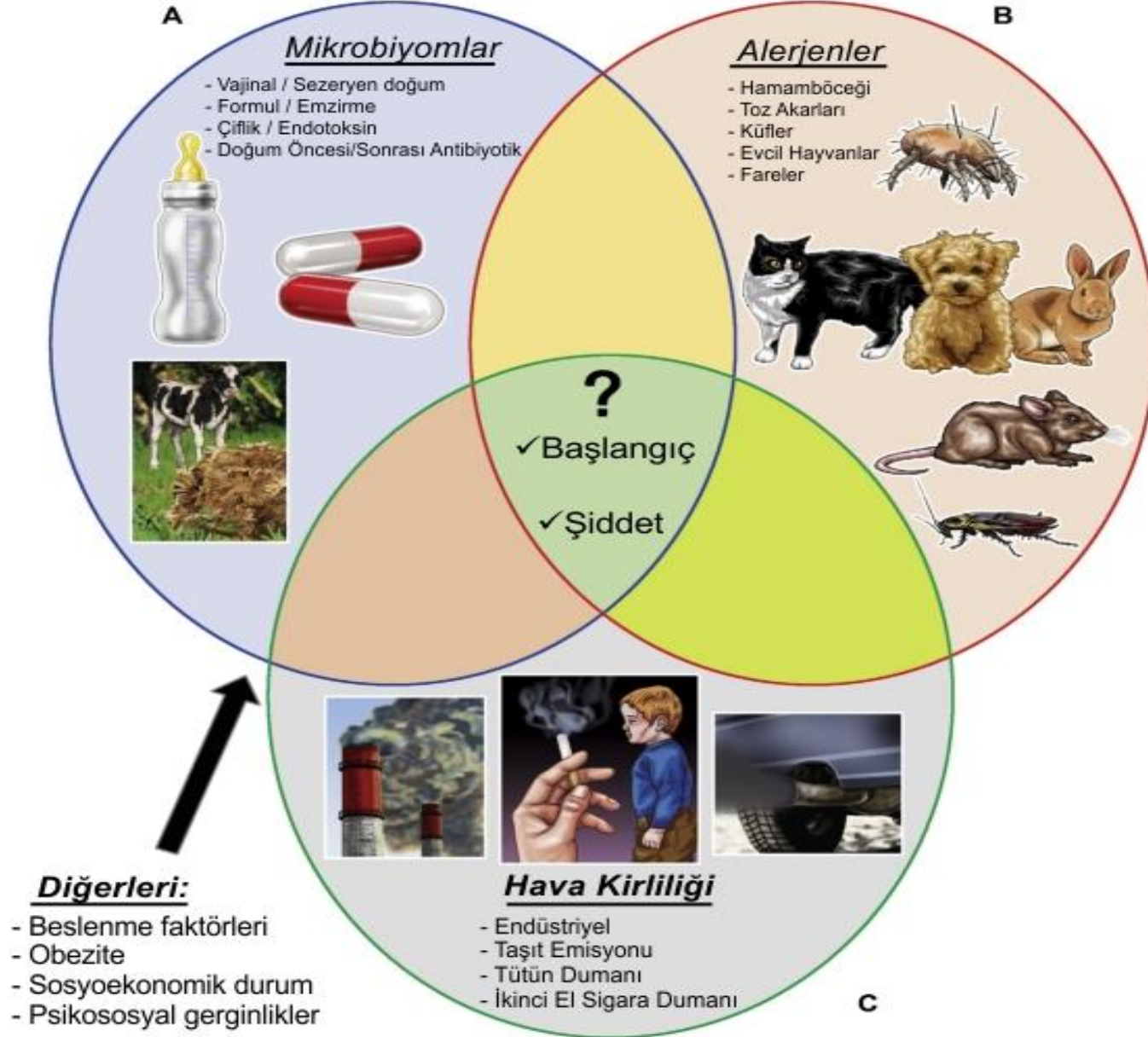


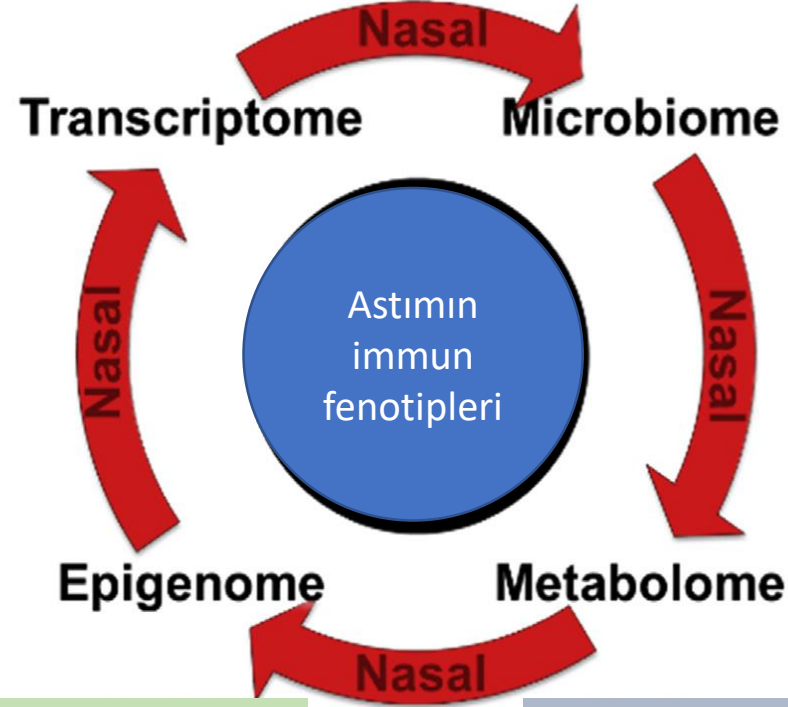
Astımda Çevresel Etkilerin Önlenmesi

Elif Dađlı

Atopi gelişimini etkileyecek maruziyetler



Hava Kirliliği



Solunanan
Mikrobiyom

Ev iđi
Alerjenler

ERKEN HAYAT MARUZİYETİ VE ALERJİ GELİŞMESİ

KORUYUCU

- Vajinal doğum
- Mikrobiyom farklılığı
- Çok kardeşi olmak
- Çiftlik hayatı
- Endotoksin maruziyeti

UYARICI

- Prenatal veya postnatal antibiyotik
- Viral alt solunum yolu enfeksiyonu
- Ev tozu, hamam böceği, mantar maruziyeti
- Prenatal veya postnatal hava kirliliği
- Prenatal veya postnatal tütün dumanı

Normali yakalama

Genetik, bireysel faktörler
Maruziyet azalması
Diyet
Fiziksel aktivite
Yararalı takviyeler
Önleme
Bireyselleşmiş tedavi

Normal akciğer fonksiyon gelişimi

Düşük solunum fonksiyon seyri

Genetik
Preterm doğum
Erken maruziyetler
Alt solunum yolu enfeksiyonu
Çocuklukta persistan astım

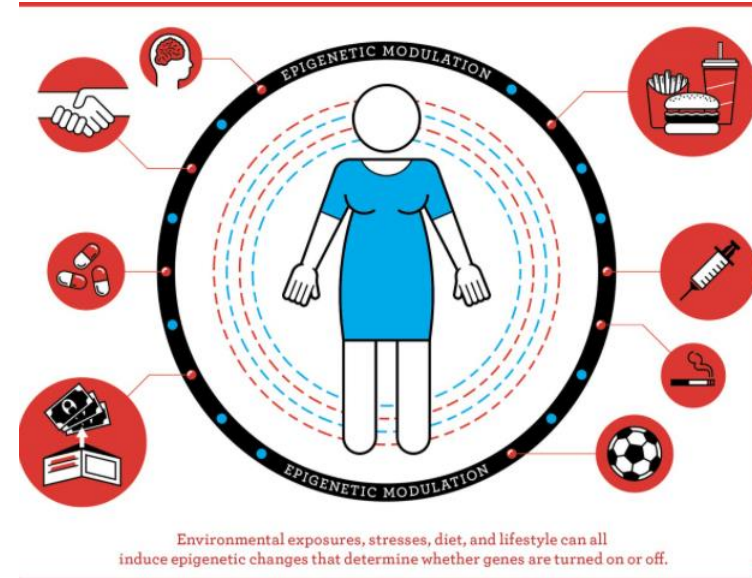
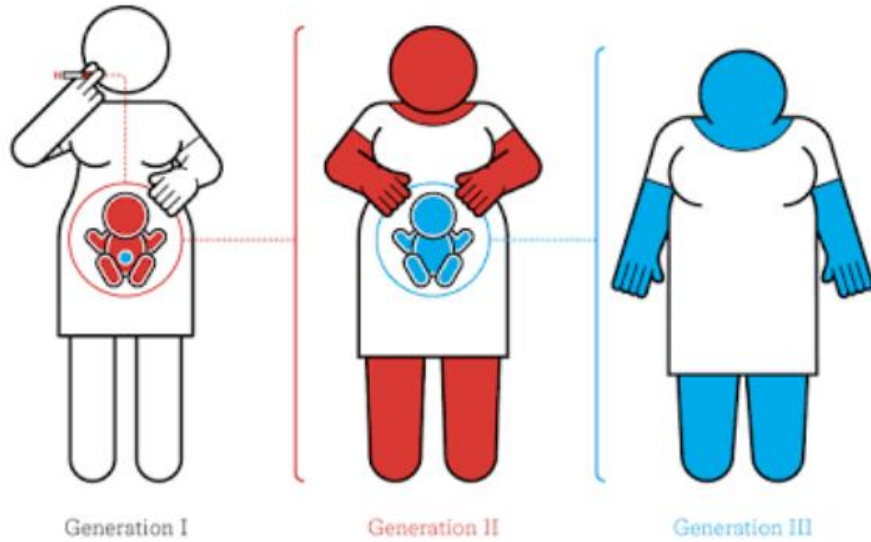
Yaş, yıl

