T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ASTIM HASTALARINDA GENETİK YATKINLIK, DUYARLILIK ve OKSİDATİF STRES GÖSTERGELERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

Behnaz KARADOĞAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Aslı GELİNCİK

Temmuz, 2020

İSTANBUL

Bu çalışma, 2.07.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ahmet Süha YALÇIN
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Suna BÜYÜKÖZTÜRK
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen/Edebiyat Fakültesi

Doç. Dr. Evren ÖNAY UÇAR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 30409 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

Behnaz Karadoğan, Şengül Beyaz, Aslı Gelincik, Suna Büyüköztürk, Nazlı Arda, Interleukin-35 levels in patients with allergic asthma, Poster presented at "7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey" (Molbiokon-2019).

Behnaz Karadoğan, Şengül Beyaz, Aslı Gelincik, Suna Büyüköztürk, Nazlı Arda, Oxidative stress and antioxidant defense in allergic asthma, Poster presented at "7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey" (Molbiokon-2019).

ÖNSÖZ

Doktora eğitimimin her aşamasında desteğini hissettiğim, çalışma azmini her zaman örnek aldığım, eğitimim boyunca bana her aşamada yol gösteren ve destek olan, çalışmamda değerli eleştirilerde ve değerlendirmelerde bulunan danışmanım **Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA**'ya tüm katkıları ve ayrıca bana olan inancı ve güveni için özel saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Klinik örneklerin toplanması ve verilerin değerlendirmesi süreçlerinde yardım ve desteklerini benden esirgemeyen ikinci danışmanım, İstanbul Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü İç Hastalıkları Anabilim Dalı Alerji Bilim Dalı öğretim üyesi **Prof. Dr. Aslı GELİNCİK**'e, tez izleme sürecinde yol gösterici yorumlarını ve cesaret verici desteklerini her zaman hissettiğim hocalarım **Prof. Dr. Suna BÜYÜKÖZTÜRK** ve **Prof. Dr. Ahmet Süha YALÇIN**'a içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimimin başlangıcından sonuna kadar benden yardım ve desteklerini esirgemeyen proteomik grubundan değerli hocam **Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ** ve sevgili arkadaşım Doktora öğrencisi **Yunus AKSÜT**'e, İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Alerji Bilim Dalı doktorlarından **Dr. Şengül BEYAZ**'a ve akademik gelişimime katkıda bulunan tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezi, zorlu eğitim ve meslek hayatımın hiçbir evresinde destek ve sevgilerini benden esirgemeyen, tüm yorgunluk ve kahrımı çeken, bana emek veren, sahip olduğum en değerli hazinelerim biricik eşim, annem ve kardeşlerime adamak istiyorum.

Temmuz 2020 Behnaz KARADOĞAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **ix**
TABLO LİSTESİ ..... **xiii**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xv**
ÖZET ..... **xx**
SUMMARY ..... **xxiii**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **5**
2.1. ASTIM 5
2.1.1. Astımın Sınıflandırılması 5
2.2. ALERJİK ASTIM 7
2.2.1. Alerjik Astım Mekanizması 8
2.2.2. Alerjik Astım Patogenezinde Önemli İnterlökinler 10
2.2.2.1. İnterlökin-4 10
2.2.2.2. İnterlökin-13 11
2.2.2.3. İnterlökin-5 13
2.2.2.4. Timik Stromal Lenfopoetin (TSLP) 14
2.2.3. Alerjik Astım Patogenezinde Önemli Hücreler 14
2.2.3.1. Mast Hücreleri 15
2.2.3.2. Tip 2 Yardımcı T Hücreleri 17
2.2.3.3. Eozinofiller 17
2.2.3.4. Nötrofiller 19
2.2.3.5. Bazofiller 19
2.2.3.6. B Lenfositleri 20
2.2.3.7. Doğal Lenfoid Hücreler 20
2.2.3.8. Dentritik Hücreler 21
2.2.4. Alerjide İmmünolojik Tolerans 21
2.2.4.1. Treg Hücrelerinin İmmün Baskılamadaki Rolü 22
2.2.4.2. İnterlökin-35'in İmmün Yanıt Baskılamadaki Rolü 24

2.2.5. Alerjik Astımın Patofizyoloji ve Etiyolojisi 26
2.2.6. Astımın Klinik Belirtileri ve Semptomları 27
2.2.7. Alerjik Astımın Tanısı 29
2.2.8. Alerjik Astımın Tedavisi 30
2.3. ASTIM VE GENETİK YATKINLIK 31
2.3.1. Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNP'ler) 32
2.3.2. *FOXP3* Geni, FOXP3 Protein Yapısı ve İşlevi 36
2.3.3. *IL13* Geni, IL-13 Protein Yapısı ve İşlevi 38
2.3.4. Astımın Genetik Epidemiyolojisi 40
2.4. OKSİDATİF STRES VE ASTIMLA İLİŞKİSİ 41
2.4.1. Oksidatif Stres 41
2.4.2. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri 42
2.4.3. Antioksidan Savunma 45
2.4.3.1. Enzimatik Antioksidanlar 45
2.4.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar 51
2.4.4. Oksidatif Stresin Biyomoleküller Üzerindeki Etkisi 53
2.4.4.1. Oksidatif Stresin DNA Üzerindeki Etkileri 53
2.4.4.2. Oksidatif Stresin Lipitler Üzerine Etkisi 54
2.4.4.3. Oksidatif Stresin Proteinler Üzerine Etkisi 54
2.4.5. Astımda Oksidatif Stres ve Antioksidanların Etkisi 55
3. MALZEME VE YÖNTEM 58
3.1. KİMYASALLAR 58
3.2. EKİPMAN VE ENSTRÜMANLAR 59
3.3. ÇALIŞMA GRUPLARININ OLUŞTURULMASI 60
3.3.1. Astım Kontrol Testi 60
3.3.2. Kanların Elde Edilmesi ve Kana Uygulanan İşlemler 61
3.4. POLİMORFİZM ANALİZİ 61
3.4.1. DNA İzolasyonu 61
3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyon 62
3.4.3. Agaroz Jel Hazırlanması ve PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi 63
3.4.4. Restriksiyon Fragman (Parça) Uzunluk Polimorfizmi Analizi 65
3.4.4.1. RFLP-PCR Prosedürü 65
3.4.4.2. Agaroz Jelden Saflaştırma ve Dizileme ile Doğrulama 66
3.5. SERUM IL-35 DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ 67

3.6. OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİNİN ANALİZİ 69
3.6.1. Plazmada Protein Karbonil Tayini 69
3.6.2. Plazmada Lipit Peroksidasyon Ürünlerinin Tayini 70
3.6.3. Plazmada İndirgenmiş Glutatyon Tayini 72
3.6.4. Plazma Ferrik İyon İndirgeme Antioksidan Gücünün Belirlenmesi 73
3.6.5. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi 74
3.6.6. Total Protein Düzeyinin Belirlenmesi 75
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 76
4. BULGULAR 77
4.1. ÇALIŞMA GRUPLARI 77
4.2. POLİMORFİZM SONUÇLARI 77
4.2.1. DNA Miktarı ve Saflığı 77
4.2.2. PCR Ürünleri 78
4.2.2.1. FOXP3 Genindeki rs3761548 ve rs3761549 SNP'ler 78
4.2.2.2. IL13 Genindeki rs20541 ve rs1881457 SNP'ler 78
4.2.3. RFLP-PCR ve Dizileme Bulguları 79
4.2.3.1. FOXP3 -3279C/A (rs3761548) Gen Bölgesinde PstI Enzimi ile Kesim ve Dizileme Sonuçları 79
4.2.3.2. FOXP3 -2383C/T (rs3761549) Gen Bölgesinde BseNI Enzimi ile Kesim ve Dizileme Sonuçları 82
4.2.3.3. IL13 +2044G/A (rs20541) Gen Bölgesinde BspLI (NlaIV) Enzimi ile Kesim ve Dizileme Sonuçları 84
4.2.3.4. IL13 -1512A/C (rs1881457) Gen Bölgesinde Bsh1236I (BstUI) Enzimi ile Kesim ve Dizileme Sonuçları 85
4.3. SERUM IL-35 DÜZEYİ 87
4.3.1. IL-35 Standart Eğrisi 87
4.3.2. Hasta ve Sağlıklı Bireylerde IL-35 Düzeyleri 87
4.3.3. Hasta Grubunda IL-35 Düzeyi ile IgE ve AKT Skoru Arasındaki Korelasyonlar 88
4.3.4. Serum IL-35 Düzeyinin *FOXP3* Genotiplerine Bağlı Değişimi 89
4.4. OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ 91
4.4.1. Standart Eğriler 91
4.4.1.1. Total Protein Standart Eğrisi 91
4.4.1.2. TBARS Standart Eğrisi 92
4.4.1.3. GSH Standart Eğrisi 93
4.4.1.4. FRAP Standart Eğrisi 93

4.4.1.5. Bradford Standart Eğrisi 94
4.4.2. Hasta ve Kontrol Gruplarında Oksidatif Stres Parametreleri 95
4.4.3. Hasta Alt Gruplarında Oksidatif Stres Parametreleri 97
4.4.4. Hasta Grubunda PK ve MDA Düzeyleri ile AKT Skoru ve IgE Düzeyleri Arasındaki Korelasyonlar 100
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 102
KAYNAKLAR 113
EKLER 135
ÖZGEÇMİŞ 137

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Alerjik astımda immünolojik yanıt mekanizması (Humbert ve diğ., 2019). 10

Şekil 2.2: Alerjik enflamasyonda IL-4 ve IL-13'ün farklı rolleri. Th2 $CD4^+$, IL-4 ve IL-13 üretir. IL-4 IgE üretimine, eozinofillerin ve mast hücrelerinin aktivasyonuna ve enflamatuvar bölgeye göç etmelerine neden olur. IL-13, epitel hücreleri, solunum yolu düz kas hücreleri ve fibroblastları aktive edebilir ve AHR, goblet hücre hiperplazisi ve mukus hipersekresyonuna yol açar (Gour ve Wills-Karp, 2015).....13

Şekil 2.3: JAK-STAT sinyal yolunun IL-35 ile aktivasyonu (Gao ve diğ., 2017b). 25

Şekil 2.4: Astımda IL-35'in işlevi. Siyah oklar pozitif etkileri ve T şeklindeki kırmızı çizgiler negatif etkileri gösterir (Pope ve Shahrara, 2013).....26

Şekil 2.5: Normal hava yolu ile şiddetli kronik astımdaki hava yolunun karşılaştırılması (Shaw ve diğ., 2014). 29

Şekil 2.6: (A) X kromozomunun, *FOXP3* geninin ve bu gendeki bazı yaygın SNP'lerin şematik gösterimi. (B) FOXP3 protein yapısı. ZF: çinko parmak alanı, LZ: lösin fermuar alanı ve FKH: forkhead (Marques ve diğ., 2015). 37

Şekil 2.7: (A) *IL13*'ün genomik yapısı ve yaygın SNP'leri (Ellis ve diğ., 2007). (B) IL-13'ün 3D protein yapısı (PDB, 2020). 40

Şekil 2.8: Oksidan ve antioksidan arasındaki dengesizlik (Arulselvan ve diğ., 2016). 42

Şekil 2.9: Antioksidan enzimler ve redoks döngüsü rejenerasyon sistemleri (Alfabetik sırayla kısaltmalar: 6PGL: 6-Fosfoglukonolakton, ATP: Adenozin trifosfat, CAT: Katalaz, G6P: Glukoz 6-fosfat, G6PD: Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, GCL: Glutamat sistein ligaz, GPx: Glutatyon peroksidaz, GR: Glutatyon redüktaz, Grx_{ox}: Oksitlenmiş glutaredoksin, Grx_{red}: İndirgenmiş glutaredoksin, GS: Glutatyon sentetaz, GSH: İndirgenmiş glutatyon, GSSG: Oksitlenmiş glutatyon, GST: Glutatyon S-transferaz, H_2O: Su, H_2O_2: Hidrojen peroksit, HK: Hekzokinaz, $NADP^+$: Oksitlenmiş nikotinamid nükleotid fosfat, NADPH: İndirgenmiş nikotinamid nükleotid fosfat, $O_2^{\cdot-}$: Süperoksit, O_2: Oksijen, Pro_{ox}: Oksitlenmiş protein, Pro_{red}: İndirgenmiş protein, Prx_{ox}: Oksitlenmiş peroksiredoksin, Prx_{red}: İndirgenmiş peroksiredoksin, ROH: Alkol, ROOH: Hidroperoksit, SOD: Süperoksit dismutaz, Trx_{ox}: Oksitlenmiş tiyoredoksin, Trx_{red}: İndirgenmiş tiyoredoksin).....50

Şekil 3.1: 50 bç DNA markır ("ladder") (Hibrigen) için beklenen agaroz jel görüntüsü ve bantların büyüklüğü. 65

Şekil 4.1: *FOXP3* genindeki A) rs3761548 (-3279C/A) SNP'ye ait 379 bç'lik bölgenin; B) rs3761549 (-2383C/T) SNP'ye ait 388 bç'lik bölgenin PCR ile amplifikasyonundan sonra agaroz jeldeki görüntüsü (M: 50 bç'lik markır, 1-5: PCR ürünleri).....78

Şekil 4.2: *IL13* genindeki A) rs20541 (+2044G/A) SNP'ye ait 235 bç'lik bölgenin; B) rs1881457 (-1512A/C) SNP'ye ait 245 bç'lik bölgenin PCR ile amplifikasyonundan sonra agaroz jeldeki görüntüsü (M: 50 bç'lik markır, 1-5: PCR ürünleri).....79

Şekil 4.3: *FOXP3* geninin -3279C/A bölgesinin PstI enzimi ile kesim sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin jelde görüntülenmesi [K: kesilmemiş 379 bç PCR ürünü, M:50 bç'lik markır, 1-5: kesilmiş PCR ürünleri (tek fragman kadınlarda AA ve erkeklerde A, 2 fragman kadınlarda CC ve erkeklerde C, 3 fragman kadınlarda AC genotipi)].....80

Şekil 4.4: *FOXP3* geni -3279 pozisyonunda C genotipi taşıyan erkek bireye ait DNA dizi analizi örneği. 80

Şekil 4.5: *FOXP3* geni -3279 pozisyonunda A genotipi taşıyan erkek bireye ait DNA dizi analizi örneği. 81

Şekil 4.6: *FOXP3* geni -3279 pozisyonunda AA genotipi taşıyan kadın bireye ait DNA dizi analizi örneği. 81

Şekil 4.7: *FOXP3* geni -3279 pozisyonunda CA genotipi taşıyan kadın bireye ait DNA dizi analizi örneği. 81

Şekil 4.8: *FOXP3* geni -3279 pozisyonunda CC genotipi taşıyan kadın bireye ait DNA dizi analizi örneği. 81

