

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**ASTIM PATOGENEZİNDE HAVA YOLU
HİPERREAKTİVİTESİ VE İNFLAMATUVAR YANIT
OLUŞUMUNDA aP2'NİN ROLÜ**

NURDAN DAĞTEKİN

**DANIŞMAN
DR.ÖĞR.ÜYESİ DENİZ KALELİ DURMAN**

**İKİNCİ DANIŞMAN
PROF.DR.GÖKHAN S. HOTAMIŞLIGİL**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



BEYAN

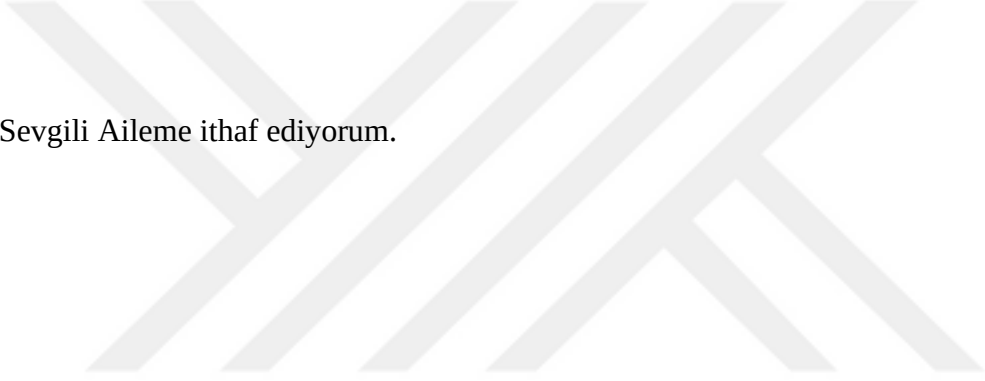
Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Nurdan DAĞTEKİN

İTHAF

Sevgili Aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilimsel ve mesleki tecrübelerinden yararlandığım ve manevi desteğini her koşulda hissettiren değerli hocam, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. Sönmez UYDEŞ DOĞAN'a

Bilimsel tecrübeleri ve tavsiyeleri ile doktora eğitimim boyunca bana destek olan, beni her konuda ilgi ve sabırla dinleyen, değerli danışman hocam Sayın Dr.Öğr. Üyesi Deniz KALELİ DURMAN'a

Araştırma laboratuvarında bana çalışma fırsatı sunan, alanında uzman araştırmacılar ve yeni geliştirilmiş tekniklerle çalışma imkânı sağlayan ve araştırmanın her aşamasında yön vermiş olan, Harvard T.H. Chan Kamu Sağlığı Okulu, Genetik ve Kompleks Hastalıklar Departmanı kurucu başkanı ve Sabri Ülker Metabolik Araştırma Merkezi/Hotamışlıgil Laboratuvarı Direktörü Sayın Prof. Dr. Gökhan S. HOTAMIŞLIGİL'e

Bilgisi, deneyimi ve tavsiyeleri ile doktora tez çalışmamın her aşamasında bana anlayış ve hoşgörüsü ile destek olan ve bilimsel gelişimime çok büyük katkılar sağlayan kıymetli hocam, Sayın Dr.Gürol TUNÇMAN'a

Araştırma boyunca vermiş oldukları bilimsel ve manevi destek için başta Dr. Furkan BURAK olmak üzere, tüm Hotamışlıgil Laboratuvarı çalışanlarına,

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren değerli hocalarım, Anabilim Dalımız Öğretim Üyeleri Prof. Dr.Alper OKYAR, Prof.Dr.Gökçe TOPAL TANYILMAZ, Doç.Dr. F.İlkay ALP YILDIRIM, Doç.Dr.Nihan ÇARÇAK YILMAZ'a, Dr.Öğr.Üyesi Zeliha PALA KARA'ya

Her türlü destekleri ile her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Dr.Öğr.Üyesi. Narin ÖZTÜRK, Dr.Öğr.Üyesi.Gülsev ÖZEN, Dr.Öğr.Üye.İmren ESENTÜRK, Dr.Öğr.Üyesi Ecz.Dilek ÖZTÜRK, Dr.Öğr.Üyesi Ecz.Ayça TOPRAK, Dr.Öğr.Üyesi Ecz.Merve KABASAKAL, Ar.Gör. Erkan CİVELEK, Ar.Gör. Zeynep Çelik, Ecz.Kübra AKYEL, Anabilim Dalında bu süreçte tanıma fırsatı bulduğum yüksek lisans ve doktora öğrencilerine,

Doktora eğitimim boyunca beni "2211-A Genel Yurt İçi Doktora Bursu" ve tez araştırmam boyunca, "2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu" ile destekleyen TÜBİTAK'a

Son olarak, yaşamımın her dönemindeki destekleri, ilgi, sabır ve anlayışları için Sevgili Aileme,

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

Bu çalışma Harvard Üniversitesi Halk Sağlığı Okulu Hotamışlıgil Laboratuvarı/Sabri Ülker Merkezi tarafından desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	Xİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XİV
ÖZET	XVİİ
ABSTRACT.....	XVİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Astım Tanımı ve Tarihçesi.....	4
2.2. Astım Epidemiyolojisi	4
2.3. Astım Risk Faktörleri.....	5
2.3.1. Genetik	5
2.3.2. Cinsiyet	6
2.3.3. Alerjenler	6
2.3.4. İnfeksiyonlar	8
2.3.5. Mesleksel Astım.....	8
2.4. Astım Patofizyolojisi	9
2.4.1. Hava Yolunda Daralma.....	12
2.4.2. Hava Yolu İnflamasyonu	13
2.4.2.1. Eozinofilik İnflamasyon.....	14
2.4.2.2. Nötrofilik İnflamasyon.....	18
2.4.2.3. Miks Granülositik Hava yolu İnflamasyonu	20
2.4.2.4. Paucigranülositik Astım	21
2.4.3. Hava Yolunda Yeniden Yapılanma	21
2.5. Astım Tedavisi	23
2.5.1. Astımda Farmakolojik Tedavi	23

2.5.2. Kortikosteroidler	24
2.5.3. Beta-2 (β 2) Adrenoreseptör Agonistleri	26
2.5.4. Antikolinergik İlaçlar	27
2.5.5. Lökotrien Reseptör Antagonistleri	28
2.5.6. Metilksantinler	29
2.5.7. Monoklonal Antikor Tedavileri	30
2.5.8. Astımda Non-Farmakolojik Girişimler	31
2.6. Deneysel Alerjik Astım Fare Modelleri	32
2.7. Yağ Asidi Bağlayıcı Proteinler	33
2.8. Adiposit Protein 2 (aP2) ve Ekspresyonu	35
2.9. aP2'nin Sekresyonu	37
2.10. aP2'nin Fonksiyonları ve Önemi	39
2.10.1. aP2 ile Protein-Protein Etkileşimleri	39
2.10.2. Dolaşımda aP2 Seviyesinin Metabolik ve Kardiyovasküler Hastalıklar ile İlişkisi	40
2.10.3. aP2'nin İmmünometabolik Hastalıklardaki Rolü	42
2.11. aP2'nin İnhibisyonu ve Nötralizasyonuna Dayalı Terapötik Yaklaşımlar	46
3. GEREÇ VE YÖNTEM	49
3.1. Materyal	49
3.1.1. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri	49
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	50
3.1.3. Kullanılan kitler	51
3.1.4. Kullanılan aletler	51
3.1.5. Kullanılan Yazılımlar	52
3.2. <i>İn vivo</i> Çalışmalar	53
3.2.1. Deney Hayvanlarının Genel Özellikleri	53
3.2.2. Deneysel Alerjik Astım Modellerinin Oluşturulması	54
3.2.2.1. Ovalbumin ile Alerjik Astım Geliştirilmesi	54
3.2.2.2. Ovalbumin ile İndüklenen Deneysel Alerjik Astım Modelinde Trakeostomi ve Kanülasyon İşlemi	55
3.2.2.3. Ovalbumin ile İndüklenen Deneysel Alerjik Astım Modelinde FlexiVent Sistemi ile Hava Yolları Reaktivitesinin Değerlendirilmesi	56
3.2.3. Ev Tozu Akarı (HDM) ile İndüklenen Alerjik Astım Modeli	57

3.2.3.1. Ev Tozu Akarı (HDM) ile Alerjik Astım Geliştirilmesi	57
3.2.3.2. Ev Tozu Akarı (HDM) ile İndüklenen Deneysel Alerjik Astım Modelinde Trakeostomi ve Kanülasyon İşlemi.....	57
3.2.3.3. Ev Tozu Akarı (HDM) ile İndüklenen Deneysel Alerjik Astım Modelinde FlexiVent Sistemi ile Hava Yolları Reaktivitesinin Değerlendirilmesi.....	58
3.3. <i>İn Vitro</i> Çalışmalar.....	59
3.3.1. Hücre Hatlarının Deneye Hazırlanması	59
3.3.1.1. İnsan Bronşiyal Epitel Hücresi, BEAS-2B'nin Deneye Hazır Hale Getirilmesi.....	60
3.3.1.2. Fare Akciğer Epitel Hücresi, MLE-12'nin Deneye Hazır Hale Getirilmesi	61
3.3.1.3. Fare Alveolar Makrofaj Hücresi, MH-S'nin Deneye Hazır Hale Getirilmesi	62
3.3.2. İnsan Bronşiyal Epitel Hücresi, BEAS-2B Üzerinde Deneyin Yapılışı	63
3.3.3. Fare Akciğer Epitel Hücresi, MLE-12 Üzerinde Deneyin Yapılışı-.....	64
3.3.4. Fare Alveolar Makrofaj Hücresi, MH-S Üzerinde Deneyin Yapılışı	65
3.3.5. Deneyin Sonlandırılması.....	66
3.3.6. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi.....	67
3.3.7. RT-QPCR Uygulaması	68
3.3.8. Hücre Kültür Ortamında aP2 ölçümü	71
3.3.9. Hücre Kültür Ortamında LDH ölçümü	72
3.3.10. İstatistiksel Analiz.....	73
4. BULGULAR.....	74
4.1. <i>İn Vivo</i> Çalışmalar.....	74
4.1.1. Ovalbumin ile Alerjik Astım Geliştirilen Gruplar	74
4.1.1.1. Ovalbumin ile Alerjik Astım Geliştirilen Gruplarda Hava Yolu Direncinin Değerlendirilmesi	74
4.1.2. Ev Tozu Akarı (HDM) ile Alerjik Astım Geliştirilen Gruplar	79
4.1.2.1. Ev Tozu Akarı (HDM) ile Alerjik Astım Geliştirilen Gruplarda Hava Yolu Dirençlerinin Değerlendirilmesi.....	79
4.2. <i>İn Vitro</i> Çalışmalar.....	81
4.2.1. İnsan Bronşiyal Epitel Hücresi, BEAS-2B Hücre Hattı Bulguları	81
4.2.2. Fare Akciğer Epitel Hücresi, MLE-12 Hücre Hattı Bulguları	86
4.2.3. Fare Alveolar Makrofaj Hücresi, MH-S Hücre Hattı Bulguları	87

4.2.4. Hücre Kültür Ortamında aP2 Protein Seviyeleri.....	90
4.2.5. Hücre Kültür Ortamında LDH Seviyeleri	91
5. TARTIŞMA	93
KAYNAKLAR	103
HAM VERİLER	145
FORMLAR	146
ETİK KURUL KARARI	147
PATENT HAKKI İZNİ	148
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	149
ÖZGEÇMİŞ	150



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: BEAS-2B Hücre Hattı için Kullanılan Hücre Kültür Besiyeri	60
Tablo 3-2: MLE-12 Hücre Hattı için Kullanılan Hücre Kültür Besiyeri.....	61
Tablo 3-3: MH-S Hücre Hattı için Kullanılan Hücre Kültür Besiyeri	62
Tablo 3-4: BEAS-2B hücrelerinde yapılan deneyde kullanılan ajanlar	63
Tablo 3-5: MLE-12 hücrelerinde yapılan deneyde kullanılan ajanlar.....	64
Tablo 3-6: MH-S hücrelerinde yapılan deneyde kullanılan ajanlar.....	65
Tablo 3-7: cDNA sentezinde kullanılan maddeler ve miktarları	67
Tablo 3-8: cDNA sentez reaksiyonu.....	68
Tablo 3-9: Referans ve Hedef Genlerin Primer Dizileri (BEAS-2B hücre hattı için)....	69
Tablo 3-10: Referans ve Hedef Genlerin Primer Dizileri (MLE-12 ve MH-S hücre hattı için).....	70
Tablo 3-11: Her bir PCR Mikroplak Kuyucuğunda Mevcut Karışım	70
Tablo 3-12: ELISA işlemi için kullanılan çözeltiler ve içerikleri	72

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Astım fenotiplerinin tanımlanmasında kullanılan özellikler- Agache ve ark. (2012)'den değiştirilerek.....	10
Şekil 2-2: Alerjik astım inflamatuvar kaskadının şematik görünümü -Holgate (2008)'den değiştirilerek.....	15
Şekil 2-3: Çevresel maruziyete bağlı epitel hücresinden sitokinlerin salınımı ve ILC2 hücrelerin indüksiyonu-Saglani ve Lloyd (2019)'dan değiştirilerek.....	17
Şekil 2-4: Kortikosteroidlerin hücresel etkileri-Barnes (2010)'dan değiştirilerek	25
Şekil 2-5: Adipositlerde FABP4 sekresyonunun regülasyonu-Prentice ve ark. (2019)'dan değiştirilerek.....	38
Şekil 2-6: Dolaşımdaki aP2 seviyelerinin ilişkilendirildiği çeşitli hastalıklar- Hotamisligil ve Bernlohr (2015)' dan değiştirilerek.....	41
Şekil 2-7: aP2'nin immünometabolik hastalıklardaki önemi ve bu hususta yapılan araştırmalarda üzerinde durulan stratejiler-Prentice ve ark. (2019)'dan değiştirilerek ..	47
Şekil 3-1: Ovalbumin ile alerjik astım modeli geliştirilmesi - Shum ve ark. 2006.	55
Şekil 3-2: Farenin boyun bölgesinde ventral diseksiyon- Hartney ve Robichaud (2013)'dan değiştirilerek.....	55
Şekil 3-3: HDM ile alerjik astım modeli geliştirilmesi-Oda ve ark.'dan (2019) değiştirilerek	57
Şekil 4-1: aP2f/f farelerde OVA ile indüklenen alerjik astım modelinde metakolin (MeCh)'in artan konsantrasyonları (0-3,125-12,5- 50 mg/ml) ile gerçekleştirilen bronkoprovokasyonda elde edilen R_N değerleri	75
Şekil 4-2: aP2f/f farelerde OVA ile indüklenen alerjik astım modelinde metakolin (MeCh)'in artan konsantrasyonları (0-3,125-12,5- 50 mg/ml) ile gerçekleştirilen bronkoprovokasyonda elde edilen R_{TS} değerleri	75
Şekil 4-3: aP2f/f farelerde OVA ile indüklenen alerjik astım modelinde metakolin (MeCh)'in artan konsantrasyonları (0-6,25-25-100 mg/ml) ile gerçekleştirilen bronkoprovokasyonda elde edilen R_N değerleri	76
Şekil 4-4: aP2f/f farelerde OVA ile indüklenen alerjik astım modelinde metakolin (MeCh)'in artan konsantrasyonları (0-6,25-25-100 mg/ml) ile gerçekleştirilen bronkoprovokasyonda elde edilen R_{TS} değerleri	77

Şekil 4-5: aP2f/f farelerde OVA ile indüklenen alerjik astım modelinde metakolin (MeCh)'in artan konsantrasyonları (0-6,25-25-100 mg/ml) ile gerçekleştirilen bronkoprovokasyonda elde edilen R_N değerleri	78
Şekil 4-6: aP2f/f farelerde OVA ile indüklenen alerjik astım modelinde metakolin (MeCh)'in artan konsantrasyonları (0-6,25-25-100 mg/ml) ile gerçekleştirilen bronkoprovokasyonda elde edilen R_{rs} değerleri	78
Şekil 4-7: aP2f/f farelerde HDM ile indüklenen alerjik astım modelinde metakolin (MeCh)'in artan konsantrasyonları (0-6,25-12,5- 25-50 mg/ml)ile gerçekleştirilen bronkoprovokasyonda elde edilen R_N değerleri	79
Şekil 4-8: aP2f/f farelerde HDM ile indüklenen alerjik astım modelinde metakolin (MeCh)'in artan konsantrasyonları (0-6,25-12,5- 25-50 mg/ml)ile gerçekleştirilen bronkoprovokasyonda elde edilen R_{rs} değerleri	80
Şekil 4-9: BEAS-2B hücre hattında CCL2 göreceli gen ekspresyon düzeyleri (n=3)....	81
Şekil 4-10: BEAS-2B hücre hattında IL-1 β göreceli gen ekspresyon düzeyleri(n=3) ...	82
Şekil 4-11: BEAS-2B hücre hattında IL-25 göreceli gen ekspresyon düzeyleri (n=3) ..	83
Şekil 4-12: BEAS-2B hücre hattında TSLP göreceli gen ekspresyon düzeyleri (n=3) ..	84
Şekil 4-13: BEAS-2B hücre hattında aP2 göreceli gen ekspresyon düzeyleri (n=3)	85
Şekil 4-14: MLE-12 hücre hattında Ccl2 göreceli gen ekspresyon düzeyleri (n=3)	86
Şekil 4-15: MH-S hücre hattında Ccl2 göreceli gen ekspresyon düzeyleri (n=3)	87
Şekil 4-16: MH-S hücre hattında IL-1 β göreceli gen ekspresyon düzeyleri (n=3).....	88
Şekil 4-17: MH-S hücre hattında aP2 göreceli gen ekspresyon düzeyleri (n=3).....	89
Şekil 4-18: MH-S hücre kültür ortamında aP2 seviyeleri.....	90
Şekil 4-19: BEAS-2B hücre kültür ortamında LDH seviyeleri	91
Şekil 4-20: MLE-12 hücre kültür ortamında LDH seviyeleri.....	92
Şekil 4-21: MH-S hücre kültür ortamında LDH seviyeleri	92

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- ABCA1:** ATP bağlayıcı kaset A1
- aP2:** Adiposit protein 2
- A-FABP, FABP4, aP2:** adiposit FABP
- AHR:** Airway Hyperresponsiveness
- ATGL:** Adipoz Trigliserid Lipaz
- BALF:** Bronkoalveolar lavaj sıvısı (Bronchoalveolar lavage fluid)
- B-FABP, FABP7:** beyin FABP
- BSA:** Sığır Serum Albumin
- CCS:** Cosmic Calf Serum
- cAMP:** Siklik Adenozin 3'-5' Monofosfat
- COX2:** siklooksijenaz-2
- CysLTR1:** Sisteinil lökotrien reseptör 1
- CCL:** C-C motif kemokin ligand
- cGMP:** Siklik Guanozin Monofosfat
- DAMP:** Hasarla ilişkili moleküler kalıplar (Damage-Associated Molecular Patterns)
- Der p:** Dermatophagoides pteronyssinus
- Der f:** Dermatophagoides farina
- eNOS:** endotelial Nitrik Oksit Sentaz
- E-FABP, FABP5, mal1:** epidermal FABP
- ECRHS:** European Community Respiratory Health Survey
- eGFR:** Tahmini Glomerüler Filtrasyon Hızı
- FABP:** Yağ Asidi Bağlayıcı Protein (Fatty Acid Binding Protein)
- GR:** Glukokortikoid reseptörler
- GWAS:** Genom-Wide Association Study
- GM-CSF:** Granülosit-Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
- HDAC:** Histon deasetilaz
- HDM:** Ev Tozu akarı (House Dust Mite)
- H-FABP, FABP3:** Kalp FABP

HSL: Hormon-duyarlı lipaz

HUVEC: İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücresi

JAK2: Janus kinaz 2

JNK: Jun-N-terminal kinaz

IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee

ICAM-1: İnterselüler Adezyon Molekül-1

ICS: Inhale kortikosteroidler

I-FABP, FABP2 : İntestinal FABP

Il-FABP, FABP6: İleal FABP

IFN- γ : Interferon gama

IgE: immünoglobulin E

IKK: İnhibitör Kappa Kinaz

IL: Interlökin

ILC: Doğal Lenfoid hücreler (Innate Lymphoid cell)

iNOS: indüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

ISAAC: International Study of Asthma and Allergies in Childhood

ITT: İnsülin Tolerans Testi

KOAH: Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı

LAMA: Uzun etkili antikolinergik

LDH:Laktat dehidrojenaz

LTi: Lenfoid doku uyarıcı

L-FABP, FABP1 : Karaciğer FABP

LABA: Uzun etkili β 2 agonistler

LPS: Lipopolisakkarit

LTRA: Lökotrien Reseptör Antagonistleri

LTC:Lökotrien

LXR- α : Karaciğer X reseptörü- α

M-FABP, FABP8: myelin FABP

MBP: Major bazik protein

Mcp-1: Monosit Kemoatraktant protein-1

- NAFLD** :Alkole bağılı olmayan yağlı karaciğer hastalığı
- NK hücreler**: Doğal öldürücü hücreler(Natural Killer cells)
- NF-κB**: Nükleer faktör-kappa B
- OGTT**:Oral Glukoz Tolerans Testi
- OVA**:Ovalbumin
- ox-LDL**: okside Düşük Dansiteli Lipoprotein
- PAMP**: patojen ilişkili moleküler kalıplar (Pathogen-Associated Molecular Patterns)
- PBS**: Fosfat ile tamponlanmış tuz eriyiği
- PDE** : fosfodiesteraz
- PPAR**:Peroksizom proliferatör-aktive reseptör
- P/S**: Penisilin-Streptomisin
- PRR** :Kalıp tanıma reseptörleri (Pattern Recognition Receptor)
- RBM**: Retiküler Bazal membran
- RSV**: Respiratuvar Sinsitiyal Virüs
- R_N**:Newtonian rezistans
- Rrs**: total respiratuvar sistem rezistans
- SABA**: Kısa etkili β agonistler
- SAMA**: Kısa etkili antikolinergik
- SMART**: Salmeterol Multicentre Asthma Research Trial
- T-FABP, FABP9**: testis FABP
- Th**: T yardımcı hücre
- T2D**: Tip 2 diyabet
- TGF-β**: Dönüştürücü büyüme faktörü-β
- THP-1**:İnsan lösemi monosit hücre hattı
- TLR**: Toll-benzeri reseptörler (Toll-like receptor)
- TNF-α**: tümör nekroz faktör-alfa
- TSLP**: Timik Stromal Lenfopoietin
- Ultra-LABA** : Ultra-Uzun Etkili β agonistler
- VEGF** : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
- VEGF-TG**: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü-transgenik

ÖZET

Dağtekin, N. (2020). Astım Patogeneğinde Hava Yolu Hiperreaktivitesi ve İnflamatuvar Yanıt Oluşumunda aP2'nin Rolü - İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Astım kronik hava yolu inflamasyonu ve bronş aşırı duyarlılığı ile karakterize heterojen bir hastalıktır. Astım patogeneğinde FABP4 olarak da bilinen adiposit-protein-2(aP2)'nin rolünü ortaya koyan çalışmalar son derece kısıtlıdır. Dolaşımdaki aP2'nin alerjik astım patogeneğinde rol alabileceği öne sürülmüştür. Ancak aP2'nin hava yolunda hangi mekanizmalar üzerinden etkili olduğu, ve bu etkiden sorumlu aP2'nin kaynağı bilinmemektedir. Bu çalışmada aP2'nin alerjik hava yolu inflamasyonu ve hava yolu hiperreaktivitesi üzerindeki rolünün aP2f/f-farelerde geliştirilen deneysel alerjik-astım modelinde araştırılması amaçlanmıştır. Astım patogeneğinde etkili aP2'nin kaynağının belirlenmesi içinde, doku spesifik aP2'den yoksun deney gruplarının oluşturulması planlanmıştır. Bu amaçla OVA veya HDM ile indüklenen deneysel aP2f/f-fare alerjik astım modelinde metakolinin artan dozları ile gerçekleştirilen bronkoprovokasyon testi sonrasında RN ve Rrs değerlerinde kontrol grubuna göre bir anlamlılık gözlenmemiştir. Bu nedenle, doku spesifik aP2'den yoksun deney gruplarında çalışma yapılamamıştır. aP2'nin hava yolları inflamasyonundaki rolünü değerlendirmek üzere çalışmaya in vitro ortamda insan bronşiyal epitel (BEAS-2B), fare akciğer epitel (MLE-12) ve alveolar makrofaj (MH-S) hücre kültürlerinde devam edilmiştir. Rekombinant aP2 uygulamasına bağlı olarak, BEAS-2B hücre kültüründe CCL2, IL-1 β , TSLP; MLE-12 hücre kültüründe CCL2 ve MH-S hücre kültüründe CCL2, IL-1 β 'in gen ekspresyonları artmıştır. Rekombinant aP2+OVA uygulaması; BEAS-2B ve MLE-12 hücre kültürlerinde CCL2; BEAS-2B ve MH-S hücre kültürlerinde ise IL-1 β ekspresyonunu OVA-grubuna kıyasla anlamlı olarak arttırmıştır. LPS uygulanan MH-S hücre kültüründe aP2 ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Epitel hücrelerde ise aP2 gen ekspresyonu ve kültür ortamında aP2 protein tespit edilmemiştir. Sonuç olarak in-vitro deneylerden elde edilen preliminer veriler aP2'nin, proinflamatuvar sitokin ve kemokin üretimini tetiklediğini ve alerjen maruziyetine bağlı gelişen inflamatuvar yanıtı arttırabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Astım, adipoz doku, aP2, FABP4, inflamasyon

Bu çalışma Harvard Üniversitesi Halk Sağlığı Okulu Hotamışlıgil Laboratuvarı/Sabri Ülker Merkezi tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Dağtekin, N. (2020). The Role of aP2 On Airway Hyperresponsiveness and The Formation of Inflammatory Response in Asthma Pathogenesis. İstanbul University, Institute of Health Science, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology. PhD Thesis. İstanbul.

Asthma is a heterogeneous disease characterized by chronic airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness. Researches on the role of adipocyte-protein2, aP2, also known as FABP4 in asthma pathogenesis are limited. It's suggested that circulating-aP2 may play role in allergic-asthma pathogenesis. The mechanism by which it exerts its effect, and the source of aP2 that acts on airways is not fully understood. In this project, it's aimed to study the aP2's role in the development of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness on experimental allergic-asthma-models developed in aP2f/fmice. In order to determine the source of aP2 in the pathogenesis of asthma, tissue-specific aP2-deficient experimental models were planned. For this purpose, OVA or HDM induced experimental allergic-asthma-models in aP2f/fmice were developed. Bronchoprovocation was performed with increasing concentrations of methacholine, no difference was observed in RN and Rrs values. Therefore tissue-specific-models were not studied. In-vitro studies were conducted on human-bronchial-epithelial-cells (BEAS-2B), mouse-lung-epithelial-cells (MLE-12), murine-alveolar-macrophages (MH-S) to evaluate the contribution of aP2-protein in airway inflammation. CCL2, IL-1 β , TSLP gene expressions in BEAS-2B; CCL2 gene expression in MLE-12 and CCL2, IL-1 β gene expressions in MH-S were increased by recombinant-aP2 treatment. CCL2-gene expression in BEAS-2B and MLE-12 cells, and IL-1 β gene expression in BEAS-2B and MH-S were elevated significantly with aP2+OVA treatment when compared with OVA-group. aP2-gene expression was significantly increased in LPS-treated alveolar-macrophages. Interestingly aP2-gene expression as well as aP2protein were not detected in epithelial-cell-culture. Preliminary data have shown that aP2 might trigger the production of proinflammatory cytokines and chemokines, and may potentiate the inflammatory-response due to allergen exposure.

Key Words: Asthma, adipose tissue, aP2, FABP4, inflammation,

The present work was supported by Harvard T.H. Chan School of Public Health/Sabri Ulker Center-Hotamisligil Laboratory

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yağ asidi bağlayıcı proteinler (FABP), doymuş ve doymamış yağ asidleri, eikozanoidler ve diğer lipidler gibi hidrofobik ligandlara geri dönüşlü olarak bağlanan, 14-15 kilodaltonluk lipid şaperonlarıdır (Furuhashi ve Hotamisligil 2008). Lipid aracılı biyolojik proseslerin ve metabolik homeostazın regülasyonunda merkezi bir rol oynamaktadır (Furuhashi ve Hotamisligil 2008). İlk olarak 1972 yılında, sıçan jejunumunda tespit edilmiş ve uzun zincirli yağ asidlerine non-kovalent bağlanabilen, düşük moleküler ağırlıklı yaklaşık 12kDa'luk intraselüler bir protein olarak tanımlanmıştır (Ockner ve ark. 1972). Günümüze kadar, bu grubun dokuz farklı izoformu tanımlanmıştır. Bunlar karaciğer FABP (L-FABP, FABP1), intestinal FABP (I-FABP, FABP2), kalp FABP (H-FABP, FABP3), adiposit FABP (A-FABP, FABP4, aP2), epidermal FABP (E-FABP, FABP5, mal1), ileal FABP (IL-FABP, FABP6), beyin FABP (B-FABP, FABP7), myelin FABP (M-FABP, FABP8) ve testis FABP (T-FABP, FABP9)'dir (Furuhashi ve Hotamisligil 2008). FABP'ler arasında, Yağ asidi Bağlayıcı Protein 4 (FABP4) olarak da bilinen adiposit protein 2 (aP2), en iyi karakterize edilen izoformdur ve immünometabolik homeostazdaki rolü oldukça önemli ve dikkat çekicidir. aP2, ilk olarak olgun adiposit ve adipoz dokuda tespit edilmiştir (Spiegelman ve ark. 1983; Hunt ve ark. 1986). Yapılan araştırmalar sayesinde ekspresyon profilinin çeşitliliği gösterilmiştir. aP2 ekspresyonu ayrıca monositlerin makrofaja farklılaşması boyunca ve forbol 12-miristat 13-asetat, lipopolisakkarid, peroksizom proliferatör-aktif reseptör- γ (PPAR- γ) agonistleri ve okside düşük dansiteli lipoprotein (ox-LDL) ile indüklenmektedir (Pelton ve ark. 1999; Fu ve ark. 2000; Makowski ve ark. 2001; Fu ve ark. 2002; Kazemi ve ark. 2005). aP2'nin dendritik hücrelerde ve kalp, böbrek dahil olmak üzere çeşitli dokuların kapiller ve ven endotel hücrelerinde de eksprese olduğu bilinmektedir (Rolph ve ark. 2006; Elmasri ve ark. 2009). Ayrıca T yardımcı hücre 2 (Th2) sitokinlerinden olan İnterlökin (IL)-4 ve IL-13 ile muamele edilen bronş epitel hücrelerinde aP2 ekspresyonunun arttığı, Th1 sitokini interferon-gama (IFN- γ) ile ekspresyonunun baskılandığı gösterilmiştir (Shum 2006; Shum ve ark. 2006).

Tarihsel olarak araştırmalar, aP2'nin lipid metabolizması ve inflamasyon üzerindeki intraselüler etkileri üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak aP2'nin bir adipokin hormon olarak görev aldığı ve pleiotropik etkilerinin mevcut olduğu ortaya çıkmıştır (Cao ve ark. 2013). Dolaşımdaki aP2 seviyesi, kardiyovasküler hastalıklarda risk artışı, miyokard enfarktüsünün erken tanısı, hipertansiyon, preeklampsi ve ateroskleroz ile; iskemik felç ile; obezite, insülin direnci, tip 1 diyabette bozulmuş glisemik kontrol, tip 2 diyabet (T2D) ve diyabetik komplikasyonlar ile; alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) ile; meme kanseri ve lösemi de dahil olmak üzere çeşitli kanser türleri ile ilişkilendirilmiştir (Xu ve ark. 2006; Tso ve ark. 2007; Xu ve ark. 2007; Yeung ve ark. 2007; Koh ve ark. 2009; Djoussé ve ark. 2012; Ota ve ark. 2012; Scifres ve ark. 2012; Fuseya ve ark. 2014; Tu ve ark. 2017; Yan ve ark. 2017; Hao ve ark. 2018; Liu ve ark. 2018; Obokata ve ark. 2018; Zhang ve ark. 2018).

Hücresel araştırmalar ve deneysel hayvan modellerinde aP2 ekspresyonunun genetik olarak değiştirilmesi ile yapılan çalışmalar, bu proteinin fonksiyonları, hücresel ve sistemik etkileri ve etki mekanizmaları hakkında araştırmaların yapılmasına olanak vermiştir (Furuhashi ve Hotamisligil 2008). Obezite, diyabet ve kardiyovasküler hastalıkların deneysel hayvan modellerinde aP2'nin rolü üzerine yapılan araştırmalar ve insanlarda plazma aP2 seviyesi ile çeşitli hastalıkların gelişme riski ve hastalığın seyri arasındaki ilişkiye yoğunlaşan çalışmalara dayanarak, bu protein üzerinden geliştirilen terapötik yaklaşımların kronik immünometabolik hastalıklarda bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilme potansiyelini ortaya çıkmıştır (Hotamisligil ve Bernlohr 2015).

Astım kronik hava yolu inflamasyonu ve bronş aşırı duyarlılığı ile karakterize heterojen bir hastalıktır. Nefes darlığı, hırıltılı solunum, göğüste sıkışıklık ve/veya öksürük gibi respiratuvar semptomlar ve beraberinde ekspiratuvar hava akım kısıtlılığı ile tanımlanmaktadır (GINA 2019). Hastalığın etiyopatogenezi henüz tam anlamıyla açıklığa kavuşmamıştır.

Alerjik astım ve hava yolu inflamasyonu gelişimi üzerinde aP2'nin rolü üzerine yapılan bir çalışmada, bronşiyal epitel hücresinde, aP2 tespit edilmiştir. Yapılan araştırmada, Th2 sitokinlerinden IL-4 ve IL-13'ün bronşiyal epitel hücrelerinde aP2 ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca aP2'nin alerjik hava yolu inflamasyonu üzerindeki rolünü değerlendirmek üzere yapılan çalışmada, farelerde geliştirilen ovalbumin ile indüklenen alerjik hava yolu inflamasyonunun aP2'den

yoksun farelerde olmadığı saptanmıştır. Aynı araştırmada, aP2'den yoksun farelerden yabancıl (WT) hayvanlara yapılan kemik iliği transplantasyonunun, WT grupta alerjene bağlı akciğer inflamasyonunda düzelmeye neden olmamasından parenkimal hücrelerdeki aP2'nin sorumlu olabileceğini sonucuna varılmıştır (Shum 2006; Shum ve ark. 2006). VEGF-TG (Vasküler endotelial büyüme faktörü-transgenik) fareler ile 2013 yılında hava yolu anjiyonezi ve inflamasyon üzerine yapılan bir araştırmada, aP2 yoksunluğunun VEGF ile indüklenen hava yolu inflamasyonunda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca astımlı hastaların hava yolunda, aP2-immünoreaktif kan damar yoğunluğunun artmış olduğu bildirilmiştir (Ghelfi ve ark. 2013).

Çalışmamızda, aP2'nin alerjik hava yolu inflamasyonu ve hava yolu hiperreaktivitesi üzerindeki rolünü araştırmak ve alerjik astım patogeneğinde rol alan aP2'nin kaynağının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla *in vivo* çalışmalarda, fare yerine insan aP2'si taşıyan aP2 f/f genotipli dişi C57BL/6 farelerde ovalbumin (OVA) ve ev tozu akarı (HDM, house dust mite) maruziyeti ile alerjik astım geliştirilmesinin ardından, adipoz doku, endotel ve makrofaj kaynaklı aP2'den yoksun farelerde, ovalbumin ve ev tozu akarı (HDM, house dust mite) ile alerjik astım geliştirilmesi planlanmıştır. Böylece, alerjik astımda, hava yolu hiperreaktivite gelişiminde aP2'nin rolünü ve bu etkiden sorumlu olan aP2'nin kaynağını araştırılması hedeflenmiştir. Çalışmamızda, çeşitli hücre hatlarında yapılan *in vitro* deneylerde ise, aP2'nin bronşiyal epitel hücresi, akciğer epitel hücresi veya alveolar makrofajlarda, alerjen varlığı veya yokluğu durumlarında, sitokin ve kemokin üretimine katkısını değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca hava yolunda epitel hücre veya alveolar makrofajlarda, alerjen varlığı veya yokluğu durumlarında aP2 ekspresyonunu değerlendirerek, alerjik astım gelişiminde dolaşımdaki aP2'nin, alerjen maruziyeti ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Astım Tanımı ve Tarihçesi

Astım kronik hava yolu inflamasyonu ve bronş aşırı duyarlılığı ile karakterize heterojen bir hastalıktır. Nefes darlığı, hırıltılı solunum, göğüste sıkışıklık ve/veya öksürük gibi respiratuvar semptomlar ve beraberinde ekspiratuvar hava akım kısıtlılığı ile tanımlanmaktadır (GINA 2019). Hastalığın etiopatogenezi henüz tam anlamıyla açıklığa kavuşmamıştır. Astımın tek bir hastalık olmadığı, farklı etiyojileri ve prognozları barındıran heterojen fenotiplerden oluşan bir grup; çeşitli genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile tanımlanan fenotipler veya hastalıklar bütünü; bir sendrom olduğu belirtilmektedir (Wenzel 2006; Borish ve Culp 2008; Pavord ve ark. 2018; Dharmage ve ark. 2019).

Astım eski çağlardan bu yana bilinen bir hastalıktır. Hastalık hakkında ilk modern yayın 1698 yılında aynı zamanda kendisi de bir astım hastası olan Sir John Floyer tarafından yapılmıştır (Cohen 1995, Pavord ve ark. 2018). Henry Hyde Salter ise yaptığı astım tanımı ile, muhtemelen ilk defa astım terimini, günümüzde hava yolu yeniden yapılanması (remodelling) olarak bilinen, hava yolları hasarı ile ilişkilendirmiştir (Sakula 1985; Pavord ve ark. 2018). Francis Rackemann tarafından yapılan klinik çalışma ile ise ilk defa astım heterojenitesi vurgulanmış ve astım için ekstrasik astım ve intrinsik astım olmak üzere iki fenotip tanımlanmıştır (Rackemann 1927; Pavord ve ark. 2018).

2.2. Astım Epidemiyolojisi

Dünya çapında 300 milyondan fazla astım hastası bulunduğu tahmin edilmektedir ve ülkelere göre %1-18'lik popülasyonu etkilemektedir. Astım vakalarının artacağı ve 2025 yılına ulaşıldığında 100 milyon astım hastasının daha eklenmiş olacağı öngörülmektedir (Masoli ve ark. 2004; GINA 2019).

Dünya sağlık örgütüne göre, dünyada astıma bağlı olarak yılda yaklaşık 250.000 ölüm gerçekleşmektedir (GARD 2007). Astım prevalansı, ciddiyeti, mortalitesi coğrafi bölgelere göre farklılık göstermektedir (Dharmage ve ark. 2019).

Astım prevalansı, yüksek gelirli ülkelerde daha fazla iken, astımla ilişkili ölümlerin büyük bir kısmının düşük ve orta gelirli ülkelerde görüldüğü belirtilmektedir (To ve ark. 2012; Dharmage ve ark. 2019). Astım insidansı ve prevalansının çocuklarda daha yüksek, morbidite ve mortalitenin ise yetişkinlerde daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Dharmage ve ark. 2019). Prevalans üzerine yapılmış birçok araştırma olmakla beraber, aralarında geniş kapsamda yapılmış olanlarından biri, yetişkinler ile yapılan *the European Community Respiratory Health Survey* (ECRHS), diğeri ise çocuklar üzerinde değerlendirme yapılmış olan *the International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC) çalışmasıdır. Bu çalışmalarda astım prevalansının, dünya çapında varyasyon gösterdiği ve astımın yaygın görülen kronik hastalıklardan biri olduğu belirtilmiştir (Asher ve ark. 1995; ECRHS 1996; ISAAC 1998; Weiland ve ark. 2004; Ellwood ve ark. 2005; GARD 2007; Dharmage ve ark. 2019).

2.3. Astım Risk Faktörleri

Astım risk faktörleri kişisel etkenler ve çevresel etkenler olmak üzere iki başlık altında incelenmektedir. Kişisel etkenler genetik, epigenetik, cinsiyet ve obezite iken; çevresel etkenler alerjenler, mesleki duyarlılaştırıcılar, sigara, hava kirliliği ve beslenme faktörlerinden oluşmaktadır (Türk Toraks Derneği 2016).

2.3.1. Genetik

Çeşitli genler ile astımı ilişkilendiren 1000'den fazla yayında astım veya fenotipleri ile ilişkilendirilmiş 600'ün üzerinde aday genin tanımlandığı belirtilmiştir (Toskala ve Kennedy 2015). Beta-2 adrenerjik reseptör genleri, Th1 ve Th2 hücre farklılaşmasında etkili sitokinlerin, reseptörlerin, sinyal proteinlerin transkripsiyon faktörlerinin genleri ve atopik hastalıklarda hücresel yanıtın oluşumda görev alan çeşitli genler, astım ile ilişkilendirilen aday genlerden bazılarıdır (Toskala ve Kennedy 2015).

Ailede astım öyküsü varlığının, çocuklarda astım görülme riskini arttırdığı bilinmektedir (Beasley ve ark. 2015; Thomsen 2015). Hastalığın çocuklarda görülme

riski, ebeveynlerden birinin astımlı olması durumunda %25 iken, her ikisinin de astımlı olması durumunda bu oranın %50'ye yükseldiği belirtilmiştir (Thomsen 2015). Ayrıca bu riskin tek yumurta ikizlerinde, çift yumurta ikizlerine kıyasla daha fazla olduğu bildirilmiştir (Thomsen ve ark. 2010).

Genetik predizpozisyonun önemli bir faktör olduğu bilinmekle beraber henüz tam anlamıyla açıklığa kavuşmamıştır. Metodolojik kısıtlılıklar, genetik çalışmalarda elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği, gen ekspresyonları üzerinde kronolojik faktörler ve astım fenotiplerinin çeşitliliği gibi etkenlerin, hastalığın genetik düzeyde anlaşılmasını zorlaştırdığı belirtilmiştir (Beasley ve ark. 2015). Yalnızca bir grup genin astım ile ilişkisi birden fazla çalışmada gösterilebilmiştir ve aynı sonuçların farklı popülasyonlarda tekrarlanamaması durumunun, bazı genlerin astımın belirli alt gruplarında etkili olması ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Thomsen 2015).

2.3.2. Cinsiyet

Astım prevalansı, insidansı, hastalığın şiddeti, klinik belirtileri üzerinde cinsiyete bağlı farklılıkların görüldüğü bilinmektedir (Zein ve Erzurum 2015; Koper ve ark. 2017). Oluşan bu farklılığın altında yatan mekanizmalar tam anlamıyla bilinmemekle beraber, çeşitli immünolojik ve hormonal faktörlerin, ayrıca sosyo-kültürel ve çevresel etkenlerin rol aldığı düşünülmektedir (Becklake ve Kauffmann 1999; Ostrom 2006; Melgert ve ark. 2007; Almqvist ve ark. 2008; Vink ve ark. 2010; Zein ve Erzurum 2015).

Çocukluk çağında erkeklerde, kadınlara kıyasla astım gelişim riski daha fazla iken, ergenlik dönemiyle beraber astım prevalansı ve morbiditesinde erkeklerde düşüş, kadınlarda ise artış olduğu bildirilmiştir (Moorman ve ark. 2012; Fuseini ve Newcomb 2017).

2.3.3. Alerjenler

Alerjene karşı gelişen sensitizasyonun astım gelişiminde en önemli risk faktörlerinden biri olduğu bilinmektedir (Arshad 2003). HDM, hamam böceği, evcil hayvanlardan kaynaklı çeşitli alerjenler, küf mantarı ve polenler gibi iç ve dış mekanlardaki alerjenler ile gelişen sensitizasyonun, astım ve çeşitli alerjik hastalıklar ile

ilişkilendirildiği bildirilmiştir (Nolte ve ark. 2001; Arshad 2003). Modern yaşam koşulları ve iç mekanlarda geçirilen zamanın artması sonucunda alerjene maruziyetteki artışın, astım ve alerji semptomlarının artmasına yol açtığı belirtilmiştir (Arshad 2003).

HDM, deri döküntüleri ile beslenen, mikroskopik boyutlarda bir eklembacaklıdır. En yaygın türlerinden biri olan *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) ve *Dermatophagoides farinae* (Der f) iç mekan alerjenlerinin başlıca kaynaklarındandır (Baxi ve Phipatanakul 2010; Yasuda ve ark. 2020). HDM'nin dışkısında bulunan proteolitik enzim yapısındaki en önemli alerjenler Der p1, Der p 2 ve Der f 1'dir (Arshad 2003; Louisias ve ark. 2019). HDM alerjisini astımla, hastalığın şiddeti ve morbiditesi ile ilişkilendiren çalışmalar bulunmaktadır. HDM'ye duyarlılık gösteren çocuklarda, HDM'ye maruziyetin, artmış bronşiyal aşırı duyarlılık, bozulmuş respiratuvar fonksiyonlar ve artmış inflamasyon ile ilişkilendirildiği bildirilmiştir (Portnoy ve ark. 2013; Louisias ve ark. 2019). Erken çocukluk döneminde HDM'ye maruziyetin astım riskini arttırdığı gösterilmiştir (Sporik ve ark. 1990; Celedón ve ark. 2007). Astım hastası çocuk ve gençlerin %50'sinden fazlasında HDM'ye duyarlılık bildirilmiştir (Ulrik ve Backer 1999). HDM seviyeleri ile astım arasında doz-cevap ilişkisine dayalı çalışmalardan bazıları bu ilişkiyi desteklerken, bazı çalışmalar ise HDM seviyesi ile astım arasında böyle bir ilişki göstermemiştir (Celedón ve ark. 2007; Torrent ve ark. 2007; Tovey ve ark. 2008; Gaffin ve Phipatanakul 2009).

Hamam böceğine maruz kalmanın, hamamböceği kaynaklı alerjenlerin inhalasyonunun insanlarda alerjik yanıt oluşmasına neden olduğu bilinmektedir (Do ve ark. 2016). Dört binden fazla türü bulunmasına rağmen alerji ile ilişkili çalışmalar belli başlı türleri üzerinde odaklanmıştır. Bunların arasında *Periplaneta americana* ve *Blattella germanica* yer almaktadır (Do ve ark. 2016). Hamamböceği kaynaklı alerjenlere ise Bla g 1, Bla g 2, Bla g 4, Bla g 5, Bla g 6, Per a 1, Per a 3 ve Per a 7 örnek verilebilir (Arruda ve Chapman 2001). Avrupa'da hamamböceğine karşı alerji bildirilmiştir. Polonya da astımlı çocukların yaklaşık %25'inin bu alerjenlere duyarlı oldukları gösterilmiştir ve çoğunun evlerinde bu alerjenlerin tespit edildiği belirtilmiştir (Stelmach ve ark. 2002). Tayvan'da ise astım hastalarının dahil olduğu bir çalışmada, Per a 2'ye duyarlılığın, hava yollarında gelişen alerjinin şiddeti ile korele olduğu gösterilmiştir (Lee ve ark. 2012). Hamamböceklerine alerjisi olan ve yüksek seviyelerde söz konusu alerjene maruz kalan çocuklarda, hastaneye yatış, medikal vizitler gibi

durumların oranında artış olduğu gösterilmiştir (Rosenstreich ve ark. 1997; Gruchalla ve ark. 2005; Baxi ve Phipatanakul 2010). Ayrıca iç mekanda bu alerjenlere maruziyete karşı alınan önlemlerin, astımla ilişkili morbiditeyi azalttığını gösteren çalışmalarda bulunmaktadır (Do ve ark. 2016).

Polen ve küf sporlarının da duyarlı kişilerde astım ataklarını tetiklediği ve klinik belirtileri ağırlaştırdığı bilinmektedir (Baxi ve Phipatanakul 2010).

