

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK ALLERJİ-İMMUNOLOJİ BİLİM DALI

**ASTIM MODELİ OLUŞTURULAN
FARELERDE ATORVASTATİN'İN AKCİĞER
HİSTOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZM. DR. FATİH FIRINCI

YANDAL UZMANLIK TEZİ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Özkan KARAMAN

İÇİNDEKİLER	Sayfa
İçindekiler	III
Tablolar Dizini	V
Şekiller Dizini	V
Resimler Dizini	VI
Kısaltmalar	VII
Teşekkür	VIII
Türkçe Özet	IX
İngilizce Özet (Summary)	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	
2.1. Astım Tanımı ve Sıklığı	2
2.2. Astımın gelişimini etkileyen faktörler	2
2.2.1. Konağa ait risk faktörleri	2-3
2.2.2. Çevresel faktörler	3-4
2.3. Astımın Patogenezi	4-5
2.3.1. Astımda rol oynayan inflamatuvar hücreler	5-6
2.3.2. Astımda rol oynayan mediatörler	6-7
2.3.3. Havayollarının yapısal değişiklikleri ve yeniden yapılanma	7-11
2.3.4. Astımda hava yolundaki daralmaya neden olan faktörler	11
2.3.5. Havayolu aşırı duyarlılığı	11
2.4. Astım Tanısı	12
2.5. Astım Tedavisi	12
2.5.1. Astım tedavisinde kullanılan ilaçların özellikleri	12-14

2.6. Atorvastatin	14
2.6.1. Atorvastatin yapısı	14
2.6.2. Atorvastatinin özellikleri	14-15
2.6.3. Atorvastatinin pleotropik etkileri	15
2.6.3.1. Atorvastatin ve immünmodülatuar etkileri	15
2.6.3.2. Atorvastatin ve antiinflamatuvar etkileri	15-17
2.6.3.3. Atorvastatinin Farklı Dokulardaki Etkileri	17
2.6.4. Farmakodinamiği	17
2.6.5. Metabolizasyonu	18
2.6.6. İlaç etkileşimleri	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1. Deney hayvanları	19
3.2. Çalışma grupları	19
3.3. Kronik astım modelinin oluşturulması	20
3.4. Çalışma ilaçlarının verilmesi	20
3.5. Hayvan yaşamını sonlandırma zamanı ve yöntemi	21
3.6. Histolojik incelemeler	21
3.7. Akciğer Dokusunda IL-4 ve IL-5 Ölçümü	22
3.8. İstatistiksel analiz	22
4. BULGULAR	23-36
5. TARTIŞMA	37-43
6. SONUÇLAR	44-45
7. KAYNAKLAR	46-54

TABLOLAR DİZİNİ

No	Başlık	Sayfa
I	Astım gelişimin ve ortaya çıkışını etkileyen risk faktörleri	4
II	Astımda hava yolu daralmasında rol oynayan faktörler	11
III	Tüm grupların histolojik parametreleri	23
IV	Grup I ile Grup II'nin histolojik parametrelerinin karşılaştırılması	24
V	Grup II ile Grup III'ün histolojik parametrelerinin karşılaştırılması	25
VI	Grup II ile Grup IV'ün histolojik parametrelerinin karşılaştırılması	26
VII	Grup III ile Grup IV'ün histolojik parametrelerinin karşılaştırılması	27

ŞEKİLLER DİZİNİ

No	Başlık	Sayfa
1	Astım gelişimindeki risk faktörleri	2
2	Astımda havayollarındaki inflamatuvar hücrelerin özellikleri	6
3	Kronik astımda havayollarında yeniden yapılanma	8
4	Havayolunda düz kas hücrelerinden salınan mediatörler	9
5	Mast hücre aracılı remodelingin şematik görüntüsü	10
6	Atorvastatininin kimyasal yapısı	14
7	Kronik astım modeli oluşturma protokolü	20
8	Gruplar arasındaki IL-4 düzeyleri	36
9	Gruplar arasındaki IL-5 düzeyleri	36

RESİMLER DİZİNİ

No	Başlık	Sayfa
1	Çalışmada kullanılan BALB/c fareler	19
2	Kontrol grubunun HE boyalı akciğer kesitleri	28
3	Kontrol grubunun PAS boyalı akciğer kesitleri	28
4	Kontrol grubunun Toluidin mavisi boyalı akciğer kesitleri	29
5	Kontrol grubunun akciğer kesitlerinin EM görünümü	29
6	Grup II'nin akciğer kesitleri (HE boyama)	30
7	Grup II'nin akciğer kesitleri (PAS boyama)	30
8	Grup II'nin akciğer kesitleri (Toluidin mavi boyama)	31
9	Grup II'nin akciğer kesitleri (Elektron mikroskopik görünümü)	31
10	Grup III'ün akciğer kesitleri (HE boyama)	32
11	Grup III'ün akciğer kesitleri (PAS boyama)	32
12	Grup III'ün akciğer kesitleri (Toluidin mavi boyama)	33
13	Grup III'ün akciğer kesitleri (Elektron mikroskopik görünümü)	33
14	Grup IV'ün akciğer kesitleri (HE boyama)	34
15	Grup IV'ün akciğer kesitleri (PAS boyama)	34
16	Grup IV'ün akciğer kesitleri (Toluidin mavi boyama)	35
17	Grup IV'ün akciğer kesitleri (Elektron mikroskopik görünümü)	35

KISALTMALAR

AR	Allerjik rinit
BAL	Bronkoalveolar lavaj
COX	Siklooksijenaz
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FEV1	1. Saniyedeki zorlu ekspiratuvar volüm
EM	Elektron mikroskopisi
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör
HE	Hemotoksilen-eosin
IgE	Immunglobulin E
IL	İnterlökin
LFA-1	lökosit
LT	Lökotrien
MCP	Monosit kemotaktik faktör
MDC	Makrofaj kaynaklı kemokin
MMP-9	Matriks metalloproteinaz-9
NF-KB	Nükleer faktör kapa
NO	Nitrik oksit
OVA	Ovalbümin
PAS	Periodik asit schiff
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PEF	Tepe ekspiratuvar akım
PG	Prostoglandin
TARC	Timus ve aktivasyon ilişkili kemokin
Th1	T helper tip 1 hücre
Th2	T helper tip 2 hücre
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü
TNF-α	Tümör nekrozis faktör
Treg	Reglatuvar T hücre
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü

ÖNSÖZ

Yan dal uzmanlık eğitimim ve tez çalışmamda sağladığı imkanlardan dolayı Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hale Ören'e, bilgi ve tecrübelerini aktarmaktan zevk duyan, desteğini her zaman hissettiğim, tez çalışmamda da her türlü yardım ve desteği sağlayan, tez danışmanım Prof. Dr. Özkan Karaman'a, yine yan dal eğitimim süresince hoşgörü ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Prof. Dr. Nevin Uzun ve Prof. Dr. Özden Anal'a ve tez çalışmamda gösterdiği yakın ilgi, yardım ve desteklerinden dolayı Prof. Dr. Alper Bağrıyanık, Yrd.Doç.Dr. Meral Karaman, ve Dr. Serap Cilaker Mıcılı'ya

Aynı çalışma ortamını paylaştığım ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili uzman ve asistan arkadaşlarıma,

Ve bugüne kadar bana her türlü desteği veren sevgili eşime ve anneme

Saygı, sevgi ve teşekkürlerimle...

Uzm. Dr. Fatih Fırıncı

ÖZET

ASTIM MODELİ OLUŞTURULAN FARELERDE ATORVASTATİN'İN AKCİĞER HİSTOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Giriş: Atorvastatin serum kolesterol seviyesini düşüren ve bu nedenle hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan statin grubu bir ilaçtır. Statinlerin kolestrol düşürücü özelliklerinden bağımsız olarak immünmodülatuar ve antiinflamatuvar etkileri de mevcuttur. Bu amaçla birçok hastalıkta kullanılmaktadır. Bu çalışmada, kronik astım modeli oluşturulmuş BALB/c farelerde atorvastatin'in akciğerdeki histolojik değişiklikler üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Yirmisekiz BALB/c fare Grup I, II, III ve IV olmak üzere dört gruba ayrıldı. Kontrol grubu (Grup I) dışındaki tüm fareler ovalbumin ile duyarlılaştırıldı. Grup II'ye (Plasebo) salın, Grup III'e 10 mg/kg dozunda atorvastatin ve Grup IV'e 1 mg/kg dozunda dexametazon intraperitoneal yolu ile beş ardışık gün boyunca verildi. Fareler ilaçların son uygulamasından 24 saat sonra sakrifiye edildi. Bütün gruplardan elde edilen akciğer örneklerinin histolojik özellikleri ışık ve elektron mikroskopisi kullanılarak değerlendirildi. Ayrıca akciğer dokusunda IL-4 ve IL-5 düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: Atorvastatin uygulanan grup (Grup III) ile plasebo uygulanan grup (Grup II) karşılaştırıldığında; Grup III de bazal membran ve subepitelyal düz kas kalınlığı, epitel yüksekliği, mast ve goblet hücre sayılarında istatistiksel olarak anlamlı düzelme gözlenmiştir. Atorvastatin (Grup IV) ve deksametazon grupları (Grup III) karşılaştırıldığında ise, tüm bu parametrelerdeki düzelmenin benzer olduğu bulunmuştur. Ayrıca atorvastatin uygulanan grupta (Grup III), plasebo uygulanan gruba göre akciğer dokusunda IL-4 ve IL-5 düzeyi anlamlı olarak düşük saptanmıştır.

Sonuç: Bu çalışmada, astım modeli oluşturulan farelerde atorvastatinin akciğer histolojisi üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir. Atorvastatin'in akciğerde inflamasyon ve yeniden yapılanma üzerine etkilerini değerlendirecek ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Astım, Atorvastatin, BALB/c fare, Deksametazon

SUMMARY
EFFICACY OF ATORVASTATIN ON LUNG HISTOPATHOLOGY
IN A MURINE MODEL OF ASTHMA

Introduction: Atorvastatin is a statin group medicine that reduces the level of serum cholesterol, thus its used to treat hypercholesterolemia. Independent of cholesterol-lowering property of statins they have also anti-inflammatory and immunmodulating effects. For this purpose they have been used in many diseases. In this study, it was aimed to determine the effect of atorvastatin on histological changes in lung in a murine model of chronic asthma in BALB/c mice.

Methods: Twenty-eight BALB / c mice in Group I, II, III and IV were divided into four groups. All the mice except the control group (Group I), were sensitized with ovalbumin. Intraperitoneal injection with saline, atorvastatin(10mg/kg),dexametazon(1mg/kg) was administered to Group II, Group III, Group IV respectively for five consecutive days. Mice were sacrificed after 24 hours from the last drug administration. All the histological properties of lung tissue samples from all groups were evaluated with light and electron microscopy. In all groups, lung histology was evaluated by light and electron microscopy. In addition, IL-4 and IL-5 levels of the lung tissue were measured.

Results: When Group II and Group III (atorvastatin) were compared, thicknesses of basement membrane and subepithelial smooth muscle layer, height of epithelium, number of mast and goblet cells were significantly lower in group III. In comparing of Group III (atorvastatin) and Group IV (dexamethasone), all the improvement in histologic parameters were similar. In addition, the IL-4 and IL-5 levels of the lung tissue were significantly lower in atorvastatin group (Group III) compared to placebo-treated group.

Conclusion: We found that atorvastatin ameliorated histological changes and cytokine levels in chronic murine model of asthma. Further studies are needed to evaluate the efficacy of atorvastatin on lung inflammation and remodeling.

Key words: Asthma, Atorvastatine, BALB/c mouse, Dexametasone

1.GİRİŞ ve AMAC

Astım, havayollarının kronik enflamatuvar bir hastalığıdır. Bu enflamasyon sonucunda gelişen havayolu hiperreaktivitesi, yaygın, değişken, spontan veya tedavi ile düzelen havayolu obstrüksiyonuna ve tekrarlayan hışıltı, nefes darlığı, öksürük vb.semptomlara neden olmaktadır. Aynı zamanda enflamasyon sonucunda havayollarında remodeling olarak adlandırılan kısmen geri dönüşümsüz birtakım değişiklikler oluşmaktadır.

Astım patogenezinde havayolu enflamasyonu temel rol oynar ve verilen tedaviler bu enflamasyonu baskılamaya yöneliktir. Bu amaçla en sık kullanılan ve en etkili tedavi steroidlerdir Sistemik steroidlerin birçok yan etkisi olması nedeni ile astımın kronik tedavisinde inhale steroidlerin kullanımı tercih edilmektedir. İn hale steroidlerin yan etkileri genellikle lokal olmaktadır, ancak nadiren adrenal supresyon, büyüme geriliği ve kemik metabolizmasında bozukluk gibi ciddi sistemik yan etkileri de söz konusu olabilmektedir. Astımda havayollarındaki enflamasyonu baskılayan, remodeling sürecini engelleyen, yan etkisi olmayan tedavi seçenekleri araştırılmaktadır

Atorvastatin serum kolesterol seviyesini düşüren ve bu nedenle hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan statin grubu bir ilaçtır. Statinlerin kolestrol düşürücü özelliklerinden bağımsız olarak immünmodülatuar ve antiinflamatuvar etkileri de mevcuttur.

Astım patogenezinde rol alan birçok sitokin ve mediatör bulunmaktadır. Bunlardan IL-4, IL-5, Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), nükleer faktör kappa (NF-kb) üzerine birçok çalışmada atorvastatinin inflamasyonun baskılanmasında olumlu etkileri gösterilmiştir. Ancak astımda, atorvastatinin bu sitokinlerin üzerine etkisini araştıran çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada; atorvastatin ovalbümin (OVA) ile sensitize edilerek kronik astım modeli oluşturulmuş BALB/c farelere uygulanarak astım nedeni ile oluşan kronik histolojik değişiklikler üzerine etkisinin araştırılması ve bu etkinin deksametazon ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

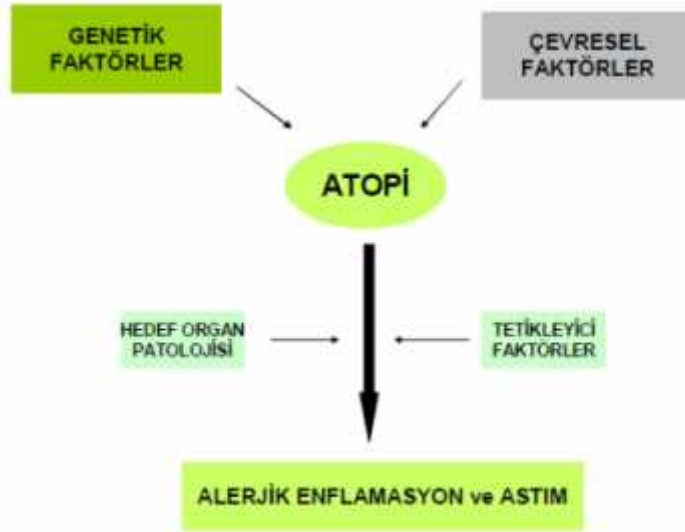
2.1 Astım tanımı ve sıklığı

Astım havayollarında pek çok enflamatuvar hücrenin ve bu hücrelerden salınan mediyatörlerin rol oynadığı kronik bir hastalıktır (1). Astım çocukluk çağındaki kronik hastalıkların en sık görülen şeklidir. Dünyadaki astım prevalansı %1 ile %18 arasında farklılık göstermektedir. Astım gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre daha sık görülmektedir (2,3). Ülkemizde yapılan değişik çalışmalarda, astım prevalansının %2.8-%14.5 arasında değiştiği gösterilmiştir (4,5). İzmir ilinde, 6-13 yaş arası çocuklarda Karaman ve ark.'ları tarafından yapılan bir çalışmada, astım kümülatif prevalansı %4.9 olarak bulunmuştur (6). Aynı bölgede yaklaşık on yıl sonra yapılan çalışmada ise 9-11 yaş arasındaki çocuklarda, tekrarlayan hışıltı oranı %15.9, doktor tanımlı astım oranı ise %4.8 olarak bulunmuştur (7).

2.2 Astım gelişimini etkileyen faktörler

Astımın gelişmesini etkileyen ve astım hastalarında semptomları tetikleyen faktörler, konağa ait ve çevresel faktörler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (8) (Tablo 1, Şekil 1).