Şekil 4.9: *FOXP3* geni -2383C/T bölgesinin BseNI enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin jelde görüntülenmesi [M:50 bç'lik markır, 1-3: kesilmiş PCR ürünleri (3 fragman kadınlarda CC ve erkeklerde C, 4 fragman kadınlarda CT genotipi), K kesilmemiş 388 bç PCR ürünü]. Bu çalışmada kadınlarda TT ve erkeklerde T genotipi bulunmadı.....82

Şekil 4.10: *FOXP3* geni -2383 pozisyonunda C genotipi taşıyan erkek bireye ait DNA dizi analizi örneği. 83

Şekil 4.11: *FOXP3* geni -2383 pozisyonunda CT genotipi taşıyan kadın bireye ait DNA dizi analizi örneği.....83

Şekil 4.12: *FOXP3* geni -2383 pozisyonunda CC genotipi taşıyan kadın bireye ait DNA dizi analizi örneği.....83

Şekil 4.13: *IL13* geninin +2044G/A (rs20541) bölgesinin BspLI (NlaIV) enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin jelde görüntülenmesi [M:50 bç'lik markır, 1-5: kesilmiş PCR ürünleri (210 bç tek fragman AA genotipini göstermektedir), K: kesilmemiş 235 bç PCR ürünü]. Bu araştırmada +2044 bölgesinde G alleli bulunmadı.....84

Şekil 4.14: *IL13* geni +2044 pozisyonunda AA genotipi taşıyan erkek bireye ait DNA dizi analizi örneği. 85

Şekil 4.15: *IL13* geni +2044 pozisyonunda AA genotipi taşıyan kadın bireye ait DNA dizi analizi örneği. 85

Şekil 4.16: *IL13* geninin -1512A/C (rs1881457) bölgesinin Bsh1236I (BstUI) enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin jelde görüntülenmesi [M:50 bç'lik markır, 1-5: kesilmiş PCR ürünleri (214 bç tek fragman AA genotipini göstermektedir), K: kesilmemiş PCR ürünü]. Bu araştırmada -1512 bölgesinde C alleli bulunmadı. 86

Şekil 4.17: *IL13* geni -1512 pozisyonunda AA genotipi taşıyan erkek bireye ait DNA dizi analizi örneği. 86

Şekil 4.18: *IL13* geni -1512 pozisyonunda AA genotipi taşıyan kadın bireye ait DNA dizi analizi örneği. 87

Şekil 4.19: Sandviç ELISA yöntemiyle serumda IL-35 düzey tayini için hazırlanan standart eğri. 87

Şekil 4.20: Sağlıklı ve hasta gruplarında serum IL-35 düzeylerinin grafiksel gösterimi.....88

Şekil 4.21: (A) Hastalarda serum IL-35 ve AKT skoru arasındaki ilişki (B) Hastalarda serum IL-35 ve IgE düzeyi arasındaki ilişki.....89

Şekil 4.22: Plazmada protein karbonil tayini için BSA ile hazırlanan standart eğri.....92

Şekil 4.23: Plazmada MDA tayini için hazırlanan standart eğri. 92

Şekil 4.24: Plazmada GSH tayini için hazırlanan standart eğri. 93

Şekil 4.25: Plazmada FRAP tayini için hazırlanan standart eğri. 94

Şekil 4.26: Bradford yöntemiyle total protein tayini için hazırlanan standart eğri. 94

Şekil 4.27: Sağlıklı ve hasta gruplarında (A) PK, (B) MDA düzeylerinin karşılaştırılması (***p<0.001 anlamlı olduğunu göstermektedir).....96

Şekil 4.28: Sağlıklı ve hasta gruplarında (A) GSH ve (B) FRAP düzeylerinin karşılaştırılması (** p <0.01,***p<0.001 anlamlı olduğunu göstermektedir). 96

Şekil 4.29: Sağlıklı ve hasta gruplarında serum katalaz aktivitesinin karşılaştırılması (* p<0.05 anlamlı olduğunu göstermektedir). 97

Şekil 4.30: Hasta alt gruplarında (A) PK ve (B) MDA düzeylerinin karşılaştırılması (*p<0.05 ve **p<0.01 anlamlı olduğünü göstermektedir). 99

Şekil 4.31: Hasta alt gruplarında (A) GSH ve (B) FRAP düzeylerinin karşılaştırılması.....99

Şekil 4.32: Hasta alt gruplarında serum katalaz aktivitesinin karşılaştırılması (*p<0.05 anlamlı olduğunu göstermektedir).....99

Şekil 4.33: Alerjik astım hastalarında (A) PK ile AKT skoru arasındaki negatif yöndeki ilişki. (B) PK ile total IgE düzeyi arasındaki monoton ilişki.....101

Şekil 4.34: Alerjik astım hastalarında (A) MDA ile AKT skoru arasındaki negatif yönde zayıf ilişki. (B) MDA ile total IgE düzeyi arasındaki monoton ilişki. 101

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Reaktif oksijen ve nitrojen türleri.....43

Tablo 2.2: Ökaryotlarda antioksidan savunmada görevli enzimler ve temel fonksiyonlari.....46

Tablo 3.1: SNP analizinde kullanılan primer dizileri, primerlerin kalıba bağlanma sıcaklıkları ve PCR ürününün uzunluğu.....63

Tablo 3.2: Agaroz jellerin hazırlanmasında kullanılan malzemeler ve tampon miktarları. 64

Tablo 3.3: Kullanılan restriksiyon enzimleri ve özellikleri. 66

Tablo 3.4: RFLP reaksiyon bileşenleri ve miktarları.....66

Tablo 4.1: Alerjik astım hastaları ve sağlıklı kontrollere ait bazı demografik ve klinik bilgiler.....77

Tablo 4.2: AKT skoruna göre hasta alt grupları ve hasta sayıları. 77

Tablo 4.3: Alerjik astım hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda *FOXP3* geni rs3761548 SNP'deki genotip ve allel sıklıkları ve dağılım yüzdeleri. 80

Tablo 4.4: Alerjik astım hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda *FOXP3* geni rs3761549 SNP'deki genotip ve allel sıklıkları ve dağılım yüzdeleri. 83

Tablo 4.5: Alerjik astım hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda *IL13* geninde rs20541 SNP'deki genotip ve allel sıklıkları ve dağılım yüzdeleri. 85

Tablo 4.6: Alerjik astım hastalar ve sağlıklı kontrol grubunda *IL13* geninde SNP rs1881457'deki genotip ve allel sıklıkları ve dağılım yüzdeleri. 86

Tablo 4.7: Hasta ve sağlıklı gruplarında IL-35 düzeyi. 88

Tablo 4.8: Hastalarda serum IL-35 düzeyi ile AKT skoru ve IgE düzeyi arasındaki korelasyonlar. 88

Tablo 4.9: Alerjik astım hastaları ve ve sağlıklı bireylerde *FOXP3* rs3761548 pozisyonundaki genotipe göre serum IL-35 düzeyleri. 90

Tablo 4.10: Alerjik astım hastaları ve ve sağlıklı bireylerde *FOXP3* rs3761549 pozisyonundaki genotipe göre serum IL-35 düzeyleri. 91

Tablo 4.11: Protein karbonil, MDA, GSH, FRAP değerleri ile katalaz aktivitesinin gruplar arasında karşılaştırılması. 95

Tablo 4.12: Sağlıklı ve hasta alt gruplarında PK, MDA, GSH, FRAP düzeyi ile katalaz aktivitesinin karşılaştırılması. 98

Tablo 4.13: Hasta grubunda PK ve MDA düzeyleri ile AKT ve IgE düzeyleri arasındaki korelasyonlar. 100

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
α	: Alfa
β	: Beta
ε	: Epsilon
ɣ	: Gamma
ºC	: Santigrat derece
Cu^{+1}	: Kupröz iyonu
Cu^{+2}	: Kuprik iyonu
Fe^{+2}	: Ferröz iyonu
Fe^{+3}	: Ferrik iyonu
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
kb	: Kilobaz
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
nmol	: Nanomol
nm	: Nanometre
$NO^{\bullet}$	: Nitrik oksit
$O_2^{\bullet-}$	: Süperoksit
$ONOO^-$	: Peroksinitrit
pg	: Pikogram
U	: Ünite
×g	: Göreceli santrifüj kuvveti (gravite kuvveti)

Kısaltmalar	Açıklama
3′-UTR	: 3'- translasyon olmayan bölge (“3′- untranslated region”)
6PGL	: 6-fosfoglukonolakton
8-oxodG	: 8-okso-2'-deoksiguanozin

8-OH-G : 8-hidroksiguanozin

A : Adenin nükleotidi (Adenin bazı içeren nükleotid)

AA : AA genotipi (iki allel de adenin nükleotidi içerir)

AG : AG genotipi (bir allel adenin, bir allel guanin nükleotidi içerir)

AHR : Hava yolu aşırı duyarlılığı (“Airway Hyper Responsiveness”)

AKT : Astım kontrol testi (“Asthma Control Test”)

APC : Antijen sunan hücreler (“Antigen Presenting Cells”)

AR : Alerjik rinit

ASM : Solunum yolu düz kasları (“Airway Smooth Muscles”)

ATP : Adenozin-5′-trifosfat

BAFF : B-hücresi aktivasyon faktörü (“B-cell Activating Factor”)

bç : Baz çifti

C : Sitozin nükleotidi (Sitozin bazı içeren nükleotid)

CC : CC genotipi (iki allel de sitozin nükleotidi içerir)

CA : CA genotipi (bir allel sitozin, bir allel adenin nükleotidi içerir)

CT : CT genotipi (bir allel sitozin, bir allel timin nükleotidi içerir)

CCS : Kortikosteroidler (“Corticosteroids”)

CNS2 : Korunmuş kodlamayan dizi 2 (“Conserved Non-Coding Sequence 2”)

CCL2 : C-C motif kemokin ligandı 2 (“C-C Motif Chemokine Ligand 2”)

CCL3 : C-C motif kemokin ligandı 3 (“C-C Motif Chemokine Ligand 3”)

CCL4 : C-C motif kemokin ligandı 4 (“C-C Motif Chemokine Ligand 4”)

CCL5 : C-C motif kemokin ligandı 5 (“C-C Motif Chemokine Ligand 5”)

CCL6 : C-C motif kemokin ligandı 6 (“C-C Motif Chemokine Ligand 6”)

CCL11 : C-C motif kemokin ligandı 11 (“C-C Motif Chemokine Ligand 11”)

CCL20 : C-C motif kemokin ligandı 20 (“C-C Motif Chemokine Ligand 20”)

CCL22 : C-C motif kemokin ligandı 22 (“C-C Motif Chemokine Ligand 22”)

CSR : Sınıf switch rekombinasyonu (“Class-Switch Recombination”)

DC : Dendritik hücre (“Dendritic Cell”)

EBI-3 : Epstein-Barr virüsü indüklü protein 3 (“Epstein-Barr virus-induced protein 3”)

EBI3 : EBI-3 proteininin geni

ECP : Eozinofil katyonik protein (“Eosinophil Cationic Protein”)

EDN : Eozinofilden türetilmiş nörotoksin (“Eosinophil-Derived Neurotoxin”)

EoA : Eozinofilik astım

EPO : Eozinofil peroksidaz

ER : Endoplazmik retikulum

FcεRI : Yüksek afiniteli IgE reseptörü (“high affinity IgE receptor”)

FOXP3 : Forkhead box protein 3

FOXP3 : Forkhead box P3 geni

FRAP : Ferrik indirgeyici antioksidan güç (“Ferric Reducing Antioxidant Power”)

G : Guanin nükleotidi (Guanin bazı içeren nükleotid)

G6P : Glukoz 6-fosfat

G6PD : Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz

GCL : Glutamat sistein ligaz

γ-GGTP : Gamma-glutamil-transpeptidaz

GG : GG genotipi (iki allel de guanin nükleotidi içerir)

GM-CSF : Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (“Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor”)

GPx : Glutatyon peroksidaz

GR : Glutatyon redüktaz

Grx_{ox} : Glutaredoksinin oksitlenmiş formu

Grx_{red} : Glutaredoksinin indirgenmiş formu

GS : Glutatyon sentetaz

GSH : Glutatyon (indirgenmiş form)

GSSG : Glutatyon (yükseltgenmiş form)

GST : Glutatyon S-transferaz

GS-X : Glutatyon-S-konjugatı

GWAS : Genom boyu ilişkilendirme çalışması (“Genome Wide Association Study”)

H1R : Histamin reseptörü 1

H2R : Histamin reseptörü 2

H3R : Histamin reseptörü 3

HK : Hekzokinaz

HNE : 4-Hidroksi-2-nonenal

IgE : İmmünoglobulin E

IL : İnterlökin

IL-4Rα : IL-4 reseptör alfa

IL-13Rα2 : IL-13 reseptör α2

ILC : Doğal lenfoid hücre (“Innate Lymphoid Cell”)

IPEX : İmmün disregülasyon, poliendokrinopati, enteropati, X'e bağlı sendromu (“Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked”)

iTregs : İndüklenmiş Treg'ler

lncRNA : Uzun kodlamayan RNA ("Long non-coding RNA")

LTC4 : Lökotrien C4

LTD4 : Lökotrien D4

LTE4 : Lökotrien E4

LZ : Lösin fermuar ("Leucine zipper")

MBP : Majör bazik protein

MDA : Malondialdehit

MGA : Karışık granülositik astım ("Mixed Granulocytic Asthma")

MHCII : Doku-uyumluluk sınıf II kompleksi ("Major Histocompatibility Complex")

miRNA : MikroRNA

miR-rSNP : MikroRNA düzenleyici SNP ("MicroRNA regulatory SNP")

NADP : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside form)

NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş form)

NeuA : Nötrofilik astım ("Neutrophilic Asthma")

NGS : Yeni nesil dizileme ("Next-Generation Sequencing")

NK : Doğal öldürücü ("Natural Killer")

nt : Nükleotid

nTregs : Natürel Treg'ler

PAF : Platelet (trombosit) aktive edici faktör ("Platelet-Activating Factor")

PC : Protein carbonyl

PGA : Pauci-granülositik astım

PGD2 : Prostaglandin D2

PK : Protein karbonil

pre-mRNA : Olgunlaşmamış (öncü) mRNA ("Precursor mRNA")

Pro_{ox} : Oksitlenmiş protein

Pro_{red} : İndirgenmiş protein

PRX : Peroksiredoksin ("Peroxiredoxin")

RFLP : Restriksiyon fragman (parça) uzunluk polimorfizmi ("Restriction Fragment Lenght Polymorphism")

RNT : Reaktif azot türleri ("Reactive Nitrogen Species")

RORɣt : Retinoik asit-ilişkili yetim reseptör gamma ("Retinoic acid-related Orphan Receptor ɣ")

ROT : Reaktif oksijen türleri ("Reactive Oxygen Species")

rSNP : Düzenleyici SNP ("Regulatory SNP")

SNP : Tek nükleotid polimorfizmi (“Single Nucleotide Polymorphism)

SOD : Süperoksit dismutaz

srSNP : Yapısal RNA SNP (“Structural RNA SNP”)

T : Timin nükleotidi (Timin bazı içeren nükleotid)

TCR : T hücresi reseptörü (“T Cell Receptor”)

TF : Transkripsiyon faktörü

TFBS : Transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgesi (“Transcription Factor Binding Site”)

Th0 : Naif T hücreleri (“Naive T cell”)

Th1 : T yardımcı 1 (“T helper 1”) [Tip 1 yardımcı T (hücreleri)]

Th2 : T yardımcı 2 (“ T helper 2”) [Tip 2 yardımcı T (hücreleri)]

Th17 : T yardımcı 17 (“T helper 17”) [Tip 17 yardımcı T (hücreleri)]

TLR : Toll benzeri reseptör (“Toll Like Receptor”)

TLR4 : Toll benzeri reseptör 4 (“Toll Like Receptor 4”)

TNF : Tümör nekroz faktörü (“Tumor Necrosis Factor”)

Treg : Düzenleyici T hücreleri (“Regulatory T cells”)

TGF-β : Tümör büyüme faktörü-β (“Tumor Growth Factor-β”)

TSLP : Timik stromal lenfopoetin (“Thymic Stromal Lymphopoietin”)

Trx_{ox} : Tiyoredoksinin oksitlenmiş formu

Trx_{red} : Tiyoredoksinin indirgenmiş formu

TrxR : Tiyoredoksin redüktaz

TT : TT genotipi (iki allel de timin nükleotidi içerir)

UA : Ürik asit

VCAM : Vasküler hücre adezyon molekülü (“Vascular Cell Adhesion Molecule”)

ZF : Çinko parmak domeni (“Zinc finger domain”)

ÖZET

ASTIM HASTALARINDA GENETİK YATKINLIK, DUYARLILIK ve OKSİDATİF STRES GÖSTERGELERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

DOKTORA TEZİ

Behnaz KARADOĞAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

II. Danışman : Prof. Dr. Aslı GELİNCİK

Akut ataklar halinde ortaya çıkan kronik bir solunum yolu hastalığı olan astım her yaştan insan için çok ciddi bir sağlık sorunudur. Türkiye'de her 12-13 erişkinden ve 7-8 çocuktan biri astım hastasıdır. Toplam hasta sayısının dünyada 300 milyona ve Türkiye'de 3.5 milyona ulaştığı belirtilmekte ve bu sayıların gelecekte hızla artacağı öngörülmektedir.