Tütün dumanı, hava kirliliği maruziyetini
Solunum yolu enfeksiyonlarını
Preterm doğumları engellemek
Çocukta persistan astımı kontrol altında tutmak

Astımın tetikleyicileri: Mekanizma

Epigenetik mekanizmalar

- Epigenetik değişiklik : Stabil kalıtılan bir fenotip yaratan, DNA dizimini koruyan, kromozom değişikliği

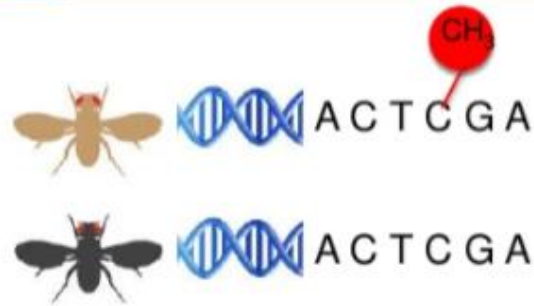


Çevre ve epigenetik mekanizmalar

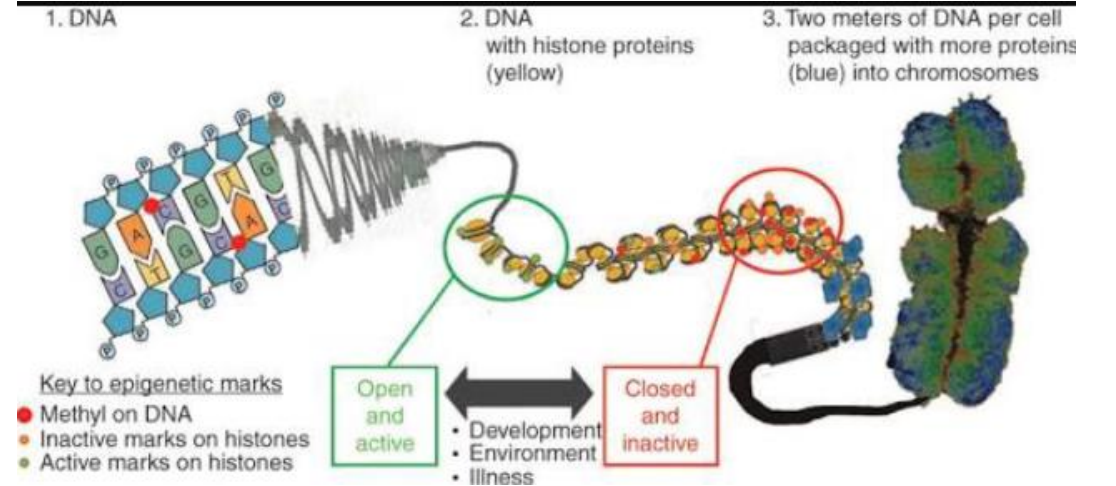
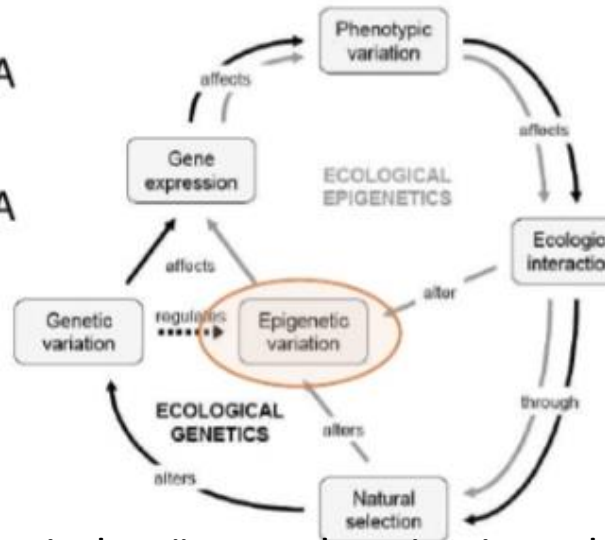
- Epigenetik mekanizmalar gen ekspresyonunu DNA dizisini bozmadan değiştirir.
- CpG adası gen promoterlarındaki sitozin hipermetile olduğunda gen susturulur.
- Hipometilasyonda aktif transkripsiyon başlar.

Epigenetik mekanizmalar

- DNA metilasyonu
- Histon modifikasyonu, histon varyantları,
- Nükleozom pozisyonlanması,
- Non-coding RNA
- RNA metilasyonu



Epigenetic mechanisms can alter gene expression and phenotypes without any change in the DNA sequence



DNA metilasyonu : Guaninden önce gelen sitozone 5.karbonuna metil takılması

Astım ve DNA metilasyonu

Alerjik sensitizasyon:

- T hücresi epigenomik regülasyonu,
- T helper hücre ayrışması
- Regulator T gelişmesi

Deneysel astım modelinde :

- Epigenetik remodeling , DNA metilasyonu, histon modifikasyonu
- T helper 2 polarizasyonu,
- İlgili sitokinler ve kemokinler

Hava Kirliliği





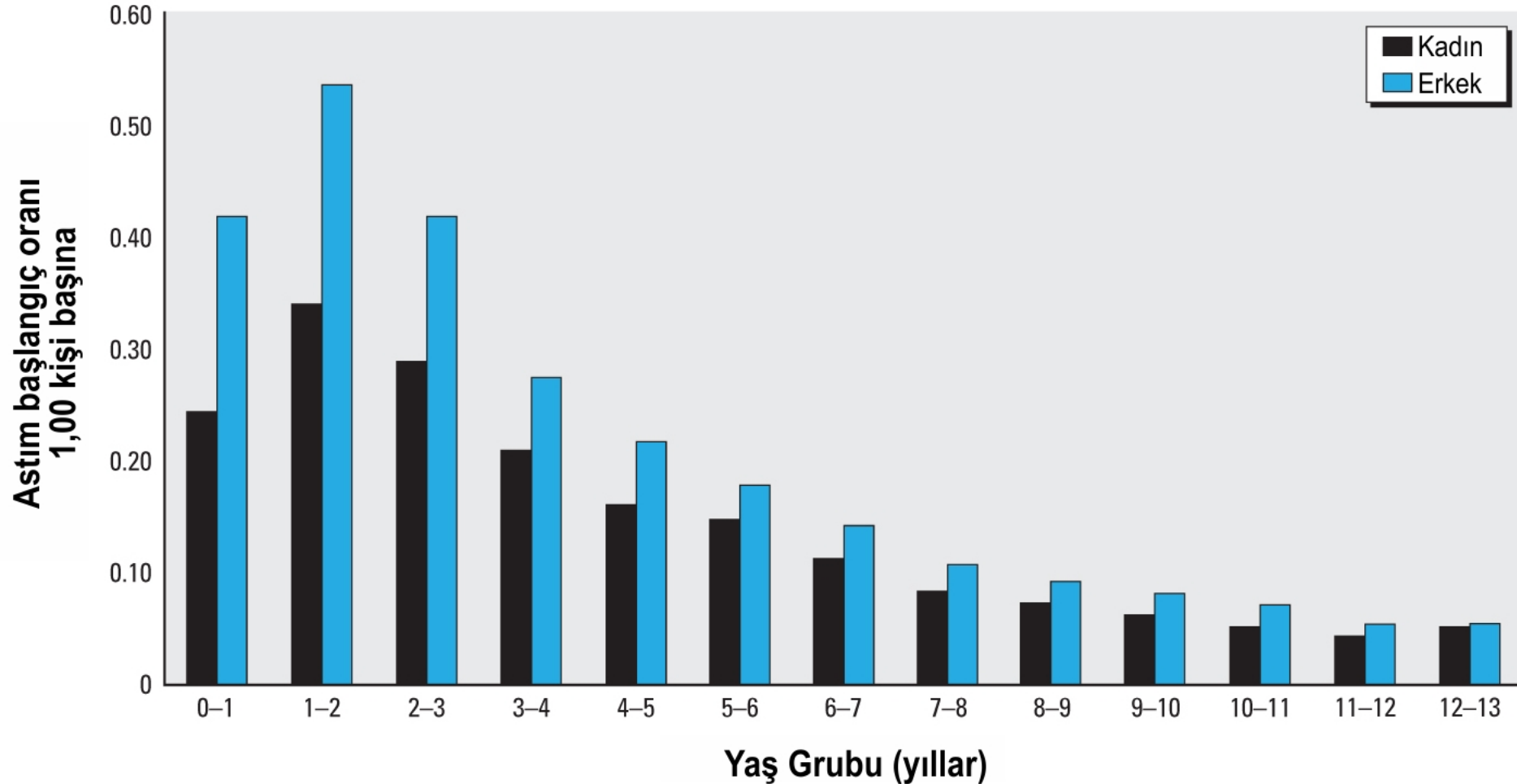
Ivana V. Yang, PhD,^{a,b,c} Catherine A. Lozupone, PhD,^a and David A. Schwartz, MD^{a,b,d} *Aurora and Denver, Colo*

- Partikül maddeler (PM) hem çevresel kirleticileri (PAH) hem polen, endotoksin ve fungal sporları taşır.
- Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) organik materyalin yarı yanması sonucunda oluşan toksik maddelerdir.
- PAH partiküllerinden fenantren ve dizel egzosu Ig E yapımını uyarır.
- Hava kirliliği periferik kan epigenomunu etkiler.
- Kısa ve uzun dönem PM maruziyeti DNA metilasyonu ile immunité (TLR4 and TLR2) ve astım genlerini etkiler (HLA-DOB, HLA-DPA1, CCL11, CD40LG, ECP, FCER1A, FCER1G, IL9, IL10, IL13, and MBP).

