

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

TROMBOSİT AKTİVASYONUNUN DÜZENLENMESİNDE
MRP-1'İN FONKSİYONUNUN HASTALIKLARLA OLAN
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI.

ÇİĞDEM BAYRAM GÜREL

DANIŞMAN
PROF. DR. GÖNÜL KANIGÜR

TIBBİ BİYOLOJİ A.D,
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2009

(BU SAYFA BOŞ BIRAKILMIŞTIR)

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**TROMBOSİT AKTİVASYONUNUN DÜZENLENMESİNDE
MRP-1'İN FONKSİYONUNUN HASTALIKLARLA OLAN
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI.**

ÇİĞDEM BAYRAM GÜREL

**DANIŞMAN
PROF. DR. GÖNÜL KANIGÜR**

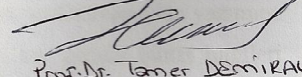
**TIBBİ BİYOLOJİ A.D.
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2009

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

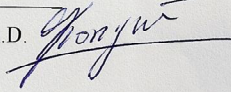
23 / 09 / 2009

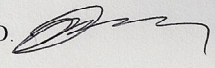

Prof. Dr. Tamer DEMİRALP
Enstitü Müdürü (vekil)

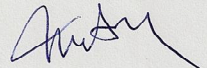
Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Doktora
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Çiğdem Bayram Gürel
Tez Başlığı : Trombosit Aktivasyonunun Düzenlenmesinde MRP-1'in Fonksiyonunun Hastalıklarla Olan İlişkisinin Araştırılması
Sınav Yeri : Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 18 / 09 / 2009

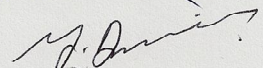
Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Gönül Kamgür I.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D. 

2. Prof. Dr. Bülent Tutluoğlu I.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları A.D. 

3. Prof. Dr. Tuncay Altuğ Bilim Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D. 

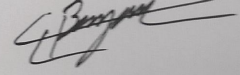
4. Doç. Dr. Yıldız Dinçer I.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya A.D. 

5. Doç. Dr. İlhan Onaran I.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D. 

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu; tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını; bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi; bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı; yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Çiğdem Bayram Gürel(İmza)



İTHAF

Canım kızım ve sevgili eşime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmama verdiği destek ve izinden dolayı, Tıbbi Biyoloji A.D. Başkanı Prof. Dr. Turgut Ulutin'e;

Tezimin planlanma ve yürütme aşamalarında bilgi ve tecrübelerini paylaşarak verdiği destek, gösterdiği ilgi ve yakınlıktan dolayı, tez danışmanım Prof.Dr. Gönül Kanıgür'e;

Tezimin her aşamasında özellikle labaratuvar çalışmalarında başını ağrıttığım ve bana ağabeylik yaparak yol gösteren Tıbbi Biyoloji A.D. Öğretim Üyesi Doç.Dr. İlhan Onaran'a;

Verdikleri teknik destek ile laboratuvarlarını çalışmamıza açan DETAE Genetik A.D. ve İmmünoloji A.D. Öğretim üyeleri Prof.Dr. Uğur Özbek ve Prof.Dr. Günnur Deniz'e;

Tezimin laboratuvar çalışmasının önemli bir bölümünde verdikleri teknik destek, sınırsız bilgi ve deneyim paylaşımıyla desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım DETAE Genetik A.D. mensubu Dr.Müge Sayitoğlu ve İmmünoloji A.D. mensubu Dr. Suzan Çınar'a;

Çalışmamıza engin bilgi ve deneyimleriyle klinik destek sağlayan İ.Ü. C.T.F. Göğüs Hastalıkları A.D. Öğretim Üyesi Prof.Dr. Bülent Tutluoğlu'na;

Çalışmamızın verilerinin istatistiksel değerlendirilmesinde katkı ve desteğini esirgemeyen İ.Ü. C.T.F. Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi A.D. Öğretim Üyesi Prof.Dr. Ahmet Dirican'a;

Çalışmamızı başından itibaren destekleyen ve ilgisini esirgemeyen İ.Ü. C.T.F. Biyokimya A.D. Öğretim Üyesi Doç.Dr. Yıldız Dinçer'e;

Ayrıca, benim dertlerime ortak olan ve beni sabırla dinleyen Tıbbi Biyoloji A.D. mensubu tüm çalışma arkadaşlarıma;

Tez çalışmam süresince ilgi ve desteğini esirgemeyip benimle birlikte sabahlayan sevgili eşim Mehmet Gürel ve küçük yaşla beni anlamaya çalışan bazen de isyan eden canım kızım Selin Gürel'e gösterdikleri sabır ve anlayıştan dolayı

sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T92/15122006

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN	İV
İTHAF	V
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	İX
TABLolar LİSTESİ	XIII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	XV
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XVII
ÖZET	XVIII
ABSTRACT.....	XIX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. ABC Taşıyıcı Ailesi.....	3
2.1.1. MDR1/P-gp (ABCB1).....	8
2.1.2. LRP(Akciger Rezistans Protein).....	8
2.1.3. MRP1 (ABCC1)	9
2.1.3.1. MRP1 Gen İfade Düzeylerinin(ekspresyonunun) Regülasyonu.....	11
2.1.3.2. GS-X Konjugatlarının MRP1 İle İlişkisi	12
2.1.3.3. MRP1'in Fonksiyonu	13
2.1.3.4. Malin Hastalıklarda MRP1	16
2.1.3.5. Malin Olmayan Hastalıklarda MRP1	16
2.2. İnflamasyon.....	18
2.2.1. İnflamasyonun Kimyasal Aracıları	19
2.2.2. Alerjik İnflamasyon	21
2.2.3. Lökotrienlerin Sentezi	21
2.2.4. Lökotrienlerin Yıkımı ve Atılımı.....	22
2.2.5. Lökotrienlerin Biyolojik Etkileri	22
2.2.6. Lökotrienlerin Farmakolojik Etkileri	24
2.2.7. Lökotrien Reseptörleri.....	26
2.2.8. Lökotrien İnhibitörleri.....	26

2.2.9. IgE Aracılı Alerjik Reaksiyon	28
2.3. Astım.....	29
2.3.1. Giriş.....	29
2.3.2. Astıma Yol Açan Çevresel Etkenler	30
2.3.3. Astım Patogenezinde Yer Alan Hava Yolu Yapısal Hücreleri.....	32
2.3.4. Alerjik Astımda Lökosit.....	34
2.3.5. Astımda Trombosit Aktivasyonu.....	34
2.4. Trombosit Yapı ve Fonksiyonları.....	36
2.4.1. Trombosit Yapıları.....	36
2.4.1.1. Hücre Zarı.....	38
2.4.1.2. Kanaliküler Sistem	38
2.4.1.3. Granüller	38
2.4.2. Trombosit Fonksiyonları	39
2.4.2.1. Adezyon ve Aktivasyon.....	40
2.4.2.2. Sekresyon.....	43
2.4.2.3. Agregasyon	43
2.5. Trombosit Lökosit Etkileşimi.....	44
2.5.1. Trombosit Lökosit Agregatları	45
2.6. Akan Hücre Ölçer ile Trombosit Fonksiyonunun Değerlendirildiği Klinik Durumlar.....	47
2.7. 4-Hidroksi-2,3-Nonenal (4-HNE)	49
2.8. Proglamlanmış Hücre Ölümü(APOPİTOZ).....	52
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	55
3.1. GEREÇLER	55
3.2. YÖNTEMLER	57
3.2.1. Beyaz Hücrelerin Ayrıştırılması	58
3.2.2. Total RNA İzolasyonu	58
3.2.3. Total RNA Konsantrasyonunun Ölçümü	59
3.2.4. cDNA Eldesi.....	60
3.2.5. Eş Zamanlı (“Real Time”) Kantitatif PZR	61
3.2.6. MRP1 İnhibisyon Ve Hücre İçi Birikim (Akümülayon) Deneyi (CFDA, Calcein-AM).....	63
3.2.7. ATP Düzeylerinin Belirlenmesi Yöntemi (Bioluminesans).....	64

3.2.8. LTC ₄ Seviyelerinin Ölçümü ELİSA.....	64
3.2.9. Trombosit Lökosit Agregatları Ve İntrastoplazmik MRP-1(sMRP-1)'in Tespiti	65
3.2.10. Trombosit Aktivitesinin Akan Hücre Ölçer İle Tespiti.....	67
3.2.11. Lökosit İzolasyonu	67
3.2.12. Trombosit Agregasyon Yöntemi.....	68
3.2.13. İndirgenmiş Glutasyon Tayini(GSH)	68
3.2.14. Protein Miktar Tayini (Lowry-Hartree Modifiye Yöntem).....	69
3.2.15. Apoptoz Ve Nekroz Tayini.....	69
3.2.16. Serum HNE Ölçümü	70
3.2.17. İstatistiksel Analiz.....	71
4. BULGULAR.....	75
4.1. Lökositlerdeki MRP1 Gen İfadesi Düzeyleri.....	75
4.2. MRP1 Fonksiyonu Ve Substratlarının(CFDA,Calcein-AM, LTC ₄) Tayini.....	78
4.2.1. Astım ve Kontrol Gruplarında Hücre İçi CFDA ve Calcein-AM Birikimi (Akümüasyon), MRP1 Fonksiyonu ile İlişkisi.....	78
4.2.1.1. MRP1 ile ATP Arasındaki Korelasyon	83
4.2.2. Astımda MRP-1 Fonksiyonuyla LTC ₄ Düzeylerinin İlişkisi.....	83
4.3. Lökositlerdeki Glutasyon Düzeyleri	85
4.4. Serum HNE Düzeyleri	86
4.5. Trombosit Aktivitesi	87
4.6. Trombositlerde MRP1 Miktarı.....	88
4.7. Trombosit Lökosit Agregatları.....	90
4.8. İntrastoplazmik MRP-1 Miktarları	98
4.9. Trombosit Fonksiyonu	101
4.10. MRP-1 İnhibisyonu Ve CuOOH'in, Lökositler Üzerindeki Etkisinin Apoptoz Ve Nekroz Açısından Değerlendirilmesi	104
5. TARTIŞMA	108
KAYNAKLAR	116
FORMLAR	129
5.1. Bilgilendirilmiş Olur Formu.....	129
5.2. Hastanın Beyanı.....	131
ETİK KURUL KARARI	132

ÖZGEÇMİŞ	133
----------------	-----

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Önemli Bazı ABC Taşıyıcı Proteinleri.....	5
Tablo 2-2: ABC Taşıyıcı Proteinleri ile ilişkili Hastalıklar (Deen M.V.D 2005).....	7
Tablo 2-3: Hücrelerde Apoptoza Neden Olan Ve İnhibe Eden Etkenler.	54
Tablo 3-1: Astım ve Kontrol Grubunun Özellikleri.....	55
Tablo 3-2: cDNA Sentezi PZR İçeriği	60
Tablo 3-3: Reaksiyon Karışımının İçeriği.	60
Tablo 3-4: PZR İçeriği.....	61
Tablo 3-5: PZR Sıcaklık Koşulları.....	62
Tablo 3-6: PZR’de Kullanılan Primer Dizileri Ve Ürün Boyları.....	63
Tablo 3-7: Akan Hücre Ölçer İle Yapılan Deneylerde Kullanılan Antikor Ve İzotip Kontroller.....	66
Tablo 3-8: Kimyasal Maddeler.	72
Tablo 3-9: Çalışmada Kullanılan Araçlar.....	73
Tablo 4-1: Astım ve Kontrol Grubunun Lökositlerinde MRP-1 Gen İfadesi Düzeyleri.....	75
Tablo 4-2: Lökositlerde MRP1 İnhibisyonu Varlığı Ve Yokluğunda Hücre İçi CFDA Birikimi.....	79
Tablo 4-3: Lökositlerde Probenecid Varlığı Ve Yokluğunda Hücre İçi Calcein-AM Birikimi.....	80
Tablo 4-4: Astım ve Kontrol Gruplarında ATP Düzeyleri.....	82
Tablo 4-5: LTC4 Seviyelerinin MRP-1 İnhibisyonu Sonucu Değişimi.....	84
Tablo 4-6: Astım Ve Kontrol Gruplarının Glutatyon Düzeyleri	85
Tablo 4-7: Astım Ve Kontrol Grubu Serum HNE Ortalamala Düzeyleri.	86
Tablo 4-8: Astım Ve Kontrol Gruplarında CD62P, CD 41 Ve CD42b Miktarları.....	87
Tablo 4-9: Trombositlerde MRP-1 Miktarı(%Fluoresan).	88
Tablo 4-10: Trombositlerde MRP-1 Miktarı(Mfi).....	89
Tablo 4-11: Lökosit Trombosit Agregatlarının Astım Ve Kontrol Gruplarındaki Ortalama Değerleri.....	90
Tablo 4-12: Aktive Olmuş Trombositlerle Agregat Yapan Lökositlerin Astım Ve Kontrol Gruplarındaki Ortalamaları.....	91

Tablo 4-13: Astım Ve Kontrol Gruplarının Granülosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD41, CD62P Ortalama Miktarları.	92
Tablo 4-14: Astım Ve Kontrol Gruplarının Granülosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD42b, CD62P, CD14 Ortalama Miktarları.	93
Tablo 4-15: Astım Ve Kontrol Gruplarının Granülosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD41, CD62P Ortalama Miktarları.	94
Tablo 4-16: Astım Ve Kontrol Gruplarının Lenfosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD42b, CD62P, CD14 Ortalama Miktarları.	95
Tablo 4-17: Astım Ve Kontrol Gruplarının Monosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD41, CD62P Ortalama Miktarları.	96
Tablo 4-18: Astım Ve Kontrol Gruplarının Monosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD42b, CD62P, CD14 Ortalama Miktarları	97
Tablo 4-19: Astım Ve Kontrol Gruplarında Lökosit Trombosit Agregatlarında İntrasitoplazmik (S)MRP-1 Miktarının Ortalama Değerleri.	98
Tablo 4-20: Astım Ve Kontrol Gruplarında Granülosit Trombosit Agregatlarında İntrasitoplazmik (S)MRP-1 Miktarının Ortalama Değerleri.	99
Tablo 4-21: Astım Ve Kontrol Gruplarında Lenfosit Trombosit Agregatlarında İntrasitoplazmik (S)MRP-1 Miktarının Ortalama Değerleri.	100
Tablo 4-22: Astım Ve Kontrol Gruplarında Monosit Trombosit Agregatlarında İntrasitoplazmik (S)Mrp-1 Miktarının Ortalama Değerleri.	100
Tablo 4-23: MRP-1 İnhibisyonu Sonucu Trombosit Agregasyon Eğrisinin Eğim Cinsinden Değişimi.	102
Tablo 4-24: MRP-1 İnhibisyonu Sonucu Trombosit Agregasyon Eğrisinin %Amplitüd Cinsinden Değişimi.	103
Tablo 4-25: Hafif İntermitant Astım Ve Hafif Persistent Astım Lökositlerinde MRP1 İnhibisyonu Ve Cumoh Uygulaması Sonucu Apoptoz Ve Nekroz Oranları.	105
Tablo 4-26: Hafif İntermitant Astım Ve Hafif Persistent Astımda MRP1 İnhibisyonu Ve Cumoh Uygulaması Sonucu Apoptoz Ve Nekroz Oranları.	107

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: ABC Taşıyıcısının Yapısı (Dean M. 2001)	4
Şekil 2-2: İnsan ABC Genlerinin Aile Ağacı(Dean M. 2001).....	6
Şekil 2-3: MRP1'in Yapısı (İto K.İ. 2003).	10
Şekil 2-4: İnsan Akciğerindeki ATP-bağlayıcı Kaset Proteinlerinin İmunohistokimyasal Olarak Boyanması.(Deen M.V.D 2005).	15
Şekil 2-5: Araşidonik Asit Metabolitleri, Lökotrien Oluşumu (WELLER P.F. 1983). ..	18
Şekil 2-6: İnflamasyonun Kimyasal Aracıları Ve Lökotrien Yolağı.	19
Şekil 2-7: Sisteinil Lökotrienlerin Hava Yolları Üzerine Etkileri (Faruk Özer 2005)....	24
Şekil 3-1: Total RNA Agaroz Jel Elektrofrezisi Görüntüsü.....	60
Şekil 3-2: Apoptoz, Nekroz Ve Hücre Canlılığının Fluoresan Mikroskop Görüntüsü..	70
Şekil 4-1: Astım Ve Kontrol Vakalarının Lökositlerinde MRP1- Gen İfadesi Seviyeleri.	76
Şekil 4-2: MRP-1 Ve Siklofilin Gen İfadesi(Ekspresyonu) Analiz Sonucu.....	77
Şekil 4-3: MRP-1 İnhibisyonu Sonucu Hücre İçi CFDA Birikiminin Ölçümü.....	79
Şekil 4-4: Lökositlerde Probenecid Varlığı Ve Yokluğunda Hücre İçi Calcein-AM Birikimi.	81
Şekil 4-5: Astım Ve Kontrol Gruplarında ATP Düzeyleri.	82
Şekil 4-6: MRP-1 ve ATP Arasındaki Korelasyonun Grafiği.	83
Şekil 4-7: LTC4 Seviyelerinin MRP-1 İnhibisyonu Sonucu Değişimi.	85
Şekil 4-8: Astım Ve Kontrol Gruplarının Glutasyon Düzeyleri.....	86
Şekil 4-9: Astım ve Kontrol Gruplarında CD62P, CD 41 ve CD42b Miktarları.....	88
Şekil 4-10: Trombositlerde MRP-1 Miktarı(%fluoresan).	89
Şekil 4-11: Trombositlerde MRP-1 Miktarı(mfi).	90
Şekil 4-12: Lökosit Trombosit Agregatlarının Astım Ve Kontrol Gruplarındaki Ortalama Değerleri.	91
Şekil 4-13: Aktive Olmuş Trombositlerle Agregat Yapan Lökositlerin Astım Ve Kontrol Gruplarındaki Ortalamaları.	92
Şekil 4-14: Astım Ve Kontrol Gruplarının Granülosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD41, CD62P Ortalama Miktarları.	93
Şekil 4-15: Astım Ve Kontrol Gruplarının Granülosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD42b, CD62P, CD14 Ortalama Miktarları.	94

Şekil 4-16: Astım Ve Kontrol Gruplarının Lenfosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD41, CD62P Ortalama Miktarları.	95
Şekil 4-17: Astım ve Kontrol Gruplarının Lenfosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD42b, CD62P, CD14 Ortalama Miktarları.	96
Şekil 4-18: Astım Ve Kontrol Gruplarının Monosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD41, CD62P Ortalama Miktarları.	97
Şekil 4-19: Astım ve Kontrol Gruplarının Monosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD42b, CD62P, CD14 Ortalama Miktarları.	98
Şekil 4-20: MRP-1 İnhibisyonu Sonucu Trombosit Agregasyon Eğrisinin Eğim Cinsinden Değişimi.	101
Şekil 4-21: PI ve Hoesth Fluoresan Boyama İle Fluoresan Mikroskopunda Gözlenen Hücreler.	104
Şekil 4-22: Astım Ve Kontrolde MRP1 inhibisyonu ve CumOH Uygulaması Sonucu Apoptoz Ve Nekroz Oranları.	106
Şekil 4-23: Hafif Intermitant Astım Ve Hafif Persistent Astımda MRP1 inhibisyonu ve CumOH Uygulaması Sonucu Apoptoz Ve Nekroz Oranları.	106

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- (SFT)(solunum fonksiyon testi)
- FEV1(birinci saniye zorlu ekspirasyon hacmi)
- FVC(zorlu vital kapasite)
- PEF(tepe akım hızı)
- CD(cluster of differentiation)(farklılaşma kümeleri)
- DCFH(dichlorofluorescein diacetate)
- CFDA(Carboksi fluoresein di asetat)
- Ca-AM(Calcien-Aseto metiloksi)
- DMSO(dimetil sülfoksit)
- g(gram)
- μM.(mikromolar)
- μl.(mikrolitre)
- TZP (trombositten zengin plazma)
- EDTA(etilen diamin tetra asetik asit)
- MRP-1(çoklu ilaç dirençliliğiyle ilgili protein-1)
- LTC4(lökotrien C4)
- ADP(adenozin difosfat)
- GSH(glutatyon)
- PMA(phorbol myristate acetate)
- PI(Propidium iodyür)
- PZR(polimeraz zincir reaksiyonu)
- ATP(adonozin tri fosfat)

ÖZET

Bayram Gürel, Ç. Trombosit aktivasyonunun düzenlenmesinde MRP-1'in fonksiyonunun hastalıklarla olan ilişkisinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji A.D. Doktora Tezi İstanbul. 2009

Astımda rolü olduğu bilinen LTC4 ile bu molekülün taşınmasından sorumlu olduğu bilinen MRP1 arasındaki ilişkinin astım hastalarında nasıl olduğu bilinmemektedir. LTC4 seviyeleri yüksek olduğu bilinen astımlı hastalarda MRP1 gen ifade seviyelerinde ve buna bağlı olarak taşıma hızında değişiklikler beklenebilir. Bu nedenle çalışmamızın ilk bölümünde lökositlerde MRP1 gen anlatım seviyeleri gerçek zamanlı kantitatif PZR yöntemiyle, fonksiyonu akan hücre ölçerle CFDA ve Calcein-AM problemleriyle ve LTC4 miktarları ELİSA ile bu sorunun cevabı incelendi. Sonuçlarımız astımda MRP1 fonksiyonu ve MRP1 gen anlatım seviyelerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu hastalarda LTC4 seviyelerinin farksız olması, MRP1'in artarak bir kompensatuar mekanizma gibi LTC4'ün seviyelerini düzenlendiğini düşündürülebilir. Çalışmamızda hastalık şiddetiyle doğru orantılı olarak lökositlerde MRP1 gen anlatım düzeylerinin artması, MRP1'in alerjik astımın patolojisinde bir rolü olabileceğini düşündürülebilir. Astımda inflamasyonu tetikleyen sebeplerden biri de lökosit ve trombosit aktivasyonları olduğu ve özellikle salgıladıkları maddelerle dolaşımdaki ve solunum yollarındaki hücreleri aktive ederek inflamasyona yol açtıkları bilinmektedir. Ancak trombosit ve lökositlerin membranlarında mevcut MRP-1'in trombosit-lökosit etkileşimindeki rolü halen açık değildir. Aktive trombositlerin belirlenmesinde özgül bir yöntem olarak kabul edilen trombosit lökosit agregatları, trombosit lökosit agregatlarında intrastoplazmik MRP1 protein düzeyleri, trombositlerde MRP1 protein miktarları akan hücre ölçer ile incelenerek böyle bir ilişkinin varlığı değerlendirildi. Aktif trombositlerin belirteci olan CD42b %fluoresans oranı astım hastalarında ve hafif intermitant astımda kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Astımda trombositlerdeki GpIb reseptörünün diğer aktivasyon belirteçlerine göre kontrolden daha yüksek olarak tespit edilmesi; trombositin; astımın patolojisine GpIb reseptörü aracılığıyla endotele adezyonu arttırarak katıldığını düşündürülebilir. Hafif intermitant astımda MRP1 özgül antikor ile tespit edilen intrastoplazmik MRP1 protein miktarı CD45CD42b antikorları ile monosit-trombosit, lenfosit-trombosit ve granülosit-trombosit agregatlarında kontrolden istatistiksel olarak yüksek bulundu. Alerjik astım hastalarının trombosit lökosit agregatlarında intrastoplazmik MRP1 protein miktarlarının arttığını gösteren bulgumuz ilk defa bir hastalık grubunda böyle bir değişimi göstermesi açısından önem teşkil etmektedir. CumOH ile indüklediğimiz oksidatif stres ve probenecid ile yaptığımız MRP1 inhibisyonun etkilerini in vitro trombosit aktivasyonuna olan etkisini ortaya koymak amacıyla trombositleri ADP ile uyararak agregasyonu takip ettik. Astım ve kontrol gruplarının her ikisinde de MRP1 inhibisyonu ve CumOH uygulaması sonucu kontrole göre agregasyonda anlamlı azalma kaydettik. MRP1 inhibisyonu ile trombosit lökosit etkileşiminin önlenmesi ve hücre aktivasyonlarının azaltılması bulgumuz, astım hastalarına yönelik tedavi protokollerine yeni bir bakış açısı kazandırabilir.

Anahtar Kelimeler: MRP1, astım, trombosit aktivasyonu, inflamasyon, P selektin

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T92/15122006

ABSTRACT

Bayram Gürel, C. Study of MRP1 function and its association with illnesses in regulation of thrombocyte activation. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Medical Biology Branch, Doctorate Thesis, 2009.

The association between LTC₄, a lipid mediator playing a role in asthma and MRP1, transporter of this molecule remains still unexplained in asthmatic patients. We can observe changes in the MRP1 expression and thus in the exportation rate in the asthmatic patients whose LTC₄ levels are high. MRP1, a trans-membrane protein known for its function in exporting LTC₄, a major agent in asthma pathology, from thrombocytes and leukocytes and its interference in the compensation mechanism against oxidative stress. In the first part of our study, we have searched for a response to this question through the PCR quantitative analysis explaining MRP1 expression in leukocytes, CFDA and Calcein-AM probes applied in flow cytometry to define its function and ELISA test for LTC₄ quantity/number. Our findings show that in asthma, MRP1 function and the levels of MRP1 expression are high. The LTC₄ levels found unvarying in these patients may lead us to think that in fact, MRP1, as a compensator mechanism, can be regulated increasingly in order to hold LTC₄ at a certain level. In our study, we may also think that the augmentation of MRP1 expression in leukocytes in parallel to the severity of the illness, indicates that MRP1 may play a role in the pathology of allergic asthma. It is also known that one of the major agents activating inflammation in asthma is the thrombocytes and leukocytes and with the substances they released, they can cause inflammation through the activation of cells found in the circulation and respiratory ways. However, the role of MRP1 present in the membranes of thrombocytes and leukocytes still remains unclear in the thrombocyte-leukocyte association. We have evaluated the existence of possible association through a flow cytometry analysing the thrombocyte-leukocyte aggregates considered as an effective method to define activated thrombocytes, the intrastoplasmic MRP1 protein levels of these aggregates in the cells. The CD42b fluorescent percentage, a major indicator of active thrombocyte, has been found significantly higher in the patients with asthma than the group experiencing mild intermittent asthma. Having found out that in the course of asthma, GpIb receptor in thrombocytes is higher than the controls regarding the other activation indicators, we may consider that thrombocytes contribute to asthma pathology by increasing endothelial adhesion over GpIb receptor. While the amount of intrastoplasmic MRP1 protein detected with MRP1 antibody in mild intermittent asthma, is found statistically higher than the controls in the aggregates of CD45CD42b antibodies, monocyte-thrombocyte, leukocyte-thrombocyte and granulocyte-thrombocyte. Our finding unveils that the increase of intrastoplasmic MRP1 proteins in the thrombocytes-leukocyte aggregates of the patients with allergic asthma, carries an importance regarding the change appeared first time in a group of patients. We have observed the course of the aggregation stimulated by ADP thrombocytes in order to demonstrate what impacts the oxidative stress induced with CumOH and the MRP1 inhibition carried out with probenecid can have on the in-vitro thrombocyte activation. We have recorded a significant decrease in the aggregation as a result of MRP1 inhibition and CumOH application in both groups of control and asthma. With the prevention of influence developed between MRP1 inhibition and thrombocyte-leukocyte and the diminution of cell activations, our finding may add a new dimension to the treatment protocols dedicated to asthma patients.

Key words: MRP1, asthma, thrombocyte activation, inflammation, P selectin

This study has been supported by Unity of Scientific Research Projects, Istanbul University. Project No: T92/15122006

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çoklu ilaç dirençliliği ile ilişkili protein 1 (MRP1), LTC₄'ün trombosit ve lökositlerden hücre dışına taşınmasında görev alan bir transmembran proteindir. LTC₄; alerjik astımda inflamasyon sahasına lökosit ve trombositlerin çağırılmasında, vasokonstrüksiyon, bronkospazm ve vasküler geçirgenliğin arttırılmasında fonksiyon gören kritik bir mediyatördür. Astımda genel olarak oksidatif stres artışının yanısıra, trombosit ve lökosit aktivasyonunda da artış olduğu bildirilmiştir. MRP1'in trombosit ve lökositlerin membranında yer alarak oksidatif strese karşı kompensasyon mekanizmasında devreye girdiği bilindiğinden, trombosit ve lökosit aktivasyonu ile MRP1 taşıyıcı proteini arasında bir ilişki beklenebilir.

MRP-1, ATP'ye bağımlı bir biçimde hücre içindeki konjugatlara ek olarak çeşitli kimyasalları ve ilaçları hücre dışına atan, hücreyi oksidatif stresin zararlı etkilerinden koruyan transmembran bir proteindir. Lökosit, trombosit ve akciğer epitel hücrelerinde MRP-1 proteini gösterilmiştir. Ancak trombosit ve lökositlerin membranlarında mevcut MRP-1'in trombosit-lökosit etkileşimindeki ve astımdaki rolü halen açıklanabilmiş değildir. Bu nedenle çalışmamızın ilk bölümünde lökositlerde MRP1 gen anlatım seviyeleri, fonksiyonu ve LTC₄ miktarları ile astım arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Lökositlerin, trombositlerle etkileşmek suretiyle onların aktivasyonlarını etkilediği bilinmektedir. Bu etkileşimin, oksidatif strese bağlı olarak çeşitli hastalıklarda değiştiği ve bozulduğu gösterilmiştir. Trombosit-lökosit etkileşiminin bozulduğuna dair bulguların mevcut olduğu hastalıklardan biri de inflamatuvar bir hastalık olarak kabul edilen astımdır. Astımda, oksidatif stres ve MRP1'in oksidatif stresdeki rolü dikkate alındığında, trombosit-lökosit etkileşiminde MRP-1 proteinin bir rolünün olması beklenebilir. Ancak literatürde, trombosit ve lökositlerin membranlarında mevcut MRP-1'in trombosit-lökosit etkileşimindeki rolü halen yeterince açık değildir. Çalışmanın ikinci bölümünde bu mekanizmaya ışık tutabilmek maksadı ile alerjik astımlılarda trombosit lökosit etkileşiminde MRP-1'in rolünü belirlemeyi hedefledik. Bununla birlikte astımlı hastalarda özellikle eozinofillerin geç apoptozu sebebiyle, dolaşımdaki sayıları ve etkilerinin arttığı ve astım patolojisine bu mekanizmanın etkili olduğu ileri sürülmektedir. Deneysel çalışmalarda MRP-1'in indüklenmiş apoptozu karşı, hücreyi

koruyucu bir etki gösterdiği bulunmuştur. Oksidatif stresin bir apoptoz indükleyicisi ve MRP-1'in oksidatif hasar ürünlerini uzaklaştıran bir komponent olduğu göz önüne alındığında, astımlı hastalarda görülen eozinofil direncinde MRP-1'in rol oynuyor olabileceği beklenebilir. Bu nedenle çalışmamızın ikinci bölümünde; astımlı hastalarda sıklıkla gözlemlenen eozinofillerin apoptoza karşı dirence sahip olmasından MRP-1 mekanizmasının sorumlu olup olmadığının araştırılması hedeflenmiştir.

Astım patogeneğinde lökositlerin ve trombositlerin aktivasyonu sonucu gelişen inflamasyonda, trombosit lökosit agregatlarının ve dolayısıyla inflamasyonun önlenmesinde MRP1'in rolünün tespitinin, yeni tedavi protokollerine farklı bir bakış açısı getirebileceği değerlendirilmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ABC Taşıyıcı Ailesi

ABC (ATP Bağlayıcı Kaset) taşıyıcı ailesi üyeleri transmembran proteinleri olup enerjiye bağımlı olarak çalışırlar. Hücrede taşımaya aracılık eden proteinler ATP ile çalışan pompalar olup P, F, V ve ABC süper ailesi olarak sınıflandırılırlar.

V tipi ATP pompası : Lizozomların yüksek asiditelerini sağlamak üzere lizozomal vakuoler zarlar arasındaki proton pompası olarak görev yapar.

F tipi ATP pompası : Hücre için ATP üretiminde kullanılan proton pompası olarak özellikle iç mitokondriyal zar ve kloroplastın tilakoid zarında görev yapar.

P tipi taşıma ATP pompası : Na^+ - K^+ pompası, Ca^{2+} pompası, H^+ pompası olarak görev yapar.

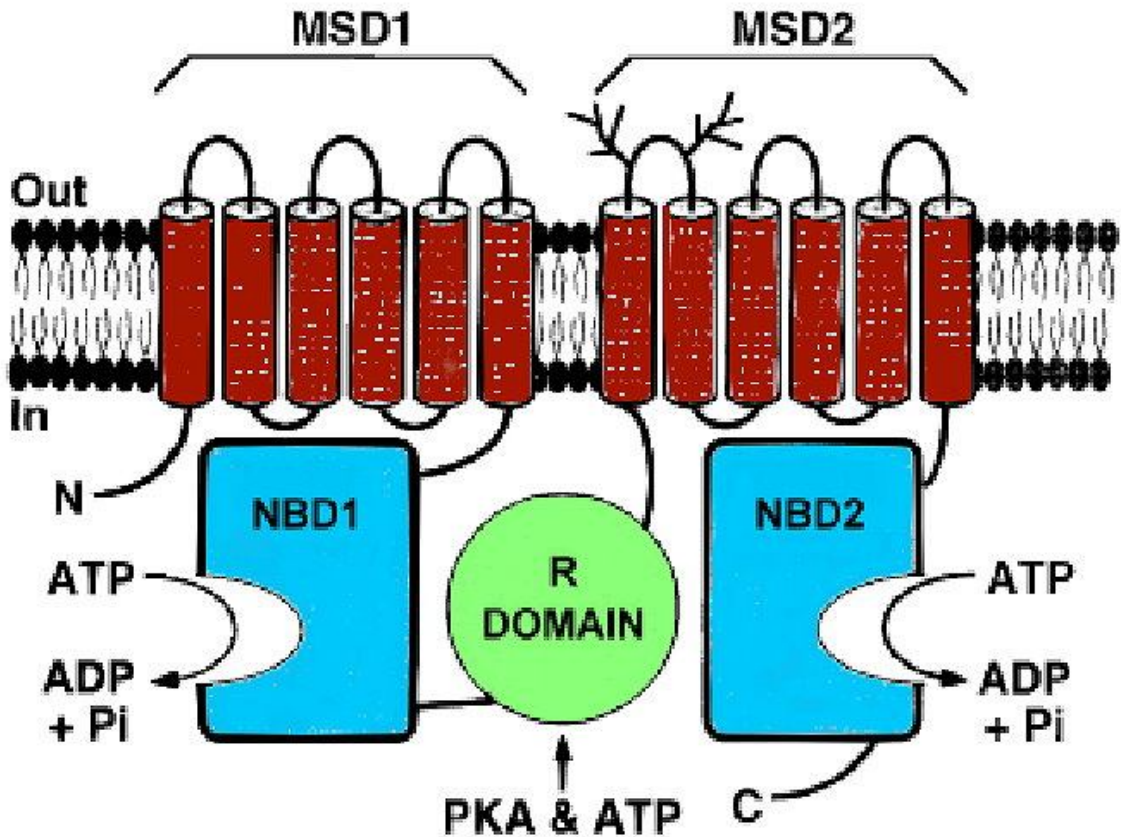
ABC Süperailisi : Büyük ve farklı pompa aileleri ATP bağlayıcı motif karakteristikleriyle ya da kasetleriyle adlandırılırlar.

Özgül taşıyıcı proteinlerin görev aldığı aktif taşıma, ilaçların hücre içinden atılımında önemli yollardan birisini oluşturur. ABC taşıyıcıların aşırı ekspresyonları, kemoteropatik ilaçların atılımıyla ilişkili olduğundan bu proteinler çoklu ilaç direnç(multidrug resistance) proteinleri olarak adlandırılmıştır. Tümör hücrelerinde kanser ilaçlarına karşı dirençten sorumlu olduğu bilinen bu proteinlerin ayrıca karaciğer, böbrek, ovaryum, akciğer gibi dokularda da sentezlendiği ve ksenobiyotiklere karşı savunma mekanizması oluşturduğu gösterilmiştir. İlk olarak 1976 yılında taşıyıcı protein ailesinden P-glikoprotein'in (MDR-1) aşırı ekspresyonu kanser ilaçlarına dirençli tümör hücrelerinde gösterilmiştir. Daha sonra bu proteinin 7. kromozom üzerinde bulunan MDR-1 geni tarafından kodlandığı bulunmuştur.

Çoklu ilaç direncinden ve ksenobiyotiklerin hücreden taşınmasından sorumlu olan ATP bağlayıcı taşıyıcı proteinlerin (ABC ailesinin) insanda 49 üyesi bulunmaktadır. Bu ailenin üyeleri, aralarındaki dizi benzerliklerine göre ABCA(12 üye), ABCB (11 üye), ABCC (13 üye), ABCD (4 üye), ABCE (1 üye), ABCF (3 üye), ABCG (5 üye) olmak üzere 7 alt aileye ayrılır. Üyelerin sadece 14 tanesinin ilaç taşıma görevi

saptanmıştır. Şu ana kadar, ATP bağlayıcı taşıyıcı protein ailesinin en büyük grupları 9 protein çeşidine sahip MRP ile 7 protein çeşidine sahip MDR'dir (Dean M. 2001, Deen M.V.D 2005).

ABC taşıyıcı protein ailesi üyeleri, en az bir ATP bağlayıcı bölge (nükleotid bağlayıcı bölge) ve en az bir transmembran bölge (TM) içermektedir (Şekil 2-1). Nükleotid bağlayıcı bölge (NBD) üç korunmuş motif içerir; Walker A (W_A), Walker B (W_B) ve LSGGQ (C motifi). W_A ve W_B motiflerinin ATPaz aktiviteleri mevcuttur.. ABC taşıyıcılarının aktivitesi, iki NBD ile ATP arasındaki kooperatif ilişkiye bağlıdır ve bir NBD'den W_A ve W_B motifleri tarafından oluşturulmuş iki aktif bölge arasında ATP sandviç yapısı ile belirlenir. ABCC proteinlerinin iki NBD'si fonksiyonel olarak eşit değildir. NBD1, NBD2'den daha büyük ATP bağlayıcı afiniteye sahiptir ve NBD2 NBD1'den daha büyük ATP hidroliz etme kapasitesine sahiptir (Dean M. 2001, Deen M. V.D. 2005)(Şekil 2-3).

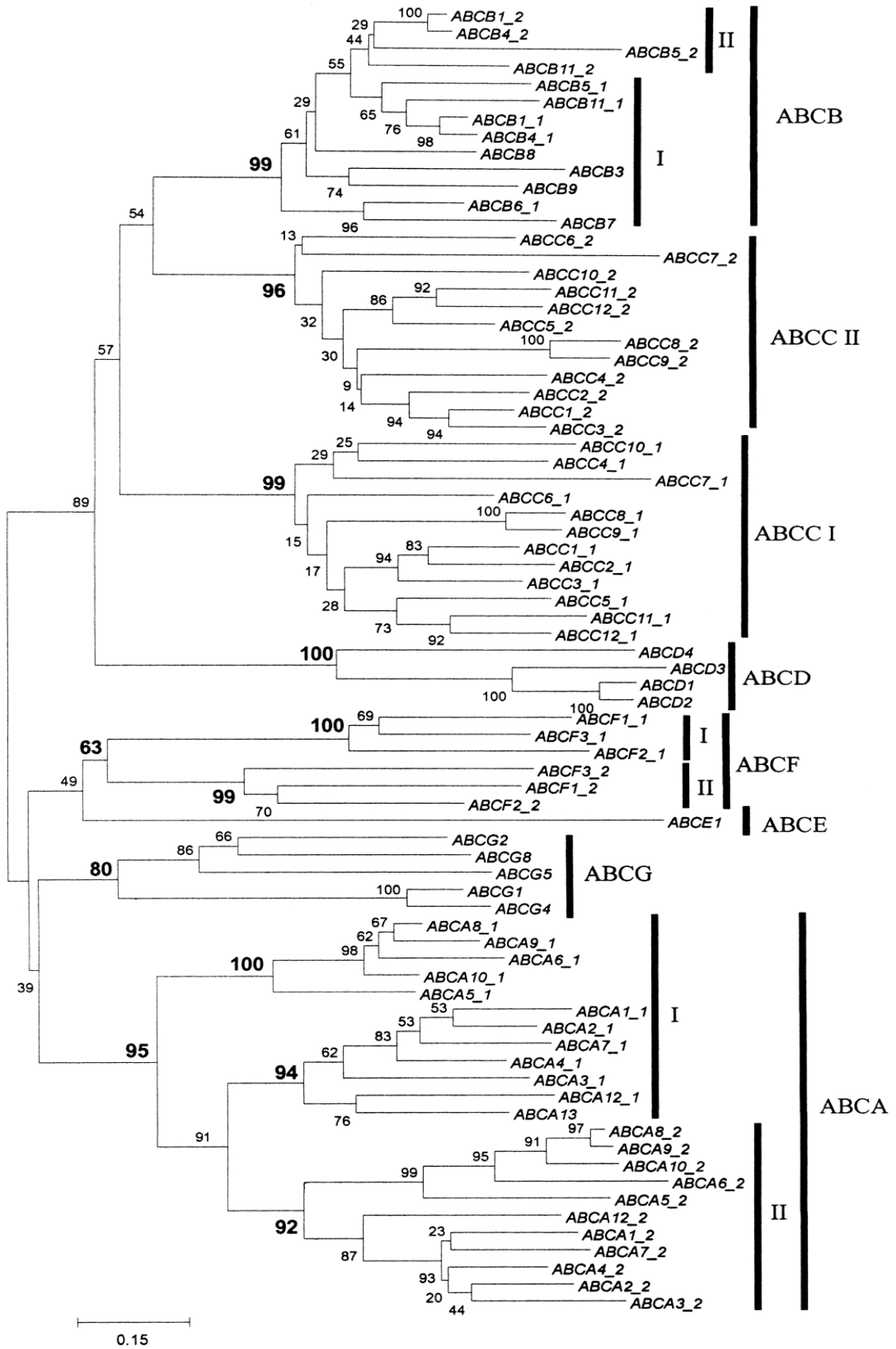


Şekil 2-1: ABC Taşıyıcısının Yapısı (Dean M. 2001)

ABC taşıyıcı proteinleri ve özellikleri **Tablo 2-1**'de, gen yapıları **Şekil 2-2**'de verilmiştir.

Tablo 2-1: Önemli Bazı ABC Taşıyıcı Proteinleri

Taşıyıcı protein	Lokelize olduğu doku	Lokelize olduğu membran yerleşimi	Substratları	İnhibitörleri
ABCB1	Karaciğer, böbrek, bağırsak, beyin, testis, adrenal bez, uterus, ovaryum		Siklosporin A, eritromisin, GF120918, ivermektin loperamid, vinkristin, verapamil, digoksin, doksorubisin, vinblastin, mitoksantron, topotekan, indinavir	kafein, simetidin, kortizol, morfin, digoksin, deksametazon, doksorubisin, ergotamin, eritromisin, pantaprozol, verapamil, vinkristin, probenecid
ABCC1 (MRP1)	Bağırsak, beyin, böbrek, akciğer, testis	Bazolateral	GS-X ve diğer konjugatlar Doksorubisin, vinblastin, vinkristin, methotreksat, paklitaksel	Siklosporin A, V-104, MK571, Probenecid
ABCC2 (MRP2/CMOAT)	Karaciğer, bağırsak, böbrek	Apikal	Cisplatin, doksorubisin, etoposid, vinkristin, metotreksat, indinavir, ritonavir, arsenik, Kadmiyum, okratoksin A, SN-38	Siklosporin, furosemid, GF120918, okratoksin A, pravastatin, probenesid, vinkristin
ABCG2 (BCRP)	Plasenta, Beyin	Apikal	Doksorubisin, etoposid, metotreksat, mitoksantron, topotecan, aktinomisin D, simetidin, estrone, progesteron, testosteron	Siklosporin A, digoksin, deksametazon, doksorubisin, estrone, fumitremorgin C, novobiosin, omeprozol,



Şekil 2-2: İnsan ABC Genlerinin Aile Ağacı(Dean M. 2001)

ABC taşıyıcıları ilaç direnç metabolizmasında etkilidirler. ABC taşıyıcılarının aşırı ekspresyonu, hücre içi ilaç (antrasiklinler, epidoflotoksinler, vinka alkaloidleri gibi kemoterapötik ilaçların atıklarının) konsantrasyonunu azaltır; dolayısı ile de bu durum ilaç direncine sebep olur. Bir çok MDR proteini ilaç atık pompası gibi çalışabilir; sonuçta toksik bileşenlerin hücre içi konsantrasyonu azaltılır. Akciğerde MRP1 ve P-gp ekspresyonunun, küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) 'ndeki bağlantısı özellikle çalışılmıştır. ABC taşıyıcıları hayati her hücre de vardır ve fizyolojik olarak ksenobiyotiklerin temizlenmesinde merkezi rol oynar. İnsan akciğerinde MRP1 ve P-gp'nin ekspresyonu; endojen veya eksojen toksik bileşenlerin akciğere girmesine karşı korunmasında önemli olabilir. Akciğer ve trakea gibi bir bariyer fonksiyonu olan dokularda bazı ABC taşıyıcılarının yüksek transkripsiyonel aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Akciğerde ABC taşıyıcılarının önemli rolleri vardır. ABC taşıyıcıları arasında kistik fibroz transmembran konduktans regülatör (CFTR) protein de vardır ve CFTR gen mutasyonları, kistik fibrozun gelişiminden sorumludurlar. ABCA1'deki mutasyonlar, Tangier hastalığına yol açarken, ölümcül olabilen ABCA3 mutasyonları yeni doğanda surfaktan üretim yokluğuna sebep olur. Astım KOAH gibi yüksek sıklıkta görülen akciğer hastalıklarında ABC taşıyıcı fonksiyonunun değişken rolü araştırılmıştır. Çeşitli kanser tiplerinde ABCB1 (MDR-1), ABCC1 (MRP-1); ABCG2 (MxR)'nin rolü gösterilmiştir. **Tablo 2-2**'de ABC taşıyıcıları ile ilişkili hastalıklar görülmektedir (Deen M.V.D 2005).

Tablo 2-2: ABC Taşıyıcı Proteinleri ile ilişkili Hastalıklar (Deen M.V.D 2005).

Hastalık	Taşıyıcı protein
Kanser	ABCB1 (MDR1), ABCC1 (MRP1), ABCG2 (MXR)
Kistik fibroz	ABCC7 (CFTR)
Stargardt Hastalığı & AMD	ABCA4 (ABCR)
Tangier Hastalığı ve Ailesel HDL Yetersizliği	ABCA1 (ABC1)
Progressive familial intrahepatic cholestasis	ABCB11 (SPGP), ABCB4(MDR2)
Dubin-Johnson Sendromu	ABCC2 (MRP2)
Pseudoxanthoma elasticum	ABCC6 (MRP6)

Ailesel Hipoglisemi	ABCC8 (SUR1), ABCC9 (SUR2)
Sideroblastik Anemi ve Ataksi	ABCB7 (ABC7)
Adrenoleukodystrophy	ABCD1 (ALD)
Sitosterolemia	ABCG5, ABCG8
Bağıışıklık Sistemi Yetersizliğı	ABCB2 (Tap1), ABCB3 (Tap2)

2.1.1. MDR1/P-gp (ABCB1)

MDR1/Pgp geni kromozom 7q21.12'de lokalize edilmiştir. İlaç direnci mekanizmasında hücrenin yüzeyinde yer alan, 170 kDa büyüklüğünde fosfoglikoprotein yapıda bir pompadır. P-gp ksenobiyotikler tarafından geliştirilmiş olup genel olarak, çevresel etkiye karşı hücredeki savunmada rol oynar. Karaciğer ve bağırsak gibi sekresyon yapan organlarda apikalde eksprese edilir ve bir kaç hidrofobik substrat ve vinblastin, doksorubicin, etoposid içeren anti kanser ilaçların transportunda rol alır. P-gp, Akciğerde, silial epitelin apikalindeki hücrelerde veya ciliallerin birleştiğı kanalda ve bronşial gland hücre serilerinin lateral ve apikal yüzeyinde eksprese edilir. Fakat mukus salgılayan goblet hücrelerinde, pnomositlerde P-gp bulunmamış; Alveollerde monosit kaynaklı makrofajda bulunmuştur. P-gp özellikle epitel hücrelerin apikalinde depolanır ve barsak kanalından lümene içeriğın taşınmasında rol oynar. P-gp'nin akciğerdeki fonksiyonu henüz tam olarak bilinmemektedir. Son yıllarda P-gp'nin klor kanallarını aktive eden ve kanal aktivitesine sahip hücre hacminin regülasyonun da rol oynadığı bulunmuştur. Fizyolojik etkisi ise hala açık değildir (Deen M.V.D 2005).

2.1.2. LRP(Akciger Rezistans Protein)

Çoklu ilaç direncinden sorumlu bir diğer moleküldür. Bu molekül bir çok farklı ilaca karşı direnç oluşumundan sorumludur ve 16.kromozom üzerinde lokalize bir gen tarafından kodlanmaktadır. LRP, ilacı spesifik veziküllere oradan da hücre dışına pompalamaktadır. Çoklu ilaç direncinden sorumlu moleküllerin gen ifade düzeylerinde artış ilaç direncinin göstergesidir. 2 veya 3 genin aynı anda gen ifadesinin olması sağ kalımı azaltmaktadır.