Alerjik astım, mast hücrelerini ve Th2 hücrelerini aktive eden, dokuda eozinofillerin sayısını arttıran ve IL-13, IL-4, TSLP gibi sitokinlerin salgılanmasını tetikleyen IgE aracılı bir yanıta bağlı olarak gelişir. Bağışıklık hücrelerinin, yapısal hücrelerin ve sitokinlerin karmaşık etkileşimleri sonucunda da hava yolu enflamasyonu meydana gelir. Çeşitli bireysel (genetik, obezite, cinsiyet) ve çevresel (ev tozu akarı, küf mantarı, polenler, bazı ilaçlar vb.) faktörler hastalığın gelişimine katkıda bulunur.

Çeşitli çalışmalar, gen polimorfizmleri ile astıma yatkınlık arasında ilişki bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu yüzden alerjik astım hastalarındaki olası polimorfik genler ve bunların hastalık gelişimindeki rollerine ilişkin çalışmalar önemlidir. İnterlökin-13 ve forkhead box protein 3 (FOXP3) ile alerjik veya immünolojik hastalıklar arasındaki ilişki birçok çalışmada

gösterilmiştir. Bu genler üzerindeki tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) farklı popülasyonlarda incelenmiş ve bazılarının astım gelişiminde önemli olduğu gösterilmiştir.

FOXP3 bir transkripsiyon faktörü olarak, düzenleyici T hücrelerinin (Treg) gelişim ve fonksiyonu için ana regülatör olarak işlev görür ve spesifik Treg biyobelirtecidir. Bazı bilimsel yayınlar astım hastalarında FOXP3 mRNA düzeyinin ve protein ekspresyonunun azaldığını rapor etmektedir. FOXP3 proteini bir sinyalden sonra bazı genlerin anlatımını bastırırken diğer bazı genlerin anlatımını arttırır. FOXP3'ün ekspresyonunu etkilediği bu genlerden biri interlökin-35 genidir (*IL35*). Bu genin protein ürünü olan IL-35, efektör T hücrelerinin baskılanmasına aracılık eder ve eksikliği, enflamatuvar ve otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalığın patogeneziyle ilişkilidir.

Alerjik ve kronik enflamatuvar hastalıklarda, bağışıklık sisteminin aktivasyonunun bir sonucu olarak oksidatif stres oluşur. Enflamasyon ve bağışıklık yanıtı sırasında reaktif oksijen türlerinin (ROT) aşırı oluşumu, oksidatif stresi indükleyerek hücre hasarına neden olabilir. Reaktif oksijen türleri, lipit, DNA, RNA ve proteinler gibi hücre bileşenlerine zarar verir. Oksidatif stresin, solunum sistemindeki çevre dokulara zarar vererek astımın ilerlemesine katkıda bulunduğu bilinmektedir ve ayrıca astım şiddeti ile korelasyonuna ilişkin bazı kanıtlar vardır.

Bu çalışmada *FOXP3* ve *IL13* genlerindeki tek nükleotid polimorfizmleri ile oksidatif stres ve antioksidan düzeylerini gösteren bazı belirteçler, astım gelişimi ve kontrolündeki rollerini anlamak amacıyla analiz edildi.

Bu çalışmada duyarlılık testleri tamamlanmış toplam 120 alerjik astım hastası (92 kadın + 28 erkek) ve 120 sağlıklı bireyden (90 kadın + 30 erkek) kan örnekleri alındı. Toplanan kan örnekleri üzerinde polimorfizm ve oksidatif stres analizleri yapıldı. Polimorfizm analizleri *FOXP3* (rs3761548 ve rs3761549 SNP'leri için) ve *IL13* (rs20541 ve rs1881457 SNP'leri için) genlerinde PCR-RFLP yöntemiyle yapıldı. Hasta ve kontrol gruplarında serum IL-35 düzeyi ELISA yöntemiyle ölçüldü. Ayrıca, her iki grupta plazma protein karbonil (PK), malondialdehit (MDA), indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyleri, ferrik indirgeyici antioksidan güç (FRAP) ve serum katalaz aktivitesi spektrofotometrik yöntemlerle saptandı.

FOXP3 geni X kromozomu üzerinde bulunduğundan, polimorfizm sonuçları erkek ve kadın bireylerde ayrı ayrı değerlendirildi. *FOXP3* geni -3279A/C (SNP rs3761548) pozisyonundaki genetik varyasyonların istatistiksel analizi, alerjik astımı olan kadınlarda CC genotipinin, erkeklerde ise C genotipinin daha yaygın olduğunu ve hastalığa yatkınlığı arttırdığını ortaya koydu. *FOXP3* geni -2383C/T (SNP rs3761549) pozisyonundaki polimorfizm durumu, CT genotipli kadınların yüksek alerjik astım riskine sahip olduğunu ortaya koydu. Bu SNP için çalışma gruplarında (sağlıklı ve hasta) kadınlarda TT genotipine ve erkeklerde T genotipine sahip bireye rastlanmadı.

IL13 geni +2044G/A (SNP rs20541) ve -1512A/C (SNP rs1881457) pozisyonlarındaki varyasyonlar bakımından alerjik astım hastaları ile sağlıklı bireyler arasında anlamlı farklar gözlenmedi.

Serumdaki IL-35 düzeyi alerjik astım hastalarında, sağlıklı bireylere kıyasla yüksek olsa da bu fark istatiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla, 17.74 ± 2.76 pg/mL ve 15.62 ± 1.93 pg/mL, $p>0.05$). Hastalarda IL-35 ve IgE arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki vardı (r = + 0.365,

p<0.001). Ayrıca, *FOX3* genindeki rs3761548 SNP'de, AC (hasta ve sağlıklı) veya AA (sağlıklı) genotipine sahip kadınların IL-35 düzeyleri diğer genotiplere kıyasla daha yüksekti.

Hastalarda plazma protein karbonil (PK) düzeyinin (1.47 ± 0.74 nmol/mg protein), sağlıklı bireylerdekinden (1.01 ± 0.43 nmol/mg protein) anlamlı olarak (p<0.001) yüksek olduğu belirlendi. Plazma malondialdehit (MDA) düzeyi de hastalarda (3.39 ± 1.1 nmol/mL) sağlıklı bireylere (2.31 ± 0.6 nmol/mL) göre anlamlı olarak yüksekti (p<0.001). Hastalardaki plazma indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyi (16.41 ± 6 nmol/mL) sağlıklı kontrol grubundakinden (23.74 ± 9.3) anlamlı derecede düşüktü (p<0.001). Benzer şekilde ferrik indirgeyici total antioksidan güç (FRAP) hasta grubunda (371.7 ± 105 nmol/mL) kontrol grubuna kıyasla (413.7 ± 133 nmol/mL) daha azdı (p<0.01). Hastalardaki serum katalaz aktivitesi (0.353 ± 0.25 U/mg protein) sağlıklı bireylerdekinden (0.425 ± 0.185 U/mg protein) daha düşüktü (p<0.05).

Sonuç olarak, rs3761548 ve rs3761549 SNP'leri alerjik astıma yatkınlıkla ilişkili gibi gözükmektedir. Ayrıca, bulgularımız, alerjik astımlı hastalarda, kontrollü koşullar altında bile yüksek oksidatif stres ve düşük antioksidan savunma durumlarının varlığını ortaya koymuştur. Dolayısıyla oksidatif stresi azaltacak ve/veya antioksidan savunmayı destekleyecek tedavi stratejileri alerjik astım hastaları için yararlı olabilir.

Gelecekte, genişletilmiş hasta ve kontrol gruplarında, burada rapor edilen SNP'leri ve diğerlerini de dikkate alarak yürütülecek çalışmalar, alerjik astıma yatkınlığı öngörmede bu genetik varyasyonların kullanılabilirliğini açık bir şekilde ortaya koyacaktır. Antioksidanların alerjik astım tedavisini destekleme kapasitesini ortaya koymak için de bu yönde daha ileri klinik çalışmalara gerek vardır.

Temmuz 2020, 163 sayfa.

Anahtar kelimeler: Alerjik astım, Tek nükleotid polimorfizmi, *FOXP3*, IL-35, Oksidatif hasar.

SUMMARY

MOLECULAR ANALYSIS OF GENETIC SUSCEPTIBILITY, SENSITIVITY and OXIDATIVE STRESS MARKERS in ASTHMA PATIENTS

Ph.D. THESIS

Behnaz KARADOĞAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

Co-Supervisor : Prof. Dr. Aslı GELİNCİK

Asthma, which is a chronic respiratory disease leading acute attacks, is a serious health problem for people of all ages. One in every 12-13 adults and 7-8 children in Turkey are suffering from asthma. It is pointed out that the total number of asthma patients reached to 300 million in the World and 3.5 million in Turkey, and these numbers are predicted to increase very rapidly in the future.

Allergic asthma develops depending on an IgE-mediated response, activating the mast cells and Th2 cells, increasing the number of eosinophils in the tissue, and trigerring the secretion of cytokines, such as IL-13, IL-4 and TSLP. Consequently, airway inflammation occurs as a result of the complex interactions of immune cells, structural cells, and cytokines. Various individual (genetics, obesity, gender) and environmental (house dust mite, mold fungus, pollens, some drugs etc.) factors contribute to the development of the disease.

Several studies have confirmed the relationship between gene polymorphisms and asthma susceptibility. Therefore, studies on the possible polymorphic genes in allergic asthma patients and their roles in progression of asthma are important.

The association of interleukin-13 (IL-13) and forkhead box protein 3 (FOXP3) with some allergic and immunological diseases has been documented in a number of studies. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) on these genes have been studied in different populations and some of them have been shown to be important in the progression of asthma. As a transcription factor, FOXP3 acts as the main regulator of the development and function of T-regulatory (Treg) cells and is the most specific Treg biomarker. Some scientific papers have shown decreased FOXP3 mRNA level and protein expression in asthmatic patients. After a signal, the FOXP3 protein suppresses expression of some genes whereas increases of some others. One of the genes that FOXP3 affects its expression is interleukin-35 gene (*IL35*). The protein product of this gene, IL-35, mediates the suppression of effector T cells, and its deficiency correlates with the pathogenesis of several diseases, such as inflammatory and autoimmune diseases.

In allergic and chronic inflammatory diseases, oxidative stress occurs as a result of immune system activation. During inflammation and immune response, excessive reactive oxygen species (ROS) formation can induce oxidative stress, ultimately leading to cell damage. Reactive oxygen species damage cell components, such as lipid, DNA, RNA, and proteins. Oxidative stress is known to contribute to asthma progression by damaging surrounding tissues in the respiratory system, and also there are some evidences of its correlation with asthma severity.

In this study, single nucleotide polimorfisms on *FOXP3* and *IL13* genes, and some markers of oxidative stress and antioxidant status were analyzed with the aim of understanding their roles in asthma progression and control.

Blood samples were obtained from total 120 allergic asthma patients (92 females + 28 males) whose sensitivity tests were completed, and 120 healthy subjects (90 females + 30 males). Polymorphism analyses were performed on *FOXP3* (for SNPs rs3761548 and rs3761549) and *IL13* (for SNPs rs20541 and rs1881457) genes by PCR-RFLP method. The serum IL-35 level was measured by ELISA in the patient and healthy control groups. Besides, plasma protein carbonyl (PC), malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) levels, ferric reducing antioxidant power (FRAP) and serum catalase activity were detected using spectrophotometric methods in both groups.

Since the *FOXP3* gene is located on the X chromosome, the results were evaluated as male and female individually. Statistical analysis of the genetic variations at the position -3279A/C on *FOXP3* gene (SNP rs3761548) revealed that CC genotype in female and C genotype in male were more prevalent in patients with allergic asthma, and increased the susceptibility to the disease. Polymorphism status at the position -2383C/T (SNP rs3761549) on *FOXP3* gene exhibited that female with CT genotype had high risk of allergic asthma. For this SNP, TT genotype in female and T genotype in male were not encountered in none of the study groups (patients and healthy).

No significant differences were observed for the variations at the positions +2044G/A (SNP rs20541) and -1512A/C (SNP rs1881457) on *IL13* gene between allergic asthma patients and healthy subjects.

Although serum IL-35 level was higher in allergic asthma patients compared to healthy subjects, this difference was not statistically significant (17.74 ± 5.76 pg/mL and 15.62 ± 4.9 pg/mL, $p>0.05$, respectively). There was a positively weak correlation between serum IL-35 and IgE levels in patients (r = + 0.365, $p<0.001$). Besides, serum IL-35 levels in female who have AC (both patient and healthy) or AA (healthy female subjects) genotypes at SNP rs3761548 on *FOXP3* gene were higher in comparison to other genotypes.