2.3.4. İnfeksiyonlar

Viral ve bakteriyel infeksiyonların astım patogeneğinde önemli bir faktör oldukları ve astımlı kişilerin bu infeksiyonlara, atopi ve bozulmuş mukozal ve sistemik immün savunma yanıt gelişimi nedeniyle, daha duyarlı olabilecekleri bildirilmiştir (Toskala ve Kennedy 2015). Çocukluk döneminde, hastane yatışına sebep olacak şiddette seyreden Respiratuvar Sinsitiyal Virüs (RSV) nedeniyle gelişen bronşiolitin erken ergenlik döneminde alerjik astım gelişiminde önemli bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (Sigurs ve ark. 2005). Respiratuvar viral infeksiyonlar, çocuklarda ve yetişkinlerde görülen astım ataklarıyla da ilişkilendirilmiştir (Nicholson ve ark. 1993; Johnston ve ark. 1995). Bir diğer yandan hijyen hipotezine göre solunum infeksiyonları da dahil olmak üzere tüm infeksiyonların, alerjik hastalıkların ve astımın gelişimine karşı koruyucu bir etkisi olabileceği düşünülmüştür (Strachan 1989; Strachan 2000; Brooks ve ark. 2013). Ancak bu infeksiyonların, astım ve alerji gelişiminde patojenik mi yoksa koruyucu bir faktör olarak mı değerlendirilmesi gerektiği tartışmalıdır (Subbarao ve ark. 2009; Brooks ve ark. 2013; van Tilburg Bernardes ve Arrieta 2017).

2.3.5. Mesleksel Astım

Mesleksel astım, kişinin çalışma ortamında astım gelişimini indükleyen çeşitli duyarlılaştırıcı ajanlara karşı spesifik immünolojik yanıtlar gelişmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır (Tarlo ve Lemiere 2014). Bu duyarlılaştırıcılar yüksek ve düşük molekül ağırlıklı bileşenler olarak iki gruba ayrılmıştır (Quirce ve Bernstein 2011). Mesleksel duyarlılaştırıcıların genellikle protein ve glikopeptid yapısındaki yüksek molekül ağırlıklı bileşenler olduğu ve bu ajanların tipik bir alerjik yanıt ve immünoglobulin E (IgE) antikor oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir (Tarlo ve Lemiere 2014). Bu gruba

örnek olarak çeşitli hayvansal alerjenler, bitkisel ürünler ve enzimler verilebilir. Diğer yandan düşük molekül ağırlıklı kimyasalların da duyarlılaşmaya ve bunu takiben astım gelişimine neden olabileceği bilinmektedir (Quirce ve Bernstein 2011; Tarlo ve Lemiere 2014). Düşük molekül ağırlıklı bileşenlere örnek olarak kompleks platinum tuzları ve diğer metal tuzları verilebilmektedir (Tarlo ve Lemiere 2014). Kompleks platinum tuzları gibi çeşitli ajanların spesifik IgE antikor üretimi ile ilişkilendirildiği belirtilmiştir (Tarlo ve Lemiere 2014). Düşük molekül ağırlıklı ajanlar ile duyarlılaştırmada IgE'den bağımsız mekanizmaların da söz konusu olabildiği veya vücutta haptenler gibi davranabildikleri de belirtilmiştir (Arkan Erdoğan 2019).

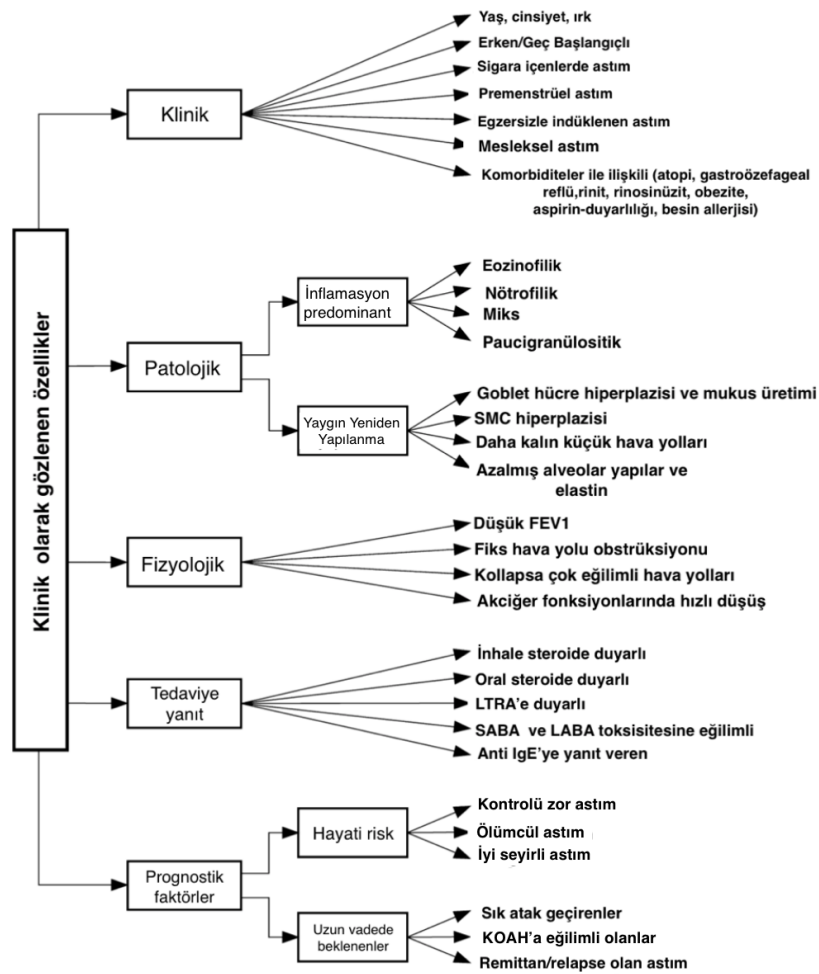
Bir diğer yandan iritan ile indüklenen mesleksel astımın, bir sensitizasyon olmaksızın, hava yollarının iritanlara yüksek seviyede maruz kalmasına bağlı olarak gelişebildiği belirtilmiştir (Quirce ve Bernstein 2011; Tarlo ve Lemiere 2014). Hava yolları iritanlarının kişide öncesinde var olan astımı ağırlaştırabildiği (mesleğin şiddetlendirdiği astım) veya yeni astım gelişimine (reaktif hava yolu disfonksiyonu sendromu) neden olabildiği belirtilmiştir (Arkan Erdoğan 2019).

2.4. Astım Patofizyolojisi

Astım ilk olarak her ne kadar tek bir hastalık olarak ele alınmışsa da, yapılan çalışmalar sonucunda günümüzde hastalığın şiddeti, tedaviye yanıt verebilirliği gibi kendisine has çeşitli karakteristik özellikler taşıyan birden fazla fenotipten meydana geldiği ve hastalığın heterojenite gösterdiği bilinmektedir (Gauthier ve ark. 2015). Fenotip kavramı, genetik ve çevresel etkilerin etkileşiminden kaynaklanan gözlenebilir karakteristik özellikler olarak tanımlanabilmektedir (Wenzel 2013).

Rackemann, ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki fenotip tanımlamıştır. Ekstrinsik astımın çeşitli alerjenlere bağlı olarak geliştiği, erken yasta başladığı ve çeşitli çevresel etkenler, atopi ve diğer alerjik hastalıklarla bağlantılı olarak meydana geldiği düşünülmüştür. İntrinsik astım ise yaşamın daha geç dönemlerinde ortaya çıkıp, çevresel ve mevsimsel etkenlere ve atopiye bağlı olmaksızın yaşamın daha geç dönemlerinde başlangıç göstermektedir. Bu iki fenotip arasındaki ana farklardan biri hastalığın başlangıç yaşıdır (Rackemann 1947; Rackemann 1950; Rackemann ve ark. 1950; Gauthier ve ark. 2015)

Sonraki yıllarda yapılmış çalışmalar ışığında astım; başlangıç dönemi, hava yolları obstrüksiyonu ve geri dönüşümlü (reversibl) olma özelliği, atakların mevcudiyeti, atopi ve alerji gibi çeşitli faktörlerle ilişkili olarak çeşitli fenotiplere, alt gruplara ayrılmıştır (Gauthier ve ark. 2015). Astım hastalığının heterojenite göstermesi özellikle tedaviye zayıf yanıt veren hastalarda, hastalığın tedavisini zorlaştırmıştır (Gauthier ve ark. 2015). Fenotip sınıflandırmanın klinik açıdan yararını anlamak adına daha fazla klinik araştırmalara ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır (Türk Toraks Derneği 2016).



Şekil 2-1: Astım fenotiplerinin tanımlanmasında kullanılan özellikler- Agache ve ark. (2012)'den değiştirilerek

(SABA: Short-Acting β_2 - Agonists/ Kısa Etkili β_2 - Agonist ; LABA:Long-Acting β_2 - Agonists/Uzun Etkili β_2 -Agonist ; LTRA: Lökotrien Reseptör Antagonist ; KOAH:Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı ; FEV1: Forced Expiratory Volume /1 Saniyedeki Zorlu Ekspiratuvar Hacim ; IgE: İmmunoglobulin E).

Hastalığın fizyolojik ve klinik özellikleri, tetikleyici faktörler ve inflamatuvar bileşenleri ile ilişkili olarak pek çok fenotipleme yaklaşımı geliştirilmiş ve birçok fenotip belirlenmiştir (Bel 2004; Wenzel 2006; Moore ve ark. 2010; Siroux ve ark. 2011; Wenzel 2012; Wu ve ark. 2014; Chung ve ark. 2014). Agache ve ark. (2012) astım fenotiplerinin tanımlanmasında kullanılan, klinik olarak gözlemlenebilen özellikleri şekil halinde vermiştir (Şekil 2-1).

Hastalığın farklı fonksiyonel ve patolojik mekanizmaları ile ilişkili olarak alt gruplara ayrılması ile endotip kavramı ortaya çıkmıştır (Anderson 2008; Lötvald ve ark. 2011).

Günümüzde endotiplerin tanımlanması için evrensel olarak kabul edilmiş bir kriter henüz bulunmamaktadır (Nelson ve ark. 2020). Astımın endotiplerine ayrılmasında, dominant CD4⁺ yardımcı T hücre (Th) yanıtlarının etkili olduğu bilinmektedir. Ağır astım, *Th2-yüksek* (eozinofilik) ve *Th2-düşük* (non-eozinofilik) olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır (Wenzel ve ark. 1999; Kuruvilla ve ark. 2019). *Th2-yüksek* astımın hem alerjik hem non-alerjik olabildiği ve eozinofilik hava yolu inflamasyonu ile karakterize olduğu bilinmektedir (Nelson ve ark. 2020). *Th2-düşük* astımın ise nötrofilik ve paucigranülositik hava yolu inflamasyon ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Fahy 2015; Nelson ve ark. 2020).

Th2 hücrelerinin yanı sıra, doğal lenfoid hücrelerinden (ILC, Innate Lymphoid Cells) biri olan ILC2'nin tip 2 immün yanıt gelişimindeki rolünün anlaşılması ile *Th2 yüksek inflamasyonun Tip 2 (T2) inflamasyon* olarak da isimlendirildiği belirtilmiştir (Kuruvilla ve ark. 2019). Astım endotipleri *Tip 2 (T2) yüksek* ve *Tip 2 (T2) düşük* grupları olmak üzere iki ana grupta incelenebilmektedir (Wenzel 2012; Kuruvilla ve ark. 2019).

T2-yüksek astım fenotipleri erken-başlangıçlı alerjik astım, geç-başlangıçlı eozinofilik astım ve aspirin ile alevlenen solunum yolu hastalığı olmak üzere üç ana grupta incelenebilirken, *T2-düşük astım* fenotiplerinin ise obezite, sigara kullanımı, başlangıç yaşı gibi klinik özelliklere göre sınıflandırıldığı belirtilmiştir (Kuruvilla ve ark. 2019).

Bu kavramların ortaya çıkması ve astımın çeşitli fenotiplere ve endotiplere ayrılmasının, daha efektif tedavi seçeneklerinin gelişimi açısından önem taşıdığı belirtilmiştir (Hamilton ve Lehman 2020).

2.4.1. Hava Yolunda Daralma

Sağlıklı kişilerde etkisi olmayan veya az etki oluşturacak bir uyarana karşı astımlı kişilerin hava yollarında aşırı daralma ile yanıt verme eğilimi (*Airway Hyperresponsiveness, AHR*), artan duyarlılık ve aşırı bronkokonstriksiyon yanıtı ile karakterizedir (Chapman ve Irvin 2015). Hava yolunda hiperreaktivite durumunda sağlıklı kişilerde hava yolu direncini etkileyecek kadar güçlü uyarıcılara yanıt verilir ve hafif uyarılara yanıt yoktur. Ancak astım hastalarında verilen yanıtın boyutu sağlıklı kişiler ile kıyaslandığında aşırı denebilecek derecede daha fazladır (Kayaalp 2012).

AHR'de hava yolu düz kasındaki anomaliler, hava yolu inflamasyonu, yeniden yapılanma gibi çeşitli faktörlerin etkili olabileceği bilinmektedir. AHR ölçümü için uygulanan bronkoprovokasyon testlerinde kullanılan ajanlar direkt veya indirekt uyarın olarak ikiye ayrılmıştır. Histamin veya metakolin gibi maddeler hava yolu düz kasında reseptörler üzerinden direkt etkili olabildiği gibi, çeşitli mediyatörlerin salınımından sorumlu inflamatuvar veya çeşitli hücrelerin uyarımı veya nörol yolların stimülasyonu üzerinden de indirekt etkili olabilmektedirler. Egzersiz, alerjen, mannitol indirekt uyarılardan bazılarıdır (Berend ve ark. 2008; Chapman ve Irvin 2015). Bu amaçla aerosol halde metakolin uygulaması ile bronkoprovokasyon testi, deneysel fare modellerinde AHR değerlendirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmıştır (Robichaud ve ark. 2015).

Zorlu osilasyon tekniği (Forced Oscillation Technique), deneysel hayvan modellerinde pulmoner fonksiyonların değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerden biridir (Dubois ve ark. 1956; Schuessler ve Bates 1995; Devos ve ark. 2017). Bilgisayar-kontrollü piston ventilatör, FlexiVent FX sistemi kullanılarak, farelerde gerçekleştirilen zorlu osilasyon ölçümleri ile respiratuvar sistemde hava yolu veya doku ile ilişkili çeşitli parametrelerin değerlendirilmesi mümkündür (McGovern ve ark. 2013; Devos ve ark. 2017). Zorlu osilasyon tekniğinde elde edilen parametrelerden, hava yolu direnci ölçüsü olarak, Newtonian rezistans (R_N), başlıca geniş hava yolları olmak üzere merkezi hava yolu direncinin bir ölçüsüdür ve artış göstermesi hava yolundaki daralmaya işaret etmektedir (Lundblad 2012; Devos ve ark. 2017). Bir diğer hava direnci ölçüsü, total respiratuvar sistem rezistansı (R_{rs}), ise hava yolu, akciğer dokusu,

çene duvarı da dahil olmak üzere dirençlerin bütününi ifade etmektedir (Wang ve ark. 2014; Chapman ve Irvin 2015). .

AHR'nin, akciğer fonksiyonlarında görülen azalma ve astım gelişme riskindeki artış ile; AHR şiddetinin ise gerek atak riskindeki gerekse de hastalığın şiddetindeki artış ile ilişkilendirildiği belirtilmiştir. Öte yandan, AHR her ne kadar astımın temel özelliklerinden biri olarak ele alınsa da, AHR'nin mevcudiyetinin ve şiddetinin sabit olmadığı da vurgulanmıştır (Yan ve ark. 1983; Postma ve Kerstjens 1998; Leuppi ve ark. 2001; Brutsche ve ark. 2006; Chapman ve Irvin 2015).

Havayolu düz kas kütlesindeki artışın AHR üzerinde etkili olabileceği düşünülmüştür. Artan düz kas kütlesini astım ve şiddeti ile ilişkilendiren çalışmaların mevcut olduğu ancak tüm astım hastalarında bu artışın görülmediği de belirtilmiştir (Carroll ve ark. 1993; James ve ark. 2012; Nair ve ark. 2017). Hava yolundaki duvar kalınlaşması, retiküler bazal membran kalınlaşması ve ekstraselüler matriks bileşenleri ile AHR'yi ilişkilendiren veya ilişkili bulmayan çalışmaların da mevcut olduğu belirtilmiştir (Boulet ve ark. 1995; Ward ve ark. 2002; Niimi ve ark. 2003; Siddiqui ve ark. 2008; Slatk ve ark. 2008; Yick ve ark. 2012; Chapman ve Irvin 2015; Nair ve ark. 2017). Öte yandan astımlı kişilerde hava yolu düz kasının intrinsik olarak daha kontraktıl olabileceği düşünülmüş ancak bu durumun geçerliliği ve altında yatan mekanizma henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (Chapman ve Irvin 2015; Nair ve ark. 2017). İntrinsik anomalilere veya çeşitli ekstrinsik faktörlere bağlı olarak hava yolu düz kasında gelişen disfonksiyonun AHR oluşumuna katkıda bulunabileceği belirtilmiştir (Chapman ve Irvin 2015).

2.4.2. Hava Yolu İnflamasyonu

Hava yolları inflamasyonu, hem immün-inflamatuvar hem de hava yollarının yapısal hücreleri tarafından oluşturulan sitokinler ve kemokinler gibi çeşitli pro-inflamatuvar mediyatörler ile gelişen, astımın başlıca patofizyolojik bileşenlerinden bir tanesidir (Pelaia ve ark. 2017). Balgamin sitolojik incelenmesi ile elde edilen bulgularda da gözlemlendiği üzere, hava yolları inflamasyonunun, eozinofilik, nötrofilik, miks granülositik ve paucigranülositik inflamasyon şeklinde çeşitlilik gösterdiği anlaşılmıştır ve bu durum astımın inflamasyon kalıplarına göre ayrılan alt gruplar halinde incelenmesine olanak vermiştir (Simpson ve ark. 2006; Wenzel 2006; Pelaia ve ark.

2017). Alerjene maruz kalım ile gelişen alerjik astım fenotipi hava yollarında eozinofilik inflamasyon ve adaptif immünte ile ilişkilendirilirken, ozon ve sigara kullanımı gibi hava kirliliği, egzersiz, viral infeksiyon, stres ve obezite ile ilişkilendirilen non-alerjik fenotip çoğunlukla hava yolunda nötrofilik inflamasyon ve Th-2 hücrelerinden bağımsız doğal immün yanıt ile ilişkilendirilmiştir (Yu, Kim ve ark. 2014).

2.4.2.1. Eozinofilik İnflamasyon

Eozinofilik hava yolu inflamasyonu erken başlangıçlı alerjik astım ve geç başlangıçlı non-alerjik astım fenotiplerinde görülmektedir. Eozinofilik hava yolu inflamasyonunun alerjik astımın başlıca bileşenlerinden biri olduğu bilinmektedir ve eozinofilik astım klasik anlamda, alerjik sensitizasyon ve Th2-baskın inflamatuvar yanıtlar ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Walford ve Doherty 2014; Pelaia ve ark. 2017; Saglani ve ark. 2019).

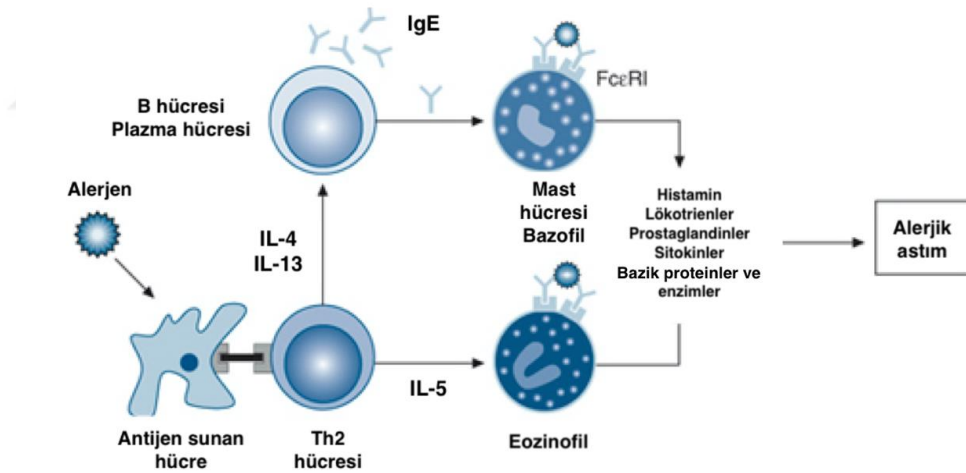
Alerjik astım, Th2 hücreleri ile indüklenen immün-inflamatuvar cevaplara bağlı olarak gelişmektedir (Pelaia ve ark. 2017). İlk olarak alerjik sensitizasyon sürecinde, inhale edilen alerjenler, antijen sunan hücreler tarafından alınarak işlenmektedir (Walford ve Doherty 2014). Bu hücrelerden en etkilisi, profesyonel antijen sunan hücre olarak da bilinen, dendritik hücrelerdir (Holgate ve Sly 2014). Dendritik hücreler alerjeni işleyerek, alerjenik peptidleri oluştururlar ve en yakın lokal lenf nodlarına göç ederek, majör histokompatibilite kompleks sınıf II ile naif T lenfositlerinde T hücre reseptörlerine sunarlar. Bunu takiben kostimülatör moleküller ve çeşitli sitokinlerin etkisiyle naif T lenfositlerinin Th2'ye diferansiyasyonu gerçekleşir (Holgate ve Sly 2014; Pelaia ve ark. 2017).

Alerjene bağlı olarak naif T lenfositlerinin aktivasyonu, T lenfositlerdeki kostimülatör moleküllerin, dendritik hücrelerde eksprese olan ligandları ile etkileşimine bağlıdır. Dendritik hücrelerdeki CD80, CD86 ile T lenfositlerdeki CD28'in veya dendritik hücrelerdeki OX40 ligandı ile, T lenfositlerdeki OX40'ın etkileşimi örnek olarak verilebilir (Holgate ve Sly 2014; Pelaia ve ark. 2017).

Ayrıca T lenfositlerinin diferansiyasyonunda önemli bir diğer faktör de sitokin profilidir. Th2 polarizasyonu için düşük seviyede IL-12 ve yüksek seviyede IL-4

mevcudiyetinin gerektiği bilinmektedir (Holgate ve Sly 2014; Pelaia ve ark. 2017). Aktive olan CD4⁺ Th2 hücreleri tarafından, IL-4, IL-5 ve IL-13 olmak üzere Th2 sitokinlerinin salınımı gerçekleşir. T yardımcı hücrelerinin farklılaşması ve Th2 sitokinlerinin oluşumunun, B hücre izotip değişimi, IgE sentezi, eozinofilin bölgede toplanması, mukus oluşumu, hava yolları aşırı duyarlılığı ve yeniden yapılanmasında rol aldıkları ve astım patofizyolojisinin oluşum ve gelişiminde büyük bir önem taşıdıkları bilinmektedir (Walford ve Doherty 2014). IL-5 eozinofillerin farklılaşmasında, maturasyonunda, periferel dolaşımdan hava yollarına toplanmasında, ayrıca eozinofillerin hayatta kalımı ve aktivasyonu üzerinde etkilidir (Fulkerson ve Rothenberg 2013; Shen ve Malter 2015; Pelaia ve ark. 2017; Saglani ve Lloyd 2019). IL-4 ve IL-13 ise başlıca B lenfositleri üzerindeki etkileri ile IgE'nin sentezinde rol almaktadır (Finkelman ve ark. 1990; Murdoch ve Lloyd 2010).

Alerjik astımda gelişen inflamatuvar kaskadı, Holgate (2008) şekil halinde vermiştir (Şekil 2-2).



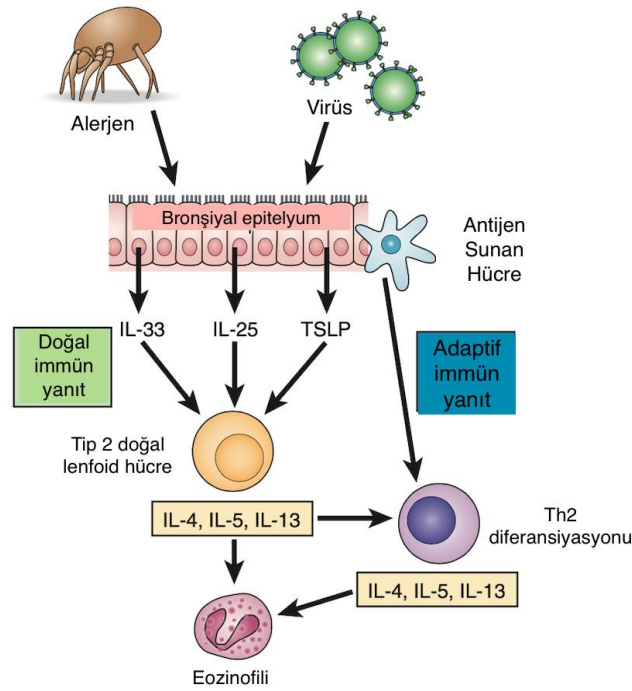
Şekil 2-2: Alerjik astım inflamatuvar kaskadının şematik görünümü -Holgate (2008)'den değiştirilerek

B hücrelerinden sentezlenen ve dolaşımda bulunan ve alerjene spesifik olarak meydana gelen IgE, dokulardaki mast hücrelerinde ve dolaşımdaki bazofillerde, yüksek afiniteli IgE reseptörlerine, FcεRI ve çeşitli lökositlerde bulunan düşük afiniteli FcεRII ile bağlanır (Gould ve ark. 2003; Murdoch ve Lloyd 2010; Weinberger ve ark. 2014).

Mast hücrelerinin hava yolu epitelinde ve mukozanın derin tabakalarında mevcut olduğu bilinmektedir (Murdoch ve Lloyd 2010). İnhalasyon yolu ile alerjene tekrar maruz kalındığında, antijen IgE antikoruna bağlanır ve çapraz etkileşim sonucunda, aktif bazofiller ve mast hücrelerinin degranülasyonu ile histamin, lökotrienler ve prostaglandinler başta olmak üzere çeşitli mediyatörlerin salınımı gerçekleşir ve bu durum bronkokonstriksiyona, hava yolunda ödeme ve inflamasyona neden olur (Saglanı ve Lloyd 2019; Nelson ve ark. 2020). Hava yolu düz kasındaki etkileri ile bahsi geçen bu mediyatörler, alerjene bağlı erken faz cevabın oluşmasından sorumlu tutulmaktadır (Fahy 2015).

Mast hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler, T ve B lenfositlerinin yanı sıra doğal lenfoid hücrelerin (ILC) de astım patogeneğinde önemli bir rol üstlendikleri bilinmektedir. ILC'ler doku homeostazı, onarımı ve inflamasyonda önemli bir rol oynamaktadır (Spits ve Di Santo 2011; Yu, Kim ve ark. 2014; Saglanı ve ark. 2019).

Bu nedenle antijen nonspesifiktir ve doğal (innate) sinyallere karşı hızlı bir yanıt geliştirebilmektedir (Yu, Kim ve ark. 2014). Son yapılan sınıflandırmaya göre ILC'ler doğal öldürücü (*Natural Killer*, NK), lenfoid doku uyarıcı (LTi) ve yardımcı ILC'ler (ILC1, ILC2 ve ILC3) olmak üzere beş alt gruba ayrılmıştır (Helfrich ve ark. 2019). ILC2'nin 2001 yılında IL-25 uygulaması ile yapılan çalışmada, ilk olarak non-T non-B hücreler olarak tanımlandığı belirtilmiştir (Fort ve ark. 2001; Fallon ve ark. 2006; Yu, Kim ve ark. 2014). ILC2'nin akciğerde baskın grup olduğu ve astım patogenezi ve alerjik inflamasyonda rol aldığı belirtilmiştir (Yu, Kim ve ark. 2014; Helfrich ve ark. 2019). Alerjen, mantar veya virüslere cevap olarak hava yolu epitel hücrelerinde IL-25, IL-33 ve timik stromal lenfopoietin (TSLP)'nin salınımı ile aktif olan ILC2'lerden, Th2 sitokinleri IL-4, IL-5, IL-13, ILC2'lerin hayatta kalımında önem taşıyan IL-9, ve amfiregülin salınımı gerçekleşmektedir (Helfrich ve ark. 2019). Saglanı ve Lloyd (2019), çevresel maruziyete bağlı olarak epitel hücrelerinden sitokinlerin salınımı ve ILC2 hücrelerin indüksiyonu şekil halinde vermiştir (Şekil 2-3).



Şekil 2-3: Çevresel maruziyete bağlı epitel hücrelerinden sitokinlerin salınımı ve ILC2 hücrelerin indüksiyonu-Sagları ve Lloyd (2019)’dan değiştirilerek

Aktif olan Th2 hücreleri ve ILC2’ler, IL-4, IL-5 ve IL-13 sentezlerken epitel ve endotel hücreleri eotaxin-1 (CCL11 C-C motif kemokin ligand 11) üretmektedir (Bakakos ve ark. 2019). Özellikle IL-5 ve CCL11, eozinofil trafiği ve eozinofili oluşumunda büyük önem taşımaktadır (Pease 2006; Bakakos ve ark. 2019).

Bunlara ek olarak, Th hücre altgruplarından biri olan Th9 hücreleri tarafından IL-9 üretildiği ve eozinofilik inflamasyona, mukus aşırı üretimine ve hava yolu hiperreaktivitesine katkıda bulunduğu bilinmektedir (Boonpiyathad ve ark. 2019).

Sonuç olarak süre gelen eozinofil infiltrasyonu ve degranülasyonu, major bazik protein (MBP), eozinofil katyonik protein, eozinofil-türevli nörotoksin ve eozinofil peroksidazın devamlı salınımıyla sonuçlanmaktadır. Bu durum hava yolu epitel hasarına, goblet hücrelerinden aşırı mukus üretimine, ve bronşiyal aşırı duyarlılığa katkıda bulunmaktadır. Ayrıca eozinofillerden salınan sisteinil lökotrienlerin (LTC₄, LTD₄, LTE₄) de bronkokonstriksiyonu, mukus aşırı sekresyonunu, ve eozinofillerin aktivasyonunu indüklediği bildirilmiştir (Bandeira-Melo ve ark. 2002; Peters-Golden ve

Henderson 2007; Hallstrand ve Henderson 2010; Hall ve Agrawal 2014; Pelaia ve ark. 2017).

Eozinofillerden salınan MBP'nin M2 reseptörün allosterik antogonisti olarak, asetilkolinle M3 reseptörünün kontrol edilemez düzeyde stimülasyonuna bağlı olarak bronkokonstriksiyonda rol oynadığı belirtilmiştir (Jacoby ve ark. 1993; Bakakos ve ark. 2019). Ayrıca eozinofillerden lökotrienlerin salınmasının, bronkokonstriksiyona ve mast hücresi ve bazofilleri aktiveştirerek prostaglandin, histamin ve daha fazla lökotrienin salınımına sebep olup, süre gelen inflamasyona katkıda bulunduğu belirtilmiştir (Kay 1983; Bakakos ve ark. 2019) Bunlara ek olarak, eozinofillerin oluşturduğu proinflamatuvar mediyatörlerin yanı sıra, T lenfositlerine antijen peptidlerini sunarak alerjik inflamasyonda rol oynadığı da belirtilmektedir (Jacobsen ve ark. 2012; Pelaia ve ark. 2017)

Yetişkinlerde görülen geç başlangıçlı eozinofilik astımın ise çoğunlukla non-alerjik olduğu belirtilmiştir. Eozinofilik non-alerjik astımda ILC2'lerin merkezi bir rol üstlendiği belirtilmiştir. IL-5 ve IL-13 üreten ILC2'lerin aktivasyonunun eşlik ettiği alerjiden bağımsız sinyallerle ortaya çıkabildiği bildirilmiştir (Yu, Kim ve ark. 2014; Smith ve ark. 2016; Pelaia ve ark. 2017; Nelson ve ark. 2020).

Sonuç olarak alerjen-spesifik Th2 lenfositleri veya alerjen-bağımsız doğal ILC2 ile aktiveşen iki farklı proinflamatuvar yolağın, astımda eozinofilik hava yolu inflamasyonundan önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir (Pelaia ve ark. 2017).

2.4.2.2. Nötrofilik İnflamasyon

Doğal immün mekanizmalar, viral veya bakteriyel infeksiyonlar, endotoksin, ve ozon gibi çevresel çeşitli uyaranlara bağlı olarak aktif olmaktadır (Carr ve ark. 2018). Doğal immün sistem, patojen ilişkili moleküler kalıplar (PAMP, Pathogen-Associated Molecular Patterns) ile aktiveşmektedir. Birçok mikroorganizmada mevcut olan lipopolisakkarid (LPS) gibi PAMP'lar, Toll-benzeri reseptörler (TLR) gibi kalıp tanıma reseptörler (PRR) tarafından tanınmaktadır (Janeway ve Medzhitov 2002; Simpson ve ark. 2007). TLR aktivasyonu bir dizi olaylar kaskadını tetikleyerek nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) aktivasyonu ve dolayısıyla tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), IL-8 ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokin yanıtı ile sonuçlanmaktadır. NF- κ B aktivasyonu, pro-IL-1 β

ve pro-IL-18 sitokinlerin ekspresyonunu indüklemektedir (Reed ve Milton 2001; Sabroe ve ark. 2002; Simpson ve ark. 2007; Pelaia ve ark. 2017).

İnflamasyonun önemli ve potent indükleyicisi oldukları bilinen inflamazomlar, çeşitli ekzojen, endojen ve patojenik tehlike sinyallerine cevap olarak proinflamatuvar sitokinlerin maturasyonu ve salınımlarında rol alan multi-protein kompleks yapılarıdır (Schroder ve Tschopp 2010; Kim ve ark. 2015). Enfeksiyona, inflamasyona veya strese bağlı olarak salınan PAMP ve hasarla ilişkili moleküler kalıplar (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMP) ile gelişen tehlike sinyalleriyle inflamazomların aktivasyonu, bir grup olaylar zincirinin başlamasında rol oynamaktadır (Kim ve ark. 2015). En iyi tanımlanmış inflamazomlardan biri olan NLRP3, kaspaz-1'in aktivasyonuna neden olmakta ve pro-IL-1 β ve pro-IL-18'i aktif formları olan IL-1 β ve IL-18'e dönüştürmektedir. Nötrofilik astımda hava yollarında NLRP3 ve kaspaz-1 seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (Simpson ve ark. 2014). NLRP3 kompleksinin aktivasyonu ve takiben kaspaz-1'in oluşumu için inflamatuvar koşullarda hücre tarafından oluşturulan ekstraselüler ATP gibi DAMP'ların mevcudiyetinin gerektiği bildirilmiştir (Schroder ve Tschopp 2010; Kim ve ark. 2015). Sonuç olarak maksimal düzeyde IL-1 β için iki farklı sinyal gerekmektedir. Bunlar; pro-IL-1 β ekspresyonunu indükleyen PAMP'lar ve DAMP'lar ile indüklenen inflamazom kompleks oluşumu, aktivasyonu ve kaspaz-1 aracılı pro-IL-1 β 'nın maturasyonu ile aktif IL-1 β salınımlarıdır (Schroder ve Tschopp 2010; Kim ve ark. 2015). Bu mekanizma üzerinden aktif IL-1 β , T yardımcı hücre 17'ye (Th17) bağlı inflamasyona katkıda bulunmaktadır (Pelaia ve ark. 2017).

CD4+Th hücreleri TGF- β , IL-6, IL-1 β ve IL-23 etkisi altında Th17 hücrelerine diferansiye olmaktadır. Th17 hücreleri hava yolu nötrofil inflamasyon gelişiminde önemli bir rol üstlenmektedir (Korn ve ark. 2009; Aujla ve Alcorn 2011; Cosmi ve ark. 2011).

Th17 hücrelerinden IL-17A, IL-17F ve IL-22 mediyatörleri salınmaktadır. IL-17A'nın hava yolu epitel hücrelerinde nükleer faktör-kappa B aktivasyonunu ve IL-8 gibi çeşitli nötrofil kemokinlerin sekresyonunu arttırmaktadır. Ayrıca, hava yolu epitel hücrelerinden, endotel hücrelerinden ve fibroblastlardan IL-6, IL-1 β ve Granülosit-Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör (GM-CSF) sekresyonunu arttırarak nötrofil infiltrasyonunda artışa sebep olduğu bildirilmiştir. IL-17A, IL17-F ve IL-22'nin hava

yolu yeniden yapılanmasına katkıda bulunmaktadır (Laan ve ark. 1999; Korn ve ark. 2009; Alcorn ve ark. 2010; Newcomb ve Peebles 2013). IL-17'nin Th17 hücreleri haricinde $\gamma\delta$ T hücreleri, sitotoksik T hücresi, invaryant NK T hücresi, NK hücreleri ve ILC3 hücrelerinden salınmaktadır (Alcorn ve ark. 2010; Yu, Kim ve ark. 2014).

Ayrıca IFN- γ ve TNF- α gibi Th1 sitokinlerinin nötrofilik astım hastalarında arttığı, dolayısıyla Th1 hücrelerinin havayolunda nötrofilik inflamasyona katkıda bulunabileceği de bilinmektedir. Yüksek IFN- γ 'nın nötrofilik inflamasyon, amfizem ve AHR'yi indüklediği belirtilmiştir. TNF- α 'nın ise başlıca makrofaj ve mast hücrelerinden salındığı ve nötrofil kemotaksisine neden olduğu bildirilmiştir (Thomas ve ark. 1995; Lee ve ark. 2011; Boonpiyathad ve ark. 2019). Astımda, özellikle kortikosteroid-dirençli ağır astım olmak üzere, Th1/IFN- γ ve Th17/IL-17 yanıtlarındaki artış önem arz etmektedir. Nötrofilik inflamasyon ile ağır astım ve astım atakları ilişkilendirilmiştir (Fahy ve ark. 1995; Wenzel ve ark. 1997; Raundhal ve ark. 2015; Ray ve ark. 2016; Ray ve Kolls 2017).

Nötrofiller patojenlere karşı birincil savunma hücresi olarak görev almanın yanı sıra çeşitli kemotaktik faktörlerin ve granül proteinlerin salınımını gerçekleştirerek infeksiyon bölgesine monosit ve makrofajların toplanmasında da rol almaktadır. Ayrıca, yeniden yapılanmaya bağlı hava yolunda daralma, artan AHR ve akciğer fonksiyonlarında hızlı çöküşte etkili oldukları bilinmektedir (Anticevich ve ark. 1996; Stănescu ve ark. 1996; Soehnlein ve ark. 2009; Nauseef ve Borregaard 2014; Ray ve Kolls 2017).

2.4.2.3. Miks Granülositik Hava yolu İnflamasyonu

Balgam eozinofil ve nötrofil miktarlarının her ikisinde de artış görülmesi durumu miks granülositik astım olarak sınıflandırılmıştır. Miks eozinofilik/nötrofilik inflamatuvar patern, Th2 ve Th17 hücrelerinin aktivasyonu ile ilişkili olduğu ve ağır astım fenotipleri ile ilişkilendirildiği bildirilmiştir (Simpson ve ark. 2006; Pelaia ve ark. 2017; Tliba ve Panettieri 2019).

2.4.2.4. Paucigranülositik Astım

Paucigranülositik astımda, balgamda eozinofil ve nötrofil seviyelerinde bir artış söz konusu değildir ve bu nedenle eozinofil veya nötrofil seviyelerini baskılamaya dayanan tedaviler hastalığın kontrolünde yetersiz kalmaktadır (Simpson ve ark. 2006; Wenzel 2006; Ntontsi ve ark. 2017; Svenningsen ve Nair 2017; Tliba ve Panettieri 2019).

Paucigranülositik astımın, hava yolu düz kası, sinirler, vasküler doku gibi yapısal hücrelerin disfonksiyonu veya anomalileri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Carr ve ark. 2018). Astımda hava yolu düz kaslarının, hava yolu obstrüksiyonuna neden olması dışında çeşitli kemokin ve sitokinleri salgılayarak inflamasyonda rol alıyor olabileceği de bildirilmiştir (Panettieri 2002; Panettieri ve ark. 2008; Carr ve ark. 2018). İnflamasyonun, hava yolu düz kası, epitel hücreler gibi yapısal hücrelerin proinflamatuvar aktivasyonuna bağlı olarak gelişebileceği düşünülmektedir (Pelaia ve ark. 2017).

Ayrıca, çeşitli tetikleyici faktörlere bağlı olarak, miyofibroblastlar, epitel hücreler, düz kaslar gibi yapısal hücrelerin fonksiyonlarında meydana gelen değişimlerin AHR'ye neden olabildiği belirtilmiştir (Tliba ve Panettieri 2019).

2.4.3. Hava Yolunda Yeniden Yapılanma

Hava yolunda yeniden yapılanma, astım hastalarının hava yolunda görülen yapısal değişiklikler ile meydana gelmektedir. Bu yapısal değişiklikler arasında; epitelyal bütünlüğün kaybı, bazal membran kalınlaşması, subepitelyal fibrozis, goblet hücreleri ve submukozal bezlerde hiperplazi/hipertrofi, düz kas kütlelerinde artma, azalan kartilaj bütünlüğü ve hava yolunda artan damarlanma yer almaktadır (Naylor 1962; Roche ve ark. 1989; Aikawa ve ark. 1992; Carroll ve ark. 1993; Li ve Wilson 1997; Elias ve ark. 1999; Haraguchi ve ark. 1999; Tanaka ve ark. 2003; Bergeron ve ark. 2009).

Epitelyal dökülme, siliyer hücre kaybı ve goblet hücre hiperplazisi olmak üzere astımda çeşitli epitelyal değişiklikler tanımlanmıştır. Ancak epitel dökülmesinin astımın patolojik bir özelliği olarak mı yoksa örnekleme tekniği ile ilişkili bir artefakt olarak mı

değerlendirilmesi gerektiği hususunun tartışmalı olduğu belirtilmiştir. Öte yandan, hava yolu epitel hücre fonksiyonlarındaki bozulmanın astım patogeneğinde önemli bir bileşen olduğunun bilindiği vurgulanmıştır (Naylor 1962; Aikawa ve ark. 1992; Carroll ve ark. 1993; James ve Wenzel 2007; Bergeron ve ark. 2009; Fehrenbach ve ark. 2017).

Goblet hücrelerde görülen artış ve submukozal bezlerde büyüme aşırı mukus oluşumuna neden olmaktadır. Aşırı mukus sekresyonu hava akımı kısıtlanmasına neden olup hava yolunda daralmaya katkıda bulunmaktadır. T hücre kaynaklı tip 2 sitokinlerin, özellikle IL-13'ün goblet hücre hiperplazisi ve mukus üretimini tetiklediği bilinmektedir (Sumi ve Hamid 2007; Fahy ve Dickey 2010; Pelaia ve ark. 2017).

Hava yolu yeniden yapılanmasının en önemli histopatolojik özelliklerinden biri de subepitelyal fibrozistir. Lamina retikularis olarak da bilinen retiküler bazal membranda (RBM) kalınlaşma söz konusudur. RBM'de kalınlaşma, kollajen I, III ve V olmak üzere artan ekstraselüler matriks birikiminden kaynaklanmaktadır (Homer ve Elias 2005; Shifren ve ark. 2012; Pelaia ve ark. 2017). Subepitelyal yeniden yapılanma da Th2 sitokinlerinin ve Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β (TGF- β)'nın etkili olduğu bilinmektedir (Batra ve ark. 2004; Doherty ve Broide 2007; Pelaia ve ark. 2017). TGF- β , epitel hücreler, makrofajlar, fibroblastlar, lenfositler ve eozinofiller tarafından üretilmektedir. Yara onarımında, çeşitli ekstraselüler matriks proteinlerinin ifade ve salınımlarını artırmakta, ve parçalanmasını engellemektedir (Shifren ve ark. 2012). Ancak çeşitli hastalık durumlarında aşırı TGF- β üretiminin patolojik doku fibrozisi ve bunu takiben doku fonksiyonlarında bozulmayla sonuçlandığı belirtilmiştir. Astımda, hava yollarında ve bronkoalveolar lavaj sıvısında (BALF'ta), kontrol grubuna kıyasla TGF- β ifadesinin arttığı bildirilmiştir (Ohno ve ark. 1996; Minshall ve ark. 1997; Branton ve Kopp 1999; Shifren ve ark. 2012). Ekstraselüler matriks birikiminin, ekstraselüler matriks moleküllerinin yıkımından sorumlu matriks metalloproteinazlar ile metalloproteinazın doku inhibitörleri arasındaki dengenin bozulmasıyla da ilişkilendirildiği belirtilmiştir (Visse ve Nagase 2003; Shifren ve ark. 2012; Pelaia ve ark. 2017). TGF- β 'nın, metalloproteinaz oluşumunu azalttığı, doku inhibitörlerinin ise sentezini stimüle ettiği belirtilmiştir (Makinde ve ark. 2007; Pelaia ve ark. 2017). Ayrıca TGF- β 'nın bronşiyal fibroblastların proliferasyonunu ve ekstraselüler matriks proteininin başlıca üreticilerinden miyofibroblasta farklılaşmalarında rol aldığı bildirilmiştir (Wynn 2007; Pelaia ve ark. 2017).

Bunlara ek olarak, astımda hava yollarında düz kas kütlesinde artış söz konusudur. Bu artışta hava yolu düz kas hücrelerindeki hiperplazi ve hipertrofinin etkili olduğu belirtilmektedir. Hava yolları düz kas tabakasında kalınlaşma bronşiyal yeniden yapılanma ve aşırı yanıt verirliliğine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca düz kas hücrelerinin, inflamatuvar ve yeniden yapılanma üzerinde proinflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve ekstraselüler matriks protein salınımı ile aktif rol alarak astım patogenezeine katkıda bulunabildiği belirtilmektedir (Hakonarson ve ark. 1999; Johnson 2001; Panettieri 2002; Bergeron ve ark. 2009; Pelaia ve ark. 2017) .

Hava yolu yeniden yapılanmasında etkili bir diğer faktör ise, artan bronşiyal neovaskülarizasyondur. Bunun sonucunda artan vasküler konjesyon, hava yolunda ödem ve inflamasyon ile hastalığın seyri kötüleşmektedir (Li ve Wilson 1997; Tanaka ve ark. 2003; Homer ve Elias 2005; Shifren ve ark. 2012).

2.5. Astım Tedavisi

2.5.1. Astımda Farmakolojik Tedavi

Astımın radikal tedavisi henüz bulunmamaktadır. Astım tedavisinde temel amaç hastalığın klinik olarak kontrolünü sağlamak ve sürdürmektir. Bu prensiple, tedavide kullanılan ilaçlar kontrol edici ilaçlar ve rahatlatıcı/semptom giderici ilaçlar olmak üzere iki alt başlıkta incelenmektedir. Kontrol edici ilaçların amacı anti-inflamatuvar etkileriyle hastalığın klinik olarak kontrol altında tutulmasıdır. Rahatlatıcı ilaçlar ise hastalığın semptomlarını gidermeye yönelik olarak hızla etki eden ve gerektiğinde kullanılan ilaçlardır. Kontrol edici ilaçların arasında inhale ve sistemik steroidler, inhale steroidlerle birlikte kullanılan uzun etkili inhale beta2-agonistleri, lökotrien antagonistleri, yavaş salınan teofilin, uzun etkili antikolinerjikler, anti-IgE tedavisi ve diğer çeşitli tedavilerin yer aldığı belirtilmiştir. Rahatlatıcı ilaçların ise hızlı etkili inhale beta2 agonistleri, inhale kısa etkili antikolinerjik ilaçlar, kısa etkili teofilin, kısa etkili oral beta2-agonistleri ve acil durum tedavisinde ilave magnezyum ve sistemik steroidleri içerdiği bildirilmiştir (Türk Toraks Derneği 2016).

