T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS HASTALIKLARI ANABİLİM
DALI

ERİŞKİN AĞIR ASTIM HASTALARINDA MONONÜKLEER HÜCRELERİN PROTEOMİK PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ VE TEDAVİ DUYARLILIĞI İLE İLİŞKİSİ

Dr. Bengü ÇÜRÜK GÜRBÜZ

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Yasemin SAYGIDEĞER

ADANA-2024

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS HASTALIKLARI ANABİLİM
DALI

ERİŞKİN AĞIR ASTIM HASTALARINDA MONONÜKLEER HÜCRELERİN PROTEOMİK PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ VE TEDAVİ DUYARLILIĞI İLE İLİŞKİSİ

Dr. Bengü ÇÜRÜK GÜRBÜZ

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Yasemin SAYGIDEĞER

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TTU-2023-15464 Nolu proje ile desteklenmiştir.

ADANA-2024

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez sürecimde ilgisi, bilgisi, sabrı ve anlayışına çokça sığındığım, hiçbir zaman katkısını ve desteğini esirgemeyen değerli tez danışman hocam Doç. Dr. Yasemin Saygıdeğer'e başta olmak üzere, eğitim sürecim boyunca bilgi ve deneyimleri ile her zaman yol gösteren ve destekleyen değerli hocalarım Prof. Dr. İsmail Hanta'ya, Prof. Dr. Ezgi Özyılmaz'a, Doç. Dr.Sedat Kuleci'ye, Doç. Dr. Oya Baydar Toprak'a, Doç. Dr. Pelin Duru Çetinkaya'ya, Öğr. Gör. Dr. Efraim Güzel'e, Öğr. Gör. Dr. Pelin Pınar Deniz'e,

Asistanlık sürecim boyunca beraber çalıştığım sevgili asistan arkadaşlarıma ve birlikte çalıştığımız tüm klinik çalışanlarımıza, tez çalışmam ve asistanlık hayatım boyunca desteğini hiç esirgemeyen sevgili Yeşim Bagav'a, Nazlı Eşit'e,

Araştırmayı yürüttüğüm sırada deneylerime teknik destekleri sağlayan Göğüs Hastalıkları Moleküler Araştırma Laboratuvarı'nda görev yapan laboratuvar ekibine, Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Merkezi Yönetimine ve Hacettepe Üniversitesi HUNİTEK Merkezi yönetimine,

Hayatımın her aşamasında beni her durumda destekleyen, her türlü fedakarlıkta bulunan, her zaman yanımda olan, sonsuz emekle beni yetiştiren sevgili annem Fatma Çürük, babam Mustafa Çürük, ablam Zeynep Çürük Başdemir başta olmak üzere tüm aileme,

Her zaman olduğu gibi asistanlık ve tez sürecim boyunca desteklerini, anlayışını, ilgisini, sabrını, sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Okan Gürbüz'e

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **I**
İÇİNDEKİLER ..... **II**
TABLO LİSTESİ ..... **V**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **VI**
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **VII**
ÖZET ..... **IX**
ABSTRACT ..... **X**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **2**
2.1. Astım Tanımı 2
2.2. Epidemiyoloji 2
2.3. Risk Faktörleri 3
2.4. Kişisel risk faktörleri 4
2.4.1. Genetik 4
2.4.2. Epigenetik 4
2.4.3. Cinsiyet 5
2.4.4. Obezite 5
2.4.5. Enfeksiyonlar 5
2.4.6. Mikrobiyata 6
2.4.7. Diyet 7
2.4.8. Vitamin D 7
2.4.9. Stres 8
2.4.10. Hijyen hipotezi 8
2.5. Çevresel risk faktörleri 8
2.5.1. Allerjenler 8
2.5.2. Mesleki Duyarlaştırıcılar 9
2.5.3. İç ve dış ortam hava kirliliği 10
2.5.4. Sigara 10
2.6. Patogenez 10

2.6.1. İnflamatuar hücreler 12
2.6.2. Hava Yolu Yapısal Hücreleri 18
Goblet Hücreleri 19
2.6.3. Hava yolu yapısal değişikleri 20
2.7. Astım Tanısı 22
2.7.1. Semptomlar 22
2.7.2. Fizik muayene 23
2.7.3. Tanı ve takipte kullanılan testler 23
2.7.4. Ayrıcı tanı 26
2.8. Astım Fenotipleri 28
2.8.1. Erken Başlangıçlı Alerjik astım 32
2.8.2. Geç Başlangıçlı Persistan Eozinifilik Astım 32
2.8.3. Alerjik olmayan astım(Th2 düşük astım) 32
2.8.4. Obezite ilişkili astım 33
2.8.5. Aspirin ile indüklenen astım 33
2.8.6. Nötrofilik Astım 34
2.8.7. Egzersizle tetiklenen Astım 34
2.9. Astımda Tedavi ve Takip 35
2.9.1. Astım tedavisinde kullanılan ilaçlar 35
2.9.1.1. Kontrol edici ilaçlar 35
2.9.1.2. Rahatlatıcı / Semptom Giderici İlaçlar 37
2.9.2. İlaç Dışı Tedaviler 41
2.9.3. Ağır astımda farmakolojik tedaviler 42
2.10. Biyobelirteç kavramı ve Proteomiks 47
2.11. Astım Hastalarında Proteomiks İncelemeleri 48
3. GEREÇ YÖNTEM 51
3.1. Araştırma Tipi, Yeri ve Hastaların Seçimi 51
3.2.Araştırmanın Genel Planı 52
3.3. Lenfosit izolasyon protokolü 54
3.4. Protein izolasyonu 55
3.5.BCA Yöntemi ile Total Protein tayini 56
3.6. Preomics Örnek Hazırlama 56

3.7. LC-MS/MS Analizleri 58
3.8. Biyoinformatik Analizler 59
3.9. İstatistiksel Değerlendirme 60
4. BULGULAR 61
5. TARTIŞMA 73
6. SONUÇLAR 79
KAYNAKÇA 80
EKLER 109
Ek 1. Etik Kurul Kararı 109
ÖZGEÇMİŞ 110

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Risk Faktörleri 3
Tablo 2. Astımda Mesleki Duyarlaştırıcılar 9
Tablo 3. Astım Patogenezinde Rol Oynayan Sitokinler 17
Tablo 4. Astım Ayrıcı Tanı 27
Tablo 5. Astımda Th_2 yüksekliği bulunan Fenotipler 30
Tablo 7. İnhaler Steroid dozları 36
Tablo 8. Hastaların demografik bilgileri, Prick testleri ve komorbiditelerinin oransal gösterimi 61
Tablo 9. Tüm hastaların verileri 62
Tablo 10. Başlanan tedaviler ve 1 yıllık tedavi sonrasında astım kontrol testi, alevlenme sıklığı ve hastane yatışı 63
Tablo 11. Proteomik analizlere dahil edilen tedaviye dirençli ve duyarlı hastaların laboratuvar değerleri 64
Tablo 12. Tedaviye duyarlı ve dirençli hastaların solunum fonksiyon testleri, Astım kontrol testleri (AKT), 1 yıllık takip sonunda alevlenme ve hastane yatış sıklıkları 65
Tablo 13. Proteomik analizlerde LC_MS/MS sonucunda istatistiksel anlamlı proteinler 67
Tablo 14. Araştırmada tedaviye dirençli / duyarlı gruplarda logfold(LFC2) değeri >1.5 (artış) ve <-1.5 (azalış) olan proteinlerin listesi 67
Tablo 15. STRING analizlerinde bulunan Reactome veritabanına göre Proteinlerin etkili olduğu yolakları gösteren tablo 70

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. **Dünyadaki astım prevelansı 3**
Şekil 2. **Astım Patogenezinde Rol Alan Sitokinler ve Sonuçlar 12**
Şekil 3. **Th2 Hücresinin Etkileri ve Düzenlenmesi 15**
Şekil 4. **Hava Yollarındaki Epitel Hücreleri 20**
Şekil 5. **Astımda Hava Yolu Remodellingi oluşumuna katkı sağladığı gösterilen mekanizmalar 21**
Şekil 6. **PEF değişkenliği formülü 24**
Şekil 7. **Metakolin Testi Yorumlanması 25**
Şekil 8. **Astım Fenotipleri 29**
Şekil 9. **Ağır Astım Tedavisinde Biyolojik Ajanlarla Tedavi Seçenekleri 42**
Şekil 10. **Ağır Astım Tedavisinde Biyolojik Ajanlar 46**
Şekil 11. **Bronşial astımın proteomik analizi için kullanılan yaygın teknikler 49**
Şekil 12. **Mononükleer hücre izolasyonu 55**
Şekil 13. **Proteomik analizlerde LC_MS/MS sonucu saptanan, karşılaştırmalı istatistiksel analizlerde artış veya azalış oranları istatistiksel anlamlı bulunan proteinleri gösteren volcano plot grafiği (y ekseni logp değeri, x ekseni artış oranını göstermektedir) (R dirençli, S duyarlı) 66**
Şekil 14. **Tedaviye duyarlı ve dirençli hastaların logfold (LFC2)(R/S) > -1.5 olan proteinlerin arasındaki ilişki (STRING v12.0 ile hazırlanmıştır) 69**
Şekil 15. **Tedaviye duyarlı ve dirençli hastaların logfold (LFC2)(R/S)> 1,5 olan proteinler arasındaki ilişki 69**
Şekil 16. **Tüm hastalarda (LFC2)(R/S) > 1,5 ve <-1.5 olarak tespit edilen proteinlerden mavi ile işaretlenmiş proteinler edinsel immün sistemle ilişkilendirilmiş proteinler, kırmızı ile işaretli olanlar genel immün sistemle ilişkili proteinlerdir.Yarısı kırmızı yarısı mavi olanlar hem doğal hem genel immünitede rol aldığı gösterilmiş proteinleri işaretlemiştir. 72**

SİMGELER VE KISALTMALAR

5-LOX : 5- Lipooksijenaz

ACE : Anjiotensin Converting Enzim

AKT : Astım kontrol testi

ASYE : Alt solunum yolu enfeksiyonu

ATS : American Thoracic Society

BAL : Bronko alveolar lavaj

BCA : Bisinkoninik asit

BHR : Bronş hiperreaktivitesi

BMI : Body mass index(vücut kitle indeksi)

cAMP : Siklik adenozin monofosfat

CGRP : Kalsitonun gene ilişkili peptit

COX : Siklooksijenaz yolağı

ECM : Ekstraselüler matriks

EDTA : Etilendiamintetraasetik asit

EGFR : Epitelyal büyüme faktötür reseptörü

EGPA : Eozinofilik granülomatozis with polianjitis

ESR1 : Östrojen reseptör 1

FEF_{25-75} : Zorlu ekspirasyon akımı

FeNO : Ekshale nitrik oksit

FEV1 : 1. Saniyedeki zorlu ekspirasyon volümü

FVC : Zorlu vital kapasite

GINA : Global initiative for asthma

GM-CSF : Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör

GO : Gene ontolojisi

GOLD : Global initiative for chronic obstructive lung disease

HÜNİTEK : Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi

IKS : İnhaler kortikosteroid

iNOs : Uyarılabilir nitrik oksit

KOAH : Kronik Obstrüktif akciğer hastalığı
LAMA : Uzun etkili antikolinerjik
LC-MS/MS : Sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi
MMP : Matriks metalloproteinaz
NO : Nitrik oksit
OKS : Oral kortikosteroid
PAF : Platelet aktive edici faktör
PBS : Fosfatlı tampon
PDE : Fosfodiesteraz inhibitörü
PDGF : Platelet kökenli büyüme faktörü
PEF : Ekspiryum tepe akım hızı
PM : Partikül büyüklüğü
PNET : Pulmoner nöroendokrin hücreler
PPB : Milyar parçada bir
SABA : Kısa etkili beta agonist
SFT : Solunum fonksiyon testi
SOD1 : Süperoksit dismutaz 1
TSLP : Timik stromal lenfopoietin
VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ÖZET

Erişkin Ağır Astım Hastalarında Mononükleer Hücrelerin Proteomik Profillerinin Belirlenmesi Ve Tedavi Duyarlılığı İle İlişkisi

Erişkin ağır astım hastalarında biyolojik tedaviler giderek önem kazanmakta ancak günümüzde oldukça pahalı olan bu tedavilere bazı hastalarda beklenen yanıt alınamamaktadır. Biyolojik tedavilere duyarlılığı veya direnci öngörebilecek bir belirteç hem hasta hem de ülke ekonomisi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu araştırmada hastaların tedaviye yanıtını tedavi başlamadan önce belirleyebilecek proteinlerin keşfedilmesi amaçlanmıştır.

Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Göğüs Hastalıkları polikliniğine Kasım 2022- Kasım 2023 tarihleri arasında başvuran ve ağır astım tanısı alarak biyolojik ajan tedavisi başlanması planlanan ve araştırmaya katılmayı kabul eden hastalardan, tedavi başlanmadan önce proteomik analiz yapılmak üzere EDTA'lı tüplere 10 cc kan örneği alındı. Ficoll solüsyonu kullanılarak kan örneklerinden mononükleer hücre izolasyonu yapıldı. Mononükleer hücrelerden protein izole edildi. Elde edilen protein örnekleri ticari kit kullanılarak peptidlerine ayrıştırıldı ve LC-MS/MS ile proteomik analizleri yapıldı. Ardından ham proteomik verileri MaxQuant programı ile analiz edildi. Analiz sonucu elde edilen proteinler Perseus programı ile hangi biyolojik yolağa ait oldukları ve KEGG numaraları belirlenmiştir. Ardından STRING veri tabanından etkileşimleri incelenmiştir.

Araştırmaya 18 ile 65 yaş aralığında 3 erkek 17 kadın toplam 20 ağır astım hastası alınmış olup hastaların 14'üne mepolizumab, 6'sına omalizumab başlanmıştır. Tedaviye başlanırken ve tedavinin 1. Yılında hastalar tekrar değerlendirilmiş ve tedaviye dirençli 3 ve duyarlı 5 hasta ile proteomik analizler yapılmıştır. Proteomik analizlerde 8 hastada toplam 2033 protein tespit edilmiştir. Tespit edilen proteinlerden 11 tanesi anlamlı farklılık göstermiştir. FHL1, GLUD1; GLUD2, RPL13, IMMT, DAAM1 genlerinin kodladığı proteinler tedaviye dirençli hastalarda, HLA-A, ACTB, USP14, DAZAP1, MYO1F,TUBB4B;TUBB4A ise duyarlı hastalarda, anlamlı artış göstermiştir. İfadesi değişen tüm proteinler STRING ve Reactome veri tabanından değerlendirildiğinde 39 farklı yolağı etkileme potansiyeli olduğu görülmüştür. Tespit edilen proteinlerin birçoğunun edinsel ve kalıtsal immün sistemde rol aldığı dikkati çekmektedir.

İfadesi değişen proteinlerden birbiri ile en çok ilişkilendirilenler literatürden incelendiğinde FHL1, ANXA2, VAMP8, ACTB, MMP9, NME1, NME2 proteinlerinin biyobelirteç olarak kullanılabileceği öngörülmektedir. FHL1 ve ANXA2'nin düz kas hipertrofisi ve remodellingi ön görebileceği, VAMP8'in goblet hiperplazisi yaparak sekresyon miktarını arttırarak hastalık seyrini değiştireceği düşünülmüştür. Araştırmada keşfedilen proteinler kapsamlı tarama çalışmaları ileduyarlılık ve özgüllüklerinin belirlenmesi sonrasında biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyeli taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Astım, ağır astım, Biyolojik tedaviler, Proteomik, biyobelirteç keşfi

ABSTRACT

Determination of Proteomic Profiles of Mononuclear Cells in Adult Severe Asthma Patients and Their Relationship With Treatment Sensitivity

Biological treatments are becoming increasingly important for adult patients with severe asthma, but these treatments, which are quite expensive today, do not yield the expected response in some patients. A marker that can predict sensitivity or resistance to biological treatments is of great importance for both the patient and the national economy. This research aims to discover proteins that can determine the patients' response to treatment before the treatment starts.

Blood samples of 10 cc with EDTA were collected for proteomic analysis before the treatment from patients who applied to the Chest Diseases outpatient clinic of Çukurova University Hospital between November 2022 and November 2023, diagnosed with severe asthma, and agreed to participate in the research for biological agent treatment. Mononuclear cell isolation from blood samples was performed using Ficoll solution. Proteins were isolated from mononuclear cells. The obtained protein samples were divided into their peptides using a commercial kit and analyzed proteomically with LC-MS/MS. Then, the raw proteomic data were analyzed with the MaxQuant program. Proteins obtained as a result of the analysis have been identified with the Perseus program to which biological pathway they belong and their KEGG numbers have been determined. Their interactions were then examined from the STRING database.

20 severe asthma patients aged between 18 and 65 were included in the study, with 14 starting on mepolizumab and 6 on omalizumab. Patients were re-evaluated at the start of treatment and in the 1st year of treatment, and proteomic analyses were conducted on 3 resistant and 5 sensitive patients. In proteomic analyses, a total of 2033 proteins were detected in 8 patients. 11 of the detected proteins showed significant differences. Proteins coded by FHL1, GLUD1, GLUD2, RPL13, IMMT, DAAM1 genes in resistant patients and HLA-A, ACTB, USP14, DAZAP1, MYO1F, TUBB4B, TUBB4A in sensitive patients showed a significant increase. All proteins with changed expression, when evaluated from the STRING and Reactome database, have been seen to have the potential to affect 39 different pathways. Many of the detected proteins play roles in the acquired and hereditary immune system.

Among the proteins with changed expression, FHL1, ANXA2, VAMP8, ACTB, MMP9, NME1, NME2 are predicted to be used as biomarkers when examined from the literature. It is thought that FHL1 and ANXA2 can predict smooth muscle hypertrophy and remodeling, and VAMP8 can change the course of the disease by increasing secretion amount through goblet hyperplasia. The proteins discovered in the research have the potential to be used as biomarkers after determining their sensitivity and specificity through comprehensive screening studies.

Keywords: Asthma, Severe asthma, Biological treatments, Proteomics, Biomarker discovery

1. GİRİŞ

Astım, alevlenme ve stabil dönemlerle izlenen, hava akım kısıtlılığı ve aşırı duyarlılığıyla karakterize kronik inflamatuar akciğer hastalığıdır. Dünya genelinde 300 milyon kişiyi etkilediği düşünülmektedir ve sıklığı giderek artmaktadır.[1]

Astım tedavisini uygun bir şekilde alan, ek hastalıkları kontrol alınmasına rağmen astımı kontrol altına alınamayan ve yüksek doz tedavide basamak inildiğinde astım kontrolü bozulan hastalar ağır astım olarak adlandırılmaktadır. Ağır astım hastalarına fenotiplerine uygun olarak biyolojik ajanlar ile tedaviler başlanmaktadır. Biyolojik tedaviler başlanırken potansiyel yararını gösterebilecek biyobelirteçler mevcut olup, tedaviye duyarlılığını ön görmektedir.

Proteomik, proteinlerin işlevlerini, bileşimlerini, yapılarını, diğer protein ve makromoleküllerle etkileşimleri ile tüm bunların hücresel aktivitelerinin incelenmesi şeklinde tanımlanmaktadır.[2] Proteomik araştırmalarla sağlıklı hastalara kıyasla protein ekspresyonu artmış veya azalmış tespit edilen proteinler biyobelirteç olarak kullanılabilmektedir.

Araştırmamızda ağır astım tanısı alan biyolojik tedavi kullanan tedaviye duyarlı ve dirençli hastaların mononükler hücrelerini izole ederek proteomik profillerini belirlemeyi planladık. Elde edilen proteinler ile literatür taraması yapılarak biyobelirteç olarak kullanılabilecek proteinleri tespit etmek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Astım Tanımı

Astım, Yunanca ἄσθμα, *ásthma* kelimesinden gelmekte olup nefes nefese, kısa nefes ya da zahmetli nefes alma anlamına gelmektedir. Bu nedenle astım uzun yıllar bir semptom olarak kabul edilip tedavi edilmiştir. [3]

Güncel tanımına bakıldığında, astım değişken ekspiratuar hava akımı kısıtlılığı ile ataklar halinde seyreden dispne, hırıltılı solunum, öksürük, göğüste sıkışma hissi gibi semptomlarla ortaya çıkan bir hastalıktır. [1]

Viral enfeksiyonlar, alerjenlere maruziyet, sigara içimi, ani ısı değişimleri, egzersiz ve stress astım ataklarının sık tetikleyicileri arasındadır.[4]

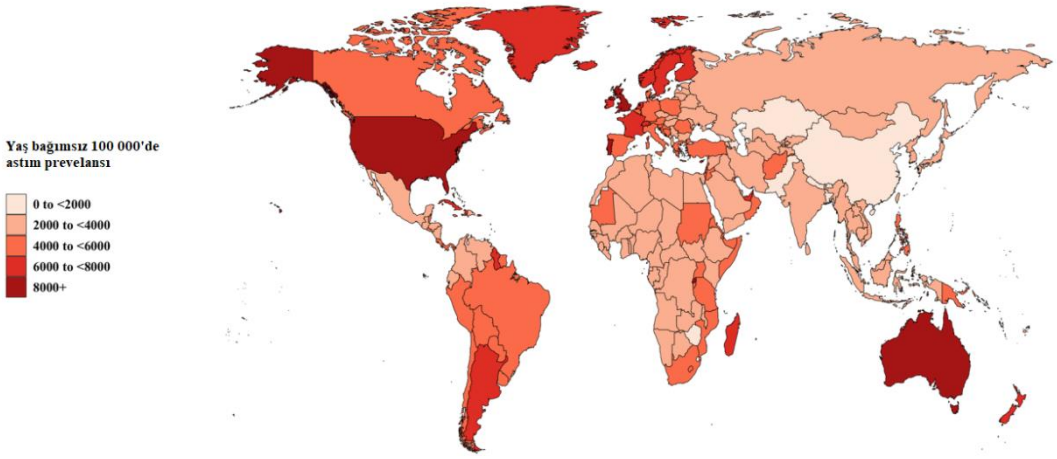
2.2. Epidemiyoloji

Astım çeşitli ülkelerde nüfusun %1-20'sini dünya genelinde ise 300 milyon kişiyi etkilediği düşünülen kronik bir hastalıktır. [1]

Şiddet, mortalite ve prevalans olarak bakıldığında astımda coğrafi olarak farklılıklar bulunmaktadır. Prevalans olarak yüksek gelirli ülkelerde astım prevalansı daha yüksek iken astım ilişkili ölümlerin çoğu düşük orta gelirli ülkelerde görülmektedir. [5] Yüksek gelirli ülkelerde astım prevelansı nispeten daha fazla görülmüş olup şekil 1'de gösterilmektedir.

Yetişkinlerde kadınlarda erkeklere göre daha yaygın olan astım, kadınlarda yaklaşık %9.7 erkeklerde ise %6.2 oranında görülmektedir.[6] Çocuklarda ise yetişkinlerin tam tersine erkek çocuklarda kız çocuklara göre daha yaygın görülmekte olup erkeklerin yaklaşık %7.3'ünde kızların ise %5.6'sında astım mevcuttur.[6]

Astım çocukluk çağının en yaygın kronik hastalığı olmakla birlikte, hastaneye yatışların, okul devamsızlığının, düzenli ilaç kullanımının oldukça sık bir nedenidir. [7]



Şekil 1.Dünyadaki astım prevelansı [8]

2.3. Risk Faktörleri

Astım risk faktörleri, hastalığa yakalanma ihtimalini arttıran, hastalığa yakalanma ihtimali olan hastalarda hastalığı ortaya çıkaran ve hasta olan kişilerde hastalığın fenotipini belirleyen çevresel ve kişisel faktörlerdir. Kişisel ve çevresel faktörler birçok faktörden oluşmaktadır tablo 1'de özetlenmektedir.

Astım hastalığı olma ihtimali olan hastalarda risk faktörleri arasında en sık neden genetik faktörlerdir.[9]

Tablo 1. Risk Faktörleri [1]

Kişisel Faktörler **-Genetik** **-Atopi** **- Bronş Hiperreaktivitesi** **-Epigenetik** **-Enfeksiyonlar** **-Mikrobiyata** **-Stres** **-Cinsiyet** **-Obezite**
Çevresel Faktörler **-İç ortam : Ev tozu akarları, ev hayvanları (kedi, köpek), hamamböceği ve küf mantarları** **-Dış ortam : Polenler ve küf mantarları** **- Mikroorganizmalar : Hava yolu ve bağırsak flora bakterileri** **- İnfeksiyonlar: Özellikle viral etkenler** **-Mesleki duyarlılaştırıcılar** **-Sigara : Hem aktif hem de pasif içiciler** **-Hava Kirliliği : İç ve dış ortam hava kirliliği** **-Diyet**

2.4. Kişisel risk faktörleri

2.4.1. Genetik

Astım oluşumunda ve gelişiminde en başta genetik faktörler gelmektedir. Genetik yatkınlıkların belirlenmesi için günümüzde kullanılan üç popüler yöntem vardır.

1. Aday gen yaklaşımı, genetik olarak hastalık patogenezinde rol oynadığına inanılan genlerdeki polimorfizm aranması temeline dayanır ve aynı genetik allel frekanslarındaki uygun adaylar karşılaştırılarak değerlendirilir.[10]
2. Geleneksel bağlantısal yaklaşım, astımdan etkilenen aile üyeleri genom boyunca taranır ve aday bölgeler belirlenir, daha sonra bu aday bölgeler daha sonra diğer hasta kişilerde taranır. Bu metod ön bilgi gerektirmeden yeni birçok olası aday gen keşfini sağlayabilir.[10]
3. En yeni yaklaşım, aile temelli veya vaka serileri ile ilişkilendirilen tek nükleotit polimorfizmleriyle hastalık fenotiplerinin ilişkisinin keşfidir. Yüzbinlerce aday nükleotit olması dolayısıyla dar bölgelerdeki araştırmaları sağlayabilir.[10]

11 farklı popülasyonda[11] yapılan genetik araştırmalarda 5q, 2q, 13q, 6q ve 12q kromozomlarında muhtemel astım/atopi genlerini içeren 18 genomik bölge belirlendi ve bugüne kadar 180'den fazla gen ile astım ilişkisi belirlendi.

Yapılan araştırmalarda B2 adrenerjik reseptör geni [12–14] , Th1 ve Th2 hücre farklılaşmasında rol oynayan IL4, IL4A,IFNG, IFNGR1, STAT6 sitokinlerde, transkripsiyon faktörlerini içeren genlerde, atopik hastalıklarda hücresel yanıtta karakterize olan IL13 ve reseptöründe ve FCER1B geninde mutasyonlar bulunmuştur.[15–17] Tüm bu keşiflere rağmen genlerin işlevleri, gen polimorfizmleri ile astım kökeni, ciddiyeti ve tedaviye yanıtla ilgili bilgiler tam olarak bilinmemektedir. [18]

2.4.2. Epigenetik

Epigenetik, genleri değiştirmeden transkripsiyonunu etkileyen histonlar ve DNA metilasyonlarındaki modifikasyonların incelenmesidir. Bireydeki tüm hücreler aynı olmasına rağmen tüm hücreleri aynı fonksiyona sahip değildir ve bu durum epigenetik olarak düzenlenmektedir. Epigenetik kontrol iki ana yoldan gerçekleşir. Birincisi DNA

metilasyonudur, genlerin düzenleyici bölgelerindeki sitozin kalıntıları metillenerek gerçekleşir. İkincisi kromozomal DNA'ların histonlarındaki değişikliklerle oluşur.

Temel olarak DNA'nın epigenetik modifikasyonu yaşam tarzı ve kimyasal maruziyet ile olduğu ileri sürülmekte[19] olup, epigenetik modifikasyonlar kalıtsal veya edinsel olabilir. Hamilelik döneminde annenin beslenmesi (folik asit ve B12 vitamini), sigara kullanımı, enfeksiyon geçirmesi ve stresi fetal genlerde epigenetik değişikliklere neden olarak allerji, astım riskini tetikleyebilir.[20,21] Benzer şekilde erken çocukluk döneminde yaşanan stres de erişkin dönemde astım gelişimi ile ilişkili genlerin epigenetik düzenlenmesini etkileyebilmekte ve epigenetik düzenlemeler kalıtsal olarak da aktarılabilmektedir.[22]

2.4.3. Cinsiyet

Çocukluk çağında astım ve atopi erkek hastalarda kadın hastalardan daha sık olduğu gözlenmiş [23,24] olup bu dağılımın ergenlik döneminde değişmektedir. Cinsiyet bağımlı değişikliklerin, kız çocuklarında düşük IgE seviyelerinin timik stromal lenfopoietin (TSLP) bağlantılı olduğu[25] ve kadınlarda astımla östrojen reseptör 1(ESR1)'in [26] ilişkili olduğu bulunmuştur.

2.4.4. Obezite

Epidemiyolojik çalışmalarda astımın obez insanlarda prevelansının arttığı görülmüş olup. Obezite astımda risk, fenotip ve prognoz ile direk ilişkili olup, hastalarda daha fazla semptom, hayat kalitesinde düşme ve ağır astım sıklığında artma bulunmuştur.[27,28] Obezitenin astım gelişimi üzerine etkisi kadınlarda erkeklere göre daha fazla bulunmuştur.[29,30] Obezitenin astım riskini arttırdığı kesin olup patofizyolojisi hala netleştirilmemiştir.

2.4.5. Enfeksiyonlar

Astım patogenezinde viral ve bakteriyel enfeksiyonlar en önemli faktörlerden biridir. Astımlı hastalarda enfeksiyonlardan sonra bozulmuş mukozal ve sistemik

immün cevabın bozulduğu buna bağlı hastalık geliştiği veya hastalığın ilerlediği izlenmiştir.[31]

Üst ve alt solunum yolu enfeksiyonlarının (ÜSYE ve ASYE) en sık sebepleri viral enfeksiyonlardır. Çocuklarda en sık tanımlanan virüsler human rhinovirusler, respiratuar sinsityal virüs, influenza ve parainfluenza, coronavirus, adenovirus, insan metapneumomovirus ve bocavirustur. [32,33] Birçok çalışmada erken çocukluk döneminde geçirilen ASYE ile çocukluk döneminde görülen wheezing ve astım ilişkili bulunmuştur.[32,34,35] Enfeksiyonlarla astım gelişimi arasındaki mekanizma net olarak bilinmemektedir.

Prospektif bir kohort araştırmasında 3 yaş öncesi geçirilen enfeksiyonların 6 yaşında görülen wheezingle doğrudan ilişkili olduğu ve 11 ile 13 yaşları arasındaki FEV1 değerindeki düşüş ve salbutamole yanıt, bronş reaktivitesi ile doğrudan ilişkili bulunmuştur.[36] Son zamanlarda yapılan bir araştırmada çocukluk çağındaki viral ve bakteriyel enfeksiyonların astım gelişimine yol açabilecek değişen hava yolu fonksiyonu ve mekaniği, bozulmuş mukozal bağışıklık, bozulmuş sistemik bağışıklık ve atopik duyarlılaşma olarak 4 ana bileşen teorileri tanımlamışlardır.

2.4.6. Mikrobiyata

Avrupada erken yaşta çiftlik maruziyeti olan çocuklarda çeşitli nedenlerle astım oranlarının daha düşük olduğu bulunmuştur, ana mekanizma inhalasyon olarak düşünülmüştür. Pastorize edilmemiş süt tüketen çocuklarda atopik hastalık riskinin azalmasının intestinal sistemin mikrobiyatası ile ilişkili olduğu bulunmuştur.[37] Barsaktaki lenfoid doku vücuttaki en büyük lenfoid doku kütlesini tanımlar ve mukozal immün yanıtta kritik önemi vardır. 1 yaşındaki atopik bebeklerin 3 haftalıkken dışkılarında sağlıklı çocuklardan daha fazla clostridium ve daha az bifidobacterium bulunduğu gösterilmiştir.[38]

Astımlı hastalardan alınan bronşial epitel örneklerde taksonomik sınıflandırmayla toplam 1941 bakteri olduğu ve astımlı hastalarda bakteriyel çeşitliliğinin sağlıklı hastalara göre arttığı (Sırasıyla 48-1200 ve 200-253) tespit edilmiştir. Mikrobiyal çeşitlilik sağlıklı ve astım hastaları arasında farklılık göstermiştir ve çeşitlilik ile spirometrik ölçümler, eozinofili ve alevlenme sıklığı arasında ilişki bulunmamıştır.[39]

2.4.7. Diyet

Doğum öncesinde ve doğum sonrasında diyetle atopik hastalıklar arasındaki ilişkiyi inceleyen araştırmalar özellikle anti-inflamatuar özelliklere sahip (omega-3 yağ asitleri), e vitamini, çinko gibi antioksidanlara ve D vitaminine odaklanmıştır. Gebelik döneminde balık tüketimi arttırılan veya balık yağı tüketen gebelerin çocuklarında 6 yaşına kadar atopik hastalık (dermatit ve astım) gelişme ihtimalinin düşük olduğu bulunmuş[40–42], doğum öncesinde yapılan çalışmalarda E vitamini ve çinko ile beslenmenin 5 yaşına kadar astım gelişme ihtimalini azalttığı gösterilmiştir.[43,44] Çok sayıda randomize kontrollü araştırmayı inceleyen bir metaanalizde, diyet ile alınan C, E ve D vitaminin, meyve tüketimi ve akdeniz diyetinin astım ve wheezing gelişmesi ile negatif korelasyon gösterdiği, tuz alımı ile astım gelişimi arasında bir kanıt olmadığı belirlenmiştir. [45]

2.4.8. Vitamin D

D vitamini kalsiyum-fosfor dengesini, kemik turnoverını düzenleyen iskelet sistemi sağlığı için erişkin ve çocukluk çağında önemli bir yer tutan bir moleküldür. [46] D vitamini ile edinilmiş bağışıklık arasındaki ilk çalışmalar tüberküloz ve lepra hastalığı tedavisinde araştırılmıştır fakat mekanizması net açıklanamamıştır.[47] Deneysel araştırmalarda kazanılmış bağışıklık sistemindeki fagositozu arttırdığı ve epitelyal bariyer sistemini kuvvetlendirdiği gösterilmiş, [48,49] epidemiyolojik araştırmalarda D vitamini seviyesi ile multiple sklerozis [50,51] , Tip 1 Diyabetes Mellitus[52], irritable bağırsak sendromu [53] ve romatoid artrit[54] arasında ilişki bulunmuştur. İmmünomodülatör etkisi bilinen D vitamini ile astım hastalarında çok sayıda çalışma yapılmıştır. Sarıoğlu ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada astım hastalarında kontrol grubuna göre daha düşük D vitamini seviyeleri saptanmış, D vitamini düşük olan hastalarda ağır astım olma ihtimalinin arttığı, astım kontrolünün bozulduğu ve akciğer fonksiyon kaybının daha fazla olduğu bulunmuştur.[55] Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan bir çalışmada vitamin D seviyesindeki her 10 ng/ml düşmenin astım kontrolüyle ile ilişkili olduğugösterilmiştir. [56]

2.4.9. Stres

Stresin astım gelişimine katkısı ile ilgili çok sayıda araştırma mevcuttur. Stresin çeşitli değişikliklerle nöral, endokrinolojik, immün sistemi düzenlediği ve gen ekspresyonunu değiştirerek hastalığı tetiklediği bilinmektedir.[57] Stres durumunda korku, öfke ve üzüntü gibi olumsuz duygular biyolojik ve davranışsal değişiklikler yaratır [58]. Strese yanıt olarak "savaş ya da kaç" yanıtı gelişir ve bu durum da astım ve alerjik hastalıklara yatkınlığı arttırabilir.[59] Davranışsal olarak stres sigara, alkol kullanımını arttırarak ve kötü beslenme ile de ilişkili olarak da astım kontrolünü zorlaştırabilir. Çocukluk çağında 7 yaşına kadar maternal strese maruz kalan çocuklarda astım gelişme riskinin 1,3 kat arttığı bulunmuştur.[60] Akut ve kronik stress yaşayanlarda glukokortikoid reseptör mRNA'sında 5,5 kat ,β2-adrenerjik reseptör mRNA'sında 9,5 kat azalma bulunmuştur.[61] Erken çocukluk döneminde stres yaşayan yetişkinlerde, epigenetik olarak etkilenen genleri inceleyen 36 makaleyi ele alan bir sistematik derlemede astım patogenezi ilişkili olabilecek pek çok genin etkilendiği dösterilmiştir. [22]

2.4.10. Hijyen hipotezi

Son yüzyılda artan sanayileşme ile artan astım ve alerjik hastalık sıklığı hijyen hipotezi ile ilişkilendirilmiştir. Hijyen hipotezi infantil ve çocukluk döneminde sık enfeksiyon geçiren çocuklarda ilerleyen dönemde alerjik hastalık ve astım gelişme ihtimalinin azaldığını öne sürmektedir. Fakat tekrarlayan enfeksiyonların inflamatuar süreci destekleyebileceği düşünülmektedir.

2.5. Çevresel risk faktörleri

2.5.1. Allerjenler

Allerjenler astım gelişmesinde ve hastalık alevlenmesinde rol oynayan faktörlerdir. Allerjenler yüksek moleküler ağrılıklı ve düşük moleküler ağırlıklı olmak üzere ikiye ayrılır [62]. En sık karşılaşılan büyük moleküler ağırlıklı allerjenler un, bitki ve hayvan kökenli enzimler, sakız, yemek, sigara, kauçuk, hayvan ve böcek kökenlilerdir.

En sık düşük molekül ağırlıklıallerjenler poliizosiyonat ve polimerleri, asit anhidritler, metaller ve diğer kimyasal içeriklerdir.[63]

En sık tanımlanan allerjenler ev tozu akarları, kedi, köpek ve hamam böceğidir.[64,65]. Astım ve alerjik rinit beraberliği görülen hastaların alerjen duyarlılığı fazla bulunmuş olup spesifik nedenlerin keşfedilmesi hasta eğitimi açısından yarar sağlayabilecek olup spesifik tedavi seçenekleri de yaratmaktadır.