Çocukların hava kirliliği maruziyeti ve astım başlangıcı: Quebec kohort çalışması

Tétreault LF, Doucet M, et al.

Environ Health Perspect 2016, 124:1276–1282



Astım başlangıcı yaşam bölgesindeki PM2.5, O3, NO2 maruziyeti ile ilişkili bulundu.

1,183,865 çocuk

7,752,083 insan-yıl izlemi

162,752 astım tanısı

İkametgah bölgesine göre uydu hava partikül kayıtları (PM2.5) doğum yerine göre ozon (O3), nitrojen oksit tahmini (NO2) (Hazards ratio HR) Cox modeline göre

Table 5. Associations between asthma onset and time-varying air pollutant levels, per interquartile range increase in pollutant levels at the residential address.^a

Pollutant	Sample size	Interquartile range	Hazard ratios (95% CI)		
			Crude	Model 1 ^b	Model 2 ^c
NO ₂ ^d	216,746	5.27 ppb	1.10 (1.08–1.12)*	1.07 (1.05–1.09)*	1.04 (1.03–1.06)*
O ₃ ^e	829,277	3.26 ppb	1.10 (1.09–1.11)*	1.13 (1.11–1.14)*	1.07 (1.06–1.08)*
PM _{2.5} ^f	1,133,938	6.53 µg/m ³	1.31 (1.30–1.33)*	1.32 (1.31–1.33)*	1.33 (1.31–1.34)*

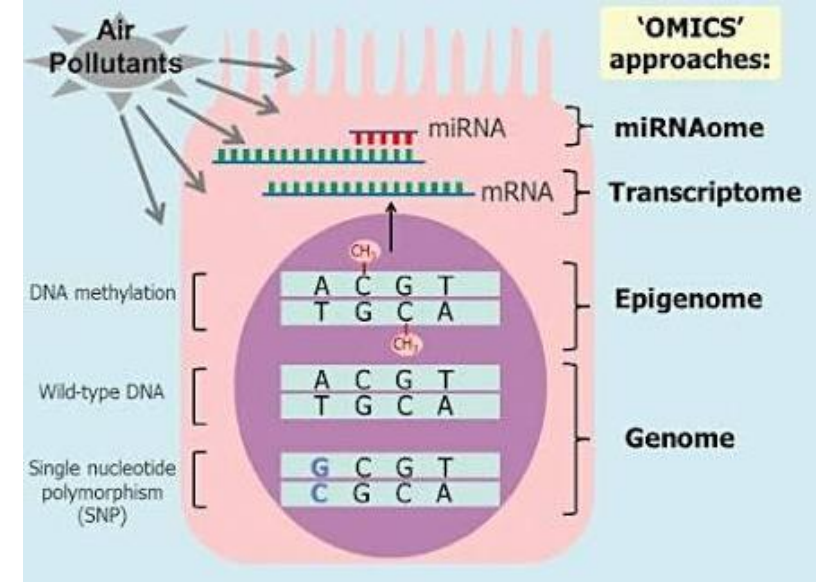
Prenatal NO₂ hava kirliliğine maruz kalan çocuklarda Epigenom Metilasyon Metaanalizi

Olena Gruzieva, Cheng-Jian Xu et al. *Environ Health Perspect* DOI: 10.1289/EHP36

- Hava kirliliği belirteci- NO₂
- Kord kanında epigenom boyu DNA metilasyonu araştırması
- 4 Avrupa ve Kuzey Amerika kentinde
- n=1,508 çocuk
- 4 (n=733) ve 8 (n=786) yaşlarda izlem
- candidate antioksidan ve antiinflamatuvar gen
- Kan hücrelerinde NO₂ maruziyetinde mRNA ekspresyonu 4 yaş (n=111) ve 16-yaşta (n=239).

Prenatal NO2 maruziyeti ile DNA metilasyonu ilişkili bulundu

3 CpG mitokondri ilişkili genlerde metilasyon
cg12283362 (*LONP1*),
cg24172570 (*HIBADH*),
cg08973675 (*SLC25A28*).



cg08973675 metilasyonu büyük çocuklarda devam ediyor.

Prenatal NO2 maruziyeti ile kordon kanı oksidatif stres gen metilasyonu

Chr	Position (build 37)	CpG	Mapped gene	Gene group	Coef	SE	P-value	Direction
11	34460856	cg03728580	<i>CAT</i> ^{FDR}	Body	0.003	0.001	0.00001	++++
11	34461028	cg17034036	<i>CAT</i> ^{FDR}	Body	0.002	0.001	0.0001	++++
2	1482597	cg01385533	<i>TPO</i> ^{FDR}	Body	-0.003	0.001	0.0004	-?--
1	226023590	cg05935800	<i>EPHX1</i>	Body	-0.002	0.001	0.002	----
20	33539306	cg13607138	<i>GSS</i>	Body	-0.003	0.001	0.003	--?-
8	107642385	cg17526936	<i>OXRI</i>	Body	-0.002	0.001	0.004	--?-
2	1544120	cg19407717	<i>TPO</i>	Body	-0.002	0.001	0.004	----
2	1479523	cg13703866	<i>TPO</i>	Body	-0.001	0.000	0.005	----
11	34460336	cg07768201	<i>CAT</i>	TSS200	0.003	0.001	0.006	++++
1	226012507	cg03337430	<i>EPHX1</i>	TSS1500;5'UTR	0.001	0.000	0.006	+--+

NO2 maruziyeti antioksidan savunma yolu genlerinin metilasyonu ile ilişkili bulundu

REVIEW

Open Access

Air pollution, epigenetics, and asthma

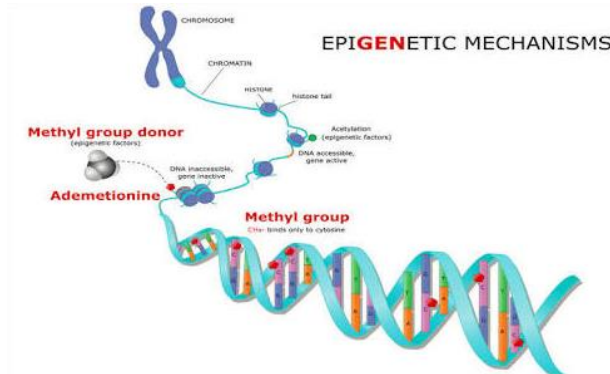
Hong Ji^{1,2}, Jocelyn M. Biagini Myers¹, Eric B. Brandt¹, Cole Brokamp³, Patrick H. Ryan³
and Gurjit K. Khurana Hershey^{1*}



Epigenom hava kirliliği ve astım arasında mekanizma köprüsüdür

Dizel eksoz tanecikleri ve alerjen maruziyeti farede astım ilişkili IL-4 geninde metilasyon yapar

Metilasyon düzeyleri serum IgE ile korelasyon gösterir.



Trafik ilişkili hava kirleticileri (TİHK)

Solunum fonksiyon bozukluęu
Astım atakları ve hastane yatışları



Doğum kohortları

- Doğumda yüksek oranda TİHK maruz kalan çocuklarda 7 yaşında 2 kat daha fazla persistan vizing
- TİHK maruziyetinden 3 yıl sonra astım gelişiyor.

Her 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ NO₂ artışı= FEV1'de 0.7 % düşme + solunum testinde % 7 bozulma

1.Bowatte G, et al. The influence of childhood traffic-related air pollution exposure on asthma, allergy and sensitization: a systematic review and a meta-analysis of birth cohort studies. Allergy. 2015;70(3):245–56.

Maternal , prenatal maruziyet

Maternal PAH maruziyeti

- kordon kanında Asetil CoA sentetaz geni metilasyonu(*ACSL3*)
- Kordon kanı beyaz kürelerinde *IFN- γ* promoter metilasyonu
- Yüksek astım riski
- Alerjik sensitizasyon, erken çocukluk vizingi