Şekil 1. Astım gelişimindeki risk faktörleri



2.2.1 Konağa ait risk faktörleri

a. Genetik: Yapılan çok sayıda çalışma, atopi ve astımda genetik geçişin basit Mendelian tipte olmadığını, birden fazla kromozomun rol oynadığı poligenik bir geçişin söz konusu olduğunu

göstermektedir (9). Ayrıca astıma yatkınlık yaratan genler dışında astım tedavisine yanıt ile ilişkili genler de tanımlanmıştır (10,11).

b. Cinsiyet: Yaşamın ilk on yılında erkeklerde astım prevalansı daha yüksektir (12). Adolesan döneminden itibaren astımın kızlarda daha fazla görüldüğü bildirilmiştir. Cinsiyet ile ilişkili sıklık farklılığının nedeni tam olarak bilinmemektedir (13).

c. Obezite: Obezitenin de astım için bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Leptin benzeri mediatörler solunum fonksiyonlarını etkileyebilmekte ve astım gelişme olasılığını arttırabilmektedir (14).

2.2.2 Çevresel risk faktörleri

a. Allerjenler ile temas: Allerjen ile temas ve duyarlanma arasındaki ilişki allerjenin tipine, dozuna, temas süresine, çocuğun yaşına ve genetik yapısına bağlı olarak değişmektedir (1).

b. Enfeksiyonlar: Gebelik boyunca fetus immünitelerinden T helper (Th) 2 hücreler ağırlıklı olarak sorumludur ve bu olay erken çocuklukta da bu şekilde sürmektedir. Ancak erken çocuklukta geçirilen bazı enfeksiyonlar, Th2 cevabını Th1'e dönüştürebilirler. Bu nedenle, Th1 cevabını uyaran enfeksiyonların astım ve allerji gelişimini engelleyici olabildikleri düşünülmektedir (15).

Atopi ve viral enfeksiyonlar arasında karmaşık bir ilişki vardır. Atopi varlığının alt havayollarının viral enfeksiyonlara yanıtını ve viral enfeksiyonların da alerjik duyarlanma gelişimini etkileyebileceği kabul edilmektedir (16). Ayrıca parazit enfeksiyonlarının ve tüberkülozun astım ve allerji gelişiminden koruduğuna dair birçok yayın mevcuttur (17,18).

c. Hava kirliliği ve sigara: Hava kirliliği havayolu aşırı duyarlılığına, solunum semptom ve bulgularına, astım alevlenmelerine ve akciğer fonksiyonlarında azalmaya neden olabilmektedir (19). Sigara dumanı ile temas, oksidatif stresi artırır ve hava yolunda inflamasyonu stimüle eder (20). Yapılan çalışmalarda prenatal dönemde annenin sigara kullanımının, okul çağı çocuklarındaki astım sıklığını arttırdığı gösterilmiştir (21).

d. Diyet: Anne sütü ile beslenme astım ve allerjik hastalıklardan korunma için önerilmektedir. İnek sütü bazlı veya soya protein içeren formula ile beslenen süt çocuklarında anne sütü ile beslenenlere göre erken çocukluk döneminde hışıltı gelişimi daha fazla bulunmuştur (22,23).

Tablo 1. Astım gelişimini ve ortaya çıkışını etkileyen risk faktörleri

Konağa ait risk faktörleri
Genetik yatkınlık
• Atopiye yatkınlık yaratan genler • Havayolu aşırı duyarlılığına yatkınlık yaratan genler
Obezite
Cinsiyet
Çevresel Faktörler
Allerjenler
• Ev içi: Ev tozları, tüylü hayvanlar, hamamböceği allerjeni, mantarlar, küfler, mayalar • Ev dışı: Polenler, mantarlar, küfler, mayalar
Enfeksiyonlar
Sigara ve hava kirliliği
Diyet
İrritanlar
Stres
Egzersiz

2.3 Astımın patogenezi

Astım çok sayıda inflamatuvar hücre ve mediatörün rol oynadığı ve birtakım karakteristik patofizyolojik değişikliklerin ortaya çıktığı havayollarının kronik inflamatuvar bir hastalığıdır (Şekil 2). Havayolu inflamasyonu astım için çok önemli karakteristik bir özelliktir. Astımda havayolu inflamasyonu persistan olup, semptomlar epizodiktir (24). İnflamasyon çoğu hastada

tüm havayollarını etkilemekte ancak fizyolojik etkileri orta büyüklükteki bronşlarda en belirgin olarak ortaya çıkmaktadır (1).

2.3.1. Astımda rol oynayan inflamatuvar hücreler

-Mast hücreleri: Aktive mukozal mast hücrelerinden çeşitli bronkokonstrüktör mediatörler salınır (histamin, sisteinil lökotrienler, prostoglandin PGD₂) (25). Bu hücreler yüksek affiniteli IgE reseptörleri aracılığı ile allerjenler ve osmotik uyarılar (egzersizin tetiklediği bronkokonstrüksiyon) tarafından aktive edilir. Havayolları düz kasında artmış mast hücre sayısı havayolu aşırı duyarlılığı ile ilişkili bulunmuştur (26). Bu hücreler sadece ani başlangıçlı hipersensitivite reaksiyonlarında değil geç faz inflamasyonda ve havayollarının yeniden yapılanmasında da (remodeling) önemli rol oynamaktadır (27).

-Eozinofiller: Havayollarında artmış sayıda bulunurlar. Bazik protein salınımına neden olarak havayolu epitel hücrelerinde hasarlanmaya yol açarlar. Büyüme faktörlerinin salınımı ve havayolu yeniden yapılanması ile ilişkilerinin olabilecekleri düşünülmektedir (28).

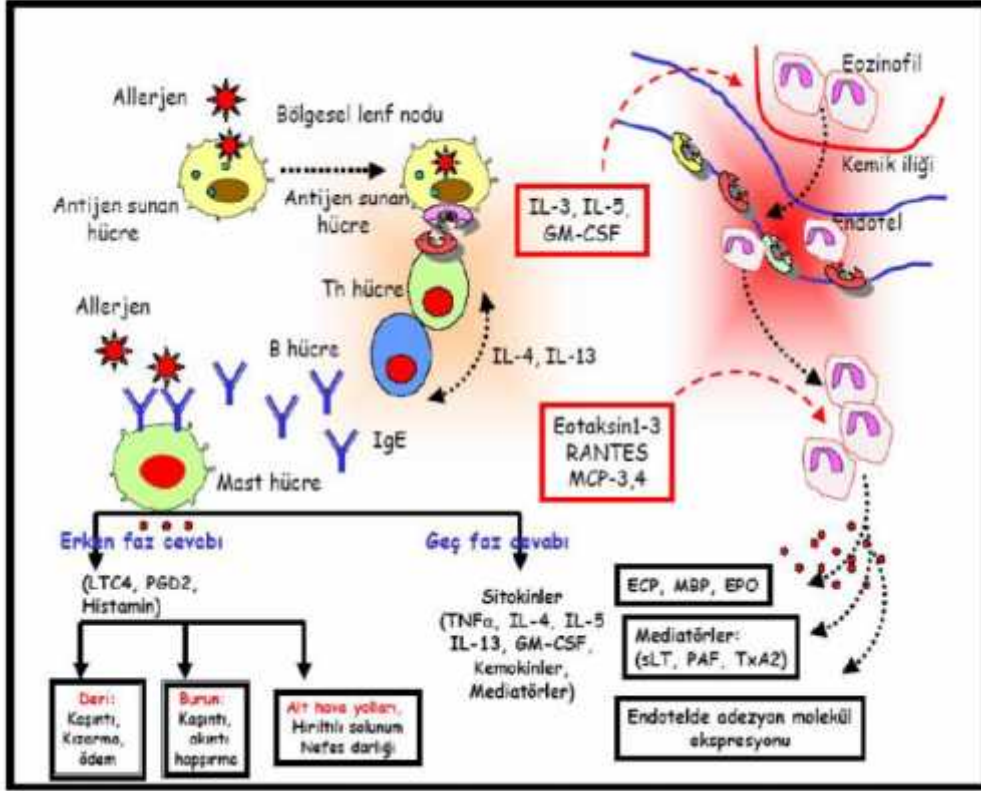
-T lenfositler: Havayollarında artmış sayıda bulunurlar. İnterlökin (IL) 4, 5, 9, 13 gibi spesifik sitokinlerin salınımına neden olarak eozinofilik inflamasyonu kontrol eder ve B lenfositlerden IgE yapımına neden olurlar (29).

-Dendritik hücreler: Havayolu mukoza yüzeyinden allerjenleri seçerek regülatuvar T hücreleri ile biraraya gelebileceği bölgesel lenf nodlarına göç ederler ve naif T hücrelerinden Th2 hücrelerinin oluşumunu stimüle ederler (30).

-Makrofajlar: Havayollarında artmış sayıda bulunurlar düşük affiniteli IgE reseptörleri aracılığı ile allerjenler tarafından aktive edilirler ve inflamatuvar cevapta rolü olan mediatörlerin ve sitokinlerin salınımına yol açarlar (31).

-Nötrofiller: Ağır astımlı ve sigara içen astımlı hastaların havayolu ve balgamlarında artmış olarak bulunurlar (32).

Şekil 2: Astımda havayollarındaki inflamatuvar hücrelerin özellikleri



(Kısaltmalar: IL=İnterlökin, ECP= Eozinofilik katyonik protein, EPO= Eozinofilik peroksidaz, MBP=Major bazik proetin, LT= Lökotrien, PAF= Trombosit aktive edici faktör, TxA2= Tromboksan A2, MCP= monosit kemotaktik protein, RANTES= Regulated on activation T-cell expressed and secreted, TNF-α= Tümör nekroz faktör alfa)

2.3.2. Astımda rol oynayan mediatörler

Astım ile ilişkili 100'den fazla farklı mediatör bulunduğu ve havayollarındaki kompleks inflamatuvar yanıtı oluşturdukları gösterilmiştir (1).

-Kemokinler: İnflamatuvar hücrelerin havayoluna taşınmasında önem taşırlar ve başlıca havayolu epitel hücreleri tarafından salınırlar. Eotaksin, eozinofiller için relatif olarak seçicidir, bununla birlikte timus ve aktivasyonun regüle ettiği kemokinler (TARC) ve makrofaj kökenli kemokinler Th 2 hücre göçüne yol açar (33).

-Sisteinil lökotrienler: Mast hücreleri ve eozinofillerden köken alan güçlü bronkokonstrüktör ve proinflamatuvar mediatörlerdir (34).

-Sitokinler: Astımdaki inflamatuvar yanıtı ve ağırlığı belirlemede ana rol oynarlar. Astımda önemli rol oynayan sitokinler inflamatuvar yanıtı arttıran IL-1 β , Tümör nekroz faktör (TNF)- α ve havayolundaki eozinofil yaşamını arttıran Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF)'dür. Th2 kökenli sitokinler; eozinofil farklılaşması ve yaşamı için gerekli olan IL-5, Th 2 hücre farklılaşması için önemli olan IL-4 ve Ig E yapımı için gerekli olan IL- 13'tür (35).

-Histamin: Histamin mast hücrelerinden salınır. Bronkokonstrüksiyon ortaya çıkmasına ve inflamatuvar yanıt oluşumuna katkıda bulunur.

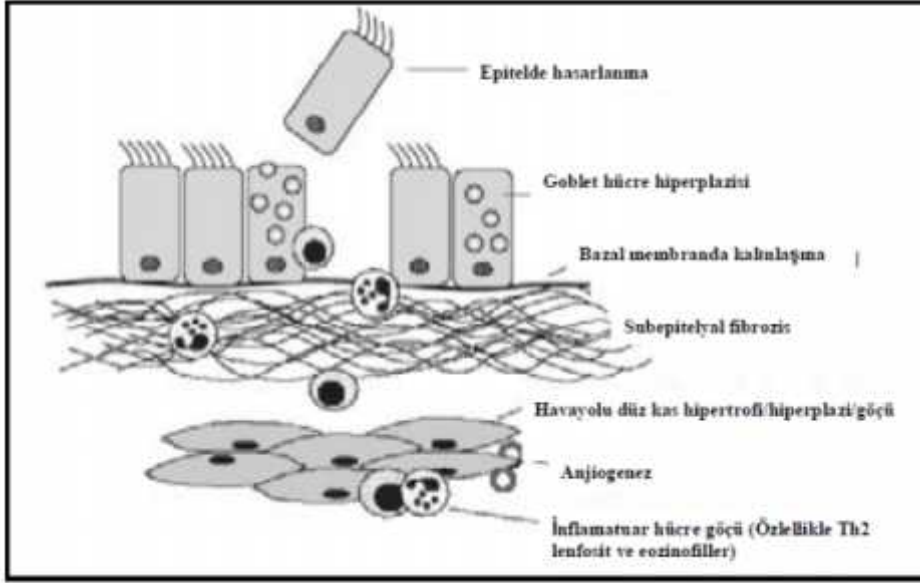
-Nitrik oksit: Havayolu epitel hücrelerindeki nitrik oksit sentazın aktivasyonu ile oluşan potent bir vazodilatördür (36). Astımdaki inflamasyonu yansıtan ekshale nitrik oksit oranı, astım tedavi etkinliğini değerlendirmede artan oranlarda kullanılmaya başlanmıştır (37).

-Prostaglandin D2: Başlıca mast hücrelerinden köken alan bir bronkokonstrüktördür ve havayoluna Th 2 hücre göçünde rol oynar.

2.3.3. Havayollarının yapısal değişiklikleri ve yeniden yapılanma (Remodeling)

Astımda havayollarında kronik inflamasyona nedeni ile hasar görmüş epitelde bir tamir süreci başlamaktadır. Hava yolu remodelingi astımlı hastaların hava yolundaki kronik, muhtemelen geri dönüşümsüz olan bu değişikliklerin genel adıdır. Bu değişiklikler düz kas hipertrofisi, anjiogenezis, artmış vaskülarite, goblet hücre hiperplazisi, kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu, kollajen depolanması, bazal membran kalınlaşması ve hava yolu duvar elastisitesinin azalmasıdır (Şekil 3) (1,38).

Şekil 3: Kronik astımda havayollarında yeniden yapılanma (remodeling)



Havayollarında yeniden yapılanmanın (Remodeling) mekanizmaları

a. Epitel hasarlanması ve tamiri

Epitel, organizmayı dış hasarlardan koruyan önemli bir bariyerdir. Epitel hücrelerinden salınan birçok inflammatuar mediatör mevcuttur. Astımlı hastalarda epitel hasarlanması çeşitli sitokin, büyüme faktörleri ve mediatörlerin etkisi ile gerçekleşir. Yeniden yapılanmaya direk etkisi olan faktörler arasında; transforming büyüme faktörü (TGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), basit fibroblast büyüme faktörü (b-FGF), IGF-1, endotelin 1 (ET-1) ve heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) sayılabilir. Bu faktörlerin fibroblast proliferasyonunu ve ekstrasellüler matriks oluşumunu etkileyerek havayollarındaki yeniden yapılanmaya katkıda bulundukları bilinmektedir (38).

b. Subepitelyal fibrozis

Astımın karakteristik bir özelliği de histolojik olarak bazal membranın kalınlaşmasıdır. Epitel bazal membranı, bazal lamina ve lamina retikularis olmak üzere iki tabakadan oluşur. Elektron mikroskopi ile astımlı havayollarında görülen bazal membran kalınlaşması daha çok lamina retikularisin hemen altındaki alanın kalınlaşmasından kaynaklanmaktadır. Subepitelyal mesafedeki kalınlaşma, kollajen I, III, V ve ekstrasellüler matriks (Fibronectin, laminin, tenaskin) birikimi ile oluşmaktadır (39). Epitel hücreleri, makrofajlar, eozinofiller, lenfositler ve

fibroblastlar tarafından sentez edilen TGF-B, ekstrasellüler matriks oluşumunu stimule eder. Bu sitokinin ekspresyonu subepitelyal fibrozisin derecesi ile direk olarak ilişkili bulunmuştur (40).