2.5.2. Mesleki Duyarlaştırıcılar

Mesleki duyarlaştırıcılar astım gelişimde ve alevlenmesinde rol oynarlar ve erişkin başlangıçlı astımların %10-25'inin iş yeri ile ilişkili olduğu bulunmuştur.[66] Mesleksel astım duyarlaştırıcıya bağlı ve irritana bağlı olmak üzere ikiye ayrılır [67]. Duyarlaştırıcıya bağlı astım yüksek molekül ağırlığına sahip maddelerle gelişmişse astım IgE aracılı hipersensivite mekanizması ile gerçekleşir ve beraberinde konjonktuvit, kontakt dermatit ve alerjik rinit de eşlik edebilir. Düşük molekül ağırlıklı maddelerle gelişen astımlarda mekanizma net olarak bilinmemekte olup eozinofilik hava yolu inflamasyonu her iki grupta da ortak bulunmuştur. [68] Yüksek ve düşük molekül ağırlıklı maddeler birçok çalışma kolunda kullanılmakta olup tablo 2'de çalışma kolları ve maddeler özetlenmiştir.

Tablo 2. Astımda Mesleki Duyarlaştırıcılar [66]

Yüksek Molekül ağırlıklı	
Un, tahıl, amilaz, yumurta	Fırıncı, pastacı
Fare, sıçan, kedi, köpek	Laboratuar çalışanı, veteriner
Lateks	Sağlık çalışanı
Deterjan enzimleri	Deterjan endüstrisi
Deniz ürünleri	Deniz ürünleri işçileri
Düşük Molekül Ağırlıklı	
Diizosiyanatlar	Sprey boyacıları, poliüretan işçileri
Persulfatlar	Kuaförler
Asit anhidridler	Plastik, Boya, İnsektisid endüstrisi
Gluteraldehit, metakrilat	Sağlık çalışanları
Tahta tozu	Marangozlar, odun işçileri
Metaller	Metal işçileri

2.5.3. İç ve dış ortam hava kirliliği

İnsan zamanın birçoğunu ev gibi kapalı alanlarda geçirmektedir. Ev gibi kapalı alanlarda alerjen, mikrop ve kimyasal kirletici mevcuttur. Evlerde artan plastik yüzey kaplayıcı, döşemelerle uçucu, yarı uçucu olan formaldehit ve fitalatların havadaki konsantrasyonu arttığı ve bu evlerde yaşayan çocuklarda daha fazla astım ve allerji tanısı koyulmuştur. [69–71] Haftada 4 günden fazla temizlik spreyi kullanan erişkin hastalarda astım sıklığı arasında yakın ilişki bulunmuştur. [72]

Dış ortam solunum sağlığını doğrudan etkiler ve dış ortam hava kirleticilerinin başında nitrojen dioksit, kükürt dioksit, ozon ve karbon monoksit gelmektedir. Partikul boyutu 2.5 ile 10-15µm olan maddeler daha rahat inhale edilerek daha fazla tepkime başlatır. Coğrafi bilgi sistemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda daha fazla PM 2.5 oranı içeren ortamlarda bulunan toplumlarda daha kötü sağlık sonuçları, solunumsal şikayetlerle ilişkilendirilmiştir. [73,74]

2.5.4. Sigara

Aktif sigara içimi astım gelişimi için risk faktörü olarak gösterilmiştir fakat sigara içen insanlardaki astım prevelansı sigara içmeyenlerle aynı görülmüştür. Sigara içen astım hastalarında astım kontrolünün daha zor olduğu görülmüştür. Hava yolu inflamasyonu artmış ve kortikosteroidlere yanıtın daha az olduğu gözlenmiştir. [75,76]

Alerjik rinit hastalarının 10 yıllık takibini içeren bir çalışmada astım gelişmesinde sigara içiciliği kuvvetli bir prediktif belirteçtir ve sigaraya temas dozuyla yakın ilişki içindedir [77]. Yapılan bir metaanalizde prenatal ve postnatal pasif sigara içiciliğinin çocukluk çağında astım gelişme riskini %21 ile %85 oranında arttırdığı bulunmuştur. [78]

2.6. Patogenez

Astım hastalığının patogenezinde de bir önceki bölümde vurgulanan risk faktörlerinin rol oynadığını görülmekle birlikte moleküler patofizyolojisi oldukça karışıktır ve henüz tamamen aydınlatılamamıştır. Astım patofizyolojisinin temeli inflamasyondur ve inflamasyonda birçok hücre ve mediatörler rol alır. Hava yolu kronik

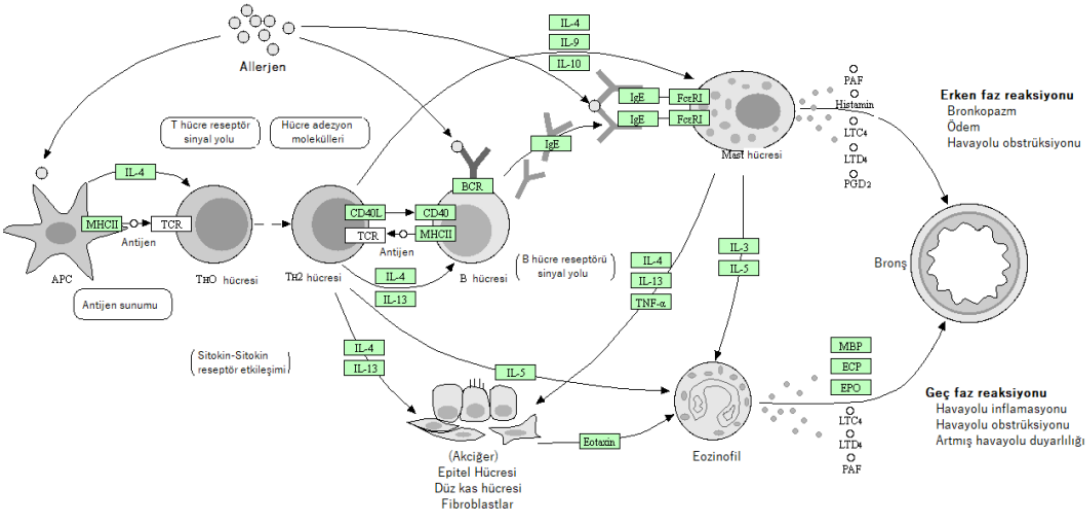
inflamasyonu, remodellingini ve hava kısıtlılığını bu hücre ve mediatörler sağlar ve hastalık fenotiplerine göre yapılsal profilleri bellirlidir.

Akciğerler anatomik olarak iletici ve respiratuar olarak ikiye ayrılır. İletici yollar burundan başlayarak solunum fonksiyonun başladığı terminal bronşiallere kadar devam eder. [79] Astım bronşial ağacı etkileyerek ve havanın alveolar değiştirir. Bronşial yapılar düz kas hücreleri ve elastik fibriller içerir, bu yapılar mediatörlerle kontraksiyon, relaksasyon yaparlar. [80]

Astım alevlenmelerinde ve kliniğinde iki faz vardır, ilk faz çevresel ve/veya kişisel risk faktörleriyle temas sonrasında duyarlanmış plazma hücrelerinden IgE salınır. Daha sonrasında IgE antikorları yüksek affiniteli mast ve bazofil hücrelerine bağlanarak sitokinleri degranülize ederek, histamin, prostoglandin ve lökotrien salınımını tetikler. Bu mediatörler düz kas hücrelerine bağlanarak hava yolunda daralma yapar.[81] Th2 hücreler IL-4, IL-5, IL-13 ve GM-CSF salınımını arttırarak tamamlayıcı rol oynar. IL-3 ve IL-5 eozinofil ve bazofil sağ kalımını arttırır, IL-13 remodelling, fibrozis ve hiperplaziyi arttırır. [82] İkinci faz interlökinler salındıktan saatler sonra başlar ve eozinofil, bazofil, nötrofil ve hafıza ve yardımcı T hücreler inflamasyon bölgesine gelerek bronkokonstriksiyon yaratırlar. Tekrarlayan bronkokonstriksiyon ve inflamasyon kalıcı hava yolu obstrüksiyonuna yol açarak solunum işini arttırır.

Hava yolu hiperreaktivitesi astımda patogenezinde bronkokonstriksiyonu arttırarak hayati rol oynar. Hiperreaktivite ile ilgili birçok mekanizma öne atılsa da mast hücrelerinden histamin salınımına bağlı düz kas kontraksiyonu en sık kabul gören patofizyolojilerden biridir. Yapılan çalışmalarda hiperreaktivite olan hastalarda vagal tonusun arttığı ve intraselüler bağımsız kalsiyum seviyesinin artmış olduğu bulunmuştur. [83] Hava yolu hiperreaktivitesi varlığı akciğer fonksiyon kaybı ve astım alevlenme riski ile ilişkili bulunmuştur. [84]

İnflamasyon, lökosit migrasyonu, mukus üretiminin artması gibi mekanizmaların birleşmesi ile hastalarda solunum güçlüğü oluşur. Miyofibroblastların artışı ile birlikte epitel hücrelerindeki kollajen üretimi artar bu durum da düz kas tabakası ve lamina retikülarisi kalınlaştırır.[85] Bazal membrandaki kalınlaşma ile birlikte hava yolu remodelling oluşur ve hava yolunda kalıcı daralmalar görülür. [86]



Şekil 2. Astım Patogenezinde Rol Alan Sitokinler ve Sonuçlar [87]

2.6.1. İnflamatuar hücreler

Hava yolu inflamasyonunda ve astım gelişiminde birçok hücre yer almakla birlikte ana hücreler eozinofiller, mast hücreleri, dendritik hücreler, makrofajlar ve T lenfositler rol almaktadır.[88]

Eozinofil

Eozinofiller alerjik hastalıklarda majör inflamatuar hücredir. Normal koşullarda sağlıklı akciğerde görülmezken inflamatuar durumlarda ve orta ağır astımlı hastalarda görülebilir. [89] IL-5 Hava yollarındaki hücre ömrünü uzatan ve maturasyonunu sağ kalımını arttırır. Bulundukları bölgede bol miktarda eozinofil peroksidaz, majör bazik protein, eozinofil katyonik protein gibi katyonuk proteinler ve hipobromide, superoksit, peroksit gibi reaktif oksijen radikalleri salgılarlar. Salgılanan bu proteinler damarlarda permeabilite artışı, düz kas kontraksiyonu, hipertrofisine yol açar. Aynı zamanda LTC4 ve LTE4 gibi lökotrienler, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, TNF alfa, TGF-beta, VEGF ve PDGF gibi sitokin salınımı yaparak inflamasyona yol açarlar. [90]

Mast Hücreleri

Mast hücreleri astımlı hastaların düz kas hücrelerinde bol sayıda bulunur. Hücre içinde bol miktarda histamin ve heparin içeren granüller bulunur. Histamin ve triptaz salgılayarak bronkokonstriksiyon ve remodellinge katkıda bulunur.[91] IL-4, TNF-alfa, nörotropinler ve büyüme faktörü gibi proinflamatuar sitokinlerin salınımında görev alırlar. Normal BAL'de mast hücresi %0.02- %0.48 arasında bulunur fakat astımlı hastaların bronkoalveolar lavajlarında mast hücresi sayısı 2 ile 6 kat artmış bulunmuştur. [92–94]

Hava yollarında bulunan mast hücreleri alerjenle ve FcεRI aracılığıyla IgE ile uyarılır. Uyarıdan dakikalar sonra histamin, triptaz ve yeni sentez edilen PGD2 ve LTC4 salınır.[95] Bu salgılar potent bronkokonstriksiyon yapar ve vasküler permeabiliteyi arttırır. Alerjenlere ek olarak egzersiz, aspirin ve bazı kimyasallar mast degranülasyonuna yol açarak bronkokonstriksiyona yol açar. [96]

Bazofil Hücreleri

Yüksek seviyede FcεRI reseptörleri içererek hızlı bir şekilde alerjen yanıtı verebilir. Sağlıklı insanların hava yollarında bazofil hücrelerine rastlanmazken astımlı hastalarda rastlanır ve semptomatik hastaların balgamlarında bazofil hücrelerine rastlanmıştır.[97] Ağır astımlı hastaların bronşiyal biyopsilerinde bronş mukozasına bazofil infiltrasyonu tespit edilmiştir. [98] Mast hücreleri gibi alerjen teması sonrasında histamin salgılar fakat PDG_2 salgılamaz. Mast hücreleri gibi LTC_4 salgılar ve son dönemlerde IgE ilişkili stimülasyonlarla IL-4 ve IL-13 salgıladığı bulunmuştur. [99]

Makrofajlar

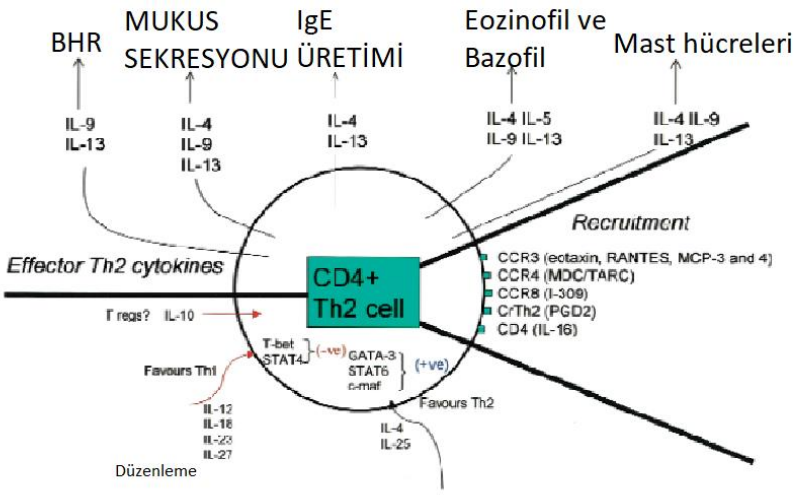
Makrofajlar kandaki monositlerin farklılaşmasıyle gelişir. Makrofajlar astımlı ve astımlı olmayan hastalarda BAL'de dominant hücredir. Akciğerlerde inflamatuar yanıtın düzenlenmesinde ve antijen sunumunda rol oynar. IL-1, IL-10 salınımı ile spesifik lenfosit diferansiasyonu ve proliferasyonunu sağlar.[100] Alveolar makrofajlar az miktarda düşük afiniteli IgE FcεRI reseptörü içerir [101] ve astımlı hastalarda sağlıkli insanlara göre artmış bulunmuştur.[102] IL-1, TNF-alfa, GM-CSF gibi proinflamatuar sitokinler salınımı yaparak eozinofil sağ kalımını arttırır.

Nötrofil

Astım fenotipleri balgamdaki hücre profiline göre isimlendilir ve çoğunlukla eozinofil astım olarak bilinse de son dönemlerde Paucigranulositik astım ve mikst granülositik astım da tanımlanmıştır. Paucigranulositik astımda balgam nötrofil <%76 ve eozinofil <%3 ölçülürken mikst granülositik astımda balgamda nötrofil >%76 eozinofil >%3 olarak ölçülmüştür.[103] Nötrofilik astım için henüz kesin tanımlama yoktur. [104] Nötrofilik astım balgamda nötrofil sayısının artması ve >%60 veya >%76 olması olarak tanımlanmaktadır.[105] Nötrofil IL-8 ve LTB4 salınımı yaparak ve TLR4 ekspresyonunu arttırarak eozinofil migrasyonunu arttırdığı bulunmuştur. [106] Ayrıca, Th17 üzerinden IL-17 ve IL-17A üretimi arttırarak epitelyal hücre üretimini ve fibroblast üretimini ve glukokortikoid reseptör β üretimini arttırırdığı gösterilmiş [107] bu durumda nötrofilik astımda glukokortikoid duyarsızlığı ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir

Lenfositler

Lenfosit subtiplerinin belirlenmesi ile astım patogenezindeki görevleri daha net anlaşılmaya başlanmıştır. Eozinofilik astımlı hastalarda Th2 lenfositler artmıştır. Th2 lenfositler IL-4, IL-5, IL-13 salınımı yaparak B lenfositler üzerinden IgE üretimini arttırır. Th hücreleri regüle eden ve Th2 hücreden salınan sitokinler astım patogenezinde rol oynamaktadır. [108] Th2 hücrelerden salınan sitokinler (şekil 3'de özetlenmiştir.) astım patogenezinde kilit rol oynamaktadır. IL-5, eozinofillerin aktivasyonu, farklılaşması ve kemotaksisinde rol oynar. IL-13, epitel hücrelerinde proliferasyon ve mukus sekresyon artışı ve bronş hiperaktivitesinde rol oynar.[109]



Şekil 3. Th2 Hücresinin Etkileri ve Düzenlenmesi [108]

Mediatörler

Mediatörler hücresel süreçlerde, hücreler arasındaki sinyal iletimi yapan kimyasal maddelerdir. Astım patofizyolojisine bakıldığında çok sayıda mediatörün rol oynadığı görülmektedir. Histamin, prostoglandin, lökotrienler, sitokinler, kemokin başlıca mediatörlerdir ve düz kas kasılması, mikrovasküler kaçış, mukus sekresyon artışında rol oynarlar.[110]

Histamin

Histamin astım patofizyolojisinde ilk tanımlanan mediatördür. Bazofil ve mast hücrelerinde sentezlenerek salınır. Mukus sekresyonu ve vagal kolinerjik refleksle birlikte bronkokonstriksiyona yol açar. Eozinofiller için kemoatraktandır ve eozinofilleri aktive eder.[111]

Lökotrienler

Sisteinil lökotrienler, LTC4, LTD4 ve LTE4 eikazanoidler, araşidonik asitten 5-lipooksijenaz(5-LOX) yoluyla üretilir. Hava yolunda potent konstriktör etkileri vardır ve BHR'de önemli bir rol oynamaktadır.[112] Güçlü LTD4 antagonistleri egzersiz ve alerjenle tetiklenen bronkokonstriksiyona karşı koruyucudur.

Platelet Aktive Edici Faktör

Platelet aktive edici faktör (PAF) potent inflamatuar mediatördür. Eozinofil aktivasyonu, indüksiyonu, BHR gelişimini, mukus hipersekresyonunu ve plazma eksüdasyonuna neden olur. Alerjik astımlı hastaların BAL analizlerinde yüksek seviyelerde lyso-PAF(PAF metaboliti) tespit edilmiştir.[113]

Prostaglandin

Prostaglandinler, araşidonik asitten siklooksijenaz (COX) yoluyla üretilir. Astımlı hastaların bronkoalveolar lavajında PGF2, PGD2 ve tromboksan B2 artmış bulunmuş. İnhale edildiklerinde bronkokonstriksiyona neden olduğu görülmüştür.[114]

Sitokinler

Sitokinler ekstraselüler sinyal proteinleridir ve inflamatuar yanıtta tüm hücrelerin iletişiminde kritik rol oynamaktadırlar.[115] Astım patogenezinde rol oynayan sitokinler ve astım hastalarında artış ve azalışı tablo 3'de özetlenmiştir.

Allerjenin vücuda girmesi ile antijen sunucu hücreler ve B lenfositler uyarılır. Antijen sunucu hücreler IL-4 salınımı ile Th0 hücreleri Th2'ye dönüşütürür. Th2 hücrelerinden salınan IL-4, IL-5 ve IL-13 akciğer epitel hücrelerini, düz kas hücrelerini ve fibroblastları uyarır aynı zamanda eozinofilleri uyarır. Eozinofiller salgıladıkları majör basit protein, eozinofilik katyonik protein, eozinofil peroksidaz ve lökotrien mekanizmasını aktive eder. Aktive olan sitokinler ve enzimlerle geç dönemde hava yolu inflamasyonu, hava yolu obstrüksiyonu ve hava yolu duyarlılığına neden olur. Aynı zamanda Th2 hücreleri salgıladıkları IL-4, IL-9 ve IL-10 ve B lenfositlerden salınan IgE ile mast hücre degranülasyonu ve aktivasyonu sağlar. Mast hücrelerinin aktive olması ile IL-3 ve IL-5 salınımı artar bu sitokinler de eozinofil aktivasyonuna neden olur. Mast hücre granüllerinde bulunan histamin, PAF ve lökotrienler erken dönemde bronkospazma, ödeme ve hava yolu obstrüksiyonuna neden olur. Bu mekanizma şekil 2'de özetlenmiştir.

Tablo 3. Astım Patogenezinde Rol Oynayan Sitokinler [108]

Sitokin	Th_1/Th_2 ilişkisi	Görevi	Üretilen Yer	Astımlı Hastalarda
IL-2	Th_1	T hücre büyümesi	Th_1, Eoz	Artmış
IL-3	Th_1/Th_2	Eozinofil, nötrofil,, bazofilfarklılaşması ve aktivasyonu	Th_1/Th_2, eoz, bazofil	Artmış
IL-4	Th_2	B hücrelerinde IgE üretim artışı, eozinofil bazofil artışı, mukus sekresyonu	Th_2, eoz, mast, bazofil	Artmış
IL-5	Th_2	Eoz, bazofil farklılaşması, olgunlaşması ve aktivasyonu	Th_2, eoz, mast, bazofil	Artmış
IL-6	Th_1/Th_2	Tve B hücre büyümesi, IgE sentezinde kofaktör	Th_1/Th_2, endotel	Ağır astımda artmış
IL-8		Nötrofil aktivasyonu ve kemotaksisi, eozinofil zayıf kemotaksisi	Endotel hücresi, fibroblast, T hücreler	Artmış
IL-9	Th_2	Mast ve eozinofil gelişimi ve mukus sekresyonu	Th_2, Eoz, mast, bazofil	Artmış
IL-10	T_{reg}	Th_1/Th_2 fonksiyon baskılanması, eoz/mast/bazofil aktivasyonu	T hücreler, makrofaj	Artmış/Azalmış
IL-11		BHR, eozınıfili, mukus hipersekresyonu, hava yolu remodellingi	Fib, makrofaj,endotel,epitel	Artmış
IL-12	Th_1	Th_1 üretiminde artış, IgE sentezi inhibisyonu	Makrofaj, B lenfosit	Azalmış
IL-13	Th_2	Mast hücresri gelişimi, B hücrelerden IgE üretiminde artış, eozinofili, BHR, mukus hipersekresyonu	Th_2, Eoz, mast, Bazofil	Artmış
IL-15	Th_1	T hücre büyüme faktörü	T hücre dışı hücreler	Azalmış
IL-16		CD4 hücreler, monosit, eozinofil kemoatraktanı	CD8, mast, eoz	Artmış
IL-17		Fibroblast, makrofaj, epitel ve endotelden inflamatuar sitokin salınımını arttırır	CD4 hafıza hücreler	Artmış
IL-18	Th_1	INF- γ üretimini arttırır	Makrofaj	Azalmış
IL-23	Th_1	Th_1 üretimini arttırır	Birçok hemopoietik hücreler	Çalışma yok
IL-25	Th_2	Th_2 gelişimini arttırır, IL-4, IL-5, IL-13 üretimini artırır	Th_2	Çalışma yok
IL-27	Th_1	Th1 büyümesini indükler	Antijen sunan hücreler	Çalışma yok
GM-CSF	Th_1/Th_2	Eoz, nötrofil, mast hücrelerinin farklılaşmasını ve aktivasyonunu sağlar	Th_1/Th_2, makrofaj, eozinofil, mast hücreler, bazofiller	Artmış
TNF-α		Endotel ve epitel aktivasyonunu sağlar	Makrofaj, NK hücreler, T hücreler	Artmış
TGF-β	T_{reg}	Th_1/Th_2 fonksiyonunu baskılar, T_{reg} üretimini indükler, fibrozis	Eoz, mast, bazofil, T hücreler, Monosit	Artmış
INF- γ	Th_1	IgE, Th_2 üretimini inhibe eder, Eoz ve makrofaj aktive eder	Th_1, NK hücreler	Alevlenme ve viral enf artmış.

NK hücreler; doğal öldürücü hücreler, Eoz; eozinofil

Kemokinler

Kemokinler, kemotaktik sitokinlerdir ve hava yollarına inflamatuar hücrelerin toplanmasını sağlar. CXC (α-tip), CC (β-tip) olarak iki ana grupta kategorize edilir.

CCR kemokinler etkilerini G protein aracılığıyla yapar.[116] Astım alevlenmelerinde kemokin sentezi ve salınımı artmıştır. Astımlı hastalarda eotaxin, eotaxin-2, MCP-3, MCP-4 ve CCR3 ekspresyonu artmış bulunmuştur ve bu durum BHR ile ilişkili bulunmuştur.[117]

Nöronal Mediatörler

Solunum siteminde çok sayıda nonadrenerjik- nonkolinerjik sinirler ve nöropeptitler tanımlanmıştır. Bu sinirler substance P, neurokinin A, kalsitonin gen ilişkili peptit (CGRP) gibi inflamatuar nitelikte nörotransmitter salgılamaktadır. Bundan dolayı kronik astım artmış nörojenik inflamasyonla ilişkili olabilir.[110]

Nitrik Oksit(NO)

Astımlı hastalarda ekshale edilen NO(FeNO) seviyeleri artmıştır ve bu durum inflamasyonun noninvaziv ölçümü için kullanılmaktadır. [118] Astımlı hastalarda NO üretimi indükte edilebilir NO sentetaz ile sağlanır (iNOS). Son çalışmalarda astımlı hastalarda FeNO seviyesi artmış bulunmuştur, bu durum da ilaç tedavisine yanıtın ve tedaviye uyumun değerlendirilmesi için kullanılabilmektedir.[119]

2.6.2. Hava Yolu Yapısal Hücreleri

Epitel hücreleri yapısal, fonksiyonel ve biyokimyasal olarak bazal, silyalı ve sekretuar olarak üç ana kategoride incelenir.[120] Yalancı çok katlı epitelden distale gittikçe kolumnar ve sonrasında küboidal olarak ilerler. [121] Hava yollarındaki epitel hücrelerinin dağılımı Şekil 4'te görülmektedir. Küçük hava yollarına gidildikçe sürfaktan salınımının artmasına bağlı granüller artar ve alveollere gelindiğinde tip 1 ve tip 2 pnömositler görülür.

Silyalı Silindirik Epitel Hücreleri

Silyalı silindirik epitel hücreleri hava yollarındaki tüm hücrelerin %50'sini oluşturur. [120] Tipik olarak hücreler 300 adet sil ve eşit sayıda mitokondri içerirler. Öncelikli görevleri mukusu akciğerden atılmasını sağlamaktır. [122]

Goblet Hücreleri

Goblet hücreleri zara bağlı bir asidik-müsinöz granüllerle karakterizedir.[123] Doğru miktarda üretimi mukusun viskoelastisitesi açısından ve mukosiliyer temizlik için önemlidir. Granüllerdeki müsinlerin salgılanması sülfür dioksit, sigara içimi ile artabilir. Normal sağlıklı bir insanda trakeada metrekarede 6800 goblet hücresi bulunur.[124] Kronik hava yolu inflamasyonla giden hastalıklarda goblet hiperplazisi ve metaplazisi gözlenir ve prodüktif öksürüğe neden olurlar [125]

Seröz Hücreler

Morfolojik olarak goblet hücrelerine benzerler fakat granül içerikleri farklıdır. Küçük hava yollarında nadir olarak görülür.[126]

Bazal hücreler

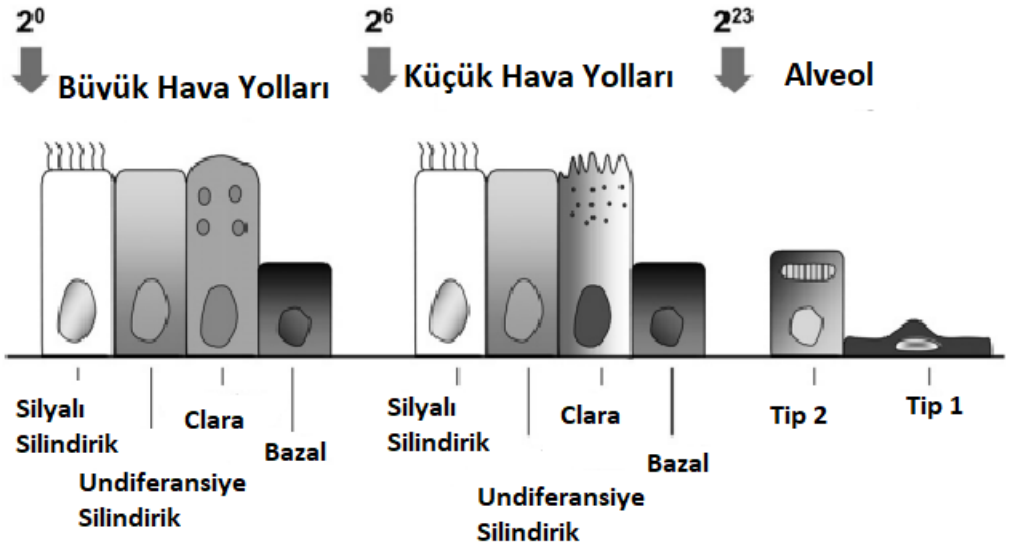
İletici epitel boyunca bazal hücreler mevcuttu fakat küçük hava yollarına gidildikçe miktarı azalır.[127] Epitel hücreleri arasında bazal membrana bağlanan tek hücredir.[128] Boers ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada incelenen otopsi örneklerinde 4mm'den büyük hava yollarının %51'inde 2mm'den küçük hava yollarının %81'inde bazal hücreler görülmüştür. [129] Küçük hava yollarında bazal hücre miktarı azalır, kök hücre görevini Clara hücreleri almaya başlar.

Clara hücreleri

Bronşial ve bronşiyoller'de görülür ve bronşiollerde sürfaktan üretimi yaparlar. Sekretuar rolüne ek olarak p450 monooksijenaz yolu ile bol miktarda lökosit peroksidaz salgılayarak ksenobiyotikleri inhibe ettikleri inanılmaktadır.[130]

Pulmoner Nöroendokrin hücreler (PNET)

Bronşial epitelde tek veya gruplar halinde bulunan epitel hücreleridir. Nazal epitelden terminal hava yollarına kadar izlenir ve sıklıkla bifurkasyonlarda bulunur.[131] Nadir gözlenen hücrelerdir ve sağlıklı insanlarda 10 000 epitel hücresinde 2.1 PNET görülür. Kronik bronşiti olan hastalarda 10 000 epitel hücresinde 6 tane görülür. [132] PNET hücreler serotonin, kalsitonin, kalsitonin gen ilişkili peptit, kromogranin A, gastrin ilişkili peptit ve kolestitokinin salgılar.[133]



Şekil 4. Hava Yollarındaki Epitel Hücreleri [121]

2.6.3. Hava yolu yapısal değişikleri

Astımdaki ilk havayolu remodellingi 1922 Hubert ve Koessler tarafından tanımlanmıştır. [134] Bütün astımlı hastalarda küçük ve büyük hava yollarında görülür. Yapısal değişiklikler epitel bütüklüğün kaybı[135], bazal membran kalınlaşması[136] , subepitelyal fibrozis [137] goblet ve submukozal bez sayısında artış, düz kas kütlesinde artış [138], kıkırdak yapının bütünlüğünü kaybı[139] , hava yolu vaskülaritesinin artması [140] olarak özetlenebilir. Kronik inflamasyona bağlı değişiklikler olarak özetlenebilir ve bu değişikliklerde CD4+ T hücreler, eozinofiller, nötrofiller ve mast hücreleri rol oynar. [141]

Epitelyal değişiklikler EGFR gibi büyüme faktörlerinini fazle ekpresyonuna bağlı, epitelyal dökülme, siliyalı hücre kaybı, goblet hiperplazisidir.[142] Klinik olarak epitelyal değişiklikler BHR ile ilişkili bulunmuştur [143] ve epitelyal hasar ve turnover astım ağırlığıyla ilişkilidir.

Subepitelyal fibrozis lamina retikülaris tabakasının fibroblast tarafından üretilen ekstraselüler matriks (ECM) proteinleri, tip I, III ve V kollajen, fibronektin, tenascin, lumican, biglycan[144,145] depolanması ile olur. Astımlı hastalarda ECM protein üretimi ve yıkımı arasında imbalans vardır. Matriks metalloproteinazlar (MMP) kollajen yıkımında rol oynayan proteazlardır ve MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 astımla ilişkili

bulunmuştur.[146,147] Yüksek MMP-9 seviyesi artmış balgam üretimi ile ilişkili bulunmuştur.[148] MMP-9 seviyeler FEV_1 düşüşü ile ilişkili bulunmuştur. [149,150]

Hava yolu düz kas hücrelerinde hipertrofi ve hiperplazi birlikte görülür. Proinflamatuar sitokinler, kemokinler, ECM proteinler [151] ile düz kas hücrelerinin remodellinginde rol oynar. Son dönemlerde kemokinlerin düz kas hücresi migrasyonu yaptığı ve kontraktilitesini arttırdığı görülmüştür.

Goblet hücre hiperplazisi ve submukozal bez hiperplazisi astımlı hastalarda görülür. [152] Hiperplazi sonucunda balgam üretiminde artış, balgam üretimine bağlı hava yolu darlığı ve hava yolu duvar kalınlığı görülür.

Hava yollarında mikrovaskülarite artar ve bu durum da bronşlardaki ödeme katkıda bulunur.[153] Vaskülaritedeki artış vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) salınımındaki artışla ilişkilidir. [154] Anjiogeneze bağlı olarak hava yollarında ödemde artış, inflamatuar hücrelerde artış ve remodelling yapan mediatörlerde artış gözlenir.

İnflamasyon hava yolu remodellinginde rol oynayan diğer bir kompenenttir. Th2 lenfositler, eozinofiller ve mast hüreleri IL-4, IL-5, IL-9 IL-13, TGF-β, GM-CSF, lipid mediatörler ve histamin salınımı yaparak bronkokonstriksiyon, mukus salınıında artışa yol açar.



Şekil 5. Astımda Hava Yolu Remodellingi oluşumuna katkı sağladığı gösterilen mekanizmalar [155]

Değişken hava akımı kısıtlanması astımda ana patolojik değişikliktir. Klinik semptomlarıa hava yolundaki daralma neden olur ve dominant nedeni bronkokonstriksiyondur. Akut alevlenmelerde bronşial düz kas hücrelerinde hızlı bir şekilde bronkokonstriksyon görülür. Allerjenler ve irritanlarla gelişen akut alevlenme IgE ilişkili mediatörlerin mast hücrelerinden salınması ile gelişir. Mast hücrelerinden histamin, triptaz, lökotrienler, prostoglandinler salınır ve direk düz kas hücrelerini etkiler. [156] Hastalık daha dirençli oldukça ve inflamasyon progresif oldukça hava akımı kısıtlanır, ödem, inflamasyon, mukus hipersekresyonu ve mukus tıkaçları hava yolu düz kas hücrelerinde hipertrofi ve hiperplazi yaparak yapısal değişikliklere yol açar (Şekil 5) . Bu yapısal değişiklikler hava yolu remodellingi olarak adlandırılır, tamamen önlenemez ya da tedavi ile tamamen geri döndürülemez. Çok sayıda fenotipi olmasına rağmen inflamasyon ve buna bağlı gelişen remodelling ortaktır. Astım fenotiplerine göre baskın hücre tipi değişebilmektedir.

2.7. Astım Tanısı

Astım hastalığının doğru tanısı gereksiz ve fazla tedavinin önlenmesi için önemlidir.[1] Tanının doğrulanması için en değerli anamnez ve fizik muayenedir. Hastalarda tipik olarak nefes darlığı, öksürük, göğüste sıkışıklık hissi, hırıltılı solunum gibi şikayetlerinin olması ve bunların değişken özellik göstermesidir. Fakat bu bulgular astım hastalığına özgün olmayıp sadece anamnez ve fizik muayene ile tanı koymak zordur, ek tanısal testler ile desteklemek gerekir. Tanısal testler tanıyı destekler fakat negatif olması tanıyı dışlatmaz.

2.7.1. Semptomlar

Nefes darlığı, öksürük, göğüste sıkışıklık hissi ve hırıltılı solunum hastalığı spesifik olup özellikle erişkinlerde semptomların birden fazlasının bulunması, şikayetlerinin gece veya sabaha karşı 03:00- 05:00 saatlerinde alevlenmesi, zamanla değişkenlik göstermesi ve viral enfeksiyonlar, allerjen teması, havadaki değişiklik, kahkaha, sigara içimi, egzoz gazları, parfüm kokuları gibi tetiklenme özellikleri varsa tanıyı desteklemektedir.[157] Solunumsal şikayetlerin çocukluk çağında başlaması,

özgeçmişinde alerjik rinit, atopik dermatit olması, ailede astım öyküsü olması, solunumsal şikayetlerin astıma bağlı olması ihtimalini arttırır.

2.7.2. Fizik muayene

Astımlı hastalarda fizik muayene sıklıkla normaldir. En sık patolojik bulgu eksipratuar ronküslerdir, alevlenme dönemlerinde sıklıkla duyulur. Alevlenmeler ağır ve hayatı tehtit edici olması durumunda solunum sesleri duyulamayabilir bu durumu sessiz akciğer denilir. Muayene sonunda veya her derin inspiryum sonunda öksürük görülmesi, hava yolu duyarlılığının göstergelerinden biridir.[158]

Ağır astım ataklarında artmış hiperinflasyon ve hava akımı kısıtlamasına bağlı görülen sessiz akciğer durumunda dinleme bulgularına ek olarak atağın ciddiyetine bağlı olarak uykuya meyil, konfüzyon, yardımcı solunum kaslarının kullanımı, taşikardi görülebilir.

Ronküs, wheezing astımlı hastalara özgün bir bulgu olmayıp laringeal obstrüksiyon, KOAH, pulmoner enfesksiyonlar, trakeomalazi, yabancı cisim aspirasyonları, endobronşial tümörlerde de görülebilir.[158]

2.7.3. Tanı ve takipte kullanılan testler

Astım hastalarında solunum fonksiyon testlerinde olmazsa olmaz geri dönüşlü hava yolu obstrüksiyonu, BHR ve PEF değişkenliğinin gösterilmesidir.[159] Astım hastalarında solunum fonksiyon testi tamamen normal de olabilmekle birlikte çok ağır obstrüksiyon da görülebilmektedir. Solunum fonksiyon testleri kontrolsüz astım hastalarında daha fazla değişkenlik gösterir.[160]

Solunum fonksiyon testleri tanı, takipte ve hava yolu değişkenliğinin tespitinde kullanılır. FEV_1, FVC ve FEV_1/FVC oranı ile zirve ekspiratuar akım hızı (PEF) ölçümü yapılabilir. [158] Bu ölçümler çoğu zaman daha büyük hava yollarıyla ilgili bilgi verir, FEF_{25-75} daha küçük hava yollarıyla ilgili bilgi verir.[159] Özetle hava yolu kısıtlılığını değerlendirmek için FEV_1, FVC, PEF ve FEF_{25-75} kullanılabilir. Hava yolu kısıtlanması genellikle postbronkodilatör $FEV_1/FVC<0.7$ olarak tanımlanır.

