

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

KRONİK ASTİM MODELİ OLUŞTURULAN
FARELERDE BOSENTANIN AKCİĞER HİSTOPATOLOJİSİ
ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. ALPER DİVARCI

DANIŞMAN
PROF. DR. DOLUNAY GÜRSES

DENİZLİ – 2017

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

KRONİK ASTİM MODELİ OLUŞTURULAN
FARELERDE BOSENTANIN AKCİĞER HİSTOPATOLOJİSİ
ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. ALPER DİVARCI


DANIŞMAN
PROF. DR. DOLUNAY GÜRSES

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 23/03/2016 tarih ve 03 sayılı komisyon toplantısında alınan 2016TIPF011 nolu kararı ile desteklenmiştir.


DENİZLİ - 2017

Prof. Dr. Dolunay GÜRSES danışmanlığında Dr. Alper DİVARCI tarafından yapılan “Kronik Astım Modeli Oluşturulan Farelerde Bosentanın Akciğer Histopatolojisi Üzerine Etkisi” başlıklı tez çalışması 09.09.2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.


BAŞKAN


Prof. Dr. Dolunay GÜRSES

ÜYE


Prof. Dr. Ruhi ÖZYÜREK

ÜYE


Yrd. Doç. Dr. Halil KOCAMAZ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. gün.../ay.../yl...

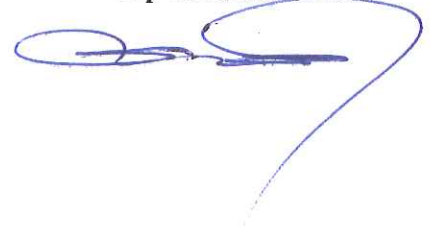
Doç. Dr. Şahika Pınar AKYER

Dekan a.

Prof. Dr.
Dekan Yardımcısı.....

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı



TEŞEKKÜR

Eğitim hayatım boyunca en zor günlerimde dahi benden desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen ve etrafımda adeta koruyucu bir güven kalkanı hissettiren en kıymetlilerim aileme,

Bana uzmanlık eğitimim süresince bir doktor, bir sanatkar ve yeri geldiğinde anlatarak yeri geldiğinde yol göstererek bilgilerimi işleyip insanlara hızlı ve faydalı bir şekilde nasıl sunacağımı öğreten; ayrıca bir çocuk doktoru olarak toplumun ışığını teslim ettiği yeni nesile layık bu mesleğin atıl bir misyoneri olmayı öğreten ve bu süreçte hoşgörü ve yardımlarını benden esirgemeyen değerleri anabilim dalı başkanım ve tez danışmanın Prof. Dr. Dolunay GÜRSES' e ve değerli hocalarıma,

Meslektaş ve arkadaş olarak uzmanlık eğitimim ve tez sürecinde benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, uzman olduktan sonra dahi desteklerini bana hissettiren Dr. Gülay Sönmez ve Dr. Emine Özdemir'e,

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

Saygı, sevgi ve teşekkürlerimle...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
KISALTMALAR	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ	X
RESİMLER DİZİNİ	XI
ÖZET	XII
İNGİLİZCE ÖZET	XIV
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
Astım Tanımı ve Sıklığı	2
Astım gelişimini etkileyen faktörler	2
Konağa ait risk faktörleri.....	3
Çevresel faktörler.....	5
Astımın Patogenezi.....	10
Astımda rol oynayan enflamatuar hücreler.....	11
Hava yollarının yapısal hücresel elemanları.....	14
Astımda rol oynayan mediatörler.....	16
Havayollarının yeniden yapılanması.....	19
Havayolu aşırı duyarlılığı.....	23
Astımda hava yolundaki daralmaya neden olan faktörler.....	23
Astım Tanısı.....	24
Astım Tedavisi.....	27
Astım tedavisinde kullanılan ilaçlar ve özellikleri.....	27
Bosentan.....	30
Bosentanın yapısı.....	30
Bosentanın özellikleri.....	31
Bosentanın ve antiinflamatuar etkileri.....	31

Bosentanın ve antiproliferatif etkileri.....	32
Bosentanın ve diğer etkileri.....	33
Farmakokinetik özellikleri.....	34
GEREÇ VE YÖNTEM	35
Deney hayvanları.....	35
Çalışma grupları.....	35
Kronik astım modelinin oluşturulması.....	36
Çalışma ilaçlarının verilmesi.....	36
Hayvan yaşamını sonlandırma zamanı ve yöntemi.....	37
Histolojik incelemeler.....	37
Işık mikroskopik doku takip protokolü.....	37
Hematoksilen-eozin boyama metodu.....	38
Periodik asid-schiff boyaması (PAS).....	39
Toluidin blue boyası.....	40
Işık mikroskopik değerlendirme.....	40
Akciğer dokusunda IL-4, IL-5 ve TSLP ölçümü	41
İstatistiksel analiz.....	41
BULGULAR	42
TARTIŞMA	56
SONUÇLAR	65
KAYNAKLAR	66

KISALTMALAR

AR	Allerjik rinit
BAL	Bronkoalveolar lavaj
BALB/c	Bagg's Albino
COX	Siklooksijenaz
CYP	Sitokrom
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FDA	Food and Drug Administration
FEV1	Birinci saniyedeki zorlu ekspiratuvar volüm
GGT	Gama glutamil transferaz
GM-CSF	Granulosit makrofaj koloni stimüle edici faktör
HE	Hemotoksilen-eosin
IgE	Immünglobulin E
IL	İnterlökin
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LT	Lökotrien
MCP	Monosit kemotaktik faktör
MDC	Makrofaj kaynaklı kemokin
MMP-9	Matriks metalloproteinaz-9
MTX	Metotreksat
NF-KB	Nükleer faktör kapa
NO	Nitrik oksit
OVA	Ovalbumin
PAS	Periodik asit schiff
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PEF	Tepe ekspiratuvar akım
PG	Prostoglandin

TSLP	Timik Stromal Lenfopoietin
Th-1	T helper tip 1
Th-2	T helper tip 2
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü - beta
TNF-α	Tümör nekrozis faktör – alfa
TxA2	Tromboksan A2
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa No
Şekil 1	Astım gelişiminde risk faktörleri	3
Şekil 2	Havayollarının yapısal değişiklikleri ve yeniden yapılanma	14
Şekil 3	Kronik astım modeli oluşturma protokolü	26
Şekil 4	Gruplar arasındaki serum IL-4 düzeyleri	40
Şekil 5	Gruplar arasındaki serum IL-5 düzeyleri	41
Şekil 6	Gruplar arasındaki serum TSLP düzeyleri	41
Şekil 7	Gruplar arasında akciğer dokusundaki IL-4 düzeyleri	43
Şekil 8	Gruplar arasında akciğer dokusundaki IL-5 düzeyleri	43
Şekil 9	Gruplar arasında akciğer dokusundaki TSLP düzeyleri	44

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1 Besinler ile astım ilişkisi	7
Tablo 2 Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü	28
Tablo 3 Hematoksilen-Eozin boyama metodu	29
Tablo 4 PAS boyama metodu	30
Tablo 5 Tüm gruplarda histolojik verilerin karşılaştırılması	32
Tablo 6 Kontrol grubu ile plasebo grubunun histolojik verilerinin karşılaştırılması	33
Tablo 7 Plasebo grubu ile bosentan grubunun histolojik verilerinin karşılaştırılması	33
Tablo 8 Plasebo grubu ile deksametazon grubunun histolojik verilerinin karşılaştırılması	34
Tablo 9 Deksametazon grubu ile bosentan grubunun histolojik verilerinin karşılaştırılması	34
Tablo 10 Gruplar arasındaki serum IL-4, IL-5 ve TSLP düzeyleri	40
Tablo 11 Gruplar arasında akciğer dokusundaki IL-4, IL-5 ve TSLP düzeylerinin karşılaştırılması	42
Tablo 12 Plasebo ve bosentan grupları arasında akciğer dokusundaki IL-5 düzeylerinin karşılaştırılması	42
Tablo 13 Deksametazon ve bosentan grupları arasında akciğer dokusundaki IL-5 düzeylerinin karşılaştırılması	42

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa No
Resim 1	Çalışmada kullanılan BALB/c fareler 25
Resim 2	Sakrifiye edilen BALB/c fareler 27
Resim 3	Kontrol grubuna ait akciğer kesiti (HE boyaması) 35
Resim 4	Kontrol grubuna ait akciğer kesiti (HE boyaması) 35
Resim 5	Kontrol grubuna ait akciğer kesiti (PAS boyaması) 35
Resim 6	Kontrol grubuna ait akciğer kesiti (Toluidin blue boyaması) 36
Resim 7	Plasebo (Astım) grubuna ait akciğer kesiti (HE boyaması) 36
Resim 8	Plasebo (Astım) grubuna ait akciğer kesiti (HE boyaması) 36
Resim 9	Plasebo (Astım) grubuna ait akciğer kesiti (PAS boyaması) 37
Resim 10	Plasebo (Astım) grubuna ait akciğer kesiti (Toluidin blue boyaması) 37
Resim 11	Deksametazon grubuna ait akciğer kesiti (HE boyaması) 37
Resim 12	Deksametazon grubuna ait akciğer kesiti (HE boyaması) 38
Resim 13	Deksametazon grubuna ait akciğer kesiti (PAS boyaması) 38
Resim 14	Deksametazon grubuna ait akciğer kesiti (Toluidin blue boyaması) 38
Resim 15	Bosentan grubuna ait akciğer kesiti (HE boyaması) 39
Resim 16	Bosentan grubuna ait akciğer kesiti (HE boyaması) 39
Resim 17	Bosentan grubuna ait akciğer kesiti (PAS boyaması) 39
Resim 18	Bosentan grubuna ait akciğer kesiti (Toluidin blue boyaması) 40

ÖZET

Amaç: Astım, bronş hipereaktivitesiyle karakterize, bronş sisteminin kronik enflamasyonu sonucu gelişen bronkospazmlarla seyreden kronik bir hastalıktır. Astım tedavisinde, bilinen en güçlü antiinflamatuvar ilaçlar steroidlerdir. Ancak steroidlerin yan etkileri nedeniyle, alternatif tedavilerin araştırılmasının önemi artmaktadır. Çalışmamızın amacı, antiinflamatuvar, antiproliferatif, non-selektif endotelin A ve endotelin B reseptör antagonisti olan bosentanın, kronik astım modeli oluşturulmuş BALB/c farelerde, akciğer histopatolojisi üzerine etkilerinin değerlendirilmesidir.

Gereç ve yöntem: Çalışma toplam 35 adet BALB/c fare üzerinde yapıldı. Fareler; kontrol grubu, plasebo grubu, deksametazon uygulanan grup ve bosentan uygulanan grup olacak şekilde dört gruba ayrıldı. Astım modeli oluşturulması ardından tüm gruplarda serum ve akciğer dokularında IL-4, IL-5 ve Timik Stromal Lenfopietin (TSLP) düzeyleriyle, doku kesitlerinde mast ve goblet hücreleri ile epitel ve düz kas kalınlıkları değerlendirildi.

Bulgular: Serum IL-4, IL-5 ve TSLP düzeylerinde, gruplar arasında farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Akciğer dokularındaki sitokin düzeyleri değerlendirildiğinde ise; IL-5 astım grubunda $5,06\pm 1,38$ pg/ml, bosentan grubunda $3,43\pm 0,55$ pg/ml olarak bulundu ($p<0,05$). Astım oluşturulan plasebo grubunda tüm histolojik parametreler diğer gruplara göre anlamlı olarak artmıştı ($p<0,05$). Bosentan ile tedavi edilen grupta epitel yüksekliğinin astım grubuna göre anlamlı oranda azaldığı ($p<0,05$); bosentan ile deksametazon grupları arasında histolojik parametreler açısından farklılık olmadığı görüldü ($p>0,05$).

Sonuç: Çalışmamızda, bosentanın astımda kronik değişiklikler ve yeniden yapılanma üzerine iyileştirici etkileri olduğu görülmüştür. Bununla beraber deksametazon ile karşılaştırıldığında benzer etkiler göstermesi de, bosentanın astım tedavisinde faydalı olabileceğini desteklemektedir. Ancak bu konuda uzun süreli ve geniş serileri içeren klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Astım, bosentan, BALB/c fare, sitokin, IL-4, IL-5, TSLP

SUMMARY

Aim: Asthma is a chronic disease which is characterized by bronchial hyperactivity and progresses with the bronchospasm following chronic inflammation of the bronchial system. The most powerful anti-inflammatory drugs known to treat asthma are steroids. However, due to the side effects of steroids, the prospect of investigating alternative therapies is increasing. The aim of our study is to evaluate the effects of bosentan, an anti-inflammatory, antiproliferative, non-selective endothelin A and endothelin B receptor antagonist, on lung histopathology in chronic asthma-modeled BALB/c mice.

Materials and Methods: The study was performed on a total of 35 BALB/c mice. The mice were divided into four groups as control group, placebo group, dexamethasone group and bosentan group. IL-4, IL-5 and Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) levels in serum and lung tissues, mast and goblet cells and epithelial and smooth muscle thicknesses in tissue sections were evaluated in all groups after the formation of asthma model.

Results: There was no found statistically difference between the groups for the serum IL-4, IL-5 and TSLP levels ($p>0.05$). IL-5 levels in the lung tissues were found as 5.06 ± 1.38 pg/ml and 3.43 ± 0.55 pg/ml in the asthma and bosentan groups respectively ($p<0.05$).

All histological parameters were significantly higher in the asthma group than the other groups ($p<0.05$). The epithelial height was significantly decreased in the bosentan group compared the asthma group ($p<0.05$). There wasn't any found statistically difference in the bosentan and dexamethasone groups for the histological parameters ($p>0.05$).

Conclusion: In our study, we showed that bosentan have therapeutic effects on chronic changes and remodeling in asthma model. There is similar effects compared to dexamethasone suggests that bosentan may be beneficial in the treatment of asthma. However, long term and extensive clinical trials are warranted.

Key words: Asthma, bosentan, BALB/c mouse, cytokine, IL-4, IL-5, TSLP

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Astım; bronş hipereaktivitesiyle karakterize, bronş sisteminin kronik enflamasyonu sonucu gelişen ve bronkospazmlarla seyreden kronik bir hastalıktır. Polenler ve hayvan epiteli gibi alerjenler, oksidan maddeler ve tekrarlayan akciğer enfeksiyonları bronş hiperreaktivitesine ve enflamasyona sebep olan etkenler arasındadır (1). Enflamatuvar yanıtı bağımlı meydana gelen havayolu obstrüksiyonu, özellikle gece ve sabaha karşı ortaya çıkan, ataklar halinde görülen öksürük, hışıltılı solunum ve göğüste sıkışma hissi gibi semptomlara neden olmaktadır (1, 2).

Astımda enflamatuvar yanıtta; mast hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler, eozinofiller ve T lenfositleri görev alırlar. Enflamasyonda hasarlanan hava yolu epitelinden salgılanan endotelin 1 (ET-1), timik stromal lenfopoyetin (TSLP) ve interlökin 25 (IL-25) gibi sitokinler bu hücrelerin uyarılmasını ve enflamatuvar yanıtın ortaya çıkmasını sağlarlar (3). IL-4, T helper-2 (Th-2) lenfositlerin uyarılmasını; IL-5, eozinofillerin matürasyonunu ve migrasyonunu; TSLP ise dendritik hücre polarizasyonunu sağlar (4, 5). Enflamasyonda rol oynayan ana sitokinler ET-1, TSLP, IL-4, IL-5 ve IL-25'tir. ET-1, enflamasyonun en erken döneminden itibaren saptanabilmektedir (6).

Astım tedavisinde, bilinen en güçlü anti-enflamatuvar ilaçlar steroidlerdir. Ancak steroidlerin uzun süreli kullanımına bağımlı ortaya çıkan sistemik ve lokal yan etkiler düşünüldüğünde, alternatif tedavilerin araştırılmasının önemi artmaktadır (1). Bosentan anti-enflamatuvar, antiproliferatif ve antioksidan etkileri olan non-selektif endotelin A ve endotelin B reseptör blokörüdür. Bu etkisi nedeni ile pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) tedavisinde lisans almıştır (7-10). Astım patogenezinde ET-1'in önemli rol oynaması ve bosentanın da endotelin reseptör blokörü olması nedeni ile astım tedavisinde etkili olabileceği hipotezinden yola çıkılarak çalışmamızda bosentanın astımda etkisi araştırıldı. Literatürde, bosentanın astımda etkisini değerlendiren sadece bir çalışma bulunmaktadır (11). Bu çalışmada az sayıda hasta, solunum fonksiyon testleri ile değerlendirilmiştir. Çalışmamızda kronik astım modeli oluşturulan Bagg Albino (BALB/c) farelerde, bosentanın immünmodülatör etkilerinin ve akciğer histolojisi üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

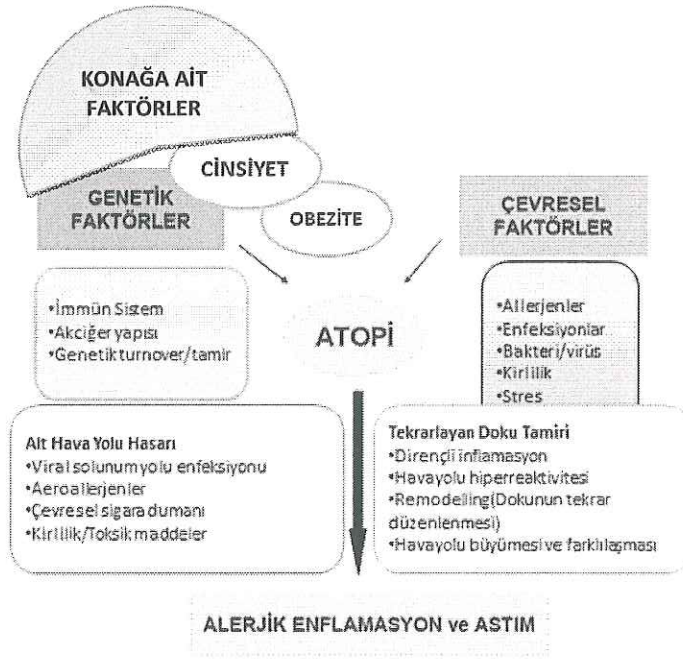
2.1 Astım tanımı ve sıklığı

Astım; bronşial hiperreaktivite ile karakterize, bronş sisteminin kronik enflamasyonu sonucu çeşitli spesifik ve nonspesifik etkenlere bağlı gelişen, spontan veya tedavi ile düzelebilen bronkospazmlarla seyreden kronik bir hastalıktır. Diffüz hava yolu obstrüksiyonu ve buna bağlı nöbetler şeklinde gelen öksürük, nefes darlığı, hışıltılı solunum (wheezing), göğüste sıkışma hissi gibi özellikle gece sabaha karşı ortaya çıkan yakınmalara sebep olmaktadır. Egzersiz, viral enfeksiyon, inhalan allerjenler ve iritanlara maruziyet, hava değişimi, ağlama/gülme gibi faktörlerle kliniğin şiddeti değişebilmektedir (1, 2).

Astım prevalansı, coğrafi bölgeler, ırk, cinsiyet ve çevresel etkenlere göre değişiklik göstermektedir. Sosyoekonomik düzeyin yüksek olduğu ülkelerde astım sıklığının daha fazla olduğu, ekonomik olarak daha zayıf olan ülkelerde ise daha az görüldüğü bildirilmiştir. Uluslararası Çocukluk Çağı Astım ve Allerjik Hastalıklar Çalışması (ISAAC- International study of asthma and allergies in childhood), astım prevalansının %0,8 ile %37,6 arasında değiştiğini göstermiştir (12). Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise, çocukluk çağında astım prevalansının %9,8-17,8 arasında olduğu belirlenmiştir (13).

2.2. Astım gelişimini etkileyen faktörler

Astımın gelişmesini etkileyen ve semptomları tetikleyen faktörler, konağa ait ve çevresel faktörler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (1, 2), (Şekil 1).



Şekil 1. Astım gelişimindeki risk faktörleri

2.2.1 Konağa ait risk faktörleri

a. Genetik: Astıma yatkınlığı olan ailelerin ikiz çocukları ile yapılan çalışmalarda kalıtsal faktörlerin astım gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (14). Üzerinde en çok araştırma yapılan gen polimorfizmi, havayolu aşırı duyarlılık ve kısa-etkili beta agonist yanıtını etkileyen $\beta 2$ -adrenerjik reseptör genidir. Beşinci kromozomun uzun kolunun 31. lokusunda bulunmaktadır (15).

b. Cinsiyet: Astım, çocukluk çağından adolesan döneme kadar erkeklerde, adolesan dönemden itibaren de kızlarda sık görülmektedir. Bu durum doğumda erkeklerde akciğer hacminin daha küçük, erişkin hayatta ise daha büyük olması ile açıklanmaktadır (16). Erken menarşın da kızlarda astım riskini arttırdığı gösterilmiştir (17).

c. Obezite: Obez bireylerde yağ dokusunda, transforming growth faktör- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), interlökin-6 (IL-6), C-reaktif protein ve leptin gibi birçok molekül salgılanır ve bunlar sistemik enflamasyona yatkınlığı artırır. Salınan majör sitokinlerden biri olan TNF- α , bronş epitel hücrelerinde Th-2

tip sitokinler olan IL-4, IL-5, IL-6, IL-1 β yapımını destekleyerek astım riskinin artmasına sebep olmaktadır (18).

Çalışmalar, vücut kitle indeksi (VKİ) artan kişilerde astım riskinin arttığını göstermiştir. Kilo veren astımlı obez bireylerde spirometrik sonuçlarda düzelme, azalmış pik akım değişkenliği, ilaç kullanımında ve astım atağı sıklığında azalma gösterilmiştir (19).

d. Atopi: Üçüncü ulusal sağlık ve beslenme inceleme taraması (NHANES) astım vakalarının yarısının atopi ile ilişkili olabileceğini bildirmiştir (20). Solunum yolu alerjisinden ve atopiden sorumlu antikor olan serum IgE düzeylerinin, hava yolu aşırı duyarlılığı ve astım atağı ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (21).