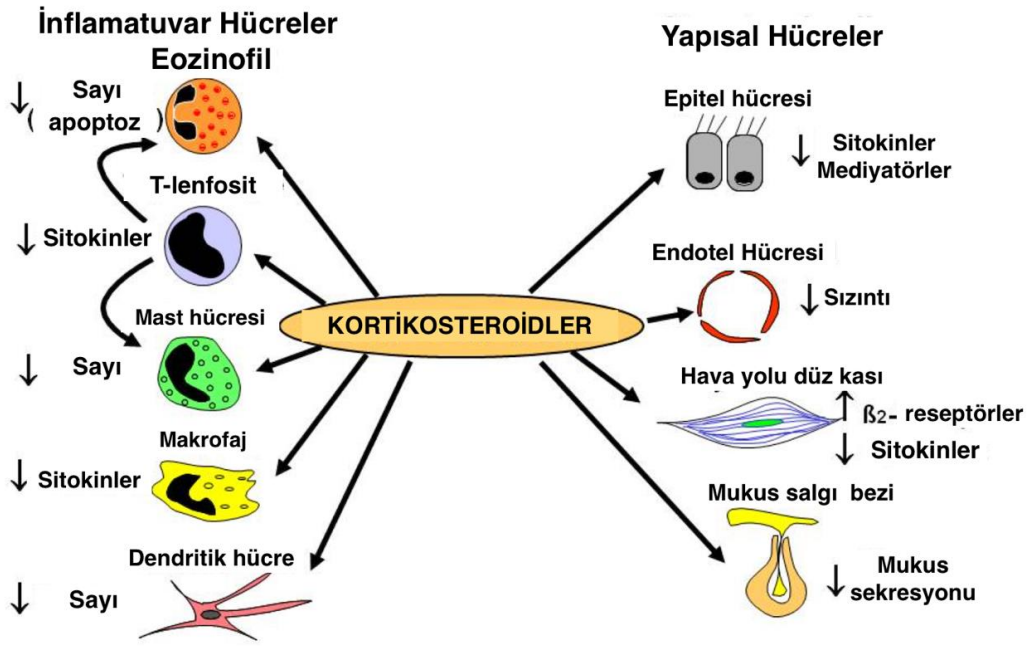
2.5.2. Kortikosteroidler

Kortikosteroidler hücre membranından diffüze olarak sitoplazmik glukokortikoid reseptörlerin (GR) aktivasyonuna neden olmakta ve sonrasında nükleusa translokasyonları ile çeşitli genlerin transkripsiyonel aktiviteleri üzerindeki etkileri ile hava yolu inflamasyonu baskılamaktadır (Holgate ve Polosa 2008).

Çeşitli anti-inflamatuvar genlerin transkripsiyonunu artırarak (transaktivasyon), çeşitli proinflamatuvar transkripsiyon faktörlerinin etkilerini inhibe ederek (transrepresyon) ve post transkripsiyonel aktiviteleri gibi genomik mekanizmalara ve sitoplazmik GR veya hücre membranı ile etkileşimleri üzerinden hücresel mekanizmalara bağlı olarak etki göstermektedir (Horvath ve Wanner 2006).

Kortikosteroidler, kemotaktik mediyatörlerin ve adezyon moleküllerin oluşumunu ve hava yolunda inflamatuvar hücrelerin bölgede toplanmasını engellemektedir. İnhal kortikosteroidler (ICS'ler) böylelikle hava yolundaki inflamatuvar hücre varlığını azaltmaktadır (Barnes 2010). Barnes (2010), kortikosteroidlerin hücresel etkilerini şekil halinde vermiştir (Şekil 2-4)

Epitel hücrelerin, ICS'lerin başlıca hücresel hedefi olabileceği belirtilmiştir. ICS'lerin, hava yolu epitel hücresinde çeşitli genleri baskıladığı bilinmektedir. IL-1 β , IL-6, eotaxin gibi çeşitli sitokinlerin, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), siklooksijenaz-2 (COX2) gibi enzimlerin, endotelin-1 gibi peptidlerin ve interselüler adezyon molekül-1 (ICAM-1) gibi çeşitli inflamatuvar genlerin transkripsiyonunu baskılamaktadır (Barnes 2010).



Şekil 2-4: Kortikosteroidlerin hücresel etkileri-Barnes (2010)’dan değiştirilerek

Kortikosteroidler, hava yolundaki inflamasyonu azaltarak ve ayrıca doğrudan submukozal salgı bezi üzerindeki etkileri ile de mukus sekresyonunu azaltmaktadır. Ayrıca, kortikosteroidlerin retiküler bazal membran kalınlığını azaltmakla birlikte, astımda artan hava yolu düz kas kütlesi üzerindeki etkilerinin tam olarak bilinmediği belirtilmiştir (Ramsahai ve Wark 2018)

Astım tedavisinde kortikosteroidlerin inhalasyon yolu ile uygulanması ilacın akciğere direkt ve lokal olarak etki etmesine ek olarak oral ve parenteral uygulamaya bağlı olarak gelişen sistemik yan etkileri azaltması nedeniyle tercih edilmektedir. Buna rağmen ICS’lerin lokal ve sistemik yan etkiler gösterdiği bilinmektedir. Lokal yan etkilere orofaringeal kandidiyaz, disfoni, irritasyona bağlı öksürük, bronkospazm örnek olarak verilebilir. Sistemik yan etkilerine ise osteoporoz, katarakt, glokom ve deri incilmesi örnek gösterilebilir (Hanania ve ark. 1995; Kelly ve Nelson 2003; Derendorf ve ark. 2006) .

ICS’ler persistan astım tedavisinin temelini oluşturmaktadır. ICS’lerin hava yolu inflamasyonu ve AHR’yi azalttığı, akciğer fonksiyonlarını iyileştirdiği, semptomların şiddetini azalttığı, akut astım ataklarını önlediği veya azalttığı bilinmektedir (Derendorf ve ark. 2006).

Günümüzde ICS'ler, uzun etkili $\beta 2$ agonistler (LABA) ve lökotrien reseptör antagonistleri başta olmak üzere kontrol edici tedavi seçenekleri ile birlikte, persistan astım tedavisinde başlıca tedavi seçeneği olarak değerlendirilmektedir (Bleecker ve ark. 2020).

Astımın kontrol altına alınamadığı ağır astım durumunda sistemik steroidlerin de etkili olduğu bilinmektedir. Ancak önemli yan etki riski kullanımını sınırlandırdığı belirtilmiştir. Bu yan etkiler arasında osteoporoz, hipertansiyon, diyabet, hipotalamo-hipofizer-adrenal aksın baskılanması, obezite, katarkt, glokom, deride stria oluşumu, kolay morluk oluşumuna yol açan deri incilmesi ve kas zayıflığı yer almaktadır (Türk Toraks Derneği 2016).

2.5.3. Beta-2 ($\beta 2$) Adrenoreseptör Agonistleri

$\beta 2$ adrenoreseptör agonistleri hava yolu düz kasında bulunan $\beta 2$ reseptörlerini doğrudan stimüle ederek bronkodilatasyon oluşturmaktadır. β reseptörlerin trakeadan terminal bronşiyollere kadar tüm hava yolu düz kasında varlığı bilinmektedir. $\beta 2$ adrenoreseptörler, G protein kenetli reseptör ailesindendir. Uyarıldığında adenilat siklaz aktivasyonu ile intraselüler siklik adenozin 3'-5' monofosfat (cAMP) artışına sebep olarak protein kinaz A aktivasyonu gerçekleşmektedir. Böylece havayolu düz kasında gevşeme sonucu bronkodilatasyon gerçekleşmektedir. Ayrıca, $\beta 2$ agonistler, mast hücrelerinden mediyatör salınımını (Histamin, LTD₄) inhibe ederek de bronkodilatör etkilerini göstermektedir (Calverly 2012).

Bu etkilerine ek olarak, nötrofil migrasyon ve aktivasyonunun inhibisyonunda, hava yolu kolinerjik nöronlardan nörotransmitter salınımı azalması ile kolinerjik refleks bronkokonstriksiyonun azalmasında rol oynamaktadır. Ayrıca duyuşal nöronlardan P maddesi gibi inflamatuvar ve bronkokonstriksiyona yol açan peptidlerin salınımının inhibisyonunda ve mukus sekresyon artışı üzerinde de etkili olduğu bilinmektedir (Calverly 2012).

$\beta 2$ agonist ilaçlar, kısa etkili β agonistler (SABA), uzun etkili β agonistler (LABA) ve ultra-uzun etkili β agonistler (Ultra-LABA) olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. SABA'lar hızlıca semptomların hafifletilmesinde, bronkokonstriksiyon ve astım ataklarına karşı kullanılmaktadır. Bronkoprotektif etkisinin dakikalar içinde

görüldüğü ve 4-6 saat kadar sürdüğü belirtilmiştir. Bu grupta salbutamol ve terbutalin yer almaktadır (Billington ve ark. 2017).

Formoterol ve salmeterolün yer aldığı LABA'lar ise uzun etkilidir. SMART (*Salmeterol Multicentre Asthma Research Trial*) ve diğer prospektif klinik çalışmalar ve meta-analiz çalışmaları sonucunda, LABA'nın monoterapi olarak, tek başına kullanılmaması gerektiği, astımda monoterapi olarak kullanımının kontrendike olduğu ortaya çıkmıştır (Castle ve ark. 1993; Nelson ve ark. 2006; Salpeter ve ark. 2006; Billington ve ark. 2017). LABA ile birlikte ICS uygulaması astımdaki tedavi yaklaşımlarından biridir. Ultra-LABA'lara örnek olarak indakaterol verilebilir ve indakaterolün 24 saat süren bronkodilatör etkisi olduğu ve tek doz kullanım kolaylığına sahip olduğu belirtilmektedir (Cazzola ve ark. 2019). Daha çok kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) tedavi yaklaşımlarından birisidir ve astım tedavisi için kullanılmadığı belirtilmiştir (Billington ve ark. 2017).

2.5.4. Antikolinergik İlaçlar

Astım hastalarında artan bronşiyal düz kas tonusu ve mukus hipersekresyonunun kolinerjik aktivite artışından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Quirce ve ark. 2015). Asetilkolinin hava yolu nöronlarından ve hava yolu epitel hücresi ve inflamatuvar hücreler gibi nöronal olmayan hücrelerden salındığı bilinmektedir (Gosens ve ark. 2006; Scott ve Fryer 2012). Hava yolu muskarinik reseptörlerine bağlanarak düz kas kasılmasını ve mukus sekresyonunu tetiklemektedir (Gosens ve Gross 2018). G protein kenetli reseptör familyasından olan muskarinik reseptörlerden M1, M2 ve M3 hava yolu fizyolojisi ve hastalıklarında rol almaktadır (Buels ve Fryer 2012; Gosens ve Gross 2018). M1 reseptörleri epitel hücresinde eksprese olup, elektrolit ve su sekresyonunda görev alırken, ganglialarda eksprese olarak parasempatik nörotransmisyonunda rol almaktadır. M2 reseptörleri parasempatik nöronlarda otoreseptör olarak asetilkolin salınımını sınırlandırmaktadır. Böylelikle vagal refleks bronkokonstriksiyon ve mukus sekresyonunu sınırlandırdığı belirtilmektedir. M3 reseptörler ise submukozal salgı bezinden mukus sekresyonu ve hava yolu düz kas kasılmasında görev alan başlıca reseptör alttipi olarak bilinmektedir (Quirce ve ark. 2015; Gosens ve Gross 2018).

Astımlı bir hava yolunda nöral aktivitenin arttığı belirtilmiştir ve M1 ve M3 reseptörlerinde asetilkolin sinyalinde artış ve M2 reseptöründe disfonksiyonunun artan bronkokonstriksiyona, mukus sekresyonuna, inflamasyona ve hava yolu yeniden yapılanmasına katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Gosens ve Gross 2018).

Astım tedavisinde bu grup ilaçlar arasında, ipratropium ve tiotropium yer almaktadır. İpratropium muskarinik reseptörlerin tüm alt tiplerine non-selektif olarak bağlanan, muskarinik reseptör antagonisti olarak, kısa etkili bir antikolinerjiktir (SAMA), ve β_2 agonistlerle birlikte kombinasyonu akut ve kronik astımda geri dönüşlü hava yolu obstrüksiyonu için bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilmektedir. Tiotropium ise fonksiyonel olarak M3 reseptörüne selektif, uzun etkili bir antikolinerjiktir (LAMA) ve astım tedavisinde ICS ve LABA'ya ilave tedavi seçeneği olduğu belirtilmiştir (Gosens ve Gross 2018; Waller ve Sampson 2018).

2.5.5. Lökotrien Reseptör Antagonistleri

Sisteinil lökotrienler (LTC₄, LTD₄, LTE₄), araşidonik asit metabolizmasının 5-lipooksijenaz yolağı üzerinden oluşan lipid mediyatörlerdir ve aktif olan mast hücreleri ve eozinofiller olmak üzere çeşitli hücrelerden salınmaktadır (Scott ve Peters-Golden 2013; Waller ve Sampson 2018).

Sisteinil lökotrienler oldukça potent endojen bronkokonstriktörlerdir. Bronkokonstriksiyonun yanı sıra hava yolu ödemine, artan mukus sekresyonuna ve hava yolu eozinofilisine katkıda bulundukları bilinmektedir (Montuschi 2010; Waller ve Sampson 2018). Sisteinil lökotrienlerin astım patofizyolojisi ile ilişkili etkilerinin çoğu, CysLT1 reseptörünün aktivasyonu aracılığıyla gerçekleşmektedir (Montuschi ve ark. 2007; Peters-Golden ve Henderson 2007).

Sisteinil lökotrien reseptör 1, CysLTR1, G-protein kenetli reseptör ailesindendir ve monositler, makrofajlar, eozinofiller, bazofiller, mast hücreleri, nötrofiller, lenfositler, pluripotent hemopoetik kök hücresi, hava yolu düz kas hücreleri, bronşiyal fibroblastlar ve vasküler endotel hücrelerinde eksprese olmaktadır (Lynch ve ark. 1999; Figueroa ve ark. 2001; James ve ark. 2006; Montuschi 2010). Sisteinil lökotrienlerin CysLTR1 ile etkileşimi, kronik eozinofilik hava yolu inflamasyonu, bronkokonstriksiyon, AHR, mukus hipersekresyonu ve hava yolu yeniden yapılanması

olmak üzere bronşiyal astım immünopatogenezinde rol oynamaktadır (Peters-Golden ve Henderson 2007; Theron ve ark. 2014).

Montelukast ve zafirlukastın da içinde yer aldığı Lökotrien Reseptör Antagonistleri (LTRA) sisteinil lökotrienler ile indüklenen bronkokonstrisyonu, bronş düz kasında CysLTR1'i bloke ederek inhibe etmektedir (Waller ve Sampson 2018). Hava yolu düz kasında CysLTR1 antagonizmasının, bronkospazmı ve AHR'yi azalttığı belirtilmiştir (Albertson ve ark. 2015). LTRA'nın, CysLTR1'in blokajına bağlı olarak ve nötrofil, monosit ve makrofaj hücreleri üzerindeki etkileriyle CysLTR1 antagonizmasından bağımsız olarak, antiinflamatuvar etkinlik gösterdikleri de bilinmektedir (Tintinger ve ark. 2010; Theron ve ark. 2014).

2.5.6. Metilksantinler

Teofilin hem bronkodilatör hem de antiinflamatuvar etkili bir metilksantindir. Başlıca fosfodiesteraz (PDE) 3 olmak üzere bir PDE inhibitörü olarak, cAMP ve siklik guanozin monofosfat (cGMP)'ın katabolizmasını önleyerek, cAMP ve cGMP'nin intraselüler artışına bağlı olarak düz kaslarda gevşemeye yol açmaktadır (Dineley ve Malaiyandi 2019). Ayrıca teofilinin adenosin reseptörünün potent antagonisti olduğu bilinmektedir ve mast hücre adenosin reseptör antagonizması ile, mast hücre degranülasyonunu ve LT, histamin ve çeşitli inflamatuvar faktörleri inhibe ederek de bronkodilatör etki gösteriyor olabileceği belirtilmiştir (Waller ve Sampson 2018; Dineley ve Malaiyandi 2019).

Teofilin düşük konsantrasyonda histon deasetilaz (HDAC)'ı aktive etmektedir. Antiinflamatuvar etkinliğinin, temel olarak artan HDAC aktivitesi ile ilişkili olduğu ve artan HDAC aktivitesi ile inflamasyonla bağlantılı çeşitli gen transkripsiyonlarının baskılandığı belirtilmiştir. Teofilinin HDAC üzerindeki etkinliğinin, kortikosteroidlerin antiinflamatuvar etkisini arttırabileceği bildirilmiştir (Waller ve Sampson 2018; Dineley ve Malaiyandi 2019). Ayrıca düşük konsantrasyonlarda, diyafram kas kontraktilesini ve böylece akciğer ventilasyonunu arttırabildiği belirtilmiştir (Waller ve Sampson 2018; Dineley ve Malaiyandi 2019).

Teofilinin özellikle yüksek dozlarda önemli yan etkilere neden olabildiği bu nedenle dikkatli doz seçimi ve plazma düzeyi izlemi gerektirdiği belirtilmiş ve bu durumun kullanımını kısıtladığı bildirilmiştir (Türk Toraks Derneği 2016).

2.5.7. Monoklonal Antikor Tedavileri

Bu gruptaki ilaçlardan biri olan Omalizumab, serbest IgE antikorunun C3 epsilon bölgesine bağlanan ve böylece IgE reseptörü ile etkileşimini engelleyen bir humanize bir monoklonal antikorudur (Tourangeau ve ark. 2011; Pelaia ve ark. 2017). Omalizumab IgE'ye bağlanmakta ve serbest IgE seviyesini azaltmaktadır. Böylelikle IgE'nin mast hücresi, bazofil, eozinofil ve dendritik hücrelerde eksprese olan reseptörlerine bağlanmasını engellemektedir. Bu durum, mast hücre ve diğer inflamatuvar hücrelerden IgE aracılı inflamatuvar mediyatörlerin salınımının, Th hücrelerine IgE-bağlı antijen sunumunun ve alerjik yanıt oluşumunun inhibisyonuyla sonuçlanmaktadır (D'Amato 2006; Pelaia ve ark. 2017). Omalizumab uygulanması sonrasında, serum serbest IgE hızla düşmektedir ve ayrıca alerjik yanıt oluşumunda görev alan çeşitli hücrelerde yüksek afiniteli IgE reseptörlerinin ekspresyonunun da azaldığı bilinmektedir (MacGlashan ve ark. 1997; Prussin ve ark. 2003; Lin ve ark. 2004; D'Amato 2006; Pelaia ve ark. 2017). Omalizumab'ın serbest plazma IgE seviyelerini ve alerjik yanıtta sorumlu inflamatuvar hücrelerde yüksek afinite reseptör yoğunluğunu azaltarak etki gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca IgE sentezini baskıladığı da bildirilmiştir (D'Amato 2006; Pelaia ve ark. 2017).

Monoklonal antikor tedavi yaklaşımlarından bir diğeri ise IL-5'i hedef alan monoklonal antikorlardır. IL-5'in eozinofillerin maturasyonunda, proliferasyonunda, aktivasyon ve hayatta kalımında başlıca rol oynayan bir sitokin olması, IL-5'i eozinofilik astım tedavisinde, terapötik bir hedef olarak seçilmesine neden olmuştur (Pelaia ve ark. 2017). Eozinofil fonksiyonlarını inhibe etmeyi amaçlayan bu monoklonal antikorlar arasında mepolizumab, reslizumab ve benralizumab yer almaktadır (Pelaia ve ark. 2017). Mepolizumab ve Reslizumab humanize anti-IL-5 monoklonal antikorlarıdır ve IL-5'e bağlanıp, IL-5'in reseptörü IL-5R α ile etkileşimini inhibe etmektedir. Benralizumab ise IL-5 reseptör α (IL-5R α)'yı direkt olarak hedef almakta ve bloke etmektedir (Pelaia ve ark. 2017). Bir diğer tedavi grubu ise hem IL-4 hem de IL-13'ün ortak reseptörü olan IL-4R α 'yı hedef almaktadır. IL-4 ve IL-13 Th2

inflamasyonunda önemli bir rol oynar ve B lenfositleri üzerindeki etkileri ile IgE sentezlenmesinde rol alırlar (Finkelman ve ark. 1990; Murdoch ve Lloyd 2010). Ayrıca hava yolu düz kas kontraktilitesini artırmakta ve hava yolunda eozinofil toplanmasını indüklemektedirler. Bunun yanı sıra IL-13'ün hava yolu yeniden yapılanmasında rol oynadığı ve mukus üretimini de stimüle ettiği belirtilmiştir (Pelaia ve ark. 2017). IL-4 ve IL-13'ü hedef alan bir terapötik yaklaşım olan, Dupilumab, insan anti-IL-4R α monoklonal antikordur ve hem IL-4 hem de IL-13 tarafından aktif edilen sinyal yollarını inhibe ederek etkisini göstermektedir (Pelaia ve ark. 2017).

2.5.8. Astımda Non-Farmakolojik Girişimler

İlaç tedavilerinin yanı sıra çeşitli non-farmakolojik girişimler de mevcuttur (GINA 2019). Bu yaklaşımlardan bazıları şunlardır:

- Tütün kullanımından kaçınılması: Sigara kullanımından kaçınılmasının, akciğer fonksiyonlarını iyileştirdiği ve hava yolu inflamasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Chaudhuri ve ark. 2006; GINA 2019).

- Fiziksel aktivite: Fiziksel aktivitenin, tek başına, akciğer fonksiyonları ve astım semptomları üzerinde spesifik bir faydasının olmadığı düşünülmektedir ancak fiziksel aktivitenin kardiyovasküler hastalık riskini azalttığı, yaşam kalitesini yükselttiği ve kardiyopulmoner fonksiyonların sağlıklı işleyişinde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (Carson ve ark. 2013; GINA 2019). Genç astım hastalarında, yüzücü olanların, akciğer fonksiyonların ve kardiyopulmoner fonksiyonların sağlıklı işleyişinde etkili olduğu fakat havuzda mevcut klor ile maruziyet nedeniyle çeşitli kaygıların mevcut olduğu da bildirilmiştir (Beggs ve ark. 2013; GINA 2019). Genel olarak sağlık üzerindeki faydaları nedeniyle düzenli fiziksel aktivite önerilmektedir (GINA 2019).

- Mesleksel maruziyetten kaçınma: Mesleksel olarak alerjen ve duyarlılaştırıcılardan maruziyetten korunmak önem taşımaktadır. Çeşitli mesleksel alerjenlere duyarlı hale gelen kişilerde gelişen atakların ciddi boyutlara ulaşabildiği belirtilmiştir (GINA 2019).

- Beslenme: Sağlıklı beslenme alışkanlığı kazanma ve obez hastalarda kilo vermenin desteklenmesi sağlanmalıdır (GINA 2019).

- Astımı kötüleştiren ilaçlardan kaçınma: Aspirin ve diğer non-steroidal antiinflatuvar ilaçların ciddi astım ataklarına neden olabileceği belirtilmektedir. Ayrıca beta-bloker ilaçların bronkospazma neden olabileceği bildirilmiştir. Ancak beta blokerlerin kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki faydalı etkileri bilinmektedir. Bu sebeple tedavideki kullanımlarının riskleri ve yararları açısından iyi değerlendirilmesi gerektiği belirtilmiştir (Szczelek ve ark. 2000; Covar ve ark. 2005; Olenchock ve ark. 2009; GINA 2019).

2.6. Deneysel Alerjik Astım Fare Modelleri

Deneysel olarak alerjik astımın geliştirildiği fare modelleri, insanlarda tekrarlanan alerjen maruziyeti ile gelişen astım patofizyolojisini aydınlatmak amacıyla geliştirilmektedir. Bu amaçla en yaygın kullanılan alerjenlerden biri, Ovalbumin (OVA)'dır (Chapman ve ark. 2014; Aun ve ark. 2017) Tavuk yumurtasından elde edilen OVA, alerjik astım gelişiminde rol alan inflamatuvar mekanizmaların anlaşılması için kullanılmaktadır. Geniş ölçüde eozinofil, T hücreleri ve makrofaj infiltrasyonu ile bronkopulmoner inflamasyona ve aynı zamanda hava yolları hiperreaktivitesine sebep olduğu bilinmektedir (Mehlhof ve ark. 1997; Gonzalo ve ark. 1998; Wills-Karp ve ark. 1998; Mathew ve ark. 2001; Pichavant ve ark. 2007). Literatürde OVA ile indüklenen astım fare modeli üzerine birçok protokol bulunmaktadır ve günümüze kadar bu model kullanılarak yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Bu metodun temelinde ise, OVA ile duyarlılaştırma ve onu takiben OVA uyarımı gerçekleştirilmektedir (Nials ve Uddin 2008; Yasuda ve ark. 2020).

OVA ile indüklenen astım modelinin genel kullanımında, OVA, alum gibi bir adjuvan ile birlikte intraperitoneal yolla uygulanarak, farelerde duyarlılaşma işlemi gerçekleştirilir. Birkaç gün içerisinde farenin immün sistemi antijene karşı reaksiyon geliştirir ve bu işlemle ovalbumin-spesifik IgE üretimi indüklenir. Duyarlılaşmayı takiben, OVA'nın aerosol halde direkt olarak akciğere tekrardan uygulanması sonucunda uyarım gerçekleştirilir. Uyarım sonucunda, hava yolunda eozinofil toplanması, hava yolu aşırı duyarlılığı ve epitelyal kalınlaşma ile karakterize inflamatuvar yanıtın oluşması gerçekleşir (Kips ve ark. 2003; Bates ve ark. 2009).

Intraperitoneal ve subkütan yollarla duyarlılaştırma işlemi, insanlardaki duyarlılaşma ile benzerlik göstermemektedir (Yasuda ve ark. 2020). Buna ek olarak OVA'nın hava yolu inflamasyonunu insanlarda indüklemeyeceği belirtilmektedir (Aun ve ark. 2017). Bu nedenle, son yıllarda, HDM, *Alternaria alternata* ve hamamböceği ekstraktı gibi klinik ile bağlantılı alerjenlerin önem kazandığı ifade edilmiştir (Debeuf ve ark. 2016).

Ev tozu akarı (House Dust Mite), insanların deri döküntüleriyle beslendiği bilinen ve alerjiye neden olan bir eklem bacaklıdır (Debeuf ve ark. 2016). Dışkılarında ihtiva ettikleri alerjenler ile insanlarda da astımın önemli tetikleyicilerinden biridir. Alerjik yapıları cansız vücut ve dışkılarında kaynaklanmaktadır (Yasuda ve ark. 2020). HDM alerjenleri otuzdan fazla grup halinde sınıflandırılmıştır. Özellikle, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) ve *Dermatophagoides farinae* (Der f), iç mekan alerjenlerinin başlıca kaynakları olarak nitelendirilmiştir (Jacquet ve Robinson, 2020; Yasuda ve ark. 2020). İntrinsik enzimatik aktivitesinin olması, immünojenitesi ve doğal immün hücreler üzerinden doğrudan alerjik inflamasyonu aktive edebilmesi başlıca önemli özelliklerindendir (Aun ve ark. 2017). Yapılan araştırmalarda, inhale edilen HDM ekstraktının, Th2 immün yanıtın oluşumunu stimüle ettiği gösterilmiştir (Hammad ve ark. 2010; Willart ve ark. 2012; Lambrecht ve Hammad 2015; Schuijs ve ark. 2015; Debeuf ve ark. 2016) Sonuç olarak HDM ekstraktlarının inhale edilmesine dayalı ve klinikle bağlantılı fare astım modellerinin geliştirilebilmesi mümkün olmuştur (Debeuf ve ark. 2016).

2.7. Yağ Asidi Bağlayıcı Proteinler

Yağ asidi bağlayıcı proteinler (FABP), doymuş ve doymamış yağ asitleri, eikozanoidler ve diğer lipidler gibi hidrofobik ligandlara geri dönüşlü olarak bağlanan, 14-15 kilodaltonluk lipid şaperonlarıdır. Lipid aracılı biyolojik proseslerin ve metabolik homeostazın regülasyonunda merkezi bir rol oynamaktadır (Furuhashi ve Hotamisligil 2008). İlk olarak 1972 yılında, sıçan jejunumunda tespit edilmiş ve uzun zincirli yağ asitlerine non-kovalent bağlanabilen, düşük moleküler ağırlıklı yaklaşık 12kDa'luk intraselüler bir protein olarak tanımlanmıştır (Ockner ve ark. 1972).

Günümüze kadar, bu grubun dokuz farklı izoformu tanımlanmıştır. Bunlar karaciğer FABP (L-FABP, FABP1), intestinal FABP (I-FABP, FABP2), kalp FABP (H-FABP, FABP3), adiposit FABP (A-FABP, FABP4, aP2), epidermal FABP (E-FABP, FABP5, mal1), ileal FABP (Il-FABP, FABP6), beyin FABP (B-FABP, FABP7), myelin FABP (M-FABP, FABP8) ve testis FABP (T-FABP, FABP9)'dir. Birer lipid şaperonları olarak FABP'ler, lipidlerin hücre içinde spesifik kompartmanlara depolanmak üzere lipid damlacıklarına, membran sentezi veya çeşitli sinyal bildirimleri için endoplazmik retikuluma, oksidasyon için mitokondri veya peroksizoma, çeşitli lipid-aracılı transkripsiyonel regülasyonlar için nükleusa, enzimlerin aktivitesini regüle etmek için çeşitli enzimlere ve ayrıca lipidlerin hücre dışına taşınmasında aktif bir rol üstlenmektedir (Furuhashi ve Hotamisligil 2008). Bunun yanı sıra FABP'ler yağ asitlerinin hücre içine alımında da rol oynayabilmektedir. Taşıyıcı proteinlerden biri olan CD36 ile doğrudan etkileşim içinde olabileceği belirtilmiştir (Spitsberg ve ark. 1995). FABP1'in sterol alımındaki etkisi ile plazma membran lipid bileşimini etkileyerek, hücre membran akışkanlığını artırdığı gösterilmiştir (Woodford ve ark. 1993). FABP'lerin lipidleri nükleusa ileterek, PPAR gibi nükleer reseptörlere sunumunda da etkili oldukları bilinmektedir. Bu kapsamda, FABP5 ile PPAR β/δ , FABP4 ile PPAR γ gibi çeşitli FABP izoformlarının, PPAR izoformları ile etkileşimleri gösterilmiştir (Huang ve ark. 2002; Tan ve ark. 2002; Makowski ve ark. 2005; Adida ve Spener 2006; Ayers ve ark. 2007; Gillilan ve ark. 2007; Schroeder ve ark. 2008; Yu ve ark. 2012; Yu, Levi ve ark. 2014).

Ayrıca FABP'ler yağ asitlerinin eikozanoidlere dönüşümünde ve lökotrienlerin stabilizasyonunda rol almaktadır (Ek ve ark. 1997; Zimmer ve ark. 2004). Özellikle lipid biyosentezi, depolanması veya yıkımı gibi yağ asitlerinin önemli bir ligand görevi üstlendiği hepatosit, adiposit ve kardiyak miyositlerde, çözünür sitozolik proteinlerin %1-%5' lik kısmını oluşturmaktadır (Furuhashi ve Hotamisligil 2008).

FABP'lerin isimlendirildikleri dokular dışında da eksprese oldukları bilinmektedir. Karaciğer FABP, FABP1, hepatositlerde mevcut sitozolik proteinlerin %5'ini oluşturmaktadır (Haunerland ve Spener 2004). Aynı zamanda bağırsak, pankreas, böbrek, akciğer ve midede de eksprese olmaktadır (Chmurzyńska 2006). Kalp FABP miyokardiyumda fazla miktarda bulunmaktadır ayrıca iskelet kası, beyin, renal korteks, akciğer, testis, aorta, adrenal bez, meme bezi, plasenta, over ve kahverengi

adipoz dokuda da mevcuttur (Zanotti 1999; Chmurzyńska 2006; Furuhashi ve Hotamisligil 2008). Epidermal FABP, deri epidermal hücreleri dışında ayrıca adiposit ve makrofajlar, dendritik hücreler, dil, beyin, meme bezi, böbrek, karaciğer, akciğer ve testiste de bulunmaktadır (Makowski ve Hotamisligil 2005; Chmurzyńska 2006; Rolph ve ark. 2006; Furuhashi ve Hotamisligil 2008). Ancak FABP'lerin doku spesifik ekspresyonlarının nasıl regüle olduğu ve her birinin biyolojik fonksiyonları ve etki mekanizmaları henüz tam anlamıyla bilinmemektedir.

FABP'ler başlangıçta bir intraselüler protein olarak çalışıldı ise de, duyarlı deteksiyon sistemleri ve serum proteomiks çalışmaları sonucunda çeşitli FABP izoformları dolaşımında da tespit edildiği bilinmektedir (Hotamisligil ve Bernlohr 2015). Bu durum genel olarak hücre yaralanması/ölümleri ile ilişkilendirilmiştir (Hotamisligil ve Bernlohr 2015). Serum FABP3 seviyelerinin erken dönemde akut miyokard enfarktüsünde bir belirteç (biomarker) olarak değerlendirilebileceği ve kalp yetmezliğinde miyokardiyal hasarın tespiti ve değerlendirilmesinde kullanılabileceği öne sürülmüştür (Tanaka ve ark. 1991; Setsuta ve ark. 2002). İskemik bağırsak hastalarında plazma FABP2 seviyesinin arttığı görülmüştür (Kanda ve ark. 1996). Artan plazma FABP1 seviyesi karaciğer transplantasyonunda organ reddi ile ilişkilendirilmiştir. FABP1'in karaciğer hasarının erken tespiti için biyokimyasal bir belirteç olma potansiyeli üzerine çalışılmıştır (Pelsers ve ark. 2002).

FABP'lerden biri olan ve adiposit protein 2 (aP2) olarak da bilinen, FABP4 üzerinde yapılan çalışmalarda ise, hücre ölümü olmaksızın adipositlerden, ayrıca insan monosit hücre hattında yapılan çalışmada makrofajlardan, bir mekanizma üzerinden salındığı anlaşılmıştır (Cao ve ark. 2013; Schlottmann ve ark. 2014). Böylelikle, bu proteinlerden bazılarının düzenlenmiş bir sekresyonlarının olabileceği ve bir biyobelirteç olarak kullanılabilmek potansiyellerine ek olarak ekstraselüler çeşitli fizyolojik faaliyetlerinin de olabileceği anlaşılmıştır (Hotamisligil ve Bernlohr 2015).

2.8. Adiposit Protein 2 (aP2) ve Ekspresyonu

FABP'ler arasında, FABP4, diğer adıyla aP2, en iyi karakterize edilen izoformdur ve immünometabolik homeostazdaki rolü oldukça önemli ve dikkat çekicidir. İlk olarak olgun adiposit ve adipoz dokuda tespit edilmiştir (Spiegelman ve

ark. 1983; Hunt ve ark. 1986). Bu protein, miyelin P2 protein (M-FABP, FABP8) ile sekans benzerliğinden (%67) dolayı aynı zamanda adiposit P2 (aP2) proteini olarak isimlendirilmiştir (Hunt ve ark. 1986). Adipoz dokuda ve olgun adipositte en fazla miktarda bulunan proteinlerden biridir (Spiegelman ve Green 1980; Matarese ve Bernlohr 1988). aP2 ekspresyonu, preadipositin adiposite farklılaşması boyunca indüklenmektedir (Spiegelman ve Green 1980; Bernlohr ve ark. 1984). Ayrıca yağ asitleri, PPAR- γ agonistleri, insülin ve deksametazon ile transkripsiyonel olarak kontrol edilmektedir (Cook ve ark. 1988; Amri ve ark. 1991a; Amri ve ark. 1991b; Distel ve ark. 1992; Kletzien ve ark. 1992; Melki ve Abumrad 1993). Buna karşın omega-3 yağ asitleri ve sitagliptinin 3T3-L1 adipositlerde, aP2 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Furuhashi ve ark. 2015; Furuhashi ve ark. 2016).

İlk olarak adiposit yağ asidi bağlayıcı protein olarak tanımlanan aP2'nin yapılan araştırmalar sayesinde ekspresyon profilinin çeşitliliği gösterilmiştir. aP2 ekspresyonu ayrıca monositlerin makrofaja diferensiyasyonu boyunca ve forbol 12-miristat 13-asetat, lipopolisakkarid, PPAR- γ agonistleri ve ox-LDL ile indüklenmektedir (Pelton ve ark. 1999; Fu ve ark. 2000; Makowski ve ark. 2001; Fu ve ark. 2002; Kazemi ve ark. 2005). Buna karşın makrofajlarda, aP2 ekspresyonunu, atorvastatin ve metforminin azalttığı bilinmektedir (Llaverias ve ark. 2004; Song ve ark. 2010). Hem adipositlerde hem de makrofajlarda eksprese olduğu bilinen bir diğer yağ asidi bağlayıcı protein mal1 (FABP5)'dir (Furuhashi ve Hotamisligil 2008). Adipositlerde aP2 ile mal1 oranı yaklaşık olarak 99:1 iken, fizyolojik koşullarda makrofajlarda bu oran 1:1'dir (Simpson ve ark. 1999; Makowski ve ark. 2001; Furuhashi ve Hotamisligil 2008). Adipositlerde oldukça az bir fraksiyonda yer alan mal1'in, aP2'den yoksun (aP2^{-/-}) adipositlerde ekspresyonunun arttığı ve aP2 yoksunluğuna bağlı bir kompensasyon geliştirdiği gösterilmiştir, ancak bu durum makrofajlarda gözlenmemiştir (Hotamisligil ve ark. 1996; Makowski ve ark. 2001).

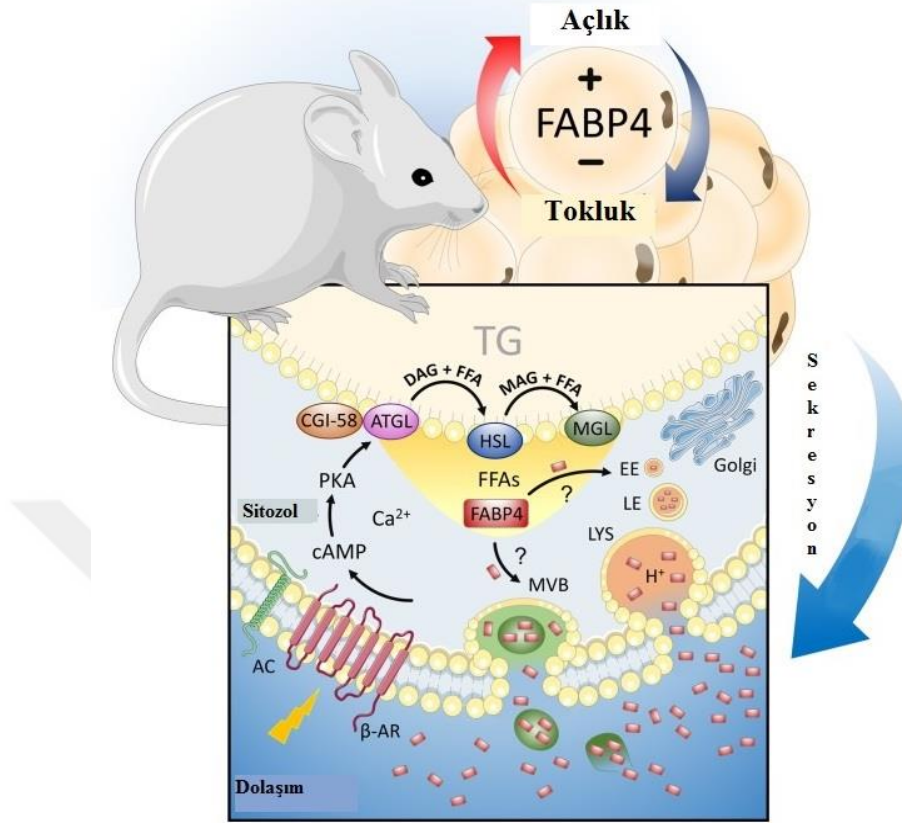
Buna ek olarak, diğer hücre tiplerinde de aP2 ekspresyonu tespit edilmiştir. aP2'nin dendritik hücrelerden ve kalp böbrek dahil olmak üzere çeşitli dokuların kapiller ve ven endotel hücrelerinde de eksprese olduğu bilinmektedir (Rolph ve ark. 2006; Elmasri ve ark. 2009). Ayrıca çeşitli özel durumlarda başka hücrelerde de aP2 ekspresyonu gösterilmiştir. T yardımcı hücre, Th2 sitokinlerinden olan IL-4 ve IL-13 ile muamele edilen bronş epitel hücresinde aP2 ekspresyonunun arttığı, Th1 sitokini, IFN-

γ ile ekspresyonunun baskılandığı gösterilmiştir (Shum 2006; Shum ve ark. 2006). Bunun yanı sıra aP2 ekspresyonu, insan plasental trofoblastlarında, granüloza hücrelerinde, ve lipoblastomun ve liposarkomun lipoblastlarında da tespit edilmiştir (Bennett ve ark. 1995; Biron-Shental ve ark. 2007; Scifres ve ark. 2011; Hu ve Qiao 2011).

2.9. aP2'nin Sekresyonu

aP2'nin sekresyon mekanizması henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Ancak adipositlerden aP2 sekresyonunun, lipoliz ile ilişkili ve klasik olmayan bir sekresyon yolağı ile gerçekleştiği bilinmektedir (Cao ve ark. 2013; Kralisch ve ark. 2014; Ertunc ve ark. 2015; Mita ve ark. 2015). Adipoz trigliserid lipaz (ATGL) ve Hormon-duyarlı lipaz (HSL) enzimlerinin inhibisyonunun aP2 sekresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Ertunc ve ark. 2015). Brefeldin A ve monensin gibi, Endoplazmik retikulum ve Golgi aparatında veziküler aktarımı bloke eden protein sekresyon inhibitörleri, adipositlerde aP2 sekresyonunu etkilememiştir (Cao ve ark. 2013; Kralisch ve ark. 2014; Schlottmann ve ark. 2014). Sonuç olarak aP2'nin klasik olmayan bir sekresyon mekanizmasıyla sekrete olduğu anlaşılmıştır. Prentice ve ark. (2019), adipositlerde aP2'nin sekresyonunu düzenleyici mekanizmaları şekil halinde vermiştir (Şekil 2-5).

In vivo çalışmalarda, aP2 seviyelerinin açlık, sempatik sistem aktivasyonu veya isoproterenol ve CL-316423 gibi $\beta 3$ -reseptör agonist tedavisi ile arttığı, yeniden beslenme ve insülin ile baskılandığı gösterilmiştir (Cao ve ark. 2013; Ertunc ve ark. 2015; Tirosh ve ark. 2019). Bu sinyallere bağlı olarak artan FABP4 sekresyonunun, hücre içinde artış gösteren cAMP ve Ca^{+2} akışı ile ilişkili olduğu ve FABP4 sekresyonunun regülasyonunda kalsiyum bağımlı mekanizmaların da yer aldığı anlaşılmıştır (Schlottmann ve ark. 2014; Mita ve ark. 2015).



Şekil 2-5: Adipositlerde FABP4 sekresyonunun regülasyonu-Prentice ve ark. (2019)’dan değiştirilerek

Öte yandan, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda aP2’nin lizozomal yol ile de sekrete olabildiği gösterilmiştir (Villeneuve ve ark. 2018). Bunun yanı sıra aP2, adiposit-türevi eksozomlarda tespit edilmiş ve oldukça az bir fraksiyonunun (~%0,5) adipositlerde multiveziküler yapılar halinde sekrete olabileceği anlaşılmıştır (Ertunc ve ark. 2015; Ferrante ve ark. 2015).

Ayrıca aP2’nin insan lösemi monosit hücre hattı (THP-1) makrofajından ve fare makrofaj hücre hattı RAW264.7’den de salındığı gösterilmiştir (Kralisch ve ark. 2014; Schlottmann ve ark. 2014).

2.10. aP2'nin Fonksiyonları ve Önemi

2.10.1. aP2 ile Protein-Protein Etkileşimleri

aP2'nin, hücresel veya deneysel modellerde genetik olarak ekspresyonunun değiştirilebilmesi bu proteinin fonksiyonları, hem hücresel hem de sistemik olarak etkileri ve etki mekanizmaları hakkında araştırmaların yapılmasına olanak vermiştir (Furuhashi ve Hotamisligil 2008).

Diğer FABP'lere benzer olarak, aP2'ler de yağ asitlerini, mitokondri, peroksizom, ER ve nükleus gibi hücresel kompartmanlara taşımakla sorumlu tutulmuştur. Yapılan araştırmalar sonucunda aP2'nin çeşitli proteinler ile etkileşim halinde olduğu anlaşılmıştır. aP2'nin, lipoliz ve adipogenezi, HSL ve PPAR- γ ile etkileşimleri sonucu düzenleyerek, adiposit homeostazının sağlanmasında önemli bir rol üstlendiği gösterilmiştir (Jenkins-Kruchten ve ark. 2003; Schroeder ve ark. 2008). Adipositlerde bir lipolitik enzim olan HSL ile aP2 arasındaki doğrudan protein-protein etkileşiminin lipolizi düzenlediği anlaşılmıştır. aP2'den yoksun fare adipositlerinde lipolizin azalmış olduğu görülmüştür (Shen ve ark. 1999; Scheja ve ark. 1999).

Bir başka protein-protein etkileşimine örnek olarak, ligand bağlı-aP2'nin Janus kinaz 2 (JAK2)'ye bağlanarak sinyal iletimini azalttığı bilinmektedir (Thompson ve ark. 2009). Bunun yanı sıra dolaşımdaki aP2'nin plazma membran proteinleri ile etkileşim içinde olduğu ve sitokeratin 1 ile bağlandığı gösterilmiştir (Saavedra ve ark. 2015). Ekstraselüler aP2'nin endotel hücrelerine alımında sitokeratin 1'in rol aldığı bildirilmiştir (Martínez-Micaelo ve ark. 2019).

Yapılan çalışmalarla, aP2'nin nükleusta, PPAR- γ ile etkileşim içinde olduğu ve ligand sunabildiği anlaşılmıştır (Tan ve ark. 2002; Adida ve Spener 2006; Ayers ve ark. 2007). aP2'nin spesifik ligandları sitozolden çekirdekteki PPAR- γ 'ya sunarak reseptörün transkripsiyonel aktivitesini arttırabildiği gösterilmiştir (Ayers ve ark. 2007). Bir diğer yandan, aP2'nin negatif geribildirim üzerinden etki gösterebileceği anlaşılmıştır, aP2'nin yokluğu durumunda, makrofajlarda PPAR- γ aktivitesinde artış görülmüştür (Makowski ve ark. 2005). aP2'nin PPAR- γ 'nın ubiquitinasyon ve proteozomal degradasyonunu tetiklediği, aP2'den yoksun preadiposit ve makrofajlarda

PPAR- γ 'nın ekspresyonunun artmış olduğu gösterilmiştir (Garin-Shkolnik ve ark. 2014).

2.10.2. Dolaşımda aP2 Seviyesinin Metabolik ve Kardiyovasküler Hastalıklar ile İlişkisi

aP2'nin bir hormon olarak işlev görebilmesi, bu protein üzerinde yapılan çalışmaların önemini ortaya koymuştur (Cao ve ark. 2013). Dolaşımdaki aP2 seviyelerinin çeşitli hastalıklara bağlı değişimleri ve hangi hastalıklarla nasıl bir korelasyon gösterdiği üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Ayrıca aP2'nin hedef hücreler ile nasıl bir etkileşim içinde olduğu, hedef hücrede nasıl etki gösterdiği ve bu etkileri hangi mekanizmalarla gerçekleştirdiği üzerine çalışmalara yoğunlaşmıştır.

Dolaşımda aP2 seviyelerinin kadınlarda erkeklere oranla daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu durum aP2 seviyelerinin adipozite ile gösterdiği korelasyon nedeniyle, kadınların vücut yağ oranının erkeklere göre daha fazla olması ile ilişkilendirilmiş, ayrıca cinsiyetler arasında görülen serum aP2 seviyelerindeki bu farkta androjenin de rolünün olabileceği bildirilmiştir (Xu ve ark. 2006; Ishimura ve ark. 2013; Hu ve ark. 2016). Dolaşımdaki aP2'nin eliminasyonunun ise esas itibarıyla renal yolla gerçekleştiği belirtilmiştir (Furuhashi ve ark. 2014). Serum aP2 seviyesinin tahmini glomerüler filtrasyon hızı (eGFR) ile negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Ishimura ve ark. 2013). Son evre böbrek yetmezliği olan hemodiyaliz hastalarında aP2 seviyesi kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuş ve bu seviyenin hemodiyaliz sonrası %57,2 azaldığı gösterilmiştir (Furuhashi ve ark. 2011). Dolaşımdaki aP2 proteininin, böbreklerden glomeruler filtrasyon ve onu takiben megalin aracılı reabsorpsiyon ile elimine olduğu gösterilmiştir (Shrestha ve ark. 2018).