Spirometrik ölçümlerde hava akımı kısıtlanmaması ölçülmemesi durumunda evde PEF metre ile 2 haftalık PEF takibi hava yolu değişkenliğinin tespit edilmesi ve astım tanısının koyulmasına yardımcı olur. [161] PEF takibi sabah erken saatlerde ve akşam saatlerinde ve tercihen bronkodilatörden önce ve sonra günde en az 2 kere olacak şekilde uygulanır. PEF takibi, Astım ağırlığının belirlenmesinde ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. PEF ölçümlerinde diürnal değişim %20 üstünde olması astım için tanısal olup değişkenlik büyüklüğü hastalık şiddeti ile orantılı bulunmuştur.[162] PEF değişkenliği hesaplanması için şekil 6'daki formül kullanılmaktadır.

$$\text{PEF değişkenliği} = \frac{(PEF_{maksimum} - PEF_{minimum})X\ 100}{(PEF_{maksimum} + PEF_{minimum})/2}$$

Şekil 6. PEF değişkenliği formülü

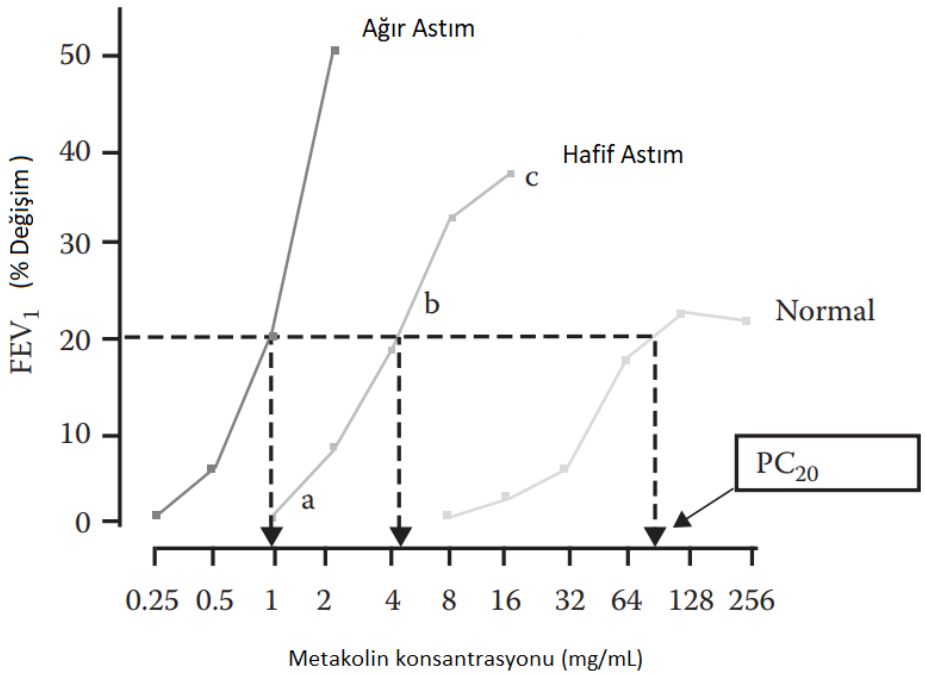
Bronş hiperaktivitesi, reverzibilitesi hızlı etkili bronkodilatörden sonra (200-400 mcg salbutamol[163] ve türevi hızlı etkili Beta2 agonist ile) hızlı FEV_1 düzelmesi veya etkili kontrol edici tedavi (IKS veya oral kortikosteroid) sonrasında FEV_1 düzelmesi olarak adlandırılır. Bronş hiperaktivitesinin variabilitesi bazı tetkikler ile tespit edilir:

- Bronkodilatör tedavi sonrasında veya uzun süreli kontrol edici tedavi sonrasında solunum fonksiyon testlerinde düzelme olması
- Bronş provakasyon testi sonrasında solunum fonksiyon testlerinde kötüleşme olması
- Evde veya vizitlerdeki 1-2 haftalık takiplerinde solunum fonksiyon testlerindeki variabilitenin tespit edilmesi

Bronkodilatör testlerin anlamlı kabul edilmesi için 200-400 mcg salbutamol inhalasyonundan 10-15 dk sonra yapılan solunum fonksiyon testinde FEV_1> %12 ve >200ml artış olması olarak tanımlanır. Ayrıca >%15 veya >400ml artış olması bronkodilatör testin güvenilirliğini arttırır. Testten 4 saat öncesine kadar SABA, günde iki defa kullanılan LABA'lar 24 saat öncesinde, günde bir defa kullanılan LABA'lar 36 saat öncesinde kesilmelidir. Geç revezibilite hastalarda 4 haftalık tedavi sonrasında

FEV_1> %12 ve >200 ml artması olarak tanımlanır. 2005 yılına kadar kabul edilen BHR tanımlamasındaki majör limitasyon FEV_1 ve FVC'nin bazal değerlerinin ve rölatif değişikliklerinin bilinmiyor olmasıydı.[164,165] 2021 ATS kılavuzunda FVC ve FEV_1 değerlerinin hava yolu hapsini göstermek için kullanılabilecek fizyolojik parametreler olarak gösterilmiştir. [166–168] BHR son kılavuzlarda postbronkodilatör dönemde FEV_1 veya FVC değerlerinde >%10 artış olarak kabul edilmiştir.[169]

Astımlı hastalarda bronş provakasyon için inhale histamin[170], inhale antikolinerjik agonist metakolin [171], egzersiz gibi fiziksel stimülasyonlar[172], soğuk hava hiperventilasyonu[173], mannitol[174] gibi hipotonik ve hipertonik solüsyonu kullanılır. Metakolin inhalasyonu bronş provakasyon testleri arasında en sık kullanılan testtir. KOAH gibi irreversible hava yolu obstrüksiyonu görülen hastalarda ayrıcı tanı için kullanılabilir. Mesleki astım tanısı için de kullanılabilir.[175] IKS almayan hastalarda testin negatif olması astım tanısını dışlarken, testin pozitif olması hastanın her zaman astım olduğu anlamına gelmemektedir. Test uygulanırken FEV_1 değerinde bazal ölçümlere göre %20 düşüş olması durumunda anlamlı kabul edilir.



Şekil 7. Metakolin Testi Yorumlanması [159]

Bronş provakasyon testlerinde (şekil 7) hastalara verilen 1 mg/mL metakolin verildikten sonra FEV_1'de >%20 değişiklik olması ağır astım, 4 mg/mL metakolin verildikten sonra FEV_1'de >%20 değişiklik olması hafif astımı göstermektedir.

Atopi varlığı solunumsal semptomların alerjik astım ilişkili olma olasılığını arttırır, fakat sadece alerjik astıma spesifik olmayıp tüm astım fenotiplerinde gözlenir. Atopi deri prik testi veya serum spesifik immunglobulin IgE ile tanımlanabilir. Alevlenme sebebinin öğrenilmesi için ailesel öyküsü olan astım hastalarına uygulanmalıdır. Deri prik testi uygulanma metodları çok yönlü olsa da sonuç yorumlanması için 3mm'den fazla olması ya da pozitif kontrol yarıçapının 0.4 katından fazla olmasıdır.[176]

Eksale nitrik oksit (FeNO) seviylesi balgam ve kan eozinofil seviyeleri ile [177] yakın ilişkili bulunmuştur. Astım tanısında veya tanının dışlanmasında kullanılmaz. FeNO yüksekliği tip 2 inflamasyonla ilişkilidir.[178] Eozinofilik bronşit, atopi, alerjik rinit, atopik dermatit gibi astım dışı patolojilerde de yükselebilir, bazı astım fenotiplerinde (nötrofilik astım) ve bronkokonstriksiyon döneminde yükselmez.

Tüm tanısal testlere ek olarak astım tanısında radyoloji, pnömoni, kardiyojenik pulmoner ödem, pulmoner tromboemboli, pnömotoraks, endobronşial darlık yaratan veya atelektazi yapan tümörler gibi astımı taklit eden hastalıkların ayrıcı tanısı için kullanılır, astım tanısı için radyolojik doğrulama gerekmez.[159]

2.7.4. Ayrıcı tanı

Astımın ayrıcı tanısına akciğer hastalıkları ve akciğer dışı hastalıklar girmektedir, tanısal değerlendirme yaparken bu hastalıklar gözden geçirilmelidir (Tablo 4).

Tablo 4. Astım Ayrıcı Tanı[1]

Pulmoner	KOAH
	Tüberküloz
	Hiperventilasyon
	Sarkoidoz
	Eozinofilik Pnomoniler
	Kistik Fibrozis
	Bronşiektazi
	Parankimal Akciğer Hastalıkları
	Alfa-1 antitripsin eksikliği
	Endobronşial tümörler
	Eozinofilik Granülomatöz Polianjitis
Neoplastik	Akciğer Kanseri
	Endobronşial Tümörler
	Hiler Lenfadenopatiyle birlikte Lenfoma
Kardiyovasküler	Sol Ventrikül Yetmezliği
	Pulmoner Emboli
Diğer Patolojiler	Gastroözefageal reflü/aspirasyon
	Yabancı Cisim Aspirasyonu
	Vokal Kord Disfonksiyonu
	İlaçlar (ACE inh)

Kontrolsüz astım

Semptom kontrol zayıf olan (semptomları dolayısıyla sık kurtarıcı ilaç kullanan, günlük aktivitesini kısıtlayan, gece uykudan uyanan vb.) veya oral kortikosteroid gereksinimi duyan yılda ≥2 alevlenme veya ≥1 yatış gerektiren hastalar kontrolsüz astım olarak tanımlanır.[1]

Tedavizi Zor astım

Semptom kontrolü ve alevlenme riskini azaltmak için orta veya yüksek doz IKS ve LABA veya oral kortikosteroid veya daha yüksek doz tedaviye ihtiyaç duyan hastalardır. Birçok hastada yanlış ve düzensiz inhaler kullanımı, sigara içimesi, komorbid hastalıkların varlığı, çevresel ve mesleki maruziyetler gibi değiştirilebilir nedenler mevcuttur.[179]

Ağır astım

Semptom kontrolü için yüksek doz IKS+LABA, oral kortikosteroid tedavisi gereken ve ilaç dozu düşürüldüğünde kontrolü bozulan komorbiditeleri kontrol altına alınmış, düzenli ve doğru inhaler kullanımı olan, çevresel, mesleki maruziyeti ortadan kaldırılmış hastalar ağır astım olarak adlandırılır.[179]

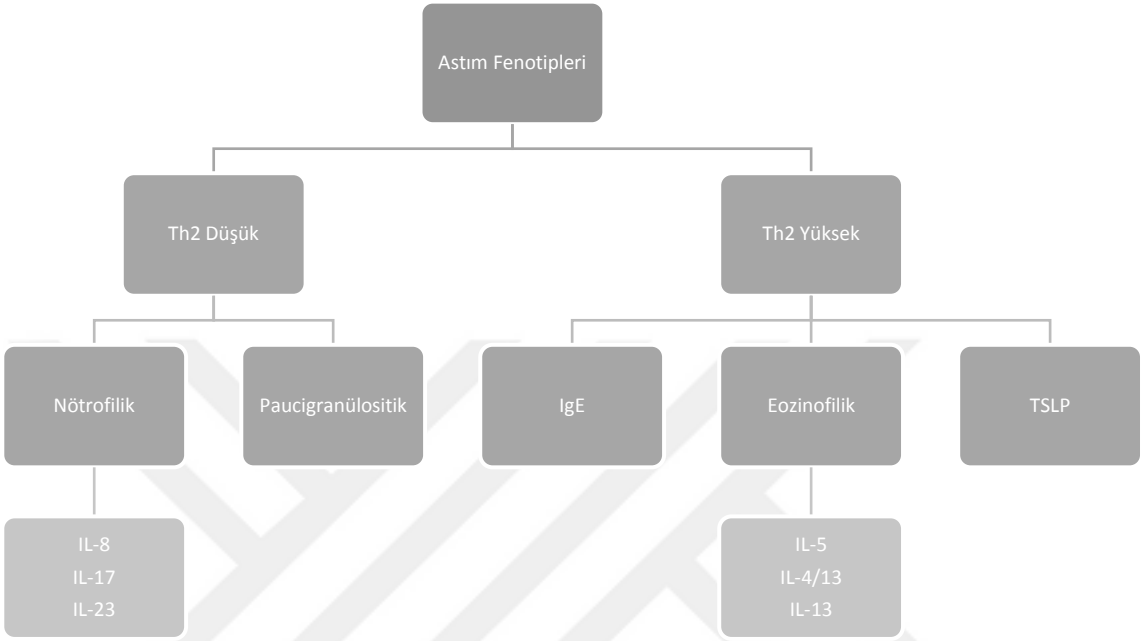
2.8. Astım Fenotipleri

Astım intrinsik ve ekstrinsik olarak fenotiplendirilirken son dönemlerde endotipik ve fenotipik tanımlamalar kullanılmaya başlanmıştır. Kesin olarak sınıflandırılması net yapılmamış olsa da GINA 2022 kılavuzlarında alerjik astım, alerjik olmayan astım, geç başlangıçlı astım, persistan hava yolu kısıtlılığı ile ilişkili astım, obezite ilişkili astım olarak sınıflandırılmıştır.[1] Fenotipik sınıflandırmalar için balgam örnekleriyle yapılan çalışmalarda hastalar dominant inflamatuar hücrelerine göre dört subgruba ayrılmıştır. Nötrofilik fenotipte balgam nötrofil oranı >%61 ve hücre sayısı >10 milyon hücre/gram, eozinofilik fenotipte > %1.9- 3, mikst granülositik fenotipte nötrofil ve eozinofil sayıları artmış ve paucigranulositik nötrofil ve eozinofil sayıları azalmış olarak tespit edilmiştir.[180] Yapılan bir ağır astım araştırma programı kohortunda 5 ana grup tanımlanmıştır. Erken başlangıçlı atopik astım, 2 veya daha fazla kontrol edici ilaçla solunum fonksiyon kaybı olmayan hastalar, 3 veya daha fazla kontrol edici ilaçla nispeten korunmuş solunum fonksiyonları olan hastalar; geç başlangıçlı atopik olmayan astım, oral kortikosteroid ve IKS kullanma ihtiyacı duyan hafif solunum fonksiyon kaybı olan hastalar. Erken başlangıçlı atopik astım, solunum fonksiyon kaybı (ortalama %57 FEV_1) olan hastalar ve geç başlangıçlı astım, en ağır solunum fonksiyon kaybı(ortalama %43 FEV_1) olan hastalardan oluşur. Tüm gruplar incelendiğinde balgam subgrup analizinde eozinofil ve nötrofil değerleri önceki çalışmalarla benzer olarak bulunmuştur.[181]

Araştırmalardan elde edilen bulgularla astımın inflamatuar ve noninflamatuar olarak heterojen bir patogenezi olduğu tespit edilmiş ve endotipleme balgam, kan ve bronşial örneklerin incelenmesi sonucunda "Th2 yüksek" ve "Th2 düşük" olarak sınıflandırılmıştır. Th2 yüksek tip kan, balgam ve bronşial örneklerde yüksek eozinofil oranları ile karakterizedir, kan eozinofil sayısı >300 hücre/mL ve bronkodilatör tedaviye iyi yanıt verirler. Th2 düşük fenotipte kan, balgam ve bronşial örneklerde nötrofil hakimiyeti veya paucigranülositik patern gözlenir ve spesifik biyomarkerı yoktur.[182] Th2 yüksek ve düşük astım fenotiplendirmesi Şekil 8'de gösterilmektedir.

IgE ve serum eozinofil sayıları hastalarda bronkodilatör tedaviye yanıtı tespit edilmesinde kullanılan biyomarkerlardır.[183,184] Th2 yüksek fenotipte eozinofilik inflamasyonun tespiti için IL-4, IL-5, IL-13, periostin, eotaxin-2, obezite ilişkili

hastalarda L-arjinin ve leptin, klamidya pnomonia antikorları, staphylococcus aerus enterotoxin-IgE ve timik stromal lenfopoietin (TSLP) kullanılabilir.



Şekil 8. Astım Fenotipleri [185]

Th2 yüksek endotip

Aspirin ilişkili astım, alerjik bronkopulmoner mikozis, erken başlanıçlı astım, erişkin başlangıçlı astım, geç başlangıçlı astım, hipereozinofilik astım, IgE ilişkili mesleki astım fenotipleri Th2 yüksek endotip içinde sınıflandırılır (Tablo 5).

Tablo 5. Astımda Th_2 yüksekliği bulunan Fenotipler

Fenotip	Klinik Tablo	Biyomarkerlar
Aspirin İlişkili Astım [183,186]	Nazal polipozis, rinosinüzit, yetişkin başlangıçlı Tedavi: LTRA inhibitörleri	Üriner Lökotrien Artmış periostin seviyesi
Alerjik Bronkopulmoner Mikozis[183,186]	Mukus üretimi, yetişkin başlangıçlı, reverzibilite az, kötü prognozlu Tedavi: OKS, antifungal ve biyolojik ajanlar	Yüksek FeNO, Serum total IgE Yüksek Aspergillus IgE Aspergillus deri testi pozitifliği
Erken Başlangıçlı Astım [186]	Yılda >3 astım atağı, erken başlangıç, ailede astım öyküsü Tedavi: IKS, LTRA, Biyolojik ajanlar	Yüksek FeNO, periostin, Yüksek IgE, spesifik IgE, eozinofili (>%3), pozitif deri prik testi
Erişkin Başlangıçlı Astım [187]	Alerjen ilişkili semptomlar, alerjik rinit Tedavi: OKS ve biyolojik ajanlar	Yüksek FeNO ve total IgE, pozitif deri prik testi
Geç Başlangıçlı, Ağır ve hipereozinofilik Astım [183]	Ağır alevlenme, non-atopik, OKS sensitif ve sıklıkla OKS bağımlı Tedavi: OKS ve Anti-IL-5	Yüksek FeNO, eotaksin Yüksek balgam ve kan eozinofili
Mesleksel Astım (IgE ilişkili) [188]	İş başlangıcı sonrasında astım semptomları Tedavi: Temasın engellenmesi	Yüksek FeNO, Yüksek IgE ve spesifik IgE, balgam eozinofili PEFmetre

*LTRA, lökotrien reseptör antagonisti; OKS, oral kortikosteroid, FeNO, ekshale nitrik oksit

Th2 Düşük Endotip

Astım-KOAH overlap, geç başlangıçlı nonatopik astım, steroid-dirençli veya nötrofilik astım, obezite ilişkili astım, perimenstrual astım, non-IgE ilişkili mesleki astım fenotipleri Th2 düşük endotipler içinde sınıflandırılır(Tablo 6). Egzersize indüklenen astım, soğuk hava ilişkili veya kros kayakçıları astımı, stresle tetiklenen astım ve psikolojik astım da bu endotip içinde sınıflandırılabilir fakat bu klasifikasyonlar için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Tablo 6. Astımda Th_2 Düşük Olan Fenotipler

Fenotip	Klinik tablo	Biyomarker
AKO veya Fiks Obstrüksiyon [1]	Kronik solunumsal semptomlar, sigara gibi risk faktörü teması Tedavi: LABA+LAMA	-
Geç Başlangıçlı non-atopik Astım [189,190]	Özellikle kadın hastalarda, geç başlangıçlı Tedavi: Yüksek doz IKS ve OKS	Balgam eozinofil artışı ve FeNO artışı olmaması
Nötrofilik (steroid-dirençli) Astım [183,187]	Erişkin başlangıçlı, düşük FEV_1 ve ağır hava hapsi Tedavi: Makrolid, IL-17 antagonistleri	Balgamda >%76 nötrofil IL-17
Obezite İlişkili Astım [189]	Sıklıkla obez kadınlarda, atopi nadir görülür Tedavi: Kilo kontrolü	L-arginin, Leptin
Pre veya Perimenstrüal [1]	Astım alevlenmesi premenstrual fazda sık görüşür ve dismenore sıklığı artar	-
Non-IgE ilişkili Mesleki Astım[190]	İrritan teması sonrasında semptomlar artar, kötü prognozlu, yüksek miktarda gaz, buhar, duman temasıyla görülür	Spesifik provakasyon testi PEFmetre

AKO, astım-KOAH overlap; LABA, Uzun etkili B_2-agonist; LAMA, uzun etkili antikolinerjik

Dış Faktörlerle Alevlenen Astım	Patogenez ve Klinik	Laboratuvar bulguları
Soğuk Hava ilişkili veya Kros kayakçıları Astımı [186]	Sıklıkla üst solunum yolu enfeksiyonları, egzersiz ve soğukla ilişkili, OKS ve IKS yanıtı zayıf Tedavi: Soğuk temasını azaltmak ve egzersiz yoğunluğunun azaltılması	Normal FeNO, normal eozinofili Artmış idrar LTE4
Egzersizle İndüklenen Astım [191]	Egzersiz döneminde artan katekolamin sentezine bağlı artmış hava yolu direnci	
Stresle Tetiklenen veya Psikolojik Astım [192]	Psikolojik stres sonrasında stres hormonlarının salınmasına bağlı gözlenir	

2.8.1. Erken Başlangıçlı Alerjik astım

Erken başlangıçlı astım için sınır bir yaş tanımlanmamıştır. Çoğu erişkin yaşta da devam eder. Atopik dermatit, alerjik rinit gibi alerjik hastalıkların görülme sıklığı artar hastaların %40'ında atopik dermatit görülür, geç başlangıçlı hastaların %4 ünde atopik dermatit görüşür.[193,194] Total ve spesifik IgE seviyeleri geç başlangıçlı astıma göre daha yüksektir. SARP çalışmasında ağır alerjik astımlı hastalar yüksek cilt testi pozitifliği ve düşük akciğer fonksiyonu ile ilişkili bulunmuştur.[195] Spesifitesi olmamasına rağmen yüksek FeNO (>30-35 ppb), balgam eozinofili (≥ 2), artmış periostin[196,197] seviyeleri Th2 yüksek astım ile ilişkili bulunmuştur. Kortikosteroidler Th2 ilişkili inflamasyonu olan hastalar için nonspesifik tedavisidir ve iyi yanıt gözlenir.[198] Kortikosteroid tedavisi dışında Th2 yolu etkileyen Anti-IgE, Anti-IL-5, Anti-IL-4, Anti-IL-13 gibi biyolojik ajanlar da tedavide kullanılabilir.

2.8.2. Geç Başlangıçlı Persistan Eozinifilik Astım

Eozinofilik astım balgamda, kanda ve bronşial yapılarda normalde bulunması gerekenden fazla eozinofil bulunması ile karakterizedir. Tanımlamalara rağmen eozinofili yüzdesi standardize edilmemiştir. Ağır astımlı hastalarda yüksek eozinofil sayıları IKS ve OKS tedavisine rağmen devam edebilir.[199] Kortikosteroid tedavisine rağmen persistan balgam eozinofilisi olan hastalar daha az alerjiklerdir [193,200]. Astımın bu formu sinüzit, nazal polipozis ve aspirin ile ilişkili astımda görülür.[193]

2.8.3. Alerjik olmayan astım(Th2 düşük astım)

Astım hastalarının büyük bir grubunu oluşturmaktadır ve Th2 yüksek hastalara göre az miktarda hava yolu obstrüksiyonu, düşük bronş hiperreaktivitesi içerirler.[197] Th2 ilişkili hastalara göre kortikosteroidlere daha zayıf yanıt verirler.[189] Balgamlarındaki hücresel profil nötrofilik, eozinofilik veya paucigranülositik olabilir. [1]

2.8.4. Obezite ilişkili astım

Obezite astım gelişiminde ve kontrolünde rol almaktadır.[201] Obezite genel olarak proinflamatuar bir durumdur ve TNF- α, IL-6, leptin gibi mediatörlerin salınımını arttırır ve düşük FeNO ve eozinofili görülür bu durum azalmış steroid yanıtıyla da ilişkilidir.[202] Obezite ilişkili astımda çeşitli fenotipler tanımlanmıştır, erken başlangıçlı Th2 ilişkili hastalarda hastalık kötü prognozlu seyreder. Bir diğer grup ise geç başlangıçlı özellikle kadın hastalarda görülür.[203] Bazı hastalarda nötrofilik inflamasyon görülür[201] ve bu hastalarda kilo vermek prognozu düzeltir.[204] Adipokinler ve adipoz dokudan salgılanan diğer stokinler akciğer ve solunum yollarını etkiler[205] ve yüksek leptin seviyesi ile FEV_1, FVC ve FEV_1/FVC arasında ters orantı bulunmuştur[206] Metabolik disregülasyon, obezitedeki komplikasyonlarda önemli rol oynar.[207] Hiperglisemi ve hiperinsülinemi BHR'yi arttır, düz kas proliferasyonu ve epitelyal hasar ile remodellinge katkı yapar.[208] Astım hastası olan veya olmayan insülin rezistansı ve metabolik sendromlu hastaların solunum fonksiyon kapasiteleri düşük bulunmuştur.[209]

2.8.5. Aspirin ile indüklenen astım

Geç başlangıçlı astımın subfenotipi olarak düşünülmekle birlikte erken başlangıçlı astımın fenotipi olarak da görülebilmektedir. Tekrarlayan ağır sinüzit, nazal polipozis, aspirin ve COX-1 inhibitörlerine karşı duyarlılık görülür.[210] Eozinofil, mast, bazofil gibi Th2 inflamasyonla ilişkili hücreler artmıştır[211] ve lökotrien yolağı ilişkilli genlerle ilişkili bulunmuştur. [212] En önemli biyomarkerları idrar lökotrien ve kan eozinofil seviyeleridir, periostin seviyeleri de yükselebilir.[186] Aspirin ile indüklenen astımın patogenezi net olarak bilinmese de en çok kabul edilen siklooksijenaz teorisidir. Bu teoride aspirin ve COX-1 inhibitörleri siklooksijenaz yolunu inhibe eder, solunum yolunda inhibe olması sonrasında prostaglandin E2(PGE2) üretimi azalır, yolağın 5-Lipooksijenaz tarafına kayması ile sisteinil lökotrien(cysLTs) üretimi artar. Sisteinil lökotrienlerin artışıyla birlikte LTC4, LTD4, LTE4 üretimi artar ve bu durum aspirin ile indüklenen astımda en önemli mediatörlerdir. Mediatör salınımın artışla birlikte bronkokonstriksiyon, mukus hipersekresyonu, vasküler permabilitede artış ve selüler infiltrasyonlar görülür.[212,213]

2.8.6. Nötrofilik Astım

Son yıllarda tutarsız bir şekilde hafif ve ağır astımlı hastalarda nötrofili tanımlanmaktadır.[214] Nötrofil seviyesi ile ilgili bir fikir birliği sağlanmamıştır. Nötrofili genellikle kortikosteroid tedavisi ile tedavi edilen hastalarda görülür. Kortikosteroidler nötrofil apoptozunu inhibe eder ve bazı durumlarda nötrofil aktivasyonuna katkıda bulunur, bu durum da kortikosteroid tedavisinin kendisinin nötrofili gelişiminde rolü olabileceğini düşündür.[215] Nötrofilik hastalar düşük solunum fonksiyon kapasitesi, fazla hava hapsi, bronş duvar kalınlığında artış (bilgisayarlı tomografi ile ölçülmüş) ve artmış matriks metalloproteinaz üretimi ile ilişkili bulunmuştur. SARP çalışmasında nötrofilik hastalar genellikle erişkin başlangıçlı ve inkomplet reverzible ağır obstrüktif hastalar ve sık OKS kullanan ve sık hastane başvurusu olan hastalar olarak tespit edilmiştir.[181] Kortikosteroid tedavisi Th2 düşük olması nedeniyle daha az etkili bulunmuştur.[216] Nötrofilik hastalarla yapılan bir çalışmada makrolid antibiyotiklerin nötrofilik markerları azalttığı, hayat kalitesini arttırdığı gözlenmiştir fakat astım kontrolünü arttırmamış ve FEV_1'de artış gözlenmemiştir.[217] Th17 inflamasyon nötrofili ile kuvvetli ilişkili bulunmuştur ve tedavi hedefleri için yeni bir hedef olmuştur.[218] IL-17A ve IL-17F kötü solunum fonksiyon kapasitesi ve ağır astımlı ilişkili bulunmuştur fakat nötrofilik astım ile ilişkili bulunmamıştır.[219] Bu nedenle anti-IL-17 tedavilerin etkiliğiyle ilişkili klinik çalışmaların sonuçları beklenmektedir.

2.8.7. Egzersizle tetiklenen Astım

Egzersizle tetiklenen astım öncelikli olarak egzersiz sonrasında semptomları kötüleşen hastalar için kullanılır. Bu fenotip yıllardır tanımlanmaktadır fakat immünolojik ve inflamatuar temelleri bilinmemektedir. Hastalarda egzersiz anında, kuru ve soğuk havalarda bronkokonstriksiyon görüşür ve FEV_1'de %10-15 düşüş gözlenir. Atopik atletlerde Th2 ilişkili gözlenmiştir ve patolojik olarak balgamda ve dokuda eozinofil yüksek oranda gözlenmiştir. [220] Mast hücreleri ve mast hücresi kökenli mediatörlerle ilişkili bulunmuştur.[221] Lökotrien reseptör antagonistleri egzersiz ilişkili astım hastalarında kullanılabilir.[222] Son zamanlarda mast hücres artışını bloklayan anti-

IL-9 tedavi için kullanılabileceği gösterilmiştir ve bu da egzersizle tetiklenen astımın Th2 ilişkili olabileceğini göstermektedir.[223]

2.9. Astımda Tedavi ve Takip

Astım tedavisinde hedef uzun dönemde etkin semptom kontrolü, günlük aktivitelerinin devamı, astım alevlenme sıklığının azaltılması, persistan hava akımı kısıtlanmasının engellenmesi, tedaviye bağlı yan etkilerin engellenmesi, astıma bağlı ölüm yüzdesini azaltmaktır. [1]

Etkin bir astım kontrolü için hasta ve doktor arasında etkin bir iletişim kurulmalıdır. Hastaya astım hakkında eğitim verilmeli, astım yönetimi ile ilgili eğitim verilmelidir bu durum astım ilişkili morbiditeyi azaltmaktadır.[224] Astım tedavisinde iki ana başlık vardır; semptom kontrolü ve risk azaltılması.[1] Tedavi kontrolü hasta için kişiselleştirilmiş olmalıdır ve değerlendirilmede tedavinin izlenmesi, yanıtın değerlendirilmesi, tekrar gözden geçirilmesi olarak döngü şeklinde değerlendirilmelidir. Yapılan çalışmalarda iyi semptom kontrolü azalmış alevlenme riskiyle ilişkili bulunmuştur.[200]

2.9.1. Astım tedavisinde kullanılan ilaçlar

Astım tedavisinde kullanılan ilaçlar üç ana grupta incelenir; kontrol edici ilaçlar, rahatlatıcı/ semptom giderici ilaçlar ve ağır astımda kullanılan biyolojik ajanlar.

2.9.1.1. Kontrol edici ilaçlar

İnhaler Steroidler

Steroidlerin tedaviyi birden çok mekanizma ile sağlar bunlar: sitokin salınımın inhibisyonu, hava yollarındaki eozinofilinin baskılanması, inflamatuar mediatör salınımın engellenmesi[225] Steroidler hava yolu hiperreaktivitesinin ve akciğer inflamasyonun baskılanmasında yarar sağlar.[226] Steroidler inhalasyon, oral, intramuskuler ve intravenöz yollarla uygulanabilir. İnhaler tedavideki amaç biyoyararlılığın arttırılması ve steroid kullanımına bağlı yan etkilerinin oluşmasının

engellenmesi için düşük dozlarda kullanılmasıdır. İnhaler steroidler daha düşük doz kullanılır ve daha düşük yan etki profiline sahiptir. Tedavide kullanılan düşük, orta ve yüksek inhaler steroid dozları tablo 7'de gösterilmektedir.

İlaç kullanımına bağlı lokal yan etkiler oral kandidiyazis, disfoni(yüksek dozlarda), refleks öksürük, bronkospazm (Hızlı inhalasyona bağlı) gibi yan etkiler gözlenir. Oral kandidiyazis ve disfoni ilaç kullanımı sonrasında ağız çalkalanması ve spacer kullanımı ile engellenebilir.

Steroid tedavisine duyarlılık veya duyarsızlığı çeşitli moleküler mekanizmalarla ve farklı hasta fenotipleriyle açıklanmıştır. Yüksek doz IKS ve oral steroid tedavisiyle zayıf kontrol altına alınmış hastalarda steroid insensivitesi dikkate alınmalıdır.[227] Sigara içen hastalarda azalmış steroid yararı nötrofilik astımla ilişkili bulunmuştur. Yine sıgara içmeyen hastalarda yapılan çalışmalarda FeNO> 50 ppb olan hastalarda IKS iyi yanıt verdikleri bulunmuştur.[228]

IKS tedavisi günümüzde uzun etkili beta2- agonist kombinasyonları ile birlikte kullanımakta, bu kombinasyonlar:

Beklametazon / formoterol

Budesonid / formoterol

Flutikazon furoat / vilanterol trifenoat

Flutikazon propionat / formoterol

Flutikazon propionat / salmaterol

Tek başına IKS tedavisiyle kıyaslandığında kombine ilaçlarda daha düşük IKS dozu ile klinik kontrol sağlandığı izlenmiştir.[229]

Tablo 7. İnhaler Steroid dozları [1]

İlaç	Düşük Doz (µg)	Orta Doz (µg)	Yüksek Doz (µg)
Beklometazon Dipropiyonat (CFC)	250-500	>500-1000	>1000
Beklometazon Dipropiyonat (HFA)	100-200	>200-400	>400
Budesonid	200-400	>400-800	>800
Flutikazon propionat	100-250	>250-500	>500-1000
Flutikazon furoat **	100		200
Mometazon furoat *	200	200-400	>400
Siklesonid *	80-160	>160-320	>320

CFC: Klorofluorokarbon, HFA: Hidrofluoroalkan

*Günde tek doz kullanılabilir ** Orta dozu ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.

Anti- Lökotrien ilaçlar

Montelukast ve zafirlukast sisteinil löktrien reseptör bloke ederek, zileuton 5-lipooksijenaz yolunu bloke eder. IKS kullanımına bağlı yan etki görülen veya IKS kullanmak istemeyen, eşlik eden alerjik astımı olan hastalarda tedavi olarak tercih edilebilir. [230] Zileuton kullanan hastalarda karaciğer fonksiyon testleri yakın takip edilmelidir. Sigara kullanma öyküsü olan, obezite, egzersizle tetiklenen astımı, aspirinle tetiklenen astımı olanlarda ve IKS insensivitesi olan hastalarda daha iyi klinik yanıt gözlenir.[3]

2.9.1.2. Rahatlatıcı / Semptom Giderici İlaçlar

Kısa etkili β_2 Agonistler

Beta-adrenerjik reseptörleri stimüle eder ve hücre içindeki siklik adenozin monofostat(cAMP) arttırır. Sonuç olarak da hava yollarındaki düz kas hücrelerinde relaksasyon sağlanır ve bronkokonstriksiyonda düzelme olur. Albuterol, salbutamol, levalbuterol ve pirbuterol bu grubun ilaçlarıdır. Terapotik etkinliği 5 dk sonra başlar ve 3-6 saat kadar sürer.[231]

Uzun etkili β_2 Agonistler

Uzun etkili β_2 Agonistler lipofilik yapısı arttırılmış ve buna bağlı akciğer dokusundaki etki süresi uzatılmış ilaçlardır etki süresi 12 saatten fazladır.[232] Formoterol uzun etkili olmasına rağmen etki süresi hızlı başlangıçlıdır. β_2 agonistlerin yan etkileri benzer olup sık görülen yan etkileri taşikardi, uzamış QT ve hipokalemidir.[233] Etki süresi 24 saat ve uzun olan uzun etkili β_2 agonistler ultra uzun olarak adlandırılmaktadır ve bu grupta indakaterol, olodaerol, vilanterol bulunur.

Antikolinerjik Ajanlar

Asetilkolin hava yollarındaki muskarinik reseptörlere bağlanarak bronkokonstriksiyon, mukus sekresyonu ve inflamasyonu tetikler. Tanımlanmış beş adet muskarinik reseptör vardır ve bunlardan sadece M_1, M_2 ve M_3 astım ve KOAH patofizyolojisinde rol oynamaktadır. M_1 reseptörleri elektrolit dengesi, su

salgılanmasında rol oynar. M_2 reseptörleri hava yolu düz kas hücreleri ve parasempatik nöronlardan salgılanır ve hava yolu düz kas hücrelerinde kontraksiyon yapar.[234] M_2 reseptörler otoreseptör olarak hareket ederek vagal kaynaklı bronkokonstriksiyon ve mukus sekreseyonunu sınırlar.[235] M_3 reseptörleri bronşial düz kas hücrelerinde primer olarak görev yaparlar ve düz kas kontraksiyonu ve submukozal glandlardan sekresyon artışına yol açar.[236] Antikolinerjik ajanlar asetilkolinin parasempatik etkilerini antagonize ederek terapotik etkinlik sağlayarak tedaviye katkı sağlar.

