



**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ALKOL'ÜN SİĞARA DUMANI EKSTRESİ VARLIĞINDA VE  
YOKLUĞUNDA PRİMER BRONŞ EPİTEL HÜCRELERİNDE  
PROİNFLAMATUVAR SİTOKİN GENLERİNİN EKSPRESYONUNA  
ETKİSİ**

**BETÜL TİMUÇİN**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**Şanlıurfa  
2025**



**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ALKOL'ÜN SİĞARA DUMANI EKSTRESİ VARLIĞINDA VE  
YOKLUĞUNDA PRİMER BRONŞ EPİTEL HÜCRELERİNDE  
PROİNFLAMATUVAR SİTOKİN GENLERİNİN EKSPRESYONUNA  
ETKİSİ**

**BETÜL TİMUÇİN**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI  
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Halit AKBAŞ**

**Şanlıurfa  
2025**

## TEŞEKKÜR

Öncelikle, bilgi birikimi, sabrı ve değerli yönlendirmeleriyle çalışmamın her aşamasında bana rehberlik eden sayın Prof. Dr. Hasan Bayram ve Prof. Dr. Halit Akbaş'a en derin minnetlerimi ifade ederim. Kıymetli vakitlerini ayırarak beni her konuda destekleyen, akademik ve kişisel gelişimime katkı sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Özgecan Kayalar'a ve bilgi paylaşımıyla bana yol gösteren PhD öğrencisi Hadi Rajabi'ye ayrıca teşekkürü bir borç bilirim.

Bu akademik yolculuğa birlikte başladığım, her adımda yanımda olan, zorlu ve keyifli anları paylaştığım değerli arkadaşım Uzm. Biyolog Hilal Taşcı Erdoğan'a özel bir teşekkür borçluyum. Onun desteği, motivasyonu ve dostluğu bu süreci anlamlı kıldı.

Araştırma sürecim boyunca yanımda olan, motivasyonumu artıran, zorlu anlarda desteğini esirgemeyen Koç Üniversitesi'ndeki arkadaşlarıma da ayrıca minnettarım. Bu yolculukta birlikte çalışmak, öğrenmek ve büyümek benim için paha biçilemez bir deneyimdi.

Tezimin bu satırlarını, bana hayat boyu yol gösterecek değerleri aşıl原因an iki kıymetli dedeme ithaf etmek istiyorum. Her ikisi de artık aramızda olmasa da, kalbimde bıraktıkları sevgi, merhamet ve iyilik izleri daima benimle. Bana ne olursa olsun önce iyi bir insan olmayı, bilimden önce vicdanı ve adaleti koymayı öğrettiler. Saf sevgiyi, karşılıksız iyiliği ve merhameti onlardan gördüm. Varlıklarıyla hayatıma kattıkları tüm güzellikler için, özlem ve minnetle...

Son olarak, hayatımın her anında sevgisiyle, sabrıyla ve inancıyla bana güç veren aileme ve dostlarıma yürekten teşekkür ederim. Onların koşulsuz desteği olmasaydı, bu başarıya ulaşmak çok daha zor olurdu. Her birinize sonsuz şükranlarımı sunarım.

Bu tez çalışması TÜBİTAK'ın 1001 programı altında açılan "Deprem Bölgesi Üniversiteleri Özel Çağrısı-BİNBİRÇABA" kapsamında desteklenen "124S069" numaralı proje kapsamında, Koç Üniversitesi Translasyonel Tıp Araştırma Merkezi (KUTTAM)'nin hizmet ve altyapısı kullanılarak yürütülmüştür.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER.....	v
KISALTMALAR.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. ALKOL KULLANIMI VE FİZYOLOJİK ETKİLERİ.....	5
2.1.1. Alkolün Tanımı, Türleri ve Tüketim Biçimleri.....	5
2.1.1.1. Alkol Metabolizması ve Vücutta Dağılımı.....	7
2.1.1.2. Akciğer Savunma Mekanizmaları.....	9
2.1.1.3. Akut ve Kronik Alkol Kullanımının Akciğer Fonksiyonlarına Etkisi.....	11
2.1.2. Bağışıklık Sistemi ve Proinflamatuvar Sitokinler.....	13
2.2. Sigara, Solunum Sistemi ve Akciğere etkileri.....	14
2.2.1. Sigara, Alkol ve KOAH.....	15
2.2.2. Sigara Kullanımı.....	15
2.2.2.1. Sigara ve Alkol Arasındaki Etkileşim.....	16
2.2.3. Hava Yolu Epitel Hücreleri.....	16
2.2.3.1. Bronş Epitel Hücreleri.....	16
2.2.3.1.1. Bronş Epitel Kültürleri ve Kültür Yöntemleri.....	17
2.2.3.1.2. Primer Bronş epitel hücre hattı (PBEH).....	17
2.2.3.1.3. Bronş Epitel Hücre Hattı (BEAS-2B).....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. BEAS-2B Hücre Hattı Kültürleri.....	19
3.1.1. İnsan Primer Bronşiyal Epitel Hücreleri (PBEH) Kültürü.....	20
3.1.2. Sigara Dumanı Ekstraktı (SDE) Hazırlanması ve BEAS-2B Hücre kültürleri ile.....	21
3.2. Hücre Canlılık Analizi.....	21
3.3. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	24
3.3.1. Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi.....	24
3.3.1.1. İnsan (Homo sapiens) Gen Ekspresyon Analizi için Primer Diziler.....	25
3.3.1.2. Hedef Genlerin Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR ile Analizi.....	26
3.4. İstatistiksel Analiz.....	27
4. BULGULAR.....	28
4.1. Hücre Canlılık Analizi.....	28
4.1.1. Alkolün BEAS-2B Kültürlerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi.....	28
4.1.2. Sigara dumanı ekstraktı (SDE)'nin BEAS-2B Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi.....	31
4.1.3. Alkolün Sigara İçmeyen PBEH Kültürlerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi.....	32
4.2. qRT-PCR mRNA Gen Ekspresyonu Sonuçları.....	37
5. TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇLAR.....	54
7. ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	62

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### ALKOL'ÜN SİGARA DUMANI EKSTRESİ VARLIĞINDA VE YOKLUĞUNDA PRİMER BRONŞ EPİTEL HÜCRELERİNDE PROİNFLAMATUVAR SİTOKİN GENLERİNİN EKSPRESYONUNA ETKİSİ

BETÜL TİMUÇİN

HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tez Danışman: Prof. Dr. Halit AKBAŞ

Yıl: 2025, Sayfa : 57

Alkol, dünya genelinde yaygın biçimde tüketilen, bağımlılık potansiyeline sahip psikoaktif bir maddedir ve yalnızca ekonomik ve sosyal sonuçlar doğurmakla kalmayıp insan sağlığı üzerinde de önemli olumsuz etkiler yaratmaktadır. Merkezi sinir sistemi ve gastrointestinal sistem üzerindeki etkileri görece iyi incelenmiş olsa da, hava yolları ve akciğerler üzerindeki etkileri yeterince aydınlatılmamıştır. Bu çalışma, alkol maruziyetinin, sigara dumanı ekstresi (SDE) varlığında ve yokluğunda, insan bronşiyal epitel hücrelerinde proinflamatuvar sitokin genlerinin (IL6, IL8, TNF $\alpha$ ) ekspresyonuna etkisini ortaya koymayı amaçlamıştır.

Çalışmada insan bronşiyal epitel kökenli BEAS-2B hücre hattı ve primer bronşiyal epitel hücreleri (PBEH) kullanılmıştır. Hücreler tek başına etanol ile (1 ve 5 mM) veya tek başına SDE ile (%2,5 ve %5) ya da kombine (etanol + SDE) biçimde 12 saat ve 24 saat süreyle muamele edilmiştir. Hücresel toksisite ve canlılık, BEAS-2B hücrelerinde 0,1–100 mM aralığındaki etanol konsantrasyonlarına ek olarak %2,5 ve %5 SDE ile (ve bunların kombinasyonlarıyla) yapılan maruziyetlerden sonra MTT testi ile değerlendirilmiştir. Proinflamatuvar sitokin genlerinin (IL6, IL8, TNF $\alpha$ ) mRNA düzeyleri, toplam RNA izolasyonunu takiben cDNA sentezi yapılarak, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile analiz edilmiştir. Primer bronş epitelinde (sağlıklı, sigara içen ve KOAH) sitokin dinamikleri zamana ve eş maruziyet koşullarına bağlı olarak belirgin biçimde farklılaşmıştır. Sağlıklı hücrelerde IL-8 ekspresyonu 12. saatte geçici bir artış göstermiş, 24. saatte ise çoğunlukla bazal düzeylere dönmüştür; sigara içen ve KOAH kaynaklı hücrelerde IL-8 yanıtı 12–24 saat boyunca genel olarak düşük kalmıştır. IL-6 için üç grupta da qPCR'da özgül ve tekrarlanabilir amplifikasyon elde edilememesi, bu genin karşılaştırmalı analizini kısıtlamıştır. TNF- $\alpha$  açısından sağlıklı epitelde yalnızca sınırlı dalgalanma izlenmiş, 24. saate doğru belirgin bir yükseliş saptanmamıştır; sigara içen ve KOAH epitelinde ise ekspresyon çoğunlukla baskılanmıştır. Eş maruziyet koşullarında, %2,5 SDE ile 1 mM etanol kombinasyonu 24. saatte IL-8'i anlamlı biçimde yükseltirken, aynı SDE düzeyinde 5 mM etanol artışı sınırlamış; IL-6 ve TNF- $\alpha$  için de 1 mM etanolde geç dönemde artış eğilimi, 5 mM etanolde ise baskılanma öne çıkmıştır.

Bu bulgular, alkol ve sigara dumanının birlikte etkisinin hava yolu epitelinde proinflamatuvar yanıtı doz–zaman bağımlı olarak yeniden ayarladığını; orta yükte proinflamasyonun güçlenirken, daha yüksek etanol dozlarında baskılanmanın belirginleştiğini göstermektedir. Klinik yorumun güçlendirilmesi için protein düzeyi doğrulamaları ve epitel bariyer fonksiyonuna ilişkin ölçümlerin eklenmesi gerekmektedir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Sigara dumanı, Akciğer, Beas-2b, Proinflammatuar sitokinler , Etanol

## ABSTRACT

### MASTER THESIS

#### EFFECT OF ALCOHOL ON THE EXPRESSION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINE GENES IN PRIMARY BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS IN THE PRESENCE AND ABSENCE OF CIGARETTE SMOKE EXTRACT.

BETÜL TİMUÇİN

HARRAN UNIVERSITY  
INSTITUTE OF GRADUATE EDUCATION  
DEPARTMENT OF MEDICAL BIOLOGY

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Halit AKBAŞ

Year: 2025, Page : 57

Alcohol is a widely consumed psychoactive substance with addictive potential that imposes not only economic and social burdens but also substantial adverse effects on human health. While its actions on the central nervous and gastrointestinal systems are relatively well characterized, its impact on the airways and lungs remains insufficiently defined. This study aimed to determine how alcohol exposure, in the presence or absence of cigarette smoke extract (CSE), influences the expression of pro-inflammatory cytokine genes (IL6, IL8, TNF $\alpha$ ) in human bronchial epithelial cells. We employed the BEAS-2B cell line and primary bronchial epithelial cells (PBECs). Cells were treated with ethanol alone (1 or 5 mM), CSE alone (2.5% or 5%), or their combinations (ethanol + CSE) for 12 or 24 hours. In BEAS-2B cells, cellular toxicity and viability were assessed by MTT following exposure to ethanol (0.1–100 mM), 2.5% or 5% CSE, and their combinations. mRNA levels of IL6, IL8, and TNF $\alpha$  were quantified by qRT-PCR after total RNA isolation and cDNA synthesis. Cytokine dynamics in primary bronchial epithelium (healthy donors, smokers, and COPD) varied with time and co-exposure conditions. In healthy cells, IL-8 expression showed a modest rise at 12 hours and largely returned to baseline by 24 hours; in smoker-derived and COPD cells, IL-8 remained generally low across 12–24 hours. For IL-6, specific and reproducible amplification could not be obtained by qPCR in any group, precluding comparative analysis. TNF- $\alpha$  exhibited only limited fluctuations in healthy cells without a clear increase toward 24 hours, whereas expression was mostly suppressed in smoker-derived and COPD epithelium. Under co-exposure, 2.5% CSE combined with 1 mM ethanol markedly elevated IL-8 at 24 hours, while the same CSE level with 5 mM ethanol produced only a modest increase. For IL-6 and TNF- $\alpha$ , a late-phase increase was evident with 1 mM ethanol, whereas 5 mM ethanol tended to suppress expression.

Collectively, these findings indicate that alcohol and cigarette smoke jointly recalibrate the proinflammatory response in airway epithelium in a dose- and time-dependent manner: moderate exposure favors heightened inflammation, while higher ethanol doses promote suppression. To strengthen clinical interpretation, future work should include protein-level validation and assessments of epithelial barrier function.

**KEYWORDS:** Cigarette smoke, Lung, Beas-2b, Proinflammatory cytokines, Ethanol

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. 2021’de alkol içen yetişkinlerin oranı, 2020 Dünya Sağlık Örgütü - Küresel Sağlık Gözlemevi (2025). .....	1
Şekil 1.2. 2019 yılında alkole bağlı ölüm oranları (Dünya Sağlık Örgütü - Küresel Sağlık Gözlemevi, 2025). .....	2
Şekil 3.1. BEAS-2B hücrelerinin faz-kontrast ışık mikroskopunda görünümü; .....	20
Şekil 3.2. İnsan primer bronş epitel hücrelerinin (PBEH) faz kontrast mikroskopisi görüntüsü. Büyütme: 10x. ....	21
Şekil 3.3. MTT görsel gösterimi. Şekil, BioRender.com (bilimsel görselleştirme platformu) aracılığıyla tasarlanmıştır. ....	22
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda (0.1-100 mM) ve farklı sürelerde (30 dk (a), 1 saat (b) , 2 saat (c) ve 4 saat (d)) alkolün, BEAS-2B hücrelerinin canlılığına etkisi. KN:kontrol (0mM). .....	29
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda (0.1-100 mM) ve farklı sürelerde (6 saat (a), 8 saat (b) ve 12 saat (c)) alkolün BEAS-2B hücrelerinin canlılığına etkisi. KN:kontrol .....	30
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda (0.1-5 mM) ve farklı sürelerde (12 saat (a) ve 24 saat (b)) alkolün BEAS-2B hücrelerinin canlılığına etkisi. KN:kontrol (0mM) .....	31
Şekil 4.4. SDE’nin (%2,5 ,%5 ve%7,5) BEAS-2B hücre kültürlerinin canlılığına etkisi; 12 saat (a) ve 24 saat (b). ....	32
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki alkolü (0.1-5 nM) farklı sürelerde (12 saat (a) ve 24 saat (b)) PBEH hücre kültürlerinin canlılığına etkisi. KN: kontrol, 0mM. ....	33
Şekil 4.6. BEAS-2B hücrelerinde a) kontrol grup b) 1mM alkol konsantrasyonu uygulanan grup c) 5mM alkol konsantrasyonu .....	33
Şekil 4.7. BEAS-2B hücrelerinde a) kontrol grup b)1mM alkol konsantrasyonu uygulanan grup c) 5mM alkol konsantrasyonu .....	34
Şekil 4.8. BEAS-2B hücrelerinde a) kontrol grup b) %2,5 sigara konsantrasyonu uygulanan grup c)%5 sigara konsantrasyonu .....	34
Şekil 4.9. BEAS-2B hücrelerinde A) kontrol grup B) %2,5 sigara konsantrasyonu uygulanan grup C) %5 sigara konsantrasyonu 24 saat. ....	35
Şekil 4.10. BEAS-2B hücrelerinde A) kontrol grup B) %2,5 sigara konsantrasyonu ve 1mM alkol uygulanan grup C) %2,5 sigara konsantrasyonu 5mM alkol uygulanan 12 saat. ....	35
Şekil 4.11. BEAS-2B hücrelerinde A) kontrol grup B) %2,5 sigara konsantrasyonu ve 1mM alkol uygulanan grup C) %2,5 sigara konsantrasyonu 5Mm alkol uygulanan 24 saat. ....	36
Şekil 4.12. BEAS-2B hücrelerinde a) kontrol grup b) %5 sigara konsantrasyonu ve 1mM alkol uygulanan grup c) %5 sigara konsantrasyonu 5mM alkol uygulanan 12 saat. ....	36
Şekil 4.13. BEAS-2B hücrelerinde a) kontrol grup b) %5 sigara konsantrasyonu ve 1mM alkol uygulanan grup c) %5 sigara konsantrasyonu 5mM alkol uygulanan 24 saat. ....	37
Şekil 4.14. 1 mM ve 5 mM etanol konsantrasyonun da IL-8 (a) ve TNF- $\alpha$ (b) mRNA düzeyleri üzerindeki etkisi (* aynı konsantrasyonların zamana bağlı karşılaştırması) .....	38
Şekil 4.15. . Farklı SDE konsantrasyonlarının IL-8 (a), IL-6 (b) ve TNF- $\alpha$ (c) mRNA düzeyleri üzerindeki etkisi (* aynı konsantrasyonların zamana bağlı karşılaştırması) .....	39
Şekil 4.16. %2.5 SDE ve alkol konsantrasyonun da IL8 (a) , IL6 (b) ve TNF- $\alpha$ (c) mRNA düzeyleri üzerindeki etkisi (* aynı konsantrasyonların zamana bağlı karşılaştırması) .....	41
Şekil 4.17. %5 SDE ve alkol konsantrasyonun da IL8 (a) , IL6 (b) ve TNF- $\alpha$ (c) mRNA düzeyleri üzerindeki etkisi (* aynı konsantrasyonların zamana bağlı karşılaştırması). ....	42
Şekil 4.18. PBEH üzerinde , farklı konsantrasyonlardaki alkolün IL8 (a) ve TNF- $\alpha$ (b) mRNA düzeyleri üzerindeki etkisi (* aynı konsantrasyonların zamana bağlı karşılaştırması). ....	44
Şekil 4.19. Sigara içen PBEH üzerinde farklı alkol konsantrasyonlarının IL8 (a) ve TNF- $\alpha$ (b) mRNA düzeyleri üzerindeki etkisi (* aynı konsantrasyonların zamana bağlı karşılaştırması). ....	45
Şekil 4.20. KOAH’lı PBEH’lerde Farklı alkol konsantrasyonlarının farklı sürelerde IL8 (a) ve TNF- $\alpha$ (b) mRNA düzeyleri üzerindeki etkisi (*aynı konsantrasyonların zamana bağlı karşılaştırması). ....	46

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	BEAS-2B Hücreleriyle gerçekleştirilen deney düzeni tablosu .....	23
Çizelge 3.2.	Primer bronş epitel hücreleriyle gerçekleştirilen deney düzeni tablosu .....	23
Çizelge 3.3.	cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri .....	25
Çizelge 3.4.	Ters Transkripsiyon Termal Döngü Protokolü .....	25
Çizelge 3.5.	Çalışmada gen ekspresyon analizlerinde kullanılan primer dizileri .....	26
Çizelge 3.6.	qRT-PCR için reaksiyon koşulları .....	26

## SİMGELER

%	Yüzde
&	Ve
•	İstatistiksel anlamlılık düzeyleri
/	Ya da ( benzer anlatımları, ortaklığı bulunan birimleri birbirinden ayırmak için kullanılır.)
<	Küçük
@	Mail Simge
c	Karbon C Derece
cm <sup>2</sup>	Santimetre kare
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
g	Gram
h	Hidrojen
M	Molar
N	Çalışmaya Katılan Kişi Sayısı
O	Oksijen
p	Anlamlılık düzeyi
s	Saat
t	t-Testi İstatistik Değeri
~	Yaklaşık olarak
Ø	Sıfır birim: sıfır tekrar / eksilteli ( derin yapıda olup yüzey yapıda olmayan sözcük, sözcük öbeği vb. dil birimlerini gösterir.)
$\alpha$	Alfa
$\epsilon$	Epsilon
$\mu$	Mikrogram
$\approx$	Yaklaşık eşittir

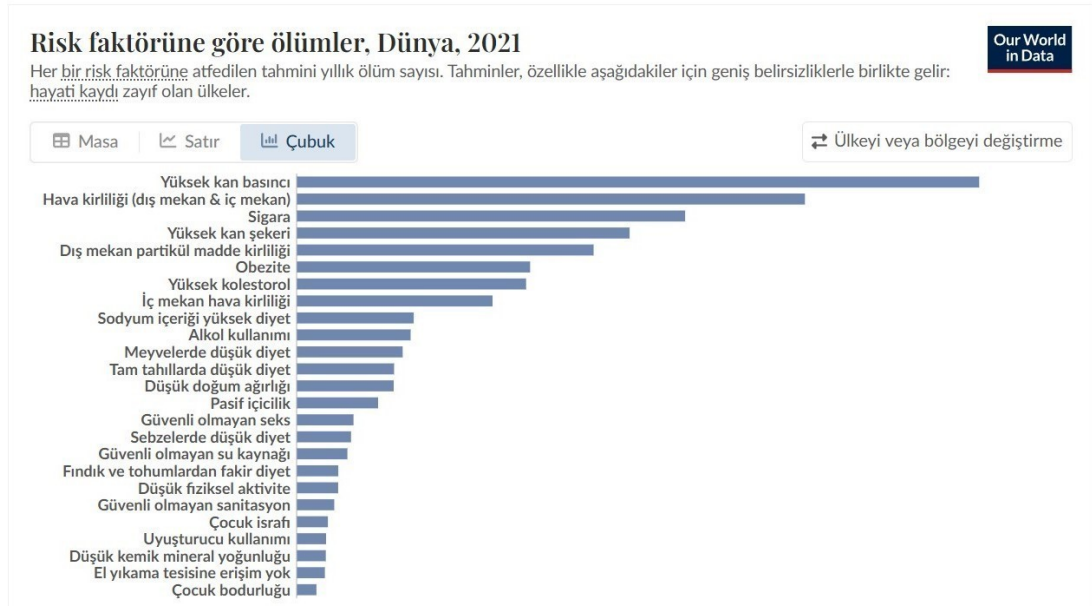
## KISALTMALAR

<b>ALI</b>	Hava sıvı arayüzlü hücre kültürü
<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>ADH</b>	Alkol Dehidrogenaz
<b>ARDS</b>	Akut solunum sıkıntısı sendromu
<b>BALT</b>	Bronşiyal İlişkili Lenfoid Doku
<b>BEAS-2B</b>	Bronşiyal Epitel Hücre
<b>cDNA</b>	Tamamlayıcı DNA
<b>CGRP</b>	kalsitonin gen ilişkili peptit
<b>CGRP</b>	kalsitonin gen ilişkili peptit
<b>Ct</b>	Eşik döngüleri
<b>DMSO</b>	Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	Deoksiribo Nükleik Asit
<b>dPBS</b>	Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salini
<b>DSÖ/WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>Ed</b>	Editör
<b>EDTA</b>	Etilen diamin tetra asetik asit
<b>FBS</b>	Fetal Sığır Serumumu
<b>Haz</b>	Hazırlayan
<b>IgA</b>	Immünglobulin A
<b>IL6</b>	İnterlökin-6
<b>IL8</b>	İnterlökin-8
<b>KOAH</b>	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
<b>mg</b>	mili gram
<b>mL</b>	Mililitre
<b>mm</b>	milimetre
<b>MTT</b>	Hücre canlılığı tayini testi (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)
<b>nm</b>	Nanometre
<b>NO</b>	Nitrik Oksit
<b>OD</b>	Optical Density
<b>OD</b>	Optical Density
<b>PBEH</b>	Primer Bronş Epitel Hücresi
<b>PKCε</b>	Protein kinaz C epsilon
<b>PKG</b>	Protein kinaz Gamma

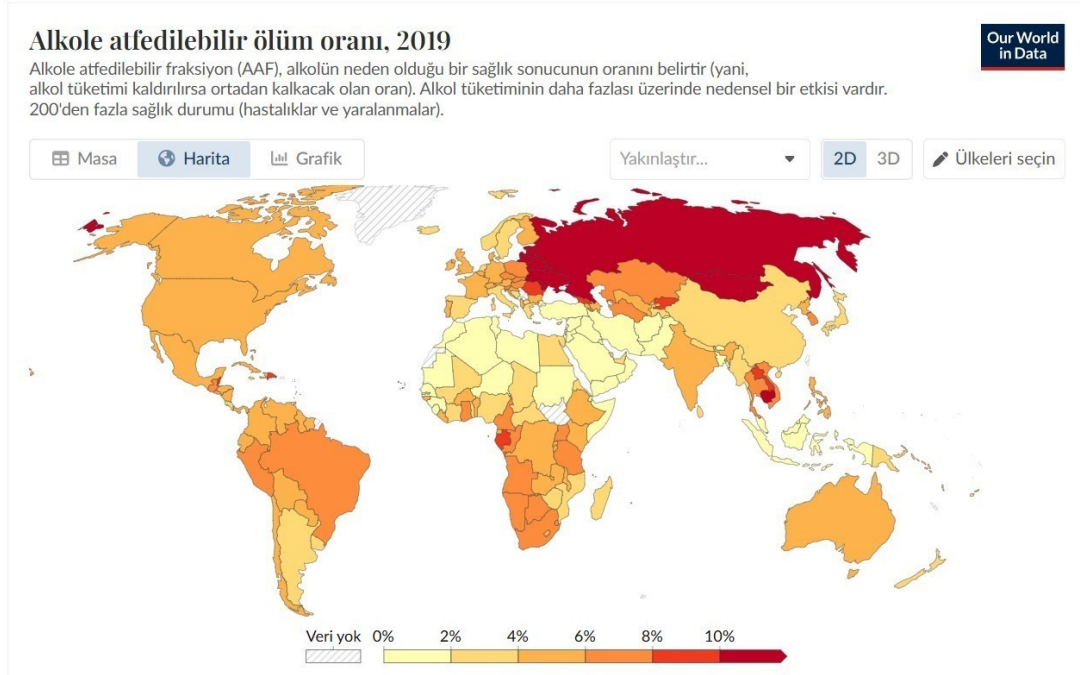
<b>Real-Time PCR</b>	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>ROS</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>SDE</b>	Sigara Dumanı Ekstratı
<b>SEM</b>	Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>STF</b>	Silya Titreşim Frekansı
<b>TEER</b>	Transendoteliyal-epiteliyal resistans
<b>TJ</b>	Sıkı bağlantılar
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tümör Nekroz Faktörü-Alfa
<b><math>\mu\text{m}</math></b>	Mikrometre