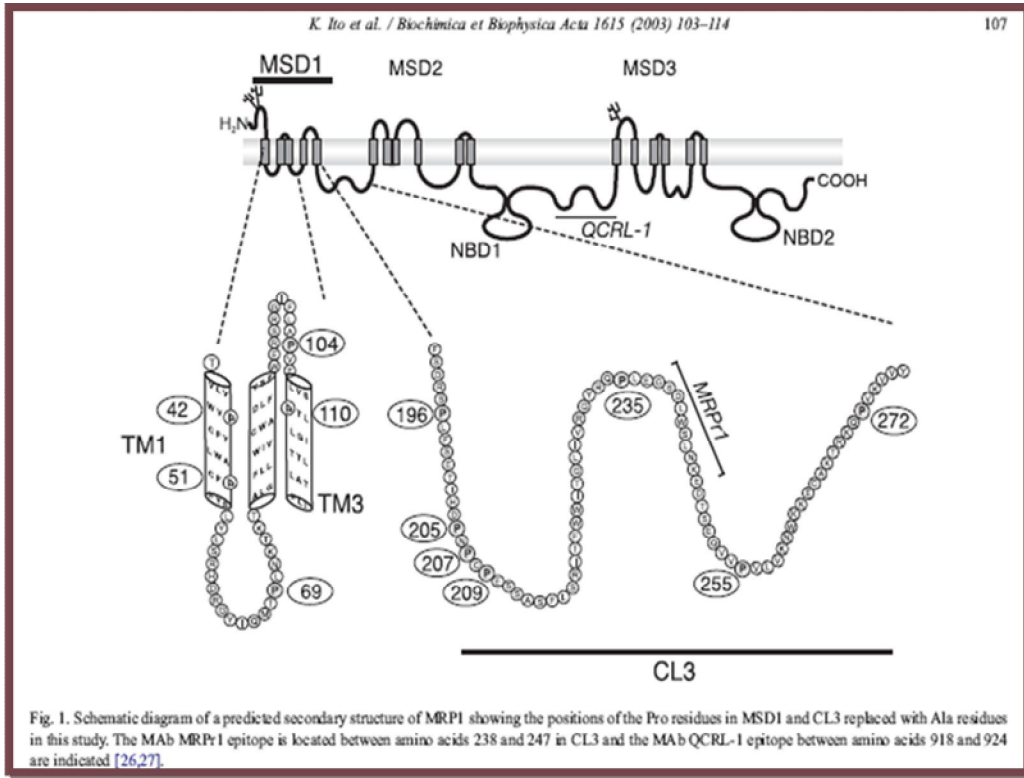
2.1.3. MRP1 (ABCC1)

Yıllarca MDR1'in ilaç direnci ile ilişkili tek ABC taşıyıcı proteini olduğu düşünülmüş ancak MDR1'in aşırı ekspresyonu olmayan, ilaca dirençli hücre hatlarını tanımlayan raporlar, diğer MDR ilişkili proteinlerin varlığına işaret etmiştir. Bu durum ise daha sonra MRP1 olarak ikinci bir ilaç dirençli ABC taşıyıcısının tanımlanmasını sağlamıştır.

MDR1 ve MRP1 yapısal ve fonksiyonel olarak benzerdirler fakat buna rağmen aynı olmayan bir grup anti kanser ilacına direnç geliştirir. Bununla birlikte bu proteinler aminoasit özelliklerinin %20'sinden azını paylaşırlar ve MDR1 ile MRP1 farklı mekanizmalar vasıtası ile ilaç direnci geliştirirler.

MRP1, 16.kromozomda lokalize 31 exondan oluşan ABCC1 geni tarafından kodlanır; hem hücre zarında hem de endoplazmik retikulum membranında yer alır (Uesaka H.F.,2007). Akciğer kanserinde artmış gen ifade düzeyleri görülmekte olup taksan direncinden sorumludur. MRP antagonistleri kullanılmaktadır. Ayrıca glutatyon azaltan ilaçlarda direnci azaltmak amacıyla kullanılmaktadır.

MRP1, ~200 amino asitlik üçlü N-terminal MSD1 içerir ve üçüncü MSD bölgesi beş amino (N) ucu glikozile olmuş ekstraselüler beş TM heliksinden oluşur. MRP ilişkili taşıyıcılar beş bölge ile (uzun MRP'ler) 17 TM alfa heliksi içerirler (**Şekil 2-3**). Diğer MRP ilişkili proteinler MRP4 (ABCC4) ve MRP5 (ABCC5) korunmuş dört bölge yapısıyla sadece 12 TM heliksine (kısa MRP'ler) sahiptir.



Şekil 2-3: MRP1'in Yapısı (İto K.İ. 2003).

MRP1 homologlarının klonları MRP2 (ABCC2) ve daha sonraları MRP3 (ABCC3), MRP4 (ABCC4), MRP5 (ABCC5) ve MRP6 (ABCC6) ilaç direncini potansiyel olarak içeren ABC taşıyıcılarının yeni bir alt ailesi olarak tanımlanmışlardır.

MRP1'in gen ifade düzeylerindeki artış ve ilaç direnci arasında kuvvetli bir ilişki kurulmuştur. MRP1'in gen ifade düzeylerinin artışı, azalmış intraselüler konsantrasyonlarla sonuçlanan ATP bağımlı ilaç atıklarının seviyesini yükseltir. Bununla birlikte yüksek MRP1 gen ifade düzeyleri, genellikle hücrelerden atılan ilaç miktarıyla doğru orantılı değildir ve bazen, MRP1 gen ifade düzeylerinin yüksek olduğu hücreler artmış ilaç atıklarını dahi göstermezler. Hassas kopyalarıyla kıyaslandığında gerçek MRP1 gen ifade düzeylerinin yüksek olduğu ilaca dirençli hücreler (doksorubicin ya da daunorubicin), floresan ilaçlarının intraselüler veziküler formlar içerisinde birikimi ile farklı ilaç dağılımları gösterirler. MRP1 ve intraselüler doksorubicin dağılımı arasındaki doğrudan ilişki, MRP1 inhibitörü MK 571 kullanılarak gösterilmiştir. Direnç durumunda yüksek MRP1 gen ifade düzeylerine sahip kopyalarda doksorubicin ileri derecede sitoplazmik dağılım gösterirken, hassas hücrelerde, doksorubicin nukleusa birikmiştir. Dirençli hücrelerin MK571 ile işlem görmesi

doksorubicinin çekirdek içinde yeniden dağılımı ile sonuçlanmıştır. Bir çok antikanser ilaç sitotoksik aktivite ortaya çıkarırken MRP1, ilaçların çekirdeğe girmesinin önüne geçmiştir. MRP1, plazma membranındaki lokalizasyonunun yanında, golgi aparatından kesilerek elde edilmiş sekretuar vesiküllerin intraselüler membranlarında da bulunur. MRP1 substratı olan di nitro fenil glutatyonun (DNP-GS) ilaca dirençli hücrelerin veziküllerinde yer aldığı görülmüştür. Bu sonuçlar, MRP1'in intraselüler olarak aktif ilaç atıklarının yanında, intraselüler veziküllerde ilaçların zehirsizleştirilmesi mekanizmasına aracılık ettiğini göstermektedir (İto K.İ. 2003, Yoshioka M. 2009).

2.1.3.1. MRP1 Gen İfade Düzeylerinin(ekspresyonunun) Regülasyonu

İlaçla indüklenen MRP1 gen ifade düzeylerinin nihai mekanizması henüz elde edilememiştir fakat MRP1 ekspresyonunun oksidatif stres tarafından tetiklendiğine dair kanıtlar mevcuttur. İnsan kolon kanser hücrelerinde MRP1 gen ifade düzeyleri tümör nekroz faktör alfa (TNF α) tarafından indüklenir. Farelerin lipopolisakkarit (LPS) ile işlem görmesi neticesinde akciğerde yükselmiş MRP1 gen ifade düzeyleri tespit edildiğinde benzer bir etki gözlenmiştir. TNF'nin hepatositlerde, taşıyıcı gen ekspresyonlarında LPS ile indüklenen etkilerin ana sebeplerinden biri olduğu değerlendirilmektedir. Yakın zamanda farede T yardımcı hücrelerinde tüm sitokinler içerisinde sadece interlökin 2 kombinasyonundaki TNF'nin MRP1 ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. TNF'nin intraselüler etkilerini gösterdiği mekanizmalardan biri reaktif oksijen türlerinin (ROS) şekillenmesidir. ROS üreteceği bilinen bileşikler MRP1 ve γ -glutamil sistein sentetazı (γ GCS) kodlayan genlerin ifade düzeylerini indükleyerek ROS ile MRP1 indüksiyonu arasında doğrudan bir bağlantı elde edilmesini sağlarlar. γ GCS, GSH sentezinde oran belirleyen enzimdir ve GSH oksidatif stres metabolitlerine karşı korunmada önemli bir rol oynar. γ GCS transfeksiyonu tarafından meydana getirilen yüksek GSH seviyeleri MRP1 gen ifade düzeylerini düşürmüştür. Bununla birlikte ağır metaller ve ACNU (3-[4-amino-2-metil-5-pirimidinilmetil]-1-(2-kloroetil)-nitrozüre) gibi GSH tarafından detoksifiye edilmiş bileşiklerin MRP1 gen ifade düzeylerini indükleme kapasitesi vardır. Bu sonuçlar GSH'ın MRP1 regülasyonunda kritik bir faktör olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, γ GCS inhibitörü buthionin sülfoksimin (BSO) tarafından GSH tüketiminin MRP1 ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. Bu durumun açıklaması mitokondri ve çekirdekte BSO rezistant bir GSH havuzunun olması olabilir. Bu havuz antikanser

ilaçlarına duyarlıdır. İlaçla tetiklenen MRP1 ekspresyonu için önerilen modelde antikanser ilaçlarının düşük konsantrasyonlarının sitoplazmik GSH ile MRP1 tarafından detoksifiye edildiği gösterilmiştir. Yüksek ilaç konsantrasyonları önce sitoplazmik GSH'ı ve müteakiben BSO dirençli havuzu tüketerek olup, bu durum ise GSH seviyelerini, MRP1 (γ GCS) ekspresyonunu indüklemek için tetik olabilecek şekilde transkripsiyon faktörlerinin hareketine ve selüler redoksun değişimine sebep olabilecek kritik değerin altına düşürebilecektir. Bununla birlikte MRP1'in promotor bölgesi antioksidana duyarlı bir element içerir. Oksidatif strese duyarlı transkripsiyon faktörleri ve MRP1 indüksiyonu arasındaki doğrudan ilişki henüz açıklanmamıştır.

2.1.3.2. GS-X Konjugatlarının MRP1 İle İlişkisi

MRP1, tümörlerde ilaç atık pompası gibi fonksiyon görebilir, bu mekanizma ATP'ye bağımlı olarak organik anyonlar ve inorganik anyonların taşınmasında görevlidir.

Organik anyonların MRP1 tarafından taşınması, konjuge olmuş metabolitlerin ve GSH glukuronit ve sülfat ile konjuge olmuş ürünlerin faz II xenobiyotik metabolizması ile taşınmasını içerir. Organik ya da inorganik konjugatların hepsi MRP1 tarafından taşınmazlar; bu konjugatlardan hangisinin taşınıp taşınmayacağını belirleyen kimyasal özellikler açık değildir. İn vitro ve in vivo olarak MRP1 tarafından taşınan ilk ve halen en iyi karakterize edilmiş fizyolojik GSH konjugatı ise sisteinil LTC₄ 'tür.

Anti kanser ilaçlarına direnç mekanizmasında çoklu ilaç direnci devreye girer. İlaç Direnci, eşzamanlı olarak, ilişkili olmayan birçok ilaca karşı gelişebilir; bu durum ise MDR (Çoklu İlaç Direnci) olarak adlandırılmaktadır. İlaçların hücre içine alınması difüzyon taşınma ve endositoz ile hücre dışına atılması ise MDR (ABCB1), MRP (ABCC1) ve MXR (ABCG2) olarak adlandırılan üç pompa tarafından gerçekleştirilir. MDR1 ve MRP1 proteinleri daha ayrıntılı incelenecek olursa farklı lokalizasyon ve görevlerinin olduğu ortaya çıkmaktadır (Leier I 1996).

2.1.3.3. MRP1'in Fonksiyonu

MRP1,

- 1) Hücre içinde zehirsizleştirme reaksiyonları sonunda oluşan metabolitleri dışarıya atarak ksenobiyotik metabolizmasında;
- 2) Vincristin, daunorubicin, metatraksat içeren kimyasal ilaçları hücreden dışarıya atarak ilaç dirençliliği mekanizmasında;
- 3) Araşidonik asit türevlerinden olan sisteinil lökotrien (LT)C₄'ün ve GSH konjugatlarını hücre dışına taşıyarak inflamasyonda;
- 4) Konjuge steroidler, E2 17 β G, Ostroron-3-sülfat, Dehidroepiandrosterone 3-sülfat'ı hücre dışına taşıyarak hormon metabolizmasında;
- 5) Oksidatif stres ürünlerinden 4-HNE ve GSSG'yi hücre dışına atarak oksidatif stres ve apoptozda fonksiyon gören ATP'ye bağımlı olarak çalışan bir transmembran proteindir.

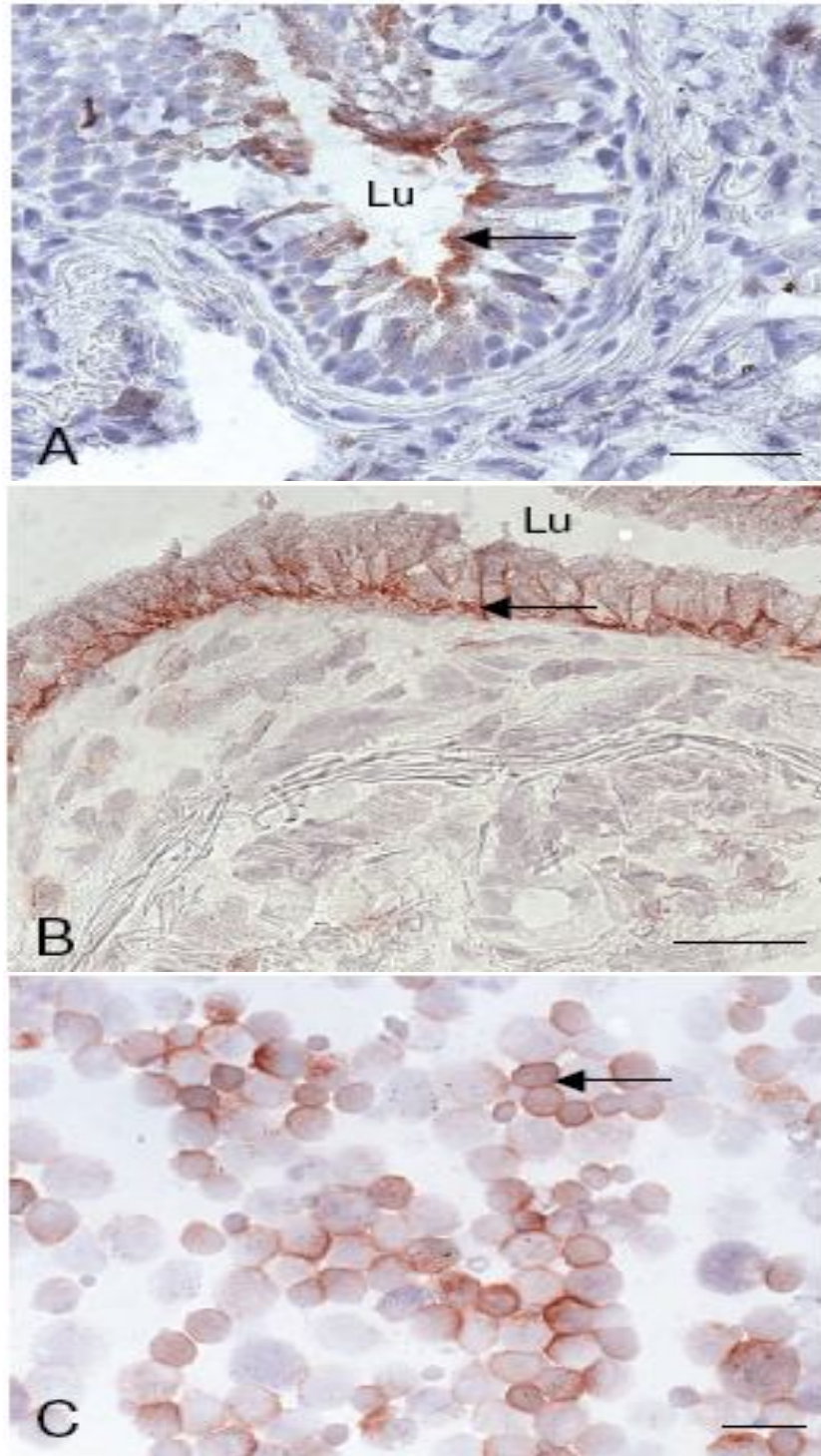
Akciğer alveollerinde, bronş epitelinde ve bronko alveolar sıvı hücrelerinde MRP1'in yüksek miktarda tespiti, akciğerin normal fonksiyonunda MRP1'in görevli olduğunu belirtmektedir(**Şekil 2-4**). Akciğer kanser hücrelerinde MRP1'in substratları sülfatlanmış konjuge organik anyonlar ve glukronit glutatyon olarak belirlenmiştir. Total akciğer RNA'sında RNase korumalı deneyle MRP 1,2,3,4,5 gen transkriptleri araştırılmış olup; MRP1 yüksek, MRP3, 4 ve MRP5 düşük olarak bulunmuş; MRP2 ise bulunmamıştır. Akciğer epitelinin bazo lateral tarafındaki yüksek MRP1 gen ifade seviyelerinin, toksinlerin lüminal tarafa alınmasını açıklamaya yardımcı olabileceği belirtilmiştir. Akciğer epitelinde glandlarda, alveolar makrofajlarda MRP1 gen ifade seviyelerinin fonksiyonu; hücre içi toksik yapıların atılmasına, antioksidan savunma ya da LTC₄'ün üretimi ile inflamasyon cevabını içerir. MRP1 gen ifade seviyelerinin fonksiyonel artış veya azalışı, akciğer hastalığının ilerleme ve/veya gelişmesi ile hava kirliliğinden ve solunan toksik ajanlardan (sigara gibi) korunmada etkili olabilir.

Lökositlerde MRP1 ekspresyonu tespit edilmiştir. MRP1'in fizyolojik rolü, lökositlerdeki ekspresyonu ile daha da yaygın ve etkili hale gelmiştir (Deen M.V.D 2005).

MRP1 gen ifade düzeylerinin, gama glutamil sisteinden bağımsız olan hücresel GSH seviyelerini belirlediği bildirilmiştir. Şeffe'ın çalışmasında, fare akciğerlerinde P-gp'nin yanında MRP1 de yüksek seviyede tespit edilmiştir. MRP1 (-/-) farenin normal

olarak geliştiği; yaşayabilirliği, fertilité özelliği ve serumdaki kimyasal parametreleri yanında hematolojik ve histolojik alanları açısından da MRP1 (+/+) ve MRP1 (-/-) fareler arasında fark tespit edilmediği belirtilmiştir. Bununla birlikte MRP1 (-/-) farenin kilo kaybı ve ölüme sebep olan etoposid gibi birçok ilaçların maruziyetlerine çok duyarlı olduğu saptanmıştır. MRP1 (-/-) farede GSH seviyelerinin özellikle akciğer, böbrek, kalp, testis ve iskelet kaslarında yükseldiği belirtilmiştir. Karaciğer ve ince bağırsak gibi az miktarda MRP1 eksprese eden organlarda GSH seviyeleri ise değişmemiştir. GSH miktarındaki artışın tripeptid GSH üretimi için oranı sınırlayan enzim olan Gama Glutamil Sistein sentezinin (γ GCS) yüksek seviyeleriyle ilişkili olmadığı saptanmıştır. MRP1 ekspresyonu, gama glutamil sisteinden bağımsız olan hücresel GSH seviyelerini belirlediğinden, MRP1'in GSH metabolizmasında rol oynadığı belirtilmiştir. Bir diğer çalışmada ise, karaciğer dokusunda MRP2 ve MRP5 mRNA seviyeleri vahşi tip fare ile karşılaştırıldığında, muhtemelen bir kompensasyon mekanizmasına bağlı olarak, MRP1 (-/-) farede yükselmiş, MDR1 ve MRP3 seviyeleri ise bu tip hayvanlarda değişmemiştir. MRP1 (-/-) farenin lökotrien üreten hücreler vasıtasıyla düşmüş LTC4 salgılaması yolu ile eşlik eden zayıflamış inflamasyon cevaplar gösterdiği bildirilmiştir.

MRP1 (-/-) faredeki gözlemler MRP1 ekspresyonunun ve fonksiyonunun azaldığını düşündürmektedir. Akciğer ve karaciğer için karsinojen aflotoksin B1 (mikotoksin) ile onun GSH konjugatı in vitro olarak MRP1 substratlarıdır. Bu sebeple MRP1 akciğerde aflotoksin B1'in zehirsizleştirilmesinde önemli bir rol oynayabilir. MRP1 (-/-) ve vahşi tip farelere sekiz ay aflotoksin verdikten sonra on iki ay süresince bir değişiklik görülmemiştir. İnsan denekler bu ölçüde maruz bırakılmadığından etki ölçülememektedir. Bu süreçte NRF2'nin (nükleer faktör E2 p45 ilgili faktör) birçok gen için transkripsiyon faktörü olduğu gözden kaçırılmamalıdır. Bu genler antioksidan savunma ve detoksifikasyon işleminde rol oynarlar. NRF2 son zamanlarda MRP1 için bir transkripsiyon faktörü gibi tanımlanmıştır. İlginç olarak sigara içiminin başlamasıyla tetiklenen anfizemin geç ve erken safhaları, vahşi tip fareyle karşılaştırılan NRF2 (-/-) farede daha iyi ayrılmıştır. İnflamasyon hücrelerinin sayısını başlıca makrofajlar oluştururlar ki, akciğer dokusu ve bronşioalveolar lavaj sıvısında NRF2 (-/-) farelerde yüksektir (Deen M.V.D 2005).



Şekil 2-4: İnsan Akciğerindeki ATP-bağlayıcı Kaset Proteinlerinin İmunohistokimyasal Olarak Boyanması.(Deen M.V.D 2005).

- A. Bronşiyel Epitelde P-gp'nin Apikal Ekspresyonu (KOAH hastası ; frozen section, antibody C219),**
- B. Bronşiyel Epitelde MRP1'in basolateral Ekspresyonu (KOAH hastası ; antibody MRPr1),**
- C. Bronşıyoalveolar lavaj Hücrelerinde MRP1 Ekspresyonu (Sağlıklı Birey; antibody MRPr1). Lu, lumen. Scale bar = 25 μ M.**

2.1.3.4. Malin Hastalıklarda MRP1

Tomas ve arkadaşları tarafından insitu hibridizasyon mRNA kullanarak tümör epitelinde gösterilen negatif bir hibridizasyon sinyalinin majör bileşeni olan normal epitelde MRP1 ekspresyonu yüksek olarak belirlenmiştir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada 100 NSCLC tümörünün hepsinde MRP1 pozitifdir. Ek olarak ekspresyon düzeyi normal bronşial ve DNA diploid karsinoma hücreleri karşılaştırıldığında, DNA anoploidilerde üç kat yüksek bulunmuş ve bu bağlantıyla MRP1 geni 16.kromozoma lokalize edilmiştir. MRP1'in aşırı ekspresyonu, NSCLC hastalarına uygulanan kemoterapide intrinsik direncin önemli bir faktörü olabileceği belirtilmiştir.

Yüksek MRP1 ekspresyonunun apoptozun artmasıyla sonuçlanabileceği verapamil deneyleriyle, MRP1 transfekte edilmiş bebek hamster böbreklerinde gösterilmiştir. Verapamilin apoptoz yapıcı ajan gibi rol oynadığı deneyde MRP1 negatif hücreler ve mutant MRP1 transfekte edilmiş kontrol hücreleri karşılaştırılmış, bu duruma MRP1 tarafından GSH'ın taşınması sırasında hücre içi GSH'ın azalması eşlik etmiştir. Aslında ekstraselüler GSH miktarının yükselmesi ile hücreyi ölümden koruyan mekanizmanın, MRP1 pozitif tümörlerin tedavisi için değerli olabileceği ortaya sürülmüştür.

Akciğer kanser hücrelerinde, ALL'de, HL60 kanser hücre soyunda MRP1 gen ifade düzeyleri yüksek olarak tespit edilmiştir (Van der Kolk DM 1998, PEC M. K. 2002, Burger H 1994). MRP1 gen ifade düzeyleri, kolon karsinoma hücre soyu olan HT29 hücrelerinde normal kolon hücrelerinden 40 kat daha fazla, fonksiyonu ise 2 kat daha hızlı bulunmuştur (KOK J.W. 2000). Glioma'da da MRP1 gen ifadesi bildirilmiştir (Calatozz C. 2005). AML'de MRP1 gen ifade seviyeleri yüksek bulunmuş ve tedavi ile ilişkilendirilmiştir (Van der Kolk 2000).

2.1.3.5. Malin Olmayan Hastalıklarda MRP1

KOAH hastaları ile yapılan çalışmada; bronş epitelinde MRP1'in gen ifade düzeylerinin azaldığı ve bu azalan gen ifade düzeylerinin kötü ciğer fonksiyonlarıyla ilgili olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, bronşial MRP1 gen ifade düzeylerinin Real Time PCR ile ölçülen mevcut sigara içiciliğinin MRP1 gen ifade düzeylerini etkilemediği gösterilirken, bu çalışmanın aksine, bir başka çalışma da akciğerlerde MRP1'in

fonksiyonel aktivitesinin sigara içiciliği ile oluşan toksik bileşenlere karşı antioksidan savunmada önemli bir rol oynayabileceği savunulmuştur (Deen M.V.D 2005, 2006).

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarından olan Crohn ve ülseratif kolit'te (Blokzijl H. 2008), Ateroskleroz (Mueller C.F.H. 2008) ve Romatoid Artrit (Hider SL. 2006) hastalıklarında MRP1 gen anlatım seviyelerinin arttığı yönünde bulgular mevcuttur.

Sistemik lupus eritamosusda yapılan araştırmada MRP1 fonksiyonunun uzun süre kortikosteroid tedavide attığı belirtilmektedir (Van der Kolk DM. 1998). Bütün bu hastalık gruplarının ortak özellikleri ise MRP1 gen anlatım seviyelerinin artışının LTC4'e bağlanarak inflamasyonda etkili olduğunun belirtilmiş olmasıdır.

Akciğer epitelinde, glandlarda, alveolar makrofajlarda MRP1'in fonksiyonu; hücre içi toksik yapıların atılması, antioksidan savunma veya LTC4'ün üretimi ile inflamasyonun gelişiminin sağlanmasıdır. MRP1 ekspresyonu akciğerde diğer solid organlardan daha yüksektir. MRP1 ekspresyonunun fonksiyonel artış veya azalışı akciğer hastalığının ilerleme ve gelişiminde, hava kirliliği ve toksik ajanların solunmasına karşı korunmada etkili olabilir (PEC M.K. 2002).

GSH konjugatları ve LTC4 MRP1'in özgül konjugatlarıdır. Ayrıca konjuge steroidler, E2 17 βG, Ostroron-3-sülfat, Dehidroepiandrosterone 3-sülfat, MRP1'in endojen substratlarındandır.

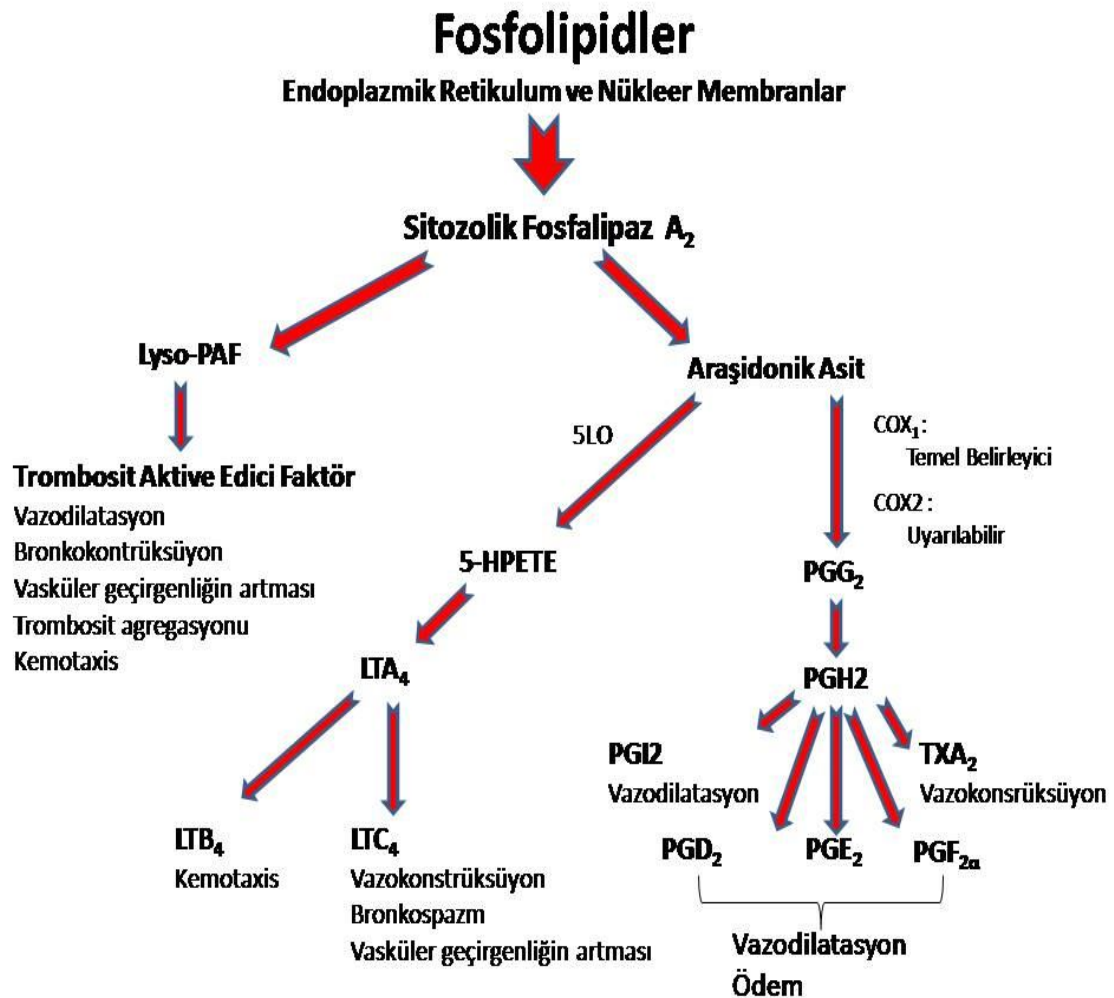
İnflamatuvar cevabın önemli mediyatörlerinden biri olan LTC4 (Lökotrien C4) MRP1'in endojen substratlarındandır.

LTC4, inflamasyon sahasına lökosit ve trombositlerin çağırılmasında görev alır (**Şekil 2-5**). Astımda trombosit fonksiyonları ve LTC4 seviyeleri artmaktadır. Yüksek LTC4 seviyeleri astım krizlerini tetiklemekte; hastalığın seyrini ve ilerlemesini arttırmaktadır. Bu nedenle astımın tedavisinde LTC4 reseptör antagonistleri ilaç olarak kullanılmaya başlanmış ve bu tedavinin steroid kullanımına yakın sonuçlarının olduğu gözlenmiştir (Yoshioka M 2009).

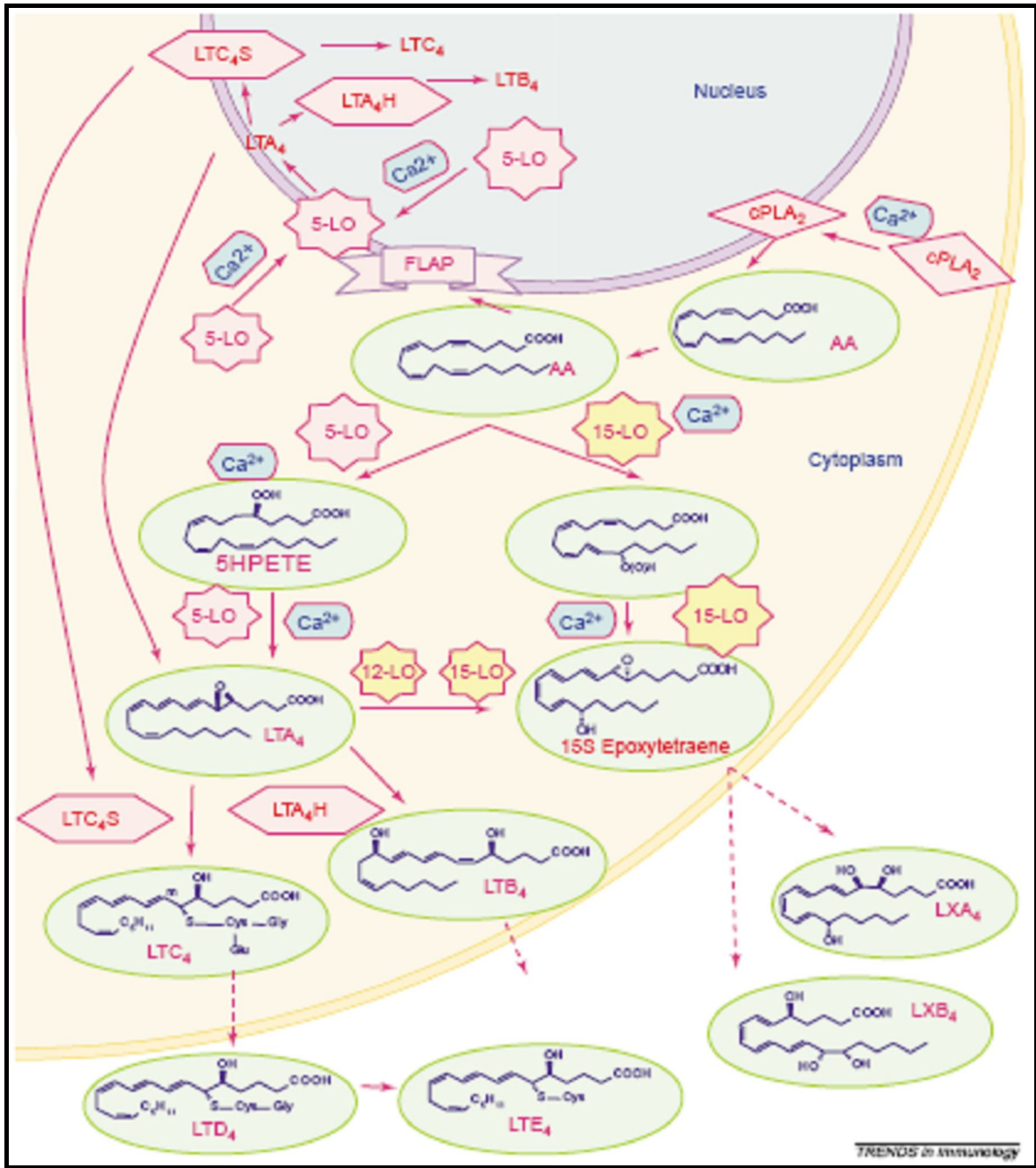
2.2. İnflamasyon

İnflamasyonun vasküler ve hücrel yanıtları, plazma hücrelerinden çıkan ve inflamatuvar bir uyararla meydana gelen kimyasal faktörlerle ortaya çıkar. İnflamasyon patolojisi, vasküler ve hücrel olaylar olmak üzere iki ana grupta toplanmaktadır.

İnflamatuvar vasküler olaylar; vasküler akımın ve damar çapının artması ve vasküler permeabilite artışıdır. Hücrel olaylar ise marjinsasyon ve yuvarlanma (lökosit göçü), adezyon, emigrasyon, fagositoz ve intravasküler yıkım, lökosit ürünlerinin ekstravasküler salınımı olarak beş alt grupta değerlendirilir. Lökosit adezyon ve migrasyonunda, adezyon moleküllerinin (selektinler) rolü vardır. Bu iki aşamada kimyasal araçlar iletişimi sağlamaktadır.



Şekil 2-5: Araşidonik Asit Metabolitleri, Lökotrien Oluşumu (WELLER P.F. 1983).



Şekil 2-6: İnflamasyonun Kimyasal Aracıları Ve Lökotrien Yolağı.

2.2.1. İnflamasyonun Kimyasal Aracıları

Kimyasal araçlar (medyatörler) hasarlı dokudan, hücrelerden veya plazmadan köken alan çeşitli maddelerdir. Şekil 2-6'da inflamasyonun kimyasal araçları ve lökotrien yolağı görülmektedir (Weller P.F. 1983, O'Byrne PM 1997).

1) Vazoaktif aminler; histamin, serotonin: Akut inflamatuvar ataklarda etkilidirler.

Vazodilatasyon permeabilite artışı ile ödem ve mukus sekresyonuna neden olurlar.

2) Plazma proteazları;

- a. Kininler; bradikinin, serotonin: Hücre aktivasyonunda görevlidirler.
- b. Kompleman sistemi; C3a, C5a, C5b-9: Savunma mekanizmasının aktivasyonu ile immün yanıt oluşumunda görevlidirler.
- c. Koagülasyon-fibrinolitik sistem (FDP): Fibrin yıkım ürünlerinin artışı, dolaşımda hücre aktivasyonları sonucunda trombositlerin aktive olarak pıhtı oluşturmaları ve oluşan pıhtının eritilmesi için fibrinolitik sistem enzimleriyle fibrin yıkım ürünlerinin plazmada artmasıdır.

3) Araşidonik asit metabolitleri (Şekil 2-5):

- a. Siklooksigenaz yolu (prostaglandinler): COX 1 ve COX2 enziminin etkisiyle PGG₂ oluşumu ve buradan PGI₂(vazodilatasyonda), PGD₂, PGE₂, PGF₂ vazodilatasyon ödem yaparlar. Tromboksan A₂ vazokonstriksiyon etkileri oluşturarak inflamasyona katılırlar.
- b. Lipoksigenaz yolu (lökotrienler, 5-lipoksigenaz enzimi aracılığıyla 5-hiperoksi eikosa tetra enoik asit (HPETE) ve hidroksi eikosa tetra enoik asit (HETE) oluşur; sonrasında ise LTA₄ oluşur. LTA₄, metabolitleri olan LTC₄ ve LTB₄'e dönüşür. Sisteinil lökotrienler vazodilatasyona ve diğer hücreleri (endotel, trombosit, lökosit) aktif hale geçirerek inflamasyonun gelişimine katkıda bulunurlar.

4) Lökosit ürünleri serbest-oksijen radikalleri: Hücredeki protein ve lipidleri etkileyerek inflamasyonu arttırırlar.

5) Trombosit aktive eden faktör (TAF): Trombosit aktivasyonu ile, trombositlerden ADP, LTC₄ gibi koagülasyona ve inflamasyona yol açan maddelerin salgılanmasını sağlar. Vazodilatasyon, bronko konstruksiyon, vasküler geçirgenlik, kemotaksisi sağlar.

6) Sitokinler : Hücre aktivasyonu.

7) Büyüme faktörleri : Rejenerasyon için önemlidir.

8) Diğer araçlar (medyatorlar)

2.2.2. Alerjik İnflamasyon

Alerjik inflamasyonun oluşumunda çok çeşitli mediyatörlerin katkısı vardır, bunlar arasında güçlü biyolojik etkileri nedeniyle lökotrienler önemli rol oynarlar. Lökotrienlerin fizyolojik etkilerinin anlaşılması yıllar öncesine dayanmasına karşın tam olarak tanımlanmaları uzun bir sürecin sonunda 20 yıl kadar önce gerçekleşmiştir (Faruk Özer 2005).

2.2.3. Lökotrienlerin Sentezi

Lökotrienlerin öncül molekülü fosfolipid yapısındaki araşidonik asittir. Araşidonik asit reseptör aktivasyonu, antijen-antikor etkileşimi, mikroorganizmalar ve fiziksel etkiler gibi çeşitli biyolojik sinyallere yanıt olarak fosfolipazlar (PLA2 ve PLC) tarafından fosfolipid tabakadan serbestleştirilir. Serbestleşen araşidonik asitten eicosanoidler olarak bilinen farklı farmakolojik etkileri bulunan aktif moleküller oluşur. Eicosanoidler arasında bulunan ve prostanoidler olarak tanımlanan prostaglandinler (PG) ve tromboksan A2 (TxA2) sentezi siklooksigenaz (COX) yolu ile oluşurken, lökotrienler 5-lipooksigenaz (5-LO) enziminin başlattığı metabolik süreç ile sentezlenir. Aktive 5-LO hücre membranında iki ayrı katalitik aktivite ile araşidonik asitten önce çok kısa yarılanma süresine sahip unstabil bir ara molekül olan 5-HPETE (5-hidroperoksi eicosa tetraenoik asit) oluşumu ve daha sonra 5-HPETE'nin epoksi lökotrien A4'e dönüşümünde rol oynar. Lökotrien A4 bütün lökotrienlerin sentezinde ortak ara basamak olup LTA4 hidrolaz aracılığı ile LTB4'e ya da glutathion-S-transferaz sınıfı bir enzim olan LTC4 sentetaz aktivitesi altında glutathion ile konjuge olarak peptidolökotrien LTC4'e metabolize olur. Oluşan LTC4 ekstraselüler ortama taşınarak burada γ -glutamil transpeptidaz tarafından sisteinil glisinil derivativesi LTD4'e dönüştürülür. LTD4'ten ise dipeptidaz aktivitesi ile sisteinil derivativesi olan LTE4 oluşur (**Şekil 2-5**). LTC4 ile birlikte metabolitleri olan LTD4 ve LTE4 topluca "*sisteinil lökotrienler*" ya da "*peptidolökotrienler*" olarak tanımlanırlar (O'Byrne PM 1997, Mayatepek E 1995, Hoffmann EF. 1998). Lökotrienlerin öncelikle mast hücreleri, bazofiller, eozinofiller ve makrofajlar gibi astım patogeneğinde rolleri olan birçok enflamatuvar hücre tarafından sentezlenebildiği bilinmektedir. Ayrıca nötrofiller, trombositler, lenfositler, endotel hücreleri ve eritrositlerin de lökotrienleri sentezleyebildiği gösterilmiştir (Henderson WR Jr.1994). Lökotrienler, birçok hücre tarafından sentezlenmelerine karşın, sentezlenen lökotrien tipi ve miktarı hücre

değişkenlik gösterir. Çoğu hücre LTB₄ ya da LTC₄ sentezlemesine karşın, her ikisini birlikte sentezleyemezler. Akciğerlerde sentezlenen LTC₄, başlıca aktive eozinofiller ve IgE aracılı uyarı sonrasında mast hücrelerce sentezlenirken, LTB₄ daha çok nötrofiller ve alveol makrofajlarından kaynaklanır (Chung KF 1995).

2.2.4. Lökotrienlerin Yıkımı ve Atılımı

LTB₄, ω-oksidasyona uğrayarak 20-OH ve 20-COOH metabolitlerine dönüşür ve bu şekilde inaktive olur. Sisteinil lökotrienler ise başlıca üç yolla yıkıma uğrarlar. Birincisi LTE₄'ün ω-hidroksilasyonu ve karboksilasyonudur. Bu süreç sonunda 20-carboxy-LTE₄, 18-carboxydinor-LTE₄, 16-carboxytetranor-LTE₃ ile insanda intravenöz LTE₄ uygulaması sonrasında idrarda saptanan başlıca metabolitler olan 16-carboxy-Δ¹³-tetranor-LTE₃ ve 14-carboxyhexanor-LTE₄ oluşur. İkinci yol, N-acetyl-LTE₄ oluşumu olup bu metabolit de ω-hidroksilasyon ve karboksilasyona uğrar. Sonuncu yıkım yolu ise hipoklorik asit üretebilen aktive polimorf nüveli lökositlerin varlığında myeloperoksidasyon olup, enflamatuvar ortamda gerçekleşir (Chung KF 1995).

2.2.5. Lökotrienlerin Biyolojik Etkileri

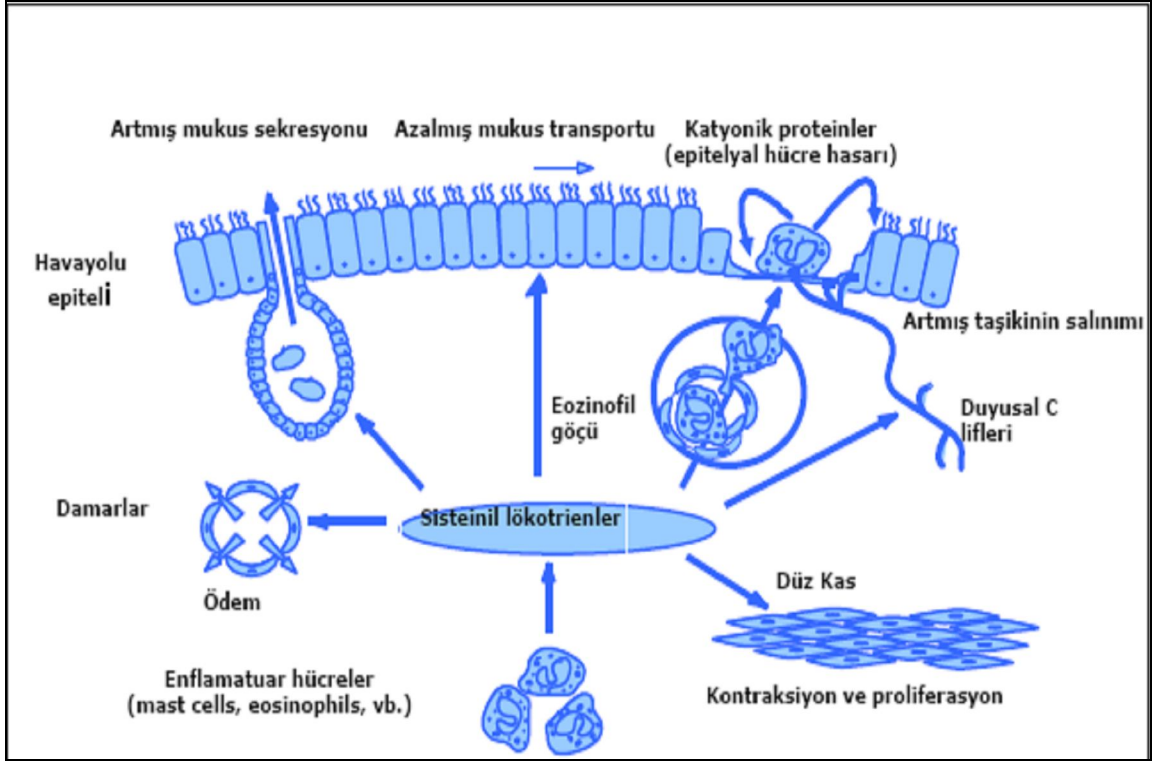
Lökotrienler lokal ya da sistemik etkileri ile genel olarak enflamatuvar yanıtta rol oynayan ve bazı kronik enflamatuvar hastalıkların gelişiminden sorumlu mediatörlerdir. Sisteinil lökotrienlerin astım patogenezinde önemli yeri bulunurken, LTB₄'ün ise diğer enflamatuvar süreçlerde etkili olduğu ileri sürülmüştür (Mayatepek E 1995). LTB₄'ün en önemli biyolojik aktivitesi lökositler ve nötrofiller üzerine kemotaktik etkisidir. Ayrıca lökositlerin endotelial adezyonu ve ekstrasvasküler aralığa migrasyonunu artırdığı saptanmıştır. Lökositlerden süperoksid anyonları ve çeşitli granül içeriklerinin salınımını uyardığı bildirilmiştir.

Lökotrienlerin insan akciğerinde nötrofiller için güçlü kemoatraktan olduğu bilinmektedir. Nötrofillerin ise nokturnal astımda rolü olduğu ileri sürülmüş ve fatal astımda postmortem incelemelerde hava yollarında yoğun olarak bulunduğu gösterilmiştir. LTB₄ özellikle IL-5 ile aktive olmuş eozinofiller için de kemoatraktan özelliğe sahiptir. Öte yandan, LTB₄'ün T lenfositlerce üretilen ve alerjik hastalıklarda gözlenen eozinofilide rol oynayan IL-5 sentezini uyardığı, ayrıca B lenfositlerin IgE

sentezlemesini sağlayan IL-4'ün etkisini kuvvetlendirdiği gösterilmiştir (Claesson HE 1999, Larsen JS 1996). Sisteinil lökotrienlerin hava yollarında en iyi bilinen aktivitesi düz kas kontraksiyonudur (**Şekil 2-7**). Bronkokonstriktör etki gerek sağlıklı gerekse astımlı bireylerde in vivo koşullarda gösterilmiştir. Hem büyük hem de küçük hava yollarının düz kaslarının sisteinil lökotrienlere konstriktör yanıt verdiği in vivo ve in vitro çalışmalar ile saptanmıştır. Bu aktivitenin benzer etkili diğer mediatörlere göre ayırdedici özelliğinin çok daha uzun süreli oluşu yanında bilinen en güçlü endojen bronkokonstriktör ajan oldukları bildirilmektedir. Histamin ile karşılaştırıldığında bronkokonstriktör etkileri izole insan bronşu üzerine **1000** kat fazladır. İn vivo çalışmalarda ise LTC4 ve LTD4 inhalasyonu sonrasında gözlenen bronkokonstiktör yanıtın da histamine göre 1000-5000 kat daha güçlü olduğu saptanmıştır. LTE4'ün bronkokonstriktör etkisi, in vitro koşullarda, LTC4 ve LTD4'ün etkilerine eşit olduğu halde, in vivo ortamda, LTD4'e göre 10 kat zayıftır; ancak etki süresi daha uzundur (Claesson HE 1999). Sisteinil lökotrienlerin bronkokonstriktör etkileri kendi farmakolojik özellikleri nedeniyle doğrudan olduğu gibi, kısmen de endojen nöropeptid salınımını uyarıcı özelliklerinden dolayı indirekt olarak ortaya çıkar (Hay DW 1995). Lökotrienlerin havayolu aşırı cevaplılığı üzerine de etkilerinin olduğu ve histamine karşı havayolu cevaplılığını üç kata kadar artırdıkları belirlenmiştir (Faruk Özer 2005).