Dolaşımda aP2 seviyesinin, kardiyovasküler hastalıklarda risk artışı, miyokard enfarktüsün erken tanısı, hipertansiyon, preeklampsi ve ateroskleroz ile; iskemik felç ile; obezite, insülin direnci, tip 1 diyabette bozulmuş glisemik kontrol, tip 2 diyabet ve diyabetik komplikasyonlarla ve NAFLD ile; ayrıca meme kanseri ve lösemi dahil olmak üzere çeşitli kanser türleri ile ilişkilendirilmiştir (Xu ve ark. 2006; Tso ve ark. 2007; Xu ve ark. 2007; Yeung ve ark. 2007; Koh ve ark. 2009; Djoussé ve ark. 2012; Ota ve ark. 2012; Scifres ve ark. 2012; Fuseya ve ark. 2014; Tu ve ark. 2017; Hao ve ark. 2018;

Metabolik hastalıklar ile dolaşımda aP2 seviyeleri arasındaki korelasyon insanlarda çeşitli genetik çalışmalarda da gösterilmiştir. İnsanlarda aP2 geninin promotor polimorfizmi ile transkripsiyonel aktivitesindeki azalmaya bağlı olarak, dokularda aP2 gen ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Bu durum insanlarda tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıkların görülme riskindeki azalma ile ilişkilendirilmiştir (Tuncman ve ark. 2006). Aynı polimorfizm üzerinden yapılan bir başka çalışmada da, azalmış aP2 ekspresyonu, azalan total kolesterol seviyesi ile ve aterosklerotik plak stabilitesinin sağlanması ve miyokard enfarktüsü gibi kardiyovasküler hastalık riskindeki azalma ile ilişkilendirilmiştir (Saksi ve ark. 2014). Ayrıca oldukça geniş çaplı bir genom çapında ilişkilendirme çalışmasında (*genom-wide association study, GWAS*) aP2, hem T2D hem de kardiyovasküler hastalıklar için bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (Zhao ve ark. 2017).

2.10.3. aP2'nin İmmünometabolik Hastalıklardaki Rolü

aP2 geni işlevsiz hale getirilmiş (aP2 knockout, aP2^{-/-}) farelerde, çeşitli hastalık modellerinin geliştirilmesi ile aP2 proteinin hastalıkların ortaya çıkmasındaki rolü ve fonksiyonları üzerine araştırmalar yapılmıştır.

Genetik olarak (ob/ob) veya diyetle indüklenen obezite geliştirilmiş aP2'den yoksun fare modellerinde, hiperinsülinemi, hiperglisemi ve insülin direncinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Hotamisligil ve ark. 1996; Uysal ve ark. 2000). Sağlıklı farelerde ise aP2'nin insülin duyarlılığına bir etkisi gözlenmemiştir (Hotamisligil ve ark. 1996; Uysal ve ark. 2000). Uysal ve ark. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, ob/ob-aP2^{-/-} fareler, kontrol grubuna (ob/ob-aP2^{+/+}) kıyasla, plazma glukoz ve insülin seviyeleri değerlendirildiğinde, daha iyi bir glukoz homeostazı göstermiş ve lipolize bağlı insülin sekresyonunda azalma gözlenmiştir. Ayrıca oral glukoz tolerans testi (OGTT) ve insülin tolerans testi (ITT) ile yapılan değerlendirme sonucunda, ob/ob-aP2^{-/-} grubunda kontrol grubuna kıyasla, insülin duyarlılığının anlamlı olarak arttığı görülmüştür (Uysal ve ark. 2000). Yapılan başka bir çalışmada da aP2^{-/-} farelerde lipolizin azaldığı ve β -adrenerjik stimülasyona bağlı insülin sekresyonunun baskılandığı bildirilmiş ve bu durum değişen serbest yağ asidi profili ile ilişkilendirilmiştir (Scheja ve ark. 1999).

aP2'nin glukoz homeostazı üzerindeki etkisi ve bunun ile ilgili mekanizmalar üzerine yapılan bir başka çalışmada, aP2'nin açlık ve açlık ile ilişkili sinyallere bağlı olarak adipositlerden sekrete olduğu ve karaciğerde glukoz üretimini düzenlediği gösterilmiş ve aP2'nin bir adipokin olarak önemli bir metabolik fonksiyonu yerine getirdiği anlaşılmıştır (Cao ve ark. 2013). Fare primer hepatosit hücrelerinin, rekombinant aP2 ile muamele edilmesi sonucunda, glukoz-6-fosfataz gibi glukoneojenik genlerin ekspresyonlarında artış gösterilmiştir. aP2'den yoksun farelere yapılan aP2 infüzyonu, glukoneojenik enzim aktivitesini ve hepatik glukoz üretimini arttırmıştır (Cao ve ark. 2013).

Kralisch ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada da farelerde rekombinant aP2 tedavisi ile, hepatik glikojen içeriği ve β -hücre fonksiyonunda bir değişiklik olmaksızın, insülin direncinin arttığı gösterilmiş ve aP2'nin insülin duyarlılığını azaltan etkisi, aP2'nin tetiklediği PPAR γ degradasyonu ve ardından adiponektin ekspresyonunun azalması ile ilişkilendirilmiştir. aP2'nin metabolik ve inflamatuvar yanıtlar üzerinde, adiposit ve makrofajlardaki etkileri ile metabolik sendromun gelişiminde önemli bir role sahip olduğu belirtilmiştir (Furuhashi ve Hotamisligil 2008).

aP2 ekspresyonunun monositlerin makrofaja farklılaşması sürecinde ve forbol 12-miristat 13-asetat, lipopolisakkarid, PPAR- γ agonistleri ve ox-LDL ile indüklendiği bilinmektedir (Pelton ve ark 1999; Fu ve ark. 2000; Makowski ve ark. 2001; Fu ve ark. 2002; Kazemi ve ark. 2005). Hipolipidemik bir ilaç olan statin ile yapılan bir *in vitro* çalışmada, makrofajlarda ox-LDL'ye bağlı aP2 ekspresyonunun atorvastatin ile baskılandığı gösterilmiştir (Llaverias ve ark. 2004). Hem tüm vücut aP2 yoksunluğunun, hem de kemik iliği transplantasyon çalışması ile geliştirilen makrofaj-spesifik aP2 yoksunluğunun, ateroskleroz deneysel modellerinden biri olan ApoE^{-/-} (Apolipoprotein E yoksunluğu) farelerde gelişen aterosklerotik lezyonlarda anlamlı bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Makowski ve ark. 2001; Boord ve ark. 2002). Ayrıca, aP2 den yoksun makrofajlarda kolesterol ester birikiminin anlamlı ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Makowski ve ark. 2001).

Sonuç olarak, aP2'nin makrofajlarda inflamatuvar yanıtta ve kolesterol ester birikiminde rol oynadığı gösterilmiş ve kemik iliği transplantasyon çalışmaları sonucu ateroskleroz gelişmesindeki rolünün temel olarak makrofajlardaki aP2'den

kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (Makowski ve ark. 2001). Ayrıca hem insan hem de fare aterosklerotik lezyonlarında yüksek seviyede aP2 ekspresyonunun olduğu gösterilmiştir (Makowski ve ark. 2001; Boord ve ark. 2002; Fu ve ark. 2002).

aP2'nin PPAR- γ —karaciğer X reseptörü- α (LXR- α)—ATP bağlayıcı kaset A1 (ABCA1) yolağında önemli bir regülatör olduğu bildirilmiş ve fare aP2^{-/-} makrofajlarda yapılan çalışmada aP2 yoksunluğu kolesterol effluksunda artışla sonuçlanmış, aP2'nin köpük hücre oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak aynı çalışmada, *in vitro* olarak aP2^{-/-} makrofajlarda yanıt oluşumunun baskılayarak inflamatuvar aktiviteyi düzenlediği gösterilmiştir (Makowski ve ark. 2005). aP2 yoksun makrofajlarda TNF- α , IL-1 β , IL-6, ve monosit kemoatraktant protein-1 (Mcp-1)'in ve iNOS ve COX2 gibi pro-inflamatuvar enzimlerin oluşumunun baskılandığı bildirilmiştir (Makowski ve ark. 2001; Makowski ve ark. 2005). Sitokin ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerin, aP2 yoksun makrofajlarda inhibitör kappa kinaz (IKK)—NF- κ B yolağının aktivitesindeki azalma ile de ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Makowski ve ark. 2005). Böylelikle, yapılan çalışmaların ışığında, aP2'nin hem fare hem de insan makrofajında inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde, köpük hücre oluşumunda ve kolesterol effluksundaki rolü ve önemi anlaşılmıştır (Makowski ve ark. 2001; Makowski ve ark. 2005).

Adipositlerde oldukça az bir fraksiyonda yer alan mal1'in, aP2^{-/-} adipositlerde ekspresyonunun arttığı ve bunun aP2 yoksunluğuna bağlı bir kompensasyon olduğu bilinmektedir (Hotamisligil ve ark. 1996). Hem genetik hem de diyetle indüklenen obezite modelinde, adipositlerde mal1 yoksunluğunda (mal1^{-/-}), insülin duyarlılığında bir miktar artma gösterilirken, yüksek yağ diyeti uygulanan transgenik farelerde, mal1'in adipoz spesifik aşırı ekspresyonu, insülin duyarlılığında azalma ile sonuçlanmıştır (Maeda ve ark. 2003).

Hem aP2 hem de mal1 geni işlevsiz hale getirilmiş *double-knockout* (DKO, aP2^{-/-}mal1^{-/-}) fareler üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Yalnız aP2 ya da yalnız mal1 yoksunluğu durumu ile kıyaslandığında, aP2^{-/-}mal1^{-/-} üzerinde genetik veya yüksek yağ diyeti ile indüklenen obezite modellerinde yapılan araştırmalarda, insülin direncine, T2D'ye ve yağlı karaciğer hastalığına karşı oldukça büyük ölçüde bir savunma geliştirildiği gösterilmiştir (Maeda ve ark. 2005; Cao ve ark. 2006). Benzer şekilde, aP2^{-/-} veya yabanıl tip (WT) ile kıyaslandığında, aP2^{-/-}mal1^{-/-}ApoE^{-/-} ile ateroskleroz

üzerine yapılan çalışmalarda da ateroskleroz gelişimindeki önemli ölçüde azalma gösterilmiştir (Boord ve ark. 2004).

Ateroskleroz ve çeşitli kardiyovasküler hastalıklarla dolaşımdaki aP2 seviyelerinin ilişkilendirilmesi ve aP2 yoksunluğunda hastalığa ait çeşitli biyokimyasal parametrelerdeki düzelmeler dolaşımda bulunan bu proteinin kardiyak fonksiyonlar üzerindeki etkilerinin araştırılmasının önemini ortaya koymuştur (Makowski ve ark. 2001; Boord ve ark. 2002; Boord ve ark. 2004; Yeung ve ark. 2007; Ota ve ark. 2012; Fuseya ve ark. 2014; Hotamisligil ve Bernlohr 2015). aP2'nin kalp ve böbrek dahil olmak üzere çeşitli dokuların kapiller ve ven endotel hücrelerinde de eksprese olduğu gösterilmiştir (Elmasri ve ark. 2009). Kalp ve iskelet kası kapiller endotel hücresinde eksprese olan aP2'nin, dolaşımdaki yağ asidlerinin, transendoteliyal taşıma ile bu dokulara alımında rol aldığı gösterilmiştir (Iso ve ark. 2013).

T2D hastalarının endotel fonksiyonları ile plazma aP2 seviyeleri arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada, periferik arter tonometri ile reaktif hiperemi indeksleri üzerinden yapılan bir değerlendirmede, T2D hastalarındaki yüksek plazma aP2 seviyeleri endotel disfonksiyon ile ilişkilendirilmiştir (Aragonès ve ark. 2010; Aragonès ve ark. 2012a). Rekombinant aP2 ile insan umbilikal ven endotel hücresi (HUVEC) üzerinde yapılan bir çalışmada, aP2'nin insülin sinyal yolağı aktivitesini inhibe ederek endotelial NOS (eNOS) aktivasyonu ve NO üretiminde azalmaya sebep olduğu gösterilmiş ve aP2'nin, diyabette gelişen endotel disfonksiyonu ile arasındaki ilişki bu mekanizmaya dayandırılmıştır (Aragonès ve ark. 2012b). İnsan koroner arter düz kas hücresi üzerinde rekombinant aP2 ile yapılan bir çalışmada aP2'nin, damar düz kas hücrelerinin migrasyon ve proliferasyonunu indüklediği gösterilmiştir (Girona ve ark. 2013). Bir başka *in vitro* çalışmada, aP2'nin kardiyomiyosit kontraksiyonunu baskıladığı gösterilmiş ve dolaşımda artmış olan aP2 ve/veya bölgesel olarak epikardiyal yağ dokusundan eksprese olan aP2'nin obezitede gelişen kardiyak disfonksiyonda rol alıyor olabileceği belirtilmiştir (Lamounier-Zepter ve ark. 2009).

Bu çalışmaların yanı sıra, aP2'nin alerjik hava yolu hastalıklarında önemli bir role sahip olduğu gösterilmiş, Th2 sitokinlerinden IL-4 ve IL-13'ün bronşiyal epitel hücrelerde aP2 ekspresyonunu indüklediği bildirilmiştir. aP2'nin alerjik hava yolu inflamasyonu üzerindeki rolünü değerlendirmek için farelerde geliştirilen OVA ile indüklenen alerjik hava yolu inflamasyonunun, aP2'den yoksun olma durumunda

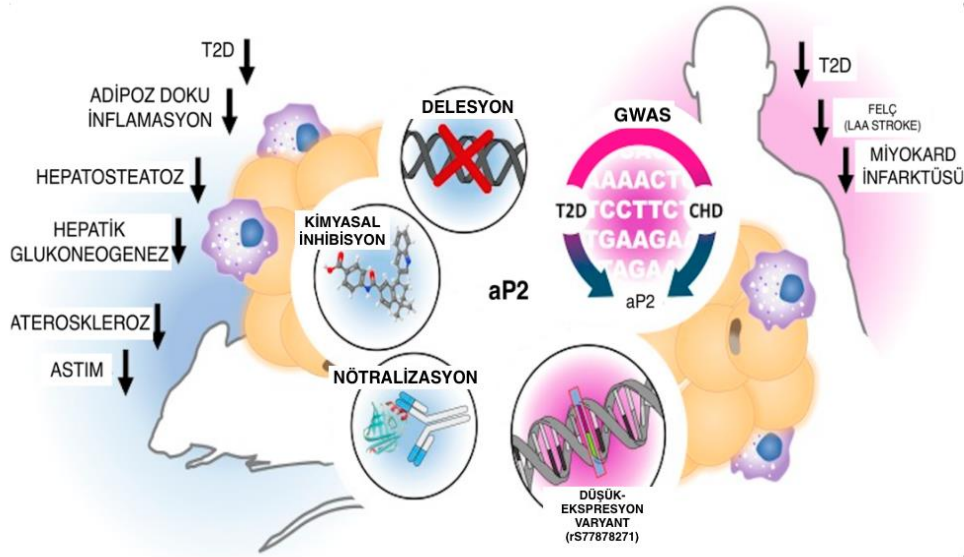
düzelendiği saptanmıştır. Aynı araştırmada, aP2'den yoksun farelerden yapılan kemik iliği transplantasyonunun, WT grubunda alerjene bağlı akciğer inflamasyonunda düzelmeye neden olmaması, görülen fenotipten parenkimal hücrelerde aP2'nin sorumlu olabileceğini göstermiştir. Ayrıca OVA ile alerjik hava yolu inflamasyonunun indüklendiği aP2^{-/-}mal1^{-/-} farelerde, sadece aP2 yoksun farelere kıyaslandığında, hava yolu eozinofili oluşumuna karşı belirgin bir savunma geliştiği gösterilmiştir (Shum 2006; Shum ve ark. 2006). VEGF-transgenik farelerde yapılan bir araştırmada, aP2 yoksunluğunun, VEGF ile indüklenen hava yolu inflamasyonunda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir, anjiyogenez ile bağlantılı olarak da astımlı hastalarının hava yolunda, aP2-immünoreaktif kan damar yoğunluğunun artmış olduğu bildirilmiştir (Ghelfi ve ark. 2013).

Sonuç olarak, aP2'nin immünometabolik hastalıklardaki ve metabolik ve inflamatuvar yanıtların regülasyonu/disregülasyonundaki önemi anlaşılmıştır. Bu durum bu protein üzerinden terapötik stratejilerin geliştirilmesine zemin hazırlamıştır.

2.11. aP2'nin İnhibisyonu ve Nötralizasyonuna Dayalı Terapötik Yaklaşımlar

Obezite, diyabet ve kardiyovasküler hastalıkların deneysel modellerinde aP2'nin rolü üzerine yapılan araştırmalar ve insan plazma aP2 seviyesi ile çeşitli hastalıkların gelişme riski ve hastalığın seyri arasındaki ilişkiye yoğunlaşan çalışmalar, bu protein üzerinden geliştirilen terapötik yaklaşımların kronik immünometabolik hastalıklarda bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilme potansiyelini ortaya çıkarmıştır (Hotamisligil ve Bernlohr 2015).

Terapötik bir hedef olarak aP2 proteini üzerinde yoğunlaşan çalışmalar, temelde genetik olarak bu proteinden yoksun modeller, RNA interferans gibi çeşitli genetik müdahaleler, geliştirilmiş olan çeşitli inhibitörler ve son olarak bir antikora nötralizasyon yolu olmak üzere dört farklı yaklaşımla gerçekleştirilmiştir (Prentice ve ark. 2019). Prentice ve ark. (2019), aP2'nin immünometabolik hastalıklarla ilişkisi üzerine yapılan çalışmaların konseptini şekil olarak vermiştir (Şekil 2-7)



Şekil 2-7: aP2'nin immünometabolik hastalıklardaki önemi ve bu hususta yapılan araştırmalarda üzerinde durulan stratejiler-Prentice ve ark. (2019)'dan değiştirilerek

Günümüze kadar çeşitli aP2 inhibitörleri tanımlanmıştır (Furuhashi ve Hotamisligil 2008; Zhang ve ark. 2014). BMS309403 endojen yağ asitlerinin bağlanmasını kompetitif olarak inhibe eden, potent ve selektif bir aP2 inhibitörüdür (Furuhashi ve ark. 2007).

BMS309403 ile yapılan deneysel çalışmalar sonucunda insülin direnci, diyabet, yağlı karaciğer hastalığı ve aterosklerozda görülen düzelmeler aP2'nin kimyasal inhibisyonunun terapötik bir strateji olarak önemini ortaya koymuştur (Furuhashi ve ark. 2007).

Ateroskleroz deneysel fare modeli üzerinde yapılan çalışmada, genetik olarak aP2'den yoksun modele benzer şekilde, aP2 inhibitörü kullanıldığında, aterosklerotik lezyonda küçülme, makrofajlarda kolesterol ester birikiminde ve çeşitli proinflamatuvar sitokin ve kemokin ekspresyonlarında azalma ve kolesterol effluksunda artış gösterilmiştir (Furuhashi ve ark. 2007).

Hem genetik olarak hem de diyet ile indüklenen obezite ve insülin direnci modelinde ise, genetik olarak aP2 den yoksun modele benzer şekilde, aP2 inhibitörü uygulaması ile insülin duyarlılığında artış gösterilmiş ve bu hepatik glukoz üretiminin baskılanması ve periferel dokulardan insülin uyarımı ile glukoz kullanımının artması ile

ilişkilendirilmiştir. Ayrıca aP2 inhibitörü verilen ob/ob farelerde adipoz dokuda obezite ile artan Mcp-1, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi kemoatraktan ve inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarının azalmasına bağlı olarak adipoz dokudaki inflamasyonun azaldığı gösterilmiştir. Buna ek olarak ob/ob farelerde aP2'nin inhibisyonu, adipoz dokuda obezite ile indüklenen Jun-N-terminal kinaz (JNK) 1 aktivitesinde azalma ile sonuçlanmış ve bu durum adipoz dokuda azalan inflamasyon ve artan insülin duyarlılığı ile ilişkilendirilmiştir (Furuhashi ve ark. 2007).

Ayrıca hem aP2 hem de mal1 yoksun (aP2^{-/-}mal1^{-/-}) şişman farelerde yağlı karaciğer hastalığı gelişmemesine benzer şekilde, aP2 inhibitörü ile tedavi edilen ob/ob farelerde, karaciğerde yağ infiltrasyonu ve total karaciğer trigliserid içeriğindeki azalma ile yağlı karaciğer hastalığında düzelme gösterilmiş ve bu durum karaciğerde çeşitli lipojenik enzim ekspresyonundaki azalmalar ile ilişkilendirilmiştir (Maeda ve ark. 2005; Cao ve ark. 2006; Furuhashi ve ark. 2007).

aP2 proteini üzerinden geliştirilen bir diğer terapötik strateji ise antikorla nötralizasyondur (Cao ve ark. 2013; Burak ve ark. 2015; Miao ve ark. 2015; Fuseya ve ark. 2017). Burak ve ark. (2015) tarafından aP2'ye karşı geliştirilmiş monoklonal antikor (anti-aP2 mAb) ile yapılan çalışmada obez farelerde glukoz homeostazının düzeldiği, sistemik insülin duyarlılığının arttığı, karaciğer lipid homeostazının düzeldiği gösterilmiştir. Antikor tedavisinin söz konusu antidiyabetik etkisi karaciğerde glukoz üretiminde azalma ve perifer dokularda glukoz kullanımındaki artış ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışma ile obezite ve diyabette görülen, aP2'nin başlıca metabolik etkilerinden, aP2'nin dolaşımdaki formunun önemli ölçüde sorumlu olduğu ortaya çıkmıştır (Burak ve ark. 2015) Bu tedavi stratejisi, antikorların gerek hücre içine gerekse de kan-beyin bariyerinden geçememesi nedeniyle, metabolik hastalıklarda *hormonal aP2'nin* önemini ortaya koymuştur (Burak ve ark. 2015; Prentice ve ark. 2019). Bu durum serum aP2'nin periferik dokulardaki etkisi ile metabolik hastalıklarda nasıl bir rol üstlendiğinin ve immünometabolik hastalıklarda tedavi veya koruyucu bir yaklaşım olarak nasıl ele alınabileceğinin daha iyi anlaşılmasına olanak vermiştir (Prentice ve ark. 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri

- Steril cerrahi aletler (makas, pens)
- Kanül (21G kanül)
- Cerrahi ipek iplik 4-0
- Eppendorf Tek kanallı Otomatik Pipet (2µl, 10µl, 200µl, 1000 µl)
- Eppendorf Çok Kanallı Otomatik Pipet (100-300 µl)
- Pipet tiplerine uygun pipet uçları (MSP, Eppendorf), Eppendorf PCR Clean pipet uçları, ep.Dualfilter T.I.P.S[®], Eppendorf Combitips advanced[®]
- 6 kuyucuklu kollagen kaplı plaka (Corning[®] BioCoat[™])
- 96 kuyucuklu plaka-ELISA (Corning[®])
- 384 kuyucuklu plaka-QPCR (Thermo Fisher Scientific)
- 100 mm boyutunda kollagen-1 ile kaplı petri (Corning[®] BioCoat[™])
- 1,5 ml tüpler, PCR tüpleri (Axygen[®])
- Enjektörler, İnsülin Enjektörleri (BD Micro-Fine[™])
- Eldiven (EvolutionOne)
- 0.2 µm şırınga filtresi (Corning[®])
- Vakumlu Filtre sistemli 500 ml şişe -Vacuum Filter Storage Bottle System (Corning[®])
- Steril Hücre Kazıyıcı (Biologix Group Ltd)
- Tek kullanımlık steril serolojik pipetler (5-10-25 ml) (Stripette[™] Corning[®])
- Kriyojenik tüpler (Nalgene, ThermoFisher Scientific)
- ELISA ve qPCR plaka yalıtkanı (Corning[®])

- Alüminyum folyo (Reynolds)
- Falkon tüpler (15-50 ml) (Corning®)
- Lam (Ted Pella)
- Distile su
- Nükleaz içermeyen su (Invitrogen™ Ambion™)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- EDTA, K-EDTA (Sigma-Aldrich®)
- Metakolin (Sigma-Aldrich®)
- Etanol (Sigma-Aldrich®)
- Fosfat ile tamponlanmış tuz eriyiği (PBS) (Gibco®)
- DMEM-12/F12 (Gibco®)
- RPMI-1640 (Gibco®)
- Penisilin streptomisin (Gibco®)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Atlanta Biologicals)
- Cosmic Calf Serum (CCS) (HyClone)
- PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems™)
- Sığır Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich®)
- Albumin from chicken egg white liyofilize tozu (Sigma-Aldrich®)
- Ovalbumin EndoFit™ (InvivoGen)
- Ev Tozu Akarı HDM (Greer Laboratories)
- Inject Alum (Thermo Fisher Scientific)
- Primerler (IDT DNA Technologies)
- Pankuronyum (Sigma-Aldrich®)
- İzofluran (Patterson Veterinary)

- Pentobarbital (Akorn)
- Ksilazin (Patterson Veterinary)
- Sülfürik asit (H₂SO₄) (Sigma-Aldrich®)
- TMB (Thermo-Scientific™)
- standart insan aP2 protein (R&D Systems)
- Tween® 20 (Sigma)
- Rekombinant Der p 1 (bioWORLD)
- Rekombinant aP2 (Hotamışlıgil Lab)
- LPS (Enzo Life Sciences)
- DMSO (Sigma)
- Tripsin (Gibco®)
- Sodyum karbonat(Sigma-Aldrich®)
- Sodyum bikarbonat(Sigma-Aldrich®)
- G9 ve H3-HRP (Hotamışlıgil Lab)

3.1.3. Kullanılan kitler

- RNeasy Mini kit (QIAGEN, katalog no:74104)
- iScript™ Ters Transkripsiyon Supermix (Bio-Rad, katalog no:1708840)
- LDH Sitotoksosite Deteksiyon Kiti (Clontech Laboratories Inc. A Takara Bio Company katalog no:630117)

3.1.4. Kullanılan aletler

- FlexiVent®-FX (SCIREQ® Scientific Respiratory Equipment Inc., an emka Technologies Company, Montreal, Quebec, Canada)
- ViiA™ 7 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems)

- Spektrofotometre (Molecular Devices – Spectromax)
- Nanodrop 2000c(Thermo-Scientific™)
- Invert mikroskop(Leica)
- Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter)
- CO₂ inkübatörü
- Laminar Hava Kabini
- Vortex(VWR)
- Lamba
- Çalkalayıcı cihaz
- Isıtma pedi
- Nebülizatör
- İzofluran inhalasyon aleti
- Buzdolabı 4-8 °C
- Buzdolabı -20 °C
- Buzdolabı -80 °C
- Sıvı Nitrojen tankı ve taşıma kapları
- Cell counter (Bio-Rad)
- Su banyosu

3.1.5. Kullanılan Yazılımlar

- FlexiWare v.8 / FlexiVent Software (SCIREQ® Scientific Respiratory Equipment Inc., an emka Technologies Company, Montreal, Quebec, Canada)
- Prism 5.0 (GraphPad Software, ABD)
- Microsoft Office Programları

3.2. *İn vivo* Çalışmalar

Harvard T.H. Chan Halk Sağlığı Okulu'nda, deney hayvanlarının bakımı, muhafazası ve deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilen tüm deneysel çalışmalar, Harvard Medical Area Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) tarafından onaylanan etik kurallara uygun ve izinli bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada, farelerde alerjik astım modeli iki farklı deneysel metod ile geliştirilmeye çalışılmıştır. Deneysel modelin gelişimi, tüm dokularda aP2 eksprese eden aP2 flox/flox (aP2 f/f) genotipli dişi C57BL/6 farelerde, deneysel grup (alerjen ile uyarılan) ile kontrol grubunun (alerjen ile uyarım yapılmayan), kümülatif dozlarda metakolin uyarımı ile gerçekleştirilen bronş provokasyon testi ile elde edilen hava yolu direnç değerlerinin (R_N ve R_{rs}) karşılaştırılması üzerinden değerlendirilmiştir. aP2 f/f dişi farelerde, ovalbumin (OVA) ve Ev Tozu Akarı (HDM) maruziyeti ile alerjik astımın gelişiminin gösterilebilmesinin ardından doku-spesifik aP2'den yoksun modellerde hava yolu dirençleri karşılaştırılarak, alerjik astımda gelişen hava yolları hiperreaktivitesinde aP2'nin rolünün ve bu rolden sorumlu olan aP2'nin kaynağının bulunması planlanmıştır.

3.2.1. Deney Hayvanlarının Genel Özellikleri

Alerjik astım patogeneğinde aP2'nin rolünü ve bu rolde etkili aP2'nin kaynağını bulmak amacıyla, Hotamışlıgil Laboratuvarı araştırmacıları tarafından geliştirilmiş olan doku-spesifik aP2'den yoksun fare modelleri üzerinde çalışılması planlanmıştır.

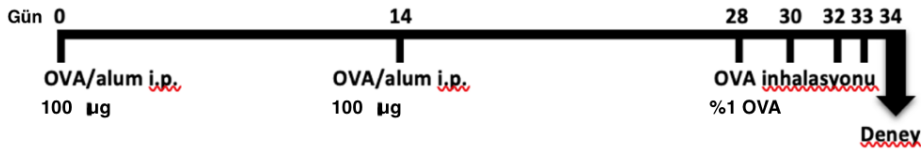
Deneysel alerjik astım modelinin oluşturulması, fare yerine insan aP2'si taşıyan aP2 f/f fareler (dişi, C57BL/6) üzerinde yürütülmüştür. Bu grup fareler, aP2 geninin eksprese olduğu tüm dokulardan, fare yerine insan aP2 genini eksprese etmektedir. aP2f/f genotipli farelerin dokularında aP2 gen ekspresyonu ve protein varlığı test edilerek valide edilmiştir. Belirli bir dokuda aP2'den yoksun modellerin geliştirilmesi için ise, aP2 f/f fareler, Adiponektin (AdipoQ), LyzM veya Tie2 promotorları kontrolünde Cre rekombinaz transgen içeren fareler ile çaprazlaştırılarak, sırasıyla adipoz doku, makrofaj ve endotel dokuya spesifik olarak aP2 geni işlevsiz hale getirilmiş (knock-out) fareler elde edilmiştir. Üç-dört haftalık yavru farelerden alınan doku örnekleri Transnetyx, Inc. (Cordova,TN) Genotipleme PCR servisi ile genotiplemesi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Deneysel Alerjik Astım Modellerinin Oluşturulması

3.2.2.1. Ovalbumin ile Alerjik Astım Geliştirilmesi

Bu çalışmada, OVA ile geliştirilen deneysel alerjik astım modelinde, duyarlılaştırma işlemi için intraperitoneal (i.p.) yol ile uygulanmak üzere enjeksiyonluk OVA çözeltisi hazırlanmıştır. OVA EndoFit™ (InVivo Gen) enjeksiyonluk çözeltinin hazırlanma işlemi laminar hava akımı kabininde steril koşullarda 1 mg/ml olacak şekilde 10 mg steril EndoFit™ OVA 10 ml endotoksin-içermeyen fizyolojik serum (NaCl % 0,9) içerisinde çözülmüştür. Kullanılacak miktarda çözelti, enjeksiyon yapılmadan önce, 1:1 oranında alum ile karıştırılarak 0,5 ml'lik insulin enjektörlere (BD Micro-Fine) çekilmiştir. Alerjik astım oluşturulacak deney gruplarında, aP2f/f fareler 0. ve 14. günlerde intraperitoneal yol (i.p.) ile 100 µg ovalbumin (OVA)/alum ile immunize edilmiştir.

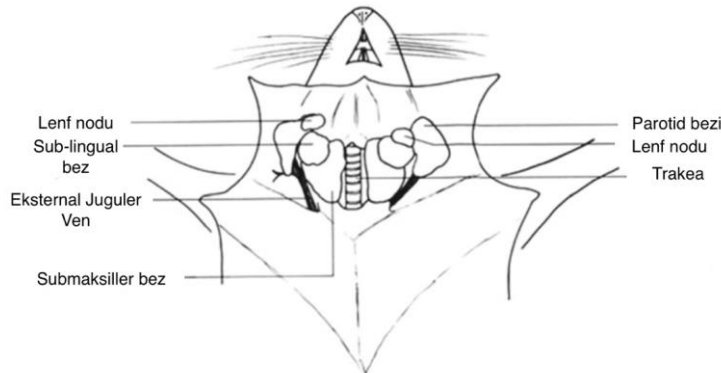
OVA duyarlılaştırmasını takiben 28, 30, 32 ve 33. günlerde, OVA ile uyarım (challenge) gerçekleştirilmiştir. OVA ile uyarım için, tavuk yumurta beyazı liyofilize tozu (albumin chicken egg white, Sigma-Aldrich®), fosfat ile tamponlanmış tuz eriyiği (PBS) içerisinde, %1 OVA içerecek oranda çözülmüştür. Çözelti laminar hava akım kabininde, 0.2 µm'lik şırınga filtresinden (Corning®) geçirilmiştir. Bu steril %1 OVA çözeltisi, hava akımlı kabin içerisinde bir nebulizatör aracılığıyla, aerosol olarak inhalasyon yolu ile 30 dakika boyunca OVA ile alerjik astım geliştirilen gruplara uygulanmıştır. Böylelikle OVA ile immunize edilmiş aP2f/f farelerde, OVA aerosol uygulaması ile solunum yolları duyarlı hale getirilip, deney gruplarında alerjik astım geliştirilmiştir. aP2f/f farelerin kontrol gruplarında ise 0. ve 14. günlerde i.p. 1 mg/ml OVA /alum ile duyarlılaştırma işlemini takiben 28. 30. 32. ve 33. günlerde PBS nebulize edilmiştir. Şekil 3-1'de deneylerde uygulanan OVA ile duyarlılaştırma ve OVA uyarım protokolü şematik olarak gösterilmiştir (Shum ve ark. 2006).



Şekil 3-1: Ovalbumin ile alerjik astım modeli geliştirilmesi - Shum ve ark. 2006.

3.2.2.2. Ovalbumin ile İndüklenen Deneysel Alerjik Astım Modelinde Trakeostomi ve Kanülasyon İşlemi

OVA uyarımının tamamlanmasında sonra 34. gün solunum sistemi çalışmaları başlatılmıştır. aP2f/f farelerin bilgisayar kontrollü ventilatöre bağlanması öncesinde, trakeostomi ve kanülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fareler, intraperitoneal yoldan ksilazin (7 mg/kg) ve pentobarbital (70 mg/kg) ile cerrahi düzeyde anestezi sağlandıktan sonra, sıcak ped üzerinde supin pozisyonuna getirilerek insizyon yapılacak bölge %70 etanol ile temizlenmiştir. Cilt ve cilt altı vertikal insizyondan sonra karotid arter ve juguler ven damarlarına dikkat edilerek, trakea submaksiller bez ve kas dokusundan ayrılarak görünür hale getirilmiştir (Hartney ve Robichaud, 2013) (Şekil 3-2). Trakea üzerinde proksimal kıkırdak halkalarına paralel küçük bir kesik atıldıktan sonra 21G kanül trakeaya yerleştirilmiş ve 4/0 cerrahi ipek iplik ile sabitlenmiştir (Hartney ve Robichaud, 2013).



Şekil 3-2: Farenin boyun bölgesinde ventral diseksiyon- Hartney ve Robichaud (2013)'dan değiştirilerek

3.2.2.3. Ovalbumin ile İndüklenen Deneysel Alerjik Astım Modelinde FlexiVent Sistemi ile Hava Yolları Reaktivitesinin Değerlendirilmesi

Bilgisayar kontrollü FlexiVent-FX (SCIREQ) sistemi kullanılmadan her deney öncesinde sistemin kalibrasyonu yapılmıştır. Her bir deney grubu için kilo ve genotip dahil olmak üzere bilgiler sistemin bilgisayar yazılımına kaydedilmiştir.

FlexiVent sisteminde mekanik ventilasyon başlatıldıktan sonra kontrol (aP2f/f-PBS) ve deney gruplarındaki (aP2f/f-OVA) fareler, kanül aracılığıyla, bilgisayar kontrollü ventilatöre bağlanmıştır. Kas gevşeticisi panküronyum (0,8 mg/kg) i.p. yoldan verildikten 3-5 dakika sonra hava yolları direnç ölçümleri başlatılmıştır. Mekanik ventilasyon sonrasında akciğer volümünün standardize edilmesi ve referans değerlerin elde edilmesinin ardından artan konsantrasyonlarda (0 – 3,125 – 12,5 – 50 mg/ml) metakolin 10 saniye süreyle nebulize edilmiş ve sonrasında toplam 12’şer kez R_N ve R_{rs} ölçümleri ard ardına kaydedilmiştir (Hartney ve Robichaud, 2013). OVA ile geliştirilen alerjik astım modelinde, kontrol (aP2 f/f-PBS) ve deney gruplarından (aP2 f/f-OVA) elde edilen hava yolu direnç değerleri arasında belirgin bir fark görülememiştir. Bu nedenle, provokasyon testinde kullanılan metakolin dozları arttırılmıştır (0 – 6,25 - 25 - 100 mg/ml). Deney sonunda fare gruplarında ötenazi, yüksek doz anestezi ile gerçekleştirilmiştir.

Her bir deney sonunda nebulizatör de dahil olmak üzere, sistemden metakolini temizlemek için gereken parçalar distile sudan geçirilip, basınçlı hava yardımıyla kurutulmuş ve sistem her bir deney öncesinde tekrar kalibre edilmiştir (Hartney ve Robichaud, 2013).

Deney sonunda her bir metakolin dozu uygulaması sonrasında elde edilen R_N ve R_{rs} değerlerinin aritmetik ortalaması alınarak, Prism 5.0 (GraphPad) yazılımında istatistiksel analizleri yapılmış ve grafikleri çizilmiştir.

Bu çalışmada, öncelikle OVA ile alerjik astım geliştirilen aP2 f/f (aP2 f/f OVA) ve PBS ile hastalık modelinin geliştirilmediği (aP2f/f PBS) gruplar arasında karşılaştırma yapılmıştır. Her iki grup için metakolinin artan konsantrasyonlarıyla yapılan bronkoprovokasyon testi ile elde edilen hava yolu direnç değerleri karşılaştırılmıştır. aP2 f/f grupları arasında hava yolu dirençleri arasında belirgin bir farkın görülmesi durumunda hava yolunda hiperreaktivite gelişiminde etkili olan

aP2'nin kaynağını araştırmak amacıyla yoksun modeller üzerinde deneyin tekrarlanıp hava yolu dirençlerinin karşılaştırılması kararlaştırılmıştır.

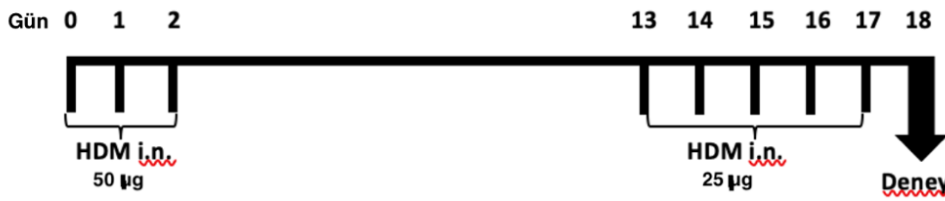
3.2.3. Ev Tozu Akarı (HDM) ile İndüklenen Alerjik Astım Modeli

3.2.3.1. Ev Tozu Akarı (HDM) ile Alerjik Astım Geliştirilmesi

Bu çalışmada ev tozu akarı ile alerjik astım modeli oluşumunda kullanılan protokol Oda ve ark.'larının (2019) çalışmalarında kullandıkları protokolden modifiye edilmiştir.

Alerjik astım oluşturulacak deney gruplarında, 6-8 haftalık aP2f/f genotipli C57BL/6 dişi fareler izofluran anestezisi altında, 0, 1 ve 2. günlerde intranazal yoldan (i.n.) 50µg HDM ile immünize edilmiştir. HDM ile duyarlılaştırmayı takiben, 13, 14, 15, 16 ve 17. günlerde izofluran anestezisi altında farelere 25µg HDM intranazal yoldan verilmiştir. Kontrol grubuna (aP2f/f-PBS) ise intranazal yolla sadece PBS uygulanmıştır.

Şekil 3-3'de deneylerde uygulanan HDM ile duyarlılaştırma ve HDM uyarım protokolü şematik olarak gösterilmiştir (Oda ve ark. 2019).



Şekil 3-3: HDM ile alerjik astım modeli geliştirilmesi-Oda ve ark.'dan (2019) değiştirilerek

3.2.3.2. Ev Tozu Akarı (HDM) ile İndüklenen Deneysel Alerjik Astım Modelinde Trakeostomi ve Kanülasyon İşlemi

HDM uyarımının tamamlanması sonrası 18. gün solunum sistemi çalışmaları başlatılmıştır. Farelerin bilgisayar kontrollü ventilatöre bağlanması öncesinde, trakeostomi ve kanülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fareler, intraperitoneal yoldan

ksilazin (7 mg/kg) ve pentobarbital (70 mg/kg) ile cerrahi düzeyde anestezi sağlandıktan sonra, sıcak ped üzerinde supin pozisyonuna getirilerek insizyon yapılacak bölge %70 etanol ile temizlenmiştir. Cilt ve cilt altı vertikal insizyondan sonra karotid arter ve juguler ven damarlarına dikkat edilerek, trakea submaksiller bez ve kas dokusundan ayrılarak görünür hale getirilmiştir (Hartney ve Robichaud, 2013). Trakea üzerinde proksimal kıkırdak halkalarına paralel küçük bir kesik atıldıktan sonra 21G kanül trakeaya yerleştirilmiş ve 4/0 cerrahi ipek iplik ile sabitlenmiştir (Hartney ve Robichaud, 2013).

3.2.3.3. Ev Tozu Akarı (HDM) ile İndüklenen Deneysel Alerjik Astım Modelinde FlexiVent Sistemi ile Hava Yolları Reaktivitesinin Değerlendirilmesi

Bilgisayar kontrollü FlexiVent-FX (SCIREQ) sisteminin kullanılmadan her deney öncesinde sistemin kalibrasyonu yapılmıştır. Her bir deney grubu için kilo ve genotip dahil olmak üzere bilgiler sistemin bilgisayar yazılımına kaydedilmiştir.

FlexiVent sisteminde mekanik ventilasyon başlatıldıktan sonra fareler, kanül aracılığıyla, bilgisayar kontrollü ventilatöre bağlanmıştır. Kas gevşeticisi panküronyum (0.8 mg/kg) intraperitoneal yoldan verildikten 3-5 dakika sonra hava yolları direnç ölçümleri başlatılmıştır. Mekanik ventilasyon sonrasında akciğer volümünün standardize edilmesi ve referans değerlerin elde edilmesinin ardından artan konsantrasyonlarda metakolin (0 – 6,25 – 12,5 –25- 50 mg/ml) 10 saniye süreyle nebulize edilmiş ve sonrasında toplam 12'ser kez R_N ve R_{rs} ölçümleri ard ardına kaydedilmiştir (Hartney ve Robichaud, 2013). Deney sonunda fare gruplarında ötenazi yüksek doz anestezi ile gerçekleştirilmiştir.

Her bir deney sonunda nebulizatör de dahil olmak üzere, sistemden metakolini temizlemek için gereken parçalar distile sudan geçirilip, basınçlı hava yardımıyla kurutulmuş ve sistem her bir deney öncesinde tekrar kalibre edilmiştir (Hartney ve Robichaud, 2013).

Deney sonunda her bir metakolin dozu uygulaması sonrasında elde edilen R_N ve R_{rs} değerlerinin aritmetik ortalaması alınarak, Prism 5.0 (GraphPad) yazılımında istatistiksel analizleri yapılmış ve grafikleri çizilmiştir.

Bu çalışmada, öncelikle deneysel modelin kontrol grubu olan aP2 f/f genotipli farelerde, HDM ile alerjik astım geliştirilen aP2 f/f (aP2 f/f HDM) ve PBS ile hastalık modelinin geliştirilmediği (aP2f/f PBS) gruplar arasında R_N ve R_{rs} değerleri karşılaştırılmıştır. aP2 f/f grupları arasında hava yolu dirençleri arasında belirgin bir farkın görülmesi durumunda hava yolunda hiperreaktivite gelişiminde etkili olan aP2'nin kaynağını araştırmak amacıyla yoksun modeller üzerinde deneyin tekrarlanıp hava yolu dirençlerinin karşılaştırılması kararlaştırılmıştır.

3.3. *In Vitro* Çalışmalar

Alerjik hava yolu inflamasyonu üzerinde aP2 proteinin etkisini değerlendirmek amacıyla *in vitro* sistemler üzerinde çalışılmıştır. Bu amaçla, alveolar makrofaj, bronşiyal epitel hücre ve akciğer epitel hücre hatları üzerinde deneyler gerçekleştirilmiştir.

In vitro sistem üzerinde gerçekleştirdiğimiz deneylerde;

1. aP2'nin alveolar makrofaj, bronşiyal epitel hücre ve akciğer epitel hücrelerinde sitokin ve kemokin üretimine katkısını değerlendirmek,
2. Alerjene maruz kalmaya bağlı olarak alveolar makrofaj, bronşiyal epitel hücre ve akciğer epitel hücrelerinde aP2 ekspresyonunu değerlendirmek
3. Alerjene maruz kalmaya bağlı olarak inflamatuvar sitokin ve kemokin oluşumunda aP2'nin katkısını değerlendirmek amaçlanmıştır.

3.3.1. Hücre Hatlarının Deneye Hazırlanması

İnsan bronşiyal epitel hücresi, BEAS-2B (ATCC #CRL-9609TM), fare akciğer epitel hücresi, MLE-12 (ATCC #CRL-2110TM) ve fare alveolar makrofaj hücresi, MH-S (ATCC #CRL-2019TM) üzerinde *in vitro* deneyler hücre kültür çalışmalarına uygun koşullarda yapılmıştır. Besiyerlerinin hazırlanması, hücrelerin ekimi, pasajlanması ve çeşitli ajanlarla muamele edilme işlemi de dahil olmak üzere tüm çalışmalar, laminar hava akım kabinlerinde steril ekipmanlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.1.1. İnsan Bronşiyal Epitel Hücresi, BEAS-2B'nin Deneye Hazır Hale Getirilmesi

BEAS-2B için hücre kültür besiyeri, Tablo 3-1'de belirtilen oran ve miktarda, DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12- Gibco®) solüsyon içerisine CCS (cosmic calf serum) ve Penisilin-Streptomisin (P/S 10000 U/ml) ilave edilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 4°C buzdolabında saklanmıştır ve kullanım öncesi 37°C su banyosunda ısıtıldıktan sonra kullanılmıştır.

Tablo 3-1: BEAS-2B Hücre Hattı için Kullanılan Hücre Kültür Besiyeri

Solüsyonlar	%	ml
DMEM/F12 (+L-Glutamin +Fenol Kırmızı)	-	445
CCS	10	50
Penisilin-Streptomisin (P/S 10,000 U/ml)	1	5

Besiyeri ilavesi ile 100 mm çaplı kollagen-1 kaplı kültür kabı hücre ekimine hazır hale getirildikten sonra 1,5 ml'lik kriyojenik tüpler içinde bulunan ve sıvı azot tanklarında saklanan BEAS-2B hücre stoku, 37°C su banyosunda hızla çözülüp ilave edilip nem ve sıcaklık (37 °C) kontrollü %5 CO₂ inkübatörüne konmuştur.

Hücre besiyeri belirli aralıklarla (48-72 saat) aspire edilip, taze besiyeri eklenmiştir. Mikroskop altında incelenen hücreler %70-80 yoğunluğa geldiklerinde, tripsin ile hücre pasajlama işlemini takiben, hücre sayımı gerçekleştirilerek, hücre kabının yüz ölçümüne uygun sayıda hücre, her bir kuyuda 1,5 ml volüm olacak şekilde, 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Nem ve sıcaklık (37°C) kontrollü, %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Deneyden bir gün önce besiyeri aspire edilerek, %0.01 BSA içeren serumsuz DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12) besiyerinde bekletilmiştir.