Prenatal TiHK maruziyeti

Otoyola yakın yaşayan annelerin bebeklerinde astım riski yüksek

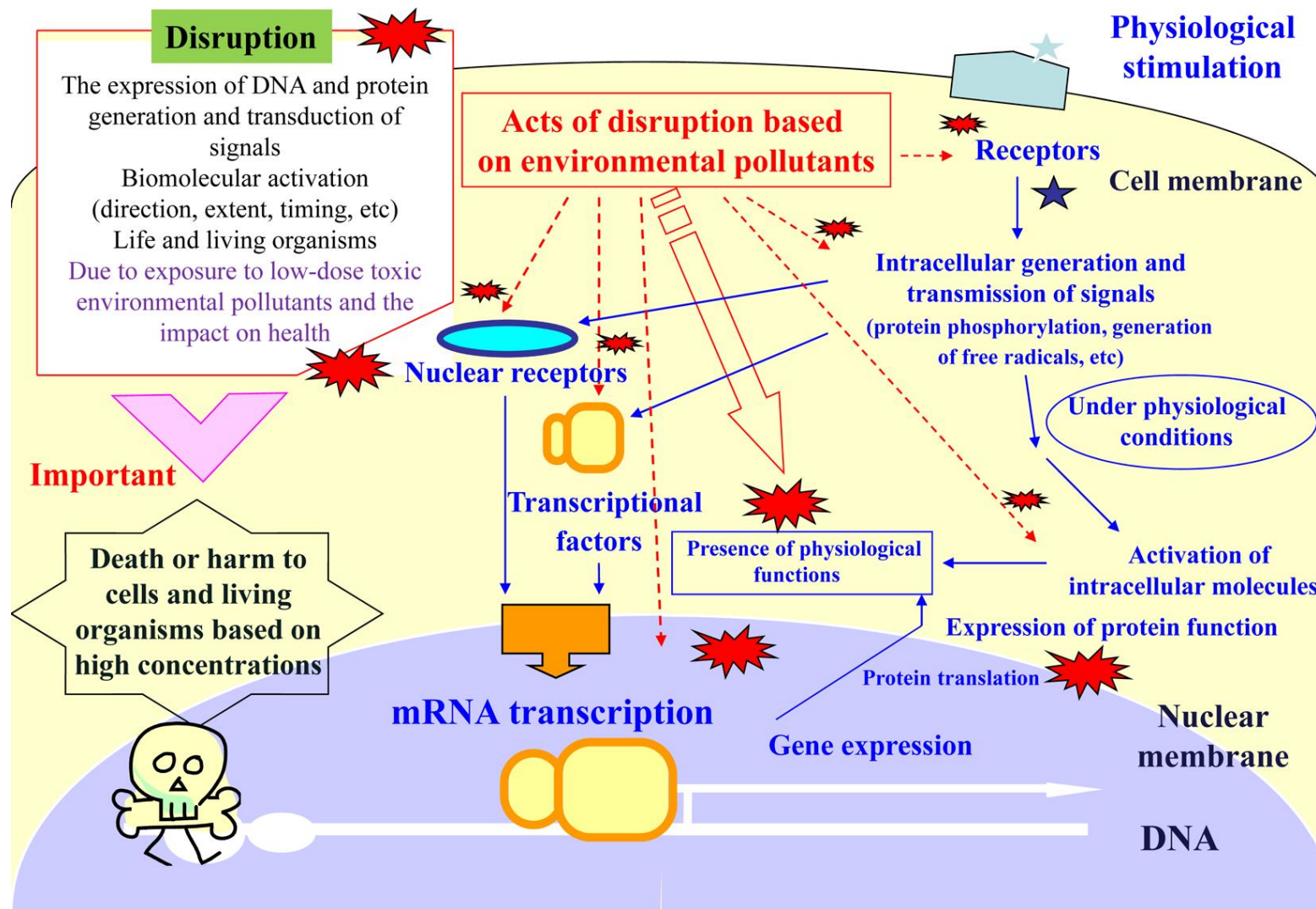



Fig. 1. The disruption of life and living organisms due to environmental pollutants.

Nanoparticles increase human bronchial epithelial cell susceptibility to respiratory syncytial virus infection via nerve growth factor-induced autophagy

Sreeparna Chakraborty¹, Vincent Castranova², Miriam K. Perez³ & Giovanni Piedimonte³ 

¹ Department of Pediatrics, West Virginia University School of Medicine, Morgantown, West Virginia

² Department of Pharmaceutical Science, West Virginia University School of Pharmacy, Morgantown, West Virginia

³ Pediatric Institute and Children's Hospital, The Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio

Physiol Rep, 5 (13), 2017, e13344,
<https://doi.org/10.14814/phy2.13344>

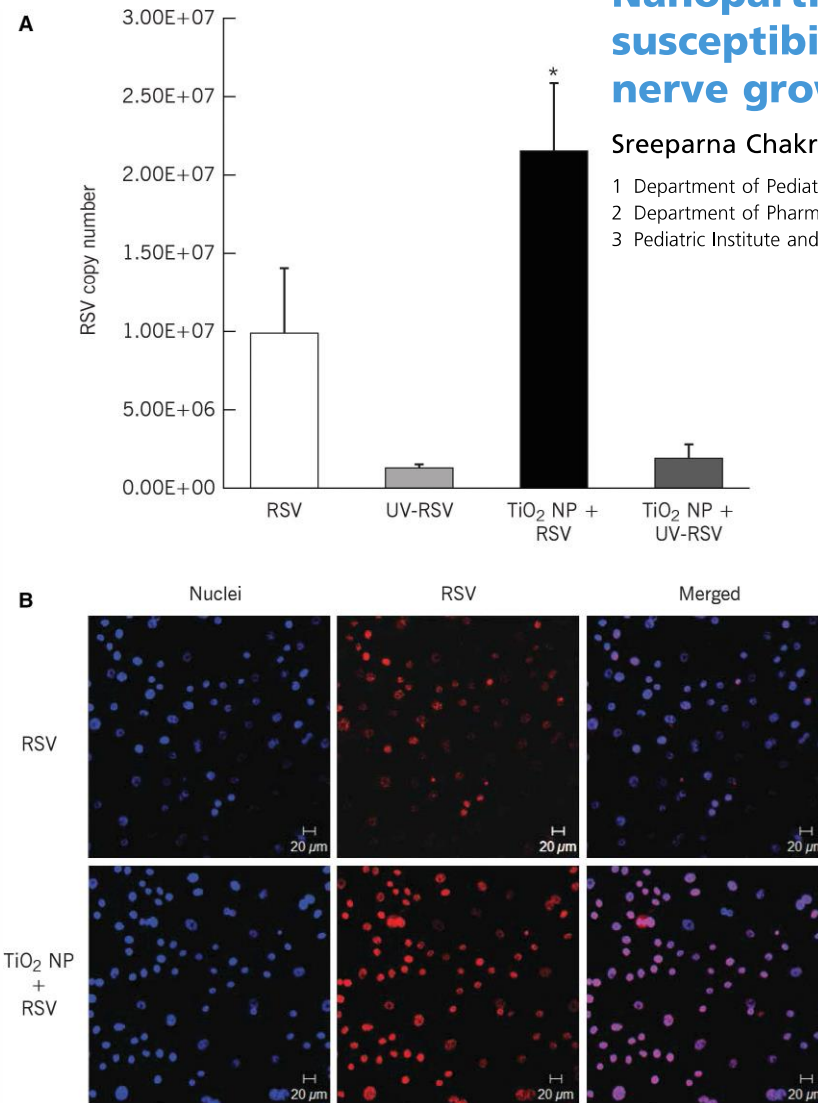
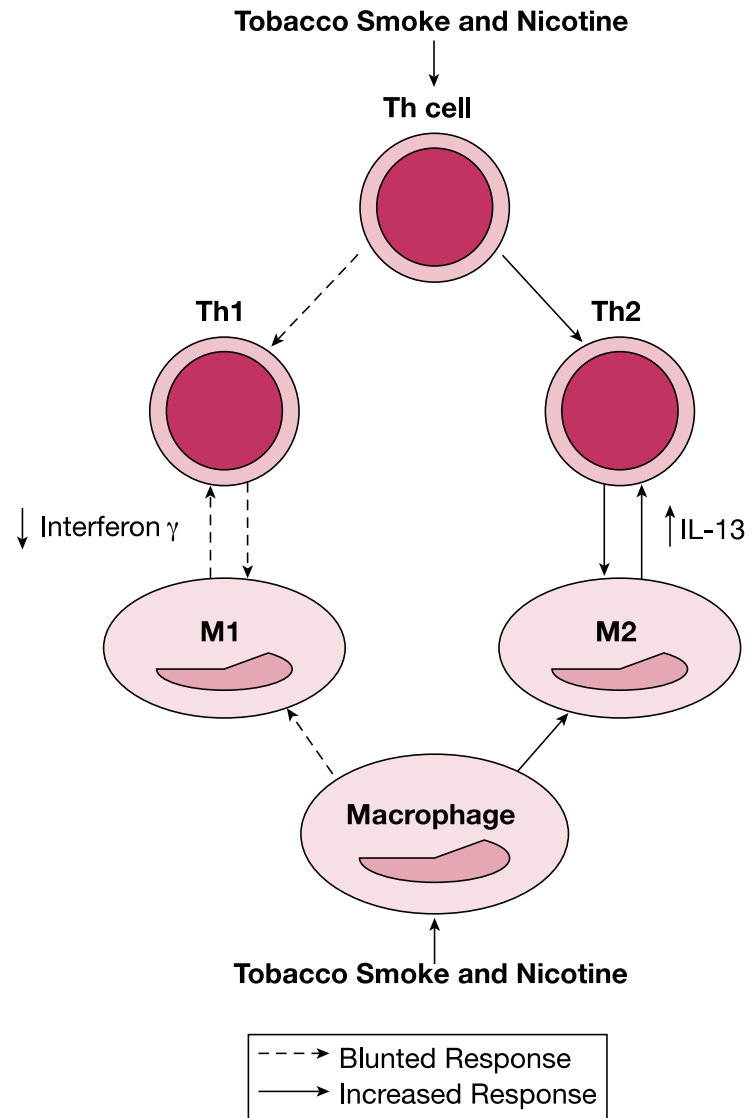


Figure 1. Titanium dioxide nanoparticle pre-exposure increases susceptibility to RSV infection in bronchial cells. (A) Bronchial cells were treated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of $\text{TiO}_2\text{-NP}$ for 24 h and then infected with RFP-expressing RSV (rrRSV) at 0.5 multiplicity of infection (MOI) for 24 h. Real-time PCR analysis showed increased rrRSV copy number in nanoparticle-treated bronchial cells. Data are expressed as mean \pm SD ($n = 5$ experiments). * $P < 0.05$ compared to nonexposed rrRSV-infected cells. (B) Cells grown on coverslips were treated as above and analyzed by confocal microscopy for rrRSV infection. $\text{TiO}_2\text{-NP}$ pre-exposed bronchial cells showed increased red fluorescent protein expression.