## 1. GİRİŞ

Alkol tüketimi, dünya genelinde yaygın bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Alkol, uzun yıllardır çeşitli toplumlarda geniş çapta tüketilen ve bağımlılık potansiyeli taşıyan bir psikoaktif madde olarak tanımlanır (WHO, 2020). Alınan doza bağlı olarak alkol insanlarda davranışsal değişikliklere sebep olmakta (HPA, 2020) ve tüm dünyada trafik kazalarının ana nedenlerinden birini oluşturmaktadır (Akgür vd., 2011). Alkolün zarar verecek dozlarda kullanımı, 200'den fazla hastalık, yaralanma ve diğer sağlık sorunlarına yol açmaktadır (WHO, 2024). Aşırı alkol kullanımı, her yıl 220 milyar dolardan fazla ekonomik maliyete ve yılda 2,8 milyon erken ölüme neden olmaktadır



**Şekil 1.1.** 2021’de alkol içen yetişkinlerin oranı, 2020 Dünya Sağlık Örgütü Küresel Sağlık Gözlemevi (2025).



**Şekil 1.2.** 2019 yılında alkole bağlı ölüm oranları (Dünya Sağlık Örgütü - Küresel Sağlık Gözlemevi, 2025).

Alkolün sistemik etkileri üzerine yapılan çalışmalar genellikle karaciğer, beyin ve kardiyovasküler sistem üzerine odaklanmakta ancak son yıllarda akciğer dokusu üzerindeki etkileri de bilimsel camianın dikkatini çekmeye başlamaktadır. Solunum sistemi, alkolün doğrudan veya dolaylı etkileriyle karşı karşıya kalmakta, bu etkiler hem yapısal hem de işlevsel bozulmalara yol açmaktadır (Álvarez-Avellón vd., 2017). Akciğer, organizmanın oksijen alımından ve karbondioksit atılımından sorumlu birincil organ olarak çeşitli toksik maddelere karşı savunmasız bir yapıya sahiptir. Bu bağlamda alkolün akciğerin bağışıklık sistemini baskılaması, epitel hücre bütünlüğünü zedelemesi ve enfeksiyonlara karşı direnci azaltması gibi etkileri ortaya çıkmaktadır. Genel olarak (Elliott vd., 2007) çalışmasında sigara dumanı ve alkolün birlikte trakeal epiteldeki siliyer fonksiyonlar ve inflamatuvar hücre toplanması üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bulgular, bu iki maddenin sinerjik biçimde mukosilyer temizliği bozduğunu ve solunum yolu enfeksiyonlarına karşı direnci azalttığını göstermektedir. Alkol, kronik ve yüksek dozda tüketildiğinde, akciğerlerde immün yanıtların zayıflamasına neden olmakta, bu durum da özellikle pnömoni ve akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) gibi ciddi pulmoner patolojilerin gelişme riskini artırmaktadır (Arıcı, 2017). Tüm bunlarla ilişkili olarak Mehta ve Guidot (2017) makalesi, alkolün solunum sistemine etkilerini kapsamlı biçimde incelemiş ve bu etkinin hem akut hem de kronik boyutlarda ortaya çıkabileceğini göstermiştir. Çalışma, alkolün epitel hücre bütünlüğünü bozarak akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) riskini artırdığını belirtmiştir. Alkolle ilişkili akciğer hasarının temel mekanizmaları arasında alveolar makrofaj fonksiyonlarının bozulması, nötrofil migrasyonunun azalması, yüzey gerilimini düzenleyen surfaktan maddelerin

sentezinin etkilenmesi ve oksidatif stres düzeylerinin artması yer almaktadır. Bu biyokimyasal ve hücresele düzeydeki değışiklikler, akciğerin normal fizyolojik işlevlerini sürdürememesine yol açmakta, solunum fonksiyonlarını olumsuz etkilemektedir. Genel olarak bu bireylerde solunum yolu enfeksiyonlarına daha sık rastlanmakta ve hastalıkların seyrinde komplikasyonlar daha ağır seyretmektedir. Klinik gözlemler, alkol tüketiminin, hem astım gibi kronik inflamatuvar hastalıkların alevlenmesine zemin hazırladığını hem de bazı interstisyel akciğer hastalıklarının şiddetini artırdığını ortaya koymaktadır (Álvarez-Avellón vd., 2017; Arıcı, 2017). Bu nedenle alkolün akciğer üzerindeki etkileri hem mikroskobik hem de makroskobik düzeyde incelenmesi gereken çok boyutlu bir mesele olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde yapılan deneysel ve klinik çalışmalar, alkolün akciğer üzerindeki etkilerini açıklamak amacıyla biyokimyasal, histopatolojik ve moleküler düzeylerde önemli bulgular sunmaktadır. Özellikle kronik alkol tüketimi, akciğer dokusunun yapısal bütünlüğünü bozmakta ve alveolar hücrelerde hasara yol açmaktadır. Alkol, alveolar epitel hücrelerinin membran geçirgenliğini artırmakta, bu durum da akciğer ödemine neden olan sıvı birikimini kolaylaştırmaktadır. Aynı zamanda intersellüler bağlantıların zayıflamasıyla birlikte hava-sıvı bariyerinde kırılma oluşmakta, bu da solunum yollarında patojen mikroorganizmaların kolonize olmasına elverişli bir ortam hazırlamaktadır (Arteel, 2020). Alkol, antioksidan savunma sistemini baskılamakta, özellikle glutatyon düzeylerinde meydana gelen azalmalar, oksidatif stresin artmasına ve hücre içi redoks dengesinin bozulmasına neden olmaktadır (Ataoğlu vd., 2024). Oksidatif stres, akciğer hücrelerinde lipid peroksidasyonunu tetiklemekte, bu da hücre membranlarının yapısal bütünlüğünü olumsuz etkilemektedir. Alkolle ilişkili bu biyokimyasal değışiklikler sonucunda akciğer dokusunda inflamatuvar yanıtın şiddetlendiği ve kronik inflamasyona yatkın bir zemin oluştuğu gözlemlenmektedir. İnflamasyonun sürekli hale gelmesi, akciğer parankiminde fibrotik değışikliklerin gelişmesine ve solunum fonksiyonlarının kalıcı olarak bozulmasına yol açmaktadır (Arteel, 2020; Ataoğlu vd., 2024). Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), küresel ölçekte yüksek mortalite ve morbiditeye yol açan, kronik inflamasyonla seyreden bir hastalıktır; güncel DSÖ verileri 2021 yılında 3,5 milyon ölüm ve dünya çapında dördüncü sırada bir ölüm nedeni olduğunu belirtir (World Health Organization, 2024). Dünya Sağlık Örgütü Solunum yolu epitel dokusu, çevresel iritanlara verilen yanıtların ilk belirleyicisidir; bu doku mukosilyer savunma, bariyer bütünlüğü ve doğal immünite işlevlerini

birlikte yürütür. Sigara dumanı ve sigara dumanı ekstraktı

(SDE), bronş epitelinde oksidatif stres artışı ile NF-κB başta olmak üzere proinflamatuvar yolakları etkinleştirir ve IL-6 / IL-8 salınımını yükseltir (Cipollina vd., 2022; Li vd., 2019; Thapa vd., 2024). Alkol (etanol) maruziyeti epitel bariyerini doza/süreye bağımlı biçimde etkiler. Hem BEAS-2B hem de primer insan bronş epitelinde sıkı bağlantı (tight junction) mimarisinin bozulduğu, parasellüler geçirgenliğin arttığı ve TEER'in azaldığı gösterilmiştir (Simet vd., 2012). Bu etkilerin bir bölümünde NO-cGMP-PKG → RhoA ekseninin baskılanması rol oynar; RhoA aktivitesindeki azalma hücre morfolojisi ve bağlantı oluşumu gibi temel işlevleri

etkileyebilir (Bailey vd., 2011). Gerçek yaşamda alkol kullanımı ve sigara sıklıkla birlikte görülür ve eş maruziyet, mukosilyer savunmayı tekil maruziyete kıyasla daha belirgin biçimde baskılayabilir. Deneysel modellerde, alkol + SDE birlikte verildiğinde PKC $\epsilon$  aracılığıyla silyer atım hızında azalma gözlenmiştir (Wyatt et al., 2012). Literatürde çoğunlukla 20–100 mM aralığında etanolü test edilmiş ve bariyer/STF etkileri tanımlamıştır (Simet et al., 2012; Bailey et al., 2011). Ancak düşük millimolar düzeylerde ( $\approx$ 1–5 mM) erken dönem proinflamatuvar yanıtlar (IL6, IL8, TNF $\alpha$  ) ve bariyer fenotipi üzerindeki etkilerin, BEAS-2B ile PBEH arasında karşılaştırmalı ve zaman-bağımlı analizi sınırlıdır (Cipollina et al., 2022; Simet et al., 2012). Bu çalışmada alkol'ün sigara dumanı ektresi varlığında ve yokluğunda BEAS-2B ve PBEH'lerde etanol (1 ve 5 mM) ve SDE'nin (%2,5 ve %5) tekil ve kombine maruziyetlerinin 12 s ve 24 s'lik sürelerde, proinflamatuvar sitokin genlerinin (IL6, IL8, TNF $\alpha$ ) ekspresyon düzeylerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Alkol Kullanımı ve Fizyolojik Etkileri

#### 2.1.1. Alkolün Tanımı, Türleri ve Tüketim Biçimleri

Alkol, kimyasal açıdan karbon, hidrojen ve oksijen elementlerinden oluşan, -OH hidroksil grubunu içeren organik bileşikler sınıfına dahil edilmektedir. Geniş bir kimyasal kategoriye sahip olmakla birlikte, halk arasında ve tıpta yaygın olarak kullanılan alkol terimi, genellikle etanol maddesini ifade etmektedir. Etanol, fermente karbonhidratlardan elde edilmekte ve psikoaktif özellikleri nedeniyle hem sosyal içecek olarak hem de bazı tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır (Aytaçoğlu ve vd., 2006). Alkolün merkezi sinir sistemi üzerindeki depresan etkileri, davranışsal değişikliklere, bilinç düzeyinde bozulmalara ve fizyolojik sistemlerde çeşitli sapmalara neden olmaktadır. Alkol türleri, üretim yöntemi, içerik yoğunluğu ve tüketim amacı bakımından farklılaşmaktadır. En yaygın olarak tüketilen alkol türleri arasında bira, şarap ve distile içkiler yer almaktadır. Bira, düşük alkol oranına sahip fermente bir içecek olarak tüketilmekte, genellikle tahılların mayalanmasıyla elde edilmektedir (Bobo, 1972). Şarap ise üzüm başta olmak üzere çeşitli meyvelerin fermantasyonu sonucu oluşmakta ve genellikle orta düzeyde alkol içermektedir. Viski, votka, rakı, cin ve benzeri distile içkiler ise yüksek alkol oranlarına sahip olup, damıtma yöntemiyle üretilmektedir. Tüm bu içecekler, içerdiği alkol oranına göre bireylerin fizyolojik ve zihinsel fonksiyonları üzerinde farklı etkiler meydana getirmektedir (Aytaçoğlu vd., 2006; Bobo, 1972).

Alkolün tüketim biçimleri, bireylerin sosyokültürel yapısı, yaş grubu, cinsiyet, yaşam tarzı ve psikolojik durumlarına göre çeşitlilik arz etmektedir. Bazı bireylerde alkol, sosyal etkileşimin bir parçası olarak kontrollü biçimde tüketilmekteyken bazı bireylerde bu tüketim kompulsif ve bağımlılık düzeyine ulaşan bir alışkanlık haline gelmektedir. Kronik alkol kullanımında bireyler, artan tolerans gelişimi nedeniyle daha yüksek miktarlarda alkol almaya yönelmekte, bu da fizyolojik sistemler üzerinde geri dönüşü zor hasarların oluşmasına neden olmaktadır (Boe ve vd., 2009).

Alkolün tüketim biçimleri bireyden bireye farklılık göstermekte ve bu farklılıklar alkolün vücutta yarattığı etkilerin şiddetini belirlemektedir. Örneğin, hızlı ve yüksek miktarda alkol alımı, kan alkol düzeyinin kısa sürede yükselmesine neden olmakta ve akut toksisite riskini artırmaktadır. Buna karşın düşük dozda ve seyrek alkol kullanımı, başlangıçta ciddi fizyolojik belirtiler yaratmamakta ancak uzun vadede kronik zararların ortaya çıkmasına zemin hazırlamaktadır (Burnham vd., 2009). Alkol alımının düzenli ve tekrarlayan bir alışkanlık haline gelmesi, özellikle merkezi sinir sistemi ve karaciğerle birlikte solunum sisteminde de geri dönüşü olmayan yapısal bozulmalara neden olmaktadır. Alkol tüketiminin biçimsel özellikleri kadar, tüketim ortamları da bireylerin maruz kaldığı riskleri şekillendirmektedir. Kapalı alanlarda sigara ve diğer zararlı maddelerle birlikte alkol tüketilmesi durumunda solunan hava yoluyla toksik maddelerin doğrudan akciğer dokusuna

ulaşması kolaylaşmakta ve bu durum özellikle solunum yolu mukozasında tahriş, inflamasyon ve hücrel yıkım gibi süreçleri tetiklemektedir (Boe ve vd., 2009; Burnham ve vd., 2009).

Bu tür komplikasyonlar, alkol tüketiminin sadece bir sindirim sistemi sorunu değil, aynı zamanda solunum sistemini doğrudan etkileyen bir sağlık problemi olduğunu ortaya koymaktadır. Sosyoekonomik ve kültürel faktörler de alkol kullanım alışkanlıkları üzerinde belirleyici bir rol oynamaktadır. Bu çerçevede Ataoğlu vd., (2024) tarafından yapılan kesitsel bir saha araştırması, İstanbul'daki bir tıp fakültesi öğrencilerinin alkol ve sigara kullanım düzeylerini ölçmüş ve bu davranışların sosyodemografik değişkenlerle olan ilişkisini analiz etmiştir. Elde edilen veriler, özellikle cinsiyet, akademik başarı ve ailevi yapı gibi değişkenlerin alkol kullanımına etki ettiğini ortaya koymaktadır. Gelişmiş ülkelerde daha kontrollü ve düzenlenmiş biçimlerde alkol tüketimi gözlemlenirken, gelişmekte olan ülkelere kayıt dışı üretim ve bilinçsiz tüketim yaygınlık göstermektedir (Büyükbaş ve İnal, 2006). Bu tür ortamlarda etanol yerine metanol veya diğer toksik alkol türevlerinin tüketilmesi, özellikle akciğerler başta olmak üzere hayati organlarda geri döndürülemez zararlara yol açmaktadır. Tıbbi literatürde bu tür olgulara bağlı olarak gelişen alkol toksisitesi vakalarında akciğer ödemi, alveolar kanama ve hipoksik solunum yetmezliği gibi tablolar sıkça raporlanmaktadır. Bu çerçevede alkolün bağımlılık yapıcı etkisi de tüketim alışkanlıklarının şekillenmesinde temel bir unsur oluşturmaktadır. Alkol, merkezi sinir sistemini etkileyerek dopamin düzeylerini artırmakta ve geçici bir ödül hissi yaratmaktadır (Büyükbaş ve İnal, 2007). Bu durum, bireylerin alkol kullanımını tekrarlama eğilimini artırmakta ve psikolojik bağımlılıkla birlikte fizyolojik tolerans gelişimi ortaya çıkmaktadır. Tolerans geliştikçe birey daha fazla miktarda alkol alma ihtiyacı hissetmekte, bu da uzun vadede pulmoner sistemin homeostatik kapasitesini aşan bir toksik yüklenmeye neden olmaktadır. Bu çerçevede (Lowery vd., 2020) kistik fibrozis hastalarının alkol kullanım alışkanlıklarını incelemiştir. Kendini bildiren anket verilerine dayalı bu çalışma, alkol tüketiminin hastalık yönetimi ve tedaviye uyum süreçlerini olumsuz etkileyebileceğini ortaya koymuştur (Lowery vd., 2020).

#### **2.1.1.1. Alkol Metabolizması ve Vücutta Dağılımı**

Alkol, vücuda alındıktan sonra sindirim sisteminde hızla emilmekte ve sistemik dolaşıma katılmaktadır. Alkolün emilimi ağırlıklı olarak mide ve ince bağırsakta gerçekleşmekte, özellikle aç karnına alındığında bu emilim daha da hızlanmaktadır. Emilim tamamlandıktan sonra etanol, kan yoluyla tüm vücuda yayılmakta ve su içeriği yüksek dokularda daha yoğun bir şekilde dağılmaktadır. Bu durum, alkolün merkezi sinir sistemi gibi yüksek su oranına sahip organlarda hızlı bir şekilde etki göstermesine neden olmaktadır (Büyükbaş ve İnal, 2006; Büyükbaş ve İnal, 2007). Akciğerler, beyin, kalp ve karaciğer gibi organlar alkolün biyolojik etkilerine en erken ve yoğun şekilde maruz kalan yapılar arasında yer almaktadır. Bu çerçevede Kechagias vd., (2019) ise alkol tüketiminin alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması (NAFLD) üzerindeki etkisini tartışmıştır. Çalışma, düşük doz alkolün bazı durumlarda koruyucu etkileri olabileceğini, fakat bu durumun çok sınırlı ve tartışmalı olduğunu belirtmiştir.

Vücutta alkolün dağılması, bireyin yaşı, cinsiyeti, vücut kitle indeksi, hidrasyon düzeyi ve genetik enzim varyasyonlarına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Örneğin, kadınlarda vücut yağ oranının daha yüksek olması ve ADH enzim aktivitesinin genellikle daha düşük olması nedeniyle, aynı miktarda alkol tüketildiğinde kandaki alkol konsantrasyonu erkeklere oranla daha yüksek olabilmektedir (Capurso ve Lahner, 2017). Benzer şekilde, yaşlı bireylerde metabolik kapasitenin azalması nedeniyle alkol daha uzun süre kanda kalmakta ve bu da toksik etkilerin şiddetlenmesine neden olmaktadır. Bu değişkenler, alkolün bireyden bireye farklı toksikolojik profiller oluşturduğunu ve etkilerinin homojen olmadığını göstermektedir. Alkolün vücuttaki dağılımı sırasında akciğerler önemli bir görev üstlenmektedir. Alkol, kısmen solunum yoluyla da atılabilmekte ve bu özellik, kandaki alkol düzeyinin tahmininde kullanılan nefes testlerinin temelini oluşturmakta fakat bu atılım yolu aynı zamanda akciğer dokusunun alkol ile doğrudan temasa geçmesine yol açmakta, bu da alveolar yüzeylerde toksik etkilere ve yapısal zedelenmelere neden olabilmektedir. Özellikle kronik alkol tüketiminde, akciğer dokusunda yüzey aktif maddelerin üretimi azalmakta, bu durum da alveollerin bütünlüğünü tehdit etmekte ve solunum fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemektedir (Çelik vd., 2002). Bununla birlikte alkol metabolizmasının ortaya çıkardığı serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri (ROS), oksidatif stres mekanizmalarını tetiklemekte ve başta karaciğer, beyin ve akciğer olmak üzere pek çok organ sisteminde hücre hasarına yol açmaktadır. Antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığı durumlarda bu toksik maddeler, hücre membranlarına, DNA'ya ve protein yapılarına zarar vermekte, bu da uzun vadede kronik inflamasyon, fibrozis ve organ yetmezliği gibi ciddi sağlık sorunlarını beraberinde getirmektedir. Bu nedenle alkol metabolizması yalnızca bir biyokimyasal süreç olarak değil, aynı zamanda pek çok sistemik patolojinin başlangıç noktası olarak değerlendirilmektedir (Capurso ve Lahner, 2017; Çelik vd., 2002).

Alkol metabolizması sırasında ortaya çıkan ara ürünlerin birikimi, vücudun homeostatik dengesini bozmaktadır. Özellikle asetaldehit, hem toksik etkisi hem de serbest radikal üretimini tetiklemesi bakımından alkolün zararlı etkilerinde kilit rol oynamaktadır. Ayrıca Capurso ve Lahner (2017), alkol ve sigara tüketiminin bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkisini ele alarak bu değişimin sistemik enflamasyon ve dolayısıyla solunum sağlığı üzerindeki etkilerine değinmiştir. Bağırsak-akciğer ekseninde bu etkileşim, alkolün çok yönlü zararlarını vurgulamaktadır. Asetaldehit, proteinlerle, lipidlerle ve DNA ile kovalent bağlar kurarak asetaldehit-protein kompleksleri oluşturmakta, bu kompleksler bağışıklık sistemini harekete geçirmekte ve doku düzeyinde inflamatuvar süreçleri başlatmaktadır. Bu çerçevede Imtiaz vd., (2017) tarafından yürütülen meta-analiz, alkol kullanımının tüberküloz riskini artırdığına dair epidemiyolojik verileri kapsamlı biçimde sunmuştur. Alkolün bağışıklık sistemi üzerindeki olumsuz etkilerinin, tüberkülozun yayılımında önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Bu bağlamda alkol yalnızca bir merkezi sinir sistemi depresanı olarak değil, aynı zamanda inflamasyonu tetikleyen prooksidan bir madde olarak da değerlendirilmelidir. Kronik alkol alımıyla birlikte asetaldehit birikimi arttıkça, başta karaciğer ve akciğer olmak üzere birçok organda kronik iltihabi süreçler ortaya

çıkılmaktadır. Karaciğerde yoğunlaşan alkol metabolizması nedeniyle bu organ fizyolojik kapasitesinin üzerinde yük altına girmekte fakat alkolün vücutta dolaşımına girmesiyle birlikte toksik etkiler diğer organlara da yayılmaktadır (Das, 2009). Akciğer, bu yayılımın etkilerini doğrudan yaşayan hayati sistemlerden biri olmakta, çünkü hem dolaylı olarak dolaşımdaki toksik maddelere maruz kalmakta hem de doğrudan solunum yolu üzerinden alkolün etkisi altında kalmaktadır. Özellikle kılcıl damar düzeyinde gerçekleşen oksijenkarbondioksit değişiminde, alkol ve metabolitlerinin oluşturduğu endotelial hasar, gaz değişimini bozmakta ve hipoksiyeye neden olabilmektedir. Genel olarak Kaphalia ve Calhoun (2013) çalışmasında alkol kaynaklı akciğer hasarlarının metabolik, biyokimyasal ve bağışıklık temelli yönleri detaylandırılmıştır. Sitokin dengesizlikleri, antioksidan savunma sisteminin çökmesi ve epitel hasarı gibi süreçler vurgulanmıştır.

Alkolün vücutta dağılım süreci, aynı zamanda metabolik dengeyi etkileyen çeşitli hormonal ve nörokimyasal değişiklikleri de tetiklemektedir. Alkol, hipotalamik-hipofizer-adrenal aksı uyararak stres hormonlarının salınımını artırmakta, bu da sistemik düzeyde inflamatuvar yanıtı pekiştirmektedir. Bununla birlikte alkolün insülin direncini artırdığı ve glukoz metabolizmasında bozulmalara yol açtığı da bilinmektedir. Söz konusu metabolik dengesizlikler, özellikle kronik hastalıkların zeminini hazırlamakta, akciğer hastalıklarının seyri üzerinde de dolaylı etkiler oluşturmaktadır (Doğan, 2014). Örneğin diyabetik bireylerde alkol tüketimi ile pulmoner enfeksiyonlara yatkınlık artmakta, iyileşme süreçleri ise gecikmektedir. Alkolün plazma proteinlerine bağlanma oranının düşük olması nedeniyle, dolaşım sisteminde serbest formda bulunma süresi uzamakta ve bu da toksik etkilerinin daha yaygın bir alanda hissedilmesine neden olmaktadır. Özellikle tekrarlayan ve yüksek dozlu tüketimlerde, metabolik enzimlerin doygunluk düzeyine ulaşması ile metabolizma yavaşlamakta, bu da kandaki alkol düzeyinin hızlı şekilde yükselmesine neden olmaktadır. Böyle durumlarda, akciğer dokusunda oksijenlenmenin bozulması ve surfaktan üretimini azalması gibi kritik fizyolojik işlevler sekteye uğramaktadır (Das, 2009; Doğan, 2014).

### 2.1.1.2. Akciğer Savunma Mekanizmaları

Akciğerler, dış ortamla doğrudan temas halinde olan hayati organlardan biri olması nedeniyle, çeşitli patojen mikroorganizmalar, zararlı partiküller, toksik gazlar ve alerjenlere karşı gelişmiş savunma sistemleriyle donatılmış bulunmaktadır. Akciğer savunma sistemlerinin etkinliği, solunum sisteminin sağlıklı işleyişi açısından vazgeçilmez bir işlev görmektedir, bu sistemlerin zayıflaması ya da bozulması halinde, enfeksiyonlar, inflamatuvar hastalıklar ve toksik hasarlar kolaylıkla gelişebilmektedir (Burnham vd., 2009). Akciğerlerin en dış savunma hattı, burun ve üst solunum yollarında bulunan vibrissae adlı kıllar ve mukus salgıları ile başlamaktadır. Bu yapılar, solunan havadaki büyük partiküllerin daha alt solunum yollarına ulaşmasını engellemektedir. Trakea ve bronşların iç yüzeyini kaplayan psödostratifliye silli epitel hücreler ve goblet hücreleri, mukosilyer klirens olarak adlandırılan bir mekanizma

aracılığıyla savunma işlevi görmektedir. Goblet hücreleri, mukus salgılayarak havadaki partikül ve mikroorganizmaları bu yapışkan maddeye hapsederken, silli epitel hücreleri bu mukusu sürekli olarak yukarı doğru itmekte ve böylece yabancı maddelerin akciğerin derin kısımlarına ulaşması engellenmektedir (Bayram vd., 1998). Mukosilyer klirens mekanizmasının bütünlüğü, akciğer sağlığının korunmasında temel bir rol oynamaktadır (Boe vd., 2009; Burnham vd., 2009). Mukus tabakası, yalnızca mekanik bir bariyer işlevi görmekle kalmamakta, aynı zamanda içerdiği lizozim, laktoferrin, defensin ve immunoglobulin A (IgA) gibi antimikrobiyal maddeler aracılığıyla mikrobiyal proliferasyonu da doğrudan baskılamaktadır. Özellikle IgA, mukozal bağışıklığın temel bileşeni olup, patojenlerin epitel hücrelerine yapışmasını engelleyerek enfeksiyonların önüne geçmektedir. Bu moleküller, doğrudan mikrobiyal duvar yapılarını hedef almakta ve patojenlerin etkisiz hale getirilmesini sağlamaktadır (Büyükbaş ve İnal, 2006). Dolayısıyla mukus tabakası, fiziksel engelin ötesinde, biyokimyasal düzeyde de aktif bir bağışıklık aracı olarak görev yapmaktadır. Genel olarak Bobo (1972) klasikleşmiş çalışmasında, alkolün maksimum oksijen alımı, akciğer ventilasyonu ve kalp atım hızına olan etkilerini deneysel yöntemlerle ölçmüştür. Bulgular, alkol alımının fiziksel performans göstergelerinde azalmaya neden olduğunu ortaya koymuştur. Akciğerlerde ikinci savunma hattını oluşturan alveolar makrofajlar, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin başlıca hücresel bileşenlerinden biri olarak görev yapmaktadır. Alveol boşluklarında yer alan bu fagositik hücreler, solunum yoluyla akciğere ulaşan mikroorganizmaları, partikülleri ve ölü hücreleri tanıyarak fagosite etmekte, lizozomal enzimler aracılığıyla parçalamakta ve bu süreçte inflamatuvar sitokinler salarak immün yanıtı yönlendirmektedir (Büyükbaş ve İnal, 2007). Alveolar makrofajlar, ayrıca antijen sunumu yaparak adaptif bağışıklık sistemini aktive etmekte, bu sayede patojenlere karşı daha spesifik ve güçlü bir savunma oluşmasını sağlamaktadır. Tüm bunlarla ilişkili olarak Boe vd., (2009), alkol kötüye kullanımının bağışıklık sistemi ve solunum yolları üzerindeki etkilerini ele alarak, alkol bağımlılığı ile artan pulmoner hastalık riski arasında doğrudan ilişki kurmuştur. Çalışma, alkolün nötrofil fonksiyonlarını baskılayarak enfeksiyonlara yatkınlığı artırdığını belirtmektedir.

