı tepkiler ile ilişkilidir. Artan hava yolu inflamasyonuna neden olabilen sistemik inflamasyon ile karakterizedir [26]. Obeziteden etkilenen leptin ve adiponektin gibi hormonlar, doğal immün cevap ve alerjik tepki oluşmasında rol oynarlar [27].

2.3.2.2. Cinsiyet

Ergenlikten sonra kadınlar, açıkça astımdan daha fazla etkilenir ve daha ağır hastalığa sahip olurlar. Hormonların hastalık patogenezinde yer aldığı düşünülmektedir. Menopoz sonrası hormon tedavisi gören kadınlarda, astım riskinin genellikle menopoz sonrası azaldığı bildirilmiştir [28, 29]. Periferik kan eozinofillerinin yakın zamanda G-protein bağlı östrojen reseptörü (GPER) eksprese ettiği ve eotaksin (eozinofiller için kemotaktik ajan) varlığında bu reseptörle güçlendirilmiş kemotaksisin aktivasyonu ve modüle edilmiş eozinofil canlılığı gösterilerek, östrojen ve eozinofiller arasındaki etkileşimin doğrudan bir mekanizması olduğu gösterilmiştir [30, 31]. Bu çalışmaların da gösterdiği gibi astım riskinin, erkeklerde kadınlardan daha sık ve şiddetli olduğunu düşündürmektedir. Cinsiyete bağlı bu farklılığın nedeni yine de tam olarak açıklanamamıştır.

2.3.2.3. Genetik

Astım hastalığı genel popülasyonda %5-10 civarında görülürken, anne veya babadan birisi astımlı ise çocuklarında görülme olasılığı 2 ila 3 kat, ikisi de astımlı ise bu olasılık 6 ila 7 kat artış göstermektedir. Bunun gibi bulgular astımda genetik faktörlerin önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir [32]. Astım patogenezinde birçok gen rol oynamaktadır. Şimdiye kadar bulunan astım duyarlı genlerin çoğu, aynı zamanda, astım ve diğer hastalıklar arasındaki ilişkiyi genetik düzeyde yansıtan, alerjik hastalıklar ve hava yolu aşırı duyarlılık hastalıkları ile de ilgili olan bağışıklık ve iltihap süreçlerinde yer almaktadır. Genel olarak astım-duyarlı genlerin, çoğunlukla farklı popülasyonlarda çoklu deneylerle belirlenen 5q31-33, 6p21, 12q13-q24 ve diğer kromozomal bölgelerde yer aldığına inanılmaktadır [33].

Astıma yatkılığa neden olan genler, inflamasyon ve immün yanıt yoluna katılanlar ve hava yolu yapısı ve akciğer fonksiyonu ile ilişkili olanlar olmak üzere iki kategoriye ayrılmıştır. İnflamasyon ve immün yanıt yolu astımın patogeneğinde özellikle önemlidir. İnsan lökosit antijeni (HLA), T yardımcı hücrelerinde inflamasyonun düzenlenmesinde rol oynar. HLA sınıf II molekülleri antijen sunumunda yer alır ve polimorfizmleri sunum etkinliğini belirler. Bu astımın başlangıcı ile yakından ilgilidir [34].

İnterlökinler, kemokinler ve tümör nekrozu faktörü dahil olmak üzere enflamatuar hücreler tarafından salgılanan sitokinler, astımı tetiklemede ve kronik hava yolu inflamasyonunu desteklemede rol oynarlar. Sitokinleri kodlayan bu genler önemli bir astım duyarlı gen tipidir ve polimorfizmi astımın şiddetini etkiler. Toll-benzeri reseptörler, hava yolu epitel hücreleri, makrofajlar ve B hücreleri yüzeyinde bulunan patern tanıma reseptör moleküllüdür. TLR2, TLR4, TLR6, TLR9 ve TLR10 polimorfizmleri astım riski ile anlamlı şekilde ilişkilidir [35].

ADAM33, hava yolu stromal hücrelerinde eksprese edilen, pozisyonel klonlama çalışmaları ile tanımlanmış, hava yolu aşırı duyarlılığında rol oynayan ve azalmış akciğer fonksiyonu ile ilişkili olan astım duyarlı bir gendir [36].

17q21 lokusundeki ORMDL3 geninin, hastalığın seyri sırasında çeşitli iltihaplı hücrelerde ifade olduğu ve hava yolu yeniden modellemesi ile ilişkili olduğu için astım ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir [37].

ADAM33, TNF, GSTP1, GSTM1 ve GSTT1 gibi duman maruziyetine bağlı bazı astım duyarlı genleri değerlendirmek için genom çapında ekspresyon profili çalışmaları yapılmıştır [38]. Yine benzer bir çalışma, IL-9 geninin toz akarları ile etkileşiminin, çocuklarda astım semptomlarının alevlenmesine yol açtığını göstermiştir [38].

Örneğin, TLR2 ve TLR4 genlerinin, gram-negatif bakteriler tarafından üretilen toksik maddelerin endotoksin maruz kalma faktörü ile etkileştiği bulunmuştur [39].

Çizelge 2.2 Astım ve alerji ile ilişkilendirilmiş genler [40]

| Kromozom | İlişkili genler |
|-----------------|--|
| 1p | IL-12 reseptörü, JAK1, PAF reseptörü, endotelin 2 |
| 2q | IL-1, IL-1Ra, ICOS, CTLA-4, CD28 |
| 3p24 | bcl-6 (stat-6 bağlanması inhibisyonu), CCR4 |
| 5q23–q25 | IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, GM-CSF, lokotrien C4 sentetaz, makrofaj-CSF reseptör, b2-AR, GR, TIM-1, TIM-3, CD14, SPINK5 |
| 6p21–p23 | MHC, TNFs, antijen işlenmesi ve sunumunu kapsayan taşıyıcılar (TAP-1 ve 2), LMP partikülleri |
| 7q11–q14 | T-hücre reseptörü, gama zincir, IL-6 |
| 10q | 5-LO |
| 11q13 | Yüksek afiniteli IgE reseptörü (FcεRI) |
| 12q14–q24 | IFN-gama, IL-22, SCF, nitrik oksit sentetaz, NF-YB (HLA genleri için transkripsiyon faktörü), ILGF-1, lokotrien A4 hidrolaz, |
| 13q21–q24 | Sisteinil lokotrien 2 reseptör |
| 14q11–q13 | T-hücre reseptörü (alfa/delta zincirleri) |
| 16p11–p12 | NF-kB, MCC |
| 17p12–p17 | IL-4 reseptör |
| 17q | CCL5 (RANTES) |
| 19q13 | CD22, TGF-b1 |
| 20p13 | ADAM33 |
| Xq13 | IL-13 reseptör, yaygın γ chain |

| | |
|----|---------------|
| Xp | MAOB |
| Y | IL-9 reseptor |

2.4. Astım Patogenezi

Hava yolu inflamasyonu ve hava yolu yeniden yapılanması, astımın fizyolojik nedenleridir. Hava yollarında dış ortamla karşılaşan ilk hücreler epitel hücreleridir. Enflamasyon çoğunlukla bronşlarda ve trakeada ortaya çıkar, fakat aynı zamanda semptomun artması ile birlikte alveollerin yakınında bile trakea boyunca proksimal ve distale yayılabilir [36]. İnflamasyon, inflamatuvar hücreler (eozinofiller, mast hücreleri, T lenfositleri, nötrofiller, makrofajlar ve hava yolu epitel hücreleri) ve yapısal hücreler (epitel hücreleri ve düz kas hücreleri) ile yakından ilişkilidir. Ek olarak, bu hücreler, sitokinler, kemokinler, sistein lökotrienler ve interferonlar gibi mediyatörler üretirler; bunlar, bronşiyal düz kas kasılmasına neden olabilir ve mukus salgılanmasını arttırabilir, ayrıca inflamatuvar ortamı daha da kötüleştirebilir [41]. Geri dönüşümlü hava yolu tıkanıklığı ve hava yolu aşırı duyarlılığı astımın başlıca özellikleridir. Ek olarak, solunum yolu hasarı ve daha sonraki onarımı, çoğunlukla subepitelyal fibroz, düz kas kalınlaşması ve bazal membran kalınlaşması olmak üzere hava yolu yeniden modellemesine yol açar. Hava yolu yeniden modellemesi, solunum yolu yapısında geri dönüşümsüz değişiklikler yapar ve akciğer hasarına neden olur, astım tedavisini zorlaştırır [42].

IL-4 ve IL-5 dahil olmak üzere Th2 sitokinleri, lokal infiltrasyon ve eozinofillerin aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır, diğer Th2 sitokinler IL-10 ve IL-13 ise hava yolu hiperreaktivitesini ve alerjik inflamasyonu indüklemeye önemlidir. Bir uyarı ile uyarılan IgE sentezi, IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13 salgılamak üzere Th hücrelerinin Th2 hücrelerine farklılaşması için sitokinleri serbest bırakmak üzere eozinofilleri, bazofili ve mast hücrelerini tetikleyebilir [43]. Th2 sitokin IL-10, proinflamatuvar sitokinlerin alerjenle indüklenen hava yolu inflamasyonu ve spesifik olmayan hava yolu yanıtılığının

salgılanmasını baskılayan bir anti-inflamatuar sitokindir. Daha yeni çalışmalar, astım hastalarında, hafif hastalığı olanlarda bile bronşiyal biyopsi örneklerinde belirgin inflamasyon bulmuştur [44].

Bir hava yolu uyarıcısı dendritik hücrenin içine girdikten sonra, katepsin S ile allerjenlerin işlenmesi ve HLA molekülleri (MHC sınıf II) üzerine yüklenen ve bunlara yüklenen peptitlerin seçilmesi, bu hücreler T lenfositlerine antijen sunan hücreler olarak hizmet etmektedir. Dendritik hücre alerjene geçtiğinde, antijen sunumunun gerçekleştiği lokal lenfoid koleksiyonlarına geçmek için sinyaller alır. CCR7, onun CCL19 ve CCL21 ligandları dahil olmak üzere spesifik kemokin reseptörleri, naive T hücreleri ile teması sağlamak için bu kemotaktik migrasyonda yer alır. Seçilen bir antijen peptidinin T hücresi reseptörüne sunulması, duyarlılığı ve spesifik alerjene karşı müteakip immün yanıtı başlatır [45]. Bu bağışıklık cevabının doğası, seçici eş-uyarıcı moleküllerin birbirine geçmesinin paralel olarak gerçekleşip gerçekleşmemesine bağlıdır. Etkili antijene bağımlı T hücresi aktivasyonu için CD80 veya CD86'nın T hücreleri üzerindeki CD28 ile dendritik hücreler üzerinde birleşmesi, duyarlılaşmaya yol açar, oysa bu modülatör moleküllerin yokluğu veya verimsiz olması anerjiye yol açabilir. Duyarlılığı önlemek ve T hücrelerini anerjik hale getirmek için alternatif bir yöntem, CD28 için CD80 veya CD86'dan daha yüksek bir afiniteye sahip olan ve bu nedenle CD80 / CD86 kostimülasyonunu önleyebilen ikinci bir uyarıcı molekül olan sitotoksik T-lenfosit antijeni (CTLA) 4'ün birleşmesidir. Bu, romatoid artrit gibi hastalıklarda ve alerjen kaynaklı hava yolu inflamasyonunun bir hayvan modelinde immünomodülatör bir ajan olarak kullanılan CTLA4-immünoglobulin füzyon proteini abatacept'in başarılı klinik uygulamasının temelidir [46].

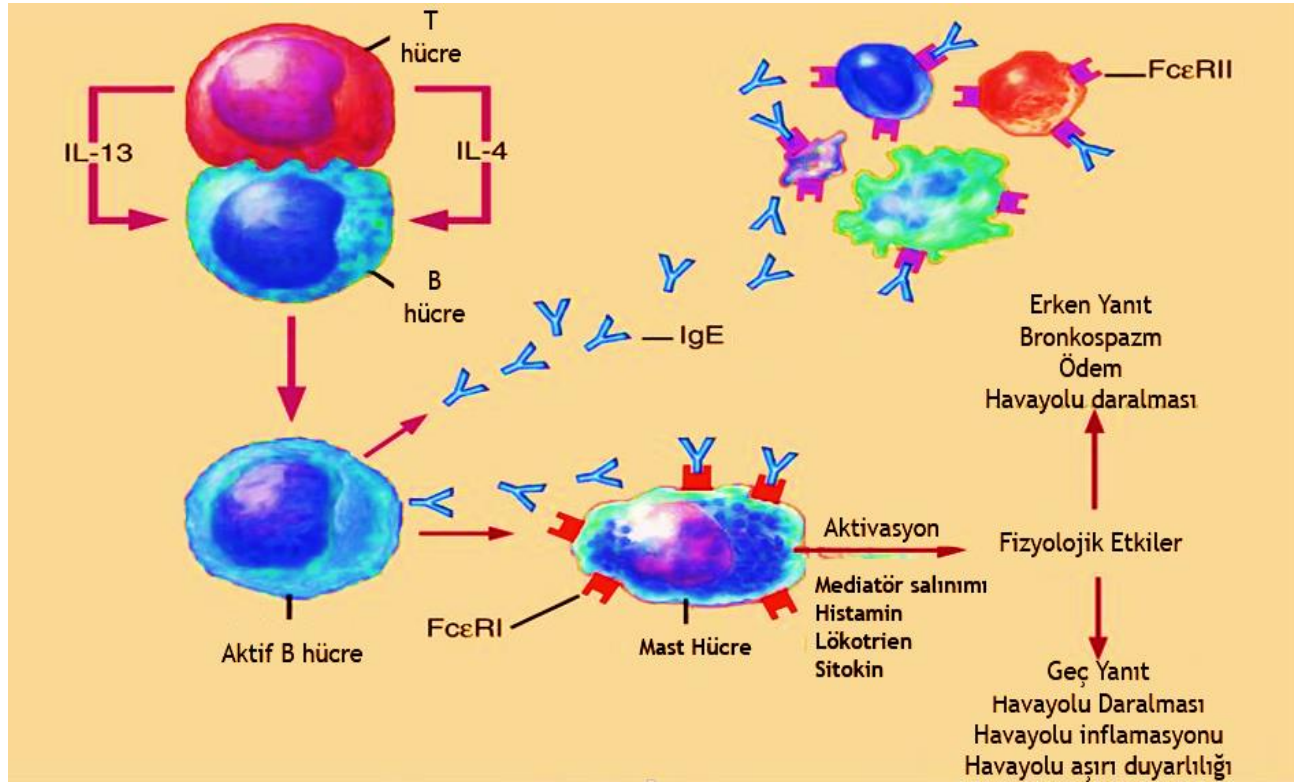
Dendritik hücrelerin IL-12 üretme kapasitesi, Th1 ve Th2 tepkileri arasındaki dengeyi, bir Th1 yanıtının lehine IL-12 polarize edici T hücresi farklılaşmasını belirler. Bir kez duyarlı hale getirildikten sonra, T hücreleri, CCL11, CCL24, CCL26, CCL7, CCL13, CCL17 ve CCL22 kemokinlerinin etkisi altında sadece antijen prezantasyonu yerine hava yollarına geri göç etmekle kalmaz, bu hücreler aynı zamanda, büyük çoğunluğu, kromozom 5'in

uzun kolunda, fakat aynı zamanda IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 ve GM-CSF üzerinde eksprese edilen bir dizi sitokin üreticisi olurlar [47].

Bir kez duyarlı hale getirildikten sonra, T hücreleri, kemokin CCL11, CCL24, CCL26, CCL7, CCL13, CCL17 ve CCL22 ve T hücreleri tarafından üretilen IL-2'nin etkisi altında antijen sunumu bölgesine hava yollarına geri göç etmekle kalmaz, ayrıca antijen ile indüklenen T'yi de artırır.

Sitokin üretimi yoluyla, makrofajlar, bazofiller ve eozinofiller gibi ikincil efektör hücrelerin, bu hücrelerin başlatıldığı ve daha sonra mediatör sekresyonu için aktive olduğu enflamatuvar bölgeye yerleştirme kapasitesi vardır [48, 49]. Ayrıca, IL-4 ve IL-13 salgılayan CCR91 doğal öldürücü T hücrelerinin kronik astımdaki enflamatuvar cevabı düzenlemede rolü vardır.

Epitel hücreleri alerjenler, hava kirleticileri ve virüslerin zararlı etkilerine karşı bariyer oluşturur. Epitel hücreleri bariyer fonksiyonları dışında sentezledikleri sitokin, kemokin ve büyüme faktörleri sayesinde inflamasyona katkıları bulunurlar. Dendritik hücreler, epitel hücrelerden sonra alerjenle direk olarak karşılaşan ikinci hücre grubudur. Alerjen sunan hücreler olan dendritik hücreler, bağladıkları alerjenleri bölgesel lenf nodlarına taşırlar. Lenf nodlarında antijen farklılaştırılarak T hücrelerine sunulur. T hücresi, kendisine doku uyumluluk kompleksi sınıf II (Major histocompatibility complex class II) molekülü ile birlikte sunulan alerjeni T hücre reseptörü sayesinde tanır [50]. Bu karşılaşma sonrası Th0 hücreler IL-2 sentezleyerek aktif hale gelir.



Şekil 2.3. B hücre ile T hücrenin etkileşimi ve IgE sentezi [51]

2.4.1. Astım ve Alerjide IgE'nin Rolü

Alerjenler ve astım arasındaki epidemiyolojik bulgular arasında bir ilişki olduğuna dair kanıtlar, spesifik immünoglobulin E antikorları ve astım arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir [52].

Th2 ve B lenfositlerinin aktivasyonu, genetik olarak yatkın kişilerde alerjenlere karşı duyarlılık sürecini vurgulamaktadır. Antijen sunan hücreler tarafından işlenen antijenler, Th2 hücreleri tarafından tanınabilmektedir. Aktive edilmiş Th2 hücreleri tarafından salınan interlökinler (IL-4 IL-13) IgE antikorlarının üretimini artırır [53]. Bu antikorlar, sırayla, IgE için spesifik reseptörlere sahip olan diğer yerleşik hücrelere bağlanır. IgE "sabit" bölgesinin küçük bir alanı, mast hücreleri veya bazofiller üzerinde yüksek afiniteli (FcεRI) yüzey reseptörlerine veya B lenfositleri ve eozinofillerinde düşük afiniteli (FcεRII

– CD23) reseptörlere bağlanır. Duyarlılaştırma fazı sırasında nazal ve bronşiyal mukozada IgE taşıyan hücrelerin olması, sonraki alerjen maruziyeti sırasında aktivasyon için aşamayı ayarlar [54].

2.4.2. Erken faz reaksiyonu

Alerjik hastalarda inhale alerjen tehdidi, erken alerjik inflamatuvar, alerjik reaksiyona yol açar ve bazı durumlarda bunu geç faz reaksiyonu izleyebilir. Erken faz reaksiyonu, alerjene özgü IgE taşıyan hücrelerin aktivasyonundan sonra başlatılır. Bu da havayolu mast hücreleri ve makrofajların hızlı aktivasyonu ile karakterizedir [55, 56]. Yüksek afiniteli IgE reseptörü FcεRI'yi taşıyan bazofiller ve mast hücreleri dışındaki hücre tipleri de katılabilir, ancak bunların doğrudan alerjenler tarafından aktive edilip edilemeyeceği bilinmemektedir. Aktive edilmiş hücreler, histamin, eikosanoidler ve solunum yollarının düz kas, muköz salgı ve vazodilatasyonun kasılmasını indükleyen reaktif oksijen türleri gibi proinflamatuvar mediatörleri hızla salmaktadır [57]. Bronşiyal sirkülasyon bu inflamatuvar süreçte merkezi bir role sahiptir. İnflamatuvar mediyatörlerin indüksiyonu, plazmanın solunum yollarına ulaşması ile mikrovasküler sızıntıya neden olur [58, 59]. Akut plazma protein sızıntısı, kalınlaşmış, tıkanmış ve ödemli bir solunum yoluna ve hava yolu lümeninin daralmasına neden olur. Ek olarak, plazma epitelyumdan, sıkı bağlantılardan geçebilir ve hava yolu lümeninde toplanabilir. Plazma eksüdasyonu epitel bütünlüğünü tehlikeye atabilir ve lümen içindeki varlığı mukus temizliğini azaltabilir [60]. Plazma proteinleri ayrıca yapışkan luminal tıkaçların oluşumunu teşvik edebilir. Bu etkiler ile birlikte hava akımı obstrüksiyonuna katkıda bulunur.

2.4.3. Geç faz reaksiyonu:

Alerjen yanıtlar, 30 dakika içinde maksimuma ulaşan ve 1 ila 3 saatte düzelen erken yanıtlardır. Geç yanıtlar, 3 ila 4 saat sonra tekrarlar ve 6 ila 12 saatin üzerinde maksimum bir değere ulaşır. Geç yanıtları, hava yolu aşırı duyarlılığında artış izler [61].

Geç faz reaksiyonu, alerjen tehdidinden 6 ila 9 saat sonra oluşur ve eozinofillerin, CD41 T hücrelerinin, bazofillerin, nötrofillerin ve makrofajların toplanması ve aktivasyonunu içerir [62]. Geç faz yanıtında, hava yolu T hücrelerinin seçici tutulması, adezyon

moleküllerinin ekspresyonu, inflamatuvar hücrelerin toplanması ve aktivasyonunda rol oynayan seçilmiş proinflamatuvar mediyatörlerin ve sitokinlerin salındığı görülmektedir [63]. Alerjen tehdidinden sonra T hücrelerinin aktivasyonu, geç faz cevabının anahtar mekanizması olabilecek tip 2 sitokinler gibi T yardımcı hücrelerinin salınmasına yol açar, ancak alerjenin geç faz reaksiyonunun birinci fazında, duyarlı T hücrelerinde sitokin gen transkripsiyonunu, translasyonunu ve protein üretimini uyarmak için yeterli zamanın olması olası değildir [64]. Bununla birlikte, önceden oluşturulmuş sitokinlerin mast hücreleri tarafından serbest bırakılması, hücrelerin erken alımı için olası ilk tetikleyicidir. Bu hücre tipi, T hücreleri tarafından daha kalıcı tutulumu tetikleyebilir ve uyarır. Alerjen tehdidinden 24 saat sonra, aktif IL-2-pozitif T hücrelerinin ve IL-5 veya GM-CSF mRNA ekspresyonunun artışı, bronş biyopsilerinde gözlenmiştir bu da muhtemelen, olası yanıtın daha kronik fazında T hücrelerinin tutulumunu düşündürmektedir [65]. Nonspesifik hava yolu aşırı duyarlılığın artması genellikle geç faz reaksiyonundan sonra gösterilebilir, ancak alerjeni takiben erken faz reaksiyonundan sonra gösterilemez.

2.4.4. Hava Yolu Epitelinin Rolü

Hava yolu epitel hücreleri, alerjenler, patojenler ve toksik bileşikler içeren havanın bileşenlerine karşı ilk savunma hattıdır. Epitel, bu yabancı maddelerin nüfuz etmesini engellemekle kalmaz, aynı zamanda onların varlığını da algılayıp bağışıklık sistemini bilgilendirir. Dış çevre ile arayüz oluşturur ve sıkı bağlantı (TJ) kompleksleri tarafından kontrol edilen fiziksel bir bariyer gibi doku homeostazının kontrol edilmesinde önemli rol oynar [66]. TJ'lar , moleküllerin ve iyonların paraselüler geçişini seçici olarak düzenleyen ve hücre zarı içindeki moleküllerin yanıl hareketini kısıtlayan kutuplaşmış epitel hücrelerinin alt bölgelerinde bulunmaktadır [16].