The independent role of prenatal and postnatal exposure to active and passive smoking on the development of early wheeze in children

C.I. Vardavas^{1,2}, C. Hohmann^{3,4}, E. Patelarou^{1,5}, D. Martinez^{6,7,8},
A.J. Henderson⁹, R. Granell⁹, J. Sunyer^{6,7,8,10}, M. Torrent^{6,11}, M.P. Fantini¹²,
D. Gori¹², I. Annesi-Maesano^{13,14}, R. Slama¹⁵, L. Duijts^{16,17,18}, J.C. de Jongste¹⁶,
J.J. Aurrekoetxea^{19,20,21}, M. Basterrechea^{7,20,21}, E. Morales^{6,7,22},
F. Ballester^{7,23}, M. Murcia^{7,23}, C. Thijs²⁴, M. Mommers²⁴, C.E. Kuehni²⁵,
E.A. Gaillard²⁶, C. Tischer²⁷, J. Heinrich^{27,28}, C. Pizzi²⁹, D. Zugna²⁹,
U. Gehring³⁰, A. Wijga³¹, L. Chatzi¹, M. Vassilaki¹, A. Bergström³², E. Eller³³,
S. Lau³⁴, T. Keil^{3,35}, M. Nieuwenhuijsen^{6,7,8} and M. Kogevinas^{6,7,8,10}

**Hamilelikte pasif tütün dumanı maruziyeti bebekte
2 yaşına kadar astım için bağımsız risk faktörüdür.**

Eur Respir J 2016; 48: 115–124
| DOI: 10.1183/13993003.01016-2015

Maternal aktif sigara içimi ile 2 yaşında vizing riski

- Prenatal maternal aktif + pasif sigara içimi
OR 1.51
- Prenatal aktif + postnatal pasif
OR 1.74
- Prenatal aktif+pasif + postnatal pasif
OR 1.73

Ailede atopi öyküsü ile artan vizing riski

- Ailede alerji öyküsü var + prenatal aktif sigara içimi -OR 2.25
- Ailede alerji öyküsü yok+ prenatal aktif sigara içimi -OR 1.28
p =0.011

Maternal pasif sigara dumanı maruziyeti 2 yaşındaki çocukta vizing için bağımsız risk faktörüdür.

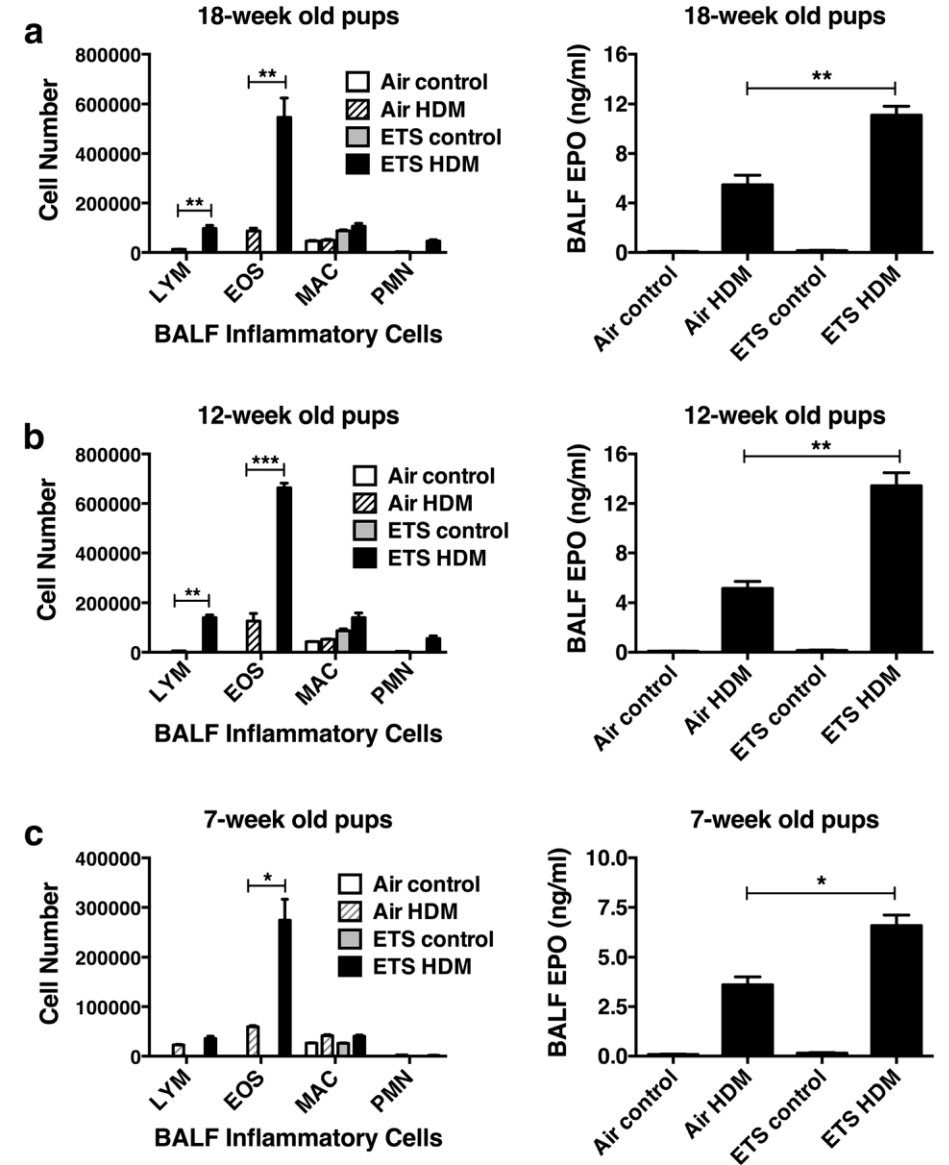
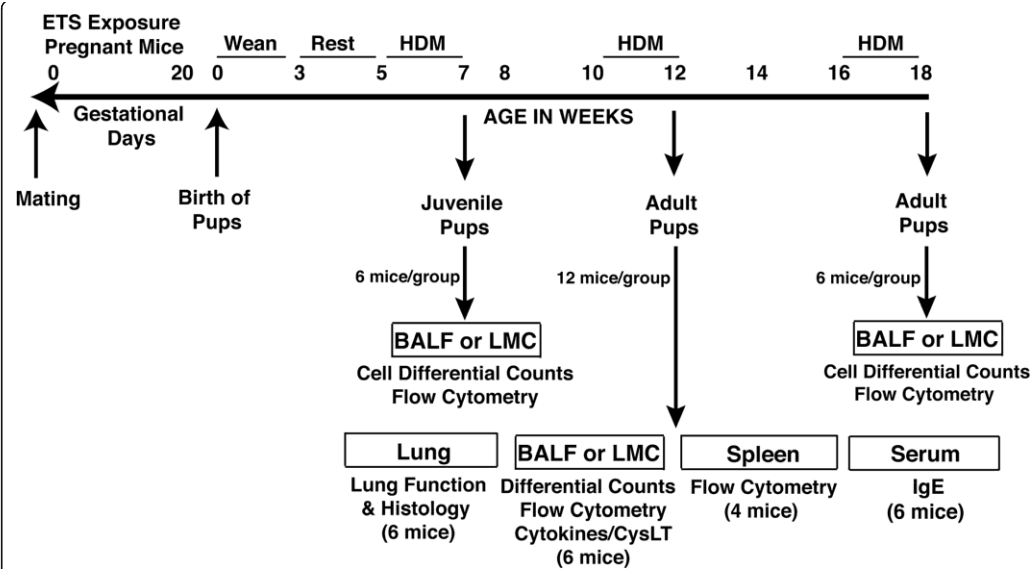
RESEARCH

Open Access



Prenatal tobacco smoke exposure predisposes offspring mice to exacerbated allergic airway inflammation associated with altered innate effector function

Maria Ferrini¹, Sophia Carvalho¹, Yoon Hee Cho¹, Britten Postma¹, Lucas Miranda Marques¹, Kent Pinkerton², Kevan Roberts^{1*†} and Zeina Jaffar^{1*†}



Nikotin ve tütün dumanının gelişme sırasında gen ekspresyonuna etkisi

Changes in Gene or Receptor Expression	Effects of Tobacco Smoke and Nicotine Exposure
↓ N-myc expression	Nicotine caused fibroblast differentiation in nonhuman embryonic stem cells
↑ $\alpha 7$ nAChRs	Prenatal nicotine exposure caused ↑ $\alpha 7$ nAChRs in airway, cartilage, and vessels in rhesus monkeys
↓ Interferon- γ ↓ Tbet ↑ Th2 signaling pathway (GATA3/Lck/Erk/STAT6)	Prenatal smoke exposure caused Th1 and Th2 changes in mice after <i>Aspergillus</i> sensitization
↑ Connective tissue growth factor	↑ lung fibrosis in rats exposed to prenatal or postnatal nicotine and hyperoxia
↓ Interferon-inducible GTPases and genes activated by viral double-stranded RNA	↓ expression of innate immunity response genes in neonatal mouse lung exposed to postnatal tobacco smoke

Sigara içme ve kord kanı çalışmaları

Immun modülasyon ve detoksifikasyon gen metilasyonu

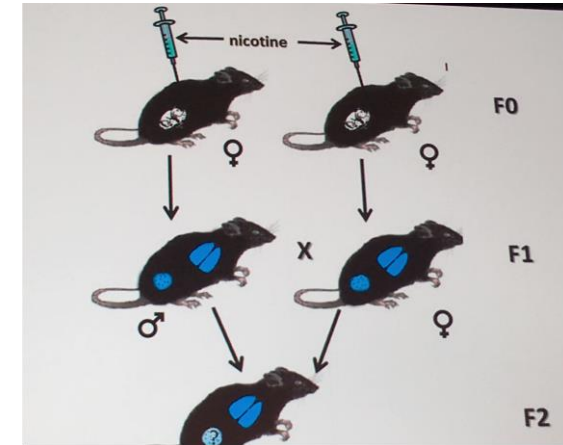
- CYP1A1,
 - GF1,
 - FOXP3,
 - AHRR,
-
- SuterM,AbramoviciA,ShowalterL,etal. Metabolism. 2010;59(10):1481-1490.
 - Hinz D, Bauer M, Roder S, et al. Allergy. 2012;67(3):380-389.
 - JoubertBR,HabergSE,NilsenRM,etal. Environ Health Perspect. 2012;120(10):1425-1431.