Plasma protein carbonyl (PC) level in patients (1.47 ± 0.74 nmol/mg protein) was detected as significantly ($p<0.001$) higher than that of healthy subjects (1.01 ± 0.43 nmol/mg protein). Plasma malondialdehyde (MDA) level was also significantly higher in patients (3.39 ± 1.1 nmol/mL) compared to healthy subjects (2.31 ± 0.6 nmol/mL) ($p<0.001$). Plasma reduced glutathione (GSH) level (16.41 ± 6 nmol/mL) in the patients was significantly lower than that of healthy subjects (23.74 ± 9.3) ($p<0.001$). Similarly, ferric reducing total antioxidant power (FRAP) was lower in patient group (371.7 ± 105 nmol/mL) in comparison to healthy group (413.7 ± 133 nmol/mL) ($p<0.01$). Serum catalase activity in patients (0.353 ± 0.25 U/mg protein) was lower than that of healthy subjects (0.425 ± 0.185 U/mg protein) ($p<0.05$).

In conclusion, rs3761548 and rs3761549 SNPs seem to be associated with allergic asthma susceptibility. Besides, our findings revealed the presence of increased oxidative stress and decreased antioxidant status in patients with allergic asthma, even under controlled conditions. Thus, treatment strategies reducing oxidative stress and/or supporting antioxidant defence may be beneficial for allergic asthma patients.

In the future, studies in expanded patient and control groups, by regarding the SNPs reported here, and the others, will definitively bring out the utility of these genetic variations to predict allergic asthma susceptibility. Besides, further clinical trials are required in this manner to indicate the supporting capacity of antioxidants in allergic asthma treatment.

July 2020, 163 pages.

Keywords: Allergic asthma, Single nucleotide polymorphism, *FOXP3*, IL-35, Oxidative damage.

1. GİRİŞ

Alerjik hastalıklar ve astım en önemli küresel sağlık problemlerinden biridir ve bu hastalıklara sahip olan insan sayısı her geçen gün artmaktadır (Pawankar, 2014; Yadav ve Saini, 2016). Astım genellikle çocukluk çağında başlar ve genetik ve çevresel risk faktörleri, astım gelişiminde önemli rol oynar (Kudo ve diğ., 2013; Shah ve Newcomb, 2018; Jesenak ve diğ., 2017; Al-Abdulla ve diğ., 2010). Ayrıca çocuklar ve yetişkinler arasında en sık görülen solunum yolu hastalığı astımdır (Fitzpatrick ve diğ., 2012). Dünyada yaklaşık 300 milyon insan astım hastasıdır ve bu hastalık yılda yaklaşık 250.000 insanın ölümüne neden olmaktadır (Fitzpatrick ve diğ., 2012; Kudo ve diğ., 2013; Globe ve diğ., 2015; Yadav ve Saini, 2016). Astımın görülme sıklığının giderek arttığını belirten uzmanlar, hastalığın ülke ekonomisine olan yükünün de fazlalaşacağını belirtmektedirler.

Astım, kronik enflamatuvar bir hastalıktır ve iki temel gruba ayrılır: alerjik astım ve alerjik olmayan astım (Qu ve diğ., 2016). Hastalıktaki sürekli enflamasyon nedeniyle, hava yolu dokusunun yeniden şekillendiği ve hava yolu duvarlarının yapı ve fonksiyonlarında değişimler olduğu görülür (Jesenak ve diğ, 2017; Mishra ve diğ, 2018). Astım, solunum yolunun daralmasına ve bronş duvarının şişmesine neden olur; mukusu arttırır ve etkilenen kişinin nefes almasını zorlaştırır; sonuçta nefes darlığı, hırıltı ve öksürüğe neden olur (Holgate, 2008; Kudo ve diğ., 2013; Globe ve diğ., 2015; Yadav ve Saini, 2016).

Astım ve astımla ilişkili fenotipler üzerinde genom çapında çok sayıda çalışma yapılmıştır. Devam eden araştırmalar nedeniyle de astımda rol alan aday gen listesi giderek uzamaktadır (Ricci ve diğ., 2011; March ve diğ., 2013). Aday gen çalışmalarında tanımlanan genler arasında, T hücresinin hayatta kalması, çoğalması, farklılaşması ve baskılanmasında rol oynayan çeşitli sitokinler ve sitokin sinyallerine ait genler bulunmaktadır (March ve diğ., 2013).

Tek nükleotid polimorfizmi (SNP) bireyler arasında bir DNA dizisindeki tek bir nükleotidin varyasyonudur (Genetics Home Reference, 2020). Polimorfizmi mutasyondan ayıran en önemli özellik popülasyonda daha yüksek sıklıkta bulunmasıdır (Shastry, 2002). Birçok araştırmaya göre SNP'ler proteinlerin anlatımını veya fonksiyonunu etkiliyebilirler. Bu nedenle de bir bireyin belirli ilaçlara vereceği cevapta, toksinler gibi çevresel faktörlere

göstereceği duyarlılıkta ve belirli hastalıklara yakalanma riskinde rol oynayabilirler. Örneğin, immün yanıtta iş gören *FOXP3* ve *IL13* genlerinde bulunan polimorfizmlerin bazı otoimmün ve alerjik hastalıklara duyarlılık ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Hassannia ve diğ., 2011; Fodor ve diğ., 2011; Bottema ve diğ., 2010a ve 2010b; Graves ve diğ., 2000).

Düzenleyici T hücreleri (Treg'ler), antijenlere veya alerjenlere karşı periferik toleransı korumak için bağışıklık tepkilerini dengelemekte önemli rol oynarlar (Provoost ve diğ., 2009; Bottema ve diğ., 2010a; Zhang ve diğ., 2012). Forkhead box protein 3 (FOXP3) bir transkripsiyon faktörü olarak, Treg gelişim ve fonksiyonu için ana regülatör olarak işlev görür ve en spesifik Treg biyobelirtecidir. FOXP3 aktif olarak, enzimatik baskılayıcıların ve/veya enzimatik aktifleştiricilerin anlatımını başlatarak transkripsiyonu düzenler (Zhang ve diğ., 2012).

Provoost ve diğ. (2009), astım hastalarında FOXP3 mRNA düzeyinin ve protein ekspresyonunun az olduğunu göstermişlerdir (Provoost ve diğ., 2009). *FOXP3* genindeki mutasyonlar, atopik dermatit, eozinofili, gıda alerjisi ve immün disregülasyon poli-endokrinopati, enteropati X-bağlantılı sendrom (IPEX) ile ilişkili olup diğer bazı immün sistem hastalıklarına da yol açmaktadır. *FOXP3* geninin kromozomal konumu Xp11.23 olarak bulunmuştur (Marques ve diğ., 2015). *FOXP3*'teki SNP'lerin çocukluk çağında atopi gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Bottema ve diğ., 2010a).

FOXP3, Treg hücrelerinde bir sinyalden sonra çeşitli efektörlere ait genleri bastırırken diğer bazı genlerin anlatımını başlatır (Li ve Greene, 2008; Zhang ve diğ., 2012). Bu genlerden biri Epstein-Barr virüsü (EBV) indüklü protein 3 (EBI-3)'ü kodlayan gendir (*EBI3*) (Zhang ve diğ., 2012). EBI-3 proteinleri, EBI-3/p35 heterodimeri oluşturmak için p35 alt birimi ile bağlantı kurabilir. Bu bağlantının sonucunda İnterlökin-35 (IL-35) meydana gelir (Bardel ve diğ., 2008; Wang ve diğ., 2015b). IL-35, efektör T hücrelerinin bastırılmasına aracılık ederek birçok enflamasyonlu hastalığın ve otoimmün hastalığın patogenezinde rol oynar. Wang ve diğ. (2015b), *in vitro*'da IL-35'in T hücrelerinin proliferasyonunu ve dolayısıyla IL-4 üretimini doza bağlı olarak engellediğini göstermişlerdir. Ayrıca astım hastalarında *IL35* gen ekspresyonunun ve kandaki IL-35 düzeylerinin azaldığını bulmuşlar ve IL-35 uygulamasının alerjik astımda yeni bir immünoterapötik yaklaşım olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Wang ve diğ., 2015b).

İnterlökin-13 (IL-13), alerjik enflamasyonun merkezi bir düzenleyicisidir (Xu ve diğ., 2017). *IL13*, kromozom 5q31.1 üzerinde bulunan kritik bir sitokin genidir. Gen 2937 bç DNA'dan oluşur ve 1287 bazlık mRNA'ya transkribe olur. IL-13, lenfoid hücreler ve T yardımcı 2 (Th2) hücreleri tarafından üretilir (Xu ve diğ., 2017; Resende ve diğ., 2017). Hava yolundaki IL-13 üretimi, eozinofillerin hayatta kalması ve migrasyonunu, makrofajların aktivasyonunu, hava yolu epitel hücrelerinin geçirgenliğini, mukus üretiminin artışını ve hava yollarının aşırı duyarlılığını uyarır (Resende ve diğ., 2017). *IL13* genindeki tek nükleotid polimorfizmleri etnik olarak çeşitli popülasyonlarda alerjik fenotiplerle ilişkilidir (Graves ve diğ., 2000; Bottema ve diğ., 2010b; Xu ve diğ., 2017; Resende ve diğ., 2017).

Enflamasyon sırasında, çok sayıda reaktif oksijen türünün (ROT) ve reaktif azot türünün (RNT) üretilmesine yol açan birçok enflamatuvar hücre aktive olur (Nadeem ve diğ., 2003; Sagdic ve diğ., 2011). Aşırı ROT üretimi nedeniyle, oksidan ve antioksidanlar arasındaki denge bozulur ve bu durum oksidatif strese yol açar (Nadeem ve diğ., 2003; Jesenak ve diğ., 2017; Marrocco ve diğ., 2017). ROT güçlü oksitleyici özelliklere sahiptir (Mittal ve diğ., 2014). Aşırı miktarda üretilen serbest radikaller, hücrelerdeki proteinlere, lipitlere ve DNA'ya zarar verebilir ve bu moleküllerin işlevini bozabilir (Mittal ve diğ., 2014; Yadav ve Saini, 2016). Bu hasarları önlemek ve ROT ile mücadele etmek için hücrede çeşitli antioksidan savunma sistemleri mevcuttur. Bu sistemler enzimatik (SOD, CAT, GPx) ve enzimatik olmayan (glutatyon, vitamin A, C ve E) ajanları içerir (Valko ve diğ., 2007). Özellikle son yirmi yıldır, serbest radikallerin astım patolojisindeki rollerine dikkat çekilmektedir (Sagdic ve diğ., 2011). Literatürde astımın ilerlemesi ve oksidatif stres arasındaki bağlantıyı gösteren yayınlara rastlanmaktadır (Emin ve diğ., 2012; Qu ve diğ., 2016).

Bu çalışma, alerjik astım patogenezinde etkili olan genetik varyasyonların, immün yanıtın ve oksidatif stresle ilişkili süreçlerin aydınlatılmasına katkıda bulunmayı amaçlamaktadır.

Bu amaçla *FOXP3* ve *IL13* genlerindeki SNP'lerin (sırasıyla, *FOXP3* geninde rs3761548 ve rs3761549 SNP'leri; *IL13* geninde rs20541 ve rs1881457 SNP'leri) alerjik astıma yatkınlıkla ilgili olup olmadığı araştırılmıştır. Literatürde *IL13* genindeki iki SNP'nin ve *FOXP3* genindeki rs3761548 SNP'nin erişkin alerjik astımlı hastalardaki durumuna ilişkin az sayıda çalışma mevcuttur (Graves ve diğ., 2000; Shazia ve diğ., 2013; Noureldin ve diğ., 2014; Figueiredo ve diğ., 2018). Bu hasta grubunda *FOXP3* genindeki rs3761549 ilk kez bu tezde

incelenmiştir. Ayrıca literatürde Türk hastalar üzerinde yapılmış benzer bir polimorfizm çalışmasına rastlanmamıştır.

FOXP3, IL-35 ekspresyonunda önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Bu nedenle hasta ve kontrollerde serum IL-35 düzeyi de belirlenmiş ve *FOXP3* genindeki iki SNP (rs3761548 ve rs3761549) ile bağlantılı olup olmadığı incelenmiştir. Alerjik astım hastalarında *FOXP3* genotipleri ile serum IL-35 düzeyi arasındaki ilişki ilk kez bu çalışmada ele alınmıştır.

Oksidatif stresin alerjik astım patogenezindeki rolünü araştırmak için hasta ve sağlıklı bireylerin plazma protein karbonil (PK), malondialdehit (MDA), indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyleri, toplam antioksidan kapasiteleri ve serum katalaz aktiviteleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Ayrıca hastalar sağlık otoriteleri tarafından geliştirilmiş Astım Kontrol Testi (AKT) skorlarına göre gruplandırılmış ve bu parametrelerin alt gruplar arasındaki değişimi ilk kez bu çalışmada incelenmiştir.

Elde edilen bulguların, alerjik astımın tanı ve tedavisine moleküler bir bakış açısı getirerek katkı sağlaması ve konuya ilişkin yeni projelerin önünü açması beklenmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ASTIM

"Astım" kelimesi, Yunanca nefes darlığı anlama gelmektedir, yani tarih boyunca nefes darlığı olan herhangi bir hasta “astımlı” olarak tanımlanmıştır (Holgate, 2010). Modern tarife göre ise, astım bağışlık sistemine bağlı olarak solunum yollarını etkileyen kronik enflamatuvar bir hastalıktır. Kronik enflamasyon, zaman içinde değişkenlik gösterebilecek tekrarlayan hışıltı, nefes darlığı, göğüste sıkışma hissi ve/veya öksürük ataklarına yol açan hava yolu aşırı duyarlılığı (virüsler, alerjenler, egzersiz vb. spesifik tetikleyicilere karşı hava yolunu daraltan bir cevap) ile ilişkilidir (Quirt ve diğ., 2018). Bu hastalık, tüm yaş gruplarını etkiler ve oldukça yaygındır. Birçok astım hastası için, hastalığın bebeklik ve erken çocukluk döneminde kökleri vardır (Kodu ve diğ., 2013). Dünyada yaklaşık 300 milyon insan astım hastasıdır ve her yıl astım kaynaklı 250.000 civarında ölüm vakası bildirilmektedir (Kudo ve diğ., 2013).

Astımın fenotipik veya patolojik özellikleri bilinmekle birlikte, neden bazı insanların bu hastalığa yakalanıp diğerlerinin yakalanmadığı sorusu hala cevap beklemektedir (Borish, 2016). Görünüşe göre bu durum hem eksojen hem de endojen faktörlere dayanmaktadır (Borish, 2016). Birçok klinik ve temel çalışma, hastalığın patofizyolojisinde anahtar rolü oynayan sürecin hava yolu enflamasyonu olduğunu öne sürmektedir (Kudo ve diğ., 2013). Astım tamamen tedavi edilemez, ancak semptomları bir dereceye kadar kontrol edilebilir. Hastalığın tedavisinde amaç, hastaya mümkün olan en yüksek yaşam kalitesini kazandırmaktır (Price ve diğ., 2013).