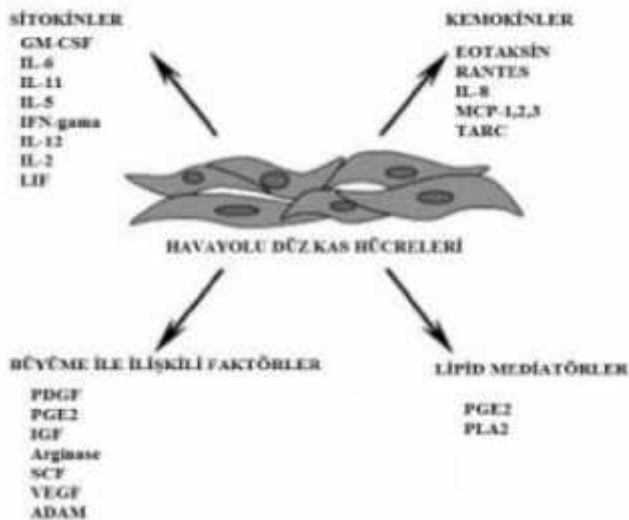
c. Goblet hücre hiperplazisi

Hava yolu yeniden yapılanmasının bir bulgusu da hava yolu epitelindeki goblet hücresi sayısındaki ve submukozal bezlerin boyutlarındaki artışa bağlı olarak aşırı mukus yapımıdır. IL-9 ve IL-13 mukus yapımını indükleyebilir. Mukus aşırı yapımı hava yolu obstruksiyonuna neden olur (41).

d. Havayolu düz kas kalınlığının artması

Havayolu düz kas kitlesinde hem hipertrofi hem de hiperplazi yeniden yapılanmanın en önemli özelliğidir (42). Yapılan bir çalışmada astımlı hastaların düz kas hiperplazisinin sadece santral havayollarında, hipertrofinin ise bronşioller dahil tüm havayollarında mevcut olduğunu gösterilmiştir (43). Düz kas hücrelerinin havayolundaki yeniden yapılanmayı çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri veya matriks proteinleri salgılayarak ve adezyon molekülleri eksprese ederek gerçekleştirmektedirler (Şekil 4).

Şekil 4: Havayolunda düz kas hücrelerinden salınan mediatörler



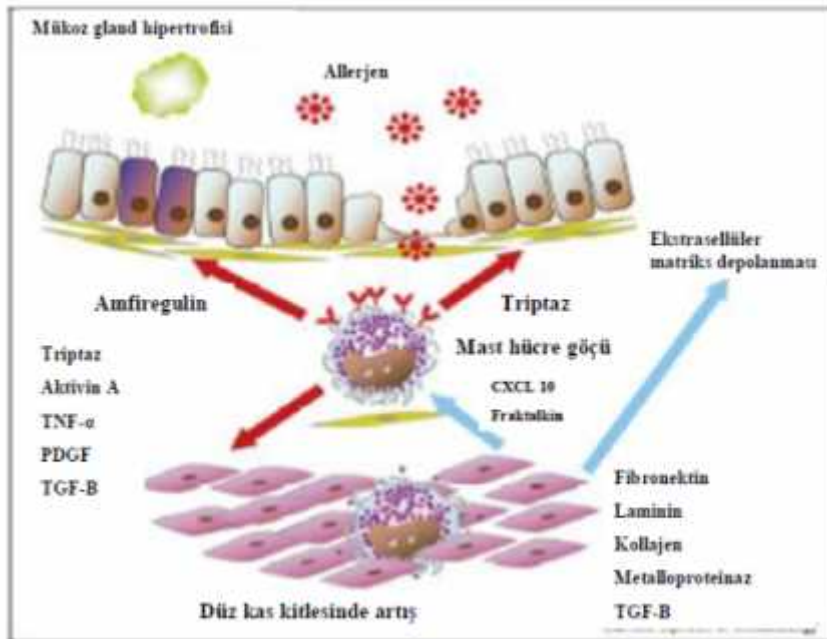
e. İnflamatuvar hücre infiltrasyonu

Havayolu düz kas hücreleri değişik sitokin, kemokin ve büyüme faktörleri salgılayarak inflamatuvar hücreleri uyarır, dolayısı ile havayolu inflamasyonu ve yeniden yapılanmasında rol oynarlar. Bu hücrelerin RANTES, eotaksin, IL-8, Monosit kemotaktik faktör (MCP) 1-3, TARC ve GM-CSF salgıladıkları ve eozinofil salınımı ve ömrünün uzamasında etkili oldukları bilinmektedir (38).

f. Mast hücre infiltrasyonu

Mast hücrelerinin, geç faz inflamasyon oluşumunda ve havayollarındaki yeniden yapılanmada önemli rolleri vardır (27). Mast hücre degranülasyonu ve aktivasyonu; triptaz, sisteinil lökotrienler ve PGD₂ gibi düz kas remodelingi oluşmasında etkin olabilecek çeşitli mediatörlerin salınımına yol açar. Degranüle olan triptaz, fibroblast ve miyositlerin proliferasyonuna ve tip I kollajen oluşumuna neden olur (38,44). Havayollarındaki mast hücre miktarındaki artış, bronşial hiper reaktivite ve astımın ağırlığı ile ilgili en önemli faktörlerden birisi olarak kabul edilmektedir (27). Mast hücrelerinin havayollarının yeniden yapılanmasındaki rolü Şekil 4’de şematik olarak görülmektedir.

Şekil 5: Mast hücre aracılı yeniden yapılanmanın şematik görüntüsü



f. Bronşial neovaskülarizasyon

Anjiogenez ve mikrovasküler düzeyde yeniden yapılanma birçok faktörün etkisi ile oluşur ve artmış vaskülarite başta vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi birtakım proanjiojenik moleküllerin etkisi ile gelişebilir (38).

2.3.4 Astımda hava yolundaki daralmaya neden olan faktörler

Hava yolundaki daralma astımdaki semptomlara ve fizyolojik değişikliklere neden olan bir sonuçtur. Astımda çok sayıda faktör hava yolu daralmasına katkıda bulunur. Tablo 2’de hava yolu daralmasına katkıda bulunan faktörler verilmiştir (1). Bir çalışmada orta ve ağır astımlı hastalarda hafif astımlılar ve sağlıklı bireyler ile karşılaştırınca distal hava yollarının toplam akciğer rezistansına dramatik katkılarının olduğunu saptamışlardır (45).

Tablo 2. Astımda hava yolu daralmasında rol oynayan faktörler

Düz kas kontraksiyonu: Birçok bronkokonstriktör mediatör ve nörotransmitterlere yanıt olarak gelişen hava yolu düz kas kontraksiyonu, hava yolu daralmasındaki başlıca mekanizmadır ve bronkodilatörler ile büyük oranda geri dönüşümlüdür.
Hava yolu ödemi: İnflamatuvar mediatörlere yanıt olarak gelişen artmış mikrovasküler kaçış nedeni ile oluşur. Bu durum özellikle akut ataklar sırasında önem kazanır.
Yapısal değişikliklere bağlı hava yollarında kalınlaşma: Sıklıkla remodeling olarak bilinir. Ağır hastalıkta önem kazanır ve günümüzdeki tedaviler ile tam olarak geri döndürülemez.
Mukus hipersekresyonu: Lümende daralmaya neden olabilir. Artmış mukus sekresyonu ve inflamatuvar eksudaların bir ürünüdür.

2.3.5 Havayolu aşırı duyarlılığı

Normal bir kişide zararsız olan uyarı ile astımlı bir hastada havayolunda daralma görülmesi “havayolu aşırı duyarlılığı” olarak tanımlanır ve astımdaki karakteristik, fonksiyonel anomaliyi gösterir. Bu havayolu daralması değişken hava akımı kısıtlılığına ve aralıklı semptomlara neden olur. Havayolu aşırı duyarlılığı, hem inflamasyona hem de havayollarındaki tamire bağlı olarak gelişir ve tedavi ile kısmen geri dönüşümlüdür. Mekanizması tam olarak bilinmemektedir (46).

2.4. Astım tanısı

Astım tanısı için genellikle anamnez, fizik muayene ve spirometrik testler yeterli olmaktadır. Tanı çoğu zaman tekrarlayan solunum sıkıntısı, öksürük atakları ve hışıltı yakınmalarının varlığında konur (124). Semptomların değişkenliği nedeni ile astımlı hastanın akciğer dinleme bulguları normal olabilir. En sık saptanan muayene bulgusu akciğer oskültasyonunda sibilan ronküs duyulmasıdır (1). Solunum fonksiyon testinde normal erişkinlerde FEV1/FVC oranı %80'den, çocuklarda ise %90'dan yüksek olmalıdır. Bu değerlerin altındaki sonuçlar hava akımındaki azalmayı düşündürmektedir. FEV1'de spontan olarak veya bronkodilatör inhalasyonu sonrasında en azından %12'lik bir düzelme olması astım tanısını desteklemektedir (48). Hafif-orta şiddette yakınmaları olup, fizik muayene bulguları ve solunum fonksiyon testleri normal olan olgularda astım tanısı konulmasında bronş provokasyon testlerinden yararlanılır (49).

2.5. Astım Tedavisi

Kronik astım tedavisinin amacı klinik kontrolü sağlamak ve devam ettirmektir. Tedavide kullanılan ilaçlar akut bronkospazmı düzelten rahatlatıcılar ve uzun dönemde inflamasyonu kontrol altına alıp astım atakları ve hastane yatışlarını azaltan kontrol edici ilaçlar olarak iki gruptur (1).

2.5.1. Astım tedavisinde kullanılan ilaçların özellikleri

a. Steroidler

İnhale kortikosteroidler en etkili kontrol edici ilaçlardır. Aynı zamanda astım tedavisinde en güçlü antiinflamatuvar etkiye sahiptir. Steroidlerin inflamatuvar hücre fonksiyon ve aktivasyonunun azalması, vasküler kaçağın stabilizasyonu, mukus üretiminde azalma, beta₂ adrenerjik cevabın artışı gibi etkileri mevcuttur. İnhale steroidlerle tedavi, astım semptomlarını kontrol etmekte, alevlenme sıklığını azaltmakta ve yaşam kalitesini, solunum fonksiyonlarını, bronş aşırı duyarlılığını, egzersizin indüklediği bronkokonstrüksiyonu düzeltmektedir (1).

b. Antilökotrien ilaçlar

Lökotrienler; eozinofil, mast hücresi ve bazofillerden üretilen ve salınan, lipid yapıda, güçlü etkili inflamasyon mediatörleridir. Sisteinil lökotrienler, vasküler geçirgenliği artırarak mukus yapımını

uyaran ve bronkospazma neden olan ajanlardır (50). Lökotrien antagonistleri; lökotrien sentez inhibisyonu yapanlar ve lökotrien reseptör antagonistleri olmak üzere iki grupta toplanabilir (51).

c. Uzun etkili beta-2 agonistler

Salmeterol, formoterol uzun etkili beta 2 agonistlerdir ve g      bronkodilatasyon yaparlar.   nhale kortikosteroidler ile kullanımlarının, inhale kortikosteroidlerin dozlarının iki katına çıkarılmasından daha etkili olduğu gösterilmiştir (52).

d. Kromonlar

Kromolin sodyum ve nedokromil sodyum, kronik astım tedavisinde benzer özellikleri olan yan etkileri oldukça az iki farklı antiinflamatuvar ilaçtır. Mast hücresini stabilize eder ve hem erken hem de geç faz reaksiyonu önlerler. Ancak son yıllarda yapılan metaanaliz çalışmalarında plasebodan fazla bir üstünlüklerinin olmadığı gösterilmiştir (1).

e. Metilksantinler

Teofilin, metilksantin grubundan hafif antiinflamatuvar etkisi olan bronkodilatatör bir ilaçtır. Çocuklar ve erişkinlerde yavaş salınlımlı teofilin preparatları kontrol edici ilaç olarak kullanılabilmektedir. Teofilin serum düzeyi yaş, diyet, hastalık durumu, ilaç etkileşimleri gibi çeşitli değişkenlerden etkilenebilir (53).

f. Sistemik steroidler

Astımlı   ocuklarda oral steroidlerin kullanımı uzun dönemde görülen yan etkilerinden dolayı sadece akut astım ataklarına ve ağır astımlılarla sınırlandırılmıştır (1).

g. Anti IgE tedavisi

Anti IgE (omalizumab) sadece yüksek serum IgE düzeyi olan hastalar için kullanılabilen bir tedavi seçeneğidir.   nhale steroidler ile kontrol altına alınamayan ağır alerjik astımlı hastalarda kullanılabilir (54).

h. Alerjen spesifik immunoterapi

Astımda immunoterapi, astım semptomlarına primer bir allerjen yol açan ve deri testi ile allerjen varlığı kanıtlanmış olgulara uygulanabilmektedir. Th1 immun yanıtı dönüşüm allerjen immunoterapisinin en önemli amacıdır (55).

2.6. ATORVASTATİN

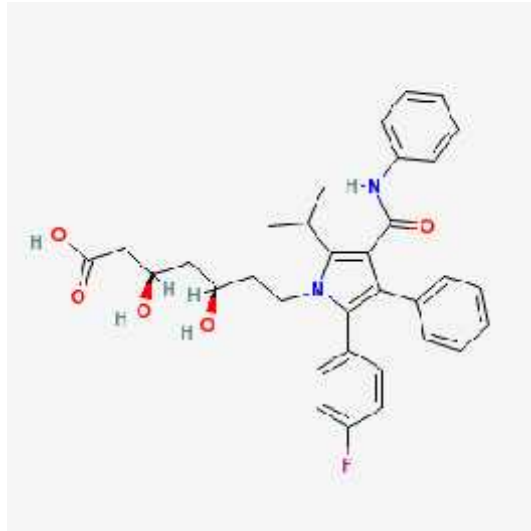
Atorvastatin serum kolesterol seviyesini düşüren ve sentetik elde edilen statin grubu bir ilaçtır.

2.6.1. Yapısı

Kimyasal açılımı; (3R,5R)-7-[2-(4-fluorophenyl)-3-phenyl-4-(phenylcarbamoyl)-5-propan-2-

Kimyasal formülü; C₃₃H₃₄FN₂O₅ (Şekil 6)

Şekil 6. Atorvastatinin kimyasal yapısı



2.6.2 Atorvastatinin özellikleri

Statinler serum kolesterol seviyesini düşüren hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan geniş bir ilaç grubudur. Statinler doğal ve sentetik olarak elde edilenler olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Lovastatin, simvastatin, pravastatin ve mevastatin doğal olarak bulunan bileşikler sayılırken atorvastatin ve fluvastatin sentetik olarak elde edilen bileşiklerdir (56). Sentetik bir bileşik olan atorvastatin, 3 Hidroksi-3 Metilglutaril Koenzim A (HMG-CoA) Redüktaz enziminin aktif kısmına bağlanarak substrat oluşumunu inhibe eder. Bu enzim karaciğer ve diğer dokularda

kolesterol sentezinin hız kısıtlayıcı basamağıdır (56). HMG-CoA'nın inhibisyonu ile kan kolesterol seviyelerinde düşme sağlandığı gibi hücre içi izoprenoidlerin de düzeyinde düşme sağlanır. İzoprenoidler bir takım proteinlerin post translasyonel lipid modifikasyonunu (pirenilasyon) sağlamakla görevlidir ve bu işlem proteinin hücre membranı ile birleşmesinde rol oynamaktadır (57). İzoprenoidlerin son ürünleri arasında Ras, Rho, Rac ve Rock yer almaktadır. Bu proteinler GTP bağlayıcı proteinler olan grubu hedef alırlar ki bunlar da hücre farklılaşması, sinyal transdüksiyonu, veziküler transport ve apoptozda rol oynamaktadır (57).

2.6.3. Atorvastatinin pleotropik etkileri

Bir ilacın özellikle geliştirildiği etki dışında gösterdiği etkiye pleiotropik etki denilmektedir. Bu etkiler ilacın primer etki mekanizmasına bağlı görülebileceği gibi, primer etki mekanizmasından bağımsız olarak da oluşabilmektedir. Pleiotropik etkiler genellikle ilacın geliştirilmesi sırasında oluşması beklenen etkiler değildir (58). Statinlerin çeşitli pleiotropik etkileri bulunmaktadır. Koroner arter hastalığını, ateroskleroz oluşumunu, platelet agregasyonu ve trombüs oluşumunu, inflamasyonu, hücre proliferasyonunu ve T-lenfosit aktivasyonunun azaltma, kemik formasyonunun artırma bu pleiotropik etkiler arasındadır (59). Bu etkiler arasındaki inflamasyonu azaltma astım açısından önem arz etmektedir.