Alerjenler hava yolu epitel hücreleri ile doğrudan etkileşir ve sitokinler ve kemokinler dahil olmak üzere inflamatuvar mediyatörlerin salımını indükler. Alerjenlerle etkileşen epitel hücreleri tarafından salınan sitokinler, epitel hücreleri diğer mediyatörleri salgılaması için aktive eder. Örneğin, epitelyal hücrelerin alerjenlerle doğrudan etkileşimi, IL-13'ü serbest bırakmak için epitelyal hücreleri aktive edebilen TSLP salımına neden olmuştur [67].

Ayrıca IL-13, CCL11 salınması için periostini indükleyerek hava yolu epitelyumu üzerinde etkili olmuştur [68]. Astımlı bireylerden bronş biyopsisi alınarak yapılan çalışmalarda, epitelde ve lamina propria'da IL-4 ve / veya IL-5 üreten eozinofiller, mast hücreleri ve CD4 + T lenfositlerinin aşırı birikmiş olduğu bildirilmiştir [69-71].

Hava yolu epitel hücreleri çevresel etkenlere maruz kaldığında, mikroplarda bulunan, patojenle ilişkili moleküler paternlerin (Pathogen-associated Molecular Patterns, PAMPs) veya doku hasarları, hücre ölümleri, hücresel stres üzerine salınan, hasarla ilişkili moleküler paternleri (damage-associated molecular patterns, DAMPs) hızla algılayıp yanıtlamak için birçok patern tanıma reseptörlerini (Pattern Recognition Receptors, PRRs) ifade eder [72]. Epitel PRRlerin aktivasyonu, doğal ve adaptif immün hücreleri aktive eden sitokinler, kemokinler ve antimikrobiyal peptidlerin salınmasına yol açar.

Havayolu duvarında yapısal değişiklikler vardır ve bunlar çoğunlukla havayolu yeniden biçimlendirme olarak adlandırılır. Havayolu duvarındaki bu değişiklikler, duvarı çevreleyen düz kas kütlesinde bir artış, epitelyal taban zarının altındaki hücre dışı matris bileşenlerinin birikimi ile kalınlaşmış görünüm, hava yolu epitelinin bütünlüğünde bir bozulma ve epitelyumda veya submukozal bezlerde mukus üreten goblet hücrelerinin artması şeklindedir [73].

2.5. Astım Fenotipleri

Astımın birçok fenotipik çeşidi vardır. Çocukluk çağında birçok fenotipi içeren heterojen bir hastalıktır. Ağır Astım Araştırma Programı (Severe Asthma Research Program; SARP) tarafından bu fenotipler küme analizi yapılarak, erken başlangıçlı alerjik astım, geç başlangıçlı şiddetli astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı niteliklerine sahip şiddetli astım olarak tanımlanmıştır.

Fenotip 1: Geç başlangıçlı, semptomatik astım grubu; kız çocuklarında daha sıklıkta görülmekte ve genellikle deri testinde alerji saptanan, akciğer fonksiyonları normal olan gruptur.

Fenotip 2: Erken başlangıçlı ve normal akciğer fonksiyonları olan gruptur. Fenotip 1 deki hastalarla benzer astım semptomları ve atopi varlığı göstermektedirler. Ancak başlangıç daha erkendir.

Fenotip 3: Erken başlangıçlı, atopik ve hafif havayolu kısıtlılığı olan gruptur. Fenotip 1 ve 2 ile kıyaslandığında gastroözofagal reflü ve antibiyotik tedavisi gerektiren kronik sinüzit gibi eşlik eden komorbid hastalıklar sık görülür.

Fenotip 4: Erken başlangıçlı, atopik ve ağır havayolu kısıtlılığı olan gruptur. Astım süresi fenotip 3 teki hastalarla benzer olmasına rağmen komorbid hastalıklar daha azdır [74].

2.5.1. Alerjik Olmayan Astım

Alerjik olmayan astım genellikle hayatın ilerleyen döneminde gelişir. Serumda alerjenlere özgü IgE reaksiyonu görülmez. Deri testleri negatiftir [66]. Alerjik olmayan astım; sigara dumanı, petrol partikülleri, ozon gibi hava kirleticileri ya da viral enfeksiyonlar, obezite, stres ve egzersiz gibi etkenler tarafından tetiklenmesiyle başlar, bunlar da immün sistem hücrelerini tetikleyerek Th2 baskın veya baskın olmayan eozinofilik, nötrofilik veya hücreden fakir inflamasyona neden olur [62].

2.5.2. Alerjik Astım

Alerjik astım, havayolu aşırı duyarlılığı, goblet hücrelerinin hiperplazisi/metaplazisi ve subepitelyal fibroza yol açarak, kronik alerjik enflamasyona neden olan, havadan gelen alerjenlere maruz kalma ile ilişkili klasik bir Th2 solunum hastalığıdır [75]. Alerjik astım tip 1 Ig E aracılığı ile oluşan erken aşırı duyarlılık reaksiyonu olarak da tanımlanabilir. Tip 1 reaksiyonunda antijen alerjenlerdir. Polen, ev tozu akarı, hava kirliliği, viral enfeksiyonların tetiklemesiyle oluşur. Çocukluk dönemi astımının %80-90'ı alerjik astımdır ve atopik kişilerde görülmektedir. Alerjik astım çoğunlukla çocukluk çağında başlar ve adolesan çağda remisyona girmesine karşın erişkin yaşta da devam edebilir [76].

Hava yolu epiteli akciğer dokusunu çevresel birçok etkene karşı koruyan fizikokimyasal bariyer özelliğindedir. Solunan hava ile birlikte çeşitli kimyasal ve biyolojik yapıdaki zararlı maddelerle karşılaşan hava yolu epitel hücreleri, doğal immün yanıtın başlaması ve sürdürülmesinden sorumludur [77, 78]. En yaygın astım formu, aerobik astım olup, bireylerin ortak aeroalerjenlere karşı antijen spesifik IgE aracılı bir yanıtın gelişmesi için genetik bir yatkınlığı vardır. Hava yolu epitelindeki ve submukozdaki dendritik hücreler, ev tozu akarı, polen, mantar sporları ve hamam böceği antijeni gibi inhale alerjenleri tespit eder. Dendritik hücreler üzerinde yüksek afiniteli reseptörlere bağlanan IgE antikoru, bu alerjenlerin alımını kolaylaştırır [79]. Dendritik hücreler daha sonra MHC sınıf II ile T- ve B-lenfositleri aracılığıyla antijenleri işledikleri ve sundukları sekonder lenfatik sistemlere göç eder [80]. B-lenfositler bazofiller ve mast hücreleri üzerindeki yüksek afiniteli FcεRI'ye bağlanan IgE üretir. Alerjene yeniden maruz kalmak, histamin, prostaglandin, lökotrien, sitokin ve kemokin dahil olmak üzere mediatörlerin salınmasına neden olan reseptörlerin çapraz bağlanmasına neden olur. Bu araçılar hava yolu düz kas hücrelerinin kasılmasını sağlayarak, ödem ve mukus sekresyonunu indüklerler. Kemokinler; eozinofil, makrofaj, nötrofil ve T-lenfosit gibi bir dizi inflamatuvar hücre çekerler [80, 81]. Aktif haldeki lökositlerden salınan ürünler, epitel tabakalarına hasar vererek, bronkokonstriksiyonu ve hücre dışı matrislerin birikmesini sağlayarak hava yolu aşırı duyarlılığı ve hava yolu yeniden şekillenmesi için temel oluşturur [82].

2.6. Proteazlar

Peptidazlar, proteinlerdeki peptid bağlarının kırılmasını katalizleyen enzimlerdir. Peptidazlar, proteazlar veya proteinazlar olarak da adlandırılır [83]. Proteazların, fizyolojik fonksiyonu virüslerden insanlara kadar tüm canlı organizmalar için gereklidir ve proteolitik enzimler kaynaklarına göre mikrobiyal (bakteri, mantar ve viral), bitki, hayvan ve insan enzimleri olarak sınıflandırılırlar. Proteolitik enzimler, enzimlerin hidrolaz sınıfına (EC 3) aittir ve peptid hidrolazların veya peptidazların alt sınıfında (EC 3.4) gruplandırılırlar [84]. Proteazlar; aspartik proteazlar, sistein proteazlar, glutamik

proteazlar, metaloproteazlar, asparagin proteazlar, serin proteazlar, treonin proteazlar olarak sınıflandırılırlar. Proteolitik enzimlerin sınıflandırılması, adlandırılması ve ayrıca bireysel proteazların ayrıntılı bir tarifi MEROPS veritabanında bulunmaktadır [85].

Proteazlar, protein substratları üzerindeki etki alanı bazında endo- veya ekso- enzimler olarak geniş çapta sınıflandırılmaktadır. Endoproteazlar katalizör mekanizmasına göre, beş sınıfa ayrılmaktadır: aspartik, metallo, sistein, serin ve treonin proteazları [84]. Serin proteazlar, sıçanda 221 üyeye sahip en bol proteolitik enzimdir, metallo ve sistein proteazları da çoklu üyeler içerir. Buna karşılık, sıçanda sadece 24 aspartik ve 29 treonin proteazı vardır. Bu enzimlerin oynadığı oldukça özelleşmiş rolleri vardır [86].

Proteazlar, protein katabolizması, kan pıhtılaşması, hücre büyümesi ve migrasyonu, doku düzenlemesi, gelişimde morfogenez, inflamasyon, tümör büyümesi ve metastaz, zimojenlerin aktivasyonu, hormonların salımı ve farmakolojik olarak aktif peptitler gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte kritik bir rol oynamaktadır [84].

Ev tozu akarı (HDM), hamamböceği, mantar veya polenden havaya karışan bazı allerjen grupları, sistein, serin veya aspartik proteazlar olarak tanımlanmaktadır [87] [69]. Buna ek olarak, tanımlanamayan diğer proteaz allerjenleri, çeşitli kökenlerden gelen polen ekstraktlarının proteolitik enzimler içerdikleri gösterilmiştir [88, 89].

Proteolitik olarak aktif allerjenler, mukozadaki antiproteaz temelli akciğer savunmalarını ters olarak regüle edebilir bunun sonucu olarakda, doku hasarının ve bağışıklık aktivasyonunun artmasına neden olabilir. Akar sistein proteazları Der p 1 veya Der f 1 in yanı sıra, Alman hamamböceğinin dışkı artıklarındaki proteazlar, hava yolu alfa-1 antitripsin inhibitörünü bozabilir. Ayrıca, grup 1 akar allerjenleri, elastaza özgü inhibitörü (elafin) ve sekretuar lökosit proteaz inhibitörünü parçalayabilir [90-92].

Çizelge 2.3. Havadaki proteaz alerjenler [93]

| KAYNAK | ALERJEN | PROTEAZ |
|---------------|---------------------|------------------|
| Ev tozu akarı | Grup1 | Sistein |
| | Grup3 | Serin |
| | Grup6 | Serin |
| | Grup9 | Serin |
| | | |
| Hamamböceği | Bla g 2 | İnaktif aspartik |
| | Per a 10 | Serin |
| | | |
| Mantar | Cladosporium Grup 9 | Vacuolar serin |
| | Curvularia Grup 1 | Serin |
| | Penicillium Grup 18 | Vacuolar serin |
| | Aspergillus Grup 13 | Alkalin serin |
| | Penicillium Grup 13 | Serin |
| | Rhodotorula Grup 2 | Vacuolar serin |
| | Epicoccum Grup 1 | Serin |
| | | |
| Polen | Cryptomeria CPA63 | Aspartik |

| | | |
|--|---------------|---------|
| | Phleum Grup 1 | Sistein |
| | Lolium Grup 1 | Sistein |

2.6.1. Metalloproteazlar

Metalloproteazlar, nötral fungal proteazlardır. pH 7.0'de aktiftirler ve EDTA gibi şelat ajanları ile inhibe olurlar. Bu proteazların, kollajen degradasyonunda rol aldığı ve astımlı hastaların akciğer dokularında ifade olduğu gösterilmiştir. Bunlar arasında matriks metalloproteaz-9 (MMP-9) astımla kuvvetli bir şekilde ilişkilendirilmiştir [94]. Astım hastalarının MMP-9 seviyeleri sağlıklılarla karşılaştırıldığında, astımlı hastaların balgamlarında anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Alerjik inflamasyonun geç faz reaksiyonlarında, eozinofilik hücreler tarafından, matriks yıkımına neden olan matriks metalloproteazlar sentezlenir [75]. Bu enzimler yüksek molekül ağırlıklı proteinleri, düşük molekül ağırlıklı proteinlere dönüştürerek, moleküler özelliklerini ve su tutma özelliklerinin değişmesine, böylece matriks içinde inflamatuvar hücrelerin kolay hareket etmesini sağlar. Matriks metalloproteazlar IL-1 β , TNF α , TGF α , PDGF ve β -FGF gibi uyarılara cevap olarak sentezlenir [95].

2.6.2. Aspartik Proteazlar

Aspartik proteazlar, asidik proteazlar olarak tanımlanırlar. Katalitik aktivitelerini aspartik asit kökleri üzerine etki ederek gösterirler. Yapılan çalışmalara göre, alman hamamböceği türünün (*Blattella germanica*) astıma katkıda bulunan alerjenleri olduğu saptanmıştır. Hamamböcekleri astımın önemli bir nedeni olan güçlü alerjenler üretirler. Bla g 2 alerjeni, hamamböceği alerjik hastaların yaklaşık %50 ile %80 inde sensitizasyona neden olan, en etkili hamamböceği alerjenlerinden biridir. Bu alerjinin enzimleri aspartik proteinaz ailesine homoloji gösterir. Yapılan bir çalışmada; hamamböceği alerjisi olan hastalardan gelen 106 serum incelenmiş, Bla g 1 ve Bla g 2'ye karşı IgE antikorlarının prevalansının sırasıyla %30,2 ve %57,6 olduğu görülmüştür [96, 97].

2.6.3. Serin Proteazlar

Aktif bölgelerindeki serin grubu ile karakterizedirler. Bakterilerde, virüslerde ve ökaryotlarda yaygın olarak bulunmaları sebebiyle, organizmalar için önemli olduğu düşünülmektedir. Mast hücrelerindeki proteazların üçte birini serin proteazlar oluşturmaktadır. Peptid bağlarını parçalamak için substrat bağlanma bölgelerindeki aktif serin rezidülerini kullanan enzimlerdir. Proteazlar içerisinde alkali koşullarda en iyi aktivite gösteren enzim sınıfı serin proteazlardır. Serin proteazlar, görevlerini yaptıktan sonra çeşitli proteinler tarafından inhibe edilirler. Bu serin proteaz inhibitörlerine serpin adı verilir. SERPINB1 ve SERPINB2 serpin ailesinin üyeleridir [98].

Polen alerjenlerinin serin proteaz aktiviteleri vardır. Japon çamı (*Cryptomeria japonica*), Küt Yapraklı Yalancı Servi (*Chamaecyparis obtusa*), kayalık dağ ardıcı (*Juniperus scopulorum*) polenleri serin proteaz aktivitesi göstermektedir. Çimde, kısa yaban mürvesi (*Ambrosia artemisiifolia*) poleninden elde edilen iki serin proteaz saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Kentucky mavi otu (*Poa pratensis*), çavdar otu (*Lolium perenne*) ve Bermuda otu (*Cynodon dactylon*) polerinde de tanımlanmıştır.

Ev tozu akarları da serin ve sistein proteazlar üretir. *Dermatophagoides pteronyssinus* 6 (Der p 6) ve Der p 9 serin proteazlardır.

Serin proteaz aktivitesi tanımlanan mantar türleri ise; *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhodotorula*, *Curvularia* ve *Cladosporium*dur. *Penicillium chrysogenum*'un büyük bir alerjeni olan Pen ch 13, bir serin proteazdır.

Aspergillus fumigatus proteazı doğrudan insan epitelyal hücre ayrılmasını indükler. Enzimatik aktivitesi, sıkı bağlantı bölgesindeki okludini parçalayarak epitel bariyere zarar verir ve ardından epitel hücrelerinde proinflamatuvar yanıt oluşmasını başlatır.

Nötrofil serin proteazları istilacı mikropları doğrudan öldürür. Fakat akciğerlerdeki nötrofil serin proteazlarının fazla olması halinde, inflamatuvar pulmoner hastalık patolojisinde bir rol oynamaktadır. Bir çalışmada, üç nötrofil serin proteazının etkili bir inhibitörü olan

SERPINB1'in, *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı konak savunmasından sorumlu hücre ve moleküler bileşenleri koruduğunu gösterilmiştir [93].

Serin proteazlar, kan pıhtılaşması, kanser, hücre ölümü, ozmo-regülasyon, doku yeniden modelleme ve enfeksiyona karşı bağışıklık dahil olmak üzere çok hücreli organizmalarda çok çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçleri kontrol eder. Adaptif hücre aracılı bağışıklık için T lenfositler gereklidir ve serin proteazlar sadece efektör fonksiyonu için değil aynı zamanda hücre sayısının homeostatik regülasyonu için de önemlidir [99]. Güçlü anti-apoptotik özellikleri olan serpinler, virüsleri ve tümörleri sitotoksik T hücreleri tarafından yok edilmekten koruyarak adaptif hücre bağışıklığına karşı da çalışabilir.

Tüm hücre ölüm formları, proteazların aktivitesini gerektirir ve Serpin 1c, sadece serin proteazları değil, aynı zamanda diğer yürütücü proteazları da inhibe ederek hücreleri hücre ölümlerinden korumak için evrimleşmiştir [99].

Nötrofil doğal ölümü, apoptozun tüm fenotipik özelliklerini barındıran ve efektör kaspaz-3'ün aktivasyonuna bağlı olarak programlanmış hücre ölümünün prototipidir. Ancak nötrofil doğal ölümünü düzenleyen yollar tam olarak tanımlanamamıştır. Yapılan bir çalışmada, yaşlanan nötrofillerde kaspaz-3'ün bölünme ve aktivasyonuna ,serin proteaz olan, Proteinaz 3 (PR3)'ün aracılık ettiği ve standart ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yollarından bağımsız olduğu belirlenmiştir. Olgun nötrofillerde, PR3 ün granüllerde depolandığı ve nötrofil yaşlanması sırasında sitozole ilerlediği gözlenmiş. PR3'ün salınması ise lizozomal membran permeabilizasyonuna bağlı olduğu belirtilmektedir [100].

2.6.4. Sistein Proteazlar

Sistein proteazlar ökaryotlarda ve prokaryotlarda bulunmaktadır. Yaklaşık olarak 20 familyası olduğu belirlenmiştir. Sistein proteazlar genellikle HCN (Hidroksiyonik asit) ve sistein varlığında aktivite göstermektedirler [101]. Clostripain proteazı, anaerobik bakteri *Clostridium histolyticum* tarafından üretilir. Streptopain ise *Streptococcus spp.* tarafından

Üretilen, okside olmuş insülin B zinciri de dahil olmak üzere birçok sentetik substrata karşı geniş substrat özelliği gösteren bir proteazdır.

imen polenlerinin, çoğunlukla serin proteaz peptidaz aktivitesi sergilemesine karşın, Kentucky ve avdar imen polenlerinde sistein proteaz aktivitesi tespit edilmiştir. imen polenleri major grup 1 alerjenlerinin sistein proteazları olduğu rapor edilmiştir [102]. Beyaz huş ağacının (*Betula alba*) iekleri ve kısa yaban mersini çiçekleri sadece serin değil aynı zamanda sistein proteaz aktivitesini de içermektedir [88].

Ev tozu akarlarından; Der p 1 ve Der p 3 sistein proteazlardır. Der p 1, sıkı bağlantı kompleksi birliğini bozarak epitel permeabilitesini arttırır. Bir çalışmada western blot yöntemiyle, sıkı bağlantı bölgesi morfolojisinin bozulmasının, MDCK (Madin-Darby canine kidney) ve 16HBE14o-insan bronşiyal epitel hücre hatlarında, Der p 1 ın, ZO-1 ve okludini birbirinden ayırmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir [89, 103].

Proteazla karşılaşan hücre, proteazlara karşı proteaz inhibitörleri salgılayarak karşı savunmaya geçer. Proteolitik yıkım karşısında inhibisyon mekanizmasının devreye girmesi homeostatik dengenin korunmasını sağlar [104]. Proteaz inhibitör sentezinde azalma ya da proteaz miktarında artma, proteaz – proteaz inihibitr dengesini bozarak ciddi sağlık sorunlarına yol açabilir. Nötrofillerden eş zamanlı salınan nötrofil elastaz, kathepsin G, proteinaz 3 proteazlara karşı hücre, α 1-antitripsin (AAT) proteaz inhibitörü sentezleyerek hücreyi korur. AAT sentezindeki ciddi azalma ya da sigara kullanımı sonucunda hava yollarına hücum eden nötrofiller nedeniyle artan proteaz miktarı sonucunda proteaz-proteaz inhibitör dengesi bozularak ciddi bir sağlık sorunu olan amfizeme yol açabilir [105].

2.7. Proteaz İnhibitörleri

Proteaz inhibitörleri, proteolitik enzimleri inihibe eden küçük moleküllü inhibitörlerdir. Canlı organizmada proteazlar ve proteaz inhibitörleri bir denge içerisindedir. Bu dengenin bozulması, Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA), Bronkopulmoner displazi (BPD) ve atopik astım gibi hastalıkların ana sebeplerinden olduğu

düşünülmektedir. Mast hücresi ve lökosit serin proteazlar, astımlı hastaların solunum yollarında yükselir. Buna ek olarak, α -1 proteinaz inhibitör eksikliğinin bir sonucu olarak antiproteaz aktivitesinde azalma olan hastalarda astım gelişme eğilimi artar.

Proteaz inhibitörleri etki ettikleri proteazlara ve inhibisyon mekanizmalarına göre 2 gruba ayrılırlar.

1. Etki ettikleri proteazlara göre proteaz inhibitörleri:

- Aspartik proteaz inhibitörleri
- Sistein proteaz inhibitörleri
- Metalloproteaz proteaz inhibitörleri
- Serin proteaz inhibitörleri
- Treonin proteaz inhibitörleri
- Tripsin proteaz inhibitörleri

2. İnhibisyon mekanizmalarına göre proteaz inhibitörleri:

- İntihar tipi inhibitörler (suicide)
- Geçiş durumu inhibitörler (transition state)
- Protein proteaz inhibitörler
- Şelat ajanları (chelating agents)

2.7. Serin Proteaz İnhibitör

Serin proteaz inhibitörleri, proteaz inhibitörlerinin en geniş ve en yaygın aileleridir. Serin proteaz inhibitörü olan serpinlerin, bugüne kadar 1500'den fazla üyesi insanlarda, bitkilerde, bakterilerde, arkealarda ve poxvirüslerde tespit edilmiştir. Bu ailenin filogenetik analizi, ökaryotik serpinleri, insan serpinlerinin evrimsel olarak dokuz ayrı kümeye (A-I) ayırdığı 16 kümeye bölünür [106]. Serpinlerin korunmuş üçüncül yapıyı paylaştıkları ve

inhibe edici aktiviteleri için eşsiz bir konformasyonel yeniden düzenleniş kullandıklarının keşfedilmesine yol açan birçok serpin yapısı belirlenmiştir [107].

