

**T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
KESİN RAPORU**

**Sitokinlerin ve sitokin genlerindeki polimorfizmlerin kömür işçileri
pnömokonyozunun gelişiminde ve klinik şiddetindeki rolü**

Prof. Dr. Asuman Karakaya

20030803036

2003-2006

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara-2006

I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri

Türkçe Adı: Sitokinlerin ve sitokin genlerindeki polimorfizmlerin kömür işçileri pnömokonyozunun gelişiminde ve klinik şiddetindeki rolü

İngilizce Adı: The role of cytokines and cytokine gene polymorphisms in the progression and severity of coal workers' pneumoconiosis

Türkçe Özeti: Kömür işçileri pnömokonyozu (KİP), etiyojisi henüz tam tanımlanmamış kompleks ve çok etkenli bir akciğer hastalığıdır. KİP, hastalığın erken dönemlerinde basit pnömokonyoz (BP) olarak tanımlanırken, perifokal yaygın fibrozise donüştüğünde ve pulmoner fonksiyonlarda ciddi değişiklikler görüldüğünde, ilerleyen masif fibrozis (İMF) olarak adlandırılır. Genelde fibrotik akciğer hastalıklarının makrofaj kaynaklı sitokinler ve gelişme faktörleri aracılığı ile geliştiği kabul edilmektedir. Kömür tozunun neden olduğu enflamasyonda ve fibrozisin ilerleyen yaygın forma dönüşümünde enflamatuvar sitokinlerin yanısıra, reaktif oksijen radikallerinin de önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Kömür işçileri pnömokonyozunun oluşumunda ve gelişiminde oksidatif stresin ve sitokinlerin ve gelişme faktörlerinin salınımının etkin olduğu hipotezine dayanan bu çalışmanın ilk bölümünde, sağlıklı kömür işçileri, BP ve İMF hastalarının serum ve BAL sıvılarında pro-enflamatuvar sitokinlerden interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), tümör nekroze edici faktör alfa (TNF- α) ve transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β) düzeyleri ölçülmüş, yine aynı örneklerde antioksidan enzimlerden katalaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerine bakılmıştır. Ayrıca BAL, serum ve idrar örneklerinde immün sistem aktivasyonunun biyogöstergesi olarak kabul edilen neopterin düzeyleri de ölçülmüştür. Hasta grubunu uzun süre kömür madencisi olarak çalışmış ve KİP hastalığına yakalanmış 81 emekli

işçi oluştururken buna karşılık kontrol grubu ise 63 işçiden oluşturulmuştur. Sitokin ve neopterin ölçümleri ELISA yöntemi ile ve antioksidan enzim ölçümleri de spektrofotometrik yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Lokal olarak hastalığın oluşumunda ve ilerlemesinde sitokinlerin, antioksidan enzimlerin rolünü ve bir biogösterge olarak neopterin düzeyini araştırmak için bronkoskopik kontrole tabi tutulan ve kontrol sonucu hastalık bulunmayan kontrol grubu ve yine kontrol sonucu KIP hastalığı olduğu saptanan ve radyografik sınıflandırılmayla BP ve İMF olarak iki grup oluşturuldu. Çalışmamızda elde edilen bulgular sonucunda serum ve BAL IL-1 β , IL-6 ve TNF- α 'nın hastalarda kontrollere oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek çıkması, bu sitokinlerin hastalık gelişimine katkıda bulunacak şekilde pro-enflamatuar bir rol oynadığını göstermektedir. İlerleyen masif fibrozisli hastaların serum IL-6 ve TNF- α ve BAL IL-1 β , IL-6 ve TNF- α seviyelerinin basit pnömokonyozlu hastalara göre anlamlı olarak yüksek olması ayrıca hastalığın klinik şiddetinin artmasında da rol oynadığını düşündürmektedir. Serum TGF- β düzeyleri ise ilerleyen masif fibrozisli hastalarda kontrol grubuna ve BP'lu hastalara göre anlamlı bir şekilde olmasa da düşük bulunmuştur. BAL TGF- β düzeylerinde bu düşüş anlamlı bulunmuştur. Bu bulgular TGF- β 'nin fibrotik özelliğinin konsantrasyona göre değiştiğini doğrulamaktadır. TGF- β düşük konsantrasyonlarda fibroblastlar üzerine stimüle edici bir etki gösterirken, yüksek konsantrasyonlarda inhibe edici bir etki göstermektedir. Ayrıca TGF- β 'nin sıklıkla anti-enflamatuar özellik gösterdiği de düşünülebilir. Serum GPx, SOD enzim düzeyleri BP ve İMF'li hastalarda, serum katalaz düzeyi ise sadece BP'li hastalarda kontrollere kıyasla anlamlı bir şekilde artmış bulunmuştur. İMF'li hastalarda da BP'lu hastalarla kıyaslandığında anlamlı olmasa da 1.5 kat artmış bulunmuştur. Bu durum hastalığın gelişiminde reaktif oksijen türlerinin (ROT) önemini göstermektedir. BAL GPx düzeyi kontrollerde, BP ve İMF'li hastalara oranla anlamlı olmasa da yüksek bulunmuştur. Bu durum hastalık oluşuktan sonra antioksidan enzim oksidan dengesinin reaktif oksijen radikali

yönüne kaydığını göstermektedir. BAL katalaz düzeyleri üç grupta da birbirine yakın bulunmuştur. BAL SOD düzeyi ise BP ve İMF hastalarında, kontrollere oranla anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur, bu durum hastalık halinde ve gelişiminde süperoksit radikalının ortamda hala yüksek miktarlarda bulunduğunu gösterebilir. Ayrıca çalışmamızda BP ve İMF li hastaların serum ve idrar neopterin düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulunmuştur. Ayrıca serum ve idrar neopterin düzeyleri arasında iyi bir korelasyon da gözlenmiştir. Neopterin düzeylerinin ölçümünün hastalığın ilerlemesinde de bir biogösterge olup olmadığını anlamak için BP ve İMF hastalarının serum ve idrar düzeyleri karşılaştırılmış ve kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı olmasa da BP hastalarında 2 kat, İMF hastalarında da 3 kat fazla bir artış gözlenmiştir. Ayrıca BAL neopterin düzeyleri İMF hastalarında, BP ve kontrol grubu ile kıyaslandığında da artmış miktarlarda bulunmuştur. Lokal oluşumu gösterdiği için BAL neopterin düzeyleri, KİP nin immün aktivasyonunun derecesini ölçmek için iyi bir gösterge olabilir.

Çalışmanın ikinci bölümünde, KİP'nun kronik enflamatuar yapısına ve bazı alelik varyantlara enflamatuar hastalıklarda anlamlı oranda rastlanıldığı yönündeki genetik bulgulara dayanılarak, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-6 ve TGF- β genlerindeki polimorfizmlerin bu hastalığın insidansı ve/veya klinik şiddetiyle ilgisi araştırılmıştır. Bireysel duyarlıkta etnik farklılıkların büyük önemini bulduğu göz önüne alındığında elde edilecek olan analiz sonuçları işçi sağlığı riskinin değerlendirilmesi açısından önemlidir. Genotipleme çalışmalarından sonra *in vitro* olarak mutant ve mutant olmayan işçilerin monositlerinden TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra sitokinlerinin salınımı ölçülmüş ve bu sitokinlerin genlerindeki polimorfizmlerin salınım üzerine gösterdikleri etkiler incelenmiştir. Hasta grubunu uzun süre kömür madencisi olarak çalışmış ve KİP hastalığına yakalanmış emekli 75 işçi oluştururken buna karşılık kontrol grubu ise 11'i emekli, 88'i ise çalışan kömür işçisi olmak üzere toplam 99 işçiden oluşturulmuştur. Genotipleme deneyleri PCR-RFLP yöntemleri ile yapılırken,

monositlerden salınım ölçümleri ise incelenen sitokinlere özgü ELISA kitleri ile yapılmıştır. Genotipleme deneyleri sonucunda hastalık oluşumu ve ilerlemesi açısından KİP gelişimi üzerinde en fazla etki gösteren sitokin polimorfizmleri, TNF- α (-238) polimorfizmi olmuş iken (hastalık oluşumunda 3,35 kat, İMF gelişiminde 3,88 kat ve hastalık genelinde ise 2,95 kat) TNF- α (-308) polimorfizmi de İMF gelişiminde anlamlı olarak etki gösterdiği bulunmuştur (2,38 kat). Bunun yanında güçlü antiinflamatuvar etkileri olduğu bilinen IL-6 sitokininin genotipleme deneyleri sonucunda ise koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır. Bu sitokinlerin dışında IL-1 α (+4845), IL-1 β (+3953), IL1-ra (+2018) ve TGF- β (Kodon 10) gen polimorfizmlerinin KİP oluşumu ve gelişimi üzerinde herhangi bir anlamlı etki oluşturmadıkları gözlenmiştir. Monositlerden sitokin salınım ölçümlerinde ise TNF- α sitokininin mutant bireylerde salınımı, mutant olmayanlara göre anlamlılık göstermiştir (kömür tozu ile $P<0,05$, LPS ile $P<0,01$). Bu da TNF- α polimorfizminin TNF- α sitokinin üretimini arttırarak monositlerden salınan düzeylerini de arttırdığını göstermiştir. IL-1 α , IL-1 β ve IL-1ra sitokinlerinin mutant ve mutant olmayan işçilerin monositlerinden salınım düzeyleri arasında ise bir anlamlılık bulunmamıştır. Ancak salınımları ölçülen dört sitokinde de, aktif kömür ve LPS stimülasyonu ile salınan monosit düzeyleri, spontan salınan monosit düzeylerine göre anlamlı çıkmıştır ($P<0,001$). Sigara içiminin ne KİP gelişimi üzerinde ne de monositlerden sitokin salınım düzeyleri üzerine herhangi bir etkisi bulunamamıştır.

İngilizce Özeti: Coal workers' pneumoconiosis (CWP) is an occupational lung disease caused by coal dust inhalation and characterized by development of fibrotic and inflammatory reactions in the lung. CWP is divided into two stages according to disease severity; simple pneumoconiosis (SP) in which fibrotic lesions remain limited and progressive masif fibrosis (PMF), characterized by severe alterations in lung functions due to extensive fibrosis and emphysema.

Coal dust particles are known to stimulate the macrophages. The activated macrophages produce excessive amounts of reactive oxygen species (ROS) and cytokines. The first part of the present study was designed to determine serum and BAL cytokine (IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β) and antioxidant enzyme [superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase] levels to investigate their roles in development of CWP and the disease severity. Also it was investigated the neopterin – as a biomarker of immune system activation-levels in BAL, serum and urinary samples of control, SP and PMF patients. Patient group was selected of 81 retired workers suffering from CWP, on the other hand control group included 63 workers having no findings of CWP. Significant increases in the serum and BAL levels of IL-1, IL-6, TNF- α was evident in SP and PMF patient groups compared to control. Serum IL-6, TNF- α and BAL IL-1, IL-6, TNF- α levels of PMF patients were found significantly higher than those of SP patient group. Although in SP patient group the serum TGF- β levels were found higher than in control and PMF patient groups, the differences were not significant. The same profile but significant levels were observed in BAL TGF- β levels. In conclusion, this study suggest that serum and BAL IL-6, TNF- α and also BAL IL-1 levels may be associated with occurrence of CWP. Serum and BAL IL-6 and TNF- α levels may be correlated with severity of disease. For three cytokines in BAL there were also significant differences between two patients groups. TGF- β may have a dual role in fibrotic processes depend on its concentration and it is related to the relatively weak development of inflammatory processes in the lung of patients with SP compared with those with PMF. Significantly elevated serum GPx, SOD levels were found in SP and PMF patients and significantly elevated serum catalase levels were found in SP patients when compared with control group. When we measured BAL antioxidant enzyme levels we found that control groups' BAL GPx levels were higher than SP and PMF patients. BAL SOD levels were found significantly higher in SP and PMF patients when compared with control. This results demonstrated that the imbalance between antioxidant

enzymes and ROS was an important factor in development of CWP. When we look at the neopterin levels we found that in SP and PMF patients, mean serum neopterin levels were significantly higher than that of the control group. On the other hand, more significantly increased amounts of urinary neopterin levels were found in SP and PMF patients when compared with the control group. However, there were no significant differences between the serum and urinary neopterin levels of SP and PMF patients. BAL neopterin levels were found significantly higher in SP and PMF patients when compared with control group. Also, BAL neopterin levels in PMF patients were significantly higher than those of SP patients. As serum levels of SP and PMF patients were found upper than normal limits while urinary levels were between normal ranges, it can be suggested that serum neopterin levels might be a good biomarker for the occurrence of CWP. However, both of them do not reflect the disease severity. Based on our findings, it can be further suggested that BAL neopterin levels could be related with both immune activation and disease severity in CWP.