2.1.1. Astımın Sınıflandırılması

Geleneksel yaklaşımda hava akımını engelleyen, bronşlarda aşırı duyarlılık ve solunum yolu enflamasyonu ile karakterize olan kronik bir solunum hastalığı olarak tanımlanan astım (Walford ve Doherty, 2014), günümüzde genetik ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık etkileşimden kaynaklanan farklı fenotiplere sahip solunum yolu hastalıklarını içine alan heterojen bir hastalık grubu olarak kabul edilmektedir. Geçen yirmi yıl boyunca yapılan araştırmaların çoğu astımın heterojen klinik yapısını daha iyi anlamaya yöneliktir (Walford ve

Doherty, 2014). Bu nedenle gelecekte, her biri farklı mekanizmaya sahip çok sayıda farklı "astım türü" tanımlamanın mümkün olacağı öngörülmektedir (Borish, 2016). Yeni biyoelirteçlerle tanıda kaydedilecek gelişmeler, astım türüne özgü tedavi süreçlerinin geliştirilmesini sağlayabilir (Walford ve Doherty, 2014). Hastaların genetik özelliklerinin bilinmesi ise hem tanıyı destekleyecek hem de bireye özel tedavileri gündeme getirecektir.

Eski astım sınıflandırması, alerjik ve alerjik olmayan astımı vurgularken, yeni sınıflandırmalarda, başlangıç yaşı, atopi durumu, hücresel ve moleküler mekanizmalar, etiyoloji, patofizyolojik mekanizma, tedavi ve diğer faktörler dahil olmak üzere çok sayıda olası durum dikkate alınmaya başlanmıştır (Lotvall ve diğ., 2011; Corren, 2013; Mathur ve diğ., 2014).

Astım genel olarak hastalığa neden olan 'tetikleyicilere' göre fenotiplere ayrılmaktadır. Buna göre astımın farklı iki alt tipi vardır; alerjik astım ve alerjik olmayan astım (örneğin; obezite astımı, mesleki astım ve ileri yaşta başlayan astım) (Horak ve diğ., 2016; Qu ve diğ., 2016). Alerjik astım fenotipinin, ortaya çıkmasına polenler veya ev tozu akarı gibi alerjenler neden olur. Alerjik astım tanısı deri prik testleri veya alerjene özgü kan testleri ile yapılır. Astımlı bireylerin %10-33'ünde alerjik olmayan astım vardır (Baos ve diğ., 2018). Alerjik olmayan astım, alerjik olmayan nedenlerle ve genelde daha geç yaşta ortaya çıkar (Qu ve diğ., 2016). Bu tür astımda, deri prik testi negatif ve toplam serum IgE düzeyi normal veya düşüktür (<150 IU/mL) (Baos ve diğ., 2018).

Astım sınıflandırmasında yeni bir yaklaşım da, spesifik hücresel, patojenik patern ve mekanizmayı temsil eden "endotip" sınıflandırmasıdır (Walford ve Doherty, 2014; Corren, 2013). İndüklenmiş balgam örneklerinin analizi enflamatuvar endotip astım alt tipinin belirlenmesine olanak verir (Simpson ve diğ., 2006; Tliba ve Panettieri, 2019). İndüklenmiş balgamda enflamatuvar hücre sayımı analizine dayanan sınıflandırmada, 4 alt enflamatuvar astım tipi tanımlanmıştır: 1) Eozinofilik astım (EoA), 2) Nötrofilik astım (NeuA), 3) Karışık granülositik astım (MGA) ve 4) Pauci-granülositik astım (PGA) (Simpson ve diğ., 2006; Schleich ve diğ., 2016; Gao ve diğ., 2017a; Tliba ve Panettieri, 2019). EoA'da, balgam eozinofil sayıları artmıştır (>%3) ve tedavide eozinofilleri baskılayan yaklaşımlar uygulanır (Tliba ve Panettieri, 2019). Eozinofilik endotipe, alerjenle alevlenen astım da dahildir ve bu grup, alerjik riniti (AR) olan ve inhale aeroalerjenlere duyarlılık (atopi) gösteren bireyleri

içerir (Borish, 2016). Bu endotip çocukluk çağında başlayan astımda daha yaygındır (Lotvall ve diğ., 2011).

NeuA, balgam nötrofil sayısı artışı (≥61% veya ≥64%) ile karakterizedir (Tliba ve Panettieri, 2019). MGA'da balgamda her iki hücre tipi de (eozinofil ve nötrofil) artmıştır. Balgamda eozinofil veya nötrofil sayısında artış olmaması PGA'yı işaret eder (Tliba ve Panettieri, 2019). NeuA ve PGA eozinofilik olmayan astım olarak adlandırılırlar ve genelde daha yaşlı bireylerde görülürler (Simpson ve diğ., 2006; Tliba ve Panettieri, 2019).

ABD'de astımlı çocukların %90'ında, erişkinlerin %50'sinde rastlanan astım tipi "alerjik astım"dır (NIH, 2020).

Son yıllarda yapılan bilimsel araştırmalar (Backman ve diğ., 2017; Idani ve diğ., 2019) ve istatistiksel çalışmalar (AAAAI, 2020) dünyanın birçok bölgesinde alerjik olmayan astım prevalansının stabil seyrine rağmen alerjik astım prevalansının arttığını ortaya koymaktadır. Bu tezde de bu astım tipi çalışılmış ve aşağıda daha ayrıntılı bilgi verilmiştir.

2.2. ALERJİK ASTIM

Alerjik astım, önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünya nüfusunun yaklaşık %20'si bu hastalığa yakalanmış durumdadır (Li ve Hua, 2014; Cipriani ve diğ., 2017). Alerjik astım, genetik ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık etkileşimin sonucu olarak ortaya çıkan bir sendromdur (Mukherjee ve Zhang, 2011; Cipriani ve diğ., 2017). Bu hastalıkta, alerjenlere maruz kalmayla aralıksız nefes darlığı, havayolu hiper-reaktivitesi, hırıltı ve öksürük krizlerine neden olan kronik bir hava yolu enflamasyonu söz konusudur (Mukherjee ve Zhang, 2011). Günümüzde, hava kirliliği ve aeroalerjenlerin çoğalması nedeniyle alerjik astım küresel olarak artmaktadır. Bu çevresel riskler özellikle sanayileşmenin hızla ilerlediği gelişmekte olan ülkelerde belirgindir (Li ve Hua, 2014).

Atopi alerjik bünyeye sahip olmak anlamına gelir. Atopi, çevresel ve gıda alerjenlerine karşı anormal bir immünolojik reaksiyon nedeniyle meydana gelen enflamatuvar bir süreçtir (Cianferoni ve Spergel, 2014) ve astım tanısında risk faktörü olarak tanımlanır. Çocuklarda erken çocukluk dönemindeki atopiyi, özellikle atopik ailelerde, daha sonra astım gelişimi için bir risk faktörü olarak tanımlayan çok sayıda çalışma mevcuttur (Oettgen ve Geha, 2001;

Mathur ve Viswanathan, 2014). Buna göre atopik olan erken başlangıçlı, atopik olmayan geç başlangıçlı astım anlamına gelir. Bu farklılıklara rağmen, iki tip arasında anlamlı derecede bir örtüşme vardır. Astımlı çocukların %70-90'ında ve astımlı yetişkinlerin yaklaşık %50'sinde atopik astım görülmektedir (Ali, 2011).

Genel olarak kronik hava yolu enflamatuvar süreçleri, aktif eozinofiller ve T yardımcı 2 (Th2) lenfositlerin hava yolunda yoğun şekilde toplanması ve yaygın alerjenlere şiddetli bir immün tepkisi ile sonuçlanır (Li ve Hua, 2014). Tekrarlayan enflamasyon ve doku onarım mekanizmalarındaki anormallikler, hava yolu duvarında yapısal değişikliklere yol açar. Bu nedenle alerjik astım, karmaşık bir hava yolu "remodeling" hastalığı olarak tanımlanır (Li ve Hua, 2014). Alerjik astımın iyi anlaşılması için, moleküler işleyişini ve sitokin oluşumunun etkisini bilmek önemlidir. Bir sonraki bolümde (2.2.1) alerjik astımın moleküler mekanizması ele alınacaktır.

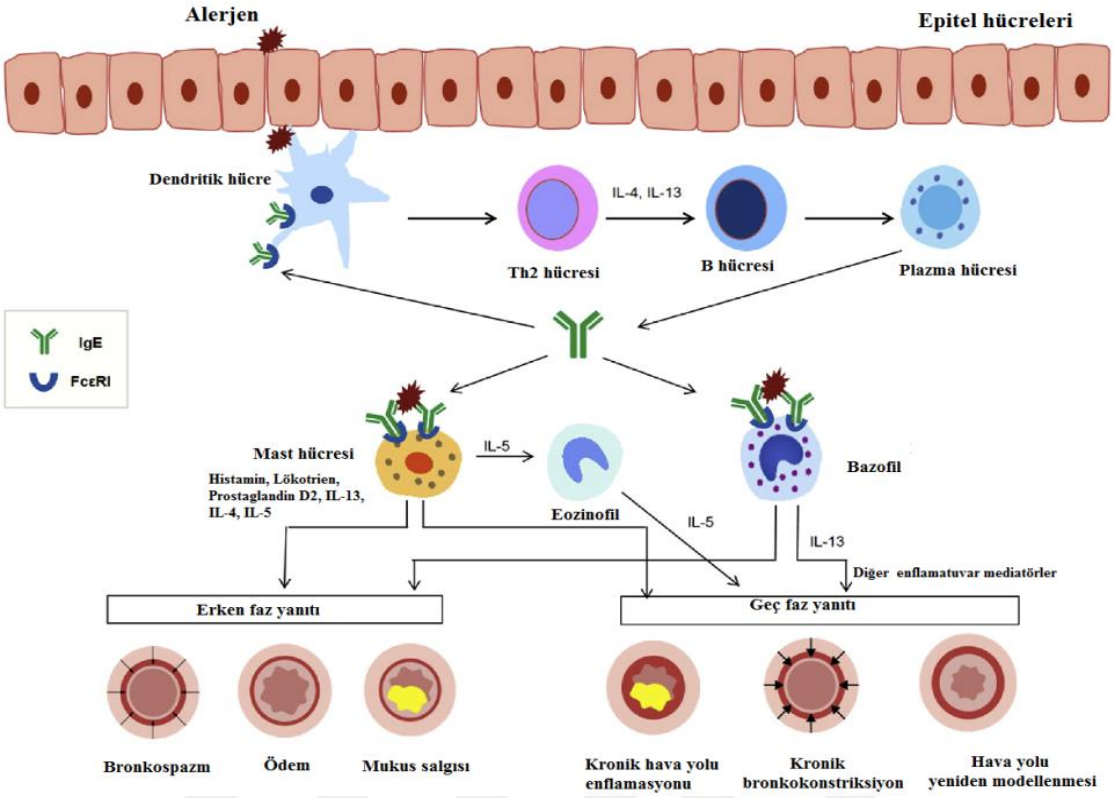
2.2.1. Alerjik Astım Mekanizması

Solunan alerjen (ler) hava yolundaki duyarlı immün hücrelerle etkileşime girerek duyarlılığa ve alerjik astıma neden olur (Mukherjee ve Zhang, 2011). Bu etkileşim ardarda bir dizi reaksiyona yol açar. Solunan alerjene karşı spesifik T hücrelerinin aktivasyonu için farklı yollar ve hücre tipleri aracılık eder (Cianferoni ve Spergel, 2014; Eckl-Dorna ve diğ., 2019). Alerjen-IgE kompleksleri reseptör aracılığıyla antijen sunan hücreler (APC'ler) tarafından tanımlandıktan sonra T hücrelerine sunulur veya alerjen APC'ler tarafından direkt olarak tanımlanır ve alerjenin sunulmasıyla T hücreleri aktive edilir (Eckl-Dorna ve diğ., 2019).

Yüksek IgE düzeyleri, alerjik olmayan astımda bile bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (Oettgen ve Geha, 2001). Dünya popülasyonunun yaklaşık %30'u, en yaygın aşırı duyarlılık hastalığı olan immünoglobulin E (IgE) ile ilişkili alerjiden muzdariptir (Eckl-Dorna ve diğ., 2019). Alerjene özgü antikorlar, alerjik hastalıkların gelişimi, tanısı ve tedavisinde önemli rol oynar (Eckl-Dorna ve diğ., 2019). Alerjik rinit, atopik dermatit ve alerjik astım IgE antikoru düzeyi belirgin şekilde artmış kişilerde görülür ve alerjene karşı IgE aracılı alerjik yanıt verilir. Yüksek afiniteli (FcεRI) ve düşük afiniteli (FcεRII; CD23) IgE reseptörleri, dendritik hücreler (DC'ler) ve B hücreleri dahil olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerinde bulunur (Şekil 2.1) (Mukherjee ve Zhang, 2011). IgE, B hücrelerinde ve DC'lerde bulunan bu reseptörlere bağlanır ve alerjen alımını kolaylaştırır. Sonra alerjen bu hücreler tarafından işlenip (küçük

peptitlere ayrılır) hücre membranında T hücrelerine sunulur. IgE'nin çoğunluğu, FcεRI içeren mast hücrelerinin yanı sıra bazofillere bağlanır. FcεRI'lere bağlı IgE'lerin spesifik bir antijen ile çapraz bağlanması, mast hücrelerinden enflamatuvar mediatörlerin (örn., histamin ve lökotrienlerin) salınmasına aracılık eder ve enflamatuvar cevaba yol açar (Mukherjee ve Zhang, 2011).

Alerjik astımda alerjene karşı erken bir adım, hava yolu epitel hücrelerinden timik stromal lenfopoetin (TSLP) ve interlökin-25 (IL-25) salgılanması ve bu alerjenin dendritik hücreler tarafından alınması ile başlar (Levine ve Wenzel, 2010; Mukherjee ve Zhang, 2011). Antijen sunan dendritik hücreler aktifleşirler ve olgunlaşırlar. Aktif dendritik hücreler, naif ("naive") $CD4^+$ T hücrelerinin, Th2 hücrelerine farklılaşmasını sağlarlar. Th2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 ve tümör nekroz faktör (TNF) gibi sitokinlerin üretimini yapar. Th2 sitokinleri hava yolu eozinofil ve mast hücrelerinin alımına ve göçlerine, B hücrelerinin IgE izotip sınıfa geçişlerine ve mukus sekresyonuna aracılık eder (Levine ve Wenzel, 2010; Mukherjee ve Zhang, 2011; Salazar ve Ghaemmaghami, 2013). Şekil 2.1'de hava yolunda alerjene karşı yanıtın detayı gösterilmiştir.



Şekil 2.1: Alerjik astımda immünolojik yanıt mekanizması (Humbert ve diğ., 2019).

2.2.2. Alerjik Astım Patogenezinde Önemli İnterlökinler

1980'lerin sonunda farklı $CD4^+$ T hücre alt kümelerinin keşfiyle birlikte, Th2 alt kümesinin astım patogenezine bazı sitokinler üreterek katkıda bulunduğu belirlenmiştir (Gour ve Wills-Karp, 2015). Çok sayıda kanıt hem insanlarda hem de hayvan modellerinde, alerjinin belirgin özelliklerinin geliştirilmesinde Th2 hücreleri ve ona bağlı interlökinlerin (IL-4, IL-5 ve IL-13) rolünü desteklemektedir. Bu interlökinlerin alerjik astımda ve enflamasyonda oynadığı roller (Gour ve Wills-Karp, 2015) aşağıda ele alınmıştır.