2.2.2 Çevresel risk faktörleri

a. Allerjenler ile temas: Ev içi allerjenlerinin, çocuklarda tekrarlayan hışıltı ve astım ataklarının gelişmesinde önemli rolü olduğu bildirmiştir (22). Allerjene maruz kalmak astım duyarlılığının gelişmesi için önemli bir risk faktörüdür. Erken çocukluk döneminde allerjenlerle karşılaşmayı değerlendiren prospektif bir çalışmada (23), minimum düzeylerde allerjene maruziyetin de astım gelişimi için risk faktörü olabileceği gösterilmiştir. Duyarlı olunan allerjene kısa süreli maruziyet astım semptomlarına, uzun süreli maruziyet ise semptomların kronikleşmesine yol açmaktadır. Ev tozu akarları, hayvansal allerjenler, hamam böceği, mantarlar ve polenler astım için genel risk faktörleridir. Yıllar içerisinde ortaya çıkan çevresel değişikliklerin ve evlerin daha fazla enerji tasarrufuna uygun olarak yapılmasının allerjenlerle karşılaşmayı artırdığı düşünülmektedir (22). Özellikle şehir merkezlerinde yaşayan çocuklarda hamamböceği ile duyarlanmanın astım gelişiminde önemli bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (24). Kedi, köpek gibi ev içi hayvan allerjenleri ile erken dönemde karşılaşmanın, hem astım gelişimiyle ilişkili, hem de astım gelişiminden koruyucu olduğu bildirilmektedir (25).

b. Enfeksiyonlar: David Strachan tarafından ortaya atılan “Hijyen Hipotezi” ne göre (26), son yüzyılda aile yapısının küçülmesi, ev içi konfordaki iyileşme,

kişisel temizlik standartlarında yükselme ve antibiyotik kullanımının artmasının, çapraz enfeksiyonları azaltırken, atopik hastalıkların yaygınlaşmasına neden olabileceği bildirilmiştir. Erken dönemde özellikle enfeksiyonlar, bağışıklık sisteminin gelişmesinde temel rolü üstlenmektedirler. Hipotezin immünolojik temelinde tip 1 (Th-1) ve tip 2 (Th-2) T helper hücrelerinin rol oynadığı iki ana immünolojik yolak söz konusudur. Erken çocukluk döneminde özellikle hücre içi patojenler, makrofajlardan Th-1 hücrelerin farklılaşmasında rol alan IL-12 üretimine neden olmaktadır. Bu sitokinin üretimi, başarılı bağışıklık yanıtının ilk aşamasında anahtardır. Hipoteze göre; eğer 'IL-12 üretimi, çocukluk çağının ilk sistemik enfeksiyonunun erken evresinde olmazsa, genetik olarak yatkın çocuklarda atopi gelişimine sebep olan Th-2 hücreleri baskın olacaktır (27).

Süt çocukluğu döneminde, respiratuar sinsityal virüs (RSV) ve parainfluenza virüsü gibi bazı virüsler astım fenotipi ile ilişkilendirilmişlerdir. RSV tanısı ile hastaneye yatırılan çocukların uzun süreli izleminde yaklaşık %40'ında hışıltılı solunumun devam ettiği veya geç çocukluk çağında astım tanısı aldıkları gösterilmiştir (28). Diğer taraftan erken çocukluk döneminde geçirilen kızamık gibi bazı viral enfeksiyonların astım gelişimine karşı koruyucu rol oynadığı düşünülmektedir (29). Rhinovirus ilişkili hışıltı atağı geçiren çocuklarda da astım ve allerjik rinit prevalanslarının yüksek olduğu gösterilmiştir (30).

c. Sigara ve hava kirliliği: Çalışmalar, sigara dumanına maruz kalma ve hava yolu aşırı duyarlılığı arasında ilişki olduğunu göstermektedir (31-33). İngiltere'de yapılan 5801 genç erişkin katılımcının değerlendirildiği bir çalışmada (31), sigara içimi ile hışıltılı solunum ve astım gelişimi arasında belirgin bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Yine adolesan çocuklarla yapılan bir çalışmada (32), yılda 300'den fazla sigara içen genç erişkinlerde sigara içmeyen akranlarına göre astım gelişme oranının 3,9 kat arttığı gösterilmiştir. Gelişim çağında pasif içiciliğe maruz kalan çocuklarda astım gelişme riskinin belirgin olarak arttığı da göze çarpmaktadır. Yapılan bir çalışmada (33), ilk bir yaşta sigara dumanına maruz kalan sigara içen annelerin çocuklarında astım gelişme riski, sigara içmeyen annelerin çocuklarından 2,1 kat fazla saptanmıştır.

Gebelikte sigara içimi ile ilgili yapılan araştırmalar değerlendirildiğinde, bebeklerde düşük akciğer kapasitesi ile ilişkili olabileceği gözlenmiştir (34). Avrupada yapılan doğumdan itibaren takip edilmeye başlanan 21.000 çocuğun dahil edildiği bir çalışmada (35), gebelikte sigara içen annelerin çocuklarında 4-6 yaşları arasında hışıltılı solunum riskinin arttığı gözlenmiş; doğum sonrası ilk bir yıl sigara dumanına maruz kalan çocuklarda ise bu riskin artmadığı saptanmıştır. Sigara içen annelere C vitamini desteği verilmesinin de fetal akciğer gelişimini desteklediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (36).

Hava kirliliği ile akciğer hastalıkları ve astım gelişimi arasında ilişki olduğu bilinmektedir ve hava kirliliğinin hastanede yatış süresini ve morbiditeyi arttırdığı saptanmıştır (37). Kuzey Amerika'da yapılan ve astım semptomları gösteren 990 çocuğun değerlendirildiği bir çalışmada (38), klinik korelasyonun nitrik oksit, kükürt dioksit ve karbon monoksit ile ilişkili olduğu, partikül katsayısı ve ozon düzeyi ile ilişkili olmadığı gözlenmiştir. Hava kirleticileri olarak; egzoz dumanı, santrallerin ve sanayilerin yakıt artıkları, endüstriyel sanayi atıkları ve kimyasal madde depo atıkları sayılabilir. Çalışmalarda trafiğin yoğun olduğu ülkelerde astım insidansının da fazla olduğu gösterilmiştir (39).

d. Diyet ve vitaminler: Diyet özelliklerinin, yenidoğan döneminde erken beslenmeye başlanmasının ve özellikle anne sütünün astımla ilişkisi sık araştırılan konulardır. Mama ve inek sütü ile beslenen çocuklarda, anne sütü alan çocuklara göre, erken çocukluk döneminde hışıltılı ataklarının daha sık gözlendiği saptanmıştır (40). Anne sütü ile beslenme ve allerji oluşturma riski yüksek besinlerin diyetle geciktirilmesinin, ilk iki yaşta cilt ve gastrointestinal sistem alerjilerinin görülmesini azalttığı, hatta engellediği, fakat solunum sistemi alerjik reaksiyonlarının gelişmesini önlemediği gösterilmiştir (41).

Son yıllarda D vitamininin immünmodülatör etkisi merkez alınarak alerjik hastalıklar ile ilişkisinin değerlendirildiği çalışmalarda (42-44), alerjik hastalığı olan bireylerde kandaki 25-OH vitamin D düzeyinin düşük olduğu gözlenmiştir. D vitamini desteğinin astım ve hışıltılı solunum atak insidansını azalttığı (43) ve gebelikte E ve D vitamini ile çinko alan annelerin bebeklerinde hışıltı sıklığında

belirgin azalma olduğu saptanmıştır (44). Tablo 1’de çeşitli vitamin ve minerallerin astım ile ilişkisi gösterilmiştir (45).

Tablo 1: Besinler ile astım ilişkisi

Besinler	Potansiyel mekanizmaları ve etkinlikleri
Vitamin A, C, E	Antioksidan; endojen ve eksojen oksidanlara karşı koruma
Vitamin C	Prostaglandin inhibisyonu
Vitamin E	Membran stabilizasyonu ve immünglobin E üretim inhibisyonu
Flavonlar ve flavonoidler	Antioksidan; mast hücre stabilizasyonu
Magnezyum	Düz kas gevşemesi ve mast hücre stabilizasyonu
Selenyum	Glutasyon peroksidazın antioksidan kofaktörü
Bakır, çinko	Süperoksid dismutazın antioksidan kofaktörü
Omega-3 yağ asitleri	Enflamatuvar hücre zarlarının lökotrien ikame ve stabilizasyonu
Omega-6 yağ asitleri	Artan eikosanoid üretimi

e. **Stres:** Sosyoekonomik düzeyi düşük ve stres faktörü yüksek ailelerin çocuklarında, astım prevalansının daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ebeveylere stresli olan okul çağı çocuklarında da astım prevalansı yüksek saptanmıştır (46). Tetikleyici faktör olarak stresin hipotalamik aksı aktiflediği, havayollarında otonomik fonksiyonları ve immun yanıtı yeniden modüle ederek, glukokortikoid direncini arttırdığı ve bağırsak florasını değiştirerek atopiyi, hışıltıyı ve alerjik semptomları arttırdığı gösterilmiştir (47).

f. **Egzersiziz:** Egzersizin, astımlı çocuklarda semptomları tetikleyebildiği veya mevcut semptomları artırabildiği bilinmektedir (48). Bu ilişkiyi değerlendirmek için iki ayrı hipotez ileri sürülmüştür. İlk hipoteze göre, egzersize bağlı hava yollarında meydana gelen dehidratasyon; ikinci hipoteze göre ise, egzersize bağlı hızlı ventilasyon ile hava yollarında meydana gelen hipotermi nedeniyle, bronşlarda bronkonstrüksiyon oluşmasına bağlı meydana gelen reaktif ısı artışının sebep olduğu düşünülmektedir. Reaktif ısı artışının sonucu ortaya çıkan ödem ve buna bağlı

gelişen hava yollarındaki daralma nedeniyle astım semptomlarının ortaya çıkabildiği varsayılmaktadır (49).

g. Antibiyotik kullanımı: Solunum yolu enfeksiyonları nedeni ile kullanılan antibiyotiklerin, Th-2 yanıtını artırarak atopi ve astım semptomlarını arttırdığı saptanmıştır (26). Doğum sonrası ve yaşamın ilk yılında antibiyotik kullanımının da, astım ve hışıltılı solunum insidansını arttırdığını gösteren çalışmalar vardır (50).

h. Parasetamol kullanımı: Epidemiyolojik çalışmalar, çocuklarda ve gebelikte parasetamol kullanım sıklığı ile çocukluk çağında astım gelişme riski arasında ilişki olduğunu göstermiştir (51).

i. Prematürite: Astım ile prematürite arasındaki ilişki halen tartışmalıdır. Gerek mekanik ventilatör tedavisi almaya bağlı, gerekse prematürite nedeniyle bronkopulmoner displazi (BPD) komplikasyonu sonucu, ileriki dönemlerde hava yolu duyarlılığı ve havayolu obstrüksiyonu gibi sekeller karşımıza çıkabilmektedir (52). Bir meta-analizde (53), prematürite ve düşük doğum ağırlığı ile ilk iki yaşta görülen hışıltılı solunum atakları arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Ondokuz çalışmanın değerlendirildiği başka bir meta-analizde ise (54), prematüritenin çocukluk çağı astım insidansını arttırdığı belirtilmiştir.

2.3 Astımın patogenezi

Astım patogenezi tam olarak açıklanamamakla beraber temel mekanizma, hava yolu duvarındaki kronik enflamatuvar süreç ve buna bağlı ortaya çıkan bronşial hiperreaktivite ile diffüz hava yolu obstrüksiyonudur. Bronş hiperreaktivitesi, kronik enflamasyon sonucunda ortaya çıkan çeşitli spesifik ve nonspesifik etkenlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Astımda enflamasyona neden olan hücrelerin mast hücreleri, makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler, eozinofiller ve T hücreleri olduğu bilinmektedir (55). Patogeneizde rol alan anahtar mediyatörler ise; lökotrien C4, lökotrien D4, lökotrien E4, TNF- α , granülosit ve monosit koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), interlökin-4, interlökin-5 ve interlökin-13'ü içeren sitokinler ile

histamin, nitrik oksit (NO) ve prostaglandin D2 (PGD-2)'dir (55). Son yıllarda, Timik Stromal Lenfopoietin'in (TSLP) ve Endotelin-1'in (ET-1) de astım patogenezinde görevli yeni anahtar mediyatör oldukları gösterilmiştir (6, 56).

2.3.1. Astımda rol oynayan enflamatuvar hücreler

-Eozinofiller: Eozinofiller astım ve alerjik enflamasyonlarda en karakteristik hücrelerdir ve hastalığın ciddiyeti ile ilişkilendirilirler. İnterlökin-5 tarafından aktive edilip, enflamasyon bölgesine çağırılırlar. Aktive eozinofillerden pek çok mediyatör salınmaktadır. Lökotrienler ve platelet aktive edici faktör (PAF) gibi düz kas hücre kontraksiyonunu uyaran lipid mediyatörler, majör basic protein (MBP), eozinofilik katyonik protein gibi toksik granüler mediyatörler ve granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör, transforming growth faktör (TGF) alfa/beta ve interlökinler gibi sitokinler eozinofil kaynaklı mediyatörlerden bazılarıdır. Total eozinofil granül proteinlerinin yarısını oluşturan MBP, düşük düzeylerde bile solunum epitel hücrelerine karşı toksik etki yaparak bronşlarda silier disfonksiyon ve kalıcı epitel hasarı oluşturmaktadır (57).

-Mast hücreleri: Astımlı hastaların havayollarında artmış olarak saptanmakta, ayrıca havayolu düz kasları ile de yakın ilişkisi olduğu bilinmektedir. Yüksek afiniteli IgE reseptörlerinin Fc (FcεRI) parçasına antijenlerin bağlanmasıyla ya da hava yollarındaki osmotik uyaranlarla aktive olmaktadır. Mast hücreleri; histamin, prostoglandin D2, proteaz ve lökotrienler gibi bronkokonstrüktör ajanların hızlı salınımında, havayolu düz kaslarının uyarımı ile hipertrofisinde ve enflamatuvar hücrelerin aktive edilmesini sağlayan TNF-α'nın salınımında görev almaktadırlar (58). IgE uyarısı ile daha önceden duyarlanmış kişilerin, alerjenler ile tekrar karşılaşması sonrasında mast hücrelerinden salgılanan IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi sitokinler kronik havayolu enflamasyonuna neden olmaktadır (59).

-T lenfositler ve B lenfositler: T lenfositler CD4 ve CD8 antijen ekspresyonlarına göre iki gruba ayrılmaktadır. CD4 antijen eksprese eden yardımcı T hücreleri de Th-1 ve Th-2 olarak iki guruba ayrılır. Th-1'ler IL-2, interferon gama

(IFN- γ) ve TNF- β salgıların; Th-2'ler IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 salgılamaktadırlar. Th-2'den salgılanan IL-3'ün, eozinofil ve bazofil yanıtını düzenlediği, mukozal bezlerde hiperplazi, hava yolu fibrozisi ve yeniden yapılanmayı sağladığı bildirilmiştir. IL-4'ün ise otoregülatör etki ile Th-2 yanıtını arttırdığı ve B lenfosit değişimi ile IgE sentezini desteklediği; endotel hücrelerinden de eozinofil, bazofil ve T hücreleri etkileyen vasküler endotelial adezyon molekülü 1'in (VCAM1) salınımını uyardığı gösterilmiştir (60).

Astımda enflamatuvar hücre reaksiyonunun başlamasını sağlayan Th-2 yanıtı sağlıklı kişilerde regülatör T lenfositler tarafından düzenlenir. Astım hastalarında, bu hücre grubunda fonksiyon bozukluğu olduğu, buna bağlı Th-2 hücre yanıtında ve enflamasyon sıklığında artış olduğu düşünülmektedir (61).

-Bazofiller: Bazofiller, astımda histamin ve lökotrien üretimine ek olarak, IL-4 ve IL-13'ün potansiyel üretici hücrelerinden birisidir (62).

-Doğal öldürücü (NK) hücreler: Sabit doğal öldürücü T (iNKT) hücrelerinin astım kliniğinde düzenleyici rolü olduğu öne sürülmüştür (63). Bu hücre grubu tarafından sentezlenen, glikolipid yapıdaki antijenleri tanıyan T hücre reseptörünün (V[α]24-J[α]18) özellikle bitkisel polenlere karşı hassas olduğu gözlenmiştir. Bu hücrelerin IL-4 ve IL-13 sentezledikleri de gözlenmiş olup, hava yolu enflamasyonu ve IgE üretimi ile de ilişkilendirilmektedirler.

-Dendritik hücreler: Antijen sunan hücreler olarak doğal ve kazanılmış bağışıklıkta görev alırlar ve konağın sensitizasyonunu takiben ortaya çıkan alerjen yanıt fazında rol oynamaktadırlar. Allerjenle karşılaşp fagosite ederek, allerjeni işler ve bölgesel lenf bezlerine göç ederek olgunlaşp; lenf bezlerinde antijeni T lenfositlere sunarlar ve Th-2 lenfosit dönüşümünü uyarırlar (64).

-Makrofajlar: Makrofajlar, havayollarında en çok bulunan hücre grubudurlar ve astımda sayıları daha da artmaktadır. Düşük afiniteli IgE reseptörlerinin uyarılması sonucunda aktive olan bu hücre grubu, salgıladıkları TNF- α , IL-8 ve lökotrien B4 (LTB4) gibi kemoatraktan mediyatörler ile nötrofilik enflamasyonu

arttırmaktadırlar. Astımda enflamasyonun başlaması ve devam etmesinden sorumludurlar (65).

-Nötrofiller: Nötrofiller, astımlı hastaların havayolu örneklerinde ve balgamlarında artmış olarak saptanırlar. Alerjik hastalıklarda primer rol oynamasalar da, steroide dirençli astım tanılı ve astım atağının ilk 6 dakikasında kaybedilen hastalar ile sık astım atağı geçiren hastalarda, havayollarında baskın olarak görülmektedirler (66).

2.3.2. Hava yollarının yapısal hücresel elemanları

Nazal kaviteden küçük bronşioleler hava yollarına kadar uzanan solunum yolu, visköz mukus ile kaplıdır. Bu yapının altında bulunan bronşial ve nazal epitel formları hava ile respiratuar sistem arasında geçiş formasyonu oluşturmaktadırlar. Epitel yapının üzerinde bulunduğu bazal membran ve submukozal alan, solunum yolu düz kaslarını, bez yapılarını ve kıkırdak dokuyu içermektedir. Epitel yapı ise; silier, sekretuar ve bazal membran hücreleri olmak üzere üç temel hücre grubunu içermektedir. Silier hücreler, mukosilyer hareket yardımı ile hava yolundaki partiküllerin uzaklaştırılmasını sağlarlar. Sekretuar hücreler mukus salgılayan ve bu sayede virüs, bakteri ve çeşitli cisimlere karşı koruma sağlayan hücre grubudur. Sekretuar hücreler kendi içerisinde goblet hücreleri, trakeal bez sekretuar hücreleri, klara hücreleri ve nöroendokrin hücreler olarak ayrılırlar (67). Bazal membran hücreleri, bronşial ve nazal epitel yapıda kök hücre olarak görev alırlar. Ayrıca bu yapının altında yer alan hücreler arası bağ dokuda ise fibroblastlar, düz kas hücreleri, serö-müköz bezler, sinir ağı ve kapiller ağ bulunmaktadır. Ek olarak serö-müköz bezler ve kapiller ağ arasındaki stromal yapıda lenfositler, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur (68).

Hava yolu epitel hücreleri, mekanik ve çevresel değişikliklere cevap olarak çok sayıda sitokin, kemokin ve lipid mediyatör üreterek enflamasyona katkıda bulunmaktadır. Epitel hücrelerinden salınan fibroblast growth faktör-2 (FGF-2), insülin benzeri growth faktör (IGF-1), platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), ET-1 ve transforming growth faktör beta (TGF- β 2), düz kaslar ve fibroblastlar

üzerine etki ederek matriks depolanmasını artırır (69). Enflamasyonda salınan IL-13'ün, epitel hücrelerinden TGF- β 2 salınımını arttırdığı, fibroblast ve miyofibroblastların farklılaşmasında ve kolajen depolanmasında görev aldığı gösterilmiştir (70). Hava yolu düz kas hücreleri, astımlı hastalarda hiperplazik ve hipertrofik değişiklikler sonucunda küçük hava yollarında daralmalar meydana getirerek akciğer volümünde azalma, rezidüel volümde artma ve hava hapsine neden olmaktadır. Enflamatuvar mediyatör salgıladıkları da gösterilmiştir (71). Nöron ağı değerlendirildiğinde ise, kolinerjik sinirler mukus salgısına ve bronkokonstrüksiyona sebep olurken, duyuşal sinirler göğüste sıkışma hissi ve öksürük semptomlarına sebep olmaktadır (72).

2.3.3 Astımda rol oynayan mediyatörler

Astım patogeneğinde çok sayıda sitokin ve kemokin rol almaktadır. En önemli mediyatörler şunlardır:

-Sitokinler: Astımdaki enflamatuvar yanıtı yönetirler ve şiddetini belirlerler. Başlıca sitokinler interlökin-1 β (IL-1 β), TNF- α , GM-CSF, IL-4, IL-5 ve IL-13'tür (73).