Sisteinil lökotrienler, histamine göre 10-1000 kat daha kuvvetli olan mikrovasküler permeabilite artışı yoluyla damar dışına enflamatuar hücre göçünü kolaylaştırarak ve plazma sızıntısına neden olarak enflamasyonun yoğunlaşmasına katkıda bulunurlar. Mukus hipersekresyonu lökotrienlerin gerek goblet hücreleri gerekse submukoz glandlar üzerine etkileri sonucu ortaya çıkar (Claesson HE 1999, Chung KF 1995, Dahlen SE.1998, Larsen JS 1996, Churg KF 1997). Astımlılarda, 4 saat sonunda LTE4 inhalasyonunun, havayollarındaki eozinofil ve daha az oranda da nötrofil sayısının artmasına neden olduğu bronş biyopsileri ile gösterilmiştir. LTD4'ün in vitro koşullarda insan eozinofilleri için oldukça güçlü ve spesifik kemoatraktan özelliği bulunduğu, astımlılarda ise LTD4 inhalasyonunun indüklenmiş balgamda eozinofil sayısını artırdığı saptanmıştır. Sisteinil lökotrienlerin eozinofil göçünü uyardığı kanıtlanmış olmasına karşın bu etkinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, doğrudan etkisinin yanında, epitel hücrelerinden IL-5 salınımını uyarma yolu ile olabileceği de ileri sürülmektedir. Havayollarında düzkas proliferasyonu ve remodelling (yeniden yapılanma) gelişiminde katkıları olabileceğini

gösteren bulgular da vardır (Claesson HE 1999, Dahlen SE.1998, Hay DW 1995). Sisteinil lökotrienlerin, sonuçta, astımın karakteristik özellikleri olan hava yolları obstrüksiyonu, bronş aşırı cevaplılığı ve eozinofil infiltrasyonu üzerine doğrudan etkili olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 2-7: Sisteinil Lökotrienlerin Hava Yolları Üzerine Etkileri (Faruk Özer 2005)

2.2.6. Lökotrienlerin Farmakolojik Etkileri

Sülfidopeptid LT'ler düz kaslarda kasıcı etkilidirler. Bu etkinin mekanizması, ekstreliiller Ca^{++} 'la ilgili olmaksızın LT'lerin intraselliiler Ca^{++} 'u etkilemesi ve onu serbest bırakmasına bağlıdır. Bu kasıcı etkinin Ca^{++} ' kanal blokerleri ile kısmen ve fakat TMB-8 gibi intraselliiler Ca^{++} ' antagonisti ile tamamen önlenmesi bu mekanizmayı doğrulamaktadır (Şule Gök 1992). Holroyde ve ark. (Holroyde MC 1981) kimyasal olarak saf LTC₄ ve LTD₄'in insanlarda bronkokonstriktif olduğunu atopik olmayan gönüllülerde yaptıkları çalışmalarda gösterilmişlerdir. Bu etki, histamin ve metakoline göre geç başlamakta, uzun sürmekte ve potensiyel yönünden histaminden çok daha güçlü olarak ortaya çıkmaktadır. İn vitro çalışmalarda LT'lerin histamin ve metakolinin bronkokonstriktör yanıtını artırdığı gösterilmiştir (Holroyde MC 1981). İnsanlarda yapılan çalışmalar, SRS-A'nın astımda esas rol oynadığı hipotezini desteklemektedir

(Lee TU. 1981). LT'ler histaminden farklı olarak etkilerini daha çok akciğerin periferik hava yollarında göstermekte, histamin ise daha çok santral hava yollarında etkili olmaktadır. Ani hipersensitivite olaylarında bronkokonstriksiyon ile beraber mukus artışının da birlikte oluşu LT'lerin bu etkide de rolü olabileceğini düşündürmüştü ve bu konuda yapılan çalışmalarda histaminden daha güçlü olarak mukus artışına yol açtığı gösterilmiştir (Gök Ş. 1992). Alerjik rinitli hastaların burun sekresyonunda ve akut astımlı hastaların plazmalarında LT'lere rastlanmıştır. Bîsgaard ve ark. (Bisgaard H 1986) LTD₄'ün topikal olarak uygulanması ile burun mukozası kan akımının ve burun hava direncinin doza bağımlı olarak arttığını, ancak histaminle görülen kaşıntı ve burun sekresyonunda artış olmadığını göstermişlerdir. Bu bulgular LT'lerin alerjik rinitteki rolünü ortaya koymaktadır. LT'lerin pulmoner ödem oluşmasında katkısı olabileceği deneysel olarak oluşturulan akut akciğer zedelenmesinde mikrovasküler permeabilitede değişiklik yapmasının gözlenmesiyle ortaya konmuştur. Ancak bu etki, eksojen LT'lerle oluşturulduğu halde, endojen LT'lerin bu olaydaki katkıları açık olarak belli değildir. Sulfidopeptid LT'ler deneysel olarak intratrakeal verildiğinde LT reseptör blokeri ile önlenen, indometazin ile önlenemeyen doza bağımlı olarak trakea mikrovaskülatüründe perméabilité artımı yapmıştır. Antijenle karşılaşma sonrası bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısında histamin ve PG düzeyi ile birlikte LT düzeyinin de yüksek bulunması, LT salınımının hücre aktivasyonu ve inflamatuvar hücre sayısında artma ile ilgili olabileceğini vurgulamaktadır. Bakteriyel endotoksinlerin bazofillerden histamin, nötrofillerden de LT salınmasına yol açması, bakteriye ve enfeksiyonlara bağlı olarak gelişen astım ataklarında LT'lerin rolü olabileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte, LT'lerin etkilerinin çok kısa süreli oluşu ve antagonistleri ile olayın tamamen önlenemeyişi, bu maddelerin ancak olayı başlatmada rol oynadığını düşündürmektedir. LT'lerin oluşturdukları etkiler yönünden aralarında farklılıklar olduğu gibi bu etkiler türler arasında da farklıdır. Ancak LT'lerin anestezi almış ve almamış hayvanlarda akciğer fonksiyonlarını aynı derecede azaltmış olmaları bu etkilerin anesteziklerle ilişkili olmadığını göstermektedir (Gök Ş. 1992). Vasküler dokunun LT'leri üretebileceği bulgusuna ek olarak damar düz kas hücrelerinde LT'lere özgü reseptörlerin saptanması, bu maddelerin kan akımının düzenlenmesinde ve damar direncinde rol oynadıklarını göstermektedir. LT'ler izole kalpte negatif inotrop etki gösterirler ve koroner kan akımını azaltırlar. Yapılan çalışmalarda bu iki etkinin birbirinden bağımsız olduğu görülmüştür (Samuelsson B. 1987). Koroner kan akımını azaltmada güç sırası LTC₄ > LTD₄ > LTE₄ şeklindedir.

2.2.7. Lökotrien Reseptörleri

Lökotrienler biyolojik etkilerini özgül reseptörleri aracılığı ile gösterirler. Farklı biyolojik aktiviteleri nedeniyle LTB_4 ve sisteinil lökotrienler için iki ayrı grup reseptör varlığı gösterilmiştir. LTB_4 için çeşitli dokularda ve polimorf nüveli lökositlerde *BLT-reseptör* olarak adlandırılan yüksek afiniteli ve düşük afiniteli olmak üzere iki farklı reseptör tanımlanmıştır. G-protein çifti yapısındaki LTB_4 reseptörlerin ligand bağlama çalışmaları ile başta polimorf nüveli lökositler ile birçok dokuda bulunduğu saptanmıştır. Yüksek afiniteli BLT-reseptörler kalsiyum iyon mobilizasyonu ve kemotaksise, düşük afiniteli reseptörler ise hücre degranülasyonu ve oksidatif metabolizmaya aracılık ederler (Claesson H.E. 1999, Dahlen S.E. 1998). Sisteinil lökotrien reseptörleri (CysLT), CysLT1 ve CysLT2 reseptörleri olmak üzere iki alt gruba ayrılır. Farklı türlerin bazı dokularında her iki grup CysLT reseptörü de (guinea pig trakeası) bulunurken bazılarında ise CysLT1 (insan bronşları ve rat akciğeri) ya da CysLT2 (koyun trakeası) reseptörünün ağırlıklı olarak bulunduğu gösterilmiştir. Bu farklılık aynı tür içinde de gözlenmiştir. Sisteinil lökotrienlerin insan hava yollarındaki hava yolu düz kas kontraksiyonu, düz kas proliferasyonu, plazma eksüdasyonu, mukus hiper sekresyonu ve eozinofil göçü gibi çoğu biyolojik etkileri CysLT1 reseptörü aracılığı ile ortaya çıkarken vasküler etkilerinin gelişiminde CysLT2 reseptörü rol oynar (Claesson HE 1999, Dahlen SE 1997).

2.2.8. Lökotrien İnhibitörleri

Lökotrienlerin astım patogenezinde rol oynayan önemli ve güçlü mediatörlerden olduğu bilinmektedir. Astımdaki hava yolu enflamasyonuna bağlı akut ve kronik değişikliklerin birçoğunun gelişimine lökotrienlerin katkısı konusunda kuşku yoktur (Claesson HE 1999, O'Byrne PM 1997). Bu nedenle astım tedavisinde lökotrien aktivitesinin selektif olarak engellenmesi üzerinde durulmuş ve buna yönelik ilaçların geliştirilmesi hedeflenmiştir. İn vitro ve hayvan çalışmaları bulgularına dayanılarak kortikosteroidlerin fosfolipaz A2 enzimini inhibe ettiği ve lökotrienlerin oluşumunu engellediğine inanılmış ise de insan çalışmaları kortikosteroidlerin in vivo lökotrien sentezi üzerine çok az etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca inhale kortikosteroid tedavinin üriner LTE_4 düzeylerini değiştirmedeği saptanmıştır. Bu nedenle güçlü antienflamatuar etkilerine karşın, kortikosteroidlerin astımlı hastalarda lökotrien yolunu

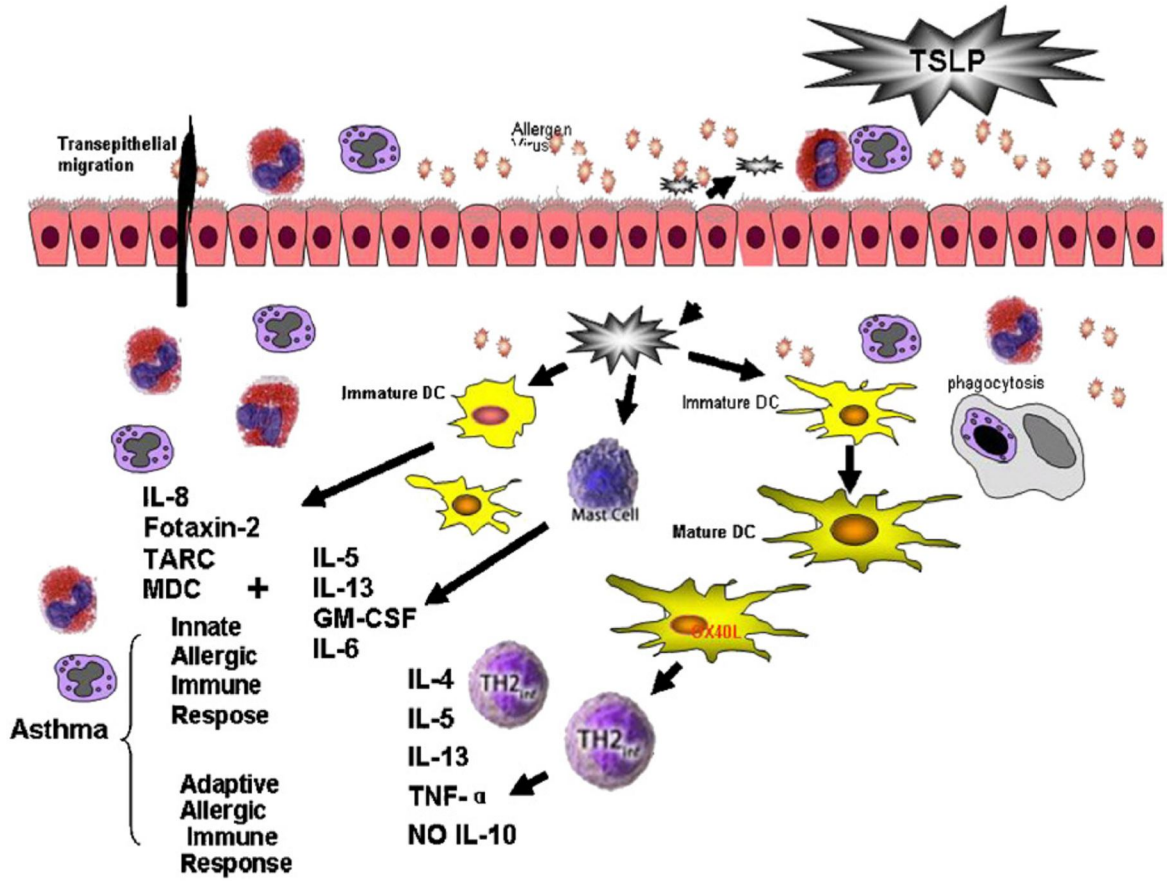
etkilemiyor görünmeleri dolayısıyla, bu noktada aktivite gösteren farmakolojik ajanların geliştirilmesi üzerinde çalışılmıştır (Claesson HE 1999, Dworski R 1994).

Lökotrien aktivitesinin modifiye edilmesini amaçlayan ilaçlar genel olarak antilökotrienler olarak adlandırılırlar. Bu tür farmakolojik yaklaşımlar başlıca iki strateji gözetirler; bunlardan birincisi lökotrien sentezinin inhibisyonu, diğeri ise lökotrienlerin reseptörlerine bağlanmasının bloke edilmesidir. Lökotrien sentez inhibitörleri enzimin aktif kısmına bağlanarak doğrudan ya da 5-lipooksigenaz aktive edici proteine (FLAP) bağlanarak indirekt yolla 5-lipooksigenaz aktivitesini engelleyerek etki etmektedirler. Bu yolla hem LTB₄ hem de sisteinil lökotrienlerin sentezinin engellenmesi mümkün olabilmektedir. Reseptör antagonistleri ise sisteinil lökotrienlerin ya da LTB₄'ün özgül reseptörlerine kompetitif olarak bağlanarak lökotrienlerin biyolojik aktivitelerinin ortaya çıkışını engellemektedirler. Sisteinil reseptör antagonistleri özgül olarak CysLT1 reseptörünü bloke ederler. Çok çeşitli antilökotrien molekül üzerinde çalışılmakla birlikte bugüne kadar sentez inhibitörü olarak *zileuton* ile sisteinil lökotrien reseptör antagonisti olarak *montelukast*, *zafirlukast* ve *pranlukast* kullanıma sunulmuştur (Chung KF 1995, Drazen JM 1997).

Astım tedavisinde amaç hava yollarında mevcut enflamasyonun kontrol altına alınmasıdır. Bu nedenle ulusal ve uluslararası astım tedavi rehberlerinde antienflamatuar ilaçlar ilk sırada önerilmektedir (GINA 2007). Bunlar arasında yer alan ve öncelikle önerilen kortikosteroidlerin hava yollarındaki inflamatuvar süreç üzerine etkileri kanıtlanmış olup kortikosteroidlerin astımın gerek uzun süreli kontrolü gerekse akut ataklardaki etkinlikleri yanında hava yolu enflamasyonunun direkt ve indirekt belirteçlerinde baskılanma sağladığını gösteren çok sayıda araştırma mevcuttur (Haahtela T. 1994, Rowe BH. 1992). Bu bağlamda kortikosteroidlerin astımlıların kan ve balgam örneklerinde eozinofil sayısı ve ECP (eozinofilik katyonik protein) düzeylerinde azalmaya neden olduğu da bu çalışmaların bulguları arasında yer almaktadır (Oh JW 1999, Bacci E. 2002). Ancak alerjik enflamasyonun etkin mediatörlerinden sisteinil lökotrienlerin sentezinin in vitro koşullarda kortikosteroidlerce inhibe edildiği gösterilmesine karşın, in vivo çalışmalarda bu etkinin gözlenmediği; yüksek doz oral kortikosteroid tedavisine rağmen astımlıların hava yollarında sisteinil lökotrienlerin saptandığı bildirilmektedir (Laviolette M. 1999, Pavord I.D. 1999). Bu nedenle astım tedavisinde kortikosteroidler yanında bu noktada etkili olması beklenen antilökotrien ilaçlar üzerinde durulmaktadır.

2.2.9. IgE Aracılı Alerjik Reaksiyon

Allerjen inhalasyonu, IgE aracılı mekanizma ile çeşitli hücrelerde bir dizi karmaşık etkileşim sonucunda inflamatuvar ve nörojenik mediatörlerin salınımına yol açmaktadır. IgE aracılı alerjik reaksiyon erken ve geç dönem olmak üzere 2 aşamada gerçekleşmektedir. Erken dönemde mast hücreleri ve bazofillerin aktivasyonu ile mediatörlerin salınımı ve bunlara bağlı etkiler; geç dönemde ise salınan sitokinler ve kemokinlerin de etkisiyle inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu sonucunda ortamda eozinofil, nötrofil, makrofaj, lenfosit ve trombositlerin toplanması söz konusudur. Alerjik hastalıklarda enflamasyon bölgesinde T lenfosit infiltrasyonu olması T hücrelerin önemli rolleri olduğunu göstermektedir. Yardımcı T lenfositler sentezledikleri sitokinlere göre fonksiyonel olarak 2 alt gruba ayrılmaktadır. Th1 hücrelerin IL-2, IFN- γ ve TNF- α oluşturduğu, Th2 hücrelerin ise IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 salgıladığı bilinmektedir. Her iki grup hücreden IL-3 ve GM-CSF yapılabilir. IL-4 ve IL-13 birlikte IgE sentezinden sorumludur. IgE sentezi IL-12 ve IFN- γ ile baskılanabilmektedir. IL-5 ise eozinofillerin farklılaşması, aktivasyonu ve belki de apoptozun inhibisyonu ile dokularda uzun süre kalmalarını sağlayan temel selektif büyüme faktörüdür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, havayolu alerjik enflamasyonunda IgE sentezi ve eozinofilik cevapta yer alan allerjen özgül Th2 hücrelerin temel role sahip oldukları düşünülmekte olup alerjik hastalıkların gelişimine yatkın olan atopik yapılı bireylerde öncelikli olarak Th2 hücrelerde aktivasyon olduğu ve böylece inflamatuvar olaylar zincirinin başladığı kabul edilmektedir (şekil 2-8)(Sin B.A 1999, Ricci M. 1993, Van Cauwenberge P. 1999, Wanga Y. 2008).



Şekil 2-8: Solunum Yolu Epitelyal Hücrelerinin Astım Ve Alerjik Rinit Gelişimindeki Roller (Wanga Y. 2008)

2.3. Astım

2.3.1. Giriş

Astım kronik hava yolu inflamasyonu, diffüz reversibl hava yolu obstrüksiyonu ve bronş aşırı duyarlılığı ile karakterize edilen bir hastalıktır.

Hava yollarının (trakea, bronşiol, bronkus, son bronşiol) ana fonksiyonu, akciğere alınan ve akciğerden atılan havayı iletmek ve solunan havanın içeriğine karşı ilk savunma hattını oluşturmaktır. Hava yolları oksidatif stres üreten ajanlara, kirlenici, irrite edici patojenlere sürekli olarak maruz kalır ve bu nedenle solunum sisteminin yüzeyinin kompozisyonu çok önemlidir (Deen M.V.D 2005).

Sadece hava yollarındaki hücreler değil dolaşımdaki hücreler de akciğerin kanlanması ve maruz kaldığı ajanların etkilerini kana geçirmesi sebebiyle patojen

ajanlardan aynı oranda etkilenirler. Bu nedenle, astımlı kişinin kronik hava yolu inflamasyonu sonucu kandaki lökositleri ve savunmada, detoksifikasyonda devreye giren mekanizmaları sistemik olarak da etkilenir.

Üst solunum yolları; mukus salgılayan Goblet hücreleri ve Cilial hücreler gibi özelleşmiş hücre tiplerini içerirler. Alt solunum yollarının (respirator bronşiooller, alveol kanalları, alveol keseleri) işleyişi ise diffüzyon ile gaz değişimine katılır. Alveollerin epitel yüzeyi temel olarak iki tip hücreden oluşurlar; birinci tip hücre alveolar epitel, ikinci tip hücre, kübik alveolar epitel hücreleridir. Birinci tip hücreler dışta yassılaştırmış ve bu yolun toplam alveol yüzeyinin %95'i kadarını oluştururlarken, ikinci tip hücreler daha çokturlar ve sürfaktan üretirler (Deen M.V.D 2005).

Diffüz reversibl hava yolu obstrüksiyonunda, duyarlı kişilerde nöbetler halinde gelen hırıltı, nefes darlığı, göğüste sıkışma hissi ve öksürük yakınmaları vardır; bunlar özellikle gece, sabaha karşı görülürler. Spontan veya ilaçlarla tamamen ya da kısmen giderilebilirler.

GİNA (*Global Strategy for Asthma Management and Prevention*) 2007 verilerine göre astımın dünyadaki farklı bölgelerde görülme sıklığı: Yeni Zelanda ve Pasifik adaları'nda >%10, Güney Asya, Kuzey Amerika Kızılderilileri ve Eskimolar'da <%1, Avrupa'da %5-10, Türkiye'de çocuklarda %5-10, erişkinlerde >%5 olarak belirlenmiştir.

Kişisel risk faktörleri; genetik yapı, atopi, bronş hiperaktivitesi, cinsiyet ve etnik köken olarak sıralanabilir.

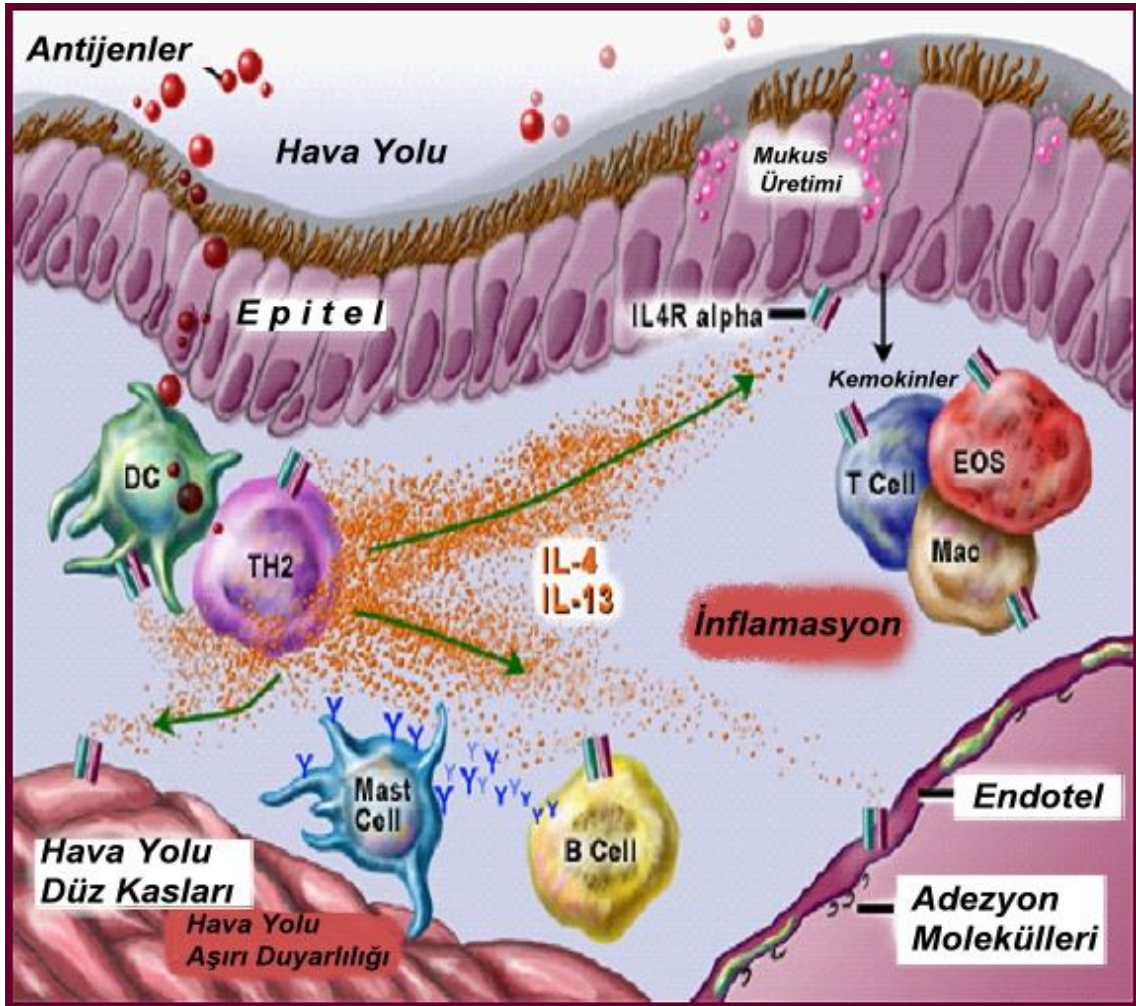
2.3.2. Astıma Yol Açan Çevresel Etkenler

Allerjenler, solunum sistemi enfeksiyonları, sigara, hava kirliliği, meslek, sosyoekonomik düzey, aile büyüklüğü, diyet, obezite astımın gelişimini etkileyen çevresel etkenlerdir. Astımı tetikleyen ajanlar arasında ise allerjen olarak ev tozu akarları, ev hayvanları, hamam böcekleri, küf mantarları, polenler yer alırken, solunum yolu inflamasyonu, egzersiz, hava kirliliği, besinsel katkı maddeleri ve ilaçlar da astımın tetikleyici ajanları arasında yer alırlar.

Astımın tanımında önemli yer tutan parametreler arasında sıralanan solunum foksion testinin (SFT) ölçümleri FEV1 (birinci saniye zorlu eksprasyon hacmi), PEF (tepe akım hızı) hava yolu obstrüksiyonu ve rezerv kapasitesi hakkında bilgi vermektedir. Astım tanısında klinik öykü, fizik muayene, değişken ve düzelebilen havayolu tıkanıklığı, hava yollarının aşırı yanıtlılığı astımın temel fizyolojik kanıtları arasında dikkate alınır. Bu arada olası alternatif tanıların dışlanması ve şu semptomlar önemlidir: Tekrarlayıcı karakterde; nöbetler halinde olması, daha çok gece ve/veya sabaha karşı gözlenmesi, kendiliğinden veya ilaçlarla hafiflemesi veya kaybolması, yakınmaların olmadığı, mevsimsel değişkenlik gösterebildiği dönemlerin varlığı önemlidir.

Astım tedavisinde yukarıda bahsi geçen durumlar hedef alınarak farklı yaklaşımlar getirilmiştir. **Steroidler**; inflamatuvar hücrelerin bronş mukozasında birikimi, bu hücrelerin aktivasyonu ve mediatör salınımını önler, mikrovasküler sızıntı ve ödemi azaltır, bronş düz kasında beta 2 reseptör sayısını artırır, sistemik steroid tedavisi atağın ağırlaşmasını ve erken rölapsları önler, morbiditeyi ve acil servise başvuru sayısını azaltır, **lökotrien reseptör antagonistleri**; sisteinil lökotrienlerin hedef hücrelerde bağlanarak etkilerini gösterdikleri lökotrien reseptörlerini bloke ederler, eozinofilik enflamasyonu önlerken, vasküler permeabilite, mukus sekresyonu ve bronkospazm da düzelme sağlarlar. Aspirin ve egzersiz astmasında, hafif persistan astmada ve inhaler steroid dozunun yükseltilmek istenmediği durumlarda düşük doz inhaler steroidle birlikte kullanılabilirler, **beta 2 agonistler**; adenil siklazı aktive ederek siklik AMP'yi arttırırlar ve bronkodilatasyon yaparlar, mast hücresinden mediatör salınımını inhibe ederler, mukosilier klirensi arttırırlar, vasküler permeabiliteyi azaltırlar, kolinerjik nöral iletiyi inhibe ederler (Churg K.F. 1997, Ricci M. 1993).

Astımlı havayolundaki inflamatuvar hücreler; mast hücreleri, eozinofiller, T helper 2 lenfositler, dendritik hücreler, makrofajlar, nötrofillerdir (**Şekil 2-9**).



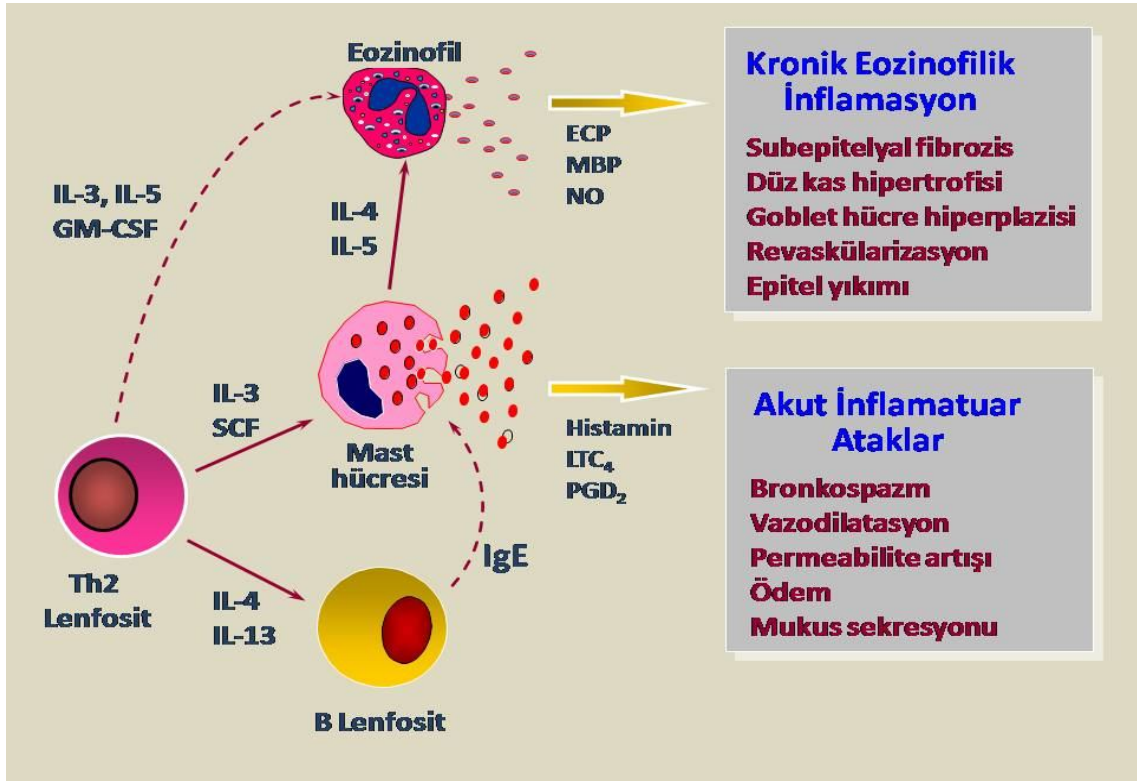
Şekil 2-9: Astımlı Havayolundaki İnflamatuvar Hücreler (GINA 2006).

2.3.3. Astım Patogenezinde Yer Alan Hava Yolu Yapısal Hücreleri

Astım patogenezinde; hava yolu epitel hücreleri, subendotelyumdaki düz kas hücreleri ve vasküler endotel hücreleri; astımda kronik hava yolu inflamasyonunda ise mast hücreleri, eozinofiller ve T-lenfositler rol oynar (Şekil 2-9).

Havayolu epitel hücreleri, virüs ve hava kirliliği ile ilişkili olarak inflamatuvar protein üretiminde görev alırlar. Havayolu düz kas hücresi inflamatuvar protein üretiminde görev alırken, endotel hücresi inflamatuvar hücre toplanmasında rol oynar. Fibroblast ve miyofibroblast konnektif doku üretimini, hava yolu sınırları inflamatuvar nöropeptid üretimini sağlarlar (Şekil 2-9).

Alerjik astımda immun cevaba karşı antijen sunan hücreler tarafından allerjenin tanınmasıyla birincil immun yanıt gerçekleşir. Çevresel ve genetik faktörler bu cevapta etkilidirler. Bu yanıtta Th2 hücreleri aktive olurlar (GINA 2006).



Şekil 2-10: T lenfosit Aktivasyonu Sonucu Gelişen Olaylar Ve İnflamasyon (GINA 2006).

Th2 hücre aktivasyonu ile salgılanan sitokinler (IL-3, IL-5, GM-CSF) eozinofillerin göçünü ve aktivasyonunu sağlarlar. IL-3 ve CSF mast hücre aktivasyonuna sebep olarak histamin, LTC₄, PGD₂ aracılığıyla, akut inflamatuvar atakların gelişiminde etkili olarak bronkospazm, vazodilatasyon, permeabilite artışı, ödem ve mukus sekresyonuna sebep olurlar (Şekil 2-10). IL-4, IL-13, IL-5, GM-CSF ve IL-3 allerjenler tarafından aktive edilen T hücrelerinden salgılanırlar. IL-4 aracılı hücre tetiğinin çekilmesi allerjene özgü IgE yapımını başlatır. Bu aşamada atopi gelişir ve alerjik semptomlar gelişmeksizin bir süre devam eder; IgE yüksek affinite ile mast hücredeki reseptörüne bağlanır. Mast hücrelerinde IgE molekülüne allerjenlerin bağlanması mast hücre aktivasyonu ve degranülasyona yol açar. Bu durum histamin, sitokin ve PAF salgılanması ile değişik etkilerin ortaya çıkmasına ve dolayısı ile bronkokonstrüksiyon, vazodilatasyon, sinir sitümülasyonu, mukus sekresyonuna yol açar. Geç yanıt; eozinofiller gibi inflamatuvar hücrelerin akciğere girmesiyle başlar ve endotel hücreleri T hücrelerinin aktivasyonuna yol açar. Astımda hava yolu daralmasında düz kas kontraksiyonu, ödem, yeniden yapılanmaya bağlı duvar kalınlaşması, mukus hipersekresyonu ve tıkaç oluşumu söz konusudur (Şekil 2-8)(GINA 2006).

2.3.4. Alerjik Astımda Lökosit

Astımda eozinofiller negatif bir role sahiptirler. Eozinofiller tarafından uyarılan bronşial hiper aktivitenin artışıyla bronşiyal epitel tabakasının yeniden yapılanmasına; IL-5'in eozinofiller tarafından salgılanması gecikmiş astım yanıtının gelişmesine neden olur. Eozinofil akümüasyonu alerjik astımın inflamasyonunda önemlidir. Kan damarları endotelinde eozinofillerin adezyonu, alerjik inflamasyonda eozinofil akümüasyonunun kritik aşamalarından birisini oluşturur. Eozinofiller, lökositler gibi adezyon molekülleri aracılığıyla endotel hücrelerine yapışırlar ve inflamasyon bölgesine göç ederler ve ilk aşamada spesifik karbonhidrat yapısıyla aktive olmuş endotelyum üzerindeki selektinle etkileşirler. Eozinofillerin adezyonunda E, P ve L selektinlerin rolü vardır.

Diğer taraftan, eozinofillerin trombositlere bağlanması, astımda adezyondaki artış nedenlerinden birini oluşturmaktadır. Sağlıklı kişilerde eozinofiller genellikle trombositlere bağlanmazken, alerjik astımda bağlanmaları trombositleri aktive eder. PAF ve IL-5 artışıyla eozinofillerin trombositleri aktiva etmesi sağlanır (Sin B.A. 1999, Gök Ş. 1992).

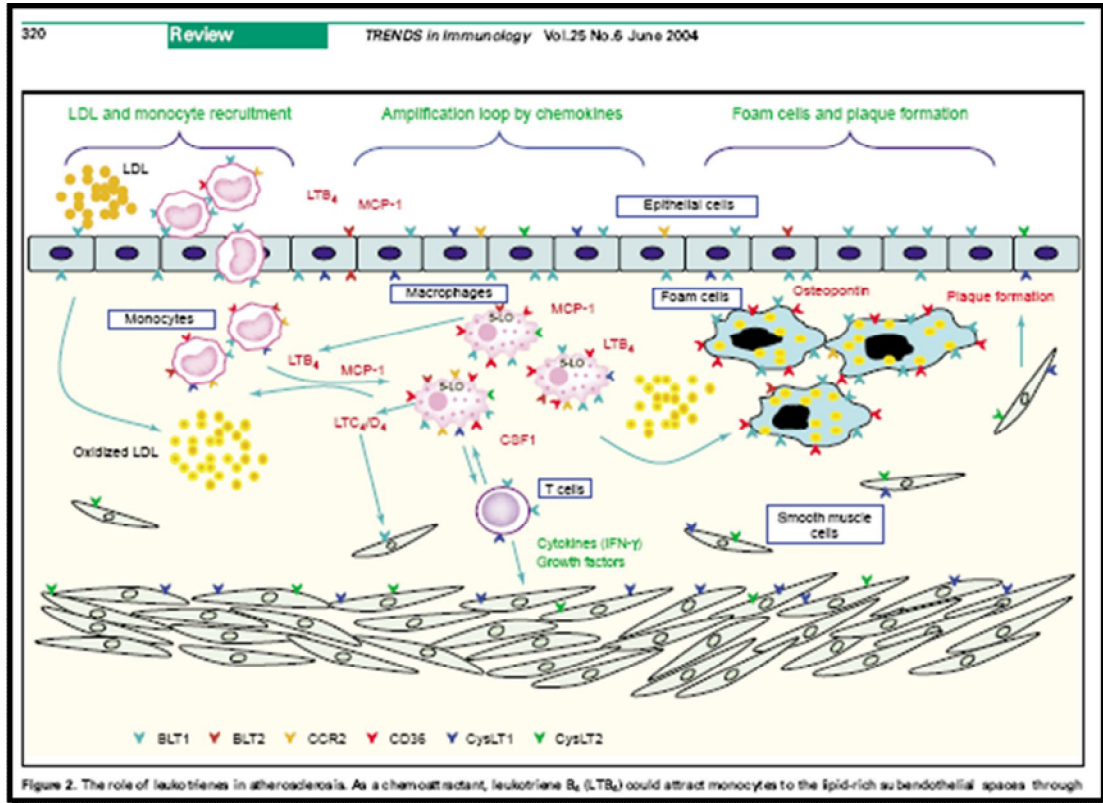
2.3.5. Astımda Trombosit Aktivasyonu

İnflamatuvar hastalıklarda ve özellikle alerjik astımda trombosit fonksiyonunun ve davranışının değişimi ile trombosit aktivasyonu gösterilmiştir. Astım atakları sırasında akciğer subendotelyumunda lokalize olmuş trombosit ve intravasküler kompartımanda trombositlerin varlığı gösterilmiştir. Ayrıca trombosit özümlü sekretuar granül ürünleri astım semptomları esnasında artmaktadır. Bu durum intravasküler trombosit aktivasyonunu göstermektedir. Bu aşamada özümlü kimyasal araçlar ve Trombosit Faktör-4(PF-4) ve Beta Tromboglobulin(BTG) salgılanır (Tutluoğlu B. 2005). Trombosit aktivasyonu, allerjenle karşılaşıldığında kısa bir sürede (10 dk. içerisinde) gerçekleşir. Alerjik astımda trombosit aktivasyonunun allerjenlere karşı cevapta doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir. Alerjik astımlıların trombosit yüzeylerinde yüksek afiniteli IgE reseptörü bulunmaktadır. Astım hastalarında IgE aracılığıyla trombosit aktivasyonu sonucu inflamatuvar araçlar serbest kalırlar.

Alerjik inflamasyon deney modelinde, pulmoner lökositlerin trombositlerle P-selektin aracılığıyla yapıştığı belirtilmiştir. Böylece P-selektin ekspresyonu yükselir; eozinofil–trombosit bağlanma kapasitesinin artması, ikincil yanıt ve geç yanıtta sirkülasyondaki trombosit ve eozinofillerin sayısının artmasını sağlar. Allerjen etki

sonrası dolaşımdaki trombosit lökosit kompleksinde trombosit formu değişkendir ve böylece trombosit, endotel ve eozinofil yüzeyine tutunabilir. İntravasküler trombosit aktivasyonun, allergene karşı verilen inflamatuvar yanıtın artefaktı olmadığı daha önce gösterilmiştir.

Trombosit aktivasyonu, erken astmatik cevapta dakikalar içerisinde birincil ve ikincil yanıtın her ikisinde de gerçekleşir. P selektin ekspresyonu, trombosit aktivasyonundan sonra hızla oluşur ve P selektin trombosit yüzeyine çıkar. β -TG düzeyleri P-selektin ekspresyonu takiben pik yapar. Antijen intravenöz olarak verildiğinde ise trombosit birikimi gerçekleşir ve böylece mast hücrelerinden histamin salgılanır. Astımda allergene maruz kalmayı takiben, inflamatuvar cevabı trombositler devam ettirirler. Bu, kemotaksiste trombositlerin rolünü aydınlatır(dokuya doğru göçünü önerir) ve böylece antijen sunan hücreler ve T hücresine karşı uyarı sinyalini geliştirir. Trombosit lökosit ilişkisinin artması, allergene maruziyet sonrasında 24 saat içerisinde gelişir (Şekil 2-11) (Pitchford S.C. 2006).



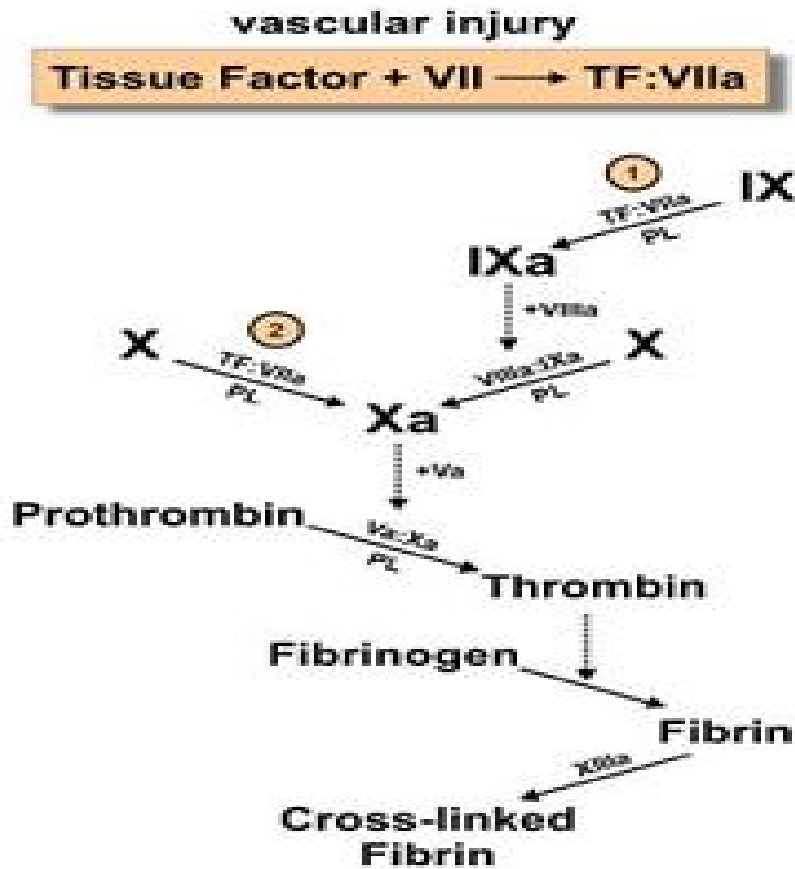
Şekil 2-11: Trombosit Ve Lökositlerin Salgıladıkları Maddeler Ve Etkileşimleri (Trends in Immunology 2004)

Astımda aktivasyonları ve fonksiyonları ile yer alan trombositleri yapı fonksiyon ve hücre etkileşimleri içerisinde incelemek mekanizmayı açıklamak açısından faydalı olacaktır.

2.4. Trombosit Yapı ve Fonksiyonları

2.4.1. Trombosit Yapıları

Hemostaz mekanizmasının üç önemli ögesi damar yapıları, koagülasyon sistemi ile trombositler ve fibrinolitik sistemdir. Travma, damar hasarı sonucu oluşan vazokonstrüksiyona ve kan akımının yavaşlamasına neden olur. Trombositler hasarlı bölgeyi reseptörleriyle fark ederler ve endotele yapışırlar. Adezyon ve agregasyonu takiben trombositlerden salınan maddeler hem koagülasyonda hem de inflamasyonda yer alan maddelerdir: serotonin, ADP, Ca, fibrinojen, PF4, β TG, Fak V bunlardan birkaçıdır (Paul A. 2007, Furman M.I. 1997, Von Hundelshausen P. 2007). Koagülan maddelerin salınımı sonunda fibrin oluşumu ile hasarlı bölge kapatılır (Şekil 2-12).



Şekil 2-12: Doku Hasarı Sonucu Fibrin Oluşum Yolağı.

İnflamasyon ve koagülasyon etkileşimini incelerken inflamasyonda artan ve azalan ajanların aynı zamanda koagülasyonda rol alan ajanlar olduğu dikkati çeker. Bu ajanları sıralayacak olursak;

İnflamasyonda artanlar :

- Doku faktörü (trombin)
- Negatif yüklü zar lipitleri
- Trombosit aktivitesi
- Fibrinojen

İnflamasyonda azalanlar :

- Trombomodulin
- Endotel hücreleri protein C reseptörü (almacı)
- Aktive protein C yarılanma ömründe kısalma
- Protein Z
- Damarsal heparin benzeri moleküller
- Fibrinoliz (PAI-1 artışı)

Trombin, koagülasyonda (fibrinojenden fibrin oluşumunda), pıhtılaşma faktörleri V, VIII, XI, XIII ve trombositleri aktive ederek prokoagülan bir etkiye sahiptir. Trombin; lökositlerin adezyon ve aktivasyonunu arttırarak inflamasyonu da arttırır. Trombin aktivasyonu güçlü bir nötrofil agonisti gibi davranan trombosit aktivatör faktörü (TAF) üretimini arttırır. Nötrofiller selektinlere bağlandığında bu etki daha da artar.

Selektinler, lökosit ve endotel hücreleri üzerindeki karbonhidrat bağlarına bağlanarak, lökosit trafiğinin düzenlenmesine katkıda bulunurlar. Trombosit ve endotelde bulunan P-selektin, trombin, histamin, protein kinaz C, kompleman gibi medyatörlerle uyarılabilir. Hücre aktive olduğunda yüzeye çıkarak lökositlerin endotele yapışarak yuvarlanmasında rol oynar. Trombositlerin trombinle aktivasyonu hem doku faktörü üretimini arttıran CD40 ligandını açığa çıkarır hem de IL-6, IL-8 gibi inflamatuvar sitokinleri arttırır. IL-6'nın artışının trombosit aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Bu durum ise inflamasyon ve tromboz ilişkisini gösterir.

Trombosit aktivasyonu bazı hastalıklarda artarak hastalığın seyrini önemli derecede etkiler. Diyabet (Feng B 2009), ateroskleroz (Furman ML 1998), astım (Tutluoğlu B. 2005), tıkanma(strok) (Ince B 1999) bu hastalıklar arasında yer alır.

Ortalama sayıları insanda $300000/\text{mm}^3$ olan trombositler, periferik yaymada küçük noktacıklar şeklinde görülür ve 2-5 μ . çap, 5-7 μ^3 . hacimleriyle vücudun en küçük kan hücreleridirler. Trombosit yapımı trombopoetin (TPO) tarafından düzenlenir. Dolaşımdaki ömürleri 8-10 gün kadar olup, bu süre sonucunda yaşlanan trombositler dalakda dolaşımdan ayıklanırlar. Yaşlanan veya aktive olan trombositlerde fosfatidil serin trombosit yüzeyine çıkar. Aneksin V; apoptozun başlaması sonrasında, trombosit yüzeyine çıkan fosfatidil serin(kısmen) ve eksi yüklü fosfolipitlere kuvvetli duyarlılık ile kalsiyum bağlar. Anneksin V bulunduran trombositler retiküloendotelial sistem elemanları tarafından dolaşımdan uzaklaştırılırlar (Feng B 2009, Gawez M. 2001).

Trombositin üç farklı yapıdan oluştuğu söylenebilir: Hücre zarı, kanaliküler sistem ve granüller (**Şekil 2-13**).

2.4.1.1. Hücre Zarı

Hücre zarı, trombosit fonksiyonunda önemli rol oynar. Hücre zarında çok miktarda fosfolipid ve daha az miktarda ise glikoprotein bulunmaktadır. Glikoproteinler normal endotel yüzeyine değil de hasarlı bölgeye bağlanırlar. Glikoprotein-Ib(GP-Ib) trombositin kollajene bağlanmasını, Glikoprotein-IIb(GP-IIb) trombositin Von-Willabrand Faktör(vWF)'e bağlanmasını, Glikoprotein-IIIa(GP-IIIa) ise trombositin trombosit fibrinojen molekülü aracılığıyla bağlanmasını sağlar (**Şekil 2-14**).

2.4.1.2. Kanaliküler Sistem

Prostaglandin çevirici enzim ve kontraktıl kalsiyum içerir.

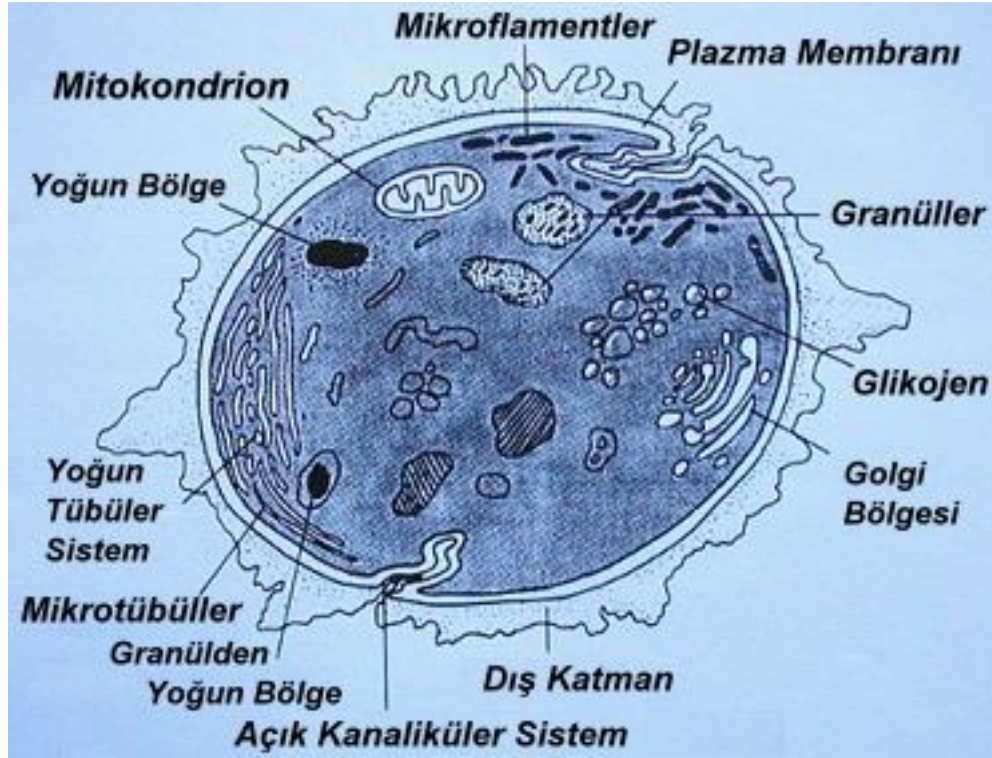
2.4.1.3. Granüller

Yoğun Granüller; Serotonin, adenosin di fosfat(ADP), Ca^{+2} içerirler.

α -Granüller; trombosit özel proteinler olarak Trombosit faktör-4(PF-4), Beta-tromboglobulin (β -TG), Trombospondin, Trombositten Türeyen Büyüme Faktörü

(PDGF), plasma proteinleri ile homolog olan fibrinojen, fibronektin, plazminojen, faktör I(Fak.I), faktör V(Fak V), faktör VIII(Fak.VIII), Von Willabrand Faktör(vWF) ve heparini nötralize eden protein içerirler (King S.M. 2009).