2.2.2.1. İnterlökin-4

İnterlökin-4 (IL-4), alerjik enflamasyonun gelişiminde anahtar bir sitokindir (Şekil 2.3). Bu süreçte IL-4'ün temel biyolojik aktivitesi, naif T yardımcı tip 0 (Th0) hücrelerinin, IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13 salgılayan Th2 hücrelerine farklılaşmasını ve proliferasyonunu sağlamaktır (Nakajima ve Takatsu, 2007). Ayrıca IL-4'ün, Th2 hücrelerinin hayatta kalması ("survival"), IgE sentezi, alerjik hava yolu tepkileri ve humoral yanıt başlatılmasında temel bir interlökin

olduğu gösterilmiştir; ancak alerjik enflamasyonda hava yolu aşırı duyarlılığı (AHR), mukus üretimi ve subepitelyal fibrozise katkıda bulunmaz (Gour ve Wills-Karp, 2015). IL-4 sinyalleşmesi iki tip heterodimerik transmembran reseptör kompleksi ile başlatılır: tip I IL-4 reseptörü ve tip II IL-4 reseptörü. Bu iki reseptörde ortak alt birim fonksiyonel reseptör zinciri olan IL-R4α (CD124)'dir. IL-R4α'ya ek olarak tip I'de ɣc, tip II'de IL-13RαI alt birimi bulunur. Dolayısıyla tip I sadece IL-4'ü bağlarken tip II hem IL-4'ü, hem de IL-13'ü bağlar (Gour ve Wills-Karp, 2015).

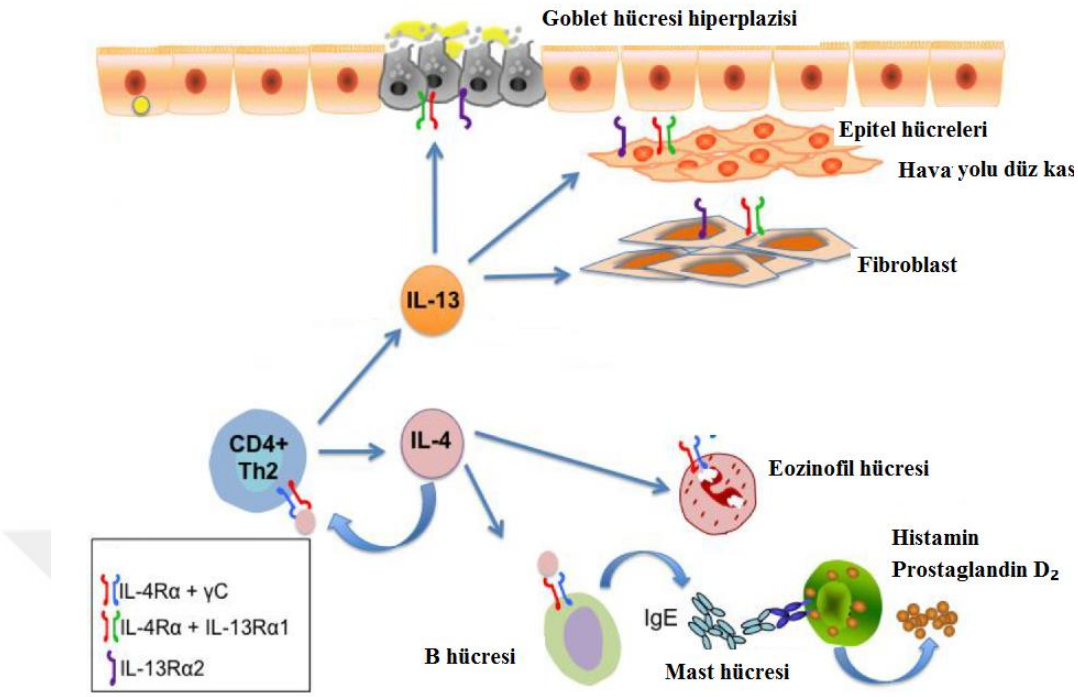
IL-4, B hücrelerinde ε izotipi IgE değişimini indükler (Steinke ve Borish, 2001). Ayrıca IgE'nin aracılık ettiği immün tepkileri arttırmak için hücreler üzerinde IgE reseptörlerinin ekspresyonunu indükler. B lenfositleri ve mononükleer fagositik hücreler üzerinde düşük afiniteli IgE reseptörünü (FcεRII; CD23) ve mast hücreleri ile bazofiller üzerinde yüksek afiniteli IgE reseptörünü (FcεRI) arttırır. IL-4 tarafından indüklenen IgE'ye bağımlı mast hücre aktivasyonu, ani alerjik reaksiyonların gelişiminde çok önemli bir role sahiptir (Steinke ve Borish, 2001). IL-4, kronik astımda enflamasyon ve akciğerde yeniden modellenmeye katkıda bulunabilecek eotaksin ve diğer enflamatuvar sitokinlerin fibroblast hücrelerindeki ekspresyonunu arttırır. IL-4, vasküler endotel üzerindeki vasküler hücre adezyon molekülünü (VCAM-1) indükler ve böylece hücresel enflamasyonu teşvik eder. VCAM-1'in IL-4 ile etkileşimi, T lenfositlerinin, monositlerin, bazofillerin ve eozinofillerin enflamatuvar bölgeye göç etmelerine neden olur (Steinke ve Borish, 2001). Ek olarak, IL-4, eozinofillerin apoptozunu inhibe eder ve eozinofil kemotaksisini, dolayısıyla eozinofilik enflamasyonu indükler (Steinke ve Borish, 2001). Bu nedenle kortikostreoidler gibi IL-4 antagonistleri astımda terapötik bir ajan olarak kullanılmaktadır (Steinke ve Borish, 2001; Kasaian ve diğ., 2014).

2.2.2.2. İnterlökin-13

IL-13'ün, eozinofiller ve immünoglobulin E (IgE) kaynaklı olayları içeren geleneksel yolaklar üzerinden değil, epitel ve düz kas hücreleri üzerindeki etkileriyle alerjik tepkimede kilit bir interlökin olduğu öne sürülmektedir (Nakajima ve Takatsu, 2007). IL-4'ün aksine IL-13'ün alerjene karşı yanıtın efektör aşamasında daha önemli bir rol oynadığı ve AHR, mukus üretimi, solunum yolu düz kas değişiklikleri ve alt epitelyal fibroz da dahil alerjik hastalıkların ana göstergelerini indüklemek için yeterli olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.2) (Gour ve Wills-Karp, 2015).

IL-13, $CD4^+$ T hücreleri, doğal öldürücü (NK) hücreler, mast hücreleri, bazofiller, eozinofiller ve nuositler ("nuocytes") tarafından üretilir (Rael ve Lockey, 2011; Gour ve Wills-Karp, 2015) ve IgE sentezin, mukus hipersekresyonu, AHR ve fibrozda merkezi regülatör olarak rol alır (Rael ve Lockey, 2011). Alerjik enflamasyon sırasında IL-13'ün fonksiyonlarının belirlenmesi, fonksiyonel reseptörünü (IL-4Rα/IL-13Rα1) IL-4 ile paylaştığı için zordur. Astımlı akciğerde IL-4 ve IL-13'ün farklı fonksiyonları için olası bir açıklama, IL-13'ün alerjik enflamatuvar koşullar altında daha fazla miktarlarda üretilebileceğidir. Enflamasyonlu dokularda IL-13 düzeyinin IL-4'e kıyasla arttığı gösterilmiştir (Gour ve Wills-Karp, 2015). Goblet hücresi hiperplazisi ve aşırı mukus üretimi astımın ve kronik obstrüktif akciğer hastalığının belirgin özellikleridir ve hava yolu tıkanmasına yol açarak fatal astıma neden olabilirler (Rael ve Lockey, 2011). Hayvan modelleri IL-13'ün goblet hücresi hiperplazisini ve mukus hipersekresyonunu indüklediğini göstermektedir (Rael ve Lockey, 2011).

Astımda fibroz, sınırlı tedavi seçenekleriyle morbidite ve mortalitenin temel nedenidir (Rael ve Lockey, 2011). Ana Th2 sitokinlerinden, IL-4, IL-5 ve IL-13, doku yeniden yapılanması ve fibrozun düzenlenmesinde farklı rollere sahiptirler (Wynn, 2004). Deneysel modeller IL-13'ün en önemli profibrotik mediatör olduğunu göstermektedir. Transgenik fare ile yapılan *in vivo* çalışmalar akciğerdeki aşırı IL-13 ekspresyonunun, ilave uyarıcıya gerek olmadan hava yolunda subepitelyal fibrozu tetiklediğini göstermektedir. IL-13, kemokinleri (CCL3, CCL4, CCL20, CCL2, CCL11, CCL22 ve CCL6) indükler. CCL3, CCL2 ve CCL6'ya karşı üretilen antikorlar, IL-13 transgenik farelerde ve bleomisin uygulanan farelerde akciğer yeniden yapılanması ve fibroz patogenezini ortadan kaldırır (Belperio ve diğ., 2002; Rael ve Lockey, 2011).



Şekil 2.2: Alerjik enflamasyonda IL-4 ve IL-13'ün farklı rolleri. Th2 $CD4^+$, IL-4 ve IL-13 üretir. IL-4 IgE üretimine, eozinofillerin ve mast hücrelerinin aktivasyonuna ve enflamatuvar bölgeye göç etmelerine neden olur. IL-13, epitel hücreleri, solunum yolu düz kas hücreleri ve fibroblastları aktive edebilir ve AHR, goblet hücre hiperplazisi ve mukus hipersekresyonuna yol açar (Gour ve Wills-Karp, 2015).

$CD4^+$ T lenfositlerinin, bir IL-4R/STAT6 mekanizması aracılığıyla AHR'ye yol açtığı hayvan astım modellerinde gösterilmişir. Bu süreç IL-4 ve IL-5'ten bağımsızdır. T lenfosit eksikliği olan farelere eksojen IL-13 uygulaması, AHR ve hava yolu enflamasyonunu arttırır (Rael ve Lockey, 2011).

2.2.2.3. İnterlökin-5

IL-5, başlangıçta B hücrelerinin farklılaşmasını ve IgE üretmesini tetikleyen T hücre kaynaklı bir sitokin olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda IL-5, eozinofiller için ana olgunlaşma ve farklılaşma faktörü olarak kabul edilmiştir (Nakajima ve Takatsu, 2007). Astımlı hastaların bronş biyopsilerinde IL-5 mRNA ekspresyonunun sağlıklı gönüllülerdekine kıyasla artmış olduğu ve IL-5 mRNA'sının en önemli kaynağının $CD4^+$ T hücreleri olduğu gösterilmiştir (Robinson ve diğ., 1992; Nakajima ve Takatsu, 2007). Ayrıca astımda $CD4^+$ T hücre aktivasyonunun artışına, serum IL-5 konsantrasyonundaki artış eşlik eder. IL-5 mRNA'sı ve

proteini alerjene maruz kalan dokulardaki mast hücrelerinde bulunmaktadır (Nakajima ve Takatsu, 2007).

Hayvan modelleri alerji ve astımda eozinofilik enflamasyonun indüklenmesinde IL-5'in rolünü desteklemektedir (Flood-Page ve diğ., 2003). İlginç bir şekilde, farelerin anti-IL-5 antikoru ile tedavisi, antijen inhalasyonunun neden olduğu subepitelyal ve peribronşiyal fibrozu neredeyse tamamen önlemektedir (Blyth ve diğ., 2000). Anti-IL-5 antikor tedavisinin astımlı hastalarda hava yolu yeniden yapılanmasını olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (Flood-Page ve diğ., 2003).

2.2.2.4. Timik Stromal Lenfopoetin (TSLP)

Akciğer ve deri epitel hücreleri çok yüksek düzeyde timik stromal lenfopoetin (TSLP) eksprese ederler (Ziegler, 2012). Önceleri bir lenfosit büyüme faktörü olduğu düşünülen (Togbe ve diğ., 2013) TSLP'nin dendritik hücreler, eozinofiller, mast hücreleri ve solunum yolu düz kas (ASM) hücreleri gibi diğer hücre tipleri üzerinde etkili olduğu sonradan anlaşılmıştır (Hall ve Agrawal, 2014). TSLP'nin aktive edilmiş makrofajların farklılaşmasında (Han ve diğ., 2013) ve eozinofillerin hava yoluna göçünde etkili olduğu, bu nedenle alerjik enflamasyona katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Togbe ve diğ., 2013; Hall ve Agrawal, 2014). TSLP'nin IL-10 üreten T düzenleyici hücreler üzerinde de bir etkisi olduğu öne sürülmüştür (Hall ve Agrawal, 2014). Hasta bireylerin bronkoalveolar lavaj sıvısı incelendiğinde, TSLP'nin IL-10 üreten Treg'leri inhibe ettiği gözlenmiştir. Buna dayanarak, TSLP'nin, pro-enflamatuvar Th2 yanıtlarını güçlendirerek ve akciğerlerdeki antijenlere toleransı baskılayarak astım patogenezine katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır (Hall ve Agrawal, 2014).

2.2.3. Alerjik Astım Patogenezinde Önemli Hücreler

Astım, eozinofiller, mast hücreleri, T lenfositleri, nötrofiller, düz kas hücreleri ve hava yolu epitel hücrelerinin yanı sıra çeşitli hücre bileşenlerinin rol aldığı heterojen bir hastalıktır (Gao ve diğ., 2017a). Balgamdaki enflamatuvar hücrelerin tipine göre, astım dört fenotipte incelenir: eozinofilik astım, nötrofilik astım, karışık granülositik astım ve paucigranülositik astım (Gao ve diğ., 2017a). Ayrıca, her bir hücresel ve alt hücresel bileşenin etkinliği ve klinik etkisi, bireyler arasında büyük farklılıklar gösterir ve zaman içerisinde, ilaç tedavisine

ve çevresel/yaşam tarzı etkilerine bağlı olarak değişebilir (McBrien ve Menzies-Gow, 2017). Alerjik astım patogenezine katkıda bulunan hücreler aşağıda ele alınmıştır.

2.2.3.1. Mast Hücreleri

Mast hücreleri, $CD34^+$ öncüleri olarak dolaşan pluripotent hematopoietik kök hücrelerden türevlenir. Bu kök hücreler uzun ömürlü ve olgun efektör hücrelere dönüşmek üzere dokulara göç ederler (Reuter ve diğ., 2010). Bu hücreler deri, bağırsak ve akciğerde, epitelde, genellikle kan ve lenf damarlarında, sinirlerde ve saç köklerinde bulunurlar. Mast hücreleri, bir dizi aracı madde (mediatör) üretir; bazıları mast hücre granüllerinde depolanır, bazıları ise aktivasyonu takiben *de novo* üretilir. Mast hücre mediatörleri aşağıdaki sınıflara ayrılabilir; a) önceden oluşturulmuş maddeler, b) lipit mediatörler ve c) sitokinler ve kemokinler (Reuter ve diğ., 2010).