İnsan serpinleri, çeşitli biyolojik fonksiyonlarda önemli bir rol oynamaktadır. Bunların büyük çoğunluğu, proteolitik kan pıhtılaşmalarına ve proteaz inhibe edici aktiviteye ihtiyaç duyan anti-inflamatuar cevaplara katılırlar [69]. Bununla birlikte, çok sayıda serpin üyesi, hormon taşıyıcıları (SERPINA6 ve SERPINA7), moleküler şaperonlar (Hsp47) ve kan basıncı regülatörü (SERPINA8) gibi inhibe edici olmayan fonksiyonları yerine getirebilir. Engelleme mekanizmasının karmaşıklığı nedeniyle serpinler, yanlış yapılandırma ve polimerizasyona neden olan, konformasyonel hastalıklara veya "serpinopatilere" neden olabilecek mutasyonlara karşı savunmasızdır. Örneğin, SERPINA1 ve SERPINC1 eksikliği sırasıyla amfizem ve tromboza neden olur. Öte yandan SERPINA1 polimerlerin endoplazmik retikulumda birikmesi siroz ile sonuçlanır [69, 108, 109].

Serin proteazlar ve serin/sistein proteaz inhibitörleri (serpinler) deri ve hava yollarındaki epitel bariyerin korunmasıyla ilişkilidir. Serin proteaz inhibitörleri, epitelyal bariyerlerin onarımında oldukça önemlidir.

Bazı nötrofil serin proteazı (NE, Cat G ve proteinaz3) ve mast hücre serin proteazları (triptaz ve kimaz) havayolu hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir. Son zamanlarda yapılan bir inceleme, astım tedavisini hedefleyen bazı serin proteaz inhibitörlerini özetlemektedir [13].

Mast hücreleri tarafından depolanan ve salınan başlıca enzimler, astımda kilit rol oynayan triptaz ve kimazdır. Bu enzimlerin çalışmaları, iltihaplanma, doku yeniden modellenmesi, bronş aşırı duyarlılığı ve hava yolu düz kasının b-adrenerjik duyarsızlaşmasını içerir. Alerjik inflamasyonda triptazın rolü için histamin salımını ve lökositleri arttırmak gibi çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Ek olarak triptaz, bronş lümeninin daralması, bronkokonstriksiyonun ilerletilmesi ve astım ile ilişkili havayolu yeniden yapılanması üzerinde etkili olur. Triptaz inhibitörleri bu proteaz enzimlerine karşı,

antiproteaz görevi görmektedir. Alerjik kobay ve koyunlarda yapılan bir çalışmada, serin ve triptaz inhibitörlerinin, antijen kaynaklı hava yolu hiperreaktivitesini azalttığı gösterilmiştir.

2.7.1. SERPINB1

SERPINB1, monosit nötrofil elastaz (NE) inhibitörü olarak da bilinen SERPINB1, serpin süper ailesinden bir proteindir ve NE, CG ve proteinaz-3'ün en etkili inhibitörlerinden biridir [110]. SERPINB1 geniş olarak ifade edilir ve özellikle nötrofillerin sitoplazmasında yüksek seviyelerde bulunur. İnsan nötrofil granül proteazlarının başlıca inhibitörü olan SERPINB1 fonksiyonel olarak fagositize patojenlerin eliminasyonu ile bağlantılıdır. Bu nedenle, SERPINB1'in bozulmuş fonksiyonu, aktive edilmiş nötrofillerin infiltrasyonu ve daha sonra proteaz salımı ile ilişkilendirilerek havayolu inflamasyonu ve akciğer dokularının hasarına neden olur [111]. Nötrofil serin proteazları, özellikle de elastaz, kistik fibrozis (KF) hastalarında akciğer tahribatının başlıca ajanlarıdır [112]. Ayrıca yapılan bir çalışma da, akciğer hasarından oluşan bir sıçan modelinde, SERPINB1'in inflamatuvar akciğer rahatsızlıklarında nötrofil proteazların tahrip edici etkilerine karşı koruyabileceğini göstermektedir [113].

Akciğerde, nötrofiller, istilacı bir patojene karşı savunmak için ilk hücrelerdir ve nötrofil serin proteazlar (NSP) mikropları öldürdüğü için, antimikrobiyal savunmanın önemli bir bileşenidir. Nötrofiller ve nötrofil serin proteazları antimikrobiyal akciğer savunmasında anahtar rol oynarlar, fakat proteaz fazlalığı durumunda, inflamasyon ve hasarın ana ajanları olarak görev yaparlar. NSP'ler, elastaz, katepsin G ve proteinaz-3, dolaşımdaki nötrofillerde taşınan yüksek döngülü enzimlerdir.

Nötrofillerin nekroz ile degranüle edilip ölmesi durumunda, nötrofil serin proteazlar salınır. Salınan nötrofil serin proteazları, proteaz inhibitörleri tarafından hızla inaktive edilebilir, ancak ekstravasküler boşlukta, inhibitör eksikliği veya nötrofil serin proteazlarının fazlalığı gibi lokal koşullar, fonksiyonel ömürlerini uzatabilir. Aktif nötrofil

serin proteazları, özellikle de elastaz, hafif hastalığı olan hastalarda bile sıklıkla kistik fibrozis hava yolu sıvısında bulunur [114, 115]. Nötrofil serin proteazlarının hücre dışı etkileri büyük ölçüde patolojiktir. Nötrofil serin proteazları, bronşiyolektaziye ve bronşektaziye katkıda bulunan yapısal proteinleri degrade eder, musin salımını artırarak hava yolu disfonksiyonunu şiddetlendirir, pro-inflamatuar sitokinleri indükleyerek inflamasyonu artırır ve fagosit reseptörlerini, antikorları, komplementleri ve yüzey aktif proteinleri parçalayarak antimikrobiyal savunmayı azaltır [116, 117].

SERPINB1, kistik fibrozlu hastaların akciğer sıvılarında nötrofil proteazlarla kompleks olarak bulunmuştur. Bu çalışmalar, SERPINB1'in nötrofil serin proteaz (NSP) aktivitesinin düzenlenmesinde rolü olduğunu gösterse de, bu komplekslerin SERPINB1'in akciğer hava yollarında önemli bir fizyolojik rolünü yansıtip taşımadığı konusunda çok fazla çalışma bulunmamaktadır. SERPINB1 ve α 1antitripsin (SERPINA1) 'i karşılaştıran in vitro çalışmalar, elastaz ile hızlıca geri dönüşümsüz kovalent kompleksler oluşturduğunu ve bunların hayatta kalma süresinde farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. SERPINB1-elastaz kompleksi, kistik fibrozis bronkoalveolar lavaj sıvısındaki moleküler formdan ayrılan SERPINB1'i serbest bırakan elastazın parçalanması nedeniyle sadece kısa bir süre hayatta kalmıştır. Bulgular, kistik fibrozis hava yollarında SERPINB1 için doğuştan gelen bir rolü olduğunu gösterir.

SERPINB1, tüm clade-B serpinler gibi, bir lider diziden yoksundur ve böylece canlı nötrofiller, monositler veya hava yolu epitel hücreleri tarafından aktif olarak üretilebilir. İnflamasyonda bir ekspresyon artışı, insan geninin promotöründe bir nükleer factor- κ B düzenleyici elemanın varlığı ile öne sürülmektedir [69, 70].

2.7.2. SERPINB2

SERPINB2, plazminojen etkinleştirici inhibitör 2, PAI-2 de denir. Serpin süper ailesinin Clade B veya Ovalbumin benzeri serin proteaz inhibitörü alt grubunun bir üyesidir. Yaygın olarak ürokinaz plazminojen aktivatörünün bir inhibitörü olarak tarif edilir. Yapısal

veya indüklenabilir SERPINB2 ekspresyonu ciltte, kıl folikülleri, endotel, mezotelyum ve fibroblastlarda da bulunur. Klinik olarak, düzensiz SERPINB2 ekspresyonu veya SERPINB2 polimorfizmleri, inflamatuvar bir dizi hastalıkla ilişkilendirilmiştir [118]. Azalan ekspresyon, pre-eklampsi ile ilişkiliyken, ekspresyon astımda düzenlidir.

SERPINB2, plazminojen aktivatörlerini inhibe edebilen ve böylece plazminin aktivasyonunu önleyen bir serin proteaz inhibitörüdür. Plazmin, hücre dışı matrisi, ya doğrudan glikoproteinleri kaldırarak ya da metalloproteinazları aktive ederek çözebilir [73]. Bu nedenle SERPINB2'yi inhibe ederek, hücre dışı matris döngüsü için daha fazla plazminin elde edilmesi ve hava yolu yeniden yapılanmasının azaltılması sağlanır.

Granüler ve spinöz tabakalarda aktif SERPINB2'nin varlığı, bu serpinin epidermal hücre farklılaşmasına karıştığını veya yara iyileşmesi üzerine aktive edilen u-PA sisteminin regülatörü olarak işlev gördüğünü göstermektedir. Bazı durumlarda, SERPINB2 sitoprotektif (hücre koruyucu) bir rol sergilemektedir [119]. SERPINB2 HT-1080 fibrosarkoma hücrelerini tümör nekroz faktör- α (TNF α) ile indüklenen apoptozdan korur. SERPINB2 ayrıca HeLa hücrelerini TNF α kaynaklı apoptozdan korur, ancak ultraviyole (UV) veya iyonlaştırıcı radyasyonla indüklenen apoptozdan koruyamaz [120].

SERPINB2 düşük seviyelerde küçük olmayan hücreli akciğer kanseri tümör yayılma ile ilişkilidir [121].

2.8. Sitokin, Kemokin Ve Büyüme Faktörleri

Sitokinler, mikroorganizmalara karşı konak savunmasında önemli bir rol oynarlar. Koruyucu lokal inflamasyonu ve sistemik akut faz yanıtlarını indükleyerek doğuştan gelen bağışıklığı düzenlerler. Sitokinler, adaptif bağışıklığın başlatılması, güçlendirilmesi, yönlendirilmesi, aracılık edilmesi ve düzenlenmesi açısından önemlidir. Ne yazık ki, aşırı tepkiler meydana gelirse veya otoimmüniteyi yönlendirmede ve aracılık etmede yer alırlarsa doku hasarını da yönlendirebilirler. Bu koşullar altında, sitokinler potansiyel tedavi hedefleridir [122].

Sitokinler, çeşitli isimlendirme ve sınıflandırma ile karakterize edilmiştir. Bu sınıflandırma sitokinlerin fonksiyonel benzerlikleri ve özelliklerine dayanmaktadır [123]. Bunlar;

1-Büyüme Faktörleri (Epidermal büyüme faktörü-EGF, Platelet orijinli büyüme faktörü-PDGF, İnsülin benzeri büyüme faktörü-2-IGF-2, insülin benzeri büyüme faktörü-1- IGF-1, Sinir büyüme faktörü-NGF, Asidik fibroblast büyüme faktörü-Afgf vb.)

2- Lenfokinler (interlökin-1 α , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15)

3- Koloni stimüle eden faktörler (Granülosit/makrofaj koloni stimüle eden faktör, GM-CSF, Granülosit-CSF, Multi-CSF, Eritropoietin, EPO, Lösemi inhibitör faktör, LIF)

4-Transforme edici büyüme faktörleri (TGF- α , TGF- β)

5- Tümör nekroz faktörleri (TNF- α , TNF- β)

6- İnterferonlar (IFN- α , IFN- β , IFN- γ)

Kronik astımı olan hastalarda; hücresel düzeyde, çok sayıda inflamatuvar hücre, hava yollarına ve akciğerlerine sızarak, daha ciddi iltihaplanmalara yol açan ve hücrelere zarar veren sitokinleri ve kemokinleri salgılar. Kemokinler çeşitli bağışıklık hücrelerinde kemotaktik aktiviteleri olan sitokinlerdir. Kemokinler, bağışıklık sisteminin gelişimi ve homeostazında, alerjik ve otoimmün hastalıklarda, enfeksiyonlar ve kanser dahil çeşitli rahatsızlıklar ile ilişkili olanlar da dahil olmak üzere, inflamatuvar cevapların patojenezinde önemli roller oynamaktadır. Bu nedenle, kemokinler birçok hastalıkta potansiyel terapötik hedefler olarak kabul edilir.

2.8.1. İnterlökin 6 (IL-6)

IL-6 yaklaşık 20 kDa luk bir sitokin olup, 28 amino asitten oluşan bir sinyal peptid kısmına sahip 212 amino asitten oluşmuştur. Enfeksiyonlara ve yaralanmalara cevap olarak acilen ve geçici olarak üretilir. Akut evre yanıtları, hematopoez ve bağışıklık reaksiyonlarının uyarılması yoluyla konakçı savunmaya katkıda bulunur. Her ne kadar

ifadesi transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel mekanizmalar ile sıkı bir şekilde kontrol edilse de, IL-6'nın disregüle edilmiş sürekli sentezi, kronik inflamasyon ve otoimmünite üzerinde patolojik bir etki oynamaktadır. Bu sitokin, B lenfositlerinin immunglobulin salımı için kofaktör görevi görür [124].

2.8.2. İnterlökin 8 (IL-8)

IL-8 kemokin ailesine bağlı bir sitokindir. Monosit, fibroblastlar ve endotel hücreler tarafından üretilir. Ek olarak, bradikinin ile indüklenen IL-8 üretimi, insan hava yolu epitelyal hücreler, düz kas hücreleri ve alveolar hücrelerde in vitro gözlenmiştir. Diğer yandan TNF- α , IL-1 β gibi sitokinlerin inflamatuvar bir yanıt oluşturması sonucunda miktarları artar [125] Enfeksiyonda ve inflamasyonda, dolaşımdaki ya da dokudaki nötrofilleri aktive edip, doku hasarı oluşan bölgeye nötrofil göçünü sağlamak en başlıca görevidir. IL-8'in olması gerekenden fazla salgılanması nötrofillerin hiperaktivasyonuna neden olur ve bu da doku yıkımına yol açmaktadır [126].

2.8.3. İnterlökin 25 (IL-25)

Hematopoyetik kökenli sitokinlerin aksine, IL-25 epitel kaynaklı bir sitokindir ve insanlarda nazal polipli kronik rinosinüzit, astım ve atopi dahil olmak üzere tip-2 sitokinlerin miktarlarının arttığı durumlarda IL-25 miktarında arttığı gösterilmiştir [127]. IL-25 ifadesindeki artış IL-4, IL-5 ve IL-13 ekspresyonunu tetikleyerek alerjik hastalığın patogeneze katkıda bulunur [128].

2.8.4. İnterlökin 33 (IL-33)

IL-33 genellikle dış ortamlarla bağlantılı epitelyal hücrelerden (cilt, göz, hava yolu, keratinositler, düz kas hücreleri gibi), endotelyal hücrelerden ve fibroblastlardan salınır [129, 130]. IL-33 ifadesi ayrıca mast hücreleri, dendritik hücreler, monosit ve makrofajlardan da salınmaktadır ancak epitelyal hücrelerle kıyaslandığında inflamatuvar hücrelerden 10 kat daha az salındığı görülmüştür. IL-33 immün cevabın oluşturulması, doku homeostazisi, yenilenme ve yeniden yapılanması gibi birçok biyolojik olayda rol oynayan bir sitokindir [131].

2.8.5. Timik Stromal Lenfopoietin (TSLP)

Çeşitli biyolojik süreçlerin ve moleküllerin doku hücreleri tarafından TSLP ekspresyonunu indüklediği veya bastırdığı gösterilmiştir. TSLP'nin Th2 tipi immün yanıtların indüksiyonu ve alerjik inflamasyonun oluşumu üzerindeki etkisi bilinmektedir. Epitelyal hücrelerden TSLP'nin salınmasına, alerjen proteazları ve biyolojik bileşenlerin etkisiyle aracılık eder. En yüksek TSLP seviyeleri, akciğer ve deri epitelyal hücrelerinde bulunur ve ayrıca fibroblastlar, hava yolu düz kas hücreleri, endotelyal hücreler, mast hücreleri, makrofajlar, monositler, granülositler ve dentritik hücreler tarafından üretilir [132, 133].

2.8.6. Aktivasyon ile Regüle Olan Eksprese ve Sekrete Edilen T Hücreleri (Regulated on Activation, Normal T-Cell Expressed and Secreted - RANTES)

RANTES, çeşitli proinflamatuvar hücre tiplerini bütünleme ve aktive etme özelliğine sahip kemokinlerdendir [134]. İn vitro koşullarda T hücrelerinin aktive olmasını ve kemotaksisini sağlar. Nötrofillere etki etmez. Dentritik hücreler ve mast hücreleri üzerinde etkileri vardır. CD+8 T hücreler, epitelyal hücreler, trombositler ve fibroblastlar tarafından baskın olarak salımı artırılır ve kendisi de belirli bir konsantrasyondan sonra inflamasyonun bir parçası haline gelir. Atopik dermatit, astım, kronik bronşit de rantesin rolü olduğu bilinmektedir [135, 136].

2.8.7. Granülosit / Makrofaj Koloni Stimüle Eden Faktör (GM-CSF)

Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör, kemik iliğinde öncü granülosit ve makrofaj gelişimini kolaylaştıran bir sitokindir. Astım hastalarının solunum yollarındaki mukozal mast hücreleri GM-CSF immünoreaktivitesini gösterebilir, bu da mast hücresinden üretilmiş GM-CSF'nin örneğin eozinofil sağkalımını düzenleyerek, alerjik hastalıkların patojenezine katılabileceğini gösterir. GM-CSF'nin TNF ile birlikte, hayatta kalmalarını arttırarak ve çevresel toleransın gelişmesine katkıda bulunarak, greft kaynaklı dendritik hücrelerin lenf düğümlerine göçüne katkısı olduğuna dair kanıtlar vardır [137, 138].

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hücre Kültürü

3.1.1. BEAS-2B Hücrelerinin Çoğaltılması ve Air Liquid Interface (ALI) Kültürü

Hücre kültürü deneyi sağlıklı insan bronş epitel hücre hattı olan (ATCC CRL-9609) BEAS-2B hücreleriyle gerçekleştirilmiştir. Der p 1 uyarımının SERPINB1 ve SERPINB2 genleri üzerine olan etkisi air liquid interface (ALI) kültürü deneyleriyle belirlenmiş, siRNA ile SERPINB1 ve SERPINB2 susturma deneyleri ise tek tabaka hücre kültüründe yapılmıştır.

BEAS-2B hücreleri 75 cm² lik flasklarda çoğaltıldı. Hücreler, flaskı %80 kapladığında tripsinize edildi ve 1.5 x 10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde kollajen tip IV ile kaplanmış transwell üzerine ekildi.

Hücreler başlangıçta 1:1 oranında bronş epitel büyüme besiyerinde (BEGM) (hidrokortizon (0.5 mg/mL), insülin (5 mg/mL), transferrin (10 mg/mL), epinefrin (0.5 mg/mL), triiodotironin (6.5 mg/mL), gentamisin (50 mg/mL), amfoterisin-B (50 mg/ mL), retinoik asit (0.1 ng/mL), EFG (epidermal growth factor, 0.5 ng/mL human recombinant), 100 U/mL penisilin, 5% FBS, 100 µg/mL streptomisin içeren) 2-3 gün süreyle inkübe edildi. Tamamen konfluent olan hücrelerin üst besiyerleri uzaklaştırılarak transwellin alt kısmına 500 µL indükleyici içeren B-ALI (Lonza) besiyeri (bronchial air liquid interface medium) konuldu. 21 gün süreyle hücreler 37 °C 'de 5% CO₂ ortamında inkübe edildi ve transwell in alt kısmındaki besiyeri 2 günde bir değiştirildi. Bronş epitel hücreleri 21 gün süreyle farklılaştırıldı.

3.1.1.1. Transwellerin Kollajenle Kaplanması

- 5 mg kollajen tip IV (C7521-5mg Sigma) 10 mL asetik asitli suyla (10 mL su +20 µL susuz asetik asit) karıştırıldı, final konsantrasyonu 0,5 mg/mL oldu. Çözünme için 1 saat beklendi.

- 50 mL lik yeni steril tüp alındı.

- Konsantrasyon 10 kat seyreltilerek, son konsantrasyon 0,05 mg/mL olacak şekilde kollajen hazırlandı.
- Hazırlanan kollajen solüsyonundan 100 µL transwell üzerine eklendi. 2 saat beklendi.
- Steril Pastör pipetiyle transwell deki kollajen çekildi.
- Transwell 200 µL PBS + Ca ile 2 kere yıkandı.
- Kuyucuklar 1X BEGM ile doldurularak 1 kez yıkandı.
- Yıkama solüsyonu uzaklaştırıldı ve hücreler ekildi.

3.1.2. Tek Tabaka Kültür

SERPINB1 ve SERPINB2 genlerinin susturulması için yapılan siRNA deneylerinde BEAS-2B hücreleri kullanıldı. Hücreler 75 cm² lik flasklarda büyütüldü. BEAS-2B hücreleri BEGM de üretildi ve siRNA ile SERPINB1 ve SERPINB2 genleri susturulmak için 24 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına 40.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Hücreler %70-80 doluluğa geldiğinde ayrı ayrı olmak üzere SERPINB1 ve SERPINB2 siRNA ları ile susturuldu.

3.2. SERPINB1 ve SERPINB2 Gen İfadelerinin siRNA ile Susturulması

- 24 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına ekilen hücrelerle 24 saat sonra siRNA transfeksiyonu aşağıdaki yöntem izlenerek gerçekleştirildi.
- Her bir kuyucuk için gerekli oligonükleotid miktarı kuyucuk başına son siRNA konsantrasyonu 5 pmol olacak şekilde hesaplanarak 50 µL Opti-MEM içinde hazırlandı.
- Solüsyon hafifçe karıştırıldı ve 2-3 dakika beklemeye bırakıldı.
- Doz tepkisi çalışması ile birlikte oligonükleotidler en iyi şekilde kullanıma hazır hale geldi.
- Üstteki karışıma 1 µL Lipofectamine RNAimax eklendi.
- Son solüsyon hafifçe karıştırıldı, 10-15 dakika beklendi ve kuyucuklara eklendi.

3.3. Proteaz İle Uyarı

BEAS-2B hücreleri, SERPINB1 geni için 12, 24, 36 ve 48 saat, SERPINB2 geni için 24 saat süre ile Der p 1 (5 µg/mL) ile uyarıldı. Uyarı sonunda hücrelerden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

3.4. RNA İzolasyonu

BEAS-2B hücrelerinden RNA izolasyonu için Thermo Scientific marka Purelink RNA Mini Kit kullanıldı.