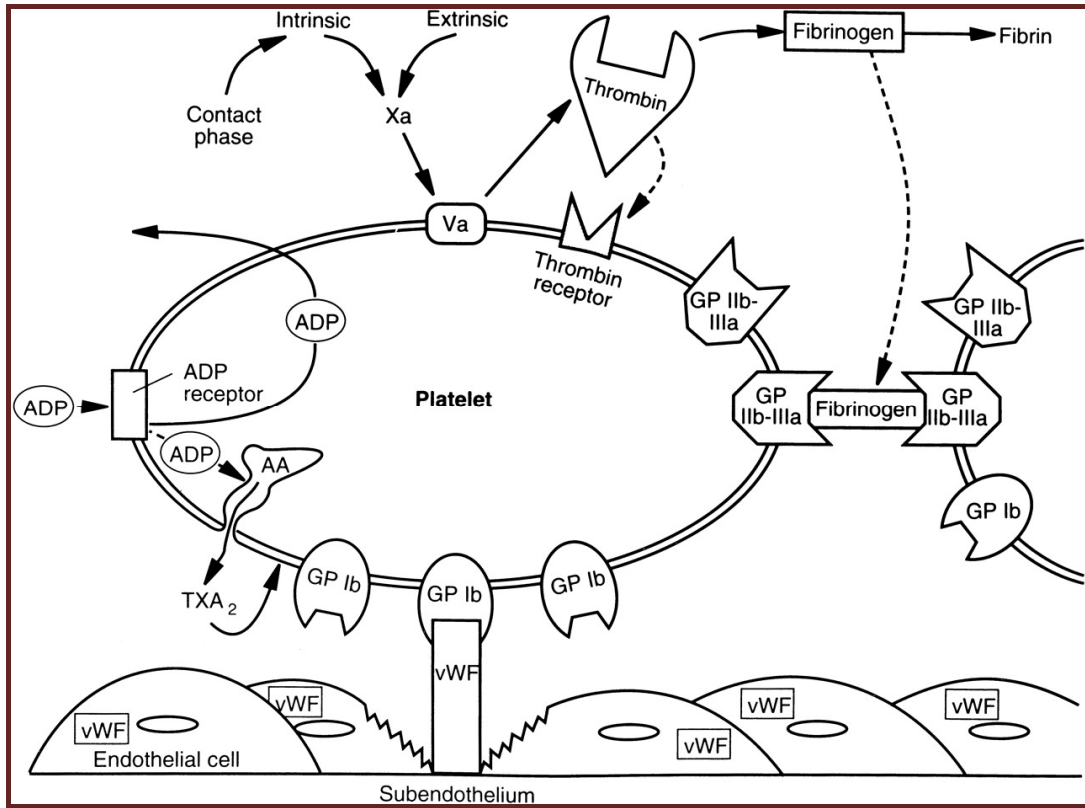
Asit Hidrolaz İçeren Granüller (lizozom); Endoglikozidaz ve Heparin içerirler.



Şekil 2-13: Trombositin Morfolojik Yapısı Ve Hücre İçi Yapıları (Greer J.P 2008).

2.4.2. Trombosit Fonksiyonları

Trombositler adezyon ve aktivasyonu takiben sekresyon ve agregasyon özellikleriyle fonksiyon görürler. Travma ile damar hasarı sonucu oluşan vazokonstriksiyon, kan akımının yavaşlamasına neden olur. Trombositler hasarlı bölgeyi reseptörleriyle tanır (Şekil 2-14) ve endotele yapışırlar. Adezyon ve agregasyonu takiben trombositlerden salınan maddeler hem koagülasyonda hem de inflamasyonda yer alan maddelerdir. Serotonin, ADP, Kalsiyum(Ca), fibrinojen, PF4, β TG, Faktör V bu süreçte salgılanan bileşiklerden bazılarıdır.



Şekil 2-14: Trombosit Adezyon Aktivasyon Ve Agregasyonda Trombosit Membran Glikoproteinlerinin Rolü (Camacho A. 2000).

2.4.2.1. Adezyon ve Aktivasyon

Tromboplastin, kollajen ve epinefrin (adrenalin) gibi doku hasarı sonucu ortaya çıkan agregan maddeler aracılığı ile aktive olan trombositler, hasarlı yüzeye membranlarındaki glikoprotein reseptörleri aracılığı ile yapışmayı (adezyon) gerçekleştirirler (Greer J.P 2008).

Şekil değişikliği ile birlikte trombosit membranındaki GpIIb/IIIa sayısı artar ve P selektinin yüzeye göç etmesi ile birlikte trombosit yapışma özelliği kazanır (Şekil 2-15 ve Şekil 2-16). Aktivasyon sürecinde trombosit granüllerindeki Ca, ADP, serotonin gibi kemoatraktan ve agregan maddeler vasıtası ile trombosit ve lökosit göçü sağlanır. Aktivasyon süreci, hasarlı bölgede tıkaç oluşumuna kadar devam eder.

Trombosit aktivasyonu sonucu ortaya çıkan önemli değişiklikler :

- 1) Trombosit glikoproteinlerinin yeniden yapılanması,
- 2) Reseptörlerin moleküler konformasyonlarında değişiklikler,
- 3) Granül içeriklerinin salgılanması,
- 4) Trombosit kaynaklı mikropartiküllerin oluşumu,
- 5) Lökosit-trombosit kompleksleri (Lökosit-trombosit agregatları), oluşumudur.

Trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kanama zamanı, agregasyon çalışmaları, trombosit fonksiyon analizörleri, serum veya idrarda trombositlerin aktivasyonları ile ortaya çıkan ürünlerin ölçümü gibi klasik yöntemler günümüzde de kullanılmaktadır. Akan hücre ölçer kullanılan (Flow Cytometric) yöntemler, önemli avantajlara sahiptirler. Örneğin agregometre ile yapılan trombosit agregasyon çalışmalarında trombositlerin reaktivitesi (agonistlere olan agregasyon cevabı) değerlendirilebilirken, akan hücre ölçer ile trombositlerin reaktivitesi yanında istirahat halindeki aktivasyon durumları da değerlendirilebilmektedir (Krueger LA 2003).

Trombosit Aktivasyon Göstergeleri :

Aktivasyona bağımlı integrin α_{IIb}/β_3 (GPIIb/IIIa kompleks, CD41/CD61)'de konformasyon değişikliklerinin belirlenmesi:

α_{IIb}/β_3 'e karşı geliştirilen monoklonal antikorların çoğu istirahat halindeki trombositlere bağlanırken, monoklonal antikor PAC1, bu integrinin, trombositlerin aktivasyon durumunda konformasyon değişikliğine bağlı ortaya çıkan fibrinojen bağlanma bölgesine karşı geliştirilmiştir (Shattil S.J. 1985). Bu yüzden PAC1, istirahat halindeki trombositleri bağlamayıp sadece aktive trombositleri bağlar. Diğer α_{IIb}/β_3 aktivasyon bağımlı monoklonal antikorlar, α_{IIb}/β_3 'e ligand bağlanması sonucu gelişen konformasyon değişikliğini (ligand induced binding site-LIBS) tanıyan antikorlar (Frenlinger A.L. 1988) ve fibrinojene bağlı reseptör etkisiyle gelişen konformasyon

değişikliğini(receptor induced binding sites-RIBS) tanıyan antikordur (Zamarron C. 1990).

Aktivasyon ile trombosit membran yüzeyine çıkan granül membran proteinlerin belirlenmesi :

Bu amaçla en sık kullanılan monoklonal antikordur alfa granül membran proteinini P selektine(CD 62P) karşı geliştirilmiş olanlardır. P selektin, istirahat halinde trombositlerin alfa granül membranının bir bileşenidir, ancak trombositlerin aktivasyonu sonucu alfa granül sekresyonu ile trombosit yüzey membranına göç eder. Böylece P selektine özel monoklonal antikordur kullanımı ile degranüle (aktive olmuş) trombositler hücre akım ölçer ile gösterilebilir. İn vivo degranüle trombositler hızlı bir şekilde yüzey P selektinlerini kaybederler, fakat P selektinler dolaşımda kalmaya devam ederler ve fonksiyon görürler (Simon C. 2005).

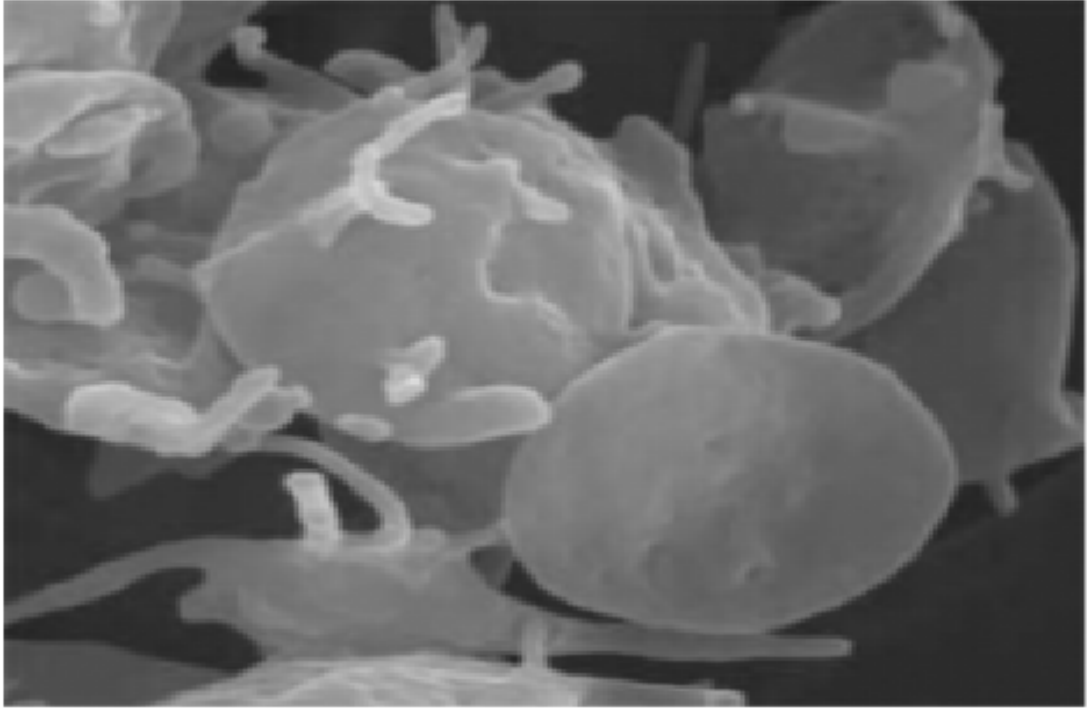
Trombositten zengin plasma, yıkanmış trombositler ve tam kan trombositlerin akan hücre ölçer çalışmalarında kullanılmaktadır.

2.4.2.2. Sekresyon

Trombosit aktivasyonu ile granüllerdeki maddelerin salındığı belirtilmiştir. Salınan maddeler: ADP; adezyon, agregasyon, trombosit şekil değişikliğinde rol oynar, trombosit faktör 4(PF4); heparin bağlar, kemotaktik etkiyi artırır, kollejenazı inhibe eder, elastazı uyarır, trombosit kaynaklı büyüme faktörü(PDGF); trombosit makrofaj ve endotelden salınır, kemotaktik faktörleri etkiler, mitozu hızlandırır, Trombosit aktive edici faktör (PAF); Membran lipidlerinden türer, trombositte reseptörü vardır, trombosit, nötrofil, eozinofil, monosit, endotel hücresi ve mast hücrelerinden salgılanır.

2.4.2.3. Agregasyon

Trombositler membranlarındaki GpIIb/IIIa ile fibrinojen köprüsü aracılığı ile birbirlerine yapışarak trombosit agregatlarını oluştururlar (Şekil 2-15, 2-16).



Şekil 2-17: Agrege Olmuş Trombositlerin Elektron Mikroskopunda Görünümleri (Greer J.P 2008).

Trombosit agregasyonunun tespiti için agregometre cihazları kullanılır. Trombositler ADP gibi uyarılar ile uyarılarak agregasyonları tetiklenir ve agregasyon takip edilerek bir agregasyon eğrisi elde edilir. Bu agregasyon eğrisi değerlendirilerek trombosit fonksiyonları hakkında bilgi sahibi olunabilir. Agregasyon eğrisinin değerlendirilmesi, eğrinin amplitütünün ve eğiminin değerlendirilmesi sonucu yapılır. Strok ve koroner kalp damar tıkanıklığı gibi hastalıklarda agregasyon artışı tespit edilmiştir. Bazı kalıtsal trombosit hastalıklarının tespiti için farklı uyarılar kullanılarak agregasyon eğrisi değerlendirilir (Tutluoğlu B.2005, Greer J.P 2008).

2.5. Trombosit Lökosit Etkileşimi

Trombosit aktivasyonu, aralarında lökositlerin de bulunduğu, dolaşımdaki diğer hücrelerden ve endotelden etkilenir. Trombosit lökosit komplekslerinin varlığı bir çok hastalığın belirlenmesinde önemli rol oynar. Trombosit lökosit agregatları inflamasyon ve koagülasyon artışının bir göstergesi olarak kabul edilen parametreler arasında yer alır. Koroner arter hastalığı(KAH)'nda trombosit-lökosit agregatlarının varlığı ve dolaşımdaki oranlarının artması hastalık belirteci olarak saptanmıştır.

Trombosit agregasyon ve aktivasyon süreci ve etkileri **Şekil 2-19**'da gösterilmiştir.

Trombositler ve lökositler salgıladıkları maddelerle de birbirlerini etkilemekte, inflamasyon, adezyon ve hücre göçüne sebep olmaktadırlar (**Şekil 2-19**). Kanserde de trombositler ve lökositler adezyon molekülleri ve salgıladıkları büyüme faktörleri gibi maddelerle kanserin ilerlemesi ve derecesi hakkında bilgi sahibi olmamıza yardımcı olmaktadırlar (Gurbel P.A. 2007).

2.5.1. Trombosit Lökosit Agregatları

Trombositlerin monosit ve nötrofillere bağlanması primer olarak P selektin tarafından başlatılır; aktivasyon ile trombosit yüzeyine çıkan P selektin lökositlerin yüzeyinde yapısal olarak eksprese olan P-selektin glikoprotein ligand 1(PSGL-1)'e bağlanır ve böylece lökosit trombosit agregatları oluşur. Lökositlerde eksprese olan Mac-1 ile trombosit glikoprotein 1bα etkileşimi gibi ek mekanizmalar ile bu komplekslerin stabilizasyonu sağlanır (**Şekil 2-18**) (McEver R.P. 2002). Monosit–trombosit ve nötrofil-trombosit agregatları tam kandan akan hücre ölçer cihazı yardımı ile tespit edilebilmektedir.

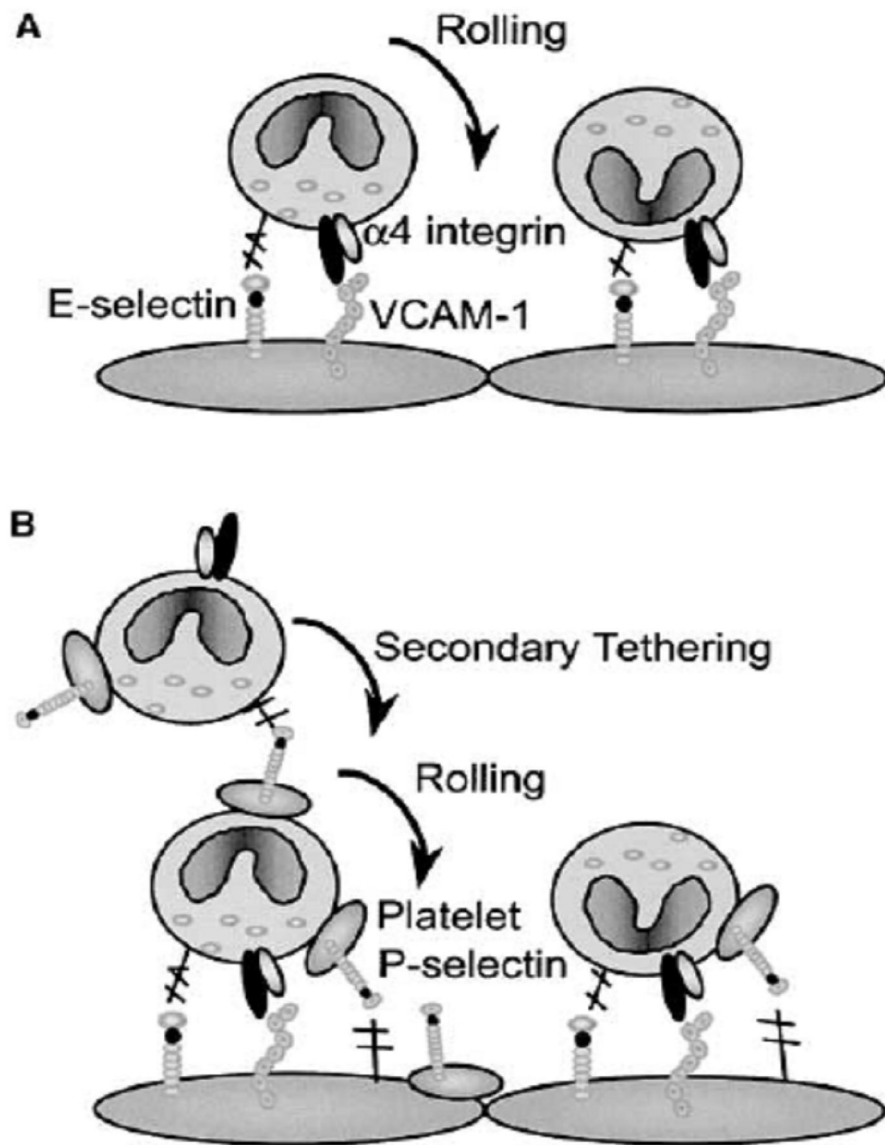
Babunlara infüze edilen biotin ile işaretlenmiş otolog trombositlerin üç renkli akan hücre ölçer ile izlenmesi sonucu şu bulgular elde edilmiştir (Vandendries E.R. 2004).

- 1) Trombin tarafından degranüle edilen trombositler çok hızlı bir şekilde (1 dakika içinde) monosit ve nötrofiller ile agregatlar oluşturur.
- 2) Monositler, infüze edilmiş trombositlerle nötrofillerden daha yüksek yüzde de agregat oluşturur.
- 3) Dolaşımdaki monosit-trombosit agregatlarının in vivo yarılanma ömrü (yaklaşık 30 dk.) hem nötrofil-trombosit agregatlarının yarılanma ömründen (yaklaşık 5 dk.) hem de agrege olmamış trombositlerin yüzey p selektinini kaybetme zamanından daha uzundur.

Bütün bu bulgular sonucu dolaşımdaki monosit-trombosit agregatlarının ölçümünün in vivo trombosit aktivasyonunu göstermede, dolaşımdaki nötrofil-trombosit

agregatlarından ve dolaşımdaki P selektin pozitif trombositlerinden daha hassas olduğu ileri sürülmüştür (Vandendries E.R. 2004).

Lökosit-trombosit agregatlarının akan hücre ölçer cihazı ile tespiti için analizi istenen lökosit popülasyonu (genellikle monosit veya nötrofil), hücrelerin büyüklük ve granül özelliklerine göre ve en az bir tane lökosit belirleyici monoklonal antikor (CD45 veya CD14) kullanılarak belirlenir. Trombositleri tanıyan ikinci bir monoklonal antikor kullanılarak (CD41, CD61, CD42a gibi) trombosit pozitif ve trombosit negatif lökosit popülasyonları belirlenir. Trombosit fonksiyon çalışmalarında belirtilen uygulamalar lökosit- trombosit agregat çalışmaları için de geçerlidir.



Şekil 2-18: Trombosit Lökosit Etkileşimi (Laurien H.U. 2003).

2.6. Akan Hücre Ölçer ile Trombosit Fonksiyonunun Değerlendirildiği Klinik Durumlar

1) Akut koroner sendromlar;

Anjina
Akut miyokard enfarktüsü
Stand sonrası değerlendirme
Anjioplasti

2) Serebrovasküler iskemi;

3) İnme periferik damar hastalıkları;

4) Diğer klinik durumlar;

Diyabet
Pre eklamsi
Tedavinin izlenmesi
Antitrombotik ilaçların etkisinin izlenmesi
Trombotik hastalıklara eğilimi olan hastaların tanımlanması
Kardiyopulmoner bypass
Radyolojide kontrast maddeler kullanımı
Trombosit süspansiyonlarının kalite kontrolü
KİT hastalarının takibi
Retiküle trombositlerin ölçümü

5) Anti trombosit antikorların tayini;

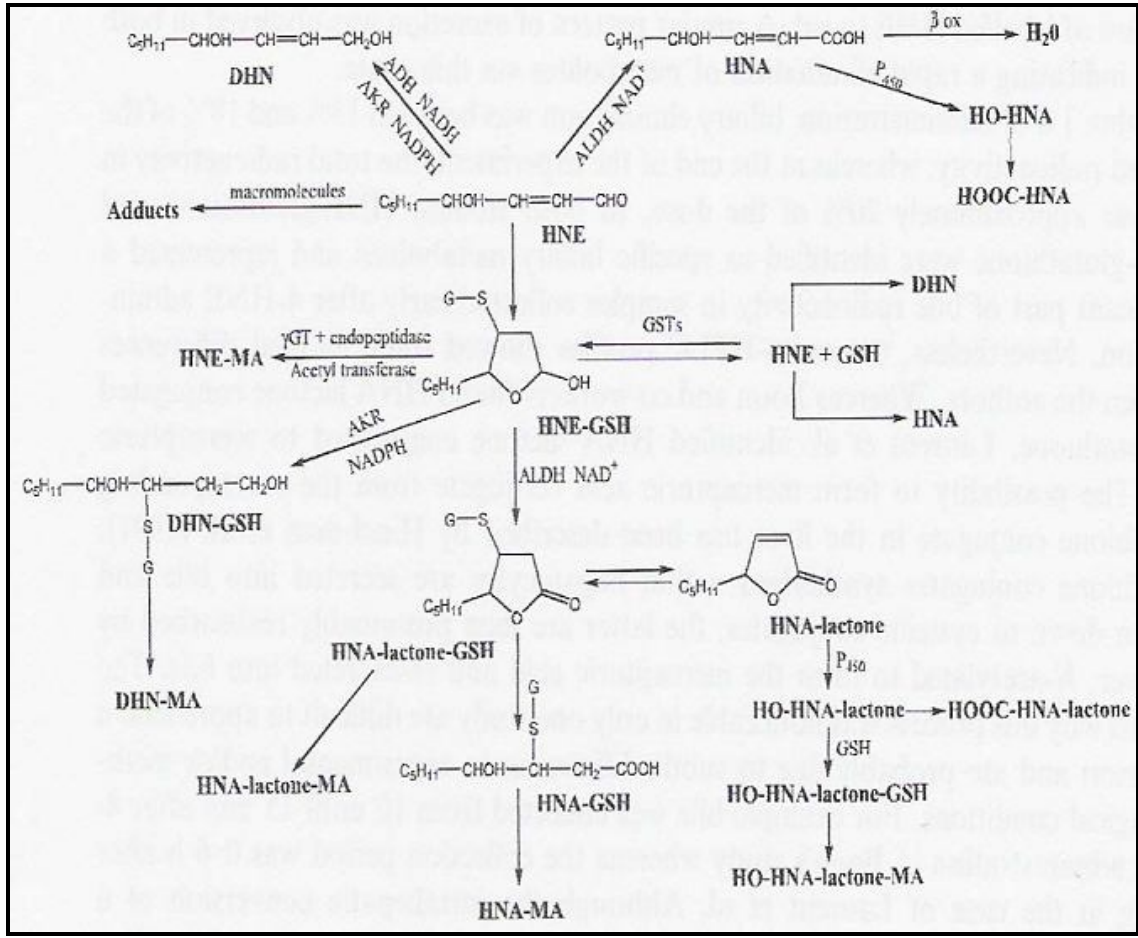
Anti-HLA Class I
Anti-HPA
Anti-ilac/ antikor kompleksleri

6) Trombosit cross-match

Trombosit lipid ilişkisinin akan hücre ölçer yardımı ile araştırılması yöntemi kullanılarak yapılmış çalışmalardan bir iki önemli örnek verecek olursak: Hiperlipidemili dolaşımda olan trombositlerin aktivasyonu ile lipid peroksidasyonu, erken apoptoz, trombosit lökosit agregatları ve agregasyonun eş zamanlı olduğu saptanmıştır (Derya Özşavcı 2002). LDL /ox-LDL ile inkübe edilen trombositler de

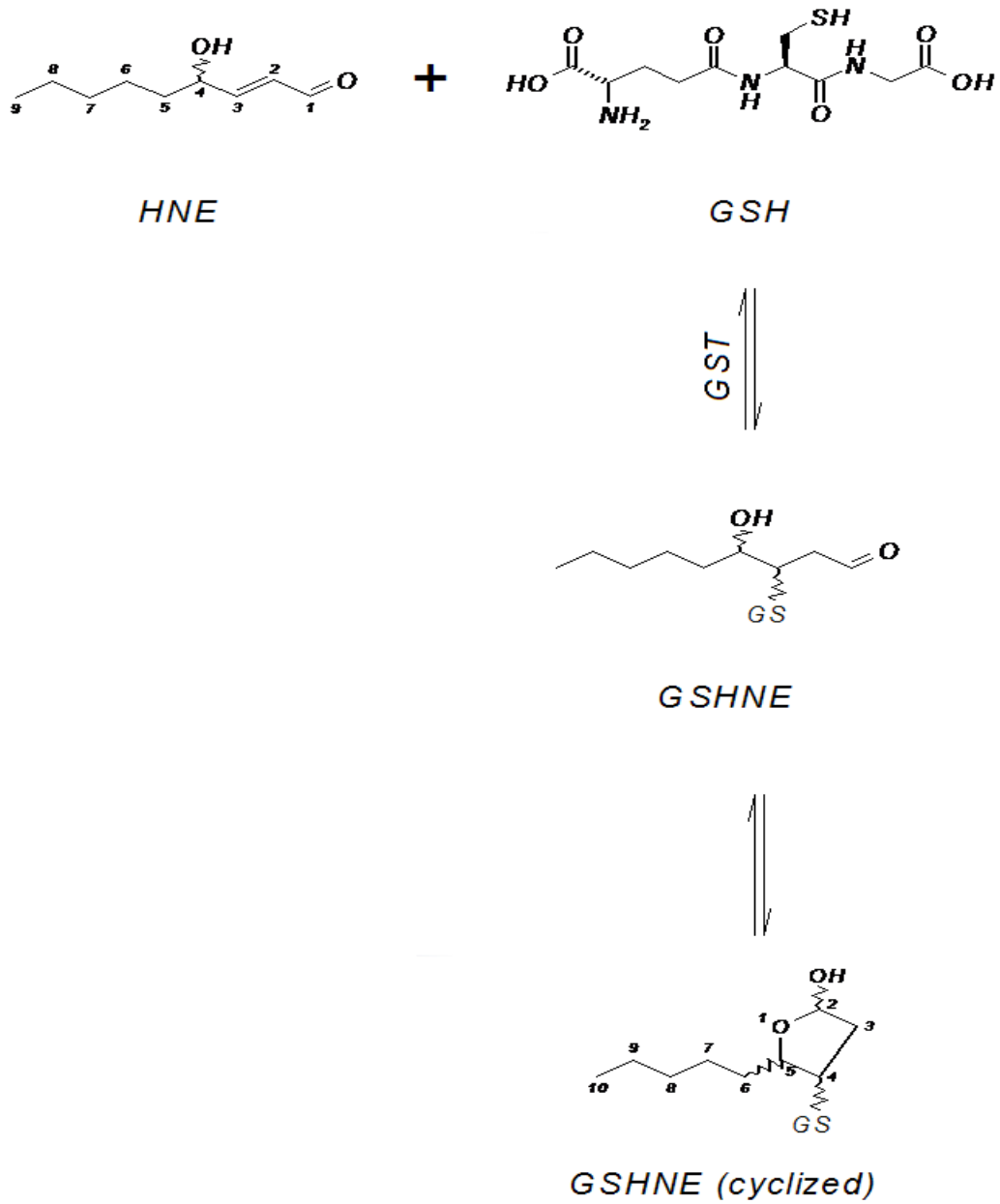
2.7. 4-Hidroksi-2,3-Nonenal (4-HNE)

Trans-4-hidroksi alkenaller veya trans-4-hidroksi-2,3-nonenal olarak isimlendirilen alkenaller membrandaki çoklu doymamış yağ asitlerinin ve lipoprotein fosfolipidlerin, lipid peroksidasyonları sonucu oluşan, birtakım genotoksik ve sitotoksik etkileri gösterilmiş son ürünlerdir (Alary J 2003, Awasthi YC 2003). Araşidonik asit ve linoleik asit peroksidasyonları sonucu oluşan 4-HNE ile pek çok dejeneratif hastalık (Parkinson, Alzhemir gibi), kronik inflamasyon, iskemi sonrası reperfüzyon durumları, erişkin solunumsal distres sendromu, aterogenez ve diabet gibi pek çok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Renes J. de Vries E.E. 2000). Çok yakın zamanlarda, HNE'nin bazı patolojik durumlarda biyolojik sinyal olabileceği kanıtlanmıştır (Alary J. 2003, Parola M. 1998, Poli G. 2000). HNE'nin patofizyolojik etkisi ile ilgili elde edilen bilgiler, son on yıl içinde HNE metabolizması ile ilgili pek çok çalışmanın yapılmasına neden olmuştur. Fizyolojik koşullarda HNE, hücrede belirli seviyelerde bulunur. Bununla birlikte, HNE yapımı pek çok patolojik durumu lipid peroksidasyonun artışı ile ilişkili olarak tetikler. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile, HNE'nin oldukça fazla reaktif ancak göreceli bir stabiliteye sahip, özellikle hücre siklusu sinyalizasyonunda görevi olan linoleik asid ve araşidonik asitin oksidatif parçalanma ürünü olduğu kanıtlanmıştır (Choucroun P. 2001). 4-HNE'nin hücre içi düzeylerinin kontrolü, HNE'nin metabolize edilmesi ile düzenlenir. Hücre içi konsantrasyonundaki artış apoptotik sinyalleri tetikler. Farklı orijinlere sahip pek çok hücre soyunda yapılan çalışmalar ile 4-HNE'nin apoptozi indüklediği de gösterilmiştir (Alary J. 2003, Camandola S. 2000). **Şekil 2-20**'de 4-HNE'nin hücre içi metabolik yolağı gösterilmiştir. **Şekil 2-20**'de gösterildiği gibi 4-HNE ve homologları, aldoz reduktaz tarafından alkol bileşiklerine indirgenir ya da aldehiddehidrogenaz ile okside edilir.



Şekil 2-20: 4-HNE'nin, Sıçanlarda Yapılmış Çalışmalara Göre In Vivo Metabolik Yolağı (Alary J. 2003).

4-HNE'nin esas metabolize olması GSH ile konjugat oluşturması yolu ile gerçekleşir. Oldukça reaktif olması ve buna bağlı olarak hücre için zararlı bir takım etkileri nedeni ile hücre dışına atılması gereken 4-HNE, GSH ile konjugasyon yaparak hücreden uzaklaştırılır (Şekil 2-21).



Şekil 2-21: 4-HNE'nin GSH ile Konjugasyonu (Alary J. 2003).

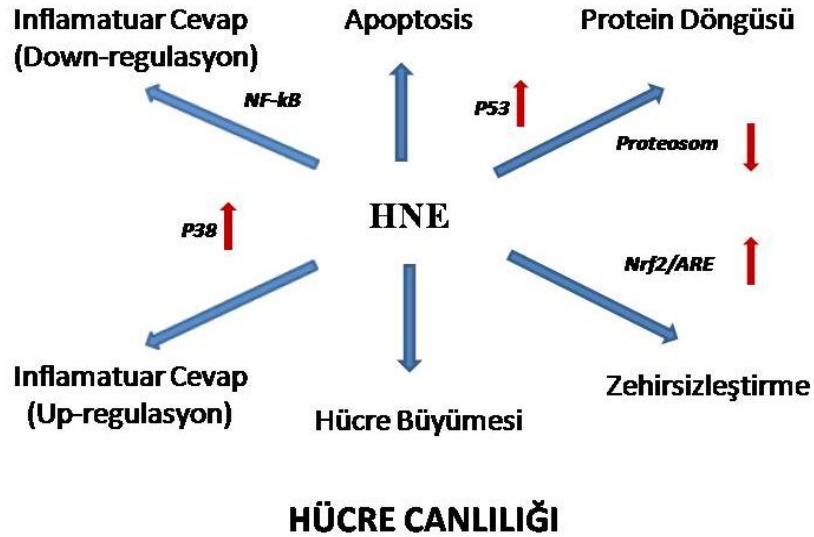
Lipid peroksidasyonu süresince toksik α,β -doymamış aldehid üretilir.

HNE'nin GSH ile konjugasyonu GST'nin farklı alt tipleri tarafından katalizlenir ve GSH S-konjugat pompası ile hücreden uzaklaştırılır (Cheng JZ 1999, Hubatsch I. 1998).

Yapılan çalışmalarla MRP1'in 4-HNE toksisitesine karşı, GSH ile oluşan konjugatları hücre dışına atarak karşı koyduğu gösterilmiştir (Renes J. de Vries E.E.

2000). Bu konjugatların hücreden uzaklaştırılmalarının hücre için kritik önemi vardır. Çünkü oluşan konjugatlar aynı zamanda GST enzim aktivitesini inhibe ederler. 4-HNE ayrıca proteinler ve nükleik asitler gibi biyomoleküller ile bileşik oluşturma eğilimindedir.

4-HNE'nin, hücrenin yaşamı ve ölümü arasındaki dengede pek çok önemli metabolik işlevi olduğu son on yılda yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Şekil 2-22).



Şekil 2-22: HNE'nin Hücredeki Önemli İşlevlerinin Hücre Ölümü Ve Hücrenin Devamlılığı ile ilişkisi.

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, hepatoma hücrelerindeki total 4-HNE'nin %61'inin GSH ile konjugasyon yaparak, 3-glutatyonil 4-hidroksi-2-nonenal bileşiğini oluşturduğu ve bu şekilde hücreden uzaklaştırıldığı gösterilmiştir (Tjalkens RB. 1999).

2.8. Programlanmış Hücre Ölümü(APOPTOZ)

Bir çok hücre bölünme ve bölünmeme ya da çoğalma ve ölüm arasında sürekli bir ardışık özellik göstermektedir. Özellikle çok hücreli organizmalarda, hücrelerin sayısı belli mekanizmaların kontrolü altındadır. Bu kontrol, hücre bölünme oranında olduğu gibi aynı zamanda hücre ölümünde de vardır. Eğer hücrelere daha fazla ihtiyaç yok ise hücre içi ölüm programının aktivasyonu ile intihara karar verilir. Bu süreç çoğunlukla programlanmış hücre ölümü veya Apoptoz olarak isimlendirilir (Beutler E. 1975).

Apoptoz ilk olarak 1885 yılında Flemming tarafından regrese olan over foliküllerinde kromatin kondensasyonu olarak tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar ile

organizmada fizyolojik koşullarda pek çok sistemin dengesini sağlayan, organizma için önemli, bir o kadar da ilginç bir mekanizma olduğu açıklanmıştır. Hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, apoptoz mekanizmasında ihtiyaç duyulan aktif RNA/protein sentezine ve enerjiye ihtiyaç duyan bu ölüm şekli, tamamen patolojik nedenlerle meydana gelen nekrozdan büyük farklılıklar göstermektedir (Beutler E. 1975).

Apoptozun varlığı kanıtlandıktan sonra, mekanizmayı aydınlatmak üzere çalışmalar yapılmıştır. Plazma membranındaki kabarcık oluşumu, kromatin kondensasyonu olarak isimlendirilen, nukleusun kenarında kromatin birikmesi, hücrenin daha sonra membranla çevrili küçük veziküllere ayrılması gibi pek çok morfolojik değişiklik incelenmiştir. Bunlara paralel olarak, histon oktamerleri arasından DNA'nın kesilerek parçalandığı ve bunun da karakteristik DNA fragmentasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Squier M.K.T. 1995).

Apoptozla ilgili olarak yapılan çalışmalarda, programlanmış ölümün farklı kökenlerden gelen hücrelerde gerçekleşmesine rağmen, ölen bütün hücrelerin aynı genetik yolu kullandıkları gösterilmiştir. C.Elegans'ın yaptığı çalışmalarda Ced-3 ve Ced-4 genlerinin ifadelerinin hücre ölümü için gerekli olduğu ve bu genlerin ekspresyonlarının, Ced-9 geni tarafından kontrol edildiği vurgulanmıştır. İnsanlarda yapılan çalışmalar ile Ced-9 geninin benzer fonksiyona sahip karşılığının, bcl-2 protoonkogeni olduğu açıklanmıştır (Orrenius, S. 1995). Apoptozun gelişimini önleyen moleküller arasında en iyi bilineni, mitokondri membranında bulunan bcl-2 proteindir. Foliküler non-Hodgkin B hücreli lenfomalarda 18q21'deki normal lokalizasyonundan farklı olarak bcl-2 geninin, immunoglobulin ağır zinciri lokusuna yakın olan 14q32'ye kromozomal olarak transloke olduğu (t 14;8) saptanmıştır. Bu tranlokasyona bağlı ekspresyonu artan bcl-2'nin normalde apoptoza gidecek olan hücrelerin ölümüne engel olduğu ve insanlarda bu aşırı bcl-2 ekspresyonu ile kanser oluşumları arasında bağlantı bulunduğu ortaya çıkarılmıştır.

Kemoterapiye direnç gösteren tümör hücrelerinde apoptotik mekanizmaların aktivasyonunda aksaklık olduğu; Bcl-2 ve bclx proteinlerinin ekspresyonlarının artması ile tümör oluşum hızı arasında pozitif bir korelasyon olduğu da gösterilmiştir.

Apoptoza neden olan sinyaller hücre dışından gelebildiği gibi, hücre içinden de kaynaklanabilir. Hücre dışı kaynaklı sinyaller, Tümör Nekroz Faktör Reseptörü (TNFR) ya da Fas reseptörü yolu ile iletilirler. Hücre içinden gelen sinyaller ise, hücrenin mitokondrisine gelen uyarılardır ve bu uyarılar sonucunda apoptotik mekanizma aktive

olur. Günümüzde, apoptoz sırasında hücre içinde oluşan değişikliklerin çoğunun sitoplazmada yer alan kaspaz adlı proteazların aktivasyonu ile oluştuğu ortaya konmuştur. Bir uyarı sonrasında birbirlerini proteolitik olarak aktive eden kaspazlar, aktivatör ve efektör etkili iki gruptan oluşmakta olup, hedef proteinlerini parçalayarak apoptozu sonuçlandırır.

Hücrelerde apoptoza neden olan veya oluşumunu engelleyen pek çok madde bulunur. Her hücredeki etkileri farklılıklar gösterse de genel olarak apoptotik mekanizmayı etkileyen maddeler **Tablo 2-3**'de listelenmiştir.

Tablo 2-3: Hücrelerde Apoptoza Neden Olan Ve İnhibe Eden Etkenler.

Apoptozu Aktive Eden	Apoptozu İnhibe Eden
Tümör Nekroz Faktör (TNF)	Büyüme Faktörleri
Tümör Büyüme Faktör β (TGF- β)	Çinko, Nötral aminoasitler
Glutamat, Dopamin (Nöron hücrelerinde)	Östrojen, Androjen
Büyüme Faktörü eksikliği	Viral bazı genler; p35, IAP, crmA
Glukokortikoidler	Kalpain inhibitörleri
Onkogenler (p53)	Sistein proteaz inhibitörleri
Serbest Radikaller	Tümör oluşturan ajanlar
Antikanser İlaçlar	
UV, Gama radyasyon	

Tüm bu verilerden sonra hücrenin hangi ölüm mekanizması ile öleceği kararını nasıl verdiği incelendiğinde, aslında hücrenin apoptoz veya nekroz arasında seçim yapmadığı görülmektedir. Hücre aşırı, ani ve şiddetli bir takım zararlı etkilere maruz kaldığında istemsiz olarak nekroz ile ölür. Ancak bu etkiler hücrenin yaşamla ilgili bazı kararlar almasını engellemiyorsa hücre oluşan zararları tamir yoluna gider. Düzelemeyecek hasarlara neden olan durumlarda ise hücredeki apoptotik sinyaller işe karışır ve hücre kendi kendini öldürür. Bu mekanizma, her an binlerce kanserojen ajanla karşılaşan organizmamızı kanserleşmeden koruyan en önemli mekanizmadır.

Apoptozun embriyonik gelişim esnasında, hücre çoğalma ve farklılaşmasında, gelişmesi gerekli olmayan hücrelerin ortadan kaldırılmasında, organ ve ekstremitelerin şekillenmesinde, içi boş olan organ ve sistemlerin oluşmasında rolü oldukça büyüktür. Apoptozun, gelişimdeki etkilerinin yanında yaşlanmada, kalp-damar sisteminde yer alan aterosklerozun oluşumunda, iskemi sonrası perfüzyon hasarında, viral patogeneizde ve tümör gelişiminde de etkin rolü olduğu bilinmektedir (The Cell Chapter 17 2002).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran ve astım tanısı konulmuş yetişkin gönüllü kişiler çalışma kapsamına alındı.

Seçime esas olarak, en az 2 yıllık hafif şiddetli astım olup solunum fonksiyon testlerinde (SFT) FEV1(birinci saniye zorlu ekspirasyon hacmi) / FVC(zorlu vital kapasite) oranı %70'in üzerinde ve FEV1 normalin %80'ine eşit veya daha yüksek, günlük PEF(tepe akım hızı) değişkenliği %20-30 arasında, total Ig E'si yüksek periferik yaymada %4'ün üzerinde, eozinofilisi ve serum eozinofilik katyonik protein düzeyleri normalin üzerinde olması; sigara içilmemesi, semptomların her gün olmaması, son 2 ayda inhale steroid ve lökotrien antagonisti kullanılmamış olması şartları arandı.

Alerji deri testi negatif olan hastalar ile son 3 ayda şiddetli astım atağı geçirmiş veya ağır kalp yetmezliği, immun süpresif hastalıklar, interstisyel fibrozis, yaygın bronşektazi, aktif infeksiyon hastalığı, ağır karaciğer veya böbrek yetersizliği olan, vitamin kullanan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.Çalışmaya dahil edilen kişilerin özellikleri tablo 3-1'de verilmektedir.

Tablo 3-1: Astım ve Kontrol Grubunun Özellikleri.

Astım ve kontrol vakalarının özellikleri				
	Kontrol		Astım	
Kişi sayısı (n)	22		36	
Cinsiyet	13K	%59K	31K	% 86K
	9E	%41E	5E	%14E
Yaş ortalaması	33		39	
Aile hikayesi (+)	(-)		13	

Astım şiddeti	0	22 hafif intermitant 14 hafif persistant
---------------	---	---

Kontrol grubumuz solunum yakınmaları olmayan, benzer yaş ve cins özelliklerine sahip sağlıklı yetişkin gönüllülerden oluşturuldu.

Çalışmaya denek olarak katılmayı kabul eden gönüllülerden 20 ml. kan alındı ve başkaca bir girişim yapılmadı.

Astım ve kontrol grubuna dahil edilen kişilerden EDTA'lı ve sitratlı olarak periferik venöz kan alındı. EDTA'lı olarak alınan kan MRP-1 ekspresyonu için kullanılmak üzere solüsyon D içerisine alınarak -80°C'de saklandı. Daha sonra bu örnekten RNA eldesi ve cDNA sentezi yapılarak MRP-1 ekspresyon düzeyleri saptandı. Astım ve kontrol grubu örneklerinin serum HNE miktarlarına ELİSA ile ve glutatyon düzeylerine spektrofotometrik yöntem ile bakıldı. MRP-1 proteininin lökosit ve trombositlerdeki seviyesi; trombosit-lökosit agregatlarının, aktive olmuş trombositlerin ve agregatlardaki MRP-1 proteininin tespiti akan hücre ölçer (flow sitometri) ile çalışıldı. Bu deneylerin analizi CellQUEST yazılımı ve akan hücre ölçer cihazı yardımı ile yapıldı.

MRP1 proteininin fonksiyonunun saptanması amacıyla hücre içi MRP1 substratlarının birikiminin belirlenmesi, probenecid ile MRP-1 inhibisyonunu takiben, CFDA ve Ca-AM problemleriyle inkübasyon sonucunda akan hücre ölçer cihazı ile gerçekleştirildi. Astım ve kontrol grubu bazal ATP miktarı kemilüminometrik yöntem ile çalışıldı. Lökotrienlerin öncül maddesi olan L-serin ve lökotrienlerin hücre dışına salgılanmasını sağlayan PMA eklenerek lökotrienlerin hücre dışında birikmesi sağlandı. MRP1 inhibisyonu öncesi ve sonrasında lökositlerden hücre dışına atılan LTC4 miktarları süpernatanda ELİSA yöntemiyle tespit edildi.

Trombosit agregasyon çalışması astım ve kontrol gruplarında yapıldı. Ardından trombosit ve lökosit ilişkisinde MRP-1 proteininin rolünün araştırılması amacıyla trombosit ve lökositler 200µM probenecidle +37°C'de bir saat inkübe edilerek MRP1 inhibisyonu gerçekleştirildi. MRP1 inhibisyonu gerçekleştirilen hücrelerde trombosit lökosit agregasyonu tespit edildi.

Protein miktarı Lowry yöntemi ile tespit edildi. MRP-1 inhibisyonu sonrasında apoptoz ve nekroz açısından incelenmek üzere hoechst 33258 ve PI(Propidium iodür)

fluoresans boyaları ile boyandı ve sonrasında fluoresans mikroskopunda renklerine göre hücre sayımı yapıldı.

Deney sonuçlarının istatistiksel analizleri için SPSS programı kullanıldı.

3.2. YÖNTEMLER

Yöntemlerin Şeması		
MRP1 Gen İfade Düzeyleri Lökosit izolasyonu RNA izolasyonu cDNA sentezi Gerçek zamanlı kantitatif PZR Roche 480	Serum HNE ELİZA	Trombosit Agregasyonu Tombosit izolasyonu ADP Agregometre
MRP1 Fonksiyonu Lökosit izolasyonu CFDA ve Calcein AM, Probenecid Akan Hücre Ölçer BD	Glutasyon Lökosit izolasyonu Ellman spektrofotometrik	Trombosit Aktivitesi Tombosit izolasyonu CD42b, CD41, CD62P Akan Hücre Ölçer BD
LTC₄ (MRP1 Substratı) Lökosit izolasyonu PMA, L-Serin, Probenecid ELİZA	Apoptoz Lökosit izolasyonu Probenecid, CumOH PI, Hoechst 33258 Fluoresan mikroskobu	Mrp1'in Agregasyona Etkisi Lökosit izolasyonu Tombosit izolasyonu Probenecid, CumOH,ADP Agregometre
ATP Lökosit izolasyonu Kemilüminometrik yöntem		Trombosit Lökosit Agregatları Tam kan CD42b(GpIb), CD41(GpIIb/IIa) CD62P(P selektin), CD14(Gp adezyon molekülü) Akan Hücre Ölçer
MRP1 inhibisyonu Probenecid		
Agregatlarda İnt. MRP1 Tayini Tam kan MRP1, CD42b, CD41, CD62P,CD14 Akan Hücre Ölçer		
Trombosit MRP1 Tayini Trombosit izolasyonu MRP1, CD42b Akan Hücre Ölçer		

3.2.1. Beyaz Hücrelerin Ayrıştırılması

Gey's tamponu:

155 mM. NH_4Cl

10 mM. KHCO_3

Denatüre Edici Solüsyon – SOL D:

25 g. Guanidium thiocyanate

1.25 ml. Sodyum sitrat (ph=7.0)

%5'lik N-Lauryl sarcosyl

350 μl . 0.1 M. 2 Merkaptotanol

Steril distile su ile 50 ml.'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Hasta ve kontrollere ait 5 ml. periferik kandan, beyaz hücreler Gey's tamponu kullanılarak ayrıştırıldı. Beyaz hücreler (5×10^6 hücre), içinde guanidyumtiosiyanat ve betamerkaptoetanol bulunan kuvvetli denatüran solüsyon (Solüsyon D) içinde homojenize edilerek -80°C derin dondurucuda çalışma gerçekleştirilene kadar saklandı.

3.2.2. Total RNA İzolasyonu

-Derin dondurucuda saklanan ve solüsyon D içinde bulunan örneklerden QiaAmp RNA Blood Mini Kit (50) (Qiagen, GmbH, D-40724 Hilden, Almanya) kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı (Koh Y.Y. 2008). Çalışma buz üzerinde gerçekleştirildi.

-Sol D içindeki denatüre hücreler eşit hacimde %70'lik etil alkol ile karıştırılarak homojenize edildi ve filtreli tüpe aktarıldı.

-14.000 rpm.'de 15 sn. çevrilerek, karışım filtreden geçirildi. RNA'nın filtreye bağlanması sağlanarak alttaki tüp atıldı.

-700 µl. RW1 olarak solüsyon ilave edildi ve 14.000 rpm.'de 15 sn. çevrilerek alttaki tüp atıldı.

-Filtrenin üzerine 500 µl. yıkama solüsyonu (RPE) eklenerek 14.000 rpm.'de 15 sn. çevrilerek alttaki tüp boşaltıldı. Yıkama işlemi iki kez tekrarlanarak alttaki tüp atıldı.

-Filtrenin üzerine 50 µl. RNaz olmayan steril su eklenerek RNA çözüldü.

-Filtre temiz tüpe alındı. 14.000 rpm.'de 2 dk. çevrilerek RNA'nın çökmesi sağlandı. Elde edilen RNA -80°C'de saklandı

3.2.3. Total RNA Konsantrasyonunun Ölçümü

İzole edilen total RNA örneklerinin miktar ve kalite ölçümleri Nano Drop kullanılarak yapıldı.

$$\text{RNA Konsantrasyonu} = 50(\text{sulandırma oranı}) \times 40(\text{sabit}) \times \text{OD}_{260} = \text{ng} / \mu\text{l}.$$

RNA örnekleri aynı zamanda %1 agoroz jelde yürütülerek, degrade olup olmadığı ve miktarı kontrol edildi. (Şekil 3-1)



Şekil 3-1: Total RNA Agaroz Jel Elektroforezi Görüntüsü

3.2.4. cDNA Eldesi

cDNA eldesi için her örnekten total 1 µg. RNA kullanıldı ve reaksiyon için aşağıdaki karışım hazırlandı. (Tablo 3-2, 3-3)

Tablo 3-2: cDNA Sentezi PZR İçeriği

<u>Miktar</u>	
• total RNA	10 µl.
• Random primer (10 µM.)	1 µl. (0.3 µg/1 µl.)
Toplam:	22 µl.

Bu karışım 5 dk. +70°C’de bekletildi ve reaksiyon karışımı ilave edilene kadar buzda bekletildi.

Tablo 3-3: Reaksiyon Karışımının İçeriği.

<u>Miktar</u>	
• 5 X RT Buffer	4 µl.
• dNTP mix (10 mM.)	1 µl.
• (0.1 M.) DTT	1 µl.
• RNase inhibitor (20 u/ µl.)	1 µl.
• Reverse transkriptaz (200 u/µl.)	1 µl.
Toplam:	8 µl.

22 µl. RNA-primer karışımı üzerine 8 µl. reaksiyon karışımı eklendi.
 +37°C’de 1 saat sentezlenerek +93°C’de 5 dk. enzim inaktivasyonu yapıldı.
 +4°C’de soğutularak sentezlenen cDNA ekspresyon analizi için kullanıldı.