Alerjik astımlı hastalarda, bir aeroalerjenin solunması, mast hücre membranına bağlı IgE'lerin alerjen aracılığıyla çapraz bağlanmasına yol açar; histamin, lökotrienler, proteazlar ve prostaglandin gibi mast hücre mediatörlerinin hızlı salınımını indükler (Reuter ve diğ., 2010; Hall ve diğ., 2014). Bu mediatörler vazodilatasyona, düz kasın kasılmasına ve mukoza sekresyonuna neden olur (Reuter ve diğ., 2010). Ayrıca bu aracılar, alerjene karşı geç faz yanıtına yol açarlar. Geç fazda bronş duvarının enflamasyonuyla ilişkili hücreler (eozinofiller, $CD4^+$ T hücreler, nötrofiller, mast hücreleri ve bazofiller) enflamasyon bölgesine göç ederler ve hava yolu aşırı duyarlılığa neden olurlar (Fahy ve diğ., 1997).

Mast hücreleri tarafından üretilen önemli ara maddelerden biri, dört ayrı reseptöre bağlanan ve farklı hücre tiplerine etki eden histamindir. Histamin, reseptörlerinin (HR) ekspresyon seviyesine ve hücre tipine bağlı olarak, anti-enflamatuvar veya pro-enflamatuvar etkiler gösterebilir. Dendritik hücre aktivasyonu ile ilgili olarak, iki reseptör H1R ve H3R, antijen sunumunun artması, sitokin üretimi ve Th1 hazırlama aktivitesi ile pro-enflamatuvar tepkileri indüklerken, H2R reseptörünün aktivasyonu IL-10 salgılanmasını ve düzenleyici bir dendritik hücre fenotipini indükler (Mazzoni ve diğ., 2001; Reuter ve diğ., 2010). T hücrelerinde, reseptör ekspresyon durumuna bağlı olarak histamin, Th2 hücrelerinde IL-4 ve IL-13, Th1 hücrelerinde ise IFN-ɣ gibi sitokinlerin üretimini indükleyebilir (Reuter ve diğ., 2010). Bryce ve diğ. (2006) alerjik hava yolu hastalığında, H1R üzerinden etki eden histaminin önemli olduğunu göstermiştir (Bryce ve diğ., 2006). Ayrıca, H1R'den yoksun olan hayvanlarda, duyarlaşma (“sensitization”) ve tekrar maruziyet (“challenge”) sonrasında alerjik hava yolu

hastalıkları gelişmemiştir ve T hücrelerinin akciğere göçü engellenmiştir. Alerjik hava yolu hastalığının histamine bağlı indüksiyonunda H4R de önemli bir rol oynamaktadır (Dunford ve diğ., 2006). *In vitro* çalışmalar, H4R'nin dendritik hücreler üzerinde bloklanmasının sitokin ve kemokin üretiminde azalmaya yol açtığını ve Th2 yanıtlarındaki indüksiyonu sınırladığını göstermiştir. Fare modellerinde yürütülen yeni araştırmalar H4R antagonistlerinin alerjik hava yolu hastalığının gelişimini bastırmada etkili olduğunu göstermektedir (Dunford ve diğ., 2006; Reuter ve diğ., 2010).

Mast hücreleri timik stromal lenfopoetin (TSLP), prostaglandinler ve tümör nekroz faktör (TNF) de üretir. TNF ekspresyonu, astımlıların solunum yollarında sağlıklı deneklere kıyasla yüksektir. Araştırmalar sağlıklı deneklere nefes borusundan TNF uygulamasının havayolu aşırı duyarlılığına (AHR) ve enflamasyona neden olduğunu ortaya koymaktadır (Reuter ve diğ., 2010).

TSLP, dendritik hücre aktivasyonuna ve Th2 fenotipinin indüklemesine neden olur. Bu nedenle TSLP, Th2 hücre-aracılı adaptif immün yanıtda önemli bir faktördür. İlginç bir şekilde, mast hücreleri TSLP reseptörü eksprese eder ve TSLP'ye maruz kalma Th2 sitokinlerinin ekspresyonuna yol açar (Allakhverdi ve diğ., 2007). Ek olarak, mast hücrelerinde IgE-aracılı aktivasyonun ardından TSLP ekspresyonu olur. Bu olay alerjene maruz kalmadan sonra TSLP üretiminin indüklenmesi için hayati önem taşımaktadır (Reuter ve diğ., 2010).

Mast hücreleri farklı lipit mediatörlerini sentezleyebilmektedir. Prostaglandin D2 (PGD2) bu lipit mediatörlerden biri olarak hava yolu enflamasyonuna ve Th2 kaynaklı sitokin üretimine yol açar. PGD2 sentezini bloke etmek enflamasyonu azaltır. PGD2 tarafından indüklenen etkiler, reseptörlere bağlıdır. Th2 hücreleri üzerinde eksprese edilen ve fonksiyonları henüz tartışmalı olan iki reseptör tanımlanmıştır: pro-enflamatuvar etkileri olan PGD2 reseptörü 1 (DP1) ve PGD2 reseptörü 2 (CRTH2) (Reuter ve diğ., 2010). Bununla birlikte, CRTH2 eksprese eden insan Th2 hücrelerinin, PGD2'ye maruz kaldıklarında sitokin üretimini arttırdıkları gözlenmiştir (Reuter ve diğ., 2010). Bu durum, CRTH2 reseptör blokajının, alerjik astım tedavisi için çekici bir yaklaşım olabileceğini göstermektedir ve bu uygulama klinik çalışmalarda test edilmektedir (Reuter ve diğ., 2010).

2.2.3.2. Tip 2 Yardımcı T Hücreleri

Naif yardımcı T hücreleri, Th1, Th2, Th17 ve düzenleyici T hücreleri (Treg) olmak üzere en az dört ana alt tipe ayrılabilir. Th2 hücrelerinin gelişimi, IL-4'e bağlıdır. Atopik dermatit, alerjik rinit ve astımı olan kişilerin yaygın çevresel alerjenlere karşı duyarlı hale geldikleri ve yüksek düzeyde immünoglobulin E antikorları üretmek için kalıtsal bir yatkınlığa sahip oldukları uzun süredir bilinmektedir (Li ve diğ., 2011). IgE yanıtlarının T hücreleri tarafından nasıl desteklendiği, $CD4^+$ T yardımcı hücrelerinin Thl ve Th2 alt tiplerinin keşfedilmesine kadar iyi anlaşılamamıştır (Li ve diğ., 2011). Alerjik enflamasyon bölgelerinde yüksek düzeyde Th2 sitokinlerinin bulunması, atopik hastalıkların Th2 temelli bir etiyolojisinin olduğunu göstermektedir (Li ve diğ., 2011). Th2 hücreleri, IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi sitokinleri üreterek, hastalığın kilit patofizyolojik özelliklerini başlatır ve sürdürür (Lloyd ve Hessel, 2010).

Hava yollarında bulunan Th2 hücrelerinin sayısı, hastalığın ciddiyeti ile doğrudan ilişkilidir. Astım alevlenmesi sırasında, kandaki ve balgamdaki Th2 ve Th1 hücre sayıları artmaktadır. Astımda Th1 hücrelerinin, Th2 hücrelerinin gelişimini doğrudan engelleyebildikleri, yani bir inhibitör gibi rol oynadıkları düşünülmektedir (Lloyd ve Hessel, 2010; Yang ve diğ., 2013). Bunu destekleyen bir bulgu, farelerde Th1 hücresi ana transkripsiyon faktörü T-bet delesyonunun, kendiliğinden olan hava yolu aşırı duyarlılığına (AHR) ve IL-13'e bağlı eozinofil gelişimine neden olmasıdır (Lloyd ve Hessel, 2010). İnsanda da Th2 hücre sayısı ile astım şiddeti arasındaki korelasyon, Th2 hücrelerinin önemine dikkat çekmektedir. Bununla birlikte, son klinik astım fenotip sınıflandırma analizleri, eozinofilik ve eozinofilik olmayan alt türlerin var olduğunu düşündürmektedir; bu da bazı hastalarda Th2 hücreleri dışındaki mekanizmaların da önemli patolojik roller üstlenebileceğini göstermektedir (Lloyd ve Hessel, 2010).

2.2.3.3. Eozinofiller

Eozinofiller alerji gelişimindeki kilit hücre gruplarından biridir. Eozinofiller kemik iliğinde üretilen diğer beyaz kan hücreleri ile birlikte dolaşan granülositlerdir. Beyaz kan hücrelerinin %1-3'ünü oluştururlar ve kan dolaşımında nispeten düşük düzeylerde bulunurlar (Shamri ve diğ., 2011; Possa ve diğ., 2013). Alerjik astımlı hastalarda dolaşımdaki ve akciğer dokusundaki eozinofil sayısının sıklıkla yüksek görülmesi bu hücrelerin klinik önemine işaret etmektedir (McBrien ve Menzies-Gow, 2017).

Büyük spesifik granüllerin varlığı, eozinofilleri diğer granülositlerden (nötrofiller ve bazofiller) ayıran karakteristik bir özelliktir (Shamri ve diğ., 2011; McBrien ve Menzies-Gow, 2017). Bu granüller bazik proteinler, sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri ve enzimler dahil olmak üzere enflamasyon ve/veya doku hasarını indükleyebilen çok sayıda mediatör içerirler. Baskın olan maddeler proteinlerdir: majör bazik protein (MBP) çekirdekte bulunurken, eozinofil katyonik protein (ECP), eozinofil peroksidaz (EPO) ve eozinofilden türetilmiş nörotoksin (EDN) matriste yer alırlar (Shamri ve diğ., 2011; Rosenberg ve diğ., 2013). Eozinofillerin astımdaki rolü için lipit cisimleri de önemlidirler. Bu cisimlerde üretilen sistein lökotrienleri, prostaglandinler ve tromboksan A2 enflamasyon gelişiminde rol alırlar (Rosenberg ve diğ., 2013). Lipit cisimleri, siklooksijenazlar, 5-lipoksijenaz ve lökotrien C4-sentaz gibi enzimler aracılığı ile araşidonik asit esterleşmesinin ve eikozanoid üretiminin kilit bölgeleridir (McBrien ve Menzies-Gow, 2017).

Eozinofiller hem doğal hem de adaptif bağışıklık yanıtları ve sistemlerinde geniş yüzey molekülleri ve reseptörleri sayesinde rol almaktadır. Eozinofiller tarafından eksprese edilen IL-5 heterodimerik reseptörünün, en önemli sitokin reseptörü olduğu düşünülmektedir. Eozinofiller ayrıca IL-4, IL-13, IL-33, TSLP ve tümör büyüme faktörü beta (TGF-β) dahil olmak üzere diğer birçok sitokinler ve büyüme faktörleri için de reseptörler eksprese ederler (McBrien ve Menzies-Gow, 2017). Antijen hava yolu ile temas ettikten sonra, Th2 hücrelerinden salınan IL-5 ve eotaksin, eozinofillerin kemik iliğinden salınımını uyarır ve onların hava yoluna göçlerine neden olur (Possa ve diğ., 2013). IL-5'in hava yolu aşırı duyarlılığını indüklemek için eozinofilleri uyardığı açıktır, IL-5'e karşı bir antikorun kullanılması aşırı duyarlılığın durmasına yol açar (Possa ve diğ., 2013). Astımda IL-13 de eozinofili ile ilişkilidir. Bu sitokin, IL-5 ve eotaksinin daha fazla üretilmesine ve böylece eozinofillerin seçici olarak uyarılmasına neden olur. IL-5, akciğer boyunca eozinofili ile ilişkilidir; eotaksin ise hava yolları eozinofillerinin dağılımını düzenler (Pope ve diğ., 2001). Eozinofiller, granül içeriklerini yalnızca hedef organa ulaştıklarında serbest bırakırlar. Eozinofiller, büyüme faktörü TGF-β'nın dönüştürülmesi, katyonik proteinlerin salgılanması ve sitokinler gibi eozinofilden türetilmiş aracıların salınması, ayrıca mast hücrelerinin epitelyal hücreler ile etkileşimleri de dahil olmak üzere çeşitli süreçlerle hava yolu yeniden modellenmesine katkıda bulunurlar (Possa ve diğ., 2013). Ayrıca eozinofillerin, T hücrelerinin aracılık ettiği hava yolu aşırı duyarlılığına (AHR) dahil olduğuna dair kanıtlar vardır (Ohtomo ve diğ., 2010).

2.2.3.4. Nötrofiller

Nötrofillerin astım patogenezine katkısı temel olarak alerjik olmayan nötrofilik astım bağlamında incelenmiştir. Bununla birlikte, hızlı bir şekilde toplanabilen nötrofillere alerjik eozinofilik astımlı hastaların hava yollarında rastlanmaktadır (Radermecker ve diğ., 2018). Semptomatik astımlı hastalarda aktive olmuş periferik nötrofil sayısı artar ve semptomların yokluğunda veya tedaviden sonra nötrofillerin sayıları ve aktivasyon düzeyleri azalır. Nötrofillerin kemotaktik aktivitesinin IL-8 ve platelet (trombosit) aktive edici faktör (PAF) tarafından indüklendiği ve astımlı hastalarda sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Monteseirín, 2009). Nötrofiller astım yanıtının erken ve geç fazlarında rol alırlar ve bu fazlarda, metalloproteinazlar, elastaz, laktoferrin gibi arabulucu faktörler salgılarlar (Monteseirín, 2009). Nötrofillerdeki artışın, hava yolu yeniden modellenmesinin buna uygun bir ortam sağlamasından kaynaklanabileceği, ancak gözlemlenen patojeneze aktif olarak katkıda bulunmadıkları bildirilmiştir (Hall ve Agrawal, 2014). Nötrofillerin alerjik astım patogenezine kesin katkısı hala araştırılmaktadır, ancak artan deneysel kanıtlar, nötrofiller veya nötrofil türevli ürünlerin, tip 2 alerjik immün yanıta katkıda bulundukları görüşünü desteklemektedir (Radermecker ve diğ., 2018).