2.6.3.1 Atorvastatin ve immünmodülatuar etkileri

Statinlerin immünmodülatuar etkilerini ilk olarak tanımlayan Francois Mach ve arkadaşları olmuştur. Makrofaj ve endotel hücreleri gibi antijen sunan hücrelerde MHCII'nin (Major Histocompatibility Class II) İnterferon-Gama'ya bağlı ekspresyonunu azaltır. Bu etki CIITA (Class II transactivator) gen ekspresyonunun baskılanması ile başlamaktadır. MHCII dışında LFA-1 (lenfosit fonksiyon ilişkili antijen-1) baskılanması, lökositlerin vasküler adhezyon ve ekstrasvazasyonunun engellenmesi, NK (natural killer) hücre aktivitesinin üzerine ve TNF-alfa, IL-1 beta, IL-6 salınımının engellenmesi gibi etkileri de vardır (60).

2.6.3.2. Atorvastatin ve antiinflamatuvar etkileri

Statinlerin antiinflamatuvar etkilerinin altında yatan mekanizmaların henüz tam olarak bilinmemesine rağmen kolesterolün endojen biosentezi sırasında oluşan ve izoprenoid olarak adlandırılan çeşitli inflamatuvar maddelerin inhibisyonunu ile açıklanmaktadır. Ayrıca in vitro

yapılan çalışma sayısı arttıkça lökosit adezyon kaskadının statinlerin antiinflamatuvar etkisinin hedef noktası olduğu doğrulanmaktadır. Bu etkiyle beraber migrasyon ve adezyon baskılanmaktadır. Genel olarak kabul gören modellere bakıldığında selektin grubuna ait reseptörler (E,P,L selektin) dolaşımdaki lökositleri hasar veya inflamasyonun olduğu yere çekmektedir (61). İşaretlenen lökositler daha sonra endotelial hücrelerden salgılanan kemokinler (MCP-1 gibi) yardımı ile aktive olurlar. Bu aktivasyon intrasellüler birtakım sinyal yolları yardımı ile lökositleri düşük afiniteli durumdan yüksek afiniteli duruma çevirir. LFA-1 ve VLA-4 (very late antigen 4) lökositler üzerindeki iki major integrindir, bu integrinlerin ligandları ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) ve VCAM-1 (vascular adhesion molecule 1) olarak bilinir. ICAM-1 ve VCAM-1 immünglobülin süper ailesinin üyeleridir ve endotelde IL-1beta ve TNF-alfa salgısı ile indüklenirler (61). Lökosit integrinleri ve adezyon moleküllerinin ilk birleşmeleri damar duvarına transmigrasyon ve adezyonu başlatan hareket olarak bilinir ki bu da inflamasyonun ilk basamağıdır (61). Statinlerin HMG-CoA redüktaz bağımlı ve daha güncel olarak bağımsız olarak da bahsedilen antiinflamatuvar etkisi bu yollar üzerinde olmaktadır.

İnsanlarda yapılan kompleks klinik çalışmaların aksine hayvanlarda yapılan çalışmalarda statinlerin antiinflamatuvar etkileri ve lipid düşürücü etkileri birbirlerinden bağımsız olarak incelenebilmiştir. Diomedea ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada deney hayvanlarında inflamasyon yaratıldıktan sonra oral kısa süreli statin ile lökosit birikiminde azalma saptanmış ve inflamasyonda baskılanma izlenmiştir. Lökosit migrasyonundaki bu baskılanma monosit kemotaktik protein 1(MCP-1), RANTES (normal T hücre ekspresyon ve sekresyonunda regulasyon ve aktivasyon) ve IL-6 reseptörlerindeki downregülasyonla açıklanmıştır (62). Buna benzer olarak Kimura ve arkadaşları hiperkolesterolemik farelerde fluvastatin tedavisi ile postkapiler venlerde trombosit aktive edici faktör ve Lökotrien B4 yanıtına sekonder gelişmiş lökosit adezyonunda azalma sağlamışlardır. Bu etkiyi tamamen lipid düşürücü özellikten bağımsız olarak göstermişlerdir (63). Stalker ve grubunu rosuvastatin sistemik olarak normokolesterolemik farelere vermiş ve trombinle indüklenen lökosit göçü, adezyon ve transmigrasyonda düzelme saptamışlardır. Bu modelde rosuvastatinin iyileştirici etkisi endotelden NO salınımının düzenlenmesi ve endotelial-P selektinin downregüle olması ile açıklanmıştır (64). Direkt antiinflamatuvar etkinin gösterilmesi için yapılan diğer bir çalışmada inflamatuvar ayak ödemi yapılmış hayvan grubuna simvastatin tedavisi (3-10mg/kg) verilmiş ve

ödem formasyonunda azalma sağlanmıştır, aynı grup için ilacın antihiperkolesterolemik etkileri incelendiğinde Apolipoprotein E2 baskılanması için gerekli ilaç düzeyinin (100mg/kg) olduğu kanıtlanmıştır. Bu da göstermektedir ki, antiinflamatuvar etki lipid düşürücü etkiden bağımsız olarak daha düşük dozlarda da meydana gelmektedir (65).

2.6.3.3 Atorvastatinin Farklı Dokulardaki Etkileri

Statinler ve epitel

Güncel olan birçok çalışma kolesterolden bağımlı ve bağımsız olarak statinlerin epitel fonksiyonlarını düzelttiğini göstermektedir (66). Statinler birden fazla mekanizma ile eNOS sentezini kontrol etmektedir. Birinci yol Rho/ROCK yoludur, bu yol eNOS'un mRNA yapımını artırmaktadır (67,68). İkinci yol statinlerin serin/tironin protein kinazı aktive etmesi ile olur. Bu yol ile eNOS fosforilasyonunu artırmaktadır. Üçüncü yol ise Caveolin-1 adı verilen bir integral membran proteini ile olur ki, bu eNOS membran bağlantısını sağlayarak NO sentezinin baskılanmasını sağlamaktadır (69).

Statinler ve düz kas

Vasküler alanda yapılan çalışmalarda statinlerin damar düz kasındaki patolojik oluşumları engellediği görülmüştür. Özellikle fare deneylerinde hasar ile ilişkili damar düz kas nötrofil birikimi ve hücre apoptozu statinlerle bloke edilmektedir (70).

2.6.4. Farmakodinamiği

Atorvastatin oral uygulamadan sonra hızla absorbe olur; maksimum plazma konsantrasyonları 1 ila 2 saat arasında görülür. Emilimin derecesi atorvastatin dozuyla orantılı olarak artar. Atorvastatinin mutlak biyoyararlanımı yaklaşık % 14'dir ve HMG – CoA redüktaz inhibitör aktivitesinin sistemik yararlılığı yaklaşık % 30'dur. Düşük sistemik yararlılık gastrointestinal mukozadaki pre-sistemik klerense ve/veya hepatik ilk-geçiş metabolizmasına bağlanır. Cmax ve eğri altındaki alan (area under curve, AUC) değerlerine göre, yiyecekler ilacın emilim oranını ve derecesini sırasıyla %25 ve %9 azaltır (71,72).

2.6.5. Metabolizasyonu

Atorvastatin'in ortalama dağılım hacmi yaklaşık 380 L'dir. Atorvastatin plazma proteinlerine $\geq$ % 98 bağlanır. Yaklaşık 0.25 oranında kan/plazma oranı, eritrositlere ilacın penetrasyonunun zayıf olduğunu göstergesidir. Atorvastatin, orto ve parahidroksilat türevlerine ve çeşitli beta oksidasyonu ürünlerine metabolize olur. HMG- KoA redüktaz için dolaşan inhibitör aktivitenin yaklaşık % 70'i aktif metabolitlere bağlanır. Atorvastatin hepatik ve/veya ekstrahepatik metabolizmayı takip ederek öncelikle safrada elimine edilir. Bununla birlikte, ilaç enterohepatik re-sirkülasyona uğramamaktadır. Atorvastatinin ortalama plazma eliminasyon yarı-ömrü insanlarda yaklaşık 14 saattir. HMG-KoA redüktaz için inhibitör aktivitenin yarı ömrü aktif metabolitlerin katkısı nedeniyle yaklaşık 20-30 saattir (71,72).

2.6.6. İlaç etkileşimleri

İlaç etkileşimlerine bakıldığında CYP3A4 aktivitesini inhibe eden siklosporin, fibrik asit türevleri, eritromisin, azol antifungaller ve niasinle etkileştiği bulunmuştur (71,72).

3.GEREÇ VE YÖNTEM:

3.1. Deney hayvanları:

Deney için 6-8 haftalık 18-20 gr ağırlığındaki 28 adet ad libitum olarak beslenen BALB/c fare kullanıldı. Çalışma için kullanılan fareler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edildi. Fareler klimalı odalarda 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda önceden dezenfekte edilmiş plastik tabanlı, zemine talaş serili metal korumalı fare kafeslerinde muhafaza edildi. Çalışmada kullanılan BALB/c fareler Resim 1’de verilmiştir. Bu çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu’ndan etik kurul onayı alınmıştır.

Resim 1. Çalışmada kullanılan BALB/c fareler



3.2. Çalışma Grupları:

Çalışmaya dahil edilen 28 adet BALB/c fare her grupta 7 fare olacak şekilde 4 gruba ayrıldı.

Grup 1 (n=7): Oda havasında kalan ve herhangi bir tedavi verilmeyen kontrol grubu

Grup 2 (n=7): Astım modeli oluşturularak salin uygulanan plasebo grubu

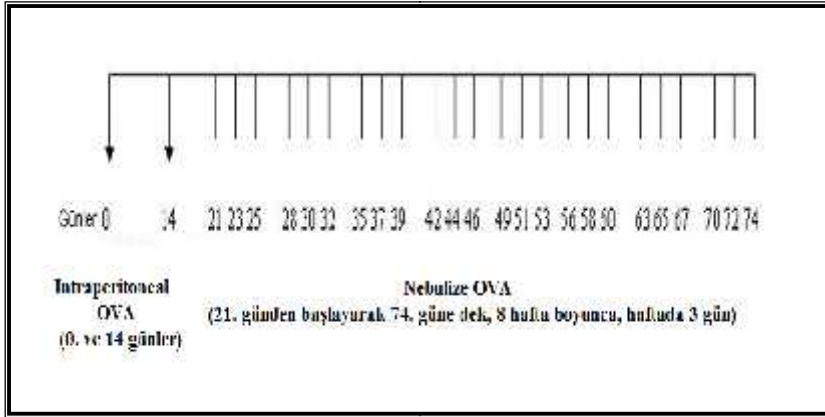
Grup 3 (n=7): Astım modeli oluşturularak atorvastatin uygulanan grup

Grup 4 (n=7): Astım modeli oluşturularak deksametazon uygulanan grup

3.3. Kronik astım modelinin oluşturulması

Temelkovski ve arkadaşları tarafından tanımlanan kronik astım modeli kullanıldı (73). Kontrol grubu (Grup 1) dışındaki diğer tüm fareler 14 gün ara ile iki kez 10µg intraperitoneal tavuk yumurta ovalbumin (OVA; Grade V, Sigma, St Louis, MO, USA) uygulanarak duyarlılaştırıldı. Kontrol grubundaki farelere aynı yol ve miktarda salin solusyonu uygulandı. Duyarlılaştırılan farelere son immunizasyondan 7 gün sonra (21. günde) başlamak üzere, günde 30 dakika süre ile haftanın üç günü, 8 hafta boyunca steril salin içindeki %2.5'lik ovalbumin solusyonundan oluşan aerol inhale ettirildi. İnhalasyon uygulamaları, jet nebulizatör ile bağlı 40x30x20 cm ebatlarındaki cam odacığın içine fareler gruplar halinde koyularak bütün vücut inhalasyon sistemi ile yapıldı. Bu nebulizatör sistemi ile verilen aerosol $\leq 4\mu\text{m}$ çapında $\geq 80\%$ partikül ayrışmasına olanak sağladı. Partikül konsantrasyonu 10-20mg/m³ idi. Kontrol grubundaki farelere de aynı sistem ile salin inhalasyonu yaptırıldı (73,74). Şekil 7'de kronik astım modeli oluşturma protokolü verilmiştir.

Şekil 7. Kronik astım modeli oluşturma protokolü



3.4. Çalışma ilaçlarının verilmesi:

Ovalbumin inhalasyonunun son haftasında plasebo grubundaki farelere salin, grup III'teki farelere atorvastatin (Sanovel İlaç/Türkiye) 10 mg/kg/gün, Grup IV'deki farelere deksametazon 1 mg/kg/gün, intraperitoneal yol ile ardı ardına 5 gün uygulandı.

3.5. Hayvan yaşamını sonlandırma zamanı ve yöntemi

Fareler son tedavinin uygulanmasından 24 saat sonra 35 mg/kg ketamin ve 5mg/kg ksilazinin intraperitoneal olarak verilmesi ile sakrifiye edildi.

3.6. Histolojik incelemeler

Tüm farelerin sol akciğer orta zonundan alınan doku örnekleri tedavi gruplarını bilmeyen iki histolog tarafından yapısal ve ultrayapısal değişiklikler açısından incelendi. Elektron mikroskopik inceleme için 1-2 mm³'lük doku örnekleri gluteraldehid içinde ayrıldı. Örnekler ışık mikroskopik değerlendirme açısından %10'luk formalinde fikse edildi. Fiksasyon sonrası doku örnekleri parafine gömüldü. Daha sonra parafin bloklar 5 mikrometre (µm) kalınlıktaki seri kesitlere bölündü. Her fare için 10 kesit seçildi ve boyama işlemine alındı. Işık mikroskopik değerlendirme için 3 farklı boyama işlemi uygulandı. Bir grup kesit doku yapıları ve orta ve küçük hava yollarının epitel kalınlıkları, subepitelyal düz kas kalınlıkları gibi morfometrik değerlendirmeler için hematoksilen ve eosin (H&E) ile boyandı. Bu ölçümler için hava yolu içeren her kesitteki 3'er alandan Olympus BH-2 RFCA model mikroskopa (Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) adapte olan digital kamera (JVC TK-890-E; JVC, Yokohama, Japan) ile fotomikrograflar çekildi (74). Morfometrik analiz UTHSCSA Image Tool for Windows (The University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA) Version 3.00 ile yapıldı. Epitel ve subepitelyal düz kas kalınlığı 2-3 farklı hava yolunun 8 farklı noktasından kalibre edilmiş mikrometrik ölçüm cihazı ile ölçüldü. Sonraki kesitler Toluidin Blue ve Periodic asit Schiff (PAS) ile boyandı. Toluidin Blue ile boyanan kesitlerin her birinden 5'er alan rastgele seçilerek fotoğrafları alındı. Mast hücre sayımı için standart 16400 mikrometre karelik (µm²) alan kullanıldı. Aynı metod her faredeki PAS ile boyalı 10'ar kesitte goblet sayımı için de kullanıldı. Her kesitte rastgele seçilen 3-5 hava yolu fotoğraflandı. Bu alandaki goblet hücre sayıları kaydedildi ve hava yolu çevresi ölçüldü. Standardizasyon için 100 mikrometre uzunluktaki goblet hücre sayımı; toplam goblet hücre sayısının toplam hava yolu çevresinin uzunluğuna bölünmesi ve sonucun 100 ile çarpılması ile elde edildi (74). Doku örnekleri elektron mikroskopik değerlendirme için %2.5'luk gluteraldehit ve osmium tetraoksit ile fikse edildi. Ardından dokular Epon bloklara gömüldü. Solunum yolları yarı ince kesitlerden işaretlendi. Tam ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandı. Bu değerlendirme için Libra 120 electron microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) kullanıldı. Fotomikrograflar mikroskoba adapte TRS Sharpeye Dual Speed CCD

Camera (Troendle, Mooren Wies, Germany) ile çekildi. Her farede 20 noktadan ölçülen solunum epitelinin bazal membran kalınlığı iTEM software package (version 5.0) (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany) programı kullanılarak elektron mikroskopu ile değerlendirildi (74).