3.3.1.2. Fare Akciğer Epitel Hücresi, MLE-12'nin Deneye Hazır Hale Getirilmesi

MLE-12 için hücre kültür besiyeri, Tablo 3-2'de belirtilen oran ve miktarda, DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12- Gibco®) solüsyon içerisine CCS (cosmic calf serum) ve Penisilin-Streptomisin (P/S 10,000 U/ml) ilave edilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 4°C buzdolabında muhafaza edilip, kullanım öncesi 37°C su banyosunda ısıtılarak, kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Tablo 3-2: MLE-12 Hücre Hattı için Kullanılan Hücre Kültür Besiyeri

Solüsyonlar	%	ml
DMEM/F12 (+L-Glutamin +Fenol Kırmızı)	-	445
CCS	10	50
Penisilin-Streptomisin (P/S 10,000 U/ml)	1	5

Hücre hattı 100 mm'lik kollagen-1 kaplı hücre kültür kabına, besiyeri ilave edilerek hücre ekimine hazır hale getirilmiştir. Kriyojenik 1,5 ml'lik tüpler içinde bulunan ve sıvı azot tanklarında muhafaza edilen MLE-12 hücre stoku, 37°C su banyosunda hızla çözülüp kültür kabına ekilerek, nem ve sıcaklık (37 °C) kontrollü %5 CO₂ inkübatörüne konmuştur.

Hücre besiyeri belirli aralıklarla (48-72 saat) aspire edilip, taze besiyeri eklenmiştir. Mikroskop altında incelenen hücreler %70-80 yoğunluğa geldiklerinde, tripsin ile hücre pasajlama işlemini takiben, hücre sayımı gerçekleştirilerek, hücre kabının yüz ölçümüne uygun sayıda hücre, her bir kuyuda 1,5 ml volüm olacak şekilde, 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Nem ve sıcaklık (37°C) kontrollü, %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Deneyden bir gün önce besiyeri aspire edilerek, %0.01 BSA içeren serumsuz DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12) besiyerinde bekletilmiştir.

3.3.1.3. Fare Alveolar Makrofaj Hücresi, MH-S'nin Deneye Hazır Hale Getirilmesi

Fare alveolar makrofaj hücresi, MH-S, hücre kültür besiyeri, Tablo 3-3'de belirtilen oran ve miktarda, RPMI-1640 solüsyonu içerisine Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum, FBS) ve Penisilin-Streptomisin (P/S 10000 U/ml) ilave edilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 4°C buzdolabında muhafaza edilip, kullanım öncesi 37°C su banyosunda ısıtılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Tablo 3-3: MH-S Hücre Hattı için Kullanılan Hücre Kültür Besiyeri

Solüsyonlar	%	ml
RPMI-1640 (+L-Glutamin +Fenol Kırmızı)	-	445
FBS	10	50
Penisilin-Streptomisin (P/S 10,000 U/ml)	1	5

Hücre hattı 100 mm'lik kollagen-1 kaplı hücre kültür kabına, besiyeri ilave edilerek hücre ekimine hazır hale getirilmiştir. Kriyojenik 1,5 ml'lik tüpler içinde bulunan ve sıvı azot tanklarında muhafaza edilen MH-S hücre stoku, 37°C su banyosunda hızla çözülüp kültür kabına ekilerek, nem ve sıcaklık (37 °C) kontrollü %5 CO₂ inkübatörüne konmuştur.

Hücre besiyeri belirli aralıklarla (48-72 saat) aspire edilip, taze besiyeri eklenmiştir. Mikroskop altında incelenen hücreler %70-80 yoğunluğa geldiklerinde, tripsin ile hücre pasajlama işlemini takiben, hücre sayımı gerçekleştirilerek, hücre kabının yüz ölçümüne uygun sayıda hücre, her bir kuyuda 1,5 ml volüm olacak şekilde, 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Nem ve sıcaklık (37°C) kontrollü, %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Deneyden bir gün önce besiyeri aspire edilerek, %0.01 BSA içeren serumsuz RPMI-1640 besiyerinde bekletilmiştir.

3.3.2. İnsan Bronşiyal Epitel Hücresi, BEAS-2B Üzerinde Deneyin Yapılışı

Hücreler %0,1 BSA içeren DMEM/F12 besiyerinde bir gece bekletildikten sonra, tabloda isimleri belirtilen ajanlar ile 18 saat boyunca nem ve sıcaklık (37°C) kontrollü %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Kontrol grubu olarak herhangi bir ajan ilave edilmemiş olup kullanılan ajanların çözeltileri (PBS) besiyerine eklenmiştir.

6 kuyucuklu hücre kültür kaplarında her bir kapta 1,5 ml volümlük besiyerde tabloda belirtilen konsantrasyonda aşağıdaki ajanlar kullanılmıştır (Tablo 3-4).

Tablo 3-4: BEAS-2B hücrelerinde yapılan deneyde kullanılan ajanlar

Ajanlar	Konsantrasyon
Rekombinant aP2 (n=3)	1000 ng/ml
OVA (n=3)	500 µg/ml
Rekombinant aP2 +OVA (n=3)	1000ng/ml + 500 µg/ml
Rekombinant Der p1 (n=3)	0,5 µg/ml
Rekombinant Der p1 (n=3)	5 µg/ml

aP2'nin bronşiyal epitel hücresinde sitokin ve kemokin üretimine katkısını değerlendirmek amacıyla BEAS-2B hücreleri rekombinant aP2 ile muamele edilmiştir. Rekombinant aP2 proteini olarak laboratuarda hazırlanmış ve +4°C de muhafaza edilen fare rekombinant aP2 proteini kullanılmıştır.

BEAS-2B hücreleri, OVA ve bir HDM alerjeni olan Rekombinant Der p 1 ile muamele edilerek, alerjene maruz kalmaya bağlı olarak bronşiyal epitel hücrelerden aP2 gen ekspresyonunu değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca OVA'nın Rekombinant aP2 ile birlikte muamele edilmesiyle, epitel hücrede alerjene bağlı inflamatuvar sitokin ve kemokin üretimi üzerinde aP2'nin etkisi araştırılmıştır. OVA, liyofilize tozunun çözelti hale getirilip ve 0.2 µm (Corning) şırınga filtresi ile laminar hava kabinde sterilize edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Rekombinant Der p

1 Protein (bioWORLD) ise 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda çözelti halinde üretici firmadan alınmıştır. BEAS-2B ve AEC (Airway epithelial cells) hücre hatları üzerinde OVA ve Der p 1 ile yapılan çeşitli çalışmalarda kullanılan konsantrasyonlar göz önüne alarak, OVA 500 $\mu\text{g/ml}$, Rekombinant Der p 1 ise 0,5 $\mu\text{g/ml}$ ve 5 $\mu\text{g/ml}$ olmak üzere iki farklı konsantrasyonda kullanılmıştır (Wong ve ark. 2006; Chuang ve ark. 2009; Lv ve ark. 2018a; Lv ve ark. 2018b).

3.3.3. Fare Akciğer Epitel Hücresi, MLE-12 Üzerinde Deneyin Yapılışı-

Hücreler %0,1 BSA içeren DMEM/F12 besiyerinde bir gece bekletildikten sonra, tabloda isimleri belirtilen ajanlar ile muamele edilerek, 18 saat boyunca nem ve sıcaklık (37°C) kontrollü %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Kontrol grubu olarak herhangi bir ajan ilave edilmemiş olup kullanılan ajanların çözeltileri (PBS) besiyerine eklenmiştir.

6 kuyucuklu hücre kültür kaplarında her bir kapta 1,5 ml volümlük besiyerde tabloda belirtilen konsantrasyonda aşağıdaki ajanlar kullanılmıştır (Tablo 3-5).

Tablo 3-5: MLE-12 hücrelerinde yapılan deneyde kullanılan ajanlar

Ajanlar	Konsantrasyon
Rekombinant aP2 (n=3)	1000ng/ml
Rekombinant aP2 (n=3)	100ng/ml
OVA (n=3)	500 $\mu\text{g/ml}$
Rekombinant aP2+ Ovalbumin (n=3)	1000ng/ml+500 $\mu\text{g/ml}$
Rekombinant aP2+ Ovalbumin (n=3)	100ng/ml+500 $\mu\text{g/ml}$

aP2'nin akciğer epitel hücresinde sitokin ve kemokin üretimine katkısını değerlendirilmesi amacıyla MLE-12 hücreleri rekombinant aP2 ile muamele edilmiştir. Bu amaçla, 100 ng/ml ve 1000 ng/ml olmak üzere iki farklı konsantrasyonda

kullanılmıştır. Rekombinant aP2 proteini olarak laboratuarda hazırlanmış ve +4°C de muhafaza edilen fare rekombinant aP2 proteini kullanılmıştır.

MLE-12 hücreleri, sadece OVA ve OVA'nın rekombinant aP2 ile birlikte muamele edilmesiyle, akciğer epitel hücresinde alerjene bağlı inflamatuvar sitokin ve kemokin üretimi üzerinde aP2'nin rolü araştırılmıştır. Kullanılan OVA, liyofilize tozunun çözelti hale getirilip ve 0,2 µm (Corning) şırınga filtresi ile laminar hava kabininde sterilize edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.3.4. Fare Alveolar Makrofaj Hücresi, MH-S Üzerinde Deneyin Yapılışı

Hücreler %0,1 BSA içeren DMEM/F12 besiyerinde bir gece bekletildikten sonra, tabloda isimleri belirtilen ajanlar ile muamele edilerek, 18 saat boyunca nem ve sıcaklık (37°C) kontrollü %5 CO2 inkübatöründe inkübe edilmiştir. Kontrol grubu olarak herhangi bir ajan ilave edilmemiş olup kullanılan ajanların çözeltileri (PBS) besiyerine eklenmiştir.

6 kuyucuklu hücre kültür kaplarında her bir kapta 1,5 ml volümlük besiyerde tabloda belirtilen konsantrasyonda aşağıdaki ajanlar kullanılmıştır (Tablo 3-6).

Tablo 3-6: MH-S hücrelerinde yapılan deneyde kullanılan ajanlar

Ajanlar	Konsantrasyon
Rekombinant aP2 (n=3)	1000ng/ml
Rekombinant aP2 (n=3)	100ng/ml
LPS (n=3)	100ng/ml
OVA (n=3)	500 µg/ml
Rekombinant aP2+ OVA (n=3)	1000ng/ml+500 µg/ml
Rekombinant aP2+LPS (n=3)	1000ng/ml+100ng/ml
Rekombinant aP2+LPS (n=3)	100ng/ml+100ng/ml

aP2'nin alveolar makrofajlarda sitokin ve kemokin üretimine katkısını değerlendirmek amacıyla hücreler rekombinant aP2 ile muamele edilmiştir. Bu amaçla, 100 ng/ml ve 1000 ng/ml olmak üzere iki farklı konsantrasyonda kullanılmıştır. Rekombinant aP2 proteini olarak laboratuarda hazırlanmış ve +4°C de muhafaza edilen fare rekombinant aP2 proteini kullanılmıştır.

MH-S hücre hattı, OVA ile muamele edilerek alerjene maruz kalmaya bağlı olarak alveolar makrofajlarda aP2 gen ekspresyonunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca OVA'nın Rekombinant aP2 ile birlikte muamele edilmesiyle alveolar makrofajlarda alerjene bağlı inflamatuvar sitokin ve kemokin üretimi üzerinde aP2'nin etkisi araştırılmıştır. Kullanılan OVA liyofilize tozunun çözelti hale getirilip ve 0,2 µm (Corning) şırınga filtresi ile laminar hava kabininde sterilize edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. LPS ise, alveolar makrofajlarda aP2 gen ekspresyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, laminar hava kabininde steril PBS çözeltisinde seyreltilerek hazırlanmıştır. Bu amaçla, MH-S hücre hattına LPS, 100 ng/ml konsantrasyonda uygulanmıştır (Kazemi ve ark. 2005).

3.3.5. Deneyin Sonlandırılması

Her bir hücre hattı ile yapılan deney gruplarının, 18 saatlik inkübasyon süresi sonrasında, hücre kültür ortamları tek kullanımlık steril pipet yardımıyla, buz üzerindeki 1,5 ml'lik eppendorf tüplere aktarılmıştır. Daha sonra RNA izolasyonu için hücre kültür kabı hızlı bir şekilde PBS ile yıkanıp RNA izolasyonuna geçilmiştir.

Eppendorf tüplerindeki hücre kültür ortamı, hücrelerden arındırmak için 4°C ve 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısım bir başka 1,5 ml'lik eppendorf tüpe aktarılmıştır. Elde edilen bu eppendorf içindeki her bir deney grubuna ait hücre kültür ortamları ELISA yöntemiyle aP2 ve LDH seviyelerini ölçmek üzere (-)80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.6. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Hücre hatlarında yapılan deney sonunda hücre kültür ortamı toplandıktan sonra, hücrelerin RNA izolasyonları için, RNeasy kiti (QIAGEN) kullanılmıştır ve üretici firmanın prosedürleri uygulanmıştır.

Elde edilen numunelerden, Nanodrop 2000c ile spektrofotometrik olarak RNA miktarı ve saflığı ölçülmüştür. Elde edilen RNA miktarlarına göre, cDNA sentezi için her bir örnekten 500 ng RNA olacak şekilde kullanılması gereken volüm hesaplanmıştır. Elde edilen RNA miktarlarına göre her bir örnek için cDNA sentezinde kullanılacak nükleaz-içermeyen su miktarı hesaplanmıştır.

İzole edilen total RNA'dan cDNA sentezi için iScript™ Ters Transkripsiyon Supermix kiti kullanılmıştır. Her bir örnekten RNA ve nükleaz-içermeyen su için yapılan hesaplamalar doğrultusunda alınan volüme, 4 µl iScript™ Ters Transkripsiyon Supermix'in ilavesi ile PCR tüplerinde birleştirilerek ters transkripsiyon yöntemiyle her bir örnekten cDNA sentez edilmiştir. cDNA sentezinde kullanılan maddeler ve miktarları Tablo 3-7'de verilmiştir.

Tablo 3-7: cDNA sentezinde kullanılan maddeler ve miktarları

Bileşenler	Miktar (µl)
Nükleaz içermeyen su	Her bir örnek için hesaplandı
RNA (500 ng)	Her bir örnek için hesaplandı
iScript™ Ters Transkripsiyon Supermix	4 µl
Total miktar	20 µl

cDNA sentezi için hazırlanan 20µl'lik numuneler PCR cihazına yerleştirilerek, kitte belirtilen reaksiyon protokolü uygulanarak cDNA elde edilmiştir. Kite mevcut cDNA sentez reaksiyon protokolü Tablo 3-8'de gösterilmiştir.

Tablo 3-8: cDNA sentez reaksiyonu

	1.Adım	2.Adım	3.Adım	4.Adım
Sıcaklık (°C)	25	46	95	4
Zaman (dakika)	5	20	1	∞

cDNA sentez işlemi sonrasında, cDNA içeren PCR tüplerinden her biri nükleaz içermeyen su ilave edilerek 1:2 oranında dilüe edilmiştir. Dilüe edilen her bir örnekten 20 µl alınarak 1,5 ml'lik eppendorf tüpte, tüm örneklerin cDNA'sını içeren standart karışım elde edilmiştir. Standart karışım her biri ayrı bir eppendorf tüpte olacak şekilde 1:4, 1:16, 1:64 ve 1:256 oranında dilüe edilerek 5 farklı konsantrasyonda standart karışım elde edilmiştir.

PCR tüplerinde geriye kalan 20 µl'lik örneklerden her biri ayrı ayrı 1,5 ml'lik eppendorf tüplere aktarılmıştır ve nükleaz-içermeyen su ile 1:16 oranında dilüe edilerek RT-QPCR uygulamasına hazır hale getirilmiştir.

3.3.7. RT-QPCR Uygulaması

Hücre hatlarında yapılan *in vitro* deneylerde, CC kemokin ligand 2, Ccl2 (monosit kemoatraktan protein-1, Mcp-1), proinflamatuvar sitokin IL-1β, epitel kaynaklı sitokinlerden TSLP ve IL-25 ile aP2 gen ekspresyonları, SYBR Green sistemi kullanılarak RT-QPCR yöntemi ile analiz edilmiştir. RT-QPCR uygulamasında kullanılan ve stokları 100mM olan primerler, nükleaz içermeyen su ile 2,5 mM konsantrasyonunda dilüe edilmiştir. Kullanılan primerler Tablo 3-9 ve Tablo 3-10'de gösterilmiştir. Master karışım ve analiz edilecek örnekler tabloda verilen değerler ölçüsünde 384 kuyucuklu PCR mikrolaklarına yüklenmiştir. Mikrosantrifüj ile

döndürülerek RT-QPCR (ViiA™ 7 Real-Time PCR Systems) yerleştirilmiştir. Her bir PCR mikropalak kuyucuğundaki mevcut karışımın içeriği Tablo 3-11’de verilmiştir. RT-QPCR uygulamasında analizler görece standart eğri metodu ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3-9: Referans ve Hedef Genlerin Primer Dizileri (BEAS-2B hücre hattı için)

Gen	Primer
β -Aktin Ön (Referans gen)	5'- AGG-CAT-CCT-CAC-CCT-GAA-GTA-3'
β -Aktin Ters (Referans gen)	5'-CAC-ACG-CAG-CTC-ATT-GTA-GA -3'
MCP-1 Ön	5'-CCT-TCT-GTG-CCT-GCT-GCT-CAT-AG-3'
MCP-1 Ters	5'-TCT-TCG-GAG-TTT-GGG-TTT-GCT-TGT-3'
TSLP Ön	5'-GCC-ATG-AAA-ACT-AAG-GCT-GC- 3'
TSLP Ters	5'- CGC-CAC-AAT-CCT-TGT-AAT-TG- 3'
IL-1 β Ön	5'-CAC-GAT-GCA-CCT-GTA-CGA-TCA- 3'
IL-1 β Ters	5'-GTT-GCT-CCA-TAT-CCT-GTC-CCT- 3'
aP2 Ön	5'-AGC-ACC-ATAACC-TTA-GAT-GGG-G - 3'
aP2 Ters	5'- CGT-GGA-AGT-GAC-GCC-TTT-CA- 3'
IL-25 Ön	5'- CCA-GGT-GGT-TGC-ATT-CTT-GG- 3'
IL-25 Ters	5'- TGG-CTG-TAG-GTG-TGG-GTT-CC- 3'

Tablo 3-10: Referans ve Hedef Genlerin Primer Dizileri (MLE-12 ve MH-S hücre hattı için)

Gen	Primer
Gapdh Ön (Referans gen)	5'-CTC-ATG-ACC-ACA-GTC-CAT-GC-3'
Gapdh Ters (Referans gen)	5'-CAC-ATT-GGG-GGT-AGG-AAC-AC -3'
Ccl2 Ön	5'-CCT-GTC-ATG-CTT-CTG-GGC-CTG-C-3'
Ccl2 Ters	5'-GGG-GCG-TTA-ACT-GCA-TCT-GGC-TG -3'
β -Aktin Ön (Referans gen)	5'-GAC-GGC-CAG-GTC-ATC-ACT-ATT-G- 3'
β -Aktin Ters (Referans gen)	5'-AGG-AAG-GCT-GGA-AAA-GAG-CC- 3'
IL-1 β Ön	5'-AAA-TAC-CTG-TGG-CCT-TGG-GC - 3'
IL-1 β Ters	5'-CTT-GGG-ATC-CAC-ACT-CTC-CAG- 3'
aP2 Ön	5'-GAT-GCC-TTT-GTG-GGA-ACC-TG - 3'
aP2 Ters	5'-GAA-TTC-CAC-GCC-CAG-TTT-GA - 3'

Tablo 3-11: Her bir PCR Mikroplak Kuyucuğunda Mevcut Karışım

Maddeler	Hacim (μ l)
Primer (Ön+Ters)	3
cDNA	3
PowerUp TM SYBR TM Green Master karışım	6

3.3.8. Hücre Kültür Ortamında aP2 ölçümü

aP2 protein seviyeleri (-) 80°C de muhafaza edilen hücre kültür ortamında, BEAS-2B ve MLE-12 hücrelerinden elde edilen media üzerinde bir dilüsyon yapılmadan, MH-S hücrelerinden elde edilen kültür ortamında ise hücre hattına uygun besiyeri ile 1:4 oranında dilüsyon yapılarak ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. ELISA işlemi, Hotamışlıgil laboratuvarının aP2 ölçüm protokolüne uygun bir şekilde ve laboratuvarında hazırlanan primer ve sekonder antikorlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığında inkübasyon işlemi çalkalayıcı cihazında gerçekleştirilmiştir.

ELISA'da ilk olarak 96 kuyucuklu mikropalak tampon çözeltisi içerisinde 10 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan 100 µl anti-FABP4 (G9) ile kaplanmıştır. Oda sıcaklığında 1 saat bekleme sonrası 300 µl yıkama solüsyonu ile üç defa yıkama gerçekleştirilmiştir. Kuyucuklara 100 µl bloklama tamponu ilave edilerek 30 dakika beklenmiştir. İnkübasyon sonrasında üçer defa gerçekleştirilen yıkama işlemi takiben, tampon çözeltisi ile seyreltilen standart örnekler (insan aP2 protein, R&D Systems) ve hücre kültür ortamından alınan örnekler, kuyucuklara 100 µl eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar altı defa yıkanmıştır. anti-FABP4 H3-HRP, 0,4 mg/ml stok çözeltiden dilüsyon tampon çözeltisi ile 1:1000 oranında dilüe edilerek hazırlanıp kuyucuklara 100 µl hacimde eklenerek 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında altı defa yıkama işlemi uygulanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılmıştır. 100 µl TMB solüsyonu ile 2-3 dakikalık inkübasyon sonrası 100 µl 0,18 N H₂SO₄ eklenerek reaksiyon sonlandırılmış ve 450 nm'de ölçüm yapılmıştır. Kullanılan çözeltilerin içerikleri Tablo 3-12'de verilmiştir. Elde edilen konsantrasyon değerleri Prism 5.0 (GraphPad) ile analiz edilerek grafikleri çizilmiştir.

Tablo 3-12: ELISA işlemi için kullanılan çözeltiler ve içerikleri

Kullanılan çözelti	İçerik
Kaplama tampon çözeltisi	6 g sodyum bikarbonat 3,03 g sodyum karbonat 1 L distile su pH: 9.6
Bloklama Tampon çözelti	PBS içerisinde 5% BSA
Dilüsyon Tampon çözelti	Yıkama çözeltisi içinde 1% BSA
Durdurma Tampon çözeltisi	0,18 N: 500 ml distile su içinde 2,5 ml H ₂ SO ₄
Yıkama çözeltisi	PBS içerisinde % 0,05 Tween 20

3.3.9. Hücre Kültür Ortamında LDH ölçümü

Tüm *in vitro* deneylerde LDH seviyeleri, ajanların toksik etkilerine bağlı hücre ölümünün söz konusu olup olmadığını anlamak amacıyla değerlendirilmiştir

Hücre kültür ortamında LDH ölçümü, LDH Sitotoksiste Deteksiyon Kiti (Clontech Laboratories Inc., Takara Bio) protokolünden modifiye edilerek yapılmıştır.

Eksi 80°C de muhafaza edilen hücre kültür ortamı örnekleri, hücre hattına göre uygun hücre kültür besiyeri ile 1:4 oranında dilüe edilmiştir. Kit içerisinde mevcut katalist ve boya solüsyonu, kit protokolünde belirtilen şekilde hazırlanmıştır. Kullanımdan hemen önce 250 µl katalist ve 11,25 ml boya solüsyonu karıştırılarak, reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Doksan altı kuyucuklu plakaya her bir kuyucuk içine her bir deney grubundan elde edilen 100 µl hücre kültür ortamı ve hemen öncesinde hazırlanan 100 µl reaksiyon karışımı konulmuştur. Plaka ışıktan korunaklı biçimde, 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

Otuz dakika sonunda örneklerin 490 nm de absorbans ölçümü yapılmıştır. Elde edilen değerler kaydedilmiştir. Her bir optik dansite (OD) değeri, o deney grubunun

kontrol grubunda elde edilen OD değerin aritmetik ortalamasına normalize edilerek Prism 5.0 (GraphPad) ile analiz edilerek grafikleri çizilmiştir.

3.3.10. İstatistiksel Analiz

Deney gruplarında belirtilen n sayıları, hayvan deneylerinde verilerin elde edildiği fare sayılarını, qPCR deneylerinde ve hücre kültürü çalışmalarında örneklerin elde edildiği kuyucuk sayılarını ifade etmektedir.

RT-QPCR analizlerinden elde edilen grafiklerde rölatif gen ekspresyon düzeyleri, standart eğri yöntemiyle, araştırılan genin ortalama değerinin (*Quantity Mean*) referans genin ortalama (*Quantity Mean*) değerine bölünmesiyle elde edilmiştir.

ELISA aP2 ölçümlerinde, BEAS-2B hariç hücre kültür ortamı örneklerindeki aP2, fare aP2 proteinin çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan standartlarından elde edilen kalibrasyon eğri denklemi üzerinden hesap edilmiştir. BEAS-2B hücre hattında ise standart olarak insan aP2 proteini kullanılmıştır.

Sitotoksisite, LDH Sitotoksiste Deteksiyon Kiti ile yapılan ölçümlerde, hücre kültür ortamından elde edilen örneklerde optik dansite (OD) değerlerin, kontrol grubunun ortalama OD değerlerine normalize edilmesiyle değerlendirilmiştir.

Elde edilen sonuçlar "ortalama $\pm$ standart hata" şeklinde verilmiştir. Deney sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Student's t-testi (Gruplar arası farkın anlamlılık testi) kullanılmıştır. İstatistiksel analizde $p < 0.05$ düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir. Analizlerde ve grafik çizimlerinde Prism 5.0 (GraphPad) programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

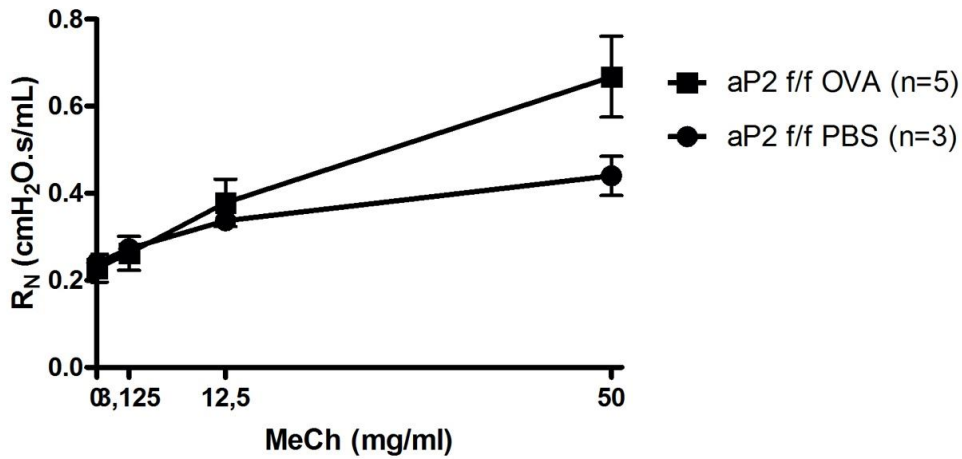
4.1. *İn Vivo* Çalışmalar

Bu çalışmada, farelerde alerjik astım modeli iki farklı deneysel metod ile geliştirilmeye çalışılmıştır. Deneysel modelin gelişimi, tüm dokularda fare yerine insan aP2'si taşıyan aP2 f/f genotipli dişi C57BL/6 farelerde, deneysel grup (alerjen ile uyarılan) ile kontrol grubunun (alerjen ile uyarım yapılmayan), hava yolu dirençleri, R_N ve Rrs değerlerinin karşılaştırılması üzerinden değerlendirilmiştir.

4.1.1. Ovalbumin ile Alerjik Astım Geliştirilen Gruplar

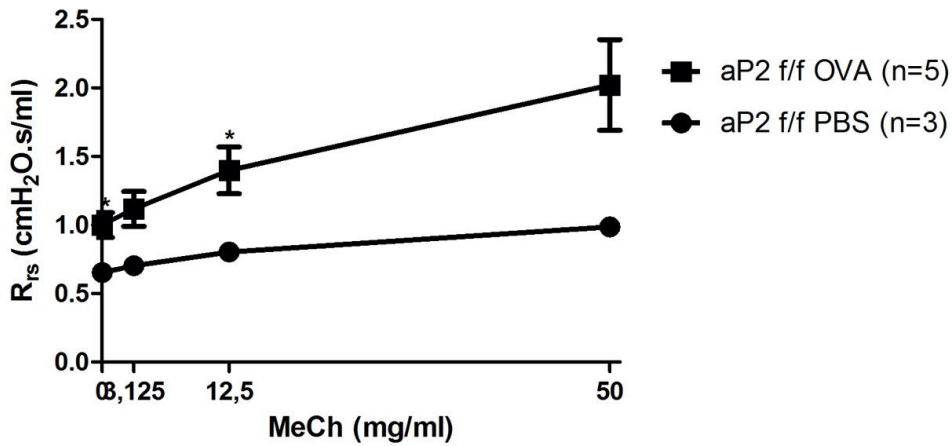
4.1.1.1. Ovalbumin ile Alerjik Astım Geliştirilen Gruplarda Hava Yolu Direncinin Değerlendirilmesi

OVA ile alerjik astım geliştirilen, aP2 f/f OVA (n=5) ve hastalık modelinin geliştirilmediği aP2f/f PBS (n=3) olmak üzere 8-9 haftalık C57BL/6 dişi fare gruplarında hava yolu dirençleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla, kümülatif dozlarda metakolin (MeCh) uyarımı (0-3,125-12,5-50mg/ml) ile gerçekleştirilen bronş provokasyon testi ile elde edilen hava yolu direnç değerleri karşılaştırılmıştır .



Şekil 4-1: aP2f/f farelerde OVA ile indüklenen alerjik astım modelinde metakolin (MeCh)'in artan konsantrasyonları (0-3,125-12,5- 50 mg/ml) ile gerçekleştirilen bronkoprovokasyonda elde edilen R_N değerleri

Hava yolları direncinin değerlendirilmesi sonucunda, aP2 f/f -OVA ile aP2 f/f -PBS gruplarından elde edilen R_N değerleri arasında hiçbir metakolin dozunda, istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4-1).



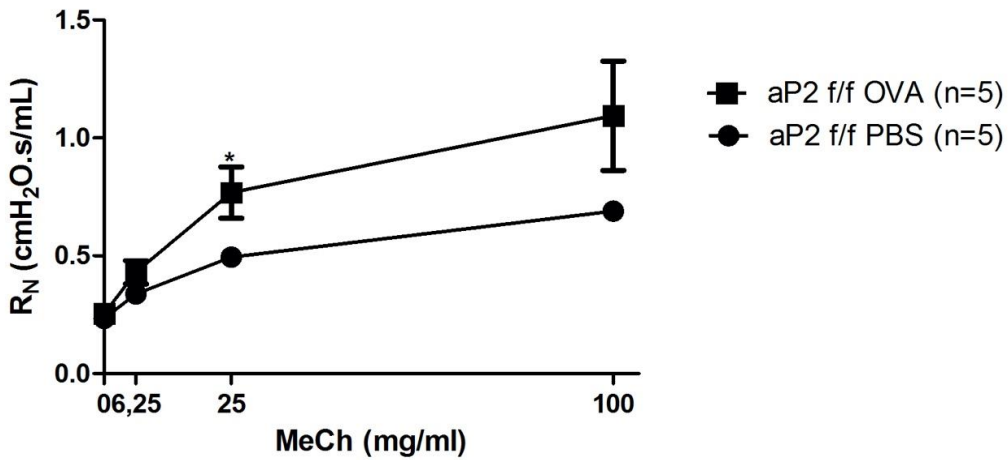
Şekil 4-2: aP2f/f farelerde OVA ile indüklenen alerjik astım modelinde metakolin (MeCh)'in artan konsantrasyonları (0-3,125-12,5- 50 mg/ml) ile gerçekleştirilen bronkoprovokasyonda elde edilen R_{rs} değerleri

(* $p < 0.05$, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.)

Hava yolu direncinin değerlendirilmesi sonucunda, aP2 f/f -OVA ile aP2 f/f -PBS gruplarından elde edilen R_N değerleri arasında, sadece 0 mg/ml ve 12,5 mg/ml dozlarında anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0.05$); ancak 3,125 mg/ml ve 50 mg/ml dozlarında elde edilmiş olan R_N değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterilememiştir (Şekil 4-2).

aP2 f/f genotipli farelerde, OVA grubunda PBS grubuna kıyasla, R_N ve R_{rs} değerlerinde bir artış eğilimi olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterilememesi nedeniyle metakolin uyarımında kullanılan metakolin dozları değiştirilerek, aP2 f/f OVA (n=5) ve aP2f/f PBS (n=5) grupları oluşturulmuştur.

OVA ile alerjik astım geliştirilen, aP2 f/f OVA (n=5) ve hastalık modelinin geliştirilmediği aP2f/f PBS (n=5) olmak üzere 8-9 haftalık C57BL/6 dişi fare gruplarında, metakolinin artan konsantrasyonlarıyla (0-6,25-25-100 mg/ml) yapılan bronş provokasyon testi ile, elde edilen hava yolu direnç değerleri karşılaştırılmıştır .

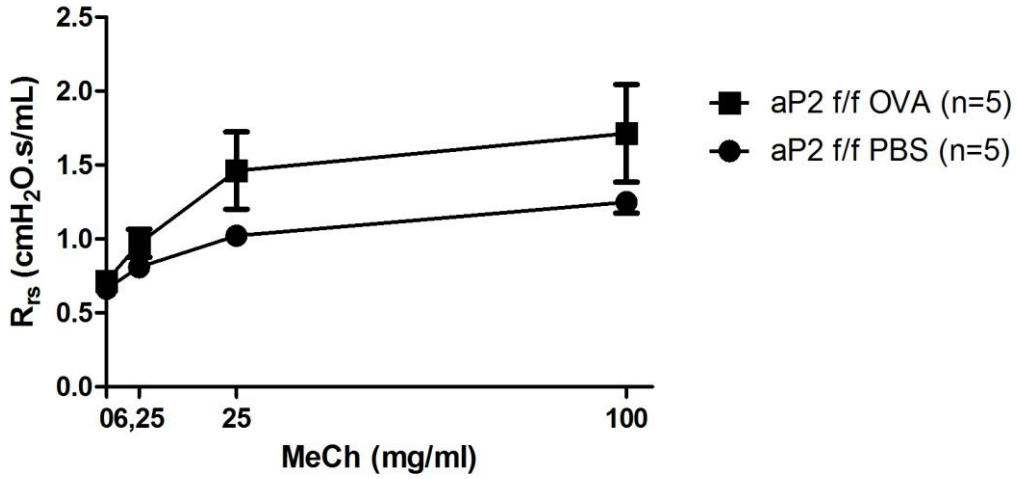


Şekil 4-3: aP2f/f farelerde OVA ile indüklenen alerjik astım modelinde metakolin (MeCh)'in artan konsantrasyonları (0-6,25-25-100 mg/ml) ile gerçekleştirilen bronkoprovokasyonda elde edilen R_N değerleri

(* $p<0.05$, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir)

Hava yolu direncinin değerlendirilmesi sonucunda, aP2 f/f -OVA ile aP2 f/f -PBS gruplarından elde edilen R_N değerleri arasında yalnızca 25 mg/ml dozunda elde

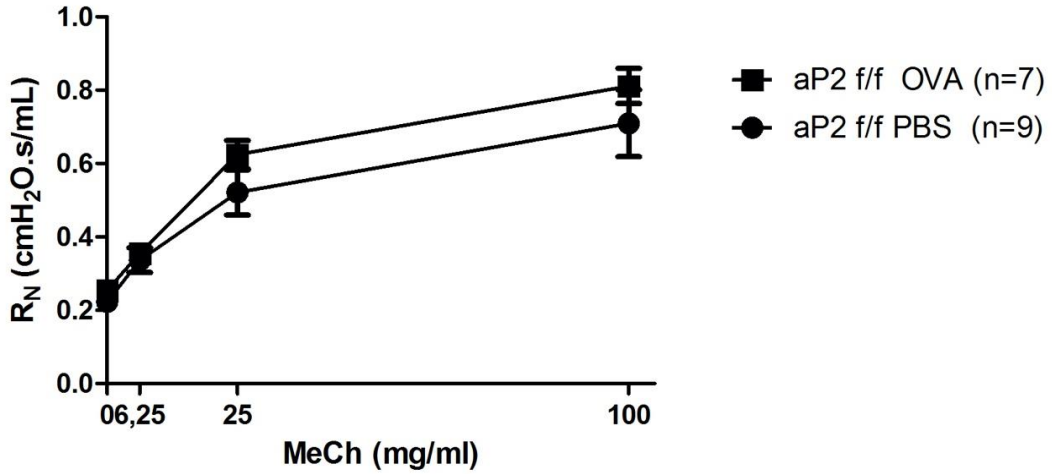
edilen R_N değeri kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0.05$) (Şekil 4-3).



Şekil 4-4: aP2f/f farelerde OVA ile indüklenen alerjik astım modelinde metakolin (MeCh)'in artan konsantrasyonları (0-6,25-25-100 mg/ml) ile gerçekleştirilen bronkoprovokasyonda elde edilen R_{rs} değerleri

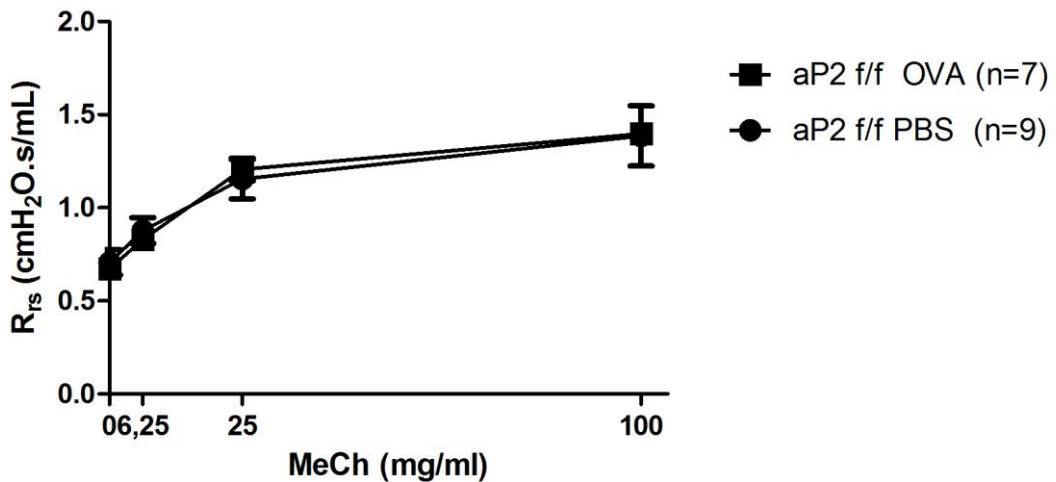
Hava yolu direncinin değerlendirilmesi sonucunda, aP2 f/f -OVA ile aP2 f/f -PBS gruplarından elde edilen R_{rs} değerleri arasında hiçbir metakolin dozunda, istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4-4).

R_N ve R_{rs} değerlerinde görülen varyasyonlar nedeniyle, yeni aP2 f/f OVA (n=7) ve aP2f/f PBS (n=9) grupları kurulmuştur. OVA ile alerjik astım geliştirilen, aP2 f/f OVA (n=7) ve hastalık modelinin geliştirilmediği aP2f/f PBS (n=9) olmak üzere 11-13 haftalık C57BL/6 dişi fare gruplarında, metakolinin artan konsantrasyonlarıyla (0-6,25-25-100 mg/ml) yapılan bronş provokasyon testi ile, elde edilen hava yolu direnç değerleri karşılaştırılmıştır.



Şekil 4-5: aP2f/f farelerde OVA ile indüklenen alerjik astım modelinde metakolin (MeCh)'in artan konsantrasyonları (0-6,25-25-100 mg/ml) ile gerçekleştirilen bronkoprovokasyonda elde edilen R_N değerleri

Hava yolları direncinin değerlendirilmesi sonucunda, aP2 f/f -OVA ile aP2 f/f -PBS gruplarından elde edilen R_N değerleri arasında hiçbir metakolin dozunda, istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4-5).



Şekil 4-6: aP2f/f farelerde OVA ile indüklenen alerjik astım modelinde metakolin (MeCh)'in artan konsantrasyonları (0-6,25-25-100 mg/ml) ile gerçekleştirilen bronkoprovokasyonda elde edilen R_{rs} değerleri

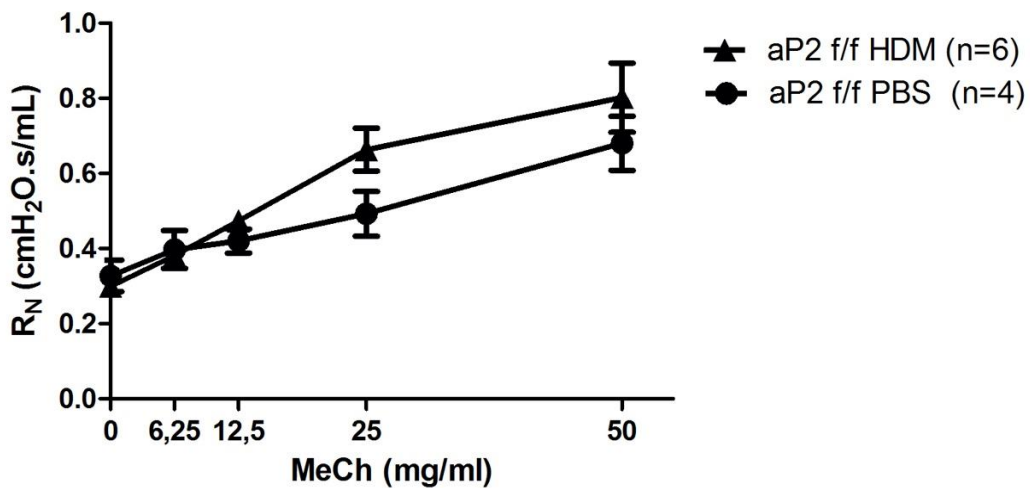
Hava yolları direncinin değerlendirilmesi sonucunda, aP2 f/f -OVA ile aP2 f/f -PBS gruplarından elde edilen Rrs değerleri arasında hiçbir metakolin dozunda, istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4-6).

OVA ile uyarıma bağlı olarak, aP2 f/f genotipli farelerde hava yolu direncinde belirgin ve anlamlı bir artış gösterilememesi nedeniyle, bir başka deneysel alerjik astım modeli olarak kullanılan Ev Tozu Akarı (HDM) ile çalışmaya devam edilmiştir.

4.1.2. Ev Tozu Akarı (HDM) ile Alerjik Astım Geliştirilen Gruplar

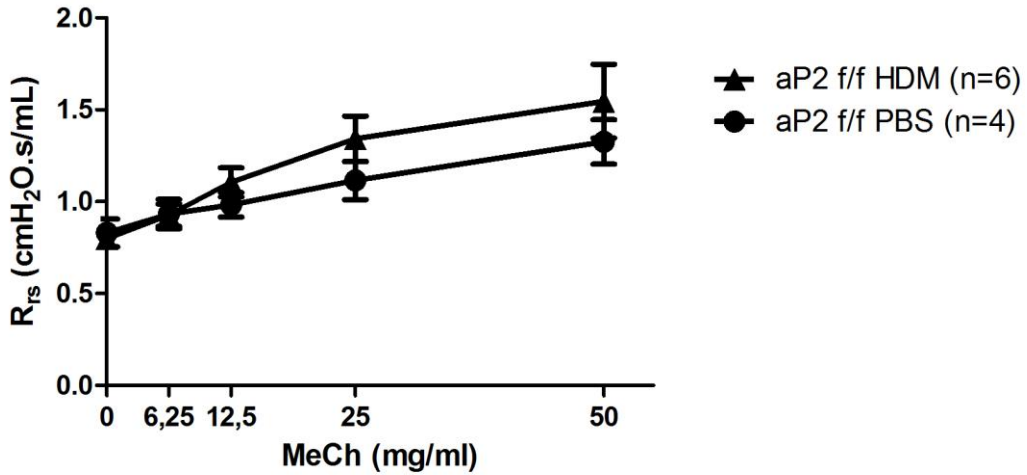
4.1.2.1. Ev Tozu Akarı (HDM) ile Alerjik Astım Geliştirilen Gruplarda Hava Yolu Dirençlerinin Değerlendirilmesi

HDM ile alerjik astım geliştirilen, aP2 f/f HDM (n=6) ve hastalık modelinin geliştirilmediği aP2f/f PBS (n=4) gruplarının hava yolu dirençleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla, kümülatif dozlarda metakolin uyarımı (0-6,25-12,5-25-50 mg/ml) ile gerçekleştirilen bronş provokasyon testi ile elde edilen hava yolu direnç değerleri karşılaştırılmıştır .



Şekil 4-7: aP2f/f farelerde HDM ile indüklenen alerjik astım modelinde metakolin (MeCh)'in artan konsantrasyonları (0-6,25-12,5- 25-50 mg/ml)ile gerçekleştirilen bronkoprovokasyonda elde edilen R_N değerleri

Hava yolu direncinin değerlendirilmesi sonucunda, aP2 f/f -HDM ile aP2 f/f -PBS gruplarından elde edilen R_N değerleri arasında hiçbir metakolin dozunda, istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4-7).



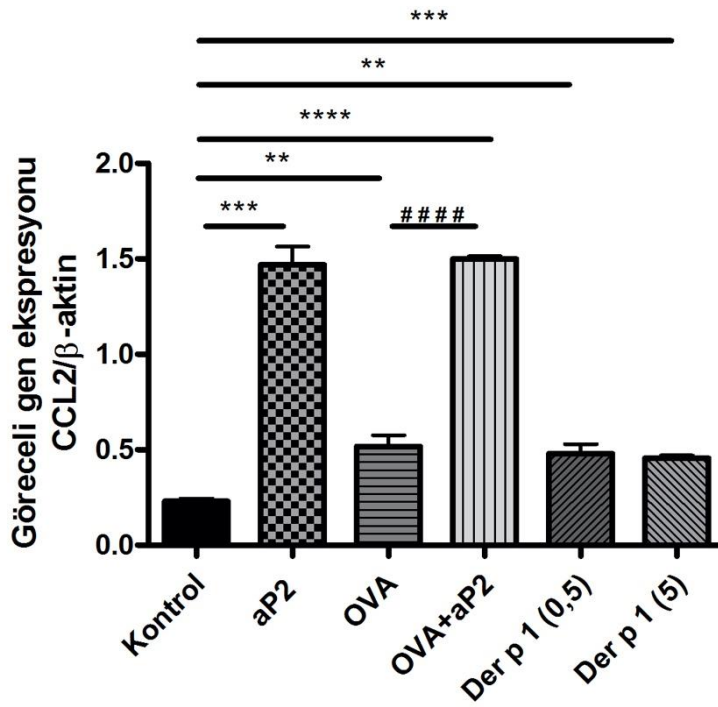
Şekil 4-8: aP2f/f farelerde HDM ile indüklenen alerjik astım modelinde metakolin (MeCh)'in artan konsantrasyonları (0-6,25-12,5- 25-50 mg/ml)ile gerçekleştirilen bronkoprovokasyonda elde edilen R_{rs} değerleri

Hava yolları direncinin değerlendirilmesi sonucunda, aP2 f/f -HDM ile aP2 f/f -PBS gruplarından elde edilen R_{rs} değerleri arasında hiçbir metakolin dozunda, istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4-8).

Sonuç olarak OVA veya HDM ile indüklenen deneysel aP2f/f-fare alerjik astım modelinde metakolinin artan dozları ile gerçekleştirilen bronkoprovokasyon testi sonrasında R_N ve R_{rs} değerlerinde kontrol grubuna göre bir anlamlılık gözlenmemiştir. Bu nedenle, doku spesifik aP2'den yoksun deney gruplarında planlanan hava yolları direncinin karşılaştırılması ve alerjik astımda hava yolları hiperreaktivitesinde rol alan aP2'nin kaynağının araştırılması çalışmaları yapılamamıştır. aP2'nin hava yolları inflamasyonundaki rolünü değerlendirmek üzere çalışmaya in vitro ortamda insan bronşiyal epitel (BEAS-2B), fare akciğer epitel (MLE-12) ve alveolar makrofaj (MH-S) hücre kültürlerinde devam edilmiştir.