In the second part of this study, we aimed to investigate CWP-related cytokines TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-6 and TGF- β to point out the cytokine profile of Turkish coal miners by performing genotypic and phenotypic analysis. It has been shown that ethnical differences are playing role in individual sensitivity so that our results are important to evaluate the health risks of coal miners. After genotyping, the *in vitro* release of TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra cytokines from blood monocytes of mutant and non-mutant workers was investigated. Afterwards, the effects of the cytokine polymorphisms on the amounts of cytokines released from monocytes were evaluated.

Patient group was selected of 75 retired workers suffering from CWP, on the other hand control group included 11 retired and 88 active workers having no findings of CWP. Genotyping experiments were performed with PCR-RFLP methods and cytokines released from monocytes were measured by using cytokine specific ELISA kits.

According to genotyping results, it seems to be TNF- α (-238) cytokine gene polymorphism was significantly effective than others on the occurrence and severity of CWP. This variant has shown 2,95 fold risk of CWP occurrence, 3,35 fold risk of the progression of SP and 3,88 fold risk of the progression of PMF. In TNF- α (-308) gene polymorphism, it was clearly seen that this variant only affected on the disease severity (OR: 2,38 fold risk of the progression of PMF). In all CWP patients, there was 1,37 fold risk but there is no significance. IL-1 α (+4845) and IL-1 β (+3953), IL-1 ra (+2018) and TGF- β (Codon 10) variants had no significant effects on neither the occurrence nor the severity of the disease. In contrast to these cytokines, IL-6 (-174) polymorphism showed a protective effect on CWP occurrence and disease severity although this cytokine had strong anti-inflammatory effects.

The level of TNF- α released from the monocytes of mutant workers was significantly increased compared to the levels released from the non-mutant workers' monocytes ($P < 0,05$ with coal dust stimulation and $P < 0,01$ with LPS stimulation). This result showed that, TNF- α gene polymorphism had an augmenting effect on the production of this cytokine. On the other hand IL-1 gene polymorphisms (IL-1 α , IL-1 β ve IL-1ra) had no effect on the levels of cytokines released from monocytes in mutant and non-mutant workers. However, this study demonstrated a common result that the levels of cytokines released from monocytes by stimulation of coal and LPS were significantly increased compared with spontaneous release ($P < 0,001$). As a confounding factor, the possible effect of smoking was also examined but no significant relationship was found between smoking and CWP.

II. Amaç ve Kapsam

Toplumlar sanayilerini geliştirdikçe mineral tozlarına olan ihtiyacı da büyük bir hızla artmaktadır. İnsan yaşamında ve enerji hammaddeleri içinde çok önemli bir yere sahip olan kömür, dünyada geniş rezervlere ve vazgeçilmez yaygın tüketim alanlarına sahip bir mineraldir. İnsanların yaşadıkları ve çalıştıkları ortamda solunan pek çok kimyasal madde solunum yollarında ve akciğerlerde çeşitli hastalıkların oluşmasına ve hatta hastalığın şiddetine bağlı olarak ölüme kadar gidebilen durumlara neden olabilmektedirler. Mesleki akciğer hastalıkları; çeşitli tozların, gaz ve dumanların solunması ile meydana gelen hastalıkları kapsamaktadır. Dünya çapında görülen mesleki akciğer hastalıkları arasında en yaygın görülenleri, mineral tozların solunmasına bağlı olarak ortaya çıkan hastalıklardır. Bu mineral tozlardan biri olan kömür tozu da günümüzdeki modern kontrollere ve düzenlemelere rağmen halen çeşitli solunum yolu hastalıklarına neden olmaktadır.

Endüstrileşmiş ülkelerde kömür madenciliği giderek daha az insanın istihdam edildiği ve risklerin en aza indirilmeye çalışıldığı bir alan olmakla beraber gelişmekte olan ülkelere önemini korumakta olup çalışan işçi sayısı halen çok yüksektir. Sadece Türkiye Taşkömürü Kurumu bünyesinde 20.07.2004 tarihi itibarıyla 8 412 yer altı ve 3 044'ü ise yerüstü olmak üzere toplam 11 456 işçi bu meslek grubunda çalışmaktadır. Bu gruptan 3 906 birey ise tozlu olma ihtimali en yüksek olan yani mesleki akciğer hastalıklara yakalanma riski en fazla olan üretim işçisi olarak diğerleri de yine yeraltında ancak toz oluşma olasılığı daha az olan üretime destek ve hazırlık işçisi olarak çalışmaktadır (Türkiye Taşkömürü Kurumu, 2004). Bu sayılar ülkemizde kömür madenciliğinin önemini devam ettirdiğinin açıkça bir göstergesidir ve bu meslek grubunda çalışan bireylerin büyük bir risk altında olduğunun bir kanıtıdır.

Uzun süreler çeşitli mineral tozlara soluma yoluyla maruz kalınması sonucu akciğerlerde toz depolanması ve daha ileriki dönemlerde fibrozis ile seyreden akciğer hastalıkları genel olarak pnömokonyozlar adı altında gruplandırılırlar ve restriktif (infiltratif veya diffüz interstisyel) akciğer hastalıkları arasında en yaygın olanlarıdır. Pnömokonyozlar, hastalığa neden olan mineral toza göre isimlendirilirler. Bu tozlardan en önemlileri ise asbest, silika ve kömür tozlarıdır. Asbest ile asbestoz, silika ile silikozis meydana gelirken kömür tozlarına maruziyet sonrasında ortaya çıkan pnömokonyoza ise kömür işçileri pnömokonyozu (KİP=CWP) adı verilir. Geçmiş yıllarda, mineral tozların solunum yolu hastalıklarındaki rolleri, *in vitro* çalışmalardan saptanmıştır. Silika ve diğer partiküller üzerine hem *in vivo* ve hem de *in vitro* çalışmalar yapılmış iken, kömür tozları hakkındaki bilgilerin büyük bir kısmı epidemiyolojik çalışmalardan elde edilmiştir. Diğer taraftan kömür işçileri ile ilgili olan epidemiyolojik çalışmalar, mineral tozların risk değerlendirmesi verilerini oluşturmaktadır.

Kömür madenlerinde çalışmakta olan işçiler çalışma süresince karbon partikülleri yanında silika, demir oksit, kaolin gibi değişik maddelere maruz kalırlar. KİP'in ilk tanımlarından biri, akciğerlerde kömür tozlarının birikmesi ve buna bağlı olarak dokunun bu toza karşı gösterdiği reaksiyon olarak adlandırılmasıdır (Morgan, 1975). KİP'in iki formu vardır; bunlar basit pnömokonyoz (BP) ve ilerleyen masif fibrosiz (İMF)'dir. Kömür işçilerinde bu iki KİP formundan biri gelişir. Ancak kömür tozuna kronik maruziyet sonucu akciğerdeki lezyonların genişlemesi ve büyümesi ile birlikte KİP'in şiddeti hafiften orta hale daha ileri safhalarda da maruziyetin devamına bağlı olarak da şiddetli ve komplike hale gelir. Basit pnömokonyoz ve ilerleyen masif fibrozis, radyolojik ve mikroskopik özellikleri ile birbirinden ayrılırlar. Radyolojik olarak basit pnömokonyoz, birçok küçük çaplı yuvarlak opaklıklarla karakterizedir ve bu opaklıklar özellikle akciğerin üst bölgesinde görülmektedir. İlerleyen masif fibrozisde küçük çaplı opaklıklar biraraya gelerek geniş bir alana yayılmıştır.

Mikroskobik olarak basit pnömokonyoz, özellikle üst lobda, bronşioller etrafında merkezlenmiş siyah kömür tozu makülleri ile karakterizedir. Maküllerin çapları 1 ile 6 mm arasında değişmektedir. İlerleyen masif fibrozisde lezyonlar özellikle sağ akciğerin üst loblarında görülmekle birlikte daha da ciddi vakalarda her iki lobda da rastlanmaktadır. Lezyonlar, kömür tozu yüklü düzensiz veya yuvarlak fibrotik yığınlar ve gelişigüzel yayılmış kolajen lifleri halinde görülür. (Castronava ve Vallyathan, 2000).

KİP, patofizyolojik mekanizmaları henüz tam tanımlanmamış kompleks ve çok etkenli bir akciğer hastalığı olmakla birlikte, kömür tozunun immün sistemde meydana getirdiği değişiklikler sorumlu tutulmaktadır. Yapılan çalışmalar, akciğerlerin kömür tozuna, proenflamatuar reaksiyonları tetikleyerek, fibroblast proliferasyonunu ve ekstrasellüler matriks sentezini arttırarak yanıt verdiğini ortaya koymuştur (Rom ve ark., 1987; Green ve Vallyathan, 1998; Schins ve Borm, 1999; Vallyathan ve ark., 2000). Kömür tozu ve diğer inorganik minerallerin fagositozu sırasında alveoler makrofajlardan ve polimorfonükleer lökositlerden reaktif oksijen türleri (ROT) salınır. ROT'un proinflamatuar özellikleri endotel hücre hasarı, nötrofil göçü, lipid peroksidasyon ve antioksidasyon, DNA hasarı, TNF- α , IL-1 salınımıdır. Gerçekten de makrofajlardan üretilen oksidan seviyesi ile akciğer hasarı ve pnömokonyozun şiddeti arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (Wallaert ve ark., 1990; Blackford ve ark., 1997). Glutation peroksidaz, superoksit dismutaz ve katalaz normalde solunum yolunda bulunan ve akciğerleri oksidatif sataşmalardan koruyan enzimlerdir. Çalışmanın ilk bölümünde BAL ve serumda bu enzim aktivitelerindeki değişikliklerin ölçülmesi amaçlanmıştır ve pnömokonyotik akciğerlerde antioksidan savunmanın ne oranda etkilendiğini ortaya koyacaktır. Kömür işçilerinde yapılan çalışmalar, BAL sıvısından elde edilen alveoler makrofajların aşırı miktarlarda sitokin ve ROT salgıdığını göstermiştir. Bu sekresyonların hücre hasarına neden olduğu ve hastalık prosesini başlattığı önerilmekle

birlikte, patofizyolojik mekanizmalar halen tam açıklanamamıştır. Bu güne kadarki bulgular, akciğerlerin kömür tozuna, pro-enflamatuar sitokinlerin sekresyonunda artışa yol açan enflamatuar reaksiyonları tetikleyerek ve ekstrasellüler matriks sentezini ve fibroblast proliferasyonunu artırarak yanıt verdiğini göstermiştir (Green ve ark., 1998). Rom ve ark.(1987) sigara içmeyen pnömokonyozlu kömür işçilerinden elde edilen alveoler makrofajların, spontan olarak kontrollere göre daha yüksek konsantrasyonlarda H₂O₂ saldıgını göstermiştir. Wallaert ve ark.(1990) basit pnömokonyozlu kömür işçilerinden izole edilen alveoler makrofajların kontrollere göre daha çok, komplike pnömokonyozlu işçilere göre daha az oranda spontan superoksit anyonu saldıgını göstermişlerdir. Toz partiküllerinin uyarımıyla reaktif oksijen türevlerinin oluşumu artar. Bu da tozun redox özelliklerine ve Fe içeriğine bağlıdır (Dalal ve ark., 1995). Bu faktörler aşırı oksijen radikali üretimine ve antioksidan savunmayı etkisiz kılarak, oksidatif strese yol açar. Glutation peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz enzimlerinin sıkı regüle edilmiş düzeyleri, ekstraselüler çevrede üretilen oksidanlara karşı akciğerleri korur. Bir çalışmada pnömokonyozlu kömür işçilerinin BAL sıvılarından elde edilen alveoler hücrelerin daha fazla oksijen radikali saldıgı ve SOD aktivitesinin kontrol bireylerden daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Wallaert ve ark., 1990). Rom ve ark. (1987) ile Voisin ve ark.(1985) ise, alveoler makrofajların SOD aktivitelerinin kontrollere göre pnömokonyozlu madencilerde anlamlı oranda yüksek olduğunu bulmuşlardır. Sıçan modelinde silika ve asbestin indüklediği enflamatuar yanıtlarda Mn-SOD mRNA indüksiyonu rapor edilmiştir (Janssen ve ark, 1994). Diğer enzimlerden GPx ve katalazın pnömokonyozlu kömür işçilerinde kontrollere göre 20 ve 15 kat arttığı rapor edilmektedir (Vallyathan ve ark.,2000). Nadif ve ark.(1998) kömür tozlarına maruziyet ile eritrosit katalaz aktivitesi arasında pozitif bir ilişki göstermişlerdir. Ayrıca yine bu bölümde, immün sistem aktivasyonunun bir biyogöstergesi olan neopterinin, enflamatuar ve fibrotik bir hastalık olan KİP için de bir biyomarker olup olmayacağı belirlenmesi de amaçlanmıştır. Günümüzde,

bir çok çalışma immün sistemi ve oksidatif stres etkileşmesinin bir çok akciğer hastalığı ile ilişkisinin olabileceğini işaret etmektedir (Vallyathan ve ark., 1988, Mac Nee, Rahman 2001, Pinho ve ark., 2004). Malign ve otoimmün hastalıklar, Alzheimer hastalığı, kalp yetmezliği, enfaktüs gibi hastalıklarda vücut sıvılarında neopterin seviyelerinin yükseldiğine dair bir çok çalışma olsa da, pulmoner hastalıklara dair sadece birkaç çalışma vardır.