3.7. Akciğer Dokusunda IL-4 ve IL-5 Ölçümü

Sakrifiye edilen farelerin sağ akciğer üst lobu 2 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı ve oda ısı ile temas etmeden -80°C'da çalışma gününe kadar saklandı. Çalışma günü -80 °C'dan çıkarılan dokular +4°C de çözüldü. Daha sonra buz üzerine alınan örneklerden 60-80 mg lık parça önceden soğutulmuş içinde 5 mm çapında paslanmaz çelik boncuk ve 1:7 oranında fosfat tampon (pH: 7.2) olan tüpe alındı. Mikrosantrifüj tüpleri önceden soğutulmuş Tissuelyser LT raklarına alınıp TissueLyser (Qiagen-Almanya) doku homojenizasyon cihazına yerleştirildi. Frekans 50, zaman 5 dakikaya ayarlandı. Elde edilen homojenat +4°C de 5000 g de 10 dakika santrifuj edildi. Santrifuj sonrası elde edilen süpernatantlardan IL-4 ve IL-5 düzeyleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda ELISA yöntemiyle çalışıldı (RayBio Mouse IL-4 Kit, RayBio Mouse IL-5 Kit). ELISA plakları 450 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirildi. (BioTek Synergy HT, USA)

3.8. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz için SPSS 11 istatistik programı (SPSS Inc., Chicago, Illinois, Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı. Veriler her grupta yedi farenin ortalama (Ort) $\pm$ standart deviasyon (SD) değerleri olarak verildi. Verilerin normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov–Smirnov testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösterenler için tüm grup verilerinin bir arada karşılaştırılması Bonferonni düzeltmeli tek yönlü ANOVA testi (tek yönlü varyans analizi) ile yapıldı. IL-4 ve IL-5 ölçümlerinde çoklu grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis, ikili grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testleri kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Her grupta 7 fare olmak üzere 28 fare çalışmayı tamamladı. Kontrol grubu (Grup I), plasebo grubu (Grup II), atorvastatin grubu (Grup III) ve deksametazon uygulanan grubun (Grup IV) bazal membran kalınlığı, düz kas kalınlığı, epitel yüksekliği, mast ve goblet hücre sayılarını içeren histolojik verileri Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3: Tüm grupların histolojik parametreleri

	Kontrol grubu (Grup I) (Ort±SD)	Plasebo grubu (Grup II) (Ort±SD)	Atorvastatin grubu (Grup III) (Ort±SD)	Deksametazon grubu (Grup IV) (Ort±SD)
Bazal membran kalınlığı (nm)	270.11± 17.09	659,65 ± 31,67	532.46 ± 12.18	509.79 ± 27.68
Subepitelyal düz kas kalınlığı (µm)	4.12±0.87	14.4±1.49	10.3±2.25	8.41±1.28
Epitel yüksekliği (µm)	25. 3± 3.78	33.0±7.32	29.7±5.10	28.9±6.63
Mast hücre sayısı /16400 (µm²)	0.32±0.58	2.67±1.00	1.05±0.91	1.02±1.00
Goblet hücre sayısı /100 µm	0.61±0.77	2.58 ± 1.89	1.29±1.24	1.05±1.07

Kontrol grubu (Grup I) ile astım modeli oluşturulup plasebo olarak salin uygulanan grubun (Grup II) histolojik verileri karşılaştırıldığında; plasebo grubunda bazal membran, düz kas ve epitel kalınlıklarının, mast ve goblet hücre sayılarının istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış olduğu gösterildi. Bu sonuçlar astım modelinin çalışma grubundaki farelerde başarı ile oluşturulduğunu göstermiştir. Her iki grubun karşılaştırılan parametreleri (ortalama $\pm$ standart hata) ve p değerleri Tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 4: Kontrol grubu ile plasebo grubunun histolojik verilerinin karşılaştırılması

	Kontrol grubu (Grup I) (Ort$\pm$SD)	Plasebo grup (Grup II) (Ort$\pm$SD)	P
Bazal membran kalınlığı (nm)	270.11 $\pm$ 17.09	659,65 $\pm$ 31,67	0.000
Subepitelyal düz kas kalınlığı (μm)	4.12 $\pm$ 0.87	14.4 $\pm$ 1.49	0.000
Epitel yüksekliği (μm)	25. 3 $\pm$ 3.78	33.0 $\pm$ 7.32	0.000
Mast hücre sayısı/ 16400 (μm²)	0.32 $\pm$ 0.58	2.67 $\pm$ 1.00	0.000
Goblet hücre sayısı /100 μm	0.61 $\pm$ 0.77	2.58 $\pm$ 1.89	0.000

Plasebo grubu (Grup II) ile atorvastatin grubunun (Grup III) histolojik verileri karşılaştırıldığında ise, atorvastatin uygulanan grupta, bazal membran (p: 0.000), düz kas (p: 0.000) ve epitel yüksekliğinin (p: 0.010), mast (p: 0.000) ve goblet hücre sayısının (p: 0.000) anlamlı olarak azalmış olduğu gösterildi. Her iki grubun karşılaştırılan parametreleri (ortalama, $\pm$ standart hata) ve p değerleri Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5: Plasebo grubu ile atorvastatin grubunun histolojik verilerinin karşılaştırılması

	Plasebo grup (Grup II) (Ort$\pm$SD)	Atorvastatin grubu (Grup III) (Ort$\pm$SD)	P
Bazal membran kalınlığı (nm)	659,65 $\pm$ 31,67	532.46 $\pm$ 12.18	0.000
Subepitelyal düz kas kalınlığı (μm)	14.4 $\pm$ 1.49	10.3 $\pm$ 2.25	0.000
Epitel yüksekliği (μm)	33.0 $\pm$ 7.32	29.7 $\pm$ 5.10	0.010
Mast hücre sayısı/16400 (μm²)	2.67 $\pm$ 1.00	1.05 $\pm$ 0.91	0.000
Goblet hücre sayısı /100 μm	2.58 $\pm$ 1.89	1.29 $\pm$ 1.24	0.000

Plasebo grubu (Grup II) ile deksametazon grubunun (Grup IV) histolojik verileri karşılaştırıldığında ise, deksametazon uygulamasının, bazal membran (p: 0.000), düz kas (p: 0.000) ve epitel yüksekliğinin (p: 0.006), mast (p: 0.000) ve goblet hücre sayısının (p: 0.001) anlamlı olarak azaltmış olduğu gösterildi. Her iki grubun karşılaştırılan parametreleri (ortalama, $\pm$ standart hata) ve p değerleri Tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6: Plasebo grubu ile deksametazon grubunun histolojik verilerinin karşılaştırılması

	Plasebo grup (Grup II) (Ort$\pm$SD)	Deksametazon grubu (Grup IV) (Ort$\pm$SD)	P
Bazal membran kalınlığı (nm)	659,65 $\pm$ 31,67	509.79 $\pm$ 27.68	0.000
Subepitelyal düz kas kalınlığı (μm)	14.4 $\pm$ 1.49	8.41 $\pm$ 1.28	0.000
Epitel yüksekliği (μm)	33.0 $\pm$ 7.32	28.9 $\pm$ 6.63	0.006
Mast hücre sayısı/ 16400 (μm²)	2.67 $\pm$ 1.00	1.02 $\pm$ 1.00	0.000
Goblet hücre sayısı /100 μm	2.58 $\pm$ 1.89	1.05 $\pm$ 1.07	0.001

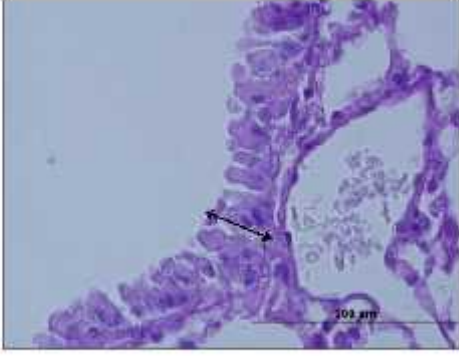
Atorvastatin grubu (Grup III) ile deksametazon grubunun (Grup IV) histolojik verileri karşılaştırıldığında ise; iki grup arasında bazal membran (p: 0.514), düz kas kalınlığı (p: 0.053), epitel yüksekliği (p:0.450), mast hücre sayısı (p: 0.801) ve goblet hücre sayısı (p: 0.477) açısından anlamlı farklılık saptanmadı. Her iki grubun karşılaştırılan parametreleri (ortalama, $\pm$ standart hata) ve p değerleri Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7: Deksametazon grubu ile atorvastatin grubunun histolojik verilerinin karşılaştırılması

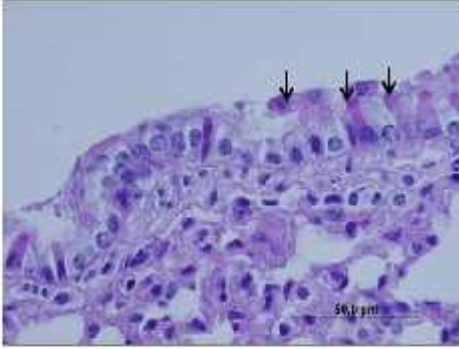
	Atorvastatin grup (Grup III) (Ort$\pm$SD)	Deksametazon grubu (Grup IV) (Ort$\pm$SD)	P
Bazal membran kalınlığı (nm)	532.46 $\pm$ 12.18	509.79 $\pm$ 27.68	0.513
Subepitelyal düz kas kalınlığı (μm)	10.3 $\pm$ 2.25	8.41 $\pm$ 1.28	0.053
Epitel yüksekliği (μm)	29.7 $\pm$ 5.10	28.9 $\pm$ 6.63	0.450
Mast hücre sayısı/ 16400 (μm²)	1.05 $\pm$ 0.91	1.02 $\pm$ 1.00	0.801
Goblet hücre sayısı /100 μm	1.29 $\pm$ 1.24	1.05 $\pm$ 1.07	0.477

Tüm grupların ışık ve elektron mikroskopik görünümüleri aşağıda verilmiştir (Resim 2-17).

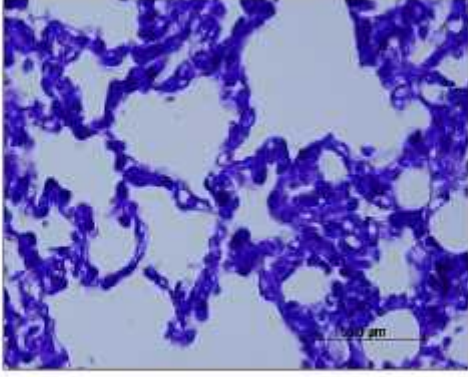
Işık ve elektron mikroskopik çalışmalarda kontrol grubunda histolojik bulgular normal saptanmıştır (Resim 2-5).



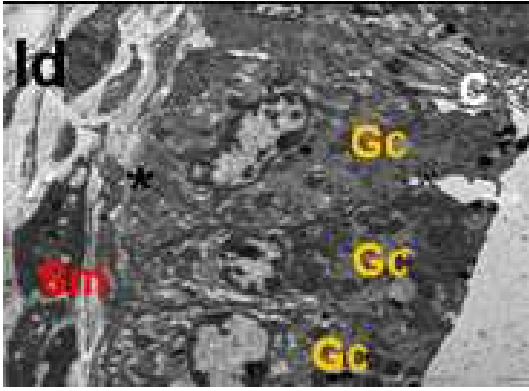
Resim 2. Kontrol grubunun H&E boyalı akciğer kesitleri: Bronşiol yapıları ve parankim olağan görünümündedir. Epitel yüksekliği normal, subepitelyal düz kas ince bir tabaka halinde gözlenmektedir (siyah ok)



Resim 3. Kontrol grubunun PAS boyalı akciğer kesitleri: Goblet hücreleri minimal sayıda izlenmektedir (siyah ok).



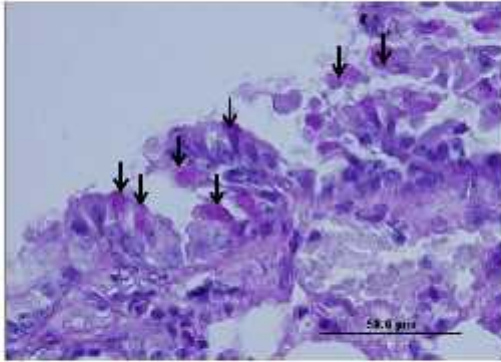
Resim 4. Kontrol grubunun toluidin mavisi boyalı akciğer kesitleri: Mast hücresi (ok) akciğer parankiminde normal sayıda izlenmektedir.



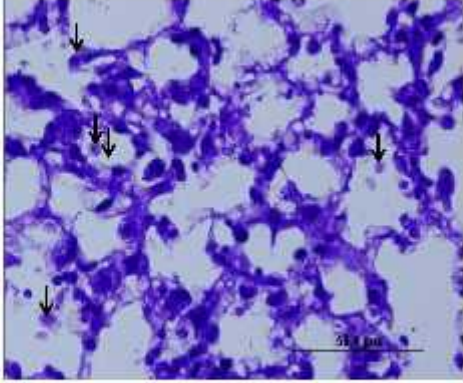
Resim 5: Kontrol grubunun akciğer kesitlerinin elektron mikroskopik görünümü: Bazal membran düzenli ve ince (*), tek sıra düz kas hücreleri (Sm), silyalı solunum yolu epiteli (C) ve goblet hücreleri (Gc) sağlıklı olarak izlenmektedir.



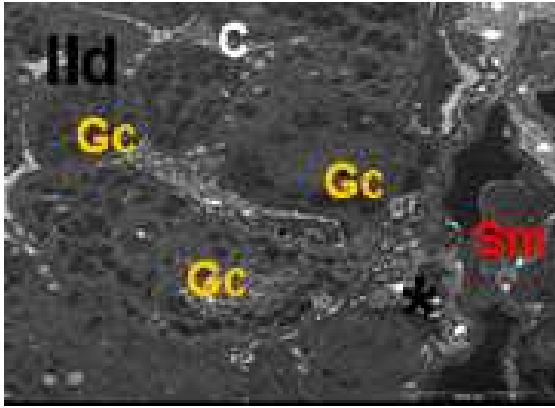
Resim 6: Plasebo grubunda (Grup II) akciğer kesitleri (H&E boyama): Havayolunu çevreleyen epitel yer yer ayrılmalar nedeni ile düzensiz ve yüksek boylu olarak gözlenmekte, kalınlaşmış düz kas tabakası dikkati çekmektedir (siyah başlı ok). Peribronşiler alanlarda yaygın mononükleer infiltrasyon (*) mevcuttur.



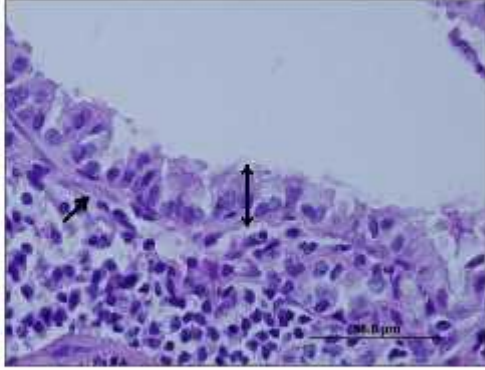
Resim 7: Plasebo grubunda (Grup II) akciğer kesitleri (PAS boyama): Akciğer parenkiminde artmış Goblet hücreleri (siyah ok) izlenmektedir.



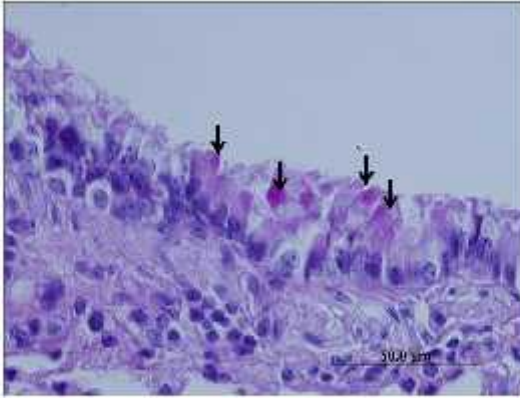
Resim 8: Plasebo grubunda (Grup II) akciğer kesitleri (Toluidin blue boyama): Akciğer parankiminde mast hücreleri (oklar) artmış olarak izlenmektedir



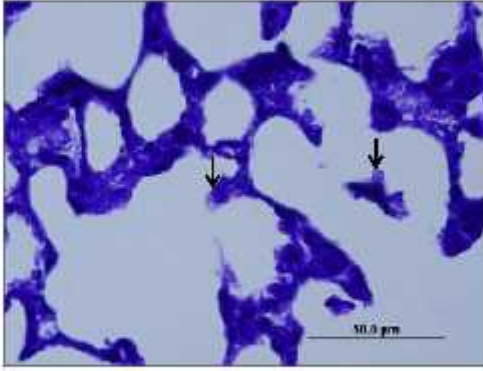
Resim 9: Plasebo grubunda (Grup II) akciğer kesitleri (Elektron mikroskopi): Subepitelyal düz kalınlığı artmış (Sm) kalınlaşmış, goblet hücreleri artmış (Gc) olarak izlenmektedir. Bazal membran kalınlaşmıştır (*).