IL-1 β ve TNF- α , astımda enflamatuvar hücrelerin bronş mukozasına toplanmasını sağlayarak enflamatuvar yanıtın güçlenmesinde rol oynamaktadır. GM-CSF, IL-8 gibi sitokinler ise, nitrik oksit ve PDGF sentezlenmesinde görev almaktadır. IL-5, eozinofil farklılaşmasında görevli iken; IL-4, Th-2 lenfositlerini uyaran anahtar sitokindir ve alerjenlere karşı yanıtın başlamasını sağlar (5). IL-4'ün IgE üretimini arttırdığı da bilinmekle birlikte, epitel hücrelerine etki ederek TGF- β 2 salınımını artırıp fibroblastların ve miyofibroblastların farklılaşmasını ve kolajen depolanmasını uyardığı da gösterilmiştir (70). IL-13 ise astımda ve hava yolu enflamasyonunda mukus üretimini ve bronş aşırı duyarlılığını artırmaktadır (5). Yeni keşfedilen sitokinlerden interlökin 25 (74) ve timik stromal lenfopoietin'in (4) de astım patogeneğinde etkili olduğu gösterilmiştir. IL-25, MHC class-2 ekspres eden hücrelerden IL-5 ve IL-13 salınımını uyararak, Th-2 lenfositlerin aracılık ettiği, alerjik ve anti parazitik reaksiyonlarda ortaya çıkan immün yanıtın başlamasını sağlamaktadır (75). Cilt, gastrointestinal sistem, akciğerler ve timusta üretildiği

saptanan ve yeni tanımlanan bir sitokin olan timik stromal lenfopoietin'in ise, Th-2 hücrelerden sitokin üretimini ve dendritik hücre polarizasyonunu başlattığı, aynı zamanda T hücre reseptör aktivasyonu ile hücre çoğalmasını ve Th-2 sitokin cevabını desteklediği saptanmıştır. B hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını da desteklediği gösterilen TSLP'nin, Th-2 aracılı enflamatuvar yanıtta kritik rolü olduğu savunulmaktadır (4). Yapılan bir araştırmada (56), cilt epiteli kaynaklı TSLP'nin, lokal etkisinden ayrı olarak, hava yolu enflamasyonunda ve astım kliniğinin alevlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir.

-Kemokinler: Kemokinler, havayolu epitel hücrelerinden salınırlar ve enflamatuvar hücrelerin hava yollarında toplanmasından sorumludurlar. Kemokin ligand 17 (CCL17), kemokin ligand 22 (CCL22), timus ve aktivasyonla düzenlenen kemokinler (TARC) ve makrofaj kaynaklı kemokinler (MDC) Th-2 hücrelerin toplanmasını sağlar. Bu grupta yer alan kemokin ligand 11 (CCL11) (eotaksin) ise özellikle eozinofiller için selektiftir (76).

-Lökotrienler ve prostanoidler: Lökotrienler, araşidonik asitten 5-lipoksijenaz enzimi aracılığıyla eozinofillerde ve mast hücrelerinde; prostanoidler ise, araşidonik asitten siklooksijenaz (COX) enzimi aracılığı ile mast hücrelerinde sentezlenmektedir. Lökotrien C4, lökotrien D4, lökotrien E4 bronkokonstrüksiyon, plazma eksudasyonu ve mukus sekresyonu gibi kolinerjik etkiler göstermektedir (77). Prostaglandinler (PGD2, PGF2 α) ve tromboksanlar (tromboksan A2 (TxA2)) de bronkokonstrüksiyon yapar (73).

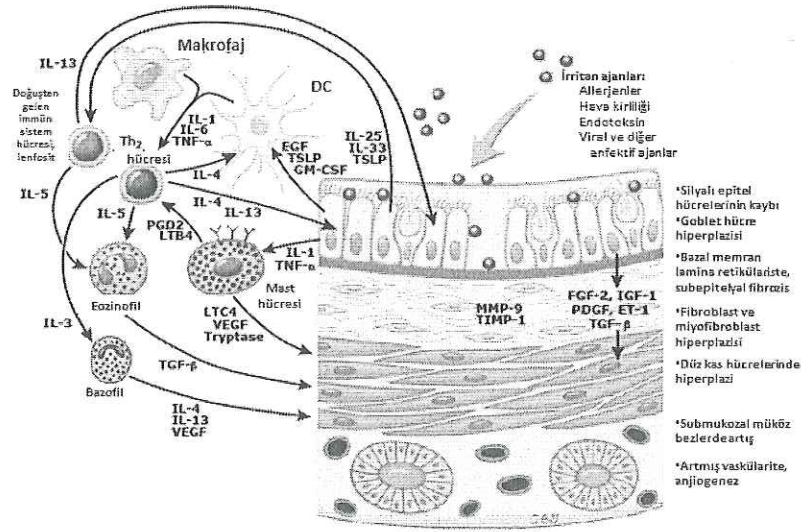
-Histamin: Astımda aktive mast hücrelerinden salınan histaminin en önemli etkisi, özellikle küçük hava yollarında görülen bronkokonstrüksiyondur. Ayrıca vazodilatasyon, ürtikeryal döküntüler, mukus hipersekresyonu, kapiller geçirgenlikte artış ve buna bağlı ödeme neden olur (78).

-Nitrik oksit (NO): NO, hava yollarındaki enflamatuvar hücreler (makrofajlar, nötrofiller, mast hücreleri), fibroblastlar, düz kas hücreleri ve epitel hücrelerinde

sentezlenir. Ekspiryum havasında ölçülebilmesi, hastalığın şiddeti hakkında bilgi sağlar (79).

2.3.4. Havayollarının yeniden yapılanması (Remodelling)

Çevresel iritanlar, alerjenler ve enfektif ajanlar, hava yolu epitelinde hasar oluşturmakta ve ardından epitelde yenilenme süreci başlanmaktadır. Sağlıklı bireylerde solunum epitel, hasar ve tamir mekanizmaları ile sürekli yenilenmektedir. Astımlı bireylerde ise hava yolunda abartılı cevap oluşmaktadır. Bu abartılı cevap; hava yolu enflamasyonu, bazal membranın kalınlaşması, hava yolu duvar elastisitesinin azalması, subepitelyal kollajen birikimi, düz kas hipertrofisi ve hiperplazisi, goblet hücre hiperplazisi, mukus aşırı sekresyonu ve artmış vazkularite olarak gözlenmektedir. Hava yollarındaki bu geri dönüşümsüz değişiklikler 'remodelling' olarak adlandırılır (80). Astımda havayollarının yeniden yapılanması şekil 2'de gösterilmiştir (3).



Şekil 2: Havayollarının yapısal değişiklikleri ve yeniden yapılanma

a) Epitel hasarlanması ve tamiri

Astımlı hastalarda epitel hasarlanması, hava yolu iritasyonu yapan faktörlerle karşılaşma sonrasında salınan sitokinler, büyüme faktörleri ve mediyatörlerin etkisi ile oluşmaktadır. TGF-β; epitel hücresinden salınan, fibroblastların

miyofibroblastlara dönüşümünü başlatan ve yeniden yapılanmaya direk etkisi olan başlıca büyüme faktörü olarak görev yapmaktadır. Endotelin, bradikinin ve taşıkininler gibi allerjik enflamasyonun nörojenik komponentinden sorumlu mediyatörlerin yıkımını sağlamakla görevli nötral endopeptidazlar epitel kaynaklıdır. Bu enzimler epitel doku hasarı görüldüğünde, görevlerini yapamazlar. Bu nedenle ortamda bulunmaması gereken mediyatörlerde artış meydana gelir. Sonuç olarak düz kas kontraksiyonu, mikrovasküler sızıntı ve mukus hipersekresyonu ortaya çıkar (80).

b) Mast hücre infiltrasyonu

Mast hücreleri, astımda erken dönem yanıtta ve kronik enflamasyonun devamında rol oynamaktadırlar. Antijen ile temas sonrasında, mast hücre yüzeyine tutunmuş IgE moleküllerinin etkileşimi ile erken allerjik faz ortaya çıkmaktadır. Erken fazda salınan TNF- α , PGD₂, LTB₄, histamin, proteazlar ve proteoglikanlar ile bronş düz kaslarında kasılma, mukus sekresyonunda artış, vazodilatasyon ve plazma eksüdasyonu gözlenmektedir. Enflamatuvar hücrelerin dokuya göçü ile saatler sonra geç dönem allerjik reaksiyonlar ortaya çıkar. Bu dönemde IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α ve membran katyonik protein 1 (MCP1) gibi mediyatörler salgılanır (81).

c) Goblet hücre hiperplazisi

Hava yolunun yeniden yapılanma sürecinde, allerjik fazın geç döneminde salgılanan sitokinlerden olan IL-4, IL-5 ve IL-13 goblet hücre hiperplazisi ve mukus hipersekresyonu yaparak, hava yolunda obstrüksiyona ve tıkaç oluşumuna neden olur (82).

d) Havayolu düz kas kalınlığının artması

Havayolu yeniden yapılanmasında, düz kas kitlesinde hipertrofi ve hiperplazi en önemli basamaklardan birisidir. Mast hücresi (lökotrien C₄, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)), eozinofil (TGF- β), bazofil (IL-4, IL-13, VEGF) ve epitel hücresi (FGF-2, IGF-1, PDGF, ET-1, TGF- β) gibi hücreler salgıladıkları sitokinler ile fibroblastları aktive ederler. Fibroblastlar aktive olduktan sonra miyofibroblastlara dönüşerek proliferasyona uğrarlar. Miyofibroblastlar, ET-1 salgılayarak düz kas

hipertrofisine, sinir büyüme faktörü (NGF) salgılayarak nörojeneze ve VEGF salgılayarak da anjiogeneze neden olmaktadır (83).

e) Bronşial neovaskülarizasyon ve anjiogeneze

Anjiogeneze, astımda hava yolu yeniden yapılanmasının önemli bir parçasını oluşturmaktadır ve bu fazın gelişmesinde FGF-2, hepatosit büyüme faktörü, PDGF, anjiogenin ve VEGF gibi anjiogenik faktörler rol oynamaktadır. VEGF en potent anjiogenik faktörlerden birisidir ve endotelial hücre proliferasyonunun uyarılmasını sağlar (80).

f) Subepitelyal fibrozis

Astımda, enflamasyon sonucunda epitel doku tarafından hasar yanıtı olarak, büyüme faktörleri, TGF- β , FGF-2, endotelin ve VEGF gibi profibrotik mediyatörler salınmaktadır. Fibroblast ve miyofibroblast gibi mezanşimal hücreler; kollajen (tip 3 ve tip 5 kollajen) ve ekstraselüler matriks proteinlerini üretirler. Mast hücrelerinden salınan proteazlar ve büyüme faktörleri, düz kas hiperplazisine ve hava yolunda kalınlaşmaya neden olmaktadır. Enflamasyon süreci içerisinde bronşial düz kas hücreleri ve fibroblastlardan salınan plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1), fibrinolizisi inhibe ederek, hava yollarında oluşan fibrozise katkıda bulunur (83).

2.3.5 Havayolu aşırı duyarlılığı

Havayolu aşırı duyarlılığı, astımda karakteristik ve fonksiyonel olarak oluşan patolojik bir süreçtir. Genetik ve çevresel etkenlerin katkısı ile kişilerde hava yollarında enflamasyon ve buna bağlı patolojik hiperreaktivite ortaya çıkmaktadır. Oluşan değişiklikler kronik süreçte kalıcı hale gelir ve bronş yapısı bozularak yeniden yapılanma ile birlikte hava yollarında aşırı duyarlılık ortaya çıkmaktadır (83).

2.3.6 Astımda hava yolundaki daralmaya neden olan faktörler

Astım tanılı hastalarda meydana gelen düz kas kasılması, hava yolu ödemi, hava yollarında kalınlaşma ve aşırı mukus sekresyonu, hava yolu obstrüksiyonu ile ilişkili semptomlara neden olmaktadır. Düz kas kontraksiyonu, obstrüktif hava yolu semptomlarının temel mekanizmasını oluşturmaktadır. Prostaglandin E2, histamin ve TxA2 gibi mediyatörlerin etkisiyle havayollarında düz kas hücrelerinin kontraksiyonu aktive olurken, ataklar sırasında enflamatuvar yanıt olarak gelişen vazküler geçirgenlik, hava yolu ödemeine neden olmaktadır (83).

2.4 Astım tanısı

Astım semptomları ile gelen bir hastada tanı, öncelikle klinik bulgular ışığında şekillendirilir. Bu nedenle tanı sürecinin başlangıcında hastalardan alınan ayrıntılı öykü büyük önem taşımaktadır. Astım; aralıklı öksürük atakları, hışıltılı solunum, nefes darlığı gibi bronkodilatör ajanlarla geri döndürülebilen klasik semptomlarla başlamaktadır. Dolayısıyla benzer klinik bulgu veren hastalıklardan ayırt edilmesi zordur. Bunun nedeni semptomların astıma karakteristik olmalarına rağmen, astıma özgün olmamalarıdır. Fizyolojik değerlendirmede astım, bronşiyal aşırı duyarlılık ve çeşitli hava yolu iritanlarına karşı hava yollarında daralmanın meydana gelmesidir. Bronşiyal aşırı duyarlılık, sadece astıma özgün bir bulgu değildir. Patolojik olarak değerlendirildiğinde ise, kronik hava yolu enflamasyonu ile ataklar halinde ortaya çıkan hava yolunda daralmalar görülmektedir. Bu bulgular doğrultusunda da astım, bronşit ve bronşiolit gibi diğer enflamasyonla giden hava yolu hastalıkları ile karıştırılabilmektedir (2). Astımlı olguların yaklaşık %75'i yedi yaşından önce tanı almaktadır. Pek çok çocukta adolesan dönemde semptomlar azalmaktadır. Astım semptomları herhangi bir yaşta kendisini gösterebilmekle birlikte, ileri yaşta sıklığının daha az olduğu bilinmektedir (84).

Astım, sebebi açıklanamayan öksürük şikayetinin en sık nedenidir. Göğüs ağrısı, sıkışma ve baskı hissi de şikayetler arasında bulunabilmektedir (85). Semptomlar aralıklı olarak görülmektedir, saatler veya günler içerisinde spontan olarak gerileyebilir ve antiastmatik ilaçlara hızlı yanıt alınmaktadır. Uzun periyotlar

boyunca asemptomatik olabilmekle birlikte, gece saatlerinde semptomların alevlendiği görülmektedir. Karakteristik olarak; egzersiz, soğuk hava, enfeksiyon ve iritanlarla temas astım semptomlarını tetikler. Alınan öyküde astım semptomlarını alevlendiren sebepler değerlendirildiğinde;

-Egzersize bağlı semptomlar, tipik olarak 5-15 dakika içerisinde başlamakta ve istirahatle 30-60 dakika içerisinde gerilemektedir. Soğuk hava semptomların daha erken ortaya çıkmasına sebep olmaktadır.

-Toz böcekleri, küf, kürklü hayvanlar ve hayvan tüyleri, hamam böcekleri ve polenler en sık alerjen iritanlardır. Kedi ve köpek epiteli ile karşılaşma alt hava yolu semptomlarına neden olurken; besin alerjileri duyarlı kişilerde ürtiker, ödem, hipotansiyon ve gastrointestinal bulgular olmaksızın izole astım semptomlarına sebep olmaktadır. Sigara ve hava kirliliğine bağlı semptomlar, astımın diğer hava yolu hastalıklarından ayırt edilmesini kolaylaştıracak patognomonik bir klinik ortaya çıkarmamaktadır. Sadece astımlı hastalarda görülen, aspirin veya herhangi bir siklooksijenaz-1 inhibitörü verildikten 30-120 dakika sonra klasik öksürük, hışıltılı solunum ve göğüste sıkışma hissi olan astım tipi, aspirine duyarlı ya da aspirin ile tetiklenen astım olarak isimlendirilmektedir (2).

-Ailesel atopi ve alerjik hastalık, genç erişkinlerde ve adolesanlarda çocukluk çağında astım benzeri semptomların varlığının sorgulanması da tanı aşamasında önemlidir.

İlk muayenede semptomların değişkenliği nedeni ile dinleme bulguları normal olabileceği gibi, ronküs ve hışıltı duyulabilir. Ağır astım ataklarında ise siyanoz, uykuya eğilim, taşikardi gibi diğer fizik muayene bulguları da görülebilmektedir.

Laboratuvar tetkikleri, astım şüphesi olan hastalarda tanıyı desteklemek ve hastalığın izlemi için kullanılmaktadır. Tanısal testler içerisinde kan testleri ve alerji testlerine ek olarak öncelik, solunum fonksiyon testlerindedir. Bununla birlikte bronş provokasyon testleri, bronkodilatör yanıtının değerlendirilmesi, deri testleri, total eozinofil düzeyi, immunglobulin E düzeyi, balgam analizi ve ekshale NO ölçümü diğer tanısal tetkikleri oluşturmaktadır (2).

Spirometre, solunum fonksiyonunu ve hava akımını değerlendirmede kullanılan temel yöntemdir. Bronkodilatör öncesi ve sonrasının değerlendirilmesi, klinik muayenede önceki test değerleri ile hızlı karşılaştırma yapılabilmesine imkan

sağlamaktadır. Spirometrik testler, hasta uyumu gerektirdiği için beş yaş ve altındaki çocuklarda yapılamamaktadır. Ölçülen parametreler; ilk bir saniyede ölçülen zorlu ekspiratuvar volüm (FEV1), zorlu vital kapasite (FVC), vital kapasitenin %25-%75'indeki zorlu ekspirasyon akımı (FEF 25-75) ve zirve ekspiratuvar akımı (PEF)'dir. Sağlıklı çocuklarda FVC %80'in üzerindedir. FEV-1/FVC oranının düşük olması (0,70'den daha düşük ya da elektronik spirometre cihazlarında belirlenen intervalin %50 normal sınır değerinin altında), hava yolu obstrüksiyonunu gösterir. Klinik pratikte hava yolu obstrüksiyonu saptandıktan sonra izlenimde FEV-1 veya PEF'deki değişkenlikler değerlendirilmektedir. Havayolu obstrüksiyonunun değerlendirilmesinde PEF değerlerindeki diurnal değişimler ve reversibilite testi kullanılabilir. Reversibilite testi, 200-400 mcg inhale salbutamol sonrası 10-15 dakika içerisinde FEV-1 veya PEF değerlerinde 200 ml ya da %12 oranında artış olmasıdır. Reversibilite testinden anlamlı sonuç alındığında tanı, yüksek oranda astımdır. Bronş provokasyon testleri ise solunum fonksiyon testleri normal fakat astım benzeri semptomları olan hastalarda, astım tanısını belirlemek amacıyla yapılmaktadır. FEF 25-75 de, provokasyon testlerinde astım hastalığının ciddiyetinin belirlenmesinde kullanılır (2, 86).

2.5. Astım Tedavisi

Astımda tedavinin ilk basamağı, hastanın ve ailesinin bilgilendirilmesi ve tedavi için hekim-hasta-aile işbirliğinin sağlanmasıdır. İlaçlar, akut dönemde kullanılan semptom gidericiler ve enflamasyonu azaltan kontrol edici ilaçlar olarak iki gruba ayrılmaktadır. Tedavide kullanılan ilaçlar; inhale kortikosteroidler, lökotrien reseptör antagonistleri, kombine kullanılabilen inhale uzun etkili beta agonistler, oral steroidler, kromonlar ve metilksantinler olarak sınıflandırılabilir (1).

2.5.1. Astım tedavisinde kullanılan ilaçlar ve özellikleri

a. Steroidler

İnhale kortikosteroidler, kontrol edici ajanlar arasında en etkili ve en güçlü antiinflamatuvar ilaç grubudur. Düşük doz inhale kortikosteroid, kontrol tedavisinde

ilk kullanılan ajandır. Antienflamatuvar etkileri, hücrelerde DNA düzeyinde protein sentezini etkileyerek ortaya çıkmaktadır. En çok nükleer faktör-κB (NF-κB) ve aktive edici protein (AP-1) üzerinden bu etkiyi oluşturmaktadırlar. İnhalasyon kortikosteroidler, enflamatuvar hücrelerin aktivasyonunu ve mediyatör salınımını engelleyerek eozinofil, T lenfosit ve diğer enflamatuvar hücrelerin bronş mukozasında birikimini azaltmaktadırlar. Hücre membranlarının stabilizasyonunu sağlayarak ve bronş düz kasında β2 reseptör sentezini ve duyarlılığını artırarak, antienflamatuvar etki oluştururlar. Enflamatuvar olayı baskılamak suretiyle mikrovasküler sızıntı ve ödemi azaltırlar (1).

Oldukça etkili olmalarına rağmen, kortikosteroidlerin lokal ve sistemik ciddi yan etkileri olmaktadır. İnhalasyon steroid kullanımına bağlı orafaringiyal kandidiyazis, diş gelişim bozuklukları, disfoni, irritasyona bağlı kaba öksürük, ciltte atrofi, strialar, telenjiyektaziler ve yara iyileşmesinde gecikme gibi lokal yan etkiler görülebilmektedir. Uzun süreli ve/veya yüksek doz kullanıma bağlı kemik mineral yoğunluğunda azalma ve kolay morarma gibi sistemik yan etkileri de bulunmaktadır (1). İnhalasyon kortikosteroidler, tedavinin ilk yılında büyüme hızında duraksamaya neden olmaktadır (87). Budesonidin 200 µg ve altındaki dozlarda kullanımına bağlı hipotalamo-pitüiter-adrenal aks süpresyonu oluşmadığı, ancak yüksek doz kullanımı ile adrenal krizlerin ortaya çıktığı bildirilmiştir (88). Konjestif kalp yetersizliği, hipertansiyon, ödem, jinekomasti, hirsutizm, akne, kaslarda güçsüzlük, miyopati, sekonder diabetes mellitus, glokom, katarakt, bağışıklık sisteminde baskılanma ve depresyon görülebilen diğer yan etkileridir (87).

b. Antilökotrien ilaçlar

Zafirlukast ve montelukast gibi lökotrien reseptör antagonistleri, sisteinil lökotrien reseptörlerini bloke ederler. Vasküler geçirgenliği, mukus yapımını ve bronkospazmı azaltıcı etki gösterirler. Oniki ayın üzerindeki çocuklarda astım kontrol tedavisinde önerilmektedirler. Viral enfeksiyonlarla tetiklenen hışıltı atağı geçiren beş yaşından küçük çocuklarda ve hafif persistan astımda kullanılabilirler. İnhalasyon kortikosteroid tedavisi ile yeterli kontrol düzeyi sağlanamayan hastalarda kombinasyon tedavisinde kullanılabilirler (89).

c. Uzun etkili beta-2 agonistler

İnhale glukokortikoidlerle birlikte kullanılan, etkisi yaklaşık 12 saat süren uzun etkili inhale beta-2 agonistler (salmeterol, formoterol, albuterol), egzersizle ortaya çıkan bronkokonstrüksiyonlarda, gece semptomlarında ve astımın klasik semptomlarının kontrolünde kullanılmaktadır. Bronkodilatatör etkilerinin yanında mast hücreleri ile bazofillerden mediyatör salınımını önlemektedirler. Damar geçirgenliğini azaltarak ödem oluşumunun önlenmesine katkıda bulunurlar. Bronş düz kas hücre proliferasyonunu ve anjiyogenezi azaltıcı etkilerine ek olarak, siliyer hareketleri de artırmaktadırlar. Tek başlarına kullanımının, astımın enflamatuvar komponentine yeterli etki etmediği gösterilmiştir (90).

d. Kromonlar

Kromonlar (sodyum kromoglikat), uzun yıllardır astımın kontrol tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Akciğerlerden hızlı emilirler ve güvenlidirler. Enflamatuvar hücre aktivasyonunu inhibe ederek, mediyatör salınımını, allerjen ile indüklenen erken ve geç faz bronkokonstrüksiyonu baskılamakta ve bu yolla hava yolu aşırı duyarlılık reaksiyonunu azaltmaktadırlar. En önemli yan etkileri, boğazda tahriş, öksürük ve bronkokonstrüksiyondur (1).

e. Metilksantinler

Metilksantinler ailesinden olan teofilinin, antiinflamatuvar ve bronkodilatör etkilidir. Astım tedavisinde, steroidden kaçınmak ve immünmodülatör özellikleri için kullanılırlar. Özellikle gece semptomlarında iyileşme ve solunum fonksiyonlarında düzelme sağlamakla birlikte, bronş aşırı reaksiyonunda da etkilidirler. Kısa dönemde kardiyak aritmi, konvülsiyon, ölüm gibi yan etkilere ve uzun dönemde de öğrenme ve davranışsal bozukluklara neden oldukları gösterilmiştir. Bu etkilerin doz bağımlı olması nedeni ile serum düzeyleri yakın takip edilmelidir (91).

f. Anti IgE tedavisi (omalizumab)

İnsan serumu kaynaklı IgE'nin Fc bölümüne bağlanma özelliği bulunan anti IgE (omalizumab) monoklonal antikordur. Sürekli olarak alerjenlere karşı pozitif deri

testine sahip, standart tedavi ile şikayetleri kontrol altına alınamayan, ağır persistan astımlı altı yaş üzerindeki çocuklarda kullanılmaları önerilmektedir (2).