Kömür tozunun neden olduğu enflamasyonda ve fibrozisin ilerleyen yaygın forma dönüşümünde reaktif oksijen radikallerinin yanısıra enflamatuar sitokinlerin de rolü olduğu gösterilmiştir. Enflamatuar sitokinler işyeri maruziyetlerinden kaynaklanan birçok kronik enflamatuar hastalıkta önemli rol oynamaktadır. Kronik enflamatuar akciğer hastalıklarının (idiyopatik pulmoner fibrozis, granümatöz hastalıklar, kronik bronşit, sistik fibrozis, silikoz, KİP ve astım) yüksek pro-enflamatuar sitokin düzeyleri ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde granümatöz reaksiyonlar ve respiratuar hipersensitiviteye neden olan aerosol ve partiküler pulmoner toksikantlara maruziyette de artan sitokin düzeylerinin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Alveoler makrofajlardan salınan sitokinler dahil bir dizi mediatörün enflamatuar proseslerin indüksiyonunda ve pulmoner fibrozisin gelişiminde rolü olduğu belirtilmektedir (Schins ve Borm, 1999; Wallaert ve ark., 1990; Rom, 1991; Vanhee ve ark., 1995; Lassalle ve ark., 1990). Enflamatuar hücre sitokinleri ve mediatörlerin hastalık gelişimi ve toz maruziyetinin şiddetiyle ilişkili olarak da deney hayvanı modellerinde ve insanlarda arttığı rapor edilmektedir (Vanhee ve ark., 1995; Lassalle ve ark., 1990, 1989). Tümör nekroze edici faktör (TNF- α), interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) gibi önemli sitokinlerin pnömokonyozlu kömür işçilerin BAL sıvılarında sentezlerinin arttığı gösterilmiştir (Schins ve Borm, 1999). Bu mediatörler enflamasyonda, kollajen sentezinde ve otoimmün proseslerde önemli rol oynar (Schins ve ark., 1999; Rom, 1991). IL-1 ve TNF- α 'nın pnömokonyozlu kömür işçilerinin alveoler

makrofajlarından artan düzeylerde salındığı gösterilmiştir (Vanhee ve ark., 1995; Lassalle ve ark., 1989). Ayrıca invitro şartlarda alveoler makrofajların kömür tozuna maruziyetinin IL-6 ve TNF- α sentezini arttırdığı gösterilmiş ve IL-6'nın proenflamatuar ve fibrotik faktörlerin artışına karşı otoregülatör reaksiyon olarak arttığı öne sürülmüştür (Vanhee ve ark., 1995; Gosset ve ark., 1991). Bununla birlikte, sitokin salınımindaki artışın direkt olarak KİP şiddetine bağlı olduğu rapor edilmiştir (Rom, 1991; Vanhee ve ark., 1995; Lassalle ve ark., 1990). Bu sonuçlar artan IL-1, IL-6 ve TNF- α 'nın kömür işçileri pnömokonyozunun başlaması ve gelişiminde rol oynadığını ortaya koymaktadır. TGF- β , fibroblast proliferasyonunun regülasyonunda önemli rol oynayan bir büyüme faktörüdür. Ancak bu sitokinin tam rolü henüz tam anlaşılabilmemiştir. Kemotaksis ve fibroblast proliferasyonunu regüle eden bir mediatör olarak düşünülmektedir. Bununla birlikte, TGF- β 'nin muhtemelen TNF- α sentezini azaltarak alveoler makrofajların deaktivasyonuna yol açtığı ve bu şekilde enflamatuar reaksiyonları baskıladığı da öne sürülmektedir (Tsunawaki ve ark., 1988). Vanhee ve ark., kontrollere göre pnömokonyozlu kömür işçilerinde alveoler makrofajlardan TGF- β salınımının daha yüksek düzeyde olduğunu göstermişlerdir (Vanhee ve ark., 1994).

Çalışmamızın ilk bölümünde, kronik enflamatuar hastalıkların etiyolojisinde önemli rol alan pro-enflamatuar sitokinlerden IL-1, TNF- α , IL-6 ve TGF- β 'nin BAL ve serum düzeyleri ölçülecek ve bu bulgularla hastalığın farklı klinik kategorilerde görülmesi arasındaki ilişki irdelenecektir.

Kronik enflamatuar hastalıkların etiyolojisinde hem çevresel hem de genetik faktörler rol oynamaktadır. Genelde hastalık etkeni ile başlayan hastalığın klinik görüntüsünü spesifik genotipler ya da çevresel faktörler etkiler. Polimorfizmler gibi genetik faktörler, genellikle tek bir baz çiftinin değişmesinden kaynaklanan dizilim farklılıklarıdır. Son yıllarda genotipleme

tekniklerindeki gelişmeler, sitokin genlerinin de polimorfik olduğunu ortaya koymuş ve bu genlerdeki tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNPs) bireyler arasında farklı düzeylerde sitokin üretimine yol açtığı gösterilmiştir. Birçok kronik hastalığın bireyler arasında farklı seyirler göstermesinde de bu genetik varyasyonların önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Sitokin genlerinde ortaya çıkan bilinen polimorfizmlerin çoğu bilinen ve farzedilen düzenleyici bölgelerde olmaktadır ve çoğunlukla SNP şeklindedir. Bu da genlerin ekspresyonlarını etkiler ve bu yaygın alelik varyantlar, hastalığa karşı hassasiyetin veya hastalığın şiddetinin artması ile ilişkili oldukları bilinmektedir. Moleküler ve epidemiyolojik çalışmalar, sitokin SNP'lerinin kronik enflamatuar veya immün sistem aracılı hastalıklarla bağlantılı olduğunu göstermiştir (Bidwell ve ark., 1999; Yücesoy ve ark., 2003). Sitokinleri kodlayan genlerin çoğunun çeşitli hastalıklara neden oldukları saptanmıştır. Kömür tozuna maruziyet sonucu sitokin genlerinde ortaya çıkan SNP'ler, KİP'e karşı hassasiyeti ve hastalığın şiddetini etkiledikleri bilinmektedir. Bu bulgular ve fibrotik hastalıkların enflamatuar karakteri, benzer çalışma koşullarına karşın bazı bireylerde akciğer fibrozunun şiddetli gelişmesinde, genetik faktörlerin önemli rol oynadığı düşüncesini desteklemektedir.

Ülkemizde büyük bir işçi grubu kömür tozuna maruz kalarak, KİP, ilerleyen masif fibrozis (PMF), silikozis, bronşit ve anfizem gibi bir dizi hastalığa yakalanmaktadır. KİP'e bireysel duyarlıkta, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-6 ve TGF- β gibi sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin aday gen olarak tanımlandığı da bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızın ikinci bölümünde, sitokin genlerindeki tek nükleotid polimorfizmlerin analizi sonuçta, bireysel duyarlılıktaki genotipik farklılıkların ortaya konulması ve de söz konusu hastalık açısından yüksek ve düşük risk gruplarının saptanması bir çalışmamızın bir diğer amacıdır. Ayrıca TNF- α ve IL-1 sitokinlerinin pnömokonyozlu kömür işçilerinin alveolar makrofajlarından artan düzeylerde salındığını gösteren çalışmalardan hareket ile genotipleme deneyleri

sonucunda TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra genlerinde polimorfizm görülen ve görülmeyen bireylerin monositlerinden *in vitro* ortamda kömür tozu stimülasyonunun uygulanıp spontan salıma karşı oluşabilecek değişikliklerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu *in vitro* çalışma, bütünlüğün sağlanması ve özgünlüğün artması açısından önemlidir.

KİP’li kişilerde bireysel farklılıkların önemini araştırılarak ortaya konmasına yönelik olarak planlanan bu çalışma, işçi sağlığı riskinin değerlendirilmesi açısından son derece gerekli ve önemlidir. Bireysel duyarlıkta etnik farklılıkların büyük önemini bulunduğu göz önüne alındığında, Türkiye’de ki kömür işçileri ile ilgili daha önceden yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla, bu çalışma ile elde edilecek olan genotipik ve fenotipik analiz sonuçları, Türk kömür işçilerindeki sitokin profilini ortaya koyacak olması açısından önemli olup çalışmanın özgünlüğünü oluşturmaktadır.

III. Materyal ve Yöntem

III.1. Sitokin, Antioksidan Enzim ve Neopterin Ölçümleri için Oluşturulan Çalışma Grubu

Çalışmada numuneler, yurdumuzda kömür madenciliğinin en yoğun olarak yapıldığı ilimiz olan Ankara’ya 270 km uzaklıktaki Zonguldak’tan toplanmıştır. Hasta grubu; uzun süre kömür madencisi olarak çalışmış, emekli olmuş ve mesleki bir akciğer hastalığı olan KİP hastalığına yakalanmış ve Zonguldak Sosyal Sigortalar Kurumu Göğüs Hastalıkları Hastanesinde yatan 81 hastadan (50 basit pnömokonyozlu, 31 PMF’li) oluşturulmuştur. Buna karşılık kontrol grubu; Türkiye Taşkömürü Kurumu Kozlu Taşkömürü İşletme Müessese Müdürlüğünde çalışan işçiler ve Zonguldak Sosyal Sigortalar Kurumu Göğüs Hastalıkları Hastanesine sağlık kontrolünü yaptırmaya gelen 63 işçiden oluşturulmuştur. Bu işçilere

Çalışma ve sigara ykleri ile respiratuar semptomların da sorulduğu bir anket uygulanmıştır. Sonuçların ayrıntılı biçimde değerlendirilebilmesi amacı ile her bir bireye ait son sağlık durumları, daha önceden varsa geçirdiği hastalıklar, beslenme, kahve ve sigara alışkanlıkları ile gerekli diğer bilgileri içeren “Bilgilendirilmiş gönüllü onay formları” ve anket formları doldurulmuştur. KİP hastalarının akciğer radyografileri incelenmiş ve ILO (International Labour Office) sınıflandırmasına basit pnömokonyozlu (n= 37) ve ilerleyen masif fibrozisli (n=19) hastalar olarak hasta grubu ikiye ayrılmıştır. Bu işlemler tamamlandıktan sonra heparinli kan tüplerine konan kan, idrar numuneleri soğuk ortamda laboratuvarımıza getirilmiştir. Kan numuneleri santrifüj edilerek serum örnekleri ependorflarda toplandı, idrar numuneleri de ependorf tüplere aktarılmış ve analize kadar -80°C’de bekletilmiştir.

BAL sıvılarının toplanması, bronkoskopik kontrole gelen kömür işçilerinin ve KİP hastalarının sonuçlarının değerlendirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. KİP hastalığı teşhisi konmuş hastaların akciğer radyografileri incelenmiş ILO sınıflandırmasına göre basit pnömokonyozlu (n=13) ve ilerleyen masif fibrozisli (n=12) hastalar olarak hasta grubu ikiye ayrılmıştır. Bronkoskopik kontrolde herhangi bir hastalığı bulunmayan 10 kişi de kontrol olarak tespit edilmiştir. BAL numuneleri santrifüj edildikten sonra ependorflara aktarılmış ve analize kadar -80°C’de bekletilmiştir.