Adaptif bağışıklık sistemine ait hücreler, özellikle T lenfositleri ve B lenfositleri, akciğer dokusunda lokalize lenfoid doku alanlarında görev yapmaktadır. T lenfositleri, enfekte hücreleri tanıyarak sitotoksik yanıt oluşturmakta, B lenfositleri ise antikor üreterek patojenlere karşı uzun süreli bağışıklık sağlamaktadır. Bronşiyal mukozada yer alan bronşiyal ilişkili lenfoid doku (BALT), bu adaptif yanıtların oluştuğu ve düzenlendiği en önemli yapılar arasında yer almaktadır. Akciğer dokusunun bu şekilde hem doğuştan gelen hem de kazanılmış bağışıklık sistemini iç içe barındıran bir yapıya sahip olması, onu dış çevreyle temas halindeki organlar içinde en kapsamlı savunma donanımına sahip yapı haline getirmektedir (Büyükbaş ve İnal, 2006; Büyükbaş ve İnal, 2007). Akciğer savunma mekanizmalarının etkili çalışabilmesi için ayrıca fizyolojik pH, nem oranı ve sıcaklık gibi çevresel koşulların da dengede olması gerekmektedir. Özellikle mukosilyer klirensin sağlıklı işlemesi için solunan havanın nemli ve ılık olması gerekmektedir. Kuru ya da soğuk hava,

silyaların hareketini yavaşlatmakta, bu da mukus temizliğini zorlaştırmakta ve mikroorganizmaların alt solunum yollarına ulaşmasını kolaylaştırmaktadır. Benzer şekilde alkol tüketimi bu savunma işlevlerini hem doğrudan hem de dolaylı yollarla bozmaktadır (Capurso ve Lahner, 2017). Alkol, alveolar makrofajların fagositik aktivitesini azaltmakta, silyaların hareketlerini yavaşlatmakta ve mukus viskozitesini artırarak mukosilyer klirensi olumsuz etkilemektedir. Ayrıca alkol, surfaktan üretimini baskılayarak alveollerin yapısal bütünlüğünü zedelemekte ve bu durum gaz değişimi kadar enfeksiyon savunması açısından da ciddi riskler doğurmaktadır. Bu sistemlerin bir arada ve dengeli biçimde çalışması, akciğerin dış ortamdan gelen tehditlere karşı korunmasında kritik bir rol oynamakta fakat dışsal toksik etmenlerin, özellikle de alkolün bu savunma mekanizmaları üzerinde yarattığı baskılayıcı etki, akciğeri enfeksiyonlara, inflamasyona ve yapısal bozulmalara karşı savunmasını bırakmaktadır (Çelik vd., 2002).

Akciğer savunma mekanizmalarının etkin bir şekilde işlemesi, aynı zamanda oksidatif stres ile mücadele edebilen antioksidan sistemlerin varlığına da bağlı bulunmaktadır. Akciğer dokusu, dış ortamdan alınan oksijenin doğrudan temas ettiği bir yapı olması nedeniyle reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı sürekli maruziyet altındadır. Bu moleküller, çevresel toksinler, enfeksiyon etkenleri ya da inflamatuvar süreçlerin tetiklediği hücrel faaliyetler sonucunda oluşmakta ve kontrol altına alınmadığında hücre zarlarına, DNA'ya ve protein yapılarına zarar vermektedir. Akciğer dokusunun bu tür hasarlardan korunması için, glutatyon, süperoksit dismutaz, katalaz gibi endojen antioksidan sistemler devreye girmektedir (Capurso ve Lahner, 2017; Çelik vd., 2002). Bu enzimler, reaktif oksijen türlerini etkisiz hale getirerek hücre bütünlüğünün ve fonksiyonunun korunmasına yardımcı olmaktadır. Özellikle kronik alkol tüketiminde glutatyon düzeylerinin azaldığı, süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerinin düştüğü çeşitli deneysel ve klinik çalışmalarla gösterilmektedir. Bu durum, akciğer epitelinde oksidatif hasarın birikmesine, hücrel dejenerasyona ve inflamatuvar süreçlerin daha kolay başlamasına zemin hazırlamaktadır. Alkolün neden olduğu bu redoks dengesizliği, sadece hücrel düzeyde değil, doku düzeyinde de bozulmalara neden olmakta ve akciğerlerin savunma kapasitesini ciddi biçimde zayıflatmaktadır (Das, 2009).

### 2.1.1.3. Akut ve Kronik Alkol Kullanımının Akciğer Fonksiyonlarına Etkisi

Alkolün akciğer fonksiyonları üzerindeki etkileri, kullanım biçimi, süresi ve bireysel fizyolojik farklılıklara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Akut ve kronik alkol maruziyeti, akciğerin hem yapısal bütünlüğünü hem de fizyolojik işlevlerini bozmakta, bu da solunum sistemi üzerinde ciddi fonksiyonel kayıplara yol açmaktadır.

Alkol, merkezi sinir sistemi üzerindeki depresif etkileriyle solunum kontrol mekanizmalarını baskılamakta, alveolar düzeyde ise oksidatif stres, inflamasyon ve hücrel hasar oluşturarak gaz değişim süreçlerini olumsuz etkilemektedir (Guidot ve

Hart, 2005; Gündoğmuş ve Turhan, 2024). Akciğerin, dış ortamla sürekli temas halinde olması ve yüksek düzeyde vaskülarize bir yapı içermesi, alkolün sistemik etkilerine karşı bu organı savunmasız kılmaktadır. Akut alkol kullanımı sonrasında solunum sisteminde birtakım geçici fizyolojik değişiklikler gözlemlenmektedir. Alkol, solunum merkezindeki kemoreseptör duyarlılığını azaltmakta, bu da hiperkapniye ve ventilasyonun yavaşlamasına neden olmaktadır. Bu çerçevede Sisson (2007) makalesi, alkolün solunum yolları üzerindeki fizyolojik etkilerini irdelemiştir. Alkolün solunum epitel hücrelerinin silya hareketlerini yavaşlattığı, nitrojen oksit dengesini bozduğu ve kronik alkolizmde bronkopulmoner komplikasyon riskini artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca refleks öksürük mekanizmasının baskılanması, solunum yollarına giren iritan maddelerin temizlenmesini güçleştirmektedir. Alkolün bronş düz kaslarındaki gevşetici etkisi kısa vadede hava yolu direncini azaltmakta gibi görünse de, mukosilyer klirens üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle mukus birikimini kolaylaştırmakta ve enfeksiyon riskini artırmaktadır. Bu durum özellikle yatay pozisyonda ve bilinci baskılanmış bireylerde aspirasyon gelişimine zemin hazırlamakta, aspirasyon pnömonisi, akut alkol zehirlenmesinin en ciddi komplikasyonları arasında yer almaktadır (Gupta vd., 2020).

Kronik alkol kullanımı ise akciğer fonksiyonları üzerinde çok daha derin, kalıcı ve ilerleyici etkilere yol açmaktadır. Uzun süreli alkol maruziyeti, alveolar makrofajların fagositik kapasitesini azaltmakta, epitel hücre bütünlüğünü bozmaktadır. Bu durum, solunum yollarında inflamasyonun kronikleşmesine, alveolar duvarların incelmeye ve interstisyel dokuda fibrotik değişimlerin gelişmesine neden olmaktadır (Happel ve Nelson, 2005). Ayrıca surfaktan üretiminde azalma meydana gelmekte, bu da alveollerin çökmesini kolaylaştırmakta ve gaz değişimini sekteye uğratmaktadır. Kronik alkolizmde sıklıkla diffüzyon kapasitesinde azalma gözlemlenmekte, bu da kandaki oksijen düzeyinin düşmesine ve hipoksik tabloya neden olmaktadır. Klinik olarak, kronik alkol kullanımına bağlı gelişen pulmoner değişiklikler genellikle sinsi ilerlemekte ve semptomlar geç dönemde ortaya çıkmaktadır. Nefes darlığı, efor kapasitesinde azalma, kronik öksürük ve sık tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları en sık bildirilen bulgular arasında yer almaktadır. Fonksiyonel değerlendirmelerde ise FEV<sub>1</sub>, FVC ve DLCO gibi parametrelerde belirgin düşüşler tespit edilmekte, bu düşüşler, obstrüktif ya da restriktif akciğer hastalıklarının gelişimine işaret etmektedir.

### 2.1.2. Bağışıklık Sistemi ve Proinflamatuvar Sitokinler

Alkol, bağışıklık sistemi üzerinde doğrudan ve dolaylı birçok yıkıcı etki oluşturmaktadır. Akut ve kronik alkol kullanımı, hem doğuştan gelen hem de sonradan kazanılmış bağışıklık yanıtlarını baskılamakta ve organizmanın enfeksiyonlara karşı savunma kapasitesini zayıflatmaktadır (Nielsen vd., 2024). Bu bağlamda alkol, yalnızca immün yetmezlik sendromlarıyla benzer etkiler göstermekle kalmamakta, aynı zamanda inflamatuvar yanıtların düzensizliğine neden olarak sistemik düzeyde bağışıklık dengesizliğine yol açmaktadır. Alkol, sitokin üretimini de baskılamakta, özellikle, (IL-6) ve (TNF- $\alpha$ ) gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretiminde düzensizlik

yaratmaktadır. Bu da immün yanıtın koordinasyonunu bozmakta ve enfeksiyonlara karşı yanıtın zayıflamasına neden olmaktadır. Bu bağlamda Das (2009) alkolün akciğer üzerindeki etkilerini literatür taraması eşliğinde kapsamlı bir şekilde ele almıştır. Çalışmada kronik alkol kullanımının akciğerde immün yanıtı zayıflattığı, mukosilyer klirensi azalttığı ve solunum yolu enfeksiyonlarına zemin hazırladığı vurgulanmaktadır.

Kazanılmış bağışıklık sistemi de alkol kullanımından derin şekilde etkilenmektedir. B lenfositlerinin antikor üretimi azalmakta, bu da humoral bağışıklığın zayıflamasına yol açmaktadır. Özellikle IgA ve IgG düzeylerinde azalma meydana gelmekte, bu durum mukozal yüzeylerde patojenlere karşı savunma bariyerlerinin zayıflamasına neden olmaktadır. T lenfositleri düzeyinde ise, hem CD4+ yardımcı T hücrelerinin hem de CD8+ sitotoksik T hücrelerinin fonksiyonları bozulmakta, bu da hem viral enfeksiyonlara karşı yetersiz yanıtların ortaya çıkmasına hem de kanser hücrelerine karşı bağışıklık gözetiminin zayıflamasına neden olmaktadır (Oğuz vd., 2015). Akciğerin yüzeyini kaplayan alveolar makrofajlar, alkol maruziyetiyle birlikte fonksiyonlarını yitirmekte ve fagositik etkinlikleri düşmektedir. Genel olarak alkolün bağışıklık sistemi üzerindeki bu etkileri yalnızca enfeksiyon riskini artırmakla kalmamakta, aynı zamanda immün tolerans mekanizmalarını da bozarak otoimmün hastalıklara yatkınlık oluşturmaktadır. Bu konu bağlamında Gamble vd., (2006) alkolün akciğerlerde bağışıklık yanıtı üzerindeki etkilerini araştırmış, özellikle bakteriyel enfeksiyonlara karşı savunma sisteminin zayıfladığını vurgulamıştır. Alkol, alveolar makrofajların aktivitesini baskılayarak enfeksiyonlara yatkınlığı artırmaktadır. Alkol, inflamatuvar süreci yalnızca başlatmakla kalmamakta, aynı zamanda kronikleşmesine ve tedaviye dirençli hale gelmesine de neden olmaktadır. Bu direnç, hem bağışıklık hücrelerinin alkolle inhibe edilmesi hem de inflamatuvar sitokinlerin regülasyonunda meydana gelen bozukluklardan kaynaklanmaktadır. Özellikle IL-6,

TNF- $\alpha$  ve IL-8 gibi proinflamatuvar mediyatörlerin aşırı salımı, akciğer dokusunda sürekli bir inflamatuvar durumun oluşmasına ve bu sürecin kronik fibrotik faza geçmesine yol açmaktadır (Mecit, 2016; Mehta ve Guidot, 2017). Bu kapsamda Büyükbaş ve İnal (2007) çalışmasında, aşırı alkol kullanımının C-reaktif protein ve alfa-1 antitripsin düzeyleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bulgular, alkolün inflamatuvar süreci artırarak sistemik düzeyde biyokimyasal değişiklikler oluşturduğunu göstermektedir. Fibrozis gelişimi ile akciğerin elastik yapısı kaybolmakta, solunum kaslarının işi artmakta ve ventilasyon ciddi oranda zorlaşmaktadır. Bu noktada hastalar sürekli dispne, efor intoleransı ve artan oksijen ihtiyacı ile sağlık kuruluşlarına başvurmaktadır. Alkolün inflamasyonla ilişkili bu etkileri, çoğu zaman diğer çevresel ya da bireysel risk faktörleriyle birleştiğinde daha yıkıcı bir hal almaktadır. Özellikle sigara kullanımı, kötü beslenme, hava kirliliği ya da eşlik eden enfeksiyonlar, alkolün etkilerini sinerjik biçimde artırmaktadır (Mouton vd., 2016). Bu faktörler, solunum yollarında inflamasyonu tetikleyen ve sürdüren döngüyü güçlendirmekte, hastalığın daha hızlı ilerlemesine neden olmaktadır. Bu çerçevede

alkol bağımlılığı olan bireylerin sağlık hizmetlerine geç başvurduğu, önerilen tedavilere tam olarak uyum sağlayamadığı ve yaşam koşullarının bu hastalıkların yönetimini zorlaştırdığı bilinmektedir. Bu durum, alkolle ilişkili solunum yolu iltihaplarının toplum sağlığı açısından da önemsenmesini gerekli kılmaktadır (Nielsen vd., 2024).

## 2.2. Sigara, Solunum Sistemi ve Akciğere etkileri

KOAH, kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Amfizem (alveollerin harabiyeti sonucu oluşur) ve kronik obstrüktif bronşit (bronş tüplerinin kronik inflamasyonu), KOAH'ın iki yaygın bulgusudur. KOAH, dünya çapında üçüncü önde gelen ölüm nedeni olup, 2019'da 3,23 milyon ölüme yol açmıştır (Dünya Sağlık Örgütü, 2022b). Bu nedenle, özellikle gelişmemiş ülkelerde ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Epidemiyolojik çalışmalara göre, 2010 yılında 384 milyon KOAH vakası tespit edilmiş ve küresel prevalans %11,7 olarak bildirilmiştir (Adeloye vd., 2015). Tahminlere göre, KOAH dahil solunum yolu hastalıklarından her yıl 5,4 milyondan fazla ölüm gerçekleşebilir (Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı Küresel Girişimi, 2022). KOAH'ın en yaygın nedeni sigara içmek olsa da, birçok çalışma sigara içmeyenlerde de hava yolu obstrüksiyonu gelişebileceğini göstermektedir. Sigara içmeyen KOAH hastalarında hava yolu tıkanıklığı, çoğunlukla çevresel kirlenmelerin solunmasından kaynaklanır (Yang vd., 2022). Yaşlanma, genetik anormallikler ve akciğer gelişimindeki bozukluklar da KOAH gelişiminde etkilidir (Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı Küresel Girişimi, 2022). KOAH için en iyi bilinen genetik risk faktörü, alfa-1 antitripsin eksikliğidir (Foreman vd., 2012). Çevresel irritanlara maruziyet, epigenetik mekanizmalar yoluyla KOAH'ın ilerlemesine katkıda bulunabilir.

### 2.2.1. Sigara, Alkol ve KOAH

Kronik alkol tüketiminin solunum sistemi üzerinde çok yönlü olumsuz etkileri bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar, alkolün hava yolu epitel bariyer fonksiyonunu bozarak KOAH patogenezinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Özellikle, alkol metabolitlerinin neden olduğu oksidatif stresin, akciğer dokusunda enflamatuvar yanıtı tetiklediği ve antioksidan savunma mekanizmalarını zayıflattığı bilinmektedir.

Bu durum, KOAH hastalarında görülen hava yolu remodellenme sürecini hızlandırabilir (Sisson et al., 2005). Çalışmada dikkat çeken bir diğer bulgu, alkolün akciğer dokusunda glutatyon seviyelerini önemli ölçüde düşürerek oksidatif stresi artırmasıdır. Artan oksidatif stres, KOAH patogenezinde kritik rol oynayan enflamatuvar yanıtı şiddetlendirmekte ve doku hasarını artırmaktadır. Özellikle, alkole bağlı olarak akciğer epitel hücrelerinde sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunun azalması, epitel bariyer fonksiyonunu bozmakta ve hava yolu hasarını kolaylaştırmaktadır (Bhat., 2016). Aşırı alkol tüketiminin KOAH'lı bireylerde oksidatif stresi artırarak hastalık progresyonunu hızlandırdığını ortaya koymaktadır. Alkol, antioksidan glutatyon seviyelerini düşürerek akciğer dokusunda serbest radikal

birikimine yol açmakta ve enflamatuvar yanıtı şiddetlendirmektedir. Ayrıca, alkolik KOAH hastalarında makrofaj fonksiyon bozukluğu nedeniyle pnömoni riskinin 3 kat arttığı belirtilmektedir (Joshi ve Guidot, 2023).

## 2.2.2. Sigara Kullanımı

Sigara, erken ölüme yol açan pek çok kimyasal madde içeren bir tütün ürünüdür. Aynı zamanda gelişmiş ülkelerde önlenebilir ölüm ve hastalık risk faktörleri arasında en önemlilerinden biridir (Bergen ve Caporaso, 1999). Sigara, Columbus döneminden beri yaygın olarak kullanılan bir tütün ürünüdür. Başlangıçta çiğnenerek tüketilen bu ürün, daha sonra makinelerin icadıyla rulo haline getirilmiştir. 1960'larda sigara tüketimi, kişi başına yılda yaklaşık 4.400 adetle zirve yapmıştır. Bunun ardından, 1964 yılında ABD Halk Sağlığı Servisi bir rapor yayınlamıştır. Bu raporda önemli uyarılar ve sonuçlar yer almıştır. İlk bulgu, sigara kullanımının erkeklerde yaşa özgü ölüm oranlarında %70 artışla ilişkili olduğunu vurgulamış, ancak bu etkinin kadınlarda daha az belirgin olduğu belirtilmiştir. Türkiye'de sigara kullanım eğilimleri her yıl değişiklik göstermektedir (Çalıköğlü ve Köyceğiz, 2018).

### 2.2.2.1. Sigara ve Alkol Arasındaki Etkileşim

Alkol ve sigaranın birlikte kullanımı, akciğerde oksidatif stresi ve enflamasyonu artırarak KOAH ve akut akciğer hasarı riskini yükseltir. Alkol, sigaranın neden olduğu epitel bariyer bozukluğunu şiddetlendirir (Joshi ve Guidot, 2023). Alkol ve sigara dumanının birlikte maruziyeti, hava yolu epitel hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırır. Bu durum, mitokondriyal DNA hasarına ve hücre ölümüne yol açarak kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) patogenezi kötüleştirir (Sundar vd., 2023). Ayrıca Her iki madde, akciğerin mukosilyer temizleme mekanizmasını bozar. Sigara dumanı ve alkol, siliyer hareketliliği azaltarak pnömoni ve kronik bronşit riskini artırır (Simet ve Sisson, 2023). Fare modellerinde yapılan bu çalışma, alkol ve sigara dumanının TGFβ1/Smad3 yolunu aktive ederek pulmoner fibrozis gelişimini tetiklediğini göstermiştir. Bu kombinasyon, kollajen birikimini tek başına sigaradan daha fazla artırmaktadır (Maremanda ve Galam, 2023).

## 2.2.3. Hava Yolu Epitel Hücreleri

### 2.2.3.1. Bronş Epitel Hücreleri

Modüle eder; hipoksik koşullarda bazal hücrelerden türeyebildikleri bildirilmiştir (Branchfield vd., 2016; Shivaraju vd., 2021).

Epitel dokusu, patojenler ve alerjenler gibi çevresel faktörlere karşı koruyucu fiziksel bir bariyer görevi görür. Epitel hücreleri yalnızca fiziksel bir engel oluşturmakla kalmaz, aynı zamanda kimyasal ve immünolojik bir savunma mekanizması da sağlar (Kayalar vd., 2024; Proud ve Leigh, 2011). Solunum yolu epitel

hücreleri, sıkı bağlantılar (TJ), yapışma bağlantıları (AJ) ve desmozomlar aracılığıyla epitel bariyerini oluşturur.

Yapışma bağlantıları, E-kaderin, aktin, vinkulin,  $\alpha$ -katenin ve  $\beta$ -katenin gibi çeşitli bileşenlerden meydana gelirken, sıkı bağlantılar kludinler, okludinler ve bağlantısal adezyon moleküllerini içeren bir kompleks yapıdadır. Sıkı bağlantılar, apikal sınırı kapatarak fiziksel bir engel görevi üstlenir. Yapışma bağlantıları ise hücreler arası adezyondan sorumludur. Desmozomlar ise stabil hücre bağlantılarını oluşturur (Lu vd., 2024).

Solunum epitelinin bir diğer önemli işlevi, gaz alışverişi için geniş ve ince bir yüzey alanı sağlamasıdır. Solunan yabancı maddeleri tanıma ve koruyucu özellikler gösterme yeteneğine sahiptir. Çözünen maddelerin ve suyun hareketini düzenleyerek akciğer sıvı dengesini korur. Ayrıca akciğer epitel rejeneratif (yenilenme) kapasiteye sahiptir ve mukus üretiminde rol oynar (Proud ve Leigh, 2011; Li vd., 2015).

### 2.2.3.1.1. Bronş Epitel Kültürleri ve Kültür Yöntemleri

Birincil bronş epitel hücreleri (PBEH), önce tanımlı sıvı fazda (ör. BEGM/DMEM-F12 temelli) ve ECM kaplı (örn. kollajen IV) geçirgen membranlarda çoğaltılır; ardından hava-sıvı ara yüzüne (ALI) alınarak ~3–4 haftada mukosilyer farklılaşma (silyalı + goblet + bazal hücreler) elde edilir (Fulcher, 2013; Jiang et al., 2018; Bukowy-Bieryło, 2021). LI kültürlerinde farklılaşmanın doğrulanması için FOXJ1<sup>+</sup> silyalı hücreler, MUC5AC/MUC5B üretimi ve TEER ile bariyer bütünlüğü izlenir (Leach et al., 2023; Jiang et al., 2018). BEAS-2B gibi ölümsüzleştirilmiş bronş epitel hatları genellikle sıvı fazda bakım/uyarı çalışmaları ve taramalar için kullanılır; farklılaşma kapasitesi sınırlı olup protokol gereksinimleri birincil hücrelerden ayrıdır (ATCC, 2025; Park et al., 2015). Yöntem seçimi (birincil ALI vs. hücre hattı, sıvı faz) araştırma sorusuna bağlıdır: fizyolojiye en yakın model için birincil ALI kültürleri, hızlı/tekrarlanabilir taramalar içinse hücre hatları tercih edilir (Bukowy-Bieryło, 2021).

### 2.2.3.1.2. Primer Bronş epitel hücre hattı (PBEH)

Primer insan havayolu epitel hücreleri (PBEH), in vitro solunum yolu çalışmalarında fizyolojik yapıyı en iyi yansıtan modellerdendir. Tanımlı besiyerlerinde çoğaltılan hücreler geçirgen membranlar üzerinde hava-sıvı ara yüzüne alındığında psödostratifiye bir epitel oluşturur ve silyalı, goblet/sekretuar ve bazal hücelere farklılaşır (Fulcher ve Randell, 2013; Jiang vd., 2018). İyi farklılaşmış ALI kültürleri; mukosilyer klirens, iyon/sıvı dengesi ve konak-patojen etkileşimlerini incelemek için kullanılır ve in vivo insan hava yolu epiteline transkriptomik ve fonksiyonel düzeyde yüksek benzerlik gösterir (Pezzulo vd., 2011). Bariyer bütünlüğü ve farklılaşma kalitesi sıklıkla transepitel elektrik direnci (TEER), silyogenezini yansıtan FOXJ1/aksetile tübülün belirteçleri ve MUC5AC/MUC5B üretimi gibi çıktılarla

doğrulandır (Srinivasan vd., 2015; Leach vd., 2023). Standart protokoller ECM kaplı (örn. kollajen IV) membranlar, serum içermeyen bronşiyal epitel büyüme ortamları ve yaklaşık 3–4 haftalık bir farklılaşma dönemini içerir (Fulcher ve Randell, 2013; Jiang vd., 2018).

### 2.2.3.1.3. Bronş Epitel Hücre Hattı (BEAS-2B)

BEAS-2B bronşiyal epitel hücre hattı, kanser öyküsü bulunmayan bir bireyden alınan normal insan bronş epitel dokusundan türetilmiştir (Reddel vd., 1988). Hücre hattının oluşturulma sürecinde, adenovirüs 12-SV40 hibrit virüsü ile transfeksiyon işlemi uygulanmış ve ardından ardışık pasajlamalar yoluyla immortalize edilmiştir.