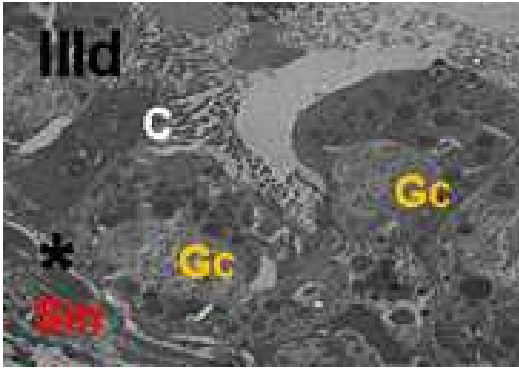
Resim 10. Grup III 'ün (Atorvastatin) H&E ile boyalı akciğer kesitleri: Epitel yüksekliği (siyah çift başlı ok) ve düz kas tabakasının kalınlığı (siyah ok) plasebo grubuna göre azalmış olarak izlenmektedir



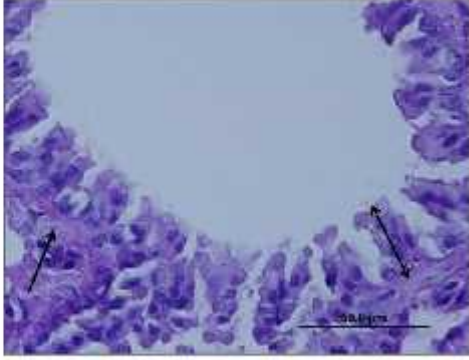
Resim 11. Grup III'ün (Atorvastatin) PAS ile boyalı akciğer kesitleri: Goblet hücreleri (siyah ok) plasebo grubuna göre azalmıştır



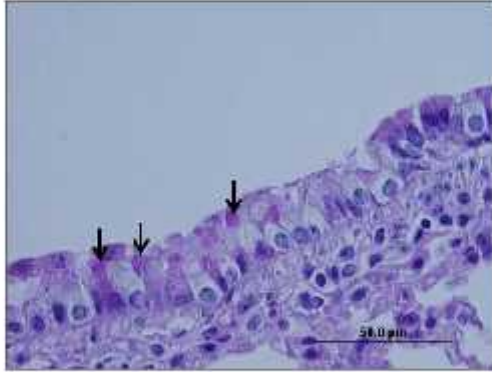
Resim 12. Grup III'ün (atorvastatin) toluidin mavisi ile boyalı akciğer kesitleri: Mast hücreleri (siyah ok) plasebo grubuna göre azalmıştır



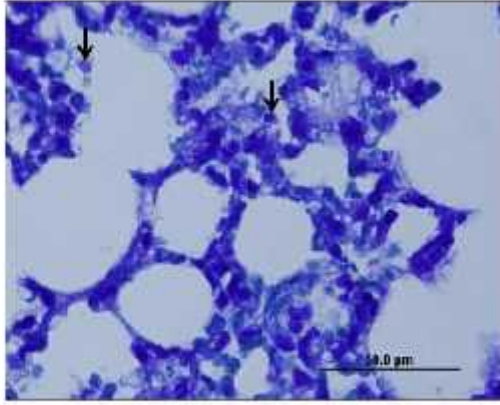
Resim 13. Grup III (atorvastatin) akciğer kesitlerinin elektron mikroskopik görünümü: Bazal membran (*) plasebo grubuna göre daha ince izlenmektedir. Silyalı solunum yolu epitel hücreleri © ve goblet hücreleri (Gc) normal görünümündedir.



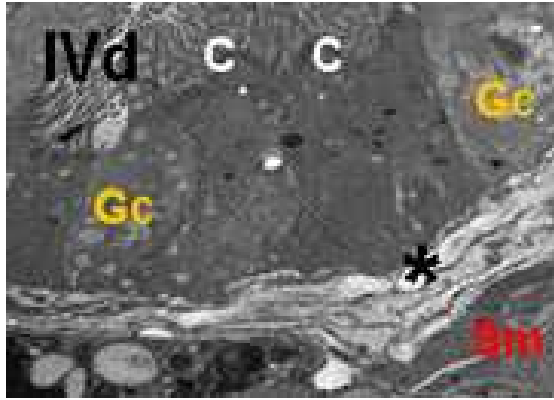
Resim 14. Grup IV'in (deksametazon) H&E ile boyalı akciğer kesitleri: Epitel yüksekliği (siyah çift başlı ok) ve düz kas tabakası kalınlığı (siyah ok) azalmıştır.



Resim 15. Grup IV'ün (deksametazon) PAS ile boyalı akciğer kesitleri: Goblet hücre (siyah ok) sayısında plasebo grubuna göre azalma saptanmıştır.

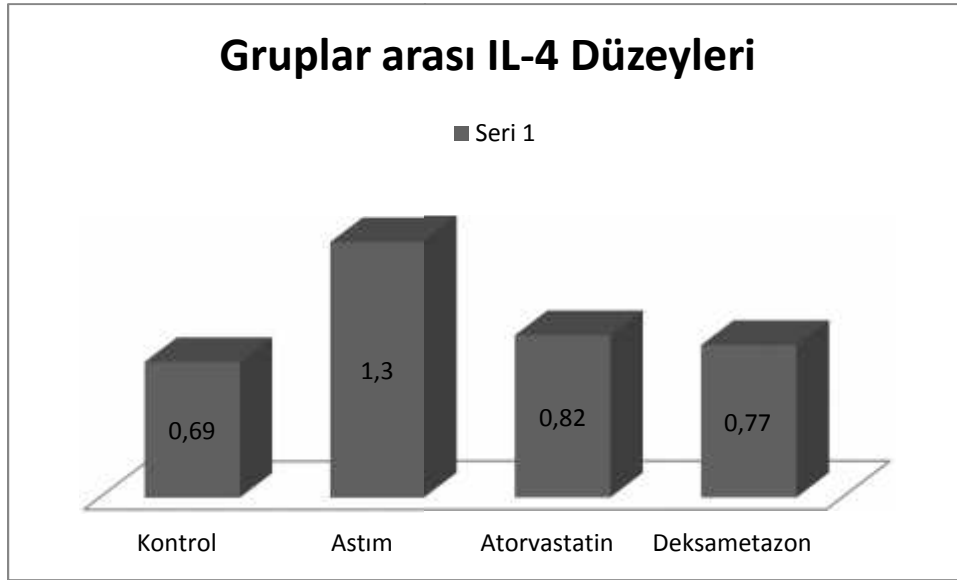


Resim 16. Grup IV'ün (deksametazon) toluidin mavisi ile boyalı akciğer kesitleri: Mast hücre (siyah ok) sayısında plasebo grubuna göre azalma saptanmıştır.



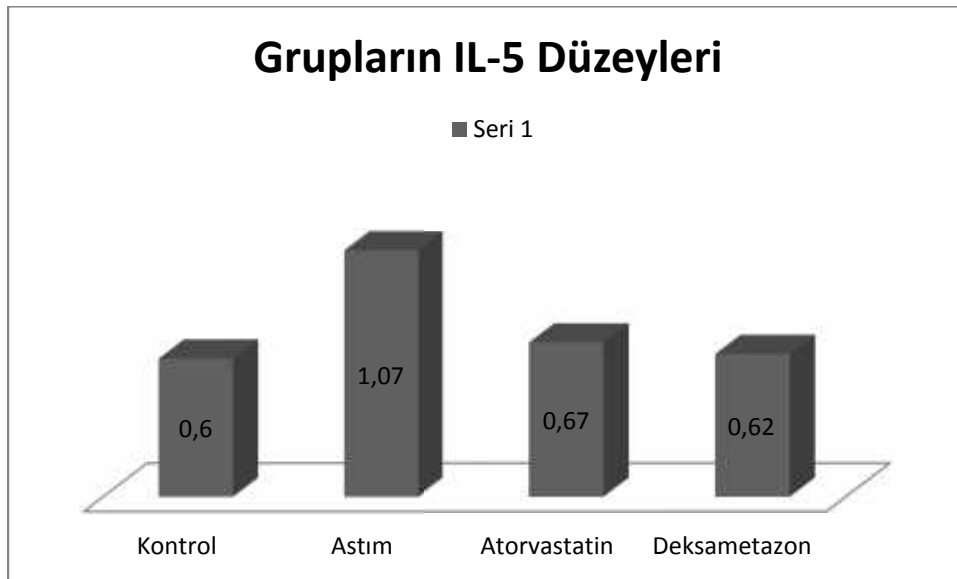
Resim 17. Grup IV'ün (deksametazon) akciğer kesitlerinin EM görünümü: Bazal membran kalınlığı (*) plasebo grubuna göre incedir ve düz kas kalınlığı (Sm) azalmıştır

Akciğer dokusundan bakılan IL-4 düzeyi, hem atorvastatin hem de deksametazon grubunda plasebo grubuna göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır ($p=0.00$, $p=0.00$). Atorvastatin ve deksametazon grupları arasında ise IL-4 düzeyi açısından bir farklılık saptanamamıştır ($p=0.38$) (Şekil 5).



Şekil 5. Gruplar arasındaki IL-4 düzeyleri (pg/ml)

Akciğer dokusundan bakılan IL-5 düzeyi, hem atorvastatin hem de deksametazon grubunda plasebo grubuna göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır ($p=0.00$, $p=0.00$). Atorvastatin ve deksametazon grupları arasında ise IL-4 düzeyi açısından bir farklılık saptanamamıştır ($p=0.72$) (Şekil 6).



Şekil 6. Gruplar arasındaki IL-5 düzeyleri (pg/ml)

5. TARTIşMA

Astım havayollarında inflamasyon, yeniden yapılanma ve solunum fonksiyonlarında düşüş ile karakterize kronik enflamatuvar bir hastalıktır (75). Havayolu inflamasyonu patogenezdaki en önemli unsurlardan birisidir. Havayollarında inflamasyonun önemli bir sonucu, havayollarındaki yapısal hücrelerin ve ekstrasellüler matriks elemanlarının yapı, organizasyon ve fonksiyonlarının farklılaşması ile gerçekleşen ve remodeling diye adlandırılan değişikliklerdir. Goblet hücre hiperplazisi, bazal membranda kalınlaşma, subepitelyal fibrozis, havayolu düz kaslarında hipertrofi/hiperplazi ve anjiogenezis remodeling süresince oluşmaktadır (76). Havayollarındaki inflamasyonu baskılamak, remodeling sürecini engellemek ve semptomları azaltmak günümüzdeki tedavi yaklaşımları arasındadır. Her ne kadar şu andaki tedaviler inflamasyonu azaltsa da havayolu remodelingine etkileri azdır.

Astımın tedavisinde birçok ilaç kullanılmaktadır. Bu ilaçların en etkili olanı steroidlerdir (77). Steroidlerin astımda solunum fonksiyonlarının düzelmesinde, havayolu aşırı duyarlılığının azalmasında ve havayolu inflamasyonunun kontrol altına alınmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Steroidler mevcut yan etkilerinin azaltılması amacıyla inhaler formda kullanılmaktadır. Ancak gerek sistemik ve lokal yan etkileri gerek ailelerde mevcut olan kortikofobi nedeniyle tedavi uyumu azalmaktadır (78,79). Bu nedenlerden dolayı astımlı hastalarda inflamasyonu baskılayan, remodelingi engelleyen ve yan etkisi olmayan tercihen nonsteroid yapıda mevcut tedavilere alternatif tedavi seçeneklerine ihtiyaç vardır.

İnsanlardaki remodeling sürecini taklit eden astım modelleri, hayvan çalışmalarında başarı ile oluşturulmuştur (73). Çalışmamızda kullandığımız astım modeli en sık uygulanan modellerden biridir. Çalışmamızda astımı destekleyen histolojik bulgulardan bazal mebran kalınlığı, goblet hücre hiperplazisi, düz kas kalınlığı, mast hücre sayısı ve epitel yüksekliği parametreleri ovaalbumin verilerek astım modeli oluşturulan fare grubunda plasebo verilen gruptan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.000$). Bu durum remodeling ile ilişkili histolojik değişikliklerin astım hayvan modelinde başarı ile oluşturulduğunu desteklemiştir.

Astımda şimdiye kadar bilinen en etkili tedavi steroidlerdir (77). Bundan dolayı çalışmamızda atorvastatinin etkinliğini değerlendirmek ve karşılaştırmak amacıyla bir grubumuza astım modeli oluşturularak steroid tedavisi verildi. Steroid verilen grup ile plasebo grubunu karşılaştırdığımızda bakılan tüm histolojik parametrelerde anlamlı olarak azalma saptandı. Bu şekilde astım bulguları üzerine steroidin etkinliği tekrar ortaya konuldu.

Atorvastatin verdiğimiz grup ile steroid grubu karşılaştırıldığında ise yine bakılan tüm histolojik parametrelerin düzeltilmesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Bu da atorvastatinin steroide yakın antienflamatuvar etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

Hava yolu yeniden yapılanmasında hava yolu tonusunu belirleyen en önemli etkenlerden birisi de havayolu düz kası olarak bilinmektedir. Astımlılarda hava yolundaki düz kas hücrelerinde hem sayıca artma hem de hacimce artma meydana gelmektedir. Migratuvar özelliği olan bu hücrelerden kemokin, sitokin aynı zamanda ekstrasellüler matriks salgılanması olmaktadır (80). Simcock ve arkadaşları vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ile düz kas ilişkisini incelemişler ve düz kas yeniden yapılanmasında rol aldıklarını göstermişlerdir (81). VEGF aynı zamanda yeniden yapılanan hava yolunda damar genişliğinde artışa ve yeni damar gelişimini sağlayarak etkili olmaktadır. Koumondouros ve arkadaşları mikroçevre ile hava yolu ilişkisini koyunlarda incelemiş ve sürekli ev tozu akarlarına maruz kalan hayvanlarda düz kas hipertrofisi ve vaskülarizasyonda artış saptamışlardır. Bu değişimin öncelikle alt ve orta seviyedeki hava yollarında gözlenmiş olması olgularda meydana gelen küçük hava yolu hastalığı ile ilişkilendirilmiş. Astımlı olguların hava yolundan alınan sekresyonlarda kontrol gruba göre daha fazla VEGF ve anjiogenin saptanmış ve artmış vasküler alanın hava yolu hastalığı ciddiyeti, hava yolu obstrüksiyonun derecesi ve hava yolu kalibrasyonunda artışa yol açtığı ileri sürülmüştür (82). Daha güncel olarak Sziksz ve arkadaşlarının yapmış olduğu hayvan çalışmasında allerjen maruziyetinin akciğer immün hücrelerinden salgılanan VEGF miktarında artışa neden olduğu ve bunun genetik yapıdan bağımsız bir mekanizma ile gerçekleştiği gösterilmiştir (83). VEGF salınımının sadece endotelial kaynaklı olmadığını, eosinofil, makrofaj ve mast hücrelerinden de VEGF salgısı olabileceği gösterilmiştir. Fadini ve arkadaşlarının statinlerin antiinflamatuvar etki mekanizmasını incelemek için yapmış oldukları hayvan çalışmasında rosuvastatin verilmiş farelerde endotelial progenitör hücreler (EPC) incelenmiştir. Vasküloproliferatif ve

rejenarasyonu düzenleme etkisi olan hücrelerin statin alan grupta ürettikleri inflamatuvar molekül düzeyinde azalma ve EPC hücrelerin vasküloproliferatif özelliklerinde baskılanmaya yol açtığı izlenmiştir (84). Statinler ile yapılan deneysel modellerde simvastatin ile yapılmış iki güncel çalışmada da özellikle hava yolundaki yeniden yapılanma üzerine etkilerden bahsetmektedir. Shaafsma ve ekibinin çalışmasında mevalonat kaskadı blokajı ile hava yolu yeniden yapılanmasında meydana gelen değişiklikleri incelemek için astım modeli oluşturulmuş farelere simvastatin verilerek hava yolu dokusu incelenmiştir. Hava yolunda meydana gelen fibroproliferatif dengenin ekstrasellüler matriks depolanmasında artış ile sonuçlanması hipotezinden yola çıkılarak bu değişimi tetikleyen tümör growth faktör-beta1 (TGF- β 1)'i salınımını etkileyen TNF-alfa ve IL-1 seviyelerinde simvastatin ile anlamlı düşme olduğu gözlenmiştir. Bu etki simvastatinin hücre içi posttranslasyonel sinyal molekül blokajı ile RhoA 'yı bloke etmesine bağlanmıştır (85). Bizim çalışmamızda histolojik olarak subepitelyal kas kalınlığı ölçülmüş ve atorvastatin verilen grupta plasebo grubuna göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır. Bu sonuç her ne kadar sitokin düzeyinde tarafımızca değerlendirilmemiş olsada atorvastatinin düz kas hücre hiperplazisini engelleme üzerine etkilerini indirekt olarak göstermektedir.