Tablo 3.1. Serum sitokin ve antioksidan enzim ölçümü yapılan grubun genel özellikleri

	BP'li hastalar	İMF'li hastalar	Kontrol grubu
Birey sayısı	14	11	27
Yaş (± S.H.)	57,64 ± 2,71	67,72 ± 1,90	50,44 ± 2,61
Maruziyet süresi (yıl) (± S.H.)	26,00 ± 0,79	29,00 ± 1,52	18,21 ± 2,15
Sigara içme durumu (%)			
Evet	64 (%64,3)	18 (%18,2)	70 (%70,4)
Hayır	35 (%35,7)	81 (%81,8)	29 (%29,6)

Tablo 3.2. Serum ve idrar neopterin ölçümü yapılan grubun genel özellikleri

	BP'li hastalar	İMF'li hastalar	Kontrol grubu
Birey sayısı	23	8	26
Yaş (± S.H.)	64,00 ± 8,58	66,50 ± 8,55	56,50 ± 2,63
Maruziyet süresi (yıl) (± S.H.)	26,00 ± 0,79	29,00 ± 1,52	18,21 ± 2,15
Sigara içme durumu (%)			
Evet	26 (%26,1)	50 (%50)	88 (%88,5)
Hayır	73 (%73,9)	50 (%50)	11 (%11,5)

Tablo 3.3. BAL sitokin, antioksidan enzim ve neopterin ölçümü yapılan grubun genel özellikleri

	Bronkoskopik kontrol (+)		Bronkoskopik kontrol (-)
	BP'li hastalar	İMF'li hastalar	Kontrol grubu
Birey sayısı	13	12	10
Yaş (± S,H.)	60,84 ± 4,18	60,83 ± 7,75	51,3 ± 13,34
Maruziyet süresi (yıl) (± S,H.)	24 ± 0,56	27 ± 2,68	12,50 ± 1,23
Sigara içme durumu (%)			
Evet	61 (%61,5)	25 (%25)	10 (%10)
Hayır	38 (%38,5)	75 (%75)	90 (%90)

Sitokin Ölçümü

IL-1 β , IL-6, TGF- β , TNF- α , serum ve BAL örneklerinden ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. Hasta ve kontrollerin serum ve BAL IL-1 β , IL-6 ve TNF- α değerleri ultrahassas ELISA kitleri (Katalog numaraları: R&D systems HSLB50; Biosouce International KHC0064; Biosouce International KHC3014) ile, TGF- β değerleri ise Biosource International'a ait KAC1688 katalog numaralı ELISA kiti ile ölçülmüştür.

Neopterin Ölçümü

Hasta ve kontrollerin serum, idrar ve BAL neopterin değerleri, IBL firmasına ait RE 59321 katalog numaralı ELISA kiti ile ölçülmüştür.

Antioksidan Enzim Ölçümü

Serum ve BAL örneklerinden antioksidan enzimlerden glutatyon peroksidaz, superoksit dismutaz ve katalaz, spektrofotometrik yöntemlerle ölçülmüştür. Ölçümlerde OxisResearch firmasına ait kitlerden (katalog numaraları: 21014, 21042, 21010) yararlanılmıştır.

Kullanılan İstatistiksel Yönelmler

Sitokin, antioksidan enzim ve neopterin ölçüm sonuçlarının analizi SPSS 11.5 programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılık One-way ANOVA testi kullanılarak hesaplandı. Ayrıca sigara içiminin etkisi Pearson Korelasyonu ile incelenmiştir.

III.2.Genotipleme için Çalışma Grubu

Hasta grubu; uzun süre kömür madencisi olarak çalışmış, emekli olmuş ve mesleki bir akciğer hastalığı olan KİP hastalığına yakalanmış ve Zonguldak Sosyal Sigortalar Kurumu Göğüs Hastalıkları Hastanesinde yatan 75 hastadan (45 basit pnömokonyozlu, 30 PMF'li) oluşturulmuştur. Buna karşılık kontrol grubu; 11'i sağlıklı emekli, 88'i ise Türkiye Taşkömürü Kurumu Kozlu Taşkömürü İşletme Müessese Müdürlüğü'ne periyodik olarak sağlık kontrolünü yaptırmaya gelen aktif olarak Kozlu bölgesi madenlerinde çalışan işçiler olmak üzere toplam 99 işçiden oluşturuldu. Hastaların kan numuneleri, tedavi gördükleri Zonguldak Sosyal Sigortalar Kurumu Göğüs Hastalıkları Hastanesinde alınırken, kontrol grubunu oluşturan işçilerin kan numuneleri ise Türkiye Taşkömürü Kurumu Kozlu Taşkömürü İşletme Müessese Müdürlüğü'nde bireylerin onayı alındıktan sonra hekim gözetiminde 10 ml olacak şekilde alındı. Sonuçların ayrıntılı biçimde değerlendirilebilmesi amacı ile her bir bireye ait son sağlık durumları, daha önceden varsa geçirdiği hastalıklar, beslenme, kahve ve sigara alışkanlıkları ile gerekli diğer bilgileri içeren "Bilgilendirilmiş gönüllü onay formları" ve anket formları dolduruldu. Bu işlemler tamamlandıktan sonra heparinli kan tüplerine konan kan numuneleri soğuk ortamda laboratuvarımıza getirildi. Genotipleme deneylerinin ön basamağı olan DNA izolasyonu hiç vakit kaybedilmeden uygulanarak her bir bireyin DNA'ları izole edildi ve genotipleme deneyleri yapılana kadar DNA numuneleri -20⁰ C'de saklandı. Genotipleme deneyleri PCR (Polymerase Chain Reaction) ve RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) teknikleri kullanılarak yapıldı. Genotipleme deneyleri tamamlandıktan sonra TNF- α , IL-1 α , IL-1 β ve IL-1ra genlerinde mutasyona uğrayan ve mutasyon görülmeyen bireyler saptanarak tekrar gruplandırılmış, çalışmanın ikinci kısmı olan kan monositlerinden yukarıda bahsedilen sitokinlerin salınımını karşılaştırmak amacıyla yapılacak olan fenotipleme deneyleri için bu kişilerden doktor gözetiminde 20 ml kan tekrar alınarak 0,5 ml heparin içeren 50 ml'lik falkon

tüpleri içinde aşırı olmamak koşuluyla soğuk ortamda laboratuvarımıza taşınmış ve hiç vakit kaybedilmeden fenotipleme deneyleri uygulanmıştır. Bu deneyde mutant olanlar ve olmayanlar iki gruba ayrılmış, bunlar mutant işçi ile mutant olmayan işçiler olarak gruplandırılmıştır. Kan monositlerinden sitokin salınım düzeyleri ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi ile ölçülmüştür.

Tablo 3.4. Genotipleme yapılan bireylerin demografik dataları

	BP'li hastalar	İMF'li hastalar	Kontrol grubu
Birey sayısı	45	30	99
Yaş (\pm S.H)	72,31 \pm 6,01	70,35 \pm 4,82	41,58 \pm 8,85
Maruziyet süresi (yıl) (\pm S.H)	26,82 \pm 6,72	24,71 \pm 6,40	11,67 \pm 7,81
Sigara içme durumu(%)			
Evet	-	-	53 (%53,5)
Bırakmış	30 (%66,7)	21 (%70,0)	30 (%30,3)
Hayır	15 (%33,3)	9 (%30,0)	16 (%16,2)

DNA İzolasyonu

Kontrol ve hasta grubundan alınmış olan kanlar laboratuvarımıza getirili getirilmez hemen DNA izolasyonuna geçildi. Bireylerin DNA'larının izolasyonu için Promega firmasının üretmiş olduğu Wizard Genomic DNA Purification kiti kullanıldı.

Öncelikle 1,5 ml'lik eppendorf tüpün içine 900 μ l Cell Lysis Çözeltisi konup üzerine 300 μ l kan ilave ederek 5-6 kez çevirip iyice karışmaları sağlandı. Tüp, kırmızı kan hücrelerinin parçalanması amacı ile rotatöre yerleştirilerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 14 000 g'de 20 saniye santrifüj edildikten sonra dipteki beyaz pellete zarar vermeden süpernatant kısmı ortamdaki uzaklaştırıldı. Pelletin zarar görmemesi için dipte 10-20 μ l süpernatant bırakıldı. Beyaz kan hücrelerinin tekrar süspanse olması için 10-15 saniye vorteks ile karıştırıldı. 300 μ l Nuclei Lysis Çözeltisi eklendikten sonra mikropipet yardımıyla 5-6 kez çekilip bırakılır. Çözeltinin viskoz hale gelmesi beyaz kan hücrelerinin parçalandığını

gösterir. Bu karışıma 100 µl Protein Çöktürme Çözeltisi ilave edilip 20 saniye süreyle çözeltinin iyice karışması amacıyla yüksek hızda vorteks ile karıştırıldı. 14 000 g'de 3 dakika santrifüjleme yapıldıktan sonra çökmüş olan proteinler beyaz bir pellet halinde gözlendi. Süpernatant kısmı çökeltideki protein karışmayacak şekilde dikkatli bir biçimde içine 300 µl izopropanol konulan yeni bir eppendorf tüpe aktarıldı. Proteinin de alınması elde edilecek DNA'nın saflığını bozacağından bir miktar süpernatant alınmayarak bu kontaminasyon riski en aza indirildi. Eppendorflar belli bir hızda aşağı yukarı çevrilerek iyice karıştırıldı ve DNA'nın ince beyaz iplikler halinde görünmesi sağlandı. 1 dakika 14 000 g'de santrifüjleme yapıldıktan sonra süpernatant ortamdaki uzaklaştırıldı, üzerine DNA'yı yıkamak amacı ile 300 µl %70'lik etanol ilave edildi ve 1 dakika 14 000 g'de santrifüj yapıldı. Dipteki DNA pelleti zarar görmeyecek şekilde süpernatant ortamdaki alınarak uzaklaştırıldı. Etanolü eppendorflardan dikkatli bir şekilde uzaklaştırdıktan sonra temiz bir süzgeç kağıdının üzerine bu eppendorflar ters bir şekilde çevrildi ve 15 dakika boyunca DNA pelletlerinin hava ile temas edip iyice kurumaması beklendi. Bu işlemden sonra tüplere 100 µl DNA Rehidratasyon Çözeltisi ilave edildi ve bir gece boyunca oda sıcaklığında bekletildikten sonra genotipleme deneyleri yapılmaya kadar -20⁰ C'de saklandı.

Genotiplerin Belirlenmesi

Genotipleme deneyleri, PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) tekniği uygulanarak yapılmıştır. TNF- α (-308) (Tsuchiya et al, 2004), TNF- α (-238), IL-1 α (+4845), IL-1 β (+3953), IL-1ra (+2018) (Yucesoy ve ark., 2001), IL-6 (-174), (Trevilatto ve ark., 2003) and TGF- β (codon 10) (Ohtsuka ve ark., 2002) bölgelerindeki polimorfizmler minör değişikliklerle Tablo 3.5 ve Tablo 3.6 da belirtildiği gibi yapılmıştır.

Tablo 3.5. Çalışılan sitokinlere ait PCR bileşenleri

PCR bileşenleri	TNF- α (-308)	TNF- α (-238)	IL-1 α (+4845)	IL-1 β (+3953)	IL-1 ra (+2018)	IL-6 (-174)	TGF- β (Codon 10)
PCR tampon	10X	10X	10X	10X	10X	10X	10X
MgCl ₂	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM
dNTP karışım	100 μ M	100 μ M	100 μ M	100 μ M	100 μ M	100 μ M	100 μ M
primer (ileri)	80 pmol	100 pmol	65 pmol	65 pmol	50 pmol	80 pmol	65 pmol
primer (geri)	80 pmol	100 pmol	65 pmol	65 pmol	50 pmol	80 pmol	65 pmol
Taq polimeraz	5000 U	5000 U	5000 U	5000 U	5000 U	5000 U	5000 U
DNA	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng
Toplam hacim	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l

Tablo 3.6. PCR primer dizilimleri

Sitokinler	Primerler
TNF- α (-308)	(5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3') (ileri) (5'-TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG-3') (geri)
TNF- α (-238)	(5'-GAA GCC CCT CCC AGT TCT AGT TC-3'), (ileri) (5'-CAC TCC CCA TCC TCC CTG GTC-3') (geri)
IL-1 α (+4845)	(5'-ATG GTT TTA GAA ATC ATC AAG CCT AGG GCA-3') (ileri) (5'-AAT GAA AGG AGG GGA GGA TGA CAG AAA TGT-3') (geri)
IL-1 β (+3953)	(5'-CTC AGG TGT CCT CGA AGA AAT CAA A-3') (ileri) (5'-GCT TTT TTG CTG TGA GTC CCG-3') (geri)
IL-1ra (+2018)	(5'-CTA TCT GAG GAA CAA CCA ACT AGT AGC-3') (ileri) (5'-TAG GAC ATT GCA CCT AGG GTT TGT-3') (geri)
IL-6 (-174)	(5'-TTG TCA AGA CAT GCC AAG TGC T-3') (ileri) (5'-GCC TCA GAG ACA TCT CCA GTC C-3') (geri)
TGF- β (codon 10)	(5'-TTC CCT CGA GGC CCT CCT A-3') (ileri) (5'-GCC GCA GCT TGG ACA GGA TC-3') (geri)

Periferik Kandan Monosit İzolasyonu

Periferik kandan monositlerin izolasyonu işlemi Strober (1994)'in yöntemine göre uygulanmıştır. Deneye geçmeden önce deneyde gereken inaktive serum hazırlamak için bir şişe fetal calf serum çalkalamalı su banyosunda 57⁰C'de 30 dakika inaktive edildi.