Kısa Etkili Antikolinerjik Ajanlar

İpratropium bromür non-selektif kısa etkili antikolinerjik bir ajandır[237] ve astım tedavisinde β_2 agonistlerle kullanılmaktadır. β_2 agoniste rağmen semptomatik fayda sağlamayan hastalarda kullanılabilir.[238] Kısa etkili β_2 agonistle, ipratropium bromürün karşılaştırıldığı çalışmalarda tek başına kısa etkili β_2 agonistin ipratropiumdan daha etkili olduğu bulunmuştur.[239]

Uzun Etkili Antikolinerjik Ajanlar

Aklidinyum, glikopironyum, umeklidinyum, tiotropium uzun etkili antikolinerjik ajanlardır. Yapılan klinik çalışmalarda glikopironyumun IKS/LABA kullanan hastalardaki güvenli ve bronkodilatör etkinliğinin olduğu gözlenmiştir.[240] Tiotropiumla yapılan çalışmalarda IKS/LABA kullanan hastalara tiotropium eklenmesinin FEV_1'de 154 ml iyileşme sağladığı ve astım alevlenmesi riskini %21 azalttığı gözlenmiştir.[241] Klinik çalışmalar sonrasında IKS/ LABA tedavisi almakta olan ve tedaviye rağmen semptomatik olan hastalarda uzun etkili antikolinerjik ajan kullanılması önerilmiştir.

Teofilin (Dimetilksantin)

Teofilin 1895 yılında çay ve kakao çekirdeklerinden izole edilmiş ve ilk üretildiği dönemde diüretik olarak kullanılmıştır. İlk olarak 1922 yılında astım tedavisi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Tedavideki etkinliğini birçok yolakla sağlar ve genellikle yüksek konsantrasyonlarda sağlar. Non-selektif fosfodiesteraz(PDE) inhibitörüdür ve PDE3 inhibisyonu ile hava yollarındaki düz kaslara etki eder.[242] PDE4 inhibisyonu ile alveolar makrofaj mediatör salınımını sağlar.PDE inhibisyonu β_2 agonist etki ile sinerjistik etki sağlar fakat in vivo veya klinik çalışmalarla net olarak ortaya

konulamamıştır.[243] PDE inhibisyonu teofilinin yan etkilerinin birçoğuna neden olur. Teofilin adenozin A_1 ve A_2 inhibisyonu yapar buna bağlı bronkodilatör etkinlik sağlar fakat adenozin A1 reseptör antagonist etkisi nöbet ve kardiyak artimiler gibi hayatı tehtit eden yan etkilere neden olabilir.[244]

Yüksek dozlarda IL-10 salınmasını engelleyerek antiinflamatuar etkinliğini sağlar. Düşük dozlarda IL-10 salınmasını etkilemez. Düşük dozlarda(5 mg/L), özellikle oksidatif stres durumlarda histon deasteilaz aktivitasyonu yapar.[245] İnflamatuar hücrelerin apoptozunu tetikler ve nükleer faktör inhibisyonu yaparak etki gösterirler.

10 mg/L altında bronkodilatör etkinliği az miktarda olup, antiinflamatuar etkinliği devam etmektedir. 25 mg/L dozun üstünde yan etki sıklığı çok arttığı için terapotik aralığı 10-20 mg/L'dir. Önerilen intravenöz tedavi dozu 6 mg/kg 20-30 dakikada yükleme sonrasında 0.5 mg/kg/saat olarak infüzyondur.[243]

Magnezyum Sülfat

Magnezyum sülfat hayatı tehtit eden astım ataklarında ıntravenöz olarak kullanılmaktadır. Teorik olarak bronş düz kas hücrelerinde sitozole kalsiyum geçişini engelleyerek[246] doz bağımlı bronkodilatatör etki yapar aynı zamanda mast hücrelerinden histamin salınımını[247] ve kolinerjik sinirlerden asetilkolin salınımını bloke ederek etki yapar[248]. β_2-agonist reseptör afinitesini arttırabilirler[249]. İntravenöz $MgSO_4$ kullanımı astım ataklarında solunum fonksiyonlarında iyileşme, ağır ve hayatı tehdit eden astım ataklarında tüm tedavi metodlarının uygulanmasına rağmen tedaviye yanıt vermeyen hastalarda hastaneye yatış sıklığını azaltmaktadır.[250] Nebülize $MgSO_4$ ile yapılan çalışmalarda düşük kanıt düzeylerinde çok ağır astım hastalarında solunum fonksiyonlarında iyileşme ve hastane yatışını azalttığı görülmüştür.[251]

Diğer Tedaviler

Alerjen İmmünoterapi

Alerjen spesifik immüterapi tedavisi astım ve alerjik rinokonjonktivit birlikte olan hastalarda kullanılabilen tedavi seçeneklerinden biridir.[252,253] Subkutanöz ve sublingual immünoterapi olmak üzere iki yaklaşım bulunmaktadır. Alerjen immünoterapide çalışmalar genellikle ev tozu akarları, polenlerle ve otlara karşı yapılmıştır. Subkutanöz ve sublingual immunoterapi astım ilişkili semptomları azalttığı ve akciğer

fonksiyonlerını arttırdığı ve bronşial aşırı duyarlılığı azalttığı görülmüştür.[225] Anaflaksi riski olan, kötü kontrollü astım hastalarında yeni geçirilmiş miyokard infarktusu, unstabil angına pectoris, kontrolsüz hipertansiyon immünoterapiye kontrendike durumlardır. Ciddi alerjik reaksiyon ve tedaviye dirençli anaflaksi riskini arttırdığından dolayı beta bloker ve anjiotensin konverting enzim(ACE) inhibitörü kullanan hastalarda immünoterapi başlanırken dikkatli olunmalıdır.[254]

Subkutanöz İmmünoterapi

Subkutanöz immunoterapi, klinik yaratan alerjenlerin tanımlanması ve alerjenlerin ekstratlarının artan dozlarda uygulanması ile alerjene karşı desensitizasyon ve/veya tolerans geliştirilmesidir. Astımı olan hastalarda immünoterapi semptomlarda azalma ve tedavi ihtiyacında azalma ile ilişkili bulunmuştur ve alerjen spesifik bronş aşırı duyarlılığını azaltmıştır. [255]

Sublingual İmmunoterapi

Alerjik riniti olan ev tozuna alerjisi olan hastalarda düşük, orta doz IKS kullanmasına rağmen semptomları varsa ve FEV_1> %70 ise sublingual immunoterapi önerilmektedir.[1] Sublingual tedaviyle en sık yan etkiler oral ve gastrointestinal semptomlardır.[253]

Aşılar

Yapılan metaanalizlerde influenza aşılanmasının astım alevlenme riskini azalttığı bulunmuştur, aşıya bağlı alevlenme riskinde artış gözlenmemiştir.[256] Astım hastalarında pnomokokal enfeksiyon riski artmıştır.[257]

Bronşial Termoplasti

Bronşial termoplasti ideal tedaviye rağmen astımı kontrolsüz olan 5. Basamak hastalarda özelleşmiş merkezlerde uygulanır. Hava yollarının üç ayrı bronkoskopide radyofrekans sinyalleriyle yapılan bir tedavi metodur. Yüksek doz IKS ve uzun etkili B_2 agonist alan hastalarda bronşial termoplastiyle ilişkili olarak 3 aylık dönemde astım alevlenmesi riski azalmıştır.[258] Etkin tedaviye rağmen basamak 5 tedavide biyolojik ajan kullanılamayan ülkelerde bronşial termoplasti önerilmektedir.[1]

Vitamin D Takviyesi

Düşük vitamin D seviyesi ile azalmış akciğer fonksiyonları, artmış alevlenme sıklığı ve azalmış kortikosteroid yanıtı ile ilişkili bulunmuştur.[259] 25(OH)D seviyesi 25-30 nmol/L altındaki hastalarda D vitamini replasmanı steroid gerektiren alevlenme sıklığını azalttığı ve astım semptom kontrolünü sağladığı görülmüştür.[260]

2.9.2. İlaç Dışı Tedaviler

İlaç tedavilerine ek olarak diğer tedaviler de semptom kontrolünün iyileşmesine ek katkılar sağlayarak gelecek risklerin azaltılmasında fayda sağlamaktadır.

Sigara kullanan hastalarda her vizitlerinde sigara bırakması önerilmelidir ve ilerleyen dönemlerde sigara ilişkili artmış akciğer kanseri, KOAH, kardiyovasküler hastalıklar riski anlatılmalı. Düzenli olarak kardiyopulmoner fitnes yapılarak astım semptomlarında azalma gözlenmiştir. Egzersiz ilişkili astımı olan hastalarda egzersiz öncesinde kısa etkibi B_2 agonist[261] veya düşük doz IKS-formoterol[262] kullanılması egzersiz ilişkili semptomlarda kullanılması önerilmektedir.

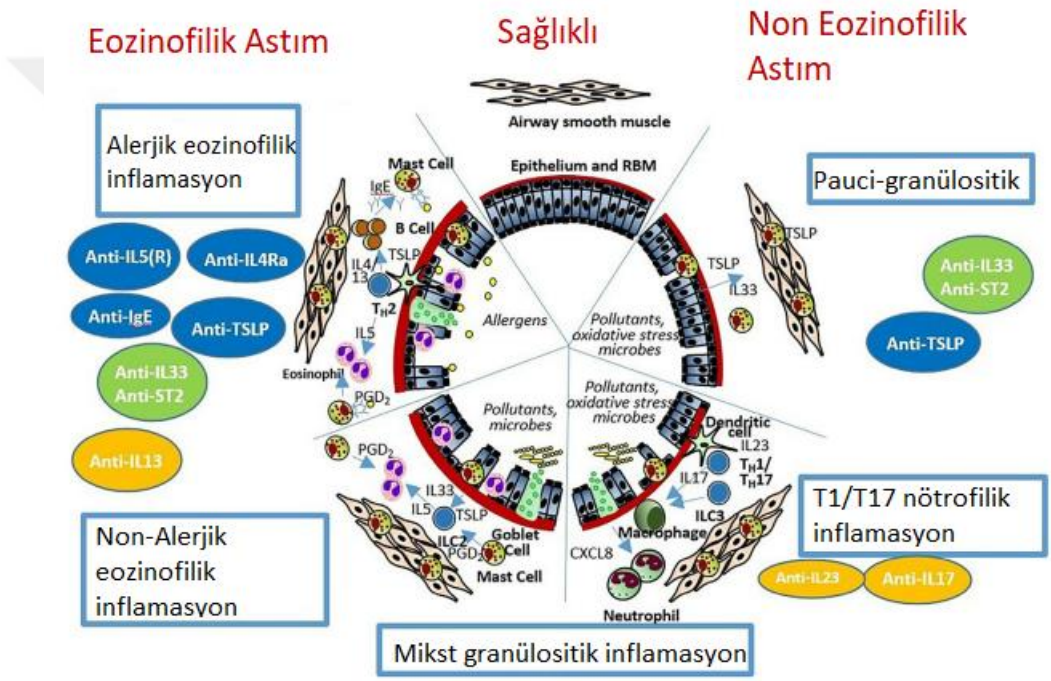
Çevresel alerjen maruziyeti veya sensitizasyon potansiyeli olan hastaların maruziyetinin azaltılması semptomları azaltmaktadır. Çevresel astım tespit edilen hastalarda ajan tespit edilip kesilmelidir. Ev tozu akarlar, evcil, hayvanlar, kemirgenler, böcekler ve mantarlar ev içi alerjenlerdir. Astım semptomları olan ve ev içi alerjenlere duyarlılığı olan hastalarda temasın azaltılması önerilmektedir.

Aspirin ve diğer non-steroid analjezikler ağır astım alevlenmelerine neden olabilir.[263] Beta-blokör ilaçlar(topikal oftalmolojik ilaçlar da dahil olmak üzere) bronkospazma yol açabilmektedir.[264] Akut koroner sendrom nedeniyle kullanılan kardiyoselektif B_2 blokerler kontrendike değildir fakat klinik yarar zarar yakın takip edilmelidir.[265]

Obez hastalarda astım kontrolü zor olup, alevlenme sıklığı daha yüksektir.[266] Kilo kaybı ile astım kontrolü arasındaki kanıt sınırldır. Çalışmalar diyet, egzersiz ve davranışsal tedavilerle yapılmış olup sonuçlar heterojendir.[267] Diyet veya egzersizle %5-10 kilo kaybı astım kontrolünü ve hayat kalitesini iyileştirdiği gözlenmiştir.[268] Hastaların diyetlerinde yüksek oranda taze meyve ve sebze tüketilmesi önerilmelidir.

Sistematik çalışmalarda Buteyko ve Papworth solunum ve relaksasyon egzersizleri semptomlarda iyileşme, hayat kalitesinde artmayla ilişkili bulunmuştur fakat fonksiyonel akciğer kapasitelerinde ve alevlenme riskinde iyileşme gözlenmemiştir. [269]

2.9.3. Ağır astımda farmakolojik tedaviler



Şekil 9. Ağır Astım Tedavisinde Biyolojik Ajanlarla Tedavi Seçenekleri[270]

Uygun dozda ve düzgün inhaler tekniğiyle kullanılan, komorbiditeleri, çevresel maruziyeti kontrol altına alınan veya inhaler ilaç dozu düşüldüğünde astım kontrolü bozulan hastalar ağır astım olarak adlandırılır. Ağır astımı olan hastalarda biyolojik ajan kullanımı önerilmektedir.[1] T2 yüksek eozinofilik astım hastalarında kullanım için geliştirilen ve klinik kullanımı olan 6 adet biyolojik ajan mevcuttur. Biyolojik ajanlar arasında tam karşılatırma yapan randomize kontrollü çalışma olmayıp, sonuçlarla ilgili farklılık gözlenmemiştir. [271]

Allerjik eozinofilik inflamasyonu baskın hastalarda anti-IL5, anti-IL5R, anti-IL4Ra, anti-IgE, anti-TSLP, nonalerjik eozinofilik inflamasyon baskın hastalarda anti-IL13, T1/T17, nötrofilik inflamasyon baskın hastalarda anti-IL23, anti-IL17 ve paucigranülositik inflamasyon baskın hastalarda anti-TSLP tedavi olarak kullanılabilmektedir. Mekanizmalarıyla birlikte Şekil 9'da özetlenmiştir.

Anti-IgE

Omalizumab astım tedavisinde kullanılan ilk biyolojik ajandır. 6 yaşın üstündeki ve alerjen sensitizasyonu olan ağır astımlılarda kullanım için onaylanmıştır.[1] Omalizumab IgE'ye bağlanarak mast hücreleri, bazofiller, dendritik hücrelere bağlanmasını engeller sonuç olarak inflamatuar hücrelerde reseptörlerde azalmayı sağlar.[272] Tedaviye yanıt serum IgE seviyesiyle ön görülememektedir.[273,274] Posthoc analizlerde eozinofil ≥260 hücre/μL ve FeNO≥20ppb olması alevlenme sıklığını azaltmada daha fazla yarar sağladığını göstermiştir.

Anti-IL5

Mepolizumab 6 yaşından daha büyük ağır eozinofilik astım hastaları için onaylanmıştır.[1] IL-5'e yüksek afinite ile bağlanarak eozinofil ve bazofillerdeki reseptörlerine bağlanmasını bloke eder.[275] Yapılan randomize kontrollü çalışmalarda ağır eozinofilik astımlı hastalarda alevlenme sıklığını %51 ve günlük oral kortikosteroid kullanımını %50 azaltmıştır.[276,277] Nazal polipozisle ilerleyen kronik rinosinüzit[278], polianjitisle ile birlikte eozinofilik granülomatozis(EGPA)[279] ve hipereozinofilik sendromda[280] yararı gözlenmiştir.

Reslizumab 18 yaşından büyük ağır eozinofilik astımlı hastalarda intravenöz infüzyonla kullanılmaktadır.[1] Ağır eozinofilik astımlı hastalarda, astım alevlenme riskini %54 azaltmaktadır.[276]

Anti-IL5R

Benralizumab 18 yaşından büyük ağır eozinofilik astımlı hastalarda ek tedavi olarak kullanılabilmektedir.[1] IL-5Rα'ya bağlanarak IL-5 ile reseptörünün bağlanmasını önler ve böylece eozinofil apoptozisini indükler.[281] FeNo seviyesini etkilemeden eozinofilik inflamasyonu azaltır.[282] Eozinofil ≥300 hücre/μL, düzenli oral

kortikosteroid kullanımı, nazal polipozis öyküsü ve FVC<%65 olması benralizumab etkinliğini ön görmede kullanılan indikatörlerdir.[283,284] Benralizumab EGPA[285] ve hipereozinofilik sendromunda[286] klinik fayda sağlamaktadır.

Anti-IL-4R

Dupilumab, 12 yaş ve üstü ağır eozinofilik astımlı hastalarda kullanım için onay almıştır.[1] IL-4R' bağlanarak IL-4 ve IL-13 arasındaki sinyali bloke eder. Ağır eozinofilik astımlarda yapılan çalışmalarda ağır alevlenme sıklığını %56 azalttığı, günlük idame oral kortikosteroid ihtiyacını azalttığı ve akciğer fonksiyonlarını arttığı gözlenmiştir.[276] Dupilumab alevlenme sıklığını azalttığını ön gören biyomarkerlar kan eozinofil sayısı >150 hücre/μL ve FeNO>25 ppb[287] olup oral kortikosteroid ihtiyacını ön gören biyomarker Th2 biyomarkerlarından bağımsızdır.[288] Dupilumab aynı zamanda atopik dermatit[289] ve nazal polipozisle birlikte ağır kronik rinosinüziti[290] olan hastalarda da yararı gözlenmiştir.

Anti-TSLP

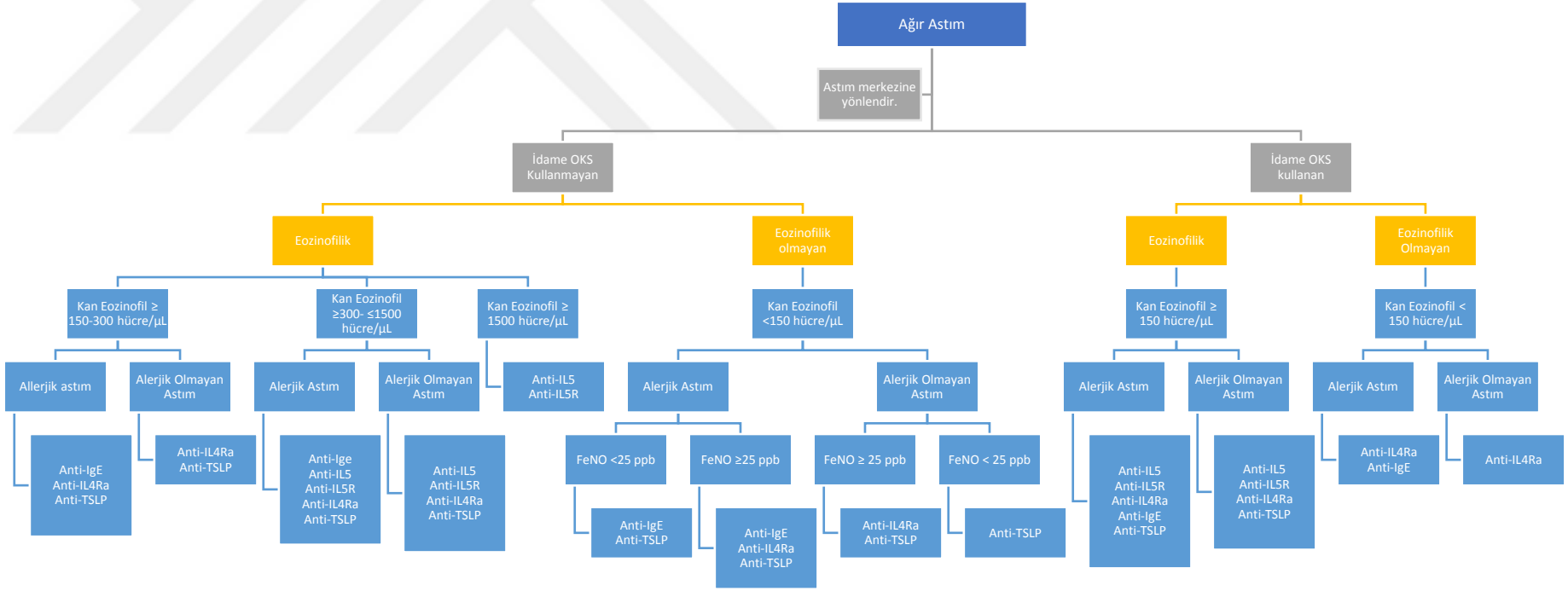
Tezepelumab, 12 yaş ve üstü ağır astım hastaları için onay almıştır. TSLP'ye bağlanarak TSLP reseptör kompleksi oluşturmasını engeller.[291] Yapılan çalışmalarda alevlenme sıklığını %71 ve %56 azaltmıştır.[292,293] Th2 inflamasyon markerları yüksek ve düşük olan hastalarda da alevlenme sıklığını azalttığı gözlenmiş olup kan TSLP seviyeleri tedaviye yanıtı ön gören bir biyomarker değildir.[294]

Alevlenme sıklığının aazaltmasının yanında astım kontrolünü, hayat kalitesini ve akciğer fonksiyonlarını ve bronş hiperreaktivitesini de etkilemektedir.[295–297] Oral kortikosteroid dozunu azaltmak için yapılan çalışmada tezepelumab ile belirgin doz altımına gidilmiş olup eozinofil seviyesi ≥150 hücre/μl olan hastalarda belirgin yarar gözlenmiştir.[298] Uzun dönem çalışmalarda tezepelumab ile 2 yıl ve fazlası tedavinin iyi tolere edildiği ve astım kontrolünü ve akciğer fonksiyonlarını iyileştirdiği gözlenmiştir.[299]

Anti-IL-33 ve Anti-ST2 henüz onay almamış ilaçlar olup Itepekimab (Anti-IL-33) ve astegolimab (Anti-IL-33 reseptör) ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Biyolojik tedavinin seçimi

Biyolojik ajan seçiminde Th2 inflamasyon belirteçleri, alevlenme sıklığı gibi belirteçler kullanılması önerilmektedir. Günümüzde tedavi seçiminde eozinofil düzeyi, FeNO ve alerjik hastalık varlığı göz önüne alınmaktadır. Biyolojik tedavinin hedeflediği mediatörlere ve astım fenotipine göre uygun biyolojik ajan seçimi Şekil 10'da özetlenmiştir.



Şekil 10. Ağır Astım Tedavisinde Biyolojik Ajanlar [270]

2.10. Biyobelirteç kavramı ve Proteomiks

Biyobelirteç vücuttaki fizyolojik süreçlerin, patolojik olayların veya farmakolojik yanıtların göstergesi olarak kullanılan moleküler, histolojik, radyolojik veya fizyolojik ölçümlerdir. Hastalıkların tanısında, takibinde, tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde, komorbidite risklerinin analizinde kullanılır. Yüksek spesifite ve sensiviteye sahip biyobelirteçler erken teşhis, tedavi ve hastalığın klinik yönetimi için önemli bir araçtır.

Bir kelimenin sonuna "omiks" eklenmesi o terimin kapsamlı ve küresel değerlendirilmesini ifade eder. İlk oluşan omiks disiplin tüm genomla ilgili çalışmalar yapılması için genetik bilimine eklenmiştir ve genomik; mendelyen ve kompleks hastalıklarda genetik haritalandırma için kullanılmıştır. Daha sonra genomik'e, epigenomik, transkriptomiks, proteomik, metabolomik, mikrobiyomik eklenmiştir.[300]

Proteomik, proteinlerin işlevleri, bileşimleri, yapıları ve diğer protein ve makromoleküllerle etkileşimleri ile tüm bunların hücresel aktivitelerinin incelenmesi şeklinde tanımlanmaktadır.[2] Bu terim ilk kez 1995 senesinde ortaya atılmış olup hücre doku ya da organizmanın tüm protein tanımlayıcısının karakterize edilmesi olarak tanımlanmıştır.[301] . Genomik potansiyel gen ürünlerini tanımlarken, proteomik gerçek fenotipi daha iyi yansıtır.[302]

Proteomikler, ekspresyon, fonksiyonel ve yapısal proteomik olmak üzere üç ana türü bulunmaktadır.[303]

Protein ekspresyonu: Hastalar ve kontrol grubu gibi iki durum arasındaki protein ifade düzeyindeki farkı belirtmeyi amaçlamaktadır.[304] Örneğin hasta bireyde eksprese olan yani varlığı tespit edilebilen veya artmış bulunan fakat sağlam bireylerde olmayan veya düşük düzeyde saptanan proteinler ilgili durum için biyobelirteç olarak kullanılabilir. Artan azalan protein ifadelerinin tespit edilmesi bireyselleştirilmiş tıpta kişiye özelilaç geliştirilmesi için de kullanılabilir.

Yapısal proteomik: "Hücre haritası" olarak bilinmekte olup, protein komplekslerini veya organel içinde bulunan tüm proteinleri haritalandırmaktadır.[305]

Fonksiyonel proteomik: Bu yaklaşım, protein işlevlerini ve moleküler mekanizmalarını inceler, protein grubunun karakterize edilmesine olanak sağlar. Bilinmeyen bir proteinin belirli bir protein kompleksindeki ortaklarla etkileşimini inceler.[306]

Proteomik çalışmalarda yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarı olmak üzere iki çalışma metodu kullanılabilir. Aşağıdan yukarı metodu peptid temelli proteomik olarak adlandırılmaktadır ve burada biyolojik örneklerden saflaştırılan proteinlerin, tripsin ve LysC gibi proteinleri özel bölgelerinden tanıyarak kesen enzimler tarafından sindirilmesi yani peptidlere parçalanması sağlanır ve ardından sıvı kromatografisi ile ayrıştırıl sonra kütle spektroskopisi (MS) ile parçalanan peptidlerin kütle/yük oranları belirlenir ve son olarak tanımlanan peptidler, global protein veritabanlarından biyoinformatik yöntemlerle karşılaştırılarak hangi proteinlere ait olduğu saptanır.[307] Yukarıdan aşağıya çalışmalarda proteinler fraksiyone olmadan LC-MS tarafından tanınır.[308]

Proteomik analizlerin sonuçları, örneklerin hazırlanması ve saklanmasından etkilenmektedir. Örnek hazırlanmasında standart bir teknik yoktur. Biyolojik materyalden proteinlerin izole edilmesi çalışmalardaki en önemli adımdır. Proteinlerin izole edilmesi organik solventler ve deterjanlar ile yapılır ve izole edildikten sonra liyofilizasyon[309] ile deterjanlar ve solventler çözeltiden uzaklaştırılır.

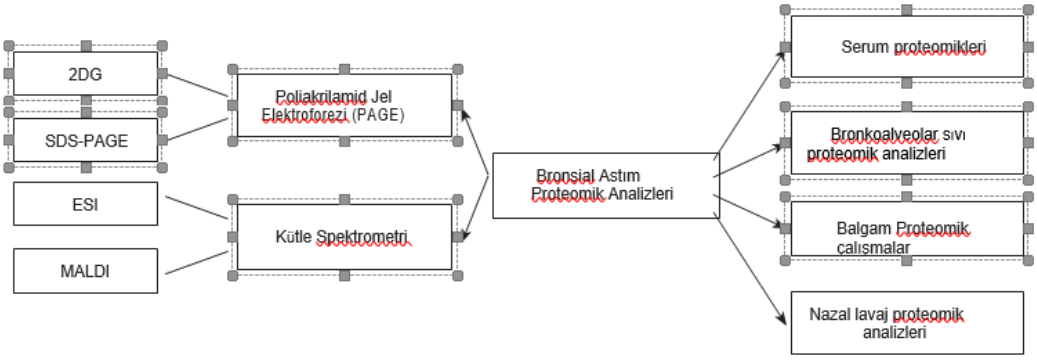
Protein izolasyonu ve ayrıştırılmasında jel bazlı ve kromatografi temelli yaklaşımlar mevcuttur. Jel bazlı yaklaşımlar 1-DE (tek boyutlu elektroforez), 2-DE (iki boyutlu elektroforez) olarak iki gruba ayrılmıştır. Kromatografi temelli yaklaşımlarda boyut dışlama kromatografisi (Size exclusion chromatography), iyon değişim kromatografisi (ion- exchange chromatography) gibi yöntemler kullanılmaktadır.[310]

2.11. Astım Hastalarında Proteomiks İncelemeleri

Proteomik analiz ve biyoenformatik araçların kombinasyonu, astım da dahil olmak üzere birçok hastalığın tanı ve tedavi hedeflerinin hızlı bir şekilde keşfedilmesi için büyük umutlar sunmaktadır.[311]

Astım hastalarına yönelik biyobelirteç keşfi araştırmalarında kütle spektrometri zeminli çalışmalar hızlı, daha doğru sonuçlar vermesi nedeniyle son zamanlarda daha değerli olmuşlardır. Biyolojik süreçleri anlamada ve araştırmacılara potansiyel biyomarker geliştirmede yardımcı olmaktadır. Bu çalışmalarda ilk basamakta proteinler sindirilmekte, oluşan peptid zincirleri çok boyutlu kromatografi tarafından ayrıştırılmakta ve kütle spektrometri ile incelenmektedir. İnceleme sonuçlarında

proteomik ekspresyon ve etkileşimleri hakkında araştırma yapmaya fırsat sağlamaktadır.[312]



Şekil 11. Bronşial astımın proteomik analizi için kullanılan yaygın teknikler[311]

Balgam, tükrük, serum, bronkoalveoler lavaj sıvısı astımda proteomik analiz yapmak için kullanılan örneklerin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. Ancak serum içlerinde en önemli olan ve en sık kullanılan örnektir. Astımlı hastalardan elde edilen örnekler kütle spektrometri veya elektroforez yapılarak proteomik çalışmalar için kullanılabilmektedir. Şekil 11'de astım hastaları için kullanılabilecek proteomik teknikler ve örnek seçimi gösterilmektedir.

Terracciano ve arkadaşlarının 16 astımlı ve 10 sağlıklı çocukta yaptığı proteomiks analizinin sonucunda astımlıların serum örneklerinde C7 ve alfa-1 antitripsinin aşırı ekprese edildiğini bulmuşlardır.[313]

Ruizcampillo ve ark, aspirinin indüklediği astımı olan hastalarda yapılan serum proteomik analizde kompleman C3 ve C4 ile siklooksijenazın serum seviyelerinin anlamlı derecede arttığını ve FEV1 ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. [314] Ghosal ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, astım hastalarının serum proteinlerini analiz etmek amacıyla LC-ESI MS'i kullanmışlar ve astımlı hastaların sağlıklı insanlarla karşılaştırıldığında serum fosfodiesteraz 7 (PDE7), UK16 bağlayıcı protein, fosfolipaz D, arginaz düzeylerinin anlamlı derecede arttığını bulmuşlardır. [315]

Cao ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada klasik astım, öksürük varyant astım ve göğüste sıkışma hissi baskın olan hastalarda klinik ve inflamatuar hücreler karakteristik olarak aynı bulunmuştur ve balgamdaki protein seviyeleri aynı

bulunmuştur. Bu bulgular da üç farklı astım fenotipinin aynı patojenik mekanizmaları içerdiğini göstermektedir.[316]

Proteomik çalışmalar ile proteinlerin karakterizasyonu, tanımlanması ve miktarı, onlarla ilişkili fonksiyonları tanımlanabilmektedir. Proteomik çalışmalardaki avantaj dinamik ve statik olarak proteomlarla ilgili anlık kesitler alınabilmesidir.[317] Proteomik çalışmalarda örneklerin toplandığı yer veya toplandığı anın (stabil dönem, alevlenme vb.) hastalık süreciyle tam bağlantılı olmadığını ve dinamik proteomik çalışmalarla ilgili net bir bilgi vermeyeceğini not etmek önemlidir.[318] Bu nedenle astımla ilgili proteomik çalışmalarda farklı numune alanlarında farklı zamanlarda örnekler alınarak karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi gerekebilmektedir. Astımlı hastalarda proteomik profiller farklı fenotipler, dokular ve dönemlerle ilişkili olabilmekte olup farklı hücrelerin aktif olduğunu göstermektedir. Karşılaştırmalı ve kohort çalışmalar proteomik yapılarıyla ilgili daha net bilgi vermektedir.[319]

Özetlenen tüm bu bilgilerden sonra literatürde ağır astım hastalarına başlanan biyolojik ajanların yanıtını gösterebilecek bir biyobelirteç olmadığı görülmektedir. Bu araştırmada hipotez "Erişkin ağır astım hastalarında mononükleer hücrelerin proteomik profilleri birbirinden farklıdır ve bu proteomik farklılıklar biyolojik ajan başlamak veya biyolojik ajanlara yanıtı göstermek için biyobelirteç olarak kullanılabilirler" olarak belirlenmiş ve tedaviye duyarlı ve dirençli hastaların mononükleer hücrelerinden proteomik analizler yapılarak tedavi yanıtını öngörebilecek biyobelirteçlerin belirlenmesi planlanmıştır.

3. GEREÇ YÖNTEM

3.1. Araştırma Tipi, Yeri ve Hastaların Seçimi

Araştırma, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Kliniğinde ağır astım ile takip edilen 20 hastanın dahil edildiği prospektif gözlemsel ve deneysel Kohort çalışmasıdır.

Çalışmaya Kasım 2022- Kasım 2023 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Göğüs Hastalıkları polikliniğine başvuran, daha önce GINA 2022 astım kılavuzuna göre astım tanısı ile takipte olan ve aydınlatılmış onam formunu okuyarak araştırmaya katılmayı kabul eden ve dâhil edilme kriterlerini karşılayan 20 hasta alındı.

Doğru ve düzenli ilaç kullanımı ile mesleki ve çevresel temasın ortadan kaldırılmasına ve uygun olan en yüksek dozda ilaç kullanılmasına rağmen astım semptomları devam eden hastalar ağır astım olarak değerlendirildi. Hasta kohortu, uygun en yüksek dozda ilaç kullanımına rağmen semptomları devam eden, sık atak geçiren, fizik muayene ve solunum fonksiyon testleri ile ağır astım tanısı desteklenen ve poliklinik sorumlu öğretim üyesi tarafından biyolojik ajan tedavisi başlanması kararlaştırılanlardan oluştu. Araştırmaya katılmayı aydınlatılmış onam formunu imzalayarak kabul eden hastaların yaş, cinsiyet, boy, kilo, BMI (vücut kitle indeksi), sigara öyküsü, aile öyküsü, tanılı ek hastalıkları, kullandığı ilaçlar, deri prick testi, son bir yıl içinde astım atak geçirme öyküleri kaydedildi.

Araştırmaya dahil edilme kriterleri

Çalışmaya katılmayı kabul eden, onam formunu imzalamış ve gönüllü olan

Nöbetler halinde gelen nefes darlığı, hışıltılı solunum, öksürük ve göğüste sıkışma hissi gibi semptomları olan, semptomları gün içinde veya mevsimsel değişkenlik gösteren, sis, duman, çeşitli kokular veya egzersiz gibi nedenlerle tetiklenen, geceleri sabaha karşı yakınmalarda artış olan, fizik muayene, spirometrik incelemeler ile astım tanısı desteklenen, astım nedeniyle yüksek doz İKS+LABA kullanımı olan 15-65 yaş aralığında Kasım 2022-Kasım 2023 arasında ÇÜTF Göğüs hastalıkları polikliniğine başvuran hastalar

Güncel GINA kriterlerine uygun şekilde ağır astım tanısı almış olmak (doğru ve düzenli ilaç kullanımı ile mesleki ve çevresel temasın ortadan kaldırılmasına ve uygun olan en yüksek dozda ilaç kullanılmasına rağmen astım semptomları devam eden hastalar)

Ağır astım nedeniyle biyolojik ajan başlanması planlanan, daha önce biyolojik ajan kullanımı olmayan ya da biyolojik ajan kullanımına rağmen semptomları devam eden ve diğer biyolojik ajan tedavisine geçiş planlanan hastalar

Araştırmaya alınmama kriterleri

GOLD tanı kriterlerine göre Kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan (anamnezinde sigara öyküsü biomass maruziyeti gibi yoğun zararlı partikül maruziyeti bulunan, prenatal dönem veya çocukluk döneminde koah risk faktörlerine sahip, sürekli balgamı olan, genellikle alerjik semptomların eşlik etmediği kalıcı progresif akciğer solunum fonksiyon kaybı olan hastalar) veya Astım-koah overlap tanısı ile takip edilen hastalar

Obezitesi olan (vücut kitle indeksi > 30 kg / m²), gastroözefageal reflü, rinosinüziti olan ve komorbiditesi kontrol altına alınamayan hastalığı bulunanlar

Çalışmayı kabul ettiğini gösterir yazılı belge imzalamayan hastalar

3.2.Araştırmanın Genel Planı

Çalışma için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 2 Haziran 2023 tarihli 134 sayılı toplantısının 19 numaralı kararı ile onay alındı. Araştırmanın maliyeti TTU-2023-15464 nolu proje ile Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından karşılanmıştır. Hastalara sözlü olarak araştırmanın konusu ve amacı hakkında bilgi verilmesinin ardından çalışmaya katılmayı kabul eden katılımcıdan bilgilendirilmiş onam formu alındı.

Çalışmaya dahil edilen hastaların yaşı, cinsiyeti, sigara öyküsü, ek hastalıkları, vücut kitle indeksi, astım kontrol testi, tanılı ek hastalıkları, deri prick testi, kullandığı ilaçlar, başlanan tedavi ve dozları, tedaviye başlamadan önce alınan kanların laboratuvar değerleri (hemoglobin değeri, beyaz küre sayısı, eozinofil sayı ve oranı, IgE değeri) solunum fonksiyon testi, astım kontrol testleri anket formuna kaydedildi.