2.6. Bosentan

Bosentan, organoheterosiklik bileşenler grubu içerisinde yer alan, diazin sınıfına mensup bir pirimidin derivativesidir. Non-selektif endotelin A (ET-A) ve endotelin B (ET-B) reseptör antagonistidir. Amerika, Avrupa, Türkiye ve diğer pek çok ülkede pulmoner arteriyel hipertansiyonu (PAH) tedavisi ve yönetimi için lisans almış etkin bir ilaçtır (7).

2.6.1. Bosentanın yapısı

Kimyasal formülü, "C₂₇-H₂₉-N₅-O₆-S.H₂-O"; kimyasal açılımı ise, "4-tert-butyl-N-[6-(2-hydroxy-ethoxyl-5-(2-methoxy-phenoxy)-[2,2']-bipyrimidin-4-yl]-benzenesulfonamide monohydrate"dır (7).

2.6.2. Farmakokinetik özellikleri:

a) Absorbsiyon: Bosentanın oral biyoyararlanımı %50 olup, plazma pik seviyesine ortalama bir haftada ulaşmaktadır (92). Emilimi yiyeceklerden etkilenmemektedir.

b) Dağılım: Bosentan, %98 oranında plazma proteinlerine bağlanarak taşınmaktadır. Bağlanmamış fraksiyonu yaklaşık %2'dir (92).

c) Metabolizma ve eliminasyon: Bosentan bir ön ilaçtır. Plazma proteinleri ile karaciğere taşınır ve burada sitokrom P450 enzimlerinden CYP2C9 ve CYP3A4 (ayrıca CYP2C19 ile de metabolize olduğu düşünülmektedir) ile aktif metaboliti Ro 48-5033'e (Hidroksi Bosentan) dönüşür. Aktif formu, bazal aktiviteyi %10-20 artırmaktadır. Karaciğerde elimine olduktan sonra safra yolu ile atılır. Ortalama yarılanma ömrü, sağlıklı bireylerde beş saattir (92).

2.6.3. Bosentanın etkileri

Bosentan potent antienflamatuvar, antiproliferatif ve antioksidandır. Mikrovasküler ekstrasvazasyonda azalma sağladığı gösterilmiştir. İlk kez 1990'ların ortalarında, yeni potent oral aktif endotelin reseptör antagonisti olarak duyurulan bosentanın, vazokonstrüksiyon ile ilişkili hastalıklarda kullanılabileceği belirtilmiştir. Food and Drug Administration (FDA) tarafından 2001 yılında, pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır (8).

Antienflamatuvar etkileri

Astımda enflamatuvar yanıt değerlendirildiğinde; hava kirliliği, enfeksiyon ve alerjen maddeler tarafından hasarlandırılan hava yolu epitelinden ET-1, TSLP, interlökin 25 ve interlökin 33 gibi sitokinler salgılanır. Bu sitokinler enflamatuvar yanıtta görevli mast hücresi, bazofil ve bölgesel lenfositleri uyarırlar. Ayrıca TSLP ile aktive olan dendritik hücreler, antijeni alarak lenf nodunda gider ve burada T lenfositleri uyarırlar. Uyarılan T lenfositleri lenf nodu foliküllerine gider ve burada B lenfositlerini uyarır. B lenfositleri dokuda plazma hücrelerine dönüşürler ve enflamasyonda görevli hücrelerin uyarılmasına yardımcı olurlar. Diğer bir grup T lenfositler ise dolaşıma geçerek Th-2'ye dönüşürler. Th-2 hücreleri, dokuda mast hücresi ve bazofiller ile birlikte interlökin 5 ve interlökin 13 gibi sitokinleri ve çeşitli büyüme faktörlerini salgılayarak akut ve kronik süreçte patolojik değişikliklerin gelişmesine katkı sağlarlar (93).

ET-1 enflamatuvar süreçlerde başlangıç fazında en erken dönemden itibaren saptanabilmektedir. Endotelinin enflamatuvar yanıtta etkisinin ve endotelin reseptör blokeri olan bosentanın antienflamatuvar etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada (6), ET-1'in mRNA düzeyindeki artışa bağlı olarak TNF- α , IL-1 β ve IL-8 gibi enflamatuvar sitokin düzeylerinde artış meydana getirdiği görülmüştür. Endotelin reseptör antagonisti olan bosentan ile tedavi sonrasında ise, TNF- α , IL-4, IL-1 β ve IFN- γ gibi enflamatuvar sitokinlerin düzeylerinde azalma saptanmıştır.

Antiproliferatif etkileri

Hava yolu düz kas hücreleri üzerine spazmojen ve mitotik etkili olan ET-1, kronik havayolu enflamasyonundaki düz kas proliferasyonundan sorumludur. Yapılan bir çalışmada (9), ET-1 tarafından indüklenen düz kas hiperplazisine karşı, ET-A ve ET-B reseptör antagonistlerinin (BQ-610 ve BQ-788) etkili oldukları saptanmıştır. Ayrıca selektif olmayan endotelin A ve B reseptör blokeri bosentanın, düz kas proliferasyonuna karşı inhibe edici etkisi gösterilmiştir. Potent inhibisyon etkisi, BQ-788 ile benzer bulunan bosentanın, etkisini ET-B reseptörü üzerinden gösterdiği düşünülmektedir (9).

Bir çalışmada (94), havayolu kronik enflamasyonuna bağlı gelişen remodellingte, kortikosteroid kullanımının sınırlı etkisinin olduğu; başka bir çalışmada ise (95), tedavide yüksek doz flutikazon kullanımının submukozal vaskülarite ve bazal membran kalınlığına karşı etkili olduğu, fakat düz kas hiperplazisine ve hipertrofisine belirgin etki göstermediği gözlenmiştir. Bu çalışmalar, steroid yan etkileri de göz önüne alındığında, astımda yenilikçi tedavi arayışlarının değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Diğer etkileri

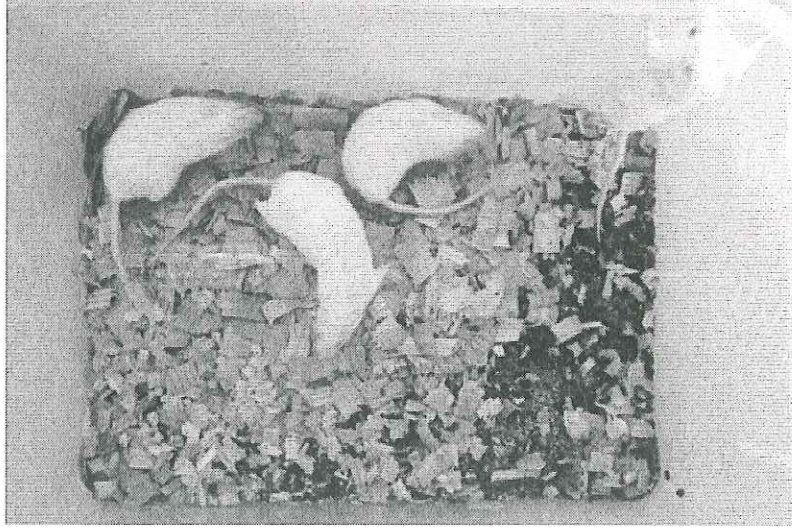
Süperoksit anyonlarının, enflamasyon sırasında üretimi artar. Buna bağlı olarak sitokin üretiminin arttığı ve enflamasyonun daha da ağırlaşarak, ağrı duyusunun ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bosentanın antioksidan etkisinin gösterilmesinin amaçlandığı bir çalışmada (10), bosentan tedavisinin süperoksit anyonları ile ortaya çıkan ödemi, termal ve mekanik ağrıları geriletmediği, miyeloperoksidaz aktivitesini de inhibe ettiği gösterilmiştir. Yapılan bir hayvan çalışmasında ise (96), bosentanın oleik asit ile oluşturulan akciğer ödeminde ekstrasvazasyonu azalttığı görülmüştür. Bu çalışmaya göre, bosentanın respiratuvar distres sendromunda da kullanılabileceği hipotezi öne sürülmüştür.

Parmaklarda ülserlerle seyreden reynaud fenomeninde de, tedavi ile vazokonstriktif etkiyi azalttığı bildirilmiştir (97).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney hayvanları

Çalışma, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilen 6-8 haftalık 20-40 gr ağırlığındaki 35 adet ad libitum olarak beslenen BALB/c fare üzerinde yapıldı (Resim 1). Fareler klimalı odalarda 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda önceden dezenfekte edilmiş plastik tabanlı, zemine talaş serili metal korumalı fare kafeslerinde muhafaza edildi. Çalışma için, Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan, 2016TIPF011 nolu etik kurul onayı alındı.



Resim 1. Çalışmada kullanılan BALB/c fareler

3.2. Çalışma grupları

Çalışmaya dahil edilen 35 adet BALB/c fare 4 gruba ayrıldı:

Grup I (n=5): Herhangi bir tedavi verilmeyen kontrol grubu

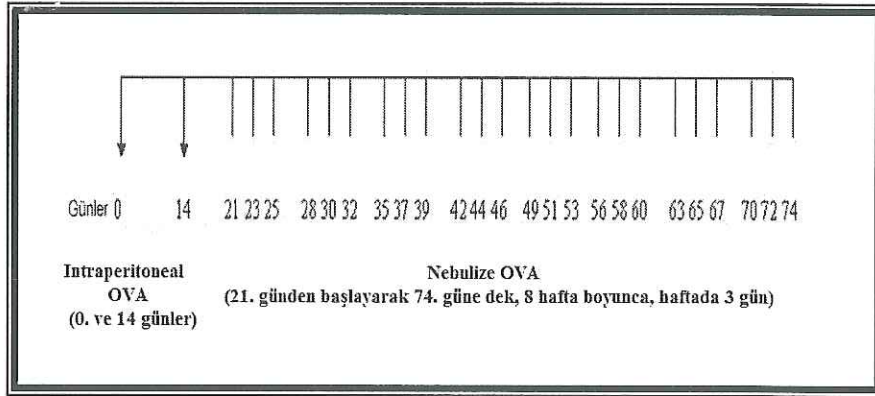
Grup II (n=10): Astım modeli oluşturularak salin uygulanan plasebo grubu

Grup III (n=10): Astım modeli oluşturularak deksametazon uygulanan grup

Grup IV (n=10): Astım modeli oluşturularak bosentan uygulanan grup

3.3. Kronik astım modelinin oluşturulması

Kronik astım modeli oluşturmak için, Temelkovski ve arkadaşları tarafından tanımlanan kronik astım modeli kullanıldı (98). Kontrol grubu (Grup 1) dışındaki diğer tüm farelere, 14 gün ara ile iki kez 10µg intraperitoneal tavuk yumurta ovalbumini (OVA; Grade V, Sigma, St Louis, MO, USA) uygulanarak duyarlılaşmaları sağlandı. Kontrol grubundaki farelere, aynı yol ile aynı miktarda salin solüsyonu uygulandı. Duyarlılaştırılan farelere, son immunizasyondan yedi gün sonra (21. günde) başlamak üzere, günde bir saat süre ile haftanın üç günü, sekiz hafta boyunca steril salin içindeki %2,5'lik ovalbumin solüsyonundan oluşan aerosol inhale ettirildi. İnhalasyon uygulamaları, jet nebulizator ile bağlı 42x24x17 cm ebatlarındaki cam odacığın içine, fareler gruplar halinde koyulduktan sonra tüm vücut inhalasyon sistemi şeklinde yapıldı. Bu nebulizator sistemi ile verilen aerosol, $\leq 4 \mu\text{m}$ çapında, $\geq 80\%$ partikül ayrışmasına olanak sağladı. Partikül konsantrasyonu 10-20 mg/m³ idi. Kontrol grubundaki farelere de, aynı sistem ile salin inhalasyonu yaptırıldı. Şekil 3'de kronik astım modeli oluşturma protokolü verilmiştir.



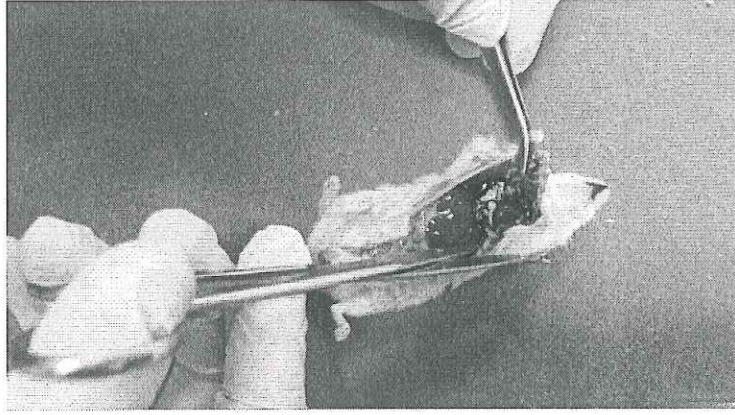
Şekil 3. Kronik astım modeli oluşturma protokolü

3.4. Çalışma ilaçlarının verilmesi

Ovalbumin inhalasyonunun son haftasında Grup II'deki (plasebo grubu) farelere serum fizyolojik, Grup III'teki farelere deksametazon 1 mg/kg/gün (99), Grup IV'deki farelere bosentan 100 mg/kg/gün (10), intraperitoneal yol ile ardına beş gün uygulandı.

3.5. Hayvan yaşamını sonlandırma zamanı ve yöntemi

Fareler, son tedavinin uygulanmasından 24 saat sonra 35 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg ksilazinin intraperitoneal olarak verilmesi ile sakrifiye edildi. Çalışmada sakrifiye edilen BALB/c fareler Resim 2’de verilmiştir. Sakrifiye edilen farelerden, histolojik çalışma ve IL-4, IL-5 ve TSLP doku düzeylerinin değerlendirilmesi için akciğer doku örnekleri ve serum IL-4, IL-5 ve TSLP düzeylerinin değerlendirmesi için intrakardiyak enjeksiyon yolu ile kan örnekleri alındı.



Resim 2. Sakrifiye edilen BALB/c fareler

3.6. Histolojik incelemeler

3.6.1. Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

Doku örnekleri, %10’luk formaldehit ile tespit edildikten sonra, fiksatiflerin uzaklaştırılması amacıyla bir gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon amacıyla yirmişer dakika %70’den %95’e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Yapılan işlemin ardından, yirmişer dakika dört adet sıralı aseton solusyonlarından geçirilerek, iki kez otuzar dakika ksilolde tutuldu. Etüv içerisinde (60°C’lik), iki kez parafin uygulanıp birer saat parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra, dokular parafin bloklar içerisine gömüldü (Tablo 2). Parafin bloklardan inceleme yapmak amacıyla mikrotom aracılığı ile 5 µm’lik ince kesitler alındı.

Tablo 2: Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

İşlem	Madde	Süre
Tespit	%10 formalin	24-48 sa
Fiksatifin uzaklaştırılması	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70 etil alkol	20 dk
	%80 etil alkol	20 dk
	%95 etil alkol	20 dk
	Aseton (4 sıralı uygulama)	20 dk
Şeffaflaştırma	Ksilol	30 dk
	Ksilol	30 dk
Emdirme 60°C etüv	Parafin	1 sa
	Parafin	1 sa
Gömme	Parafin	

3.6.2. Hematoksilen-Eozin (HE) Boyama Metodu

Mikrotom aracılığı ile alınan 5 µ'lık parafin kesitler, deparafinizasyon işlemi için bir gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, yirmişer dakika üç sıralı deparafinizasyon uygulamasına tabi tutuldu. Ardından dehidratasyon işlemi için %95'den %70'e azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler, on dakika akarsu altında yıkandı. On dakika hematoksilen ile boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için on dakika akarsuda yıkanan kesitler, iki dakika eozin boyası ile boyandı. Ardından sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip, havada kurutulan kesitler, şeffaflaştırma amacıyla otuzar dakika iki sıralı işleme tabi tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 3).

Hematoksilen-Eozin ile boyanan akciğer doku örneklerinin genel histolojik özellikleri incelendi. Her deneğe ait preparatlardan, yaklaşık aynı çapta üçer bronşun dörder alanında epitel kalınlığı ve subepitelial düz kas kalınlığı ölçüldü.

Tablo 3: Hematoksilen-Eozin boyama metodu

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	(3 değişim)	20 dk
Dehidratasyon	%95 alkol	Yıkama
	%80 alkol	Yıkama
	%70 alkol	Yıkama
Yıkama	Akarsu	10 dk
Boyama	Hematoksilen	10 dk
Yıkama	Akarsu	10 dk
Boyama	Eozin	2 dk
Yıkama	Akarsu	5 dk
	%80 alkol	1 yıkama
	%95 alkol	1 yıkama
Şeffaflaştırma	Üç kez değişim	20 dk
Kapama	Entellan	

3.6.3. Periodik asid-schiff (PAS) Boyaması

Alınan parafin kesitler, deparafinizasyon işlemi için bir gece 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki bir saat (etüvde), diğer ikisi otuzar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için iki kez sırasıyla, saf alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirildi. Kesitler, distile su ile çalkalandıktan sonra üç ila beş dakika peryodik asit ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için bir ila iki dakika akarsuda yıkanan kesitler, 20-25 dakika schiff boyası ile boyandı. Boyamadan sonra, beş dakika akarsuda tutuldu. Daha sonra dehidratasyon işlemi için sırasıyla %70, %80, %96 ve iki seri saf alkol serilerinden geçirilen kesitler, şeffaflaştırma amacıyla yirmişer dakika üç sefer ksilende tutularak entellan ile kapatıldı (Tablo 4). PAS ile boyanan kesitlerde goblet hücreleri sayıldı.

Tablo 4: Periodik asid-schiff (PAS) boyama metodu

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	1 (etüvde)	1 sa
Deparafinizasyon	2-3 (oda ısısında)	30 dk
Rehidratasyon	%100-100-96-80-70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	10 dk
Boyama	Periodik asit	3-5 dk
Yıkama	Akarsu	1 dk
Boyama	Schiff	20-25 dk
Yıkama	Akarsu	1-2 dk
Boyama	Hematoksilen	2 dk
Yıkama	Akarsu	5 dk
Dehidratasyon	%60-70-80-96-100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen üç kez	Yirmişer dakika
Kapama	Entellan	

3.6.4. Toluidin Blue Boyası

Deparafinize edilen doku kesitleri, 30 dakika toluidin blue boyasında bekletildi. Ardından ksilen serilerinden geçirilip entellan ile kapatıldı. Işık mikroskobu ile mast hücre sayısı değerlendirildi.

3.6.5. Işık mikroskopik değerlendirme

Preparatların fotoğrafları Olympus DP71 model (Olympus Optical, Tokyo, Japan) kamera ile çekildi ve DP70 model mikroskop (Olympus Optical, Tokyo, Japan) ile değerlendirildi. Ölçümler bilgisayar destekli UTHSCSA Image Tool for Windows Version 3.00 software ile yapıldı.

Hematoksilen-Eozin ile boyanan akciğer doku örneklerinin, genel histolojik özellikleri incelendi. Her deneğe ait preparatlardan, yaklaşık aynı çapta üçer bronşun dörder alanında epitel kalınlığı ve subepitelial düz kas kalınlığı ölçüldü ve

ortalamaları alındı. Toluidin boyamasında her denekten alınan kesitlerde, rastgele onar alanda toplam $16.400 \mu\text{m}^2$ olacak şekilde mast hücre sayısı sayıldı ve ortalaması alındı. PAS boyası ile boyanan preparatlarda yapılan goblet hücre sayımında ise, her denekte ayrı ayrı $100 \mu\text{m}$ uzunluğa düşen pozitif hücre sayısı sayılarak ortalaması alındı.