4.2. *İn Vitro* Çalışmalar

4.2.1. İnsan Bronşiyal Epitel Hücresi, BEAS-2B Hücre Hattı Bulguları

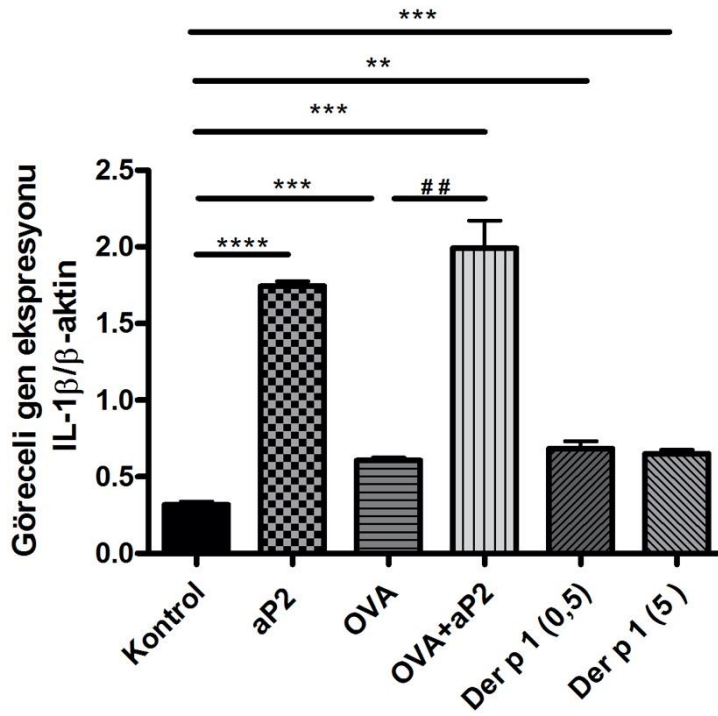


Şekil 4-9: BEAS-2B hücre hattında CCL2 göreceli gen ekspresyon düzeyleri (n=3)

(####p<0.0001, OVA vs OVA+aP2 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlılığı; **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.)

Çeşitli ajanlarla 18 saatlik inkübasyon sonucunda BEAS-2B hücre hattında göreceli CCL2 gen ekspresyon düzeyleri Şekil 4-9'da gösterilmiştir. BEAS-2B hücre kültüründe rekombinant aP2 (1000 ng/ml), OVA (500 µg/ml), OVA+aP2, Der p 1 (0,5 µg/ml) ve Der p 1 (5 µg/ml) uygulamaları CCL2 gen ekspresyonunu kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırmıştır.

CCL2 gen ekspresyonunun, OVA ile birlikte rekombinant aP2'nin uygulandığı hücrelerde, yalnızca OVA ile muamele edilen hücrelere kıyasla anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (OVA: 0,52±0,06 vs OVA+aP2 : 1,5±0,01, p<0.0001, n=3)

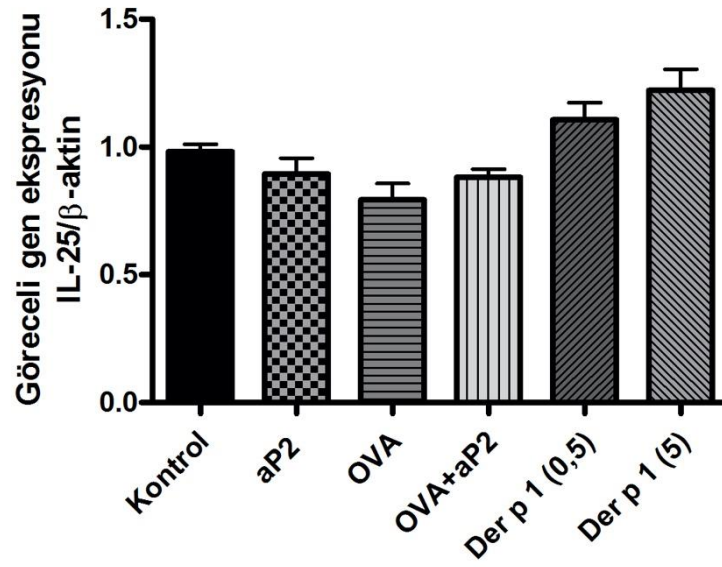


Şekil 4-10: BEAS-2B hücre hattında IL-1β göreceli gen ekspresyon düzeyleri(n=3)

(##p<0.01, OVA vs OVA+aP2 arasındaki istatistiksel olarak anlamlılığı; **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.)

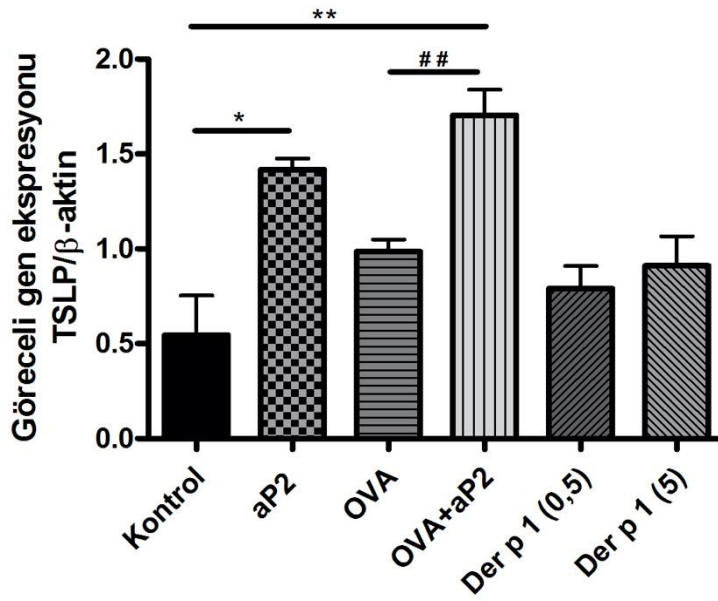
Çeşitli ajanlarla 18 saatlik inkübasyon sonucunda BEAS-2B hücre hattında göreceli IL-1β gen ekspresyon düzeyleri Şekil 4-10'de gösterilmiştir. BEAS-2B hücre kültüründe, rekombinant aP2 (1000 ng/ml), OVA (500 µg/ml), OVA+aP2, Der p 1 (0,5 µg/ml) ve Der p 1 (5 µg/ml) uygulamaları IL-1β gen ekspresyonunu kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırmıştır.

IL-1β gen ekspresyonunun, OVA ile birlikte rekombinant aP2 uygulanan hücrelerde, yalnızca ovalbumin ile muamele edilen hücrelere kıyasla anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (OVA: 0,61 ±0,02 vs OVA+aP2:1,99 ±0,18, p<0.01, n=3)



Şekil 4-11: BEAS-2B hücre hattında IL-25 göreceli gen ekspresyon düzeyleri (n=3)

18 saatlik inkübasyon sonucunda, kullanılan ajanlara bağlı olarak BEAS-2B hücre hattında IL-25 gen ekspresyonunda herhangi bir regülasyon görülmemiştir. Kullanılan hiçbir ajan IL-25 gen ekspresyonunda anlamlı bir artışa sebep olmamıştır (Şekil 4-11).

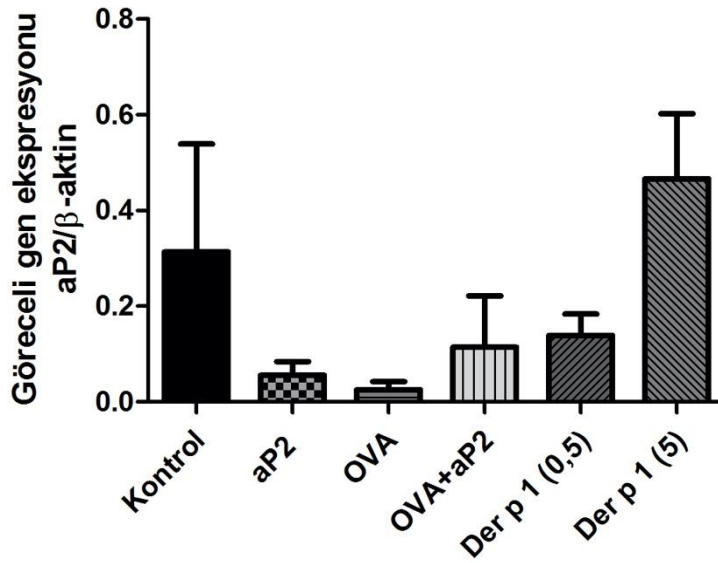


Şekil 4-12: BEAS-2B hücre hattında TSLP göreceli gen ekspresyon düzeyleri (n=3)

(##p<0.01, OVA vs OVA+aP2 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlılığı; *p<0.05, **p<0.01, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.)

18 saatlik inkübasyon sonucunda, BEAS-2B hücre hattında rekombinant aP2 (1000 ng/ml) ve aP2'nin OVA (500 µg/ml) ile birlikte uygulanışı, TSLP gen ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmuştur (Şekil 4-12).

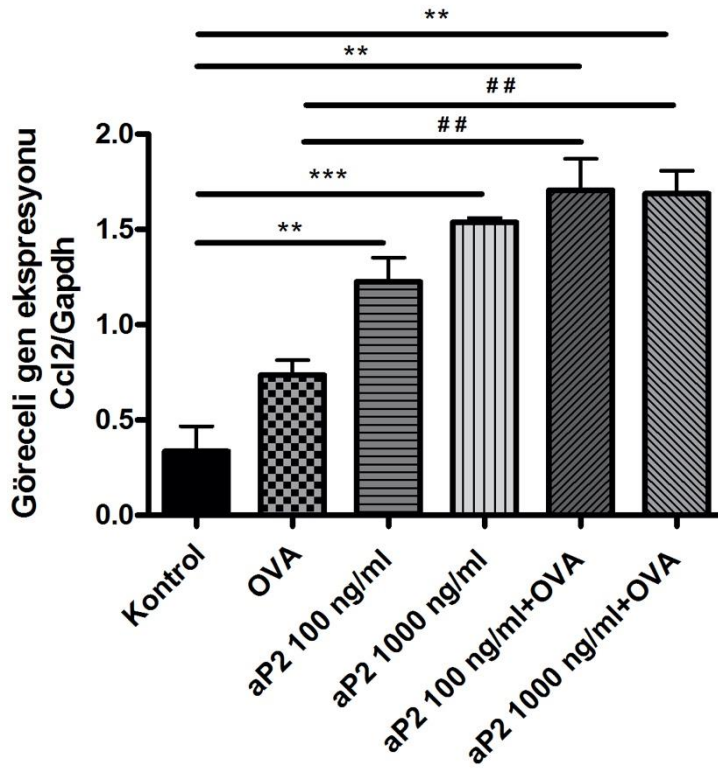
Rekombinant aP2'nin OVA ile birlikte uygulanışı, yalnızca OVA uygulanan hücrelerle kıyaslandığında, TSLP ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artışa sebep olmuştur (OVA: 0,98±0,06 vs OVA+aP2:1,70± 0,13, p<0.01, n=3) (Şekil 4-12).



Şekil 4-13: BEAS-2B hücre hattında aP2 göreceli gen ekspresyon düzeyleri (n=3)

OVA(500 $\mu\text{g/ml}$), rekombinant aP2(1000 ng/ml), OVA ve aP2'nin birlikte uygulanışı, rekombinant Der p 1'nin iki farklı konsantrasyonu (0,5 $\mu\text{g/ml}$ / 5 $\mu\text{g/ml}$) ile 18 saatlik inkübasyon sonucunda, BEAS-2B hücre hattında uygulanan ajanlar, aP2 gen ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4-13).

4.2.2. Fare Akciğer Epitel Hücresi, MLE-12 Hücre Hattı Bulguları



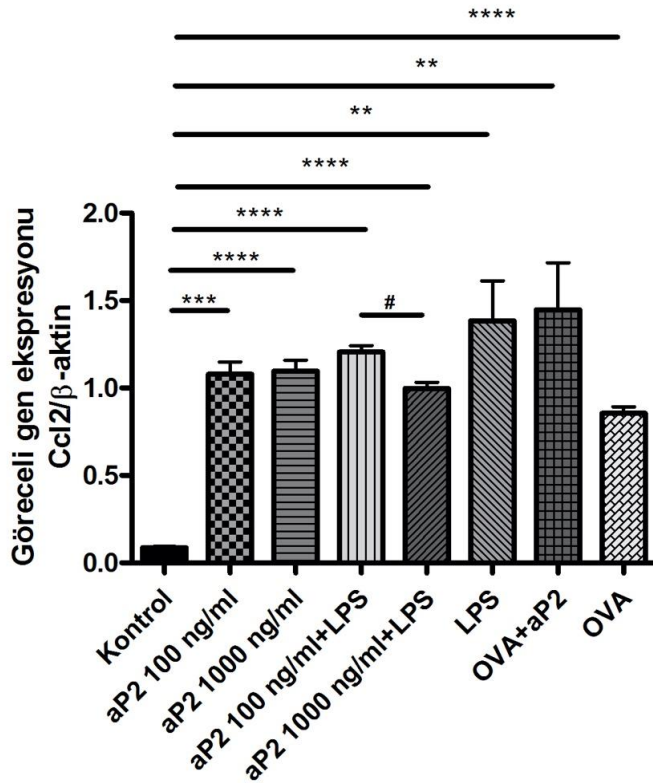
Şekil 4-14: MLE-12 hücre hattında Ccl2 göreceli gen ekspresyon düzeyleri (n=3)

(##p<0.01, OVA vs OVA+aP2 grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlılığı; **p<0.01, ***p<0.001 kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.)

18 saatlik inkübasyon boyunca çeşitli ajanlarla muamele edilen MLE-12 hücre hattında, göreceli Ccl2 gen ekspresyon düzeyleri Şekil 4-14’da gösterilmiştir. Rekombinant aP2’nin iki farklı konsantrasyonda da (100-1000 ng/ml), Ccl2 gen ekspresyonunu kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığı gösterilmiştir. Aynı şekilde OVA (500 µg/ml) ve aP2’nin iki farklı konsantrasyonunun birlikte uygulandığı hücrelerde, Ccl2 gen ekspresyonunu kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. Ayrıca, OVA ile rekombinant aP2’nin birlikte uygulandığı hücrelerde, yalnızca OVA ile muamele edilen hücrelere kıyasla, Ccl2 gen ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (OVA: 0,73±0,08 vs

OVA+aP2 (100 ng/ml): $1,71 \pm 0,16$, $p < 0,01$, $n=3$; OVA: $0,73 \pm 0,08$ vs OVA+aP2 (1000 ng/ml): $1,69 \pm 0,12$, $p < 0,01$, $n=3$). Sadece rekombinant aP2'nin uygulandığı hücreler ile OVA ile aP2'nin birlikte uygulandığı hücreler kıyaslandığında ise aynı regülasyon gösterilememiştir.

4.2.3. Fare Alveolar Makrofaj Hücresi, MH-S Hücre Hattı Bulguları



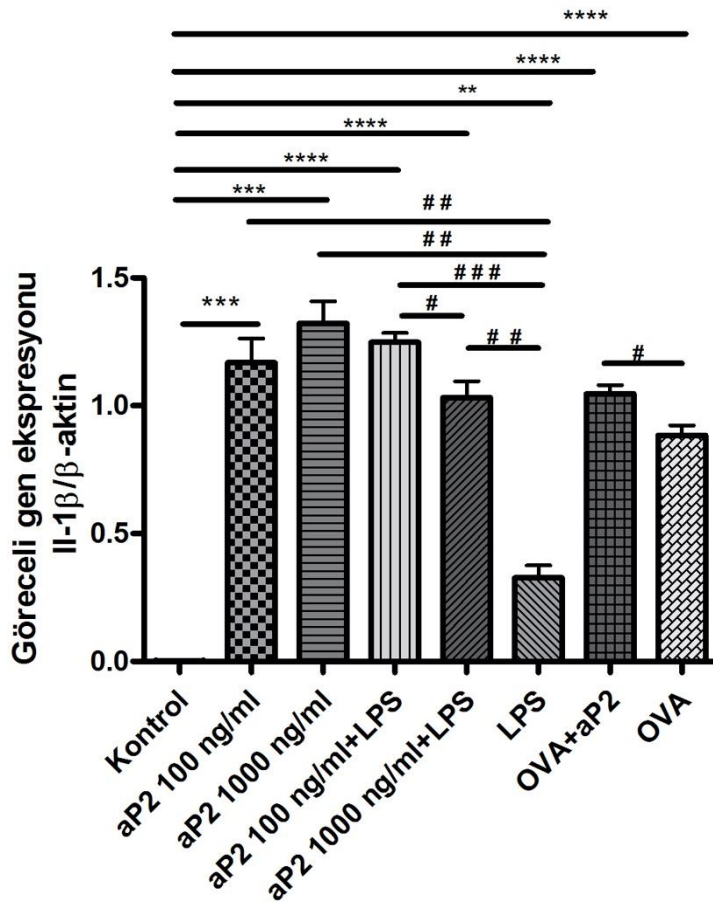
Şekil 4-15: MH-S hücre hattında Ccl2 göreceli gen ekspresyon düzeyleri (n=3)

(# $p < 0,05$, aP2+LPS grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlılığı; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.)

18 saatlik inkübasyon boyunca çeşitli ajanlarla muamele edilen MH-S hücre hattında göreceli Ccl2 gen ekspresyon düzeyleri Şekil 4-15’de gösterilmiştir.

Rekombinant aP2’nin iki farklı konsantrasyonda da (100-1000 ng/ml), Ccl2 gen ekspresyonunu kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığı gösterilmiştir. Ccl2 gen ekspresyonu üzerinde kullanılan aP2’nin konsantrasyonuna bağlı bir etki gösterilememiştir. Aynı şekilde, rekombinant aP2 iki farklı

konsantrasyonunun LPS ile birlikte muamele edildiği hücrelerde (100-1000ng/ml + 100 ng/ml) Ccl2 gen ekspresyonunun, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir. Ccl2 gen ekspresyonunun, OVA ile aP2'nin birlikte uygulandığı hücreler ile, sadece OVA ile veya sadece aP2 ile muamele edilen hücreler kıyaslandığında, Ccl2 gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış eğilimi gösterilmiştir.



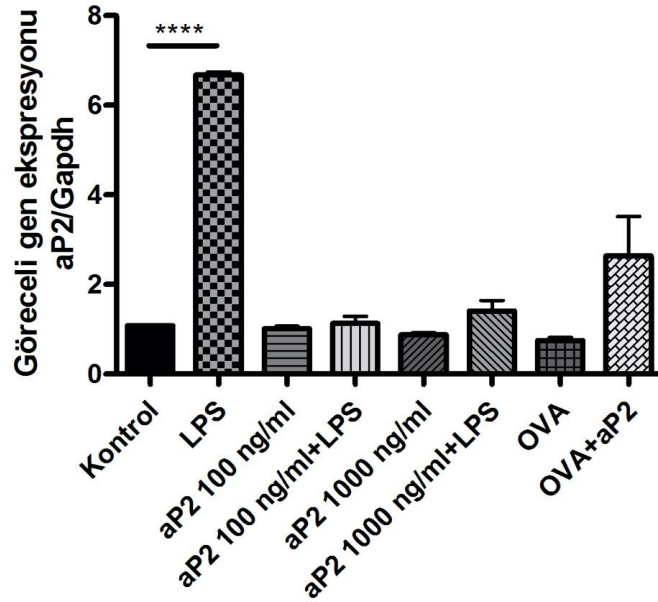
Şekil 4-16: MH-S hücre hattında IL-1 β göreceli gen ekspresyon düzeyleri (n=3)

(#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, (aP2 vs LPS) , (aP2+LPS vs LPS) ve (OVA vs OVA+aP2) grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlılığı; **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.)

18 saatlik inkübasyon boyunca çeşitli ajanlarla muamele edilen MH-S hücre hattında, göreceli IL-1β gen ekspresyon düzeyleri Şekil 4-16'da gösterilmiştir.

Rekombinant aP2, uygulanan iki farklı konsantrasyonda da (100-1000 ng/ml), Il-1 β gen ekspresyonunu kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırmıştır. Ancak Il-1 β gen ekspresyonu üzerinde kullanılan aP2 konsantrasyonuna bağlı bir etki gösterilememiştir. aP2'nin iki farklı konsantrasyonunun LPS ile birlikte uygulandığı hücrelerde, Il-1 β gen ekspresyonunu kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir. Ayrıca rekombinant aP2 ve rekombinant aP2 ile LPS'in birlikte uygulandığı hücrelerde tek başına LPS uygulanan hücrelere kıyasla, Il-1 β gen ekspresyonundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür.

OVA ile rekombinant aP2'nin birlikte uygulandığı hücrelerde, yalnızca OVA ile muamale edilen hücrelere kıyaslandığında Il-1 β gen ekspresyonunda, istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterilmiştir (OVA: $0,88 \pm 0,04$ vs OVA+aP2: $1,05 \pm 0,03$, $p < 0.05$, $n=3$). Aynı regülasyon, yalnızca aP2'nin uygulandığı hücreler ile OVA ile birlikte aP2'nin uygulandığı hücreler arasında gösterilememiştir.



Şekil 4-17: MH-S hücre hattında aP2 göreceli gen ekspresyon düzeyleri (n=3)

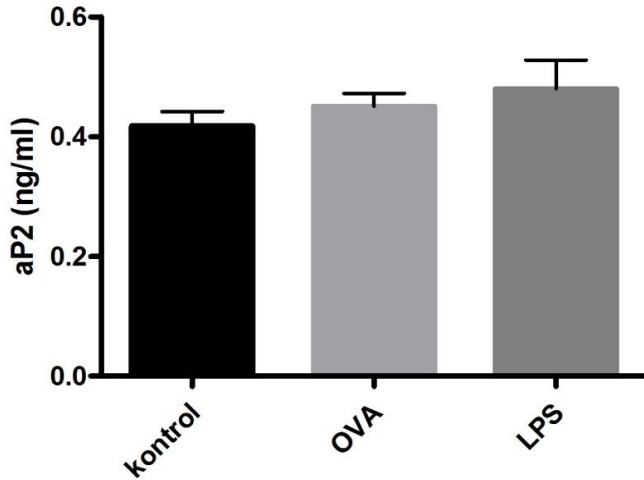
(**** $p < 0.0001$ kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.)

18 saatlik inkübasyon boyunca çeşitli ajanlarla muamele edilen MH-S hücre hattında, göreceli aP2 gen ekspresyon düzeyleri Şekil 4-17’de gösterilmiştir.

LPS ile muamele edilen hücrelerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterilmiştir. LPS dışında kullanılan hiçbir ajan aP2 gen ekspresyonunda, istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmamıştır.

4.2.4. Hücre Kültür Ortamında aP2 Protein Seviyeleri

Hücre hatlarında 18 saatlik inkübasyon süresi sonunda toplanan hücre kültür ortamında aP2 protein varlığı ve seviyeleri tespit edilmiştir. BEAS-2B ve MLE-12 hücre hatlarında elde edilen kültür ortamında aP2 protein mevcudiyeti gösterilememiştir. MH-S kültür ortamında aP2 tespit edilmiştir ve kullanılan ajanlara bağlı aP2 protein seviyeleri Şekil 4-18’de gösterilmiştir.

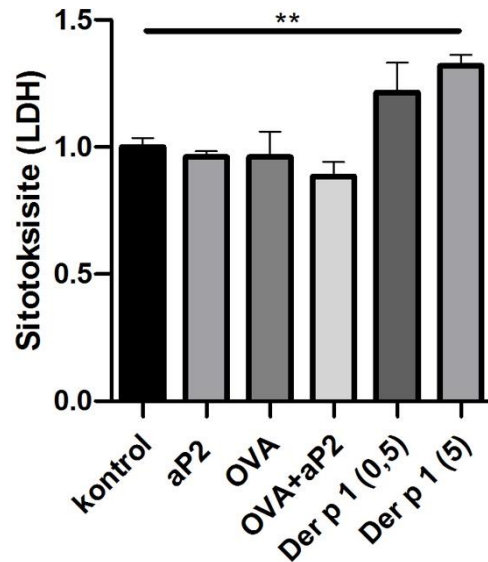


Şekil 4-18: MH-S hücre kültür ortamında aP2 seviyeleri

OVA ve LPS ile 18 saatlik inkübasyon sonrasında MH-S hücre hattından elde edilen hücre kültür ortamında, kontrol grubuna kıyasla aP2 protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4-18).

4.2.5. Hücre Kültür Ortamında LDH Seviyeleri

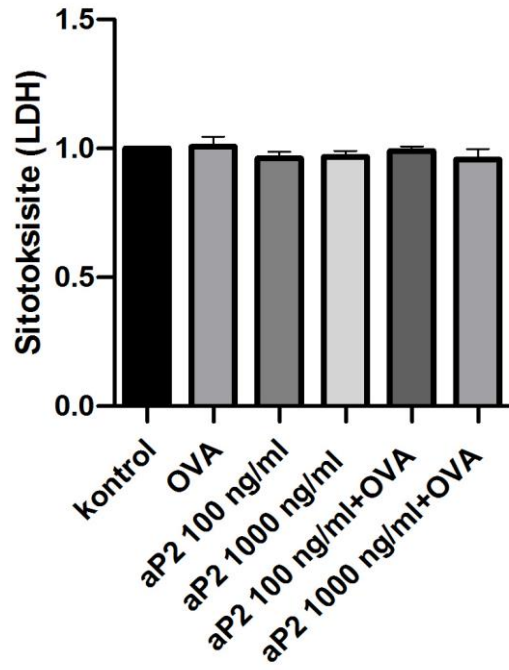
İn vitro sistemler üzerinde gerçekleştirilen deneylerde, uygulanan ajanların sitotoksisiteleri, hücre hattından elde edilen hücre kültür ortamında LDH ölçümü ile değerlendirilmiştir. Sitotoksiste, LDH Sitotoksiste Deteksiyon Kiti ile yapılan ölçümlerde, hücre kültür ortamından elde edilen örneklerde OD değerlerin, kontrol grubunun ortalama OD değerlerine normalize edilmesiyle değerlendirilmiştir.



Şekil 4-19: BEAS-2B hücre kültür ortamında LDH seviyeleri

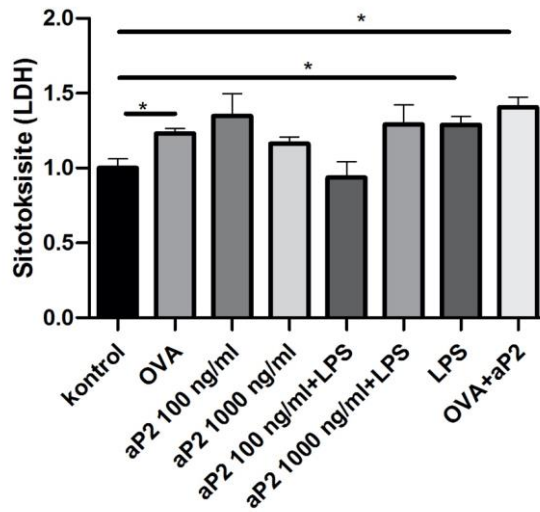
(** p<0.01, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.)

Rekombinant Der p 1'nin 5µg/ml konsantrasyonun uygulandığı hücre grubu dışında, hiçbir ajan uygulamasına bağlı sitotoksiste bulgusu gözlenmemiştir (Şekil 4-19).



Şekil 4-20: MLE-12 hücre kültür ortamında LDH seviyeleri

MLE-12 hücre hattında, hiçbir ajan uygulamasına bağlı sistotoksosite bulgusuna rastlanmamıştır (Şekil 4-20).



Şekil 4-21: MH-S hücre kültür ortamında LDH seviyeleri

(* $p < 0.05$, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.)

OVA'nın tek başına ve aP2 ile birlikte uygulandığı gruplarda ve LPS ile muamele edilen hücreler dışında hiçbir grupta sistotoksosite bulgusu gözlenmemiştir (Şekil 4-21).

5. TARTIŞMA

Lipid aracılı prosesler ile sistemik metabolik regülasyonlar arasındaki bağlantı, lipid araştırmalarında artan bir ilgiyle üzerinde durulan odak noktalarından birisidir. Bir lipid şaperonu olarak, yağ asidi bağlayıcı proteinler (FABP), hidrofobik ligandlara geri dönüşlü olarak bağlanmakta ve hücrelerde gelişen lipid cevabının koordinasyonunda görev almaktadır (Furuhashi ve Hotamisligil 2008). FABP'ler arasında, FABP4 diğer adıyla adiposit protein 2 (aP2) en iyi karakterize edilmiş izoformdur ve immünometabolik homeostazdaki rolü oldukça önemli ve dikkat çekicidir. Lipid aracılı biyolojik proseslerin ve metabolik homeostazın regülasyonunda merkezi bir rol oynamaktadır (Furuhashi ve Hotamisligil 2008). aP2'nin obezite, diyabet, yağlı karaciğer hastalığı, ateroskleroz gibi kronik inflamasyonun eşlik ettiği immünometabolik hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol üstlendiği bilinmektedir (Furuhashi ve Hotamisligil 2008; Hotamisligil ve Bernlohr 2015). Ancak kronik hava yolu inflamasyonu ile karakterize bir hastalık olan astım hastalığında aP2'nin nasıl bir rol üstlendiği henüz tam olarak bilinmemektedir.

Tarihsel olarak araştırmalar, aP2'nin lipid metabolizması ve inflamasyon üzerindeki intraselüler etkileri üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak aP2'nin bir adipokin hormon olarak görev aldığı ve pleiotropik etkilerinin mevcut olduğu ortaya çıkmıştır (Cao ve ark. 2013). Başlangıçta adipoz doku ve adipositlerde tespit edilen aP2'nin, adipositte en fazla miktarda bulunan proteinlerden biri olduğu bilinmektedir (Spiegelman ve Green 1980; Matarese ve Bernlohr 1988). aP2 ekspresyonu, preadipositin adiposite farklılaşması boyunca indüklenmektedir (Spiegelman ve Green 1980; Bernlohr ve ark. 1984). Ayrıca yağ asitleri, PPAR- γ agonistleri, insülin ve deksametazon ile transkripyonel olarak kontrol edilmektedir (Cook ve ark. 1988; Amri ve ark. 1991a; Amri ve ark. 1991b; Distel ve ark. 1992; Kletzien ve ark. 1992; Melki ve Abumrad 1993). aP2 ekspresyonu ayrıca makrofajlarda, monositlerden diferensiyasyonu boyunca eksprese olmaktadır ve ekspresyonu ayrıca forbol 12-miristat 13-asetat, lipopolisakkarid, PPAR- γ agonistleri ve ox-LDL ile indüklenmektedir (Pelton ve ark. 1999; Fu ve ark. 2000; Makowski ve ark. 2001; Fu ve ark. 2002; Kazemi ve ark. 2005). Ateroskleroz üzerine yapılan çalışmalarda makrofajlarda aP2'nin inflamatuvar yanıtı

düzenlediği ve köpük hücre oluşumu ve aterogenez gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (Makowski ve ark. 2001; Boord ve ark. 2002; Makowski ve ark. 2005).

Yapılan çalışmalar ile ayrıca aP2'nin özellikle kapiler ve küçük venlerde olmak üzere endotel hücrelerinde eksprese olduğu, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) sinyali ve hücre proliferasyonunda rol oynadığı gösterilip anjiyogenez ile ilişkilendirilmiştir (Elmasri ve ark. 2009; Cataltepe ve ark. 2012; Elmasri ve ark. 2012; Ghelfi ve ark. 2013).

Alerjik astım ve hava yolu inflamasyonu gelişimi üzerinde aP2'nin rolü üzerine yapılan bir çalışmada, bronşiyal epitel hücresinde, aP2 tespit edilmiştir. Bronş epitel hücrelerinin Th2 sitokinlerinden IL-4 ve IL-13 ile muamele edilmesi, aP2 gen ve protein ekspresyonunda artışa neden olmuştur. aP2'nin Th2 aracılı hava yolu inflamasyonunda önemli bir rol üstlendiği bildirilmiştir (Shum 2006; Shum ve ark. 2006). Aynı çalışmada, OVA ile indüklenen alerjik hava yolu inflamasyonu üzerine çalışılan deneysel fare modelinde, aP2'den yoksun olma durumu, hava yolu inflamasyonunda gerileme ile sonuçlanmıştır. aP2'nin eozinofilin bölgede toplanmasının düzenlenmesi ve pulmoner inflamatuvar sitokin oluşumu ve alerjik hava yolu inflamasyonu üzerinde anahtar bir rol üstleniyor olabileceği belirtilmiştir. Aynı çalışmada, alerjik hava yolu inflamasyon modelinde yapılan kemik iliği transplantasyonu sonucunda, parenkimal hücrelerdeki aP2'nin bu fenotipten sorumlu olabileceği belirtilmiştir (Shum 2006; Shum ve ark. 2006).

VEGF-TG (Vasküler endotelial büyüme faktörü-transgenik) fareler ile 2013 yılında hava yolu anjiyogenez ve inflamasyonu üzerine yapılan bir çalışmada, aP2 yoksunluğunun VEGF ile indüklenen hava yolu inflamasyonun da azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca astımlı hastaların hava yolunda, aP2-immünoreaktif kan damar yoğunluğunun artmış olduğu bildirilmiştir (Ghelfi ve ark. 2013).

aP2'nin hava yolunda hangi mekanizma üzerinden etki gösterdiği ve bu etkiden sorumlu olan aP2'nin kaynağının ne olduğu henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle, çalışmamızda, aP2f/f genotipli dişi farelerde OVA ve HDM ile indüklenen deneysel alerjik astım modelinde, aP2'nin alerjik hava yolu inflamasyonu ve hava yolu hiperreaktivite gelişimi üzerindeki rolünün araştırılması ve alerjik astım patogenezinde rol alan aP2'nin kaynağını ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Araştırmada öncelikle OVA ile alerjik astım geliştirilen aP2 f/f (aP2 f/f OVA) ve PBS ile hastalık modelinin geliştirilmediği (aP2f/f PBS) gruplarda metakolinin artan konsantrasyonlarıyla yapılan bronkoprovokasyon testi ile elde edilen hava yolu direnç değerleri karşılaştırılmıştır. Hava yolu direnci ölçüsü olarak, Newtonian rezistans (R_N) ve total respiratuvar sistem rezistansı (R_{rs}) değerleri karşılaştırılmıştır. Newtonian rezistans (R_N) başlıca geniş hava yolları olmak üzere merkezi hava yolu direncinin bir ölçüsüdür ve artış göstermesi hava yolundaki daralmaya işaret etmektedir (Lundblad 2012; Devos ve ark. 2017). Total respiratuvar sistem rezistansı (R_{rs}), ise hava yolu, akciğer dokusu, çene duvarı da dahil olmak üzere dirençlerin bütününe ifade etmektedir (Wang ve ark. 2014; Chapman ve Irvin 2015). Deneyin kontrol grubunu oluşturan aP2 f/f farelerde OVA ve PBS grupları arasında R_N ve R_{rs} değerlerinde beklenen anlamlı fark gösterilememiştir. Bu durumun bronkoprovokasyon testinde kullanılan metakolin dozları ile ilişkili olabileceği düşünülerek, metakolin dozları yükseltilmiştir. Ancak bu yaklaşımla da aP2 f/f OVA ve aP2 f/f PBS gruplarının hava yolları dirençleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Ovalbumin ile deneysel alerjik astım modeli oluşmadığı için başka bir alerjen olan ev tozu akarı (HDM) denenmesine karar verilmiştir. HDM ile alerjik astımın indüklendiği aP2 f/f HDM ile PBS ile astım indüklenmeyen aP2 f/f PBS gruplarından bronkoprovokasyon testi ile elde edilen hava yolu direnç değerleri kıyaslanmıştır. Ancak aP2 f/f PBS ve aP2 f/f HDM fareler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Hava yolları direncinde beklenen farkın gösterilememesi, kullandığımız deneysel alerjik astım modellerinin aP2 f/f genotipli farelerde, hava yolu hiperreaktivite gelişimi üzerinde yeterince etkili olmamasından veya üzerinde alerjik astım modeli geliştirilen farelerin cinsinden kaynaklanıyor olabileceğini düşünmekteyiz. Alerjik astım patogenezinde rol alan aP2'nin kaynağını araştırmak amacıyla Hotamışlıgil Laboratuvarında geliştirilen doku spesifik aP2 yoksun fareler ile de *in vivo* deneylerin gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Bu amaçla, aP2 f/f fareler Adiponektin, LyzM veya Tie2 promotorları kontrolünde Cre rekombinaz transgeni taşıyan fareler ile çaprazlaştırılarak, sırasıyla adipoz doku, makrofaj ve endotel dokuya spesifik olarak aP2 geni işlevsiz hale getirilmiş (knock-out) fareler elde edilmiştir. Ancak, aP2f/f genotipli farelerde deney grubu (alerjen ile uyarılan) ile kontrol grubunun (alerjen ile

uyarım yapılmayan) hava yolu direnç (R_N ve R_{rs}) değerleri arasında anlamlı bir farklılığın elde edilmemesi nedeniyle doku spesifik aP2 geni işlevsiz hale getirilmiş (knock-out) model üzerinde hava yolu hiperreaktivitesi üzerinde araştırmaya devam edilememiştir.

Çalışmamızın devamı, aP2 proteinin, alerjik hava yolu inflamasyonu üzerindeki etkisini değerlendirilmesi amacıyla *in vitro* sistemler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Dolaşımdaki aP2'nin hava yolunda gelişen inflamasyona katkıda bulunarak, astım patogenezinin oluşumu veya gelişimi üzerinde etkili olabileceği ve bronşiyal epitel hücrelerinde, akciğer epitel hücrelerinde veya alveolar makrofajlarda çeşitli inflamatuvar sitokin ve kemokinlerin oluşumuna neden olarak ve/veya aP2'nin alerjenlerin bu hücreler üzerindeki etkilerini potansiyalize ederek hava yolu inflamasyonuna katkıda bulunabileceğini göstermek, ayrıca alerjenlerin, bu hücre gruplarında aP2 ekspresyon ve sekresyonuna neden olup olmadığını araştırmak amacıyla, hücre kültür çalışmalarımızı, insan bronşiyal epitel hücre hattı, BEAS-2B, fare akciğer epitel hücre hattı, MLE-12 ve fare alveolar makrofaj hücre hattı, MH-S üzerinde gerçekleştirdik.

CC kemokin ligand 2, Ccl2 (monosit kemoatraktan protein-1, Mcl-1), epitel hücreleri ve makrofajlar da dahil olmak üzere çeşitli hücrelerden salınan, C-C kemokin ailesi üyelerinden biridir ve monositler için potent bir kemotaktik faktördür. Monositlerin, bellek T lenfositlerinin ve NK hücrelerin migrasyon ve infiltrasyonunu düzenlemektedir (Deshmane ve ark. 2009). Ccl2'nin astım patogenezinde oldukça önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Ccl2, reseptörü Ccr2'ye bağlanarak inflamatuvar hücreleri aktive etmekte ve inflamasyon bölgesinde toplanmasına neden olmaktadır. Bu durum Ccl2/Ccr2 aksisinin astımda patogenezinde bir hedef haline gelmesine neden olmuştur (Mellado ve ark. 2008; Wang ve ark. 2015; Jiang ve ark. 2019). Çeşitli klinik ve deneysel çalışmalar astımda, BALF'da Ccl2 seviyelerinde yükseliş ve akciğerde Ccl2 mRNA ve protein ekspresyonlarında artış olduğunu göstermiştir. Ayrıca Ccl2'nin astımda gelişen hava yolu inflamasyonu, hava yolu hiperreaktivitesi ve yeniden yapılanmadaki önemi anlaşılmıştır (Sousa ve ark. 1994; Lukacs ve ark. 1997; Campbell ve ark. 1999; Mellado ve ark. 2008; Lee ve ark. 2015; Wang ve ark. 2015; Jiang ve ark. 2019; Zhu ve ark. 2019). Araştırmalarda çeşitli alerjenlerle muamele edilen BEAS-2B ve alveolar makrofaj dahil olmak üzere çeşitli hücre hatlarında, Ccl2 ekspresyonunda ve protein seviyelerindeki artış da gösterilmiştir. Bu araştırmalardan birinde, Ccl2 mRNA

ekspresyonunu Der p 1 ile muamele edilen THP-1 insan monosit hücrelerinde arttığı bildirilmiştir (Jang ve ark. 2014). Bir başka çalışmada Der p 1'e bağlı olarak hem primer bronşiyal epitel kültürlerinde hem de BEAS-2B hücre süpernatant örneklerinde Ccl2 seviyelerinde artış gösterilmiştir (Pichavant ve ark. 2005). Ccl2 seviyelerinin HDM alerjisi ile muamele edilen BEAS-2B kültür ortamında, Ccl2 gen ekspresyonunun ise alerjen uyarımına bağlı olarak alveolar makrofajlarda arttığı gösterilmiştir (Lee ve ark. 2015).

aP2 yoksun makrofajlarda TNF- α , IL-1 β , IL-6, ve monosit kemoatraktant protein-1 (MCP-1)'in, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz 2 (COX2) gibi pro-inflamatuvar enzimlerin oluşumunun baskılandığı bildirilmiştir (Makowski ve ark. 2001; Makowski ve ark. 2005). aP2'nin hava yolu epitel hücrelerinde alerjik inflamatuvar yanıt oluşumunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. aP2'nin hava yolu epitelyumunda inflamatuvar sitokin üretimini arttırdığı ve ayrıca AEC'lerde araşidonik asid metabolik yolağı etkileyerek, alerjik astım patojenezinde lipid ve sitokin sinyal yolları arasında köprü oluşturduğu belirtilmiştir. IL-4 ve TNF- α gibi uyaranlara bağlı olarak artan MCP-1 ekspresyonunu ve hücre kültür süpernatantında IL-6 düzeylerinin aP2'den yoksun hava yolu epitel hücrelerinde, (aP2^{-/-} AEC) azaldığı gösterilmiştir ve proinflamatuvar sitokin ekspresyonlarındaki azalmanın, aP2^{-/-} farelerde alerjik hava yolu inflamasyonunda görülen düzelmeye katkıda bulunabileceği belirtilmiştir. OVA ile alerjik hava yolu inflamasyonu geliştirilen aP2^{+/+} ve aP2^{-/-} fare gruplarının akciğer dokusu üzerinde yapılan incelemede, aP2^{-/-} farelerde MCP-1, eotaxin-1, eotaxin-2 dahil olmak üzere çeşitli gen ekspresyonlarında azalma bildirilmiştir (Shum 2006; Shum ve ark. 2006.) Bir başka çalışmada ise, VEGF ile indüklenen hava yolu inflamasyonunda, VEGF-TG fare trakealarında, aP2 yoksunluğu durumunda MCP-1 ve IL-1 β mRNA ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir (Ghelfi ve ark. 2013).

Bu çalışmada, BEAS-2B, MLE-12 ve MH-S olmak üzere tüm hücre hatları, rekombinant aP2 ile inkübe edildiğinde Ccl2 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterilmiştir. Ccl2 gen ekspresyonunda, kullanılan aP2 dozuna bağlı olarak doz-cevap ilişkisi söz konusu olup olmadığını araştırmak amacıyla MLE-12 ve MH-S hücre hattı, 100 ng/ml ve 1000 ng/ml olmak üzere iki farklı dozda rekombinant aP2 proteini ile muamele edilmiştir. Ancak iki farklı dozda görülen Ccl2 gen

ekspresyonu arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu durum kullanılan en düşük dozda (100 ng/ml) maksimum yanıtın görülmesinden veya çalışmanın tam anlamıyla *in vivo* koşulları karşılamamasından kaynaklanıyor olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca bu hususta yapılabilecek ileri çalışmalarda, endotoksin mevcudiyetinin de değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

aP2'nin OVA'ya maruz kalındığında görülen inflamatuvar yanıtın, yani Ccl2 gen ekspresyonunu potansiyalize edip etmediğini değerlendirmek amacıyla, tüm hücre hatlarında rekombinant aP2 ve OVA birlikte verilmiştir. BEAS-2B ve MLE-12 hücre hattında OVA'nın tek başına kullanıldığı hücrelere kıyasla OVA'nın aP2 ile birlikte uygulandığı hücrelerde Ccl2 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. aP2 bu hücre hatlarında OVA'nın etkisini potansiyalize etmiştir.

Ccl2 alerjik astım patogeneğinde oldukça önemli rol oynayan bir kemokindir. Ve bu çalışmada elde edilen preliminere veriler aP2'nin bronşiyal epitel hücrelerinde ve alveolar makrofajlarda Ccl2 gen ekspresyonunun indüklenmesine ve epitel hücrede alerjene bağlı Ccl2 gen ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden olduğu gösterilmiştir.

Bir proinflamatuvar sitokin olan IL-1 β , akciğerde eozinofil infiltrasyonu, goblet hücre hiperplazisi, adezyon molekül ekspresyonu, IL-4, IL-5 ve alerjen spesifik IgG ve IgE oluşumu, AHR olmak üzere astım gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. IL-1 β , T hücre hayatta kalımı, B hücrelerinden antikor üretiminde ve B hücre proliferasyonu ve Th17 hücre diferansiyonu üzerindeki etkileriyle inflamatuvar yanıt oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Sims ve Smith 2010; Lamkanfi ve ark. 2011).

IL-1 α/β , hava yolu epitelinin alerjen veya çeşitli zararlı partiküllere maruz kalması sonucunda salınan başlıca immün mediatörler arasında yer almaktadır. Ayrıca inflamasyon bölgesinde toplanan alveolar makrofajların da IL-1 α/β 'nin yüksek konsantrasyonda mevcudiyetinden sorumlu olduğu belirtilmiştir (Osei ve ark. 2020). IL-1 ve astımdaki rolünün önemine dair farklı görüşler hakim olmakla birlikte, alerjik astımın deneysel bir modelinde, BALF'da IL-1 β seviyesinde arttığı ve IL-1 β blokajının hava yolu inflamasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Schuijs ve ark. 2013; Wei-xu ve ark. 2014). Astım hastalarının BALF örnekleri üzerinde yapılan bir çalışmada alveolar makrofaj kaynaklı IL-1 β 'nin mevcudiyeti gösterilmiştir (Borish ve ark. 1992). Bir diğer çalışmada ise semptomatik hastalar, asemptomatik grup ile kıyaslandığında BALF

örneklerinde IL-1 β seviyeleri yüksek bulunmuştur (Broide ve ark. 1992). Alerjene maruz kalma ile astımda artan IL-1 seviyelerinin ilişkilendirildiği çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların olduğu bilinmektedir (Osei ve ark. 2020). HDM'ye duyarlı kişilerden alınan dendritik hücrelerin Der p 1 ile muamele edilmesi, sağlıklı kişilerdeki dendritik hücrelerden elde edilen verilerin aksine, IL-1 β seviyelerinde artış ile sonuçlanmıştır (Hammad ve ark. 2001). HDM'ye bağlı olarak monositlerden IL-1 β salınımı gösterilmiş ancak aynı çalışmada HDM ile muamele edilen insan bronşiyal epitel hücrelerde IL-1 β salınımı gerçekleşmemiştir (Sundaram ve ark. 2015). Bir başka çalışmada Der p 1'in eozinofillerde IL-1 β salınımına neden olduğu gösterilmiş, aynı durum tek başına BEAS-2B hücrelerinde görülmemiştir (Wong ve ark. 2006).

Bu çalışmada, alerjenler ile muamele edilen bronşiyal epitel hücresi ve alveolar makrofaj hücresi hattında, kontrol grubuna kıyasla IL-1 β gen ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Rekombinant aP2 ile inkübe edilen BEAS-2B ve MH-S hücre hatlarında, IL-1 β gen ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir. Rekombinant aP2'nin iki farklı dozu (100 ng/ml ve 1000 ng/ml) ile muamele edilen MH-S hücrelerinde, IL-1 β ekspresyon seviyelerinde, doza bağlı olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu durum kullanılan en düşük dozda (100 ng/ml) maksimumum yanıtın elde edilmiş olmasına bağlı olabilir. Ancak, bu hususta yapılabilecek ileri çalışmalarda, endotoksin mevcudiyetinin kontrolünün de değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

BEAS-2B ve MH-S hücre hattında, OVA'nın tek başına kullanıldığı hücrelere kıyasla aP2 ile birlikte uygulandığı hücrelerde, IL-1 β gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. aP2, bu hücre hatlarında OVA'nın IL-1 β gen ekspresyonu üzerindeki etkisini potansiyalize etmiştir.