Araştırmada ilave tedavi (yeni biyolojik tedaviler) ihtiyacı olan bu hasta grubuna ilave tedavi öncesi ve ilave tedavi kullanımından bir yıl sonraki klinik semptomlarına, Astım kontrol testi skorlarına, atak nedeniyle acil servis başvuru ve hastaneye yatış sayısına, solunum fonksiyon testinde FEV1 değerindeki değişikliklerine bakıldı. Hastalarda 1 yılın sonunda Astım Kontrol testi hala 20 nin altında olan, FEV1 değerinde artış olmayan, astım atak nedeniyle yıl içinde en az iki kez acil servis başvurusu veya en az 1 kez hastaneye yatışı olan hastalar tedaviye dirençli olarak kabul edildi. Astım kontrol testi 20 nin üzerinde olan ve tedavi öncesi ve sonrasında yapılan astım kontrol testi skor farkı en belirgin olan, belirgin FEV1 artışı olup atak nedeniyle hastane başvurusu olmayan hastalar ise tedaviye duyarlı grup olarak kabul edildi. Çalışmaya alınan 20 hastadan biyolojik tedavi öncesinde, 1 yıllık tedavi sonundaki duyarlılık-dirençlilik durumuna göre proteomiks analiz yapılmak üzere ve hastaların başlangıç eozinofil ve IgE düzeyinin değerlendirilmesi üzerine EDTA'lı ve biyokimya tüplerine ayrılan 15 cc kan örneği alındı. Alınan kan örneğinin 5'cc i tam kan sayımı ve total IgE düzeyi tayini yapmak üzere analiz edildi. Tam kan sayımı için Çukurova Üniversitesi merkez laboravuarında bulunan *Beckman-Coulter cihazı*, IgE için *ELISA* analizörü *GRİFOLS* marka *TRITURUS cihazı kullanıldı.*

Hastalara Çukurova Üniversitesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları Polikliniğindeki solunum fonksiyon testi odasında Kalibre edilmiş bir Sensor Medics V-Max 20 Spirometre (Jaeger MS-PFT Analizör Ünitesi, Wiasys erdem saNe sesa Healthcare GmbH, Höchberg, Almanya) kullanılarak solunum fonksiyon testleri (SFT'ler) yapılmış olup ilk saniyedeki temel zorlu ekspiratuar hacim (FEV1) ve zorlu vital kapasite (FVC) üç kez ölçülüp ve üç ölçümün en iyisi kaydedildi. Spirometrik sonuçlardan FEV1 (%/L), FVC (%/L), FEV1/FVC, FEF25/75(%-L/s) kullanıldı.

Deri prick testi Çukurova Üniversitesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı solunum fonksiyon testi teknisyeni tarafından yapıldı. Deri prick testinde D.farinea (ev akarları), D.Pterynossinus (ev tozu), kedi, köpek, betulacea (ağaç polenleri), grasses mix (ot karışımları), solicaceae (kavak-söğüt), aspergillus solüsyonları bulunmaktaydı. Test için Starallergens, France deri prick testi kitleri kullanıldı. Kit katalog önerilerine göre yanlış sonuç alınabilmesi nedeniyle trisiklik antidepresanlar, antiemetikler, sistemik ve topikal steroidler, H2 reseptör blokörleri test uygulamasından uygun süre öncesinde kesilmesi ile deri prick testi uygulandı. Negatif kontrol olarak ekstratlarda kullanılan çözücü,

pozitif kontrol için ise histamin hidroklorit 10 mg/ml kullanıldı. Testin değerlendirilmesi cetvel ile yapıldı. Pozitif kontroldeki kabartı çapı 4 mm ve üzerinde, negatif kontrol üzerindeki çapı ise 3 mm ve altında ise yapılan test geçerli kabul edildi. Deri prick testi pozitifliği katalog bilgisine göre kabartı çapı negatif kontrolden büyük, çapı 5 mm den büyük veya pozitif kontrolde elde edilen sonucun 4 mmden az olmaması koşulu ile %70 i veya daha fazlası olarak kabul edildi.

Olgularda Astım Kontrol Testinde (AKT); gündüz ve gece astım semptomları, kurtarıcı ilaç gereksinimi, günlük aktivite kısıtlamasını sorgulayan 5 başlıktan oluşan anketin valide edilmiş Türkçe versiyonu[320] kullanıldı.

Araştırmaya alınan 20 hastanın hepsine tedaviye başlamadan önce 10 cc EDTA'lı tüpe alınan kan örneklerinin Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Merkezi bünyesinde bulunan Göğüs Hastalıkları Moleküler Araştırma Laboratuvarında lenfosit izolasyonu ve protein ekstraksyonu yapıldı, numuneler -80 ^{o}C de buzdolabında muhafaza edildi.1 yıllık tedavi sonrasında yukarıda belirtilen kriterlere göre tedaviye en duyarlı 5 hasta ve tedaviye dirençli 3 hasta olmak üzere toplamda 8 hasta seçilerek ileri proteomik analizler yapıldı.

3.3. Lenfosit izolasyon protokolü

EDTA'lı tüpe alınan kan örneklerinden mononükleer hücrelerin izolasyonu için Ficoll solüsyonu kullanıldı. (Sigma, katalog no: F8016). Aşağıdaki aşamalarla hücreler izole edildi.

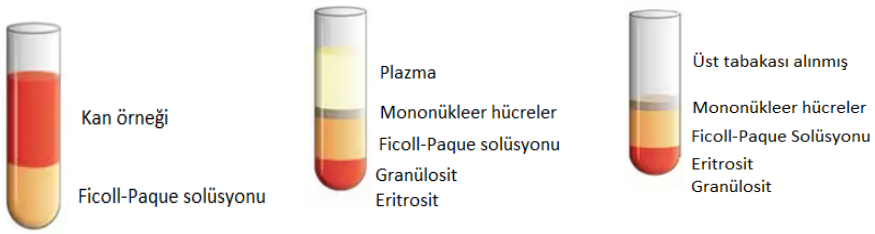
50mL'lik falkon tüpünde hastadan alınan kan 1:1 oranında steril PBS (fosfatlı salin tampon çözeltisi) ile dilüe edildi.

15mL veya ayrı bir 50mL falkon tüpüne kanın yeni hacmi kadar ficoll konularak PBS ile dilüe edilmiş olan kan örneğinin tamamı ficoll üzerine yavaşça yayıldı.

1800 rpm'de 30 dakika +4 santigrat derecede santrifüj edildi.

Ficoll ve PBS arasında bulutsu bir görünüm yapan mononükleer hücreler pastör pipeti yardımı ile çekilerek 15 ml lik falconlara aktarıldı.

Ardından 8-10 ml soğuk PBS 15lik falconlara alınarak 1200 rpm de 10 dakika +4 derecede santrifüj edildi. Ve bu yıkama aşaması bir kez daha tekrarlandı. Şekil 12'de protokol özetlenmiştir.



Şekil 12. Mononükleer hücre izolasyonu

Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra ardından protein izolasyonu aşamasına geçildi.

3.4. Protein izolasyonu

Araçlar:

Proteaz fosfataz inhibitör kokteyl: Thermo Scientific™ Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X) Catalog number: 78440

Ripa Buffer: Thermo Scientific™ 89901 Pierce™ RIPA Buffer

Non-steril 20X PBS 1X'e seyreltildi (Örnek; 20 mL için 19 mL distile su ve 1 mL 20X PBS birbirine eklendi ve 1 defa yavaşça baloncuk oluşturmadan pipetajlanarak karıştırıldı).

100X konsantrasyonundaki Proteaz fosfataz inhibitör kokteyl' i kullanılarak ripa buffer'ın miktarına göre hesaplama yapıldı. 1000 µL ripa buffer;

100X * V = 1X*1000

V= 10 µL 100X Proteaz ve fosfataz inhibitör kokteyl

Bir eppendorf tüpüne kullanıma hazır Ripa buffer ve 1/100 µL/X Proteaz inhibitör kokteyl eklenip pipetajlanarak karışmaları sağlandı.

30 saniye vorteks 5 dakika buzda inkübasyon yapılarak işlem totalde 4 kez tekrarlandı.

İnkübasyonun ardından hücre süspansiyonu, 15300 rpm de +4 derecede 20 dk boyunca santrifüj edildi.

Santifüj ile hücre süspansiyonu pelet ve süpernatant şeklinde ayrılır ve proteinler süpernatantta kalır. Bu nedenle santrifüj ardından elde edilen süpernatant yeni bir

eppendorf tüpüne alındı. Böylece protein izolasyonu gerçekleştirildi ve hücreden protein elde edildi. 15 dakika buzda inkübasyon sonrasında elde edilen numuneler -80^{o}C'e alındı.

3.5.BCA Yöntemi ile Total Protein tayini

Kullanılan araç ve ekipman:

BCA solüsyon kiti (Pierce, katalog no: 23225) Reagent A - Reagent B

Pipet - Örnekler (lenfosit örnekleri)

İnkübatör: Nüve EN500 TS 5151

Spektrofotometre: EZ Read 400 microplate reader biochrom

Deney prosedürü:

Total protein tayini için Bisinkoninik asit (BCA) solüsyon kiti (Pierce, katalog no: 23225) kullanıldı. BSA (bovine serum albümin) ile 2000ug, 1000ug, 500ug, 250ug, 125ug, 62.5ug, 31.25ug ve 0 ug standartlar hazırlandı. Eppendorf içindeki proteinlerden 5'er uL alınarak 1/5 oranında soğuk distile su ile dilüe edildikten sonra hem standartlar hem de proteinler, 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 10'ar mikrolitre ve ikişerli olarak kuyucuklara aktarıldı. Üzerlerine 200uL BCA çalişma solüsyonu eklenip kaplar plate çalkalayıcısında çalkalandıktan sonra 30 dakika 37 C derecede inkübe edilerek ve plate okuyucuda 562 nM dalga boyunda okundu.

3.6. Preomics Örnek Hazırlama

Kullanılan araç ve ekipman

Proteomiks örnek hazırlama kiti: (Preomics sample preparation kit 8x ve katalog no: NC1699269)

Kit içeriği: Sindirim kiti, canlandırma kiti, litik kiti, stop kiti, yıkama-1, yıkama-2, ayrıştırma kiti, LC-LOAD

Pipet

Isıtıcı blok: Thermomixer comfort-EPPENDORF

Santrifüj

Sonikatör

Vakum buharlaştırıcı (Thermo)

Deney Prosedürü:

Mononükleer hücre izolasyonu ve hücrelerden total protein izolasyonu ardından proteomik analizler için proteinlerin peptid fraksiyonlarına ayrılması üç aşamada yapıldı:

1-LİTİK BASAMAK:

1.1: 1-100 µg protein örneğine 50 µL LYSE ekleyip ısıtıcı blokta 95°C 1000 rpm 10 dakika santrifüj edildi.

1.2: Örnekler opsiyonel olarak ters döndürüldü.

1.3: Adaptör kullanılarak kartuşlar atık tüpüne koyuldu.

1.4: Tabanına zarar vermemek adına adaptörler soğutuldu.

2- SİNDİRİM BASAMAĞI

2.1: 210 µL canlandırma kiti sindirim kitine eklendi. (1 tüp için 4 reaksiyon yapıldı, aşağı yukarı sallanarak oda havasında 500 rpm 10 dakika santrifüj edildi.)

2.2: Sindirim tüpünden 50 µL kartuşa eklendi ve önceden ısıtılmış ısıtma bloklarına eklendi. (37°C 500 rpm 1 saat)

2.3: Kartuşa 100 µL STOP eklendi. Oda havasında 500 rpm de 1 dakika santrifüj edildi

3-SAFLAŞTIRMA BASAMAĞI

3.1: Kartuş santrifüjde 3800 rcf de 1-3 dakika döndürüldü.

3.2: 200 µL WASH-1 kartuşa eklenip 1. Basamak tekrar edildi.

3.3: 200 µL WASH-2 kartuşa eklenip 1. Basamak tekrar edildi.

3.4: Adaptör kullanılarak kartuş temiz bir toplama tüpüne alındı.

3.5: 100 µL ayrıştırma kitinden kartuşa ilave edilip 1. Basamak tekrar edildi.

3.6: Bir önceki basamak tekrar edilip toplama tüpündeki akış tekrar ettirildi.

3.7: Kartuş atılıp toplama tüpüne eklendi ve vakum buharlaştırıcı eklendi.(45°C tamamen kuruyana kadar)

3.8: Toplama tüpüne LC-LOAD eklendi.

3.9: Toplama tüpleri ultrasonik banyoya koyuldu. Oda havasında 500 rpm 5 dakika santrifüj edildi.

-20°C de muhafaza edilerek LC-MS/MS yapılmak üzere depolandı.

3.7. LC-MS/MS Analizleri

Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜNİTEK) LC-MS/MS biriminden hizmet alımı yapıldı.

Bruker Maxis II ETD QTOF Mass Spectrometer with BRUKER NanoElute nANOlc system cihaz modeli kullanıldı.

LC-MS/MS analizi eşzamanlı nLC (nano Liquid Chromatography) sistemi bağlı ESI-QTOF-MS (Electrospray Ionization – Quadrupole Time-of-Flight – mass spectrometer) cihazında gerçekleştirildi. Yüksek düzeyde bir kütle doğruluğu sağlamak için cihaz, üreticinin talimatlarına göre kalibre edildi.

Protein ekstraksiyonu ve tripsin ile parçalama gibi örnek hazırlama işlemlerinin ardından peptit karışımı haline getirilmiş numuneler nLC sisteminde bulunan 100 µm iç çaplı 2 cm uzunluğundaki zenginleştirme kolonununa (AcclaimPepMap RSLC, Thermo) yüklendi.

Daha sonra nLC uygun gradiyen sistemi ile kolonda ayrılan peptitler 75 µm iç çaplı, 25 cm uzunluğunda ve C18 parçacıkları içeren analitik kolonla (PepSep, 1.9 µm) birbirlerinden ayrıldı.

Ayırma işlemlerinde nano-ESI (Bruker captive spray) iyon kaynağına entegre yüksek basınçlı nLC (Bruker NanoElute) kromatografi sistemi kullanıldı.

Her numune % 2 Asetonitril/ % 98 su (% 0,1 (v/v) TFA) çözeltisinde 500 ng/mL peptit çözüldükten sonra 1 µl çekilerek 80 dakikalık ayırma işlemine tabi tutuldu.

Peptitler zenginleştirme kolonuna tampon A (0,1% v/v formik asit) ile yüklendikten sonra tampon B (0,1% v/v formik asit, Asetonitril) gradienti sürekli artırarak (40 dakika boyunca doğrusal % 2– % 17 gradient ile daha sonra sırayla 20 dakika içinde % 25'e, sonraki 10 dakika içinde % 40'a ve takip eden 5 dakika içerisinde % 80'e ve son 5 dakika % 80'da tutularak) analitik kolonda ayrıldı.

Tüm ayırma işlemleri esnasında kolon sıcaklığı Peltier sistemi entegre edilmiş ısıtıcıyla 40°C'ye ayarlanarak sabit tutuldu.

Kütle spektrometrik veriler dönüş süresi 3 saniye olacak şekilde data-independent MS/MS yöntemiyle elde edildi.

Kuru gaz sıcaklığı 180°C'ye, kuru gaz 4.0 L/dk olacak şekilde ayarlandı.

Kapiler voltajı 4500 V, nebulizatör basıncı 0,4 bar olarak ayarlandı.

Spektra hızı 2 Hz, MSMS tarama hızı 4-16 Hz arasında intensitesine bağlı olarak değişkenlik gösterdi.

Tripsin ile parçalama sonrası elde edilen peptit parçalarına ait moleküler iyonlar (precursor ions) QTOF içerisinde yer alan CID (Collision Induced Dissociation) hücresinde kontrollü bir şekilde parçalanarak (auto MS/MS) kütle spektrometrik veriler elde edildi.

MS1 taramaları 350-2200 m/z aralığında yaklaşık 80.000 rezolüsyonda ve oto MS/MS taramaları da 150-2200 m/z aralığında aynı rezolüsyonda aktif "exclusion" modunda gerçekleştirildi.

3.8. Biyoinformatik Analizler

Proteomik ham data analizleri için MaxQuant analiz programı kullanılmıştır. Maxquant kantitatif bir proteomik yazılımıdır ve büyük kütle spektrometri datalarını yorumlamak üzere dizayn edilmiştir.[321] Analizler Hacettepe Üniversitesi Sağlık bilimleri enstitüsü biyoinformatik anabilim dalı tarafından yapıldı. Bu analizlerde, çalışma grupları tedaviye duyarlı 5 örnek, tedaviye dirençli 3 örnek olarak 2 grup halinde oluşturulduktan sonra ön hazırlık olarak, insan proteom dizilerini içeren FASTA dosyası Uniprot üzerinden indirildi (UP000005640). Uniprot protinlerin fonksiyonları, yapıları ve dizileri hakkında bilgi sağlayan, ulaşılabilir bir kaynaktır. Swiss Institute of Bioinformatics, Europan Bioinformatics institute ve Protein İnformation Resources tarafından ortak yürütülen bir proje kapsamında geliştirilmiş ve düzenli olarak güncellenmektedir.[322] Bilinen kirletici peptidler ve sahte fasta dosyalarının ayıklanması için programda ayrıştırma kuralları seçenekleri bulunmaktadır. Bu çalışmada, numunelere herhangi bir özel etiketleme/kantitasyon stratejisi uygulanmadığı için MaxQuant ile ölçme yöntemi olarak etiketsiz kantifikasyon seçildi (ing. label-free quantification (LFQ)). "Çıktı Seçenekleri"nde çıktı dosyalarının tümü seçildi. Protein bilgisi "Protein Grupları" seçilerek elde edilebilirken, peptit bilgisi "Peptidler" seçilerek elde edildi. Uygulanan MaxQuant parametreleri mqpar.xml'de saklanmış olup bu dosya,

MaxQuant (mqpar.xml kullanılarak) aracında bir giriş dosyası olarak yeniden kullanılabilecek şekilde saklandı.

İki grubun proteomik bileşimini karşılaştırmak için "Protein Grupları" dosyasında bazı son işlem adımları gereklidir. Protein Grupları dosyası, protein düzeyiyle ilgili tüm bilgileri içermektedir. Protein grupları dosyası R programlama diline yüklendi. R programlama dili istatistiksel hesaplamalar, grafikler için tasarlanmış bir dildir ve çeşitli grafik teknikleri sunar.[323]

Her numune için LFQ yoğunlukları hesaplandı. Önce MaxQuant'ta "ters" olarak adlandırılan proteinleri çıkarıldı, ardından kirleticiler kaldırıldı. Numune başına bolluğu en fazla olan proteini bulmak için LFQ yoğunlukları sıralandı. Her numunenin bileşimi ayrı ayrı analiz edildikten sonra, ikigrup arasındaki protein ifade düzeyleri karşılaştırıldı. Bunun için yoğunluk değerleri log2-dönüştürülerek ve 0 olan değerler ortalamadan tahmin edilmiştir (ing. İmputation). Değerler arasındaki farklılık için. Student's T testi ile istatistiksel analiz yapıldı. Ayrıca, log2 kat değişimi hesaplanarak >1.5 ve <-1.5 olan anlamlı proteinler belirlendi. Verilerin anatasoyonu Perseus (v2.0.11) ile hangi yolaklara ait oldukları bulunmuştur. KEGG numaraları belirtilmiştir. Ayrıca Gen Ontoloji analizi yapılmıştır. Proteinlerin GO analizi ile hangi biyolojik süreç, moleküler fonksiyon, hücresel komponente ait olduğu belirlenmiştir. GO(Gene Ontology) analizi genlerin veya proteinlerin işlevlerinin yer aldıkları, hücresel bileşenleri ve biyolojik süreçlerle olan ilişkilerini anlamak için yapılan yöntemdir. GO analizi üç ana kategoride incelenir bunlar biyolojik süreçler, moleküler fonksiyonlar, hücresel bileşenlerdir, bu analizlerin yapılabileceği çeşitli veri tabanları ve yazılım araçları mevcuttur.[324]

3.9. İstatistiksel Değerlendirme

Demografik değişkenler Prism (V10.2.0) ve Chatgpt 4 kullanılarak analiz edildi. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki-Kare Testi kullanıldı ve yapılan analizlerde $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Gruplar arasında farklı bulunan proteinler, genler ve proteinler arasındaki etkileşimleri, etkileşimlerin derecesini ve ait oldukları hücresel yolakları mevcut literatüre dayanarak analiz eden ve görsele dönüştüren bir platform olan STRING (v12.0.0) üzerinden incelendi.

4. BULGULAR

Araştırmaya 18 ile 65 yaş aralığında ağır astım tanısı ile biyolojik ajan başlanan 20 hasta alındı. Çalışmaya alınan hastalardan 17'si kadın (%85), 3'ü erkek (%15)'ti. Hastaların yaş ortalaması 46,85±12,68 olup 28 ile 62 yaş arasında değişkenlik göstermekteydi. Çalışmaya alınan hastaların 17'si(%85) sigara kullanmıyor ve hiç kullanmamıştı ve 3'ü (%15) sigara kullanıcısıydı. Hastalara yapılan deri prick testinde 7 hastada (%35) pozitif sonuçlar elde edildi. Bazı hastalarda birden çok alerjene karşı pozitif sonuç alındı. Hastaların 3'ünde ev tozuna, 4'ünde ev akarlarına, 1'inde kediye, 1'inde ot karışımına, 2'sinde ağaç polenlerine, 1'inde aspergillusa karşı pozitif sonuçlar alındı. Hastaların 13'ünde (%65) deri prick testinde bakılan alerjenlere karşı pozitif yanıt gözlenmedi(Tablo 8).

Tablo 8. Hastaların demografik bilgileri, Prick testleri ve komorbiditelerinin oransal gösterimi

Hasta Sayısı (n:20)	
Yaş	46,85±12,68
Cinsiyet **Kadın** **Erkek**	 17(%85) 3(%15)
Sigara **Var** **Yok**	 3(%15) 17(%85)
Deri Prick **Ev Tozu** **Ev Akarlar** **Kedi** **Köpek** **Ot Karışımı** **Ağaç Polenleri** **Aspergillus**	 3 (%15) 4 (%20) 1 (%5) 0 1 (%5) 2 (%10) 1 (%5)
Ek Hastalıklar	
Diyabetes Mellitus	4(%20)
Hipertansiyon	5 (%25)
Koroner Arter Hastalığı	3 (%15)
Romatolojik Hastalık	4 (%15)
Nörolojik Hastalık	2 (%10)
Psikiyatrik Hastalık	6 (%30)
Hipotiroidi	2 (%10)
Görh	1 (%5)
Allerjik Rinit	2 (%10)
Chron Hastalığı	1 (%5)
Osteoporoz	1 (%5)

Hastaların 18'inin (%80) ek hastalığı izlenmiştir. 4'ünün(%20) diyabetes mellitus, 5'inin (%25) hipertansiyon, 3'ünün (%15) koroner arter hastalığı, 4'ünün (%20) romatolojik hastalığı, 2'sinin(%10) nörolojik hastalığı, 6'sının (%30) psikiyatrik hastalığı, 2'sinin (%10) hipotiroidisi olduğu, 1'inin(%5) gastroözefageal reflü hastalığı olduğu, 2'sinin (%10) alerjik rinit, 1'inin (%5) chron hastalığı olduğu ve 1'inin (%5) osteoporozu olduğu gözlendi.

Çalışmaya alınan hastalar sırasıyla 1'den 20'ye kadar sıralanmış olup hastalara ait demografik veriler tabloda verilmiştir(Tablo 9).

Tablo 9. Tüm hastaların verileri

HASTA SAYISI(n:20)	YAŞ	CİNSİYET	VKİ	SİGARA(P/Y)	DERİ PRİCK
1	53	Kadın	26,30	Hiç İçmemiş	Ev Tozu, Ev Akar
2	41	Kadın	27,4	Hiç İçmemiş	Ev Tozu, Ev Akar
3	62	Kadın	24,8	Hiç İçmemiş	Allerjen Saptanmadı.
4	54	Kadın	24,2	Hiç İçmemiş	Allerjen Saptanmadı.
5	46	Erkek	28,08	Hiç İçmemiş	Ev Akarları
6	61	Erkek	23,6	Hiç İçmemiş	Allerjen Saptanmadı.
7	46	Kadın	23,7	VAR	Ev Tozu
8	48	Kadın	29,2	Hiç İçmemiş	Allerjen Saptanmadı.
9	48	Kadın	27,1	Hiç İçmemiş	Ev Akarları
10	28	Kadın	25	Hiç İçmemiş	Kedi, Ot, Polenler, Aspergillus
11	62	Kadın	25,9	Hiç İçmemiş	Allerjen Saptanmadı.
12	42	Kadın	24,5	Hiç İçmemiş	Allerjen Saptanmadı.
13	42	Erkek	21,2	Hiç İçmemiş	Allerjen Saptanmadı.
14	56	Kadın	27,2	Hiç İçmemiş	Allerjen Saptanmadı.
15	32	Kadın	22,4	VAR	Allerjen Saptanmadı.
16	29	Kadın	21,8	Hiç İçmemiş	Polenler
17	53	Kadın	29,5	Hiç İçmemiş	Allerjen Saptanmadı.
18	21	Kadın	27	Hiç İçmemiş	Allerjen Saptanmadı.
19	59	Kadın	28,7	Hiç İçmemiş	Allerjen Saptanmadı.
20	44	Kadın	29,5	VAR	Allerjen Saptanmadı.

Hastaların araştırmaya dahil edilmeden önce inhaler kullanımı kontrol edildi ve astım kontrol testleri yapıldı. Hastaların 7'si (%35) salmaterol, flutikazon(SAL+FLU), 5'i (%25) formoterol, beklametazon (FOR+BEK), 8'i (%40) formoterol, budesonid (FOR+BUD), 6'sı (%30) tiotropium kullanıyordu. Tedavilere rağmen hastalardan 9'u (%45'i) kurtarıcı ilaç olarak salbutamol kullanıyordu. Allerjik fenotipte olan hastalardan 16'sı (%80) montelukast ve antihistaminik kombine preparatlar kullanıyordu. Hastalardan 7'si (%35) metilprednizolon kullanma ihtiyacı gösteriyordu.

Ağır astım olarak değerlendirilen hastaların hastaların 6'sına (%30) fenotipik değerlendirme ile omalizumab, eozinofil yüksekliği bulunan 14'üne (%70) mepolizumab tedavisi başlanmıştır. Tedaviden fayda görme durumlarının değerlendirilebilmesi için tedaviye başlarken hastalara 5 parametreli astım kontrol testi (AKT) uygulandı. Astım kontrol testleri tedaviye başlarken 10,1±3,07 olarak bulundu ve tedaviye başlarken test skorları 6 ile 15 arasında gözlendi (Tablo 10).

Tablo 10. Başlanan tedaviler ve 1 yıllık tedavi sonrasında astım kontrol testi, alevlenme sıklığı ve hastane yatışı

HASTA No	Başlanan Biyolojik Tedavi	Astım Kontrol Testi Skoru		ALEVLENME	YATIŞ
		Tedavi Öncesi	Tedavi Sonrası		
1	Omalizumab	11	20	0	0
2	Omalizumab	15	22	0	0
3	Mepolizumab	15	23	0	0
4	Omalizumab	8	21	0	0
5	Mepolizumab	11	20	0	0
6	Mepolizumab	11	21	0	0
7	Omalizumab	10	20	0	0
8	Mepolizumab	10	23	0	0
9	Omalizumab	13	22	0	0
10	Mepolizumab	13	24	0	0
11	Mepolizumab	9	21	0	0
12	Mepolizumab	15	21	0	0
13	Mepolizumab	6	25	0	0
14	Mepolizumab	7	22	0	0
15	Mepolizumab	8	22	0	0
16	Mepolizumab	5	24	0	0
17	Omalizumab	8	25	0	0
18	Mepolizumab	12	10	2	0
19	Mepolizumab	6	7	2	0
20	Mepolizumab	9	10	3	1

Hastalara tedavi başlandıktan sonra hastalar 1 yıllık süreçte prospektif olarak takip edildi. Birinci yıl kontrolünde hastalara tekrardan astım kontrol testi yapıldı ve 20,15±5,07 olarak bulundu. Tedavi sonrasında skorlar 7 ile 25 arasında değişmektedir. Başlanan biyolojik tedaviye rağmen 1 yılın sonunda AKT'si <20 olan ve son 1 yıl

içinde en az 2 kez astım nedeniyle atak ile acil servis başvurusu olan veya en az bir kez bu sebepten hastaneye yatışı olan 3 hasta olduğu tespit edildi, bu hastalar tedaviye dirençli grup olarak kabul edilirken, tedaviye başlanan hastalar içerisinde dirençli olan hastaların oranı %15'idi. Ayrıca çalışmaya alınan tüm hastalardan tedaviye en çok yanıt veren 5 hasta ve tedaviye dirençli 3 hasta olmak üzere toplam 8 hastadan proteomik çalışmalar yapıldı.

Tedaviye başlarken alınan kan örneklerinde tedaviye duyarlı hastaların beyaz küre sayısı(10^3/µL) 8,44±1,16, nötrofil sayısı (10^3/µL) 4,66±1,40, lenfosit sayısı(10^3/µL) 2,14±0,50, eozinofil sayısı (10^3/µL) 0,96±0,40, IgE (U/L) 350,2±354,39, hemoglobin (g/dL) 15,42±1,39, platelet sayısı (10^3/µL) 262,2±50,03, total protein (ug/mL) 672,38±568,40 olarak hesaplandı.

Tedaviye başlarken alınan kan örneklerinde tedaviye dirençli hastaların beyaz küre sayısı(10^3/µL) 11,2±2,77, nötrofil sayısı (10^3/µL) 6,9±3,5, lenfosit sayısı(10^3/µL) 2,36±0,30, eozinofil sayısı (10^3/µL) 1,1±0,81, IgE (U/L) 390,2±428,47, hemoglobin (g/dL) 14,53±1,53, platelet sayısı (10^3/µL) 288,33±75,63, total protein (ug/mL) 890,78±229,67 olarak hesaplandı. Tedaviye duyarlı ve dirençli hastaların laboratuvar değerleri tablo 11'de özetlenmiştir.

Tablo 11. Proteomik analizlere dahil edilen tedaviye dirençli ve duyarlı hastaların laboratuvar değerleri

Hasta No*:	WBC (10^3/µL)	NEU(10^3/µL)	LYM (10^3/µL)	EO (10^3/µL)	HGB (g/dL)	PLT (10^3/µL)	IgE (U/L)	TOTAL PROTEİN (ug/mL)
13	8,8	5,4	1,5	1,1	17	225	955	344,76
14	9	5,6	2	0,8	16,4	333	170	1678,8
15	9,8	6	2,1	1	14,3	207	90	546,78
16	7,8	2,9	2,9	1,5	15,7	286	375	354,78
17	6,8	3,4	2,2	0,4	13,7	260	161	436,8
18	9,7	5,4	2,7	0,9	15,7	331	881	702,78
19	9,5	4,4	2,1	2	15,1	201	90	1146,78
20	14,4	10,9	2,3	0,4	12,8	333	200	822,78

(*) Hasta numaraları Tablo 9 ve 10'daki hasta numaraları ile uyumludur

Tedaviye başlarken yapılan solunum fonksiyon testlerinde tedaviye yanıt veren hastalarda FEV_1/FVC oranı 63,33±13,61 FEV_1 (%/L) 53,82±20,36, FVC (%/L) 71,36±21,33 olarak izlendi. Tedavi öncesinde yapılan astım kontrol testi 6,8±1,30

olarak izlendi. Tedaviye yanıt veren hastalarda 1.yıl sonunda yapılan astım kontrol testi 23,6±1,51 olarak izlendi.

Tedaviye başlarken yapılan solunum fonksiyon testlerinde tedaviye yanıt vermeyen hastalarda FEV_1/FVC oranı 67,43±6,35, FEV_1 (%/L) 70,66±15,90, FVC (%/L) 87,5±12,73 olarak izlendi. Tedavi öncesinde yapılan astım kontrol testi 9±3 olarak izlendi. Tedaviye yanıt vermeyen hastalarda 1.yıl sonunda yapılan astım kontrol testi 9±1,73 olarak tespit edildi. Ayrıca bu hastalarda yılda ortalama 2,33 alevlenme ve 0,33 hastane yatışı gözlenmedi (tablo 12).

Tablo 12. Tedaviye duyarlı ve dirençli hastaların solunum fonksiyon testleri, Astım kontrol testleri (AKT), 1 yıllık takip sonunda alevlenme ve hastane yatış sıklıkları

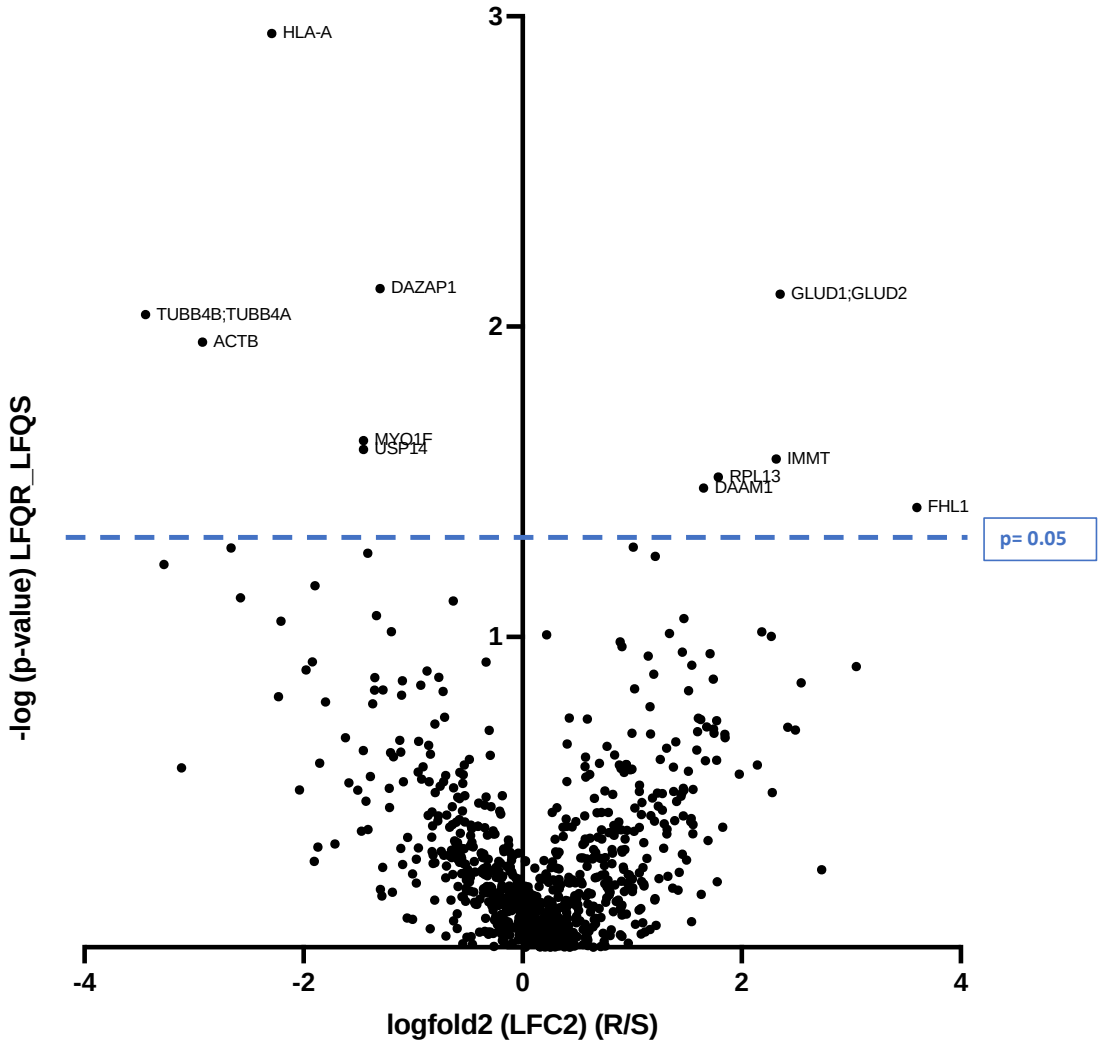
HASTA(n:8)*	FEV1/ FVC	FEV1(%/L)	FVC(%/L)	AKT TEDAVİ ÖNCESİ	TEDAVİ SONRASI	ALEVL ENME	HASTANE YATIŞI
13	39,8	27	54	6	25	0	0
14	63,4	55,8	74,8	7	22	0	0
15	69	61,3	76,9	8	22	0	0
16	72,5	43,4	48,7	5	24	0	0
17	71,8	81,6	102,4	8	25	0	0
18	71	79,5	94,6	12	10	2	0
19	60,1	52,3	72,8	6	7	2	0
20	71,2	80,2	95,1	9	10	3	1

(*) Hasta numaraları Tablo 9 ve 10'daki hasta numaraları ile uyumludur

Ağır astımlı hastalarda başlanan biyolojik tedaviye duyarlı ve dirençli olarak ayrılan gruplarda yapılan proteomik çalışmalarla toplam 2033 protein tespit edildi. Tespit edilen proteinlerden iki grupta log2: 1.5 kat artma ve azalma oranlarında anlamlı farklılık gösteren ($p<0,05$) 11 protein gözlendi (Şekil 13, Tablo 13). FHL1, GLUD1; GLUD2, RPL13, IMMT, DAAM1 genlerinde tedaviye dirençli hastalarda, duyarlı hastalara göre ($p>0,05$) anlamlı artış bulundu. HLA-A, ACTB, USP14, DAZAP1, MYO1F,TUBB4B;TUBB4A genlerinde ise duyarlı hastalarda, dirençli hastalara göre ($p>0,05$) anlamlı artmış olduğu bulundu. FHL1 geni tedaviye dirençli hastalarda duyarlılara göre 3.59 kat artmış(t: 0,0382765) , ACTB geni duyarlı hastalarda dirençli hastalara göre 2.92 kat artmış (t:0,0112174) olarak gözlendi.

Ağır astım hastalarında tedaviye dirençli / duyarlı gruplarda logfold(LFC2) değeri >1.5 (artış) ve <-1.5 (azalış) olan proteinler hedef bir biyobelirteç olarak düşünülmektedir ve bunlar tablo 14'de listelenmiştir. Hastalardan logfold(LFC2)>1.5

olan hastaların STRING (v12.0.0) ile birbirleriyle etkileşimi şekil 15'de logfold(LFC2)<-1.5 olan hastaların etkileşimi şekil 14'de gösterilmektedir. Şekil 16'da tüm proteinlerin etkileşimleri incelenmiş ve etkileşimler arasında en fazla doğal ve kazanılmış immünite ile ilişkili olan proteinler gösterilmektedir.