3.7. Akciğer Dokusunda ve Serumda IL-4, IL-5 ve TSLP Ölçümü

Sakrifiye edilen farelerin, sağ akciğer üst lobu 2 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı ve oda ısı ile temas etmeden -80°C 'de çalışma gününe kadar saklandı. Çalışma günü -80°C 'de çıkarılan dokular $+4^\circ\text{C}$ 'de çözüldü. Buz üzerine alınan dokulardan elde edilen 60-80 mg'lik örnekler, önceden soğutulmuş içinde 5 mm çapında paslanmaz çelik boncuk ve 1/7 oranında fosfat tamponu (pH: 7,2) olan tüpe alınarak homojenat elde edildi. Elde edilen homojenat, $+4^\circ\text{C}$ 'de 5000 G'de on dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen supernatanlardan IL-4, IL-5 ve TSLP düzeyleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda ELISA yöntemiyle çalışıldı (RayBio Mouse IL-4 Kit, RayBio Mouse IL-5 Kit, Mouse TSLP Kit). ELISA plakları 450 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirildi (BioTek Synergy HT, USA). Ayrıca farelerin serumlarından da IL-4, IL-5 ve TSLP düzeyleri eş zamanlı olarak aynı yöntemle ölçüldü.

3.8. İstatistiksel analiz

Çalışmada elde edilen parametrelerin değerlendirilmesinde Statistical Package for Social Sciences (SPSS 21, Inc, Chicago, IL, USA) paket programı kullanıldı. Histolojik veriler ile serum ve akciğer doku örneklerindeki sitokin düzeylerinin değerlendirilmesinde (bağımsız çoklu grup farklılıklarının karşılaştırılması), Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanıldı. Kruskal Wallis Varyans Analizi ile istatistiksel anlamlılık saptanan değişkenlerde ikili grup farklılıklarının incelemesinde (post hoc) Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. Sürekli değişkenler, ortalama \pm standart sapma (SD) ve kategorik değişkenler, sayı ve yüzde olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi ise $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma, 6-8 haftalık toplam 35 adet BALB/c farede yapıldı. Grup I'de beş fare ve diğer gruplarda ise onar fare olacak şekilde gruplar belirlendi. Çalışma süresinde, 4 fare ex olduğu için toplam 31 fare ile çalışma tamamlandı. Çalışma protokolünün tamamlanmasının ardından, denekler sakrifiye edilerek akciğer örneklerinden histolojik incelemeler yapıldı. Tüm grupların düz kas kalınlığı, epitel yüksekliği, mast hücre sayısı ve goblet hücre sayılarını içeren histolojik veriler Tablo 5'de verilmiştir. Tüm gruplar karşılaştırıldığında; düz kas kalınlığı, epitel hücre yüksekliği, mast hücre sayısı ve goblet hücre sayıları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p<0,05$), (Tablo 5). Bu sonuçlar doğrultusunda, gruplar arasında Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi uygulandı.

Tablo 5: Tüm gruplarda histolojik verilerin karşılaştırılması

	Kontrol (Grup I) (n=5)	Plasebo (Grup II) (n=8)	Deksametazon (Grup III) (n=9)	Bosentan (Grup IV) (n=9)	P
Subepitelyal düz kas kalınlığı (μm)	5,25 \pm 0,52	11,95 \pm 0,93	6,19 \pm 0,68	8,13 \pm 1,48	0,0001
Epitel yüksekliği (μm)	14,52 \pm 1,13	23,67 \pm 3,97	14,08 \pm 0,64	15,21 \pm 2,73	0,0001
Mast hücre sayısı /16400 (μm^2)	0,0037 \pm 0,0044	0,033 \pm 0,0081	0,0148 \pm 0,0114	0,0138 \pm 0,0041	0,0001
Goblet hücre sayısı /100 μm	0,24 \pm 0,24	2,88 \pm 1,53	0,42 \pm 0,4	1,29 \pm 1,14	0,004

Kontrol grubu (Grup I) ile plasebo tedavi verilen astım grubunun (Grup II) histolojik verileri karşılaştırıldığında; plasebo grubunda düz kas ve epitel

kalınlıklarının, mast hücre sayısının ve goblet hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış olduğu görüldü ($p<0,05$), (Tablo 6).

Tablo 6: Kontrol grubu ile plasebo grubunun histolojik verilerinin karşılaştırılması

	Kontrol (Grup I)	Plasebo (Grup II)	P
Subepitelyal düz kas kalınlığı (μm)	5,25 \pm 0,52	11,95 \pm 0,93	0,0001
Epitel yüksekliği (μm)	14,52 \pm 1,13	23,67 \pm 3,97	0,023
Mast hücre sayısı /16400 (μm^2)	0,0037\pm0,0044	0,033\pm0,0081	0,0001
Goblet hücre sayısı /100 μm	0,24 \pm 0,24	2,88 \pm 1,53	0,014

Plasebo grubu (Grup II) ile bosentan grubunun (Grup IV) histolojik parametreleri karşılaştırıldığında, bosentan grubunun epitel yüksekliğinin istatistiksel olarak anlamlı azaldığı ($p<0,05$); bununla birlikte diğer histolojik parametrelerde azalma olmasına rağmen farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0,05$), (Tablo 7).

Tablo 7: Plasebo grubu ile bosentan grubunun histolojik verilerinin karşılaştırılması

	Plasebo (Grup II)	Bosentan (Grup IV)	P
Subepitelyal düz kas kalınlığı (μm)	11,95 \pm 0,93	8,13 \pm 1,48	0,156
Epitel yüksekliği (μm)	23,67 \pm 3,97	15,21 \pm 2,73	0,015
Mast hücre sayısı /16400 (μm^2)	0,033\pm0,0081	0,0138\pm0,0041	0,093
Goblet hücre sayısı /100 μm	2,88 \pm 1,53	1,29 \pm 1,14	0,398

Plasebo grubu (Grup II) ile deksametazon grubunun (Grup III) histolojik verileri karşılaştırıldığında, deksametazon uygulamasının düz kas kalınlığını ve epitel yüksekliğini, mast hücre sayısını ve goblet hücre sayısını istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttığı saptandı ($p<0,05$), (Tablo 8).

Tablo 8: Plasebo grubu ile deksametazon grubunun histolojik verilerinin karşılaştırılması

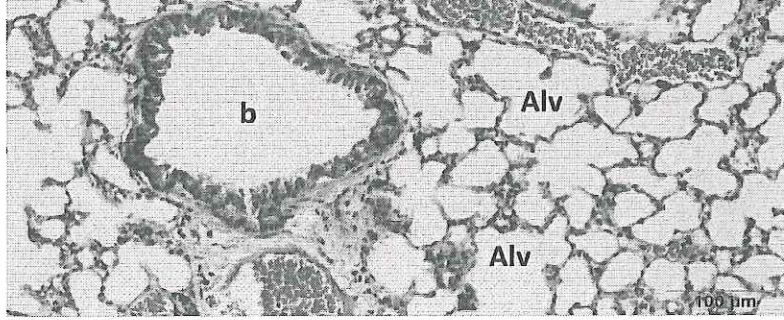
	Plasebo (Grup II)	Deksametazon (Grup III)	P
Subepitelyal düz kas kalınlığı (μm)	11,95 \pm 0,93	6,19 \pm 0,68	0,001
Epitel yüksekliği (μm)	23,67 \pm 3,97	14,08 \pm 0,64	0,0001
Mast hücre sayısı /16400 (μm^2)	0,033\pm0,0081	0,0148\pm0,0114	0,031
Goblet hücre sayısı /100 μm	2,88 \pm 1,53	0,42 \pm 0,4	0,008

Bosentan grubu (Grup IV) ile deksametazon grubunun (Grup III) histolojik verileri karşılaştırıldığında ise; iki grup arasında düz kas kalınlığı, epitel yüksekliği, mast hücre sayısı ve goblet hücre sayısı açısından anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$), (Tablo 9).

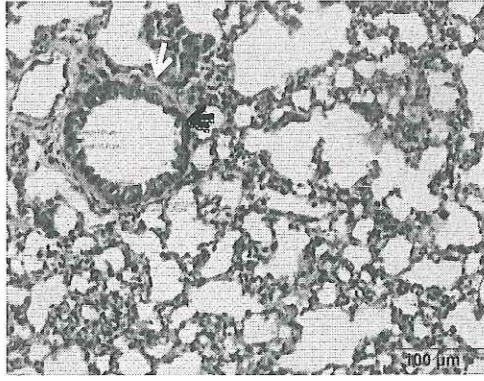
Tablo 9: Deksametazon grubu ile bosentan grubunun histolojik verilerinin karşılaştırılması

	Deksametazon (Grup III)	Bosentan (Grup IV)	P
Subepitelyal düz kas kalınlığı (μm)	6,19 \pm 0,68	8,13 \pm 1,48	0,615
Epitel yüksekliği (μm)	14,08 \pm 0,64	15,21 \pm 2,73	1,000
Mast hücre sayısı /16400 μm^2	0,0148\pm0,0114	0,0138\pm0,0041	1,000
Goblet hücre sayısı /100 μm	0,42 \pm 0,4	1,29 \pm 1,14	0,969

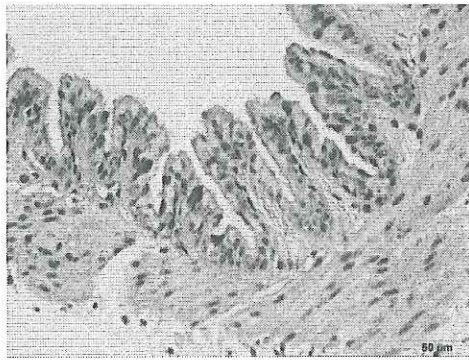
Tüm grupların ışık mikroskopik görünümleri aşağıda verildi (Resim 3-18). Işık mikroskopik çalışmalarda kontrol grubunda (Grup I) histolojik bulgular normal saptandı (Resim 3-6).



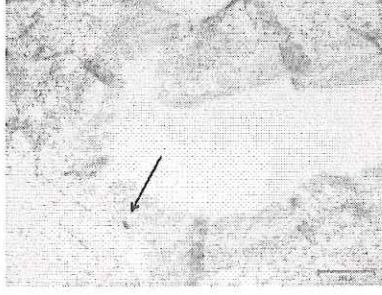
Resim 3: Kontrol grubuna ait akciğer kesiti (HE boyaması). Normal akciğer parankimi ve hava yolları gözlenmekte (Alv: Alveol, b: Bronşiol). Scale bar: 100 µm.



Resim 4: Kontrol grubuna ait akciğer kesiti (HE boyaması). Epitel boyunun ve subepitel kalınlığının normal olduğu gözlenmekte. (Siyah ok: Epitel kalınlığı, sarı ok: Subepitelyal düz kas kalınlığı). Scale bar: 100 µm.

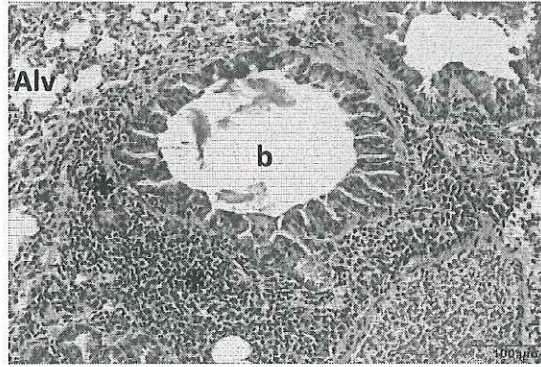


Resim 5: Kontrol grubuna ait akciğer kesiti (PAS boyaması). Epitelde PAS pozitif goblet hücreleri gözlenmemekte. Scale bar: 50 µm.

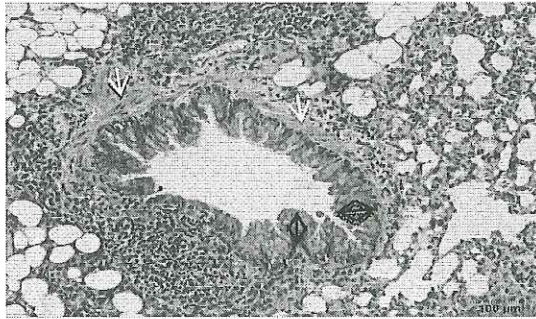


Resim 6: Kontrol grubuna ait akciğer kesiti (Toluidin blue boyaması). Akciğer parankimasında mast hücresi artışı gözlenmemekte. (Siyah ok: Mast hücresi). Scale bar: 100 μ m.

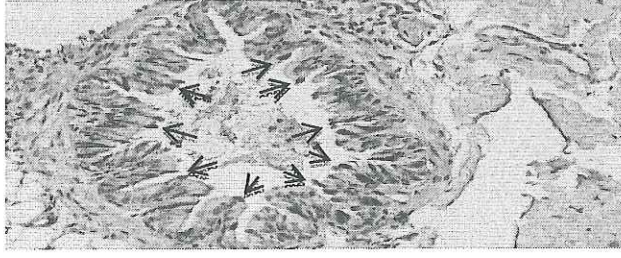
Işık mikroskopik çalışmalarda plasebo grubuna (Grup II) ait histolojik bulgular Resim 7-10'da gösterilmiştir.



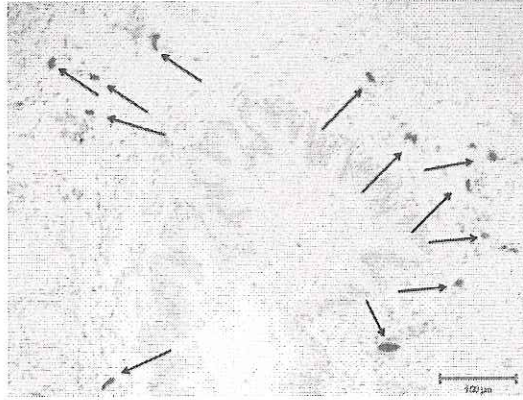
Resim 7: Plasebo (Astım) grubuna ait akciğer kesiti (HE boyaması). Solunum yolları epitelinin düzensiz olduğu, akciğer parankimasının enflamatuvar hücreler içerdiği (*) gözlenmekte. (Alv: Alveol, b: Bronşiol, *: Enflamasyon). Scale bar: 100 μ m.



Resim 8: Plasebo (Astım) grubuna ait Akciğer kesiti (HE boyaması). Epitel boyunun ve subepitel kalınlığının artmış olduğu gözlenmekte. (Çift yönlü ok: Epitel kalınlığı, sarı ok: Subepitelyal düz kas kalınlığı). Scale bar: 100 μ m.

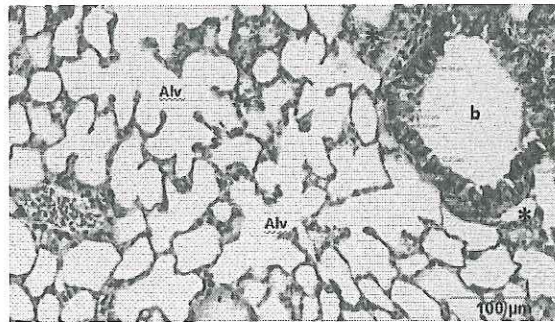


Resim 9: Plasebo (Astım) grubuna ait akciğer kesiti (PAS boyaması). Epitelde artmış PAS pozitif goblet hücreleri ve PAS pozitif materyal gözlenmekte. (Siyah ok: PAS pozitif goblet hücresi). Scale bar: 100 µm.

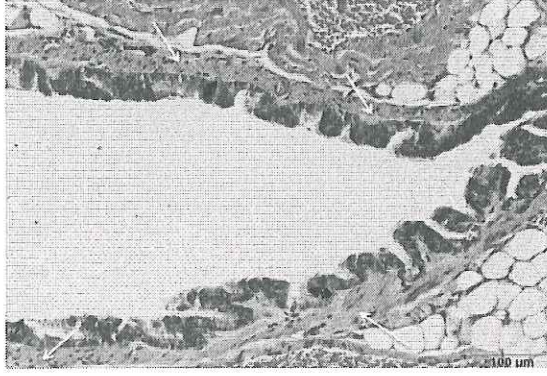


Resim 10: Plasebo (Astım) grubuna ait Akciğer kesiti (Toluidin blue boyaması). Akciğer parankimasında artmış mast hücreleri gözlenmekte (Siyah ok: Mast hücresi). Scale bar: 100 µm.

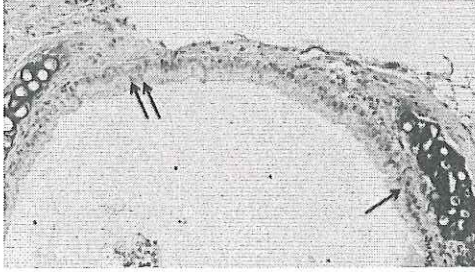
Işık mikroskopik çalışmalarda deksametazon grubuna (Grup III) ait histolojik bulgular Resim 11-14'de gösterilmiştir.



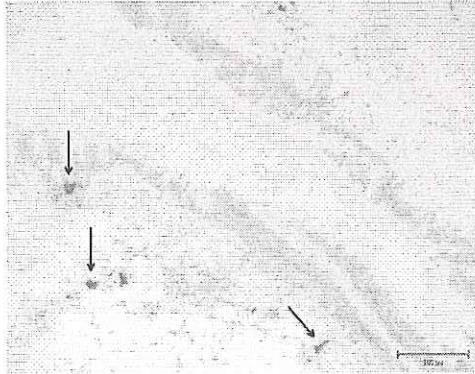
Resim 11: Deksametazon grubuna ait Akciğer kesiti (HE boyaması). Düzensiz hava yolları ve akciğer parankimi ile enflamasyonun azaldığı gözlenmekte (Alv: Alveol, b: Bronşiol, *: İnflamasyon). Scale bar: 200 µm.



Resim 12: Deksametazon grubuna ait akciğer kesiti (HE boyaması). Epitel boyunun ve subepitel kalınlığının astım grubuna göre azaldığı gözlenmekte. (Çift yönlü ok: Epitel kalınlığı, sarı ok: Subepitelyal düz kas kalınlığı). Scale bar: 100 µm.

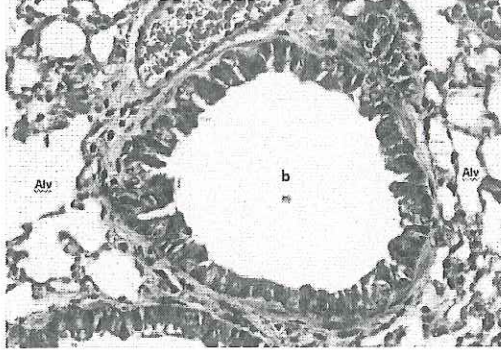


Resim 13: Deksametazon grubuna ait akciğer kesiti (PAS boyaması). Epitelde PAS pozitif goblet hücrelerinin astım grubuna göre azaldığı gözlenmekte. (Siyah ok: PAS pozitif goblet hücresi). Scale bar:100 µm.

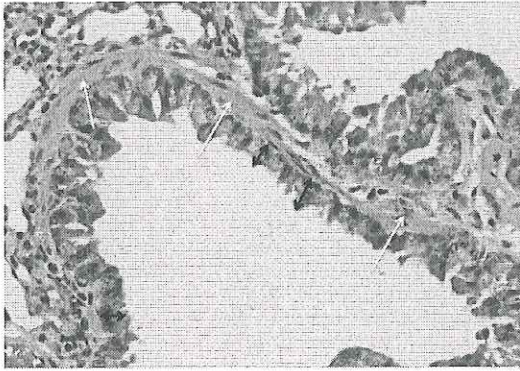


Resim 14: Deksametazon grubuna ait akciğer kesiti (Toluidin blue boyaması). Akciğer parankimasında mast hücrelerinin astım grubuna göre azaldığı gözlenmekte. (Siyah ok: Mast hücresi). Scale bar: 100 µm.

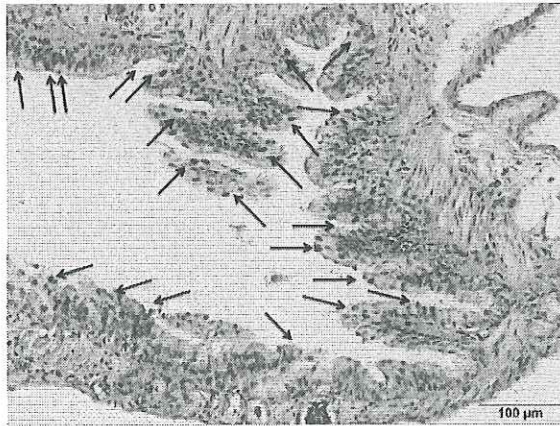
Işık mikroskopik çalışmalarda bosentan grubuna ait histolojik bulgular Resim 15-18'de gösterilmiştir.



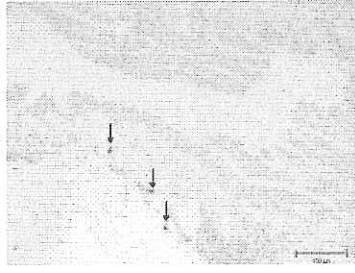
Resim 15: Bosentan grubuna ait akciğer kesiti (HE boyaması). Normale yakın akciğer parankimi ve hava yolları gözlenmekte (Alv: Alveol, b: Bronşiol). Scale bar: 50 μ m.



Resim 16: Bosentan grubuna ait akciğer kesiti (HE boyaması). Epitel boyunun ve subepitelyal kalınlığın azalmış olduğu gözlenmekte. (Çift yönlü ok: Epitel kalınlığı, sarı ok: Subepitelyal düz kas kalınlığı). Scale bar: 50 μ m.



Resim 17: Bosentan grubuna ait Akciğer kesiti (PAS boyaması). Epitelde PAS pozitif goblet hücreleri ve PAS pozitif materyal gözlenmekte. (Siyah ok: PAS pozitif goblet hücresi). Scale bar: 100 μ m.