RESEARCH ARTICLE

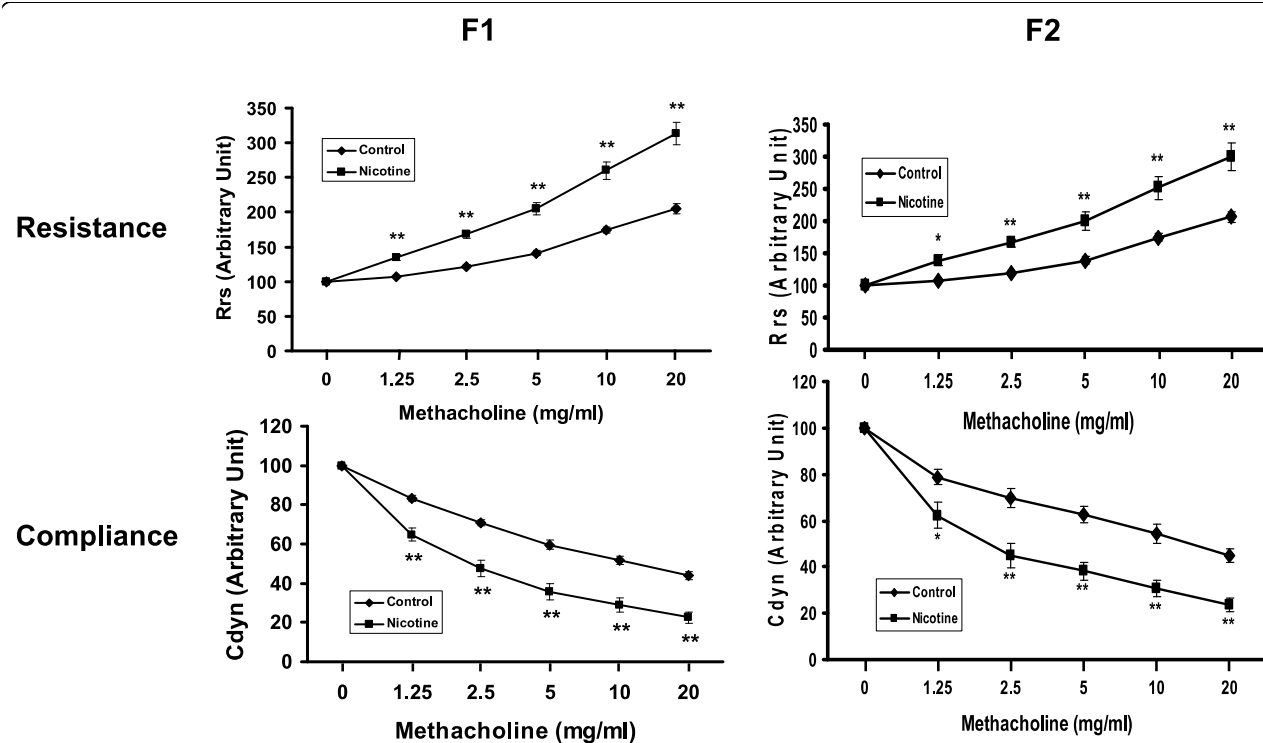
Open Access

Perinatal nicotine exposure induces asthma in second generation offspring

Virender K Rehan^{1*}, Jie Liu¹, Erum Naeem¹, Jia Tian¹, Reiko Sakurai¹, Kenny Kwong¹, Omid Akbari² and John S Torday¹



Hamilelikte maruz kalınan nikotinin etkileri Epigenetik mekanizmalarla ikinci nesilde de izlenmektedir



Büyükannenin sigara içimi ve torunda astım

Yazar	N	Ölçüm	Çocuk astım riski
2005 Li et al	691	Retrospektif	Anne içici OR 2.6, anne içici değil OR 1.8
2014 Miller et al	6881	Retrospektif	Maternal kalıtımda ilişki yok
2015 Magnus et al	5618236 haftalık, 26659 7 yaş	Retrospektif	36 ayda RR 1.15 7 yaşta RR 1.21

Grandmaternal smoking increases asthma risk in grandchildren: a nationwide Swedish cohort

C J Lodge, L Bråbäck, A J Lowe, S C Dharmage, D Olsson, B Forsberg DOI: 10.1111/cea.13031

- İsveç sağlık kayıt sisteminden üç nesil verileri sağlanmış.
- Hamilelikte sigara içme bilgisi 1982 yılından itibaren kayıt edilmiş.
- 2013 yılı öncesi doğan çocuklar çalışmaya alınmış.
- Ebeveynlerden biri 1982-1986 yıllarında doğmuş olma koşulu var.
- 10 734 çocuk 6 yaşına kadar izlenmiş.



Büyük annenin sigara içmesi ve torunda astım fenotipi (Kaba OR) (N=10 734)

	Erken geçisi	Erken persistan	Geç başlangıç
	496	1093	442
Babaanne	1.14(0.95-1.37)	0.96 (0.84-1.09)	0.91 (0.74-1.10)
Anneanne	1.02 (0.85-1.23)	1.27 (1.12-1.45)	0.99 (0.81-1.21)
Anne	1.31 (1.04-1.65)	1.12 (0.94-1.32)	1.06 (0.81-1.38)

6 yaşında astım ilacı kullanma ile büyükanne sigara içmesi

	1-9 sigara/gün	> 9 sigara/gün	N=12078
Babaanne	0.97 (0.81-1.15)	0.85(0.69-1.04)	
Anneanne	1.15 (0.97-1.37)	1.21 (1.00-1.47)	
Anne	1.01 (0.82-1.24)	1.01 (0.66-1.54)	

Sonuç

- **Torunda astım gelişmesinde babaannenın içtiği sigaradan çok , anneannenın içtiği önemlidir.**
- Anne ve babaanne sigara içmediği halde anneannenın sigara içmesi torunda erken persistan astım gelişmesinde risk faktörüdür. (OR 1.38, 1.15-1.65)
- **Anneannenın sigara içmesi torun astımı için risktir.**
- **Babanın anne karnında nikotine maruz kalması çocuğuna aktardığı bir etkilenme değildir.**

DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis

Bonnie R. Joubert,^{1,58} Janine F. Felix,^{2,3,4,58} Paul Yousefi,^{5,58} Kelly M. Bakulski,^{6,58} Allan C. Just,^{7,58} Carrie Breton,^{8,58} Sarah E. Reese,^{1,58} Christina A. Markunas,^{1,9,58} Rebecca C. Richmond,^{10,58} Cheng-Jian Xu,^{11,12,13,58} Leanne K. Küpers,^{14,58} Sam S. Oh,^{15,58} Cathrine Hoyo,^{16,58} Olena Gruzieva,^{17,58} Cilla Söderhäll,^{18,58} Lucas A. Salas,^{19,20,21,58} Nour Baiz,^{22,58} Hongmei Zhang,^{23,58} Johanna Lepeule,²⁴ Carlos Ruiz,^{19,20,21} Symen Ligthart,² Tianyuan Wang,¹ Jack A. Taylor,¹ Liesbeth Duijts,^{2,4,25,26} Gemma C. Sharp,¹⁰ Soesma A. Jankipersadsing,^{11,12} Roy M. Nilsen,²⁷ Ahmad Vaez,^{14,28} M. Daniele Fallin,⁶ Donglei Hu,¹⁵ Augusto A. Litonjua,²⁹ Bernard F. Fuemmeler,³⁰ Karen Huen,⁵ Juha Kere,¹⁸ Inger Kull,¹⁷ Monica Cheng Munthe-Kaas,³¹ Ulrike Gehring,³² Mariona Bustamante,^{19,20,21,33} Marie José Saurel-Coubizolles,³⁴ Bilal M. Quraishi,²³ Jie Ren,⁸ Jörg Tost,³⁵ Juan R. Gonzalez,^{19,20,21} Marjolein J. Peters,³⁶ Siri E. Håberg,³⁷ Zongli Xu,¹ Joyce B. van Meurs,³⁶ Tom R. Gaunt,¹⁰ Marjan Kerkhof,¹³ Eva Corpeleijn,¹⁴ Andrew P. Feinberg,³⁸ Celeste Eng,¹⁵

- 450,000 CpG bölge taraması
- Annenin sigara içmesine ilişkin 6,000 CpGs metilasyonu
- 2017 gende yeni 2,965 CpGs bölgesi tanımlanması
- Bazı genler annenin sigara içmesi ve astım, damak yarığı ile ilişkili

Hamilelikte sigara içilmesine bağlı çocuklarda uzun süre devam eden metilasyon bölgeleri saptanmıştır.