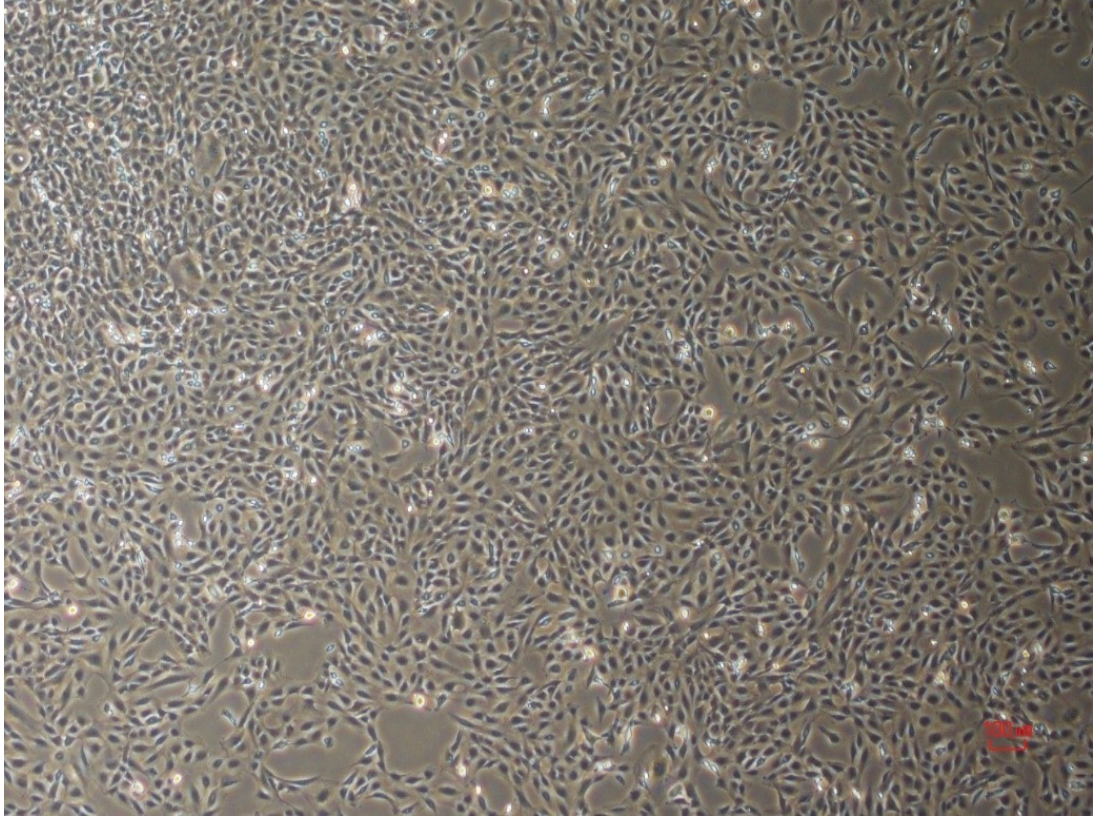
Bu hücre hattı 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'de genellikle serum içermeyen BEBM/BEGM-türevleriyle ya da DMEM/F-12 kültür vasatlarında kültürlenir; ATCC, fibronectin/kolajen I/BSA kaplı yüzeyler ve BEBM + Bronchial Epithelial Cell Growth Kit ile bakımı önerir (ATCC, 2025; Veranth et al., 2007). Fenotip kültür koşullarına, özellikle serum varlığına duyarlıdır; fetal sığır serumu (FBS) skuamöz farklılaşmayı tetikleyebilir ve gen ifadesi profillerini belirgin biçimde etkileyebilir (Ke vd., 1988; Zhao ve Klimecki, 2015). BEAS-2B toksikoloji, inflamasyon ve bariyer işleviyle ilgili mekanistik çalışmalarda yaygın kullanılan bir modeldir; bununla birlikte primer ALI epitele kıyasla mukosilyer farklılaşma ve goblet mütünü (MUC5AC) ekspresyonu sınırlı kalabilir (Rayner et al., 2019). O zamandan bu yana, solunum yolu hastalıklarının moleküler mekanizmalarının araştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir in vitro model olarak pek çok çalışmada yer almıştır (Ha vd., 2007; Vallabani vd., 2011; Vergaro vd., 2016).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. BEAS-2B Hücre Hattı Kültürleri

BEAS-2B hücreleri (ATCC, CRL-9609 Wesel, Almanya), %10 fetal bovine serum (FBS) (Kat no: S181H-500, Biowest) ve %1 penisilin/streptomisin (Kat no: L0022-100, Biowest) içeren Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (Kat no: R8758, Sigma) büyüme vasatı, 75 cm<sup>2</sup> kültür flasklarında (Corning, Thermo) 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub> altında inkübe edildi. Kültür vasatı iki günde bir değiştirildi. Hücre yaşının sonuçlar üzerindeki etkisini önlemek için deneyler P25 ile P30 pasaj numaraları arasında gerçekleştirildi. Deneylerde zemininin %80'ni kaplayan (konfluansa ulaşan) hücreler kullanıldı. (şekil3.1) Kültürdeki BEAS-2B hücrelerine örnek bir görsel şekilde gösterilmiştir.

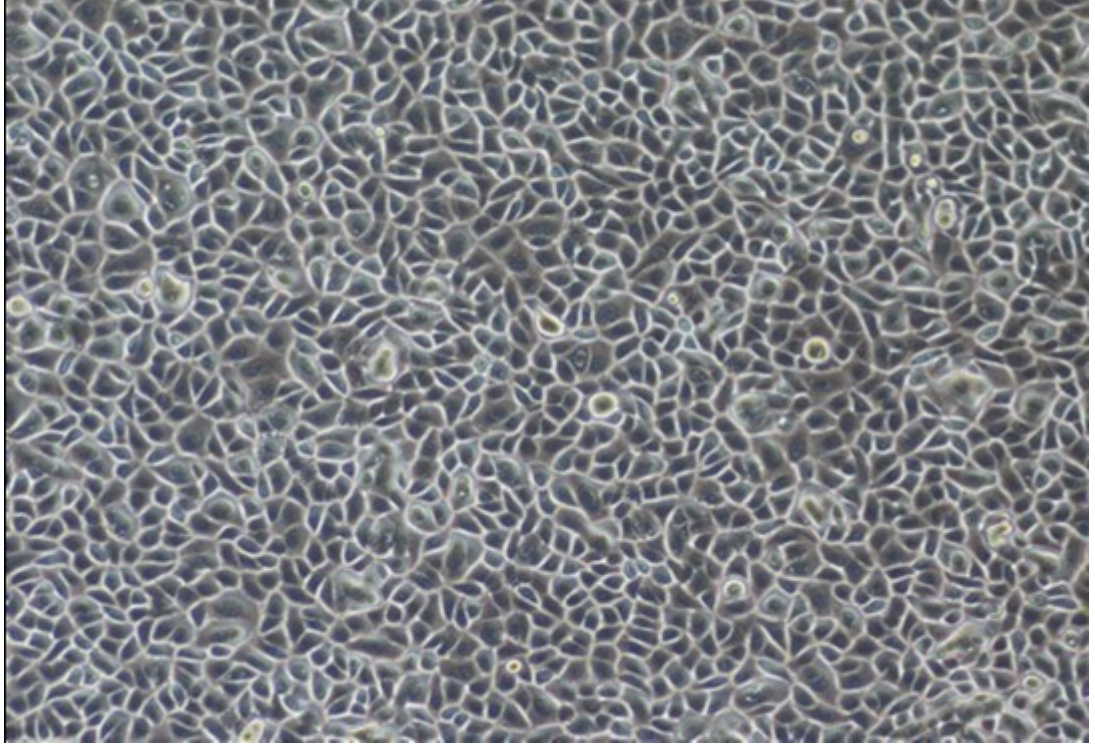
Hücreler %80 konfluansa ulaştığında, sonraki aşamada kullanılacak tripsinin inaktivasyonunu önlemek için 1X Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salini (1x DPBS) (Kat no: L0615-500, Biowest) ile yıkandı. Yıkamanın ardından, hücrelerin flask tabanından ayrılması için 3 mL %0,25 Trypsin-EDTA (1X) (Kat:25200072) (Gibco) eklenerek 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> ortamında 4 dakika inkübe edildi. Hücrelerin ayrılma durumu mikroskop (Olympus CK40, Japonya) altında kontrol edildi. Tripsini inaktive etmek için %10 fetal bovine serum içeren 6 mL büyüme vasatı eklenerek hücre süspansiyonu 15 mL'lik konik tüpe aktarıldı. 400 xg'de 4 dakika santrifüj işlemi sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet uygun miktarda büyüme vasatı içinde yeniden sulandırıldı. Hücre süspansiyonu, tripan mavisi (160 µL tam RPMI besiyeri, 20 µL hücre süspansiyonu ve 20 µL tripan mavisi) ile hazırlanarak pipetaj ile homojenize edildi. Süspansiyondan 10 µL alınarak hemositometreye (Marienfeld, Almanya) yüklendi ve invert mikroskop (Olympus CK40, Japonya) altında canlı hücreler sayıldı (Petty et al., 2005).



**Şekil 3.1.** BEAS-2B hücrelerinin faz-kontrast ışık mikroskobunda görünümü;

### **3.1.1. İnsan Primer Bronşiyal Epitel Hücreleri (PBEH) Kültürü**

Ticari olarak temin edilen sağlıklı ve sigara içmeyen bir bireyden elde edilen primer insan bronş epitel hücreleri (Kat no: 02AB0839.02, Epithelix), sigara içen (Kat no: 02AB066901, Epithelix) ve KOAH'lı bir bireyden (Kat no: 02AB066801, Epithelix) elde edilen primer insan bronş epitel hücreleri, kuru buz içerisinde laboratuvara transfer edildi ve kültür gününe kadar azot tankında tutuldu. Kültür sırasında hücreler, üreticinin talimatlarına göre çözüldü. Hücreler 37°C'de 2-3 dakika bekletildi ve %10 FBS içeren önceden ısıtılmış DMEM besiyerinde 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. İlk olarak, hücreler 1 ml insan solunum yolu epitel hücresi (PBEH) kültür vasatında (EP09AM, Epithelix) yeniden süspanse edildi ve 30 ml kültür besiyeri içeren 75 cm<sup>2</sup>'lik bir kültür kabına ekildi ve 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve %99 nemde inkübe edildiler. Hücre kültür vasatı her 3 günde bir değiştirildi. Bu hücreler birkaç ay boyunca pasajlandı ve her pasajda yedek hücre dondurma işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3.2). Kültürdeki BEAS-2B hücrelerine örnek bir görsel şekilde gösterilmiştir.



**Şekil 3.2.** İnsan primer bronş epitel hücrelerinin (PBEH) faz kontrast mikroskopisi görüntüsü. Büyütme: 10x.

### **3.1.2. Sigara Dumanı Ekstraktı (SDE) Hazırlanması ve BEAS-2B Hücrekültürleri ile**

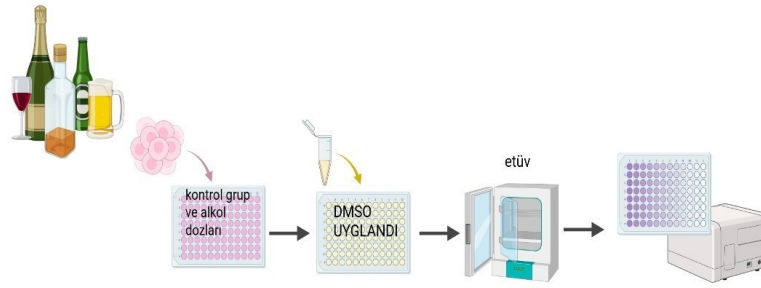
Sigara duman ekstraktı (SDE), literatürde kullanılan yöntemler (Aoshiba vd., 2001; Sarı vd., 2020) temel alınarak hazırlandı. Bu yöntemle göre, deneysel amaçlı bir sigara (Kentucky, ABD), filtre kısmına ulaşana kadar bir aspirasyon cihazı ile yakıldı ve oluşan duman 37°C'de 10 mL steril fosfat tamponlu salin (PBS, 0,01M) içerisinde karıştırıldı. Hazırlanan ekstre, 0,22 µm'lik milipore filtre ile süzüldü. Elde edilen ekstre, %100'lük stok SSE olarak kabul edildi. Spektrofotometrik ölçümde 290 nm dalga boyunda optik dansite (OD) değeri 2-2,4 aralığında olan ekstralar deneylerde kullanıldı. SDE, her deney için taze olarak hazırlandı.

BEAS-2B hücreleri kültür kaplarına ekildikten sonra %80 konfluens seviyesine ulaştıklarında, literatürde yaygın olarak kullanılan bir konsantrasyon olan (Li vd., 2022) %0,5'lik SDE ile 24 saat inkübe edildi. Uygulama sonrasında hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

### **3.2. Hücre Canlılık Analizi**

BEAS-2B hücre hattı üzerinde stok konsantrasyonu 17,12 M olan %100 saf

etanol kullanılarak hazırlanan 0, 0,1, 1, 2,5, 5, 10, 25, 50 ve 100 mM konsantrasyonlarda etanol içeren serum içermeyen kültür vasatı uygulandı. Etanol maruziyeti 30 dk, 1 saat ,2 saat, 4 saat, 6 saat, 8 saat ve 12 saat gerçekleştirildi.( Şekil 3.2) Alkolün hücre canlılığı üzerine doz ve zaman yanıtını MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) ile test etmek için hücreler, 24 kuyulu kültür plaklarına  $5 \times 10^4$  hücre/kuyu yoğunluğunda ekildi. Deneylelerden 24 saat önce, hücre besiyeri serum içermeyen kültür vasatı ile değiştirildi. Kültür vasatı, 1 mg/mL MTT (M6494, Sigma) içeren serum içermeyen kültür vasatı ile değiştirildi ve  $37^\circ\text{C}$ 'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında MTT solüsyonu uzaklaştırıldı ve hücreler üzerine DMSO eklendi. Renk değişimi, spektrofotometrik ölçümlerle 550 nm dalga boyunda okundu.



**Şekil 3.3.** MTT görsel gösterimi. Şekil, BioRender.com (bilimsel görselleştirme platformu) aracılığıyla tasarlanmıştır.

BEAS-2B hücrelerinde 1 ve 5 mM etanol ile %2,5 ve %5 sigara dumanı ekstraktının (SDE), tek başına ve kombinasyon halinde 12 ve 24 saatlik maruziyetleriyle oluşturulan deney koşulları Tablo 3.1'te özetlenmiştir.

**Çizelge 3.1.** BEAS-2B Hücreleriyle gerçekleştirilen deney düzeni tablosu

Uygulama Tipi	Alkol Dozu	Sigara Konsantrasyonu	Zaman (saat)
Kontrol	-	-	12, 24
Sadece Alkol	1 mM	-	12, 24
Sadece Alkol	5 mM	-	12, 24
Sadece Sigara	-	%2.5	12, 24
Sadece Sigara	-	%5	12, 24
Alkol + Sigara	1 mM	%2.5	12, 24
Alkol + Sigara	1 mM	%5	12, 24
Alkol + Sigara	5 mM	%2.5	12, 24
Alkol + Sigara	5 mM	%5	12, 24

Bu çalışmada PBEH hücreleri kullanılmış; farklı donör tipleri (sigara içmeyen, sigara içen, KOAH'lı) için kontrol ve alkol dozları (1–5 mM) ile 12 ve 24 saatlik zaman noktaları Tablo 3.2 'te özetlenmiştir.

**Çizelge 3.2.** Primer bronş epitel hücreleriyle gerçekleştirilen deney düzeni tablosu

Hücre Tipi	Uygulama Grupları	Alkol Dozu	Zaman (saat)
Sigara İçmeyen	Kontrol	5mM	12, 24
Sigara İçmeyen	Alkol	-	12, 24
Sigara İçmeyen	Alkol	5 mM	12, 24
Sigara İçen	Kontrol	-	12, 24
Sigara İçen	Alkol	1 mM	12, 24
Sigara İçen	Alkol	5 mM	12, 24
KOAH'lı	Kontrol	-	12, 24
KOAH'lı	Alkol	1 mM	12, 24
KOAH'lı	Alkol	5 mM	12, 24

### 3.3. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Bu işlem için, sıralanmış BEAS-2B ve ticari insan primer bronş epitel hücreleri içeren her tüp, 500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar uzaklaştırıldı ve pelletlerden RNeasy Micro Kit (Kat no: 74004, Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici protokolüne uygun şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Örnekler öncelikle pellet üzerine 350 µl RLT Tamponu eklenerek lizis işlemine tabi tutuldu ve ardından homojenize edildi. Bağlanma verimini artırmak için lizata etanol eklendi. Hazırlanan lizat, RNeasy silika membran kolonuna yüklendi; burada RNA membrana bağlanırken kontaminantlar etkili bir şekilde uzaklaştırıldı. Kalan DNA kalıntılarının giderilmesi için kolon üzerinde DNaz uygulaması yapıldı. Saf RNA, elüsyon tamponu kullanılarak kolondan elüte edildi. Elde edilen total RNA'nın miktarı ve kalitesi, Qubit RNA HS Assay Kit (Q32852, Thermo, ABD) ile üretici talimatları doğrultusunda ölçüldü.

#### 3.3.1. Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi

RNA'nın cDNA'ya ters transkripsiyonu için üretici talimatları doğrultusunda iScript™ cDNA Sentez Kit (Kat no: 1708891, Biorad, ABD) kullanıldı. Reaksiyonlar, 96 kuyulu T100 PCR termal döngücihazı (Bio-rad, ABD) ile gerçekleştirildi. Sırasıyla Tablo 3.3 ve 3.4'da açıklanmaktadır.

#### Çizelge 3.3. cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Reaksiyon Başına Hacim (µl)
5X iScript Reaksiyon Karışımı	4
Script Ters Transkriptaz	1
RNA şablonu (100 fg-1µg RNA)	Değişken
Nükleazsız su	Değişken
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20</b>

İnkübasyon sonrasında her bir örnekten 120 ng cDNA elde edildi. Elde edilen cDNA ürünleri, -20°C'de saklanarak sonraki analizler için muhafaza edildi.

**Çizelge 3.4.** Ters Transkripsiyon Termal Döngü Protokolü

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
1. Aşama	95°C	2 dakika	1
2. Aşama	95°C	30 saniye	40
	Farklı Sıcaklıklar*	30 saniye	
	72°C	1 dakika	
3. Aşama	72°C	10 dakika	1

### 3.3.1.1. İnsan (Homo sapiens) Gen Ekspresyon Analizi için Primer Diziler

qRT-PCR için primerler, NCBI Primer-BLAST kullanılarak tasarlandı. Primerlerin listesi Tablo 3.5'te gösterilmektedir.

**Çizelge 3.5.** Çalışmada gen ekspresyon analizlerinde kullanılan primer dizileri

Gen Adı (NCBI)	Gen Sembolü	Forward Primer (5'→3')	Revers Primer (5'→3')
TümörNekroz Faktör-Alfa	<i>TNFA</i>	ACAAGCCTGTAGCCCATGTT	TATCTCTCAGCTCCACGCCATT
İnterlökin 6	<i>IL6</i>	AGTGAGGAACAAGCCAGAGC	ATTTGTGGTTG GGCAGGGG
İnterlökin 8	<i>CXCL8/IL-8</i>	GGCAGCCTTCCTGATTTC	CTCAGCCCTCT TCAAAAACCTC
Gliseraldehit-3-Fos fat Dehidrojenaz	<i>GAPDH</i>	ATGGAAATCCCATCACCATCTT	CGCCCCACTTG ATTTTGG

### 3.3.1.2. Hedef Genlerin Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR ile Analizi

Hedef genlerin amplifikasyonu, QuantStudio 7 Flex qPCR (Applied Biosystems, ABD) cihazında SYBR Green yöntemi kullanılarak ve gen spesifik primerler ile gerçekleştirildi.. Çeşitli genlerin ekspresyon seviyelerinin normalizasyonu için referans gen olarak gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) kullanıldı. Bağlı cDNA oranı, eşik döngüsü (Ct) değerleri kullanılarak hesaplandı.

Toplam 10 µl'lik reaksiyon karışımında, forward ve revers primerlerin final konsantrasyonu 0,3 µM olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir kuyuya 5 µl 2X SYBR Green PCR karışımı (Kat no: 1725120, QuantiNova, Qiagen), 10 µM primer karışımından 0.33 µl ve 2.97 µl nükleazsız su (NFW) eklenmiştir. Son olarak her kuyuya 25 ng cDNA (2 µl) ilave edilmiştir.

Hedef genler ile referans GAPDH geni arasındaki amplifikasyon verimliliği karşılaştırması  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Her bir qRT-PCR plakası, her konsantrasyon (0, 1mM, 5mM ) için 3 biyolojik tekrar ve her örnek için 3 teknik tekrar olacak şekilde çalıştırılmıştır. Termal döngü cihazına ait reaksiyon koşulları Tablo 3.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. qRT-PCR için reaksiyon koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
<b>Başlangıç</b>	95°C	2 dakika	1
<b>Aktivasyon</b>			
<b>Aşama</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
<b>PCR Aşaması</b>	95°C	5 saniye	40
	60°C*	19 saniye	
<b>Erime</b>	95°C	5 saniye	1
<b>Eğrisi</b>			
<b>Aşaması</b>	65°C	1 dakika	
	97°C	15 saniye	
<b>Son Bekletme</b>	40°C	10 dakika	1

### 3.4. İstatistiksel Analiz

Analiz verilerin normallik dağılımı öncelikle D'Agostino ve Pearson omnibus normallik testleri ile değerlendirildi. Ardından, verilerin dağılımına göre parametrik testler için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) veya parametrik olmayan testler için Kruskal Wallis testleri uygulandı. Gruplar arası karşılaştırmalar, parametrik olmayan verilerde Kruskal Wallis/Dunn's çoklu karşılaştırma testleri ile yapılırken; parametrik verilerde ANOVA/Dunnett's çoklu karşılaştırma testi veya Tukey's çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. 0,05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizler için GraphPad 9.3.1 (San Diego, Kaliforniya ABD) yazılımı kullanıldı.

## 4. BULGULAR

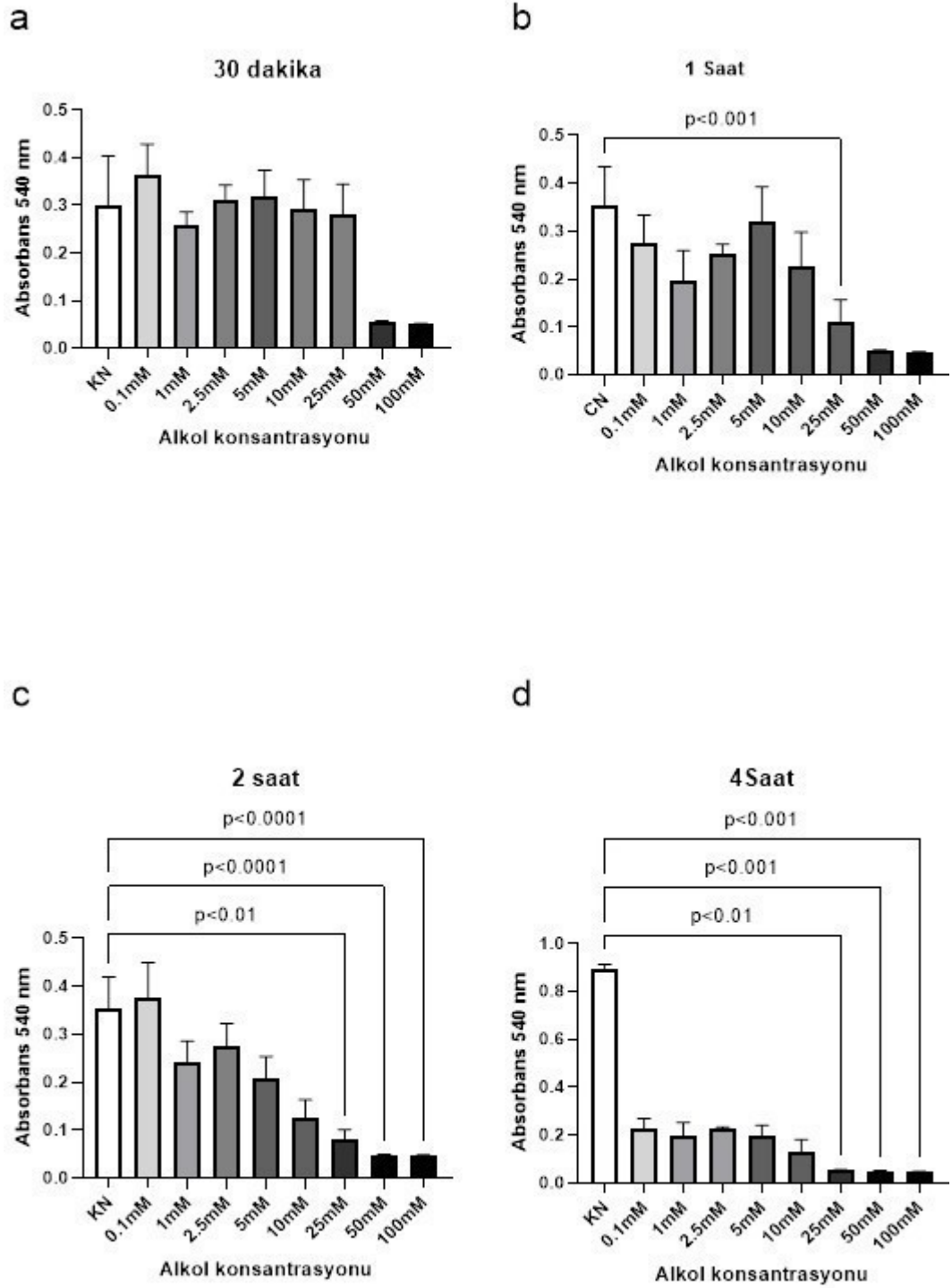
### 4.1. Hücre Canlılık Analizi

Çalışmamızda, BEAS-2B ve Primer insan bronş epitel hücreleri (PBEH)'nde alkolün ve sigara dumanı ekstraktı (SDE)'nin hücre canlılığına etkisini belirlemek için MTT testi gerçekleştirildi. Veriler, zaman uyumlu kontrol gruplarına göre normalize edildi ve üç bağımsız deneyin (her bir deneyde n=3 biyolojik tekrar) ortalaması  $\pm$  SEM veya medyan  $\pm$  çeyrekler aralığı olarak sunuldu. Belirli zaman aralıklarındaki her maruziyet grubu, kontrol grubu (0mMalkol ) ile karşılaştırıldı.