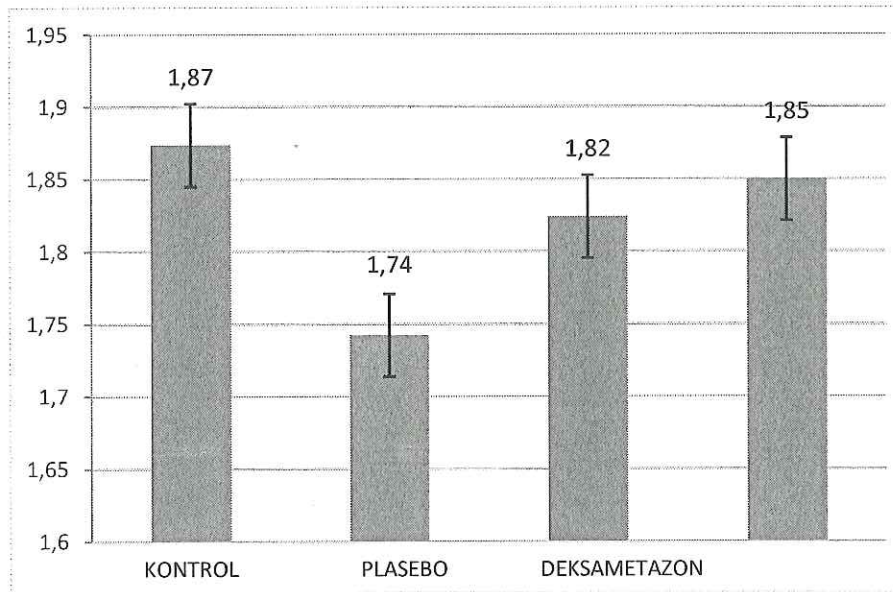


Resim 18: Bosentan grubuna ait Akciğer kesiti (Toluidin blue boyaması). Akciğer dokusunda intraepitelial az sayıda mast hücresi gözlenmekte. (Siyah ok: Mast hücresi). Scale bar: 100 μ m.

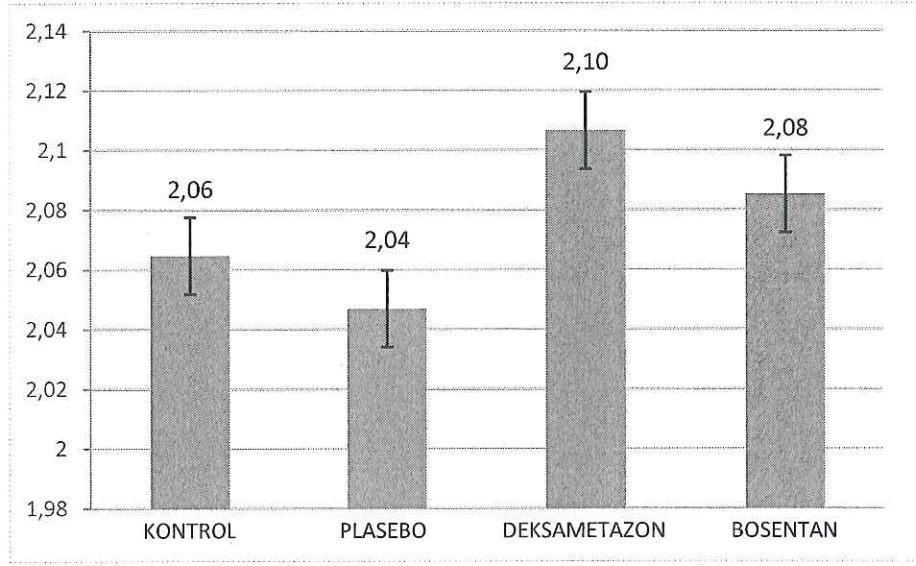
Serum IL-4, IL-5 ve TSLP serum düzeylerinde gruplar arasında farklılık saptanmadı ($p>0,05$), (Tablo 10), (Şekil 4-6).

Tablo 10: Gruplar arasındaki serum IL-4 (pg/ml), IL-5 (pg/ml) ve TSLP (pg/ml) düzeyleri

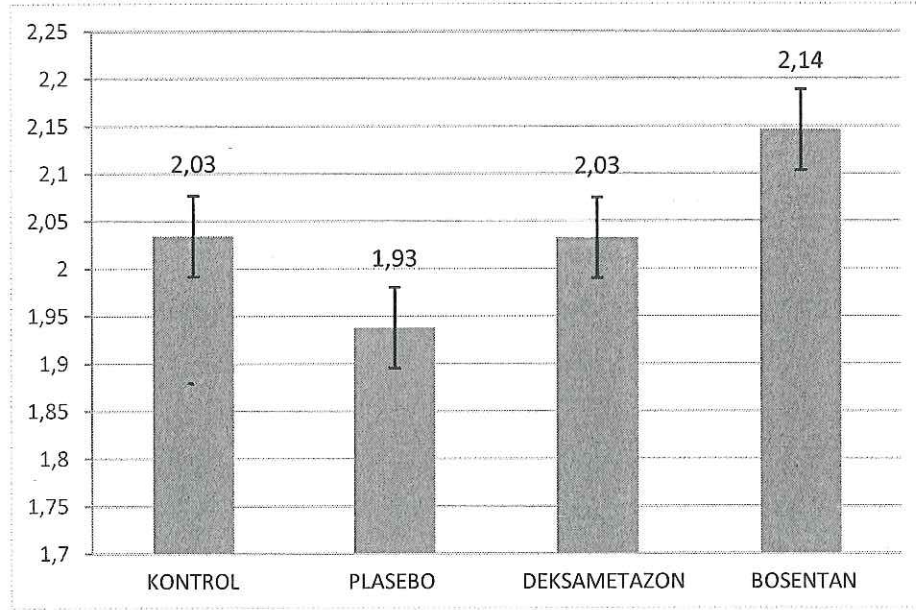
Serum	Kontrol (Grup I)	Plasebo (Grup II)	Deksametazon (Grup III)	Bosentan (Grup IV)	P
IL-4	1,87 \pm 0,14	1,74 \pm 0,18	1,82 \pm 0,3	1,85 \pm 0,29	0,705
IL-5	2,06 \pm 0,07	2,05 \pm 0,04	2,11 \pm 0,05	2,09 \pm 0,07	0,172
TSLP	2,03 \pm 0,22	1,94 \pm 0,08	2,03 \pm 0,19	2,15 \pm 0,15	0,062



Şekil 4: Gruplar arasındaki serum IL-4 düzeyleri (pg/ml)



Şekil 5: Gruplar arasındaki serum IL-5 düzeyleri (pg/ml)



Şekil 6: Gruplar arasındaki serum TSLP düzeyleri (pg/ml)

Akciğer dokusundaki sitokin düzeyleri değerlendirildiğinde; IL-4, IL-5 ve TSLP düzeyleri astım grubunda (Grup II) yüksek bulunmakla birlikte, gruplar arasında IL-4 ve TSLP düzeylerinde farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$), (Tablo 11). Tüm gruplar karşılaştırıldığında, sadece doku IL-5 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p<0,05$), (Tablo 11), (Şekil 7-9).

Tablo 11: Gruplar arasında akciğer dokusundaki IL-4 (pg/ml), IL-5 (pg/ml) ve TSLP (pg/ml) düzeylerinin karşılaştırılması

Doku	Kontrol (Grup I)	Plasebo (Grup II)	Deksametazon (Grup III)	Bosentan (Grup IV)	P
IL-4	6,06 ± 1,77	6,89 ± 2,49	5,65 ± 1,05	4,23 ± 0,88	0,053
IL-5	4,37 ± 1,11	5,06 ± 1,38	4,36 ± 0,62	3,43 ± 0,55	0,01
TSLP	2,3 ± 0,41	2,46 ± 0,21	2,68 ± 0,19	2,62 ± 0,26	0,062

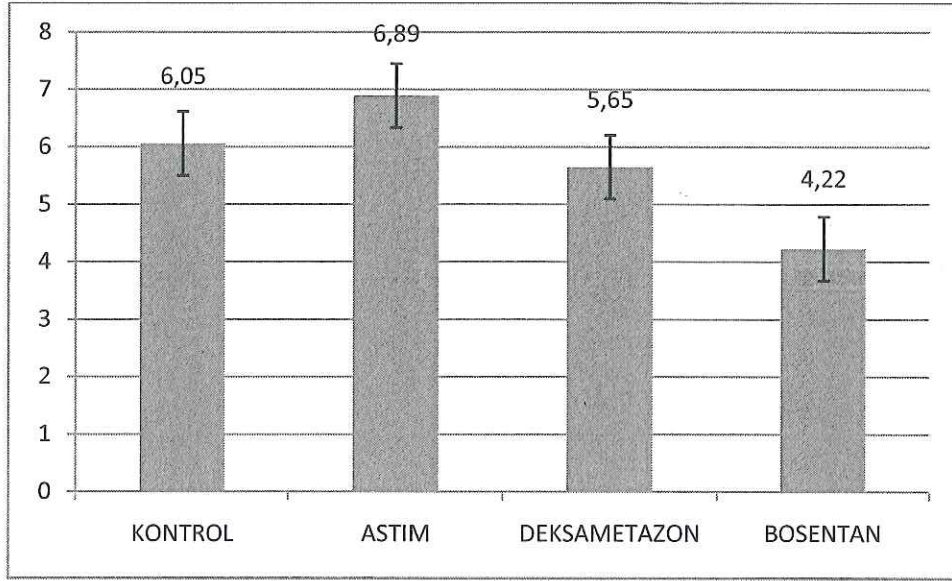
Doku IL-5 düzeyinde saptanan anlamlı farklılık için Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi uygulandı. Astım grubu (Grup II) ile bosentan grubu (Grup IV) arasında IL-5 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. IL-5 düzeylerinin bosentan alan grupta belirgin düşük olduğu görüldü ($p < 0,05$), (Tablo 12). Deksametazon grubu (Grup III) ile bosentan grubu (Grup IV) arasında ise, IL-5 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p > 0,05$), (Tablo 13)

Tablo 12: Plasebo ve bosentan grupları arasında akciğer dokusundaki IL-5 düzeylerinin karşılaştırılması (pg/ml)

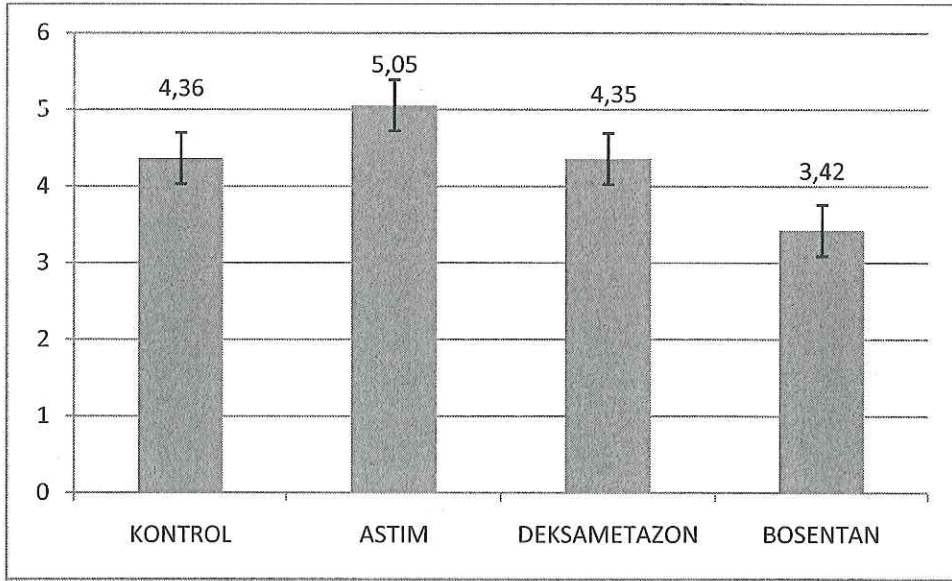
Doku	Plasebo (Grup II)	Bosentan (Grup IV)	P
IL-5	5,06 ± 1,38	3,43 ± 0,55	0,008

Tablo 13: Deksametazon ve bosentan grupları arasında akciğer dokusundaki IL-5 düzeylerinin karşılaştırılması (pg/ml)

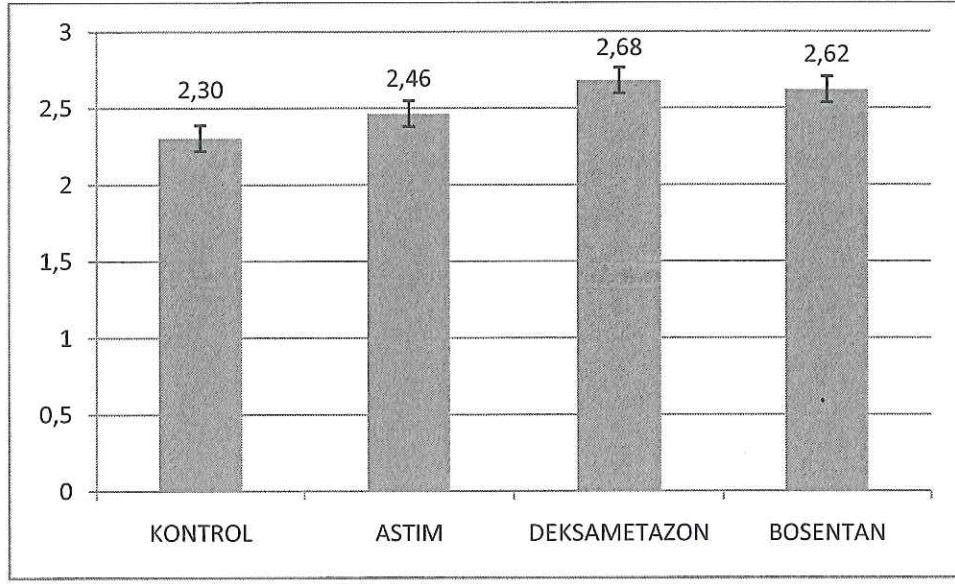
Doku	Deksametazon (Grup III)	Bosentan (Grup IV)	P
IL-5	4,36 ± 0,62	3,43 ± 0,55	0,086



Şekil 7: Gruplar arasında akciğer dokusundaki IL-4 düzeyleri (pg/ml)



Şekil 8: Gruplar arasında akciğer dokusundaki IL-5 düzeyleri (pg/ml)



Şekil 9: Gruplar arasında akciğer dokusundaki TSLP düzeyleri (pg/ml)

5. TARTIŞMA

Astım, enflamasyona neden olan mast hücreleri, makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler, eozinofiller ve T lenfositlerin patogeneizde rol aldığı geri dönüşümlü hava yolu obstrüksiyonu ile karakterize havayollarının kronik enflamatuvar bir hastalığıdır (1, 55, 100). Enflamasyon astım patogenezinin temelini oluşturmaktadır ve astımda gözlenen enflamatuvar sürecin astım semptomlarının ortaya çıktığı dönemden önce başladığı, hastanın asemptomatik olduğu dönemlerden itibaren ilerleyici olarak devam ettiği gösterilmiştir (101).

Havayolu epitelinde irritasyona sebep olan allerjen ya da oksidan maddeler epitel hücrelerini aktive ederler. Aktive olan epitel hücrelerinden salınan TSLP, IL-4, IL-5, IL-33, ET-1 gibi sitokinler enflamatuvar cevabın başlamasına sebep olurlar (3, 93). Bu sitokinler arasında ET-1'in, astım patogenezinde irritan maddelerle karşılaşıldıktan sonra en erken salınan ve diğer sitokinlerin uyarılmasını sağlayan mediyatör olduğu düşünülmektedir. Finsnes ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (6); akciğer dokusundaki ET-1 mRNA düzeyindeki artışın, TNF-alfa, IL-1 β ve IL-8 düzeylerinde artışa sebep olduğu saptanmıştır. Çalışmada astım yapıcı etkisi bulunan bir madde olan sephadex, intratrakeal olarak verildikten sonra ortaya çıkarılan eozinofilik hava yolu enflamasyonunun ardından, ilk yükselen sitokin gen ekspresyonunun 15 dakika içerisinde ortaya çıkan ET-1 olduğu gözlenmiştir. Endotelin 1'in diğer enflamatuvar mediyatörlerden önce salınması, eozinofilik havayolu enflamasyonunun gelişmesinde ve diğer sitokinlerin salınımında anahtar rolü üstlendiği hipotezinin geliştirilmesini sağlamıştır. Ayrıca sitokin düzeyinin ilk yarım saatte pik düzeyine ulaştığı gözlenmiştir (6). Astımda enflamatuvar yanıtın ilerlemesinde IL-4 ve IL-5 gibi uyarıcı sitokinlerle birlikte IL-9 ve IL-13 salınımı da önemli rol oynamaktadır (102). IL-4, Th-2 lenfositlerin uyarılmasında, IgE üretiminin artırılmasında ve enflamasyonun başlamasında görevli iken; IL-5 eozinofillerin farklılaşmasını sağlamaktadır (5, 70). IL-13 ise enflamasyonda mukus üretimini ve bronş aşırı duyarlılığını arttırmaktadır (5). Yeni keşfedilen sitokinlerden interlökin 25 ve timik stromal lenfopietinin de astım patogenezinde etkili olduğu gösterilmiştir (4, 74). IL-25; IL-5 ve IL-13 salınımını uyararak alerjik immün yanıtın başlamasına aracılık yaparken (75), timik stromal lenfopietin, Th-2 hücrelerde

sitokin üretimini ve dendritik hücre polarizasyonunu başlatmaktadır. B hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını da desteklediği gösterilen timik stromal lenfopoitinin, Th-2 aracılı enflamatuvar yanıtta kritik rol oynadığı düşünülmektedir (4). Enflamasyonun başlangıcında salınan TSLP ile uyarılan dendritik hücrelerin antijeni alarak lenf nodundaki T lenfositlere tanıtmasıyla ilerleyen süreç, Th-2 lenfositlerin ve B lenfositlerin olgunlaşmasıyla devam etmektedir. Mast hücreleri ve bazofiller salınan diğer sitokinler aracılığı ile enflamasyon sürecinde uyarılırken, dokuda B lenfositlerden farklılaşan plazma hücreleri de bu hücre grubunun uyarılmasına katkı sağlamaktadır. Doku cevabında uyarılan enflamatuvar hücreler, dokuya göçen Th-2 hücrelerle birlikte enflamatuvar cevabın daha da güçlenmesine neden olmaktadır (93).

Astımlı bireylerde ortaya çıkan hava yolundaki abartılı enflamatuvar cevap sonucunda; bazal membranın kalınlaşması, hava yolu duvar elastisitesinin azalması, subepitelyal kollajen birikimi, düz kas hipertrofisi, goblet hücre hiperplazisi ve artmış vazkülerite ortaya çıkmaktadır (3, 93). Kronik enflamatuvar yanıtla bağlı hava yolunda görülen bu geri dönüşümsüz değişiklikler ‘remodelling’ (yeniden yapılanma) olarak adlandırılır (80). “Remodelling”, hava yolu epiteli ve submukozadaki patolojik yapısal değişikliklerle karakterizedir. Epiteldeki değişiklikler goblet hücre hiperplazisi ve epitel müsin depolarındaki artışı içerir. Submukozal değişiklikler ise; subepitelyal fibrozis, submukozal bezlerde hücrelerin genişlemesi, düz kas hücrelerinde hipertrofi, hiperplazi ve dokuda vazkülerite artışıdır. Subepitelyal fibrozis; bazal membranda lamina retikularisinde kollajen I, kollajen III, kollajen V, fibronektin ve tenascin C’nin birikimine bağlı ortaya çıkmaktadır (93).

Hava yolundaki patolojik değişiklikler, bronkokonstrüksiyona yol açar ve inhale edilen iritan ya da allerjen maddelere abartılı enflamatuvar yanıtın ortaya çıkmasına zemin hazırlar. Astımı olan bireylerin bu patolojik değişikliklere bağlı olarak, alevlenmeye yatkınlıklarının arttığı düşünülmektedir (93). Hava yollarında oluşan geri dönüşümsüz obstrüksiyona bağlı olarak, enflamasyonun kontrol altına alınamaması ve solunum fonksiyonlarında progresif kayıplar görülebilmektedir (103).

Enflamatuvar yanıtın başlangıcında salınan ET-1 ve enflamasyon sürecinin devamında salınan TNF- α , transforming growth faktör- β , fibroblast büyüme faktörü-2, vasküler endotelial growth faktör, triptaz ve kinaz gibi sitokinler de “remodelling”e katkıda bulunmaktadır (9, 59). “Remodelling” sürecinde; vasküler yapılanmanın ana yöneticisi vasküler endotelial growth faktörken, düz kas hipertrofisi ve hiperplazisinde ET-1 rol oynamaktadır (80, 104, 105). Vasküler endotelial growth faktör, endotelial nitrik oksit sentetaz aktivitesi ile nitrik oksit sentezlenmesini ve vazodilatasyon gelişmesini sağlar. Bu etkisi nedeniyle vasküler permeabilite artışı ve buna bağlı olarak da ödem ortaya çıkmaktadır. VEGF anjiogenetik etkilerini ise, endotelial hücre proliferasyonunu uyararak oluşturur (80, 104). Kanawaza ve arkadaşlarının yaptığı eozinofilik bronşiolit ve astımda VEGF düzeylerinin değerlendirildiği bir çalışmada (106), astımda VEGF düzeyinin yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca astımlı hastalarda damar permeabilitesindeki artış ile VEGF düzeyleri arasında ilişki saptanmıştır. Astım ve eozinofilik bronşiolitin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada da (107), benzer şekilde astımlı grupta VEGF düzeylerinin arttığı ve vasküler remodellingin olduğu gözlenmiştir. ET-1 ise, TGF- β 2 ile birlikte fibroblastları aktive ederek fibroblastların ve miyofibroblastların farklılaşmasını sağlarken, havayolu düz kas hücrelerine karşı da mitojenik etki göstermektedir (70, 105). Güçlü bronkokonstrüktör etkisi de olan ET-1’in, steroide yanıt alınmayan astımlı hastalarda, klinikle korelasyon gösterdiği düşünülmektedir (105).

İnsanlarda görülen astımın kronik patolojik değişiklikleri ve kliniği, benzer şekilde farelerde de görülmektedir. Çalışmamızda; farelerde kronik astım modelinin oluşturulmasında en sık uygulanan ve hastalığı en iyi taklit eden modellerden birisi olan Temelskovski ve arkadaşlarının yaptığı ovalbumin ile astım modeli oluşturulan metod kullanıldı (98). BALB/c fareler ovalbumine yüksek IgE yanıtı olan ve bu nedenle patofizyolojik değişiklikleri en iyi taklit eden hayvanlardır (98).