Hava yolu epitel hücreleri, alerjenler, zararlı partiküller gibi çevresel faktörlere çeşitli sitokinlerin salınımını gerçekleştirerek yanıt vermektedir. Bu sitokinler arasında alarmin olarak da isimlendirilen epitel kaynaklı sitokinler olan TSLP, IL-33 ve IL-25 yer almaktadır. Alarminlerin tip 2 inflamasyonun gelişiminde önemli birer mediyatör oldukları, ayrıca doku hasarı sonrası doku onarımının regülasyonunda rol oynadıkları bilinmektedir (Roan ve ark. 2019). Hava yolu inflamasyonu ve hava yolu hiperreaktivite gelişimi üzerindeki etkileri, birçok deneysel astım modelinde değerlendirilmiştir (Fort

ve ark. 2001; Hurst ve ark. 2002; Al-Shami ve ark. 2005; Ballantyne ve ark. 2007; Kearley ve ark. 2009; Kurowska-Stolarska ve ark. 2009; Suzukawa ve ark. 2012). Ayrıca astım üzerine yapılan çeşitli klinik çalışmalarda da alarminlerin ekspresyonlarındaki artış gösterilmiştir (Ying ve ark. 2005; Kurowska-Stolarska ve ark. 2009; Préfontaine ve ark. 2009; Corrigan ve ark. 2011)

HDM alerjenlerinin epitel hücrelerinden TSLP oluşumunu indüklediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Kashyap ve ark. 2011; Al-Ghouleh ve ark. 2012; Yi ve ark. 2017). Yapılan *in vitro* çalışmalarda, Der p 1 ile muamele edilen BEAS-2B hücre hattının supernatantında TSLP seviyelerindeki artış gösterilmiştir (Al-Ghouleh ve ark. 2012). Benzer şekilde, Der p 1 ile muamele edilen akciğer epitel hücrelerinde TSLP protein ekspresyonunda artış bildirilmiştir (Weng ve ark. 2019). Ayrıca çeşitli proteazlarla muamele edilen BEAS-2B hücrelerinde TSLP mRNA ve protein seviyelerindeki artış gösterilmiştir (Kouzaki ve ark. 2009). HDM ile muamele edilen BEAS-2B hücrelerinde IL-25’inde ekspresyonunda da artış gösterilmiştir (Yi ve ark. 2017). Çeşitli alerjenlere bağlı olarak, MLE-12 ve insan akciğer epitel hücre hattı A549 da dahil olmak üzere çeşitli hücre hatlarında IL-25 mRNA ekspresyonlarının arttığı bildirilmiştir (Angkasekwinai ve ark. 2007). BEAS-2B ve primer fare trakeal epitelyal hücre hattında LPS’e bağlı olarak IL-25 mRNA seviyelerindeki artış gösterilmiştir (Qiu ve ark. 2017).

Çalışmamızda aP2’nin bronşiyal epitel hücresinde TSLP ve IL-25 ekspresyonu üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Bu amaçla bir alerjen varlığında veya yokluğunda, BEAS-2B hücreleri, rekombinant aP2 uygulaması ile, dolaşımda mevcut aP2’nin bronşiyal epitel hücrelerinden TSLP ve IL-25 ekspresyonuna neden olup olmadığı modellenmiştir. Rekombinant aP2’nin ve kullanılan diğer ajanların IL-25 ekspresyonu üzerinde bir etkisi gösterilmemiştir. Rekombinant aP2’nin uygulandığı BEAS-2B hücrelerinde, TSLP gen ekspresyonunda bir artış görülmüştür. Sadece OVA ile muamele edilen hücrelere kıyasla OVA’nın aP2 ile birlikte uygulandığı hücrelerde TSLP gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterilmiştir. aP2, OVA’nın TSLP gen ekspresyonu üzerindeki etkisini potansiyalize etmiştir. Bu ön veriler (preliminer data) aP2’nin TSLP ekspresyonunun regülasyonunda rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle farklı süre ve farklı dozlarda aP2’nin kullanılması ve endotoksin varlığının değerlendirilmesi ile gerçekleştirilecek ileri

çalışmalar, aP2'nin TSLP ekspresyonu üzerindeki etkilerini daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

Lipopolisakkaridler (LPS) gram-negatif bakterilerin hücre duvarı dış membran yapısında bulunan major komponentlerden biridir. İnsan alveolar makrofaj ve alveolar tip II epitelyal hücrelerinde (ATII) 2007 yılında yapılan bir çalışmada zamana ve doza bağlı olarak LPS ile stimülasyonun, CCL2 ve IL-1 β salınımı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir (Thorley ve ark. 2007). Fare makrofaj hücre hattı, RAW 264.7'de, değişik doz ve zaman aralıklarında LPS uygulamasının, aP2 mRNA seviyeleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir ve LPS uygulamasına bağlı olarak aP2 mRNA seviyelerinde artış bildirilmiştir (Kazemi ve ark. 2005). Ayrıca WT ve aP2^{-/-} farelerden elde edilen dendritik hücreler ile yapılan ve aP2'nin dendritik hücrelerde sitokin üretimi ve dendritik hücre fonksiyonları üzerinde rolünü inceleyen bir araştırmada, LPS ile muamele edilen dendritik hücrelerde aP2 mRNA ekspresyonunda artış gösterilmiştir. Ayrıca aP2'den yoksun dendritik hücrelerde (aP2^{-/-} DC) IL-12 ve TNF- α dahil olmak üzere LPS ile indüklenen sitokin üretiminde azalma gösterilmiştir. (Rolph ve ark. 2006) Bu çalışmada da benzer şekilde, LPS ile muamele edilen alveolar makrofaj hücre hattında, aP2 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir.

Tüm *in vitro* deneylerde LDH seviyeleri, ajanların toksik etkilerine bağlı hücre ölümünün söz konusu olup olmadığını anlamak amacıyla değerlendirilmiştir. MLE-12 hücreleri ile yapılan deneylerde kullanılan ajanlara bağlı olarak LDH seviyelerinde bir farklılık görülmemiştir. BEAS-2B'de Rekombinant Der p 1'nin en yüksek konsantrasyonu ve MH-S hücre hattında OVA ve LPS'e maruz bırakılan hücreler dışında, BEAS-2B ve MH-S hücre hatlarında da elde edilen hücre kültür ortamında LDH seviyelerinde kullanılan ajanlara bağlı anlamlı bir fark görülmemiştir.

Bu çalışmada, hava yolu hiperreaktivitesi ve alerjik hava yolu inflamatuvar yanıt oluşumunda aP2'nin rolünü, kaynağını ve hangi mekanizmayla alerjik astım patogeneğinde yer aldığının araştırılması amaçlanmıştır. Yapılan *in vivo* çalışmalarımızda, C57BL/6 dişi aP2f/f farelerde OVA ve HDM ile geliştirilen alerjik astım modelinde, kümülatif dozlarda metakolin (MeCh) uyarımı ile gerçekleştirilen bronş provokasyon testi ile elde edilen hava yolu direnç değerlerinde (R_N ve R_{rs}) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilememiştir. Bu nedenle, çalışmanın

başında, astım patogeneğinde etkili aP2 kaynağını araştırmak amacıyla planlanan doku spesifik aP2 geni işlevsiz hale getirilmiş fareler üzerinde çalışmaya devam edilememiştir. Bununla birlikte, *in vitro* deneylerden elde ettiğimiz prelininer dotalar, dolaşımdaki aP2'nin, bronşiyal epitel hücre, akciğer epitel hücresi ve alveolar makrofajlarda, bazı proinflatuvar sitokin ve kemokin ekspresyonunu tetikleyebileceğini ve alerjene verilen yanıtı potansiyalize edebileceğini göstermiştir. Yapılan *in vitro* çalışmaların optimize edilerek tekrarlanması ve hücre hatlarının farklı doz ve sürelerde aP2 ile muamele edilerek, fizyolojik ve patolojik koşullarda dolaşımda bulunan aP2 seviyelerinin modellenmesiyle aP2'nin astım gelişimindeki rolü, daha açık ve detaylı bir şekilde incelenmesini sağlayacaktır. Alerjik astım gelişiminde aP2'nin rolü ve dahil olduğu mekanizmalar üzerine ilerleyen çalışmalarla açıklık getirilmesi gerekmektedir, bu tez çalışmasının, alerjik astım patogeneğinde hava yolu hiperreaktivitesi ve alerjik hava yolu inflamasyonu gelişiminde aP2'nin katkısına ışık tutmak adına önemli olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Adida, A. ve Spener, F. (2006). Adipocyte-type fatty acid-binding protein as inter-compartmental shuttle for peroxisome proliferator activated receptor gamma agonists in cultured cell. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1761**(2), 172–181.
- Agache, I., Akdis, C., Jutel, M. ve Virchow JC. (2012). Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy*, **67**(7), 835-46.
- Aikawa, T., Shimura, S., Sasaki, H., Ebina, M., ve Takishima, T. (1992). Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest*, **101**(4), 916–921.
- Albertson, TE., Schivo, M., Gidwani, N., Kenyon, NJ., Sutter, ME., Chan, AL., ve ark. (2015). Pharmacotherapy of critical asthma syndrome: current and emerging therapies. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology.*, **48**(1), 7-30.
- Alcorn, JF., Crowe, CR. ve Kolls, JK. (2010). Th17 cells in asthma and COPD. *Annual Review of Physiology*, **72**, 495– 516.
- Almqvist, C., Worm, M., Leynaert, B. ve working group of GA2LEN WP 2.5 Gender. (2008). Impact of gender on asthma in childhood and adolescence: a GA2LEN review. *Allergy*, **63**(1), 47–57
- Al-Ghoulh, A., Johal, R., Sharquie, I.K., Emara, M., Harrington, H., Shakib, F. ve ark (2012) The glycosylation pattern of common allergens: the recognition and uptake of Der p 1 by epithelial and dendritic cells is carbohydrate dependent. *PLoS One.*, **7**(3):e33929.
- Al-Shami, A., Spolski, R., Kelly, J., Keane-Myers, A., ve Leonard, WJ. (2005). A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *The Journal of Experimental Medicine.*, **202**(6), 829-39.
- Amri, EZ., Bertrand, B., Ailhaud, G., ve Grimaldi, P. (1991a). Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression. *Journal of Lipid Research*, **32**(9), 1449-1456

- Amri, EZ., Ailhaud, G., ve Grimaldi, P. (1991b). Regulation of adipose cell differentiation. II. Kinetics of induction of the aP2 gene by fatty acids and modulation by dexamethasone. *Journal of Lipid Research*, **32**(9),1457–1463.
- Anderson, GP. (2008). Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *The Lancet*, **372**(9643),1107-19.
- Angkasekwinai, P., Park, H., Wang, YH., Wang, YH., Chang, SH., Corry, DB., ve ark.(2007). Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. *The Journal of Experimental Medicine*, **204**(7), 1509– 1517.
- Anticevich, SZ., Hughes, JM., Black, JL., Armour, CL. (1996) Induction of hyperresponsiveness in human airway tissue by neutrophils-- mechanism of action. *Clinical and Experimental Allergy*, **26**(5),549–56.
- Aragonès, G., Ferré, R., Lázaro, I., Cabré, A., Plana, N., Merino, J., ve ark. (2010). Fatty acid-binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, **213**(1): 329-331
- Aragonès, G., Ferré, R., Girona, J., Plana, N., Merino, J., Heras, M., ve ark. (2012a). Small artery dilation and endothelial markers in cardiovascular risk patients. *European Journal of Clinical Investigation*. **42**(1), 34-41.
- Aragonès, G., Saavedra, P., Heras, M., Cabré, A., Girona J., Masana, L. (2012b) Fatty acid-binding protein 4 impairs the insulin-dependent nitric oxide pathway in vascular endothelial cells. *Cardiovascular Diabetology*, 11:72.
- Arkan Erdoğan, G., (2019). Mesleksel Astım. *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi*, **7** (2), 141-149
- Arruda, LK. ve Chapman, MD. (2001). The role of cockroach allergens in asthma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, **7**(1),14–19.
- Arshad, SH. (2003) Indoor allergen exposure in the development of allergy and asthma. *Current Allergy and Asthma Reports*,. **3**(2),115-20.
- Asher, MI., Keil, U., Anderson, HR., Beasley, R., Crane, J., Martinez, F., ve ark. (1995). International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *European Respiratory Journal*,. **8**,483–91.

- Aujla, S.J. ve Alcorn, J.F. (2011). T(H)17 cells in asthma and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1810**(11),1066–79.
- Aun, M.V., Bonamichi-Santos, R., Arantes-Costa, F.M., Kalil, J., ve Giavina-Bianchi, P. (2017). Animal models of asthma: utility and limitations. *Journal of Asthma and Allergy*, 10,293-301
- Ayers, S.D., Nedrow, K.L., Gillilan, R.E., ve Noy, N. (2007). Continuous nucleocytoplasmic shuttling underlies transcriptional activation of PPAR γ by FABP4. *Biochemistry*,**46**(23),6744–6752
- Ballantyne, S.J., Barlow, J.L., Jolin, H.E., Nath, P., Williams, A.S., Chung, K.F., ve ark. (2007). Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*., **120**(6),1324-31.
- Bandeira-Melo, C., Bozza, P.T. ve Weller, P.F. (2002) The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **109**(3),393–400.
- Bakakos, A., Loukides, S. ve Bakakos, P. (2019). Severe Eosinophilic Asthma. *Journal of Clinical Medicine*, **8**(9): 1375.
- Barnes P.J. (2010). Inhaled Corticosteroids. *Pharmaceuticals (Basel,Switzerland)*. **3**(3), 514–540.
- Bates, J.H., Rincon, M., ve Irvin, C.G. (2009). Animal models of asthma. *American Journal Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, **297**(3), L401-L410
- Batra, V., Musani, A.I., Hastie, A.T., Khurana, S., Carpenter, K.A., Zangrilli, J.G., ve ark. (2004) Bronchoalveolar lavage fluid concentrations of transforming growth factor (TGF)-beta1, TGF-beta2, interleukin (IL)-4 and IL-13 after segmental allergen challenge and their effects on alpha-smooth muscle actin and collagen III synthesis by primary human lung fibroblasts. *Clinical and Experimental Allergy*.,**34**(3),437-44.
- Baxi, S.N. ve Phipatanakul, W. (2010). The Role of Allergen Exposure and Avoidance in Asthma. *Adolescent Medicine State of the Art Reviews*, **21**(1), 57–71.
- Beasley, R., Semprini, A. ve Mitchell, E.A. (2015). Risk factors for asthma: is prevention possible?. *The Lancet*.,**386**(9998):1075-85.

Becklake, MR. ve Kauffmann, F.(1999). Gender differences in airway behaviour over the human life span. *Thorax*. **54**(12),1119–38.

Beggs, S., Foong, Y.C., Le, H.C., Noor, D., Wood-Baker, R. ve Walters, J.A. (2013). Swimming training for asthma in children and adolescents aged 18 years and under. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 4:CD009607.

Bel, E.H. (2004). Clinical phenotypes of asthma. *Current opinion in pulmonary medicine*, **10**(1), 44-50

Bennett, J.H., Shousha, S., Puddle, B., ve Athanasou, N.A. (1995). Immunohistochemical identification of tumours of adipocytic differentiation using an antibody to aP2 protein. *Journal of Clinical Pathology*. **48**(10),950–4.

Berend, N., Salome, C.M. ve King, G.G. (2008). Mechanisms of airway hyperresponsiveness in asthma. *Respirology*. **13**(5),624-31.

Bergeron, C., Al-Ramli, W., ve Hamid, Q. (2009). Remodeling in asthma. *Proceedings of the American Thoracic Society*. **6**(3), 301-5.

Bernlohr, D.A., Angus, C.W., Lane, M.D., Bolanowski, M.A., ve Kelly, T.J. Jr. (1984). Expression of specific mRNAs during adipose differentiation: identification of an mRNA encoding a homologue of myelin P2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **81**(17), 5468–5472.

Billington, C.K., Penn, R.B., ve Hall, I.P. (2017). β 2 Agonists. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 237,23-40.

Biron-Shental, T., Schaiff, WT., Ratajczak, CK., Bildirici, I., Nelson, DM., ve Sadovsky, Y. (2007). Hypoxia regulates the expression of fatty acid-binding proteins in primary term human trophoblasts. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. **197**(5), 516.e1-6.

Bleecker, E.R., Menzies-Gow, A.N., Price, D.B., Bourdin, A., Sweet, S., Martin, A.L., ve ark. (2020). Systematic Literature Review of Systemic Corticosteroid Use for Asthma Management. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **201**(3), 276-293.

Boonpiyathad, T., Sözen, Z.C., Satitsuksanoa, P. ve Akdis, C.A. (2019). Immunologic mechanisms in asthma. *Seminars in Immunology*. 46:101333.

Boord, J.B., Maeda, K., Makowski, L., Babaev, V.R., Fazio, S., Linton, M.F. ve ark. (2002). Adipocyte fatty acid-binding protein, aP2, alters late atherosclerotic lesion formation in severe hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biology*, 22(10), 1686–1691.

Boord, J.B., Maeda, K., Makowski, L., Babaev, V.R., Fazio, S., Linton, M.F., ve ark. (2004). Combined adipocyte-macrophage fatty acid-binding protein deficiency improves metabolism, atherosclerosis, and survival in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 110,1492–1498.

Borish, L. ve Culp, J.A. (2008). Asthma: a syndrome composed of heterogeneous diseases. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 101(1),1-8

Borish, L., Mascali, J.J., Dishuck, J., Beam, W.R., Martin, R.J. ve Rosenwasser, L.J. (1992). Detection of alveolar macrophage-derived IL-1 beta in asthma. Detection of alveolar macrophage-derived IL-1 beta in asthma. Inhibition with corticosteroids. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. :1950)*, 149(9),3078-82

Boulet, L., Bélanger, M. ve Carrier, G. (1995) Airway responsiveness and bronchial-wall thickness in asthma with or without fixed airflow obstruction. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 152(3),865–871.

Branton, M.H. ve Kopp, J.B. (1999). TGF- β and fibrosis. *Microbes and Infection*, 1(15), 1349–1365.

Broide, D.H., Lotz, M., Cuomo, A.J., Coburn, D.A., Federman, E.C., ve Wasserman, S.I. (1992). Cytokines in symptomatic asthma airways. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 89(5),958-67.

Brooks, C., Pearce, N. ve Douwes, J. (2013). The hygiene hypothesis in allergy and asthma: an update. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology*. 13(1), 70-77.

Brutsche, M.H., Downs, S.H., Schindler, C., Gerbase, M.W., Schwartz, J., Frey, M., ve ark. (2006). Bronchial hyperresponsiveness and the development of asthma and COPD in asymptomatic individuals: SAPALDIA cohort study. *Thorax*. 61(8),671–677.

- Buels, KS. ve Fryer, AD. (2012). Muscarinic receptor antagonists: effects on pulmonary function. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 208, 317–341.
- Burak, MF., Inouye, KE., White, A., Lee, A., Tuncman, G., Calay, ES., ve ark. (2015). Development of a therapeutic monoclonal antibody that targets secreted fatty acid-binding protein aP2 to treat type 2 diabetes. *Science Translational Medicine*, 7(319), 319ra205
- Calverly, P.M.A. (2012) Bronchodilators. İçinde S.G. Spiro, G.A. Silvestri, A. Agusti, (ed) (4th ed) *Clinical Respiratory Medicine*. Philadelphia: Saunders, Elsevier; 202-212
- Campbell, E.M., Charo, I.F., Kunkel, S.L., Strieter, R.M., Boring, L., Gosling, J., ve ark. (1999). Monocyte chemoattractant protein-1 mediates cockroach allergen-induced bronchial hyperreactivity in normal but not CCR2-/- mice: the role of mast cells. *Journal of Immunology(Baltimore, Md. :1950)*, **163**(4), 2160–2167
- Cao, H., Maeda, K., Gorgun, C.Z., Kim, H.J., Park, S.Y., Shulman, G.I., ve ark. (2006). Regulation of metabolic responses by adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins in leptin-deficient mice. *Diabetes*. **55**(7), 1915–1922.
- Cao, H., Sekiya, M., Ertunc, M.E., Burak, M.F., Mayers, J.R., White, A., ve ark. (2013). Adipocyte lipid chaperone AP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell Metabolism*, **17**(5), 768-778
- Carr, T.F., Zeki, A.A., ve Kraft, M. (2018). Eosinophilic and Noneosinophilic Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **197**(1),22-37.
- Carroll, N., Elliot, J., Morton, A. ve James, A.(1993). The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *The American Review of Respiratory Disease* **147**(2), 405–410.
- Carson, K.V., Chandratilleke, M.G., Picot, J., Brinn, M.P., Esterman, A.J., ve Smith, B.J. (2013). Physical training for asthma. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (9),CD001116.
- Castle, W., Fuller, R., Hall, J., ve Palmer, J.(1993). Serevent nationwide surveillance study: comparison of salmeterol with salbutamol in asthmatic patients who require regular bronchodilator treatment. *BMJ*. **306**(6884),1034–7.

- Cataltepe, O., Arikan, M.C., Ghelfi, E., Karaaslan, C., Ozsurekci, Y., Dresser, K., ve ark. (2012). Fatty acid binding protein 4 is expressed in distinct endothelial and non-endothelial cell populations in glioblastoma. *Neuropathology Applied Neurobiology*, **38**(5):400–410.
- Cazzola, M., Rogliani, P., ve Matera, M.G. (2019). Ultra-LABAs for the treatment of asthma. *Respiratory Medicine*.156,47-52.
- Celedón, J.C., Milton, D.K., Ramsey, C.D., Litonjua, A.A., Ryan, L., Platts-Mills, ve ark. (2007) Exposure to dust mite allergen and endotoxin in early life and asthma and atopy in childhood. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **120**(1),144–149.
- Chapman, D.G., Tully, J.E., Nolin, J.D., Jansen-Heininger, Y.M., ve Irvin, C.G. (2014). Animal Models of Allergic Airway Disease: Where Are We and Where to Next. *Journal of Cellular Biochemistry*, **115**(12),2055-2064.
- Chapman, D.G. ve Irvin, C.G. (2015). Mechanisms of Airway Hyperresponsiveness in Asthma: The Past, Present and Yet to Come. *Clinical and Experimental Allergy*. **45**(4), 706–719.
- Chaudhuri, R., Livingston, E., McMahon, A.D., Lafferty, J., Fraser, I., Spears, M., ve ark. (2006). Effects of smoking cessation on lung function and airway inflammation in smokers with asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **174**(2),127-33.
- Chmurzyńska, A. (2006) The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *Journal. of Applied Genetics*, **47**(1),39–48.
- Chuang, C. Y., Chang, C. H., ve Huang, Y. L. (2009). Thioredoxin mediates remodeling factors of human bronchial epithelial cells upon interaction with house dust mite-stimulated eosinophils. *Inhalation toxicology*, **21**(2), 153–167.
- Chung, K.F., Wenzel, S.E., Brozek, J.L., Bush, A.,Castro, M.,Sterk, P.J. ve ark. (2014). International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *The European Respiratory Journal*. **43**(2),343-73.
- Cohen, S.G. (1995). Sir John Floyer (1649–1734) British physician and pioneer clinical investigator. *Allergy Proceedings: the official journal of regional and state allergy societies*, **16**(6), 328–29

- Cook, J.S., Lucas, J.J., Sibley, E., Bolanowski, M.A., Christy, R.J., Kelly, T.J., ve ark. (1988). Expression of the differentiation-induced gene for fatty acid-binding protein is activated by glucocorticoid and cAMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**(9), 2949-2953
- Corrigan, C.J., Wang, W., Meng, Q., Fang, C., Eid, G., Caballero, M.R. ve ark. (2011). Allergen-induced expression of IL-25 and IL-25 receptor in atopic asthmatic airways and late-phase cutaneous responses. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **128**(1), 116-24.
- Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, S., Romagnani, S. ve Annunziato, F. (2011). Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*. **66**(8):989–98.
- Covar, R.A., Macomber, B.A., ve Szefer, S.J. (2005). Medications as asthma triggers. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, **25**(1), 169-90.
- D'Amato, G. (2006). Role of anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab) in the treatment of bronchial asthma and allergic respiratory diseases. *European Journal of Pharmacology*. **533**(1-3), 302-7.
- Debeuf, N., Haspeslagh, E., van Helden, M., Hammad, H., ve Lambrecht, B.N. (2016). Mouse models of asthma. *Current. Protocols in Mouse Biology*. **6**(2), 169-184.
- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S. ve Sawaya, B.E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. **29**(6), 313-26.
- Derendorf, H., Nave, R., Drollmann, A., Cerasoli, F., Wurst, W. (2006). Relevance of pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids to asthma. *The European Respiratory Journal*. **28**(5), 1042-50.
- Devos, F.C., Maaske, A., Robichaud, A., Pollaris, L., Seys, S., Lopez, C.A., ve ark. (2017) Forced expiration measurements in mouse models of obstructive and restrictive lung diseases. *Respiratory Research*, **18** (1), 123
- Dharmage, S.C., Perret, J.L. ve Custovic, A. (2019). Epidemiology of Asthma in Children and Adults. *Frontiers in Pediatrics*, **7**, 246.

- Dineley KE, ve Malaiyandi L. (2019) Pharmacological Treatment of Asthma and COPD. İçinde L. Wecker , D.A.Taylor, R.J. Theobald (ed)(6th edition) *Brody's Human Pharmacology Mechanism-Based Therapeutics*,. Philadelphia:Elsevier; 626-633
- Djoussé, L., Khawaja,O., Bartz, T.M., Biggs, M. L., Ix, J. H. , Ziemann, S. J. ve ark. (2012). Plasma fatty acid-binding protein 4, nonesterified fatty acids, and incident diabetes in older adults. *Diabetes Care*. **35**(8), 1701–1707.
- Distel, R.J., Robinson, G.S., ve Spiegelman, B.M.(1992). Fatty acid regulation of gene expression. Transcriptional and post- transcriptional mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 5937-5941
- Do, D.C, Zhao, Y., ve Gao, P. (2016). Cockroach allergen exposure and risk of asthma. *Allergy*. **71**(4),463-74.
- Doherty, T. ve Broide, D.(2007). Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Current Opinion in Immunology*. **19**(6),676-80.
- Dubois, A. B., Brody, A. W., Lewis, D. H., ve Burgess, B. F. Jr (1956). Oscillation mechanics of lungs and chest in man. *Journal of Applied Physiology*, **8** (6), 587–594.
- Elias, J.A., Zhu, Z., Chupp, G. ve Homer, R.J. (1999). Airway remodeling in asthma. *The Journal of Clinical Investigation*, **104**(8),1001–1006.
- Ek, B.A., Cistola, D.P., Hamilton, J.A., Kaduce, T.L., ve Spector, A.A.(1997). Fatty acid binding proteins reduce 15-lipoxygenase-induced oxygenation of linoleic acid and arachi- donic acid. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1346**(1),75–85.
- Ellwood, P., Asher, M.I., Beasley, R., Clayton, T.O., Stewart, A.W. ve ISAAC Steering Committee (2005).The international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): phase three rationale and methods.*The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, **9**(1),10–6.
- Elmasri, H., Karaaslan, C., Teper, Y., Ghelfi, E., Weng, M., Ince, T.A.,ve ark. (2009). Fatty acid binding protein 4 is a target of VEGF and a regulator of cell proliferation in endothelial cells. *FASEB Journal*, **23**(11), 3865-3873
- Elmasri, H., Ghelfi, E., Yu, C.W., Traphagen, S., Cernadas, M., Cao, H., ve ark.(2012). Endothelial cell-fatty acid binding protein 4 promotes angiogenesis: role of stem cell factor/c-kit pathway. *Angiogenesis*. **15**(3),457-68.

Ertunc, M. E., Sikkeland, J., Fenaroli, F., Griffiths, G., Daniels, M.P. Cao, H., ve ark. (2015). Secretion of fatty acid binding protein aP2 from adipocytes through a nonclassical pathway in response to adipocyte lipase activity. *Journal of Lipid Research*. **56**(2), 423–434.

Fahy, J.V., Kim, K.W., Liu, J., ve Boushey, H.A.(1995). Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **95**(4),843–852.

Fahy, J.V. ve Dickey, B.F.(2010). Airway mucus function and dysfunction.*The New England Journal of Medicine*, **363**(23),2233–47.

Fahy, J.V. (2015). Type 2 inflammation in asthma—present in most, absent in many. *Nature Reviews Immunology*,**15**(1),57-65.

Fallon, P.G., Ballantyne, S.J., Mangan, N.E., Barlow, J.L., Dasvarma, A., Hewett, D.R., ve ark. (2006). Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL- 4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion.*The Journal of Experimental Medicine*, **203**(4), 1105-16.

Ferrante, S. C., Nadler, E. P., Pillai, D.K., Hubal, M. J., Wang, Z., Wang, J.M., ve ark. (2015). Adipocyte-derived exosomal miRNAs: a novel mechanism for obesity-related disease. *Pediatric Research*. **77**(3), 447–454.

Fehrenbach, H., Wagner, C., ve Wegmann, M. (2017). Airway remodeling in asthma: what really matters. *Cell and Tissue Research*. **367**(3),551-569.

Figueroa, D.J., Breyer, R.M., Defoe, S.K., Kargman, S., Daugherty, B.L., Waldburger, K. ve ark. (2001).Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **163**(1), 226–233.

Finkelman F.D., Holmes, J., Katona, I.M., Urban, J.F.Jr., Beckmann M.P., Park L.S., ve ark. (1990). Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection, *Annual Review of Immunology*, **8**, 303– 333.

Fort, M.M., Cheung, J., Yen, D., Li, J., Zurawski, S.M., Lo, S., ve ark. (2001). IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity*,**15**(6), 985-95.

- Fu, Y., Luo, N. ve Lopes-Virella, M.F. (2000). Oxidized LDL induces the expression of ALBP/aP2 mRNA and protein in human THP-1 macrophages. *Journal of Lipid Research*, **41**(12), 2017-2023
- Fu, Y., Luo, N., Lopes-Virella, M.F. ve Garvey, W.T. (2002). The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*, **165**(2), 259–269.
- Fulkerson, P.C. ve Rothenberg, M.E. (2013). Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*, **12**(2), 117–29.
- Furuhashi, M., Tuncman, G., Gorgun, C.Z., Makowski, L., Atsumi, G., Vaillancourt, E. ve ark. (2007). Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature*, **447**(7147), 959-965
- Furuhashi, M. ve Hotamisligil, G.S.(2008). Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, **7**(6), 489-503
- Furuhashi, M., Ishimura, S., Ota, H., Hayashi, M., Nishitani, T., Tanaka, M., ve ark. (2011). Serum Fatty Acid-Binding Protein 4 Is a Predictor of Cardiovascular Events in End-Stage Renal Disease. *PLoS One*, **6**(11), e27356
- Furuhashi, M., Saitoh, S., Shimamoto, K., ve Miura, T. (2014). Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clinical Medicine Insights. Cardiology*. **8**, 23–33.
- Furuhashi, M., Hiramitsu, S., Mita, T., Fuseya, T., Ishimura, S., Omori, A. ve ark. (2015). Reduction of serum FABP4 level by sitagliptin, a DPP-4 inhibitor, in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Lipid Research*, **56**(12), 2372-2380
- Furuhashi, M., Hiramitsu, S., Mita, T., Omori, A., Fuseya, T., Ishimura, S. ve ark. (2016). Reduction of circulating FABP4 level by treatment with omega-3 fatty acid ethyl esters. *Lipids in Health and Disease*, **15**, 5.
- Fuseini, H. ve Newcomb, D.C. (2017). Mechanisms Driving Gender Differences in Asthma . *Current Allergy and Asthma Reports*, **17**(3), 19

Fuseya, T., Furuhashi, M., Yuda, S., Muranaka, A., Kawamukai, M. Mita, T. ve ark. (2014). Elevation of circulating fatty acid-binding protein 4 is independently associated with left ventricular diastolic dysfunction in a general population. *Cardiovascular Diabetology*, **13**(1): 126

Fuseya, T., Furuhashi, M., Matsumoto, M., Watanabe, Y., Hoshina, K., Mita, T. ve ark. (2017). Ectopic Fatty Acid-Binding Protein 4 Expression in the Vascular Endothelium is Involved in Neointima Formation After Vascular Injury. *Journal of American Heart Association*, **6**(9), e006377

Gaffin, J.M. ve Phipatanakul, W. (2009). The role of indoor allergens in the development of asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. **9**(2), 128-35

Garin-Shkolnik, T., Rudich, A., Hotamisligil, G.S., ve Rubinstein, M. (2014). FABP4 attenuates PPARgamma and adipogenesis and is inversely correlated with PPARgamma in adipose tissues. *Diabetes*, **63**, 900-911

Gauthier, M., Ray, A., ve Wenzel, S.E. (2015). Evolving Concepts of Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **192**(6), 660–668.

Ghelfi, E., Yu, C.W., Elmasri, H., Terwelp, M., Lee, C.G., Bhandari, V., ve ark. (2013). Fatty acid binding protein 4 regulates VEGF-induced airway angiogenesis and inflammation in a transgenic mouse model: implications for asthma. *The American Journal of Pathology*, **182**(4), 1425-33.

Gillilan, R.E., Ayers, S.D., ve Noy, N. (2007). Structural basis for activation of fatty acid-binding protein 4. *Journal of Molecular Biology*, **372**(5), 1246–1260.

Global Initiative for Asthma (GINA) (2019). Global Strategy for Asthma Management and Prevention, www.ginasthma.org

Girona, J., Rosales, R., Plana, N., Saavedra, P., Masana, L., Vallvé, J.C. (2013). FABP4 induces vascular smooth muscle cell proliferation and migration through a MAPK-dependent pathway. *PLoS One*, **8**, e81914.

Global Alliance against Chronic Respiratory Diseases (GARD), (2007), Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: A comprehensive approach. J. Bousquet, N. Khaltaev (ed). World Health Organization, WHO.

Gonzalo, J.A., Lloyd, C.M., Wen, D., Albar, J.P., Wells, T.N., Proudfoot A., ve ark. (1998). The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *The Journal of Experimental Medicine*.**188**(1),157-67.

Gosens, R. ve Gross, N. (2018). The mode of action of anticholinergics in asthma. *The European Respiratory Journal* 2018; 52: 1701247

Gosens, R., Zaagsma, J., Meurs, H. ve Halayko A.J. (2006). Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respiratory Research*, 7, 73.

Gould, H.J. , Sutton, B.J. , Beavil, A.J. , Beavil, R.L., McCloskey, N., Coker, H.A. ve ark. (2003). The biology of IGE and the basis of allergic disease, *Annual Review of Immunology*, **21**, 579–628.

Gruchalla, R.S., Pongracic, J., Plaut, M., Evans, R.3rd, Visness, C.M., Walter, M. ve ark. (2005). Inner City Asthma Study: relationships among sensitivity, allergen exposure, and asthma morbidity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*,**115**(3),478–485.

Hakonarson, H., Maskeri, N., Carter, C. ve Grunstein, MM. (1999). Regulation of TH1- and TH2-type cytokine expression and action in atopic asthmatic sensitized airway smooth muscle. *The Journal of Clinical Investigation* . **103** (7), 1077– 1087.

Hall, S. ve Agrawal, D.K. (2014). Key mediators in the immunopathogenesis of allergic asthma. *International Immunopharmacology*. **23**(1), 316–29.

Hallstrand, TS. ve Henderson Jr W.R. (2010). An update on the role of leukotrienes in asthma. *Current Opinion in Allergy Clinical Immunology*.**10**(1), 60–6.

Hammad, H., Charbonnier, A.S., Duez, C., Jacquet, A., Stewart, G.A., Tonnel, A.B., ve ark. (2001). Th2 polarization by Der P 1--pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood*.**98**(4),1135-41.

Hammad, H., Plantinga, M., Deswarte,K., Pouliot, P., Willart, M.A., Kool, M. ve ark. (2010). Inflammatory dendritic cells-not basophils-are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *The Journal of Experimental Medicine*, **207**(10),2097-2111.

- Hamilton, D. ve Lehman, H. (2020). Asthma Phenotypes as a Guide for Current and Future Biologic Therapies. *Clinical Reviews in Allergy& Immunology*. **59**(2), 160-174
- Hanania, N.A., Chapman, K.R. ve Kesten, S. (1995). Adverse effects of inhaled corticosteroids. *The American Journal of Medicine*, **98**(2), 196–208.
- Hao, J., Zhang,Y., Yan,X., Yan,F., Sun,Y., Zeng, J. ve ark. (2018). Circulating adipose fatty acid binding protein is a new link underlying obesity-associated breast/mammary tumor development. *Cell Metabolism*. **28**(5), 689–705.e5.
- Haraguchi, M., Shimura, S., ve Shirato, K. (1999). Morphometric analysis of bronchial cartilage in chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. *American Journal Respiratory and Critical Care Medicine*. **159**(3), 1005–1013.
- Hartney JM ve Robichaud A. (2013) Assessment of airway hyperresponsiveness in mouse models of allergic lung disease using detailed measurements of respiratory mechanics. İçinde I.C. Allen (ed). *Mouse Models of Allergic Disease Methods and Protocols*. Humana Press, Springer;205-217
- Haunerland, N.H., ve Spener, F. (2004). Fatty acid-binding proteins — insights from genetic manipulations. *Progress in Lipid Research*. **43**(4),328–349.
- Helfrich, S., Mindt, B.C., Fritz, J.H. ve Duerr, C.U. (2019) Group 2 Innate Lymphoid Cells in Respiratory Allergic Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 10,930.
- Holgate, S.T. (2008). Pathogenesis of asthma. *Clinical& Experimental Allergy*. **38**(6):872-97.
- Holgate, S.T. ve Polosa, R. (2008). Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature Reviews. Immunology*. **8**(3):218-30.
- Holgate, S.T. ve Sly, P.D. (2014). Asthma Pathogenesis. İçinde N.F. Adkinson Jr, B.S. Bochner, A.W. Burks, W.W. Busse, S.T. Holgate, R.F. Lemanske, R.E. O’Hehir (Ed.) *Middleton's Allergy: Principles and Practice* 8th.edition, Philadelphia: Saunders Elsevier; 812-841.
- Homer, R.J. ve Elias, J.A. (2005). Airway remodeling in asthma: therapeutic implications of mechanisms. *Physiology (Bethesda,Md.)*. 20:28-35.
- Horvath, G. ve Wanner, A.(2006). Inhaled corticosteroids: effects on the airway vasculature in bronchial asthma. *The European Respiratory Journal*. **27**(1),172-87.

Hotamisligil, G.S., Johnson, R.S., Distel, R.J., Ellis, R., Papaioannou, V.E., ve Spiegelman, B.M. (1996). Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science*. 274,1377–1379.

Hotamisligil, G.S. ve Bernlohr, D.A. (2015). Metabolic functions of FABPs--mechanisms and therapeutic implications. *Nature Reviews. Endocrinology*, **11**(10), 592-605

Hu, W. ve Qiao, J. (2011). Expression and regulation of adipocyte fatty acid binding protein in granulosa cells and its relation with clinical characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrine*. **40**(2),196–202.

Hu, X., Ma, X., Pan, X., Luo, Y., Xu, Y., Xiong, Q. ve ark. (2016). Association of androgen with gender difference in serum adipocyte fatty acid binding protein levels. *Scientific Reports*, 6,27762

Huang, H., Starodub, O., McIntosh, A., Kier, A.B., ve Schroeder, F. (2002) Liver fatty acid-binding protein targets fatty acids to the nucleus. Real time confocal and multiphoton fluorescence imaging in living cells. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(32), 29139–29151.

Hunt, C.R., Ro, J.H., Dobson, D.E., Min, H.Y. ve Spiegelman, B.M. (1986). Adipocyte P2 gene: developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America*, **83**(11),3786–3790.

Hurst, S.D., Muchamuel, T., Gorman, D.M., Gilbert, J.M., Clifford, T., Kwan, S., ve ark. (2002). New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. :1950)*, **169**(1),443-53.

Ishimura, S., Furuhashi, M., Watanabe, Y., Hoshina, K., Fuseya, T., Mita, T. ve ark (2013). Circulating levels of fatty acid- binding protein family and metabolic phenotype in the general population. *PLoS One*. **8**(11):e81318.

Iso, T., Maeda, K., Hanaoka, H., Suga, T., Goto, K., Syamsunarno, M.R. ve ark (2013). Capillary endothelial fatty acid binding proteins 4 and 5 play a critical role in fatty acid

uptake in heart and skeletal muscle. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. **33**(11),2549–57.

Jacoby, D.B., Gleich, G.J. ve Fryer, A.D. (1993). Human eosinophil major basic protein is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M2 receptor. *The Journal of Clinical Investigation* **91**(4), 1314–1318.

Jacobsen, E.A., Helmers, R.A., Lee, J.J. ve Lee, N.A. (2012). The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. *Blood*. **120**(19):3882–90.

Jacquet,A. ve Robinson, C. (2020). Proteolytic, lipidergic and polysaccharide molecular recognition shape innate responses to house dust mite allergens. *Allergy*, 75,33-53

James, A.J., Penrose, J.F., Cazaly, A.M., Holgate, S.T., ve Sampson, A.P. (2006). Human bronchial fibroblasts express the 5-lipoxygenase pathway. *Respiratory Research* 7, 102.

James, A.L. ve Wenzel, S. (2007). Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases.*The European Respiratory Journal*. **30**(1):134-55.

James, A.L., Elliot, J.G., Jones, R.L., Carroll, M.L., Mauad, T., Bai, T.R., ve ark. (2012). Airway smooth muscle hypertrophy and hyperplasia in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **185**(10):1058-64.

Janeway, C.A. Jr. ve Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20:197–216.

Jang, J., Ha, J.H., Kim, S.M., Kim, W., Kim, K., Chung, S.I. ve ark. (2014) β -catenin mediates the inflammatory cytokine expression induced by the Der p 1 house dust mite allergen. *Molecular Medicine Reports*. **9**(2):633-8.

Jenkins-Kruchten, A.E., Bennaars-Eiden, A., Ross, JR, Shen, W.J., Kraemer, F.B. Bernlohr, D.A. (2003). Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction. Fatty acid dependence on binding. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**(48):47636–47643.

Jiang, S., Wang,Q., Wang,Y., Song,X., ve Zhang,Y.(2019). Blockade of CCL2/CCR2 signaling pathway prevents inflammatory monocyte recruitment and attenuates OVA-Induced allergic asthma in mice. *Immunology Letters*. 214:30-36.

- Johnson, P.R. (2001). Role of human airway smooth muscle in altered extracellular matrix production in asthma. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* **28**(3),233–236.
- Johnston, S.L., Pattemore, P.K., Sanderson, G., Smith, S., Lampe, F., Josephs, L., ve ark. (1995). Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9–11 year old children. *BMJ (Clinical. Research ed.)*. **310**(6989),1225–9.
- Kaess, B.M., Enserro, D.M., McManus, D.D., Xanthakis,V., Chen, M.H., Sullivan, L.M. ve ark. (2012). Cardiometabolic correlates and heritability of fetuin-A, retinol-binding protein 4, and fatty-acid binding protein 4 in the Framingham Heart Study. *The Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism*. **97**(10),E1943–E1947.
- Kanda, T., Fujii, H., Tani, T., Murakami, H., Suda, T., Sakai, Y. ve ark. (1996). Intestinal fatty acid-binding protein is a useful diagnostic marker for mesenteric infarction in humans. *Gastroenterology*. **110**(2), 339–343.
- Kashyap, M., Rochman, Y., Spolski, R., Samsel, L. ve Leonard, W.J. (2011). Thymic stromal lymphopoietin is produced by dendritic cells. *Journal of Immunology.(Baltimore, Md.: 1950)*, **187**(3),1207-11.
- Kay, A.B. (1983). Mediators of hypersensitivity and inflammatory cells in the pathogenesis of bronchial asthma. *European Journal of Respiratory Diseases*. Supplement 129, 1–44.
- Kayaalp, S.O. (Ed.). (2012). *Akılcıl Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, Ankara: Pelikan Yayıncılık
- Kazemi, M.R., McDonald, C.M., Shigenaga, J.K., Grunfeld, C. ve Feingold, K.R. (2005). Adipocyte fatty acid-binding protein expression and lipid accumulation are increased during activation of murine macrophages by toll-like receptor agonists. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, **25**(6), 1220-1224
- Kearley, J., Buckland, K.F., Mathie, S.A., ve Lloyd, C.M.(2009). Resolution of allergic inflammation and airway hyperreactivity is dependent upon disruption of the T1/ST2-IL-33 pathway. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **179**(9),772-81.

- Kelly, H.W. ve Nelson, H.S. (2003). Potential adverse effects of the inhaled corticosteroids. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **112**(3), 469–478.
- Kim, R.Y., Pinkerton, J.W., Gibson, P.G., Cooper, M.A., Horvat, J.C. ve Hansbro, P.M. (2015). Inflammasomes in COPD and neutrophilic asthma. *Thorax*, **70**(12), 1199–1201.
- Kips, J.C., Anderson, G.P., Fredberg, J.J., Herz, U., Inman, M.D., Jordana, M., ve ark. (2003). *Murine models of asthma*, The European Respiratory Journal, **22**(2), 374–382
- Kletzien, R.F., Foellmi, L.A., Harris, P.K., Wyse, B.M., ve Clarke, S.D. (1992). Adipocyte fatty acid-binding protein: regulation of gene expression in vivo and in vitro by an insulin-sensitizing agent. *Molecular Pharmacology*, **42**(4), 558–562.
- Koh, J.H., Shin, Y.G., Nam, S.M., Lee, M.Y., Chung, C.H. ve Shin, J.Y. (2009). Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels are associated with nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. **32**(1): 147–152.
- Koper, I., Hufnagl, K. ve Ehmann, R. (2017). Gender aspects and influence of hormones on bronchial asthma - Secondary publication and update. *World Allergy Organization Journal*. **10**(1):46.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. ve Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*. **27**:485–517.
- Kouzaki, H., O'Grady, S.M., Lawrence, C.B. ve Kita, H. (2009). Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. :1950)*. **183**(2), 1427–34.
- Kralisch, S., Ebert, T., Lossner, U., Jessnitzer, B., Stumvoll, M., ve Fasshauer, M. (2014). Adipocyte fatty acid-binding protein is released from adipocytes by a non-conventional mechanism. *International Journal of Obesity (Lond)*, **38**(9), 1251–1254
- Kralisch, S., Klöting, N., Ebert, T., Kern, M., Hoffmann, A., Krause, K. ve ark. (2015). Circulating adipocyte fatty acid-binding protein induces insulin resistance in mice in vivo. *Obesity (Silver Spring)*. **23**(5), 1007–1013.
- Kurowska-Stolarska, M., Stolarski, B., Kewin, P., Murphy, G., Corrigan, C.J., Ying, S. ve ark. (2009). IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **183**(10):6469–77.

- Kuruvilla, M.E., Lee, F.E. ve Lee, G.B. (2019). Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. **56**(2):219-233.
- Laan, M., Cui, Z.H., Hoshino, H., Lötvall, J., Sjöstrand, M., Gruenert, D.C., ve ark. (1999) Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways, *Journal of Immunology (Baltimore,Md.; 1950)*, **162** (4) 2347–2352.
- Lambrecht, B.N. ve Hammad, H. (2015). The immunology of asthma. *Nature Immunology*, **16**(1),45-56
- Lamkanfi, M., Vande Walle, L., ve Kanneganti, T.D. (2011). Deregulated inflammasome signaling in disease. *Immunological Reviews*. **243**(1):163-73.
- Lamounier-Zepter, V., Look, C., Alvarez, J., Christ, T., Ravens, U., Schunck, W.H., ve ark. (2009). Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: a new link between obesity and heart disease. *Circulation Research*, **105**(4),326–334.
- Lee, B.J., Moon, H.G., Shin, T.S., Jeon, S.G., Lee, E.Y., Gho, Y.S. ve ark. (2011). Protective effects of basic fibroblast growth factor in the development of emphysema induced by interferon-gamma, *Experimental& Molecular Medicine*. **43** (4), 169–178.
- Lee, M.F., Song, P.P., Hwang, G.Y., Lin, S.J. ve Chen, Y.H. (2012). Sensitization to Per a 2 of the American cockroach correlates with more clinical severity among airway allergic patients in Taiwan. *Annals of Allergy, Asthma &Immunology* **108**(4),243–248.
- Lee, Y.G., Jeong, J.J., Nyenhuis, S., Berdyshev, E., Chung, S., Ranjan, R. ve ark. (2015). Recruited alveolar macrophages, in response to airway epithelial-derived monocyte chemoattractant protein 1/CCl2, regulate airway inflammation and remodeling in allergic asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. **52**(6),772-84.
- Leuppi, J.D., Salome, C.M., Jenkins, C.R., Anderson, S.D., Xuan, W., Marks, G.B. ve ark. (2001). Predictive markers of asthma exacerbation during stepwise dose reduction of inhaled corticosteroids. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **163**(2),406–412.
- Li, X. ve Wilson, J.W. (1997). Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **156**(1),229–233.