#### 4.1.1. Alkolün BEAS-2B Kültürlerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi

BEAS-2B hücrelerinde etanolün (0–100 mM) hücre canlılığına etkisi, MTT testi ile 540 nm absorbans üzerinden 30 dk, 1 saat, 2 saat ve 4 saat zaman noktalarında değerlendirildi. 30. dakikada, 0.1–10 mM aralığındaki dozlarda canlılık kontrole benzer seyretti; buna karşın  $\geq 25$  mM dozlarda düşüş gözlemlendi ancak istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır (Şekil 4.1a). 1. saatte, canlılık doza bağlı olarak azaldı ve özellikle 25–100 mM aralığında kontrole göre anlamlı düşüş saptandı ( $p < 0,001$ ; Şekil 4.1b). 2. saatte, azalma daha belirgin ve sistematik hale geldi: 5–10 mM için düşüş anlamlıydı ( $p < 0,01$ – $0,0001$ ), 25–100 mM dozlarda ise yüksek derecede sitotoksikite izlendi ( $p < 0,0001$ ; Şekil 4.1c).

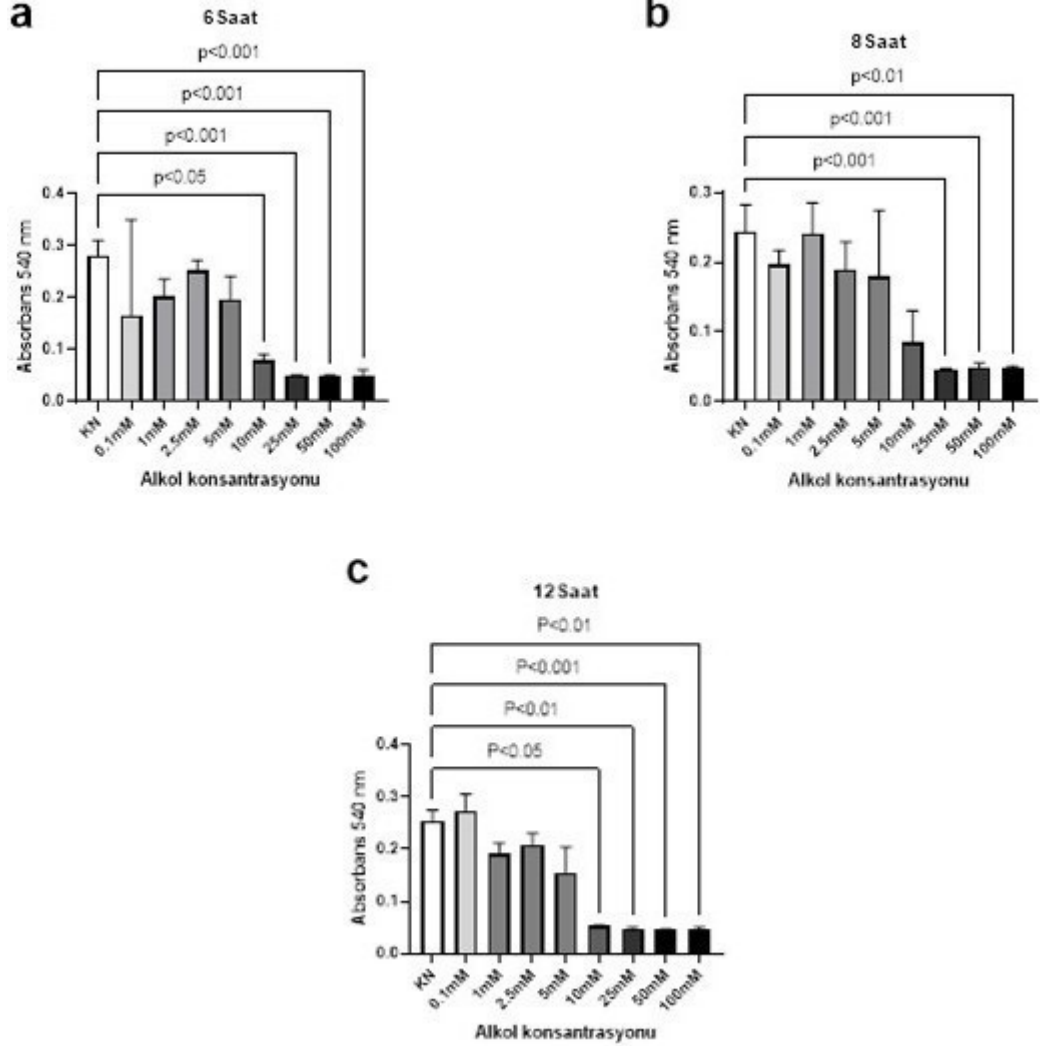
4. saatte, tüm dozlarda canlılık kontrolün anlamlı biçimde altında bulundu ( $p < 0,01$ – $0,001$ ) ve  $\geq 25$  mM konsantrasyonlarda değerler taban düzeyine yaklaştı (Şekil 4.1d).



**Şekil 4.1.** Farklı konsantrasyonlarda (0.1-100 mM) ve farklı sürelerde (30 dk (a), 1 saat (b) , 2 saat (c) ve 4 saat (d)) alkolün, BEAS-2B hücrelerinin canlılığına etkisi. KN:kontrol (0mM).

BEAS-2B hücrelerinde etanolün (0–100 mM) hücre canlılığına etkisi MTT testi ile 540 nm absorbans üzerinden 6, 8 ve 12 saat zaman noktalarında değerlendirildi. 6 saatte, 0,1–5 mM aralığı kontrolle benzer seyrederken, 10 mM’de canlılık anlamlı

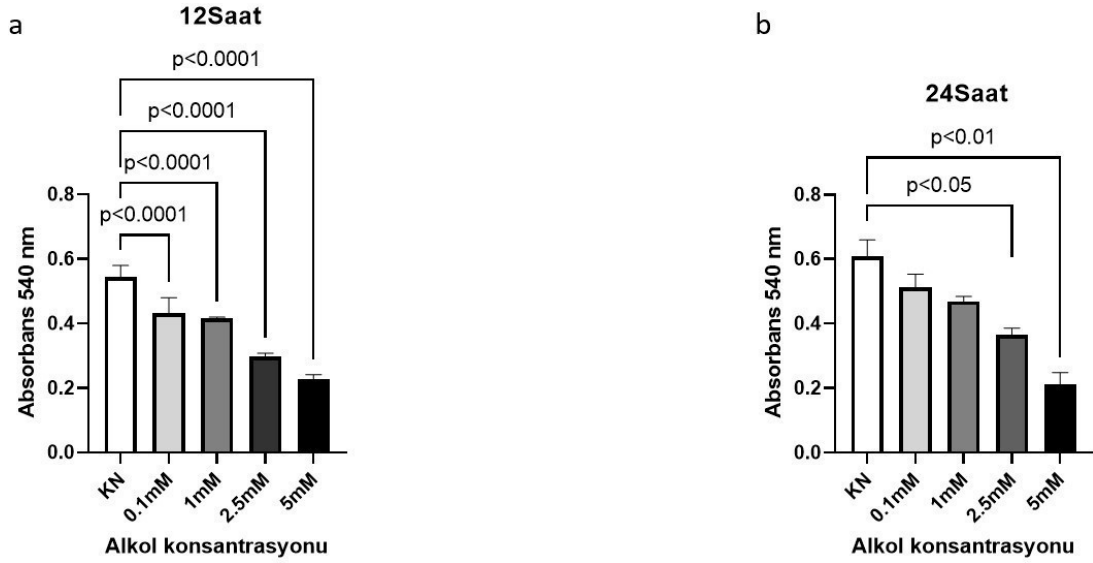
olarak azaldı ( $p<0,05$ ); 25–100 mM dozlarda düşüş belirgindi ( $p<0,001$ ; Şekil 4.2 a) 8. saatte, azalma doza bağımlı olarak ilerledi;  $\geq 10$  mM için kontrole göre anlamlı düşüş saptandı ( $p<0,01$ ) ve 25–100 mM gruplarında yüksek derecede azalma izlendi ( $p<0,001$ ; Şekil 4.2 b). 12. saatte, canlılık kaybı sürerek derinleşti: 10 mM’de anlamlı düşüş ( $p<0,05$ ), 25–100 mM dozlarda ise daha belirgin düşüş görüldü ( $p<0,01$ – $0,001$ ; Şekil 4.2 c).



**Şekil 4.2.** Farklı konsantrasyonlarda (0.1-100 mM) ve farklı sürelerde (6 saat (a), 8 saat (b) ve 12 saat (c)) alkolün BEAS-2B hücrelerinin canlılığına etkisi.

KN:kontrol

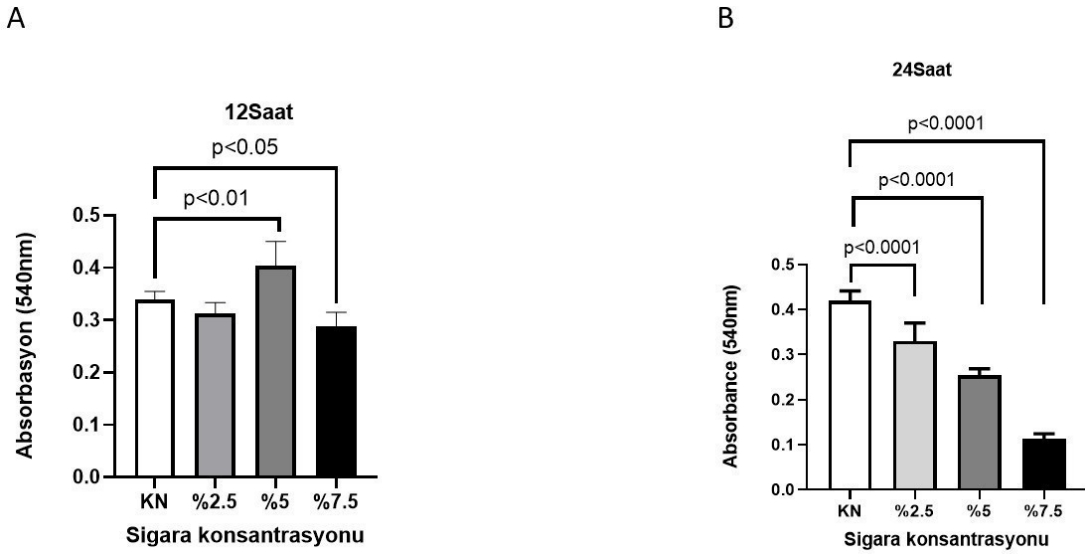
(0mM).0.1–5 mM alkol konsantrasyonunun 12 saat maruziyeti sonucunda, BEAS-2B hücre canlılığı anlamlı düzeyde azalmıştır (Şekil 4.3.b, \*\*\*\* $p<0.0001$ ) Alkolün 24 saatlik maruziyeti sonrasında ise, 2.5 mM ( $*p<0.05$ ) ve 5 mM ( $**p<0.01$ ) alkol konsantrasyonları kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında anlamlı düzeylerde azalttı (Şekil 4.3.b).



**Şekil 4.3.** Farklı konsantrasyonlarda (0.1-5 mM) ve farklı sürelerde (12 saat (a) ve 24 saat (b)) alkolün BEAS-2B hücrelerinin canlılığına etkisi. KN:kontrol (0mM)

#### 4.1.2. Sigara dumanı ekstraktı (SDE)'nin BEAS-2B Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi

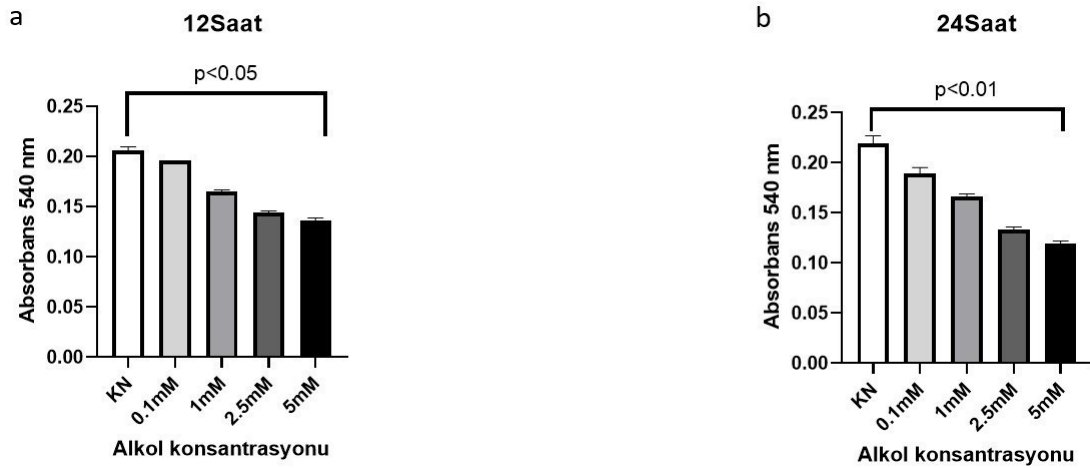
BEAS-2B hücrelerinde SDE maruziyetinin hücre canlılığına etkisi MTT testi ile 540 nm absorbans üzerinden değerlendirildi. 12. saatte %2,5 SDE kontrolle benzer seyrederken, %5 SDE kontrole göre anlamlı artış gösterdi ( $p < 0,01$ ); %7,5 SDE ise %5'e kıyasla daha düşük düzeydeydi ( $p < 0,05$ ) ve kontrole yakın kaldı (Şekil 4.4a). 24. saatte ise hücre canlılığı doza bağlı olarak azaldı: %2,5, %5 ve %7,5 SDE gruplarının her biri kontrole göre belirgin düşüş gösterdi (tüm karşılaştırmalar için  $p < 0,0001$ ; (Şekil 4.4b).



**Şekil 4.4.** SDE'nin (%2,5 ,%5 ve%7,5) BEAS-2B hücre kültürlerinin canlılığına etkisi; 12 saat (a) ve 24 saat (b).

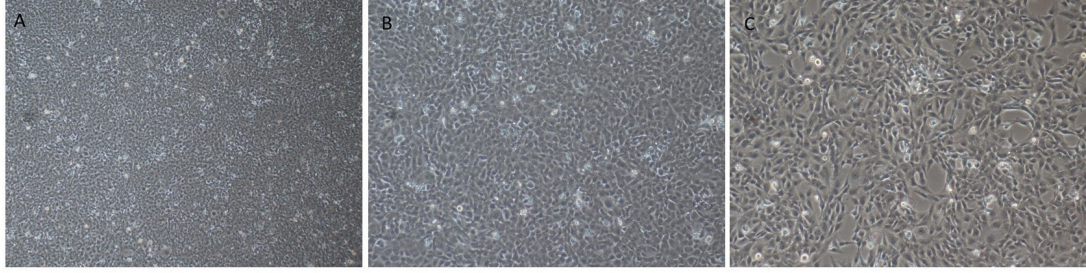
#### 4.1.3. Alkolün Sigara İçmeyen PBEH Kültürlerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi

Alkolün, 0, 0.1, 1, 2.5 ve 5 mM konsantrasyonlarının 12 ve 24 saat dilimlerinde maruziyetinin sigara içmeyen PBEH hücrelerinin hücre canlılığına etkisi üç tekrarlı bağımsız deney ile incelendi. Alkolün 12 saatlik maruziyeti sonucunda, 5 mM alkol uygulaması kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığını anlamlı düzeyde azalttı. (Şekil 4.5a, \* $p < 0.05$ ). Alkolün, 24 saatlik maruziyeti sonrasında ise, benzer şekilde yalnızca 5 mM alkol grubunda kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığını anlamlı düzeyde azalttı (Şekil 4.5b, \*\* $p < 0.01$ ). Diğer gruplarda anlamlı bir değişim saptanmamıştır. Bu bulgular, yüksek konsantrasyonlardaki alkolün, sigara içmeyen bireylerden elde edilen primer bronş epitel hücrelerinde zamana bağlı olarak hücre canlılığını olumsuz yönde etkileyebileceğini göstermektedir.



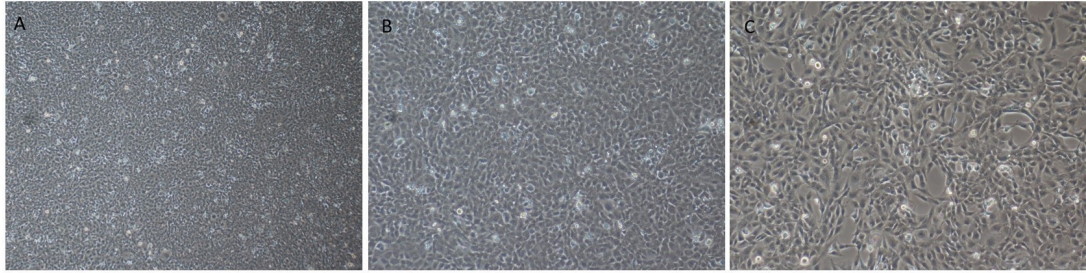
**Şekil 4.5.** Farklı konsantrasyonlardaki alkolü (0.1-5 mM) farklı sürelerde (12 saat (a) ve 24 saat (b)) PBEH hücre kültürlerinin canlılığına etkisi. KN: kontrol, 0mM.

BEAS-2B hücrelerinin 12. saatte elde edilen faz-kontrast mikroskop görüntüleri: (A) kontrol, (B) 1 mM etanol, (C) 5 mM etanol. Etanol maruziyetiyle birlikte doza bağlı morfolojik değişim belirtileri gözlenmektedir; kontrol grubuna kıyasla deney gruplarında hücrelerin kısmen yuvarlaklaştığı/uzadığı, hücre-hücre temaslarının seyrekleştiği ve alan başına canlı hücre yoğunluğunda görece bir azalma olduğu dikkati çekmektedir (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** BEAS-2B hücrelerinde a) kontrol grup b) 1mM alkol konsantrasyonu uygulanan grup c) 5mM alkol konsantrasyonu

BEAS-2B hücrelerinin 24. saatte elde edilen faz-kontrast mikroskop görüntüleri: (A) kontrol, (B) 1 mM etanol, (C) 5 mM etanol. Etanol maruziyeti ile doza bağlı morfolojik değişiklikler gözlenmektedir; kontrol grubuna kıyasla deney gruplarında hücrelerin şekil bütünlüğünün belirgin ölçüde bozulduğu, hücre-hücre temaslarının seyrekleştiği ve alan başına canlı hücre yoğunluğunun görece olarak azaldığı dikkati çekmektedir. Özellikle 5 mM koşulunda hücrelerde yuvarlaklaşma ve aralıklı boşlukların artışı daha belirgindir (Şekil 4.7).



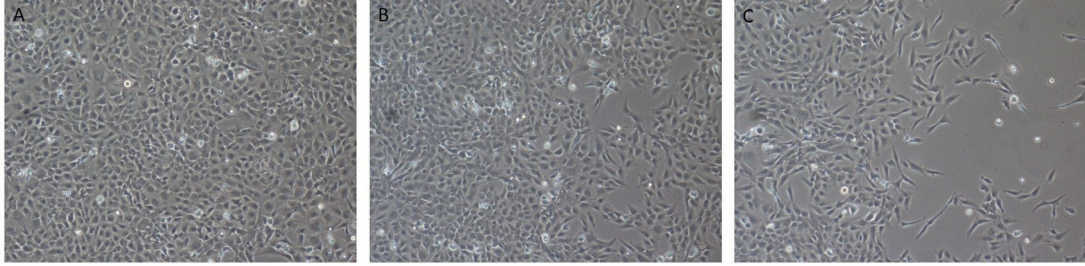
**Şekil 4.7.** BEAS-2B hücrelerinde a) kontrol grup b) 1mM alkol konsantrasyonu uygulanan grup c) 5mM alkol konsantrasyonu

BEAS-2B hücrelerinin 12. saat faz-kontrast mikroskop görüntüleri: (A) kontrol, (B) %2,5 SDE, (C) %5 SDE. SDE maruziyeti ile doza bağlı morfolojik değişiklikler gözlenmektedir; kontrol grubuna kıyasla deney gruplarında hücrelerin belirgin biçimde yuvarlaklaştığı, hücre-hücre temaslarının azaldığı ve alan başına düşen canlı hücre yoğunluğunun görece olarak azaldığı dikkat çekmektedir (Şekil 4.8).



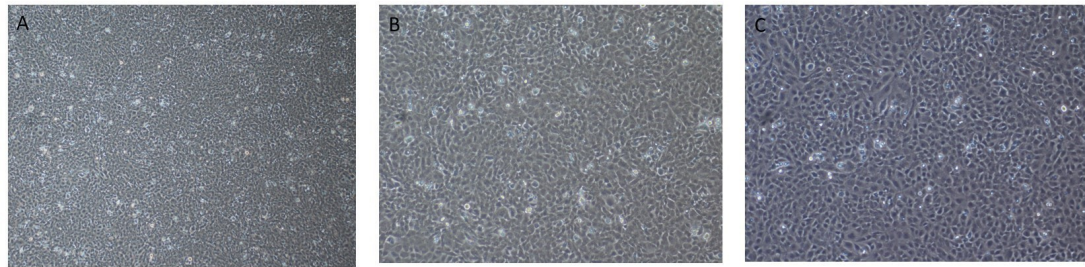
**Şekil 4.8.** BEAS-2B hücrelerinde a) kontrol grup b) %2,5 sigara konsantrasyonu uygulanan grup c) %5 sigara konsantrasyonu

BEAS-2B hücrelerinin 24. saatte elde edilen faz-kontrast mikroskop görüntüleri: (A) kontrol, (B) %2,5 SDE, (C) %5 SDE. SDE maruziyetiyle doza bağlı morfolojik değişiklikler gözlenmektedir; kontrol grubuna kıyasla deney gruplarında hücrelerin şekil bütünlüğünde bozulma, hücre- hücre temaslarında azalma ve intersellüler boşlukların artışı dikkat çekmektedir. Özellikle %5 SDE koşulunda hücrelerin incelme/uzama ve kısmi ayrılma eğilimi daha belirgindir (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9.** BEAS-2B hücrelerinde A) kontrol grup B) %2,5 sigara konsantrasyonu uygulanan grup C) %5 sigara konsantrasyonu 24 saat.

BEAS-2B hücrelerinin 12. saat faz-kontrast mikroskop görüntüleri. (A) Kontrol, (B) %2,5 SDE + 1 mM etanol, (C) %2,5 SDE + 5 mM etanol. Kombine maruziyetlerde doza bağlı morfolojik değişiklikler izlenmektedir: kontrol grubuna kıyasla (B) ve (C)'de hücrelerde yuvarlaklaşma/uzama, hücre-hücre temaslarında azalma, intersellüler aralıkların artışı ve konfluans düzeyinde düşüş gözlenir; bu değişimler 5 mM etanol içeren (C) panelinde daha belirgindir (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** BEAS-2B hücrelerinde A) kontrol grup B) %2,5 sigara konsantrasyonu ve 1mM alkol uygulanan grup C) %2,5 sigara konsantrasyonu 5mM alkol uygulanan 12 saat.

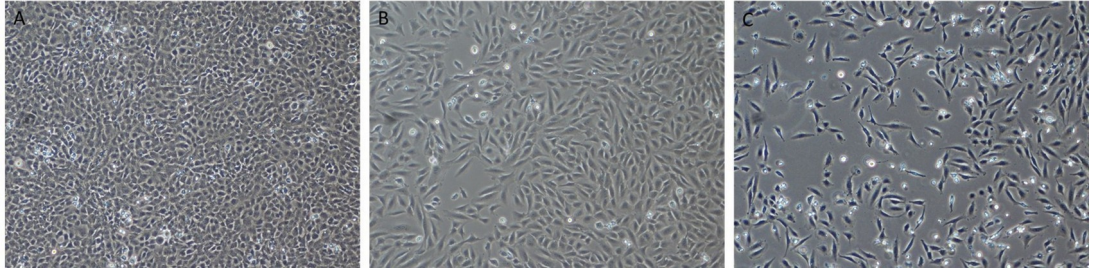
BEAS-2B hücrelerinin 24. saatte elde edilen faz-kontrast mikroskop görüntüleri: (A) Kontrol, (B) %2,5 SDE + 1 mM etanol, (C) %2,5 SDE + 5 mM etanol. Kombine maruziyet, kontrol grubuna kıyasla doza bağlı morfolojik değişikliklerle seyretmektedir; özellikle (B) ve (C) panellerinde hücre-hücre temaslarında azalma,

interselüler boşluklarda artış, kısmi yuvarlaklaşma/uzama ve konfluans düzeyinde görece düşüş gözlenir. Bu değişimler 5 mM etanol içeren koşulda (C) daha belirgindir (Şekil 4.11.).



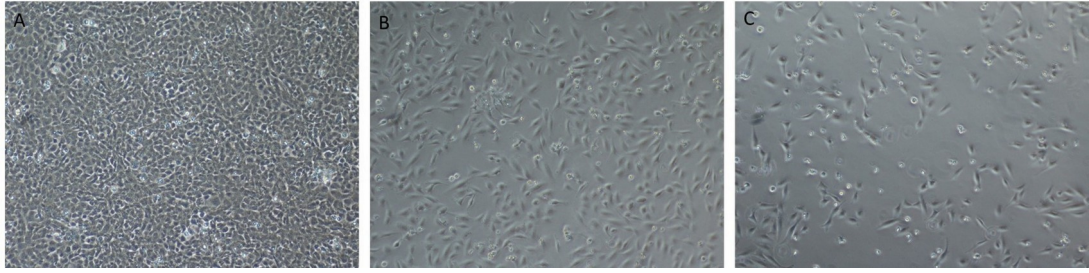
**Şekil 4.11.** BEAS-2B hücrelerinde A) kontrol grup B) %2,5 sigara konsantrasyonu ve 1mM alkol uygulanan grup C) %2,5 sigara konsantrasyonu 5mM alkol uygulanan 24 saat.

(Şekil 4.12.) BEAS-2B hücrelerinin 12. saatte elde edilen faz-kontrast mikroskop görüntüleri: (A) Kontrol, (B) %5 CSE + 1 mM etanol, (C) %5 SDE + 5 mM etanol. Yüksek SDE koşullarında etanol eklenmesiyle doza bağlı morfolojik değişiklikler belirginleşmektedir; kontrol grubuna kıyasla (B) ve (C)'de hücrelerde spindle/uzama eğilimi, yuvarlaklaşma odakları, hücre-hücre temaslarında seyrelme, interselüler boşluk artışı ve konfluans düzeyinde azalma gözlenir. Bu değişimler 5 mM etanol içeren (C) daha belirgindir.