3.2.5. Eş Zamanlı (“Real Time”) Kantitatif PZR

Eş zamanlı PZR teknolojisi, farklı floresan işaretleyicileri kullanarak, biriken floresan yoğunluğuna bağlı olarak DNA veya mRNA örneklerine bağlanarak ürün miktarını tespit eder. Floresan yoğunluğunun, arka plan kirliliğinden daha yoğun olduğu değer *Ct* (“*cycle threshold*”) olarak tanımlanır ve bu değer kullanılarak gen ekspresyon hesaplamaları yapılır.

Gen ekspresyon çalışmalarında normalizasyon için referans (“housekeeping”) gen/genler kullanılır. Referans genlerden stabil ekspresyon göstermeleri beklenir. Her deneyde kullanılabilecek bu özelliklere sahip tek bir gen yoktur. Bu nedenle normalizasyon çalışmaları için tek bir referans gen kullanmak sonuçların hesaplanması aşamasında büyük yanılgılara yol açabilir. Gen ekspresyon çalışmamızda öncelikle, MRP-1 mRNA düzeylerini belirleyeceğimiz hasta (n=5) ve kontrole (n=5) ait örneklerde en ideal referans genleri seçmek amacı ile “geNorm” analizi yapıldı. Bu amaçla 7 farklı referans gen kullanılarak çalışmayı gerçekleştirebileceğimiz en ideal 3 referans gen belirlendi. geNorm V3.4 (Belçika) yazılımı kullanılarak yapılan analizler sonucunda siklofilin, MRPL28 ve ABL genleri en ideal genler olarak belirlendi (Vandesomepele J. 2002).

Çalışmamız PZR Light Cyclor 480 (Roche Diagnostics) cihazı ve LC480 Probe master kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Kullanılan primerler **Tablo 3-6**’de, PZR koşulları **Tablo 3-5**’de verilmiştir.

Uygun koşullarda eş zamanlı PZR yapıldı. (**Tablo 3-4**)

Tablo 3-4: PZR İçeriği.

10 µl. reaksiyon için ;

	<u>Miktar</u>
SYBR reaksiyon karışımı	1 µl.
Primer karışımı (5 pmol)	1 µl.
MgCl ₂ (25mM)	0,8 µl.
dH ₂ O	5,2 µl.
cDNA	2 µl.

Her örnek çift çalışılarak MRP-1 ürün spesifikliği “melting curve analizi” ve agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi. PZR sıcaklık koşulları **Tablo 3-4**’de verilmiştir.

Tablo 3-5: PZR Sıcaklık Koşulları.

<u>Sıcaklık</u>	<u>Zaman</u>	
Ön Denatürasyon	+95 °C	10 dk.
Denatürasyon	+95 °C	10 sn.
Primer Bağlanması	+60 °C	10 sn.
Zincir Uzaması	+72 °C	14 sn.
		45 döngü
Son Uzama	+65 °C	15 dk.

Melting curve:

denaturation	+95 °C’de	0 sn.
annealing	+65 °C’de	15 sn.
melting	+95 °C’de	0 sn. olarak belirlenmiştir.

Karşılaştırmalı $\Delta\Delta C_t$ yöntemi, gen anlatımı düzeyini relatif (göreceli) olarak hesaplamada kullanılan matematiksel bir yöntem (Livak *et al*, 2001) olup

$$[\Delta][\Delta]C_t = [\Delta]C_{t, \text{hedef gen}} - [\Delta]C_{t, \text{referans gen}}$$

şeklinde ifade edilir.

MRP-1 geni mRNA düzeyi, 3 referans gene (CYPA, MRPL28, ABL) ait C_t değerlerinin geometrik ortalamaları normalize edilerek karşılaştırmalı $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile hesaplandı (Livak K.J. 2001, Vandesompele J. 2002).

Tablo 3-6: PZR’de Kullanılan Primer Dizileri Ve Ürün Boyları.

Gen	primer A (5'→3')	primer B (5'→3')	Ürünboyu(bç)
MRP1/ABCC1	atgtcacgtggaataaccagc	Gaagactgaactcccttcct	348
CYPA	tatctgcactgccaagactgagtg	Cttcttgctggcttgccattcc	127
MRPL 28	cctgaaaggctcgcatg	Ggaacagatgcctcccg	80
ABL	ttcagcggccagtagcatctgactt	Ctgttgactggcgtgatgtagttgctt	277

3.2.6. MRP1 İnhibisyon Ve Hücre İçi Birikim (Akümülyasyon) Deneyi (CFDA, Calcein-AM)

MRP-1 inhibisyonu sonucunda astım ve kontrol grubunda hücre içindeki CFDA ve Ca-AM birikimi akan hücre ölçer cihazı ile tespit edildi. EDTA’lı kandan lökosit izolasyonu yapılarak her deney için 1×10^6 hücre kullanıldı. MRP1 proteininin hücre içi substratları olarak bilinen CFDA ve Ca-AM $1 \mu\text{M}$ konsantrasyonda kullanılarak, bir saat 37°C ’de inkübasyon sonrası $1500 \times g$ ’de 5 dk. santrifüj edildi. Üst sıvı atılarak hücre peleti üzerine $500 \mu\text{l}$. PBS eklendi hücre içi substrat miktarları akan hücre ölçer cihazı yardımıyla tespit edildi. Makalederdeki koşullar modifiye edildi (Donna M. 1998, Legrand O. 1998, 1999).

CFDA ve Ca-AM hücre içine girdiklerinde esterazlar tarafından kesilerek yapılarındaki diasetat(DA) ve asetometil oksit(AM) gruplarını kaybederler. Böylece indirgenen karboksifluorescein(CF) ve Calcein hücre içi esterlerleri oluşturarak floresan verir hale gelirler. Calcein Ca^{+2} ile birleşerek kararlı hale gelir ve esterleşmiş moleküllerle birleşir. MRP-1in özgül substratları olan bu iki esterleşmiş bileşik uyarıldıklarında floresan ışımaya verirler. Biz bu floresan ışımayı ölçerek hücre içinde biriken MRP-1 substratlarının bir saatlik inhibisyon sonucunda değişimini inceledik. Böylece MRP1 proteinin fonksiyonunu ve hücede yaptığı önemli görevin engellenmesi ile trombosit lökosit etkileşimindeki rolünü araştırdık.

MRP-1 membran proteininin spesifik kimyasal inhibitörleri olarak bilinen probenesit (probenecid) ve MK-571((E)-3- [[3- [2- (7-Chloro-2-quinoliny)] ethenyl]

phenyl] -[[3-dimethylamino) -3-oxopropyl] thio] methyl] thio] -propanoic Acid,) inhibisyonu gerçekleştirmek amacıyla kullanıldı. Yaptığımız denemeler sonucu her iki kimyasal maddenin MRP-1'i aynı oranda inhibe ettiği saptandı. Çeşitli makalelerde önerilen konsantrasyonlar denenerek probenesitin 200 μ M, MK-571'in ise 10 μ M olan konsantrasyonlarda 1 saat 37°C'deki koşullarda etkili oldukları saptandı.

3.2.7. ATP Düzeylerinin Belirlenmesi Yöntemi (Bioluminesans)

Kullanılan çözeltiler:

Luciferase

ATP

Tris-EDTA (100 mM. tris 4 mM. EDTA) (kaynamış)

ATP ölçümü bioluminesans deney kiti CLS II (ATP Bioluminescence Assay Kit CLC II) (Roche) ile çalışıldı.

Astım ve kontrol gruplarına ait lökositlerde ATP ölçümü yapıldı. Süspansiyon 50 μ l. hacimde ve ml.'de 10^5 - 10^8 lökosit olacak şekilde hazırlandı. Bir hacim lökosit süspansiyonuna 9 hacim kaynamış tris-EDTA solüsyonu eklenerek +100°C'de 2 dk. bekletildi. 1000xg'de 60 sn. santrifüj edilerek süpernatant alınarak buz içinde kısa süre bekletildi. Örneklerden tüplere 50 μ l. aktarılması sonrasında üzerine 50 μ l. luciferase eklenerek 1-10 sn. içerisinde kemilüminesans ölçümü yapıldı. Blank ölçümü ise ATP veya hücre yokluğunda yapıldı. ATP standartının belirlenmesi maksadı ile 1 pM.'den 1 mM.'a kadar artan ATP konsantrasyonları kullanıldı. Sonuçlar 1×10^6 hücre başına pM. olarak hesaplandı.

3.2.8. LTC4 Seviyelerinin Ölçümü ELİSA

Kullanılan solüsyonlar:

PMA(phorbol myristate acetate)

L-Serin

Probenesit

PBS

Plasmada LTC₄ seviyeleri normalde çok düşük seviyelerde olduğu için LTC₄'ün öncül maddesi olan L-Serin ve hücre dışına salgılanmasını sağlayan PMA hücre kültür sisteminde LTC₄'ün hücre dışında birikmesi amacıyla kullanıldı.(rf.) lökosit izolasyonunu takiben 3-5x10⁶ hücre 200 µM. probenecid ile 1 saat 37°C'de inkübe edildi. 45'inci dk.'da 50 mM. L-Serin, 50'nci dk. da 1 µg/ml. PMA eklenerek 60'ıncı dk. sonunda 8000xg'de 2 dk. Santrifüj edildi, üst sıvı ve hücre peleti ayrılarak -80°C'ye kaldırıldı. LTC₄ seviyeleri bu saklanan üst sıvılarda tespit edildi.

LTC₄ seviyeleri Cayman'ın LTC₄ EIA kiti (96 testlik) ile çalışıldı (Rao A. M. 1999).

Testin yapılışı:

- 1) Örnekler ve standartlardan 50 µl. kuyulara koyuldu.
- 2) LTC₄ antiserumdan 50 µl. tüm kuyulara (kör, total aktivite, non spesifik bağlanma kuyuları hariç) eklendi.
- 3) 18 saat oda sıcaklığında antijen antikör bağlanması için bekletildi.
- 4) Her bir kuyu 5 defa yıkandı.
- 5) Taze olarak hazırlanan Elman ayırıcından 200 µl. tüm kuyulara eklendi.
- 6) Renklenme aşaması için 60-90 dk. karanlıkta bekletildi.
- 7) Örnekler mikropate okuyucu cihazı ile 405 nm.'de okundu.
- 8) Standartlar önerildiği gibi çift çalışıldı.

Sonuçlar kit prospektüsünde önerilen yöntem ve standartlar kullanılarak hesaplandı. LTC₄ seviyeleri her örnekten inhibe edilen ve inhibe edilmeyen olmak üzere pg/ml. cinsinden ölçüldü. Sonuçlar ng/10⁶ hücre olarak hesaplandı.

3.2.9. Trombosit Lökosit Agregatları Ve İntrastoplazmik MRP-1(sMRP-1)'in Tespiti

Kullanılan çözeltiler;

PBS (fosfat tamponu) çözeltisi:

8.1 gr. NaCl,

2.302 gr. Na₂HPO₄,

0.194 gr. NaH₂ PO₄ tartılarak 1 L’de çözülür.

EDTA’ lı PBS (%12.5 K₃EDTA’lı PBS)

Saponinli PBS (500 µg/ml. saponin),

BD Facs Lysing solüsyon,

Facs flow izotonik sıvı.

EDTA’lı kan ile çalışılmış olup örnek tüplerine izotip kontrol ve monoklonal antikorların (CD45, CD42b) her birinden 20 µl. konularak yüzey boyama yapıldı. Tüplere 100µl. tam kan ilave edilerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dk. inkübe edildi. Sonrasında 1ml. eritrosit eritici solüsyon(lysing solüsyon) eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 15dk. inkübe edildi. Üzerine PBS eklenerek 5dk. 800xg’de santrifüj edildi ve üst faz atıldı.

İntrasitoplazmik boyama için 100µl. saponinli PBS eklenerek +4°C’de ve karanlıkta 20dk. inkübe edildi. 20µl. Anti-MRP1 FITC ilave edildikten sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta 60dk. inkübe edildi. Daha sonra üzerlerine 1 ml. saponinli PBS eklenerek 600xg’de 5dk. santrifüj edildi ve üst faz atıldı. Pelete 500µl. PBS eklenerek akan hücre ölçer yardımı ile trombosit lökosit agregatları ve intrastoplazmik MRP-1(sMRP-1)’in tespiti yapıldı (Schmidt V. 2006, . H. M. Sanderson 1998, Gawaz MP 1994, Michelson AD. 2001).

Tablo 3-7: Akan Hücre Ölçer İle Yapılan Deneylerde Kullanılan Antikor Ve İzotip Kontroller.

Antikor	İzotip kontrol	Marka
MRP1 – FITC	IgG _{2a} , k – FITC	BD pharmingen
CD 62P – FITC	IgG ₁ , k – FITC	BD pharmingen
CD 14 – FITC	igG _{2a} , k – FITC	BioLegend
CD 41b – PE	IgG ₁ , k – PE	BioLegend

CD 42b – PE	igG ₁ , k – PE	BioLegend
CD 45 – PECy5	IgG ₁ , k - PECy5	BioLegend

3.2.10. Trombosit Aktivitesinin Akan Hücre Ölçer İle Tespiti

Trombosit lökosit agregatları ve intrastoplazmik MRP-1(sMRP-1)'in tespiti yönteminde kullanılan çözeltiler kullanıldı.

Astım ve kontrol grubu vakalarında yapılan çalışmada 4 ml. EDTA'lı kan alınarak 300xg'de 10 dk. Santrifüj edilerek trombosit zengin plazma (TZP) ayrıldı. TZP 1500xg'de 5 dk. santrifüj edilip plazma ayrılarak -20°C'de saklandı. Trombosit pelleti homojenize edilerek 2 ml. EDTA'lı PBS eklendi. 1500xg'de 5 dk. Santrifüj edilerek üst faz atıldı. Pelete 1 ml. EDTA'lı PBS eklendi. Herbirinden 20 µl. olmak üzere CD62P, CD41b, CD 42b, MRP1 monoklonal antikorları ve bu dört antikoru izotip kontrolleri ile 100 µl. trombosit süspansiyonu tüplere konarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dk. bekletildi. PBS eklenerek 600xg'de 5dk. santrifüj edildi ve üst faz atıldı. Pelete 500µl. PBS eklenerek akan hücre ölçer yardımı ile trombosit aktivitesi tespit edildi.

Trombosit lökosit agregatları ve intrastoplazmik MRP-1(sMRP-1)'in tespiti, trombosit aktivitesinin Akan Hücre Ölçer ile tespiti deneylerinde CellQUEST yazılımı ve akan hücre ölçer cihazı yardımı ile hücreler analiz edildi. Trombosit lökosit agregatları; lenfosit, monosit, granülosit ve lökosit hücre gruplarında tek (histogram) ve çift (dot plot) parametrelili grafiklerle ayrı ayrı değerlendirildi (Michelson AD. 2001, Leytin V. 2000).

3.2.11. Lökosit İzolasyonu

Periferik kandan lökosit izolasyonu (Boyum A. 1968) 10ml. EDTA'lı kandan yapıldı. Sızdırma metodu ile Histopaque 1119 üzerine yayılan periferik kan, 1500xg'de 20 dk. santrifüj edildi. Yoğunluk gradiyentine göre fazlara ayrılan kandan lökosit tabakası cam pastör pipeti yardımı ile toplanarak 2 defa steril PBS ile yıkandıktan sonra planlanan deneylere tabi tutuldu.

3.2.12. Trombosit Agregasyon Yöntemi

Periferik venöz kan 1/9 oranında %3.8'lik Sodyumsitrat ile karıştırıldı. 300xg'de 15 dk. santrifüj edilerek üst fazdaki trombositden zengin plazma alındı. Tüpte kalan kan Histopaque 1119 üzerine yayılarak 1500xg'de 20 dk. çevrildi. Yoğunluk gradiyenti prensibi ile halka şeklinde oluşan lökosit hücre tabakası pastör pipet yardımıyla toplanarak 2 defa PBS tamponu ile yıkandı.

500 µl. trombositten zengin plazma T1, T2, T3, T4, T5, T6 olarak markalanan 6 ayrı tüpe konuldu. (T1)'e 3×10^8 trombosit/ml., (T2)'ye 3×10^8 trombosit/ml. ve 1×10^6 lökosit, (T3)'e 3×10^8 trombosit/ml., 1×10^6 lökosit, 200µM. probenecid, (T4)'e 3×10^8 trombosit/ml. (T5)'e 3×10^8 trombosit/ml., 1×10^6 lökosit, 200µM. Probenecid, 20µM CumOH, (T6)'ya 3×10^8 trombosit/ml., 1×10^6 lökosit 20µM CumOH koyularak +37°C'lik etüvde 1 saat inkübe edildi.

Ardından her içerik agregometrenin örnek kaplarına aktararak 3 dk. +37°C'de bekletildi ve 3 dk. boyunca 1µM.ADP eklenerek trombosit agregasyonu takip edildi. Agregometre den elde edilen agregasyon kurbu(grafığı) eğim ve % amplitüd olarak değerlendirildi(Tutluoğlu B.2005, Greer J.P 2008).

3.2.13. İndirgenmiş Glutasyon Tayini(GSH)

Hücre lizatlarındaki sülfhidril gruplarının Ellman ayırıcı ile oluşturdukları rengin spektrofotometrik olarak saptanmasına dayanan bir yöntemdir (J. Beier 2003).

Kullanılan solüsyonlar:

0,2 M. EDTA (soğuk)

%20'lik TCA (soğuk)

0,4 M. Tris pH:8,9

Elman ayırıcı: 3,4 mg/ml. dTNB / metanol

150 µl. hücre süspansiyonu (lökosit) 150 µl. EDTA ile karıştırılarak hücreler parçalandı. 10 µl. süspansiyon ise protein tayininde kullanılmak üzere ayrıldı. Kalan hücre lizatının üzerine 20 µl. soğuk TCA eklenerek proteinler presipite edildi. 5 dk. beklenmesi sonrasında 1500xg'de 5 dk. çevrilerek oluşturulan üst sıvı -30°C'ye kaldırıldı. Çalışma öncesinde çözülen üst sıvıdan 100 µl. alınarak kuyuya konuldu (96 kuyuluk plak). Sonrasında 160 µl. tris solüsyonu ilave edilerek 5 dk. karanlıkta

bekletildi. En fazla 5-10 dk. içerisinde 414 nm. dalga boyunda spektrofotometre ile yapılan ölçüm ile glutatyon düzeyi belirlendi. Her örneğe ait protein miktarı belirlenerek 10^6 hücreye karşılık gelen protein miktarı hesaplanarak Glutatyon seviyeleri $\mu\text{M}/10^6$ hücre cinsinden hesaplandı.

3.2.14. Protein Miktar Tayini (Lowry-Hartree Modifiye Yöntem)

Kullanılan solüsyonlar:

Solüsyon A: 7 mM. NaK tartarat

0.81 M. Na CO₃

0.5 N. NaOH

Solüsyon B: 7 mM. NaK tartarat

40 mM. CuSO₄

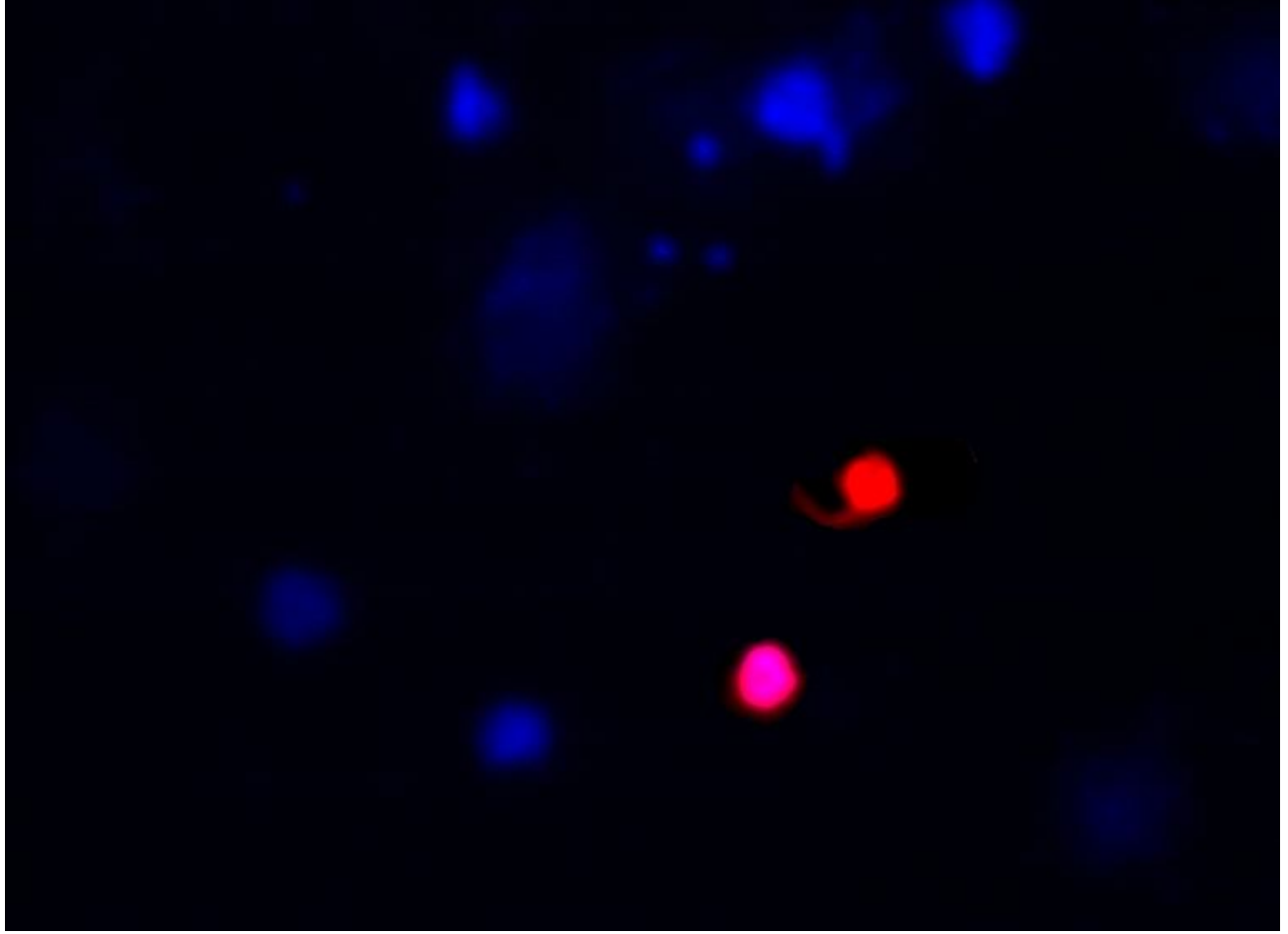
Solüsyon C: 1 hacim Folin + 15 hacim H₂O

100 μl . protein miktarı ölçülecek olan solüsyon üzerine 90 μl . “solüsyon A” ilave edilerek +50°C’de 10 dk. bekletildi. Oda sıcaklığında soğutulması sonrasında ise 10 μl . “solüsyon B” eklenerek 10 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 300 μl . “solüsyon C” eklenerek 10 dk. +50°C’de bekletildi. 650 nm. dalga boyunda okundu. BSA (bowin serum albümin) kullanılarak protein standart eğrisi oluşturuldu. Sonuçlar $\mu\text{g}/\text{ml}$. olarak hesaplandı. (modifiye edilmiş Lowry: Lowry O.H. 1951, Oostra G.M. 1987, Stocscheck CM.1990, Hartree E.F. 1972)

3.2.15. Apoptoz Ve Nekroz Tayini

MRP1 inhibisyonu sonucu oksidatif stresin hücreye verdiği zararı apoptoz ve nekroz açısından tespit edebilmek için dört ayrı deney sonucunda hücreler incelendi. EDTA’lı kandan lökosit izolasyonunu takiben MRP-1 inhibisyonu ve oksidatif stresin arttırılması amacıyla kümen hidroperoksit ile dört ayrı deney planlandı. Deneylerin içerikleri şu şekildedir: Her deney tüpüne 1×10^6 lökosit koyulduktan sonra A1 kontrol, A2 200 μM . probenecid, A3 200 μM . Probenecid + 20 μM . kümen, A4 20 μM . kümen olacak şekilde uygulandı. Bir saat 37°C’de su banyosunda inkübasyon sonrasında 1500xg’de 5 dk. santrifüj edildi. Üst sıvıdan 900 μl atılarak kalan 100 μl içerisindeki hücre peleti resüspanse edilerek 0.13 mM. Hoechst 33258/ 0.23 mM. PI boyalarından 5

μ l. eklendi ardından 5 dk. $+37^{\circ}\text{C}$ 'lik etüvde inkübe edildi. Boyanan hücreler lam üzerine yayılarak $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Floresans mikroskopunda soluk mavi floresans veren hücreler canlı, koyu mavi floresans veren hücreler erken apopitoz, mor floresans veren hücreler geç apopitoz, kırmızı floresans veren hücreler nekroz olarak değerlendirildi(Şekil 3-2). En az 300 hücre sayılarak sonuçlar yüzde hücre sayısı olarak hesaplandı.



Şekil 3-2: Apopitoz, Nekroz Ve Hücre Canlılığının Floresan Mikroskop Görüntüsü.

Canlı: açık soluk mavi ve küçük. Erken apopitoz: koyu mavi. Geç apopitoz:menekşe. Nekroz: kırmızı.

3.2.16. Serum HNE Ölçümü

Kullanılan solüsyonlar:

PBS

Yıkma tamponu (Wash buffer)

Anti-HNE antikoru (Anti-HNE antibody)

HNE-BSA standartları (0.5 µg/ml. İle 10 µg/ml arasında 8 konsantrasyon) hazırlandı.

4-HNE seviyeleri ELİSA kiti (96 testlik) ile çalışıldı(Machado M.V 2008).

Testin yapılışı :

- 1) Serum protein düzeyi PBS tamponu ile 10µg/ml.'ye ayarlanan örnekler ve standartlardan 100 µl. koyuldu.
- 2) Bir gece +4C° 'de antijen antikor bağlanması için bekletildi.
- 3) HNE antiserumdan 50 µl. tüm kuyulara (kör hariç) eklendi.
- 4) Her bir kuyu 5 defa yıkandı.
- 5) Her bir kuyuya 200 µl. "Assay dilüent" eklendi.
- 6) 1-2 saat oda sıcaklığında çalkalandı.
- 7) Her bir kuyu 5 defa yıkandı.
- 8) Her bir kuyuya 100 µl."anti-HNE-His Antibody" eklendi.
- 9) 1 saat oda sıcaklığında çalkalandı.
- 10) Her bir kuyu 5 defa yıkandı.
- 11) Her bir kuyuya 100 µl."sekonder antibody-HRP conjugate" eklendi.
- 12) 1 saat oda sıcaklığında çalkalandı.
- 13) Her bir kuyu 5 defa yıkandı.
- 14) Her bir kuyuya 100 µl."substrat" eklendi.
- 15) 5-20 dk. oda sıcaklığında çalkalandı.
- 16) Her bir kuyuya 100 µl reaksiyonu durdurma solüsyonu eklendi.
- 17) Örnekler 450nm dalga boyunda mikropate okuyucusunda okundu. Sonuçlar standart eğri üzerinden hesaplandı.

3.2.17. İstatistiksel Analiz

SPSS 16 programı kullanılarak; Student-t testi, Wilcoxon testi, Man-Withney-U testi, Pillai's Trace testi (post-hoc) çoklu kıyaslamalar (LSD) testi, Bonferroni, Dunnett t testi yapıldı. Ayrıca yaptığımız deneyler arasındaki bağıntıları tespit etmek için

Pearson korelasyon testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama ve standart sapma olarak değerlendirildi ve verildi.

KİMYASAL MADDELER

Tablo 3-8: Kimyasal Maddeler.

İzopropil alkol (Merc)
 CFDA (5,6 Carboksi fluoresein di acetat (İnvitrogen))
 Calcein-AM (Calcein-acetoxymethylester) (Biochemica)
 MK-571((*E*)-3-[[[3-[2-(7-Chloro-2-quinoliny)ethenyl]phenyl]-[[3-dimethylamino)-3-oxopropyl]thio]methyl]thio]-propanoic Acid) (Cayman)
 Probenecid (İnvitrogen)
 DMSO (Dimetilsülfoksit) (Sigma)
 Etanol (Merck)
 Metanol (Merck)
 ADP (Adenozin di fosfat) (Chronolog)
 Luminol (Sigma)
 PI (Propidium iodur) (Sigma)
 Hoechst 33258 (Sigma)
 NaCl (Sodyum klorür) (Merck)
 Na₂HPO₄ (Merck)
 NaH₂ PO₄ (Merck)
 Histopaque 1119 (Sigma)
 PMA(phorbol myristate acetate)(Sigma)
 L-Serin (Sigma)
 Saponin (Sigma)
 Triton X-100 (Merck)
 Glutaraldehit (Merck)
 Na-citrat (Merck)
 EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) (Sigma)

Kümen CuOOH(Cumene hydroperoxide) (Merck)
 Syber Green (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya)
 dTNB (5,5 ‘ ditiobis-2 nitrobenzoikası) (Merck)
 Glutation (GSH ind)(Sigma)
 CDNB(chloro-dinitro benzene) (Sigma)
 Agaro (Sigma)
 EtBr (Sigma)

KULLANILAN ARAÇLAR

Tablo 3-9: Çalışmada Kullanılan Araçlar.

Benmary (Su banyosu) (Kotterman labortecnic tip 3047)
 Hassas terazi (Chyo tip JL 180)
 pH metre (Microprocessor pH meter pH537WTW tip 50)
 Buzdolabı (Bosch)
 Derin dondurucu -20 oC , -80°C (Forma Scientific)
 Derin dondurucu -80 derece (Heraeus Sepatech)
 Vorteks (Jake&Kunkel IKA labor tecnic VF2)
 Karıştırıcı (Jake&Kunkel IKA labor tecnic IKO)
 Spektrofotometre (Shimadzu)
 Akan Hücre Ölçer (FACSCalibur Becton Dickinson(BD)-ABD)
 Floresans mikroskobu (Nicon)
 Mikro ELİSA okuyucu (Pasteur)
 Etüv (37°C) (Memmert)
 Deney tüpleri (Facs flow tüpü)
 Kültür tüpleri (Falcon)
 Sonikatör (Sonoreks)
 Otomatik pipet (Gilson)
 Light Cycler 480 (Roche Diagnostics)
 Güç kaynağı (Vericon)
 Laminar air flow steril kabin (Thermo, Scientific)
 Jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat)
 Agregometre (Chronolog 500)
 Mini jel tankı (Thermo)
 Masaüstü mini santrifüj (Eppendorf) (Hettich)

Sogutmalı santrifüj (Heraus) (Rotina)

Spektrofotometre (NanoDrop)

CCD kamera - bilgisayar donanımı Bio Rad -Universal Hood II-SN

Çeker Ocak (Kermanlar)

4. BULGULAR

4.1. Lökositlerdeki MRP1 Gen İfadesi Düzeyleri

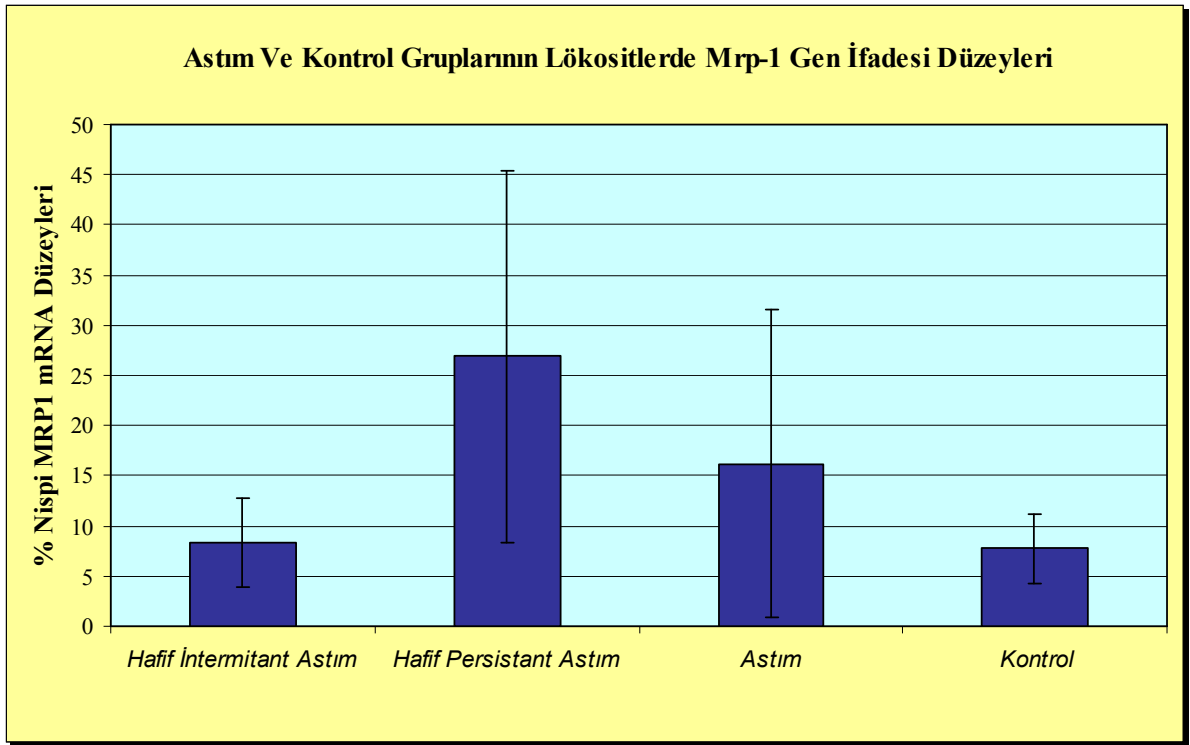
Hücreyi oksidatif stres ürünlerinden koruyan, hücre içi konjugatları hücre dışına atan bir protein olan MRP1 gen ifadesi düzeyleri, alerjik astımlı hastaların ve kontrol grubunun lökositlerinde eş zamanlı kantitatif PZR yöntemi ile incelendi. (**Tablo4-1. Şekil-4-1.**) hastalık derecesine göre sınıflandırılan hasta grubunda MRP1 gen ifadesi düzeyleri hafif persistant astımda kontrol grubuna oranla anlamlı olarak yüksek bulunurken($P<0.05$). Hafif intermitant astımda anlamlı fark tespit edilemedi. MRP-1 gen ifadesi düzeyleri astım grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı olarak yüksek bulundu($P<0.05$) ancak bu farklılık tabloda görüldüğü gibi hafif persistant astımdaki MRP1 gen ifadesi düzeylerinin çok yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Hafif persistant astımda MRP1 gen ifade düzeyleri hafif intermitant astım grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek bulundu($P<0.05$). (**Tablo 4-1, Şekil 4-1**)

Tablo 4-1: Astım ve Kontrol Grubunun Lökositlerinde MRP-1 Gen İfadesi Düzeyleri.

	n	MRP1 gen ifade düzeyleri
		% nispi
Hafif intermitant astım	15	8,32 ± 4,47
Hafif persistant astım	11	26,88 ± 18,49**
Astım	26	16,17 ± 15,34*
Kontrol	18	7,74 ± 3,49

* $P < 0,05$: Man Withney U Testi ile Astım grubu kontrol grubu kıyaslandığında.

** $P<0,05$: Tamhane testi, Astımın alt grupları kendi aralarında ve kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. Değerler 26 astım 18 kontrol bireye ait olup referans genlere göre %nispi mRNA seviyesi olarak verilmiştir.



Şekil 4-1: Astım Ve Kontrol Vakalarının Lökositlerinde MRP1- Gen İfadesi Seviyeleri.

Değerler 26 astım 18 kontrol bireye ait olup referans genlere göre %nispi mRNA seviyesi olarak verilmiştir.

MRP1 gen ifade düzeylerinin astım derecesi($r=0,44$) ile doğru orantılı olarak artarken, ATP seviyeleri ile ters orantılı olarak düştüğü perarson korelasyon analiziyle gösterildi.

Şekil 4-2: MRP-1 Ve Siklofilin Gen İfadesi(Ekspresyonu) Analiz Sonucu.



4.2. MRP1 Fonksiyonu Ve Substratlarının(CFDA,Calcein-AM, LTC₄) Tayini

4.2.1. Astım ve Kontrol Gruplarında Hücre İçi CFDA ve Calcein-AM Birikimi (Akümülayon), MRP1 Fonksiyonu ile İlişkisi

MRP1'in özgül substratları olan CFDA ve Calcein-AM 1µM konsatrasyonda olmak üzere 37°C'de 1saat inkübe edilerek hücre içi fluoresan düzeyleri astım ve kontrol grubunda tespit edildi. Ayrıca MRP-1'in 200µM probenecid ile 37°C'de 1 saat inhibisyonu sonucunda astım ve kontrol grubunda hücre içindeki CFDA ve Calcein-AM birikimi tespit edildi.

Kontrol, astım, hafif intermitant astım ve hafif persistant astım grupları arasında hücre içi CFDA düzeylerinde istatistiksel açıdan bir fark tespit edilemedi, aynı zamanda MRP1 inhibisyonu yapıldığında da kontrol, astım, hafif intermitant astım ve hafif persistant astım grupları arasında hücre içi CFDA düzeylerinde istatistiksel açıdan bir fark tespit edilemedi(Mann-Whitney U ve Bonferroli, Dunnet testi P>0,05).

Kontrol grubunda MRP-1 inhibisyonu sonucunda hücre içi CFDA birikimi inhibisyon yapılmayan CFDA birikimine göre ileri düzeyde anlamlı olarak artmıştır (Tablo 4-2, Şekil 4-3).

Astım grubunda MRP-1 inhibisyonu sonucunda lökositlerde hücre içinde kalan CFDA miktarı inhibisyon yapılmayan hücre içi CFDA miktarına göre anlamlı olarak artmıştır. Astımın alt grupları olan hafif intermitant astım ve hafif persistant astım gruplarında da MRP1 inhibisyonu sonucu hücre içi CFDA birikimi, inhibisyon yapılmayan hücre içi CFDA birikimine göre artmıştır(Wilcoxon P<0.05) (Tablo 4-2)

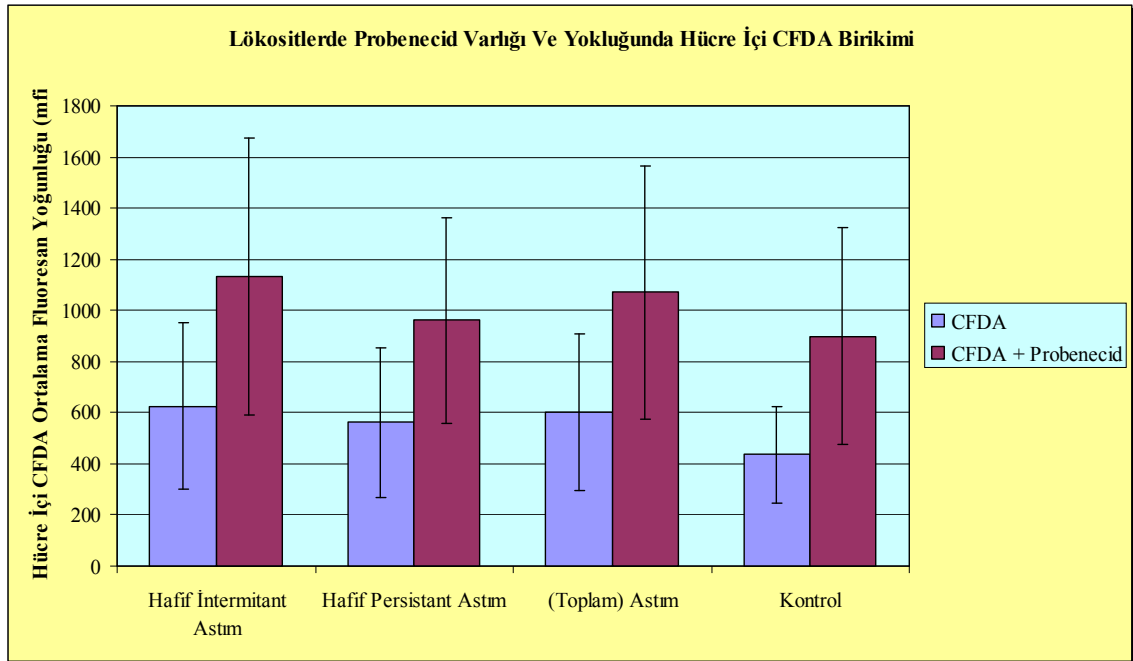
Tablo 4-2: Lökositlerde MRP1 İnhibisyonu Varlığı Ve Yokluğunda Hücre İçi CFDA Birikimi.

	Hücre içi CFDA (mfi)ortalama fluoresan yoğunluğu		
	n	CFDA	MRP1 inhibisyonu sonucu CFDA
Hafif intermitant astım	16	624,53± 324,84	1132,85± 542,58*
Hafif persistant astım	9	561,07± 291,88	960,57± 403,81*
Astım	25	601,68 ± 308,73	1070,83± 495,45*
Kontrol	17	435,86± 189,61	898,01± 424,47*

(mfi: mean fluoresans intensity)

1µM CFDA, 200µM Probenecid 10⁶ lökosit ile 37C°'de 1 saat inkübe edilmiştir.

*P<0.05: Astımın alt gruplarında, astım ve kontrol gruplarında MRP1 inhibisyonu öncesi ve sonrası arasındaki farkı denetlemek için Pair Student-t Testi uygulandı.



Şekil 4-3: MRP-1 İnhibisyonu Sonucu Hücre İçi CFDA Birikiminin Ölçümü.

Kontrol, astım, hafif intermitant astım ve hafif persistent astım grupları arasında hücre içi Calcein-AM düzeylerinde istatistiksel açıdan bir fark tespit edilememiş aynı zamanda MRP1 inhibisyonu yapıldığında da kontrol, astım, hafif intermitant astım ve hafif persistent astım grupları arasında hücre içi Calcein-AM düzeylerinde istatistiksel açıdan bir fark tespit edilememiştir(Student t testi ve Bonferroni, Dunnett t testi $P>0,05$).

Kontrol grubunda MRP-1 inhibisyonu sonucunda hücre içi Calcein-AM birikimi, inhibisyon yapılmayan Calcein-AM birikimine göre anlamlı olarak artmıştır.

Astım grubunda MRP-1 inhibisyonu sonucunda lökositlerde hücre içi Calcein-AM birikimi inhibisyon yapılmayan Calcein-AM birikimine göre ileri düzeyde anlamlı olarak artmıştır(Wilcoxon $P<0.05$). Ancak hafif persistent astım grubunda istatistiksel olarak fark tespit edilememiştir. Hafif intermitant astım grubunda ise inhibisyon sonrası hücre içi Calcein AM miktarları inhibisyon yapılmayan Calcein AM miktarlarına göre ileri düzeyde anlamlı olarak artmıştır(Tablo 4-3, Şekil 4-4).

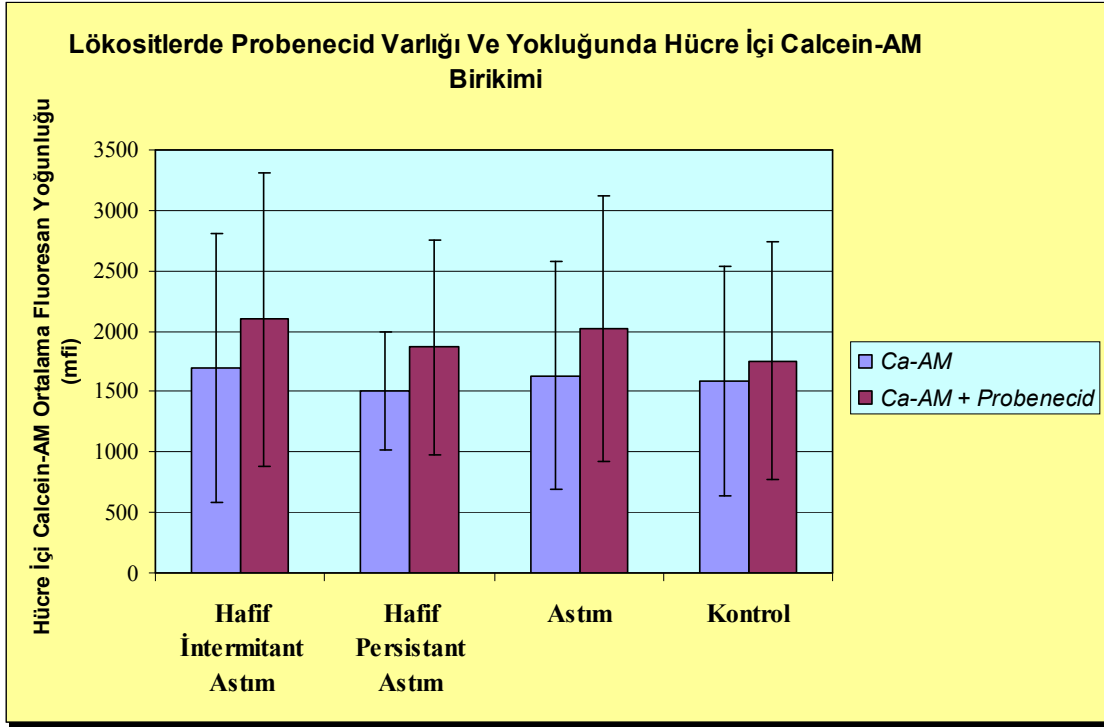
Tablo 4-3: Lökositlerde Probenecid Varlığı Ve Yokluğunda Hücre İçi Calcein-AM Birikimi.

	n	Ca-AM (mfi)	MRP1 inhibisyon sonucu Ca-AM (mfi)
Hafif intermitant astım	16	1694,76 ± 1114,90	2100,10 ± 1212,55**
Hafif persistent astım	9	1503,01 ± 488,54	1866,04 ± 893,220
Astım	25	1630,84 ± 944,36	2022,08 ± 1102,00**
Kontrol	18	1584,38 ± 945,66	1752,30 ± 983,33*

((mfi) mean fluoresans intensity) ortalama fluoresan yoğunluğu

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ Kontrol astım ve astımın alt gruplarında MRP1 inhibisyonu öncesi ve sonrası arasındaki farkı denetlemek için Wilcoxon Testi uygulandı

1 μ M Calcein-AM, 200 μ M Probenecid 10⁶ lökosit ile 37C°'de 1 saat inkübe edilmiştir.



Şekil 4-4: Lökositlerde Probenecid Varlığı Ve Yokluğunda Hücre İçi Calcein-AM Birikimi.

Bu sonuçlar bize; Ca-AM substratının MRP1 proteini tarafından astım ve hafif intermitant astım grubuplarında hızlı taşınırken kontrol grubunda astıma göre daha yavaş taşındığını düşündürmektedir. CFDA substratı için ise astım ve kontrol gruplarının her ikisinde de taşıma hızı benzerdir.

MRP-1 taşıyıcı proteini ATP bağlayıcı bir proteindir. Çalışmamıza katılan tüm deneklerin ATP düzeylerine bakıldı. Lökositlerde ATP seviyeleri kemilüminesans esasına dayanılarak ölçüldü.

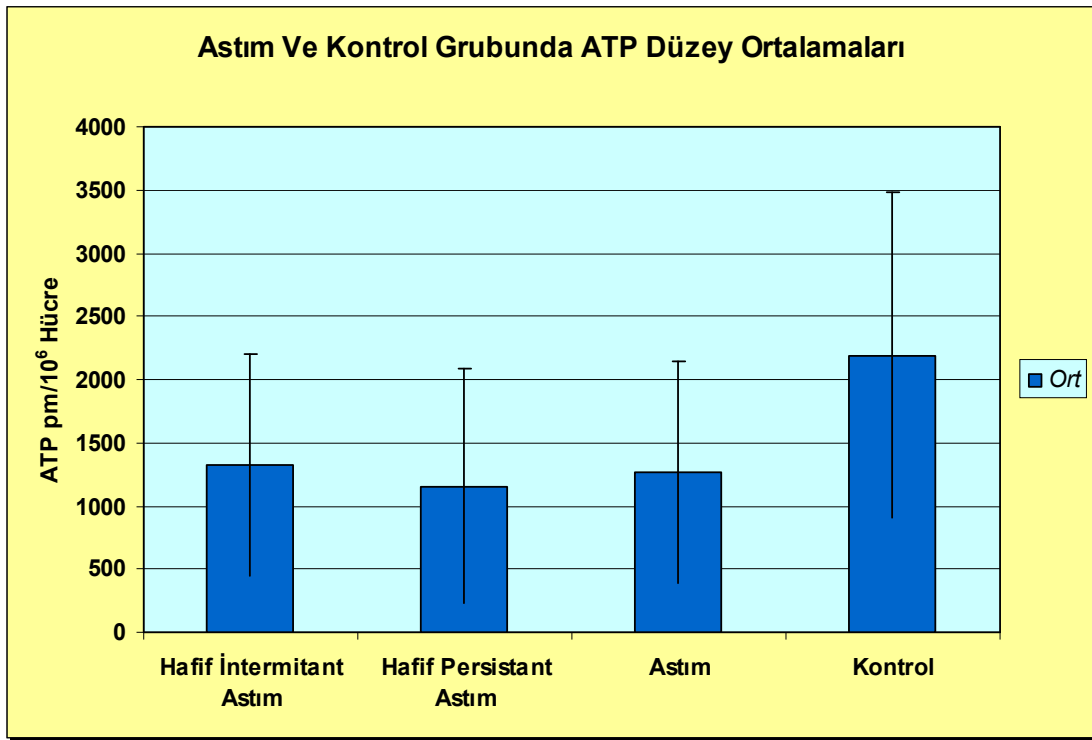
ATP seviyeleri alerjik astımlı grupta kontrol grubuna göre daha düşük, (Mann Withney U Testi $P < 0.01$). hafif intermitant astım ve hafif persistant astım gruplarına göre de daha düşük olarak tespit edildi(Dunnett t testi $P < 0,05$). ATP seviyeleri hafif intermitant astım ve hafif persistant astım grupları arasında farklı bulunmadı(**Tablo 4-4 Şekil 4-5**).