Lin, H., Boesel, K.M., Griffith, D.T., Prussin, C., Foster, B., Romero, F.A. ve ark. (2004). Omalizumab rapidly decreases nasal allergic response and FcεRI on basophils. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **113**(2),297-302.

Liu, M., Zhou, M., Bao, Y., Xu, Z., Li, H., Zhang, H. ve ark. (2013). Circulating adipocyte fatty acid-binding protein levels are independently associated with heart failure. *Clinical Science*, **124**(2), 115–122.

Liu, H., Guo, M. ve Jiang, F.L. (2018). Serum concentrations of fatty acid-binding protein 4 in Chinese children with type 1 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications*. **32**(5), 488–491.

Llaverias, G., Noé, V., Peñuelas, S., Vázquez-Carrera, M., Sánchez R.M., Laguna, J.C. ve ark. (2004). Atorvastatin reduces CD68, FABP4, and HBP expression in oxLDL-treated human macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **318**(1), 265-274

Lötvall, J., Akdis, C.A., Bacharier, L.B., Bjermer, L., Casale, T.B., Custovic, A., ve ark. (2011). Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **127**(2):355-60.

Louisias, M., Ramadan, A., Naja, A.S. ve Phipatanakul, W. (2019). The Effects of the Environment on Asthma Disease Activity. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. **39**(2),163-175.

Lukacs, N.W., Strieter, R.M., Warmington, K., Lincoln, P., Chensue, S.W., ve Kunkel, S.L. (1997) Differential recruitment of leukocyte populations and alteration of airway hyperreactivity by C-C family chemokines in allergic airway inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.; 1950)*, **158**(9), 4398–4404.

Lundblad L.K.A. (2012). Issues determining direct airways hyperresponsiveness in mice . *Frontiers in Physiology*. **3**, 408.

Lv, J., Yu, Q., Lv, J., Di, C., Lin, X., Su, W., ve ark. (2018a). Airway epithelial TSLP production of TLR2 drives type 2 immunity in allergic airway inflammation. *European journal of immunology*, **48**(11), 1838–1850.

Lv, J., Su, W., Yu, Q., Zhang, M., Di, C., Lin, X., ve ark. (2018b). Heme oxygenase-1 protects airway epithelium against apoptosis by targeting the proinflammatory NLRP3-RXR axis in asthma. *The Journal of biological chemistry*, **293**(48), 18454–18465.

Lynch, K.R., O'Neill, G.P., Liu, Q., Im, D.S., Sawyer, N., Metters, K.M., ve ark. (1999). Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature*, **399**(6738), 789–793.

MacGlashan, D.W., Bochner, B.S., Adelman, D.C., Jardieu, P.M., Togias, A., McKenzie-White, J., ve ark. (1997). Down-regulation of FcεRI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **158**(3), 1438–1445.

Maeda, K., Uysal K.T., Makowski, L., Görgün, C.Z., Atsumi, G., Parker, R.A. ve ark. (2003) Role of the fatty acid binding protein mal1 in obesity and insulin resistance. *Diabetes*, **52**(2), 300–307.

Maeda, K., Cao, H., Kono, K., Gorgun, C.Z., Furuhashi, M., Uysal, K.T. ve ark. (2005) Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metabolism*. **1**(2), 107–119.

Makinde, T., Murphy, R.F. ve Agrawal, D.K. (2007). The regulatory role of TGF-β in airway remodeling in asthma. *Immunology and Cell Biology*, **85**(5), 348–56.

Makowski, L., Boord, J.B., Maeda, K., Babaev, V.R., Uysal, K.T., Morgan, M.A., ve ark. (2001). Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nature Medicine*, **7**(6), 699–705

Makowski, L. ve Hotamisligil, G.S. (2005). The role of fatty acid binding proteins in metabolic syndrome and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* **16**(5), 543–548.

Makowski, L., Brittingham, K.C., Reynolds, J.M., Suttles, J. ve Hotamisligil, G.S. (2005). The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor γ and IκB kinase activities. *The Journal Biological Chemistry*, **280**(13), 12888–12895

Martínez-Micaelo, N., Rodríguez-Calvo, R., Guaita-Esteruelas, S., Heras, M., Girona, J., Masana, L. (2019). Extracellular FABP4 uptake by endothelial cells is dependent on cyto- keratin 1 expression. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*. **1864**(3),234-244.

Masoli, M., Fabian, D., Holt, S., Beasley, R. ve Global Initiative for Asthma (GINA) Program. (2004). The global burden of asthma: executive summary of the GINA dissemination committee report. *Allergy*. **59**(5),469–78

Matarese, V. ve Bernlohr, D.A. (1988). Purification of murine adipocyte lipid-binding protein. Characterization as a fatty acid- and retinoic acid-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**(28), 14544- 14551.

Mathew, A., MacLean, J.A., DeHaan, E., Tager, A.M., Green, F.H., Luster, A.D. (2001). Signal transducer and activator of transcription 6 controls chemokine production and T helper cell type 2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*.,**193**(9):1087-96.

McGovern, T.K., Robichaud, A., Fereydoonzad, L., Schuessler, T.F., ve Martin, J.G. (2013). Evaluation of Respiratory System Mechanics in Mice using the Forced Oscillation Technique. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (75), e50172.

Mehlhof, P.D., van de Rijn, M., Goldberg, A.B., Brewer, J.P., Kurup, V.P., Martin, T.R. ve ark. (1997) Allergen-induced bronchial hyperreactivity and eosinophilic inflammation occur in the absence of IgE in a mouse model of asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*., **94**(4):1344-9.

Mellado, M., Martín de Ana, A., Gómez, L., Martínez, C., ve Rodríguez-Frade, J.M.(2008). Chemokine receptor 2 blockade prevents asthma in a cynomolgus monkey model. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **324**(2),769-75.

Melgert, B.N., Ray, A., Hylkema, M.N., Timens, W. ve Postma, D.S. (2007). Are there reasons why adult asthma is more common in females? *Current Allergy and Asthma Reports*. **7**(2),143–50.

Melki, S.A., ve Abumrad, N.A. (1993). Expression of the adipocyte fatty acid-binding protein in streptozotocin-diabetes: effects of insulin deficiency and supplementation. *Journal of Lipid Research*, **34**(9), 1527-1534

Miao, X., Wang, Y., Wang, W., Lv, X., Wang, M., ve Yin, H. (2015). The mAb against adipocyte fatty acid-binding protein 2E4 attenuates the inflammation in the mouse model of high-fat diet-induced obesity via toll-like receptor 4 pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **403**: 1-9

Minshall, E.M., Leung, D.Y., Martin, R.J., Song, Y.L., Cameron, L., Ernst, P., ve ark. (1997). Eosinophil-associated TGF- β 1 mRNA expression and air- ways fibrosis in bronchial asthma, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **17**(3), 326– 333

Mita, T., Furuhashi, M., Hiramitsu, S., Ishii, J., Hoshina, K., Ishimura, S., ve ark. (2015). FABP4 is secreted from adipocytes by adenyl cyclase-PKA- and guanylyl cyclase-PKG-dependent lipolytic mechanisms. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. **23**(2), 359–367.

Montuschi, P., Sala, A., Dahlén, S.E. ve Folco, G. (2007). Pharmacological modulation of the leukotriene pathway in allergic airway disease. *Drug Discovery Today*, **12**(9-10), 404–412.

Montuschi, P. (2010). Role of Leukotrienes and Leukotriene Modifiers in Asthma. *Pharmaceuticals (Basel)*. **3**(6), 1792–1811.

Moore, W.C., Meyers, D.A., Wenzel, S.E., Teague, W.G., Li, H., Li, X. ve ark. (2010). Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **181**(4), 315-23.

Moorman, J.E., Akinbami, L.J., Bailey, C.M., Zahran, H.S., King, M.E., Johnson, C.A., ve ark. (2012). National surveillance of asthma: United States, 2001–2010. *Vital Health Statistics. Series 3, Analytical and Epidemiological Studies*, (35):1–58.

Murdoch, J.R. ve Lloyd, C.M. (2010). Chronic inflammation and asthma. *Mutation Research*, **690**(1-2), 24–39.

- Nair, P., Martin, J.G., Cockcroft, D.C., Dolovich, M., Lemiere, C., Boulet, L.P. ve ark. (2017). Airway Hyperresponsiveness in Asthma: Measurement and Clinical Relevance. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice.*, 5(3),649-659.e2.
- Nauseef, W.M. ve Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nature Immunology*. 15(7),602–11.
- Naylor, B. (1962). The shedding of the mucosa of the bronchial tree in asthma. *Thorax.*, 17(1),69–72.
- Nelson, H.S., Weiss, S.T., Bleecker, E.R., Yancey, S.W., ve Dorinsky, P.M. (2006). The Salmeterol Multicenter Asthma Research Trial: a comparison of usual pharmacotherapy for asthma or usual pharmacotherapy plus salmeterol. *Chest* 129(1),15–26.
- Nelson, R.K., Bush, A., Stokes, J., Nair, P., ve Akuthota, P. (2020). Eosinophilic Asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice*. 8(2),465-473
- Newcomb, D.C. ve Peebles, R.S. Jr. (2013). Th17-mediated inflammation in asthma. *Current Opinion in Immunology*. 25(6), 1–12.
- Nials, A.T. ve Uddin, S. (2008). Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Disease Models & Mechanisms*,. 1(4-5):213-20.
- Nicholson, K.G., Kent, J. ve Ireland, D.C. (1993). Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ (Clinical Research ed.)*. 307(6910),982–6
- Niimi, A., Matsumoto, H., Takemura, M., Ueda, T., Chin, K., Mishima, M., (2003). Relationship of airway wall thickness to airway sensitivity and airway reactivity in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 168(8):983–988.
- Nolte, H., Backer, V. ve Porsbjerg, C. (2001). Environmental factors as a cause for the increase in allergic disease. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 87(6 Suppl 3):7–11.

Ntontsi, P., Loukides, S., Bakakos, P., Kostikas, K., Papatheodorou, G., Papathanassiou, E., ve ark. (2017). Clinical, functional and inflammatory characteristics in patients with paucigranulocytic stable asthma: comparison with different sputum phenotypes. *Allergy*, **72**(11), 1761-7.

Obokata, M., Iso, T., Ohyama, Y., Sunaga, H., Kawaguchi, T., Matsui, H., ve ark. (2018). Early increase in serum fatty acid binding protein 4 levels in patients with acute myocardial infarction. *European Heart Journal. Acute Cardiovascular Care*. **7**(6), 561–569.

Ockner, R.K., Manning, J.A., Poppenhausen, R.B. ve Ho, W.K. (1972). A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science*. **177** (4043), 56–58.

Oda, N., Miyahara, N., Taniguchi, A., Morichika, D., Senoo, S., Fujii, U., ve ark. (2019). Requirement for neuropeptide Y in the development of type 2 responses and allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. **316**(3):L407-L417.

Ohno, I., Nitta, Y., Yamauchi, K., Hoshi, H., Honma, M., Woolley, K., ve ark. (1996). Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) gene expression by eosinophils in asthmatic airway inflammation, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **15**(3), 404–409.

Olenchock, B.A., Fonarow, G.G., Pan, W., Hernandez, A., Cannon, C.P. ve Get With The Guidelines Steering Committee (2009) Current use of beta blockers in patients with reactive airway disease who are hospitalized with acute coronary syndromes. *The American Journal of Cardiology*, **103**(3), 295-300.

Osei, E.T., Brandsma, C.A., Timens, W., Heijink, I.H., ve Hackett, T.L. (2020). Current perspectives on the role of interleukin-1 signalling in the pathogenesis of asthma and COPD. *The European Respiratory Journal*., **55**(2). pii: 1900563.

Ostrom, N.K. (2006). Women with asthma: a review of potential variables and preferred medical management. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, **96**(5), 655–665.

- Ota, H., Furuhashi, M., Ishimura, S., Koyama, M., Okazaki, Y., Mita, T., ve ark. (2012). Elevation of fatty acid-binding protein 4 is predisposed by family history of hypertension and contributes to blood pressure elevation. *American Journal of Hypertension*. **25**(10), 1124–30.
- Panettieri, R.A. Jr, Kotlikoff, M.I., Gerthoffer, W.T., Hershenson, M.B., Woodruff, P.G., Hall, I.P., ve ark. (2008). Airway smooth muscle in bronchial tone, inflammation, and remodeling: basic knowledge to clinical relevance. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **177**(3), 248–252.
- Panettieri, R.A. Jr. (2002). Airway smooth muscle: an immunomodulatory cell. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **110**(6), S269–S274.
- Pavord, I.D., Beasley, R., Agusti, A., Anderson, G.P., Bel, E., Brusselle, G., ve ark. (2018). After asthma: redefining airways diseases. *Lancet*(London, England), **391**(10118), 350–400.
- Pease, J.E. (2006). Asthma, allergy and chemokines. *Current. Drug Targets*, **7**(1), 3–12
- Pelaia, G., Vatrella, A. ve Maselli, R. (2017). *Asthma: Targeted Biological Therapies*, Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
- Pelsers, M.M., Morovat, A., Alexander G.J., Hermens, W.T., Trull, A.K., Glatz, J.F. (2002). Liver fatty acid-binding protein as a sensitive serum marker of acute hepatocellular damage in liver transplant recipients. *Clinical Chemistry*, **48**(11), 2055–2057.
- Pelton, P.D., Zhou, L., Demarest, K.T. ve Burris, T.P. (1999). PPARgamma activation induces the expression of the adipocyte fatty acid binding protein gene in human monocytes. *Biochemical Biophysical Research Communications*, **261**(2), 456–458
- Peters-Golden, M. ve Henderson, W.R. Jr (2007) Leukotrienes. *The New England Journal of Medicine*, **357**(18), 1841–1854.
- Pichavant, M., Charbonnier, A.S., Taront, S., Brichet, A., Wallaert, B., Pestel, J., ve ark. (2005). Asthmatic bronchial epithelium activated by the proteolytic allergen Der p 1 increases selective dendritic cell recruitment. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **115**(4), 771–8.

Pichavant, M., Goya, S., Hamelmann, E., Gelfand, E.W., ve Umetsu, D.T. (2007). Animal models of airway sensitization. *Current Protocols in Immunology*. **79**(1), 15.18.1-15.18.19.

Portnoy, J., Miller, J.D., Williams, P.B., Chew, G.L., Miller, J.D., Zaitoun, F. ve ark. (2013). Environmental assessment and exposure control of dust mites: a practice parameter. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, **111**(6), 465-507

Postma, D.S. ve Kerstjens, H.A. (1998). Characteristics of airway hyperresponsiveness in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **158**(5. Pt 3), S187–S192.

Préfontaine, D., Lajoie-Kadoch, S., Foley, S., Audusseau, S., Olivenstein, R., Halayko, A.J., ve ark. (2009). Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. **183**(8):5094-103.

Prentice, K.J., Saksi, J. ve Hotamisligil, G.S. (2019). Adipokine FABP4 integrates energy stores and counterregulatory metabolic responses. *Journal of Lipid Research*. **60**(4):734-740.

Prussin, C., Griffith, D.T., Boesel, K.M., Lin, H., Foster, B. ve Casale, T.B. (2003). Omalizumab treatment downregulates dendritic cell FcεRI expression. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **112**(6), 1147-54.

Qiu, Z., Zhou, J., Liu, F., Qin, X., Dai, Y., Ke, Y. ve ark. (2017). Deletion of Shp2 in bronchial epithelial cells impairs IL-25 production in vitro, but has minor influence on asthmatic inflammation in vivo. *PLoS One*. **12**(5):e0177334.

Quirce, S. ve Bernstein, J.A. (2011). Old and new causes of occupational asthma. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, **31**(4), 677-98.

Quirce, S., Domínguez-Ortega, J. ve Barranco, P. (2015). Anticholinergics for treatment of asthma. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*. **25**(2):84-95

Rackemann, F.M. (1927) A clinical survey of 1074 patients with asthma followed for two years. *J Lab Clin Med* **12**, 1185–97.

Rackemann, F.M. (1947) A working classification of asthma. *The American Journal of Medicine*, **3**(5), 601–606.

- Rackemann, F.M. (1950). Other factors besides allergy in asthma. *JAMA*, **142**(8),534–538.
- Rackemann, F.M., Burrage, W.S. ve Irwin, J.W. (1950). Intrinsic asthma. *Postgrad Med*,8,134–140.
- Ramsahai, J.M. ve Wark, P.A. (2018). Appropriate use of oral corticosteroids for severe asthma. *The Medical Journal of Australia*. **209**(2):S18-S21.
- Ray, A. Raundhal, M., Oriss, T.B., Ray, P. ve Wenzel, S.E. (2016). Current concepts of severe asthma. *The Journal of Clinical Investigation*. **126**(7),2394–24403.
- Ray, A. ve Kolls, J.K. (2017). Neutrophilic Inflammation in Asthma and Association with Disease Severity. *Trends in Immunology*. **38**(12),942-954.
- Raundhal, M, Morse, C. Khare, A. Oriss, T.B., Milosevic, J., Trudeau, J. ve ark. (2015). High IFN-gamma and low SLPI mark severe asthma in mice and humans. *The Journal of Clinical Investigation*. **125**(8),3037–50.
- Reed, C.E. ve Milton, D.K. (2001). Endotoxin-stimulated innate immunity: a contributing factor for asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **108**(2),157–66.
- Roan, F., Obata-Ninomiya, K., ve Ziegler, S.F. (2019). Epithelial cell-derived cytokines: more than just signaling the alarm. *The Journal of Clinical Investigation*. **129**(4),1441-1451.
- Robichaud, A., Fereydoonzad, L. ve Schuessler, T.F. (2015). Delivered dose estimate to standardize airway hyperresponsiveness assessment in mice. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, **308**(8), L837–L846.
- Roche, W.R., Beasley, R., Williams, J.H. ve Holgate, S.T. (1989). Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet (London,England)*, **1**(8637),520–524.
- Rodríguez-Calvo, R., Girona, J., Alegret, J.M., Bosquet, A., Ibarretxe, D. ve Masana, L. (2017). Role of the fatty acid-binding protein 4 in heart failure and cardiovascular disease. *The Journal of Endocrinology*, **233**(3), R173-R184

Rolph, M.S., Young, T.R., Shum, B.O., Gorgun, C.Z., Schmitz- Peiffer, C., Ramshaw, I.A., ve ark. (2006). Regulation of dendritic cell function and T cell priming by the fatty acid-binding protein AP2. *Journal of Immunology (Baltimore,Md.:1950)*, **177**(11), 7794-7801

Rosenstreich, D.L., Eggleston, P., Kattan, M., Baker, D., Slavin, R.G., Gergen, P. ve ark. (1997). The role of cockroach allergy and exposure to cockroach allergen in causing morbidity among inner-city children with asthma. *The New England Journal of Medicine*, **336**(19):1356–1363.

Saavedra, P., Girona, J., Bosquet, A., Guaita, S., Canela, N., Aragonès, G. ve ark. (2015). New insights into circulating FABP4: Interaction with cytokeratin 1 on endothelial cell membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1853**(11 Pt A), 2966-2974

Sabroe, I., Lloyd, C.M., Whyte, M.K.B, Dower, S.K., Williams, T.J. ve Pease, J.E., (2002). Chemokines, innate and adaptive immunity, and respiratory disease. *The European and Respiratory Journal*, **19** (2),350–355.

Saglani S, Lloyd CM ve Bush A. (2019) Biology and Assessment of Airway Inflammation. İçinde Wilmott RB, Deterding R, Li A, Ratjen F, Sly R, Zar HJ, Bush A, (Ed.). (9th ed) *Kendig's Disorders of The Respiratory Tract in Children*. Philadelphia:Elsevier; 101-119

Saglani S ve Lloyd CM. (2019) The Immunopathogenesis of Asthma. İçinde Wilmott RB, Deterding R, Li A, Ratjen F, Sly R, Zar HJ, Bush A, (Ed.). (9th ed.) *Kendig's Disorders of The Respiratory Tract in Children*. Philadelphia:Elsevier; 665-676

Saksi, J., Ijäs,P., Mäyränpää, M.I., Nuotio, K., Isoviita, P.M., Tuimala, J. ve ark. (2014). Low-expression variant of fatty acid-binding protein 4 favors reduced manifestations of atherosclerotic disease and increased plaque stability. *Circulation. Cardiovascular Genetics*, **7**(5), 588–598.

Salpeter, S.R., Buckley, N.S., Ormiston, T.M., ve Salpeter, E.E. (2006). Meta-analysis: effect of long-acting beta- agonists on severe asthma exacerbations and asthma-related deaths. *Annals of Internal Medicine*. **144**(12),904–12.

Sakula, A. (1985). Henry Hyde Salter (1823–71): a biographical sketch. *Thorax*, **40**(12), 887–88.

- Scheja, L., Makowski, L., Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., Shimshek, D.R., Meyers, D.S. ve ark. (1999). Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2-/- mice. *Diabetes*, **48**(10), 1987-1994
- Schlottmann, I., Ehrhart-Bornstein, M., Wabitsch, M., Bornstein, S.R. Lamounier-Zepter, V. (2014). Calcium-dependent release of adipocyte fatty acid binding protein from human adipocytes. *International Journal of Obesity*. **38**(9), 1221–1227.
- Schroeder, F., Petrescu, A.D., Huang, H., Atshaves, B.P., McIntosh, A.L., Martin, G.G. ve ark. (2008). Role of fatty acid binding proteins and long chain fatty acids in modulating nuclear receptors and gene transcription. *Lipids*. **43**,1–17.
- Schroder, K. ve Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell*, **140**(6),821–32.
- Schuessler, T.F., ve Bates, J.H. (1995). A computer-controlled research ventilator for small animals: design and evaluation. *IEEE Transactions on Bio-medical Engineering*. **42**(9), 860–866.
- Schuijs, M.J., Willart, M.A., Hammad, H., ve Lambrecht, B.N. (2013). Cytokine targets in airway inflammation. *Current Opinion in Pharmacology*. **13**(3):351-61.
- Schuijs,M.J., Willart, M.A., Vergote, K., Gras, D., Deswarte, K., Ege, M.J. ve ark. (2015). Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science (New York,N.Y.)* **349**(6252),1106-1110
- Scifres, C.M., Chen, B., Nelson, D.M. ve Sadovsky, Y. (2011). Fatty acid binding protein 4 regulates intracellular lipid accumulation in human trophoblasts. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **96**(7),E1083–91.
- Scifres, C. M., Catov, J. M. ve Simhan, H. (2012). Maternal serum fatty acid binding protein 4 (FABP4) and the development of pre-eclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **97**(3), E349–E356.
- Scott, G.D. ve Fryer, A.D. (2012). Role of parasympathetic nerves and muscarinic receptors in allergy and asthma. *Chemical Immunology and Allergy* ,**98**, 48–69.
- Scott, J.P. ve Peters-Golden, M. (2013). Antileukotriene agents for the treatment of lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **188**(5),538-44.

- Shen, W.J., Sridhar, K., Bernlohr, D.A., ve Kraemer, F.B. (1999). Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipid-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **96**(10),5528–5532.
- Shen, Z.J. ve Malter, J.S. (2015) Determinants of eosinophil survival and apoptotic cell death. *Apoptosis*. **20**(2),224–234.
- Shifren, A., Witt, C., Christie, C., ve Castro, M.(2012) Mechanisms of remodeling in asthmatic airways. *Journal of Allergy (Cairo)*. **2012**:316049.
- Shrestha, S., Sunaga, H., Hanaoka, H., Yamaguchi, A., Kuwahara, S., Umbarawan, Y., ve ark. (2018). Circulating FABP4 is eliminated by the kidney via glomerular filtration followed by megalin-mediated reabsorption. *Scientific Reports*, **8**(1): 16451.
- Shum, B.O.V. (2006). Regulation of Allergic Asthma by Fatty Acid-Binding Proteins. Doktora Tezi, The University of New South Wales, Sydney, Avustralya
- Shum, B.O.V., Mackay, C.R., Gorgun, C.Z., Frost, M.J., Kumar, R.K., Hotamisligil, G.S. ve ark. (2006). The adipocyte fatty acid-binding protein aP2 is required in allergic airway inflammation. *The Journal Clinical Investigation*.**116**(8),2183-2192.
- Setsuta, K., Seino, Y., Ogawa, T., Arao, M., Miyatake, Y., ve Takano, T. (2002). Use of cytosolic and myofibril markers in the detection of ongoing myocardial damage in patients with chronic heart failure. *The American Journal of Medicine*, **113**(9),717–722.
- Siddiqui, S., Mistry, V., Doe, C., Roach, K., Morgan, A., Wardlaw, A., ve ark. (2008). Airway hyperresponsiveness is dissociated from airway wall structural remodeling. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **122**(2),335–341. 341.e1–3.
- Sigurs, N., Gustafsson, P.M., Bjarnason, R., Lundberg, F., Schmidt, S., Sigurbergsson, F. ve ark. (2005). Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **171**(2),137-41.
- Sims, J.E. ve Smith, D.E. (2010). The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature Reviews, Immunology*. **10**(2):89-102.

Simpson, M.A., LiCata, V.J., Ribarik Coe, N., ve Bernlohr, D.A. (1999). Biochemical and biophysical analysis of the intracellular lipid binding proteins of adipocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 192,33–40.

Simpson, J.L., Scott, R., Boyle, M.J. ve Gibson, P.G. (2006). Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology (Carlton,Vic.)* **11**(1), 54–61.

Simpson, J.L., Grissell, T.V., Douwes, J., Scott, R.J., Boyle, M.J. ve Gibson, P.G. (2007). Innate immune activation in neutrophilic asthma and bronchiectasis. *Thorax*. **62**(3),211-218.

Simpson, J.L., Phipps, S., Baines, K.J., Oreo, K.M, Gunawardhana, L. ve Gibson, P.G. (2014). Elevated expression of the NLRP3 inflammasome in neutrophilic asthma. *The European Respiratory Journal*, **43**(4),1067–1076.

Smith, S.G., Chen, R., Kjarsgaard, M., Huang, C., Oliveria, J.P., O’Byrne, P.M., ve ark. (2016). Increased numbers of activated group 2 innate lymphoid cells in the airways of patients with severe asthma and persistent airway eosinophilia. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **137**(1), 75-86.

Siroux, V., Basagaña, X., Boudier, A., Pin, I., Garcia-Aymerich, J., Vesin, A. ve ark. (2011). Identifying adult asthma phenotypes using a clustering approach. *The European Respiratory Journal*, **38**(2), 310–317.

Slats, A.M., Janssen, K., van Schadewijk, A., van der Plas, D.T., Schot, R., van den Aardweg, J.G., ve ark. (2008). Expression of smooth muscle and extracellular matrix proteins in relation to airway function in asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **121**(5), 1196–1202.

Soehnlein, O., Weber,C. ve Lindbom,L. (2009). Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends in Immunology*, **30**(11):538–46.

Song, J., Ren, P., Zhang, L., Wang, X.L., Chen, L., ve Shen, Y.H. (2010). Metformin reduces lipid accumulation in macrophages by inhibiting FOXO1-mediated transcription of fatty acid-binding protein 4. *Biochemical Biophysical Research Communications*, **393**(1), 89-94

Sousa, A.R., Lane, S.J., Nakhosteen, J.A., Yoshimura, T., Lee, T.H., ve Poston, R.N. (1994). Increased expression of the monocyte chemoattractant protein-1 in bronchial tissue from asthmatic subjects. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. **10**(2),142–147.

Spiegelman, B.M. ve Green, H. (1980). Control of specific protein biosynthesis during the adipose conversion of 3T3 cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **255**(18),8811–8818.

Spiegelman, B.M., Frank, M. ve Green, H. (1983). Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development. *The Journal of Biological Chemistry*, **258**(16),10083–10089.

Spits, H. ve Di Santo, J.P. (2011). The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nature Immunology*, **12**(1), 21-27.

Spitsberg, V.L., Matitashvili, E. ve Gorewit, R.C. (1995). Association and coexpression of fatty-acid-binding protein and glycoprotein CD36 in the bovine mammary gland. *European Journal of Biochemistry*. **230**(3),872– 878.

Sporik, R., Holgate, S.T., Platts-Mills, T.A. ve Cogswell, J.J. (1990). Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. A prospective study. *The New England Journal of Medicine*, **323** (8):502–507.

Stănescu, D., Sanna, A., Veriter, C., Kostianev, S., Calcagni, P. G., Fabbri, L. M., ve ark. (1996). Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax*, **51**(3), 267–271.

Stelmach, I., Jerzynska, J., Stelmach, W., Majak, P., Chew, G., Gorski, P. ve ark. (2002). Cockroach Allergy and Exposure to Cockroach allergen in Polish Children with Asthma. *Allergy*, **57**(8),701-705

Strachan, D.P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ (Clinical research ed.)*. **299** (6710), 1259–60.

- Strachan, D.P. (2000). Family size, infection and atopy: the first decade of the “hygiene hypothesis”. *Thorax*. **55**(Suppl 1):S2–10.
- Subbarao, P., Mandhane, P.J. ve Sears, M.R. (2009). Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ*. **181**(9),E181-90.
- Sumi, Y. ve Hamid, Q. (2007). Airway remodeling in asthma. *Allergology International: official journal of the Japanese Society of Allergology*, **56**(4):341-348.
- Sundaram, K., Mitra, S., Gavrilin, M.A., ve Wewers, M.D. (2015). House Dust Mite Allergens and the Induction of Monocyte Interleukin 1 β Production That Triggers an I κ B ζ -Dependent Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor Release from Human Lung Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. **53**(3):400-11.
- Suzukawa, M., Morita, H., Nambu, A., Arae, K., Shimura, E., Shibui, A., ve ark. (2012). Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma. *Journal of Immunology(Baltimore,Md.:1950)*. **189**(7):3641-52.
- Svenningsen, S. ve Nair, P. (2017). Asthma endotypes and an overview of targeted therapy for asthma. *Frontiers in Medicine (Lausanne)*, **4**:158.
- Szczeklik, A., Nizankowska, E., ve Duplaga, M. (2000). Natural history of aspirin-induced asthma. AIANE Investigators. European Network on Aspirin-Induced Asthma. *The European Respiratory Journal*, **16**(3),432-436.
- Tan, N.S., Shaw, N.S., Vinckenbosch, N., Liu, P., Yasmin, R., Desvergne, B., ve ark. (2002) Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator- activated receptors in regulating transcription. *Molecular and Cellular Biology*, **22**(14),5114–5127.
- Tanaka, T., Hirota, Y., Sohmiya, K., Nishimura, S., ve Kawamura, K. (1991). Serum and urinary human heart fatty acid-binding protein in acute myocardial infarction. *Clinical Biochemistry*, **24**(2),195–201.

Tanaka, H., Yamada, G., Saikai, T., Hashimoto, M., Tanaka, S., Suzuki, K., ve ark. (2003). Increased airway vascularity in newly diagnosed asthma using a high-magnification bronchovideoscope. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **168**(12),1495–1499.

Tarlo, S.M. ve Lemiere, C. (2014). Occupational asthma. *The New England Journal of Medicine*. **370**(7):640-9.

The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. (1998) Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *The Lancet*, **351**(9111), 1225–1232.

Theron, A.J., Steel, H.C., Tintinger, G.R., Gravett, C.M., Anderson, R., ve Feldman, C. (2014). Cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonists as modulators of innate immune cell function. *Journal of Immunology Research*. **2014**:608930.

Thompson, B.R., Mazurkiewicz-Muñoz, A.M., Suttles, J., Carter-Su, C., ve Bernlohr, D.A. (2009). Interaction of adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP) and JAK2: AFABP/ aP2 as a regulator of JAK2 signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**(20),13473–80.

Thomsen, S.F., van der Sluis, S., Kyvik, K.O., Skytthe, A. ve Backer, V. (2010). Estimates of asthma heritability in a large twin sample. *Clinical and Experimental Allergy:journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, **40**(7), 1054-61.

Thomsen, S.F. (2015). Genetics of asthma: an introduction for the clinician. *European Clinical Respiratory Journal*. 2, 10.3402/ecrj.v2.24643.

Thomas, P.S., Yates, D.H. ve Barnes, P.J. (1995). Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **152** (1),76–80.

Thorley, A.J., Ford, P.A., Giembycz, M.A., Goldstraw, P., Young, A.,ve Tetley, T.D.(2007). Differential regulation of cytokine release and leukocyte migration by lipopolysaccharide-stimulated primary human lung alveolar type II epithelial cells and macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore,Md. :1950)*. **178**(1),463-73.

Tintinger, G.R., Feldman, C., Theron, A.J., ve Anderson, R. (2010) Montelukast: more than a cysteinyl leukotriene receptor antagonist? *TheScientificWorldJournal*. 10,2403-13.

Tirosh, A., Calay, E. S. , Tuncman, G., Claiborn, K. C. , Inouye, K. E. Eguchi, K. ve ark. (2019). The short-chain fatty acid propionate increases glucagon and FABP4 production, impairing insulin action in mice and humans. *Science Translational Medicine*. **11**(489), eaav0120

Tliba, O. ve Panettieri, R.A. Jr. (2019). Paucigranulocytic asthma: Uncoupling of airway obstruction from inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **143**(4):1287-1294.

To, T., Stanojevic, S., Moores, G., Gershon, A.S., Bateman, E.D., Cruz, A.A, ve ark. (2012). Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health*. **12**, 204

Torrent, M., Sunyer, J., Garcia, R., Harris, J., Iturriaga, M.V., Puig, C., ve ark. (2007). Early-life allergen exposure and atopy, asthma, and wheeze up to 6 years of age. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **176**(5), 446–453.

Toskala, E. ve Kennedy, D.W. (2015). Asthma risk factors. International Forum of. *Allergy Rhinology*. 5 Suppl 1(Suppl 1), S11–S16.

Tourangeau, L.M., Kavanaugh, A., ve Wasserman, S.I. (2011). The role of monoclonal antibodies in the treatment of severe asthma. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, **5**(3), 183-194.

Tovey, E.R., Almqvist, C., Li, Q., Crisafulli, D. ve Marks, G.B. (2008). Nonlinear relationship of mite allergen exposure to mite sensitization and asthma in a birth cohort. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **122**(1), 114–118. e1185 .

Tso, A.W., Xu, A., Sham, P.C., Wat, N.M., Wang, Y., Fong, C.H. ve ark. (2007). Serum adipocyte fatty acid binding protein as a new biomarker predicting the development of type 2 diabetes: a 10-year prospective study in a Chinese cohort. *Diabetes Care*, **30**(10), 2667–72.

- Tu, W.J., Zeng, X.W., Deng, A., Zhao, S.J., Luo, D.Z., Ma, G.Z. ve ark. (2017). Circulating FABP4 (fatty acid-binding protein 4) is a novel prognostic biomarker in patients with acute ischemic stroke. *Stroke*. **48**(6), 1531–1538.
- Tuncman, G., Erbay, E., Hom, X., De Vivo, I., Campos, H., Rimm, E.B. ve ark. (2006). A genetic variant at the fatty acid-binding protein aP2 locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(18), 6970–6975.
- Türk Toraks Derneği (2016), Astım Tanı ve Tedavi Rehberi, *Turkish Thoracic Journal*, **17** (Suppl. 1 October 2016).
- Uysal, K.T., Scheja, L., Wiesbrock, S.M., Bonner-Weir, S., ve Hotamisligil, G.S. (2000). Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology*. **141**(9), 3388–3396.
- Ulrik, C.S. ve Backer, V. (1999). Markers of impaired growth of pulmonary function in children and adolescents. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **160**(1), 40–44.
- van Tilburg Bernardes, E. ve Arrieta, M.C. (2017). Hygiene Hypothesis in Asthma Development : Is Hygiene to Blame?. *Archives of medical research*, **48**(8), 717-726
- Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). (1996). *The European Respiratory Journal*, **9**(4), 687–95.
- Villeneuve, J., Bassaganyas, L., Lepreux, S., Chiritoiu, M., Costet, P., Ripoche, J., ve ark. (2018). Unconventional secretion of FABP4 by endosomes and secretory lysosomes. *The Journal of Cell Biology*, **217**(2), 649–665.
- Vink, N.M., Postma, D.S., Schouten, J.P., Rosmalen, J.G. ve Boezen, H.M. (2010). Gender differences in asthma development and remission during transition through puberty: the TRacking Adolescents' Individual Lives Survey (TRAILS) study. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **126**(3), 498–504. e5046.
- Visse, R. ve Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry, *Circulation Research*, **92**(8), 827–839.

- Walford, H.H. ve Doherty, T.A. (2014). Diagnosis and management of eosinophilic asthma: a US perspective. *Journal of Asthma and Allergy*. 7, 53–65.
- Waller, D.G. ve Sampson, A.P. (2018). *Medical Pharmacology ve Therapeutics* (5th edition). Elsevier.
- Wang, X., Shannahan, J.H. ve Brown, J.M. (2014). IL-33 Modulates Chronic Airway Resistance Changes Induced by Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Inhalation Toxicology*, **26**(4), 240–249.
- Wang, A., Wang, Z., Cao, Y., Cheng, S., Chen, H., Bunjhoo, H., ve ark. (2015). CCL2/CCR2-dependent recruitment of Th17 cells but not Tc17 cells to the lung in a murine asthma model. *International Archives of Allergy and Immunology*. **166**(1), 52–62.
- Ward, C., Pais, M., Bish, R., Reid, D., Feltis, B., Johns, D., ve ark. (2002). Airway inflammation, basement membrane thickening and bronchial hyperresponsiveness in asthma. *Thorax*. **57**(4), 309–316.
- Wei-xu, H., Qin, X., Zhu, W., Yuan-yi, C., Li-feng, Z., Zhi-yong, L., ve ark. (2014). Therapeutic potential of anti-IL-1 β IgY in guinea pigs with allergic asthma induced by ovalbumin. *Molecular Immunology*. **58**(1), 139–49.
- Weiland, S.K., Björkstén, B., Brunekreef, B., Cookson, W.O., von Mutius, E., Strachan, D.P., ve ark. (2004). Phase II of the international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC II): rationale and methods. *The European Respiratory Journal*, **24**(3), 406–12.
- Weinberger, S.E., Cockrill, B.A. ve Mandel, J. (2014), *Principles of Pulmonary Medicine* (6th ed.) Elsevier, Saunders.
- Weng, Y.H., Chen, W.Y., Lin, Y.L., Wang, J.Y., ve Chang, M.S. (2019) Blocking IL-19 Signaling Ameliorates Allergen-Induced Airway Inflammation, *Frontiers in Immunology*. 10, 968.
- Wenzel, S.E., Szefler, S.J., Leung, D.Y., Sloan, S.I., Rex, M.D., ve Martin, R.J. (1997). Bronchoscopic evaluation of severe asthma: persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **156**(3 Pt 1), 737–743.

- Wenzel, S.E., Schwartz, L.B., Langmack, E.L., Halliday, J.L., Trudeau, J.B., Gibbs, R.L. ve ark. (1999) Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, **160**(3),1001–1008
- Wenzel, S.E. (2006). Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet*. **368**(9537), 804 – 813.
- Wenzel, S.E. (2012). Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nature Medicine*, **18**(5),716-25.
- Wenzel, S.E. (2013). Complex phenotypes in asthma: current definitions. *Pulmonary Pharmacology& Therapeutics.*, **26**(6),710-5.
- Willart, M.A., Deswarte, K., Pouliot, P., Braun, H., Beyaert, R., Lambrecht, B.N. ve ark. (2012). Interleukin-1 α controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. *The Journal of Experimental Medicine*, **209**(8), 1505-1517
- Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T.Y., Karp, C.L., ve ark. (1998). Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science(New York, N.Y.)*. **282**(5397),2258-61.
- Wong, C.K., Li, M.L., Wang, C.B., Ip, W.K., Tian, Y.P., ve Lam, C.W. (2006). House dust mite allergen Der p 1 elevates the release of inflammatory cytokines and expression of adhesion molecules in co-culture of human eosinophils and bronchial epithelial cells. *International Immunology*. **18**(8),1327-35.
- Woodford, J.K., Jefferson, J.R., Wood, W.G., Hubbell, T., ve Schroeder, F. (1993). Expression of liver fatty acid binding protein alters plasma membrane lipid composition and structure in transfected L-cell fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1145**(2),257–265.
- Wu, W., Bleecker, E., Moore, W., Busse, W.W., Castro, M., Chung, K.F., ve ark. (2014). Unsupervised phenotyping of Severe Asthma Research Program participants using expanded lung data. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **133**(5), 1280–1288.

- Wynn, T.A. (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of Clinical Investigation*. **117**(3),524–9.
- Xu, A., Wang, Y., Xu, J.Y., Stejskal, D., Tam, S., Zhang, J. ve ark. (2006). Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clinical Chemistry*, **52**(3),405–13.
- Xu, A., Tso, A.W., Cheung, B.M., Wang, Y., Wat, N.M., Fong, C.H. ve ark. (2007). Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation*. **115**(12),1537–43.
- Yan, K., Salome, C. ve Woolcock, A.J. (1983). Rapid method for measurement of bronchial responsiveness. *Thorax*, **38**(10),760–765.
- Yan, F., Shen, N., Pang, J.X., Zhang, Y.W., Rao, E.Y., Bode, A.M., ve ark. (2017). Fatty acid- binding protein FABP4 mechanistically links obesity with aggressive AML by enhancing aberrant DNA methylation in AML cells. *Leukemia*. **31**(6), 1434–1442.
- Yasuda, Y., Nagano, T., Kobayashi, K. ve Nishimura, Y. (2020). Group 2 Innate Lymphoid Cells and the House Dust Mite-Induced Asthma Mouse Model. *Cells*, **9**(5), 1178.
- Yeung, D.C., Xu, A., Cheung, C.W., Wat, N.M., Yau, M.H., Fong, C.H., ve ark. (2007). Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels were independently associated with carotid atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, **27**(8), 1796-1802
- Yi, L., Cheng, D., Zhang, K., Huo, X., Mo, Y., Shi, H., ve ark. (2017). Intelectin contributes to allergen-induced IL-25, IL-33 and TSLP expression and type 2 response in asthma and atopic dermatitis. *Mucosal Immunology*. **10**(6), 1491–1503.
- Yick, C.Y., Ferreira, D.S., Annoni, R., von der Thusen, J.H., Kunst, P.W., Bel, E.H., ve ark. (2012). Extracellular matrix in airway smooth muscle is associated with dynamics of airway function in asthma. *Allergy*. **67**(4),552–559.
- Ying, S., O'Connor, B., Ratoff, J., Meng, Q., Mallett, K., Cousins, D., ve ark. (2005). Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. :1950)*. **174**(12),8183-90.

Yu, S., Levi, L., Siegel, R., ve Noy, N. (2012). Retinoic acid induces neurogenesis by activating both retinoic acid receptors (RARs) and peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ). *The Journal of Biological Chemistry*, **287**(50),42195–42205.

Yu, S., Levi, L., Casadesus, G., Kunos, G., ve Noy, N. (2014) Fatty acid-binding protein 5 (FABP5) regulates cognitive function both by decreasing anandamide levels and by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ) in the brain. *The Journal of Biological Chemistry*. **289**(18),12748–12758.

Yu, S., Kim, H.Y., Chan, Y.J., DeKruyff, R.H. ve Umetsu, D.T. (2014). Innate lymphoid cells and asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **133**(4),943-50; quiz 51.

Zanotti, G. (1999). Muscle fatty acid-binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta*,**1441**(2-3),94–105.

Zein, J.G. ve Erzurum, S.C. (2015). Asthma is different in women. *Current Allergy and Asthma Reports*, **15**(6),28.

Zhang, M., Zhu,W. ve Li, Y. (2014). Small molecule inhibitors of human adipocyte fatty acid binding protein (FABP4). *Medicinal Chemistry (Sharjah (United Arab Emirates))* **10**(4), 339–347.

Zhang, X. Z., Tu, W. J., Wang,H., Zhao,Q., Liu,Q., Sun, L. ve ark. (2018). Circulating serum fatty acid-binding protein 4 levels predict the development of diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients. *American Journal of Ophthalmology*,. 187, 71–79.

Zhu, T., Chen, Z., Chen, G., Wang, D., Tang, S., Deng, H., ve ark. (2019). Curcumin Attenuates Asthmatic Airway Inflammation and Mucus Hypersecretion Involving a PPAR γ -Dependent NF- κ B Signaling Pathway In Vivo and In Vitro. *Mediators of Inflammation*. **2019**:4927430.

Zimmer, J.S., Dyckes, D.F., Bernlohr, D.A., ve Murphy, R.C. (2004). Fatty acid binding proteins stabilize leukotriene A4: competition with arachidonic acid but not other lipoxy- genase products. *Journal of Lipid Research*, **45**(11),2138–44.

Zhao, W., Rasheed, A., Tikkanen, E., Lee, J.J., Butterworth, A.S., Howson, J.M.M. ve ark. (2017). Identification of new susceptibility loci for type 2 diabetes and shared etiological pathways with coronary heart disease. *Nature Genetics*, **49**(10), 1450–1457.



HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI



Karen Inouye, PhD
Director, Sabri Ülker Physiology Core
Laboratory of Dr. Gökhan Hotamışlıgil
Sabri Ülker Center, Department of Molecular Metabolism
Harvard T.H. Chan School of Public Health
Boston, MA, USA

September 2, 2020

To whom it may concern,

I am writing to inform you that the animal studies performed by Nurdan Dagtekin for her PhD thesis work in the laboratory of Dr. Gökhan Hotamışlıgil titled, 'The Role of aP2 On Airway Hyperresponsiveness and The Formation of Inflammatory Response in Asthma Pathogenesis' were performed under Dr. Hotamışlıgil's approved animal protocol, ISO-00000800, "Lipids, Inflammation, and Insulin Action". This protocol was approved by the Harvard Medical Area Standing Committee on Animals for the period of July 26, 2016 to July 26, 2019, and renewed for July 26, 2019 to July 26, 2022.

Sincerely,

Karen Inouye, PhD
Director, Sabri Ülker Physiology Core



PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI**ASTIM PATOGENEZİNDE HAVA YOLU HİPERREAKTİVİTESİ
VE İNFLAMATUVAR YANIT OLUŞUMUNDA aP2'NİN ROLÜ****ORIJINALLIK RAPORU**

%3	%3	%0	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Nurdan	Soyadı	DAĞTEKİN
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	07.10.1991
Email	nurdandagtekin@hotmail.com	Uyruğu	T.C

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üni. Eczacılık Fak.Farmakoloji ABD	
Lisans	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2014
Lise	Kabataş Erkek Lisesi	2009

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Staj		Abdi İbrahim İlaç firması	-
2. Staj		Zentiva Sanofi-Aventis Group Company	-
3. Staj		Egemen Eczanesi	-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	YDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	çok iyi	çok iyi	çok iyi	71,25	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	85,29		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

Tebliğleri

Dağtekin, N., Civelek, E., Kaleli Durman, D., Teskin, Ö., İyigün, T., Uydeş Doğan, B.S. The assessment of the relaxant effect of S-nitrosoglutathione on isolated human saphenous vein. 7.Avrupa Farmakoloji Kongresi, EPHAR, 26-30 Haziran 2016, İstanbul ,Türkiye (poster bildirisi)

Dağtekin, N., Civelek, E., Kaleli Durman, D., Teskin, Ö., Uydeş Doğan, B.S. S-Nitrozoglutasyon'un İnsan Safen Veni Üzerindeki Gevşetici Etkisi. 23.Ulusal Farmakoloji Kongresi, 7-10 Eylül 2015, Ankara, Türkiye. (poster bildirisi)

Sertifikaları

İ.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası
Certificates, AALAS Learning Library

Burslar/Ödülleri

TÜBİTAK 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Program Bursiyeri
TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu Program Bursiyeri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Müzik dinlemek, tiyatroya gitmek, kitap okumak