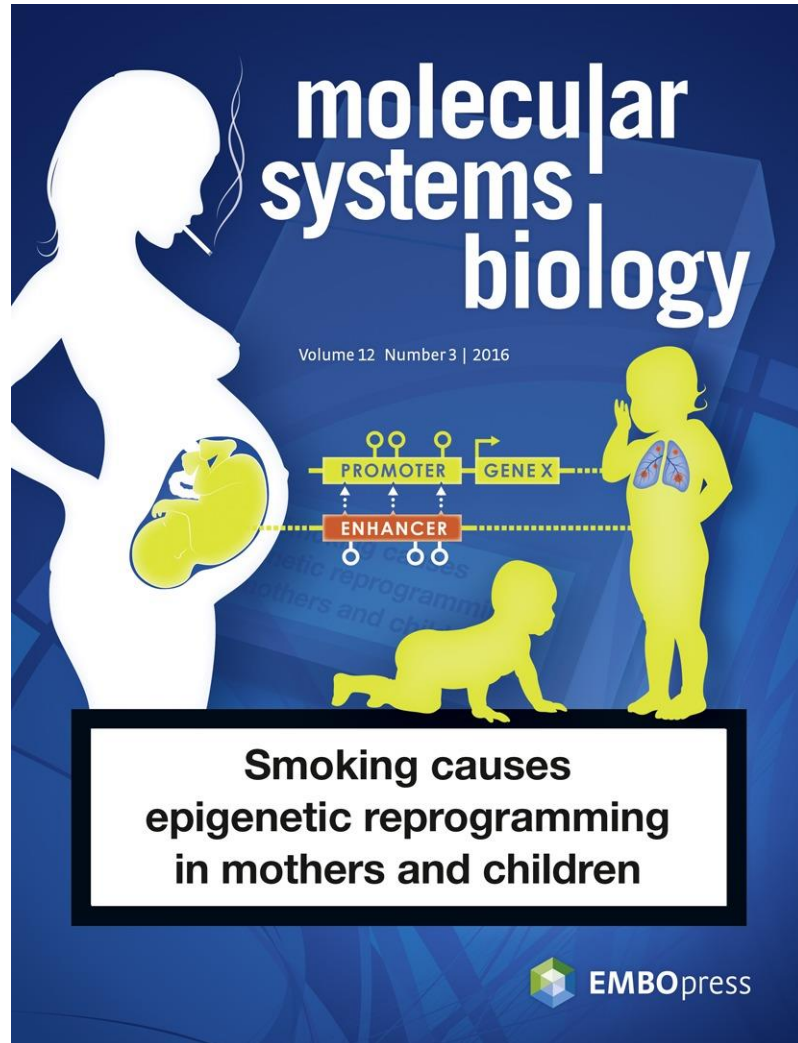
Annenin sigara içmesinin epigenetik etkilerini araştıran “hamilelik ve çocuk epigenetik konsorsuyumu

Pregnancy And Childhood Epigenetics (PACE)

- 6685 çocuğu kapsayan 13 kohort çalışmanın metaanalizini yaptı.

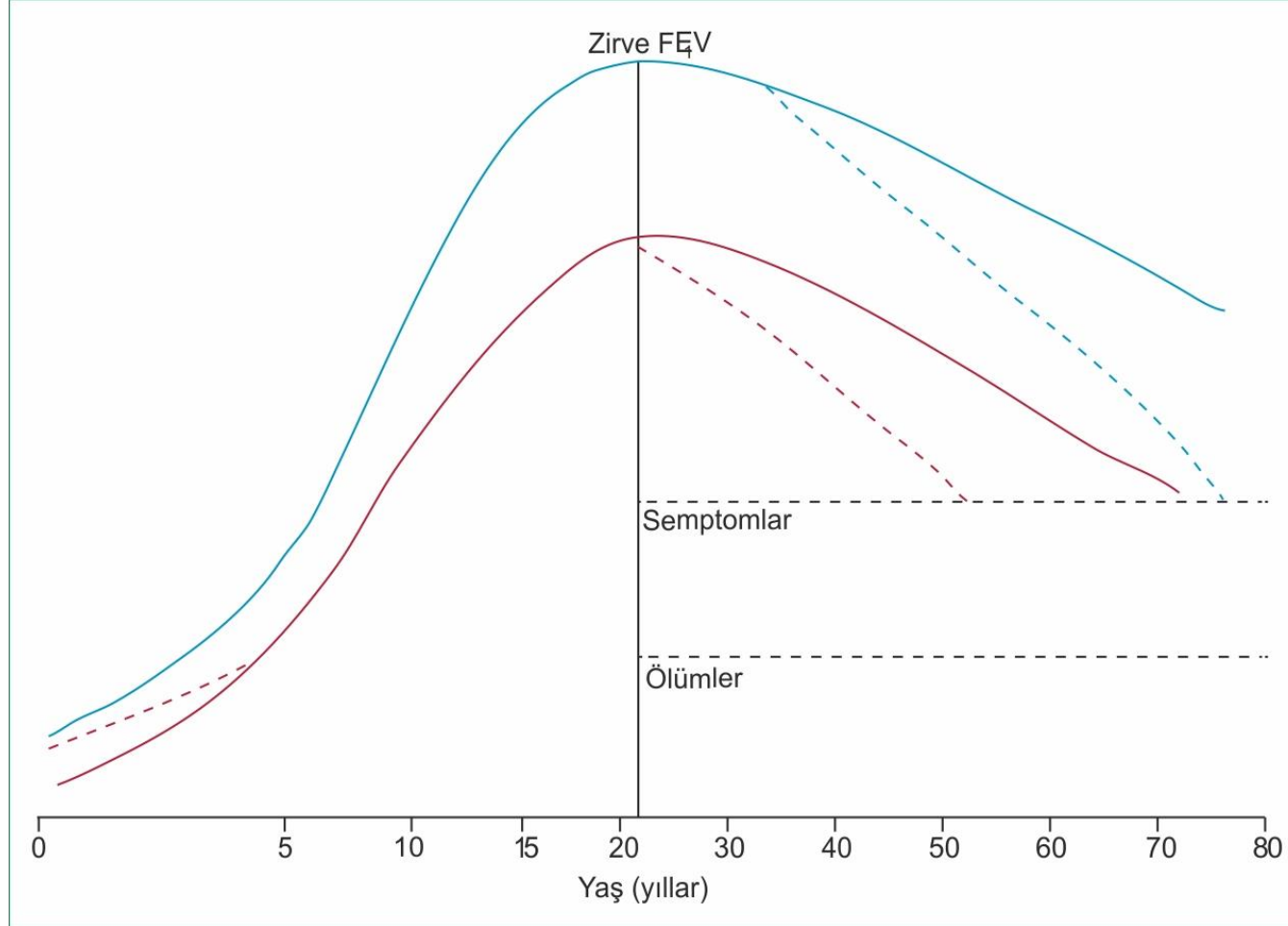
Environment-induced epigenetic reprogramming in genomic regulatory elements in smoking mothers and their children

Tobias Bauer , Saskia Trump et al. Mol Syst Biol. (2016) 12: 861



Tüm genom bilsülfid sekansı annenin sigara içmesi ile uzun yıllar devam eden DNA metilasyonu saptandı

Erken bebeklikteki solunum işlevi erişkin hastalığı belirler



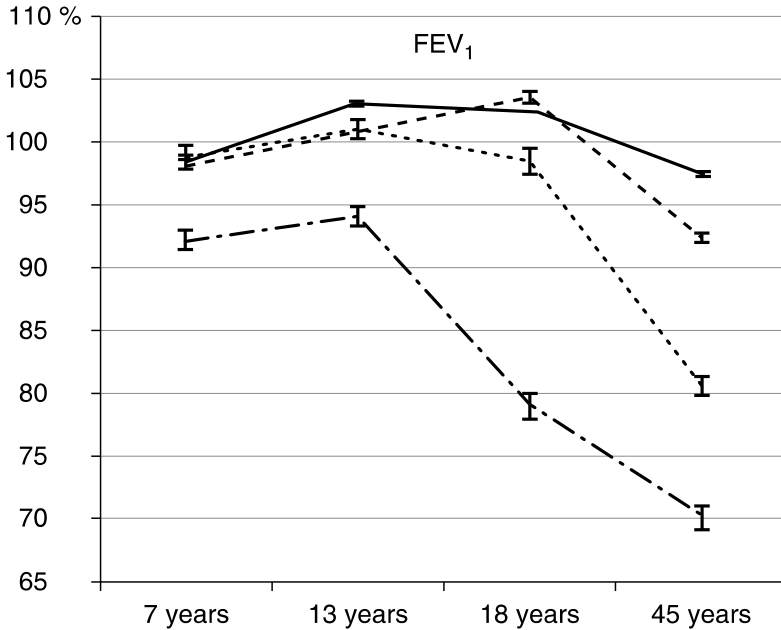
Childhood Lung Function Predicts Adult Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Asthma–Chronic Obstructive Pulmonary Disease Overlap Syndrome

Dinh S. Bui¹, John A. Burgess¹, Adrian J. Lowe¹, Jennifer L. Perret¹, Caroline J. Lodge¹, Minh Bui¹, Stephen Morrison², Bruce R. Thompson³, Paul S. Thomas⁴, Graham G. Giles⁵, Judith Garcia-Aymerich^{6,7,8}, Debbie Jarvis^{9,10}, Michael J. Abramson¹¹, E. Haydn Walters^{1,12}, Melanie C. Matheson^{1*}, and Shyamali C. Dharmage^{1*}

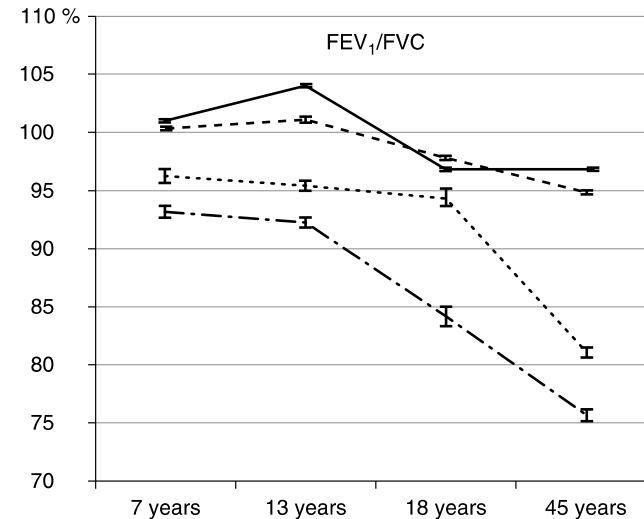
¹Allergy and Lung Health Unit, Centre for Epidemiology and Biostatistics, The University of Melbourne, Melbourne, Victoria, Australia; ²University of Queensland, Brisbane, Queensland, Australia; ³Department of Allergy, Immunology, and Respiratory Medicine, The Alfred Hospital, Melbourne, Victoria, Australia; ⁴University of New South Wales, Sydney, New South Wales, Australia; ⁵Cancer Epidemiology Centre, Cancer Council Victoria, Melbourne, Victoria, Australia; ⁶ISGlobal, Centre for Research in Environmental Epidemiology, Barcelona, Spain; ⁷Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain; ⁸Centros de Investigación Biomédica en Red Epidemiología y Salud Pública, Barcelona, Spain; ⁹Department of Epidemiology and Biostatistics, MRC-PHE Centre for Environment and Health, School of Public Health, Imperial College London, London, United Kingdom; ¹⁰Respiratory Epidemiology and Public Health Group, National Heart and Lung Institute, Imperial College London, London, United Kingdom; ¹¹School of Public Health and Preventive Medicine, Monash University, Melbourne, Victoria, Australia; and ¹²School of Medicine, University of Tasmania, Hobart, Tasmania, Australia