Tablo 4-4: Astım ve Kontrol Gruplarında ATP Düzeyleri.

	n	ATP pM/10 ⁶ Hücre
Hafif intermitant astım	19	1321,8 ± 873,35*
Hafif persistant astım	14	1155,1 ± 926,35*
Astım	33	1267,26 ± 877,39**
Kontrol	19	2191,65 ± 1287,30

Dunnett t testi *P< 0,05

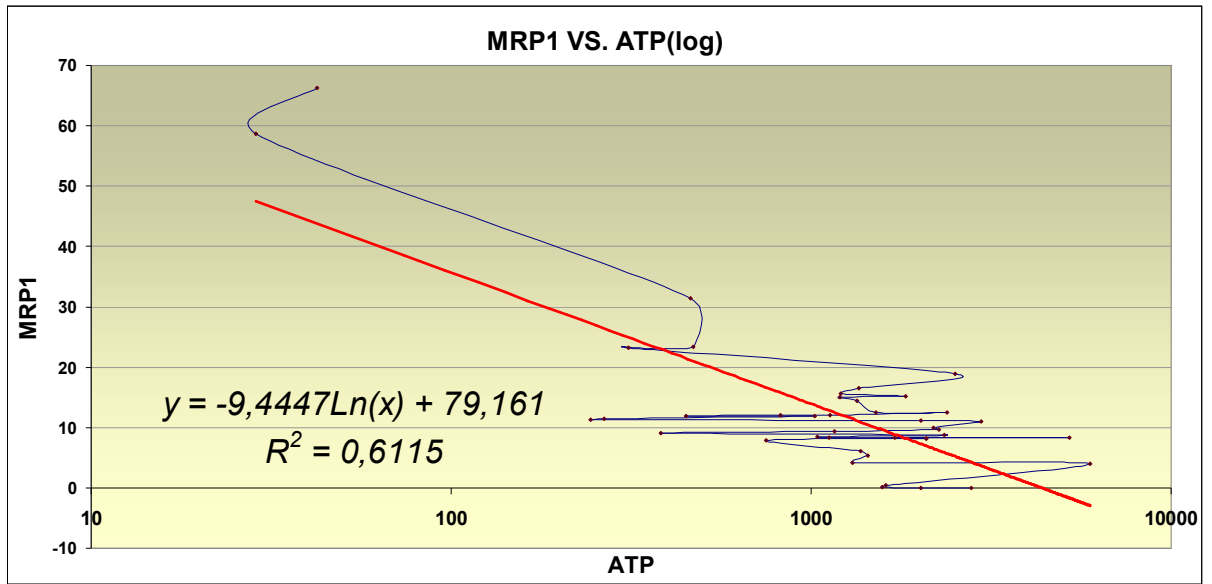
Mann Withney U Testi **P< 0,01



Şekil 4-5: Astım Ve Kontrol Gruplarında ATP Düzeyleri.

4.2.1.1. MRP1 ile ATP Arasındaki Korelasyon

MRP1 taşıyıcı proteini ATP'ye bağımlı olarak çalıştığı bilindiğinden dolayı MRP1 ekspresyonu ve ATP düzeylerinin arasındaki bağıntı istatistik olarak değerlendirildi. Astım ve kontrol gruplarında detaylı istatistiksel analiz sonucu ATP düzeyleri ile MRP-1 gen ifade düzeyleri arasında, ters yönde bir bağıntı tespit edildi($r = -0,42$)(Şekil 4-6).



Şekil 4-6: MRP-1 ve ATP Arasındaki Korelasyonun Grafiği.

4.2.2. Astımda MRP-1 Fonksiyonuyla LTC4 Düzeylerinin İlişkisi

CysLT'lerden LTC₄, MRP-1 taşıyıcı proteini tarafından hücre içinden hücre dışına taşınan ve inflamasyon gelişimine katkıda bulunan aracı bir maddedir. LTC₄ seviyeleri kontrol, astım ve astımın alt gruplarında istatistiksel olarak farklı bulunmadı(Student t Testi, Bonferroni ve Dunnett Testi $P > 0.05$). MRP-1 taşıyıcı proteininin lökositlerde probenecid ile +37°C'de 1 saat inhibisyonu sonucu LTC₄ seviyelerinin hücre dışındaki düzeyleri ELİSA yöntemiyle tespit edildi. Her örnek için inhibe edilen ve inhibe edilmeyen değerler **Tablo 4-5**'de verilmektedir.

MRP-1 inhibisyonunun astım grubunda hücre dışına taşınan LTC₄ seviyelerini anlamlı olarak düşürdüğü ($p<0.05$), kontrol grubunda ise herhangi bir değişime neden olmadığı tespit edildi (Tablo 4-5, Şekil 4-7) MRP1 inhibisyonu hafif intermitant astım ve hafif persistant astım gruplarında hücreden salgılanan LTC₄ seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe neden olmadığı tespit edildi.

MRP1 taşıyıcı proteini tarafından hücre içinden hücre dışına taşınan fizyolojik bir ajan olan LTC₄ astım grubunda, kontrol grubundan daha hızlı taşınmaktadır. Ancak astımın alt gruplarında bu fark istatistiksel olarak saptanamamıştır. Astımda Ca-AM ile gösterdiğimiz yüksek taşınma hızı ve yüksek MRP1 gen ifade düzeylerinin kontrolden daha yüksek bulunması LTC₄'ün taşınma hızıyla paralellik göstermektedir.

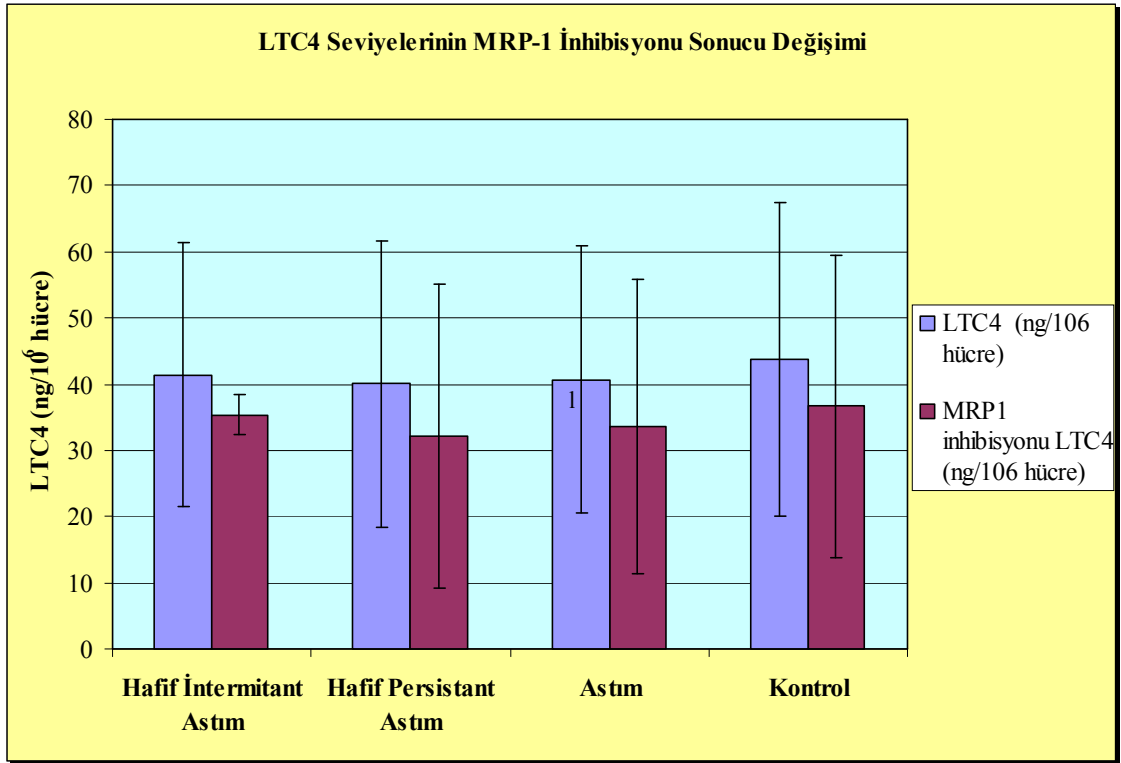
Tablo 4-5: LTC₄ Seviyelerinin MRP-1 İnhibisyonu Sonucu Değişimi.

	LTC ₄ (ng/10 ⁶ hücre)		
	n	LTC ₄	MRP1 inhibisyonu sonucu LTC ₄
Hafif intermitant astım	7	41,40± 19,92	35,40± 22,93
Hafif persistant astım	8	40,01± 21,66	32,14± 23,02
Astım	15	40,66± 20,13*	33,66± 22,21*
Kontrol	12	43,73± 23,67	36,67 ± 22,78

Kontrol ve astım grupları Student t Testi ile, kontrol ve astımın alt grupları Bonferroni ve Dunnett Testi ile kıyaslandı $P>0.05$.

Kontrol, astım ve astımın alt gruplarında MRP1 inhibisyonu öncesi ve sonrası arasındaki farkı denetlemek için Wilcoxon Testi uygulandı * $P<0.05$

200µM Probenecid 3×10^6 lökosit ile 37C°'de 1 saat inkübasyon.



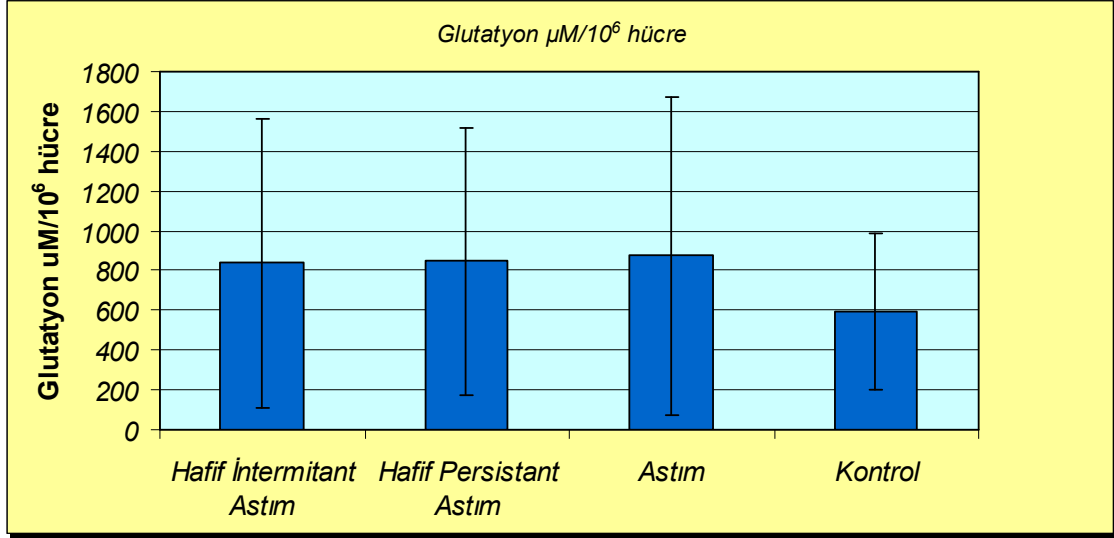
Şekil 4-7: LTC4 Seviyelerinin MRP-1 İnhibisyonu Sonucu Değişimi.

4.3. Lökositlerdeki Glutasyon Düzeyleri

Astım ve kontrol grupları arasında lökositlerdeki glutasyon düzeyleri açısından fark bulunmadı. ($P > 0.05$)(Tablo 4-6, Şekil 4-8)

Tablo 4-6: Astım Ve Kontrol Gruplarının Glutasyon Düzeyleri

	n	Glutasyon $\mu\text{M}/10^6$ hücre
Hafif intermitant astım	18	$839,43 \pm 727,48$
Hafif persistant astım	13	$845,21 \pm 672,17$
Astım	31	$896,47 \pm 668.70$
Kontrol	20	$592,51 \pm 391,96$



Şekil 4-8: Astım Ve Kontrol Gruplarının Glutasyon Düzeyleri.

4.4. Serum HNE Düzeyleri

Oksidatif stresin son ürünlerinden biri olan HNE düzeylerini astım ve kontrol gruplarının serum örneklerinde ölçtük. Astım ve kontrol gruplarında serum HNE düzeyleri istatistiksel olarak farklı bulunmadı.(Tablo 4-7)

Tablo 4-7: Astım Ve Kontrol Grubu Serum HNE Ortalamala Düzeyleri.

	n	HNE µg/ml.
Hafif intermitant astım	13	5,96 ± 0,63
Hafif persistant astım	9	5,54 ± 0,64
Astım	22	5,71 ± 0,66
Kontrol	17	5,98 ± 1,01

4.5. Trombosit Aktivitesi

Astımda trombosit aktivitesini tespit edebilmek amacıyla akan hücre ölçer cihazı kullanıldı. Trombositlerin aktiviteleri membranlarındaki özel glikoproteinler ve reseptörlerin tespiti ile her hangi bir uyarıcı ajan kullanılmadan gerçekleştirildi.

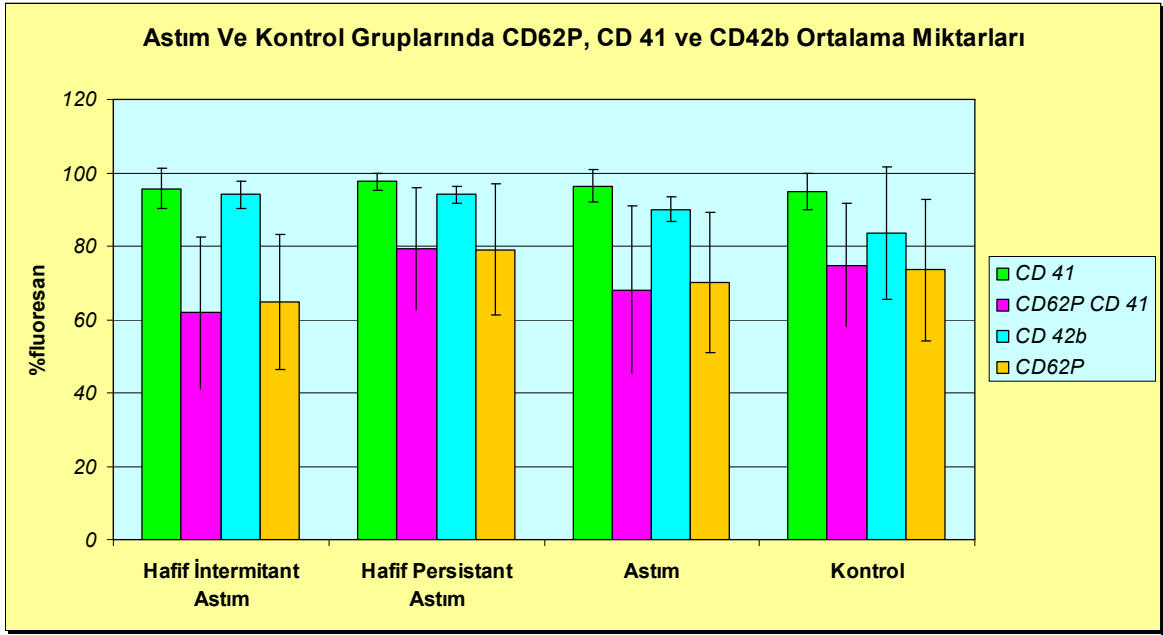
Akan hücre ölçer cihazı ile yapılan trombosit aktivite deneyi, trombositlerin izolasyonu ve bunu takiben CD41, CD62P, CD42b antikorlarıyla muamelesi sonucu yapıldı.

Trombosit aktivitesi GpIIb/IIIa'ya özgül CD41 antikor, P selektin'e özgül CD62P antikor ve Glikoprotein Ib (GpIb)'ye özgül CD42b antikor kullanılarak yapıldı. Astım ve kontrol grupları arasında trombosit aktivitesi CD41, CD62P, CD41CD62P ortalama floresan değerleri açısından fark tespit edilemezken($P>0.05$), aktif trombositlerin diğer bir belirteci olan CD42b astım grubunda, kontrol grubundan ileri düzeyde anlamlı olarak daha yüksek bulundu(**Tablo 4-8**). Astımın alt gruplarının kendi aralarında ve kontrol grubu ile kıyaslanmaları sonucu trombosit aktivite belirteçleri açısından bir fark tespit edilemedi(**Tablo 4-8**).

Tablo 4-8: Astım Ve Kontrol Gruplarında CD62P, CD 41 Ve CD42b Miktarları.

	n	Trombosit aktivite belirteçleri % floresans			
		CD 41	CD62P CD 41	CD 42b	CD62P
Hafif intermitant astım	16	97,67 ± 2,28	61,80 ± 20,66	94,10 ± 3,75	64,75 ± 18,52
Hafif persistant astım	9	96,44 ± 4,52	79,19 ± 16,63	94,01 ± 2,29	79,06 ± 17,82
Astım	25	95,74 ± 5,33	68,06 ± 22,77	94,07 ± 3,24*	70,11 ± 19,22
Kontrol	18	94,84 ± 4,95	74,83 ± 16,71	83,65 ± 18,09*	73,52 ± 19,37

* $P < 0,01$: Mann Withney U testi



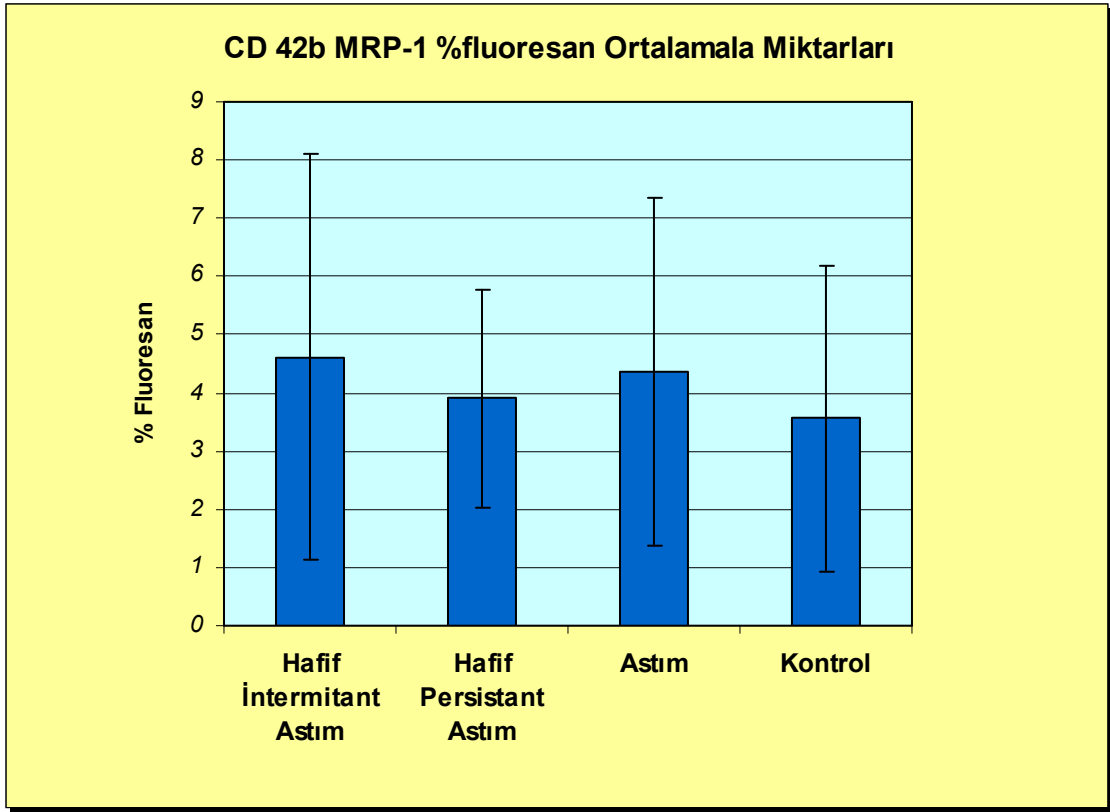
Şekil 4-9: Astım ve Kontrol Gruplarında CD62P, CD 41 ve CD42b Miktarları.

4.6. Trombositlerde MRP1 Miktarı

Akan hücre ölçer cihazı ile yapılan trombositlerdeki MRP1 miktarı, trombositlerin izolasyonu ve bunu takiben CD42b ve MRP1 antikorlarının muamelesi sonucu yapıldı. Trombositlerde MRP-1 yüzde(%) ve ortalama floresan yoğunluğu(mfi:mean floresan intencity) değerleri gruplar arasında farklı bulunmadı(Tablo 4-9, Şekil 4-10, Tablo 4-10, Şekil 4-11).

Tablo 4-9: Trombositlerde MRP-1 Miktarı(% Floresan).

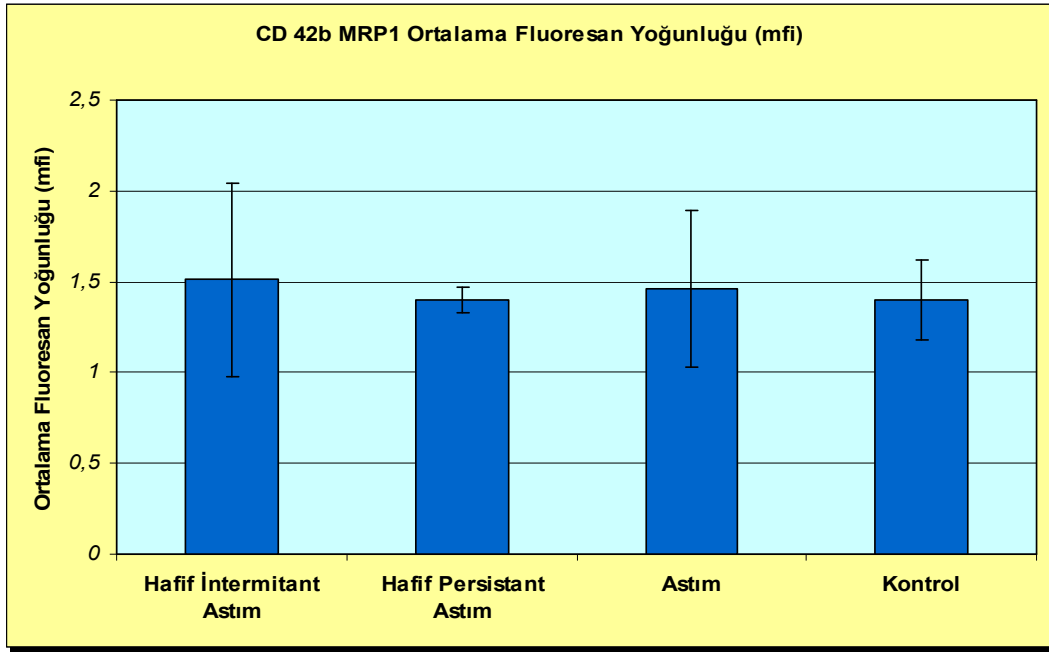
	Trombositlerde MRP1 miktarı % floresan	
	n	CD 42b MRP1
Hafif intermitant astım	16	4,62 ± 3,49
Hafif persistent astım	9	3,90 ± 1,87
Astım	25	4,36 ± 2,98
Kontrol	18	3,56 ± 2,63



Şekil 4-10: Trombositlerde MRP-1 Miktarı(%fluoresan).

Tablo 4-10: Trombositlerde MRP-1 Miktarı(Mfi)

	Trombositlerde MRP1 miktarı (mfi)	
	n	CD 42b MRP1
Hafif intermitant astım	16	1,51 ± 0,53
Hafif persistant astım	9	1,40 ± 0,07
Astım	25	1,46 ± 0,43
Kontrol	18	1,40 ± 0,22



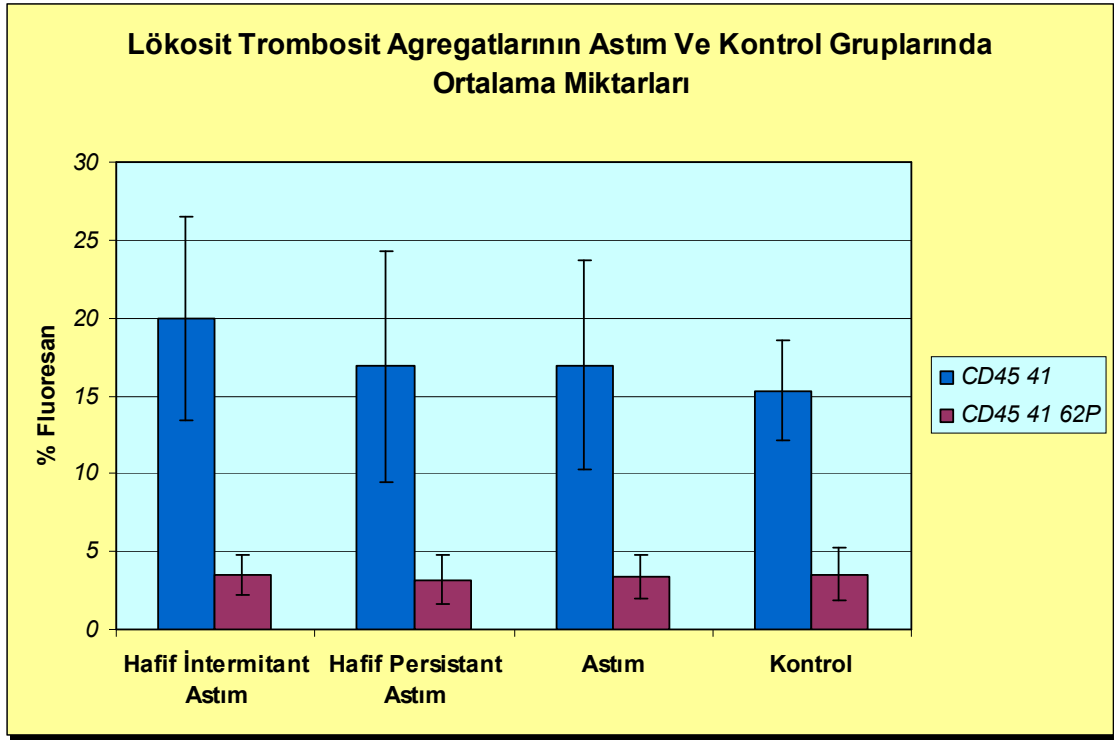
Şekil 4-11: Trombositlerde MRP-1 Miktarı(mfi).

4.7. Trombosit Lökosit Agregatları

Astım ve kontrol grupları, CD62P CD45 CD41 antikorlarıyla akan hücre ölçer cihazı yardımıyla yapılan lökosit-trombosit agregatlarının miktarı açısından istatistiksel olarak farklı bulunmadı.(Tablo 4-11, Şekil 4-12).

Tablo 4-11: Lökosit Trombosit Agregatlarının Astım Ve Kontrol Gruplarındaki Ortalama Değerleri.

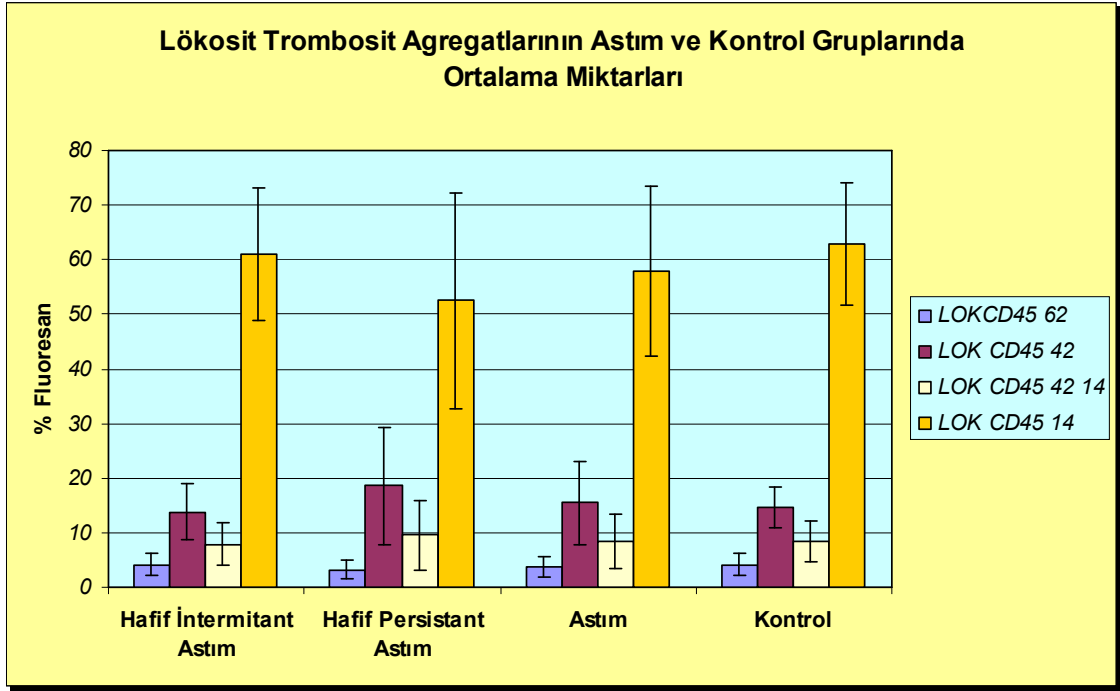
	Lökosit-trombosit agregatları % fluoresan		
	n	CD45 41	CD45 41 62
Hafif intermitant astım	16	19,99 ± 6,56	3,49 ± 1,33
Hafif persistant astım	9	16,92 ± 7,41	3,21 ± 1,59
Astım	25	16,96 ± 6,72	3,39 ± 1,40
Kontrol	18	15,35 ± 3,19	3,54± 1,69



Şekil 4-12: Lökosit Trombosit Agregatlarının Astım Ve Kontrol Gruplarındaki Ortalama Değerleri.

Tablo 4-12: Aktive Olmuş Trombositlerle Agregat Yapan Lökositlerin Astım Ve Kontrol Gruplarındaki Ortalamaları.

Lökosit-trombosit agregatları					
% fluoresans					
	n	CD45 62	CD45 42	CD45 42 14	CD45 14
Hafif intermitant astım	16	4,16 ± 1,93	13,80 ± 5,11	7,80 ± 3,89	61,05 ± 12,21
Hafif persistant astım	9	3,18 ± 1,68	18,53 ± 10,75	9,54 ± 6,38	52,47 ± 19,89
Astım	25	3,83 ± 1,87	15,50 ± 7,62	8,43 ± 4,87	57,96 ± 15,58
Kontrol	18	4,16 ± 1,92	14,64 ± 3,85	8,48 ± 3,78	62,91 ± 11,13

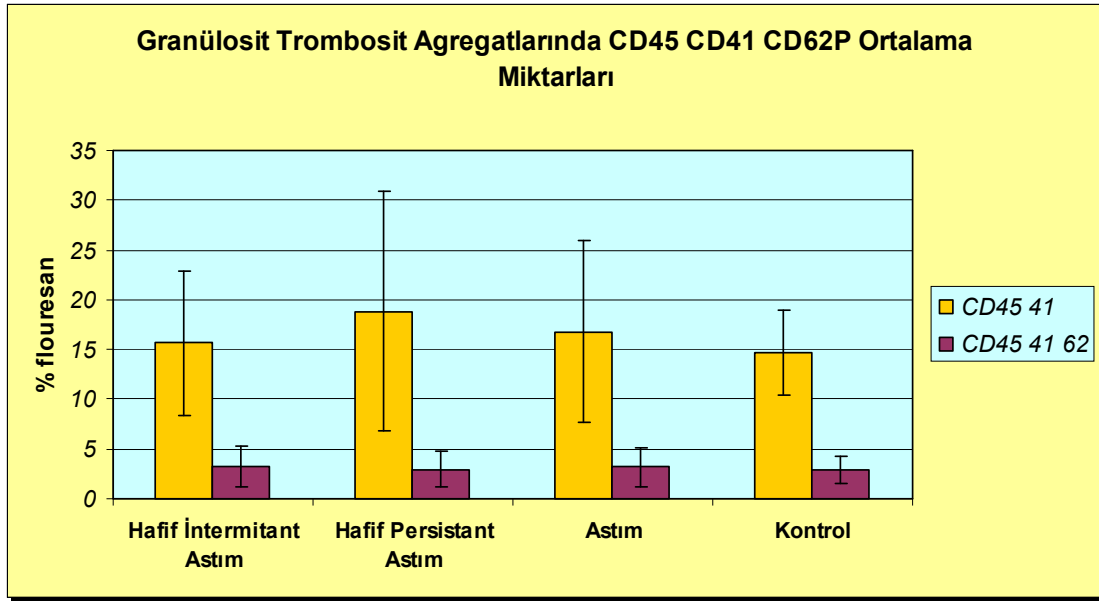


Şekil 4-13: Aktive Olmuş Trombositlerle Agregat Yapan Lökositlerin Astım Ve Kontrol Gruplarındaki Ortalamaları.

Astım ve kontrol grupları, granülosit trombosit ve lökosit trombosit agregatlarının miktarı açısından farksız bulundu (Tablo 4-12, Şekil 4-13, Tablo 4-13, Şekil 4-14).

Tablo 4-13: Astım Ve Kontrol Gruplarının Granülosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD41, CD62P Ortalama Miktarları.

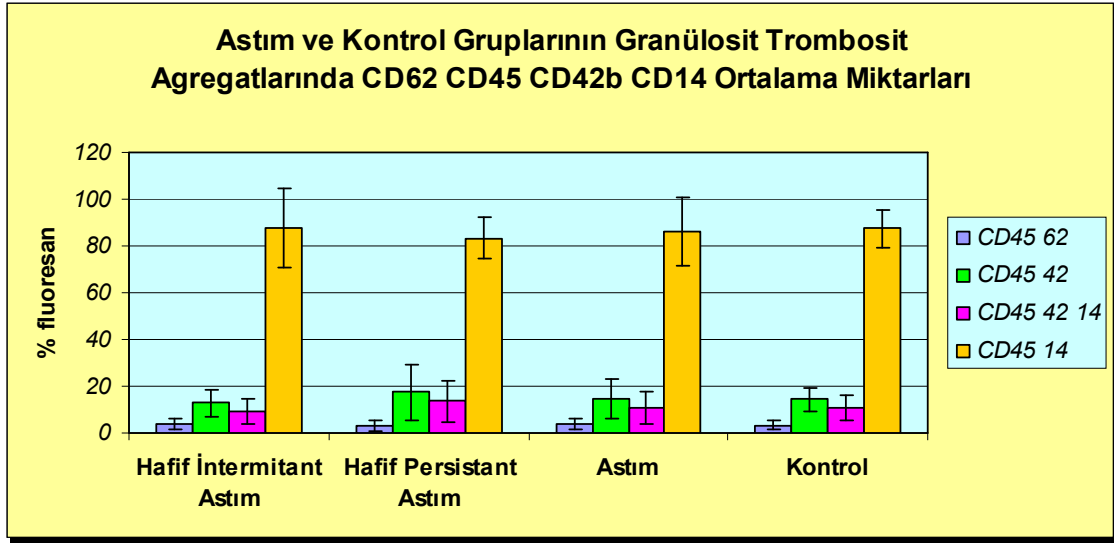
	Granülosit-trombosit agregatları		
	% fluoresan		
	n	CD45 41	CD45 41 62
Hafif intermitant astım	16	15,67 ± 7,24	3,31 ± 2,06
Hafif persistant astım	9	18,83 ± 12,01	2,97 ± 1,86
Astım	25	16,81 ± 9,12	3,19 ± 1,96
Kontrol	18	14,74 ± 4,29	2,84 ± 1,38



Şekil 4-14: Astım Ve Kontrol Gruplarının Granülosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD41, CD62P Ortalama Miktarları.

Tablo 4-14: Astım Ve Kontrol Gruplarının Granülosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD42b, CD62P, CD14 Ortalama Miktarları.

Granülosit-trombosit agregatları					
% fluoresans					
	n	CD45 62	CD45 42	CD45 42 14	CD45 14
Hafif intermitant astım	16	3,77 ± 2,25	12,71 ± 5,66	9,27 ± 5,31	87,62 ± 17,18
Hafif persistant astım	9	3,27 ± 2,18	17,46 ± 12,10	13,56 ± 9,00	83,29 ± 8,99
Astım	25	3,59 ± 2,19	14,42 ± 8,61	10,70 ± 6,88	86,18 ± 14,85
Kontrol	18	3,39 ± 1,91	14,34 ± 5,27	10,51 ± 5,50	87,66 ± 8,05

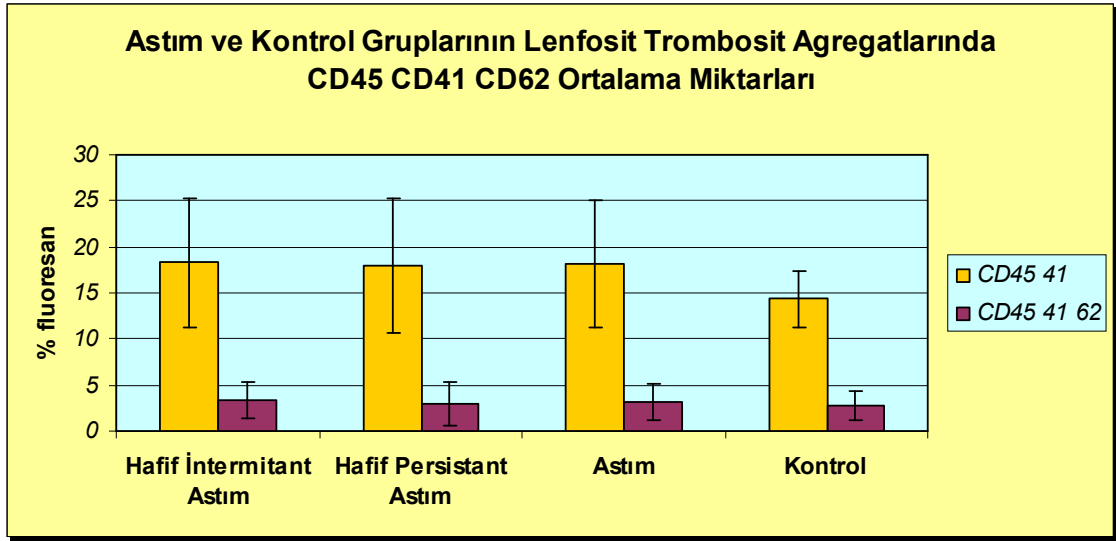


Şekil 4-15: Astım Ve Kontrol Gruplarının Granülosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD42b, CD62P, CD14 Ortalama Miktarları.

Astım ve kontrol grupları, lenfosit trombosit agregatlarında CD45, CD41, CD62P ortalama miktarı açısından farksız bulundu(Tablo 4-15, Şekil 4-16)

Tablo 4-15: Astım Ve Kontrol Gruplarının Granülosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD41, CD62P Ortalama Miktarları.

	Lenfosit-trombosit agregatları		
	% fluoresan		
	n	CD45 41	CD45 41 62
Hafif intermitant astım	16	18,29 ± 7,04	3,30 ± 1,94
Hafif persistant astım	9	17,91 ± 7,26	2,95 ± 2,34
Astım	25	18,15 ± 6,97	3,17 ± 2,01
Kontrol	18	14,36 ± 3,07	2,75 ± 1,66



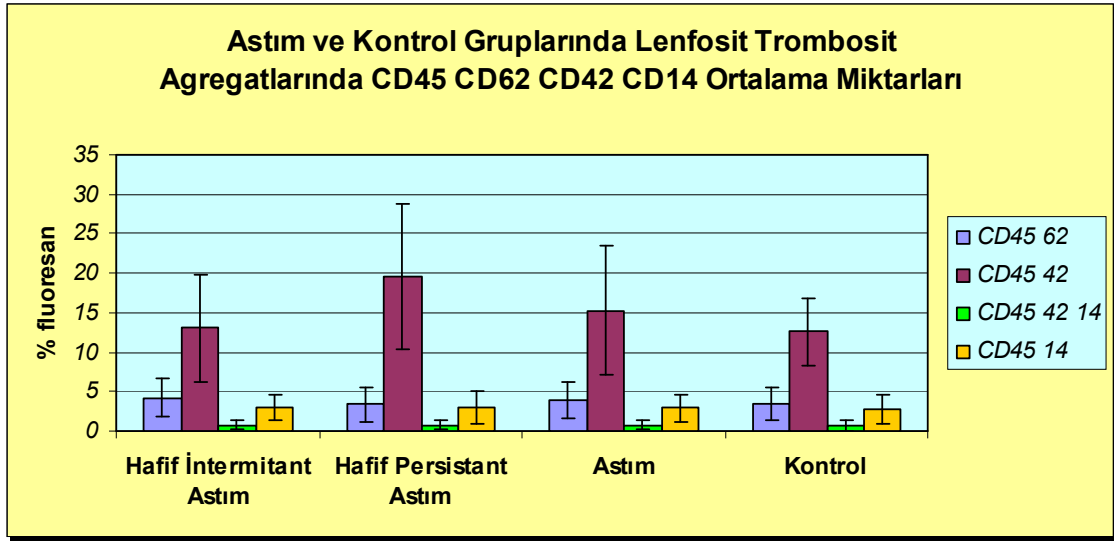
Şekil 4-16: Astım Ve Kontrol Gruplarının Lenfosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD41, CD62P Ortalama Miktarları.

Astım ve kontrol grupları, lenfosit trombosit agregatlarında CD45, CD62P, CD14 ortalama miktarlarını açısından farksız ($P > 0,05$) bulunurken CD42 CD45 ortalama miktarları açısından hafif persistant astım grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulundu ($P < 0,05$) (Tablo 4-16, Şekil 4-17).

Tablo 4-16: Astım Ve Kontrol Gruplarının Lenfosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD42b, CD62P, CD14 Ortalama Miktarları.

Lenfosit-trombosit agregatları					
% fluoresans					
	n	CD45 62	CD45 42	CD45 42 14	CD45 14
Hafif intermitant astım	16	4,24 ± 2,45	13,07 ± 6,82	0,78 ± 0,510	2,92 ± 1,59
Hafif persistant astım	9	3,43 ± 2,21	19,56 ± 9,30*	0,80 ± 0,67	2,94 ± 2,04
Astım	25	3,93 ± 2,35	15,23 ± 8,15	0,79 ± 0,56	2,92 ± 1,71
Kontrol	18	3,49 ± 2,04	12,57 ± 4,29*	0,76 ± 0,69	2,76 ± 1,91

* $P < 0,05$ Astımın alt grupları ve kontrol arasında kıyaslama Bonferroni testi kullanıldı.

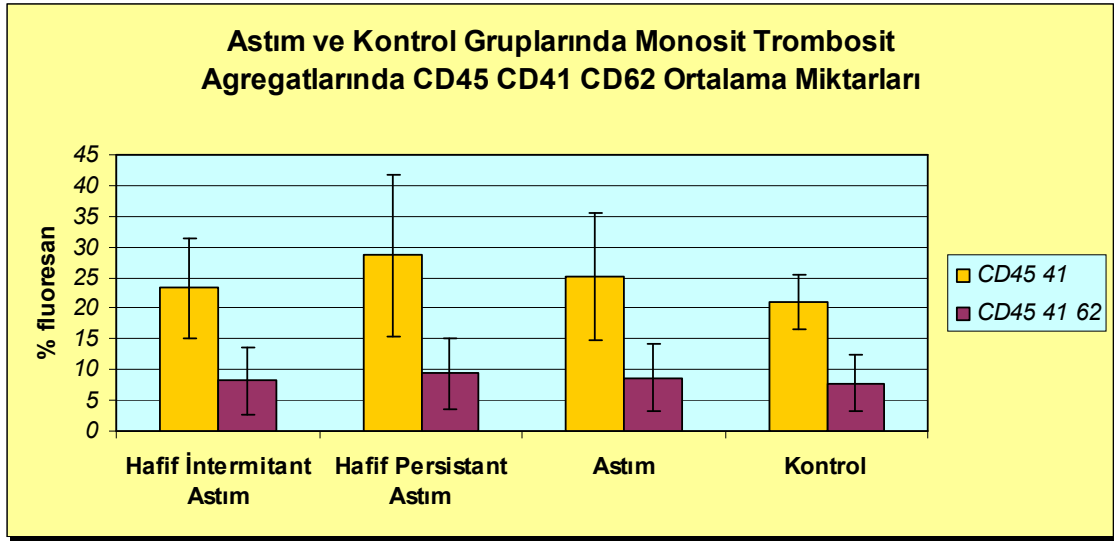


Şekil 4-17: Astım ve Kontrol Gruplarının Lenfosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD42b, CD62P, CD14 Ortalama Miktarları.

Astım ve kontrol grupları, monosit trombosit agregatlarında CD45, CD41, CD62P CD14 ortalama miktarları açısından farksız bulundu(Tablo 4-17, Şekil 4-18)(Tablo 4-18).

Tablo 4-17: Astım Ve Kontrol Gruplarının Monosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD41, CD62P Ortalama Miktarları.

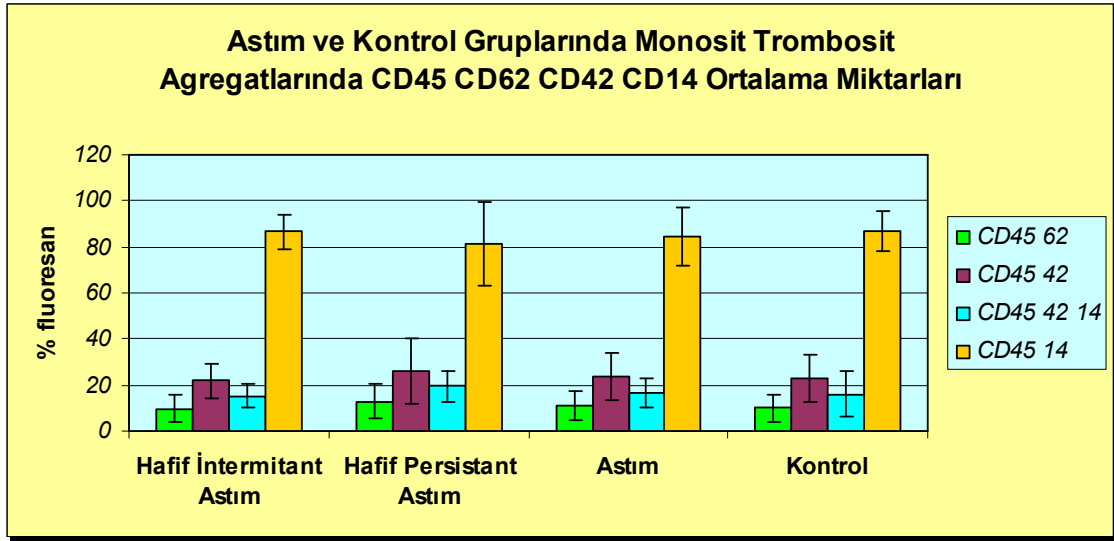
	Monosit-trombosit agregatları		
	% fluoresan		
	n	CD45 41	CD45 41 62
Hafif intermitant astım	16	23,25 ± 8,11	8,24 ± 5,52
Hafif persistant astım	9	28,68 ± 13,21	9,39 ± 5,85
Astım	25	25,20 ± 10,31	8,64 ± 5,53
Kontrol	18	21,06 ± 4,48	7,81 ± 4,51



Şekil 4-18: Astım Ve Kontrol Gruplarının Monosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD41, CD62P Ortalama Miktarları.

Tablo 4-18: Astım Ve Kontrol Gruplarının Monosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD42b, CD62P, CD14 Ortalama Miktarları

Monosit -trombosit agregatları					
%fluoresans					
	n	CD45 62	CD45 42	CD45 42 14	CD45 14
Hafif intermitant astım	16	9,86 ± 6,20	21,99 ± 7,47	15,23 ± 5,23	86,60 ± 7,62
Hafif persistant astım	9	12,90 ± 7,25	25,75 ± 14,27	19,41 ± 6,72	80,98 ± 18,13
Astım	25	11,00 ± 6,63	23,34 ± 10,30	16,62 ± 5,97	84,58 ± 12,39
Kontrol	18	9,93 ± 6,18	22,80 ± 10,13	15,99 ± 9,74	86,67 ± 8,55



Şekil 4-19: Astım ve Kontrol Gruplarının Monosit-Trombosit Agregatlarında CD45, CD42b, CD62P, CD14 Ortalama Miktarları.

4.8. İntrastoplazmik MRP-1 Miktarları

Lökosit trombosit agregatlarında intrastoplazmik MRP-1 miktarları hafif persistant astım grubunda kontrol grubundan farksız bulunurken hafif intermitant astım grubunda kontrol grubundan yüksek olarak bulundu ($P < 0,05$) (Tablo 4-19).

Tablo 4-19: Astım Ve Kontrol Gruplarında Lökosit Trombosit Agregatlarında İntrasitoplazmik (S)MRP-1 Miktarının Ortalama Değerleri.

	Lökosit-trombosit agregatları	
	%fluoresans	
	n	CD45 42 sMRP
Hafif intermitant astım	16	2,87 ± 1,37*
Hafif persistant astım	9	2,12 ± 0,42
Astım	25	2,60 ± 1,12
Kontrol	18	2,01 ± 0,49*

* $P < 0,05$: Kontrol ve astımın alt grupları arası kıyaslama Bonferroni testi ile yapılmıştır.

Granülosit trombosit agregatlarında intrastoplazmik MRP-1 miktarları hafif persistant astım grubunda kontrol grubundan farksız bulunurken hafif intermitant astım grubunda kontrol grubundan yüksek olarak bulundu($P<0,05$) Granülosit trombosit agregatlarında yüzey MRP1 miktarları astım ve kontrol grupları arasında farklı bulunmadı(**Tablo 4-20**)

Tablo 4-20: Astım Ve Kontrol Gruplarında Granülosit Trombosit Agregatlarında Intrastoplazmik (S)MRP-1 Miktarının Ortalama Değerleri.

	Granülosit-trombosit agregatları	
	% fluoresans	
	N	CD45 42 sMRP
Hafif intermitant astım	16	$3,50 \pm 2,19^*$
Hafif persistant astım	9	$2,43 \pm 0,51$
Astım	25	$3,12 \pm 1,83$
Kontrol	18	$2,19 \pm 0,56^*$

* $P<0,05$: Kontrol ve astımın alt grupları arası kıyaslama Bonferroni testi ile yapılmıştır.

Lenfosit trombosit agregatlarında intrastoplazmik MRP-1 miktarları hafif persistant astım grubunda kontrol grubundan farksız bulunurken hafif intermitant astım grubunda kontrol grubundan yüksek olarak bulundu($P<0,05$) Lenfosit trombosit agregatlarında yüzey MRP1 miktarları astım ve kontrol grupları arasında farklı bulunmadı(**Tablo 4-21**)

Tablo 4-21: Astım Ve Kontrol Gruplarında Lenfosit Trombosit Agregatlarında İntrasitoplazmik (S)MRP-1 Miktarının Ortalama Değerleri.

	Lenfosit-trombosit agregatlarında MRP1	
	%fluoresans	
	n	CD45 42 sMRP
Hafif intermitant astım	16	2,01 ± 0,97*
Hafif persistant astım	9	1,49 ± 0,19
Astım	25	1,80 ± 0,82
Kontrol	18	1,45 ± 0,28*

*P<0,05: Kontrol ve astımın alt grupları arası kıyaslama Bonferroni testi ile yapılmıştır.

Monosit trombosit agregatlarında intrastoplazmik MRP-1 miktarları hafif persistant astım grubunda kontrol grubundan farksız bulunurken hafif intermitant astım grubunda kontrol grubundan yüksek olarak bulundu(P<0,05) (**Tablo 4-22**)

Tablo 4-22: Astım Ve Kontrol Gruplarında Monosit Trombosit Agregatlarında İntrasitoplazmik (S)Mrp-1 Miktarının Ortalama Değerleri.