**Şekil 4.12.** BEAS-2B hücrelerinde a) kontrol grup b) %5 sigara konsantrasyonu ve 1mM alkol uygulanan grup c) %5 sigara konsantrasyonu 5mM alkol uygulanan 12 saat.

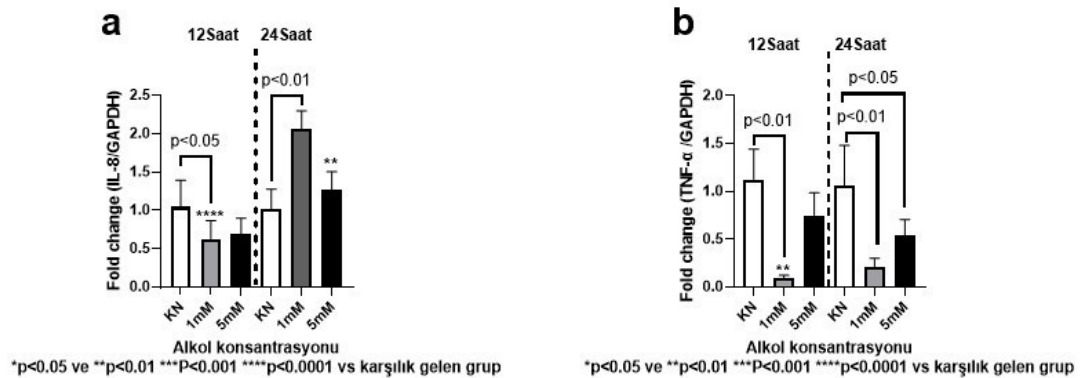
(Şekil 4.13.) BEAS-2B hücrelerinin 24. saatte elde edilen faz-kontrast mikroskop görüntüleri: (A) Kontrol, (B) %5 SDE + 1 mM etanol, (C) %5 SDE + 5 mM etanol. Yüksek SDE koşulunda etanol eklenmesiyle doza bağlı belirgin morfolojik bozulmalar gözlenmektedir. Kontrole kıyasla (B) ve özellikle (C) panellerinde konfluansın belirgin şekilde azaldığı, interselüler boşlukların genişlediği, hücrelerin yuvarlaklaşma/çekilme eğilimi gösterdiği ve hücre-hücre temaslarının zayıfladığı izlenmektedir. En yüksek etanol konsantrasyonunda (C) kısmi hücre ayrılması ve düşen hücre yoğunluğu daha belirgindir.



**Şekil 4.13.** BEAS-2B hücrelerinde a) kontrol grup b) %5 sigara konsantrasyonu ve 1mM alkol uygulanan grup c) %5 sigara konsantrasyonu 5mM alkol uygulanan 24 saat.

#### 4.2. qRT-PCR mRNA Gen Ekspresyonu Sonuçları

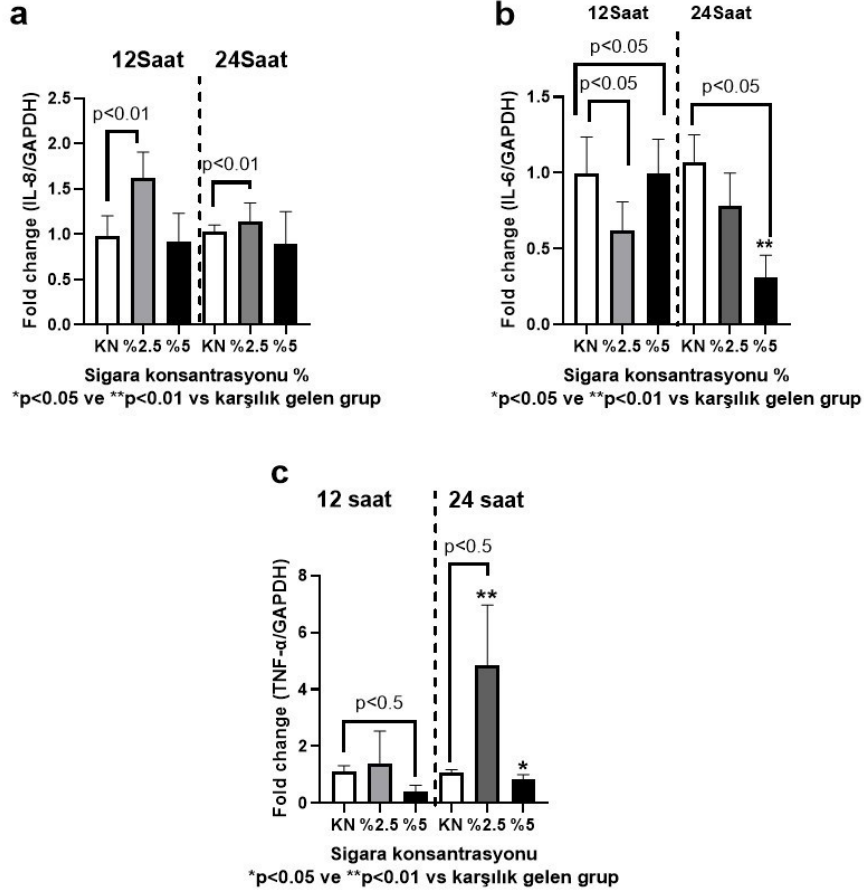
BEAS-2B hücrelerinde IL-8 (CXCL8) ekspresyonu, GAPDH'ye normalize edilerek kat değişimi olarak qRT-PCR ile ve zaman-bağımlı değerlendirildi; grafikteki yıldızlar, aynı doz için 12–24 saat karşılaştırmasını göstermektedir (Şekil.4.14a). 12. saatte 1 mM etanol IL-8 düzeylerini kontrole göre azalttı ( $p<0,05$ ); 5 mM kontrolle benzer seyretti. 24. saatte 1 mM, 5 mM'den yüksekti ( $p<0,01$ ). Zaman etkisine bakıldığında 5 mM grubunda 24. saat, 12. saate göre anlamlı artış görüldü. BEAS-2B hücrelerinde TNF- $\alpha$  gen ekspresyonu, GAPDH'ye normalize edilerek qRT-PCR ile ölçüldü ve zaman-bağımlı analiz yapıldı; grafikteki yıldız işaretleri, aynı doz için 12 saat–24 saat karşılaştırmasını göstermektedir. 12. saat: 1 mM etanol TNF- $\alpha$  düzeylerini belirgin biçimde düşürdü; 5 mM dozda da kontrolün altında seyir izlendi ve kontrol–5 mM farkı anlamlıydı ( $p<0,01$ ; Şekil 4.14b). Zaman karşılaştırmasında 1 mM grubunda 12 saat değerinin 24 saate göre daha düşük olduğu saptandı ( $p<0,01$ ; zaman etkisi, \*). 24. saat: 1 mM etanol, kontrole göre daha düşük TNF- $\alpha$  düzeyi ile seyretti ( $p<0,01$ ) ve 5 mM'den de anlamlı olarak düşüktü ( $p<0,05$ ; Şekil 4.14b).



**Şekil 4.14.** 1 mM ve 5 mM etanol konsantrasyonunun da IL-8 (a) ve TNF- $\alpha$  (b) mRNA düzeyleri üzerindeki etkisi (\* aynı konsantrasyonların zamana bağlı karşılaştırması)

BEAS-2B hücrelerinde IL8 gen ekspresyonu, GAPDH'ye normalize edilerek qRT-PCR ile ve zaman-bağımlı biçimde değerlendirildi; grafikteki yıldız işaretleri,

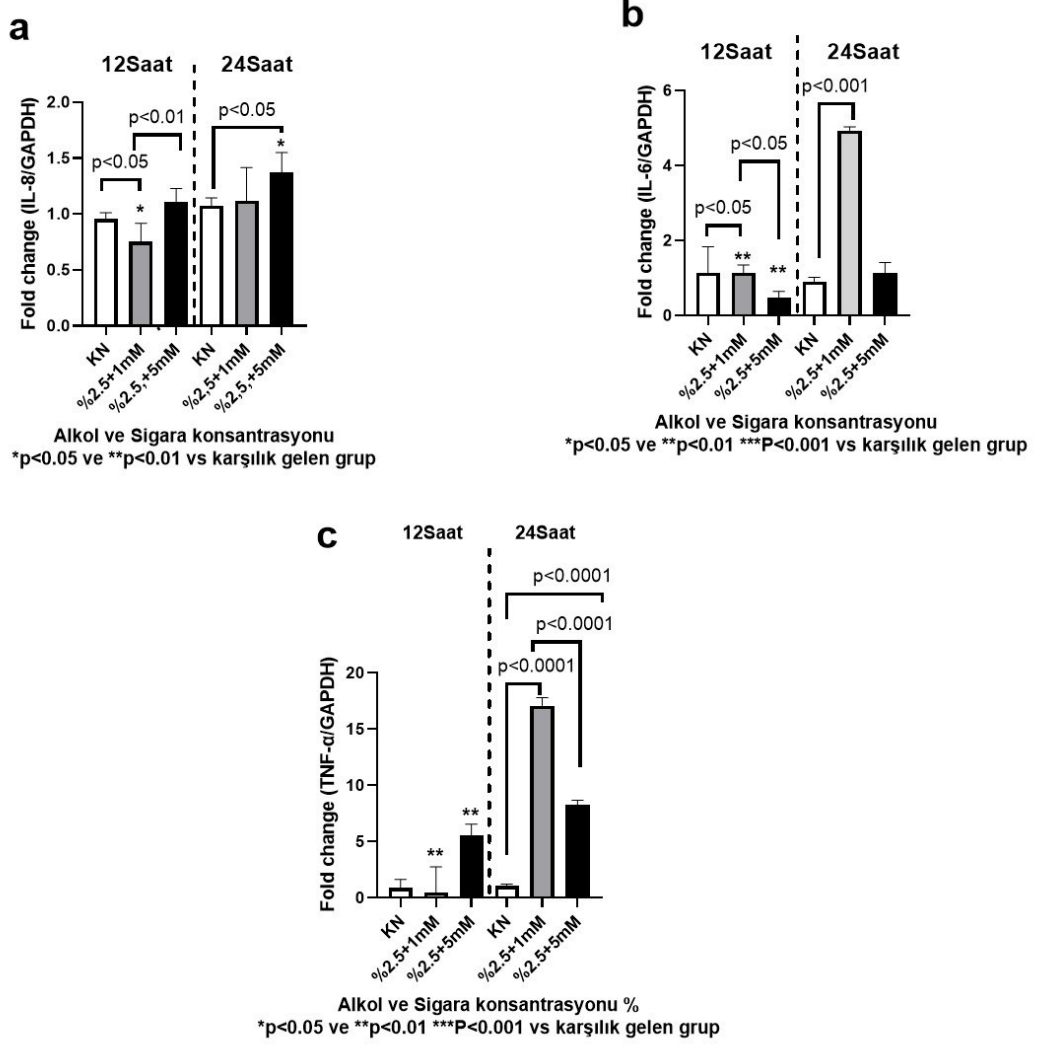
aynı SDE dozu için 12 saat–24 saat karşılaştırmasını göstermektedir. 12. saat: %2,5 SDE grubunda IL8 düzeyleri kontrole benzer seyretti; %5 SDE ise daha düşük değerler gösterdi (anlamlılık işareti verilmemiştir; (Şekil.4.15a,). 24. saat: %2,5 SDE, IL8 mRNA düzeylerini kontrole göre anlamlı biçimde artırdı ( $p<0,05$ ); buna karşılık %5 SDE kontrole kıyasla anlamlı azalma oluşturdu ( $p<0,05$ ; Şekil.4.15a). Zaman etkisi (12 s ↔ 24 s): %2,5 SDE için 24. saat değeri 12. saate göre daha yüksektir ( $p<0,01$ ), %5 SDE için ise 24. saat 12. saate göre daha düşüktür ( $p<0,05$ ). BEAS-2B hücrelerinde IL-6 gen ekspresyonu, GAPDH'ye normalize bağlı kat değişimi olarak qRT-PCR ile ve zaman-bağımlı biçimde değerlendirildi; grafikteki yıldızlar, aynı koşulun 12–24 saat karşılaştırmasını göstermektedir(Şekil 4.15b). 12. saat: %2,5 SDE, IL-6 düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak azalttı ( $p<0,05$ ); ayrıca %2,5 ile %5 SDE arasında %5 lehine fark saptandı ( $p<0,05$ ). 24. saat: %5 SDE, kontrole kıyasla anlamlı düşüş gösterdi ( $p<0,05$ ). Zaman etkisi: %5 SDE koşulunda 24. saat, 12. saate göre daha düşüktür ( $p<0,01$ ; yıldızla gösterilmiştir). BEAS-2B hücreleri sigara dumanı ekstraktı (SDE) %2,5 ve %5 konsantrasyonlarıyla muamele edilerek 12 ve 24 saat sonunda TNF- $\alpha$  mRNA düzeyleri qRT-PCR ile ölçülmüş ve GAPDH'ye normalize bağlı kat değişimi (fold change) olarak raporlanmıştır (Şekil.4.15c). 12. saat: Her iki dozda değerler kontrole yakın seyretti; ancak %2,5 SDE, %5 SDE'den yüksek bulundu ( $p<0,05$ ). 24. saat: %2,5 SDE, TNF $\alpha$  ekspresyonunu kontrole göre belirgin biçimde artırdı ( $p<0,01$ ); %5 SDE ise kontrole göre azalma gösterdi ( $p<0,05$ ) ve 24. saatte %2,5 SDE > %5 SDE idi ( $p<0,05$ ). Zaman etkisi (aynı dozun 24 s vs 12 s karşılaştırması, yıldızlarla gösterilmiştir): %2,5 SDE: 24 s > 12 s \*\* ( $p<0,01$ ) %5 SDE: 24 s < 12 s \* ( $p<0,05$ ).



**Şekil 4.15.** Farklı SDE konsantrasyonlarının IL-8 (a), IL-6 (b) ve TNF- $\alpha$  (c) mRNA düzeyleri üzerindeki etkisi (\* aynı konsantrasyonların zamana bağlı karşılaştırması)

BEAS-2B hücrelerinde IL-8 gen ekspresyonu, GAPDH'ye normalize edilerek qRT-PCR ile ve zaman-bağımlı olarak değerlendirildi; grafikteki yıldızlar, aynı koşulun 12–24 saat karşılaştırmasını göstermektedir. %5 SDE + 1 mM ve %5 SDE + 5 mM etanol uygulamalarında (Şekil4.16a.) 12. saatte düzeyler sırasıyla kontrole benzer ve kontrole göre daha yüksektir ( $p<0,05$ ). 24. saatte, %5 + 1 mM IL-8 düzeylerini kontrole göre azalttı ( $p<0,01$ ), %5 + 5 mM ise kontrole kıyasla artırdı ( $p<0,05$ ) ve %5 + 5 mM, %5 + 1 mM'den belirgin olarak yüksekti ( $p<0,0001$ ). Zaman etkisi: 5 mM koşulunda 24. saat, 12. saate göre daha yüksektir; 1 mM koşulunda ise 24. saat, 12. saate göre daha düşüktür. BEAS-2B hücrelerinde IL-6 gen ekspresyonu, GAPDH'ye normalize edilerek qRT-PCR ile ve zaman-bağımlı olarak değerlendirildi (%5 SDE + etanol). 12. saat: %5 SDE + 1 mM ve %5 SDE + 5 mM etanol koşulları kontrole benzer seyretti; anlamlı fark görülmedi(Şekil.4.16b ). 24. saat: %5 SDE + 5 mM etanol, %5 SDE + 1 mM'a göre anlamlı olarak daha düşük IL-6 düzeyi gösterdi ( $p<0,05$ ; Şekil.4.16b). Her iki kombinasyonun kontrole karşılaştırmasına ilişkin bir anlamlılık bulunmamaktadır. BEAS-2B hücrelerinde TNF- $\alpha$  ekspresyonu, GAPDH'ye normalize

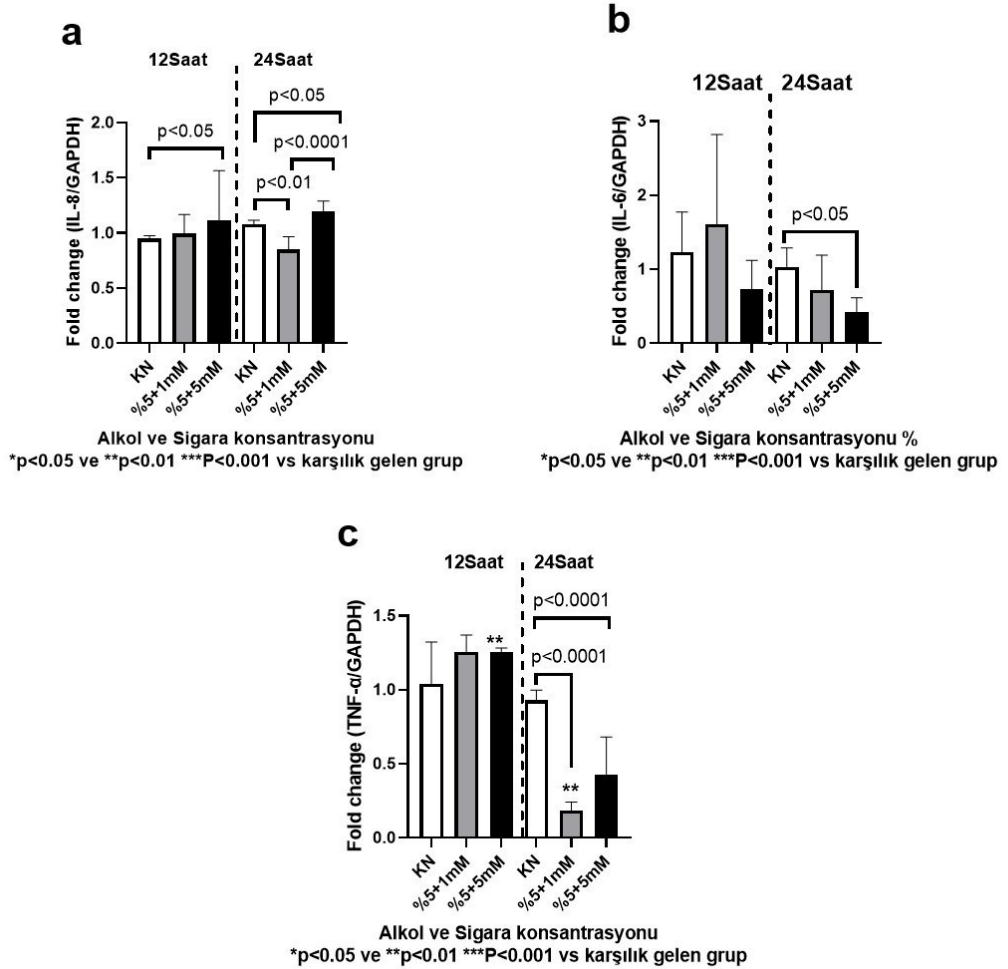
edilerek qRT-PCR ile ve zamana bağımlı biçimde değerlendirildi; grafikteki yıldızlar, aynı koşulun 12–24 saat istatistiksel karşılaştırmasını göstermektedir. %5 SDE + 1 mM ve %5 SDE + 5 mM etanol uygulamalarında (Şekil.4.16c). 12. saatte düzeyler kontrole yakın seyretti. 24. saatte ise her iki kombinasyon da kontrole göre anlamlı azalma oluşturdu (her ikisi için  $p < 0,0001$ ). Zaman etkisi: her iki dozda da 24. saat, 12. saate kıyasla belirgin şekilde daha düşüktür (yıldızlarla gösterilmiştir) (Şekil 4.16a). IL-8 (BEAS-2B, %2,5 SDE + etanol; GAPDH'ye normalize qRT-PCR) %2,5 SDE ile birlikte 1 mM ve 5 mM etanol uygulamalarında 12. saatte IL-8 düzeyleri kontrole yakın/ılımlı artış gösterdi. 24. saatte, %2,5 + 1 mM koşulu IL-8'i kontrole göre belirgin yükseltti; %2,5 + 5 mM ise daha sınırlı kaldı ve 1 mM koşulundan düşük seyretti. Zaman etkisi: 1 mM için  $24 s > 12 s$ ; 5 mM için  $24 s \approx / \leq 12 s$ . (Grafikteki yıldızlar, aynı koşulun 12–24 saat içi karşılaştırmasını göstermektedir) (Şekil4.16b). IL-6 (BEAS-2B, %2,5 SDE + etanol; GAPDH'ye normalize qRT-PCR) 12. saatte hem %2,5 + 1 mM hem de %2,5+ 5 mM grupları kontrole benzer düzeylerde seyretti. 24. saatte, %2,5 + 1 mM IL-6'yı belirgin artırırken, %2,5 + 5 mM düşük kaldı ve 1 mM koşulundan anlamlı biçimde daha düşüktü. Zaman etkisi: 1 mM için  $24 s > 12 s$ ; 5 mM için  $24 s < 12 s$ /kontrol (Şekil4.16c). TNF- $\alpha$  (BEAS-2B, %2,5 SDE + etanol; GAPDH'ye normalize qRT-PCR) 12. saatte her iki kombinasyon da kontrole yakın değerler verdi. 24. saatte farklılaştı: %2,5 + 1 mM koşulu TNF- $\alpha$ 'yı yükseltti, buna karşılık %2,5 + 5 mM baskılandı ve kontrole göre daha düşük düzeylere indi. Zaman etkisi: 1 mM için  $24 s > 12 s$ , 5 mM için  $24 s < 12 s$ /kontrol.



**Şekil 4.16.** %2.5 SDE ve alkol konsantrasyonunun da IL8 (a) , IL6 (b) ve TNF- $\alpha$  (c) mRNA düzeyleri üzerindeki etkisi (\* aynı konsantrasyonların zamana bağlı karşılaştırması)

BEAS-2B hücrelerinde IL-8 gen ekspresyonu, GAPDH'ye normalize edilerek qRT-PCR ile ve zaman-bağımlı olarak değerlendirildi; grafikteki yıldızlar, aynı koşulun 12–24 saat karşılaştırmasını göstermektedir. %5 SDE + 1 mM ve %5 SDE + 5 mM etanol uygulamalarında (Şekil4.17a). 12. saatte düzeyler sırasıyla kontrole benzer ve kontrole göre daha yüksektir ( $p<0,05$ ). 24. saatte, %5 + 1 mM IL-8 düzeylerini kontrole göre azalttı ( $p<0,01$ ), %5 + 5 mM ise kontrole kıyasla artırdı ( $p<0,05$ ) ve %5 + 5 mM, %5 + 1 mM'den belirgin olarak yüksekti ( $p<0,0001$ ). Zaman etkisi: 5 mM koşulunda 24. saat, 12. saate göre daha yüksek; 1 mM koşulunda ise 24. saat, 12. saate göre daha düşüktür. BEAS-2B hücrelerinde IL-6 gen ekspresyonu, GAPDH'ye normalize edilerek qRT-PCR ile ve zaman- bağımlı olarak değerlendirildi (%5 SDE + etanol). 12. saat: %5 SDE + 1 mM ve %5 SDE + 5 mM etanol koşulları kontrole benzer seyretti; anlamlı fark görülmedi (Şekil.4.17b). 24. saat: %5 SDE + 5 mM etanol, %5

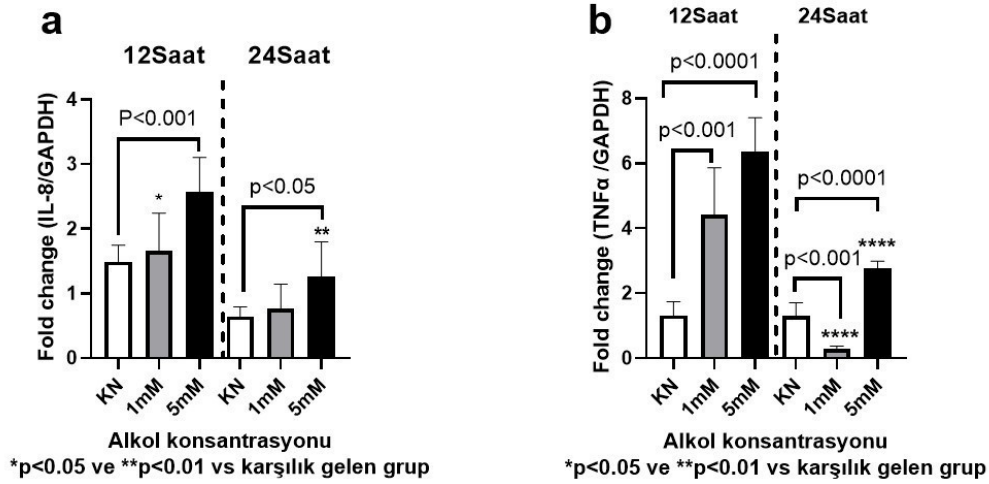
SDE + 1 mM'a göre anlamlı olarak daha düşük IL-6 düzeyi gösterdi ( $p<0,05$ ; Şekil.4.17b). Her iki kombinasyonun kontrolle karşılaştırmasına ilişkin bir anlamlılık bulunmamaktadır. BEAS-2B hücrelerinde TNF- $\alpha$  ekspresyonu, GAPDH'ye normalize edilerek qRT-PCR ile ve zamana bağımlı biçimde değerlendirildi; grafikteki yıldızlar, aynı koşulun 12–24 saat istatistiksel karşılaştırmasını göstermektedir. %5 SDE + 1 mM ve %5 SDE + 5 mM etanol uygulamalarında (Şekil.4.24c). 12. saatte düzeyler kontrole yakın seyretti. 24. saatte ise her iki kombinasyon da kontrole göre anlamlı azalma oluşturdu (her ikisi için  $p<0,0001$ ). Zaman etkisi: her iki dozda da 24. saat, 12. saate kıyasla belirgin şekilde daha düşüktür (yıldızlarla gösterilmiştir).



**Şekil 4.17.** %5 SDE ve alkol konsantrasyonunun da IL8 (a) , IL6 (b) ve TNF- $\alpha$  (c) mRNA düzeyleri üzerindeki etkisi (\* aynı konsantrasyonların zamana bağlı karşılaştırması).