1/40 heparin içeren falkon tüpe alınmış olan 20 ml'lik kan örneği üzerine 1/1 oranında serum fizyolojik çözeltisi ilave edilerek dilüe edildi. 1/1 oranında dilüe edilen karışım, 50 ml'lik falkon tüpün içine eklenen 15 ml ficoll üzerine yavaşça yayıldı. 1500 rpm'de 30 dakikalık bir santrifüj işlemi uygulandı. Periferik kan mononükleer hücrelerini içeren "buffy coat" fazı steril bir Pasteur pipeti yardımıyla dikkatlice toplanarak 15 ml'lik steril falkon tüpüne aktarıldı. Yaklaşık olarak 5 ml toplanan buffy coat üzerine 14 ml çizgisine kadar serum fizyolojik çözeltisi ilave edildi ve tüp el yardımıyla ters düz edilerek buffy coat ile serum fizyolojik çözeltisinin iyice karışması sağlandı. 1800 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant fazı ortamdan uzaklaştırıldı. Hücre çökeltisi üzerine 10 ml serum fizyolojik çözeltisi ilave edilip 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Süpernatant atılıp tekrar 10 ml serum fizyolojik çözeltisi kondu ve 1500 rpm'de 10 dakika tekrar santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra RPMI-1640 ile hacmi 2 ml'ye tamamlanıp mikropipet yardımı ile karıştırılarak homojenize edildi. Bu hücre süspansiyonundan 20 µl alındı ve 20 µl %0,4'lük tripan mavisi boyası ile karıştırıldıktan sonra Thoma lamında 40X büyütmede ışık mikroskopunda hücre sayısı ve canlılığı incelendi. Bu arada daha önceden inaktive edilen fetal calf serumdan konsantrasyonu %10 olacak şekilde RPMI-1640 ile karıştırılarak %10 inaktive serum içeren RPMI-1640 çözeltisi hazırlandı ve bu çözelti kullanıldı. Hücreler sayıldıktan sonra, hücre süspansiyonunun konsantrasyonu %10 inaktive serum içeren RPMI-1640 içinde 3×10^6 hücre/ml'ye ayarlandı. Daha sonra bu hücre süspansiyonu flaska aktarıldı ve flask %5 CO₂'li nemli ortamda, 37⁰C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. Bundan sonra tripsinizasyon yöntemi kullanılarak deneye devam edildi. 4 saat sonunda flask CO₂ inkübatöründen alındı, süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra 37⁰C sıcaklıktaki RPMI-1640 çözeltisinden 5 ml ilave edilerek 1 kez yıkandı. Yine aynı sıcaklıkta 5 ml serum fizyolojik çözeltisi ile yıkama yapıldı. 1X konsantrasyonuna ayarlanmış Tripsin EDTA çözeltisinden 5 ml ilave edildi. 37⁰C'de 4 dakika bekledikten sonra flaskın yan taraflarına el

ile vurularak hücrelerin yapıştığı yerden ayrılmaları sağlandı. Kontrol amacı ile mikroskopta inceleme yapıldı. Eğer bütün hücreler ayrılmamış ise 3-4 dakika bekleyip tekrar yan taraflarından flaska vurarak bütün hücreler ayrılana kadar bu işleme devam edilir. Ayrılma sağlandıktan sonra flask içindeki çözelti tüpe aktarıldı, 4⁰C'deki serum fizyolojik çözeltilisinden 10-15 ml eklenip 1500 rpm'de 5 dakika 4⁰C'de santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlandı. Çökelti üzerine 10 ml serum fizyolojik çözeltilisi ilave edilerek aynı şartlarda tekrar yıkama işlemi yapıldı. Süpernatant kısım uzaklaştırıldıktan sonra çökelti üzerine 1ml %10'luk inaktive serumlu RPMI-1640 çözeltilisinden konarak iyice karıştırıldı. 4 sitokin ölçümü yapılacağından dolayı toplam hacim olan 1 ml, 250 µl'lik 4 eşit kısma bölündü ve ELISA yöntemi ile ölçümler yapılana kadar -20⁰C'de saklandı.

Monositlerden Sitokin Salınım Düzeylerinin Ölçümü

Monositlerden TNF- α , IL-1 α , IL-1 β ve IL-1ra sitokinlerinin salınım düzeyleri ELISA kitleri kullanılarak ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. Her bir sitokin için her bir numuneden spontan salınım, aktif kömür ile stimülasyon sonucu oluşan salınım ve LPS ile stimülasyon sonucu meydana gelen salınım düzeyleri ölçülmüştür.

Bunun için her bir bireyin 250 µl'lik monosit çözeltilisi üçe bölünmüş, birinci kısım spontan salınım için bırakılırken ikinci kısma 1µg/ml LPS (Kim ve ark., 2002) ve üçüncü kısma ise 5 mg/ml aktif kömür (Kim ve ark., 1999) ilave edilerek 37⁰C'de %5 CO₂'li ortamda 18 saat inkübasyona bırakıldı ve bu süre sonunda ELISA yöntemiyle ölçüme geçildi.

Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Çalışmamızın bu bölümündeki tüm istatistiksel analizler “SPSS for Windows” programının 11.0 sürümü ile yapılmıştır. Deney sonuçlarının ortalamaları \pm standart hata (SH) ile belirtilmiştir. İncelenen sitokin polimorfizmleri için genotip dağılımları ve alel frekansları hesaplanmıştır. KİP gelişiminde sitokin polimorfizmlerinin gerek hastalık geneli ve gerekse de hastalık şiddeti ile ilişkisinin olup olmadığı ise χ^2 Testi ile hesaplanmış ve OR değerleri saptanarak %95 güvenlik aralığı (confidence interval: CI) değerleri ile birlikte belirtilmiştir. Mutant ve mutant olmayan işçilerin monositlerinden sitokin salınım ölçümleri sonuçları ise t-testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Sigara içimi ile hastalık gelişimi arasındaki ilişki ise Pearson İlişki Testi ile hesaplanmıştır.

IV. Analiz ve Bulgular

Sitokin Bulguları

Hasta ve kontrol grubunun serum ve BAL sitokin değerleri Tablo 4.1 ve 4.2’de gösterilmektedir. Tüm değerler ort \pm S.H. olarak verilmektedir.

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubunun serum sitokin değerleri

Gruplar	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	TGF- β (pg/mL)
Kontrol grubu	1,58 \pm 0,06	6,87 \pm 0,27	1,10 \pm 0,16	49,39 \pm 6,74
BP	1,96 \pm 0,14 ^a	17,11 \pm 1,09 ^a	2,10 \pm 0,24 ^a	67,91 \pm 11,44
İMF	2,18 \pm 0,14 ^a	19,89 \pm 1,08 ^{a,b}	3,75 \pm 0,73 ^{a,c}	58,34 \pm 9,21

^a p< 0,01; kontrol grubu ile kıyaslandığında

^b p< 0,05; BP grubu ile kıyaslandığında

^c p< 0,01; BP grubu ile kıyaslandığında

Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grubunun BAL sitokin değerleri

Gruplar	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	TGF- β (pg/mL)
Kontrol grubu	1,28 \pm 0,27	11,22 \pm 0,59	6,71 \pm 0,78	41,92 \pm 7,86
BP	4,69 \pm 0,61 ^a	25,54 \pm 1,68 ^a	28,64 \pm 1,83 ^a	75,33 \pm 12,89 ^c
İMF	9,48 \pm 0,46 ^{a,b}	32,26 \pm 1,03 ^{a,b}	43,64 \pm 1,29 ^{a,b}	65,88 \pm 9,91

^a p < 0,01; kontrol grubu ile kıyaslandığında

^b p < 0,01; BP grubu ile kıyaslandığında

^c p < 0,05; kontrol grubu ile kıyaslandığında

Neopterin Bulguları

Hasta ve kontrollerin serum, idrar ve BAL neopterin değerleri Tablo 4,3’de gösterilmiştir,

Tablo 4.3. Hasta ve kontrollerin serum, idrar ve BAL neopterin değerleri

Gruplar	Serum neopterin (nmol/L)	İdrar neopterin (μ mol/mol creatinine)	BAL neopterin (nmol/L)
Kontrol grubu	5,30 \pm 0,47	140,00 \pm 5,43	6,26 \pm 1,71
BP	10,72 \pm 0,98 ^a	235,17 \pm 7,40 ^b	22,67 \pm 2,90 ^c
İMF	14,08 \pm 3,85 ^a	256,00 \pm 9,42 ^b	41,67 \pm 8,68 ^b

^a p < 0,05; kontrol grubu ile kıyaslandığında

^b p < 0,01; kontrol grubu ile kıyaslandığında

^c p < 0,05 kontrol grubu ve İMF grubu ile kıyaslandığında

Antioksidan Enzim Bulguları

Hasta ve kontrollerin serum ve BAL antioksidan enzim değerleri Tablo 4.4. ve 4.5.de gösterilmiştir,

Tablo 4.4. Hasta ve kontrollerin serum antioksidan enzim değerleri

Gruplar	GPx (ng/mL)	Katalaz (U/mL)	SOD (U/mL)
Kontrol	9,51 \pm 1,30	48,78 \pm 4,79	0,61 \pm 0,67
BP	28,42 \pm 5,43 ^a	89,73 \pm 8,71 ^a	1,51 \pm 0,66 ^a
İMF	42,90 \pm 6,35 ^{a,b}	72,27 \pm 18,43	2,18 \pm 0,20 ^c

^a p < 0,01; kontrol grubu ile kıyaslandığında

^b p < 0,05; BP grubu ile kıyaslandığında

^c p < 0,01; BP grubu ile kıyaslandığında

Tablo 4.5. Hasta ve kontrollerin BAL antioksidan enzim değerleri

Gruplar	GPx (ng/mL)	Katalaz (U/mL)	SOD (U/mL)
Kontrol	132,37 ± 13,27	81,95 ± 2,80	0,96 ± 0,80
BP	105,61 ± 14,49	83,34 ± 2,30	1,57 ± 0,56 ^a
İMF	126,97 ± 11,77	90,53 ± 4,99	2,43 ± 0,13 ^{a,b}

^a p< 0,01; kontrol grubu ile kıyaslandığında

^b p< 0,01; BP grubu ile kıyaslandığında

Sigara kullanımının sitokin, antioksidan enzim ve neopterin salınımına etkisi

Sigara kullanımının sitokin salınımına etkisi, her üç grubun sigara içen ve içmeyen bireylerinin BAL ve serum sitokin değerlerinin ayrı ayrı karşılaştırılması ile araştırılmış ve sonuçta sadece BAL IL-1 seviyeleri İMF hastalarında sigara içimi ile istatistiksel olarak artmış bulunmuş (p<0,01). diğer düzeylere herhangi bir etki saptanmamıştır, Sigara kullanımının antioksidan enzim düzeylerine etkisi de araştırılmış ve sadece serum SOD düzeyleri sigara içen İMF hasta grubunda sigara içmeyenlere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek çıkmıştır (p<0,01), Sigara kullanımı ile neopterin salınımı arasında ise herhangi bir ilişki saptanmamıştır.

Genotipleme Bulguları

Kontrol ve hasta gruplarındaki alel frekanslarının dağılımına ait veriler Tablo 4.6'te belirtilmiştir.