- Hücreler, %1 β-Merkaptoetanol ilave edilmiş 350 µL Lizis tamponu ile pipetle çekip bırakmak suretiyle parçalandı.
- Üzerine eşit miktarda steril DEPC su ile sulandırılmış %70 etanol ilave edildi ve 2 mL'lik toplama tüpü üzerine yerleştirilmiş olan kolon üzerine pipetlendi.
- Tüpler 12.000 rpm'de 15 s santrifüj edildi.
- Toplama tüpündeki sıvı boşaltıldı ve üzerine 700 µL Wash Buffer I yıkama tamponu ilave edildi.
- Tüpler 12.000 rpm de 15 s santrifüj edildi.
- Kolon yeni bir toplama tüpü üstüne yerleştirildi ve üzerine 500 µL Wash Buffer II solüsyonu ilave edildi ve 12.000 rpm'de 15 s santrifüj edildi.
- Toplama tüpündeki sıvı boşaltıldı ve üzerine yine 500 µl Wash Buffer II solüsyonu ilave edildi.
- Tüpler 12.000 rpm de 15 s santrifüj edildi.
- Toplama tüpündeki sıvı boşaltıldı ve üzerine hiçbir şey ilave edilmeden yine 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Kolon steril 1,5 mL ependorf tüp üzerine alındı ve üzerine 50 µL RNaz içermeyen su ilave edilerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.

- Tüpler 12.000 rpm de 2 dakika santrifüj edildi.

Elde edilen RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80 °C' de saklandı.

3.5. Komplementer DNA (cDNA) Eldesi

Total RNA'lardan RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit ile cDNA elde edildi. Analizler süresince Applied Biosystems marka 7500 Fast RT-PCR kullanıldı.

- Prosedür, 1 µg ila 5 µg toplam RNA veya 1 µg ila 500 ng poli (A) + RNA'nın tek iplikcikli cDNA'ya dönüştürülmesi için tasarlandı. cDNA aşamasında daha spesifik bir sentez gerçekleştirilmesi amacıyla oligo (dT)18 primer kullanıldı.

- Kullanmadan önce her bileşen karıştırıldı ve kısaca santrifüjlendi.

- 0,2' mL 'lik PCR tüplerine 1 µL Oligo (dT)18 Primer (100 µM) eklendi.

- Toplam hacmi 12 µL'ye tamamlamak için konsantrasyonu 1µg olan total RNA'dan hesaplanan miktarda eklendi.

- Üzerine toplam volumnü 12 µl'ye tamamlayacak kadar ddH₂O ilave edildi.

- 65 °C'de 5 dakika PCR' da inkübe edildi, ardından 1 dakika buz üstünde bekletildi.

- Ardından 4 µL 5x Reaction Buffer, 1 µL RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL), 2 µL 10 mM dNTP Mix, 1 µL RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL) eklendi.

- Her RNA / primer karışımına 8 µL cDNA sentez karışımı eklendi, hafifçe karıştırıldı.

- Sonra 42 °C'de 60 dakika PZR'da inkübe edildi.

Böylece elde edilen cDNA'lar gerçek zamanlı PCR'da kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.

3.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiş örnekler SERPINB1 ve SERPINB2, genlerine özgü primerler kullanılarak gerçek zamanlı PZR'de ifadelerine bakıldı. Gerçek zamanlı PZR de kullanılacak, IL-6, IL-8, PDGF-β, GM-CSF, RANTES, IL-25, IL-33, CCL11 ve TSLP primerleri Tablo 3.1'de verildi.

Gerçek zamanlı PCR için SYBR Green PCR kiti ABI 7500 Fast Q-PCR cihazında kullanıldı. İnternal kontrol olarak Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) kullanıldı.

Çizelge 3.1. PZR reaksiyonunda kullanılmak üzere dizayn edilen primer dizileri

| | İleri Primer | Ters Primer |
|----------|-------------------------|-------------------------|
| SERPINB1 | TCCTTCCTGAGTTCTTGGTTTC | ACCCACTGGTTTATGGTCTTC |
| SERPINB2 | TTGATTGCAGAGCTGAGAGAG | TCCAGAAGGGTAGTTATCCTGA |
| IL-6 | GCAGATGAGTACAAAAGTCCTGA | TTCTGTGCCTGCAGCTTC |
| IL-8 | CTGCGCCAACACAGAAATTAT | AAACTTCTCCACAACCCTCTG |
| IL-25 | GGCGTGGTACAGGTCCT | CTCCCCTAGAGCCTGCTA |
| IL-33 | CTGGTCTGGCAGTGGTTT | CAACACCCCTCAAATGAATCAG |
| TSLP | CCAGAGCCTAACCTTCAATCC | CCTCTTCTTCATTGCCTGAGTAG |
| RANTES | GAGTATTTCTACACCAGTGGCA | GACTCTCCATCCTAGCTCATCT |
| GM-CSF | CTCCTGAACCTGAGTAGAGACA | CCTGCTTGTACAGCTCCAG |
| CCL11 | CGACTAGAGAGCTACAGGAGAA | CACAGATATCCTTGGCCAGTT |
| PPIA | TCTTTCACCTTGGCCAAACACC | CATCCTAAAGCATACGGGTCC |
| PDGF-β | CGATCCGCTCCTTTGATGAT | GGAGCGGGGTCATGTTTCAG |

Reaksiyon koşulları

| | |
|------------------------------------|---------|
| 2X SYBR Green PCR Master Mix | 12,5 µL |
| İleri Primer (10 µM) | 0,1 µL |
| Ters Primer (10 µM) | 0,1 µL |
| Kalıp (50 ng) | 1 µL |
| Nükleazsız su | 11,5 µL |

Döngü Koşulları

| | | |
|----------------------|------------------|------------|
| Isıyla aktivasyon | 95 °C.....5 dk. | } 35 döngü |
| Denaturasyon | 95 °C10 s. | |
| Primer yapışma/uzama | 60 °C30 s. | |

3.7. ELISA Metodu

Gerçek zamanlı PZR'de istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edilen IL-6 ve IL-8 genlerindeki RNA düzeyinde görölen değişikliği, protein düzeyinde incelemek için IL-6 ve IL-8 ELISA (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) kitleri kullanıldı.

3.7.1. İnsan İnterlökin 8 ELISA

3.7.1.1. Standartların seyreltilmesi:

Standart seyreltme tamponu ile Human IL-8 standardı 10 ng/mL'ye kadar sulandırıldı. Yavaşça karıştırıldı ve içeriğın tamamen sulandırılmasını sağlamak için 10 dakika bekletildi. (Sulandırmadan sonraki 1 saat içinde standardın kullanılması gerekmektedir.) 900 µL Standart seyreltici tamponu içeren tüpe 100 µL sulandırılmış standart ekleyip, karıştırıldı. Dilüsyon sonucu 1000 pg/mL insan IL-8 standardı elde edildi. 7 tüpün her

birine 300 µL Standart Seyreltici tampon eklendi: 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 ve 0 pg / mL olacak şekilde, standardın seri dilüsyonları yapıldı ve aralarda karıştırıldı.

3.7.1.2. 1X Streptavidin - HRP solüsyonu hazırlanması:

Analizde kullanılan her 8 kuyucuklu strip için, 10 µL Streptavidin - HRP solüsyonu, 1 mL Streptavidin - HRP Seyreltici içeren tüpe dağıtıldı ve iyice karıştırıldı.

Deneye başlamadan önce tüm reaktifler ve örnekler oda ısısına getirildi (18-25°C). Her kuyucuğa 50 µL Hu IL - 8 Biotin Conjugate solüsyonu eklendi. Uygun kuyulara 50 µL standart, kontrol veya numune eklendi, plakaların üstü kapatıldı ve oda sıcaklığında 1 saat 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklar yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı. Yıkamadan sonra, her kuyucuğa 100 µL taze 1X Streptavidin - HRP solüsyonu eklendi ve plakanın üzeri kapatılarak, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra 1X yıkama tamponu ile tekrar 4 kez kuyucuklar yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 µL stabilize kromojen eklendi ve karanlıkta ortamda, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra, kuyucuklara 100 µL stop solüsyonu eklenerek, ELISA optik okuyucu cihazında 450 nm dalga boyunda okutuldu.

3.7.2. İnsan İnterlökin 6 ELISA Metodu

3.7.2.1. Standartların seyreltilmesi:

Standart seyreltme tamponu ile Human IL-6 standardı 2,500 pg/mL'ye kadar sulandırıldı. Yavaşça karıştırıldı ve içeriğin tamamen sulandırılmasını sağlamak için 10 dakika bekletildi. 800 µL standart seyreltici tamponu içeren tüpe 200 µL sulandırılmış standart eklenip, karıştırıldı. Dilüsyon sonucu 500 pg/mL Human IL-6 standardı elde edildi. 7 tüpün her birine 300 µL Standart Seyreltici tampon eklendi: 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 ve 0 pg/mL olacak şekilde, standardın seri dilüsyonları yapıldı ve aralarda karıştırıldı.

3.7.2.2. 1X Streptavidin - HRP solüsyonu hazırlanması:

Analizde kullanılan her 8 kuyucuklu strip için, 10 µL Streptavidin - HRP solüsyonu, 1 mL Streptavidin - HRP Seyreltici içeren tüpe dağıtıldı ve iyice karıştırıldı.

Deneeye başlamadan önce tüm reaktifler ve örnekler oda ısısına getirildi (18-25°C). Uygun kuyucuklara 100 µL standart veya numune eklendi. Kromojen boşluklar hariç her kuyucuğa 50 µL Human IL-6 biyotin konjugat solüsyonu eklendi. Plakanın üstü kapatıldı ve 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Solüsyon aspire edildi ve 1X yıkama tamponu ile 4 kez kuyucuklar yıkandı. Kromojen boşluklar hariç her kuyucuğa 100 µL 1X Streptavidin-HRP solüsyonu eklendi ve plakanın üzeri kapatılarak, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında solüsyon aspire edildi ve 1X yıkama tamponu ile 4 kez kuyucuklar yıkandı. Her kuyucuğa 100 µL stabilize kromojen eklendi ve karanlıkta ortamda, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra, kuyucuklara 100 µL stop solüsyonu eklenerek, ELISA optik okuyucu cihazında 450 nm dalga boyunda okutuldu.

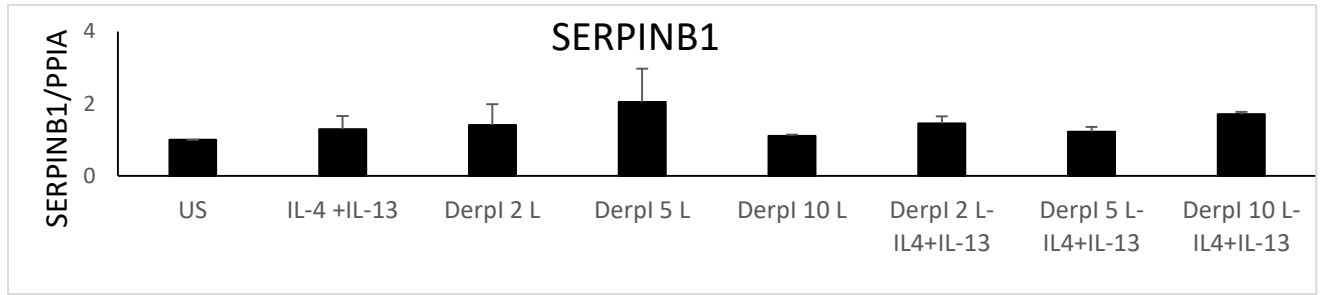
3.8. İstatistiksel Analiz

Tez çalışmasında tüm istatistiksel analizler Graph Pad Prism 7.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Veriler, \pm ortalama standart hata ile gösterilmiştir. Genler arasındaki ifade farklılıklarını tespit etmek amacıyla Kruskal Wallis Test uygulanmış devamında post hoc analizleri yapılmıştır. $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

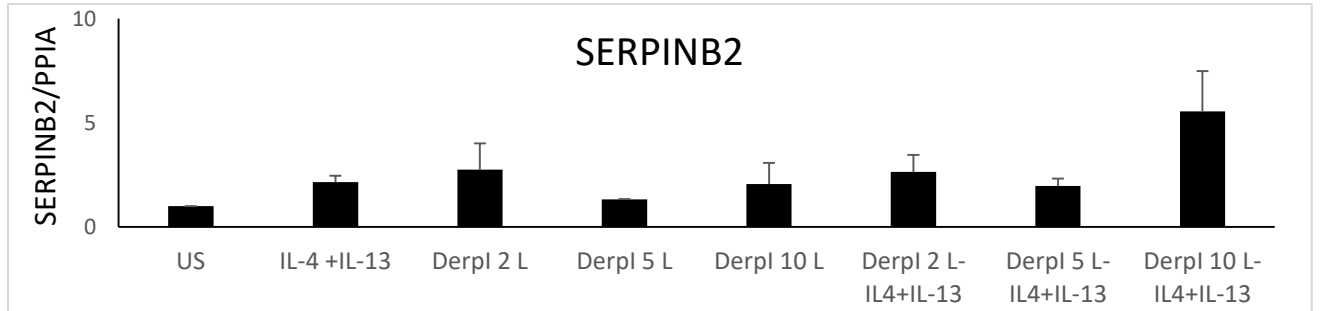
4. BULGULAR

4.1 Bronş Epitel Hücrelerinde Derp1 ve Th2 tip sitokin varlığında SERPINB1 ve SERPINB2 ifadesindeki değişiklikler

Th2 tip sitokinler olan IL-4 +IL-13'ün olduğu ve olmadığı koşullarda 2, 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonda Der p 1 ile uyarılma sonucu sağlıklı primer bronş epitel hücrelerinde SERPINB1 ve SERPINB2 genlerinin ifadeleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.1: Bronş epitel hücrelerinin Th2 tip sitokinlerin bulunduğu ve bulunmadığı ortamda artan konsantrasyonlarda Der p 1 ile uyarımı sonucu SERPINB1 ifadesindeki değişiklikler. (L: low endotoksin Der p 1 düşük endotoksinli Der p 1)



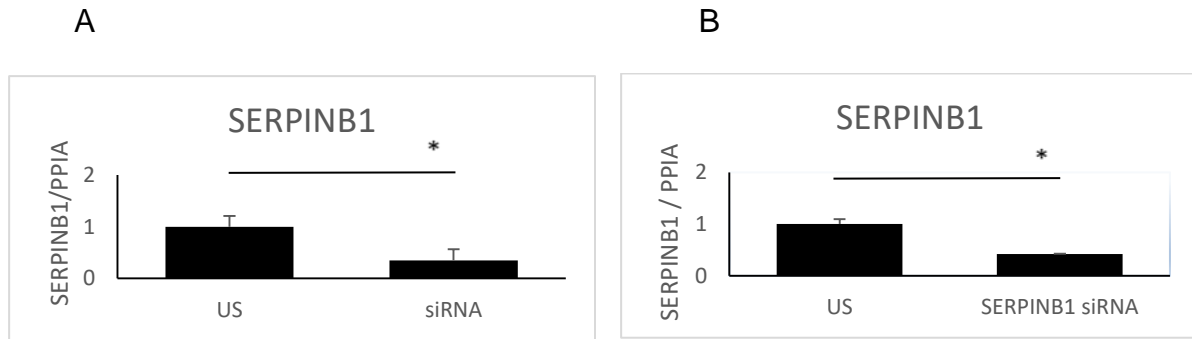
Şekil 4.2: Bronş epitel hücrelerinin Th2 tip sitokinlerin bulunduğu ve bulunmadığı ortamda artan konsantrasyonlarda Der p 1 ile uyarımı sonucu SERPINB2 ifadesindeki değişiklikler

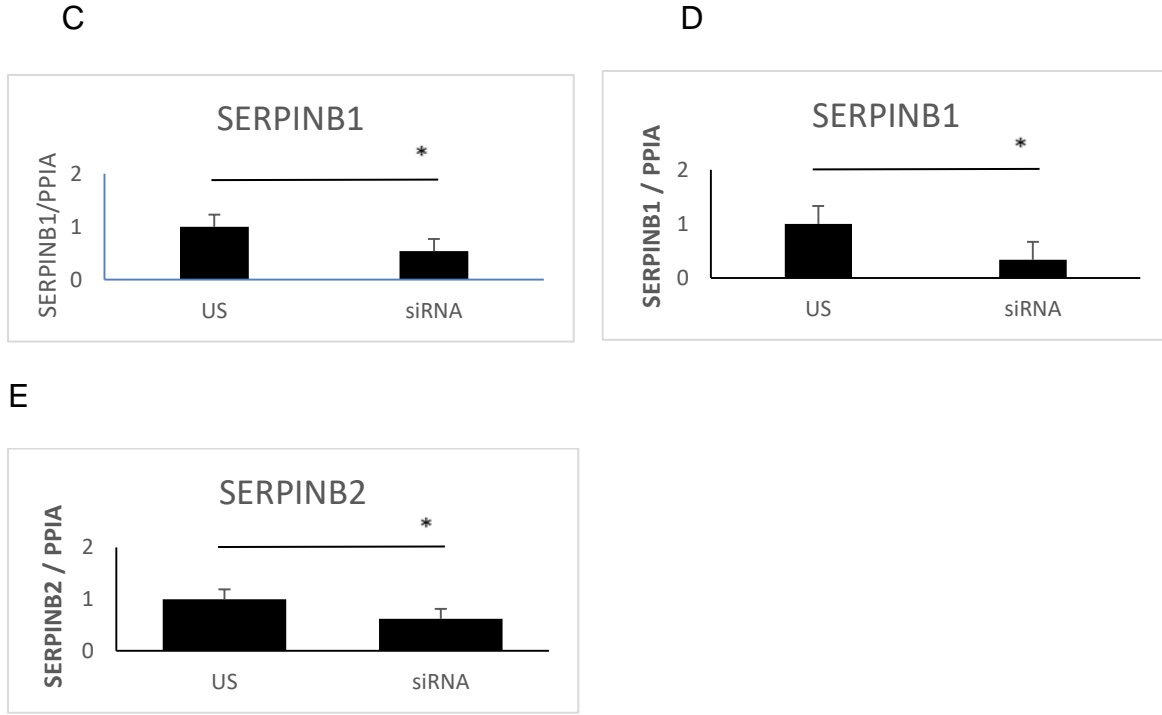
BEAS-2B hücrelerinde Der p 1 ile uyarım sonucu SERPINB1 ve SERPINB2 ekspresyonunun, kullanılan alerjen konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği bulunmuştur. SERPINB1 ifadesi artan en yüksek 2 ve 5 µg/mL konsantrasyonda Der p 1 ile birlikte artar iken yüksek konsantrasyonda Der p 1 ile karşılaşma sonrası SERPINB1 ifadesi 2 ve 5 µg/mL'ye göre düşmüştür. IL-4 / IL-13 sitokinlerinin bulunduğu koşulda SERPINB1 ifadesi artmış ancak Der p 1 ile birlikte bulunan koşullarda gen ifadesindeki artış tek tek uyarıma göre anlamlı olarak değişmemiştir (Şekil 4.1).

SERPINB2' nin ifadesi düşük ve yüksek konsantrasyonda (2 ve 10 µg/mL) anlamlı olarak artmış, 5 µg/mL ise artış istatistiksel olarak anlamlılığı yakalayamamıştır. Yüksek konsantrasyonda Der p 1 (10 µg/mL) ile uyarılan ve Th2 tip sitokinlerin ortamda bulunduğu koşullarda SERPINB2 geninin ifadesi SERPINB1'den farklı Th2 ifadesinin olmadığı koşullara göre artış göstermiştir (Şekil 4.2).

4.2 Transfeksiyon Yapılan Deney Gruplarında SERPINB1 ve SERPINB2 Proteaz İnhibitörlerinin İfadesi

Bronş epitel hücrelerine uygulanan transfeksiyon ile baskılanan SERPINB1 geninin ifadesine 12, 24, 36 ve 48. saat sonunda, SERPINB2 geninin ifadesine ise 24 saat sonunda bakılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.3'te gösterilmiştir.





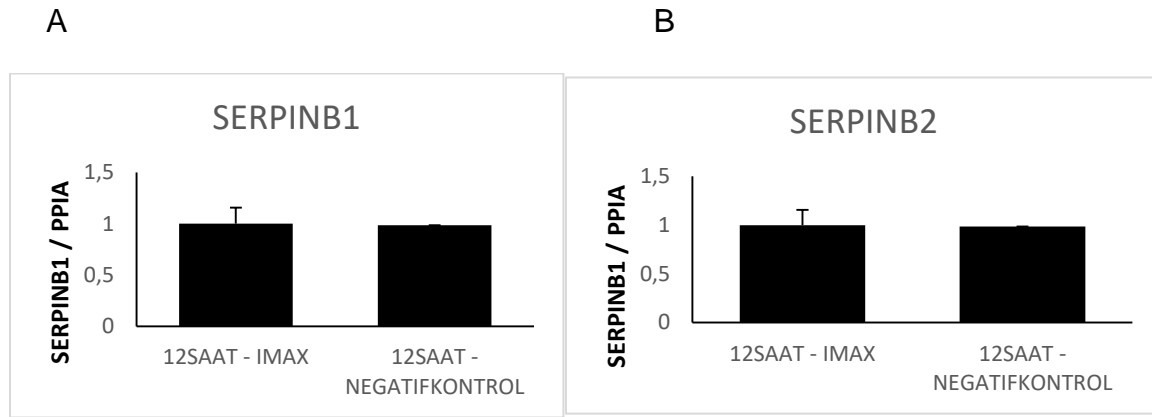
Şekil 4.3: siRNA ile transfekte edilmiş bronş epitel hücrelerinde 12 (A), 24 (B), 36 (C) ve 48 (D) saat sonunda SERPINB1, 24 saat sonunda (E) SERPINB2 geninin ifadesi SERPINB1 ve SERPINB2 gerçek zamanlı PZR deneyleri ile siRNA ile yapılan transfeksiyon deneyinin çalıştığı ve SERPINB1 ile SERPINB2 genlerinin susturulduğu sonucuna ulaşmaktayız.

4.3 SERPINB1 ve SERPINB2 Proteaz inhibitörlerinin Sitokin ve Kemokin İfadesi Üzerine etkileri

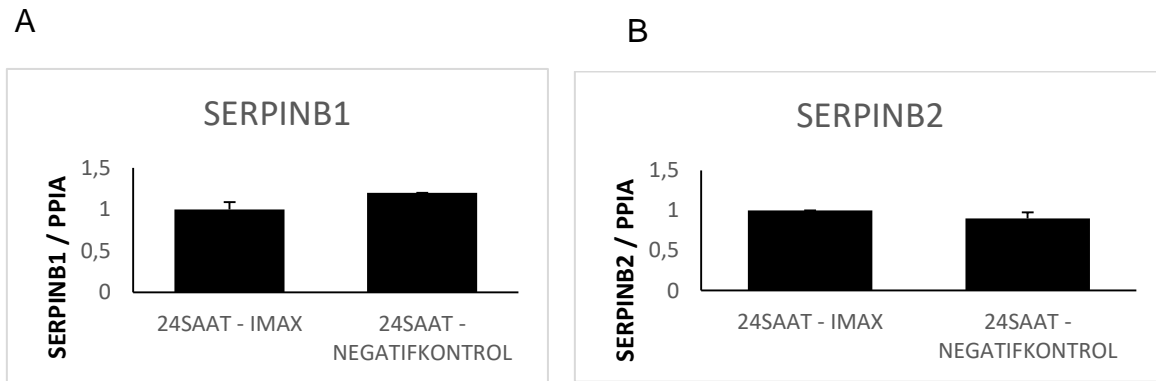
Gen susturma deneylerinden önce transfeksiyon işleminin SERPINB1 ve SERPINB2 genlerinin ifadesi üzerine etkisinin olup olmadığı negatif kontrol siRNA kullanılarak araştırılmıştır.