Sağlıklı bireylerden elde edilen PBEH hücrelerinde alkol maruziyetinin IL-8 mRNA düzeylerine etkisi, qRT-PCR ile GAPDH'a normalize bağıl kat değişimi olarak değerlendirildi. (Şekil.4.18a) 12. saatte, 5 mM etanol IL-8 ekspresyonunu kontrol ve 1 mM gruplarına kıyasla anlamlı biçimde artırdı ( $p<0,001$ ); 1 mM doz kontrole benzer

seyretti. 24. saatte, 5 mM etanol yine kontrole göre artış gösterdi ( $p<0,05$ ), 1 mM için anlamlı değişim görülmedi. Zaman etkisi: grafikteki yıldız işaretleri, 5 mM grubunda 24. saatin 12. saate göre daha düşük bir düzey sergilediğini göstermektedir. Sağlıklı bireylerden elde edilen PBEH TNF- $\alpha$  gen ekspresyonu, GAPDH'ye normalize edilerek qRT-PCR ile ve zaman-bağımlı olarak değerlendirildi; grafikteki yıldızlar, aynı doz için 12–24 saat karşılaştırmasını göstermektedir (Şekil.4.18b). 12. saatte, 1 mM ve 5 mM etanol TNF- $\alpha$  mRNA düzeylerini kontrole göre sırasıyla anlamlı ve son derece anlamlı biçimde artırdı ( $p<0,001$  ve  $p<0,0001$ ). 24. saatte, 1 mM etanol TNF- $\alpha$  düzeylerini kontrole kıyasla belirgin olarak düşürdü ( $p<0,001$ ), 5 mM etanol ise kontrole göre daha anlamlı artış oluşturdu ( $p<0,0001$ ). Zaman etkisi: her iki dozda da 24. saat, 12. saate göre daha düşük bulundu (\*\*). (IL-6 erime eğrisi): IL-6 için kontrol örneklerinde (CN12h, CN24h)  $\sim 78\text{--}80$  °C civarında tek ve keskin bir tepe görülürken, 1 mM ve 5 mM etanol uygulanmış 12 h/24 h örneklerinde eğriler taban çizgisine yakın kalmış, belirgin tepe oluşmamış ve özgül amplifikasyon saptanmamıştır ( $Ct \geq 40$  / ND). (GAPDH erime eğrisi): İç kontrol GAPDH tüm gruplarda  $\sim 77\text{--}79$  °C'de tek tepelikli profil sergilemiş, özgül ve başarılı amplifikasyonu doğrulamıştır. Bu koşullarda (1–5 mM etanol; 12–24 saat) IL-6 transkript düzeyi tespit sınırının altında kalmıştır. Bu nedenle bağıl ekspresyon (fold change) hesaplanamamış ve doz/zaman karşılaştırması yapılamamıştır. İç kontrolün sağlam tek tepelikli profili, bulgunun teknik sorun değil, biyolojik olarak düşük IL-6 bolluğu ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

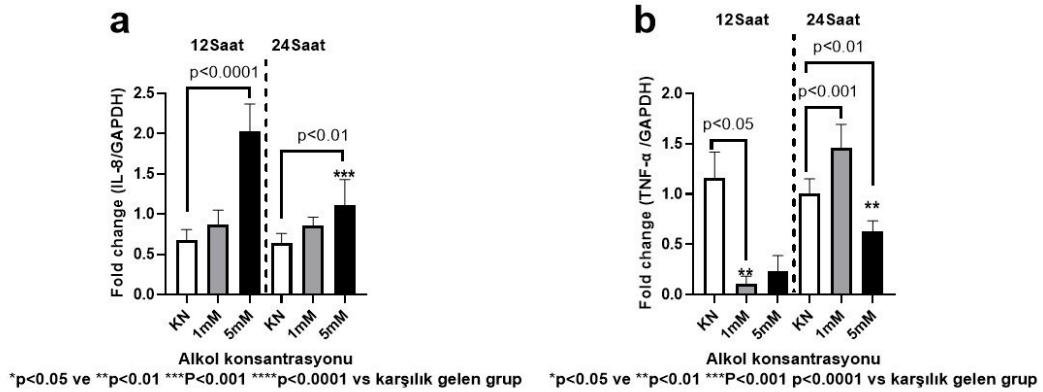


**Şekil 4.18.** PBEH üzerinde , farklı konsantrasyonlardaki alkolün IL8 (a) ve TNF- $\alpha$  (b) mRNA düzeyleri üzerindeki etkisi (\* aynı konsantrasyonların zamana bağlı karşılaştırması).

Sigara içen bireylerden elde edilen PBEH IL-8 gen ekspresyonu, GAPDH'ye normalize edilerek qRT-PCR ile ve zaman-bağımlı olarak değerlendirildi; grafikteki yıldızlar, aynı doz için 12–24 saat karşılaştırmasını göstermektedir. 12. saatte, 5 mM etanol IL-8 mRNA düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak artırdı ( $p<0,0001$ ), 1 mM ise kontrole benzer seyretti. 24. saatte, 5mM etanol ile kontrole göre artış devam etti

( $p<0,01$ ); 1 mM dozda anlamlı fark izlenmedi. Zaman etkisi: 5 mM dozda 24. saat, 12. saate göre anlamlı olarak daha düşüktü (\*\*\*) , 1 mM için zaman farkı işaretlenmedi (Şekil4.19a). Sigara içen bireylerden elde

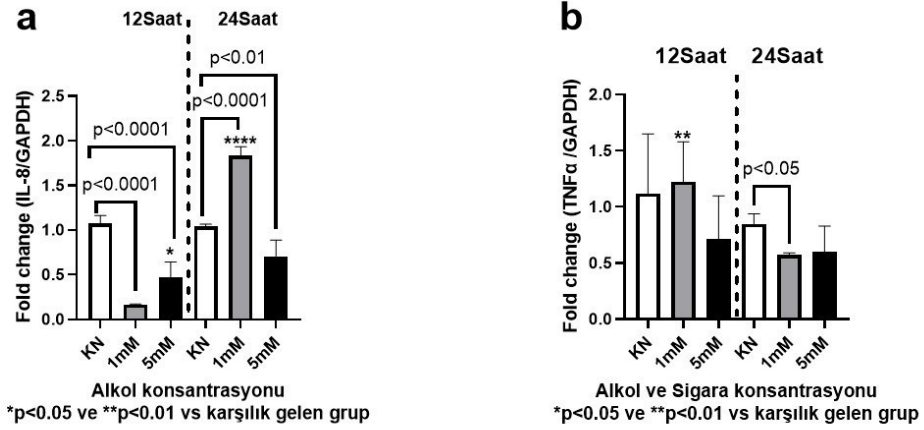
edilen PBEH TNF- $\alpha$  gen ekspresyonu, GAPDH'ye normalize edilerek qRT-PCR ile zaman-bağımlı olarak değerlendirildi; grafikteki yıldızlar, aynı doz için 12–24 saat karşılaştırmasını göstermektedir (Şekil4.19b). 12. saatte, 1 mM etanol TNF- $\alpha$  düzeylerini kontrole göre anlamlı biçimde azalttı ( $p<0,01$ ); 5 mM dozda da kontrole kıyasla azalma izlendi ( $p<0,05$ ). 24. saatte, 1 mM etanol TNF- $\alpha$  ekspresyonunu kontrole göre artırdı ( $p<0,001$ ), 5 mM ise kontrolün altında seyretti ( $p<0,01$ ) ve 1 mM, 5 mM'den yüksekti ( $p<0,01$ ). Zaman etkisi: yıldız işaretlerinin gösterdiği üzere, her iki dozda da 24. saat, 12. saate göre daha yüksektir. Sigara içen bireylerden elde edilen PBEH IL-6 qRT-PCR erime eğrileri (Şekil 4.42.a). ~80–86 °C aralığında birden fazla tepelik/omuz göstermektedir; bu görünüm non-spesifik bağlanma / primer-dimer oluşumu ile uyumludur. Buna karşılık iç kontrol GAPDH (Şekil 4.19.b) ~76–78 °C'de tek ve keskin bir tepe vererek özgül amplifikasyonun çalıştığını doğrulamaktadır. Sonuç olarak, bu koşullarda IL-6 için güvenilir Ct elde edilememiş, gen yeterli düzeyde aktif/ifade edilmiş görünmemektedir; bu nedenle bağıl ekspresyon (fold change) hesaplanamamış ve biyolojik yorum yapılmamıştır.



**Şekil 4.19.** Sigara içen PBEH üzerinde farklı alkol konsantrasyonlarının IL8 (a) ve TNF- $\alpha$  (b) mRNA düzeyleri üzerindeki etkisi (\* aynı konsantrasyonların zamana bağlı karşılaştırması).

KOAH'lı bireylerden elde edilen PBEH IL-8 gen ekspresyonu, GAPDH'ye normalize edilerek qRT-PCR ile ve zaman-bağımlı olarak değerlendirildi; grafikteki yıldızlar, aynı doz için 12–24 saat karşılaştırmasını göstermektedir. 12. saatte, 1 mM etanol IL-8 düzeylerini kontrole göre belirgin biçimde azalttı ( $p<0,0001$ ); 5 mM etanol da azalma oluşturdu ( $p<0,0001$ ). 24. saatte, 1 mM etanol IL-8 ekspresyonunu kontrole kıyasla artırdı ( $p<0,0001$ ), 5 mM etanol ise 1 mM'den anlamlı derecede düşüktü ( $p<0,01$ ) ve kontrole yakın seyretti. Zaman etkisi: 1 mM koşulunda 24. saat, 12. saate

göre çok daha yüksektir (\*\*); 5 mM için de 24. saatte 12. saate kıyasla artış gözlenmiştir (Şekil.4.20a). KOAH'lı bireylerden elde edilen primer PBEH TNF $\alpha$  gen ekspresyonu, GAPDH'ye normalize edilerek qRT-PCR ile ve zaman-bağımlı olarak değerlendirildi; grafikteki yıldızlar, aynı doz için 12–24 saat karşılaştırmasını göstermektedir. (Şekil.4.20b) 12. saatte, hem 1 mM hem 5 mM etanol grupları kontrole benzer seyretti; ancak 1 mM dozda 12–24 saat karşılaştırması anlamlıydı ( $p<0,01$ ). 24. saatte, 1 mM etanol TNF- $\alpha$  düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak azalttı ( $p<0,05$ ); 5 mM dozda kontrole karşı anlamlı fark işaretlenmedi. Zaman etkisi: 1 mM grubunda 24. saat, 12. saate göre daha düşüktür (yıldızlarla gösterilmiştir); 5 mM için zaman etkisi saptanmadı. KOAH'lı bireylerden elde edilen PBEH 1 mM ve 5 mM etanol maruziyeti sonrası yapılan qRT-PCR'da IL-6 hedefinin amplifikasyon eğrileri (Şekil 4.20.a) log-linear faz göstermemiş, sinyal tüm döngüler boyunca taban çizgisine yakın seyretmiş; yalnızca 40. döngü sonrası görülen zayıf yükselmeler geç döngü/spekülatif olup non-spesifik amplifikasyon/primer-dimer ile uyumludur. Buna karşılık GAPDH erime eğrileri tüm gruplarda  $\sim 76-78$  °C'de tek ve keskin tepe vermiş, iç kontrolün özgül ve başarılı çalıştığını doğrulamıştır (Şekil 4.20.b).



**Şekil 4.20.** KOAH'lı PBEH'lerde Farklı alkol konsantrasyonlarının farklı sürelerde IL8 (a) ve TNF- $\alpha$  (b) mRNA düzeyleri üzerindeki etkisi (\*aynı konsantrasyonların zamana bağlı karşılaştırması).

## 5. TARTIŞMA

Bu araştırmada, BEAS-2B hücre hattı ve PBEH hücreleri kullanılarak, etanolün solunum yolu epitelinin canlılığı ve inflamatuvar sitokin gen ekspresyonu üzerine olan etkileri zamana bağlı olarak araştırılmıştır. Deneysel tasarımda 1 ve 5 mM etanol konsantrasyonları kullanılmış; 12 ve 24 saatlik etanol uygulamaların yanı sıra, SDE ile maruziyetin olası etkileşimleri incelenmiştir ve bu etkinin SDE varlığında arttığını ortaya koymuştur. Bu bulgular, etanolün solunum yolu epiteli üzerine toksik etkiler gösterebileceğini, sigaranın bunu arttırabileceğini, dolayısıyla iki ajanın bir arada solunum sistemi patolojilerinin ortaya çıkmasına katkı sunabileceğini düşündürmektedir.

Hücre canlılığı ve gen ekspresyon değişimleri ile elde edilen bulgular, hem uygulanan doz hem de maruziyet süresinin hücre canlılığında azalmaya yol açtığını, ancak bu etkinin hücre tipi ve süreye göre değişkenlik gösterebileceğini göstermiştir.

BEAS-2B hücrelerinde, 30 dakikalık maruziyetlerde herhangi bir konsantrasyonda anlamlı değişim saptanmamıştır. Bir saatlik uygulamada yalnızca 25 mM etanol belirgin azalmaya yol açmıştır. İki ve dört saatlik sürelerde yüksek dozlar (25–100 mM) canlılıkta kayba neden olmuştur. Altı saatlik maruziyette ise 10 mM düzeyi bile istatistiksel olarak anlamlı düşüş yaratmış; bu etki 25 mM ve üzerindeki dozlarda daha da artmıştır. Sekiz saatlik uygulamalarda 25–100 mM aralığında benzer azalmalar gözlenmiş, 12 saatlik maruziyetlerde ise 10 mM ve üzerindeki konsantrasyonlarda daha belirgin etkiler ortaya çıkmıştır. Yirmi dört saatlik uygulamalarda orta düzey konsantrasyonlar (2,5–5 mM) dahi hücre canlılığını azaltmış, yüksek dozlarda bu azalma daha belirginleşmiştir. Bu durum, BEAS-2B hücrelerinde toksisite eşiğinin maruziyet süresi uzadıkça düştüğünü göstermektedir.

Bu bulgular, yalnızca hücre canlılığı açısından değil, aynı zamanda epitel bariyer fonksiyonunun korunması açısından da önemlidir. Nitekim literatürde, hava yolu epitel bütünlüğünün sıkı bağlantı proteinleri aracılığıyla sağlandığı, alkol ve çevresel toksinlerin bu yapıları kısa sürede zayıflatabildiği ifade edilmektedir (Carlier vd., 2021). Ayrıca, etanolün mitokondri kaynaklı ROS üretimini artırdığı, NF-κB sinyal yolunu aktive ederek inflamatuvar yanıtı güçlendirdiği de rapor edilmiştir (Mekala vd., 2024).

Çalışmamız, aynı zamanda alkolün tek başına düşük dozlarda (1 mM) kısa süreli maruziyette bile inflamatuvar belirteçlerde artışa yol açabileceğini göstermesi açısından önemlidir. Bu bulgu, düşük doz alkolün “zararsız” olduğu varsayımını sorgulatan önceki klinik gözlemleri desteklemektedir. Çalışmanın klinik ve bilimsel önemi, alkol ve sigara dumanı maruziyetinin birlikte değerlendirilmesidir. Literatürde bu iki faktör genellikle bağımsız olarak incelenmekte, ancak gerçek hayatta eş zamanlı maruziyet yaygındır (WHO, 2023). Bulgularımız, bu kombinasyonun özellikle inflamasyon ve bariyer disfonksiyonu üzerinde sinerjistik zararlı etkiler

oluşturduğunu, dolayısıyla KOAH yönetiminde sadece sigara bırakma değil, alkol tüketiminin de azaltılmasının önemli bir önleyici strateji olabileceğini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada BEAS-2B hücrelerinde yalnızca alkol maruziyeti, 12 ve 24 saatlik sürelerde IL-8 düzeylerinde anlamlı bir değişime yol açmamış, yüksek doz uygulamalarda ise hafif bir azalma eğilimi gözlenmiştir. Buna karşılık, SDE uygulaması, özellikle %5'lik konsantrasyonda, IL-8 üretimini artırmış ve bu artış zamanın uzamasıyla daha belirgin hâle gelmiştir. En dikkat çekici bulgu, alkol ve SDE'nin birlikte uygulandığı koşullarda ortaya çıkmıştır; özellikle %5 SDE ile 5 mM alkol kombinasyonu, IL-8 düzeylerinde belirgin bir artışa neden olmuştur. Bu durum, iki ajanın sinerjistik olarak hava yolu epitelinde proinflamatuvar bir yanıt oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Literatürde SDE'nin bronş epitelinde IL-8 üretimini artırdığı ve bu etkinin, özellikle uçucu aldehitlerin (ör. akrolein, krotonaldehit) protein kinaz C (PKC) aracılı sinyal yollarını aktive etmesiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Moretto vd., 2012; van der Toorn vd., 2007). Ayrıca NF- $\kappa$ B yolaklarının SDE'ye yanıt olarak aktive olması, IL-8 transkripsiyonunu artırmakta ve bu durum inflamatuvar süreci güçlendirmektedir (Guo vd., 2024; Mao vd., 2025). Önceki çalışmalar, SDE'nin IL-8 üretimini IL-17A/NF- $\kappa$ B eksenini üzerinden güçlendirdiğini (Lee vd., 2018) ve bu etkinin oksidatif stres koşullarında daha da arttığını göstermiştir (Seenak vd., 2024). Alkolün tek başına IL-8 üretiminde sınırlı bir değişim yaratması, ancak SDE ile uygulandığında bu yanıtı kuvvetlendirmesi, Muralidharan vd., (2023)'nin alkol ve sigara dumanı kombinasyonunun epitel bütünlüğünü bozarak inflamatuvar mediatörleri artırdığı yönündeki bulgularıyla uyumludur.

IL-8'in KOAH patogenezendeki rolü göz önüne alındığında—nötrofil göçü, mukus üretimi ve alevlenme sıklığındaki artış ile ilişkilidir (Mio et al., 1997; Yoshikawa vd., 2007)—bu çalışmada gözlenen kombinasyon etkisi klinik açıdan önemlidir. Bulgularımız, özellikle alkol ve sigara dumanının birlikte maruziyetinin, kronik hava yolu hastalıklarında inflamatuvar yükü artırarak hastalık progresyonunu hızlandırabileceğini göstermektedir. Mekanistik olarak bu durum, SDE'nin proinflamatuvar gen ekspresyonunu artırması ve alkolün oksidatif stres aracılığıyla bu yanıtı potansiyelize etmesi ile açıklanabilir.

Bu çalışmada alkolün TNF- $\alpha$  üzerindeki etkisi hücre bağlamına ve zamana duyarlı bir örüntü sergiledi. KOAH'tan elde edilen HAE hücrelerinde 12 saatte TNF $\alpha$  değişmedi, 24 saatte ise her iki dozda azaldı; bu azalış, alkolün hava yolu epitelinde NO-cAMP/PKA eksenini uyarıp TACE/ADAM17 aracılı TNF- $\alpha$  salımını baskılayabildiğine dair bulgularla uyumludur (Gerald vd., 2016). Sigara içen HAE hücrelerinde erken fazda (12 saat) TNF- $\alpha$  azaldı; buna karşılık 24 saatte 1 mM dozunda artış, 5 mM'de ise düşüş gözlemlendi. Bu “iki fazlı” desen, duman maruziyetinin oluşturduğu oksidatif stres/MAPK-NF- $\kappa$ B uyarısına bağlı primer/sekonder yanıt

dinamikleri ve yüksek dozda mitokondriyal stres ile transkripsiyonel baskılanma olasılığıyla tutarlıdır (Yang vd., 2006; van der Toorn vd., 2007; Kulkarni vd., 2010). Sağlıklı HAE hücrelerinde 12 saatte doza bağlı artış izlendi; 24 saatte ise U-şekilli bir yanıt göze çarptı: 1 mM’de azalış, 5 mM’de belirgin artış. Bu davranış, alkolün hormetik (doza bağlı yön değiştiren) etkilerini ve stres yanıtlarının eşik değerlerini düşündürür (Calabrese ve Baldwin, 2002).

BEAS-2B ile karşılaştırma, model-bağımlı farklılıkların altını çizdi: BEAS-2B’de alkol tek başına genel olarak TNF- $\alpha$ ’yı azalttı (12–24 saat), 5 mM’de kısmi toparlanma olsa da düzeyler çoğu zaman kontrolün altında seyretti; bu, KOAH HAE (24 saat) ve sigara içen HAE (12 saat) ile uyumlu, sağlıklı HAE (12/24 saat) ile ise ayrışan bir patern. BEAS-2B’de saptanan baskılayıcı kol, alkolün TACE/ADAM17 üzerinden TNF- $\alpha$  çıkışını frenlemesiyle açıklanabilir (Gerald vd., 2016); buna eşlik eden bariyer gevşemesi (PKC $\alpha$  aracılı ZO-1/claudin yerleşiminde bozulma) ise ilerleyen aşamada duman sinyallerinin hücre içine erişimini kolaylaştıran bir “hazırlayıcı” etki yaratabilir (Simet vd., 2012). Primer HAE’lerde görülen artış yönlü pencereler (özellikle sağlıklı HAE’de 12 s, 24 s-5 mM ve sigara içende 24 s-1 mM), epitelin bazal inflamatuvar tonu, kronik dumanla yeniden programlanma, antioksidan kapasite ve hücre-özümlü transkripsiyonel durumları nedeniyle NF- $\kappa$ B/MAPK eksenlerinin daha kolay süperindüklenmesine bağlanabilir (Nyunoya vd., 2014; Yang vd., 2006). Yüksek dozlarda görülen azalış ise mitokondriyal solunum zinciri blokajı, oksidan/karbonil aşırılığı ve bazı bağlamlarda NF- $\kappa$ B transaktivasyonunun baskılanması ile tutarlı bir “üst-eşik” etkisine işaret eder

(van der Toorn vd., 2007; Kulkarni vd., 2010). TNF- $\alpha$  bronş epitelinde TEER’i düşürür, paraselüler akışı artırır ve ZO-1/occludin/claudin dağılımını bozar; böylece bariyer bütünlüğü zayıflarken sekonder mediatörler (IL-6, IL-8) devreye girer (Hardyman vd., 2013; Wittekindt, 2016). Dolayısıyla sigara içen PBEH’de 24 s-1 mM ve sağlıklı HAE’de 12 s / 24 s-5 mM pencerelerinde görülen TNF- $\alpha$  artışı, bariyer kırılabilirliği ve alevlenme riskinin yükselmesiyle ilişkilendirilebilir. Tersine KOAH PBEH (24 s), sigara içen PBEH (12 s) ve BEAS-2B’deki azalış, kısa vadede inflamasyonun sınırlanması anlamına gelebilir; ancak doğuştan bağışıklık sinyallerinin zayıflaması üzerinden enfeksiyon yatkınlığını artırma riski de taşır (Gerald vd., 2016; Kulkarni vd., 2010). Bu nedenle yorumda “faz-spesifik risk/yarar” dengesine odaklanmak gerekir. Son olarak, bu sonuçlar mRNA düzeyine dayalıdır; TNF- $\alpha$  protein salımı (ELISA), TACE aktivitesi, TEER/geçirgenlik ölçümleri ve MLCK/PKC $\alpha$  hedefli müdahale deneyleri ile mekanizma haritasının güçlendirilmesi önerilir (Hardyman vd., 2013; Simet vd., 2012).

Bu çalışmada alkolün TNF- $\alpha$  üzerindeki etkisi, hücre bağlamına ve zamana duyarlı bir örüntü sergiledi. KOAH’tan elde edilen insan primer bronş epitel hücrelerinde (PBEH) 12 saatte TNF- $\alpha$  değişmedi, 24 saatte ise her iki dozda azaldı; bu azalış, alkolün hava yolu epitelinde NO-cAMP/PKA eksenini uyarıp TACE/ADAM17 aracılı TNF- $\alpha$  salımını baskılayabildiğine dair bulgularla uyumludur

(Gerald vd., 2016). Sigara içenlerden elde edilen PBEH örneklerinde erken fazda (12 saat) TNF- $\alpha$  azaldı; buna karşılık 24 saatte 1 mM dozunda artış, 5 mM’de ise düşüş gözlemlendi. Bu “iki fazlı” desen, sigara dumanının oluşturduğu oksidatif stres/MAPK–NF- $\kappa$ B uyarısına bağlı primer/sekonder yanıt dinamikleri ve yüksek dozda mitokondriyal stres ile transkripsiyonel baskılanma olasılığıyla tutarlıdır (Yang vd., 2006; van der Toorn vd., 2007; Kulkarni vd., 2010). Sağlıklılarından elde edilen PBEH’lerde 12 saatte doza bağlı artış izlendi; 24 saatte ise U-şekilli bir yanıt göze çarptı: 1 mM’de azalış, 5 mM’de belirgin artış. Bu davranış, alkolün hormetik (doza bağlı yön değiştiren) etkilerini ve stres yanıtlarının eşik değerlerini düşündürür (Calabrese ve Baldwin, 2002).

Etanol tek başına (BEAS-2B): 12 ve 24 saatte IL-6 azaldı ya da değişmedi; 24 saatte düşüş daha belirgindi. Bu tablo, etanolün hava yolu epitelinde NO–cAMP/PKA yolunu artırarak TACE/ADAM17 etkinliğini sınırlaması ve böylece proinflatuvar çıkışı zayıflatabilmesiyle uyumlu okunabilir (Gerald et al., 2016). Bununla birlikte etanolün PKC $\alpha$  aracılı sıkı bağlantı (ZO-1/claudin) zayıflamasıyla bariyer geçirgenliğini yükseltebildiği bilinir; bariyerin gevşemesi, eşlik eden duman sinyallerinin daha etkili girişine zemin hazırlayabilir (Simet vd., 2012). SDE tek başına: Zaman ve doza bağlı farklılıklar izlendi. 12 saatte kontrole karşılaştırıldığında %2,5 SDE’de azalma, %5 SDE’de görece yüksek bir düzey görüldü; 24 saatte ise her iki dozda da azalma belirgindi ve %5’te düşüş daha fazlaydı. İlk saatlerdeki görece yükseklik, dumanın oksidatif stres üzerinden NF $\kappa$ B/p38-JNK eksenlerini kısa süreli etkinleştirmesiyle açıklanabilir; 24 saatteki düşüş ise mitokondriyal stres, karbonil/ROS aşırılığı ve transkripsiyonel geri besleme mekanizmalarının baskınlaşmasına işaret eder (Yang vd., 2006; van der Toorn vd., 2007; Kulkarni vd., 2010; Guo vd., 2024). Kombinasyon – %2,5 SDE + etanol: 12 saatte hem 1 mM hem 5 mM etanol ile IL-6 yükseldi. 24 saatte 1 mM etanol ile belirgin bir artış korunurken, 5 mM’de düşük düzeylere geri dönüldü. Bu durum, orta düzey SDE’nin NF- $\kappa$ B/MAPK uyarımının, düşük etanolün bariyer gevşetici ama mitokondriyi zorlamayan etkisiyle kooperatif biçimde güçlenmesine; yüksek etanolde ise stres yükünün artıp transkripsiyonel fren/sinyal tükenmesi mekanizmalarının devreye girmesine bağlanabilir (Simet vd., 2012; Raby vd., 2023; Guo vd., 2024).