Astımda histolojik değişiklikler dışında hava yollarında kronik bir inflamasyon süreci yaşanmaktadır. İnflamasyonun tetiklenmesinde ve sürecin devamında bugüne kadar tanımlanan sitokinlerden en öne çıkanları IL-4, IL-5, IL-13 olmakla beraber son zamanlarda TNF-alfa ile yapılan çalışmalar daha çarpıcı sonuçlar göstermiştir. TNF-alfa özellikle nötrofil ve eosinofil aktivasyonunda rol oynamakta ve eosinofillerin sitotoksik etkilerini artırmaktadır, yine düz kas hücrelerinde kasılma kuvvetini artırdığına yönelik çalışmalar mevcuttur (86). Howarth ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada astım ataklarında BAL'da TNF-alfa miktarında artış gösterilmiştir (87). Berry ve Erin'in kendi grupları ile yaptığı çalışmalarda ise refrakter astım ve normal astımlı olgularda TNF-alfa blokajı ile solunum fonksiyon testi ve semptom skorunda düzelme gösterilmiştir (88). Har Seong Nam ve ekibinin hayvan çalışmalarında TNF-alfanın biyolojik etkileşimi incelenmiş ve TNF-alfa blokajı ile IL-4, IL-5, IL-6'da baskılanma saptanmıştır. Camara ve Gabari'nin insan bronş epitelinde yapmış olduğu çalışmada epitelyal dönüşümü tetikleyen en önemli ajanın TNF-alfa ve IL-1 olduğu gösterilmiştir (89). Statinlerin antiinflamatuvar etkileri hücresel düzeyde de birçok alanda çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (90).

Yapılan yayınlarda statinlerin makrofaj ve endotel gibi antijen sunan hücrelerde LFA-1 ve MHCII baskılanması yaparak lökositlerin ekstrasvazasyonunun engellenmesi, NK aktivitesinde baskılanma ve TNF-alfa, IL-6 ve IL-1 seviyelerinde düşme sağladığı gösterilmiştir (91). Shyu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada hücre kültürlerinde atorvastatinin etkisi incelenmiş ve atorvastatinin makrofajlardan salgılanan TNF-alfa seviyelerinde düşmeye yol açtığı gösterilmiştir (92). Benzer bir çalışmanın daha günceli Awad ve Sharif tarafından yapılmış rosuvastatinin immünmodülatuar etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada iskemik reperfüzyon hasarı geliştirilmiş fare modelinde başta iskemik hepatit olmak üzere kalp, akciğer ve böbrek dokuları incelenmiş ve reperfüzyon hasarı ile beraber rosuvastatin alan fare grubunda TNF-alfa, IL-6, monosit kemoataktan protein-1 (MCP-1) düzeylerinde azalma saptanırken antiinflamatuvar özellikleri bulunan IL-10 seviyelerinde artış gösterilmiştir (93).

Statinlerin plazma kolesterol düzeyini düşürmenin yanında anti inflamatuvar etkileri vardır. Özellikle IL-4 ve IL-5 gibi sitokinler inflamasyonda çok önemli rolleri bulunmaktadır. Kim ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada ovalbumin ile indüklenmiş farelerde simvastatinin akciğer dokularında IL-4 ve IL-5 sentezini engellemiştir. Statinlerin aynı zamanda ovaalbumin spesifik IgE seviyelerini de düşürdüğü saptanmıştır (104). McKey ve ark. yaptıkları başka bir çalışmada ovalbumin ile duyarlaştırılmış ve intraperitoneal simvastatin ile tedavi edilmiş fare modelinde torasik lenf nodu kültürlerinde IL-4 ve IL-5 sekresyonlarının azaldığı gösterilmiştir. Aynı zamanda BAL'da da IL-4 ve IL-5 seviyelerinde azalma saptanmıştır. Astımda artmasıyla havayolu inflamasyonuna neden olan IFN- δ üretiminde lenf nodu kültürlerinde azaldığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada simvastatin tedavisinin BAL'da eozinofil ve makrofaj seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. İnflamatuvar hücrelerin havayoluna göçü spesifik adhezyon molekülleri ve kemokinlerle olmaktadır. Eosinofiller ve makrofajlar LFA -1 salgılamaktadırlar ve simvastatinin bu yolak üzerinden etkisinin olduğu gösterilmiştir (105).

Amir ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada ise ovalbumin ile duyarlanmış BALB/c farelerde simvastatinin havayolu inflamasyonunu azaltmadaki rolünün büyük ölçüde mevalonata bağlı olduğunu gösterilmiştir. Aynı zamanda simvastatinin Th2 ve TNF-alfa seviyelerini BAL sıvısında azalttığıda gösterilmiştir. Simvastatinin önemli ölçüde akciğer dokusunda IL-4, IL-13

ve TNF- α seviyelerini azalttığı saptanmıştır. Yine aynı çalışmada simvastatinin insan bronşial düz kas hücre proliferasyonunu azalttığı ve akciğer kompliansını arttırdığı saptanmıştır (106)

Amir ve arkadaşlarının daha sonra yaptığı başka bir çalışmada ise simvastatinin goblet hücre hiperplazisi, Arg1 gibi profibrojenik mediatörlere etkileri araştırılmıştır. Simvastatinin akciğer lavajında IL-4 ve IL-13 artışıyla korelasyon gösteren Arg1 protein ekspresyonunu ve total arginaz enzim aktivitesini baskıladığı belirtilmiştir. Simvastatinin goblet hücre hiperplazisini azalttığı ve bunu IL-13 aracılığıyla yaptığı yine bu çalışmada gösterilmiştir (107).

IL-17 insan bronşial fibroblastlarında ve insan havayolu düz kas hücrelerinde sitokin-kemokin üretimini dolayısıyla havayollarında alerjik reaksiyonları arttırmaktadır. Imamura ve arkadaşları ovalbumin ile sensitize edilmiş BALB/c farelerine intraperitoneal pravastatin tedavisi uygulamışlar ve pravastatinin IL-17 üretimini azaltarak OVA antijenine duyarlılığı baskıladığını göstermişlerdir. Sistemik immunizasyon sırasında uygulanan pravastatin IL-17 üretiminin baskılanması ile OVA ile uyarılan Th-2 tip cevabı baskıladığı buna ek olarak OVA ile havayolu challenge uygulanan grupta eosinofilik havayolu inflamasyonunu IL-17 yi azaltarak yaptığını ve akciğerde antijen sunan CD11 hücrelerini azalttığı belirtmişlerdir. Bu çalışmada statinlerin serumda IgE üretimini ve torasik lenf nodundaki immunsitlerde sitokin üretimini azalttığı da gösterilmiştir. Böylece statinlerin bu sitokini baskılayarak bronşial astımlı hastalarda devam eden havayolu inflamasyonunu baskıladığı saptanmıştır (108).

Bizim çalışmamızda atorvastatin ve salin verilen fare grubunun akciğer dokusundan bakılan IL-4, IL-5 düzeyleri karşılaştırıldığında atorvastatin verilen grupta anlamlı olarak düşük saptandı ($p<0.05$). Yine Amir ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmaya benzer şekilde goblet hiperplazisinde azalma saptandı. Elde ettiğimiz bu sonuç literatür bilgilerini desteklemekte idi.

Atorvastatinin astım patogenezinde önemli rol oynayan mast hücre degranulasyonu üzerine de etkileri bulunmaktadır. Astımda mast hücreleri immunolojik ve non immunolojik olarak degranüle olmakta, daha önceden sentez edilmiş histamin, triptaz, kimaz, kininogenaz, heparin ve yeni sentez edilen PGD₂, LTC₄, LTD₄, LTE₄ ve PAF gibi enflamatuvar mediyatörler açığa çıkmakta ve astım bulguları gelişmektedir. Yapılan bir çalışmada atorvastatinin, hem immunolojik hem de non immunolojik stimuluslarla oluşan mast hücre degranülasyonunu

engellediği gösterilmiştir (94). Ayrıca atorvastatin yine geç faz alerjik reaksiyonda ve astım patogenezinde önemli role sahip olan eozinofiller üzerine de etkili olduğu ve alerjen uyarımı sonrasında BAL'da eozinofil toplanmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (95). Bizim çalışmamızda atorvastatin verilen grup ile plasebo grubu histolojik olarak karşılaştırıldığında atorvastatin verilen grupta mast hücre sayısında belirgin azalma olduğu gösterildi ($p=0.000$).

Ayrıca atorvastatin astım patogenezinde rol alan başka mediyatörler üzerine de etkilidir. Platelet aktive edici faktör (PAF) bunlardan bir tanesi olup atorvastatinin PAF antagonisti etkisi de mevcuttur (96). PAF, astım ve diğer alerjik hastalıkların patogenezinde görevli fosfolipid yapısında proinflamatuvar bir mediyatördür. Eozinofiller, mast hücreleri, bazofiller, endotel hücreleri, nötrofiller, monositler ve makrofajlar tarafından fosfolipaz A2 ve asetiltransferazın bir metabolik ürünü olarak üretilen PAF, aktive mast hücreleri ve bazofillerden histamin salınımını uyarmaktadır. Hem hayvan hem de insan çalışmalarında PAF uygulamasının astımda olduğu gibi bronkokonstrüksiyona, bronşiyal hiperreaktiviteye, enflamatuvar hücre infiltrasyonuna, mukus sekresyonuna, gaz değişiminde bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir (97,98). Astımlı hastalarda PAF reseptörlerinin arttığı, özellikle astım atağı sırasında kanda PAF düzeylerinde yükselme olduğu görülmüştür (99,100). Tüm bunların sonucunda PAF, havayolu hiperreaktivitesinden ve havayollarında hem allerjik hem de non allerjik inflamasyonun devamından sorumlu olduğu düşünülen önemli bir mediyatördür. Astımda önemli rolü olan bu mediyatörün antagonize edilmesinin astım tedavisinde yeri ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Potent, spesifik, oral olarak aktif bir PAF reseptör antagonisti olan Y-24180'nin hayvanlarda ve astımlı hastalarda kullanıldığında bronşiyal hiperreaktiviteyi azalttığı gösterilmiştir (101). Başka bir PAF antagonisti olan WEB2086'ın PAF ile oluşturulan bronkokonstrüksiyonu düzelttiği saptanmıştır (102). Başka bir PAF antagonisti olan SR 27417A'ın akut astım atağında kullanıldığı bir çalışmada, SR 27417A'ın FEV1, solunum yolu rezistansı, alveolar-arteiyel oksijen gradiyenti ve arteriyel oksijen basıncında herhangi bir düzelme yapmadığı gösterilmiştir (103). Atorvastatinin enflamasyonda mast hücre degranülasyonu, eozinofil toplanması, IL-5, IL-6, TNF- α , PAF vb. enflamasyon ve remodeling sürecinde yer alan pek çok olayı ve mediyatörü inhibe eden bir statindir. Bu nedenle sadece PAF antagonisti olan ilaçlardan farklı olarak astım tedavisinde daha etkili olabileceği düşünülmüştür.

Ayrıca erişkinlerde yapılan klinik çalışmalarda statinlerin astım üzerine etkilerinin oldukları gösterilmiştir. Cowan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada inhale steroid tedavisi alan astımlı hastaların simvastatin kullanımı ile semptomlarında düzelme ve inhale steroid ihtiyacında azalma etkisi incelenmiştir. Çalışmaya alınma kriteri olarak inhale steroid kullanmadan önce bakılan balgam eosinofilisi > %2 olan 51 hastaya kullanmakta oldukları fluticasone yanına 40 mg simvastatin eklenerek inhale steroid dozu kademeli olarak düşürülmüştür. Sonuçlara bakıldığında tedaviye statin eklenmesi ile beraber fluticasone dozunun azaltıldığı görülmüştür (109).

Bizim çalışmamızın bazı kısıtlılıkları mevcuttu. Örneğin; çalışma az sayıda hayvanı kapsamaktadır ve hayvan çalışmalarında tespit edilen olumlu sonuçların direk olarak insan çalışmalarına uyarlayabilmek mümkün olamamaktadır. Ayrıca; atorvastatin uygulamasının astımlı havayollarında mevcut histolojik değişiklikleri düzeltici etkisinin devamlı olup olmayacağını belirleyecek izlem dönemi de bu çalışma planı içerisine dahil edilmemiştir.

Sonuç olarak bu çalışma; atorvastatin uygulamasının kronik astım oluşturulan fare modelinde, havayollarının bazal membran kalınlığı, düz kas ve epitel kalınlığı, mast ve goblet hücre sayısı dahil olmak üzere değerlendirilmiş olan tüm histolojik değişiklikleri plaseboya oranla anlamlı olarak düzelttiğini göstermiştir. Atorvastatin ile deksametazon uygulamasının histolojik parametreler üzerine etkinliği karşılaştırıldığında ise, her iki tedavi şeklinin etkinliği arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu çalışmanın sonuçları, atorvastatin'in astımlı havayollarında kronik yapısal değişiklikleri düzeltici etkisini göstermiştir, ancak sonuçların insanlara uyarlanması ve atorvastatinin astımda tek başına veya ek tedavi seçeneği olarak kullanılabilmesi için yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

6.SONUÇLAR

1. Grup I (kontrol grubu) ve Grup II (plasebo grubu) karşılaştırıldığında; bazal membran kalınlığı ($p=0,000$), subepitelyal düz kas tabakası kalınlığı ($p=0.000$), epitel yüksekliği ($p=0.000$), goblet hücre sayısı ($p=0.000$) ve mast hücre sayısını ($p=0.000$) içeren tüm parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Bu sonuçlar astım modelinin çalışma grubundaki farelerde başarı ile oluşturulduğunu göstermiştir.

2. Plasebo grubu (Grup II) ile atorvastatin grubunun (Grup III) histolojik parametreleri karşılaştırıldığında atorvastatin grubunda (Grup III); bazal membran kalınlığı ($p=0.000$), subepitelyal düz kas tabakası kalınlığı ($p=0.000$), epitel yüksekliği ($p=0.010$), goblet hücre sayısı ($p=0.000$) ve mast hücre sayısının ($p=0.000$) anlamlı olarak azalmış olduğu gösterildi.

3. Deksametazon grubu (Grup IV) ile plasebo grubunun (Grup II) histolojik parametreleri karşılaştırıldığında deksametazon grubunda (Grup IV); bazal membran kalınlığı ($p=0.000$), subepitelyal düz kas tabakası kalınlığı ($p=0.000$), epitel yüksekliği ($p=0.010$), goblet hücre sayısı ($p=0.000$) ve mast hücre sayısının ($p=0.000$) anlamlı olarak azalmış olduğu gösterildi.

4. Atorvastatin grubu (Grup III) ile deksametazon grubunun (Grup IV) histolojik verileri karşılaştırıldığında ise iki grup arasında bazal membran ($p=0.513$), düz kas kalınlığı ($p=0,053$), epitel kalınlığı ($p=0.450$), mast hücre sayısı ($p=0.801$), goblet hücre sayısı ($p=0.477$) açısından anlamlı farklılık saptanmadığı görüldü.