4.3.1 Negatif Kontrol siRNA ile Transfeksiyonun SERPINB1 ve SERPINB2 Genleri Üzerine Etkisi

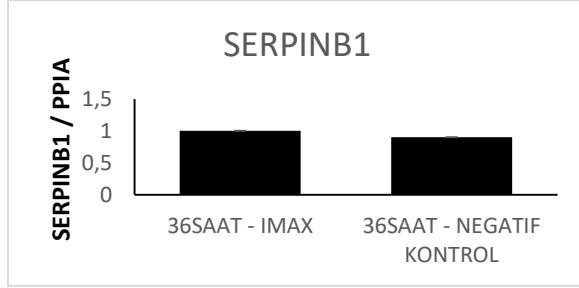
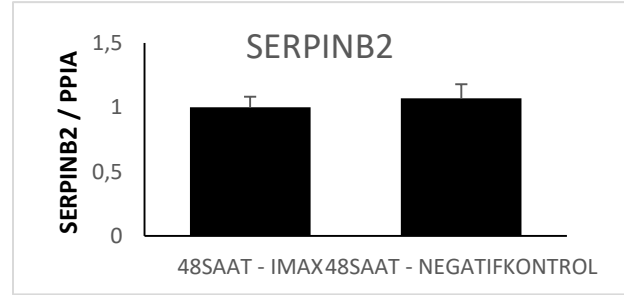
SERPINB1 ve SERPINB2 genlerinin bronş epitel hücrelerden sentezlenen sitokin ve kemokinlerin sentezi üzerine olan etkilerini belirlemek üzere her iki gene özgü siRNA'lar kullanılarak bu genler susturulmuştur. siRNA transfeksiyonunun her iki genin ifadesi üzerine olası etkisinin belirlenmesi için genomda hiçbir geni tanımayan negatif kontrol siRNA kullanılarak 12, 24, 36 ve 48. saatlerde SERPINB1 ve SERPINB2 genlerinin ifadelerine bakılmıştır (Şekil 4.4-4.7).



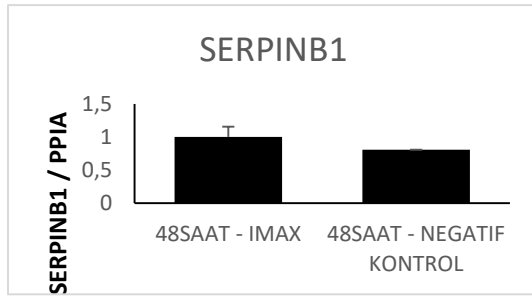
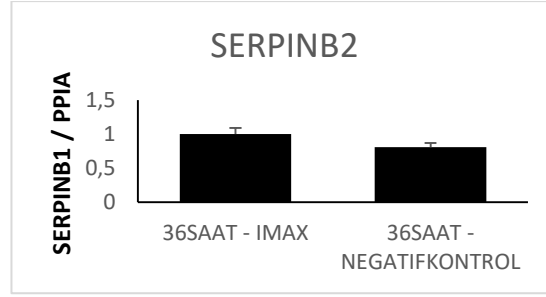
Şekil 4.4: Negatif kontrol siRNA ile transfekte edilmiş bronş epitel hücrelerinde 12 saat sonunda SERPINB1 (A) ve SERPINB2 (B) genlerinin ifadeleri



Şekil 4.5: Negatif kontrol siRNA ile transfekte edilmiş bronş epitel hücrelerinde 24 saat sonunda SERPINB1 (A) ve SERPINB2 (B) genlerinin ifadeleri

A**B**

Şekil 4.6: Negatif kontrol siRNA ile transfekte edilmiş bronş epitel hücrelerinde 36 saat sonunda SERPINB1 (A) ve SERPINB2 (B) genlerinin ifadeleri

A**B**

Şekil 4.7: Negatif kontrol siRNA ile transfekte edilmiş bronş epitel hücrelerinde 48 saat sonunda SERPINB1 (A) ve SERPINB2 (B) genlerinin ifadeleri

12, 24, 36 ve 48 saat negatif siRNA ile transfekte edilmiş bronş epitel hücrelerinde SERPINB1 ve SERPINB2 genlerinin ifadeleri incelendiğinde tek başına siRNA transfeksiyonunun SERPINB1 ve SERPINB2 ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik yapmadığı bulunmuştur (Şekil 4.7).

4.3.2 SERPINB1 siRNA'nın Sitokin ve Kemokin İfadesi Üzerine Olan Etkisi

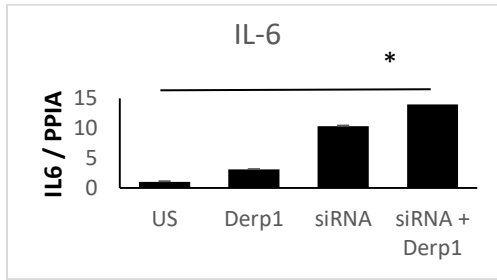
SERPINB1 ifadesinin sitokin ve kemokin sentezi üzerine etkisini belirlemek için bronş epitel hücreler 12, 24, 36 ve 48 saat süreyle Der p 1 (5 µg) ile uyarıldı SERPINB1

siRNA'in olduğu ve olmadığı koşullarda IL-6, IL-8, GM-CSF, RANTES, PDGF-B, IL-25, IL33 ve TSLP sitokin ve kemokinlerin ifadelerine bakıldı. Anlamalı çıkan sonuçlar Şekil 4.8-4.11'da verildi.

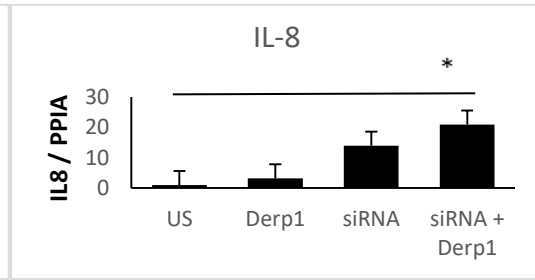
4.3.2.1 12 saat Der p 1 ile Uyarılan Koşulda SERPINB1 Bağlı Sitokin ve Kemokin İfadesindeki Değişiklikler

SERPINB1 siRNA ile susturulmuş ve susturulmamış koşullarda 12 saat sũreyle Der p 1 (5 µg/mL) ile uyarılma sonucunda ifadesi anlamalı olarak değişen IL-6, IL-8(p=0,019) , TSLP, RANTES, GM-CSF ve PDGF- β, Şekil 4.8'de verilmiştir.

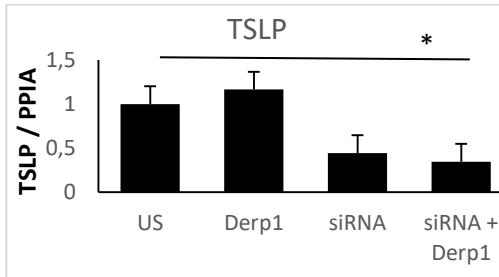
A



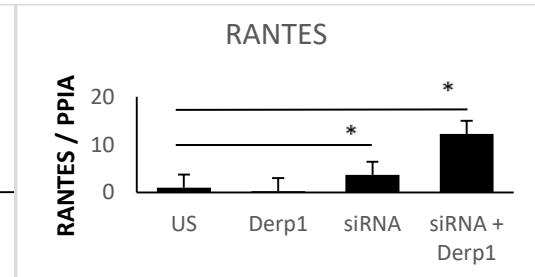
B



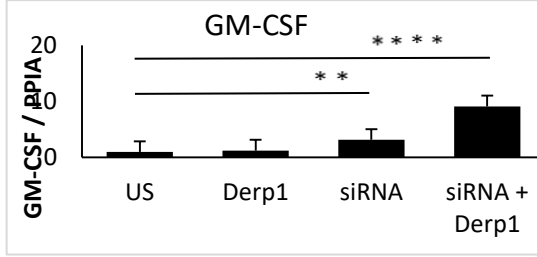
C



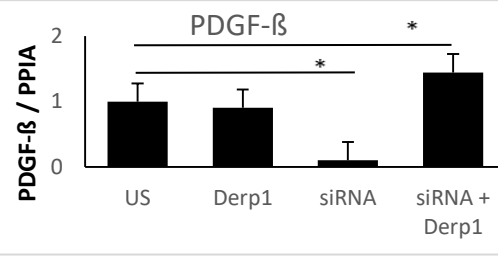
D



E



F



Şekil 4.8: Der p 1 ve SERPINB1 siRNA'nın IL-6 (A), IL-8 (B), TSLP (C), RANTES (D), GM-CSF (E) ve PDGF-β (F) ifadesi üzerine olan etkileri

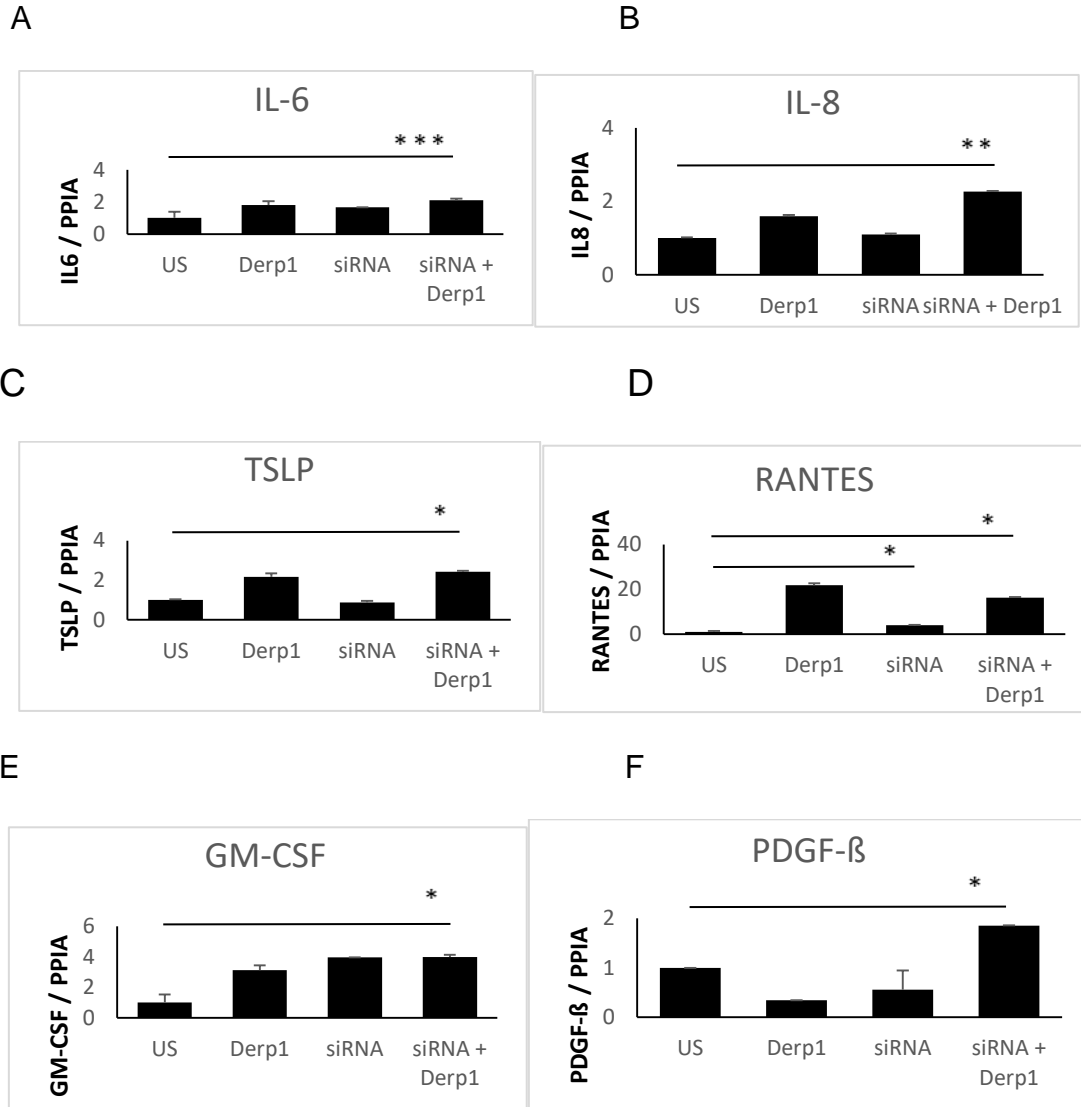
12 saat Der p 1 ile karşılaşma sonucunda; PDGF- β, RANTES genlerinin ifadesi, uyarı olmayan kontrole göre düşmüş; IL-6, IL-8, TSLP genlerinin ifadesi ise artmıştır. GM-CSF ifadesinde ise değişiklik gözlenmemiştir.

SERPINB1 siRNA'lı koşullarda; IL-8, IL-6, GM-CSF(p=0,0025), RANTES (p=0,0420) genlerinin ifadesi istatistiksel olarak anlamlı biçimde artmış; TSLP, PDGF-β (p=0,036) genlerinin ifadesi ise azalmıştır (p<0,05).

12 saatte siRNA nın olduğu koşullarda Derp1 ile uyarı IL-8, IL-6, GM-CSF (p=0,0001), RANTES(p=0,0252) ve PDGF- β (p=0,038) genlerinin ifadelerini arttırmıştır. TSLP geninin ifadesi ise düşmüştür (Şekil 4.8).

4.3.2.2 24 saat Der p 1 ile Uyarılan Koşulda SERPINB1 Bağlı Sitokin ve Kemokin İfadesindeki Değişiklikler

SERPINB1 siRNA ile susturulmuş ve susturulmamış koşullarda 24 saat süreyle Der p 1 (5 µg/mL) ile uyarılma sonucunda ifadesi anlamlı olarak değişen IL-6, IL8, TSLP, RANTES, GM-CSF ve PDGF- β, şekil 4.9'de verilmiştir.



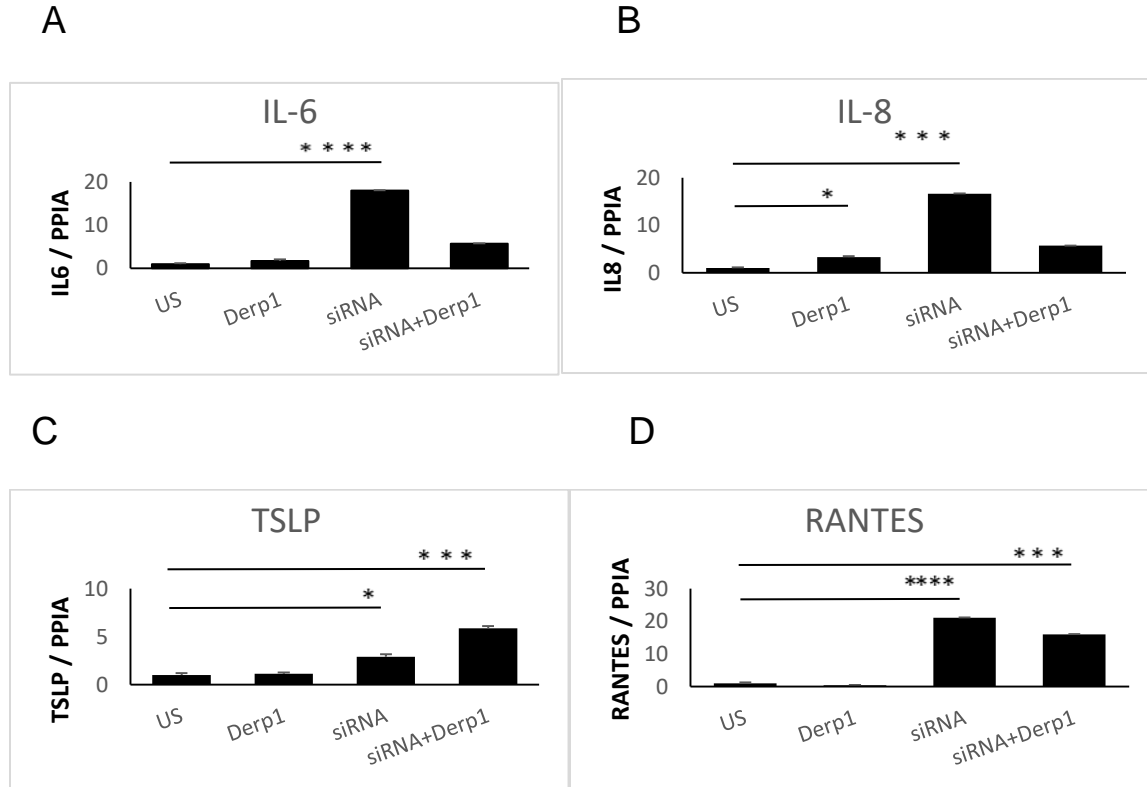
Şekil 4.9: Der p 1 ve SERPINB1 siRNA'nın IL-6 (A), IL-8 (B), TSLP (C), RANTES (D), GM-CSF (E) ve PDGF-β (F) ifadesi üzerine olan etkileri

24 saat Der p 1 ile karşılaşma sonucunda; IL-8, IL-6, TSLP, GM-CSF ve RANTES ($p=0,0036$) genlerinin ifadesi uyarı olmayan kontrole göre artmıştır. PDGF-β geninin ifadesi azalmıştır. RANTES ve GM-CSF'de artış farkı istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmuştur ($p<0,05$).

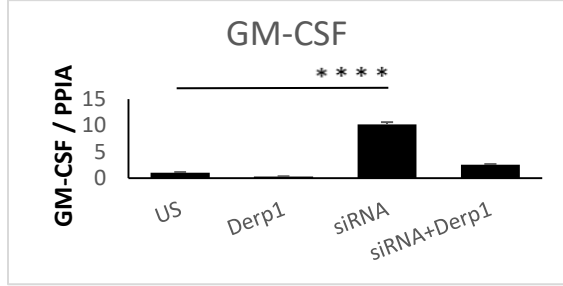
SERPINB1 siRNA ile SERPINB1 genini susturulduğu koşullarda IL-6, GM-CSF ve RANTES (p=0,0133) genlerinin ifadesi artmış, TSLP ve PDGF-β genlerinin ifadesi ise azalmıştır. IL-8 geninin ifadesi ise değişmemiştir.

SERPINB1'in susturulduğu ve Der p 1 ile uyarılan koşullarda; IL-6, IL-8 (p=0,0011) , TSLP (p=0,0120), RANTES (p=0,0147) GM-CSF (p=0,0341) ve PDGF-β (p=0,0016) genlerinin ifadesi uyarılmamış koşula göre artmıştır.

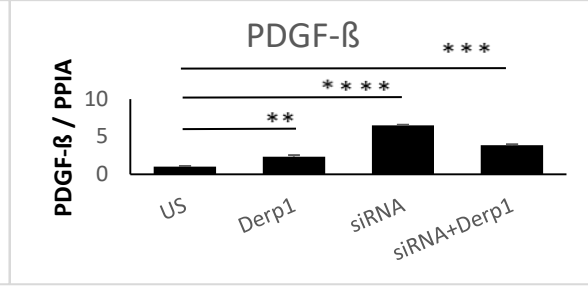
4.3.2.3 36 Saat Der p 1 ile Uyarılan Koşulda SERPINB1 Bağlı Sitokin ve Kemokin İfadesindeki Değişiklikler



E



F



Şekil 4.10: Der p 1 ve SERPINB1 siRNA'nın IL-6 (A), IL-8 (B), TSLP (C), RANTES (D), GM-CSF (E) ve PDGF-β (F) ifadesi üzerine olan etkileri sure bilgisi

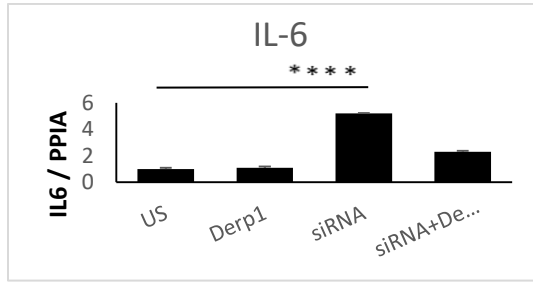
36 saatte Der p 1 ile uyarılma sonucunda; IL-8, IL-6 ve PDGF-β ($p=0,0058$) genlerinin ifadesi uyarı olmayan kontrole göre artmıştır. IL-6'daki artış sınırlı düzeyde gözlenirken; IL-8 ve PDGF-β ise sınırda anlamlıdır ($p<0,05$). GM-CSF ve RANTES genlerinin ifadesinde ise azalma gözlenmiştir. TSLP geninin ifadesi değişmemiştir.

SERPINB1 siRNA ile genin susturulduğu koşullarda IL-8 ($p=0,0001$), IL-6 ($p=0,0001$), TSLP ($p=0,0393$), GM-CSF ($p=0,0001$), PDGF-β ($p=0,0001$) ve RANTES ($p=0,001$) genlerinin ifadesi istatistiksel olarak anlamlı biçimde artmıştır ($p<0,05$).

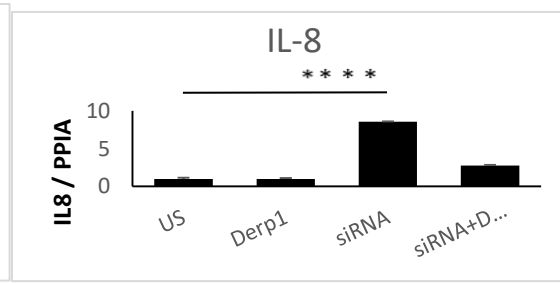
SERPINB1 siRNA ile genin susturulduğu ve Der p 1 ile 36 saat uyarının gerçekleştiği koşullarda IL-8, IL-6, TSLP ($p=0,001$), GM-CSF, PDGF-β ($p=0,0002$) ve RANTES ($p=0,0001$) genlerinin ifadeleri artmıştır.