Tablo 4.6. Kontrol ve hasta gruplarındaki alel frekanslarının dağılımı

Allel	Allel frekansları						
	TNF- α (-308)	TNF- α (-238)	IL-1 α (+4845)	IL-1 β (+3953)	IL-1ra (+2018)	IL-6 (-174)	TGF- β (codon 10)
Kontrol grubu							
1	0,68	0,97	0,80	0,53	0,65	0,62	0,61
2	0,32	0,03	0,20	0,47	0,35	0,38	0,39
Hasta grubu							
1	0,61	0,91	0,79	0,48	0,60	0,69	0,45
2	0,39	0,09	0,21	0,52	0,40	0,31	0,55

Tablo 4.6'te belirtildiği gibi IL-6 hariç tüm polimorfizmlerdeki alel dağılım profili yaklaşık olarak aynıdır. IL-6 da, alel 1 frekansı hastalarda kontrollere göre artmıştır. Özellikle TNF- α (-238) de, allele 2 frekansları diğer sitokinlere göre alel 1 ile karşılaştırıldığında en düşük seviyededir. Bunun yanısıra, hastalardaki alel 2 frekansları kontrol grubuna göre 3 kat daha yüksektir. IL-1 β 'de, alel 2 frekansları diğerlerine göre en üst seviyededir. IL-6 (-174) hariç diğer sitokinlerde alel 2 frekansı hastalarda kontrollere göre yükselme gözlenmiştir. İlginç olarak IL-1 α (+4845) polimorfizminde, hem kontrol hem de hastalarda ki alel frekansı oranları neredeyse birbirine eşit düzeyde saptanmıştır, TGF- β 'da ise alel 1'in hastalarda kontrollere göre diğer sitokinlere oranla önemli bir şekilde azalmıştır.

Tablo 4.7'te, çalışılan sitokinlerin genotipik dağılımları gösterilmiştir, Tablodan da görüldüğü üzere, TNF- α (-238) sitokin gen polimorfizmi, KİP oluşumu ve gelişimi üzerine diğer sitokin polimorfizmlerine göre anlamlı olarak etki göstermiştir. Bu varyant, KİP oluşumunda 2,95 kat, basit pnömokonyoz gelişiminde 3,35 kat ve PMF gelişiminde ise 3,88 kat risk oluşturmaktadır. TNF- α (-308) gen polimorfizminde ise dikkati çeken olay bu varyantın sadece hastalık şiddetini etkilemiş olmasıdır (PMF gelişiminde OR: 2,38 kat risk). Tüm KİP hastalarında, anlamlı olmayan 1,37 katlık bir risk görülmüştür. IL-1 α (+4845), IL-1 β (+3953) ve IL-1 ra (+2018) varyantları ne hastalığın gelişimi ne de şiddeti üzerinde bir etki göstermemişlerdir. Tüm bu verilere karşın IL-6 (-174) polimorfizmi, KİP oluşumu ve şiddeti üzerinde enflamatuar etkilerinin tersine koruyucu bir etki göstermiştir.

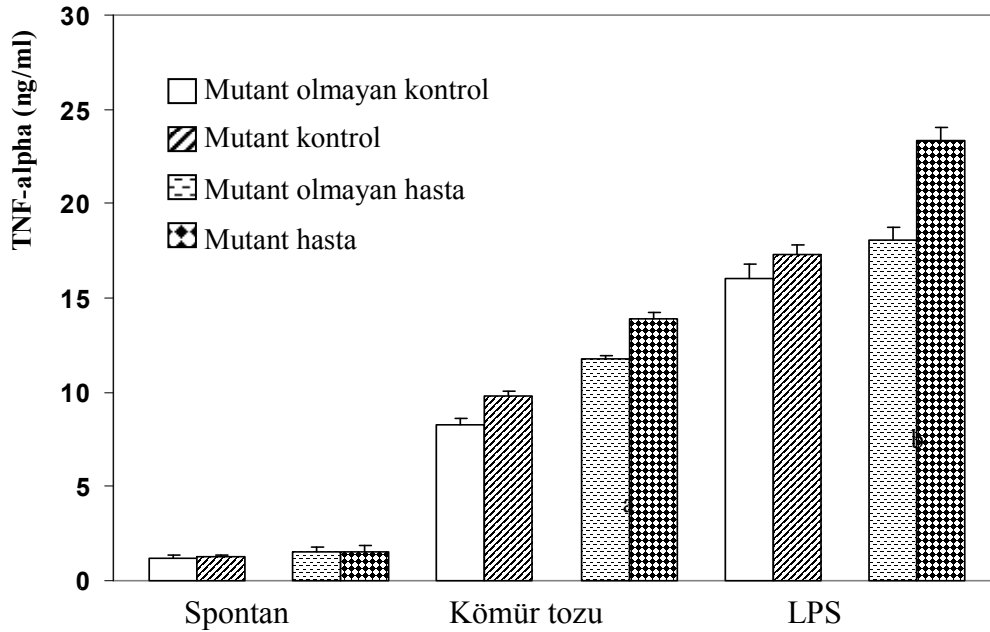
Tablo 4.7. Sitokinlerin genotipik dağılımları

	1/1 alleli (%)	1/2 ve 2/2 alleli (%)	n	OR* (CI)
TNF-α (-308)				
Kontrol	50 (50,5)	49 (49,5)	99	1,00
Basit pnömokonyozlular	23 (51,1)	22 (48,9)	45	0,97 (0,48-1,98)
PMF'li hastalar	9 (30,0)	21 (70,0)	30	2,38 (1,00-5,71) ^a
Tüm hastalar	32 (42,7)	43 (57,3)	75	1,37 (0,75-2,51)
TNF-α (-238)				
Kontrol	93 (93,9)	6 (6,1)	99	1,00
Basit pnömokonyozlular	37 (82,2)	8 (17,8)	45	3,35 (1,09-10,32) ^a
PMF'li hastalar	24 (80,0)	6 (20,0)	30	3,88 (1,15-13,09) ^a
Tüm hastalar	61 (81,3)	14 (18,7)	75	2,95 (1,05-8,28) ^a
IL-1α (+4845)				
Kontrol	65 (65,6)	34 (34,4)	99	1,00
Basit pnömokonyozlular	30 (66,7)	15 (33,3)	45	0,96 (0,45-2,02)
PMF'li hastalar	19 (63,3)	11 (36,7)	30	1,11 (0,47-2,59)
Tüm hastalar	49 (65,3)	26 (34,7)	75	1,01 (0,54-1,91)
IL-1β (+3953)				
Kontrol	20 (20,2)	79 (79,8)	99	1,00
Basit pnömokonyozlular	9 (20,0)	36 (80,0)	45	1,01 (0,42-2,44)
PMF'li hastalar	6 (20,0)	24 (80,0)	30	1,01 (0,37-2,81)
Tüm hastalar	15 (20,0)	60 (80,0)	75	1,01 (0,48-2,14)
IL-1α (+2018)				
Kontrol	40 (40,4)	59 (59,6)	99	1,00
Basit pnömokonyozlular	17 (37,8)	28 (62,2)	45	1,12 (0,54-2,30)
PMF'li hastalar	11 (36,7)	19 (63,3)	30	1,17 (0,50-2,72)
Tüm hastalar	28 (37,3)	47 (62,7)	75	1,14 (0,61-2,11)
IL-6 (-174)				
Kontrol	33 (33,3)	66 (66,7)	99	1,00
Basit pnömokonyozlular	24 (53,3)	21 (46,7)	45	0,44 (0,21-0,90) ^b
PMF'li hastalar	17 (56,7)	13 (43,3)	30	0,38 (0,17-0,88) ^b
Tüm hastalar	41 (54,7)	34 (45,3)	75	0,42 (0,22-0,77) ^b
TGF-β (codon 10)				
Kontrol	27 (27,3)	72 (72,7)	99	1,00
Basit pnömokonyozlular	12 (26,7)	33 (73,3)	45	1,03 (0,47-2,28)
PMF'li hastalar	6 (20,0)	24 (80,0)	30	1,50 (0,55-4,07)
Tüm hastalar	18 (24,0)	57 (76,0)	75	1,19 (0,60-2,37)

^a p<0,001 kontrol grubu ile kıyaslandığında^b p<0,05 kontrol grubu ile kıyaslandığında

Şekil 4.1’de tüm gruplarda kan monositlerinden kömür tozu ve LPS stimülasyonu ve stimülasyonsuz spontan salınan TNF- α sitokininin profili gösterilmiştir. Sitokin salınımının stimülasyonla arttığı açıkça gözlenmiştir. LPS stimülasyonu, sitokin salınımını kömür tozuna göre daha fazla etkilemiştir. Mutant hastalarda salınan TNF- α miktarının mutant olmayan hastalara ve mutant kontrol grubuna göre anlamlı olduğu bulunmuştur. TNF- α verilerinin aksine IL-1 α , β and ra polimorfizmlerinin salınım ile anlamlı bir ilişkisi bulunmamıştır (Tablolar gösterilmemiştir).

Ayrıca, sigara içiminin KİP hastalığının oluşumu ve gelişimi üzerindeki olası etkisi araştırılmış fakat istatistiksel açıdan anlamlı bir sonuç bulunmamıştır.



Şekil 4.1. Tüm gruplarda kan monositlerinden kömür tozu ve LPS stimülasyonu ve stimülasyonsuz spontan salınan TNF- α sitokininin profili

^a $P < 0,05$ Kömür tozu ile stimüle olan mutant hastalar ile hem mutant kontrol hem de mutant olmayan hastalar arasında sitokin seviyelerinin karşılaştırılması ^b $P < 0,01$ LPS ile stimüle olan mutant hastalar ile hem mutant kontrol hem de mutant olmayan hastalar arasında sitokin seviyelerinin karşılaştırılması

V. Sonuç ve Öneriler

Kömür, 70 farklı ülkede madenciliği yapılan, elektrik üretiminde, ısınmada, çelik üretiminde ve kimyasal proseslerde yaygınca kullanılan önemli bir madendir. Kömür tozu maruziyetinin en önemli kaynağı, yeraltı kömür madenciliği sırasında oluşan kömür madeni tozudur. Ülkemiz için de kömür madeni çok büyük bir önem taşımaktadır, Türkiye Kömür İşletmeciliği madenlerde tozla mücadele etmek için çeşitli önlemler almıştır. Ülkemizde de kömür işçilerinin sağlığını korumak ve kömür tozu ile mücadele etmek amacı ile Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı, “Maden ve Taşocakları İşletmelerinde ve Tünel Yapımında Tozla Mücadeleyle İlgili Yönetmelik” adlı yönetmeliği çıkarmıştır. Ancak buna rağmen kömür tozuna maruziyet çeşitli solunum yolu hastalıklarına neden olmaktadır. Kömür tozuna maruziyet sonucu ortaya çıkan en önemli hastalık olan KİP’un patofizyolojik mekanizması halen tam açıklanamamıştır. Dolayısı ile KİP tedavisinde hastalığa spesifik bir terapötik uygulama yapılamamaktadır. Fibrotik prosesi önlemek için yapılan glukokortikoid tedavisi ve sitotoksik ajan tedavisi genellikle hastalığın gelişimini durdurmakta yeterli olmamaktadır. Hastalığın patofizyolojik mekanizmasının ortaya çıkması yeni tedavi yaklaşımlarına da olanak sağlayacaktır (Goldstein ve Fine, 1995).

Bu çalışmada elde edilen bulgular sonucunda serum ve BAL IL-1 β , IL-6 ve TNF- α ’nın hastalarda kontrollere oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek çıkması, bu sitokinlerin hastalık gelişimine katkıda bulunacak şekilde pro-enflamatuar bir rol oynadığını göstermektedir. İlerleyen masif fibrozisli hastaların serum IL-6 ve TNF- α ve BAL IL-1 β , IL-6 ve TNF- α seviyelerinin basit pnömokonyozlu hastalara göre anlamlı olarak yüksek olması ayrıca hastalığın klinik şiddetinin artmasında da rol oynadığını düşündürmektedir. Serum ve BAL TGF- β düzeyleri ise ilerleyen masif fibrozisli hastalarda kontrol grubuna ve BP’li

hastalara göre anlamlı bir şekilde olmasa da düşük bulunmuştur. BP'li hastaların BAL TGF- β düzeyleride kontrollerle kıyaslandığında anlamlı bir şekilde artmış bulunmuştur. Bu bulgular TGF- β 'nın fibrotik özelliğinin konsantrasyona göre değiştiğini doğrulamaktadır. TGF- β düşük konsantrasyonlarda fibroblastlar üzerine stimüle edici bir etki gösterirken, yüksek konsantrasyonlarda inhibe edici bir etki göstermektedir. Ayrıca TGF- β 'nın sıklıkla anti-enflamatuar özellik gösterdiği de düşünülebilir.