Şekil 13. Proteomik analizlerde LC_MS/MS sonucu saptanan, karşılaştırmalı istatistiksel analizlerde artış veya azalış oranları istatistiksel anlamlı bulunan proteinleri gösteren volcano plot grafiği (y ekseni logp değeri, x ekseni artış oranını göstermektedir) (R dirençli, S duyarlı)

Tablo 13. Proteomik analizlerde LC_MS/MS sonucunda istatistiksel anlamlı proteinler

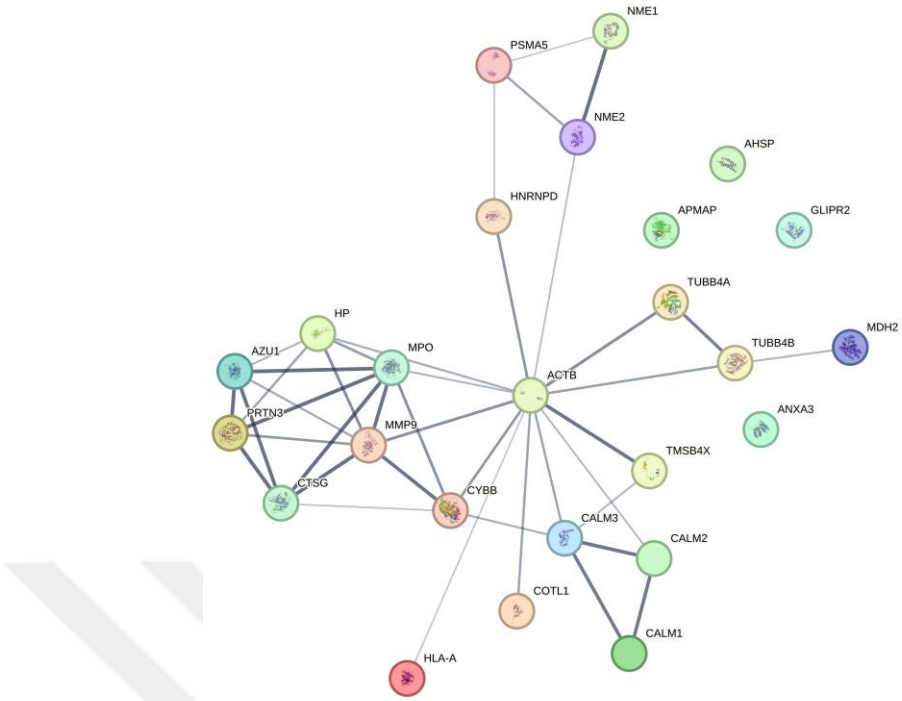
No	GEN ADI	PROTEİN KODU*	logfold2(LFC2)(R/S)	Ptesti(R/S)
1	FHL1	A0A0D9SFI6	3,598968506	0,0382765
2	HLA-A	Q53Z42	-2,291635513	0,0011365
3	ACTB	A0A2R8YEA7	-2,923916658	0,0112174
4	USP14	A6NJA2	-1,451569716	0,0248944
5	DAZAP1	K7EQ02	-1,301543872	0,0075432
6	MYO1F	O00160	-1,452629884	0,0232871
7	GLUD1;GLUD2	P00367	2,351511002	0,0078518
8	RPL13	P26373	1,785740852	0,0305099
9	TUBB4B;TUBB4A	P68371	-3,44322602	0,0091384
10	IMMT	Q16891	2,314702829	0,0267115
11	DAAM1	Q9Y4D1	1,651193142	0,0331094

Tablo 14. Araştırmada tedaviye dirençli / duyarlı gruplarda logfold(LFC2) değeri >1.5 (artış) ve <-1.5 (azalış) olan proteinlerin listesi

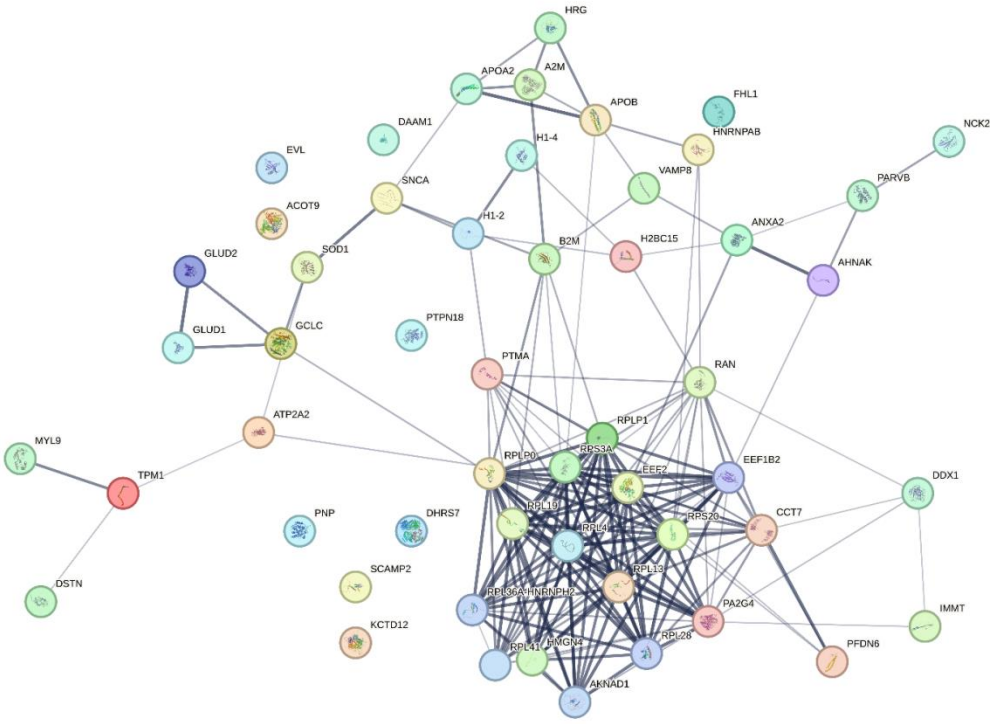
NO	GEN ADI	PROTEİN KODU*	logfold(LFC2) (R/S)	P Değeri (R/s)
1	FHL1	A0A0D9SFI6	3,598968506	0,038276469
2	HIST1H1C	P16403	3,045732657	0,124495975
3	HIST1H2BN	U3KQK0	2,729313691	0,562100596
4	IGHG1	P01857	2,541798433	0,140623574
5	HNRNPAB	D6R9P3	2,4906106	0,199728222
6	SNCA	E7EPV7	2,420254707	0,195356068
7	GLUD1;GLUD2	P00367	2,351511002	0,007851807
8	IMMT	Q16891	2,314702829	0,026711498
9	TPM1	H7BYY1	2,278501987	0,317086046
10	AHNAK	Q09666	2,270464261	0,099581
11	PNP	P00491	2,184003989	0,096368375
12	A2M	P01023	2,142245293	0,258438795
13	PTPN18	E7EMB8	1,977502982	0,276609928
14	HMGN4	O00479	1,874109586	NaN
15	DHRS7	Q9Y394	1,847034613	0,21117232
16	RAN	B5MDF5	1,846196493	0,205887465
17	HIST1H1E	P10412	1,825848738	0,410564876
18	RPL13	P26373	1,785740852	0,030509895
19	B2M	P61769	1,77716128	0,615522843
20	RPS20	P60866	1,771889369	0,186007758
21	RPS3A	D6RAT0	1,770445347	0,249550619
22	PA2G4	Q9UQ80	1,747770627	0,204336666
23	SCAMP2	O15127	1,742943287	0,198063381
24	RPL4	P36578	1,739449501	0,136765428
25	DSTN	P60981	1,711296399	0,113182476
26	PTMA	B8ZZQ6	1,691367308	0,453140301
27	NCK2	O43639	1,684291204	NaN
28	ANXA2;ANXA2P2	P07355	1,680570602	0,195049403
29	ACOT9	C9J7L8	1,678737958	NaN
30	APOA2	V9GYM3	1,668230375	0,250543969
31	PFDN6	O15212	1,656037807	NaN
32	DAAM1	Q9Y4D1	1,651193142	0,033109357
33	PARVB	Q9HBI1	1,62893645	0,675004862
34	KCTD12	Q96CX2	1,625655174	0,18458378
35	CCT7	Q99832	1,603469213	0,182873184

(Tablo 14 devamı)

36	**HRG**	**P04196**	**1,599736373**	**NaN**
37	SOD1	P00441	1,595288595	0,201869975
38	ATP2A2	P16615	1,588392893	0,231433507
39	EVL	Q9UI08	1,556522051	0,309768778
40	RPLP1	P05386	1,556187312	0,402629829
41	VAMP8	B8ZZT4	1,554202875	0,430470507
42	RPLP0	P05388	1,543101629	0,123382347
43	MYL9	P24844	1,54197216	0,827462761
44	DDX1	Q92499	1,539306482	0,384635233
45	RPL19	J3QR09	1,533530235	0,394099682
46	APOB	P04114	1,515084108	0,149029611
47	EEF2	P13639	1,512888749	0,271061162
48	GCLC	A0A0C4DGB2	1,505504131	NaN
49	HP	P00738	-1,504974047	0,311736606
50	PSMA5	P28066	-1,587223212	0,29522715
51	CALM2	P0DP25	-1,618928909	0,210989456
52	CTSG	P08311	-1,712921937	0,465045741
53	GLIPR2	Q9H4G4	-1,800264517	0,162128627
54	MDH2	P40926	-1,853552341	0,254842293
55	ANXA3	P12429	-1,870577017	0,475749172
56	AHSP	Q9NZD4	-1,896927198	0,068426401
57	MMP9	P14780	-1,90286843	0,528804644
58	NME1	P15531	-1,920373281	0,120182402
59	CYBB	P04839	-1,977801164	0,127660648
60	MPO	P05164	-2,036226432	0,311138875
61	APMAP	H0Y512	-2,208143711	0,088934958
62	COTL1	Q14019	-2,229561011	0,15588092
63	HLA-A	Q53Z42	-2,291635513	0,001136547
64	AZU1	P20160	-2,57705609	0,07481165
65	HNRNPD	D6RAF8	-2,662459215	0,051690649
66	ACTB	A0A2R8YEA7	-2,923916658	0,011217366
67	TMSB4X	P62328	-3,115455151	0,264294398
68	PRTN3	U3KPS2	-3,275491238	0,05835234
69	TUBB4B;TUBB4A	P68371	-3,44322602	0,009138353



Şekil 14. Tedaviye duyarlı ve dirençli hastaların logfold (LFC2)(R/S) > -1.5 olan proteinlerin arasındaki ilişki (STRING v12.0 ile hazırlanmıştır).[325]



Şekil 15. Tedaviye duyarlı ve dirençli hastaların logfold (LFC2)(R/S)> 1,5 olan proteinler arasındaki ilişki. [325]

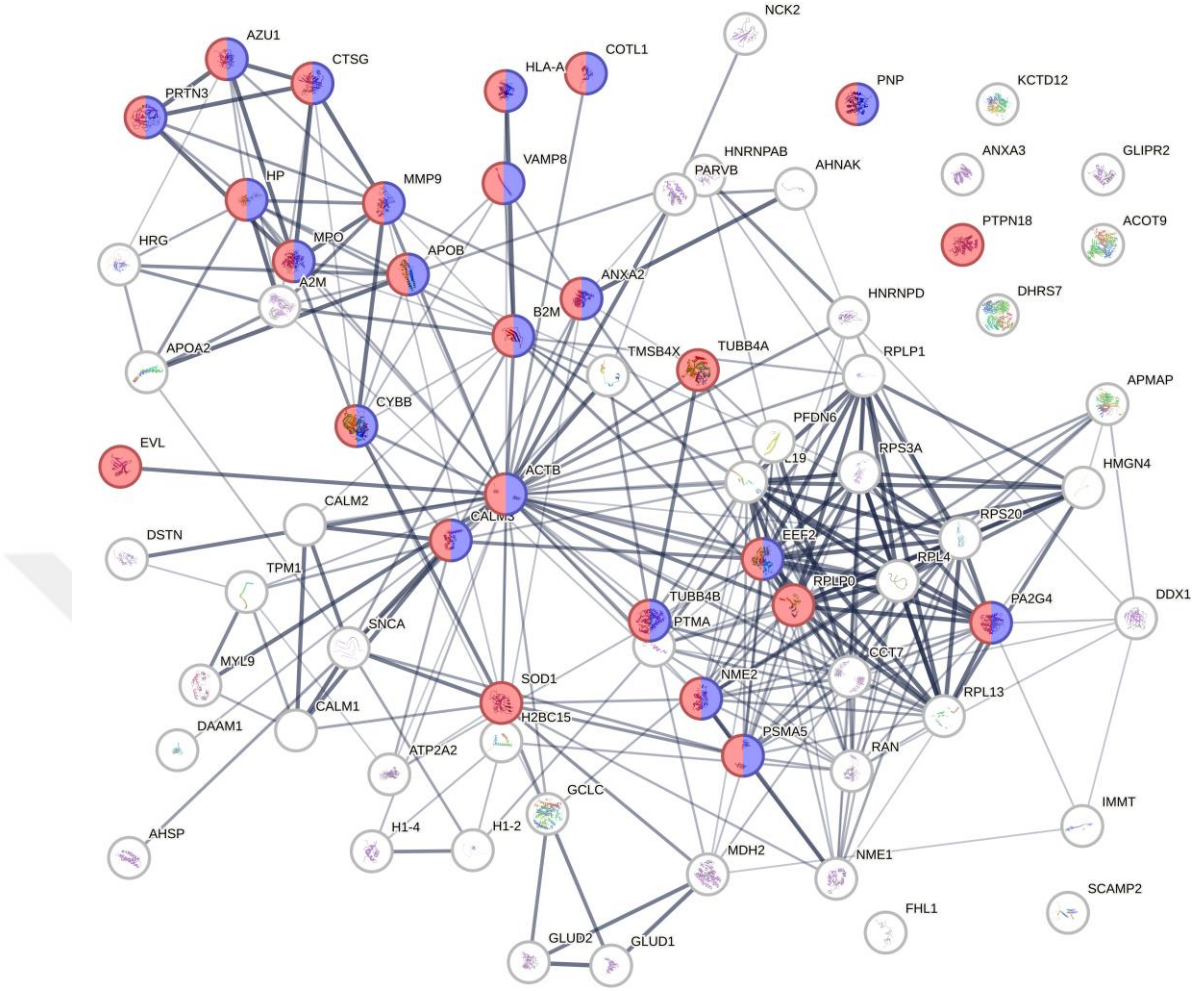
Yapılan STRING analizlerinde artan ve azalan proteinleri kodlayan genlerin ilişkili olduğu yolaklar, hücresel yolak analizlerini literatüre göre sınıflama ve ilişkili diğer gen ve proteinleri saptama amaçlı analiz eden Reactome adı verilen veritabanı ile karşılaştırıldığında Tablo 15'te görüldüğü 39 farklı hücresel yolağı etkileme potansiyeli olduğu görüldü.

Tablo 15. STRING analizlerinde bulunan Reactome veritabanına göre Proteinlerin etkili olduğu yolakları gösteren tablo

Yolak adı	Bu araştırmada Yolakla İlişkili bulunan proteinlerin sayısı	Bu proteinlerle bu yolakta görev yaptığı belirlenmiş ve etkilenme potansiyeli bulunan proteinler	Analizin gücü	FDR (false discovery rate)
Neutrophil degranulation	15	476	1.0	5.00e-08
Peptide chain elongation	7	88	1.4	1.84e-05
Innate Immune System	17	1041	0.72	1.84e-05
Signaling by ROBO receptors	9	215	1.12	1.84e-05
Axon guidance	12	551	0.84	5.71e-05
Influenza Infection	7	155	1.16	0.00014
Viral mRNA Translation	6	88	1.34	0.00014
Cellular responses to stress	13	747	0.74	0.00014
Selenocysteine synthesis	6	92	1.32	0.00014
Eukaryotic Translation Termination	6	92	1.32	0.00014
Nonsense Mediated Decay (NMD) independent of the Exon Junction Complex (EJC)	6	94	1.31	0.00014
Formation of a pool of free 40S subunits	6	100	1.28	0.00015
Response of EIF2AK4 (GCN2) to amino acid deficiency	6	100	1.28	0.00015
Regulation of expression of SLITs and ROBOs	7	169	1.12	0.00017
L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	6	110	1.24	0.00020
Immune System	20	1979	0.51	0.00020
SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	6	110	1.24	0.00020
GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit	6	111	1.23	0.00020

(Tablo 15 devamı)

Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC)	6	114	1.22	0.00021
Infectious disease	13	917	0.65	0.00042
Antigen processing-Cross presentation	5	105	1.18	0.0019
Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol	6	181	1.02	0.0019
Plasma lipoprotein assembly	3	19	1.7	0.0029
Metabolism of proteins	17	1917	0.45	0.0042
Metabolism of RNA	10	705	0.65	0.0044
Prefoldin mediated transfer of substrate to CCT/TriC	3	27	1.55	0.0068
Metabolism of amino acids and derivatives	7	368	0.78	0.0096
ER-Phagosome pathway	4	89	1.15	0.0113
Disease	15	1702	0.45	0.0113
EPH-Ephrin signaling	4	92	1.14	0.0122
Hemostasis	8	607	0.62	0.0318
Nef mediated downregulation of MHC class I complex cell surface expression	2	10	1.8	0.0318
Folding of actin by CCT/TriC	2	10	1.8	0.0318
Chylomicron assembly	2	10	1.8	0.0318
Chylomicron remodeling	2	10	1.8	0.0318
Platelet degranulation	4	126	1.0	0.0337
Endosomal/Vacuolar pathway	2	11	1.76	0.0337
Host Interactions of HIV factors	4	129	0.99	0.0355
Apoptosis induced DNA fragmentation	2	13	1.69	0.0419



Şekil 16. Tüm hastalarda (LFC2)(R/S) > 1,5 ve <-1.5 olarak tespit edilen proteinlerden mavi ile işaretlenmiş proteinler edinsel immün sistemle ilişkilendirilmiş proteinler, kırmızı ile işaretli olanlar genel immün sistemle ilişkili proteinlerdir. Yarısı kırmızı yarısı mavi olanlar hem doğal hem genel immünitede rol aldığı gösterilmiş proteinleri işaretlemiştir.

5. TARTIŞMA

Bu araştırmada biyolojik tedavi başlanan ağır astımlı hastalardan, başlanan tedaviye duyarlı ve dirençli olanlarda mononükleer hücrelerin proteomik profillerinin birbirinden farklılık gösterdiği belirlenmiş ve araştırma hipotezi desteklenmiştir. Araştırma bulgularına göre tedaviye direnç gösteren hastalarda duyarlılara göre anlamlı kabul edilebilecek düzeyde artan veya azalan 69 farklı protein tespit edilmiştir.

Anlamlı düzeyde artış ve azalış gösteren proteinler ile ilgili yolaklar incelendiğinde Reactome analizlerine göre 39 farklı yolağın tedavi direncinde rol alabilme potansiyeli olduğu görülmüştür. Bu yolaklardan özellikle nötrofil degranülasyonu, doğuştan/kalıtsal immün sistem, strese hücresel yanıt ve immün sistem ilişkili olanlar astım seyri ve tedaviye yanıtın düzenlenmesi açısından dikkati çekmektedir.

Tüm proteinler değerlendirildiğinde nötrofil degranülasyonu yolağında etkili olan 18 protein tespit edilmiştir (AZU1, CTSG, PRTN3, HP, MPO, MMP9, CYBB, HLA-A, VAMP8, COTL1, ANXA2, PNP, TUBB4B, NME2, PSMA5, EEF2, PA2G4 B2M) Doğuştan/ kalıtsal immün sistem yolağında etkin 21 protein tespit edilmiştir, immün sistem üzerine 26 protein tespit edilmiştir.

Proteinlerle ilgili literatür taramasında daha önce astım patogenizinde bilinen proteinler tespit edilmiş olup yeni proteinlerle ilgili sonuçlar elde edilmiştir ve literatürden taranmıştır.

Dirençli hastalarda artmış proteinlerden biri olan FHL-1(Four and half LIM domain protein1) geni X kromozomunda kodlanmaktadır. Literatürde SLIM1 olarak da isimlendirilmektedir. Hücre içinde sitoplazmada, nükleusta ve plazma membranında gözlenmiştir. Literatürde incelendiğinde hücre diferansiasyonunda, kas gelişiminde, hücre büyümesinde negatif regülasyonda, mitozda G_1/S ve G_2/M geçiş kontrolünde negatif regülasyonda, potasyum transportunu arttırdığı, membran depolarizasyonunda ve potasyum transmembran geçişinin düzenlenmesinde görev aldığı gözlenmiştir. Literatür taramasında FHL-1 ile ilişkilendirilen bazı hastalıklar vardır. Bunlar X ilişkili Skapuloperoneal miyopati, X ilişkili Emery-Dreifuss müsküler distrofi, X ilişkili erken başlangıçlı ve çocukluk çağında başlayan miyopati, Uruguay

fasiyokardiyomüsküloskeletal sendromu, X ilişkili postüral musküler atrofi ile giden miyopatidir.

FHL-1 proteini pulmoner arter düz kası proliferasyonunun inhibisyonu ile karakterizedir.[326,327] FHL1 izoformu KyoT2 astım tedavisinde hava yolu remodellinginin engellenmesi için potansiyel bir hedeftir.[328] FHL1 birçok hücresel mekanizma ile etki göstermektedir bunlar östrojen ilişkili[329] Notch-[330] ve MAPK ilişkilidir.[331] MAPK yolağının aktivasyonunun astım hastalarında inflamatuar süreçle ilişkili olduğu gözlenmiştir.[332] Farelerle yapılan çalışmalarda FHL1 proteini astım ile ilişkili izlenmiş ve astımlı farelerde FHL1 ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada FHL1 ekspresyonun arttığı farelerde IL-4, IL-5, IL-13 ve IFN'un bronkoalveolar lavajda anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir. FHL1 geninin susturulması ile hava yolu düz kas hücrelerinin apoptozisinin indüklendiği izlenmiştir.[333] Kronik obstrüktif akciğer hastalarında 16'sı kontrol 33 hastada yapılan proteomik çalışmalarda FHL1 en belirgin regülasyonu artmış gen olarak izlenmiştir. Potansiyel bir tedavi hedefi olarak önerilmiştir.[334] FHL1 gen seviyesi sigara içen hastalarda akciğer fonksiyonları ile pozitif korele izlenmiştir.[328] Sigara kullanan, hipoksi ile tetiklenmiş pulmoner hipertansiyon hastalarında FHL1 gen seviyelerinin ekspresyonun arttığı gözlenmiştir.[327,328]

Tedaviye dirençli hastalarda artmış izlenen ANXA2 proteini 15. Kromozomda kodlanmakta olup anneksin A2 kalsiyum ile düzenlenen membran proteinidir. İki kalsiyuma yüksek afinite ile bağlanır ve ısı stresi mekanizmasında, IL-2 ve IL-12, G-CSF ve INF sinyalizasyonunda rol oynar.[335] Antifosfolipid sendromu, akut promiyelositik lösemi, yeni doğanın dissemine intravasküler koagülasyon[335], adenomiyozis, pankreas kanseri ile ilişkili bulunmuştur. ANXA2 ile yapılan hücre kültürü çalışmasında, ANXA2 sIgA'nın bir belirteci olarak gözlenmiştir. sIgA stimülasyonu ile hava yolu epitelinde üretilen IL-8/CXCL8 ve CCL2/MCP-1 inflamatuar sitokinlerin üretimini arttırdığı izlenmiştir.[336] Bir başka çalışmada prokoagülan FXa'nın hava yolu düz kas hücrelerinde hiperplaziye yol açtığı ve sitokin salınımını arttırdığı gözlenmiştir. FXa'nın bu fonksiyonlarını Annexin A2(ANXA2) ve PAR-1 aracılığıyla yaptığı izlenmiştir.[337]

Tedaviye dirençli hastalarda artmış izlenen VAMP8 (Vezikül ilişkili membran proteini 8) proteini 2. Kromozomda kodlanmakta olup endobrevin olarak da

isimlendirilmektedir. VAMP8 bir v-SNARE(veziküllerde bulunan ve diğer veziküllere bağlanmayı sağlayan proteinler)'dir. VAMP8 aynı zamanda mast hücrelerinden histamin granüllerinin salınmasını ve yaralanma sonrasında trombüsteki plateletlerden a-granüllerin salınmasını düzenler. İnsan bronş epitel hücre kültürü ile yapılan çalışmalarda VAMP8 goblet hücrelerindeki mucin granüllerinde yerleşmiştir. Calu-3 hücre kültüründe yapılan çalışmalarda VAMP ailesinde en fazla eksprese olan genin, dominant v-SNARE'in VAMP8 olduğu izlenmiştir. VAMP8'in susturulduğu farelerde mukus üretiminin azaldığı izlenmiştir.[338] VAMP8 geninin de içinde bulunduğu SNARE'leri baskılamak için SP9(sabitlenmiş protein) isimli bir protein geliştirmiştir ve terapötik etki sağlayabileceği öngörülmüştür.[339]

Tedaviye direnç gösteren hastalarda SOD1 (Süperoksit Dismutaz 1) proteini artmış bulunmuştur. SOD1 proteinini kodlayan gen, 21. kromozomda kodlanan olarak da adlandırılmaktadır. Hücre metabolizması sırasında oluşan radikalleri redükte eder. Literatürde amniyotrofik lateral skleroz, motor nöron hastalıklarıyla olan ilişkili bulunmuştur. İmmün sistemdeki fonksiyonları incelendiğinde membran atak komplesinde C9'un fonksiyonel düzenlenmesinde, reaktif oksijen radikallerinin indirgenmesinde, IL-12 ailesi sinyalizasyonunda, INF sinyalizasyonunda görev aldığı izlenmiştir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda PM2.5(ince partiküllü maddeler) seviyesinin hava yolu direncini arttırdığı, akciğerde inflamatuar yanıtı arttırdığı izlenmiştir. PM 2.5 farelerin akciğer dokusunda CAT(katalaz), GSH (glutatyon), GSH-Px(glutatyon peroksidaz) ve T-SOD(total süperoksit dismutaz) gibi antioksidan enzimlerin seviyesini azaltarak serbest oksijen radikallerinin sayısının arttığı izlenmiştir. PM2.5'un mİR-206 ekspresyonunu arttırarak SOD1 ekspresyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir.[340] Bir başka hücre kültürü çalışmasında artmış PM2.5 teması hücre içi reaktif oksijen radikallerini arttırdığı, hücre içi Ca^{+2} seviyesini arttırdığı ve artmış Ca^{+2} nedeniyle apoptozisi tetiklediği, MMP seviyelerini azalttığı gözlenmiştir.[341]

Bu araştırmada dirençli hastalar değerlendirildiğinde ifadesi değişen proteinlerin ortak olarak nötrofil degranülasyonu, kalıtsal ve edinsel immünite patogenezinde rol aldığını görülmektedir. FHL1, ANXA2, VAMP8 ile ilgili önceki literatür taramamızda özellikle FHL1 ve ANXA2'nin inflamatuar süreç ve bronş düz kas hipertrofisi ile ilişkili olduğunu gözledik. VAMP8 ile yapılan hayvan çalışmalarında goblet hiperplazisi yaptığı ve buna bağlı olarak mukus hipersekresyonu yaptığını gözledik.

Astım patogenezinde hastalığın ilerleyen aşamalarında izlenen patolojik bulgulara neden olabileceğini düşündüğümüz proteinleri tespit etmiş olduk. Bu genlerin ekspresyonu fazla tespit edilen hastalarda tedaviye direnç olduğunu da gözlemlemiş olduk.

Ayrıca tedaviye dirençli hastaların proteinleri incelendiğinde dirençli hastalarda gözlenen SOD1 proteinine özellikle antioksidan görevi nedeniyle dikkat çekmek istedik. SOD1 antioksidan özelliği hücre metabolizmasının devamı ve apoptozisten korunmak için önemli bir yer tutar fakat hayvan deneylerinde PM2.5 arttıkça fonksiyonunun azaldığını izlemlenmiştir. Dünya genelinde artan karbon emisyonu, fosil yakıt kullanımı iklim krizine öncülük etmektedir. Artan tüketim dolayısıyla şehrimizde 2021 tarihinden sonra kış aylarında PM2.5 oranlarının belirgin bir şekilde arttığını gözlemledik. SOD1 proteininin özellikle tedaviye dirençli hastalarda artmış olması, hastalığın tedavi edilmesi ve kontrol altına alınabilmesi için farmakolojik tedaviler dışında çevre kirliliğinin de kontrol altına alınması gerektiğini göstermektedir.

Tedaviye duyarlı hastalarda artmış gözlenen ACTB(Beta aktin) proteini A0A2R8YEA7 proteinini kodlamakta olup 7. Kromozomda kodlanmaktadır. Beta aktinin fonksiyonları incelendiğinde hücre motilitesinde ve kontraksiyonunda[342], hasarlı DNA dokusunun onarımında rol oynar ve dineinin motor aktivitesini aktive eder.[342] ACTB geni Baraitser-Winter sendromu tip 1 ve distoni sağırlık sendromu ile ilişkili bulunmuştur.

9 hasta ile yapılan çalışmada obez ve astımlı hastalarda ACTB geninin ekspresyonunun arttığı görülmüştür.[343] KOAH, astım, idiopatik pulmoner fibrozis(IPF) ile yapılan bir meta analizde KOAH'da 6348 genin, astımda 1597 genin, IPF'de 5272 genin ekspresyonunun arttığı ve/veya azaldığı gözlenmiştir. Tüm hasta grupları incelendiğinde 22 ortak genin arttığı ya da azaldığı izlenmiştir. ACTB geniyle ilgili yapılan analizlerde KOAH hastalarında 11 çalışmada protein artmış, 6 çalışmada protein azalmış izlenmiştir. Astım hastalarında 2 çalışmada protein artmış, 5 çalışmada protein azalmış, İPF hastalarında yapılan 8 çalışmada protein artmış, 3 çalışmada protein azalmış izlenmiştir.[344])

Tedaviye duyarlı hastalarda gözlenen MMP9(matriks metalloproteinaz 9) proteini 20. kromozomda kodlanmaktadır. Ekstraselüler matriksin lokal proteolizinde ve lökosit migrasyonunda, tip 4 ve tip 5 kollajenin C terminal ucundan bölünmesinde rol

oynamaktadır.[345] Metafizyel anadispilazi tip 1 ve tip 2 ile ilişkili bulunmuştur. Astım hastalarında balgam ve serumda yapılan proteomik analizlerde nötrofilik hastalarda serumda MMP9 seviyeleri artmış olarak izlenmiştir.[346]

Astımlı ve alerjisi olan hastaların BAL sıvısında MMP9 seviyeleri artmıştır.[347] Artmış MMP-9 seviyeleri BAL'da artmış nötrofil ve makrofajlarla ilişkili bulunmuştur.[348] Ağır astım hastalarında omalizumab ile yapılan çalışmalarda tedavi sonrasında matriks metalloproteinazların BAL'da konsantrasyonları azalmış olarak izlenmiştir, 12 aylık takip sonrasında özellikle MMP-2, MMP-3, MMP-9 seviyeleri azalmış gözlenmiştir ayrıca retiküler bazal membran kalınlığının azaldığı izlenmiştir.[349] MMP-9 seviyeleri ağır astımda[350] ve astım alevlenmesinde artmış olarak izlenmiştir.[351]

Tedaviye duyarlı hastalarda artmış gözlenen NME2(nükleozid difosfataz kinaz B) proteini 17. kromozomda kodlanmaktadır. ATP dışında nükleozid trifosfatların sentezinde, histidin protein kinaz aktivitesinde önemli rol oynar. Kistik fibrozis proteini ile birlikte yerleşmiştir ve hava yolu epitelinde ATP üretiminde rol oynar.[352] Endometrium kanseri, nemaline myopati 2, nazofaringeal karsinom ve Burkitt lenfomayla ilişkili bulunmuştur.

Astım hastalarının balgam örneklerinde yapılan çalışmalarda NME1 ve NME2 yalnızca kontrol altındaki astım hastalarının balgamında izlenmiştir.[353] Yapılan çalışmlarda NME1 ve NME2, CFTR geni ile etkileşime girerek iyon transportunu düzenlemektedir.[354] Timik stromal lenfopoietin ile yapılan çalışmalarda NME1 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı izlenmiştir.

Tedaviye duyarlı hastalarda ön plana çıkan genler incelendiğinde genellikle biyolojik ajan tedavileri ile proteinlerin ekspresyonun azaldığı ve beraberinde astım patogenezinde rol oynayan inflamatuar hücrelerin azaldığı izlendi. Tedaviye duyarlı hastalarda literatürde en fazla MMP9 ile yayın izlenmiştir. Hayvan çalışmalarında MMP9 seviyeleri ve inflamatuvar hücre sayısının omalizumab tedavisinden sonra düştüğü izlenmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer olarak MMP9 seviyesi yüksek olan ve biyolojik tedavi alan hastaların 1 yıllık kontrolünde astım alevlenmesi yaşamadığı astım kontrol testlerindeki puanlarının yükseldiği gözlenmiştir. Bu durum çoğu çalışma ile ağır astım patogenezinde rolü olduğu belirtilen MMP9 seviyelerinin yüksekliği ile başlanan biyolojik tedaviden görülen fayda arasında pozitif bir ilişki olduğunu düşündürmektedir.

Araştırmaya dahil edilen hasta sayıları 6 Şubat 2023 tarihli Kahramanmaraş merkezli depremler nedeniyle planlanandan az olmuştur ve tek merkezden yürütülmüştür. Deprem nedeniyle hastalarımızda can kaybı yaşanmamıştır. Çalışmamız ağır astımda kullanılan biyolojik tedaviye dirençli ve duyarlı hasta gruplarında yapılan ilk proteomik çalışmadır. Çalışmamızda anlamlı derecede artış ve azalma görülen proteinler birer biyobelirteç adayıdır. Bu proteinler ayrıca tedaviye duyarlılığı ve direnci ön görebilecek proteinler olup astım ile ilgili çalışmaları daha önceki literatür verilerinde saptanmamıştır.

Ağır astım hastalarında tedaviye yanıtı öngörmek için bir biyobelirteç keşfi için yapılan bu araştırmada bulunan proteinlerin tedaviye yanıtı öngörmekte kullanılabileceğini düşünülmektedir. Özellikle tedaviye dirençli hastalarda arttığı belirlenen FHL1, ANXA2, VAMP8, ve azalan ACTB, MMP9, NME1, NME2 proteinlerinin biyobelirteç olarak kullanılabileceği ancak öngörülmekle birlikte, öncesinde bu proteinlerin geniş hasta populasyonunda test edilmesi gerektiği düşünülmüştür.

6. SONUÇLAR

Bu araştırma, ağır astımda biyolojik tedaviye duyarlı ve dirençli hasta grubunda yapılan ilk proteomik çalışmadır. Araştırma analizlerinde dirençli hastalarda 48, duyarlı hastalarda 21 olmak üzere toplam 69 proteini artmış olarak gözlemlenmiştir. Artış ve azalış gözlenen proteinlerin hücresel fonksiyonları incelendiğinde bulunan proteinlerin çoğunun kalıtsal ve edinsel immünite ve nötrofil degranülasyonu üzerine rol aldığı belirlenmiştir.

Ortak yolaklarda olan ve STRING verilerinde birbiriyle en çok ilişkilendirilen proteinler literatürdeincelendiğinde FHL1, ANXA2, VAMP8, ACTB, MMP9, NME1, NME2 proteinlerinin biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşünülmektedir. FHL1 ve ANXA2'nin özellikle remodellingi ön görebileceği, düz kas hipertrofisini gösterdiği literatür verileriyle kanıtlanmıştır. VAMP8'in goblet hiperplazisi yaparak sekresyon miktarını arttırdığını ve hastalık seyrini değiştirdiğini düşünmekteyiz. Özellikle dirençli hastalarda azalan dolayısı ile duyarlı hastalarda ifadesi artmış bulunan proteinlerin daha fazla hasta popülasyonlarıyla ileri bir çalışma yapılması gerekmektedir. Yapılan proteomik analizler sonucunda biyolojik ajanlarla tedavinin başarısının ön görülebileceği gözlenmiştir.

Bu araştırma sonucunda astım patogenezinde rol oynayan daha önceden bilinen ve yeni proteinler keşfedilmiştir. Bu proteinlerin bir kısmı hayvan deneylerinde hava yollarına ve akciğer parankimine olan etkileri incelenmekle birlikte bazılarının henüz araştırılmamış olduğu görülmektedir. Bu araştırma verileri, biyolojik tedavi duyarlılığında ifadesi anlamlı oranda değişen bu proteinlerin de patofizyolojik mekanizmasının aydınlatılması gerektiğini ortaya koymuş, ileri araştırmalar için önemli bir pencere açmıştır. Keşfedilen proteinlerin biyobelirteç olarak kullanılması, duyarlılık ve özgüllüğünün belirlenmesi için çok merkezli araştırmaların planlanması gerekmektedir.

KAYNAKÇA

1. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Published online **2023.**

2. **Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, et al.** Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*. **1996**;13:19-50. doi:10.1080/02648725.1996.10647923

3. *Asthma in the 21st Century*. Elsevier; **2023**. doi:10.1016/C2020-0-01800-1

4. **Mims JW.** Asthma: definitions and pathophysiology. *Int Forum Allergy Rhinol*. **2015**;5(S1):S2-S6. doi:10.1002/alr.21609

5. **To T, Stanojevic S, Moores G, et al.** Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health*. **2012**;12(1):204. doi:10.1186/1471-2458-12-204

6. National Center for Health Statistics. 2021 NHIS Adult Summary Health Statistics. U.S. Department of Health and Human Services.**2022**.

7. **Macdonald JB, Seaton A, Williams DA.** Asthma deaths in Cardiff 1963-74: 90 deaths outside hospital. *Br Med J*. 1976;1(6024):1493-1495.