4.3.2.4 48 Saat Der p 1 ile Uyarılan Koşulda SERPINB1 Bağlı Sitokin ve Kemokin İfadesindeki Değişiklikler

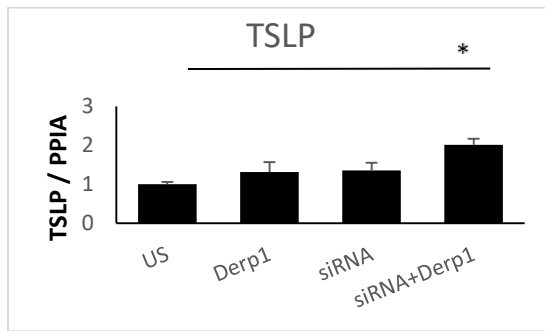
A



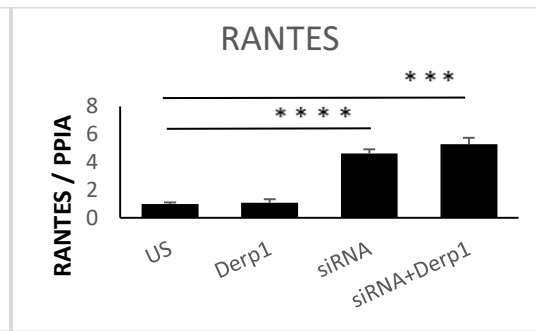
B



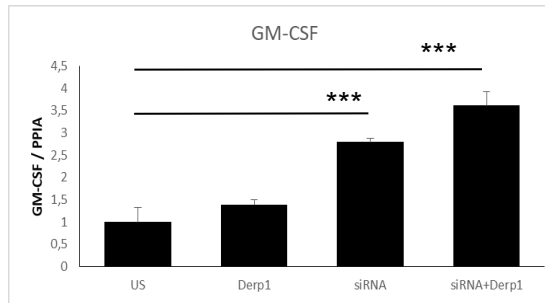
C



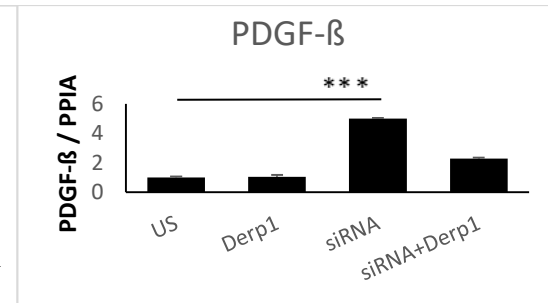
D



E



F



Şekil 4.11: 48 saatte Der p 1 ve SERPINB1 siRNA'nın IL-6 (A), IL-8 (B), TSLP (C), RANTES (D), GM-CSF (E) ve PDGF- β (F) ifadesi üzerine olan etkileri

48 saatte Derp1 ile karşılaşma sonucunda; TSLP geninin ifadesi, uyarı olmayan kontrole göre hafif bir artış gözlenmiştir. IL-8 geninin ifadesi azalmış ancak iki değişiklikte

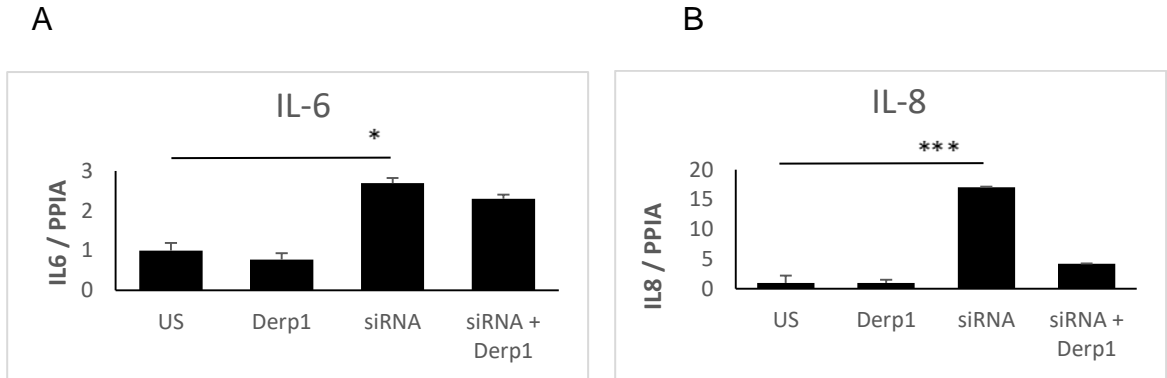
istatistiksel olarak nalama ulaşmamıştır ($p>0,05$). RANTES, GM-CSF ($p=0,001$), IL-6 ve PDGF- β genlerinin ifadesi değişmemiştir.

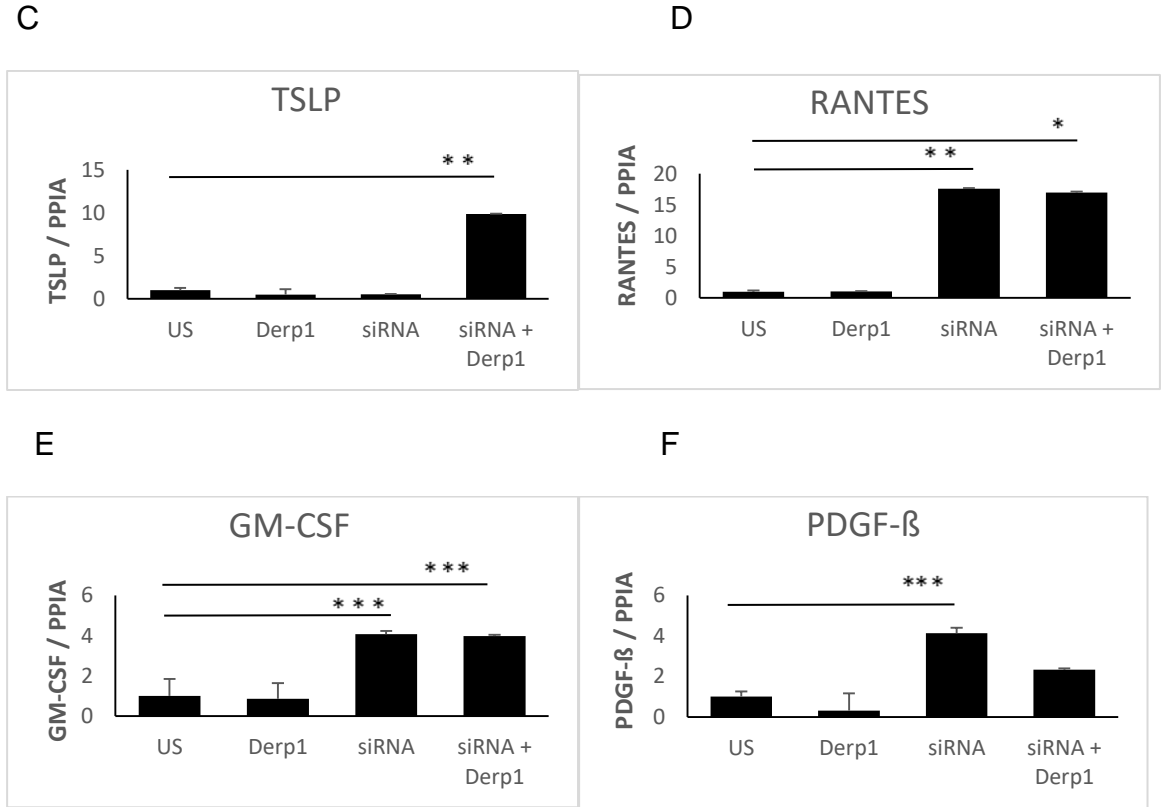
SERPINB1 siRNA ile genin susturulduğu koşullarda; IL-8 ($p=0,0001$), IL-6 ($p=0,0001$), GM-CSF, PDGF- β ($p=0,001$) ve RANTES ($p=0,001$) genlerinin ifadesi anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$).

SERPINB1 siRNA ile genin susturulduğu ve Der p 1 ile 48 saat uyarının gerçekleştiği koşullarda IL-8, IL-6, TSLP, GM-CSF ($p=0,001$), PDGF- β ve RANTES ($p=0,001$) genlerinin ifadeleri artmıştır (Şekil 4.11)

4.3.3 SERPINB2 siRNA'nın Sitokin ve Kemokin İfadesi Üzerine Olan Etkisi

SERPINB2 ifadesinin sitokin ve kemokin sentezi üzerine etkisini belirlemek için bronş epitel hücreler 24 saat süreyle Der p 1 (5 μ g) ile uyarıldı. SERPINB2 siRNA'nın olduğu ve olmadığı koşullarda IL-6, IL-8, GM-CSF, RANTES, PDGF- β , IL-25, IL-33 ve TSLP sitokin ve kemokinlerin ifadelerine bakıldı. Anlamlı çıkan sonuçlar Şekil 4.12'de verildi.





Şekil 4.12: Der p 1 ve SERPINB2 siRNA'nın IL-6 (A), IL-8 (B), TSLP (C), RANTES (D), GM-CSF (E) ve PDGF-β (F) ifadesi üzerine olan etkileri

24 saatte Derp1 ile karşılaşma sonucunda;IL-6, IL-8, GM-CSF, PDGF-β ve TSLP genlerinin ifadesinde uyarı olmayan kontrole göre azalma gözlenmiştir. IL-8 ve RANTES genlerinin ifadesi değişmemiştir.

SERPINB2 siRNA ile genin susturulduğu koşullarda; IL-6, IL-8, RANTES, GM-CSF ve PDGF-β genlerinin ifadesi anlamlı olarak artmıştır. TSLP geninin ifadesi azalmıştır.

SERPINB2 siRNA ile genin susturulduğu ve Der p 1 ile 24 saat uyarının gerçekleştiği koşullarda IL-8, IL-6, TSLP, GM-CSF, PDGF-β ve RANTES genlerinin ifadeleri artmıştır (Şekil 4.12).

| | IL-6 | IL-8 | GM-CSF | RANTES | PDGF-β | TSLP |
|----------------------|------|------|--------|--------|--------|------|
| Der p 1 | | | | | | |
| 12 saat | + | + | <-> | - | - | + |
| 24 saat | + | + | + | + | - | + |
| 36 saat | + | + | - | - | + | <-> |
| 48 saat | <-> | - | <-> | <-> | <-> | + |
| siRNA | | | | | | |
| 12 saat | + | + | + | + | - | - |
| 24 saat | + | <-> | + | + | - | - |
| 36 saat | + | + | + | + | + | + |
| 48 saat | + | + | + | + | + | + |
| SiRNA+Der p 1 | | | | | | |
| 12 saat | + | + | + | + | + | - |
| 24 saat | + | + | + | + | + | + |

| | | | | | | |
|---------|---|---|---|---|---|---|
| 36 saat | + | + | + | + | + | + |
| 48 saat | + | + | + | + | + | + |

+ : İfadesinde anlamlı artış gözlenen

- : İfadesinde azalma gözlenen

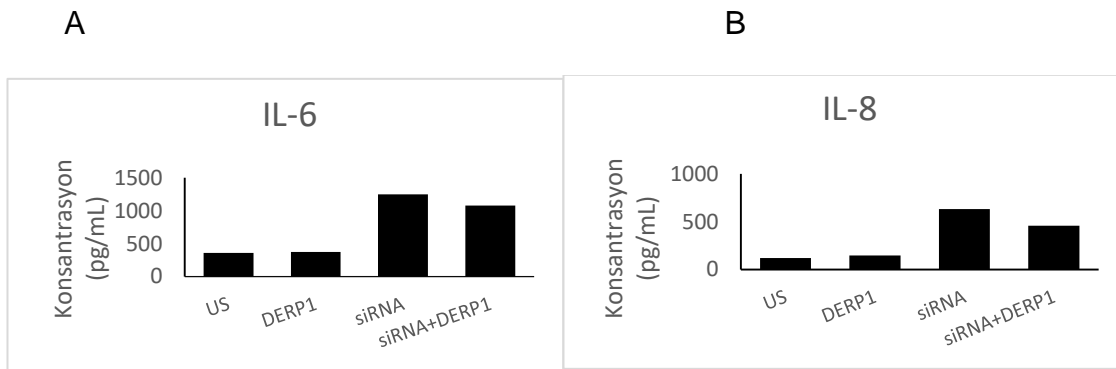
<-> : İfadesinde değişiklik gözlenmeyen

4.4 SERPINB1 ve SERPINB2 Gen İfadesi Susturulmasının IL-6 ve IL-8 Protein Düzeyine Etkisi

Gerçek zamanlı PZR deneyleri sonunda SERPINB1 ve SERPINB2 genelerinin susturulması sonunda ifadesi en fazla değişen IL-6 ve IL-8 proteinlerindeki değişiklik ELISA yöntemiyle belirlendi.

4.4.1. 12 Saat Der p 1 ile Uyarı Sonucunda SERPINB1 siRNA'nın IL-6 ve IL-8'in Protein Düzeylerine Olan Etkisi

12 saat Der p 1 (5 µg/mL) ile uyarılan ve SERPINB1 siRNA ile ifadesi susturulmuş ve susturulmamış koşullarda IL-6 ve IL-8 protein düzeylerindeki değişimler Şekil 4.13'te verilmiştir.

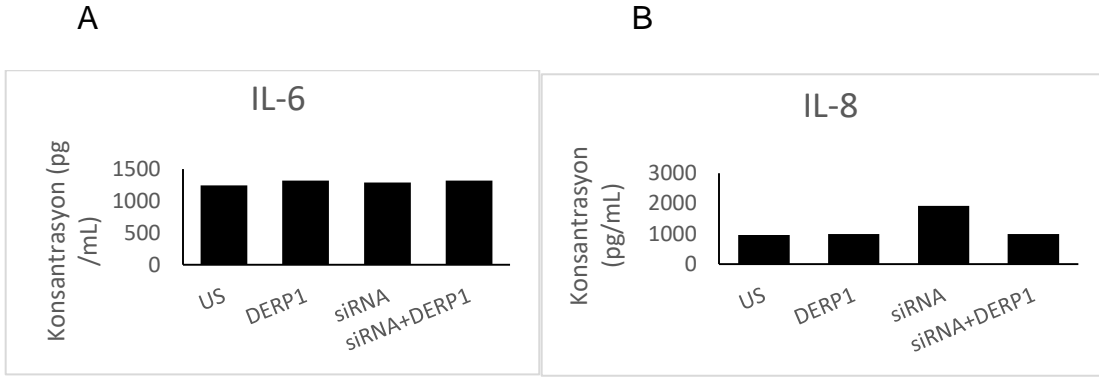


Şekil 4.13: 12 saat Der p 1 (5 µg/mL) ve SERPINB1 siRNA'nın IL-6 (A) ve IL-8 (B) protein düzeyine etkisi

IL-6 ve IL-8 protein düzeyleri SERPINB1 siRNA ile genin susturulduğu koşullarda uyarılmamış koşullara ve Der p 1 ile uyarılmış koşula göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$).

4.4.2. 24 Saat Der p 1 ile Uyarı Sonucunda SERPINB1 siRNA'nın IL-6 ve IL-8'in Protein Düzeylerine Olan Etkisi

24 saat Der p 1 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ile uyarılan ve SERPINB1 siRNA ile ifadesi susturulmuş ve susturulmamış koşullarda IL-6 ve IL-8 protein düzeylerindeki değişimler Şekil 4.14'te verilmiştir.

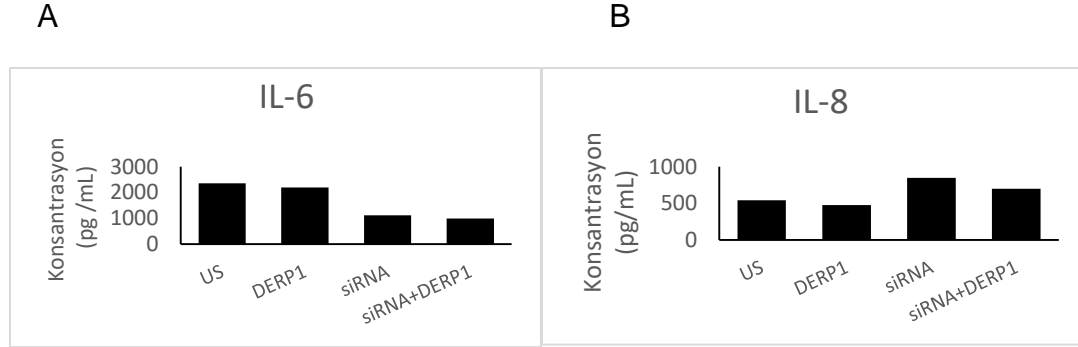


Şekil 4.14: 24 saatte Der p 1 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ve SERPINB1 siRNA'nın IL-6 (A) ve IL-8 (B) protein düzeyine etkisi

24 saat Der p 1 ile uyarılan koşulda IL-6 protein düzeyi uyarılmış ve uyarılmamış koşullarda ve SERPINB1 geninin susturulduğu koşullarda da değişmemiştir. Ancak IL-8 protein düzeyi SERPINB1 siRNA kullanılan koşulda uyarılmamış koşula göre artmıştır (Şekil 4.14)

4.4.3 36 saat Der p 1 ile Uyarı Sonucunda SERPINB1 siRNA'nın IL-6 ve IL-8'in Protein Düzeylerine Olan Etkisi

36 saat Der p 1 (5 µg/mL) ile uyarılan ve SERPINB1 siRNA ile ifadesi susturulmuş ve susturulmamış koşullarda IL-6 ve IL-8 protein düzeylerindeki değişimler Şekil 4.15'te verilmiştir.



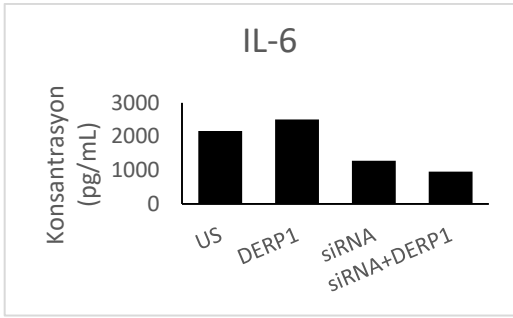
Şekil 4.15: 36 saat Der p 1 (5 µg/mL) ve SERPINB1 siRNA'nın IL-6 (A) ve IL8 (B) protein düzeyine etkisi

36 saat sonunda Der p 1 ile uyarı IL-6 ve IL-8 protein düzeyinde bir değişikliğe yol açmamasına karşın SERPINB1 siRNA ile susturulmuş koşullarda IL-6 protein düzeyi düşerken IL-8 düzeyi ise artmıştır (Şekil 4.15).

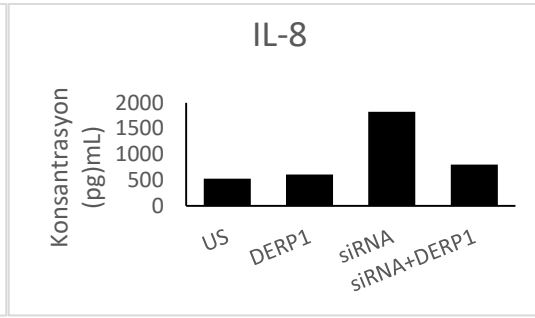
4.4.2.4 48 saat Der p 1 ile Uyarılan Koşulda SERPINB1'e Bağlı IL-6 ve IL-8'in Protein Düzeylerindeki Değişimler

48 saat Der p 1 (5 µg/mL) ile uyarılan ve SERPINB1 siRNA ile ifadesi susturulmuş ve susturulmamış koşullarda IL-6 ve IL-8 protein düzeylerindeki değişimler Şekil 4.16'da verilmiştir.

A



B

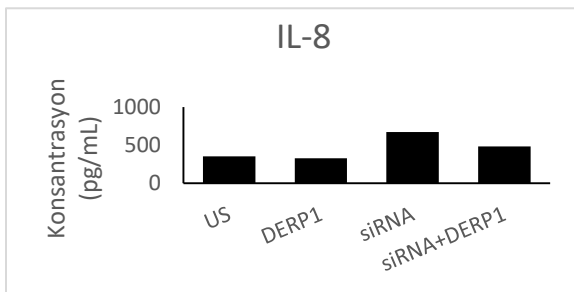


Şekil 4.16: 48 saat Der p 1 (5 µg/mL) ve SERPINB1 siRNA'nın IL-6 (A) ve IL-8 (B) protein düzeyine etkisi

48 saat Der p 1 ile uyarı sonucu 36 saattekine benzer bir profil göstermektedir. Der p1 ile uyarı sonucunda her iki protein düzeyinde de bir değişiklik olmamasına karşın SERPINB1 siRNA ile genin susturulduğu koşullarda 36 saatteki sonulara benzer bir şekilde IL-6 protein düzeyi düşerken IL-8 düzeyi ise artmaktadır. ($p < 0.05$)

4.4.3. SERPINB2 siRNA'nın IL-8'in Protein Düzeylerine Olan Etkisi

24 saat Der p 1 ile uyarılan koşulda SERPINB2'e bağlı IL-8'in protein düzeylerindeki değişimler Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.17: Der p 1 (5 µg/mL) ve SERPINB2 siRNA'nın IL-8 protein düzeyine etkisi

24 saat Der p 1 ile uyarımın etkisi gözlenmemiştir. siRNA ile SERPINB2 geninin baskılandığı koşulda, IL-8 protein düzeyi artmıştır. siRNA ile SERPINB2 geninin baskılandığı ve Der p 1 ile hücrelerin uyarıldığı koşulda IL-8 protein düzeyinde azalma gözlenmiştir.

SERPINB2 geninin 24 saat süre ile siRNA ile baskılandığı deney koşulunda IL-6 protein düzeyinde çıkan yüksek konsantrasyon nedeniyle ölçüm gerçekleştirilememiştir.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Astım; hırıltılı solunum, nefes darlığı, göğüste sıkışma ve öksürük ataklarına neden olan, mast hücreler, eozinofiller ve T lenfositler gibi birçok hücre tipinin rol oynadığı solunum yollarının kronik inflamatuvar bir hastalığıdır.

Astım patogenezinde, astımın ortaya çıkışmasında ve gelişmesinde etkili faktörlerden biri alerjenler, sigara dumanı ve enfeksiyon gibi etkenleri içine alan çevresel faktörlerdir. Çevresel faktörlere karşı vücudun geliştirdiği mekanizma ise havayolu inflamasyonudur ve bu inflamasyonun başladığı ilk basamak hava yolu epitel hücreleridir. Hava yolu epitel hücreleri alerjen, polen, sigara dumanı gibi çevresel irritantlara karşı hava yolunun bariyer hücreleridir. Astımın esas olarak bir epitel bozukluğu olduğu ve klinik bulgularının yanı sıra, alerjik yollara tamamen bağlı olmanın dışında epitelyal fiziksel ve fonksiyonel bariyer özellikleri ile daha fazla ilgisinin olduğu kanıtlanmıştır [139].

Hava yolu epitel hücreleri fiziksel bariyer özelliklerinin yanı sıra sentezledikleri sitokin, kemokin ve büyüme faktörleriyle de inflamatuvar süreçte rol oynarlar. Laboratuvarımızda yaptığımız çalışmaların sonucunda alerjen proteazla karşılaşma sonucunda epitel hücrelerin çeşitli proteaz inhibitörlerini salgıladıklarını bulduk. Bu proteaz inhibitörleri içerisinde önemli iki tanesi de SERPINB1 ve SERPINB2 proteaz inhibitörleridir.

SERPINB1 lökosit elastaz inhibitörü (LEI) olarak da adlandırılan, proteinlerin serpin (serin proteaz inhibitörleri) süper familyasının B kolunun bir üyesidir ve yaygın olarak nötrofil elastaz inhibitörü olarak bilinmektedir [140]. SERPINB2 ise plazminojen etkinleştirici inhibitör 2'dir ve PAI-2 olarak da adlandırılır. Serpin süper ailesinin Clade B veya Ovalbumin benzeri serin proteaz inhibitörü alt grubunun bir üyesidir [141].

Tez çalışması kapsamında Der p 1 ile karşılaşma sonrasında bronş epitel hücrelerinde ifadesi değişen SERPINB1 ve SERPINB2 proteaz inhibitörlerinin sitokin, kemokin ve büyüme faktörleri üzerine etkileri araştırıldı. SERPINB1 ve SERPINB2 genlerinin etkisi bu genlere özgü siRNA'lar kullanılarak genlerin susturulduğu ve susturulmadığı koşulların karşılaştırılmasıyla belirlendi. Transfeksiyon sonrasında, epitel hücreden sentezlenen IL-

6, IL-8, IL-25, IL-33, GM-CSF, CCL11, RANTES, PDGF- β ve TSLP 'nin ifadesine bakmak için gerçek zamanlı PZR yapıldı.