5. Atorvastatin grubu (Grup III) ile plasebo grubunun (Grup II) sitokin düzeyleri karşılaştırıldığında; atorvastatin grubunda IL-4 ($p=0.000$) ve IL-5 ($p=0.000$) düzeyleri anlamlı olarak düşük saptandı.

6. Atorvastatin grubu (Grup III) ile deksametazon grubunun (Grup IV) sitokin düzeyleri karşılaştırıldığında ise iki grup arasında IL-4 ($p=0.380$) ve IL-5 ($p=0720$) düzeyleri açısından anlamlı farklılık saptanmadığı görüldü.

7. Bu çalışmanın sonuçları atorvastatinin astımlı havayollarında kronik değişiklikler ve yeniden yapılanma üzerine iyileştirici etkileri olduğunu göstermiştir. Ancak atorvastatinin akciğerde inflamasyon ve yeniden yapılanma üzerine etkilerini değerlendirecek uzun süreli, ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR:

1. National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. Available at: <http://www.ginasthma.org>. Updated December 2008.
2. Guilbert T, Krawiec M. Natural history of asthma. *Pediatr Clin N Am* 2003;50:523-38.
3. Beasley R, Ellwood P. International patterns of the prevalence of pediatric asthma. The ISAAC program *Pediatr Clin N Am* 2003; 50: 539-53.
4. Saraclar Y, Kuyucu S, Tuncer A, et al. Prevalence of asthmatic phenotypes and bronchial hyperresponsiveness in Turkish schoolchildren: an International Study of Asthma and Allergies in Childhood Study (ISAAC) phase 2 study. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003;91:477-84.
5. Demir AU, Karakaya G, Bozkurt B et al. Asthma and allergic diseases in schoolchildren: third cross-sectional survey in the same primary school in Ankara, Turkey. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15:531-8.
6. Karaman O, Türkmen M, Uzuner N. Allergic disease prevalence in Izmir. *Allergy*. 1997;52:689-90.
7. Karaman O, Turgut CS, Uzuner N et al. The determination of asthma, rhinitis, eczema, and atopy prevalence in 9- to 11-year-old children in the city of Izmir. *Allergy Asthma Proc*. 2006;27:319-24.
8. Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001;344:350-62.
9. Wiesch DG, Meyers DA, Bleecker ER. Genetics of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:895-901.
10. Israel E, Chinchilli VM, Ford JG et al; National Heart, Lung, and Blood Institute's Asthma Clinical Research Network. Use of regularly scheduled albuterol treatment in asthma: genotype-stratified, randomised, placebo-controlled cross-over trial. *Lancet* 2004;364:1505-12.
11. Ito K, Chung KF, Adcock IM. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:522-43.
12. Gissler M, Jarvelin MR, Louhiala P et al. Boys have more health problems in childhood than girls: follow-up of the 1987 Finnish birth cohort. *Acta Paediatr* 1999;88:310-4.

13. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM et al. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med* 1995;332:133-8.
14. Beuther DA, Weiss ST, Sutherland ER. Obesity and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:112-9.
15. Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ. Measles and atopy in Guinea- Bissau. *Lancet* 1996;347:1792-6.
16. Zambrano JC, Carper HT, Rakes GP et al. Experimental rhinovirus challenges in adults with mild asthma: response to infection in relation to IgE. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:1008-16.
17. Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S et al. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997;275:77-9.
18. Cooper PJ. Interactions between helminth parasites and allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009;9:29-37
19. Gauderman WJ, Avol E, Gilliland F et al. The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. *N Engl J Med* 2004;351:1057-67.
20. Chaudhuri R, Livingston E, McMahon AD et al. Cigarette smoking impairs the therapeutic response to oral corticosteroids in chronic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:1308-11.
21. Lannerö E, Wickman M, Pershagen G et al. Maternal smoking during pregnancy increases the risk of recurrent wheezing during the first years of life (BAMSE). *Respir Res.* 2006;7:3.
22. Friedman NJ, Zeiger RS. The role of breast-feeding in the development of allergies and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1238-48.
23. Devereux G, Seaton A. Diet as a risk factor for atopy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1109-17.
24. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol* 2004;22:789-815.
25. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA et al. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 2005;23:749-86.

26. Robinson DS. The role of the mast cell in asthma: induction of airway hyperresponsiveness by interaction with smooth muscle? *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:58-65.
27. Okayama Y, Ra C, Saito H. Role of mast cells in airway remodeling. *Curr Opin Immunol* 2007;19:687-93.
28. Kay AB, Phipps S, Robinson DS. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. *Trends Immunol* 2004;25:477-82.
29. Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:450-63.
30. Kuipers H, Lambrecht BN. The interplay of dendritic cells, Th2 cells and regulatory T cells in asthma. *Curr Opin Immunol* 2004;16:702-8.
31. Peters-Golden M. The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31:3-7.
32. Wenzel S. Mechanisms of severe asthma. *Clin Exp Allergy* 2003;33:1622-8.
33. Miller AL, Lukacs NW. Chemokine receptors: understanding their role in asthmatic disease. *Immunol Allergy Clin North Am* 2004;24:667-83.
34. Leff AR. Regulation of leukotrienes in the management of asthma: biology and clinical therapy. *Annu Rev Med* 2001;52:1-14.
35. Barnes PJ. Cytokine modulators as novel therapies for asthma. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:81-98.
36. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004;84:731-65.
37. Smith AD, Taylor DR. Is exhaled nitric oxide measurement a useful clinical test in asthma? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:49-56.
38. Tagaya E, Tamaoki J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. *Allergol Int* 2007;56:331-40.
39. Roche WR, Beasley R, Williams JH et al. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1989; 1:520-4.
40. Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R et al. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;3:507-11.

41. Kuperman DA, Huang X, Koth LL et al. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat Med* 2002;8:885-9.
42. Hirst SJ, Martin JG, Bonacci JV et al. Proliferative aspects of airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:2-17.
43. Ebina M, Takahashi T, Chiba T et al. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:720-6
44. Akers IA, Parsons M, Hill MR et al. Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease- activated receptor-2. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* 2000;278:193-201.
45. Wang L, McParland BE, Paré PD. The functional consequences of structural changes in the airways: Implications for airway hyperresponsiveness in asthma. *Chest* 2003; 123:356-62.
46. Joos GF. The role of neuroeffector mechanisms in the pathogenesis of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2001;1:134-143.
47. Martinez FD. Recognizing early asthma. *Allergy* 1999;54:24-8.
48. Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. American Thoracic Society. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:1202-18.
49. O'Byrne P. Bronchial challenges by pharmacologic agents. In: Clark TJH, Godfrey S, Lee TH, Thomson NC, eds. *Asthma*, 4th edition. London: Arnold; 2000:92-103.
50. Adelroth E, Morris M, Hargreave FE et al. Airway responsiveness to leukotrienes C4 and D4 and to methacholine in patients with asthma and normal controls. *N Engl J Med* 1986;315:480-4.
51. Holgate ST, Bradding P, Sampson AP. Leukotriene antagonists and synthesis inhibitors: new directions in asthma therapy. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:1-13.
52. Greening AP, Ind PW, Northfield M et al. Added salmeterol versus higher-dose corticosteroid in asthma patients with symptoms on existing inhaled corticosteroid. Allen & Hanburys Limited UK Study Group. *Lancet* 1994;344:219-24
53. Weinberger M, Hendeles L. Theophylline in asthma. *N Engl J Med* 1996;334:1380-94

54. Busse W, Corren J, Lanier BQ, McAlary M, et al. Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:184-90.
55. Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;(4):CD001186.
56. Corsini, A., F.M. Maggi, and A.L. Catapano, Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase. *Pharmacol Res*, 1995;31: 9-27.
57. Zhang, F.L. and P.J. Casey, Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem*, 1996;65:241-69.
58. Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* 2004; 15:109:39-43.
59. Başkurt M, Ökçün B, Ersanlı M. Pleiotropic effects of statins. *J Int Med Sci* 2006;2:66-72.
60. Kwak, B. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med*, 2000; 6:1399-402.
61. Springer, T.A, Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 1994;76:301-14.
62. Diomedede L, Albani D, Sottocorno M et al., In vivo anti-inflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001; 21: 1327-32.
63. Kimura M, Kurose I, Russell J et al., Effects of fluvastatin on leukocyte-endothelial cell adhesion in hypercholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997;17: 1521-6.
64. Stalker TJ, Lefer AM, Scalia R. A new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, exerts anti-inflammatory effects on the microvascular endothelium: the role of mevalonic acid. *Br J Pharmacol*, 2001;133: 406-12.
65. Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M et al., Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001;21:15-21.
66. Landmesser U, Bahlmann F, Mueller M et al., Simvastatin versus ezetimibe: pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans. *Circulation*, 2005;111:2356-63.

67. Laufs U, La Fata V, Plutzky J et al. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*, 1998;97:1129-35.
68. Laufs U, Liao JK Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem*, 1998;273:24266-71
69. Plenz GA, Hofnagel O, Robenek H. Differential modulation of caveolin-1 expression in cells of the vasculature by statins. *Circulation*, 2004;109: 7-8.
70. Chen Z, Fukutomi T, Zago AC et al., Simvastatin reduces neointimal thickening in low-density lipoprotein receptor-deficient mice after experimental angioplasty without changing plasma lipids. *Circulation*, 2002;106:20-3.
71. Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A et al. Atorvastatin: safety and tolerability. *Expert Opin Drug Saf*. 2010;9:667-74.
72. Van Leuven SI, Kastelein JJ. Atorvastatin. *Expert Opin Pharmacother*. 2005;6:1191-203.
73. Temelkovski J, Hogan SP, Shepherd DP, et al. An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. *Thorax* 1998;53:849-56.
74. Firinci F, Karaman M, Baran Y et al. Mesenchymal stem cells ameliorate the histopathological changes in a murine model of chronic asthma. *Int Immunopharmacol*. 2011;11:1120-6.
75. Hansel TT, Barnes PJ. Novel drugs for treating asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2001;1:164-73.
76. James A. Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2005;11:1-6.
77. Juniper EF, Kline PA, Vanzielegheem MA et al. Effect of long-term treatment with an inhaled corticosteroid (budesonide) on airway hyperresponsiveness and clinical asthma in nonsteroid-dependent asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:832-6.
78. Boulet LP. Perception of the role and potential side effects of inhaled corticosteroids among asthmatic patient. *Chest* 1998;113:578-92.
79. Chan PW, DeBruyne JA. Parental concern towards the use of inhaled therapy in children with chronic asthma. *Pediatr Int* 2000;42:547-51.
80. Panettieri RA Jr. Airway smooth muscle: an immunomodulatory cell. *J Allergy Clin Immunol*, 2002;110:269-74.

81. Simcock DE, Kanabar V, Clarke GW et al., Induction of angiogenesis by airway smooth muscle from patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008;178:460-8.
82. Koumoundouros E, Bischof RJ, Meeusen EN et al., Chronic airway disease: deteriorating pulmonary function in sheep associated with repeated challenges of house dust mite. *Exp Lung Res*, 2006;32:321-30
83. Sziksz E, Tibor Kozma G, Komlósi ZI et al., Increased synthesis of vascular endothelial growth factor in allergic airway inflammation in histidine decarboxylase knockout (HDC(-/-)) mice. *Exp Lung Res*, 2010;36:420-30.
84. Fadini GP, Albiero M, Boscaro E et al., Rosuvastatin stimulates clonogenic potential and anti-inflammatory properties of endothelial progenitor cells. *Cell Biol Int*, 2010;34:709-15.
85. Schaafsma D, Dueck G, Ghavami S et al., The Mevalonate Cascade as a Target to Suppress Extracellular Matrix Synthesis by Human Airway Smooth Muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011;44:394-403
86. Pennings HJ, Kramer K, Bast A et al., Tumour necrosis factor- α induces hyperreactivity in tracheal smooth muscle of the guinea-pig in vitro. *Eur Respir J*, 1998;12:45-9.
87. Howarth PH, Babu KS, Arshad HS et al., Tumour necrosis factor (TNF α) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. *Thorax*, 2005;60:1012-8.
88. Berry MA, Hargadon B, Shelley M et al., Evidence of a role of tumor necrosis factor α in refractory asthma. *N Engl J Med*, 2006;354:697-708.
89. Câmara J, Jarai G. Epithelial-mesenchymal transition in primary human bronchial epithelial cells is Smad-dependent and enhanced by fibronectin and TNF- α . *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2010;3:2.
90. Simes J, Furberg CD, Braunwald E et al., Effects of pravastatin on mortality in patients with and without coronary heart disease across a broad range of cholesterol levels. The Prospective Pravastatin Pooling project. *Eur Heart J*, 2002;23:207-15.
91. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S et al., Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med*, 2000;6:1399-402.

92. Shyu KG, Chua SK, Wang BW et al., Mechanism of inhibitory effect of atorvastatin on resistin expression induced by tumor necrosis factor- α in macrophages. *J Biomed Sci*, 2009;27;16:50.
93. Awad AS, El Sharif A. Immunomodulatory effects of rosuvastatin on hepatic ischemia/reperfusion induced injury. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2010;32: 555-61.
94. Egesi A, Sun G, Khachemoune A et al. Statins in skin: research and rediscovery, from psoriasis to sclerosis. *J Drugs Dermatol*. 2010;9:921-7.
95. Queralt M, Brazis P, Merlos M et al. In vitro inhibitory effect of rupatadine on histamine and TNF- α release from dispersed canine skin mast cells and the human mast cell line HMC-1. *Inflamm Res* 2000;49:355-60.
96. Tsantila N, Tsoupras AB, Fragopoulou E et al. In vitro and in vivo effects of statins on platelet-activating factor and its metabolism. *Angiology*. 2011;62:209-18.
97. Lin CC, Lin CY. Bronchoconstriction and eosinophil recruitment in guinea pig lungs after platelet activating factor administration. *J Asthma* 1997;34:153-60
98. Cuss FM, Dixon CM, Barnes PJ. Effects of inhaled platelet activating factor on pulmonary function and bronchial responsiveness in man. *Lancet* 1986;26:189-92.
99. Kishimoto S, Shimadzu W, Izumi T et al. Comparison of platelet-activating factor receptor mRNA levels in peripheral blood eosinophils from normal subjects and atopic asthmatic patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997;114:60-3.
100. Chan-Yeung M, Lam S, Chan H et al. The release of platelet-activating factor into plasma during allergen induced bronchoconstriction. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87:667-73
101. Hozawa S, Haruta Y, Ishioka S et al. Effects of a PAF antagonist, Y-24180, on bronchial hyperresponsiveness in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1198-1202.
102. Adamus W, Heuer SHO, Meade CJ et al. Inhibitory effects of the new PAF acether antagonist WEB-2086 on pharmacologic changes induced by PAF inhalation in human beings. *Clin Pharmacol Ther* 1990;47:456-62.

103. Gomez FP, Marrades RM, Iglesia R et al. Gas Exchange response to a PAF receptor antagonist, SR 27417A, in acute asthma: a pilot study. *Eur Respir J* 1999; 14: 622-6.
104. Kim DY, Ryu SY, Lim JE et al. Anti-inflammatory mechanism of simvastatin in mouse allergic asthma model. *Eur J Pharmacol.* 2007;14:76-86
105. McKay A, Leung BP, McInnes IB et al. A novel anti-inflammatory role of simvastatin in a murine model of allergic asthma. *J Immunol.* 2004;172:2903-8
106. Zeki AA, Franzi L, Last J et al. Simvastatin inhibits airway hyperreactivity: implications for the mevalonate pathway and beyond. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;15:731-40
107. Zeki AA, Bratt JM, Rabowsky M et al. Simvastatin inhibits goblet cell hyperplasia and lung arginase in a mouse model of allergic asthma: a novel treatment for airway remodeling? *Transl Res.* 2010;156:335-49.
108. Imamura M, Okunishi K, Ohtsu H et al. Pravastatin attenuates allergic airway inflammation by suppressing antigen sensitisation, interleukin 17 production and antigen presentation in the lung. *Thorax.* 2009;64:44-9.
109. Cowan DC, Cowan JO, Palmay R et al. Simvastatin in the treatment of asthma: lack of steroid-sparing effect. *Thorax*, 2010;65:891-6.