Çalışmamızda kronik astımı destekleyen histopatolojik bulgulardan subepitelial düz kas tabakası kalınlığı, epitel yüksekliği, goblet hücre sayısı ve mast hücre sayısı değerlendirildi. Tüm parametreler astım modeli oluşturulan farelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Bu bulgular, çalışmamızdaki astım modelinin başarı ile oluşturulduğunu

göstermektedir. Doku sitokin düzeyleri değerlendirildiğinde ise; IL-4, IL-5 ve TSLP düzeylerinin istatistiksel olarak anlamsız olmakla birlikte astım grubunda daha yüksek olduğu görüldü.

Astım kliniği bronkokonstrüksiyon ve buna bağlı öksürük atakları, nefes darlığı, hışıltılı solunum ve göğüste sıkışma hissi gibi özellikle gece sabaha karşı ortaya çıkan yakınmalar şeklinde ortaya çıkar. Egzersiz, enfeksiyon, allerjenler ve iritanlara maruziyet, ağlama/gülme gibi faktörler de hastalığın kliniğini değiştirebilmektedir (2).

Astım kliniği göz önüne alındığında tedavide, akut dönemde kullanılan semptom giderici ve antiinflamatuvar etkinliği yüksek kontrol edici ilaçlar olmak üzere iki grup ilaç tedavisi kullanılmaktadır. İlaçlar; inhale kortikosteroidler, lökotrien reseptör antagonistleri, kombine tedavide kullanılabilen inhale uzun etkili beta agonistler, oral steroidler, kromonlar ve metilksantinler olarak sınıflandırılmaktadır (1). Tedavinin ilk basamağı, hastanın ve ailesinin bilgilendirilmesi ve tedavi için hekim-hasta-aile işbirliğinin sağlanmasıdır. Astımın tedavisi hastanın uyumuna ve hastalık şiddetine göre değişkenlik göstermektedir. Kronik astım tedavisinin amacı, kliniği kontrol altına almak ve hasta uyumunu sağlamaktır. Uzun süreli ilaç tedavisinde hastalığın kontrolünün sağlanmasında gözlenen en büyük engeller; hasta uyum problemleri, hastalarda ya da ailelerdeki steroid korkusu veya uyumun zaman içinde kişisel isteksizliğe bağlı olarak giderek azalmasıdır. Uyumun azalması ve hastalığın kontrol edilememesi sonucunda ilaç dozlarının yükseltilmesi ilaca bağlı ciddi yan etkilere ve tedavi maliyetinde artmaya neden olmaktadır (108).

Tedavide kullanılan inhale β_2 adrenerjik reseptör agonistleri 1969 yılında, sonrasında ise inhale glukokortikoidler 1974 yılında FDA onayı almıştır (93). Bu iki grup ilaç, lökotrien reseptör antagonistleri ve IgE antagonistleri gibi başka ek tedavi seçeneklerinin de olmasına rağmen, günümüzde halen astımdaki ana tedavi gruplarını oluşturmaktadır. Ağır astımlı hastalarda, hastalığın kontrol edilmesinde ve astım atağından korunmada bu ilaç kombinasyonları kullanılmaktadır. Tedavi seçenekleri uzun etkili β_2 -adrenerjik reseptör antagonistleri ile kombine yüksek doz inhale kortikosteroidler, oral kortikosteroidler, lökotrien reseptör antagonistleri, uzun etkili antikolinergikler ve IgE antagonistlerini kapsamaktadır (1). Mevcut tedavi

kılavuzlarında, hastalığın şiddeti arttıkça, kortikosteroid dozunun artırılması tavsiye edilmektedir (2). Steroid tedavisine yeterli yanıt alınmadığında ise, IgE antagonistleri gibi ilave tedaviler önerilmektedir. Tip 2 enflamasyonda görülen eozinofil sayısında artış, ağır astımlı hastalarda daha yüksek oranda görülmektedir ve kombine tedaviden fayda görülmesi, iki ilaç sınıfının da alerjik hava yolu enflamatuvar cevabında benzer mekanizmalarla etki gösterdiğini düşündürmektedir. Günümüzde astımda kortikosteroid cevabındaki yetersizlik, steroid direnci olarak düşünülmekte ve bu bireylerin kortikosteroidlere verilen sistemik yanıtta bir bozukluğa sahip oldukları düşünülmektedir. Bu tip steroid direncinin görüldüğü ve hastalığın kontrol altına alınmadığı durumlar için tedavi kılavuzlarında önerilen strateji, steroid dozunun artırılmasıdır (93). Steroidlerin yan etkilerine rağmen tedaviden çıkarılmaması ve radikal ilaç değişikliklerine gidilmemesinin nedeni, tedavide kullanılan ajanlar içerisinde astım tedavisinin hemen her basmağında kullanılan ve şimdiye kadar bilinen en etkili ilaç sınıfı olmaları nedeniyledir (101).

Kortikosteroidler hücre içerisine pasif difüzyon yolu ile girerler. Alveoler endotel hücrelerinde glukokortikoid reseptörlerine bağlanarak DNA düzeyinde protein sentezini etkiler ve nükleer faktör- κ B (NF- κ B) ile aktive edici protein (AP-1) başta olmak üzere çeşitli hücre içi proteinlerin sentezlerinin yeniden düzenlenmesine sebep olurlar. Hücre içi aktive edici sinyal üretiminde azalma ile sitokin üretimini de baskırlar ve bu sayede enflamatuvar hücrelerin aktivasyonu ve göçünü engellerler. Endotel hücrelerinde sitokinlerin salınımının azalmasına bağlı olarak vazküler permeabilite ve ödem oluşumunu önlerler. Fosfolipaz A2 enzimini inhibe eden lipokortin-1 proteininin sentezini stimüle ederek arışidonik asit ve platelet aktive edici faktör gibi mediyatörlerin yapımını önlerler. Ayrıca β 2 adrenerjik reseptör proteininin transkripsiyonunu artırarak pulmoner β 2 adrenerjik reseptörlerinin down regülasyonunu sağlarlar ve β 2 agonistlere tolerans gelişimini önlerler (1).

İnhaler steroid tedavisinin, atak sıklığını azalttığı ve yaşam kalitesini arttırdığı gösterilmiştir (1, 88, 101). Etkin olmalarına rağmen kortikosteroidlerin lokal ve sistemik ciddi yan etkileri bulunmaktadır. Steroid kullanımına bağlı orafaringiyal kandidiyazis, diş gelişim bozuklukları, disfoni, kaba öksürük, ciltte atrofi, strialar, yara iyileşmesinde gecikme gibi lokal yan etkilerle birlikte; uzun süreli ve yüksek

dozda kullanımına bağlı olarak büyüme hızında duraklama, hipertansiyon, jinekomasti, hirsutizm, akne, myopati, diabetes mellitus, glokom, katarakt ve bağışıklık sisteminde baskılanma gibi sistemik yan etkiler görülebilir (1, 87, 88). Steroidlerin yan etkileri göz önüne alındığında astım tedavisinde yenilikçi ve nonsteroidal tedavi arayışlarının değerlendirilmesi gerekmektedir.

Bosentan, non-selektif endotelin reseptör antagonistidir. ET-1 ve diğer endotelin peptidlerin endotelin A ve endotelin B reseptörlerine bağlanmamaları için onlarla yarışır. Bu şekilde diğer reseptörlere bağlanmadan yarışmalı olarak endotelin reseptörlerini antagonize eder ve etkisini ortaya çıkarır (7). Endotelin reseptör antagonizmasının bulunmadığı pulmoner arteriyel hipertansiyon ve kalp yetersizliğinde, yükselen ET-1 konsantrasyonunun hastalığın ciddiyeti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (109-111). Bosentan, endotelin A ve endotelin B reseptörlerine bağlanarak kardiyak stimülasyon yapmadan pulmoner ve sistemik vasküler direnci azaltır (7). Bu özelliğinden dolayı 2001 yılında FDA tarafından pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisi ve yönetiminde kullanılmak üzere onay almıştır (8). Ayrıca potent antiinflamatuvar, antiproliferatif ve antioksidandır. Mikrovasküler ekstravazasyonda azalma da sağlamaktadır (8).

Bosentanın sistemik inflamatuvar hastalıklardaki tedavi etkinliği, aralarında insan çalışmalarının da bulunduğu pek çok araştırma ile desteklenmiştir (112-118). Sistemik sklerozis hastalarında bosentan tedavisinin etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada (112), proinflamatuvar ve profibrotik sitokin düzeyleri araştırılmış; ET-1, IL-4, IL-5, IL-10, GM-CSF ve TNF- α düzeylerinde belirgin değişiklik olmadığı; bununla birlikte IL-2, IL-6, IL-8 ve IFN- γ düzeylerinde ise azalma olduğu gösterilmiştir. Bu hastalarda akut alevlenme dönemlerinde serumda yüksek konsantrasyonlarda bulunan ve proinflamatuvar etkileri olan IL-6 ve IL-8 düzeylerinin baskılanması, hastalığın progresyonunun bosentan tedavisi ile yavaşlatılabileceğini göstermiştir. Bu çalışma, bosentanın pulmoner arteriyel hipertansiyondan sonra farklı bir kullanım alanı olarak, sistemik inflamatuvar hastalıklardaki antiinflamatuvar etkisini araştıran ilk klinik çalışmadır. Son yıllarda sistemik sklerozis tanılı hastalarda bosentan tedavisinin etkinliği üzerine pek çok çalışma yapılmıştır (113-115). Bu hastalarda görülen dijital ülserlerin tedavisinde bosentanın etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada (113); bir yıllık tedavi

sonunda bosentanın yeni dijital ülserlerin oluşumunu engellediği ve mevcut dijital ülserlerin iyileşmesine katkı sağladığı belirtilmiştir. Ayrıca akciğer tutulumu olan sistemik sklerozis hastalarında uzun süre bosentan tedavisi ile endotel hasarının gerilediği, pulmoner arteriyel hipertansiyon gelişme riskinin azaldığı ve kardiyopulmoner stres testlerinin düzeldiği de gösterilmiştir (114, 115). Bosentanın romatoid artrit ve sistemik lupus eritematozus gibi enflamatuvar hastalıklarda da etkisinin araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır (116-118).

Bosentanın endotelin reseptör blokörü olması; ayrıca antiinflamatuvar ve antiproliferatif etkileri üzerine yapılan araştırmalarda olumlu sonuçlar alınması, astım tedavisinde de etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu hipotezle ilişkili olarak yapılan bir hayvan çalışmasında (6), Finsnes ve arkadaşları endotelinin enflamasyondaki etkisi ile beraber, endotelin antagonizmasının antiinflamatuvar etkisini de değerlendirmişlerdir. İntratrakeal sephadex verilerek eozinofilik havayolu enflamasyonu oluşturulan farelerde bosentan ile tedavi sonrasında, üçüncü ve yirmi dördüncü saatlerde bakılan bronkoalveoler lavaj örneklerinde TNF- α artışının inhibe olduğu; IL-4, IL-1 β ve IFN- γ gibi enflamatuvar mediyatör düzeylerinin de azaldığı saptanmıştır. Çalışmada serum IL-5, timik stromal lefopoietin ve doku sitokin düzeyleri ile akciğer dokusundaki histopatolojik değişiklikler değerlendirilmemiştir. Çalışmanın sonucunda endotelinin enflamasyonda anahtar mediyatör olabileceği belirtilmiştir. Ancak çalışmanın; eozinofilik havayolu enflamasyonu ile seyreden hastalıkların tedavisinde, endotelin reseptör antagonistlerinin kullanılmasında kesin kanıt niteliği taşımadığı da belirtilmektedir.

Sampaio ve arkadaşları ise, intratorasik ovalbumin enjeksiyonu ile eozinofilik alerjik plörezi modeli oluşturdukları BALB/c farelerde endotelin-A reseptör antagonisti (BQ-123) ve bosentan tedavisinin etkinliğini değerlendirmişlerdir (119). Çalışmada endotelin reseptör antagonizması sonrasında; plazma ve bronkoalveoler lavaj IL-5 düzeylerinde azalma sağlandığı gösterilmiştir. Ayrıca tedavi sonrası alınan akciğer doku örneklerinde eozinofil infiltrasyonunun da baskılandığı görülmüştür. Endotelin-1 aktivitesinin enflamasyonda önemli rolünün olduğu belirtilen çalışmada, endotelin reseptör antagonistleri ile bu enflamatuvar yanıtın baskılanabildiği ve klinik progresyonun fayda sağlayabileceği belirtilmektedir.

Her iki çalışmada (6, 119), astım modeli olmasa da bu modele benzer şekilde eozinofilik havayolu enflamasyonu modeli oluşturulmuş ve bronkoalveoler lavaj örneklerinde sitokin düzeyleri değerlendirilmiştir. Sampaio ve arkadaşlarının çalışmasında diğer çalışmadan farklı olarak plazma IL-4 ve IL-5 düzeyleri ile histopatolojik açıdan eozinofil infiltrasyonu da değerlendirilmiştir (119). Biz çalışmamızda eozinofilik havayolu enflamasyonu modelini değil, astım modeli oluşturduğumuz farelerde hem plazma, hem de doku sitokin (IL-4, IL-5 ve TSLP) düzeylerini değerlendirdik. Literatürde bosentan tedavisi sonrası akciğer dokusunda sitokin düzeylerinin değerlendirildiği başka bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda astım oluşturduğumuz fare modelinde bosentan tedavisinin etkinliğini, astım tedavisinde yeri kanıtlanmış olan steroid tedavisi ile de karşılaştırdık. Ayrıca bosentan ve steroid tedavilerinin etkilerini histopatolojik olarak da değerlendirdik. Astımda remodellingte görev alan mast hücreleri, goblet hücreleri, epitel hücreleri ve düz kas hücrelerini inceledik.

Çalışmamızda, bosentan tedavisi alan farelerde serum IL-4, IL-5 ve TSLP düzeylerinde diğer gruplara göre farklılık saptanmadı. Bununla birlikte, akciğer dokusunda bakılan sitokin düzeylerinin ise astımlı grupta yüksek olduğu; bosentan alan grupta doku IL-4, IL-5 ve TSLP düzeylerinin azaldığı ve bu azalmanın IL-5 açısından istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Bosentan ve deksametazon grupları arasında doku sitokin düzeyleri açısından anlamlı farklılık gözlenmedi.

Finsnes ve arkadaşları, intratrakeal sephadex vererek oluşturdukları eozinofilik havayolu enflamasyonunda bosentan tedavisinin histopatolojik etkinliğini değerlendirmişlerdir (120). Eozinofilik hava yolu enflamasyonu sonrasında histopatolojik olarak epitel kalınlığının arttığını ve bronşların daraldığını; bosentan tedavisi ardından ise epitel kalınlığının azaldığını göstermişlerdir. Çalışmamızda değerlendirdiğimiz histopatolojik veriler açısından bakıldığında; astım oluşturulan grupta mast hücre sayısı, goblet hücre sayısı, epitel kalınlığı ve düz kas kalınlığı kontrol grubuna göre belirgin artmıştı. Bu durum, çalışmamızdaki farelerde astım modelinin oluşturulduğunun bir göstergesidir. Bosentan tedavisi sonrası tüm bu parametrelerde belirgin azalma saptandı. Ancak, epitel kalınlığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlıydı. Bosentan verdiğimiz grup ile deksametazon grubu karşılaştırıldığında bakılan histolojik parametrelerde ise, iki grup arasında düz kas

kalınlığı, epitel kalınlığı, mast hücre sayısı ve goblet hücre sayısı açısından istatistiksel olarak farklılık saptanmadı. Gerek histopatolojik veriler, gerekse doku sitokin düzeylerinin bosentan ve deksametazon alan grupta benzer olması; bosentanın deksametazon ile benzer düzeylerde etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçlar, bosentanın steroide yakın bir antiinflamatuvar etkisinin olabileceğini ve astım tedavisinde bosentanın da etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Bosentanın düz kas proliferasyonu üzerine etkilerinin değerlendirildiği iki farklı çalışmada (121, 122); ET-1'in proenflamatuvar ve proliferatif etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Bosentan ile tedavi sonrasında düz kas hücre proliferasyonunda ve trakeal oklüzyonda azalma saptanmıştır. Biz de çalışmamızda astımlı akciğer dokularından bosentan tedavisi sonrası alınan örneklerde düz kas hücre kalınlığının, yani düz kas proliferasyonunun astım grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaldığını saptadık.

Literatürde astımda bosentanın etkinliğinin değerlendirildiği sadece bir tane erişkin ve sınırlı sayıda hastayı içeren klinik çalışma bulunmaktadır. Timothy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (11), dirençli astım tanısı koyulan yedi hastada bosentan tedavisinin etkinliği değerlendirilmiştir. Yaşları 21 ile 70 arasında değişen yedi hastanın dördüne bosentan tedavisi üçüne plasebo tedavisi uygulanmıştır. On yedi haftalık tedavi programı sonunda; astım semptomları, kontrol skorları, FEV-1 değerleri ve beta agonist kullanım ihtiyaçları karşılaştırılmıştır. Bosentan ile plasebo tedavileri arasında bu parametreler açısından farklılık saptanmamış ve endotelin reseptör antagonistlerinin astım tedavisinde etkili olmadığı belirtilmiştir. Bu çalışma, astımda bosentan tedavisinin etkinliğini değerlendiren ilk klinik çalışmadır. Ancak, çalışmaya dahil edilen hasta sayısının az olması, bosentanın astım tedavisinde herhangi bir rolünün olup olmadığına karar verilmesini sınırlandırmaktadır. Ayrıca çalışmada serum, bronkoalveoler lavaj, doku sitokin düzeyleri ile akciğer histopatolojik değişiklikleri değerlendirilememiştir.

Hayvan çalışmalarında elde edilen olumlu sonuçların, insan çalışmalarına uyarlanabilmesi her zaman mümkün değildir. Elde edilen sonuçlar tedavi izlemi ve yeni yapılacak çalışmalar için yol gösterici nitelik taşımaktadır. Çalışmamızda, bosentanın astımda kronik değişiklikler ve yeniden yapılanma üzerine iyileştirici

etkileri olduğunu saptadık. Bununla birlikte; deksametazon ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılığın görülmemesi de, bosentanın astım tedavisinde deksametazon kadar faydalı olabileceğini göstermektedir. Ancak insan çalışmalarının uyarlanması ve bosentanın astımda tek başına veya ek tedavi seçenekleri arasında değerlendirilebilmesi için uzun süreli ve hasta sayısının fazla olduğu daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

Kronik astım modeli oluşturulan farelerde bosentanın akciğer histopatolojisi üzerine etkisinin değerlendirildiği çalışmamızda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Gruplar arasında histolojik parametreler değerlendirildiğinde tüm gruplar arasında; düz kas kalınlığı, epitel hücre yüksekliği, mast hücre sayısı ve goblet hücre sayıları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. Bu sonuçlar doğrultusunda, gruplar arasında ikili eşleşmeli ileri istatistiksel anlamlılık testleri uygulandı.
 - a. Kontrol grubu (Grup I) ile astım modeli oluşturulup, plasebo olarak salin uygulanan grubun (Grup II) histolojik verileri karşılaştırıldığında; plasebo grubunda düz kas ve epitel kalınlıkları, mast hücre sayısı ve goblet hücre sayısı istatistiksel olarak yüksek saptandı ($p<0,05$).
 - b. Plasebo grubu (Grup II) ile bosentan grubunun (Grup IV) histolojik parametreleri karşılaştırıldığında; bosentan grubunun epitel yüksekliğinin istatistiksel olarak anlamlı azaldığı ($p<0,05$), diğer histolojik parametrelerde ise anlamlı farklılık olmadığı saptandı ($p>0,05$).
 - c. Plasebo grubu (Grup II) ile deksametazon grubunun (Grup III) histolojik verileri karşılaştırıldığında; deksametazon grubunda düz kas kalınlığı, epitel yüksekliği, mast hücre sayısı ve goblet hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttığı saptandı ($p<0,05$).
 - d. Bosentan grubu (Grup IV) ile deksametazon grubunun (Grup III) histolojik verileri karşılaştırıldığında; iki grup arasında histolojik parametrelerde anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).
2. Gruplar arası serum sitokin (IL-4, IL-5 ve TSLP) düzeyleri değerlendirildiğinde; serum IL-4, IL-5 ve TSLP serum düzeylerinde gruplar arasında farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

3. Gruplar arası akciğer doku örneklerinde sitokin (IL-4, IL-5 ve TSLP) düzeyleri değerlendirildiğinde, sadece IL-5 açısından farklılık olduğu görüldü.
- a. IL-4, IL-5 ve TSLP düzeyleri astım grubunda (Grup II) yüksek bulunmakla birlikte kontrol grubu (Grup I) ve deksametazon grubuna (Grup III) göre anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).
 - b. Astım grubu ile (Grup II) bosentan grubu (Grup IV) arasında IL-5 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. IL-5 düzeylerinin bosentan alan grupta belirgin düşük olduğu görüldü ($p<0,05$).
 - c. Deksametazon grubu (Grup III) ile bosentan grubu (Grup IV) arasında doku sitokin düzeylerinde anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

KAYNAKLAR

1. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R, The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy*, 2004;59(5):469-478.
2. National AE, Prevention P, Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma-Summary Report 2007. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2007;120(5):S94.
3. Liu M. Pathogenesis of asthma. Up To Date [serial online] 2016;May 31, 2016:[https://www.uptodate.com/contents/pathogenesis-of-asthma?source=search_result&search=pathogenesis%20of%20asthma&selectedTitle=1~150].
4. He R, Geha RS, Thymic stromal lymphopoietin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010;1183(1):13-24.
5. An SS, Kim J, Ahn K, Trepast X, Drake KJ, Kumar S, Ling G, and et al., Cell stiffness, contractile stress and the role of extracellular matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009;382(4):697-703.
6. Finsnes F, Lyberg T, Christensen G, Skjøsberg OH, Effect of endothelin antagonism on the production of cytokines in eosinophilic airway inflammation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2001;280(4):L659-L665.
7. Incorporated AP. Tracleer (bosentan) [product monograph]. December 2015;[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2003/21290se8-001_tracleer_lbl.pdf].
8. Clozel M, Breu V, Gray GA, Kalina B, Löffler B, Burri K, Cassal J-M, and et al., Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1994;270(1):228-235.