Alerjen proteazlarla karşılaşma sonucunda epitel hücrede sıkı bağlantı proteinlerinin deşre olduğu, epitel harabiyetin meydana geldiği ve epitel hücre kaynaklı IL-6, IL-8, GM-CSF, IL-25, IL-33 ve TSLP sentezinin arttığı literatürde gösterilmiştir [66]. Ancak Der p 1 ile karşılaşma sonucunda epitel hücrede artan proteaz inhibitörleri ile yine Der p 1 ile karşılaşma sonucunda epitel hücreden artan inflamatuvar sitokinlerin ilişkisi bilinmemektedir. SERPINB1 geninin susturulduğu ve 12 saat süreyle Der p 1 ile uyarılan koşulda pro- ve anti-inflamatuvar cevapta etkili olan IL-6'nın 12. saatte epitel hücrenin Der p 1 ile uyarımında, SERPINB1 proteaz inhibitörü varlığında ifadesinin düştüğü, SERPINB1 geni susturulduğunda ifadesinin arttığı, 24. saatteki stimölasyon sonunda IL-6 geninin ifadesinin hem epitel hücrenin uyarıldığı ve hem de SERPINB1 geninin susturulduğu koşulda ise ifadesinin arttığı gözlemlendi. Ancak 48. saate kadar ifadesinin artmaya devam ettiği, 48. saatte değişmediği görüldü. Influenza virüsüyle enfekte olmuş SERPINB1 nakavt farelerin immün hücrelerinin, aşırı IL-6 ve TNF-a ürettiği görülmüştür [142]. 12 saatlik uyarının olduğu siRNA'lı örneklerde görülen artış 24 saatte devam etmemiştir. Bu sonuç Gong ve arkadaşlarının sonuçlarıyla benzerdir [142]. SERPINB2 geninin susturulduğu koşullarda ise IL-6 protein seviyesindeki artış 24 saatte devam etmiştir.

Epitel hücre sitokinlerinden TSLP 12.ve 24. saatlerde yapılan deneyde proteaz ile uyarıldığı zaman ifadesinin arttığı, siRNA ile SERPINB1 proteaz inhibitörü susturulduğunda ise yine 12. ve 24. saatlerde TSLP geninin ifadesinin azaldığı bulundu. 12. saatte SERPINB1 geni susturulup, Der p 1 proteazı ile uyarılma koşulunda ise, TSLP ifadesinin azaldığı bulundu. TSLP sitokininin ifadesinde SERPINB1 ile doğru orantılı bir sonuç elde edilmesi, bu durumun SERPINB1 proteaz inhibitörünün TSLP ifade mekanizmasında rol aldığı düşünmektedir.

TSLP, dendritik hücre aracılı Th2 farklılaşmasını indükleyen önemli bir sitokindir. Yapılan çalışmalarda, epitelten türetilmiş TSLP'nin, IL-5, IL-6, IL-13, GM-CSF ve CCL11 ve IL-8

de dahil olmak üzere kemokinleri içeren IL-1 β ve TNF varlığında sitokin üretmek için mast hücrelerini de aktive ettiğini göstermektedir [143, 144]. HDM alerjisi kullanılan başka bir çalışmada ise, hava yolu epitel hücrelerinden salınan IL-4 ve IL-13 sitokinleri, IL-8 ve GM-CSF ile sinerji göstermiştir [143].

Çeşitli proinflatuar hücre tiplerini aktive etme özelliğine sahip kemokinlerden biri olarak bilinen RANTES'in, SERPINB1 geni susturulmuş koşulda proteaz ile uyarıldığında, 12, 24, 36. ve 48. saatlerde ifadesinin artması, ancak proteaz inhibitörü varlığında ifadesinin sürekli değişmesi, SERPINB1'in RANTES kemokininin regülasyonunda yer alabileceğini düşündürmektedir.

PDGF- β , RANTES ve GM-CSF genlerinin ifadeleri SERPINB1 susturulan koşullarda artış göstermektedir ancak bu cevabın mekanizmasını şu anki bilgilerimizle açıklayamamaktayız.

Diğer önemli bir kemokin olan IL-8 polimorfonükleer lökositler, T hücreleri, NK hücreler ve B hücreleri için güçlü bir aktivatör, kemoatraktan ve hayatta kalma ajanıdır [145]. Bronş epitel hücrelerinde IL-8 ifadesinin 12. 24. ve 36. saatlerde Der p 1 ile uyarım sonucu arttığını, 48. saatte ise ifadesinin değişmediğini gördük. IL-8 protein sentezinin ise SERPINB1'in susturulduğu koşullarda 12 saat ile 36 saatlik uyarıda yaklaşık olarak 4 katlık bir artış olduğunu tespit ettik. Literatürde Der p 1 ile uyarı sonucu epitel hücrede IL-8 ifadesinin arttığı gösterilmiş ise de bu cevabın proteaz inhibitörlerle etkileşimi bilinmemektedir.

İnterlökin 8 (IL-8), biyolojik işlevleri farklı etkilere sahip üç NSP üyesi tarafından bölünen, nötrofil çeken bir kemokindir. İlginç bir şekilde, IL-8'in CG ve NE aracılı N terminalinin kesilmesi kemokinin inaktivasyonuna yol açarken; PR3, IL-8'i daha güçlü bir nötrofil aktivasyon versiyonuna dönüştürmektedir. Farelerde IL-8'in doğrudan homoloğu olmamakla birlikte, ilgili IL8 reseptör homoloğunun, makrofaj inflamatuar protein 2 (MIP-2) ve yaklaşık on kat daha az etkili kemokin KC ile en güçlü şekilde aktive olduğu bilinmektedir [146].

Nötrofiller, reaktif oksijen metabolitleri ve serin proteinazlar, elastaz ve katepsin G gibi granül proteinleri içeren sitotoksik bileşikleri serbest bırakma yetenekleri sayesinde doku hasarını indükleyebilirler. Nötrofillerin nekroz ile degranüle edilmesiyle, nötrofil serin proteazlar (NSP) salınır. Salınan nötrofil serin proteazlar, proteaz inhibitörleri tarafından hızla inaktive edilebilir, ancak ekstravasküler boşlukta, inhibitör eksikliği veya nötrofil serin proteazlarının fazlalığı gibi lokal koşullar, fonksiyonel ömürlerini uzatabilir. Bu proteazlar hücre dışı matrisin bozulmasına hem endotelial hem de epitelyal hücrelere zarar verir ve siliyer fonksiyonu etkiler. NSP'ler, elastaz, katepsin G ve proteinaz-3, dolaşımdaki nötrofillerde taşınan yüksek döngülü enzimlerdir.

IL-8'in biyoaktivitesi, daha sonra, kemokin N-terminalinin PR3 aracılı kesilmesiyle artırılabilir ve bu da iltihaplanma bölgesine daha fazla nötrofilin artırılmasına yol açar. NSP'lerin üç üyesinin de, çözünebilir IL-6 reseptörünü inaktive ettiği, böylelikle de kistik fibrozisli hastalarda inflamatuvar duruma katkıda bulunabilen IL-6 sinyallemesine müdahale ettiği gösterilmiştir [146].

Serin proteaz sitosolik inhibitörü SERPINB1, nötrofillerin sitoplazmasında PR3 aktivitesini dengeler ve nötrofillerdeki SERPINB1'in delesyonu, doğal ölümü hızlandırır [100].

SERPINB1 ve SERPINB2 gerçek zamanlı PZR ve protein sonuçları göstermektedir ki, epitel hücreden sentezlenen bu proteaz inhibitörleri epitel hücre kaynaklı IL-6, IL-8, TSLP, RANTES, GM-CSF, PDGF- β sitokin ve kemokinlerin sentezinde aktif olarak rol oynamaktadır.

Bilgilerimiz dahilinde literatürde ilk defa gösterilen bu sonuçların direk ya da dolaylı bir mekanizmalardan hangisi üzerinden gerçekleştiğinin gösterilebilmesi için ileri deneylere ihtiyaç vardır.

Bu mekanizmanın açıklanması için çalışmalarımız devam edecektir.

6. KAYNAKLAR

- [1] X. Su, Y. Ren, M. Li, X. Zhao, L. Kong, and J. Kang, "Prevalence of Comorbidities in Asthma and Nonasthma Patients: A Meta-analysis," *Medicine (Baltimore)*, vol. 95, p. e3459, **2016**.
- [2] R. F. Lemanske, Jr. and W. W. Busse, "Asthma: clinical expression and molecular mechanisms," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 125, pp. S95-102, **2010**.
- [3] M. Masoli, D. Fabian, S. Holt, R. Beasley, and P. Global Initiative for Asthma, "The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report," *Allergy*, vol. 59, pp. 469-78, **2004**.
- [4] Z. Goseva, E. J. Janeva, A. Gjorcev, Z. Arsovski, and S. Pejkovska, "Role and Significance of Markers of Inflammation in the Asthmatic Disease," *Open Access Maced J Med Sci*, vol. 3, pp. 630-4, **2015**.
- [5] S. O. Ayşe Bayram, İnci Gülmez, Ramazan Demir, Hakan Büyükoğlan, "The Prevalance of Atopy and Allergic Rhinitis in Asthma," **2010**.
- [6] "Global Strategy for Asthma Management and Prevention," **2014**.
- [7] L. P. Boulet and M. E. Boulay, "Asthma-related comorbidities," *Expert Rev Respir Med*, vol. 5, pp. 377-93, **2011**.
- [8] *T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Türkiye Kronik Hava Yolu Hastalıklarını (ASTİM-KOAH) Önleme ve Kontrol Programı, 2009-2013 Eylem Planı*. Ankara: Anıl Matbaacılık, **2009**.
- [9] H. K. Reddel, S. S. Hurd, and J. M. FitzGerald, "World Asthma Day. GINA 2014: a global asthma strategy for a global problem," *Int J Tuberc Lung Dis*, vol. 18, pp. 505-6, **2014**.
- [10] W. J. Song, M. G. Kang, Y. S. Chang, and S. H. Cho, "Epidemiology of adult asthma in Asia: toward a better understanding," *Asia Pac Allergy*, vol. 4, pp. 75-85, **2014**.
- [11] "Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee," *Lancet*, vol. 351, pp. 1225-32, **1998**.
- [12] D. P. Strachan and D. G. Cook, "Health effects of passive smoking. 6. Parental smoking and childhood asthma: longitudinal and case-control studies," *Thorax*, vol. 53, pp. 204-12, **1998**.
- [13] M. R. Sears, J. M. Greene, A. R. Willan, E. M. Wiecek, D. R. Taylor, E. M. Flannery, J. O. Cowan, G. P. Herbison, P. A. Silva, and R. Poulton, "A longitudinal,

- population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood," *N Engl J Med*, vol. 349, pp. 1414-22, **2003**.
- [14] S. N. Baxi and W. Phipatanakul, "The role of allergen exposure and avoidance in asthma," *Adolesc Med State Art Rev*, vol. 21, pp. 57-71, viii-ix, **2010**.
- [15] K. Amin, A. Ekberg-Jansson, C. G. Lofdahl, and P. Venge, "Relationship between inflammatory cells and structural changes in the lungs of asymptomatic and never smokers: a biopsy study," *Thorax*, vol. 58, pp. 135-42, **2003**.
- [16] A. Tam, S. Wadsworth, D. Dorscheid, S. F. Man, and D. D. Sin, "The airway epithelium: more than just a structural barrier," *Ther Adv Respir Dis*, vol. 5, pp. 255-73, **2011**.
- [17] K. Gangl, R. Reiningger, D. Bernhard, R. Campana, I. Pree, J. Reisinger, M. Kneidinger, M. Kundi, H. Dolznig, D. Thurnher, P. Valent, K. W. Chen, S. Vrtala, S. Spitzauer, R. Valenta, and V. Niederberger, "Cigarette smoke facilitates allergen penetration across respiratory epithelium," *Allergy*, vol. 64, pp. 398-405, **2009**.
- [18] A. Spira, J. Beane, V. Shah, G. Liu, F. Schembri, X. Yang, J. Palma, and J. S. Brody, "Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, pp. 10143-8, **2004**.
- [19] Y. H. Kim, E. Lee, H. J. Cho, S. I. Yang, Y. H. Jung, H. Y. Kim, J. H. Seo, H. B. Kim, S. Y. Lee, D. J. Song, W. K. Kim, G. C. Jang, J. Y. Shim, E. J. Kim, J. S. Lee, J. W. Kwon, and S. J. Hong, "Association between menarche and increased bronchial hyper-responsiveness during puberty in female children and adolescents," *Pediatr Pulmonol*, vol. 51, pp. 1040-1047, **2016**.
- [20] W. J. Gauderman, E. Avol, F. Gilliland, H. Vora, D. Thomas, K. Berhane, R. McConnell, N. Kuenzli, F. Lurmann, E. Rappaport, H. Margolis, D. Bates, and J. Peters, "The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age," *N Engl J Med*, vol. 351, pp. 1057-67, **2004**.
- [21] M. Guarnieri and J. R. Balmes, "Outdoor air pollution and asthma," *Lancet*, vol. 383, pp. 1581-92, **2014**.
- [22] F. Castro-Giner, N. Kunzli, B. Jacquemin, B. Forsberg, R. de Cid, J. Sunyer, D. Jarvis, D. Briggs, D. Vienneau, D. Norback, J. R. Gonzalez, S. Guerra, C. Janson, J. M. Anto, M. Wjst, J. Heinrich, X. Estivill, and M. Kogevinas, "Traffic-related air pollution, oxidative stress genes, and asthma (ECHRS)," *Environ Health Perspect*, vol. 117, pp. 1919-24, **2009**.
- [23] H. A. Scott, M. E. Jensen, and L. G. Wood, "Dietary interventions in asthma," *Curr Pharm Des*, vol. 20, pp. 1003-10, **2014**.

- [24] I. Rahman, "Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases," *J Biochem Mol Biol*, vol. 36, pp. 95-109, **2003**.
- [25] A. G. Bowie and L. A. O'Neill, "Vitamin C inhibits NF-kappa B activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase," *J Immunol*, vol. 165, pp. 7180-8, **2000**.
- [26] N. Guler, E. Kirerleri, U. Ones, Z. Tamay, N. Salmayenli, and F. Darendeliler, "Leptin: does it have any role in childhood asthma?," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 114, pp. 254-9, **2004**.
- [27] O. Kilinc and M. Akgun, "The Future Plans of Turkish Thoracic Journal," *Turk Thorac J*, vol. 17, p. 131, **2016**.
- [28] I. Romieu, A. Fabre, A. Fournier, F. Kauffmann, R. Varraso, S. Mesrine, B. Leynaert, and F. Clavel-Chapelon, "Postmenopausal hormone therapy and asthma onset in the E3N cohort," *Thorax*, vol. 65, pp. 292-7, **2010**.
- [29] R. J. Troisi, F. E. Speizer, W. C. Willett, D. Trichopoulos, and B. Rosner, "Menopause, postmenopausal estrogen preparations, and the risk of adult-onset asthma. A prospective cohort study," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 152, pp. 1183-8, **1995**.
- [30] A. S. Payne and R. J. Freishtat, "Conserved steroid hormone homology converges on nuclear factor kappaB to modulate inflammation in asthma," *J Invest Med*, vol. 60, pp. 13-7, **2012**.
- [31] V. Saint-Criq, R. Rapetti-Mauss, Y. R. Yusef, and B. J. Harvey, "Estrogen regulation of epithelial ion transport: Implications in health and disease," *Steroids*, vol. 77, pp. 918-23, **2012**.
- [32] J. Bousquet, P. K. Jeffery, W. W. Busse, M. Johnson, and A. M. Vignola, "Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 161, pp. 1720-45, **2000**.
- [33] C. Ober and S. Hoffjan, "Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery," *Genes Immun*, vol. 7, pp. 95-100, **2006**.
- [34] Y. Yao, L. Zhu, J. Li, Y. Jin, and L. He, "Association of HLA-DRB1 Gene Polymorphism with Risk of Asthma: A Meta-Analysis," *Med Sci Monit Basic Res*, vol. 22, pp. 80-6, **2016**.
- [35] K. Tizaoui, W. Kaabachi, K. Hamzaoui, and A. Hamzaoui, "Association of Single Nucleotide Polymorphisms in Toll-like Receptor Genes With Asthma Risk: A Systematic Review and Meta-analysis," *Allergy Asthma Immunol Res*, vol. 7, pp. 130-40, **2015**.

- [36] S. T. Holgate, "Pathogenesis of asthma," *Clin Exp Allergy*, vol. 38, pp. 872-97, **2008**.
- [37] C. N. Zhao, Y. Fan, J. J. Huang, H. X. Zhang, T. Gao, C. Wang, T. Wang, and L. F. Hou, "The Association of GSDMB and ORMDL3 Gene Polymorphisms With Asthma: A Meta-Analysis," *Allergy Asthma Immunol Res*, vol. 7, pp. 175-85, **2015**.
- [38] J. E. Sordillo, R. Kelly, S. Bunyavanich, M. McGeachie, W. Qiu, D. C. Croteau-Chonka, M. Soto-Quiros, L. Avila, J. C. Celedon, J. M. Brehm, S. T. Weiss, D. R. Gold, and A. A. Litonjua, "Genome-wide expression profiles identify potential targets for gene-environment interactions in asthma severity," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 136, pp. 885-92 e2, **2015**.
- [39] E. von Mutius, "Gene-environment interactions in asthma," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 123, pp. 3-11; quiz 12-3, **2009**.
- [40] J. W. Steinke and L. Borish, "Genetics of allergic disease," *Med Clin North Am*, vol. 90, pp. 1-15, **2006**.
- [41] N. G. Papadopoulos, H. Arakawa, K. H. Carlsen, A. Custovic, J. Gern, R. Lemanske, P. Le Souef, M. Makela, G. Roberts, G. Wong, H. Zar, C. A. Akdis, L. B. Bacharier, E. Baraldi, H. P. van Bever, J. de Blic, A. Boner, W. Burks, T. B. Casale, J. A. Castro-Rodriguez, Y. Z. Chen, Y. M. El-Gamal, M. L. Everard, T. Frischer, M. Geller, J. Gereda, D. Y. Goh, T. W. Guilbert, G. Hedlin, P. W. Heymann, S. J. Hong, E. M. Hossny, J. L. Huang, D. J. Jackson, J. C. de Jongste, O. Kalayci, N. Ait-Khaled, S. Kling, P. Kuna, S. Lau, D. K. Ledford, S. I. Lee, A. H. Liu, R. F. Lockey, K. Lodrup-Carlsen, J. Lotvall, A. Morikawa, A. Nieto, H. Paramesh, R. Pawankar, P. Pohunek, J. Pongracic, D. Price, C. Robertson, N. Rosario, L. J. Rossenwasser, P. D. Sly, R. Stein, S. Stick, S. Szeffler, L. M. Taussig, E. Valovirta, P. Vichyanond, D. Wallace, E. Weinberg, G. Wennergren, J. Wildhaber, and R. S. Zeiger, "International consensus on (ICON) pediatric asthma," *Allergy*, vol. 67, pp. 976-97, **2012**.
- [42] S. T. Holgate, H. S. Arshad, G. C. Roberts, P. H. Howarth, P. Thurner, and D. E. Davies, "A new look at the pathogenesis of asthma," *Clin Sci (Lond)*, vol. 118, pp. 439-50, **2009**.
- [43] K. G. Tournoy, J. C. Kips, and R. A. Pauwels, "Endogenous interleukin-10 suppresses allergen-induced airway inflammation and nonspecific airway responsiveness," *Clin Exp Allergy*, vol. 30, pp. 775-83, **2000**.
- [44] Q. A. Hamid and E. M. Minshall, "Molecular pathology of allergic disease: I: lower airway disease," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 105, pp. 20-36, **2000**.
- [45] J. J. Smit and N. W. Lukacs, "A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses," *Eur J Pharmacol*, vol. 533, pp. 277-88, **2006**.

- [46] M. Weinblatt, B. Combe, A. Covucci, R. Aranda, J. C. Becker, and E. Keystone, "Safety of the selective costimulation modulator abatacept in rheumatoid arthritis patients receiving background biologic and nonbiologic disease-modifying antirheumatic drugs: A one-year randomized, placebo-controlled study," *Arthritis Rheum*, vol. 54, pp. 2807-16, **2006**.
- [47] O. H. Ryu, J. Lee, K. W. Lee, H. Y. Kim, J. A. Seo, S. G. Kim, N. H. Kim, S. H. Baik, D. S. Choi, and K. M. Choi, "Effects of green tea consumption on inflammation, insulin resistance and pulse wave velocity in type 2 diabetes patients," *Diabetes Res Clin Pract*, vol. 71, pp. 356-8, **2006**.
- [48] O. S. Akbari, A. Bousum, E. Bae, and R. A. Drewell, "Unraveling cis-regulatory mechanisms at the abdominal-A and Abdominal-B genes in the *Drosophila* bithorax complex," *Dev Biol*, vol. 293, pp. 294-304, **2006**.
- [49] D. T. Umetsu and R. H. DeKruyff, "The regulation of allergy and asthma," *Immunol Rev*, vol. 212, pp. 238-55, **2006**.
- [50] J. A. Boyce, "Mast cells: beyond IgE," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 111, pp. 24-32; quiz 33, **2003**.
- [51] W. W. Busse and R. F. Lemanske, Jr., "Asthma," *N Engl J Med*, vol. 344, pp. 350-62, **2001**.
- [52] J. Sunyer, J. M. Anto, J. Sabria, J. Roca, F. Morell, R. Rodriguez-Roisin, and M. J. Rodrigo, "Relationship between serum IgE and airway responsiveness in adults with asthma," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 95, pp. 699-706, **1995**.
- [53] W. W. Busse, R. L. Coffman, E. W. Gelfand, A. B. Kay, and L. J. Rosenwasser, "Mechanisms of persistent airway inflammation in asthma. A role for T cells and T-cell products," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 152, pp. 388-93, **1995**.
- [54] L. Presta, R. Shields, L. O'Connell, S. Lahr, J. Porter, C. Gorman, and P. Jardieu, "The binding site on human immunoglobulin E for its high affinity receptor," *J Biol Chem*, vol. 269, pp. 26368-73, **1994**.
- [55] W. J. Calhoun, H. E. Reed, D. R. Moest, and C. A. Stevens, "Enhanced superoxide production by alveolar macrophages and air-space cells, airway inflammation, and alveolar macrophage density changes after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects," *Am Rev Respir Dis*, vol. 145, pp. 317-25, **1992**.
- [56] A. B. Tonnel, M. Joseph, P. Gosset, E. Fournier, and A. Capron, "Stimulation of alveolar macrophages in asthmatic patients after local provocation test," *Lancet*, vol. 1, pp. 1406-8, **1983**.
- [57] N. N. Jarjour, W. J. Calhoun, E. A. Kelly, G. J. Gleich, L. B. Schwartz, and W. W. Busse, "The immediate and late allergic response to segmental

- bronchopulmonary provocation in asthma," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 155, pp. 1515-21, **1997**.
- [58] L. Greiff, I. Erjefalt, C. Svensson, P. Wollmer, U. Alkner, M. Andersson, and C. G. Persson, "Plasma exudation and solute absorption across the airway mucosa," *Clin Physiol*, vol. 13, pp. 219-33, **1993**.
- [59] T. Van Vyve, P. Chanez, A. Bernard, J. Bousquet, P. Godard, R. Lauwerijs, and Y. Sibille, "Protein content in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma and control subjects," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 95, pp. 60-8, **1995**.
- [60] A. Wanner, M. Salathe, and T. G. O'Riordan, "Mucociliary clearance in the airways," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 154, pp. 1868-902, **1996**.
- [61] G. M. Gauvreau, A. I. El-Gammal, and P. M. O'Byrne, "Allergen-induced airway responses," *Eur Respir J*, vol. 46, pp. 819-31, **2015**.
- [62] J. G. De Monchy, H. F. Kauffman, P. Venge, G. H. Koeter, H. M. Jansen, H. J. Sluiter, and K. De Vries, "Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions," *Am Rev Respir Dis*, vol. 131, pp. 373-6, **1985**.
- [63] S. Greenfeder, S. P. Umland, F. M. Cuss, R. W. Chapman, and R. W. Egan, "Th2 cytokines and asthma. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease," *Respir Res*, vol. 2, pp. 71-9, **2001**.
- [64] Q. Hamid and M. Tulic, "Immunobiology of asthma," *Annu Rev Physiol*, vol. 71, pp. 489-507, **2009**.
- [65] M. Larche, D. S. Robinson, and A. B. Kay, "The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 111, pp. 450-63; quiz 464, **2003**.
- [66] Y. Matsumura, "Role of Allergen Source-Derived Proteases in Sensitization via Airway Epithelial Cells," *J Allergy (Cairo)*, vol. 2012, p. 903659, **2012**.
- [67] H. Kouzaki, S. M. O'Grady, C. B. Lawrence, and H. Kita, "Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2," *J Immunol*, vol. 183, pp. 1427-34, **2009**.
- [68] N. Yuyama, D. E. Davies, M. Akaiwa, K. Matsui, Y. Hamasaki, Y. Suminami, N. L. Yoshida, M. Maeda, A. Pandit, J. L. Lordan, Y. Kamogawa, K. Arima, F. Nagumo, M. Sugimachi, A. Berger, I. Richards, S. L. Roberds, T. Yamashita, F. Kishi, H. Kato, K. Arai, K. Ohshima, J. Tadano, N. Hamasaki, S. Miyatake, Y. Sugita, S. T. Holgate, and K. Izuhara, "Analysis of novel disease-related genes in bronchial asthma," *Cytokine*, vol. 19, pp. 287-96, **2002**.
- [69] G. A. Silverman, P. I. Bird, R. W. Carrell, F. C. Church, P. B. Coughlin, P. G. Gettins, J. A. Irving, D. A. Lomas, C. J. Luke, R. W. Moyer, P. A. Pemberton, E. Remold-O'Donnell, G. S. Salvesen, J. Travis, and J. C. Whisstock, "The serpins

are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature," *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 33293-6, **2001**.