8. **Wang Z, Li Y, Gao Y, et al.** Global, regional, and national burden of asthma and its attributable risk factors from 1990 to 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Respir Res*. **2023**;24(1):169. doi:10.1186/s12931-023-02475-6

9. **Ober C.** Perspectives on the past decade of asthma genetics. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(2):274-278. doi:10.1016/j.jaci.2005.04.039

10. Epidemiology of asthma: risk factors for development: Expert Review of Clinical Immunology: Vol 5, No 1. Accessed December 25, **2023**. https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/1744666X.5.1.77

11. **Hoffjan S, Ober C.** Present status on the genetic studies of asthma. *Curr Opin Immunol*. **2002**;14(6):709-717. doi:10.1016/S0952-7915(02)00393-X

12. **Liggett SB.** Genetics of β2-adrenergic receptor variants in asthma. *Clin Exp Allergy*. **1995**;25(s2):89-94. doi:10.1111/j.1365-2222.1995.tb00431.x

13. **Potter PC, Van Wyk L, Martin M, Lentes KU, Dowdle EB.** Genetic polymorphism of the β-2 adrenergic receptor in atopic and non-atopic subjects. *Clin Exp Allergy*. **1993**;23(10):874-877. doi:10.1111/j.1365-2222.1993.tb00267.x

14. **Martinez FD, Graves PE, Baldini M, Solomon S, Erickson R.** Association between genetic polymorphisms of the beta2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. *J Clin Invest*. **1997**;100(12):3184-3188. doi:10.1172/JCI119874

15. **Howard TD, Koppelman GH, Xu J, et al.** Gene-Gene Interaction in Asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch Population with Asthma. *Am J Hum Genet*. **2002**;70(1):230-236. doi:10.1086/338242

16. **Potaczek DP, Nishiyama C, Sanak M, Szczeklik A, Okumura K.** Genetic variability of the high-affinity IgE receptor α-subunit (FcεRIα). *Immunol Res*. **2009**;45(1):75-84. doi:10.1007/s12026-008-8042-0

17. **Wu X, Li Y, Chen Q, et al.** Association and Gene-Gene Interactions of Eight Common Single-Nucleotide Polymorphisms with Pediatric Asthma in Middle China. *J Asthma*. **2010**;47(3):238-244. doi:10.3109/02770900903509099

18. **Toskala E, Kennedy DW.** Asthma risk factors. *Int Forum Allergy Rhinol*. **2015**;5(S1):S11-S16. doi:10.1002/alr.21557

19. **Qiu J.** Epigenetics: Unfinished symphony. *Nature*. **2006**;441(7090):143-146.

20. Maternal Genistein Alters Coat Color and Protects Avy Mouse Offspring from Obesity by Modifying the Fetal Epigenome | Environmental Health Perspectives | Vol. 114, No. 4. Accessed December 25, **2023**. https://ehp.niehs.nih.gov/doi/full/10.1289/ehp.8700

21. **Waterland RA, Jirtle RL.** Transposable Elements: Targets for Early Nutritional Effects on Epigenetic Gene Regulation. *Mol Cell Biol*. **2003**;23(15):5293-5300. doi:10.1128/MCB.23.15.5293-5300.2003

22. **Saygideger Y, Özkan H, Baydar O, Yilmaz O.** Adulthood asthma as a consequence of childhood adversity: a systematic review of epigenetically affected genes. *J Dev Orig Health Dis*. **2022**;13(6):674-682. doi:10.1017/S2040174422000083

23. **Nicolai T, Pereszlenyiova-Bliznakova L, Illi S, Reinhardt D, Von Mutius E.** Longitudinal follow-up of the changing gender ratio in asthma from childhood to adulthood: role of delayed manifestation in girls. *Pediatr Allergy Immunol*. **2003**;14(4):280-283. doi:10.1034/j.1399-3038.2003.00047.x

24. **Bottema RWB, Reijmerink NE, Koppelman GH, Kerkhof M, Postma DS.** Phenotype Definition, Age, and Gender in the Genetics of Asthma and Atopy. *Immunol Allergy Clin*. **2005**;25(4):621-639. doi:10.1016/j.iac.2005.07.002

25. **Hunninghake GM, Lasky-Su J, Soto-Quirós ME, et al.** Sex-stratified Linkage Analysis Identifies a Female-specific Locus for IgE to Cockroach in Costa Ricans. *Am J Respir Crit Care Med*. **2008**;177(8):830-836. doi:10.1164/rccm.200711-1697OC

26. **Dijkstra A, Howard TD, Vonk JM, et al.** Estrogen receptor 1 polymorphisms are associated with airway hyperresponsiveness and lung function decline, particularly in female subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. **2006**;117(3):604-611. doi:10.1016/j.jaci.2005.11.023

27. **Weiss ST.** Obesity: insight into the origins of asthma. *Nat Immunol*. **2005**;6(6):537-539. doi:10.1038/ni0605-537

28. **Sutherland ER.** Linking obesity and asthma. *Ann N Y Acad Sci*. **2014**;1311(1):31-41. doi:10.1111/nyas.12357

29. Prospective Study of Body Mass Index, Weight Change, and Risk of Adult-onset Asthma in Women | Asthma | JAMA Internal Medicine | JAMA Network. Accessed December 25, **2023**. https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/article-abstract/485181

30. **Hancox RJ, Milne BJ, Poulton R, et al.** Sex Differences in the Relation between Body Mass Index and Asthma and Atopy in a Birth Cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(5):440-445. doi:10.1164/rccm.200405-623OC

31. Prenatal and childhood infections: implications for the development and treatment of childhood asthma - The Lancet Respiratory Medicine. Accessed December 25, **2023**. https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600(13)70145-0/fulltext

32. **Kieninger E, Fuchs O, Latzin P, Frey U, Regamey N.** Rhinovirus infections in infancy and early childhood. *Eur Respir J*. **2013**;41(2):443-452. doi:10.1183/09031936.00203511

33. Early identification of atopy in the prediction of persistent asthma in children - The Lancet. Accessed December 25, **2023**. https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140673608614518/fulltext

34. **Holt PG, Sly PD.** Viral infections and atopy in asthma pathogenesis: new rationales for asthma prevention and treatment. *Nat Med*. **2012**;18(5):726-735. doi:10.1038/nm.2768

35. **Holtzman MJ.** Asthma as a chronic disease of the innate and adaptive immune systems responding to viruses and allergens. *J Clin Invest*. **2012**;122(8):2741-2748. doi:10.1172/JCI60325

36. **Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, et al.** Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *The Lancet*. **1999**;354(9178):541-545. doi:10.1016/S0140-6736(98)10321-5

37. **Ege MJ, Mayer M, Normand AC, et al.** Exposure to Environmental Microorganisms and Childhood Asthma. *N Engl J Med*. **2011**;364(8):701-709. doi:10.1056/NEJMoa1007302

38. **Kalliomäki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E.** Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol*. **2001**;107(1):129-134. doi:10.1067/mai.2001.111237

39. **Huang YJ, Nelson CE, Brodie EL, et al.** Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol*. **2011**;127(2):372-381.e3. doi:10.1016/j.jaci.2010.10.048

40. **Willers SM, Devereux G, Craig LCA, et al.** Maternal food consumption during pregnancy and asthma, respiratory and atopic symptoms in 5-year-old children. *Thorax*. **2007**;62(9):773-779. doi:10.1136/thx.2006.074187

41. **Romieu I, Torrent M, Garcia-Esteban R, et al.** Maternal fish intake during pregnancy and atopy and asthma in infancy. *Clin Exp Allergy*. **2007**;37(4):518-525. doi:10.1111/j.1365-2222.2007.02685.x

42. **Mihrshahi S, Ampon R, Webb K, et al.** The association between infant feeding practices and subsequent atopy among children with a family history of asthma. *Clin Exp Allergy*. **2007**;37(5):671-679. doi:10.1111/j.1365-2222.2007.02696.x

43. **Litonjua AA, Rifas-Shiman SL, Ly NP, et al.** Maternal antioxidant intake in pregnancy and wheezing illnesses in children at 2 y of age. *Am J Clin Nutr*. **2006**;84(4):903-911. doi:10.1093/ajcn/84.4.903

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. *Am J Respir Crit Care Med*. **2005**;171(2):121-128. doi:10.1164/rccm.200402-220OC

45. **Garcia-Larsen V, Del Giacco SR, Moreira A, et al.** Asthma and dietary intake: an overview of systematic reviews. *Allergy*. **2016**;71(4):433-442. doi:10.1111/all.12800

46. **Antonucci R, Locci C, Clemente MG, Chicconi E, Antonucci L.** Vitamin D deficiency in childhood: old lessons and current challenges. *J Pediatr Endocrinol Metab*. **2018**;31(3):247-260. doi:10.1515/jpem-2017-0391

47. **Herrera G.** Vitamin D in Massive Doses as an Adjuvant to the Sulfones in the Treatment of Tuberculoid Leprosy. *Int J Lepr*. **1949**;17(1/2):35-42.

48. **Sly LM, Lopez M, Nauseef WM, Reiner NE.** 1α,25-Dihydroxyvitamin D3-induced Monocyte Antimycobacterial Activity Is Regulated by Phosphatidylinositol 3-Kinase and Mediated by the NADPH-dependent Phagocyte Oxidase *J Biol Chem*. **2001**;276(38):35482-35493. doi:10.1074/jbc.M102876200

49. **Shin DM, Yuk JM, Lee HM, et al.** Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signalling. *Cell Microbiol*. **2010**;12(11):1648-1665. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01497.x

50. **Tao C, Simpson S, Mei I van der, et al.** Higher latitude is significantly associated with an earlier age of disease onset in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. **2016**;87(12):1343-1349. doi:10.1136/jnnp-2016-314013

51. **Jelinek GA, Marck CH, Weiland TJ, Pereira N, van der Meer DM, Hadgkiss EJ.** Latitude, sun exposure and vitamin D supplementation: associations with quality of life and disease outcomes in a large international cohort of people with multiple sclerosis. *BMC Neurol*. **2015**;15(1):132. doi:10.1186/s12883-015-0394-1

52. **Mohr SB, Garland CF, Gorham ED, Garland FC.** The association between ultraviolet B irradiance, vitamin D status and incidence rates of type 1 diabetes in 51 regions worldwide. *Diabetologia*. **2008**;51(8):1391-1398. doi:10.1007/s00125-008-1061-5

53. **Szilagyi A, Leighton H, Burstein B, Xue X.** Latitude, sunshine, and human lactase phenotype distributions may contribute to geographic patterns of modern disease: the inflammatory bowel disease model. *Clin Epidemiol*. **2014**;6:183-198. doi:10.2147/CLEP.S59838

54. **Song GG, Bae SC, Lee YH.** Association between vitamin D intake and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin Rheumatol*. **2012**;31(12):1733-1739. doi:10.1007/s10067-012-2080-7

55. **Sarıoglu N, Yalcın AD, Sahin F, Soyyigit S, Tepetam FM, Erel F.** Does vitamin D deficiency in asthma affect clinical and functional parameters? A Turkish multicenter study. *Allergy Asthma Proc*. **2021**;42(5):e152-e158. doi:10.2500/aap.2021.42.210056

56. **Keet CA, McCormack MC, Peng RD, Matsui EC.** Age- and atopy-dependent effects of vitamin D on wheeze and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. **2011**;128(2):414-416.e5. doi:10.1016/j.jaci.2011.06.011

57. **Rosenberg SL, Miller GE, Brehm JM, Celedón JC.** Stress and asthma: Novel insights on genetic, epigenetic, and immunologic mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*. **2014**;134(5):1009-1015. doi:10.1016/j.jaci.2014.07.005

58. **Lazarus RS, Folkman S.** Stress, Appraisal and Coping. *Springer Publ Co NY USA*. Published online **1984**.

59. **Connett GJ.** Asthma, classical conditioning, and the autonomic nervous system - a hypothesis for why children wheeze. *Arch Dis Child*. Published online August 30, **2023**:archdischild-2023-325441. doi:10.1136/archdischild-2023-325441

60. **Kozyrskyj AL, Mai XM, McGrath P, HayGlass KT, Becker AB, MacNeil B.** Continued Exposure to Maternal Distress in Early Life Is Associated with an Increased Risk of Childhood Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. **2008**;177(2):142-147. doi:10.1164/rccm.200703-381OC

61. **Miller GE, Chen E.** Life stress and diminished expression of genes encoding glucocorticoid receptor and β2-adrenergic receptor in children with asthma. *Proc Natl Acad Sci*. **2006**;103(14):5496-5501. doi:10.1073/pnas.0506312103

62. **Baur X, Sigsgaard T, Aasen TB, et al.** Guidelines for the management of work-related asthma. *Eur Respir J*. **2012**;39(3):529-545. doi:10.1183/09031936.00096111

63. **Henneberger PK, Patel JR, Groene GJ de, et al.** Workplace interventions for treatment of occupational asthma. *Cochrane Database Syst Rev*. **2019**;(10). doi:10.1002/14651858.CD006308.pub4

64. **Sporık R, Holgate ST, Platts-Mılls Tae, Gogswell JJ.** Exposure to house-dust mite allergen (der p I) and the development of asthma in childhood : a prospective study. *Expo House-Dust Mite Allerg P Dev Asthma Child Prospect Study*. **1990**;323(8):502-507.

65. **Rosenstreıch DL, Eggleston P, Malveaux F, et al.** The role of cockroach allergy and exposure to cockroach allergen in causing morbidity among inner-city children with asthma. *Role Cockroach Allergy Expo Cockroach Allerg Causing Morb Inn-City Child Asthma*. **1997**;336(19):1356-1363.

66. **Uçan ES, Ergan B.** *İş ve Meslek Hastalıkları Kitabı*. Toraks Kitapları; **2022**.

67. **Cormier M, Lemière C.** Occupational asthma. *Int J Tuberc Lung Dis*. **2020**;24(1):8-21. doi:10.5588/ijtld.19.0301

68. **Vandenplas O, Godet J, Hurdubaea L, et al.** Are high- and low-molecular-weight sensitizing agents associated with different clinical phenotypes of occupational asthma? *Allergy*. **2019**;74(2):261-272. doi:10.1111/all.13542

69. **Dales R, Raizenne M.** Residential Exposure to Volatile Organic Compounds and Asthma. *J Asthma*. **2004**;41(3):259-270. doi:10.1081/JAS-120026082

70. **Hoppin JA, Ulmer R, London SJ.** Phthalate exposure and pulmonary function. *Environ Health Perspect*. **2004**;112(5):571-574. doi:10.1289/ehp.6564

71. **Oie L, Hersoug LG, Madsen JO.** Residential exposure to plasticizers and its possible role in the pathogenesis of asthma. *Environ Health Perspect*. **1997**;105(9):972-978. doi:10.1289/ehp.97105972

72. **Zock JP, Plana E, Jarvis D, et al.** The Use of Household Cleaning Sprays and Adult Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. **2007**;176(8):735-741. doi:10.1164/rccm.200612-1793OC

73. **Gauderman WJ.** Air Pollution and Children-An Unhealthy Mix. *N Engl J Med*. **2006**;355(1):78-79. doi:10.1056/NEJMe068096

74. **Brauer M, Hoek G, Smit HA, et al.** Air pollution and development of asthma, allergy and infections in a birth cohort. *Eur Respir J*. **2007**;29(5):879-888. doi:10.1183/09031936.00083406

75. **Rabe KF, Adachi M, Lai CKW, et al.** Worldwide severity and control of asthma in children and adults: the global asthma insights and reality surveys. *J Allergy Clin Immunol*. **2004**;114(1):40-47. doi:10.1016/j.jaci.2004.04.042

76. The Impact of Cigarette Smoking on Asthma: A Population-Based International Cohort Study | International Archives of Allergy and Immunology | Karger Publishers. Accessed December 25, **2023**. https://karger.com/iaa/article/158/2/175/161847/The-Impact-of-Cigarette-Smoking-on-Asthma-A

77. **Polosa R, Knoke JD, Russo C, et al.** Cigarette smoking is associated with a greater risk of incident asthma in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. **2008**;121(6):1428-1434. doi:10.1016/j.jaci.2008.02.041

78. **Burke H, Leonardi-Bee J, Hashim A, et al.** Prenatal and passive smoke exposure and incidence of asthma and wheeze: systematic review and meta-analysis. *Pediatrics*. **2012**;129(4):735-744.

79. **Patwa A, Shah A.** Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. *Indian J Anaesth*. **2015**;59(9):533-541. doi:10.4103/0019-5049.165849

80. **Amador C, Weber C, Varacallo M.** Anatomy, Thorax, Bronchial. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; **2023**. Accessed December 25, 2023. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537353/

81. **Liu MC, Hubbard WC, Proud D, et al.** Immediate and Late Inflammatory Responses to Ragweed Antigen Challenge of the Peripheral Airways in Allergic Asthmatics: Cellular, Mediator, and Permeability Changes. *Am Rev Respir Dis*. **1991**;144(1):51-58. doi:10.1164/ajrccm/144.1.51

82. **Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, et al.** Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest*. **1999**;103(6):779-788. doi:10.1172/JCI5909

83. **Doeing DC, Solway J.** Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. *J Appl Physiol*. **2013**;114(7):834-843. doi:10.1152/japplphysiol.00950.2012

84. **Chapman DG, Irvin CG.** Mechanisms of airway hyper-responsiveness in asthma: the past, present and yet to come. *Clin Exp Allergy*. **2015**;45(4):706-719. doi:10.1111/cea.12506

85. **Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I.** Pathology of asthma. *Front Microbiol*. 2013;4. Accessed December 25, **2023**. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2013.00263

86. **Limb SL, Brown KC, Wood RA, et al.** Irreversible lung function deficits in young adults with a history of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. **2005**;116(6):1213-1219. doi:10.1016/j.jaci.2005.09.024

87. https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=hsa05310&show_description=Show.

88. **Rayees S, Din I.** Inflammatory Cells Involved in Asthma. In: Rayees S, Din I, eds. *Asthma: Pathophysiology, Herbal and Modern Therapeutic Interventions*. SpringerBriefs in Immunology. Springer International Publishing; **2021**:13-16. doi:10.1007/978-3-030-70270-0_5

89. **Walsh G.** Novel Therapies for Asthma - Advances and Problems. *Curr Pharm Des*. **2005**;11(23):3027-3038. doi:10.2174/1381612054864984

90. **Blanchard C, Rothenberg ME.** Chapter 3 Biology of the Eosinophil. In: *Advances in Immunology*. Vol 101. Academic Press; **2009**:81-121. doi:10.1016/S0065-2776(08)01003-1

91. **Louahed J, Zhou Y, Maloy WL, et al.** Interleukin 9 promotes influx and local maturation of eosinophils. *Blood*. **2001**;97(4):1035-1042. doi:10.1182/blood.v97.4.1035

92. **Foresi A, Bertorelli G, Pesci A, Chetta A, Olivieri D.** Inflammatory Markers in Bronchoalveolar Lavage and in Bronchial Biopsy in Asthma during Remission. *Chest*. **1990**;98(3):528-535. doi:10.1378/chest.98.3.528

93. **Liu MC, Bleecker ER, Lichtenstein LM, et al.** Evidence for Elevated Levels of Histamine, Prostaglandin D2, and Other Bronchoconstricting Prostaglandins in the Airways of Subjects with Mild Asthma. *Am Rev Respir Dis*. **1990**;142(1):126-132. doi:10.1164/ajrccm/142.1.126

94. **Ädelroth E, Rosenhall L, Johansson SÅ, Linden M, Venge P.** Inflammatory Cells and Eosinophilic Activity in Asthmatics Investigated by Bronchoalveolar Lavage: The Effects of Antiasthmatic Treatment with Budesonide or Terbutaline. *Am Rev Respir Dis*. **1990**;142(1):91-99. doi:10.1164/ajrccm/142.1.91

95. **Wenzel SE, Fowler AA, Schwartz LB.** Activation of Pulmonary Mast Cells by Bronchoalveolar Allergen Challenge: In Vivo Release of Histamine and Tryptase in Atopic Subjects with and without Asthma. *Am Rev Respir Dis*. **1988**;137(5):1002-1008. doi:10.1164/ajrccm/137.5.1002

96. **Hamid Q, Tulic' MK, Liu MC, Moqbel R.** Inflammatory cells in asthma: Mechanisms and implications for therapy. *J Allergy Clin Immunol*. **2003**;111(1, Supplement):S5-S17. doi:10.1067/mai.2003.22

97. **Kimura I, Tanizaki Y, Saito K, Takahashi K, Ueda N, Sato S.** Appearance of basophils in the sputum of patients with bronchial asthma. *Clin Exp Allergy*. **1975**;5(1):95-98. doi:10.1111/j.1365-2222.1975.tb01840.x

98. **Koshıno T, Teshıma S, Fukushıma N, et al.** Identification of basophils by immunohistochemistry in the airways of post-mortem cases of fatal asthma. *Identif Basophils Immunohistochem Airw Post-Mortem Cases Fatal Asthma*. **1993**;23(11):919-925.

99. **MacGlashan D Jr, White JM, Huang SK, Ono SJ, Schroeder JT, Lichtenstein LM.** Secretion of IL-4 from human basophils. The relationship between IL-4 mRNA and protein in resting and stimulated basophils. *J Immunol*. **1994**;152(6):3006-3016. doi:10.4049/jimmunol.152.6.3006

100. **Liu MC, Proud D, Schleimer RP, Plaut M.** Human lung macrophages enhance and inhibit lymphocyte proliferation. *J Immunol*. **1984**;132(6):2895-2903. doi:10.4049/jimmunol.132.6.2895

101. Melewicz FM, Kline LE, Cohen AB, Spiegelberg HL. Characterization of Fc receptors for IgE on human alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol*. **1982**;49(2):364-370.

102. Williams J, Johnson S, Mascali JJ, Smith H, Rosenwasser LJ, Borish L. Regulation of low affinity IgE receptor (CD23) expression on mononuclear phagocytes in normal and asthmatic subjects. *J Immunol*. **1992**;149(8):2823-2829. doi:10.4049/jimmunol.149.8.2823

103. Schleich F, Brusselle G, Louis R, et al. Heterogeneity of phenotypes in severe asthmatics. The Belgian Severe Asthma Registry (BSAR). *Respir Med*. **2014**;108(12):1723-1732. doi:10.1016/j.rmed.2014.10.007

104. Nair P, Surette MG, Virchow JC. Neutrophilic asthma: misconception or misnomer? *Lancet Respir Med*. **2021**;9(5):441-443. doi:10.1016/S2213-2600(21)00023-0

105. Chung KF. Asthma phenotyping: a necessity for improved therapeutic precision and new targeted therapies. *J Intern Med*. **2016**;279(2):192-204. doi:10.1111/joim.12382

106. Marc-Malovrh M, Camlek L, Škrgat S, et al. Elevated eosinophils, IL5 and IL8 in induced sputum in asthma patients with accelerated FEV1 decline. *Respir Med*. **2020**;162:105875. doi:10.1016/j.rmed.2020.105875

107. Vazquez-Tello A, Semlali A, Chakir J, et al. Induction of glucocorticoid receptor-β expression in epithelial cells of asthmatic airways by T-helper type 17 cytokines. *Clin Exp Allergy*. **2010**;40(9):1312-1322. doi:10.1111/j.1365-2222.2010.03544.x

108. Larché M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. **2003**;111(3):450-463. doi:10.1067/mai.2003.169

109. Messi M, Giacchetto I, Nagata K, Lanzavecchia A, Natoli G, Sallusto F. Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human TH1 and TH2 lymphocytes. *Nat Immunol*. **2003**;4(1):78-86. doi:10.1038/ni872

110. Pereira C. *Asthma: Biological Evidences*. BoD – Books on Demand; **2019**.

111. Raible DG, Lenahan T, Fayvilevich Y, Kosinski R, Schulman ES. Pharmacologic characterization of a novel histamine receptor on human eosinophils. *Am J Respir Crit Care Med*. **1994**;149(6):1506-1511. doi:10.1164/ajrccm.149.6.8004306

112. Dupilumab in Persistent Asthma with Elevated Eosinophil Levels | NEJM. Accessed December 27, **2023**. https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1304048

113. Tsukioka K, Matsuzaki M, Nakamata M, Kayahara H, Nakagawa T. Increased plasma level of platelet-activating factor (PAF) and decreased serum PAF acetylhydrolase (PAFAH) activity in adults with bronchial asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. **1996**;6(1):22-29.

114. Saroea HG, Inman MD, O'Byrne PM. U46619-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects is mediated by acetylcholine release. *Am J Respir Crit Care Med*. **1995**;151(2):321-324. doi:10.1164/ajrccm.151.2.7842185

115. Chung, Kian Fan, Barnes PJ. Cytokines in Asthma. *Thorax*. 199AD;(54):825-857.

116. Barnes PJ. Intrinsic asthma: not so different from allergic asthma but driven by superantigens? *Clin Exp Allergy*. **2009**;39(8):1145-1151. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03298.x

117. Ying S, Meng Q, Zeibecoglou K, et al. Eosinophil Chemotactic Chemokines (Eotaxin, Eotaxin-2, RANTES, Monocyte Chemoattractant Protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C Chemokine Receptor 3 Expression in Bronchial Biopsies from Atopic and Nonatopic (Intrinsic) Asthmatics1. *J Immunol*. **1999**;163(11):6321-6329. doi:10.4049/jimmunol.163.11.6321

118. Kharitonov S a., Barnes P j. Clinical aspects of exhaled nitric oxide. *Eur Respir J*. **2000**;16(4):781-792. doi:10.1034/j.1399-3003.2000.16d32.x

119. Saleh D, Ernst P, Lim S, Barnes PJ, Giaid A. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J*. **1998**;12(11):929-937. doi:10.1096/fasebj.12.11.929

120. Spina D. Epithelium Smooth Muscle Regulation and Interactions. *Am J Respir Crit Care Med*. **1998**;158(supplement_2):S141-S145. doi:10.1164/ajrccm.158.supplement_2.13tac100a

121. Crystal RG, Randell SH, Engelhardt JF, Voynow J, Sunday ME. Airway Epithelial Cells. *Proc Am Thorac Soc*. **2008**;5(7):772-777. doi:10.1513/pats.200805-041HR

122. Harkema JR, Marıassy A, George JS, Hyde DM, Plopper CG. Epithelial cells of the conducting airways : a species comparison. *Epithel Cells Conduct Airw Species Comp*. **1991**;55:3-39.

123. Jeffery PK. Morphologic Features of Airway Surface Epithelial Cells and Glands. *Am Rev Respir Dis*. **1983**;128(2P2):S14-S20. doi:10.1164/arrd.1983.128.2P2.S14

124. Ayers MM, Jeffery PK. Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium. *Eur Respir J*. **1988**;1(1):58-80. doi:10.1183/09031936.93.01010058

125. Lumsden AB, McLean A, Lamb D. Goblet and Clara cells of human distal airways: evidence for smoking induced changes in their numbers. *Thorax*. **1984**;39(11):844-849.

126. Rogers AV, Dewar A, Corrin B, Jeffery PK. Identification of serous-like cells in the surface epithelium of human bronchioles. *Eur Respir J*. **1993**;6(4):498-504. doi:10.1183/09031936.93.06040498

127. Evans MJ, Plopper CG. The Role of Basal Cells in Adhesion of Columnar Epithelium to Airway Basement Membrane. *Am Rev Respir Dis*. **1988**;138(2):481-483. doi:10.1164/ajrccm/138.2.481

128. Evans MJ, Cox RA, Shami SG, Plopper CG. Junctional adhesion mechanisms in airway basal cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **1990**;3(4):341-347. doi:10.1165/ajrcmb/3.4.341

129. Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med*. **1998**;157(6 Pt 1):2000-2006. doi:10.1164/ajrccm.157.6.9707011

130. De Water R, Willems LN, Van Muijen GN, et al. Ultrastructural localization of bronchial antileukoprotease in central and peripheral human airways by a gold-labeling technique using monoclonal antibodies. *Am Rev Respir Dis*. **1986**;133(5):882-890.

131. Boers JE, den Brok JL, Koudstaal J, Arends JW, Thunnissen FB. Number and proliferation of neuroendocrine cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med*. **1996**;154(3):758-763. doi:10.1164/ajrccm.154.3.8810616

132. Mercer RR, Russell ML, Roggli VL, Crapo JD. Cell number and distribution in human and rat airways. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **1994**;10(6):613-624. doi:10.1165/ajrcmb.10.6.8003339

133. Weichselbaum M, Sparrow MP, Hamilton EJ, Thompson PJ, Knight DA. A confocal microscopic study of solitary pulmonary neuroendocrine cells in human airway epithelium. *Respir Res*. **2005**;6:115. doi:10.1186/1465-9921-6-115

134. Redington AE, Howarth PH. Airway wall remodelling in asthma. *Thorax*. **1997**;52(4):310-312.

135. Naylor B. The Shedding of the Mucosa of the Bronchial Tree in Asthma. *Thorax*. **1962**;17(1):69-72.

136. Wr R. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*. **1989**;1:520-524.

137. Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ. Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest*. **1999**;104(8):1001-1006. doi:10.1172/JCI8124

138. Carroll N, Elliot J, Morton A, James A. The Structure of Large and Small Airways in Nonfatal and Fatal Asthma. *Am Rev Respir Dis*. **1993**;147(2):405-410. doi:10.1164/ajrccm/147.2.405

139. Haraguchi M, Shimura S, Shirato K. Morphometric Analysis of Bronchial Cartilage in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Bronchial Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. **1999**;159(3):1005-1013. doi:10.1164/ajrccm.159.3.9712144

140. Li X, Wilson JW. Increased Vascularity of the Bronchial Mucosa in Mild Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. **1997**;156(1):229-233. doi:10.1164/ajrccm.156.1.9607066

141. Kroegel C, Jc V, Luttmann W, Walker C, Warner JA. Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I). *Eur Respir J*. **1994**;7(3):519-543. doi:10.1183/09031936.94.07030519

142. Laitinen LA, Heino M, Laitinen A, Kava T, Haahtela T. Damage of the Airway Epithelium and Bronchial Reactivity in Patients with Asthma. *Am Rev Respir Dis*. **1985**;131(4):599-606. doi:10.1164/arrd.1985.131.4.599

143. Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB. Bronchial Biopsies in Asthma: An Ultrastructural, Quantitative Study and Correlation with Hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*. **1989**;140(6):1745-1753. doi:10.1164/ajrccm/140.6.1745

144. Wilson JW, Li X. The measurement of reticular basement membrane and submucosal collagen in the asthmatic airway. *Clin Exp Allergy*. **1997**;27(4):363-371. doi:10.1111/j.1365-2222.1997.tb00720.x

145. Karjalainen EM, Lindqvist A, Laitinen LA, et al. Airway inflammation and basement membrane tenascin in newly diagnosed atopic and nonatopic asthma. *Respir Med*. **2003**;97(9):1045-1051. doi:10.1016/S0954-6111(03)00136-7

146. Lemjabbar H, Gosset P, Lamblin C, et al. Contribution of 92 kDa Gelatinase/Type IV Collagenase in Bronchial Inflammation during Status Asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med*. **1999**;159(4):1298-1307. doi:10.1164/ajrccm.159.4.9708080

147. Prikk K, Maisi P, Pirilä E, et al. Airway Obstruction Correlates with Collagenase-2 (MMP-8) Expression and Activation in Bronchial Asthma. *Lab Invest*. **2002**;82(11):1535-1545. doi:10.1097/01.LAB.0000035023.53893.B6

148. Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, et al. Sputum Metalloproteinase-9/Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Ratio Correlates with Airflow Obstruction in Asthma and Chronic Bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. **1998**;158(6):1945-1950. doi:10.1164/ajrccm.158.6.9803014

149. Cataldo DD, Bettiol J, Noe¨l A, Bartsch P, Foidart JM, Louis R. Matrix Metalloproteinase-9, but not Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1, Increases in the Sputum from Allergic Asthmatic Patients After Allergen Challenge. *Chest*. **2002**;122(5):1553-1559. doi:10.1378/chest.122.5.1553

150. Johnson C, Sung HJ, Lessner SM, Fini ME, Galis ZS. Matrix Metalloproteinase-9 Is Required for Adequate Angiogenic Revascularization of Ischemic Tissues. *Circ Res*. **2004**;94(2):262-268. doi:10.1161/01.res.0000111527.42357.62

151. Pra J. Role of human airway smooth muscle in altered extracellular matrix production in asthma. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. **2001**;28:233-236.

152. Jenkins HA, Cool C, Szefler SJ, et al. Histopathology of Severe Childhood Asthma: A Case Series. *Chest*. **2003**;124(1):32-41. doi:10.1378/chest.124.1.32

153. Tanaka H, Yamada G, Saikai T, et al. Increased Airway Vascularity in Newly Diagnosed Asthma Using a High-magnification Bronchovideoscope. *Am J Respir Crit Care Med*. **2003**;168(12):1495-1499. doi:10.1164/rccm.200306-727OC

154. Hoshino M, Takahashi M, Aoike N. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. **2001**;107(2):295-301. doi:10.1067/mai.2001.111928

155. Bergeron C, Al-Ramli W, Hamid Q. Remodeling in Asthma. *Proc Am Thorac Soc*. **2009**;6(3):301-305. doi:10.1513/pats.200808-089RM

156. Busse WW. Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med*. **2001**;(344):350-362.

157. Levy ML, Fletcher M, Price DB, Hausend T, Halbert RJ, Yawn BP. International Primary Care Respiratory Group (IPCRG) Guidelines: Diagnosis of respiratory diseases in primary care. *Prim Care Respir J*. **2006**;15(1):20-34. doi:10.1016/j.pcrj.2005.10.004

158. Gulfem E. Celik. *Astım Tanı ve Tedavi Rehberi **2020** Güncellemesi*. Torak Kitapları.

159. Jonathan A. Bernstein , Mark L. Levy. *Clinical Asthma Theory and Practice*. Crc Press.; **2014**.

160. Reddel H, Ware S, Marks G, Salome C, Jenkins C, Woolcock A. Differences between asthma exacerbations and poor asthma control. *The Lancet*. **1999**;353(9150):364-369. doi:10.1016/S0140-6736(98)06128-5

161. Reddel H, Marks G, Jenkins C. When can personal best peak flow be determined for asthma action plans? *Thorax*. **2004**;59(11):922-924. doi:10.1136/thx.2004.023077

162. Reddel HK. Peak flow monitoring in clinical practice and clinical asthma trials. *Curr Opin Pulm Med*. **2006**;12(1):75-81. doi:10.1097/01.mcp.0000198065.65704.08

163. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, et al. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J*. **2005**;26(5):948-968. doi:10.1183/09031936.05.00035205

164. Brand PL, Quanjer PH, Postma DS, et al. Interpretation of bronchodilator response in patients with obstructive airways disease. The Dutch Chronic Non-Specific Lung Disease (CNSLD) Study Group. *Thorax*. **1992**;47(6):429-436.

165. Quanjer PH, Ruppel GL, Langhammer A, et al. Bronchodilator Response in FVC Is Larger and More Relevant Than in FEV1 in Severe Airflow Obstruction. *CHEST*. **2017**;151(5):1088-1098. doi:10.1016/j.chest.2016.12.017

166. **Chen C, Jian W, Gao Y, Xie Y, Song Y, Zheng J.** Early COPD patients with lung hyperinflation associated with poorer lung function but better bronchodilator responsiveness. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. **2016**;11:2519-2526. doi:10.2147/COPD.S110021

167. **Jae Seung Lee, Huh JW, Lee JH, et al.** Response patterns to bronchodilator and quantitative computed tomography in chronic obstructive pulmonary disease. *Response Patterns Bronchodilator Quant Comput Tomogr Chronic Obstr Pulm Dis*. **2012**;32(1):12-18.

168. **Walker PP, Calverley PMA.** The Volumetric Response to Bronchodilators in Stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*. **2008**;5(3):147-152. doi:10.1080/15412550802092928

169. **Stanojevic S, Kaminsky DA, Miller MR, et al.** ERS/ATS technical standard on interpretive strategies for routine lung function tests. *Eur Respir J*. **2022**;60(1):2101499. doi:10.1183/13993003.01499-2021

170. **Cockcroft DW, Killian DN, Mellon JJA, Hargreave FE.** Bronchial reactivity to inhaled histamine: a method and clinical survey. *Clin Exp Allergy*. **1977**;7(3):235-243. doi:10.1111/j.1365-2222.1977.tb01448.x

171. **Juniper EF, Frith PA, Hargreave FE.** Airway responsiveness to histamine and methacholine: relationship to minimum treatment to control symptoms of asthma. *Thorax*. **1981**;36(8):575-579.

172. **Anderson SD, Daviskas E.** The mechanism of exercise-induced asthma is …. *J Allergy Clin Immunol*. **2000**;106(3):453-459. doi:10.1067/mai.2000.109822

173. **O'Byrne PM, Ryan G, Morris M, et al.** Asthma Induced by Cold Air and Its Relation to Nonspecific Bronchial Responsiveness to Methacholine. *Am Rev Respir Dis*. **1982**;125(3):281-285. doi:10.1164/arrd.1982.125.3.281

174. **Anderson SD, Charlton B, Weiler JM, et al.** Comparison of mannitol and methacholine to predict exercise-induced bronchoconstriction and a clinical diagnosis of asthma. *Respir Res*. **2009**;10(1):4. doi:10.1186/1465-9921-10-4

175. **Cartier A, Bernstein IL, Burge PS, et al.** Guidelines for bronchoprovocation on the investigation of occupational asthma: Report of the Subcommittee on Bronchoprovocation for Occupational Asthma. *J Allergy Clin Immunol*. **1989**;84(5, Part 2):823-829. doi:10.1016/0091-6749(89)90346-1

176. **van der Valk JPM, Gerth van Wijk R, Hoorn E, Groenendijk L, Groenendijk IM, de Jong NW.** Measurement and interpretation of skin prick test results. *Clin Transl Allergy*. **2016**;6(1):8. doi:10.1186/s13601-016-0092-0

177. **Korevaar DA, Westerhof GA, Wang J, et al.** Diagnostic accuracy of minimally invasive markers for detection of airway eosinophilia in asthma: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med*. **2015**;3(4):290-300. doi:10.1016/S2213-2600(15)00050-8

178. Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma-present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol*. **2015**;15(1):57-65. doi:10.1038/nri3786

179. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J*. **2014**;43(2):343-373. doi:10.1183/09031936.00202013

180. Jl S. Inflammatory subtypes in asthma : assessment and identification using induced sputum. *Respirology*. **2006**;11:54-61.

181. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, et al. Identification of Asthma Phenotypes Using Cluster Analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med*. **2010**;181(4):315-323. doi:10.1164/rccm.200906-0896OC

182. Stokes JR, Casale TB. Characterization of asthma endotypes: implications for therapy. *Ann Allergy Asthma Immunol*. **2016**;117(2):121-125. doi:10.1016/j.anai.2016.05.016

183. Skloot GS. Asthma phenotypes and endotypes: a personalized approach to treatment. *Curr Opin Pulm Med*. **2016**;22(1):3-9. doi:10.1097/MCP.0000000000000225

184. Braido F, Tiotiu A, Kowal K, Mihaicuta S, Novakova P, Oguzulgen IK. Phenotypes/endotypes-driven treatment in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. **2018**;18(3):184-189. doi:10.1097/ACI.0000000000000440

185. Gülşen A. Asthma Phenotypes and Current Biological Treatments. Published online **2021**.

186. Lötvall J, Akdis CA, Bacharier LB, et al. Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. **2011**;127(2):355-360. doi:10.1016/j.jaci.2010.11.037

187. Godar M, Blanchetot C, de Haard H, Lambrecht BN, Brusselle G. Personalized medicine with biologics for severe type 2 asthma: current status and future prospects. *mAbs*. **2018**;10(1):34-45. doi:10.1080/19420862.2017.1392425

188. Muñoz X, Cruz MJ, Bustamante V, Lopez-Campos JL, Barreiro E. Work-related asthma: diagnosis and prognosis of immunological occupational asthma and work-exacerbated asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. **2014**;24(6):396-405.

189. Ilmarinen P, Tuomisto LE, Kankaanranta H. Phenotypes, risk factors, and mechanisms of adult-onset asthma. *Mediators Inflamm*. **2015**.

190. Hirose M, Horiguchi T. Asthma phenotypes. *J Gen Fam Med*. **2017**;18(5):189-194. doi:10.1002/jgf2.7

191. Giesbrecht GG, Younes M. Exercise- and Cold-Induced Asthma. *Can J Appl Physiol*. **1995**;20(3):300-314. doi:10.1139/h95-023

192. Ohno I. Neuropsychiatry phenotype in asthma: Psychological stress-induced alterations of the neuroendocrine-immune system in allergic airway inflammation. *Allergol Int*. **2017**;66:S2-S8. doi:10.1016/j.alit.2017.06.005

193. Miranda C, Busacker A, Balzar S, Trudeau J, Wenzel SE. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. **2004**;113(1):101-108.

194. Pearce N, Douwes J, Beasley R. Is allergen exposure the major primary cause of asthma? *Thorax*. **2000**;55(5):424.

195. Fitzpatrick AM, Teague WG, Meyers DA, et al. Heterogeneity of severe asthma in childhood: confirmation by cluster analysis of children in the National Institutes of Health/National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol*. **2011**;127(2):382-389. e13.

196. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, et al. T-helper type 2–driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. **2009**;180(5):388-395.

197. Berry MA, Morgan A, Shaw DE, et al. Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma. *Thorax*. Published online **2007**.

198. Wu CY, Fargeas C, Nakajima T, Delespesse G. Glucocorticoids suppress the production of interleukin 4 by human lymphocytes. *Eur J Immunol*. **1991**;21(10):2645-2647.

199. van Veen IH, Ten Brinke A, Gauw SA, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. Consistency of sputum eosinophilia in difficult-to-treat asthma: a 5-year follow-up study. *J Allergy Clin Immunol*. **2009**;124(3):615-617. e2.

200. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*. **2008**;178(3):218-224.

201. Sideleva O, Suratt BT, Black KE, et al. Obesity and asthma: an inflammatory disease of adipose tissue not the airway. *Am J Respir Crit Care Med*. **2012**;186(7):598-605.

202. Huang F, del-Río-Navarro BE, Torres-Alcántara S, et al. Adipokines, asymmetrical dimethylarginine, and pulmonary function in adolescents with asthma and obesity. *J Asthma*. **2017**;54(2):153-161.

203. Holguin F, Bleecker ER, Busse WW, et al. Obesity and asthma: an association modified by age of asthma onset. *J Allergy Clin Immunol*. **2011**;127(6):1486-1493. e2.

204. Scott HA, Gibson PG, Garg ML, Wood LG. Airway inflammation is augmented by obesity and fatty acids in asthma. *Eur Respir J*. **2011**;38(3):594-602.

205. Kattan M, Kumar R, Bloomberg GR, et al. Asthma control, adiposity, and adipokines among inner-city adolescents. *J Allergy Clin Immunol*. **2010**;125(3):584-592.

206. Eising JB, Uiterwaal CS, Evelein AM, Visseren FL, van der Ent CK. Relationship between leptin and lung function in young healthy children. *Eur Respir J*. **2014**;43(4):1189-1192.

207. Suratt BT, Ubags ND, Rastogi D, et al. An official american thoracic society workshop report: obesity and metabolism. An emerging frontier in lung health and disease. *Ann Am Thorac Soc*. **2017**;14(6):1050-1059.

208. Agrawal A, Mabalirajan U, Ahmad T, Ghosh B. Emerging interface between metabolic syndrome and asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **2011**;44(3):270-275.

209. Forno E, Han YY, Muzumdar RH, Celedón JC. Insulin resistance, metabolic syndrome, and lung function in US adolescents with and without asthma. *J Allergy Clin Immunol*. **2015**;136(2):304-311. e8.

210. Samter M, Beers RF. Concerning the nature of intolerance to aspirin. *J Allergy*. **1967**;40(5):281-293. doi:10.1016/0021-8707(67)90076-7

211. Cowburn AS, Sladek K, Soja J, et al. Overexpression of leukotriene C4 synthase in bronchial biopsies from patients with aspirin-intolerant asthma. *J Clin Invest*. **1998**;101(4):834-846. doi:10.1172/JCI620

212. Choi JH, Park HS, Oh HB, et al. Leukotriene-related gene polymorphisms in ASA-intolerant asthma: an association with a haplotype of 5-lipoxygenase. *Hum Genet*. **2004**;114(4):337-344. doi:10.1007/s00439-004-1082-1

213. Szczeklik A. The cyclooxygenase theory of aspirin-induced asthma. *Eur Respir J*. **1990**;3(5):588-593. doi:10.1183/09031936.93.03050588

214. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic Inflammation in Severe Persistent Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. **1999**;160(5):1532-1539. doi:10.1164/ajrccm.160.5.9806170

215. Schleımer RP, Freeland HS, Peters SP, Brown KE, Derse CP. An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B4 by purified human neutrophils. *Assess Eff Glucocorticoids Degranulation Chemotaxis Bind Vasc Endothel Form Leukot B4 Purified Hum Neutrophils*. **1989**;250(2):598-605.

216. Green R, Brightling C, Woltmann G, Parker D, Wardlaw A, Pavord I. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and

poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax*. **2002**;57(10). Accessed December 30, 2023. https://ora.ox.ac.uk/objects/uuid:ddd616cc-e6c6-41e7-8d3b-69bad4a76e0c

217. Simpson JL, Powell H, Boyle MJ, Scott RJ, Gibson PG. Clarithromycin Targets Neutrophilic Airway Inflammation in Refractory Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. **2008**;177(2):148-155. doi:10.1164/rccm.200707-1134OC

218. Fei M, Bhatia S, Oriss TB, et al. TNF-α from inflammatory dendritic cells (DCs) regulates lung IL-17A/IL-5 levels and neutrophilia versus eosinophilia during persistent fungal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2011**;108(13):5360-5365. doi:10.1073/pnas.1015476108

219. Doe C, Bafadhel M, Siddiqui S, et al. Expression of the T Helper 17-Associated Cytokines IL-17A and IL-17F in Asthma and COPD. *Chest*. **2010**;138(5):1140-1147. doi:10.1378/chest.09-3058

220. Helenius IJ, Tikkanen HO, Sarna S, Haahtela T. Asthma and increased bronchial responsiveness in elite athletes: Atopy and sport event as risk factors. *J Allergy Clin Immunol*. **1998**;101(5):646-652. doi:10.1016/S0091-6749(98)70173-3

221. Hallstrand TS, Moody MW, Wurfel MM, Schwartz LB, Henderson WR, Aitken ML. Inflammatory Basis of Exercise-induced Bronchoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med*. **2005**;172(6):679-686. doi:10.1164/rccm.200412-1667OC

222. Finnerty JP, Wood-Baker R, Thomson H, Holgate ST. Role of leukotrienes in exercise-induced asthma. Inhibitory effect of ICI 204219, a potent leukotriene D4 receptor antagonist. *Am Rev Respir Dis*. **1992**;145(4 Pt 1):746-749. doi:10.1164/ajrccm/145.4_Pt_1.746

223. Parker JM, Oh CK, LaForce C, et al. Safety profile and clinical activity of multiple subcutaneous doses of MEDI-528, a humanized anti-interleukin-9 monoclonal antibody, in two randomized phase 2a studies in subjects with asthma. *BMC Pulm Med*. **2011**;11(1):14. doi:10.1186/1471-2466-11-14

224. Gibson PG, Powell H, Wilson A, et al. Self-management education and regular practitioner review for adults with asthma. *Cochrane Database Syst Rev*. **2002**;2002(3):CD001117. doi:10.1002/14651858.CD001117

225. Rayees S, Din I. *Asthma: Pathophysiology, Herbal and Modern Therapeutic Interventions*. Springer Nature Switzerland; **2021**.

226. Masoli M, Beasley R. Asthma exacerbations and inhaled corticosteroids. *The Lancet*. **2004**;363(9416):1236. doi:10.1016/S0140-6736(04)15961-8

227. Tantisira KG, Lasky-Su J, Harada M, et al. Genomewide Association between GLCCI1 and Response to Glucocorticoid Therapy in Asthma. *N Engl J Med*. **2011**;365(13):1173-1183. doi:10.1056/NEJMoa0911353

228. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, et al. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am J Respir Crit Care Med*. **2011**;184(5):602-615. doi:10.1164/rccm.9120-11ST

229. Ga D, Ma A, S S, et al. Impact of COVID-19 lockdown on emergency asthma admissions and deaths: national interrupted time series analyses for Scotland and Wales. *Thorax*. **2021**;76(9):867-873. doi:10.1136/thoraxjnl-2020-216380

230. Aaron SD, Boulet LP, Reddel HK, Gershon AS. Underdiagnosis and Overdiagnosis of Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. **2018**;198(8):1012-1020. doi:10.1164/rccm.201804-0682CI

231. Hsu E, Bajaj T. Beta2-Agonists. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2023. Accessed December 30, **2023**. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542249/

232. Grembiale RD, Pelaia G, Naty S, Vatrella A, Tranfa CME, Marsico SA. Comparison of the Bronchodilating Effects of Inhaled Formoterol, Salmeterol and Salbutamol in Asthmatic Patients. *Pulm Pharmacol Ther*. **2002**;15(5):463-466. doi:10.1006/pupt.2002.0387

233. Nelson HS, Carr W, Nathan R, Portnoy JM. Update on the safety of long-acting β-agonists in combination with inhaled corticosteroids for the treatment of asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. **2009**;102(1):11-15. doi:10.1016/S1081-1206(10)60101-9

234. Quirce S, Domínguez-Ortega J, Barranco P. Anticholinergics for treatment of asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. **2015**;25(2):84-93; quiz 94-95.

235. Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res*. **2006**;7(1):73. doi:10.1186/1465-9921-7-73

236. Barnes PJ. Muscarinic receptor subtypes in airways. *Life Sci*. **1993**;52(5):521-527. doi:10.1016/0024-3205(93)90310-Y

237. Restrepo RD. Use of Inhaled Anticholinergic Agents in Obstructive Airway Disease. *Respir Care*. **2007**;52(7):833-851.

238. Network BTSSIG. British guideline on the management of asthma. *Thorax*. **2014**;69(Suppl 1):i1-i192.

239. van Schayck CP, Folgering H, Harbers H, Maas KL, van Weel C. Effects of allergy and age on responses to salbutamol and ipratropium bromide in moderate asthma and chronic bronchitis. *Thorax*. **1991**;46(5):355-359.

240. Gosens R, Gross N. The mode of action of anticholinergics in asthma. *Eur Respir J*. **2018**;52(4). doi:10.1183/13993003.01247-2017

241. Kerstjens HAM, Moroni-Zentgraf P, Tashkin DP, et al. Tiotropium improves lung function, exacerbation rate, and asthma control, independent of baseline characteristics including age, degree of airway obstruction, and allergic status. *Respir Med*. **2016**;117:198-206. doi:10.1016/j.rmed.2016.06.013

242. Rabe KF, Magnussen H, Dent G. Theophylline and selective PDE inhibitors as bronchodilators and smooth muscle relaxants. *Eur Respir J*. **1995**;8(4):637-642. doi:10.1183/09031936.95.08040637

243. Barnes PJ. Theophylline. *Am J Respir Crit Care Med*. **2013**;188(8):901-906. doi:10.1164/rccm.201302-0388PP

244. Polosa R, Blackburn MR. Adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Pharmacol Sci*. **2009**;30(10):528-535. doi:10.1016/j.tips.2009.07.005

245. Cosio BG, Tsaprouni L, Ito K, Jazrawi E, Adcock IM, Barnes PJ. Theophylline Restores Histone Deacetylase Activity and Steroid Responses in COPD Macrophages. *J Exp Med*. **2004**;200(5):689-695. doi:10.1084/jem.20040416

246. Gourgoulianis K i., Chatziparasidis G, Chatziefthimiou A, Molyvdas PA. Magnesium as a Relaxing Factor of Airway Smooth Muscles. *J Aerosol Med*. **2001**;14(3):301-307. doi:10.1089/089426801316970259

247. Bois P. Effect of Magnesium Deficiency on Mast Cells and Urinary Histamine in Rats. *Br J Exp Pathol*. **1963**;44(2):151-155.

248. del Castillo J, Engbaek L. The nature of the neuromuscular block produced by magnesium. *J Physiol*. **1954**;124(2):370-384.

249. Long S, Romani AM. Role of Cellular Magnesium in Human Diseases. *Austin J Nutr Food Sci*. **2014**;2(10):1051.

250. British Thoracic Society Scottish Intercollegiate Guidelines Network. British Guideline on the Management of Asthma. *Thorax*. **2008**;63 Suppl 4:iv1-121. doi:10.1136/thx.2008.097741

251. Song WJ, Chang YS. Magnesium sulfate for acute asthma in adults: a systematic literature review. *Asia Pac Allergy*. **2012**;2(1):76-85. doi:10.5415/apallergy.2012.2.1.76

252. Xu K, Deng Z, Li D, et al. Efficacy of add-on sublingual immunotherapy for adults with asthma: A meta-analysis and systematic review. *Ann Allergy Asthma Immunol*. **2018**;121(2):186-194. doi:10.1016/j.anai.2018.05.019

253. Calamita Z, Saconato H, Pelá AB, Atallah ÁN. Efficacy of sublingual immunotherapy in asthma: systematic review of randomized-clinical trials using the Cochrane Collaboration method. *Allergy*. **2006**;61(10):1162-1172. doi:10.1111/j.1398-9995.2006.01205.x

254. Çekiç Ş, Sapan N. Alerjen Spesifik İmmünoterapi. *Güncel Pediatri*. Published online June **2015**:46-55.

255. Marogna M, Spadolini I, Massolo A, et al. Long-term comparison of sublingual immunotherapy vs inhaled budesonide in patients with mild persistent asthma due tograss pollen. *Ann Allergy Asthma Immunol*. **2009**;102(1):69-75. doi:10.1016/S1081-1206(10)60111-1

256. Vasileiou E, Sheikh A, Butler C, et al. Effectiveness of Influenza Vaccines in Asthma: A Systematic Review and Meta-Analysis. Clinical Infectious Diseases EBSCOhost. doi:10.1093/cid/cix524

257. Li L, Cheng Y, Tu X, et al. Association between asthma and invasive pneumococcal disease risk: a systematic review and meta-analysis. *Allergy Asthma Clin Immunol*. **2020**;16(1):94. doi:10.1186/s13223-020-00492-4

258. Castro M, Rubin AS, Laviolette M, et al. Effectiveness and Safety of Bronchial Thermoplasty in the Treatment of Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. **2010**;181(2):116-124. doi:10.1164/rccm.200903-0354OC

259. Cassim R, Russell MA, Lodge CJ, Lowe AJ, Koplin JJ, Dharmage SC. The role of circulating 25 hydroxyvitamin D in asthma: a systematic review. *Allergy*. **2015**;70(4):339-354. doi:10.1111/all.12583

260. Jolliffe DA, Greenberg L, Hooper RL, et al. Vitamin D supplementation to prevent asthma exacerbations: a systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Lancet Respir Med*. **2017**;5(11):881-890. doi:10.1016/S2213-2600(17)30306-5

261. Parsons JP, Hallstrand TS, Mastronarde JG, et al. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline: Exercise-induced Bronchoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med*. **2013**;187(9):1016-1027. doi:10.1164/rccm.201303-0437ST

262. Lazarinis N, Jørgensen L, Ekström T, et al. Combination of budesonide/formoterol on demand improves asthma control by reducing exercise-induced bronchoconstriction. *Thorax*. **2014**;69(2):130-136. doi:10.1136/thoraxjnl-2013-203557

263. Szczeklik A, Nizankowska E, Duplaga M. Natural history of aspirin-induced asthma. AIANE Investigators. European Network on Aspirin-Induced Asthma. *Eur Respir J*. **2000**;16(3):432-436. doi:10.1034/j.1399-3003.2000.016003432.x

264. Covar RA, Macomber BA, Szefler SJ. Medications as asthma triggers. *Immunol Allergy Clin*. **2005**;25(1):169-190. doi:10.1016/j.iac.2004.09.009

265. Morales DR, Jackson C, Lipworth BJ, Donnan PT, Guthrie B. Adverse Respiratory Effect of Acute β-Blocker Exposure in Asthma: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Chest*. **2014**;145(4):779-786. doi:10.1378/chest.13-1235

266. Fıtzpatrıck S, Joks R, Sılverberg JI. Obesity is associated with increased asthma severity and exacerbations, and increased serum immunoglobulin E in inner-city adults. *Obes Assoc Increased Asthma Sev Exacerbations Increased Serum Immunoglobulin E Inn-City Adults*. **2012**;42(5):747-759.

267. Okoniewski W, Lu KD, Forno E. Weight Loss for Children and Adults with Obesity and Asthma. A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Ann Am Thorac Soc*. **2019**;16(5):613-625. doi:10.1513/annalsats.201810-651sr

268. Scott HA, Gibson PG, Garg ML, et al. Dietary restriction and exercise improve airway inflammation and clinical outcomes in overweight and obese asthma: a randomized trial. *Clin Exp Allergy*. **2013**;43(1):36-49. doi:10.1111/cea.12004

269. Santino TA, Chaves GS, Freitas DA, Fregonezi GA, Mendonça KM. Breathing exercises for adults with asthma. *Cochrane Database Syst Rev*. **2020**;(3). doi:10.1002/14651858.CD001277.pub4

270. Shah PA, Brightling C. Biologics for severe asthma-Which, when and why? *Respirol Carlton Vic*. **2023**;28(8):709-721. doi:10.1111/resp.14520

271. Brusselle GG, Koppelman GH. Biologic Therapies for Severe Asthma. *N Engl J Med*. **2022**;386(2):157-171. doi:10.1056/NEJMra2032506

272. Diver S, Russell RJ, Brightling CE. New and emerging drug treatments for severe asthma. *Clin Exp Allergy*. **2018**;48(3):241-252. doi:10.1111/cea.13086

273. Wahn U, Martin C, Freeman P, Blogg M, Jimenez P. Relationship between pretreatment specific IgE and the response to omalizumab therapy. *Allergy*. **2009**;64(12):1780-1787. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02119.x

274. Bousquet J, Rabe K, Humbert M, et al. Predicting and evaluating response to omalizumab in patients with severe allergic asthma. *Respir Med*. **2007**;101(7):1483-1492. doi:10.1016/j.rmed.2007.01.011

275. Pelaia C, Vatrella A, Busceti MT, et al. Severe eosinophilic asthma: from the pathogenic role of interleukin-5 to the therapeutic action of mepolizumab. *Drug Des Devel Ther*. **2017**;11(null):3137-3144. doi:10.2147/DDDT.S150656

276. Agache I, Beltran J, Akdis C, et al. Efficacy and safety of treatment with biologicals (benralizumab, dupilumab, mepolizumab, omalizumab and reslizumab) for severe eosinophilic asthma. A systematic review for the EAACI Guidelines - recommendations on the use of biologicals in severe asthma. *Allergy*. **2020**;75(5):1023-1042. doi:10.1111/all.14221

277. Bel EH, Wenzel SE, Thompson PJ, et al. Oral Glucocorticoid-Sparing Effect of Mepolizumab in Eosinophilic Asthma. *N Engl J Med*. **2014**;371(13):1189-1197. doi:10.1056/NEJMoa1403291

278. Investigators S study. Mepolizumab for chronic rhinosinusitis with nasal polyps (SYNAPSE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Respir Med*. **2021**;9(10):1141-1153. doi:10.1016/S2213-2600(21)00097-7

279. Bettiol A, Urban ML, Dagna L, et al. Mepolizumab for Eosinophilic Granulomatosis With Polyangiitis: A European Multicenter Observational Study. *Arthritis Rheumatol*. **2022**;74(2):295-306. doi:10.1002/art.41943

280. Roufosse F, Kahn JE, Rothenberg ME, et al. Efficacy and safety of mepolizumab in hypereosinophilic syndrome: A phase III, randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. **2020**;146(6):1397-1405. doi:10.1016/j.jaci.2020.08.037

281. Pelaia C, Calabrese C, Vatrella A, et al. Benralizumab: From the Basic Mechanism of Action to the Potential Use in the Biological Therapy of Severe Eosinophilic Asthma. *BioMed Res Int*. **2018**;2018:e4839230. doi:10.1155/2018/4839230

282. Hearn AP, Kavanagh J, d'Ancona G, et al. The relationship between Feno and effectiveness of mepolizumab and benralizumab in severe eosinophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*. **2021**;9(5):2093-2096.e1. doi:10.1016/j.jaip.2021.01.008

283. Caminati M, Bagnasco D, Vaia R, Senna G. New horizons for the treatment of severe, eosinophilic asthma: benralizumab, a novel precision biologic. *Biol Targets Ther*. **2019**;13:89-95. doi:10.2147/BTT.S157183

284. FitzGerald JM, Bleecker ER, Menzies-Gow A, et al. Predictors of enhanced response with benralizumab for patients with severe asthma: pooled analysis of the SIROCCO and CALIMA studies. *Lancet Respir Med*. **2018**;6(1):51-64. doi:10.1016/s2213-2600(17)30344-2

285. Alam V, Agarwal S, Hopkins C, et al. P213 Real-world effectiveness of benralizumab in patients with eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (EGPA). *Thorax*. **2022**;77(Suppl 1):A195-A195. doi:10.1136/thorax-2022-BTSabstracts.345

286. Kuang FL, Legrand F, Makiya M, et al. Benralizumab for PDGFRA-Negative Hypereosinophilic Syndrome. *N Engl J Med*. **2019**;380(14):1336-1346. doi:10.1056/NEJMoa1812185

287. Wechsler ME, Ford LB, Maspero JF, et al. Long-term safety and efficacy of dupilumab in patients with moderate-to-severe asthma (TRAVERSE): an open-label extension study. *Lancet Respir Med*. **2022**;10(1):11-25. doi:10.1016/S2213-2600(21)00322-2

288. Rabe KF, Nair P, Brusselle G, et al. Efficacy and Safety of Dupilumab in Glucocorticoid-Dependent Severe Asthma. *N Engl J Med*. **2018**;378(26):2475-2485. doi:10.1056/NEJMoa1804093

289. Tameez Ud Din A, Malik I, Arshad D, Tameez Ud Din A. Dupilumab for Atopic Dermatitis: The Silver Bullet We Have Been Searching for? *Cureus*. 12(4):e7565. doi:10.7759/cureus.7565

290. Bachert C, Han JK, Desrosiers M, et al. Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (Lıberty NP Sınus-24 and Lıberty NP Sınus-52): results from two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials. *Lancet Lond Engl*. **2019**;394(10209):1638-1650. doi:10.1016/S0140-6736(19)31881-1

291. Marone G, Spadaro G, Braile M, et al. Tezepelumab: a novel biological therapy for the treatment of severe uncontrolled asthma. *Expert Opin Investig Drugs*. **2019**;28(11):931-940. doi:10.1080/13543784.2019.1672657

292. Corren J, Parnes JR, Wang L, et al. Tezepelumab in Adults with Uncontrolled Asthma. *N Engl J Med*. **2017**;377(10):936-946. doi:10.1056/NEJMoa1704064

293. Menzies-Gow A, Corren J, Bourdin A, et al. Tezepelumab in Adults and Adolescents with Severe, Uncontrolled Asthma. *N Engl J Med*. **2021**;384(19):1800-1809. doi:10.1056/NEJMoa2034975

294. Corren J, Pham TH, Garcia Gil E, et al. Baseline type 2 biomarker levels and response to tezepelumab in severe asthma. *Allergy*. **2022**;77(6):1786-1796. doi:10.1111/all.15197

295. Diver S, Khalfaoui L, Emson C, et al. Effect of tezepelumab on airway inflammatory cells, remodelling, and hyperresponsiveness in patients with moderate-to-severe uncontrolled asthma (CASCADE): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Respir Med*. **2021**;9(11):1299-1312. doi:10.1016/S2213-2600(21)00226-5

296. Gauvreau GM, O'Byrne PM, Boulet LP, et al. Effects of an anti-TSLP antibody on allergen-induced asthmatic responses. *N Engl J Med*. **2014**;370(22):2102-2110. doi:10.1056/NEJMoa1402895

297. Sverrild A, Hansen S, Hvidtfeldt M, et al. The effect of tezepelumab on airway hyperresponsiveness to mannitol in asthma (UPSTREAM). *Eur Respir J*. **2022**;59(1):2101296. doi:10.1183/13993003.01296-2021

298. Wechsler ME, Menzies-Gow A, Brightling CE, et al. Evaluation of the oral corticosteroid-sparing effect of tezepelumab in adults with oral corticosteroid-dependent asthma (SOURCE): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Respir Med*. **2022**;10(7):650-660. doi:10.1016/S2213-2600(21)00537-3

299. Menzies-Gow A, Wechsler ME, Brightling CE, et al. Long-term safety and efficacy of tezepelumab in people with severe, uncontrolled asthma (DESTINATION): a randomised, placebo-controlled extension study. *Lancet Respir Med*. **2023**;11(5):425-438. doi:10.1016/S2213-2600(22)00492-1

300. Hasin Y, Seldin M, Lusis A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol*. **2017**;18(1):83. doi:10.1186/s13059-017-1215-1

301. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. *Electrophoresis*. **1995**;16(7):1090-1094. doi:10.1002/elps.11501601185

302. Li J, Zhao W, Akbani R, et al. Characterization of Human Cancer Cell Lines by Reverse-phase Protein Arrays. *Cancer Cell*. **2017**;31(2):225-239. doi:10.1016/j.ccell.2017.01.005

303. Hanash S. Disease proteomics. *Nature*. **2003**;422(6928):226-232. doi:10.1038/nature01514

304. Cash P. Proteomics in medical microbiology. *Electrophoresis*. **2000**;21(6):1187-1201. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:6<1187::AID-ELPS1187>3.0.CO;2-F

305. Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol*. **1999**;17(3):121-127. doi:10.1016/s0167-7799(98)01245-1

306. Gavin AC, Bösche M, Krause R, et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*. **2002**;415(6868):141-147. doi:10.1038/415141a

307. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. **2000**;405(6788):837-846. doi:10.1038/35015709

308. Ortea I, O'Connor G, Maquet A. Review on proteomics for food authentication. *J Proteomics*. **2016**;147:212-225. doi:10.1016/j.jprot.2016.06.033

309. Macklin A, Khan S, Kislinger T. Recent advances in mass spectrometry based clinical proteomics: applications to cancer research. *Clin Proteomics*. **2020**;17:17. doi:10.1186/s12014-020-09283-w

310. Al-Amrani S, Al-Jabri Z, Al-Zaabi A, Alshekaili J, Al-Khabori M. Proteomics: Concepts and applications in human medicine. *World J Biol Chem*. **2021**;12(5):57-69. doi:10.4331/wjbc.v12.i5.57

311. Xu P, Wang L, Chen D, et al. The application of proteomics in the diagnosis and treatment of bronchial asthma. *Ann Transl Med*. **2020**;8(4):132. doi:10.21037/atm.2020.02.30

312. Cruz RH, Pontes LG de, Condino-Neto A. Allergy, asthma, and proteomics: opportunities with immediate impact. *Allergol Immunopathol (Madr)*. **2023**;51(1):16-21. doi:10.15586/aei.v51i1.567

313. Terracciano R, Pelaia G, Preianò M, Savino R. Asthma and COPD proteomics: current approaches and future directions. *Proteomics Clin Appl*. **2015**;9(1-2):203-220. doi:10.1002/prca.201400099

314. Ruiz-Campillo MT, Molina Hernandez V, Escamilla A, et al. Immune signatures of pathogenesis in the peritoneal compartment during early infection of sheep with Fasciola hepatica. *Sci Rep*. **2017**;7(1):2782. doi:10.1038/s41598-017-03094-0

315. Ghosal K, Saha B, Gupta Bhattacharya S. Clinical and immuno-proteomic approach on Lantana camara pollen allergy-a major health hazard. *Allergy Asthma Clin Immunol Off J Can Soc Allergy Clin Immunol*. **2016**;12:33. doi:10.1186/s13223-016-0135-z

316. Cao C, Li W, Hua W, et al. Proteomic analysis of sputum reveals novel biomarkers for various presentations of asthma. *J Transl Med*. **2017**;15(1):171. doi:10.1186/s12967-017-1264-y

317. Altelaar AFM, Munoz J, Heck AJR. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat Rev Genet*. **2013**;14(1):35-48. doi:10.1038/nrg3356

318. Teran LM, Montes-Vizuet R, Li X, Franz T. Respiratory proteomics: from descriptive studies to personalized medicine. *J Proteome Res*. **2015**;14(1):38-50. doi:10.1021/pr500935s

319. Abdel-Aziz MI, Neerincx AH, Vijverberg SJ, Kraneveld AD, Maitland-van der Zee AH. Omics for the future in asthma. *Semin Immunopathol*. **2020**;42(1):111-126. doi:10.1007/s00281-019-00776-x

320. Uysal MA, Mungan D, Yorgancioglu A, et al. The validation of the Turkish version of Asthma Control Test. *Qual Life Res*. **2013**;22(7):1773-1779. doi:10.1007/s11136-012-0309-1

321. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*. **2008**;26(12):1367-1372. doi:10.1038/nbt.1511

322. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. **2017**;45(D1):D158-D169. doi:10.1093/nar/gkw1099

323. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Published online **2020**. https://www.R-project.org/)

324. Harris MA, Clark J, Ireland A, et al. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res*. **2004**;32(Database issue):D258-261. doi:10.1093/nar/gkh036

325. Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, et al. The Strıng database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res*. **2023**;51(D1):D638-D646. doi:10.1093/nar/gkac1000

326. Li Y, Pu G, Chen C, Yang L. Inhibition of FHL1 inhibits cigarette smoke extract-induced proliferation in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Mol Med Rep*. **2015**;12(3):3801-3808. doi:10.3892/mmr.2015.3787

327. Yue J, Guan J, Wang X, et al. MicroRNA-206 is involved in hypoxia-induced pulmonary hypertension through targeting of the HIF-1α/Fhl-1 pathway. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. **2013**;93(7):748-759. doi:10.1038/labinvest.2013.63

328. Zhong S, Chen C, Liu N, et al. Overexpression Of hsa-miR-664a-3p Is Associated With Cigarette Smoke-Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease Via Targeting FHL1. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. **2019**;14:2319-2329. doi:10.2147/COPD.S224763

329. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. **2004**;3:Article3. doi:10.2202/1544-6115.1027

330. Wei DZ, Guo XY, Lin LN, et al. Effects of Angelicin on Ovalbumin (OVA)-Induced Airway Inflammation in a Mouse Model of Asthma. *Inflammation*. **2016**;39(6):1876-1882. doi:10.1007/s10753-016-0423-2

331. Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL, Winther H, Bonato MS, Störkel S. Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. **2004**;52(7):893-901. doi:10.1369/jhc.3A6195.2004

332. Dong X, Xu M, Ren Z, et al. Regulation of CBL and ESR1 expression by microRNA-22‐3p, 513a-5p and 625-5p may impact the pathogenesis of dust mite-induced pediatric asthma. *Int J Mol Med*. **2016**;38(2):446-456. doi:10.3892/ijmm.2016.2634

333. Zhuang Z, Zhou Y, Xu J, Pan L. Anti-asthmatic miR-224-5p inhibits the FHL1/MAPK pathway to repress airway smooth muscle cell proliferation in a murine model of asthma-like airway inflammation. *Allergy Asthma Clin Immunol Off J Can Soc Allergy Clin Immunol*. **2022**;18(1):88. doi:10.1186/s13223-022-00724-9

334. Bekker NJ, van Pijkeren A, Wolters JC, et al. A proteomics approach to identify COPD-related changes in lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **2023**;324(4):L521-L535. doi:10.1152/ajplung.00105.2022

335. Mayer G, Poirier S, Seidah NG. Annexin A2 is a C-terminal PCSK9-binding protein that regulates endogenous low density lipoprotein receptor levels. *J Biol Chem*. **2008**;283(46):31791-31801. doi:10.1074/jbc.M805971200

336. Watanabe S, Kobayashi K, Suzukawa M, et al. Identification of ANXA2 on epithelial cells as a new receptor for secretory IgA using immunoprecipitation and mass spectrometry. *Clin Exp Immunol*. **2022**;208(3):351-360. doi:10.1093/cei/uxac043

337. Schuliga M, Royce SG, Langenbach S, et al. The Coagulant Factor Xa Induces Protease-Activated Receptor-1 and Annexin A2-Dependent Airway Smooth Muscle Cytokine Production and Cell Proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **2016**;54(2):200-209. doi:10.1165/rcmb.2014-0419OC

338. Jones LC, Moussa L, Fulcher ML, et al. VAMP8 is a vesicle SNARE that regulates mucin secretion in airway goblet cells. *J Physiol*. **2012**;590(3):545-562. doi:10.1113/jphysiol.2011.222091

339. Lai Y, Fois G, Flores JR, et al. Inhibition of calcium-triggered secretion by hydrocarbon-stapled peptides. *Nature*. **2022**;603(7903):949-956. doi:10.1038/s41586-022-04543-1

340. Wang L, Xu J, Liu H, Li J, Hao H. PM2.5 inhibits SOD1 expression by up-regulating microRNA-206 and promotes ROS accumulation and disease progression in asthmatic mice. *Int Immunopharmacol*. **2019**;76:105871. doi:10.1016/j.intimp.2019.105871

341. Shan H, Li X, Ouyang C, et al. Salidroside prevents PM2.5-induced BEAS-2B cell apoptosis via SIRT1-dependent regulation of ROS and mitochondrial function. *Ecotoxicol Environ Saf*. **2022**;231:113170. doi:10.1016/j.ecoenv.2022.113170

342. Drazic A, Aksnes H, Marie M, et al. NAA80 is actin's N-terminal acetyltransferase and regulates cytoskeleton assembly and cell motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2018**;115(17):4399-4404. doi:10.1073/pnas.1718336115

343. Bantulà M, Arismendi E, Picado C, Mullol J, Roca-Ferrer J, Tubita V. Reference Gene Validation for RT-qPCR in PBMCs from Asthmatic Patients with or without Obesity. *Methods Protoc*. **2022**;5(3):35. doi:10.3390/mps5030035

344. Rezaeeyan H, Nobakht M Gh BF, Arabfard M. A computational approach for the identification of key genes and biological pathways of chronic lung diseases: a systems biology approach. *BMC Med Genomics*. **2023**;16(1):159. doi:10.1186/s12920-023-01596-7

345. Takino T, Koshikawa N, Miyamori H, et al. Cleavage of metastasis suppressor gene product KiSS-1 protein/metastin by matrix metalloproteinases. *Oncogene*. **2003**;22(30):4617-4626. doi:10.1038/sj.onc.1206542

346. K A, Kf C, N ZK, et al. Proteomic signatures of eosinophilic and neutrophilic asthma from serum and sputum. *Ebiomedicine*. **2023**;99:104936-104936. doi:10.1016/j.ebiom.2023.104936

347. Wenzel SE, Balzar S, Cundall M, Chu HW. Subepithelial basement membrane immunoreactivity for matrix metalloproteinase 9: association with asthma severity, neutrophilic inflammation, and wound repair. *J Allergy Clin Immunol*. **2003**;111(6):1345-1352. doi:10.1067/mai.2003.1464

348. Maisi P, Sorsa T, Raulo SM, Prikk K, Sepper R, McGorum B. Increased matrix metalloproteinase (MMP)-9 in the airway after allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med*. **2001**;164(9):1740; discussion 1740-1. doi:10.1164/ajrccm.164.9.correspondence_b

349. Zastrzeżyńska W, Bazan-Socha S, Przybyszowski M, et al. Effect of omalizumab on bronchoalveolar lavage matrix metalloproteinases in severe allergic asthma. *J Asthma Off J Assoc Care Asthma*. **2022**;59(6):1087-1094. doi:10.1080/02770903.2021.1903917

350. Ko FWS, Diba C, Roth M, et al. A comparison of airway and serum matrix metalloproteinase-9 activity among normal subjects, asthmatic patients, and patients with asthmatic mucus hypersecretion. *Chest*. **2005**;127(6):1919-1927. doi:10.1378/chest.127.6.1919

351. Mattos W, Lim S, Russell R, Jatakanon A, Chung KF, Barnes PJ. Matrix metalloproteinase-9 expression in asthma: effect of asthma severity, allergen challenge, and inhaled corticosteroids. *Chest*. **2002**;122(5):1543-1552. doi:10.1378/chest.122.5.1543

352. Muimo R, Crawford RM, Mehta A. Nucleoside diphosphate kinase A as a controller of AMP-kinase in airway epithelia. *J Bioenerg Biomembr*. **2006**;38(3-4):181-187. doi:10.1007/s10863-006-9033-2

353. Poachanukoon O, Roytrakul S, Koontongkaew S. A shotgun proteomic approach reveals novel potential salivary protein biomarkers for asthma. *J Asthma Off J Assoc Care Asthma*. **2022**;59(2):243-254. doi:10.1080/02770903.2020.1850773

354. Attwood PV, Muimo R. The actions of NME1/NDPK-A and NME2/NDPK-B as protein kinases. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. **2018**;98(3):283-290. doi:10.1038/labinvest.2017.125