9. Carratu P, Scuri M, Styblo JL, Wanner A, Glassberg M, ET-1 induces mitogenesis in ovine airway smooth muscle cells via ETA and ETB receptors. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 1997;272(5):L1021-L1024.
10. Serafim KG, Navarro SA, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Fattori V, Cunha TM, Alves-Filho JC, and et al., Bosentan, a mixed endothelin receptor antagonist, inhibits superoxide anion-induced pain and inflammation in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2015;388(11):1211-1221.
11. Coyle TB, Metersky ML, The effect of the endothelin-1 receptor antagonist, bosentan, on patients with poorly controlled asthma: a 17-week, double-blind, placebo-controlled crossover pilot study. *Journal of Asthma*, 2013;50(4):433-437.
12. Lai C, Beasley R, Crane J, Foliaki S, Shah J, Weiland S, Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*, 2009.
13. Bulduk S, Esin MN, İlkokul Çocuklarında Astım ve Alerjik Hastalık Semptom Prevelansı ve Etkileyen Faktörler (Prevalence of asthma and allergic symptoms and related factors among children of elementary school). *Maltepe Üniversitesi Hemşirelik Bilim ve Sanatı Dergisi*, 2009;2:13-22.
14. Allen M, Heinzmann A, Noguchi E, Abecasis G, Broxholme J, Ponting CP, Bhattacharyya S, and et al., Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14. *Nature Genetics*, 2003;35(3):258-263.
15. Kobilka BK, Dixon R, Frielle T, Dohlman HG, Bolanowski MA, Sigal IS, Yang-Feng TL, and et al., cDNA for the human beta 2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-

- derived growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987;84(1):46-50.
16. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ, Asthma and wheezing in the first six years of life. *New England Journal of Medicine*, 1995;332(3):133-138.
 17. Macsali F, Real FG, Plana E, Sunyer J, Anto J, Dratva J, Janson C, and et al., Early age at menarche, lung function, and adult asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2011;183(1):8-14.
 18. Hersoug L, Linneberg A, The link between the epidemics of obesity and allergic diseases: does obesity induce decreased immune tolerance? *Allergy*, 2007;62(10):1205-1213.
 19. Stenius-Aarniala B, Poussa T, Kvarnström J, Grönlund E-L, Ylikahri M, Mustajoki P, Immediate and long term effects of weight reduction in obese people with asthma: randomised controlled study. *British Medical Journal*, 2000;320(7238):827-832.
 20. Arbes SJ, Gergen PJ, Vaughn B, Zeldin DC, Asthma cases attributable to atopy: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007;120(5):1139-1145.
 21. Sears M, Burrows B, Flannery E, Herbison G, Hewitt C, Holdaway M, Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *New England Journal of Medicine*, 1991;325(15):1067-1071.
 22. Platts-Mills T, How environment affects patients with allergic disease: indoor allergens and asthma. *Annals of Allergy*, 1994;72(4):381-384.
 23. Torrent M, Sunyer J, Garcia R, Harris J, Iturriaga MV, Puig C, Vall O, and et al., Early-life allergen exposure and atopy, asthma, and wheeze up to 6 years

- of age. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2007;176(5):446-453.
24. Call RS, Smith TF, Morris E, Chapman MD, Platts-Mills TA, Risk factors for asthma in inner city children. *The Journal of Pediatrics*, 1992;121(6):862-866.
 25. Kerkhof M, Wijga A, Brunekreef B, Smit H, Jongste JD, Aalberse R, Hoekstra MO, and et al., Effects of pets on asthma development up to 8 years of age: the PIAMA study. *Allergy*, 2009;64(8):1202-1208.
 26. Mutius EV, Infection: friend or foe in the development of atopy and asthma? The epidemiological evidence. *European Respiratory Journal*, 2001;18(5):872-881.
 27. Herten LV, The hygiene hypothesis in the development of atopy and asthma--still a matter of controversy? *International Journal of Medicine*, 1998;91(11):767-771.
 28. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B, Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2000;161(5):1501-1507.
 29. Matricardi PM, Rosmini F, Ferrigno L, Nisini R, Rapicetta M, Chionne P, Stroffolini T, and et al., Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus. *British Medical Journal*, 1997;314(7086):999.
 30. Matricardi PM, Rosmini F, Riondino S, Fortini M, Ferrigno L, Rapicetta M, Bonini S, Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *British Medical Journal*, 2000;320(7232):412-417.

31. Strachan DP, Butland BK, Anderson HR, Incidence and prognosis of asthma and wheezing illness from early childhood to age 33 in a national British cohort. *British Medical Journal*, 1996;312(7040):1195-1199.
32. Gilliland FD, Islam T, Berhane K, Gauderman WJ, McConnell R, Avol E, Peters JM, Regular smoking and asthma incidence in adolescents. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2006;174(10):1094-1100.
33. Weitzman M, Gortmaker S, Walker DK, Sobol A, Maternal smoking and childhood asthma. *Pediatrics*, 1990;85(4):505-511.
34. Hanrahan JP, Tager IB, Segal MR, Tosteson TD, Castile RG, Vunakis HV, Weiss ST, and et al., The effect of maternal smoking during pregnancy on early infant lung function. *American Review of Respiratory Disease*, 1992;145(5):1129-1135.
35. Neuman Å, Hohmann C, Orsini N, Pershagen G, Eller E, Kjaer HF, Gehring U, and et al., Maternal smoking in pregnancy and asthma in preschool children: a pooled analysis of eight birth cohorts. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2012;186(10):1037-1043.
36. McEvoy CT, Schilling D, Clay N, Jackson K, Go MD, Spitale P, Bunten C, and et al., Vitamin C supplementation for pregnant smoking women and pulmonary function in their newborn infants: a randomized clinical trial. *JAMA*, 2014;311(20):2074-2082.
37. Dockery DW, Speizer FE, Stram DO, Ware JH, Spengler JD, Ferris BG, Effects of inhalable particles on respiratory health of children. *American Review of Respiratory Disease*, 1989;139(3):587-594.
38. Schildcrout JS, Sheppard L, Lumley T, Slaughter JC, Koenig JQ, Shapiro GG, Ambient air pollution and asthma exacerbations in children: an eight-city analysis. *American Journal of Epidemiology*, 2006;164(6):505-517.
39. McConnell R, Islam T, Shankardass K, Jerrett M, Lurmann F, Gilliland F, Gauderman J, and et al., Childhood incident asthma and traffic-related air

- pollution at home and school. *Environmental Health Perspectives*, 2010;1021-1026.
40. Friedman NJ, Zeiger RS, The role of breast-feeding in the development of allergies and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2005;115(6):1238-1248.
 41. Oddy WH, Peat JK, Klerk NHd, Maternal asthma, infant feeding, and the risk of asthma in childhood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2002;110(1):65-67.
 42. Arshi S, Ghalehbaghi B, Kamrava S-K, Aminlou M, Vitamin D serum levels in allergic rhinitis: any difference from normal population? *Asia Pacific Allergy*, 2012;2(1):45-48.
 43. Cassim R, Russell M, Lodge C, Lowe A, Koplin J, Dharmage S, The role of circulating 25 hydroxyvitamin D in asthma: a systematic review. *Allergy*, 2015;70(4):339-354.
 44. Martindale S, McNeill G, Devereux G, Campbell D, Russell G, Seaton A, Antioxidant intake in pregnancy in relation to wheeze and eczema in the first two years of life. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2005;171(2):121-128.
 45. McKeever TM, Britton J, Diet and asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2004;170(7):725-729.
 46. Klinnert MD, Nelson HS, Price MR, Adinoff AD, Leung DY, Mrazek DA, Onset and persistence of childhood asthma: predictors from infancy. *Pediatrics*, 2001;108(4):e69-e69.
 47. Dave ND, Xiang L, Rehm KE, Marshall GD, Stress and allergic diseases. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 2011;31(1):55-68.
 48. Lee T, Anderson S, Heterogeneity of mechanisms in exercise induced asthma. *Thorax*, 1985;40(7):481-487.

49. Yüzer S, Polat S, Astımlı Çocuklar ve Spor. TAF Preventive Medicine Bulletin, 2014;13(3):241-244.
50. Eldeirawi KM, Kunzweiler C, Atek A, Persky VW, Antibiotic use in infancy and the risk of asthma in Mexican American children. Journal of Asthma, 2015;52(7):707-714.
51. Evers S, Weatherall M, Jefferies S, Beasley R, Paracetamol in pregnancy and the risk of wheezing in offspring: a systematic review and meta-analysis. Clinical & Experimental Allergy, 2011;41(4):482-489.
52. Northway WH, Moss RB, Carlisle KB, Parker BR, Popp RL, Pitlick PT, Eichler I, and et al., Late pulmonary sequelae of bronchopulmonary dysplasia. New England Journal of Medicine, 1990;323(26):1793-1799.
53. Jaakkola JJ, Ahmed P, Ieromnimon A, Goepfert P, Laiou E, Quansah R, Jaakkola MS, Preterm delivery and asthma: a systematic review and meta-analysis. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2006;118(4):823-830.
54. Patelarou E, Chochlidaki M, Vivilaki V, Brokalaki H, Is there a link between wheezing in early childhood and adverse birth outcomes? A systematic review. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2009;6(11):2752-2761.
55. Özlü T, Consensus report on diagnosis and treatment of community-acquired pneumonia in adults. Türk Toraks Derneği 11. Yıllık Kongresi Paneli; 24-26 Nisan 2008;Antalya.2008.P. 1-12.
56. Han H, Xu W, Headley MB, Jessup HK, Lee KS, Omori M, Comeau MR, and et al., Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)-mediated dermal inflammation aggravates experimental asthma. Mucosal Immunology, 2012;5(3):342-351.
57. Kay AB, Phipps S, Robinson DS, A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. Trends in Immunology, 2004;25(9):477-482.

58. Shakoory B, Fitzgerald SM, Lee SA, Chi DS, Krishnaswamy G, The role of human mast cell-derived cytokines in eosinophil biology. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2004;24(5):271-281.
59. Robinson DS, The role of the mast cell in asthma: induction of airway hyperresponsiveness by interaction with smooth muscle? *Journal of allergy and clinical immunology*, 2004;114(1):58-65.
60. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, and et al., Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *The Journal of clinical investigation*, 1999;103(6):779-788.
61. Larché M, Robinson DS, Kay AB, The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2003;111(3):450-463.
62. Redrup AC, Howard BP, MacGlashan DW, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Schroeder JT, Differential regulation of IL-4 and IL-13 secretion by human basophils: their relationship to histamine release in mixed leukocyte cultures. *The Journal of Immunology*, 1998;160(4):1957-1964.
63. Akbari O, Faul JL, Hoyte EG, Berry GJ, Wahlström J, Kronenberg M, DeKruyff RH, and et al., CD4⁺ invariant T-cell-receptor⁺ natural killer T cells in bronchial asthma. *New England Journal of Medicine*, 2006;354(11):1117-1129.
64. Lara JTD, Redington A, Bradding P, Church M, Hartley J, Semper A, Holgate S, Dendritic cells in normal and asthmatic airways: expression of the α subunit of the high affinity immunoglobulin E receptor (Fc ϵ RI- α). *Clinical & Experimental Allergy*, 1996;26(6):648-655.
65. Peters-Golden M, The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2004;31(1):3-7.

66. Sur S, Crotty TB, Kephart GM, Hyma BA, Colby TV, Reed CE, Hunt LW, and et al., Sudden-onset fatal asthma: a distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? *American Review of Respiratory Disease*, 1993;148(3):713-719.
67. Franken C, Meijer C, Dijkman J, Tissue distribution of antileukoprotease and lysozyme in humans. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1989;37(4):493-498.
68. Ayers M, Jeffery P, Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium. *European Respiratory Journal*, 1988;1(1):58-80.
69. Zhang S, Smartt H, Holgate ST, Roche WR, Growth factors secreted by bronchial epithelial cells control myofibroblast proliferation: an in vitro co-culture model of airway remodeling in asthma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 1999;79(4):395-405.
70. Richter A, Puddicombe SM, Lordan JL, Bucchieri F, Wilson SJ, Djukanovic R, Dent G, and et al., The contribution of interleukin (IL)-4 and IL-13 to the epithelial-mesenchymal trophic unit in asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2001;25(3):385-391.
71. Chung K, Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation? *European Respiratory Journal*, 2000;15(5):961-968.
72. Groneberg D, Quarcoo D, Frossard N, Fischer A, Neurogenic mechanisms in bronchial inflammatory diseases. *Allergy*, 2004;59(11):1139-1152.
73. Barnes PJ, Chung KF, Page CP, Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacological Reviews*, 1998;50(4):515-596.
74. Wang C, Liu Q, Chen F, Xu W, Zhang C, Xiao W, IL-25 Promotes Th2 immunity responses in asthmatic mice via nuocytes activation. *PloS One*, 2016;11(9):e0162393.

75. Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, Menon S, and et al., IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity*, 2001;15(6):985-995.
76. Miller AL, Lukacs NW, Chemokine receptors: understanding their role in asthmatic disease. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 2004;24(4):667-683.
77. Leff AR, Regulation of leukotrienes in the management of asthma: biology and clinical therapy. *Annual Review of Medicine*, 2001;52(1):1-14.
78. Kamada AK, Szeffler SJ, Martin RJ, Boushey HA, Chinchilli VM, Drazen JM, Fish JE, and et al., Issues in the use of inhaled glucocorticoids. The Asthma Clinical Research Network. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1996;153(6):1739-1748.
79. Gern JE, Lemanske RF, Busse WW, Early life origins of asthma. *The Journal of Clinical Investigation*, 1999;104(7):837-843.
80. Lloyd C, Robinson D, Allergen-induced airway remodelling. *European Respiratory Journal*, 2007;29(5):1020-1032.
81. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD, IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010;125(2):S73-S80.
82. Kuperman DA, Huang X, Koth LL, Chang GH, Dolganov GM, Zhu Z, Elias JA, and et al., Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nature Medicine*, 2002;8(8):885-889.
83. Bousquet J, Vignola A, Chanez P, Campbell A, Bonsignore G, Michel F-B, Airways remodelling in asthma: no doubt, no more? *International Archives of Allergy and Immunology*, 1995;107(1-3):211-214.

84. Yunginger JW, Reed CE, O'Connell EJ, III LJM, O'Fallon WM, Silverstein MD, A community-based study of the epidemiology of asthma: incidence rates, 1964–1983. *American Review of Respiratory Disease*, 1992;146(4):888-894.
85. Pratter MR, Hingston DM, Irwin RS, Diagnosis of bronchial asthma by clinical evaluation: an unreliable method. *Chest*, 1983;84(1):42-47.
86. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, and et al., Standardisation of spirometry. *European Respiratory Journal*, 2005;26(2):319-338.
87. Pedersen S, Do inhaled corticosteroids inhibit growth in children? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2001;164(4):521-535.
88. Group CAMPR, Long-term effects of budesonide or nedocromil in children with asthma. *N Engl J Med*, 2000;2000(343):1054-1063.
89. Kemp JP, Dockhorn RJ, Shapiro GG, Nguyen HH, Reiss TF, Seidenberg BC, Knorr B, Montelukast once daily inhibits exercise-induced bronchoconstriction in 6-to 14-year-old children with asthma. *The Journal of Pediatrics*, 1998;133(3):424-428.
90. Greening A, Ind PW, Northfield M, Shaw G, Added salmeterol versus higher-dose corticosteroid in asthma patients with symptoms on existing inhaled corticosteroid. *The Lancet*, 1994;344(8917):219-224.
91. Weinberger M, Hendeles L, Theophylline in asthma. *New England Journal of Medicine*, 1996;334(21):1380-1388.
92. Giersbergen PLV, Halabi A, Dingemans J, Single-and multiple-dose pharmacokinetics of bosentan and its interaction with ketoconazole. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2002;53(6):589-595.
93. Fahy JV, Type 2 inflammation in asthma [mdash] present in most, absent in many. *Nature Reviews Immunology*, 2015;15(1):57-65.

94. Ward C, Walters H, Airway wall remodelling: the influence of corticosteroids. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 2005;5(1):43-48.
95. Chetta A, Zanini A, Foresi A, Donno MD, Castagnaro A, D'Ippolito R, Baraldo S, and et al., Vascular component of airway remodeling in asthma is reduced by high dose of fluticasone. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2003;167(5):751-757.
96. Guimarães CL, Trentin PG, Endothelin ETB receptor-mediated mechanisms involved in oleic acid-induced acute lung injury in mice. *Clinical Science*, 2002;103(s2002):340S-344S.
97. Linnemann B, Erbe M, Raynaud's phenomenon and digital ischaemia-pharmacologic approach and alternative treatment options. *VASA. Zeitschrift für Gefäßkrankheiten*, 2016;45(3):201.
98. Temelkovski J, Hogan SP, Shepherd DP, Foster PS, Kumar RK, An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. *Thorax*, 1998;53(10):849-856.
99. Karaman M, Firinci F, Kiray M, Tuncel T, Bagriyanik A, Yilmaz O, Uzuner N, and et al., Beneficial effects of erythropoietin on airway histology in a murine model of chronic asthma. *Allergologia et Immunopathologia*, 2012;40(2):75-80.
100. Cohn L, Elias JA, Chupp GL, Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annual Review of Immunology*, 2004;22:789-815.
101. Juniper EF, Kline PA, Vanzielegem MA, Ramsdale EH, O'byrne PM, Hargreave FE, Effect of long-term treatment with an inhaled corticosteroid (budesonide) on airway hyperresponsiveness and clinical asthma in nonsteroid-dependent asthmatics. *American Review of Respiratory Disease*, 1990;142(4):832-836.

102. Locksley RM, Asthma and allergic inflammation. *Cell*, 2010;140(6):777-783.
103. Nelson HS, Davies DE, Wicks J, Powell RM, Puddicombe SM, Holgate ST, Airway remodeling in asthma: new insights. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2003;111(2):215-225.
104. Hirst SJ, Martin JG, Bonacci JV, Chan V, Fixman ED, Hamid QA, Herszberg B, and et al., Proliferative aspects of airway smooth muscle. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004;114(2):S2-S17.
105. Gregory L, Jones C, Mathie S, Pegorier S, Lloyd C, Endothelin-1 directs airway remodeling and hyper-reactivity in a murine asthma model. *Allergy*, 2013;68(12):1579-1588.
106. Kanazawa H, Nomura S, Yoshikawa J, Role of microvascular permeability on physiologic differences in asthma and eosinophilic bronchitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2004;169(10):1125-1130.
107. Siddiqui S, Sutcliffe A, Shikotra A, Woodman L, Doe C, McKenna S, Wardlaw A, and et al., Vascular remodeling is a feature of asthma and nonasthmatic eosinophilic bronchitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007;120(4):813-819.
108. Boulet LP, Once-daily inhaled corticosteroids for the treatment of asthma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 2004;10(1):15-21.
109. Morelli S, Ferri C, Poletini E, Bellini C, Gualdi G, Pittoni V, Valesini G, and et al., Plasma endothelin-1 levels, pulmonary hypertension, and lung fibrosis in patients with systemic sclerosis. *The American journal of medicine*, 1995;99(3):255-260.
110. Perez A, Grodin J, Wu Y, Hernandez A, Butler J, Metra M, Felker G, and et al., Increased mortality with elevated plasma endothelin-1 in acute heart failure: an Ascend-hf biomarker substudy. *European journal of heart failure*, 2016;18(3):290-297.

111. Jankowich M, Wu W-C, Choudhary G, Association of Elevated Plasma Endothelin-1 Levels With Pulmonary Hypertension, Mortality, and Heart Failure in African American Individuals: The Jackson Heart Study. *Jama cardiology*, 2016;1(4):461-469.
112. Bellisai F, Morozzi G, Scaccia F, Chellini F, Simpatico A, Pecetti G, Galeazzi M, Evaluation of the effect of bosentan treatment on proinflammatory cytokine serum levels in patients affected by Systemic Sclerosis. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2011;24(1):261-264.
113. Mouthon L, Carpentier P, Lok C, Clerson P, Gressin V, Hachulla E, Bérezné A, and et al. Controlling the digital ulcerative disease in systemic sclerosis is associated with improved hand function. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2017;<https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2017.01.001>.
114. Murdaca G, Lantieri F, Puppo F, Bezante G, Balbi M, Beneficial effects of long-term treatment with bosentan on the development of pulmonary arterial hypertension in patients with systemic sclerosis. *Journal of International Medical Research*, 2016;44(1 suppl):85-89.
115. Romaniello A, Gigante A, Paolo M, Tallerini G, Barbano B, Amoroso D, Palange P, and et al., Bosentan for digital ulcers prevention does not worsen cardiopulmonary exercise test parameters in SSc patients with interstitial lung disease. *International Journal of Cardiology*, 2016;223:113-115.
116. Donate PB, Cunha TM, Verri WA, Junta CM, Lima FO, Vieira SM, Peres RS, and et al., Bosentan, an endothelin receptor antagonist, ameliorates collagen-induced arthritis: the role of TNF- α in the induction of endothelin system genes. *Inflammation Research*, 2012;61(4):337-348.
117. Nagai Y, Shimizu A, Ishikawa O, Successful treatment with bosentan for refractory digital ulcers in a patient with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Dermatology*, 2008;35(7):447-451.

118. Mok M, Tsang P, Lam Y, Lo Y, Wong W, Lau C, Bosentan use in systemic lupus erythematosus patients with pulmonary arterial hypertension. *Lupus*, 2007;16(4):279-285.
119. Sampaio A, Rae GA, Henriques M, Role of endothelins on lymphocyte accumulation in allergic pleurisy. *Journal of Leukocyte Biology*, 2000;67(2):189-195.
120. Finsnes F, Skjønsberg O, Tønnessen T, Naess O, Lyberg T, Christensen G, Endothelin production and effects of endothelin antagonism during experimental airway inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1997;155(4):1404-12.
121. Tikkanen JM, Koskinen PK, Lemström KB, Role of Endogenous Endothelin-1 in Transplant Obliterative Airway Disease in the Rat. *American Journal of Transplantation*, 2004;4(5):713-720.
122. Knobloch J, Yanik SD, Körber S, Stoelben E, Jungck D, Koch A, TNF α -induced airway smooth muscle cell proliferation depends on endothelin receptor signaling, GM-CSF and IL-6. *Biochemical Pharmacology*, 2016;116:188-199.