- [70] W. Zeng and E. Remold-O'Donnell, "Human monocyte/neutrophil elastase inhibitor (MNEI) is regulated by PU.1/Spi-1, Sp1, and NF-kappaB," *J Cell Biochem*, vol. 78, pp. 519-32, **2000**.
- [71] J. K. Sont, L. N. Willems, E. H. Bel, J. H. van Krieken, J. P. Vandenbroucke, and P. J. Sterk, "Clinical control and histopathologic outcome of asthma when using airway hyperresponsiveness as an additional guide to long-term treatment. The AMPUL Study Group," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 159, pp. 1043-51, **1999**.
- [72] C. Benarafa, G. P. Priebe, and E. Remold-O'Donnell, "The neutrophil serine protease inhibitor serpinb1 preserves lung defense functions in *Pseudomonas aeruginosa* infection," *J Exp Med*, vol. 204, pp. 1901-9, **2007**.
- [73] I. Kucharewicz, K. Kowal, W. Buczko, and A. Bodzenta-Lukaszyk, "The plasmin system in airway remodeling," *Thromb Res*, vol. 112, pp. 1-7, **2003**.
- [74] N. N. Jarjour, S. C. Erzurum, E. R. Bleeker, W. J. Calhoun, M. Castro, S. A. Comhair, K. F. Chung, D. Curran-Everett, R. A. Dweik, S. B. Fain, A. M. Fitzpatrick, B. M. Gaston, E. Israel, A. Hastie, E. A. Hoffman, F. Holguin, B. D. Levy, D. A. Meyers, W. C. Moore, S. P. Peters, R. L. Sorkness, W. G. Teague, S. E. Wenzel, W. W. Busse, and N. S. A. R. Program, "Severe asthma: lessons learned from the National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 185, pp. 356-62, **2012**.
- [75] S. J. Galli, M. Tsai, and A. M. Piliponsky, "The development of allergic inflammation," *Nature*, vol. 454, pp. 445-54, **2008**.
- [76] H. Y. Kim, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu, "The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity," *Nat Immunol*, vol. 11, pp. 577-84, **2010**.
- [77] G. R. Hellermann, S. B. Nagy, X. Kong, R. F. Lockey, and S. S. Mohapatra, "Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells," *Respir Res*, vol. 3, p. 22, **2002**.
- [78] P. W. Finn and T. D. Bigby, "Innate immunity and asthma," *Proc Am Thorac Soc*, vol. 6, pp. 260-5, **2009**.
- [79] S. T. Holgate, "Innate and adaptive immune responses in asthma," *Nat Med*, vol. 18, pp. 673-83, **2012**.
- [80] A. S. Bharadwaj, A. K. Bewtra, and D. K. Agrawal, "Dendritic cells in allergic airway inflammation," *Can J Physiol Pharmacol*, vol. 85, pp. 686-99, **2007**.

- [81] D. K. Agrawal and Z. Shao, "Pathogenesis of allergic airway inflammation," *Curr Allergy Asthma Rep*, vol. 10, pp. 39-48, **2010**.
- [82] F. T. Ishmael, "The inflammatory response in the pathogenesis of asthma," *J Am Osteopath Assoc*, vol. 111, pp. S11-7, **2011**.
- [83] A. J. Barrett and J. K. McDonald, "Nomenclature: protease, proteinase and peptidase," *Biochem J*, vol. 237, p. 935, **1986**.
- [84] M. B. Rao, A. M. Tanksale, M. S. Ghatge, and V. V. Deshpande, "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases," *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 62, pp. 597-635, **1998**.
- [85] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, and A. Bateman, "MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors," *Nucleic Acids Res*, vol. 40, pp. D343-50, **2012**.
- [86] X. S. Puente, L. M. Sanchez, C. M. Overall, and C. Lopez-Otin, "Human and mouse proteases: a comparative genomic approach," *Nat Rev Genet*, vol. 4, pp. 544-58, **2003**.
- [87] K. Y. Chua, G. A. Stewart, W. R. Thomas, R. J. Simpson, R. J. Dilworth, T. M. Plozza, and K. J. Turner, "Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases," *J Exp Med*, vol. 167, pp. 175-82, **1988**.
- [88] H. Gunawan, T. Takai, S. Ikeda, K. Okumura, and H. Ogawa, "Protease activity of allergenic pollen of cedar, cypress, juniper, birch and ragweed," *Allergol Int*, vol. 57, pp. 83-91, **2008**.
- [89] S. Runswick, T. Mitchell, P. Davies, C. Robinson, and D. R. Garrod, "Pollen proteolytic enzymes degrade tight junctions," *Respirology*, vol. 12, pp. 834-42, **2007**.
- [90] N. A. Kalsheker, S. Deam, L. Chambers, S. Sreedharan, K. Brocklehurst, and D. A. Lomas, "The house dust mite allergen Der p1 catalytically inactivates alpha 1-antitrypsin by specific reactive centre loop cleavage: a mechanism that promotes airway inflammation and asthma," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 221, pp. 59-61, **1996**.
- [91] T. Takai, T. Kato, M. Ota, H. Yasueda, T. Kuhara, K. Okumura, and H. Ogawa, "Recombinant Der p 1 and Der f 1 with in vitro enzymatic activity to cleave human CD23, CD25 and alpha1-antitrypsin, and in vivo IgE-eliciting activity in mice," *Int Arch Allergy Immunol*, vol. 137, pp. 194-200, **2005**.
- [92] V. S. Hughes and K. Page, "German cockroach frass proteases cleave pro-matrix metalloproteinase-9," *Exp Lung Res*, vol. 33, pp. 135-50, **2007**.

- [93] A. Jacquet, "Interactions of airway epithelium with protease allergens in the allergic response," *Clin Exp Allergy*, vol. 41, pp. 305-11, **2011**.
- [94] A. A. F. A. S. M. M. M. S. G. A. A. M. A. E. R. W. Taha, "Asthma remodeling: The pathogenic role of matrix metalloproteinase-9," *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*, vol. 63, pp. 755-759, **2014**.
- [95] S. P. Stanley J Szeffler, *Childhood Asthma*: CRC Press, **2005**.
- [96] D. E. Dietrich, A. D. Martin, and K. A. Brogden, "Human beta-defensin HBD3 binds to immobilized Bla g2 from the German cockroach (*Blattella germanica*)," *Peptides*, vol. 53, pp. 265-9, **2014**.
- [97] L. K. Arruda, L. D. Vailes, B. J. Mann, J. Shannon, J. W. Fox, T. S. Vedvick, M. L. Hayden, and M. D. Chapman, "Molecular cloning of a major cockroach (*Blattella germanica*) allergen, Bla g 2. Sequence homology to the aspartic proteases," *J Biol Chem*, vol. 270, pp. 19563-8, **1995**.
- [98] D. Collen, "The plasminogen (fibrinolytic) system," *Thromb Haemost*, vol. 82, pp. 259-70, **1999**.
- [99] P. G. Ashton-Rickardt, "An emerging role for Serine Protease Inhibitors in T lymphocyte immunity and beyond," *Immunol Lett*, vol. 152, pp. 65-76, **2013**.
- [100] F. Loison, Y. Xu, and H. R. Luo, "Proteinase 3 and Serpin B1: a novel pathway in the regulation of caspase-3 activation, neutrophil spontaneous apoptosis, and inflammation," *Inflamm Cell Signal*, vol. 1, **2014**.
- [101] J. Zeng, R. A. Dunlop, K. J. Rodgers, and M. J. Davies, "Evidence for inactivation of cysteine proteases by reactive carbonyls via glycation of active site thiols," *Biochem J*, vol. 398, pp. 197-206, **2006**.
- [102] K. Grobe, W. M. Becker, M. Schlaak, and A. Petersen, "Grass group I allergens (beta-expansins) are novel, papain-related proteinases," *Eur J Biochem*, vol. 263, pp. 33-40, **1999**.
- [103] H. Wan, H. L. Winton, C. Soeller, D. C. Gruenert, P. J. Thompson, M. B. Cannell, G. A. Stewart, D. R. Garrod, and C. Robinson, "Quantitative structural and biochemical analyses of tight junction dynamics following exposure of epithelial cells to house dust mite allergen Der p 1," *Clin Exp Allergy*, vol. 30, pp. 685-98, **2000**.
- [104] V. Costa, A. Quintanilha, and P. Moradas-Ferreira, "Protein oxidation, repair mechanisms and proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*," *IUBMB Life*, vol. 59, pp. 293-8, **2007**.
- [105] A. Churg, S. Zhou, and J. L. Wright, "Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Matrix metalloproteinases in COPD," *Eur Respir J*, vol. 39, pp. 197-209, **2012**.

- [106] J. A. Irving, R. N. Pike, A. M. Lesk, and J. C. Whisstock, "Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function," *Genome Res*, vol. 10, pp. 1845-64, **2000**.
- [107] P. E. Stein, A. G. Leslie, J. T. Finch, W. G. Turnell, P. J. McLaughlin, and R. W. Carrell, "Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins," *Nature*, vol. 347, pp. 99-102, **1990**.
- [108] P. A. Pemberton, P. E. Stein, M. B. Pepys, J. M. Potter, and R. W. Carrell, "Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation," *Nature*, vol. 336, pp. 257-8, **1988**.
- [109] D. A. Lomas, D. L. Evans, J. T. Finch, and R. W. Carrell, "The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver," *Nature*, vol. 357, pp. 605-7, **1992**.
- [110] W. Zeng, G. A. Silverman, and E. Remold-O'Donnell, "Structure and sequence of human M/NEI (monocyte/neutrophil elastase inhibitor), an Ov-serpin family gene," *Gene*, vol. 213, pp. 179-87, **1998**.
- [111] P. Birrer, "Proteases and antiproteases in cystic fibrosis: pathogenetic considerations and therapeutic strategies," *Respiration*, vol. 62 Suppl 1, pp. 25-8, **1995**.
- [112] P. Fouret, R. M. du Bois, J. F. Bernaudin, H. Takahashi, V. J. Ferrans, and R. G. Crystal, "Expression of the neutrophil elastase gene during human bone marrow cell differentiation," *J Exp Med*, vol. 169, pp. 833-45, **1989**.
- [113] D. D. Rees and J. D. Brain, "Effects of cystic fibrosis airway secretions on rat lung: role of neutrophil elastase," *Am J Physiol*, vol. 269, pp. L195-202, **1995**.
- [114] N. G. McElvaney, R. C. Hubbard, P. Birrer, M. S. Chernick, D. B. Caplan, M. M. Frank, and R. G. Crystal, "Aerosol alpha 1-antitrypsin treatment for cystic fibrosis," *Lancet*, vol. 337, pp. 392-4, **1991**.
- [115] P. Birrer, N. G. McElvaney, A. Rudeberg, C. W. Sommer, S. Liechti-Gallati, R. Kraemer, R. Hubbard, and R. G. Crystal, "Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 150, pp. 207-13, **1994**.
- [116] V. Witko-Sarsat, L. Halbwachs-Mecarelli, A. Schuster, P. Nusbaum, I. Ueki, S. Canteloup, G. Lenoir, B. Descamps-Latscha, and J. A. Nadel, "Proteinase 3, a potent secretagogue in airways, is present in cystic fibrosis sputum," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 20, pp. 729-36, **1999**.
- [117] M. Bedard, C. D. McClure, N. L. Schiller, C. Francoeur, A. Cantin, and M. Denis, "Release of interleukin-8, interleukin-6, and colony-stimulating factors by upper airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 9, pp. 455-62, **1993**.

- [118] K. Ogiwara, A. Hagiwara, S. Rajapakse, and T. Takahashi, "The role of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in follicle rupture during ovulation in the teleost medaka," *Biol Reprod*, vol. 92, p. 10, **2015**.
- [119] L. Tonnetti, S. Netzel-Arnett, G. A. Darnell, T. Hayes, M. S. Buzza, I. E. Anglin, A. Suhrbier, and T. M. Antalis, "SerpinB2 protection of retinoblastoma protein from calpain enhances tumor cell survival," *Cancer Res*, vol. 68, pp. 5648-57, **2008**.
- [120] R. J. Fish and E. K. Kruithof, "Evidence for serpinB2-independent protection from TNF-alpha-induced apoptosis," *Exp Cell Res*, vol. 312, pp. 350-61, **2006**.
- [121] C. Y. Su, Y. P. Liu, C. J. Yang, Y. F. Lin, J. Chiou, L. H. Chi, J. J. Lee, A. T. Wu, P. J. Lu, M. S. Huang, and M. Hsiao, "Plasminogen Activator Inhibitor-2 Plays a Leading Prognostic Role among Protease Families in Non-Small Cell Lung Cancer," *PLoS One*, vol. 10, p. e0133411, **2015**.
- [122] S. R. Holdsworth and P. Y. Gan, "Cytokines: Names and Numbers You Should Care About," *Clin J Am Soc Nephrol*, vol. 10, pp. 2243-54, **2015**.
- [123] C. A. Dinarello, "Historical insights into cytokines," *Eur J Immunol*, vol. 37 Suppl 1, pp. S34-45, **2007**.
- [124] T. Tanaka, M. Narazaki, and T. Kishimoto, "IL-6 in inflammation, immunity, and disease," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 6, p. a016295, **2014**.
- [125] G. Brunius, H. Domeij, A. Gustavsson, and T. Yucel-Lindberg, "Bradykinin upregulates IL-8 production in human gingival fibroblasts stimulated by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha," *Regul Pept*, vol. 126, pp. 183-8, **2005**.
- [126] C. Giannopoulou, I. Cappuyns, and A. Mombelli, "Effect of smoking on gingival crevicular fluid cytokine profile during experimental gingivitis," *J Clin Periodontol*, vol. 30, pp. 996-1002, **2003**.
- [127] F. Chen, H. Hong, Y. Sun, X. Hu, J. Zhang, G. Xu, W. Zhao, H. Li, and J. Shi, "Nasal interleukin 25 as a novel biomarker for patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps and airway hypersensitiveness: A pilot study," *Ann Allergy Asthma Immunol*, vol. 119, pp. 310-316 e2, **2017**.
- [128] D. Saadoun, B. Terrier, and P. Cacoub, "Interleukin-25: key regulator of inflammatory and autoimmune diseases," *Curr Pharm Des*, vol. 17, pp. 3781-5, **2011**.
- [129] L. Y. Drake and H. Kita, "IL-33: biological properties, functions, and roles in airway disease," *Immunol Rev*, vol. 278, pp. 173-184, **2017**.
- [130] P. D. Mitchell and P. M. O'Byrne, "Epithelial-Derived Cytokines in Asthma," *Chest*, vol. 151, pp. 1338-1344, **2017**.

- [131] K. Bonnelykke, P. Sleiman, K. Nielsen, E. Kreiner-Moller, J. M. Mercader, D. Belgrave, H. T. den Dekker, A. Husby, A. Sevelsted, G. Faura-Tellez, L. J. Mortensen, L. Paternoster, R. Flaaten, A. Molgaard, D. E. Smart, P. F. Thomsen, M. A. Rasmussen, S. Bonas-Guarch, C. Holst, E. A. Nohr, R. Yadav, M. E. March, T. Blicher, P. M. Lackie, V. W. Jaddoe, A. Simpson, J. W. Holloway, L. Duijts, A. Custovic, D. E. Davies, D. Torrents, R. Gupta, M. V. Hollegaard, D. M. Hougaard, H. Hakonarson, and H. Bisgaard, "A genome-wide association study identifies CDHR3 as a susceptibility locus for early childhood asthma with severe exacerbations," *Nat Genet*, vol. 46, pp. 51-5, **2014**.
- [132] A. Semlali, E. Jacques, L. Koussih, A. S. Gounni, and J. Chakir, "Thymic stromal lymphopoietin-induced human asthmatic airway epithelial cell proliferation through an IL-13-dependent pathway," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 125, pp. 844-50, **2010**.
- [133] B. Watson and G. M. Gauvreau, "Thymic stromal lymphopoietin: a central regulator of allergic asthma," *Expert Opin Ther Targets*, vol. 18, pp. 771-85, **2014**.
- [134] M. Baggiolini, "Chemokines and leukocyte traffic," *Nature*, vol. 392, pp. 565-8, **1998**.
- [135] V. Appay and S. L. Rowland-Jones, "RANTES: a versatile and controversial chemokine," *Trends Immunol*, vol. 22, pp. 83-7, **2001**.
- [136] J. Elsner, H. Petering, R. Hochstetter, D. Kimmig, T. N. Wells, A. Kapp, and A. E. Proudfoot, "The CC chemokine antagonist Met-RANTES inhibits eosinophil effector functions through the chemokine receptors CCR1 and CCR3," *Eur J Immunol*, vol. 27, pp. 2892-8, **1997**.
- [137] J. D. McCurdy, T. J. Olynych, L. H. Maher, and J. S. Marshall, "Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells," *J Immunol*, vol. 170, pp. 1625-9, **2003**.
- [138] V. C. de Vries, K. Pino-Lagos, E. C. Nowak, K. A. Bennett, C. Oliva, and R. J. Noelle, "Mast cells condition dendritic cells to mediate allograft tolerance," *Immunity*, vol. 35, pp. 550-61, **2011**.
- [139] S. T. Holgate, "The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis," *Immunol Rev*, vol. 242, pp. 205-19, **2011**.
- [140] R. H. Law, Q. Zhang, S. McGowan, A. M. Buckle, G. A. Silverman, W. Wong, C. J. Rosado, C. G. Langendorf, R. N. Pike, P. I. Bird, and J. C. Whisstock, "An overview of the serpin superfamily," *Genome Biol*, vol. 7, p. 216, **2006**.
- [141] W. A. Schroder, T. T. Le, L. Major, S. Street, J. Gardner, E. Lambley, K. Markey, K. P. MacDonald, R. J. Fish, R. Thomas, and A. Suhrbier, "A physiological function

- of inflammation-associated SerpinB2 is regulation of adaptive immunity," *J Immunol*, vol. 184, pp. 2663-70, **2010**.
- [142] D. Gong, K. Farley, M. White, K. L. Hartshorn, C. Benarafa, and E. Remold-O'Donnell, "Critical role of serpinB1 in regulating inflammatory responses in pulmonary influenza infection," *J Infect Dis*, vol. 204, pp. 592-600, **2011**.
- [143] V. D. Gandhi and H. Vliagoftis, "Airway epithelium interactions with aeroallergens: role of secreted cytokines and chemokines in innate immunity," *Front Immunol*, vol. 6, p. 147, **2015**.
- [144] A. Kato and R. P. Schleimer, "Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity," *Curr Opin Immunol*, vol. 19, pp. 711-20, **2007**.
- [145] C. M. Lilly, H. Tateno, T. Oguma, E. Israel, and L. A. Sonna, "Effects of allergen challenge on airway epithelial cell gene expression," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 171, pp. 579-86, **2005**.
- [146] K. Kessenbrock, T. Dau, and D. E. Jenne, "Tailor-made inflammation: how neutrophil serine proteases modulate the inflammatory response," *J Mol Med (Berl)*, vol. 89, pp. 23-8, **2011**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Övgü Aran
Doğum Yeri : Aydın
Medeni Hali : Bekar
E-Posta : owguaran06@gmail.com
Adresi :

Eğitim

Lise : 2003-2007 Etimesgut Anadolu Lisesi
Lisans : 2008-2013 Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : 2014-2018 Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik ABD

Yabancı Dil ve Düzeyi: İngilizce (iyi)

İş Deneyimi

MEDSANTEK LAB.MLZ.SAN. ve TİC.LTD.ŞTİ

Deneyim Alanları

-

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/~~DOKTORA~~ TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Biyomühendislik ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 18/7/2018

Tez Başlığı / XXXXXXXXXX SERPINB1 VE SERPINB2 PROTEAZ İNHİBİTÖRLERİNİN BRONŞ EPİTEL HÜCRELERİNDEKİ İNFLAMATUVAR CEVAPTAKİ ROLÜ

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 90 sayfalık kısmına ilişkin, 18/07/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar XXXXXXXXXX/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Övgü Aran

Öğrenci No: N13227301

Anabilim Dalı: Biyomühendislik

Programı: Yüksek Lisans

Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

18.07.2018
Övgü Aran

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Doç. Dr. V. Gökçetay Keraslan

(Unvan, Ad Soyad, İmza)