	Monosit-trombosit agregatlarında MRP1	
	%fluoresans	
	n	CD45 42 sMRP
Hafif intermitant astım	16	2,95 ± 1,44*
Hafif persistant astım	9	2,11 ± 0,46
Astım	25	2,65 ± 1,23
Kontrol	18	2,12 ± 0,60*

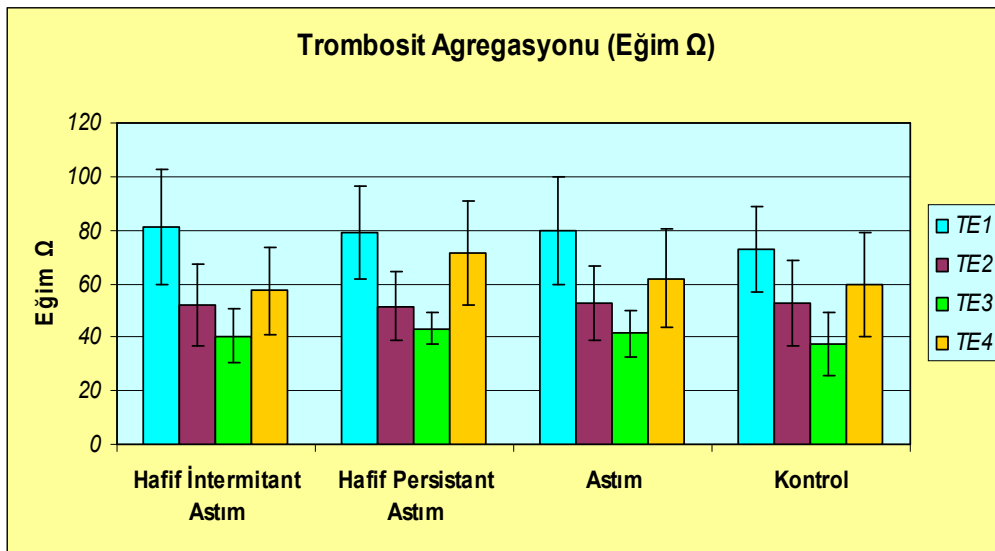
*P<0,05: Kontrol ve astımın alt grupları arası kıyaslama Bonferroni testi ile yapılmıştır.

4.9. Trombosit Fonksiyonu

Trombosit fonksiyonları, sekresyon ve agregasyon fonksiyonu açısından agregometre cihazı yardımıyla ADP ile uyarılarak çalışıldı. Astım ve kontrol grupları arasında agregasyon eğrisinin iki ölçüsü olan %amplitüd ve eğim cinsinden değerlendirilerek karşılaştırıldı. Astım (hafif intermitant astım, hafif persistant astım ve astım) ve kontrol grupları arasında eğim ve %amplitüd açısından anlamlı fark bulunamadı. Trombosit agregasyon göstergesi olan eğim (TE1) ($r = -0,40$) attıkça MRP1 gen anlatım seviyelerinin ters orantılı olarak düştüğü tespit edildi.

Trombosit ve lökositlerde probenecid ile MRP1 inhibisyonu sonucu örneklerdeki trombosit agregasyon sonuçları **Tablo 4-23**'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre astım ve kontrol grupları arasında trombosit agregasyonu açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır(**Şekil 4-20**).

Trombosit agregasyon eğrisinin (kurbanun) eğiminin hesaplanması ile elde edilen değerlerin MRP-1 inhibisyonu yapılan trombosit ve lökositlerde (TE3) kontrole göre (TE2, TE1) ileri düzeyde anlamlı olarak düşük bulundu. (General Linear Model - Multivariate Test'den Pillai's Trace testi uygulanmıştır)($P < 0.01$)



Şekil 4-20: MRP-1 İnhibisyonu Sonucu Trombosit Agregasyon Eğrisinin Eğim Cinsinden Değişimi.

Tablo 4-23: MRP-1 İnhibisyonu Sonucu Trombosit Agregasyon Eğrisinin Eğim Cinsinden Değişimi.

	Trombosit agregasyonu (Eğim Ω)				
	n	TE1	TE2	TE3	TE4
Hafif intermitant astım	19	81,04 ± 21,72*	51,86 ± 15,15	40,47 ± 10,09*	57,28 ± 16,15
Hafif persistant astım	10	79,16 ± 17,39*	51,67 ± 12,77	43,28 ± 5,74*	71,38 ± 19,68
Astım	29	79,74 ± 20,02*	52,67 ± 14,14	41,41 ± 8,86*	61,98 ± 18,32
Kontrol	18	73,05 ± 15,89*	52,76 ± 16,24	37,61 ± 11,77*	59,50 ± 19,45

*P< 0,05 :TE1 > (TE4 = TE2) > TE3

TE1: trombosit

TE2: trombosit + lökosit

TE3: trombosit + lökosit ve probenecidle inhibisyon

TE4: trombosit

TE2, TE3, TE4 örnekleri 37C^o'de 1 saat inkübe edilmiştir.

Hasta ve kontrol grupları arası trombosit agregasyonu açısından fark yok P>0,05

Trombosit agregasyon eğrisinin (kurbunun) yüzde amplitüdünün hesaplanması ile elde edilen değerlerin MRP-1 inhibisyonu yapılan trombosit ve lökositlerde (TA3) kontrole göre (TA2, TA1) ileri düzeyde anlamlı olarak düşük bulundu. (General Linear Model -Multivariate Test'den Pillai's Trace testi uygulanmıştır)(P<0.01) (**Tablo 4-24**)

Tablo 4-24: MRP-1 İnhibisyonu Sonucu Trombosit Agregasyon Eğrisinin %Amplitüd Cinsinden Değişimi.

	Trombosit agregasyonu (% amplitüd)				
	n	TA1	TA2	TA3	TA4
Hafif intermitant astım	19	62,71 ± 10,73*	42,91 ± 13,89	6,91 ± 6,43*	39,89 ± 16,57
Hafif persistant astım	10	61,33 ± 15,44*	39,22 ± 12,48	11,26 ± 6,69*	39,79 ± 25,05
Astım	29	62,49 ± 12,28*	42,40 ± 13,41	8,36 ± 6,72*	39,19 ± 19,31
Kontrol	18	57,47± 15,16*	40,22 ± 14,71	4,65 ± 1,97*	37,58± 19,45

TA1 > (TA2 = TA4) > TA3

TA1: trombosit

TA2: trombosit + lökosit

TA3: trombosit + lökosit ve inhibisyon

TA4: trombosit

TA2, TA3, TA4 örnekleri 37C^o'de 1 saat inkübe edilmiştir.

Oksidatif stresi arttırmak amacıyla kümen ve probenecid uygulanan trombosit ve lökositler inhibisyon koşullarına maruz bırakıldı ve akabinde trombosit egregasyonu değerlendirildi.

TE5:trombosit + lökosit + kümen ve MRP1 inhibisyonu

TE6: trombosit + lökosit + kümen

Ortalama değerler hafif intermitant astımda TE5=33,80, TE6=37,40, hafif persistant astımda TE5=40,31, TE6=42,39, astımda TE5=37,30, TE6=40,08, kontrolde TE5=32,26, TE6=39,47 olarak saptandı. Astım ve kontrol gruplarında trombosit agregasyonunda TE5 ve TE6 deneyleri açısından farklı bulunmadı.

TA5:trombosit + lökosit + kümen ve MRP1 inhibisyonu

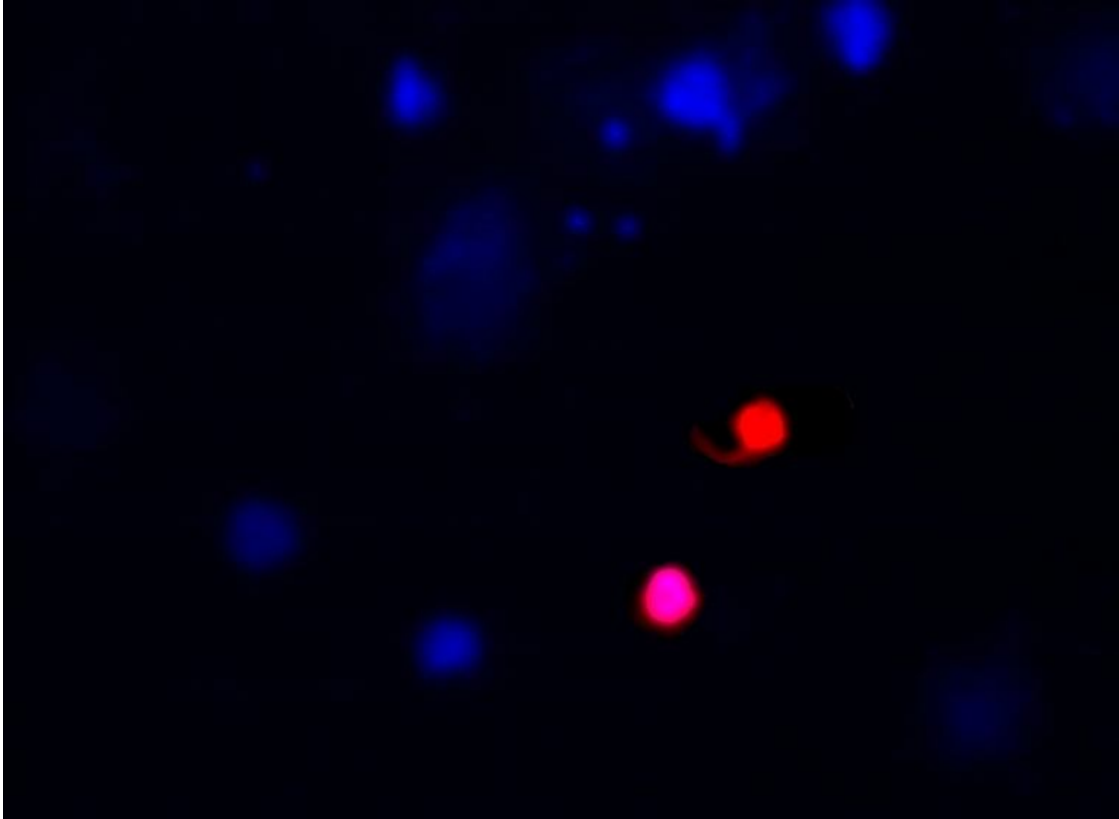
TA6: trombosit + lökosit + kümen

Ortalama trombosit agregasyonu %amplitüd değerleriHafif intermitant astımda TA5=1,60 TA6=8,60, hafif persistant astımda TA5=1,72 TA6=13,82 astımda TA5=1,66 TA6=11,41 kontrolde TA5=1,54 TA6=15,63 olarak saptandı. Astım ve kontrolgrupları TA5 ve TA6 değerleri açısından farklılık göstermedi.

4.10. MRP-1 İnhibisyonu Ve CuOOH'in, Lökositler Üzerindeki Etkisinin Apoptoz Ve Nekroz Açısından Değerlendirilmesi.

Lökositlerde CuOOH ile oksidatif stresi indükleyerek ve oksidatif stres ürünlerini hücreden dışarı atan MRP1'i inhibe ederek astım ve sağlıklı kontrollerin lökositlerindeki değişikliklerin apoptoz ve nekroza neden olup olmadığını inceleyebilmek amacıyla flouresan boyama yapıldı.

Astım ve kontrol grubunda lökositlerdeki MRP1 inhibisyonu sonucu hücrede gerçekleşen değişikliklerin apoptoz ve nekroza neden olup olmadığını tespit edebilmek amacıyla flouresan boyama ve akabinde flouresan mikroskobunda kırmızı(nekroz), mor(geç apoptoz), güçlü mavi(erken apoptoz) ve açık mavi(canlı)(Şekil 4-21) (diğerlerine göre hücre daha küçük olarak gözlenir) olarak sayılan en az 300 hücre sayılmış ve herbir hücre grubu % hücre sayısı olarak ifade edilmiştir.(Şekil 4-21, Tablo 4-25)



Şekil 4-21: PI ve Hoesth Flouresan Boyama İle Flouresan Mikroskobunda Gözlenen Hücreler.

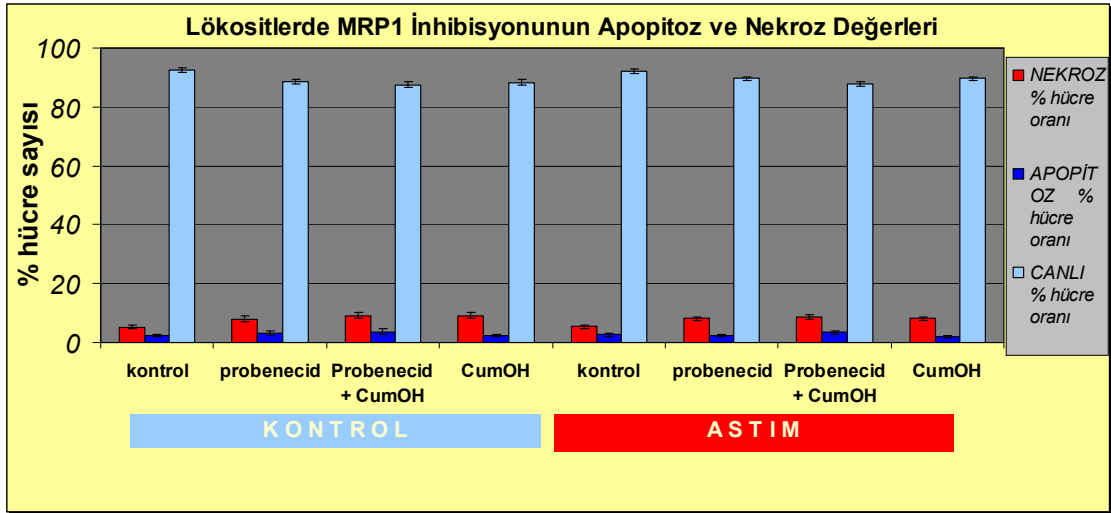
kırmızı(nekroz), mor(geç apoptoz), güçlü mavi(erken apoptoz) ve açık mavi(canlı) (diğerlerine göre hücre daha küçük olarak gözlenir) hücreleri göstermektedir.

Astım ve kontrol gruplarında MRP1 inhibisyonu ile lökositler nekroz ve canlılık oranları açısından anlamlı olarak farklı tespit edildiler. Bu farklılık inhibisyon yapılan grupta hücre canlılığı azalırken nekroz oranının artması yönündeydi (General Linear Model -Multivariate Test'den Bonferroni testi uygulanmıştır). $P < 0.05$ (Tablo 4-25, Tablo 4-26)

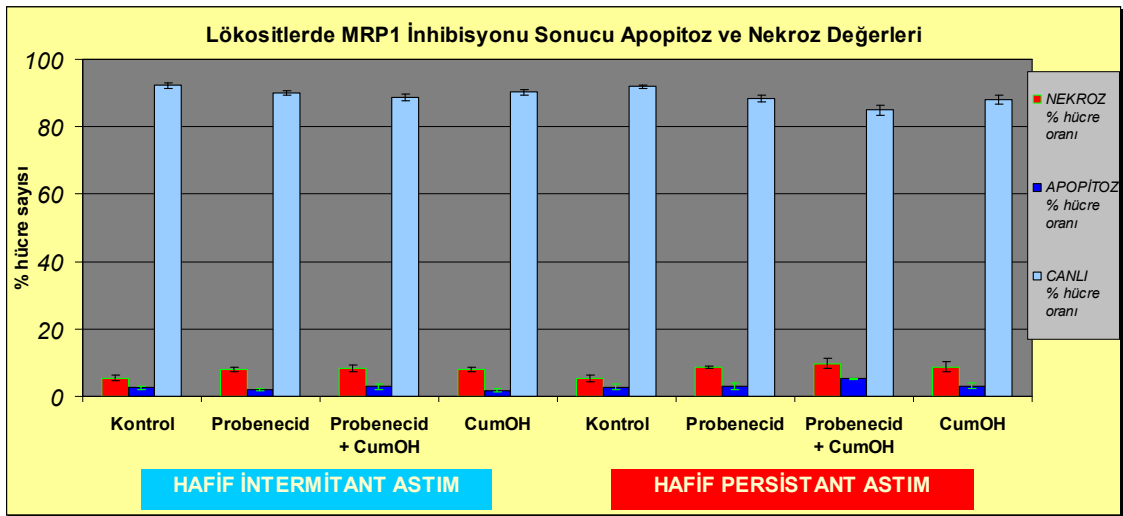
Apoptoz açısından gruplar arasında fark tespit edilemedi. $P > 0.05$ (Şekil 4-22, Şekil 4-23)

Tablo 4-25: Hafif İntermitant Astım Ve Hafif Persistant Astım Lökositlerinde MRP1 İnhibisyonu Ve Cumoh Uygulaması Sonucu Apoptoz Ve Nekroz Oranları.

	Deney adı	NEKROZ % hücre sayısı	APOPTOZ % hücre sayısı	CANLI % hücre sayısı
Kontrol* N:18	kontrol	$5,27 \pm 0,72$ *	$2,18 \pm 0,40$	$92,44 \pm 0,89$ *
	probenecid	$8,05 \pm 0,93$ *	$3,26 \pm 0,76$	$88,50 \pm 0,82$ *
	Probenecid + CumOH	$9,16 \pm 0,91$	$3,74 \pm 0,84$	$87,47 \pm 1,01$
	CumOH	$9,14 \pm 0,90$	$2,33 \pm 0,38$	$88,27 \pm 0,91$
Astım* N:19	kontrol	$5,41 \pm 0,62$ *	$2,62 \pm 0,46$	$92,18 \pm 0,65$ *
	probenecid	$8,15 \pm 0,49$ *	$2,21 \pm 0,37$	$89,57 \pm 0,58$ *
	Probenecid + CumOH	$8,63 \pm 0,82$	$3,48 \pm 0,65$	$87,78 \pm 0,95$
	CumOH	$8,15 \pm 0,65$	$2,16 \pm 0,39$	$89,63 \pm 0,71$



Şekil 4-22: Astım Ve Kontrolde MRP1 inhibisyonu ve CumOH Uygulaması Sonucu Apoptoz Ve Nekroz Oranları.



Şekil 4-23: Hafif İntermitant Astım Ve Hafif Persistent Astımda MRP1 inhibisyonu ve CumOH Uygulaması Sonucu Apoptoz Ve Nekroz Oranları.

Tablo 4-26: Hafif İntermitant Astım Ve Hafif Persistent Astımda MRP1 İnhibisyonu Ve Cumoh Uygulaması Sonucu Apoptoz Ve Nekroz Oranları.

	Deney adı	NEKROZ % hücre sayısı	APOPTOZ % hücre sayısı	CANLI % hücre sayısı
Astım 1* N:14	kontrol	5,42 ± ,779 *	2,58 ± 0,56	92,28 ± 0,88 *
	probenecid	8,00 ± ,655 *	1.93± 0.34	90,00± 0,70 *
	Probenecid + CumOH	8,21 ± ,973	2.87 ± 0.82	88,78± 1,08
	CumOH	7,92 ± ,737	1.82 ± 0.40	90,21 ± 0,81
Astım 2 N:5	Kontrol	5,40 ± 1,03	2,72 ± 0,84	91,90 ± 0,40
	Probenecid	8,60 ± 0,40	3.00 ± 1.04	88,40 ± 0,92
	Probenecid ve CumOH	9.80 ± 1,56	5.20 ± 0.20	85,00± 1,51
	CumOH	8.80 ± 1,49	3.14 ± 0.90	88,00± 1,30

5. TARTIŞMA

Çoklu ilaç dirençliliği ile ilişkili protein 1(MRP1), LTC₄'ün trombosit ve lökositlerden hücre dışına taşınmasında görev alan bir transmembran proteindir. LTC₄; alerjik astımda inflamasyon sahasına lökosit ve trombositlerin çağırılmasında, vasokonstrüksiyon, bronkospazm ve vasküler geçirgenliğin arttırılmasında fonksiyon gören kritik bir mediyatördür (B. Lam 2004). Lorico ve arkadaşlarının mrp1(-/-) transgenik sıçan modelinde yaptığı çalışmalar LTC₄ seviyelerinin azalmasının inflamatuvar cevapta yetersizliğe yol açtığını göstermektedir. (Lorico A 1997, Wijnholds J 1997). Yoshioka ve arkadaşlarının transgenik mrp1(-/-) sıçanlarda yaptığı çalışmada; MRP1'in mast hücrelerinden salınan IgE aracılı CysLT'ün regülasyonu, alerjik solunum yolu inflamasyonunun gelişiminde önemli bir rol oynadığına işaret ettiği belirtilmektedir (Yoshioka M 2009). Bu verileri dikkate alırsak LTC₄ seviyeleri yüksek olduğu bilinen astımlı hastalarda MRP1 ekspresyon seviyelerinde ve buna bağlı olarak taşıma hızında değişiklikler beklenebilir. Bu nedenle çalışmamızın ilk bölümünde lökositlerde MRP1 gen anlatım seviyeleri, fonksiyonu ve LTC₄ miktarları ile astım arasındaki ilişki incelenmiştir.

Real time PZR(Gerçek zamanlı kantitatif PZR) yöntemiyle astım hastalarının lökositlerinde MRP1 gen anlatım düzeyleri, kontrole göre istatistiksel açıdan yüksek olduğu bulundu. Ayrıca astımda MRP1 düzeyleri ile astım şiddeti arasında pozitif korelasyon saptandı. MRP1 gen anlatım düzeyleri hafif persistant astımda hafif intermitant astıma göre daha yüksek olarak tespit edildi. Bu bulgu alerjik astımın erken döneminde tespit edilebilen ve hastalığın şiddetiyle doğru orantılı olarak artan MRP1 gen ifade düzeylerinin astım gelişiminde rol oynayabileceğini gösterebilir. İnflamasyon ve solunum yollarıyla ilişkili diğer bir hastalık olan KOAH ile MRP1 gen anlatım seviyeleri arasındaki ilişki incelenmiş ve KOAH'lı hastalarda bronş epitelinde MRP1 gen anlatım seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir (Deen M.V.D 2005, 2006). Bizim bulgularımızı destekler nitelikte olarak inflamatuvar hastalıklar arasında romatoid artrit, ateroskleroz, inflamatuvar gastrointestinal sistem hastalıklarından Crohn hastalığı ve ülseratif kolitte MRP1 gen anlatım düzeyleri yüksek bulunmuş ve hastalık patogenezi ile ilişkilendirilmiştir (Hider SL. 2006, Cornelius F.H. 2008, Blokzijl H. 2008). Astımda

MRP1 etkinliğini ve mekanizmasını anlayabilmek için gen anlatım seviyeleri, MRP1'in fonksiyon göstermesi açısından yeterli olmadığından (Cole SPC. 1992, Burger H. 1994, Legrand O. 1998, Chaudhary PM. 1992, Drach D. 1992) substrat taşıma aktiviteleri ölçüldü. Astımlı hastaların lökositlerinde taşıma hızı CFDA ve Calcein-AM propları kullanılarak akan hücre ölçer cihazı yardımıyla belirlendi (Donna M. 1998, Nakano R.1998). Calcein –AM probu kullanılarak yapılan çalışmada, MRP1 substrat taşıma hızı astım lökositlerinde kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulundu. CFDA probu kullanılarak yapılan çalışmada ise, taşıma hızı açısından astım ve kontrol arasında bir fark görülemedi. Sonuçlarımız MRP1 Calcein AM taşıma hızı vede MRP1 gen anlatım düzeylerinin astımda kontrole göre yüksek olduğunu göstermektedir. Lu ve arkadaşlarının yaptığı yine inflamatuvar bir hastalık olan sistemik lupus eritamatozusda bizim bulgumuza paralel olarak MRP1'in taşıma hızı yüksek bulunurken gen anlatım seviyesi farksız bulunmuştur.

Bu sonuçları desteklemek amacıyla, astımda inflamasyonun gelişimine ve astımın gelişimine aracılık eden, MRP1'in substratı olan LTC4'ün taşınma hızına ve hücre dışındaki miktarlarına hücre kültür ortamında ELİSA yöntemi ile bakıldı (Weller P.F. 1983). Astım ile kontrol grubu arasında LTC4 miktarları açısından bir fark tespit edilemedi. Kan beyin bariyerinde, iskemi sonrası LTC4 seviyeleri yüksek bulunmuştur (Rao A. M. 1999, Kim C.K. 2006) İnhibe edildiğinde LTC4 seviyelerinin astımda kontrole göre düşük olduğunun gösterilmesi(P<0.05) bulgumuz, astımlı hastalarda MRP1'in LTC4'ü daha hızlı olarak taşıdığını göstermektedir. İnhibisyon çalışmasından elde edilen MRP1 fonksiyonu ve MRP1 gen anlatım seviyelerinin yüksek olduğunu birlikte değerlendirirsek; astımlı hastalarda MRP1'in LTC4'ün seviyelerini belli bir düzeyde tutmak için MRP1 gen anlatım düzeylerinin artması sonucu düzenlediğini gösterebilir. Bu çıkartım MRP1'in astımlılarda bir kompansatuvar mekanizma mı olarak çalıştığı sorusunu akla getirebilir.

GSH MRP1'in endojen substratı olup, hücre içi zehirsizleştirme reaksiyonlarında oluşan bileşikler glutatyon ile konjuge olarak hücre dışına atılırlar. Bununla birlikte MRP1 taşıma hızının hücre içi ATP seviyeleriyle ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (Leier I. 1996). Bu nedenle astımlı hastaların lökositlerinde glutatyon miktarları ve ATP düzeylerine de bakıldı. Hücre içi glutatyon

miktarları astım ve kontrol grupları arasında farklı bulunamazken astımlı hastalarda ATP düzeyleri düşük bulundu.

Bu bölümdeki sonuçları beraber değerlendirdiğimizde; Alerjik astımda MRP1 gen anlatım düzeylerinin lökositlerde hastalık şiddetiyle doğru orantılı olarak artması, MRP1'in alerjik astımın patolojisinde bir rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Astımda inflamasyonu tetikleyen sebeplerden biri de lökosit ve trombosit aktivasyonları olduğu ve özellikle salgıladıkları maddelerle (sitokin, LTC4, PAF, interlökin, histamin...) dolaşımdaki ve solunum yollarındaki hücreleri aktive ederek inflamasyona yol açtıkları bilinmektedir (Pitchford S.C. 2006, Tutluoğlu B. 2005). Astımdaki inflamasyonda önemli yer tutan hücrelerin eozinofil, mast hücreleri, trombositler olduğu ve eozinofillerin geç apoptozu sebebiyle, dolaşımdaki sayıları ve etkilerinin arttığı bildirilmiştir (GINA 2006). Öte yandan trombosit ve lökosit membranlarında yer alan MRP1'in oksidatif stres ürünlerini, glutasyonu(GSSG) ve LTC4'ü hücreden uzaklaştırmak suretiyle apoptozu karşı koruyucu rol oynadığı belirtilmiştir (Blokzijl H. 2008, Alary J. 2003, Camandola S. 2000). Endotelial hücrelerde yapılan bir in vitro çalışmada; MRP1'in sitokinle indüklenmiş apoptozu karşı bir up regülasyona maruz kalabildiği ve hücreyi koruyucu bir rol oynadığı gösterilmiştir(Blokzijl H. 2008). Bu bilgilerin ışığında bizim artan MRP1 aktivitesi bulgularımızı da dikkate alırsak astımlı hastalarda sıklıkla gözlemlenen eozinofillerin apoptoz direncinde MRP1'in sorumlu bir mekanizma mı olduğu sorusu akla gelebilir. Oksidatif stresin bir apoptoz düzenleyicisi olduğu bilgisi dikkate alınır, artan MRP1 aktivitesinin astımlı hastaların hücrelerinde oksidatif stres ürünlerini hızla uzaklaştırarak lökositlerin bir apoptotik direnç oluşturmaya neden olabilir. Diğer yandan trombosit ve lökosit aktivasyonunun oksidatif stresin trombosit ve lökosit etkileşimlerini de etkilediğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Sjölander M. 1999, Serrano CV. 1997, Pitchford S.C. 2006). Literatürde konjugat transport hızının artan oksidatif strese bağlı bir kompensatuvar mekanizma olarak arttığını ileri süren bilgiler de mevcuttur (Simon C. 2005). MRP1'in oksidatif hasar ürünlerini uzaklaştıran bir komponent olduğu bilgisini de gözönüne alırsak astımlı hastalarda MRP1 aktivitesi ile trombosit lökosit aktivasyonlarında ilişki beklenebilir. Ancak trombosit ve lökositlerin membranlarında mevcut MRP-1'in trombosit-lökosit etkileşimindeki rolü halen açık değildir. Bu iki soruya cevap vermek üzere planladığımız çalışmamızın ikinci

bölümünde öncelikle astımlı hastalarda aktive trombositlerde MRP1 proteinin miktarını ve trombosit aktivasyonu tespit ettik.

Aktive trombositlerin belirlenmesinde özgül bir yöntem olarak kabul edilen trombosit lökosit agregatları, trombosit lökosit agregatlarında intrastoplazmik MRP1 protein düzeyleri, trombositlerde yüzeyMRP1 protein miktarları akan hücre ölçer ile incelenerek böyle bir ilişkinin varlığı değerlendirildi.

ADP ile trombositlerin uyarılması ve akabinde agregometrik olarak sekresyon ve agregasyonun tespiti, trombosit fonksiyonlarının belirlenmesi için pek çok hastalığın teşhisinde faydalanan bir yöntemdir (Paul A. 2007). Bu yöntem bazı trombosit membran glikoprotein eksikliği ile oluşan trombosit fonksiyonunun azaldığı hastalıkların(glanzman trombastenisi) ve trombosit aktivitesinin arttığı (koroner arter tıkanıklığı, diabet) hastalıkların teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Alan D. 2004). Bu nedenle bizde çalışmamızda trombosit aktivitesini fonksiyon olarak belirleyebilmek amacıyla ADP ile uyarılmış trombosit agregasyon yöntemini tercih ettik. Ayrıca trombosit membran glikoproteinlerinin tek tek belirlenmesine imkan tanıyan, özgül trombosit membran glikoprotein antikorlarının uygulanması sonucu, akan hücre ölçer cihazı yardımıyla trombosit süspansiyonu ve tam kandan trombosit aktivitesinin belirlenmesi yine alternatif bir seçenek olarak pek çok makalede yerini almış hassas bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Biz çalışmamızda trombosit aktivitesini değerlendirirken her iki yöntemi de uygulayarak alerjik astımda trombositin hangi fonksiyonunun etkili olduğunu ve buna bağlı olarak hangi glikoproteinin astım fizyopatolojisinde etkili olduğunu tespit etmeye çalıştık.

Trombosit agregasyonunun eğim ve amplitüd cinsinden değerleri kontrol ve astım grupları arasında istatistiksel olarak farklı bulunmadı. Astımda trombosit agregasyonları atak sırasında arttığından, bizim hasta grubumuzun da en az iki ay öncesine kadar astım atağı geçirmemiş hastalardan seçilmiş olması hafif alerjik astımda trombosit agregasyonunun atak dışında gelişmediğini düşündürebilir. Trombosit agregasyon göstergesi olan eğim (TE1) düştükçe MRP1 gen anlatım seviyelerinin ters orantılı olarak yükseldiği tespit edildi ($r = -0,51$). Bu korelasyon bulgusu ile MRP1'in astımda oksidatif stres ürünlerini hızla hücreden uzaklaştırarak trombosit agregasyonunun oksidatif stresden etkilenmemesi açısından bir koruyucu rol oynadığı, trombosit agregasyonunun normal seviyelerde kalmasını sağladığı düşünülebilir.

Trombosit izolasyonunu takiben akan hücre ölçer cihazında trombosit aktivasyon belirteci olarak makalelerde belirtilen, trombosit membranında yer alan GpIIb/IIIa'ya özgül CD 41 antikor, P selektin'e özgül CD62P antikor ve Glikoprotein Ib (GpIb)'ye özgül olan CD42b antikor kullanılarak trombosit aktivitesi tespit edildi (SCHMIDT V. 2006, H. M. Sanderson). Astım ve kontrol grupları arasında trombosit aktivitesi CD41, CD62P, CD41CD62P, antikorları ortalama floresan değerleri açısından fark tespit edilemezken ($P>0.05$) CD42b antikor miktarları astım grubunda kontrolden anlamlı olarak yüksek bulundu ($P<0.05$). Astımda trombositlerdeki GpIb reseptörünün diğer aktivasyon belirteçlerine göre kontrolden daha yüksek olarak tespit edilmesi; trombositin; astımın patolojisine GpIb reseptörü aracılığıyla endotele adezyonu arttırarak katıldığını düşündürebilir. Trombosit trombosit ve trombosit lökosit agregatlarının (GpIIb/IIIa ile gösterilen) oluşumu ateroskleroz ve koroner arter hastalıklarında etkin olarak arttığı belirtilirken (Gawaz M. 1996, Ott I. 1996), bizim bulgularımıza göre alerjik astımda bu veri GpIIb/IIIa açısından anlamlı artış olarak tespit edilememiştir.

İnflamasyon ve trombosit aktivitesinin yüksek olduğu bilinen, akut koroner sendromlar, ateroskleroz, serebrovasküler iskemi, sepsis, gibi hastalıklarda trombosit aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kanda trombosit-lökosit agregatlarının tespiti akan hücre ölçer cihazı ile yapılmaktadır (Gawaz M.P. 1994, Mickelson J.K. 1996, Serrano C.V. 1997, Rinder C. 1994, Gawaz M. 1996, Ott I. 1996, Furman M.L. 1997, Gawaz M. 1995). Trombosit lökosit agregatlarını ölçmek amacıyla kullanılan CD45-CD62P-CD41-CD42b-CD14 antikor miktarları astım ve kontrol gruplarında farksız bulundu. Buna karşın hafif persistant astım grubunda ise CD45CD41 antikorları lenfosit-trombosit ve monosit-trombosit agregatları kontrolden istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). Koroner arter hastalığında, akut miyokard enfarktüsünde, kardiyopulmoner bypass da yapılan çalışmalarda; akan hücre ölçer cihazı yardımıyla, invivo trombosit aktivasyonun belirlenmesi amacıyla yapılan, dolaşımdaki trombosit lökosit agregatları varlığı, trombosit yüzey P selektin yöntemine göre daha belirleyici olduğu belirtilmiştir (Mickelson A.D. 2001, Furman M.L. 1998). Astımda trombosit aktivasyonu ile ilgili olarak bulduğumuz sonuçlar da dolaşımda trombosit-lökosit agregatlarının P selektinden daha yüksek olarak tespiti yönünde olup daha önceki benzer inflamasyon temelli hastalıklarda yapılan çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Hafif intermitant astımda MRP1 özgül antikoru ile tespit edilen intrastoplazmikMRP1 protein miktarı CD45CD42b antikorumla ile monosit-trombosit, lenfosit-trombosit ve granülosit-trombosit agregatlarında kontrolden istatistiksel olarak yüksek bulundu. Alerjik astım hastalarının trombosit lökosit agregatlarında intrastoplazmik MRP1protein miktarlarının arttığını gösteren bulgumuz ilk defa bir hastalık grubunda böyle bir değişimi göstermesi açısından önem teşkil etmektedir.

MRP1'in trombosit agregasyonu ve trombosit lökosit etkileşimindeki rolünü ve astımda etkili olan ajanlar ile bağıntısı olup olmadığını açıklayabilmek amacıyla MRP1 gen ifade seviyeleri ile ATP, LTC₄, glutatyon, trombosit lökosit agregatları(CD41, CD42b, CD62P, CD45) ve trombosit agregasyonu arasında korelasyon analizi yapıldı. Ayrıca MRP1 gen ifade seviyeleri ile hastalık şiddeti, yaş, cinsiyetin bağlantılı olup olmadığı yine pearson korelasyon analizi ile araştırıldı.

MRP1 gen anlatım seviyelerinin astım derecesi ile doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir.

MRP1 proteininin lökosit ve trombosit etkileşimlerindeki etkilerini görebilmek amacıyla MRP1 protein inhibisyonu yapıldı ve iyi bilinen bir oksidatif ajan olan CumOH ile lökositlerde oksidatif stresin indüklenmesi sağlandı. Takiben fluoresan boyama yöntemiyle, lökositlerin apoptoza ve nekroza gitme eğilimleri, trombositlerin de agregometrik yöntemle trombosit fonksiyon ve agregasyonundaki değişiklikler incelendi.

MRP1 inhibisyonunu özgül kimyasal MRP1 inhibitörü olarak bilinen probenecid ile yapıldı. MRP1 inhibisyonu ve CumOH'e maruz bırakılan astım ve kontrol gruplarında apoptoz, hücre canlılığı ve nekroz açısından fark gözlenmedi. Ancak kontrol ve astım grubunda inhibisyon ve inhibisyonla birlikte CumOH uygulanan grupta kontrol hücrelerine göre nekrozun arttığı hücre canlılığının da buna bağlı olarak azaldığı ($P < 0.05$) gözlemlendi. Biz invitro olarak hazırladığımız deney sisteminde alerjik astımda MRP1'in lökositlerin apoptoz direncinden sorumlu bir mekanizmada yer almadığını gösterebilir ancak bu mekanizmayı açıklamak için ayrıntılı olarak yapılacak in vivo çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu söyleyebiliriz. İkinci bölümde yaptığımız oksidatif stres ve MRP1 inhibisyonu etkilerini in vitro trombosit aktivasyonuna olan etkisini ortaya koymak amacıyla trombositleri ADP ile uyurarak agregasyonu takip ettik. Daha önce yapılan benzer çalışmalarda trombosit ve lökosit

sayılarının ve oranlarının agregasyonda etkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle invitro olarak uygulamalarda normal fizyolojik koşullarda olduğu gibi lökosit/trombosit sayılarını 1/40 oranında(Yakaryılmaz A. 2005) uyguladık. Aynı süre ve koşullara tabi tutulan lökosit-trombositin yer aldığı kontrol örneklerinde agregasyon, trombosit agregasyonundan daha düşük olarak tespit edildi. Bu bulgumuz aktif trombosit ürünlerinin nötrofil kemiluminesansını artırıp agregasyonu azaltarak nötrofil fonksiyonlarını etkilediğini gösteren çalışma (Yakaryılmaz A. 2005) ile paralellik göstermektedir. Astım ve kontrol gruplarının her ikisinde de MRP1 inhibisyonu sonucu kontrole göre agregasyonda anlamlı azalma kaydettik. Yine inhibisyon ve CumOH maruziyeti sonucu astım ve kontrol gruplarında kontrole göre agregasyonda anlamlı azalma kaydedildi bu azalış bir önceki inhibisyondan farklı değildi. İnflamasyonda salgıladıkları maddeler ve etkileştikleri hücreler ile astım gelişiminden sorumlu tutulan trombosit ve lökositlerin agregasyon fonksiyonları MRP1 inhibisyonu ile azaltılmıştır. Astımda trombosit lökosit etkileşiminin önlenmesi ve hücre aktivasyonlarının azaltılmasına yönelik tedavi protokollerinde bu bulgumuz yeni bir bakış açısı kazandırabilir. Bu açıdan trombosit lökosit ilişkisinin astımda araştırıldığı başka bir çalışmaya rastlanmamış olup, astım ve aterosklerozda trombosit lökosit aktivitesinin ve agregatlarının yüksek olarak tespit edildiği çalışmalar mevcuttur (Simon C. 2005, Michelson A.D. 2001). Bununla birlikte MRP1'in inhibisyonunun trombosit-lökosit agregasyonunu azaltan bir veriye literatürde henüz rastlanmamıştır. Sonuçlarımız, süreçte rol oynayan araçlar ve mekanizmalar konusunda ileri düzeyde gerçekleştirilecek sonuçlarla birlikte trombosit ve lökositlerin birlikte yer aldığı hemostaz ve inflamasyon gibi fizyolojik mekanizmalarda, miyokard infarktüsü, stroke ve inflamatuvar hastalıklar gibi patolojik süreçlerin aydınlanmasına katkıda bulunacaktır.

Arttırılmış oksidatif stresin astımda araştırılmasının ardından sonuçlarımızı desteklemek amacıyla oksidatif hasar ürünlerinden olan 4-HNE ve glutatyonun bazal düzeylerine bakılmıştır. 4-HNE MRP1 tarafından hücre dışına taşınmakta olup pek çok dejeneratif hastalık (Parkinson, Alzhemir gibi), kronik inflamasyon, iskemi sonrası reperfüzyon durumları, erişkin solunumsal distres sendromu, aterogeneze ve diyabet gibi pek çok hastalıkla ilişkilendirilmiş (Renes J. 2000) ve Machado ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada serum 4-HNE düzeyleri oksidatif stres belirteci olarak tespit edilmiştir (Machado M.V. ab 2008) Hücre içi zehirsizleştirme reaksiyonlarında oluşan

bileşikler glutatyon ile konjuge olarak hücre dışına atılırlar ki; indirgenmiş glutatyon (GSH) MRP1'in endojen substratıdır. MRP1'in oksidatif hasara karşı artan GSH düzeyleri ile hücrenin savunma mekanizmasında rol aldığı bildirilmiştir (T39). Bu bilgilerin ışığı altında astımda bazal oksidatif stres ve MRP1 ilişkisini araştırmak amacıyla 4-HNE ve glutatyon miktarlarına bakıldı. Serum 4-HNE düzeyleri astımda kontrol grubundan farklı bulunmadı. Hücre içi glutatyon miktarları da astım ve kontrol grupları arasında farklı bulunmadı. Astımda yükselmiş taşıma hızı ve gen anlatım düzeyleri, artmış protein miktarı ile karşımıza çıkan MRP1 proteini hücreyi oksidatif stresden koruyan bir mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır.

Sonuç olarak:

Astımda MRP1 gen anlatım seviyeleri, MRP1 substrat taşıma hızı, LTC4 taşıma hızı yüksek ve ATP seviyeleri kontrole göre düşük olarak bulunmuştur. Astımda trombosit membranındaki GpIb miktarları yine kontrole göre yüksek olarak tespit edilmiş olup GpIIb/IIIa ve P selektin miktarları kontrolden farklı bulunmamıştır. Astımda trombositlerdeki MRP1 protein miktarları istatistiksel olarak kontrolden farklı bulunamamıştır. Astımda intrastoplazmik MRP1 protein miktarları monosit-trombosit, lenfosit-trombosit ve granülosit-trombosit agregatlarında kontrolden istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. Ayrıca hafif persistant astım grubunda lenfosit-trombosit ve monosit-trombosit agregatları kontrolden istatistiksel olarak yüksek bulundu. Bulgularımız astımda trombosit lökosit agregatlarının arttığını ve MRP1'in astımlı lökositlerde miktar ve gen anlatımı olarak yükselmesinin kompanseasyon mekanizmasında önemli olduğunu düşündürmektedir. Astımda trombosit lökosit etkileşiminin önlenmesi ve hücre aktivasyonlarının azaltılmasına yönelik tedavi protokollerinde MRP1 inhibisyonu yeni bir bakış açısı kazandırabilir.

İleriki çalışmalarımızda astımın gelişimi ve patolojisi açısından etkili bir hücre olan eozinofiller ve diğer lökosit alt gruplarının seçilerek MRP1 protein fonksiyonu ve hücre hücre etkileşimlerindeki rolünün araştırılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Alary J., Gueraud F., Cravedi JP. Fate of 4-HNE in vivo: disposition and metabolic pathways. *Mol. Asp. Med.* 2003; 24(4-5):177-87.
- Awasthi YC., Sharma R., Cheng JZ., Yang Y., Sharma A., Singhal S.S., Awasthi S. Role of 4-HNE in stress mediated apoptosis signaling. *Mol Aspects Med.* 2003;24(4-5):219- 30.
- Bacci E., Di Franco A., Bartoli M.L., Carnevali S., Cianchetti S., Dente F.L., et al. Comparison of anti-inflammatory and clinical effects of beclomethasone dipropionate and salmeterol in moderate asthma. *Eur Respir J* 2002;20:66-72.
- Beier J., Beeh K.M., Kornmann O., Buhl R., Stability of Glutathione in Induced Sputum: Impact of Freezing. *Respiration* 2003;70:523-527 Lowry ,oh, NJ Rosbrough, AL Farr, and RJ Randall. *J. Biol.Chem.*193: 265.1951.
- Beutler E. *Red Cell Metabolism: A manual of Biochemical Methods.* 2nd Edition, NewYork, 1975; 71-73, Grune&Stratton
- Bisgaard H., Olsson P., Bende M., Effect of LTD4 On Nasal Blood Flow, Nasal Airway Resistance And Nasal Secretion In Humans. *Clin Allergy* 1986; 16:289-97.
- Blokzijl H., van Steenpaal A., Vander Borgh S., Bok L.I., Libbrecht L., Tamminga M., Geuken M., Roskams T.A., Dijkstra G., Moshage H., Jansen P.L., Faber K.N. Up-Regulation And Cytoprotective Role Of Epithelial Multidrug Resistance-Associated Protein 1 In Inflammatory Bowel Disease. *J Biol Chem.* 2008 Dec 19;283(51):35630-7. Epub 2008 Oct 6
- Boyum A., Isolation Of Mononuclear Cells And Granulocytes From Human Blood. *Scand J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 1968; 21:77-89.

- Burger H., Nooter K., Zaman G.J., Sonneveld P., Van Wingerden K.E., Oostrum R.G., Stoter G. Expression Of The Multidrug Resistance –Associated Protein (MRP) in Acute And Chronic Leukemias. *Leukemia* 1994; 8 (6) : 990–7.
- Calatozz C., Gela M. , Ciusani E., Sciacca F.L ., Pollo B., Cajola L., Marras C., Silva A., Vitellaro- Zuccarell L., Croc D., Boiardi A. and Sa Imaggi A., Expression Of Drug Resistance Proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 AND GST-p In Human Glioma. *Journal of Neuro-Oncology* (2005) 74: 113–121)
- Camacho A., and Dimsdale J.E., Platelets and Psychiatry: Lessons Learned From Old and New Studies *Psychosomatic Medicine* 62:326-336 (2000)
- Camandola S., Poli G., Mattson M.P. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal increases AP-1-binding activity through caspase activation in neurons. *J. Neurochem.* 2000; 74: 159–168.,46, 103,167).
- Chaudhary P.M., Metchener EB, Roninson IB. Expression And Activity Of The Multidrug Resistance P-Glycoprotein In Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Blood* 1992; 80 (11) : 2735–74.
- Cheng J.Z., Singhal S.S., Saini M., Singhal J., Piper J.T., Van Kuijk F.J., Zimniak P, Awasthi YC, Awasthi S. Effects of mGST A4 transfection on 4-HNE Mediated Apoptosis And Differentiation Of K562 Human Erytroleukemia Cells. *Arc. Biochem. Biophys.* 1999; 372(1):29-36.
- Choucroun P., Gillet D., Dorange G., Sawicki B., Dewitte J.D. Comet Assay And Early Apoptosis. *Mutat. Res.* 2001; 478: 89-96.)
- Chung K.F., Leukotriene Receptor Antagonists And Biosynthesis Inhibitors: Potential Breakthrough In Asthma Therapy. *Eur Respir J* 1995;8:1203-13.
- Chung K.F, Holgate S.T. Leukotrienes: Why Are They Important Mediators In Asthma. *Eur Respir Rev* 1997;7:259-63.
- Claesson H.E., Dahlen S.E., Asthma And Leukotrienes: Antileukotrienes As Novel Anti-Asthmatic Drugs. *J Intern Med* 1999;245:205-27.