KİP patolojisinde oksidan ve antioksidan mekanizma arasındaki dengenin oksidan yönünde bozulması önemlidir. Bu nedenle kontrol, basit pnömokonyoz ve ilerleyen masif fibrosizli hastalardan oluşan çalışma grubunda antioksidan enzim düzeyleri ölçülmüştür. Serum GPx ve SOD enzim düzeyleri BP ve İMF'li hastalarda kontrollere kıyasla anlamlı bir şekilde artmış bulunmuştur. İMF'li hastalarda da BP'li hastalarla kıyaslandığında anlamlı olmasa da 1,5 kat artmış bulunmuştur. Bu durum hastalığın gelişiminde ROT'lerinin önemini göstermektedir, BAL GPx düzeyi kontrollerde, BP ve İMF'li hastalar oranla anlamlı olmasa da yüksek bulunmuştur. Bu durum hastalık oluşuktan sonra antioksidan enzim oksidan dengesinin reaktif oksijen radikali yönüne kaydığını göstermektedir. BAL katalaz düzeyleri üç grupta da birbirine yakın bulunmuştur. BAL SOD düzeyi ise BP ve İMF hastalarında, kontrollere oranla anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur, bu durum hastalık halinde ve gelişiminde süperoksit radikalinin ortamda hala yüksek miktarlarda bulunduğunu göstermektedir.

Sigara içimi ile sitokin salımı ve antioksidan enzim salımı arasında bir ilişki olup olmadığı da incelenmiş ve sonuçta sadece İMF'li hastalarda sigara içiminin BAL IL-1 ve SOD ve serum SOD düzeyini arttırdığı bulunmuştur.

Ayrıca hücrel immün aktivasyonun bir biogöstergesi olan neopterin ölçümü de idrar, serum ve BAL sıvılarında yapılmıştır. Günümüzde, bir çok çalışma immün sistemi ve oksidatif stres etkileşmesinin bir çok akciğer hastalığı ile ilişkisinin olabileceğini işaret etmektedir. Malign ve otoimmün hastalıklar, Alzheimer hastalığı, kalp yetmezliği, enfaktüs gibi hastalıklarda vücut sıvılarında neopterin seviyelerinin yükseldiğine dair bir çok çalışma olsa da, pulmoner hastalıklara dair sadece birkaç çalışma vardır. Bizim çalışmamızda BP ve İMF li hastaların serum ve idrar düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulunmuştur. Ayrıca serum ve idrar neopterin düzeyleri arasında iyi bir korelasyon da gözlenmiştir. Gruplar arasında neopterin düzeylerinin karşılaştırılması idrar düzeyinin serum düzeyinden daha anlamlı olduğunu göstermiştir. Çünkü BP ve İMF hastalarının serum düzeyleri normal limitlerin üzerinde iken (>10 nmol/L), idrar neopterin düzeyleri, normal değerler dahilinde (50-250 μ mol/mol kreatinin) bulunmuştur. Bu nedenle serum neopterin düzeyleri, KİP oluşumu için daha uygun bir biogösterge denebilir. Ayrıca bir çok malign hastalıkta neopterin konsantrasyonu hastalığın derecesi ile korelasyon gösterebilir. Biz de neopterin düzeylerinin ölçümünün hastalığın ilerlemesinde de bir biogösterge olup olmadığını anlamak için BP ve İMF hastalarının serum ve idrar düzeylerini karşılaştırdık. Kontrollerle kıyasla anlamlı olmasa da BP hastalarında 2 kat, İMF hastalarında da 3 kat fazla bir artış gözlenmiştir. Ayrıca BAL neopterin düzeyleri İMF hastalarında, BP ve kontrol grubu ile kıyaslandığında da artmış miktarlarda bulunmuştur. Lokal oluşumu gösterdiği için BAL neopterin düzeyleri, KİP nin immün aktivasyonunun derecesini ölçmek için iyi bir gösterge olabilir. Benzer olarak Mohammed ve ark. (2001), BAL neopterin düzeylerinin tüberkülozlu hastalarda hastalık şiddetini de gösterebileceğini bulmuşlardır. Sigara içimi ile neopterin salımı arasında bir ilişki olup olmadığı da araştırılmış ve herhangi bir etki gözlenmemiştir. Sonuçta verilerimiz neopterin KİP deki hücrel immün aktivasyonunu faydalı bir biogösterge olabileceğini göstermektedir. BAL neopterin düzeyleri

hem immün aktivasyonu hem de hastalık şiddetini anlamak için faydalı olabilir. Ayrıca serum neopterin düzeylerinde KİP de klinik semptomların yoksunluğunda da biogösterge olarak kullanılabilir. Neopterin spesifik bir biogösterge olmamasına rağmen, stabilitesi, hassaslığı ve biyolojik sıvılardan kolayca tespit edilebilmesi nedeni ile KİP'un teşhis ve tedavisinde önemli olabilir.

KİP'lu kişilerde bireysel farklılıkların önemini araştırılarak ortaya konmasına yönelik olarak planlanan çalışmamızın ikinci bölümü, işçi sağlığı riskinin değerlendirilmesi açısından son derece gerekli ve önemlidir. Bireysel duyarlılıkta etnik farklılıkların büyük önemini bulunduğu göz önüne alındığında, Türkiye'de ki kömür işçileri ile ilgili daha önceden yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu çalışma ile elde edilen genotipik ve fenotipik analiz sonuçları, Türk kömür işçilerindeki sitokin profilini ortaya koymaktadır. Genotipleme deneyleri sonucunda çalışılan sitokinlerin genlerinde mutasyon görülen ve görülmeyen işçilerin monositlerinden in vitro ortamda kömür tozu ve LPS stimülasyonu uygulanıp, spontan salınımına karşı oluşabilecek değişikliklerin değerlendirilmesi ile çalışmanın bütünlüğü sağlanmıştır. Genotipleme sonrası mutant ve mutant olmayan işçilerin saptanıp monositlerden sitokin salınımının ölçülmesine dayanan fenotipik analizlerin yapıldığı başka bir çalışmanın bulunmaması, bu çalışmanın özgünlüğünü arttırmaktadır. TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-6 ve TGF- β sitokin genlerindeki polimorfizmlerin analizi yapılarak bireysel duyarlılıktaki genotipik farklılıkların ortaya konması ve KİP açısından yüksek ve düşük risk gruplarının saptanmasına olanak tanımıştır. Özellikle TNF- α (-238) polimorfizminin -308 polimorfizmine oranla hem hastalık genelinde hem de PMF'li hastalarda KİP gelişiminde daha etkili olduğu, hastalık geneli incelendiğinde TNF- α (-238) ve IL-1 β (+3953) polimorfizminin diğer sitokinlere oranla KİP gelişiminde fazla rol oynarken, hastalık şiddeti açısından incelendiğinde PMF'li hastalarda özellikle TNF- α (-238),

TGF- β (Kodon 10) ve TNF- α (308) gen polimorfizmlerinin KİP gelişimi riskini arttırdığı, BP hastalarında ise özellikle IL-1 β (+3953), IL-1 α (+4845) ve IL-1ra (+2018) gen polimorfizmlerinin hastalık gelişimi riskini arttırdığı sonucuna varılmıştır. In vitro ortamda kan monositlerinden TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra sitokinlerinin salınımının ölçülmesi deneyleri sonucu özellikle TNF- α sitokin polimorfizminin bu sitokin monositlerden salınan düzeyleri üzerine anlamlı bir etkisi olduğu gözlenmiştir. Çalışma kapsamında olan tüm bireylerin sigara kullanım durumlarının KİP gelişimi üzerinde ve monositlerden sitokin salınım düzeyleri arasındaki ilişki incelenmiş ancak herhangi bir anlamlı ilişki bulunmamıştır. Özetle çalışmanın bu bölümü, ülkemizdeki kömür işçilerinde TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-6 ve TGF- β sitokin gen polimorfizmlerinin profilinin çıkarılması bakımından, kömür işçilerinde IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-6 ve TGF- β sitokin gen polimorfizmlerinin KİP gelişimine etkisi üzerine daha önceden yapılmış bir çalışma olmaması bakımından, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra sitokin gen polimorfizmlerinin genotipleme çalışmaları yapıldıktan sonra fenotipleme çalışması olarak mutant ve mutant olmayan bireylerde bu sitokinlerin kan monositlerinden in vitro salınımlarının ölçüldüğü başka bir çalışma bulunmaması bakımından özgün bir çalışmadır.

Bütün bu sonuçlar çerçevesinde, ülkemizde kömür madenciliği dalında çalışan işçilerin KİP'dan mümkün olduğunca korunmaları ve daha sağlıklı koşullarda çalışabilmeleri için aşağıda belirtilen bazı öneriler getirilmiştir.

- Kömür madenlerinde kömür tozunun havada bulunmasına izin verilen konsantrasyonlarının periyodik ölçümlerinin yapılması ve bu konuda hassasiyet gösterilmesi gereklidir.

- Kömür  retiminde çalışan işçiler baŐta olmak üzere kömür madeninde çalışan herkesin maske gibi koruyucu malzemeleri düzenli olarak kullanması ve bunun kontrolünün sağlanması gerekmektedir.
- işçilerin sağlık kontrollerinin düzenli olarak yapılması ve özellikle akciğer röntgenlerinin periyodik olarak kontrol edilmesi ve hastalık ile ilgili Őüpheler oluŐtuėu taktirde gerekli iŐlemlerin yapılması konusunda hassasiyet gösterilmesi gerekmektedir.
- Biyolojik izleme sonucunda sitokinlere duyarlılığı arttırabilecek genotiplere sahip bireylerin belirlenerek olası risklerden haberdar edilmeleri ve bunun için gerekli önlemlerin alınması sağlanmalıdır.
- Sigara kullanımı ile K P gelişimi arasında ilişki olup olmaması konusunda çeliŐkili sonuçlar mevcuttur, Ancak sigaranın reaktif oksijen radikallerinin oluŐumuna neden olduğu bilinmektedir, Ayrıca sigara kullananlarda solunum yolu mekaniğinde oluşan problemler, kömür tozunun solunmasına ek olarak kişilerde önemli solunum zorluklarına neden olmaktadır, Bu nedenle sigara içen kömür işçileri içmeyenlere göre daha büyük bir risk altındadır, Bu bilgilerin kömür iŐçilerine aktarılarak bilinçlendirilmeleri ve sigara imemelerinin önerilmesi gerekmektedir.
- Kömür tozunun oluŐturduėu ROT'nin etkilerine karşı iŐçilerde antioksidan takviyesine gidilmesi sağlanabilir.