8,583 Tasmanya’lı 7 yaş
1,389 - 1968 den itibaren 45 yıl izlem
Solunum testi en düşük % 25 de olanlar
KOAH ve AKOS riski yüksek

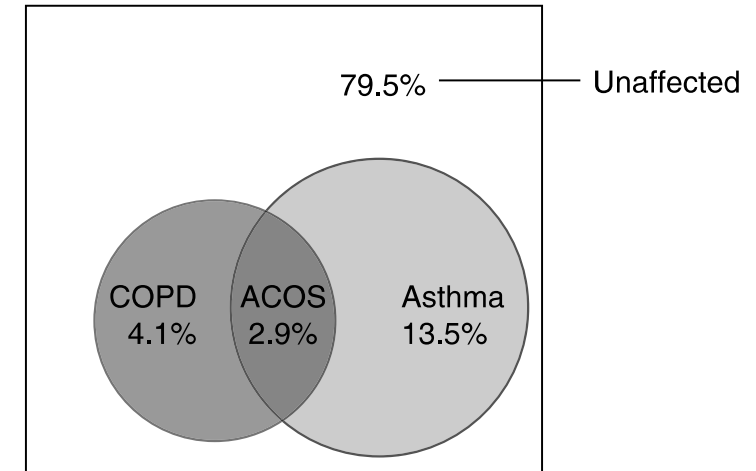
Çocukların solunum fonksiyon testleri yakın izlenmeli



— Unaffected
- - - Asthma alone
... COPD alone
- · - ACOS

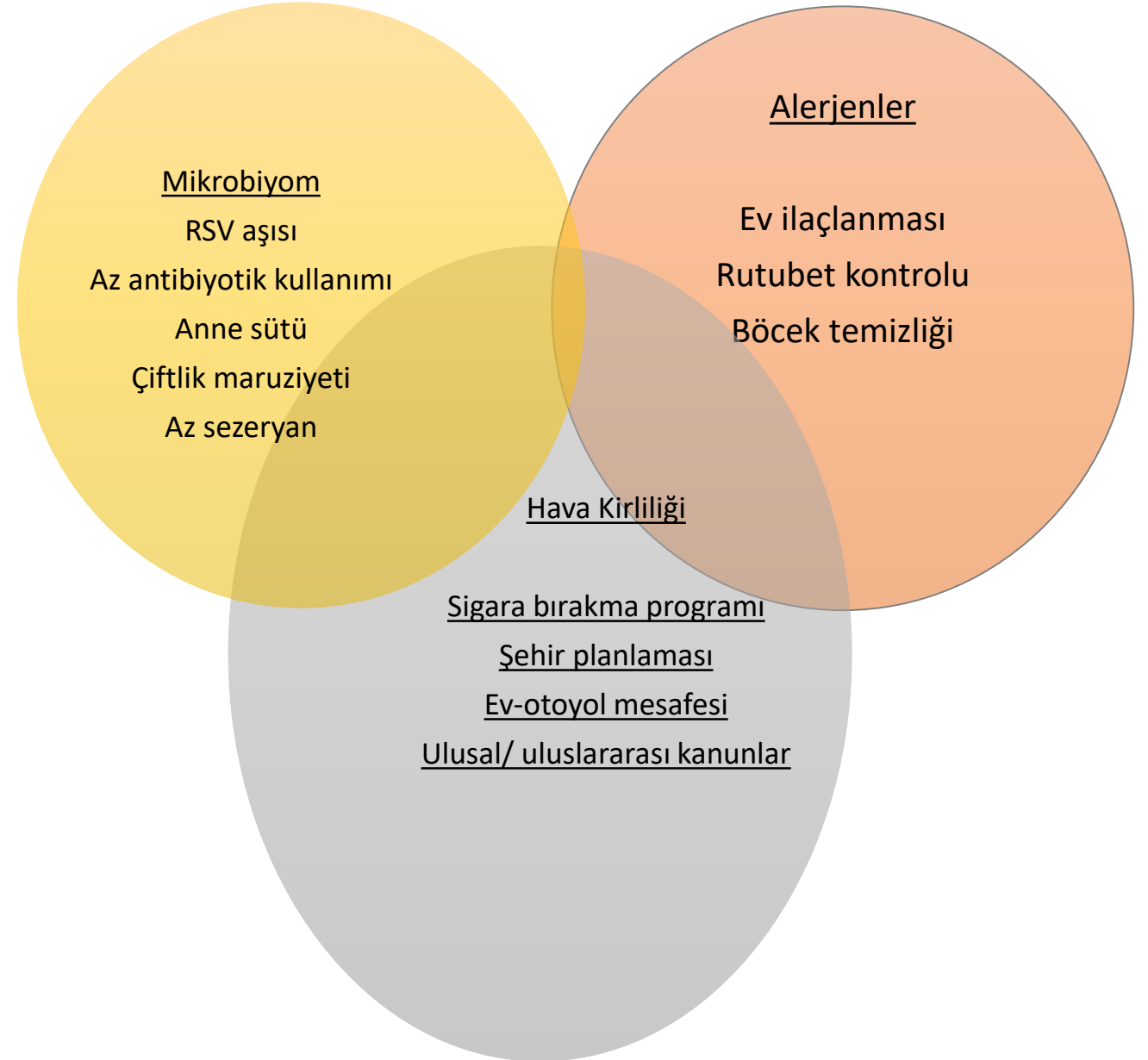
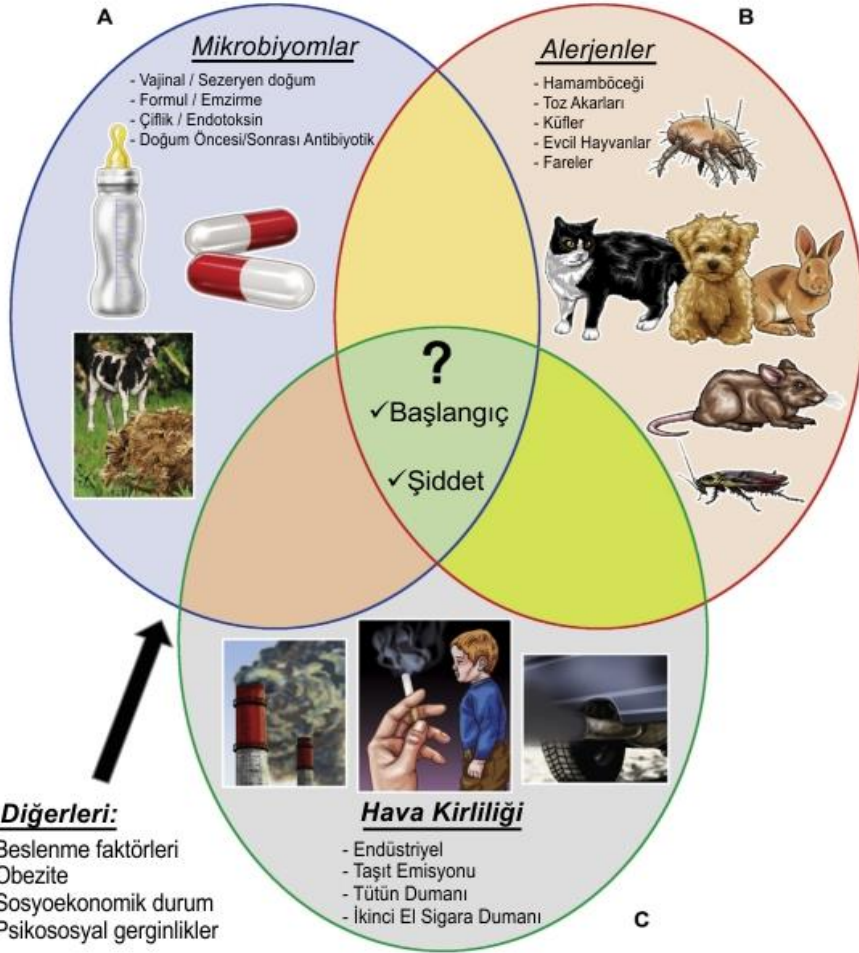


— Unaffected
- - - Asthma alone
... COPD alone
- · - ACOS



Çözüm Önerileri

Atopi gelişimini etkileyecek maruziyetler



Ne yapmalıyız ?

- Tütün dumanı, hava kirliliği maruziyetini ,
- Solunum yolu enfeksiyonlarını,
- Preterm doğumları engellemek
- Çocukta persistan astımı kontrol altında tutmak

A serene landscape featuring a body of water in the foreground, a cloudy sky, and a small cluster of trees on the horizon. The text is overlaid on a dark rectangular background in the center of the image.

GOD GRANT ME
THE **SERENITY**
TO ACCEPT
THE THINGS
I CANT CHANGE
COURAGE
TO CHANGE
THE THINGS I CAN
AND **WISDOM**
TO KNOW
THE DIFFERENCE