- Cole S.P.C., Bhardwaj G., Gerlach J.H., Mackie J.E., Grant C.E., Almquist K.C., Stewart A.J., Kurz E.U., Duncan A.M., Deeley R.G., Overexpression Of A Transporter Gene In A Multidrug-Resistance Human Lung Cancer Cell Line. *Science* 1992; 258 (5028) : 1650-4
- Dahlen S.E., Leukotriene Receptors And Their Antagonists. In: Holgate S.H., Dahlen S.E., editors. *SRS-A to Leukotrienes*. Cornwall, Blackwell-Science, 1997. p.155-69.
- Dahlen S.E., Leukotrienes. In: Holgate St, Busse WW, editors. *Inflammatory Mechanism In Asthma*. NewYork, Marcel-Deccer Inc 1998.p. 679-733.
- Dean M., Rzhetsky A., Allikmets R., The Human ATP-binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Res*. 2001 Jul;11(7):1156-66.
- Deen M.V.D., Elisabeth G.E de Vries, Timens W., Scheper R.J., Timmer-Bosscha H. and Postma D.S. ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters In Normal And Pathological lung . *Respiratory Research* 2005, 6:59
- Deen M.V.D., Marks H. , Willemse B.W. M. , Postma D.S. , Müller M., Smit E.F. , Scheffer G. L. , Scheper R.J. , Elisabeth G. E. de Vries and Timens W.. Diminished expression of multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) in bronchial epithelium of COPD patients. Volume 449, Number 6 / December, 2006 p 682-688
- Drach D., Zhao S., Drach J., Mahadevia R., Gatringer C., Huber H., Andreef M. Subpopulations Of Normal Peripheral Blood And Bone Marrow Cells Express A Functional Multidrug Resistance Phenotype. *Blood* 1992; 80 (11) : 2729-34.
- Drazen J.M., Effects Of Cysteinil Leukotrienes On Human Airways. In: Holgate SH, Dahlen SE, editors. *SRS-A to Leukotrienes*. Cornwall, Blackwell-Science 1997.p. 189-201.
- Drug Transporters - Molecular Characterization and Role in Drug Disposition. Marilyn E. Morris University at Buffalo State University of New York 2007 by John Wiley & Sons p 270-274

- Dworski R., Fitzgerald G.A., Oates J.A., Sheller J.R., Effect Of Oral Prednisone On Airway Inflammatory Mediators In Atopic Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:953-9.
- Özer F., Yosunkaya Ş., Astım ve Lökotrienler, *Genel Tıp Dergisi* 2005;15(2):91-99.
- Feng B., Chen Y., Luo Y., Chen M., Li X., Ni Y., Circulating Level Of Microparticles And Their Correlation With Arterial Elasticity And Endothelium-Dependent Dilation In Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Atherosclerosis*. 2009 Jul 10.
- Fox J.E., Aggerbeck L.P., Structure Of The Glycoprotein Ib.IX Complex From Platelet Membranes. *J. Biol. Chem.*, Vol.263, Issue10, 4882-4890, 04, 1998.)
- Frenlinger A.L., Lam S.C., Plow E et al. Occupancy Of An Adhesive Glycoprotein Receptor Modulates Expression Of An Antigenic Site Involved In Cell Adhesion. *J Biol Chem* 1988;263:12397
- Furman M.I., Benoit S.E., Borbone M., Becker R.C., Michelson A.D., Patients With Stable Coronary Artery Disease Have Increased Platelet Reactivity And Circulating Monocyte–Platelet Aggregates. *Thromb Haemostas* 1997; Suppl: 62.
- Furman M.L., Benoit S.E., Barnard M.R., et al. Increased Platelet Reactivity And Circulating Monocyte-Platelet Aggregates In Patients With Stable Coronary Artery Disease., *J.Am.Coll Cardiol* 1998;31:352-358.
- Gawaz M., Fateeh-Moghadam S., Pilz G., Gurland H-J., Werdan K., Platelet Activation And Interaction With Leucocytes In Patients With Sepsis Or Multiple Organ Failure. *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 843–51.
- Gawaz M, Reinninger A, Neumann F-J. Platelet Function And Platelet-Leucocyte Adhesion In Symptomatic Coronary Heart Disease. Effects Of Intravenous Magnesium. *Thromb Res* 1996; 83: 341–9.
- Gawaz MP, Mujais SK, Schmidt B, Gurland HJ. Platelet–Leukocyte Aggregation During Hemodialysis. *Kidney Int* 1994; 46: 489–95.
- Gök Ş., Lökotrienler ve Antagonistleri. *T Klin. Tıp Bilimleri* 1992, 12.sy190-199

- Greer J.P, Foerster J., Rodgers G. M, Paraskevas F., Glader B.. Wintrobe's Clinical Hematology 12th ed., 2-Vol. : Chapter 17. Lippincott Williams & Wilkins. 2008
- Gurbel P.A., Becker R.C., Mann K.G., Steinhubl S.R., Michelson A.D., Platelet Function Monitoring in Patients With Coronary Artery Disease Journal of the American College of Cardiology Vol. 50, No. 19, 2007.
- Haahtela T., Jarvinen M., Kava T., Kiviranta K., Koskinen S., Lehtonen K., et al., Effects Of Reducing Or Discontinuing Inhaled Budesonide In Patients With Mild Asthma. N Engl J Med 1994;331:700-5. 45.
- Hartree, EF. Anal Biochem 48:422-427 1972.)
- Hay D.W., Torphy T.J., Undem B.J., Cysteinyl Leukotrienes In Asthma: Old Mediators Up To New Tricks. Trends Pharmacol Sci 1995;16:304-9
- Henderson W.R. Jr. 1994 Role Of Leukotrienes In Asthma. Ann Allergy 1994; 72: 272-8.
- Hider S.L., Owen A., Hartkoorn R., Khoo S., Back D., Silman A.J., Bruce I.N., Down Regulation Of Multidrug Resistance Protein-1 Expression In Patients With Early Rheumatoid Arthritis Exposed To Methotrexate As A First Disease-Modifying Antirheumatic Drug. Ann Rheum Dis. 2006 Oct;65(10):1390-3. Epub 2006 Feb 27.
- Holroyde M.C., Altounyan R.E.C. et al. Bronchoconstriction Produced In Man By Lekotrienes C4 and D4 Lancet 1981; 2:17-18
- Hubatsch I., Ridderstrom M. ,Mannervik B., Human Glutathione Transferase A4-4: An Alpha Class Enzyme With High Catalytic Efficiency In The Conjugation Of 4-Hydroxynonenal And Other Genotoxic Products Of Lipid Peroxidation. Biochem. J. 1998; 330: 175– 179.
- Ince B., Bayram C., Harmanci H., Ulutin T., Hemostatic Markers In Ischemic Stroke Of Undetermined Etiology. Thromb Res. 1999 Nov 1;96(3):169-74.
- Ito K.I., Weigl K.E., Deeley R.G., Cole S.P.C. Mutation Of Proline Residues In The NH₂-Terminal Region Of The Multidrug Resistance Protein, MRP1 (ABCC1):

Effects On Protein Expression, Membrane Localization, And Transport Function .*Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)/Biomembranes* Vol. 1615, Number 1, 2 September 2003 p. 103-114(12)

Khan M. I. G. , *Encyclopedia of Heart Diseases*. Elsevier Academic pres.2006

Kim C.K., Koh J.Y., Han T.H., Kim do K., Kim B.I., Koh Y.Y., Increased levels of BAL Cysteinyl Leukotrienes in acute [corrected] RSV bronchiolitis. *Apr*;95(4):479-85. Erratum in: *Acta Paediatr*. 2006 Jun;95(6):767.

King S.M., McNamee R.A., Hough A.K., Patel R., Brands M., Reed G.L., Platelet Dense-Granule Secretion Plays a Critical Role in Thrombosis and Subsequent Vascular Remodeling in Atherosclerotic Mice. *Circulation*. 2009 Aug 17.

Koh Y.Y., Lu M.C., Lai N.S., Li K.J., Hsieh S.C., Wu C.H., Yu C.L., Increased Multidrug Resistance-Associated Protein Activity In Mononuclear Cells Of Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2008 Jul-Aug;26(4):638-45.

Kok J.W., Eldman R.J.V., Klappe K., Koning H., Filipeanu C.M., Mu. M., Differential Expression Of Sphingolipids In Mrp1 Overexpressing Ht29 Cells. *Int. J. Cancer*: 87, 172–178 .2000)

Krueger L.A., Barnard M.R., Frenlinger A.L., Furman M.I., Michelson A.D. Immunophenotypic Analysis Of Platelets. In Robinson JP (ed): *Current Protocols in Cytometry*, Volume1, John Wiley and Sons.Inc. New York, 2003, pp.6.10.1-6.10.17

Lam B ., Kanaoka Y., Boyceand J. , Austen K. F . , *Clin Exp All Rev* 2004; 4 :89–95
CHAPTER 8 Cysteinyl leukotrienes: biosynthesis and receptors.

Larsen J.S., Jackson S.K. ,Antileukotriene Therapy For Asthma. *Am J Health Syst Pharm* 1996;53:2821-30.

Laurien H.U., Dianne P. H. Joosten, Corneli W. van Aalst, Jan-Willem J. Lammers, Ed A. van de Graaf, Leo Koenderman, and Jaap Jan Zwaginga. Adhesion of Eosinophils of Patients with Asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. Vol. 28, pp. 512–519, 2003

- Laviolette M, Malmstrom K, Lu S, Chervinsky P, Pujet JC, Peszek I, et al. Montelukast Added To Inhaled Beclomethasone In Treatment Of Asthma. Montelukast/Beclomethasone Additivity Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1862-8.
- Lee TU, Walport MJ et al. Slow Reacting Substance Of Anaphylaxis Antagonist FPL 55712 in chronic asthma. *Lancet* 1981;2:304-5.
- Legrand O., Simonin G., Beauchamp-Nicoud A., Zittoun R., and Marie J.P., Simultaneous Activity of MRP1 and Pgp Is Correlated With In Vitro Resistance to Daunorubicin and With In Vivo Resistance in Adult Acute Myeloid Leukemia Blood, Vol 94, No 3 (August 1), 1999: pp 1046-1056
- Legrand O., Simonin G., Perrot J.Y., Zittoun R. and Marie J.P., Pgp and MRP Activities Using Calcein-AM Are Prognostic Factors in Adult Acute Myeloid Leukemia Patients. *Blood*, Vol 91, No 12 (June 15), 1998: pp 4480-4488
- Leier I., Jedlitschky G., Buchholz U., Center M., Cole S.P., Deeley R.G., Keppler D. 1996. ATP-dependent Glutathione Disulphide Transport Mediated By The MRP gene-encoded conjugate export pump. *Biochem J* 314(Pt 2):433–437.
- Leytin V., Mody M., Semple J.W., Garvey B., Flow Cytometric Parameters for Characterizing Platelet Activation by Measuring P-Selectin (CD62) Expression: Theoretical Consideration and Evaluation in Thrombin-Treated Platelet Populations *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol. 269, Issue 1, 5 March 2000, Pages 85-90
- Livak K.J. and Schmittgen T.D., Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *METHODS* 25, 402–408 (2001)
- Lorico A., Rappa G., Finch R.A., Yang D., Flavell R.A., Sartorelli A.C.: Disruption Of The Murine MRP (Multidrug Resistance Protein) Gene Leads To Increased Sensitivity To Etoposide (VP-16) And Increased Levels Of Glutathione. *Cancer Res* 1997, 57:5238-5242. 68.

- Machado M.V., Ravasco P., Jesus L., Marques-Vidal P., Catarina R. Oliveira Teresa Proença, Inês Baldeiras, Maria Ermelinda Camilo, Helena Cortez-Pinto, Blood oxidative stress markers in non-alcoholic steatohepatitis and how it correlates with diet. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2008; 43: 95-102
- Mayatepek E, Hoffmann EF. Leukotrienes: Biosynthesis, Metabolism, And Pathophysiologic Significance. *Ped Res* 1995;37:1-9.
- Mc Ever R.P., P-Selectin_McEver RP: P-selectin/PSGL- 1 and other interactions Between Leucocyte And Endothelium. In *platelets*(A.D. MichelsonA.D.)pp139-155. Academic Press. San Diego, 2002.
- Michelson A.D., Platelet Function Testing in Cardiovascular Diseases. *Circulation*. 2004;110: e489-e493.)
- Michelson A.D., Bernard M.R., Krueger L.A., et al. Circulating Monocyte-Platelet Agregates Are A More Sensitive Marker Of In Vivo Platelet Activation Than Platelet Surface P-Selectin: Studies In Baboons, Human Coronary Intenvention, And Human Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 2001;104:1533-1537.
- Mickelson J.K., Lakkis M., Vilarreal-Levy G., Hughes B.J., Wayne Smith C., Leukoyte Activation With Platelet Adhesion After Coronary Angioplasty: Mechanism For Recurrent Disease? *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 345–53.
- Mueller C.F.H., Wassmann K., Widder J.D., Wassmann S., Chen C.H., Keuler B., Kudin A., Kunz W.S., Nickenig G., Multidrug Resistance Protein-1 Affects Oxidative Stress, Endothelial Dysfunction, and Atherogenesis via Leukotriene C₄ Export. *Circulation* 2008 117: 2841-2843
- Nakano R., Oka M., Nakamura T., Fukuda M., Kawabata S., Terashi K., Tsukamoto K., Noguchi Y., Soda H., and Kohno S., A Leukotriene Receptor Antagonist, ONO-1078, Modulates Drug Sensitivity and Leukotriene C Efflux in Lung Cancer Cells Expressing Multidrug Resistance Protein. *Biochemical And Biophysical Research Communications*. 251, 307–312 (1998) Article No. RC989472
- O'Byrne P.M., Leukotrienes In The Pathogenesis Of Asthma. *Chest* 1997;111:27S-34S.

- Oh J.W., Lee H.B., Kim C.R., Yum M.K., Koh Y.J., Moon S.J., et al. Analysis Of Induced Sputum To Examine The Effects Of Inhaled Corticosteroid On Airway Inflammation In Children With Asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;82:491-96.
- Olive C., Board P., Glutathione S-Conjugate Transport By Cultured Human Cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1994; 1224:264-268.
- Onaran İ., Güven G., Özaydın A., Ulutin T., The influence of GSTM1 Null Genotype On Susceptibility To In Vitro Oxidative Stres. *Toxicology*, 2001; 157: 195-205.
- Oostra G.M., Mathewson N.S., and Catravas G.N.. *Anal. Biochem.* 89:31.1987.
- Orrenius S., Apoptosis: Molecular Mechanisms And Implications For Human Disease. *J. Intern. Med.* 1995; 237: 529–536.
- Ott I., Neumann F-J., Gawaz M., Schmitt M., Schomig A., Increased Neutrophil–Platelet Adhesion In Patients With Unstable Angina. *Circulation* 1996; 94: 1239–46.
- Özer F., Yosunkaya Ş. ,Astım ve lökotrienler. *Genel Tıp Derg* 2005;15(2):91-99.)
- Özsavcı D., Yardımcı K.T., Yanıkkaya-Demirel G., ve arkadaşları. Flow Cytometric Assay Of Platelet Glycoprotein Receptor Numbers In Hypercholesterolemia. *Platelets* 2002;13:223-229.
- Parola M., Robino G., Marra F., Pinzani M., Bellomo G., Leonarduzzi G., Chiarugi P., Camandola S., Poli G., Waeg G., Gentilini P., Dianzani M.U., HNE Interacts Directly With JNK Isoforms In Human Hepatic Stellate Cells. *J. Clin. Invest.* 1998; 102(11):1942–1950.
- Pathways. *Mol. Asp. Med.* 2003; 24(4-5):177-87.
- Pavord I.D., Ward R., Woltmann G., Wardlaw A.J., Sheller J.R., Dworski R., Induced Sputum Eicosanoid Concentrations In Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1905-9.)
- Pec M.K., Aguirre A., Fernández J.J., Souto M.L., Dorta J.F. and Villar J. Dehydrothysiferol Does Not Modulate Multidrug Resistance-Associated Protein 1

Resistance: A Functional Screening System For Mrp1 Substrates. *International Journal Of Molecular Medicine* 10: 605-608, 2002)

Pitchford S.C., Momi S., Giannini S., Casali L., Spina D., Page C. P., and Gresele P., Platelet P-Selectin Is Required For Pulmonary Eosinophil And Lymphocyte Recruitment In A Murine Model Of Allergic Inflammation *Blood*, 1 March 2005. Volume 105, Number 5 P 2074-2081

Pitchford S.C., Page C.P., Platelet Activation In Asthma: Integral To The Inflammatory Response. *Clin Exp Allergy*. 2006 Apr;36(4):399-401.

Poli G. Schaur R.J. 4-Hydroxynonenal In The Pathomechanisms Of Oxidative Stress. *IUBMB Life*. 2000; 50: 315–321.).

Rao A.M., Hatcher J.F., Kindy M.S., and Dempsey R. J.. Arachidonic Acid and Leukotriene C4: Role in Transient Cerebral Ischemia of Gerbils *Neurochemical Research*, Vol. 24, No. 10, 1999, pp. 1225-1232

Renes J. de Vries E.E., Hooiveld GJ. Krikken I. Jansen PL. Muller M. Multidrug resistance protein MRP1 protects against the toxicity of the major lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Biochem J*. 2000; 350: 555-61.

Ricci M., Rossi O., Bertoni M., Matucci A., The Importance Of Th2-Like Cells In The Pathogenesis Of Airway Allergic Inflammation. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 360-9.

Rinder C., Gall D., Student L.A., Smith B.R., Platelet-Leukocyte Activation And Modulation Of Adhesion Receptors In Pediatric Patients With Congenital Heart Disease Undergoing Cardiopulmonary Bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 107; 280–8.

Rowe B.H., Keller J.L., Oxman A.D., Effectiveness Of Steroid Therapy In Acute Exacerbations Of Asthma: A Meta Analysis. *Am J Emerg Med* 1992;10:301-10.

Samuelsson B., Dahlen S.B., Lingdmrcn J.A. et al. Leukotrienes And Lipoxins. Structure Biosynthesis And Biological Effects. *Science* 1987; 237:1171-36.

- Sanderson H. M., Fox S. C., Robbins R. A., Losche W., Spangenberg P., Heptinstall S. Role of GPIIb–IIIa In Platelet–Monocyte And Platelet–Neutrophil Conjugate Formation In Whole Blood. *Platelets* (1998) 9, 245–250
- Schmidt V., Hilberg T., Thrombofix TM Platelet Stabilizer: Advances In Clinical Platelet Analyses By Flow Cytometry? *Platelets* , June 2006; 17(4): 266–273
- Serrano C.V., Ramires J.A., Venturinella M., Arie S., D’Amico E., Zwieier J.L., Pileggi F., Protasio L.D., Coronary Angioplasty Results In Leukocyte And Platelet Activation With Adhesion Molecules Expression. Evidence Of Inflammatory Responses In Coronary Angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1997; 27: 1276–83.
- Shattil S.J., Hoxie J.A., Cunningham M., et al. Changes In The Platelet Membrane glycoprotein IIb/IIIa Complex During Platelet Activation . *J Biol Chem* 1985; 260:11107-11114.
- Sin B.A., Alerjik Hastalıklarda İmmünoterapi. *T Klin J Allergy-Asthma* 1999, 1 42-52.)
- Sjölander M., Tornhamre S., Claesson H.E., et al. Characterization Of A Keukotriene C4 Export Mechanism In Human Platelets:Possible Involvement Of Multidrug Resistance-Associated Protein-1.*Journal Of Lipid Research* vol.40 1999 p439-446.
- Squier M.K.T., Sehnert AJ. Cohen JJ. Apoptosis In Leukocytes. *J. Leuk. Biol.* 1995; 57: 2-10)
- Stocscheck C.M., Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology* 182:50-69 1990.
- The Cell, Chapter 17. The Cell Cycle And Programmed Cell Death. 4th ed. 2002, Garland Science.
- Tjalkens R.B., Cook L.W., Petersen D.R., Formation And Export Of The Glutathione Conjugate Of 4-Hydroxy-2, 3-E-Nonenal (4-HNE) In Hepatoma Cells. *Arch Biochem Biophys.* 1999; 361(1): 113-119.).
- Tutluoğlu B., Gürel Ç.B., Özdaş Ş.B, Musellim B., Erturan S., Anakkaya A.N., Kilinc G., Ulutin T., Platelet Function And Fibrinolytic Activity In Patients With Bronchial Asthma. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2005 Jan;11(1):77-81.

- Uesaka H.F. et al. Genetic Variations And Haplotype Structures Of The ABC Transporter Gene ABCC1 In A Japanese Population Drug Metab. Pharmacokinetic. 22(1):SNP1 (48)-SNP13 (60) 2007.
- Van Cauwenberge P., Watelet J.B., Verhoye C., et al. The Clinical Expression Of Allergy In The Nose. Allergy 1999; 54: 93- 102.)
- Van Der Kolk D.M., de Vries E.G., van Putten W.J., Verdonck L.F., Ossenkoppele, G.J., Verhoef, G.E., Vellenga, E. P-Glycoprotein And Multidrug Resistance Protein Activities In Relation To Treatment Outcome In Acute Myeloid Leukemia. Clin. Cancer Res. 6: 3205-3214. (2000) 2005 margaretha van deen. Respiratory Research
- Van Der Kolk D.M., de Vries E.G., Koning J.A., van den Berg E., Müller M. and Vellenga E: Activity And Expression Of The Multidrug Resistance Proteins MRP1 And MRP2 In Acute Myeloid Leukemia Cells, Tumor Cell Lines, And Normal Hematopoietic CD34. Peripheral Blood Cells. Clin Cancer Res 4: 1727-1736, 1998.
- Van Der Kolk D.M., Elisabeth G. E. de Vries, Johannes A. Koning, Eva van den Berg, Michael Muller, and Edo Vellenga. Activity and Expression of the Multidrug Resistance Proteins MRP1 and MRP2 in Acute Myeloid Leukemia Cells, Tumor Cell Lines, and Normal Hematopoietic CD34+ Peripheral Blood Cells'. Clinical Cancer Research Vol. 4, 1727-1736, July 1998
- Vandendries E.R, Furie B.C, Furie B., Role Of P-Selectin And PSGL-1 In Coagulation And Thrombosis. Thrombosis And Haemostasis 2004 92:459-66.
- Vandesompele J. et al. Accurate Normalization Of Real-Time Quantitative RT-PCR Data By Geometric Averaging Of Multiple Internal Control Genes. Genome Biology 2002, (7): research 0034.1–0034.11.
- Von Hundelshausen P., Petersen F., Brandt E., [Platelet-Derived Chemokines In Vascular Biology](#). Thromb Haemost. 2007 May;97(5):704-13.

- Wanga Y., Baia C., Lia K., Adlerb K.B., Wanga X., Role Of Airway Epithelial Cells In Development Of Asthma And Allergic Rhinitis Respiratory Medic. 2008 Jul;102(7):949-55. Epub 2008 Mar 12.
- Weller P.F., Chong W. Lee, Donald W. Foster, E.J. Corey, K.Frankausten, And Robert A. Lewis. Generation And Metabolism Of 5-Lipoxygenase Pathway Leukotrienes By Human Eosinophils: Predominant Production Of Leukotriene₄. Proc.Natl.Acad.Sci.USA Vol. 80, pp. 7626-7630, December 1983 Immunology
- Wijnholds J., Evers R., van Leusden M.R., Mol C.A., Zaman G.J., Mayer U., Beijnen J.H., van der Valk M., Krimpenfort P., Borst P.: Increased Sensitivity To Anticancer Drugs And Decreased Inflammatory Response In Mice Lacking The Multidrug Resistance-Associated Protein. Nat Med 1997, 3:1275-1279.
- Yakaryılmaz A. , Trombosit-Lökosit Fonksiyonel Etkileşiminin In-Vitro Koşullarda İncelenmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2005; 58(2).
- Yoshioka M., Sagara H., Takahashi F., Harada N., Nishio K., Mori A., Ushio H., Shimizu K., Okada T., Ota M., Ito Y.M., Nagashima O., Atsuta R., Suzuki T., Fukuda T., Fukuchi Y., Takahashi K., Role Of Multidrug Resistance-Associated Protein 1 In The Pathogenesis Of Allergic Airway Inflammation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009 Jan;296(1):L30-
- Zamarron C., Gingsberg M.H., Plow E.F., Monoclonal Antibodies Specific For A Conformationally Altered State Of Fibrinogen. Thromb Haemost 1990;64:41-46.

FORMLAR

5.1. Bilgilendirilmiş Olur Formu

Sayın.....

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D., Göğüs hastalıkları A.D., DETAE (Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü ile ortak olarak “Trombosit Aktivasyonunun Düzenlenmesinde MRP-1’in Fonksiyonunun Hastalıklarla Olan İlişkisinin Araştırılması ” isimli bir araştırma yapmaktadır. Trombositler kan pıhtılaşmasını sağlayan çeşitli hastalıklarda ve yaralanmalarda aktif hale geçerek kanamanın durmasını ve ayrıca hastalıkların daha kompleks hale gelmesini sağlayan hücrelerdir. Bu çalışma ile astım gibi hastalıklarda trombositlerin rolü ve hastalığın tedavisinin açıklanmasında yararlı olabileceğini düşündüğümüz bir çalışma planladık. Amacımız bu grup hastalığa daha erken tanı koyabilmek ve ileride daha etkin tedavi yöntemlerinin gelişmesine katkıda bulunabilmektir. Bu tip bir çalışma için az miktarda kan örneği yeterli olmaktadır. Eğer kabul ederseniz sizi bu araştırmaya katmayı istiyoruz.

Bu araştırmanın sonuçları yalnızca bilimsel amaçlarla kullanılacak ve kimliğiniz her zaman gizli tutulacaktır. Bu araştırmaya katılmanızdan dolayı sizden herhangi bir para talep edilmeyecektir. Aynı şekilde size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır. Toplanan kanlar öncelikle yurt içi, çok gerekli olduğu zaman yurtdışında bir laboratuarda tetkik edilebilir.

Araştırmaya katılmak isterseniz size uygulanacak işlemler şu şekilde olacaktır. Önce Doç Dr. Bülent Tutluoğlu tarafından muayene edileceksiniz. Daha sonra solunum fonksiyon testi ve bazı laboratuvar tetkikleriniz yapılacak. Analiz için kolunuzdan 2 tüp (15ml) kan alınacaktır.. Toplanan kanda farklı bir metodla çalışılma

gerekliliğinde hücre çoğaltması yoluna gidilebilir. Bu işlem “hücre kültürü” olarak adlandırılır.

Kan alınırken iğne batması nedeniyle hafif bir acı duyabilirsiniz.

Çalışma öncesi veya sonrası doktorunuz gerekli görürse tedavinizde uygun değişiklikleri yapabilir.

Araştırma sonuçlarının yalnızca bilimsel amaçlarla ve kimliğinizi gizli tutarak kullanılacağını tekrar vurgulamak istiyoruz.

Araştırmaya katılmak zorunda olmadığınız gibi araştırmaya katılmayı kabul ettiğinizde, istediğiniz anda ayrılma hakkına da sahipsiniz. Ancak bu kararınızı bize önceden bildirirseniz araştırmanın bozulmasına meydan vermemiş olursunuz. Katılmak istemediğinizde şu anda sürdürülen tedavi işlemleri bundan etkilenmeyecektir.

Bu araştırmadan elde edilen sonuçları herhangi bir ücret talep etmeden size bildireceğiz. Bilgi edinmek istemiyorsanız lütfen yazılı formun altına belirtiniz.

Bülent TUTLUOĞLU

Prof.Dr.

Göğüs Hastalıkları Uzmanı

5.2. Hastanın Beyanı

Dr. tarafından astım ile ilgili araştırma hakkında bana bilgi verildi. Araştırmanın amacı, uygulama biçimi ile riskleri ve tıbbi bilgilerimle ilgili gizliliğin sağlanacağı konusunda yeterli açıklama yapıldı. Araştırma sırasında klinik sorularım için Dr Bülent Tutluoğlu (0212 4143034-22428) ile temas edebileceğim bana bildirildi. İstedğim zaman araştırmadan çekilebileceğimi biliyorum. Araştırmaya katılımımın tamamen gönüllü olduğu, katılmam ya da katılıp daha sonra araştırmadan çekildiğim durumda tedavi ve tetkiklerimin bundan etkilenmeyeceği belirtildi. Bu araştırmaya kendi gönüllü onayım ile kendimin /çocuğumun katılmasına olurum vardır.

Hasta	Adı Soyadı	Doğum Tarihi	Adres/Tel	İmza
-------	------------	--------------	-----------	------

Veli/Vasi	Adı Soyadı	Doğum Tarihi	Adres/Tel	İmza
-----------	------------	--------------	-----------	------

Tanık	Adı Soyadı	Doğum Tarihi	Adres/Tel	İmza
-------	------------	--------------	-----------	------

Hekim:

Adı Soyadı :

Adres/Tel :

İmza :

Görüşme tarih ve saati: :

Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri,

Öğrenmek istiyorum ()

Öğrenmek istemiyorum ()

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



Sayı :

Konu :

26527

İstanbul, / /

17 Ekim 2006

Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

İLGİ: 21.09.2006 tarihli, 2052 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi **ÇİĞDEM BAYRAM GÜREL** tarafından yürütülecek olan “ a-Trombosit Aktivasyonunun Düzenlenmesinde MRP-1'in Fonksiyonunun Hastalıklarla Olan ilişkisinin araştırılması” başlıklı çalışma hakkında ilgi yazınız ve ekleri **10 Ekim 2006** tarihinde toplanan Fakültemiz Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini saygılarımla rica ederim.

EKİ:
1 dosya

Prof.Dr. Mehmet YILDIRIM
Dekan Yardımcısı ve Etik
Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Çiğdem	Soyadı	BAYRAM GÜREL
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	06/02/1970
Uyruğu	T.C.	TC Kim. No.	28643096952
Eposta	bayram@istanbul.edu.tr	Tel.	0212 414 30 34

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	Tıbbi Biyoloji	2009
Yük.Lis.	Tıbbi Biyoloji	1994
Lisans	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü	1991
Lise	Mudanya Lisesi	1987

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	13-
2.	Tıbbi Biyolog	Amerikan Hastanesi	2,5-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Zayıf	Orta	50	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı		50	
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Word	Çok iyi
Exel	Çok iyi
Power Point	iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri :

Yayımlanmış Uluslararası Makaleler

1-) Ekmekçi H, Ekmekçi OB, Erdine S, Sönmez H, Ataev Y, Oztürk Z, Bütün II, Gürel C, Kucur M, Turfaner N, Ulutin T, Purisa S, Vural VA. Effects of serum homocysteine and adiponectin levels on platelet aggregation in untreated patients with essential hypertension. J Thromb Thrombolysis. 2008 Nov 11. PMID: 19002385

2-) Bütün II, Ekmekçi H, Sönmez H, Gürel C, Ciftçi O, Ulutin T, Kökoğlu E, Domaniç N, Dirican A. Preliminary study showing the relationship between platelet fibronectin, sialic acid, and ADP-induced aggregation levels in coronary heart disease. Clin Appl Thromb Hemost. 2007 Jul;13(3):308-12. PMID: 17636193

3-)Cetin O, Bekpinar S, Unlucerci Y, Turkmen A, Bayram C, Ulutin T.Hyperhomocysteinemia in chronic renal failure patients: relation to tissue factor and platelet aggregation. Clin Nephrol. 2006 Feb;65(2):97-102.

4-) Ekmekci H, Isler I, Sonmez H, Gurel C, Ciftci O, Ulutin T, Kokoglu E, Domanic N, Dirican A. Comparison of platelet fibronectin, ADP-induced platelet aggregation and serum total nitric oxide (NOx) levels in angiographically determined coronary artery disease. Thromb Res. 2006;117(3):249-54.

5-) Tutluoglu B, Gurel CB, Ozdas SB, Musellim B, Erturan S, Anakkaya AN, Kilinc G, Ulutin T. Platelet function and fibrinolytic activity in patients with bronchial asthma. Clin Appl Thromb Hemost. 2005 Jan;11(1):77-81.

6-) Bilgen D, Sonmez H, Ekmekci H, Ulutin T, Ozturk Z, Kokoglu E, Bayram C, Soner A, Domanic N The relationship of TFPI, Lp(a), and oxidized LDL antibody levels in patients with coronary artery disease. Clin Biochem. 2005 Jan;38(1):92-6.

7-) G. Tekin, D.Güzelsoy, A. Kaya, Ç.B.Gürel, Z. Yiğit, T.Ulutin. Effect of atorvastatin(10mg) on hemostatic and inflammatory parameters in hyperlipidemic patients with angiographically proven coronary artery disease. The American Journal of Chardiology. Vol.94, Iss 2, 15 July 2004, P 206-209.

8-)R. Akdemir, H. Özhan, M. Yazıcı, H. Gündüz, S. Duran, Ç. Gürel, S. Özdaş, I. Başar, T. Ulutin. In vivo effect of Losartan on platelet aggregation in patients with Hypertension. Heart and Vessels. Vol.19 Num.4 , July 2004. P 167-171.

9-)B.Tutluoğlu, Ç.Bayram Gürel, Ş. Beyhan Özdaş, B. Müsellim, S. Erturan, A. N. Anakkaya, G. Kılınç, T. Ulutin. Platelet functions and fibrinolytic activity in patients with bronchial asthma. Clinical and Applied Thrombosis Hemostasis. 23 mart 2004 ‘te kabul edildi. Basılacak.

10-)H.Özhan, R. Akdemir, M.Yazıcı, H.gündüz, S.Duran, Ç.Gürel, Ş.Özdaş, C.Uyan, I. Başar, T.Ulutin. In vivo effect of Losartan on platelet aggregation in patients With hypertension. Heart and vessels. 29 Dec 2003’ de kabul edildi. Basılacak.

11-) N.Buyru, J.Altınışık, Ç. Bayram Gürel, T. Ulutin. PCR-RFLP Detection of PAI-2 variants in myocardial infarction. Clin. Appl. Thrombosis/ Hemostasis. 9(4):333-336, 2003.

12-) T.Ulutin, H.Sönmez, N.Domaniç, B.İnce, Ç.Bayram Gürel, D.Ural, V.A Vural, H.Harmancı, A.Özaydın, E.İnce, N.Buyru.Sayhan , Ş.Yılmaz, G.Kanıgür, E.Kökoğlu: Looking For Our Ten Years Results For Coronary Heart Disease And Ischemic Stroke Group For The Standpoint Of Haemostasis. Turk J Haematol 2002, 19(2) : 255-263.

- 13-) N.Domaniç, D.Ural, V.A. Vural, Ç.B. Gürel, T. Ulutin. Factor VII levels in patients undergoing coronary angiography:Factor VII and coronary artery disease. Journal of cardiovascular risk. 8:57-61, 2001.
- 14-) Domaniç, N., Ulutin, T., Sönmez, H., Öztürk, Z., Bayram, Ç., Turgut, M., Öztekin, G.E., Kökoğlu, E.: Relationship between levels of fibrinectin and of platelet aggregation in coronary heart disease. Atherosclerosis, Elsevier Press, S39, 2000.
- 15-) A.G.Akkan, S.Özyazgan, B.Bıçakçı, B.Barutçu, M.Öztürk, F.Kaya, M.Tunçdemir, T.Ulutin, Ç.Bayram. : The effect of agmatine on the responses of isolated tharacic aorta in streptozotocin diabetic rats. Diabetologia . Vol.43 Supp 1. August 2000. (36 th Annual Meeting of the Easd Jerusalem, Isrceal)
- 16-) N.Sayhan, Ç. Bayram-Gürel, Ş.Yilmaz, T.Ulutin, O.N.Ulutin. : PCR-RFLP defection of PAI-2 gene variants and ACE gene polymorphism in mycard infarction. Haemostatis. 30/S1/00 (16th International Congress on Thrombosis, Porto 2000).
- 17-) Domaniç N., Ulutin T., Sönmez H., Öztürk Z., Bayram Ç., Turgut M., Öztekin G.E., Kökoğlu E. Relationship between levels of platelet aggregation in coronary heart disease. Atherosclerosis, Elsevier Press, S39 , 2000.
- 18-) B.Bıçakçı, T. Ulutin, Ç.Bayram, S.Özyazgan, G.Akkan . The effect of agmatine on the platelet aggregation in strptozotocin diabetic rats. Diabetologica, 43: 1 Aug 2000.
- 19-)Ince. B, Bayram. Ç, Harmanci. H, Ulutin. T.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10588458&dopt=Abstract> Hemostatic markers in ischemic stroke of undetermined etiology. Thromb Res.1999Nov1;96(3):169-74.
- 20-) T.Ulutin, Ç.Bayram, F.Bolat, N.Domaniç. : Tissue factor pathway inhibitor in patients with coronary heart disease. 15th İnternational Congress onThrombosis, 1998. (Haemastosis 28/S2/98).
- 21-) N.Domaniç, D.Ural, V.A. Vural, Ç.Bayram-Gürel, T.Ulutin. : Factor VII levels in coronary artery disease. 15th İnternational Congress on Thrombosis, 1998. (Haemastosis 28/S2/98).

- 22-) Sönmez, H. , Ulutin, T. , Süer, S. , Kökoğlu, E. , Bayram, Ç. , Sultuybek, G. , Üçışık, N. Ulutin, O.N : The interaction between foam cell formation and fibrinolysis in the atherogenesis. Trombosis and Haemostasis. Supplement P 1-884, June 97. (XVI th Congress of the International Society on Trombosis and Haemostasis, Florence, Italy, 1997.
- 23-) T. Ulutin, H. Sönmez, N. Üçışık, S. Süer, Ç. Bayram, E. Kökoğlu, G. Sultuybek. : The molecular markers of hemostatic activation on coronary artery disease. Trombosis Research 88, 329-332, 1997
- 24-) B.İnce, Ç.Bayram, H.Harmancı, T.Ulutin : Hemostatic markers in is chemic stroke of undermined etiology. Thrombosis Research Vol 96, Sayı 3, 169-174.
- 25-) Süer, S., Ulutin, T., Sönmez, H., Kökoğlu, E., Üçışık, N., Bayram, Ç., Sultuybek, G. : Pma Lp(a) and t-PA-PAI-1 complex levels in coronary heart disease. Thrombosis Research, Vol.83, No:1 pp.77-89, 1996.
- 26-) Ulutin, T., Üçışık, N., Bayram, Ç., Sönmez, H., Süer, S., Kökoğlu, E., Sultuybek, G., Ulutin, O.N . : The molecular markers of hemostatic activation in coronary artery disease Haemostasis 26153196 No.349 (14th İnternational Congress on Throbosis Mantpellier, France 1996.
- 27-) Ulutin, T., Hatemi, H., Taşan, E., Bayram, Ç., Sultuybek, G., Ulutin, O.N . : The effect of glidazide on platelet functions and fibrinolytic system in ytpc II diabetic patients with vasculopathy. Haemostasis 26153196 No: 235. (14th İnternational Congress on Throbosis Mantpellier, France 1996.
- 28-) Ulutin, T., Bayram, Ç., Okar, İ., Özlük, K., Tüzün, N., Ulutin, O.N. : The effect of endothelin-1 on vera jugularis thrombus model in rabbits. Journal of Basic and clinical Physiology Pharmacology, Vol : 6, No: 3-4, 1995.
- 29)- N.Domaniç-Üçışık, T.Ulutin, Ç.Bayram, Z.Öngen, G.Sultuybek, Ş.Yavuz, K.Knovuc, B.Ülkü : Plasma +-PA/PAI-1 complex in patients with coronary artery disease, European Heart Journal, p:2 807, 1995

Yurt İçi Makaleler

1-) B. İnce, Ç. Bayram, A. Dirican, A. Sıfoğlu, T. Ulutin, H. Denктаş. : İskemik İnmede FPA ve Total Kolesterol Korelasyonu. Beyin Damar Hastalıkları Dergisi Cilt : 3 Sayı : 1, Sayfa : 3 Nisan 1997. (Beyin Damar Hastalıkları Derneği , 2. Sempozyumu, Antalya, 1997).

2-) İnce B., Bayram Ç., Dirican A., Sifoğlu A., Ulutin T., Denктаş H: İskemik İnmede FPA ve Total Kolesterol Korelasyonu. Beyin Damar Hastalıkları Dergisi Cilt 3 Sayı: 1 S: 3 Nisan 1997.

3-) Ulutin, T., Hatemi, H., Bayram, Ç., Taşan, E., Sultuybek, G. : Makrovasküler İskemik Hastalıklarda Tiklopidinin Fibrinolitik Sistem ve Trombosit Fonksiyonlarına Etkileri. Endokrinolojide Yönelişler Cilt : 5 Sayı : 2 Sayfa : 53-55 , 1996.

İştirak Edilen Uluslararası Kongreler

1-)Domaniç, N, Bilgen D, Sönmez H, Gürel Ç, Ekmekçi H, Öztürk Z, Demir A.S, Ulutin T, Vural . VA, Kökoğlu E: European Atherosclerosis Society 73 nd EAS Congress Salzburg Austria, 2002.

2-) B.Bıçakçı, T.Ulutin, Ç.Bayram, S.Özyazgan, G.Aklan. : The effect of aguateine on the platelet aggregation in streptozocin diabetic rats EASD Congress, 2000.

3-)N.Sayhan, Ç.B.Gürel, Ş.Yılmaz, T.Ulutin: Ace gene polymorphisms and PAI-2 variants in myocardial infarction.XVth Meeting of the ISH,Durban, South Africa, 1999.

4-)Ç.B.Gürel, B.Tutluoğlu, G.K.Yılmaz, B.Müsellim, A.N.Anakkaya, S.Şener, İ.Keskiner, B.Gemicioğlu, Ş.B.Özdaş, Y.Şahinöz, A.R.Küçükusta, T.Ulutin : The function of platelets and endothelial cell in chronic obstructive pulmonary disease and acute asthmatic attack. XVth Meeting of the ISH,Durban, South,Africa, 1999.

- 5-) T.Ulutin, N.Domaniç, H.Sönmez, Ç.Bayram-Gürel, D.Ural, B.Aydoğ, F.Bolat, E.Kökoğlu. : The Effect of Lipid-Lowering Therapy on Haemostatic System in Hyperlipidemia. 15th International Congress On Trombosis. Antalya, 1998.
- 6-) G.Sultuybek, H.Hatemi, M.Güven, T.Ulutin, Ç.Bayram, V.Tezcan. : The Effect of Metformin and Glucolazide on Plateles and Red Blood Cell Glucose Transport Mechanisms and Haemostatic System In Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetic Patients With Vasculopathy. 15th International Congress On Trombosis. Antalya, 1998.
- 7-) Çiğdem Bayram-Gürel, Bülent Tutluoğlu, Günseli Yılmaz, Sevda Şener, İlkay Keskiner, Fuat Bolat, Turgut Ulutin. : Thrombotic and Fibrinolytic in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.15th International Congress On Trombosis. Antalya, 1998
- 8-)Nergiz Domaniç, Dilek Ural, Vural Ali Vural, Çiğdem Bayram, Turgut Ulutin , Şule Yavuz. FVII Levels in Coronary Artery Disease. 15th International Congress on Thrombosis Antalya Turkey, October 16-21 1998 . European Atherosclerosis Society 70th Eas Congress Geneva Switzerland September 6-9 1998 .
- 9-)N.Domaniç, D.Ural, V.A, Vural, Ç.Bayram, T.Ulutin, Ş.Yavuz. : FVII levels in coronary artery disease. European Atherosclerosis Society, 7th EAS Congress,Geneva, Switzeland, Sept.6-9, 1998.
- 10-)N. Üçışık , T. Ulutin , H. Sönmez , Ç. Bayram , F. Bolat , S. Duran, G. Sultuybek, O.N. Ulutin,;Platelet activation in coronory artery disease. 10th Meeting of the Meditterraneu Blood Club, Thessaloniki, Greace 1997.
- 11-) Ulutin, O.N., Üçışık, N., Ulutin, T., Sönmez, H., Ural, D., Bayram, Ç., Aydoğ, B.,Kökoğlu, E., Bolat, F., Sultuybek, G. : The effect of simvastatinon coagulation and fibrinolysis in hyperlipidemia. XIVth. Meeting of the International Society of Haematology, Stockholm, Sweden, 1997.

Kongre Sözlü Tebliğleri

- 1-)Ç.B.Gürel, T.Ulutin, N.Domaniç, H.Sönmez, S.Süer, H.Ekmekçi, E.Kökoğlu, P.Akın, V.A.Vural.: Koroner arter hastalığında hemostatik değişimler.8.Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, Adana 2003.
- 2-)N.Domaniç, D.Bilgen, Z.Öztürk, H.Ekmekçi, H.Sönmez, T.Ulutin, Ç.Gürel, V.A.Vural.: Plasma TFPI and PAI-1 level in Coronary Heart Disease. Turkish-İtalian-Spanish Joint Meeting on Hypertension and Atherosclerosis, Antalya 2002.
- 3-) Çiğdem Bayram-Gürel, Fuat Bolat, Erdal İnce, Mehmet Güven, İlhan Onaran Ahmet Özaydın, Adnan Yüksel, Müjgan Cengiz, Turgut Ulutin. : Koroner Arter Hastalığında Trombosit Hücre Fonksiyonları. 5. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi 21.24 Eylül 1998, İzmir.
- 4-) N.Domaniç, D.Ural, V.A.Vural, Ç.Bayram, T.Ulutin, Ş.Yavuz: Koroner arter hastalığında faktör VII düzeyleri XIV. Ulusal Kardiyoloji Kongresi Belek, 1998.
- 5-)N.Domaniç, D.Ural, V.A, Vural, Ç.Bayram, T.Ulutin, Ş.Yavuz. : FVII levels in coronary artery disease. European Atherosclerosis Society, 7th EAS Congress, Geneva, Switzerland, Sept.6-9, 1998

İştirak Edilen Ulusal Kongreler

- 1-) Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu. (Uluslararası katılımı) 12-15 Mart 2006. Grand Yazıcı Otel, Uludağ.
- 2-)IX. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi. 24-27 Kasım 2005 Celal Bayar Üniversitesi.Anemon Otel Manisa.
- 3-)T.Ulutin, N.Domaniç, H.Sönmez, S.Süer, H.Ekmekci, Ç.B.Gürel, E.Kökoğlu, P.Akın, V.A.Vural.: Koroner arter hastalığında hemostatik değişimler. IV. Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongresi, Edirne 2003.

- 4-)T.Ulutin, N.Domaniç, H.Sönmez, S.Süer, H.Ekmekci, Ç.B.Gürel, , P.Akın, E.Kökoğlu V.A.Vural.: Koroner arter hastalığında hemostatik parametreler.Ulusal Kardioloji Kongresi, Antalya 2003.
- 5-) D.Bilgen, Ç.B.Gürel, Z.Öztürk, H.Sönmez, T.Ulutin, N.Domaniç, V.A Vural, E.Kökoğlu: Bazı Fibronolitik Sistem Markerlarının Koroner Arter Hastalığında İncelenmesi 3.Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjioloji Kongresi . 7-8 Kasım 2002 İstanbul
- 6-) N.Domaniç, D.Bilgen, Z.Öztürk, H.Ekmekçi, H.Sönmez, T.Ulutin, Ç.Gürel, V.A Vural, E.Kökoğlu: Bazı Fibronolitik Sistem Markerlarının Koroner Arter Hastalığında İncelenmesi. 18. Ulusal Kardioloji Kongresi Antalya 2002.
- 7-) Ç.B Gürel, Ş.B.Özdaş, D.Bilgen, H.Sönmez, T.Ulutin, N.Domaniç. Koroner Arter Hastalarında Koagulasyon ve Trombosit Fonksiyonlarının Değişimi. 2.Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjioloji Kongresi . 7-8 Kasım 2001 İstanbul
- 8-) D Ural, Ç.Bayram-Gürel, V.A Vural, N Domaniç, T.Ulutin. Koroner Anjiopatili Hastalarda Faktör VII Düzeyleri. 2.Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjioloji Kongresi . 7-8 Kasım 2001 İstanbul
- 9-) D.Bilgen, H.Sönmez, T.Ulutin, Ç.B Gürel, E.Kökoğlu, N.Domaniç. Koroner Aterosklerozlu Hastalarda Plazma Total ve Serbest TFP1 Düzeyleri İle Tıkalı Damar Sayıları Arasındaki İlişkinin İncelenmesi. 2.Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjioloji Kongresi . 7-8 Kasım 2001 İstanbul
- 10-) A. Sarbay, H. Sönmez, E. Kökoğlu, T. Ulutin, Ç. Bayram, N. Üçışık : Koroner anjiolu kalp hastalarında plazma homosistein ve t-PA düzeylerinin tıkalı damar sayısı yönünden incelenmesi. 2.Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjioloji Kongresi . 7-8 Kasım 2001 İstanbul
- 11-) S.Duran, Ş.B. Özdaş Ç.B. Gürel, T.Ulutin, I. Başar. Hipertansif Hastalarda Kullanılan Losartan Potasyumun Trombosit Agregasyonuna Etkisi. 2.Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjioloji Kongresi . 7-8 Kasım 2001 İstanbul.

- 12-) E.İnce, S.Özyazgan, V.Şenses, Ç.B. Gürel, Ş.B. Özdaş, T.Ulutin, G.Sultuybek, A.G. Akkan. Sıçanlarda Vasküler Cevaplar Üzerine Hiperoksi ve Metforminin Etkisi. 2.Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongresi . 7-8 Kasım 2001 İstanbul .
- 13-)Gürgeç E., Sönmez.H., Öztürk.Z., Bayram.Ç., Ulutin.T., Kökoğlu.E., Özyurt.E.: Beyin tümörlerinde fibronektin ve doku tip plasminojen aktivatör düzeylerinin incelenmesi.II. Ulusal Biyokimya Kongresi,2001.
- 14-)K.D.Bilgen, H.Sönmez, T.Ulutin, Ç.B.Gürel, E.Kökoğlu, N.Domaniç.: koroner aterosklerozlu hastalarda plazma total ve serbest TFPI düzeyleriyle tıkalı damar sayıları arasındaki ilişkinin incelenmesi. 2. Tromboz Hemostaz ve Anjiyoloji kongresi,İstanbul,2001.
- 15-)Sayhan, N., Bayram-Gürel, Ç., Yılmaz, Ş., Ulutin, T. : Miyokard infarktüsünde PAI-2 Gen varyantlarının PCR-RFLP ile saptanması ve ACE Gen Polimorfizmi, IV.Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, İzmir, 2000.
- 16-) S.Karcier, C.Bostan, S.Uzan, Ç.Gürel, E.Yılmaz, T.Ulutin, S.Dondurmacı, Y.Aydın . : Metabolik sendrom X'li kişilerde koroner arter hastalığı gelişmesi ve sendromun çeşitli parametrelerinin birbirleriyle ve koroner arter hastalığı gelişmesi ile ilişkileri. XXVI.Ulusal Diabet Kongresi, Gaziantep, 2000.
- 17-)N.Sayhan, Ç.B.Gürel, Ş.Yılmaz, T.Ulutin. : Miyokard infarktüsünde PAI-2 gen varyantlarının PCR-RFLP ile saptanması ve ACE gen polimorfizmi. Ulusal Trombus Kongresi, İstanbul, 2000.
- 18-)T.Ulutin, Ç.B.Gürel, Ş.B.Özdaş, M.Cengiz, A.Yüksel, M.Seven, N.Domaniç. : Doku faktör inhibitörünün koroner kalp hastalığıyla ilişkisi. Ulusal Trombus Kongresi, İstanbul, 2000.
- 19-) H.Sönmez, T.Ulutin, Z.G. Öztürk, H.Ekmekçi, Ç.Bayram, E.Kökoğlu, N.Domaniç, O.Ulutin. : Trombosit agregasyonu ve fibronektin düzeyleri arasındaki ilişkinin koroner kalp hastalarında incelenmesi. The First International Biosciences days. 20-24 Nisan 1999, Antalya.

20-) Domaniç N., Sönmez H., Kökoğlu H., Gürel Ç.B., Cengiz M., Soner A., Ulutin T. Aterogeneze de Köpük Hücre Oluşumu ve Fibrinolitik Sistem Arasındaki İlişki. 15.Ulusal Kardiyoloji Kongresi 1999. S.280

21-) Domaniç N., Gürel Ç.B., Cengiz M., Yüksel A., Seven M., Sönmez H., Ulutin T. Koroner Kalp Hastalığında Doku Faktör İnhibitörleri. 15.Ulusal Kardiyoloji Kongresi 1999. S.368.

22-) Çiğdem Bayram Gürel, Fuat Bolat, Erdal İnce Mehmet Güven, İlhan Onaran, Ahmet Özaydın, Adnan Yüksel, Müjgan Cengiz, Turgut Ulutin: Koroner Arter Hastalığında Trombosit Hücre Fonksiyonları 5.Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi 21-24 Eylül 1998 İzmir.

23-)Turgut Ulutin, Çiğdem Bayram Gürel, Erdal İnce, Fuat Bolat, Mehmet Güven, İlhan Onaran, Adnan Yüksel, Müjgan Cengiz: Ateroskleroz Patogenezinde Fibrinolitik Sistemin Rolü. 5.Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi 21-24 Eylül 1998 İzmir.

24-)Turgut Ulutin, Çiğdem Bayram-Gürel, Fuat Bolat, Nergis Domaniç: Koroner Kalp Hastalığında Doku Faktör İnhibitörü. 5.Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi 21-24 Eylül 1998 İzmir.

25-) N.Domaniç, Ç.Bayram-Gürel, M.Başkurt, E.Kural, F.Bolat, T.Ulutin: Koroner Kalp Hastalığında Doku Faktör İnhibitörü. 14.Ulusal Kardioloji Kongresi. Belek 1998.

İştirak Edilen Projeler

1-)1243/181289 nolu proje.Yard. Araş.Myokard enfaktüsünde PAI-2 gen varyantlarının PCR-RFLP ile saptanması ve ACE gen polimorfizmi.1999-2001.

2-)788/131295 nolu proje. Yard. Araş Koroner arter hastalığında bağımsız risk faktörü olarak tPA ,PAI-1, FVII ve fibrin erime zamanı, ApoA, Apo B.1998

ÖDÜLLER

- 1-) İ.Ü. Araştırma fonu Başarılı araştırmacı ödülü 2003.
- 2-) İ.Ü. Araştırma fonu Başarılı araştırmacı ödülü 2000
- 3-) İ.Ü. Araştırma fonu Başarılı araştırmacı ödülü 1999

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Müzik(koro çalışması)

Spor (Masa tenisi)

Organizasyon (toplantı, kongre, gezi, parti...)

(BU SAYFA BOŞ BIRAKILMIŞTIR)