VI. Kaynaklar

- 1- Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, Mcdermott MF, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C, D'alfonso S. (1999). Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun.* **1**:3-19.
- 2- Blackford JA Jr, Jones W, Dey RD, Castranova V. (1997). Comparison of inducible nitric oxide synthase gene expression and lung inflammation following intratracheal instillation of silica, coal, carbonyl iron, or titanium dioxide in rats. *J. Toxicol. Environ. Health.* **51**: 203-218.
- 3- Castranova V, Vallyathan V. (2000). Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Environ. Health. Perspect.* **108**: 675-684.
- 4- Dalal NS, Newman J, Pack D, Leonard S, Vallyathan V. (1995). Hydroxyl radical generation by coal mine dust: possible implication to coal workers' pneumoconiosis. *Free. Rad. Biol. Med.* **18**:11-20.
- 5- Goldstein RH, Fine A. (1995). Potential Therapeutic Initiatives for Fibrogenic Lung Diseases. *Chest* **108**: 848-855.
- 6- Gosset P, Lassalle P, Vanhee D, Wallaert B, Aerts C, Voisin C, Tonnel AB. (1991). Production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 by human alveolar macrophages exposed to in vitro coal mine dust. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **5**: 431-436.
- 7- Green FHY, Vallyathan V. (1998). Coal workers' pneumoconiosis and pneumoconiosis due to other carbonaceous dusts. In: *Pathology of Occupational Lung Disease*, Eds: A Churg, FHY Gren, 2nd Edition Philadelphia, Williams Wilkins, p.: 129-208.
- 8- Janssen YMW, Marsh JP, Driscoll KEO, Borm PJA, Oberdorster G, Mossman BT. (1994). Increased expression of manganese-containing superoxide dismutase in rat lungs after inhalation of inflammatory and fibrogenic minerals. *Free Rad. Biol. Med.* **16**:315-322.
- 9- Lassalle P, Gosset P, Aerts C, Benhamou M, Fortin F, Wallaert B, Tonnel AB, Voisin C. (1989). Alveolar macrophages secretory dysfunctions in coal workers' pneumoconiosis: comparison between simple pneumoconiosis and progressive massive fibrosis. In: *Effects of Mineral Dusts on Cells* Eds: BT Mossman and RO Begin, New York, Springer-Verlag, p.: 65-71.
- 10- Lassalle P, Gosset P, Aerts C, Fournier E, Lafitte JJ, Degreef JM, Wallaert B, Tonnel AB, Voisin C. (1990). Abnormal secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha by alveolar macrophages in coal workers' pneumoconiosis: comparison between simple pneumoconiosis and progressive massive fibrosis. *Exp. Lung. Res.* **16**: 73-80.
- 11- MacNee W, Rahman I. (2001). Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Trends Mol. Med.* **7**: 55-62.
- 12- Mohamed KH, Mobasher AAMT, Yousef ARI. (2001). BAL Neopterin: A novel marker for cell-mediated immunity in patients with pulmonary tuberculosis and lung cancer. *Chest* **119**: 776-780,

- 13- Morgan WK, Seaton A. (1975). Occupational lung diseases. *WB Saunders Co.* 149-210.
- 14- Nadif R, Bourgkard E, Dusch M, Bernadac P, Bertrand JP, Mur JM, Pham QT. (1998). Relations between occupational exposure to coal mine dusts, erythrocyte catalase and Cu/Zn superoxide dismutase activities, and the severity of coal workers' pneumoconiosis. *Occup. Environ. Med.* **55**: 533-540.
- 15- Ohtsuka T, Yamakage A, Yamazaki S. (2002). The polymorphism of transforming growth factor-beta1 gene in Japanese patients with systemic sclerosis. *Br. J. Dermatol.* **147**: 458-63.
- 16- Pinho RA, Bonatto F, Andrades M. 2004. Lung oxidative response after acute coal dust exposure. *Environ. Res.* **96**: 290-297.
- 17- Rom WN. (1991). Relationship of inflammatory cell cytokines to disease severity in individuals with occupational inorganic dust exposure. *Am. J. Ind. Med.* **19**: 15-27.
- 18- Rom WN, Bitterman PB, Rennard SI, Cantin A, Crystal RG. (1987). Characterization of the lower respiratory tract inflammation of nonsmoking individuals with interstitial lung disease associated with chronic inhalation of inorganic dusts. *Am. Rev. Respir. Dis.* **136**:1429-1434.
- 19- Schins RFP, Borm PJA. (1999). Mechanisms of mediators in coal dust induced toxicity: a review. *Ann. Occup. Hyg.* **43**: 7-33.
- 20- Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB Jr, de Souza AP, Line SR. (2003). Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *J. Clin. Periodontol.* **30**: 438-42.
- 21- Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nthn C. (1988). Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature.* **344**: 3553-3560.
- 22- Türkiye Taşkömürü Kurumu, (2004) <http://www.taskomuru.gov.tr>
- 23- Vallyatahn V, Shi XL, Dalal NS, Irr W, Castranova V. (1988). Generation of free radicals from freshly fractured silica dust, Potential role in acute silica induced lung injury. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **138**: 1213-1219.
- 24- Vallyathan V, Goins M, Lapp LN, Pack D, Leonard S, Shi W, Castranova V. (2000). Changes in bronchoalveolar lavage indices associated with radiographic classification in coal miners. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **162**: 958-965.
- 25- Vanhee D, Gosset P, Boitelle A, Wallaert B, Tonnel AB. (1995). Cytokines and cytokine network in silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Eur. Respir. J.* **8**: 834-842.
- 26- Vanhee D, Gosset P, Wallaert B, Voisin C, Tonnel AB. (1994). Mechanisms of fibrosis in coal workers' pneumoconiosis: increased production of platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor type I, and transforming growth factor-beta and relationship to disease severity. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **150**:1049-1055.

- 27- Voisin C, Wallaert B, Aerts C, Grosbois JM. (1985). Bronchoalveolar lavage in coal workers' pneumoconiosis: oxidant and antioxidant activities of alveolar macrophages, In: *In Vitro effects of Mineral Dusts*, Eds: EG Beck and J Bignon, Berlin, Springer-Verlag, p.: 93-100.
- 28- Wallaert B, Lassalle P, Fortin F, Aerts C, Bart F, Fournier E, Voisin C. (1990). Superoxide anion generation by alveolar inflammatory cells in simple pneumoconiosis and in progressive massive fibrosis of nonsmoking coal workers. *Am. Rev. Respir. Dis.* **141**: 129-133.
- 29- Yucesoy B, Vallyathan V, Landsittel DP, Sharp DS, Weston A, Bureson GR, Simeonova P, McKinstry M, Luster MI. (2001). Association of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 gene polymorphisms with silicosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **172**:75-82.
- 30- Yucesoy B, Kashon ML, Luster MI. (2003). Cytokine polymorphisms in chronic inflammatory diseases with reference to occupational diseases. *Curr. Mol. Med.* **3**:39-48.
- 31- Kim KA, Lim Y, Kim JH, Kim EK, Chang HS, Park YM, Ahn AY. (1999). Potential biomarker of coal workers' pneumoconiosis. *Toxicol. Lett.* **108**:297-302.
- 32- Kim, K.A., Cho, Y.Y., Cho, J.S., Yang, K.H., Lee, W.K., Lee, K.H., Kim, Y.S., Lim, Y. (2002). Tumor necrosis factor- α gene promoter polymorphism in coal workers' pneumoconiosis. *Mol. Cell Biol.* **234/235**:205-209.
- 33- Strober, W. (1994). Depletion of monocytes/macrophages from mononuclear cells using adherence method. Section: 7.1.3. In: *Current Protocols in Immunology*. Eds: JE Colligan, M Kruisbeck, DH Margulies, EM Shevach, W Strober, R Coico. John Wiley & Sons Inc. USA.

VIII. Ekler

a) Mali Bilanço ve Açıklamalar:

Bütçe Kodu	Ödenek Adı	Hareket Tarihi	Gider Miktarı
0-06-2	Menkul Sermaye Üretim Giderleri	23/12/2004	6,346.040
2-03-2	Tüketime Yönelik Mal ve Hizmet Alımları	11/06/2004	767.000
2-03-2	Tüketime Yönelik Mal ve Hizmet Alımları	15/07/2004	1,770.000
2-03-3	Yolluklar	23/12/2004	118.000
2-03-3	Yolluklar	28/12/2004	116.000
2-03-3	Yolluklar	123/12/2004	126.000
6-03-2	Tüketime Yönelik Mal ve Hizmet Alımları	18/04/2005	4,050.000
6-03-2	Tüketime Yönelik Mal ve Hizmet Alımları	06/05/2005	702.000
6-03-2	Tüketime Yönelik Mal ve Hizmet Alımları	07/06/2005	1,534.000
6-03-2	Tüketime Yönelik Mal ve Hizmet Alımları	04/07/2005	6,077.000
6-03-2	Tüketime Yönelik Mal ve Hizmet Alımları	15/10/2005	2,360.000
6-03-2	Tüketime Yönelik Mal ve Hizmet Alımları	15/11/2005	265.500
6-03-3	Yolluklar	09/12/2005	121.200
6-03-3	Yolluklar	28/11/2005	121.200
Toplam Gider:			24,437.940
Toplam Ödenek:			27,228.430
Kalan:			2,754.490

b) Makine Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımlarına Dair Açıklamalar:

Makine Teçhizatı	Demirbaş Numarası
Elektroforez Güç Kaynağı	943-1
Elektroforez Tankı	942-1, 942-2
Jel Görüntüleme Sistemi	853

c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar

d) Sunumlar:

Türk Toksikoloji Derneği, 24 Ocak 2006, Ankara. “Karakaya A., Kömür işçileri pnömokonyozunun gelişiminde sitokin polimorfizminin rolü. Mini Sempozyum: Partiküller ve İnsan Sağlığı: Kömür Madenciliğinden Nanoteknolojiye” (Çağrılı bildiri)

ISOPS, 8th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, June 13-16, 2006, Ankara, Turkey. “Ulker C.O., Yucesoy B., Tekin O.I., Karakaya A., Neopterin as a marker for immune system activation in coal miners pneumoconiosis”

43rd Congress of the European Societies of Toxicology, 6th Congress of Toxicology in Developing Countries, September 20-24, 2006 Dubrovnik/Cavtat, Croatia. “Ulker O.C., Ustundag A., Duydu Y., Yucesoy B., Karakaya A., Possible genotoxic risk in coal workers’ pneumoconiosis” (Oral Presentation)

43rd Congress of the European Societies of Toxicology, 6th Congress of Toxicology in Developing Countries, September 20-24, 2006 Dubrovnik/Cavtat, Croatia. "Karakaya A., Ates I., Yucesoy B., Suzen S.H., Cytokine genes in susceptibility to coal workers' pneumoconiosis"

6th International Congress of Turkish Society of Toxicology, November 2-5, 2006, Antalya, Turkey. "Ulker O. C., Yucesoy B., Demir O., Karakaya A., Serum and BALF cytokine levels at different stages of pneumoconiosis in coal workers"

6th International Congress of Turkish Society of Toxicology, November 2-5, 2006, Antalya, Turkey. "Karakaya A, Ulker O.C., Yucesoy B., Durucu M., Neopterin: A novel marker for immune activation in patients with CWP"

6th International Congress of Turkish Society of Toxicology, November 2-5, 2006, Antalya, Turkey. "Ates I., Suzen H.S., Yucesoy B., Karakaş A., Karakaya A., The effects of TNF- α cytokine gene polymorphisms and the stimulation and release from blood monocytes of coal workers with pneumoconiosis"

The 5th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations, May 20-24, 2007, Tekirova, Antalya, Turkey. "Karakaya A., Suzen S., Ates I., Yucesoy B., Are TNF- α and IL-1 promoter mutations associated with the risk of coal workers' pneumoconiosis?"

The 5th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations, May 20-24, 2007, Tekirova, Antalya, Turkey. "Ates I., Suzen S., Yucel A., Yucesoy B., Karakaya A., The effects of mutations in TNF- α and IL-1 genes on the levels of these cytokines released from blood monocytes" (Oral Presentation)

The 5th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations, May 20-24, 2007, Tekirova, Antalya, Turkey. "Ulker C.O., Ustundag A., Duydu Y., Yucesoy B., Karakaya A., Sister chromatid Exchange (SCE) and micronucleus (MN) frequencies in coal workers and coal workers' pneumoconiosis patients"

e) Yayınlar ve Tezler:

Yayınlar:

Yucesoy B., Cemiloglu O., Chronic lung diseases and cytokines. Sendrom, 2003, 15(10): 95-101

Ulker C.O., Yucesoy B., Durucu M., Karakaya A., Neopterin as a marker for immune system activation in coal workers' pneumoconiosis, Toxicol. Ind. Health (Baskıda)

Ulker C.O., Ustundag A., Duydu Y., Yucesoy B., Karakaya A., Possible genotoxic risk in coal workers' pneumoconiosis, Mutation Research (Baskıda)

Cytokine genes in susceptibility to coal workers' pneumoconiosis (Yayına hazırlanmakta)

The effects of mutations in TNF- α and IL-1 genes on the levels of these cytokines released from blood monocytes (Yayına hazırlanmakta)

Serum and BALF cytokine and antioxidant enzyme levels at different stages of pneumoconiosis in coal workers (Yayına hazırlanmakta)

Tezler:

Yüksek Lisans Tezi: Bazı Pro-Enflamatuar Sitokinlerin Ve Antioksidan Enzimlerin Kömür İşçileri Pnöмокonyozunun Gelişiminde Ve Klinik Şiddetindeki Rolü, Özge Cemiloğlu Ülker, Danışman: Prof. Dr.Asuman Karakaya

Doktora Tezi: Kömür Tozunun Neden Olduğu Pnöмокonyozda Rol Oynayan Sitokinlerin Genotipik ve Fenotipik Analizleri, İlker Ateş, Danışman: Prof. Dr. Asuman Karakaya