Kombinasyon – %5 SDE + etanol: 12 saatte anlamlı bir farklılık görülmedi. 24 saatte 5 mM etanol varlığında IL-6 azaldı; 1 mM’de değişim sınırlıydı. Yüksek SDE dozu altında gözlenen bu gerileme, mitokondri zinciri blokajı ve aşırı oksidan yük ile uyumlu, üst-eşik bir baskılayıcı yanıtı düşündürür (van der Toorn vd., 2007).

Biyolojik/klinik çeviri: IL-6, epitel-immün ekseninde trans-sinyalleşme (sIL-6R/gp130) yoluyla akut faz tepkilerini besler; TNF- $\alpha$  ve IL-8 ile birlikte bariyer bütünlüğünün bozulmasına katkı verebilir (Tanaka vd., 2014; Hardyman vd., 2013; Wittekindt, 2016). Bu nedenle %2,5 SDE + 1 mM etanol/24 saat koşulunda gözlenen yüksek IL-6, alevlenme riski ve nötrofilik inflamasyon olasılığının arttığı bir pencere olarak yorumlanmalıdır. Öte yandan yüksek SDE (ve/veya 5 mM etanol) altında

IL-6'daki azalma, kısa vadede yükü sınırlayabilir; fakat eşzamanlı doğuştan bağışıklık sinyallerinde zayıflamaya ve enfeksiyon yatkınlığına katkıda bulunma riski taşır (Kulkarni vd., 2010).

Üç ayrı insan primer bronş epitel hücresi (PBEH) grubundaki (sağlıklı, sigara içen, KOAH) ölçümlerde IL-6 qPCR için özgül ve tekrarlanabilir bir amplifikasyon elde edilemedi. Amplifikasyon eğrilerinde sigmoidal yükseliş gözlenmedi ya da geç/kararsız sinyaller oluştu; erime eğrileri bazı örneklerde düşük genlikli veya çoklu tepeler gösterdi. Buna karşılık GAPDH için erime eğrileri tek ve keskin tepe verdi ve amplifikasyon kararlıydı; bu durum toplam RNA'nın ve cDNA sentezinin genel olarak çalışır olduğunu, sorunun gen-özgül olabileceğini düşündürmektedir. MIQE ilkelerine uygun olarak (Bustin vd., 2009) özgül tek tepe ve tekrarlanabilir Cq üretmeyen IL-6 reaksiyonları analiz dışı bırakıldı; bu nedenle PBEC gruplarında IL-6 mRNA düzeyleri karşılaştırmalı olarak rapor edilmedi.

Bu çalışma, hava yolu epitelinin alkol ve sigara dumanına eşzamanlı maruziyetinde ortaya çıkan yanıtlarda tek bir nedene indirgenemeyen bir etkileşim mimarisi bulunduğunu gösterdi. Yanıtın yönü ve büyüklüğü; uygulanan yük, maruziyet süresi ve doku kökeninin kesiştiği noktada belirlendi. Hücre hattında alkol çoğu durumda TNF- $\alpha$  ve IL-6 ifade düzeylerini aşağı çekerken; dumanın orta derişimi (%2,5) inflamatuvar programı yukarı yönlendirdi, yüksek derişimde (%5) ise baskılanma ön plana çıktı. Orta duman yükünün düşük doz alkol ile birlikte verilmesi, TNF- $\alpha$ /IL-6/IL-8 artışı belirginleştirdi; bu durum, alkolün sıkı bağlantıları gevşetici etkisinin ve dumanın NF- $\kappa$ B/MAPK üzerinden sinyal yükseltmesinin işbirlikçi biçimde çalıştığına işaret eder. Buna karşılık, yük arttıkça ve/veya süre uzadıkça mitokondri kaynaklı stres ve transkripsiyonel geri frenleme ağır basarak sitokin üretimini zayıflattı. İnsan primer bronş epitelinde bağlam belirleyiciydi: sağlıklı hücrelerde kısa sürede artış, daha geç ölçümlerde gerileme izlenirken; sigara içen ve KOAH kökenli örneklerde yanıt genel olarak sönüktü. Ayrıca üç primer epitel grubunda IL-6 qPCR özgülük kriterlerini karşılamadığı için bu gene ilişkin yorumlar protein düzeyi doğrulamasıyla sınırlandırıldı.

Genel tablo, bariyer bütünlüğü–oksidatif yük–NF- $\kappa$ B/MAPK üçlüsünün, alkol ve tütünün birlikte görüldüğü gerçek yaşam koşullarında alevlenme eğilimini belirlediğini düşündürüyor. Bulgularımız; (i) orta yükte eş maruziyetin inflamasyonun artmasına zemin hazırlayabileceğini, (ii) yüksek yük/uzun süre koşullarında yanıtın bastırılarak doğuştan bağışıklık çıktılarının zayıflayabileceğini ve (iii) kronik duman geçmişinde epitelin uyarılabilirlik aralığının daraldığını ortaya koyuyor. Bu çerçevede, tütün maruziyeti olan bireylerde alkol tüketiminin sınırlanması ve epitel bariyerini güçlendiren yaklaşımlar klinik açıdan öncelikli görünmektedir.

Çalışmanın öne çıkan yanları; aynı deney iskeletinin hem hücre hattı hem de insan primer epitel üzerinde sınanması, doz–zaman boyutlarının sistematik

haritalanması ve birlikte maruziyet etkilerinin ayrıntılandırılmasıdır. Kısıtlar arasında; sitokinlerin çoğunlukla mRNA düzeyinde ele alınması, primer epitelde IL-6 qPCR özgülük sorunu, duman ekstraktı partileri arasındaki bileşim değişkenliği ve donör sayısı sayılabilir. Bir sonraki adım için; (a) ELISA ile TNF- $\alpha$ /IL-6/IL-8 ve sIL-6R ölçümleri, (b) TEER ve geçirgenlik testleriyle bariyer çıktısının nicelenmesi, NF- $\kappa$ B/MAPK/PKC $\alpha$  eksenine yönelik hedefli müdahaleler, (d) primer epitel için yeni IL-6 ampikonları/prob-bazlı veya ddPCR yaklaşımları ve (e) ALI kültür ile donör çeşitliliğinin artırılması önerilir. Alkol ve tütün dumanının epitel üzerindeki etkisi “tek doz–tek sonuç” ilişkisi değildir; yanıt, yük–süre–doku etkileşiminin ürünüdür. Bu çalışma, bu etkileşimi deneysel olarak görünür kılarak, hem önleyici stratejilerin hem de epitel hedefli müdahalelerin rasyonel zeminini güçlendirmektedir.

## 6. SONUÇLAR

Elde edilen bulgular, orta düzey SDE (%2,5) ile düşük doz etanolün (1 mM) 24. saatte IL-8 ekspresyonunu belirgin artırdığını, aynı koşulda 5 mM etanolün artışı sınırladığını göstermiştir (1 mM: 24 s > 12 s; 5 mM: 24 s  $\approx$  /  $\leq$  12 s). IL-6 için %2,5 SDE + 1 mM etanol kombinasyonu 24. saatte yükseliş sergilerken, 5 mM etanol aynı koşulda IL-6 ve TNF- $\alpha$ 'yı baskılama eğilimi göstermiştir; 12. saatte her iki kombinasyon kontrol düzeylerine yakındır. Primer hücrelerde sağlıklı grupta IL-8'de 12. saatte hafif artış gözlenip 24. saatte normale yakın seyrederken, sigara içen ve KOAH epitelinde IL-8 ve TNF- $\alpha$  yanıtları genel olarak düşük/baskılı bulunmuştur. IL-6'da üç grupta da qPCR'da özgül ve tekrarlanabilir amplifikasyon sağlanamadığından karşılaştırma yapılamamıştır. Sonuç olarak, etanol ve SDE eş maruziyeti bronş epitelinde yanıtı doz-zaman bağımlı biçimde yeniden şekillendirmekte; orta yükte proinflamatuvar artış, yüksek yükte ise baskılanma öne çıkmaktadır. Bu tespitler, alkol ve tütün dumanına eş zamanlı maruziyetin hava yolu patofizyolojisindeki klinik önemini vurgulamakta; bulguların protein düzeyi doğrulamaları (örn. ELISA, Western blot) ve bariyer fonksiyonu ölçümleri (TEER, permeabilite) ile destekleneceği ileri çalışmaların tasarlanması açısından yol gösterici olmaktadır. Ayrıca, farklı hava yolu hücre tipleri ve in vivo modellerde mekanistik doğrulamalar ve doz-yanıt/ zaman-yanıt analizleri, olası terapötik hedeflerin belirlenmesine katkı sağlayacaktır.

## 7. ÖNERİLER

Bu çalışmanın bulgularına dayanarak, gelecekteki araştırmalarda model ve yöntem çeşitliliğinin artırılması önerilir: BEAS-2B'ye ek olarak farklı donörlerden elde edilen primer bronş epiteli Hava-sıvı arayüzü hücre kültürü Hava sıvı arayüzlü hücre kültürü koşullarında ve tekrarlayan/uzun süreli maruziyetlerle incelenmeli; 0.25–2 mM arası daha düşük etanol basamakları ve 6–48 saat arası ek zaman noktalarıyla doz–zaman eşiğı ayrıntılandırılmalıdır. Kullanılan SDE partileri kimyasal olarak (karboniller, PAH, endotoksin) karakterize edilmeli, oksidan yük göstergeleri eklenmelidir. qPCR çıktıları ELISA ve gerekiyorsa western/immünofloresan ile protein düzeyinde doğrulanmalı; özellikle IL-6 için yeni ekzon-ekzon primer/prob tasarımları veya ddPCR ile yöntemsel optimizasyon yapılmalıdır. Epitelyal bariyer ve onarım kapasitesi TEER, FITC-dextran geçişi ve yara iyileşmesi testleriyle sayısallaştırılmalı; NF-κB/MAPK/PKCα eksenine yönelik inhibitörlerle nedensellik sınanmalıdır. Etanol–SDE birlikteliği için sinerji/antagonizm nicel analizleri (ör. Bliss/Loewe) uygulanmalı; hücresel heterojenliği anlamak üzere alt popülasyon belirteçleri ve/veya tek hücre ifadesi değerlendirilmeli, uygun görülen adaylar biyobelirteç olarak protein düzeyinde teyit edilmelidir. Raporlamada MIQE ilkeleri (çoklu referans gen, standart eğri, verim) eksiksiz izlenmeli ve ham Ct ile primer dizileri ek veri olarak paylaşılmalıdır. Uygulamada, tütün maruziyeti olan bireylerde alkol azaltımı ve bariyer bütünlüğünü destekleyen yaklaşımlar önceliklendirilmeli; araştırma planı kaynaklara göre iki fazda yürütülerek ilk fazda protein doğrulaması + TEER ve IL-6 metod optimizasyonu, ikinci fazda omik ve uzun süreli maruziyet çalışmalarına odaklanılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Adeloye, D., Chua, S., Lee, C., Basquill, C., Papana, A., Theodoratou, E., Nair, H., Gasevic, D., Sridhar, D., Campbell, H., Chan, K. Y., Sheikh, A., Rudan, I., & Global Health Epidemiology Reference Group (GHERG). (2015). Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Global Health*, 5(2), 020415.
- Arteel, G. E. (2020). Liver–lung axes in alcohol-related liver disease. *Clinical and Molecular Hepatology*, 26(6), 670–676.
- Aytaçoğlu, B. N., Çalikoğlu, M., Tamer, L., Coşkun, B., Sucu, N., Köse, N., Aktaş, S., & Dikmengil, M. (2006). Alcohol-induced lung damage and increased oxidative stress. *Respiration*, 73(1), 100–104.
- Álvarez-Avellón, S. M., Fernández-Somoano, A., Navarrete-Muñoz, E. M., Vioque, J., & Tardón, A. (2017). Effect of alcohol and its metabolites in lung cancer: CAPUA study. *Medicina Clínica (English Edition)*, 148(12), 531–538.
- Arıcı, A. (2017). Gençlerde alkol kullanımı ve kültürel yapının bağımlılığa etkisi: Tekirdağ örneği [Yüksek lisans tezi].
- ATCC. (2025). BEAS-2B – CRL-3588.
- Bailey, K. L., & Wyatt, T. A. (2023). Synergistic detrimental effects of cigarette smoke, alcohol, and SARS-CoV-2 in COPD bronchial epithelial cells. *Pathogens*, 12(3), 498.
- Bailey, K. L., Robinson, J. E., Sisson, J. H., & Wyatt, T. A. (2011). Alcohol decreases RhoA activity through a nitric oxide (NO)/cGMP/PKG-dependent pathway in the airway epithelium. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(7), 1277–1281.
- Bobo, M. W. (1972). Effects of alcohol upon maximum oxygen uptake, lung ventilation, and heart rate. *Research Quarterly. American Association for Health, Physical Education and Recreation*, 43(1), 1–6.
- Boe, D. M., Vandivier, R. W., Burnham, E. L., & Moss, M. (2009). Alcohol abuse and pulmonary disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(5), 1097–1104.
- Branchfield, K., Nantie, L., Verheyden, J. M., Sui, P., Wienhold, M. D., & Sun, X. (2016). Pulmonary neuroendocrine cells function as airway sensors to control lung immune response. *Science*, 351(6274), 707–710.
- Bukowy-Bieryłło, Z. (2021). Long-term differentiating primary human airway epithelial cell cultures for disease modeling. *Cells*, 10(6), 1457.
- Burnham, E. L., Halkar, R., Burks, M., & Moss, M. (2009). The effects of alcohol abuse on pulmonary alveolar-capillary barrier function in humans. *Alcohol and Alcoholism*, 44(1), 8–12.
- Büyükbaş, S., & İnal, A. (2007). Erkeklerde aşırı alkol kullanımının C-reaktif protein ve alfa-1 antitripsin üzerine olan etkileri. *Van Tıp Dergisi*, 14(1), 19–24.
- Büyükbaş, S., & İnal, A. (2006). Ilımlı alkol alan erkeklerde laktat dehidrogenaz

- izoenzim değişiklikleri. *Van Tıp Dergisi*, 13(3), 85–89.
- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2002). Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology*, 21(2), 91–97.
- Capurso, G., & Lahner, E. (2017). The interaction between smoking, alcohol and the gut microbiome. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 31(5), 579–588.
- Carlier, F. M., de Fays, C., & Pilette, C. (2021). Epithelial barrier dysfunction in chronic respiratory diseases. *Frontiers in Physiology*, 12, 691227.
- Çelik, S., Görgülü, Ş., & Tezel, T. (2002). Alkol tüketimi ve koroner kalp hastalığı. *Türk Kardiyoloji Derneęi Arşivi*, 30, 634–639.
- Das, S. (2009). Effects of alcohol on the lung. *Current Respiratory Medicine Reviews*, 5(1), 28–40.
- Davis, J. D., & Wypych, T. P. (2021). Cellular and functional heterogeneity of the airway epithelium. *Mucosal Immunology*, 14, 978–990.
- Doğan, S. (2014). Acil servise araç içi trafik kazası nedeni ile başvuran hastalarda kan alkol düzeyi ile yaralanma ciddiyetinin ilişkisi [Tıpta uzmanlık tezi].
- Foreman, M. G., Campos, M., & Celedón, J. C. (2012). Genes and chronic obstructive pulmonary disease. *Medical Clinics of North America*, 96(4), 699–711.
- Fulcher, M. L., & Randell, S. H. (2013). Human nasal and tracheo-bronchial respiratory epithelial cell culture. In S. H. Randell & M. L. Fulcher (Eds.), *Epithelial cell culture protocols* (2nd ed., pp. 109–121). *Methods in Molecular Biology*, 945.
- Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). (2022). Global strategy for prevention, diagnosis, and management of COPD (2022 report).
- Guidot, D. M., & Hart, M. C. (2005). Alcohol abuse and acute lung injury: Epidemiology and pathophysiology of a recently recognized association. *Journal of Investigative Medicine*, 53(5), 235–245.
- Gupta, N. M., Deshpande, A., & Rothberg, M. B. (2020). Pneumonia and alcohol use disorder: Implications for treatment. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 87(8), 493–500.
- Happel, K. I., & Nelson, S. (2005). Alcohol, immunosuppression, and the lung. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2(5), 428–432.
- Hardyman, M. A., Wilkinson, E., Martin, E., Jayasekera, N. P., Blume, C., Swindle, E. J., Gozzard, N., Holgate, S. T., Howarth, P. H., Davies, D. E., & Collins, J. E. (2013). TNF- $\alpha$ -mediated bronchial barrier disruption and regulation by srcfamily kinase activation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(3), 665–675.e8.
- Hewitt, R. J., & Lloyd, C. M. (2021). Regulation of immune responses by the airway epithelial cell landscape. *Nature Reviews Immunology*, 21(6), 347–362.

- Hivaraju, M., Chitta, U. K., Grange, R. M. H., et al. (2021). Airway stem cells sense hypoxia and differentiate into protective solitary neuroendocrine cells. *Science*, 371(6524), 52–57.
- İdiz, N., Karakuş, A., Dalgıç, M., Meseri, R., & Akgür, S. A. (2011). The alcohol levels in fatal & nonfatal traffic accidents in İzmir. *Turkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine*, 8(1), 6–11.
- İmtiaz, S., Shield, K. D., Roerecke, M., Samokhvalov, A. V., Lönnroth, K., & Rehm, J. (2017). Alcohol consumption as a risk factor for tuberculosis: Metaanalyses and burden of disease. *European Respiratory Journal*, 50(1), 1700216.
- Jiang, D., Schaefer, N., & Chu, H. W. (2018). Air–liquid interface culture of human and mouse airway epithelial cells. *Methods in Molecular Biology*, 1809, 91–109.
- Joshi, P. C., & Guidot, D. M. (2023). Alcohol abuse worsens COPD progression through oxidative stress and immune dysfunction. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 207(8), 987–999.
- Joshi, P. C., & Guidot, D. M. (2023). The additive effects of alcohol and tobacco on lung injury and immunity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 68(4), 345–357.
- Kaphalia, L., & Calhoun, W. J. (2013). Alcoholic lung injury: Metabolic, biochemical, and immunological aspects. *Toxicology Letters*, 222(2), 171–179.
- Ke, Y., Reddel, R. R., Gerwin, B. I., Miyashita, M., McMEnamin, M., Lechner, J. F., & Harris, C. C. (1988). Human bronchial epithelial cells with integrated SV40 virus T antigen genes retain the ability to undergo squamous differentiation. *Differentiation*, 38(1), 60–66.
- Kechagias, S., Blomdahl, J., & Ekstedt, M. (2019). Alcohol consumption in nonalcoholic fatty liver disease—harmful or beneficial? *HepatoBiliary Surgery and Nutrition*, 8(3), 235–239.
- Leach, T., Sorour, M., Triantafillou, V., Feghali, H., Wearden, P., & Verdugo, J. M. (2023). Development of a novel air–liquid interface airway tissue equivalent model for in vitro respiratory modeling studies. *Scientific Reports*, 13, 10645.
- Lee, K. H., Lee, C. H., Woo, J., Jeong, J., Jang, A. H., & Yoo, C. G. (2018). Cigarette smoke extract enhances IL-17A-induced IL-8 production via upregulation of IL-17R in human bronchial epithelial cells. *Molecules and Cells*, 41(4), 282–289.
- Li, G., et al. (2019). Activation of NF-κB pathways mediating inflammation in bronchial epithelial cells. *Environmental Pollution*, 254, 113063.
- Lowery, E. M., Afshar, M., West, N., Kovacs, E. J., Smith, B., & Joyce, C. (2020). Self-reported alcohol use in the cystic fibrosis community. *Journal of Cystic Fibrosis*, 19, 84–90.
- Maremanda, K. P., & Galam, L. (2023). Ethanol and tobacco smoke synergistically promote lung fibrosis via TGF-β1/Smad3 signaling. *Cell Communication and*

Signaling, 21(1), 12.

- Mehta, A. J., & Guidot, D. M. (2017). Alcohol and the lung. *Alcohol Research*, 38(2), 243–254.
- Mekala, N., Trivedi, J., Bhoj, P., Togle, N., Rom, S., Sriram, U., & Persidsky, Y. (2024). Alcohol and e-cigarette damage the alveolar-epithelial barrier by activation of P2X7r and provoke brain endothelial injury via extracellular vesicles. *Cell Communication and Signaling*, 22, 39.
- Montoro, D. T., Haber, A. L., Biton, M., et al. (2018). A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature*, 560(7718), 319–324.
- Moretto, N., Bertolini, S., Iadicicco, C., Marchini, G., Kaur, M., Volpi, G., Patacchini, R., Singh, D., & Facchinetti, F. (2012). Cigarette smoke and its component acrolein augment IL-8/CXCL8 mRNA stability via p38 MAPK/MK2 signaling in human pulmonary cells. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*, 303(10), L929–L938.
- Muralidharan, A., Bauer, C. D., Katafiasz, D. M., Siddique, A., Reid, S. P., Bailey, K. L., Park, Y., et al. (2015). Human bronchial epithelial BEAS-2B cells, an appropriate in vitro model to study airway inflammation. *Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 19(1), 1–7.
- Petty, W. J., Li, N., Biddle, A., Bounds, R., Nitkin, C., Ma, Y., Dragnev, K. H., Freemantle, S. J., & Dmitrovsky, E. (2005). A novel retinoic acid receptor beta isoform and retinoid resistance in lung carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(22), 1645–1651.
- Pezzulo, A. A., Starner, T. D., Scheetz, T. E., Traver, G. L., Tilley, A. E., Harvey, B.-G., Crystal, R. G., McCray, P. B., Jr., & Zabner, J. (2011). The air–liquid interface and the use of primary cell cultures are crucial for recapitulating the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*, 300(1), L25–L31.
- Plasschaert, L. W., Žilionis, R., Choo-Wing, R., et al. (2018). A single-cell atlas of the tracheal epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature*, 560(7718), 377–381.
- Rayner, R. E., Makena, P., Prasad, G. L., & Cormet-Boyaka, E. (2019). Optimization of normal human bronchial epithelial (NHBE) cell 3D cultures for in vitro lung model studies. *Scientific Reports*, 9, 500.
- Seenak, P., Nernpermpisooth, N., Kumphune, S., Songjang, W., Jiraviriyakul, A., Jumroon, N., Pankhong, P., Roytrakul, S., Thaisakun, S., Phaonakrop, N., & Nuengchamnong, N. (2024). Secretome profiling of human epithelial cells exposed to cigarette smoke extract and their effect on human lung microvascular endothelial cells. *Scientific Reports*, 14, 13740.
- Simet, S. M., & Sisson, J. H. (2023). Alcohol and cigarette smoke synergistically disrupt lung mucociliary clearance. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 47(5), 892–903.

- Simet, S. M., Wyatt, T. A., DeVasure, J. M., et al. (2012). Alcohol increases the permeability of airway epithelial tight junctions in BEAS-2B and NHBE cells. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 36(3), 432–442.
- Sisson, J. H. (2007). Alcohol and airways function in health and disease. *Alcohol*, 41(5), 293–307.
- Srinivasan, B., Kolli, A. R., Esch, M. B., Abaci, H. E., Shuler, M. L., & Hickman, J. J. (2015). TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *Journal of Laboratory Automation*, 20(2), 107–126.
- Sueblinvong, V., Fan, X., Hart, C., Molina, S., Koval, M., & Guidot, D. M. (2023). Ethanol-exposed lung fibroblasts cause airway epithelial barrier dysfunction. *Alcohol: Clinical and Experimental Research*, 47(10), 1839–1849.
- Sundar, I. K., et al. (2023). Alcohol enhances cigarette smoke-induced oxidative stress and mitochondrial damage in airway epithelium. *Antioxidants & Redox Signaling*, 38(9–10), 701–718.
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10), a016295.
- Te Hiringa Hauora | Health Promotion Agency. (2020). On-licensed premises toolkit: Info pages. Wellington, New Zealand.
- Thapa, R., Moglad, E. H., Singhal, R., et al. (2024). Deciphering NF- $\kappa$ B pathways in smoking-related lung disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 179, 116663.
- Ualiyeva, S., Lemire, E., Aviles, E. C., et al. (2021). Tuft cell-produced cysteinyl leukotrienes and IL-25 synergistically initiate lung type 2 inflammation. *Science Immunology*, 6(66), eabj0474.
- van der Toorn, M., Smit-de Vries, M. P., Slebos, D. J., de Bruin, H. G., Abello, N., van Oosterhout, A. J., Bischoff, R., & Kauffman, H. F. (2009). Lipid-soluble components in cigarette smoke induce mitochondrial production of reactive oxygen species in lung epithelial cells. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*, 297(1), L109–L114.
- Veranth, J. M., Kaser, E. G., Veranth, M. M., Koch, M., & Yost, G. S. (2007). Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Particle and Fibre Toxicology*, 4, 2.
- Wittekindt, O. H. (2017). Tight junctions in pulmonary epithelia during lung inflammation. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*, 469(1), 135–147.
- World Health Organization. (2025). Alcohol, consumers past 12 months (%) [Data set]. Global Health Observatory (GHO).
- World Health Organization. (2023). WHO report on the global tobacco epidemic, 2023: Protect people from tobacco smoke.
- World Health Organization. (2020). World health statistics 2020: Monitoring health for the SDGs, sustainable development goals.

- World Health Organization. (2024, June 28). Alcohol.
- World Health Organization. (2024, November 6). Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) — Fact sheet.
- Wyatt, T. A., Sisson, J. H., Allen-Gipson, D. S., et al. (2012). Co-exposure to cigarette smoke and alcohol decreases airway epithelial cell cilia beating in a protein kinase Cε-dependent manner. *American Journal of Pathology*, 181(2), 431–440.
- Yang, I. A., Jenkins, C. R., & Salvi, S. S. (2022). Chronic obstructive pulmonary disease in never-smokers: Risk factors, pathogenesis, and implications for prevention and treatment. *The Lancet Respiratory Medicine*, 10(5), 497–511.
- Yeligar, S. M., Chen, M. M., Kovacs, E. J., Sisson, J. H., Burnham, E. L., & Brown, L. A. S. (2016). Alcohol and lung injury and immunity. *Alcohol*, 55, 51–59.
- Zhao, F., & Klimecki, W. T. (2015). Culture conditions profoundly impact phenotype in BEAS-2B, a human pulmonary epithelial model. *Journal of Applied Toxicology*, 35(8), 945–951.