2.2.3.5. Bazofiller

Fare modellerinde, bazofillerin proalerjik Th2 tipi immün yanıtları düzenlemede ve kronik alerjik enflamasyona aracılık etmede önemli bir rol oynadığını gösteren çok sayıda çalışmaya rağmen, insanlar için bu hücrelerin alerjideki rolü hala tartışmalıdır. Bu durum, bazofil morfolojisindeki önemli farklılıklar ve çeşitli hücre yüzey reseptörlerinin ekspresyonu ve indüksiyonundan sonra ortaya çıkan farklı sonuçlardan kaynaklanmaktadır (Korosec ve diğ., 2018). Bazofiller, mast hücrelerine benzer birçok özelliğe sahiptir. IgE aracılı alerjik reaksiyonlar, ağırlıklı olarak mast hücreleri ve bazofiller üzerindeki yüksek afiniteli IgE reseptörü (FceRI) yoluyla efektör hücrelerin aktivasyonunu içerir. Bu hücreler, reseptörlerin çapraz bağlanmasına ve daha sonra granüllerin ekzositozuna neden olan IgE'ye bağlanmış çok değerlikli (multivalent) bir antijen tarafından aktive edilir (Hall ve Agrawal, 2014). Bazofillerden salınan önceden oluşturulmuş ana aracı histamindir ve aktivasyondan sonra belli lökotrienler (LTC4, LTD4 ve LTE4) hızlı bir şekilde sentezlenir. Bazofiller, alerjik hava yolu enflamasyonunun ilerlemesine katkıda bulunur. Bu hücreler, Th2 hücre farklılaşmasına ve çoğalmasına katkıda bulunan IL-4'ü üretirler. Bazofillerin antijen sunan hücreler olarak işlev görme kapasitesine de sahip oldukları bulunmuştur (Hall ve Agrawal, 2014). Son

çalışmalar, bazofillerin, lenf düğümlerine hareket etme kabiliyetinin bulunduğunu ve T hücrelerine antijen sunabildiğini ve böylece Th2 polarizasyonunu daha da arttırdıklarını ortaya koymaktadır (Hall ve Agrawal, 2014).

2.2.3.6. B Lenfositleri

B lenfosit hücreleri çok sayıda ve sürekli değişen patojenlere karşı savunma yeteneğiyle ve immünoglobulin repertuarlarındaki benzersiz çeşitlilik ile tanımlanır. B hücreleri antijenle karşılaştıktan sonra, immünoglobulin repertuarlarını sınıf değişim rekombinasyonu (CSR/ "class-switch recombination") aracılığı ile geliştirir ve böylece antijenik spesifikliğini kayıp etmeyip, işlevini çeşitlendiren antikor alt sınıflarını oluşturur (Gould ve Wu, 2018). Alerjene karşı spesifik IgE sentezi için, B lenfositlerinin T-hücre kaynaklı sitokinlere (IL-4 ve IL-13) ihtiyacı vardır (Larché ve diğ., 2003). Alerjik olmayan kişilerde IgE, beş antikor izotipinden (IgM, IgD, IgG, IgA ve IgE) serumdaki en düşük düzeyi olanıdır. Çok değişken olmakla birlikte, alerjik bireylerde B hücreleri ortalamadan en fazla üç kat daha fazla IgE üretirler (Gould ve Wu, 2018). B-hücresi aktivasyon faktörü (BAFF), TNF ailesinin bir üyesidir; olgun B-lenfositlerinin oluşumunda ve devamlılığında rol oynar (Hall ve Agrawal, 2014). Astımdaki rolü hala tam belirgin değildir ve bugüne kadarki çalışmalar çelişkili sonuçlar vermiştir. Bu çelişkili bulgulara rağmen, BAFF düzeylerinin, astımlı hastaların serum ve bronkoalveoler lavaj sıvısında normal bireylere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlara dayanarak, antijen kaynaklı BAFF üretiminin, B hücrelerinde sınıf geçişi rekombinasyonuna ve immünoglobulin sentezine katkıda bulunabileceği rapor edilmiştir (Hall ve Agrawal, 2014).

2.2.3.7. Doğal Lenfoid Hücreler

Doğal lenfoid hücreler (ILC'ler) astım patogenezinde ortaya çıkan aracı mediatörlerdir. Bu hücreler sitokine bağımlı doğuştan bağışıklık yanıtı, enflamasyon, doku yeniden modellenmesi ve doku onarımının teşvikinde rol alırlar. Genel olarak üç ILC grubu vardır: T-bet transkripsiyon faktörünü eksprese eden ve Thl hücreleri gibi IFN-ɣ ve IL-12 salgılayan ILC1; GATA-3 transkripsiyon faktörünü eksprese eden ve Th2 hücreleri gibi IL-5, IL-9 ve IL-13'ü üreten ILC2; Retinoik asit-ilişkili yetim reseptör gamma (RORɣt) transkripsiyon faktörünü eksprese eden ve IL-17 ve IL-22'yi üreten ILC3. Bu hücreler antijene özgü reseptörleri eksprese etmemelerine rağmen, IL-33 ve/veya IL-25 tarafından aktivasyondan sonra Th2 sitokinlerini serbest bırakma yeteneğine sahiptirler. Araştırmalar, ILC2'nin alerjen

maruziyetinden sonra akciğerlere göç ettiğini ve başlıca IL-13 kaynağı olduğunu göstermiştir. ILC2'lerin de adaptif yanıtları etkilemede rol oynadığı öne sürülmüştür, ancak bu süreçte yer alan mekanizmalar henüz aydınlatılamamıştır. Bu hücreler üzerinde yapılacak araştırmalarla mekanizmaların ve tedavi için potansiyel hedeflerin daha iyi anlaşılması mümkün olabilecektir (Hall ve Agrawal, 2014).

2.2.3.8. Dentritik Hücreler

Dendritik hücreler hava yolu epitelinde bulunurlar ve akciğerlerin maruz kaldığı antijenleri sürekli olarak tararlar. Profesyonel antijen sunan hücreler (APC'ler) olarak, işlenmiş antijenleri T hücrelerine sunmak için lenf düğümlerine göç ederler. Dendritik hücrelerin astımdaki rolü, fare ve insan deneklerinde yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Çalışmalar, ovalbümin ile duyarlılaştırılmış farelerde alerjen uyarımının ardından hava yolunda dendritik hücrelerde bir artış olduğunu göstermektedir. Bu hücrelerin, lökositlerin hava yollarına göçü ve aktivasyonu için önemli oldukları ispatlanmıştır (Hall ve Agrawal, 2014). Astımlı hastaların periferik kan ve balgam analizi, alerjenle karşılaşma sonrası miyeloid dendritik hücrelerde artış olduğunu göstermiştir. Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar dendritik hücrelerin antijen sunumunda, Th2 polarizasyonunda ve ardından hava yolu enflamasyonunda rol oynadığını göstermektedir (Hall ve Agrawal, 2014).

2.2.4. Alerjide İmmünolojik Tolerans

Organizmayı kendi antijenlerinin ve çevresel zararsız antijenlerin tetiklediği abartılı immün yanıtlara karşı korumak için bağışıklık sisteminin sıkı kontrolü gerekir. Antijenin doğasına bağlı olarak, bağışıklık sistemini düzenleyen mekanizmalardaki bir dengesizlik, genetik yatkınlığı olan bireylerde otoimmün hastalıklara veya alerjik hastalıklara neden olabilir (Calzada ve diğ., 2018). Periferik T hücrelerinde immün toleransın indüklenmesi, immün yanıtların kontrolü için anahtar bir basamağı temsil eder. Bu toleransın kırılmasını açıklayan ilk hipotez, Th1 ve Th2 lenfositlerinin ikiye ayrılmalarına (“dichotomy”) dayanmaktadır. İkinci hipotez (hijyen hipotezi), erken çocukluk çağında bulaşıcı ajanlara ve parazitlere maruz kalmanın azalmasına dayanır. Bu hipoteze göre, bağışıklık sisteminin doğru gelişimi ve baskılanması mikroorganizmalara maruz kalmanın azalmasından etkilenebilir (Calzada ve diğ., 2018).

Periferik T hücreleri toleransının bağışıklık sisteminin düzenlemesinde rol aldığına dair birkaç kanıt vardır. Bu düzenleme, antijen ile temas halinde olan hücrelerin fonksiyonel olarak etkisizleştirilmeleri ve hem proliferatif yanıt hem de sitokin salgılamalarının ortadan kaldırılması ile karakterize edilir. İmmünosupresif (immün baskılayıcı) fonksiyonu olan T hücresi alt tipleri geniş çapta çalışılmıştır ve bu hücreler düzenleyici T hücreleri (Treg'ler) olarak adlandırılmıştır (Calzada ve diğ., 2018). Treg hücreleri ve bu hücrelerden salgılanan interlökin-35 (IL-35) aşağıdaki bölümlerde detaylı olarak ele alınmıştır.

2.2.4.1. Treg Hücrelerinin İmmün Baskılamadaki Rolü

Treg hücreleri, $CD4^+$ $CD25^+$ yüksek FOXP3 transkripsiyon faktörü ekspresyonu ve immün yanıtları baskılayabilme özelliği ile tanımlanan bir $CD4^+$ T hücre soyunu oluşturur (Cuadrado ve diğ., 2018). Farklı tip Treg hücreleri tanımlanmıştır. Bu hücreler işlev ve fenotip, doku lokalizasyonu, ortaya çıktıkları hastalık evresi, aktivasyon ve farklılaşma durumları gibi değişik özelliklerine göre sınıflandırılır, hastalıkta ve sağlıkta farklı roller oynayabilirler. Bu nedenlerle de geniş çapta çalışılmakta ve farklı hastalıklarda umut verici potansiyel terapötik araçlar olarak ele alınmaktadırlar (Calazda ve diğ., 2018).

Treg hücreleri, immün toleransı korur, immün hücre kaynaklı doku hasarını tanır ve doku onarımını teşvik ederler. Treg'ler, immünosupresif moleküllerin ekspresyonunu arttırarak ve hücrelerin enflamasyonlu dokuya göçünü önleyerek enflamasyonu bastırırlar. Ayrıca kanser hücrelerine karşı geliştirilen bağışıkl yanıtını engellerler (Cuadrado ve diğ., 2018; Calazda ve diğ., 2018). Yetersiz Treg hücre işlevi, otoimmün ve alerjik hastalıkların altında yatan nedenlerden biri olabilir (Cuadrado ve diğ., 2018; Calazda ve diğ., 2018).

Treg hücreleri, enflamatuvar sitokinlere maruz kalsalar bile, IL-2, IL-4, IL-17 ve IFN-γ gibi sitokinleri genellikle üretmezler; bununla birlikte, baskılama işlevini arttırabilen enflamatuvar sinyallere cevap verirler (Josefowicz ve diğ., 2012).

Farklı Treg tipleri tanımlanmıştır. Treg'ler kökenlerine göre iki ana kategoriye ayrılır: öz (self) antijenlere karşı toleransı sağlayan timik kökenli natürel Treg'ler (nTregs) ve antijenlere maruz kaldıktan sonra $CD4^+$ T hücrelerinden türetilen periferik veya indüklenmiş Treg'ler (iTregs) (Min, 2017). İndüklemiş düzenleyici T hücrelerinin (iTreg'ler, ayrıca periferik düzenleyici T hücreleri olarak da bilinir), mikrobiyal antijenlere veya çevresel alerjenlere karşı, özellikle enflamasyon sırasında mide, bağırsak kanalı ve akciğerlerdeki sayıları artar

(Rivas ve Chatila, 2016). Akciğer dokularında, yerleşik makrofajlardan salgılanan TGF-β ve retinoik asit, naif $CD4^+$ T hücrelerinin iTreg hücrelerine dönüşümünü indükleyen ana faktörlerdir (Rivas ve Chatila, 2016). Bu Treg alt kümelerinin her ikisi de periferik toleransın korunmasında anahtar bir işlev görürler, ancak örtüşmeyen T hücresi reseptörleri (TCR) nedeniyle, bunların etkileri farklı antijenlere yöneliktir. Şu anda, her bir tip Treg için özel bir belirteç bulunmamakla birlikte, her iki tür de forkhead box protein 3'ü (FOXP3) eksprese ederler. Esasen FOXP3, Treg gelişim ve fonksiyonu için ana anahtar olarak önerilmiştir (Calzada ve diğ., 2018; Min, 2017). *FOXP3* genindeki mutasyonlar veya FOXP3 ekspresyonundaki kusurlar, kontrolsüz bağışıklık aktivasyonu ile sonuçlanarak sistemik otoimmün enflamasyon ve erken ölüm ile sonuçlanabilir (Min, 2017).

Treg, baskılama aktivitesini çeşitli moleküller (IL-10, IL-35 ve TGF gibi düzenleyici sitokinler) üreterek gösterir. Treg'ler Th hücrelerinin gelişimini de inhibe edebilir: Treg'ler, IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13 gibi enflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını azaltarak Th2 hücrelerinin aktivasyonunu baskılar; Th1 hücrelerinden INF-ɣ sekresyonunu baskılar, Th17 ve Th22 hücre yanıtlarını sırasıyla IL-17 ve IL-22 üretimini baskılıyarak inhibe eder (Calzada ve diğ., 2018).

Treg'in yeni bir baskılama mekanizması olarak görülen mikroRNA'lar (miRNA'lar), immün tepkinin önemli düzenleyicileri olarak ortaya çıkan, kodlayıcı olmayan kısa RNA molekülleridir. miRNA'lar Treg gelişimi ve fonksiyonunda görev alırlar; miR-155, miR-15b/16, miR-24 ve miR-29a, Treg farklılaşması ve korunmasında önemli oyuncular olarak tanımlanmıştır (Calzada ve diğ., 2018).

Treg hücre popülasyonları arasında, $FOXP3^+$ iTreg hücreleri, ince ve kalın bağırsaklar ile akciğer solunum mukozası dahil olmak üzere çevresel arayüzlerde toleransın korunmasında önemli bir rol oynarlar (Rivas ve Chatila, 2016). Alerjene özgü iTreg hücreleri, enflamasyon şiddetini ve Th2 hücresi bağışıklık yanıtını kontrol etmede (IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13'ü azaltarak) rol oynarlar (Curotto ve diğ., 2008). Buna göre, alerjik reaksiyonların gelişimi genetik olarak alerjiye yatkın kişilerde iTreg'lerin azalmış indüksiyonu veya bozulmuş fonksiyonundan kaynaklanabilir. Treg hücreleri, immünosupresif fonksiyonlarını, doğal immün hücreler de dahil olmak üzere çok çeşitli hücre tipleri üzerinde gösterebilir. Deneysel kanıtlar, Treg hücrelerinin doğrudan mast hücrelerine etki ederek ve degranülasyonlarını bloke ederek aşırı duyarlılık tepkisini kontrol ettiğini göstermektedir (Rivas ve Chatila, 2016).

Bazı araştırmalar Treg hücrelerinin IgE aracılı mukozal mast hücresi degranülasyonunu modüle ettiğini ve mast hücresi efektör aracılarının salınımını OX40-OX40 ligand bağlı bir mekanizma aracılığıyla azalttığını göstermiştir (Gri ve diğ., 2008). OX40 (CD134) ve ligandı OX40L (CD252), TNFR/TNF süper ailesinin üyeleridir ve aktifleştirilmiş CD4 ve CD8 T hücrelerinin yanı sıra bir dizi başka lenfoid ve lenfoid olmayan hücre üzerinde eksprese edilirler (Croft ve diğ., 2009). Treg hücreleri üzerinde eksprese edilen OX40 ile mast hücreleri üzerindeki OX40 ligandı arasında doğrudan hücre-hücre etkileşimi, mast hücrelerinde hücre içi siklik AMP düzeyinin artmasına yol açar ve hücre içine Ca^{+2} girişinin azalmasıyla sonuçlanır (Gri ve diğ., 2008).

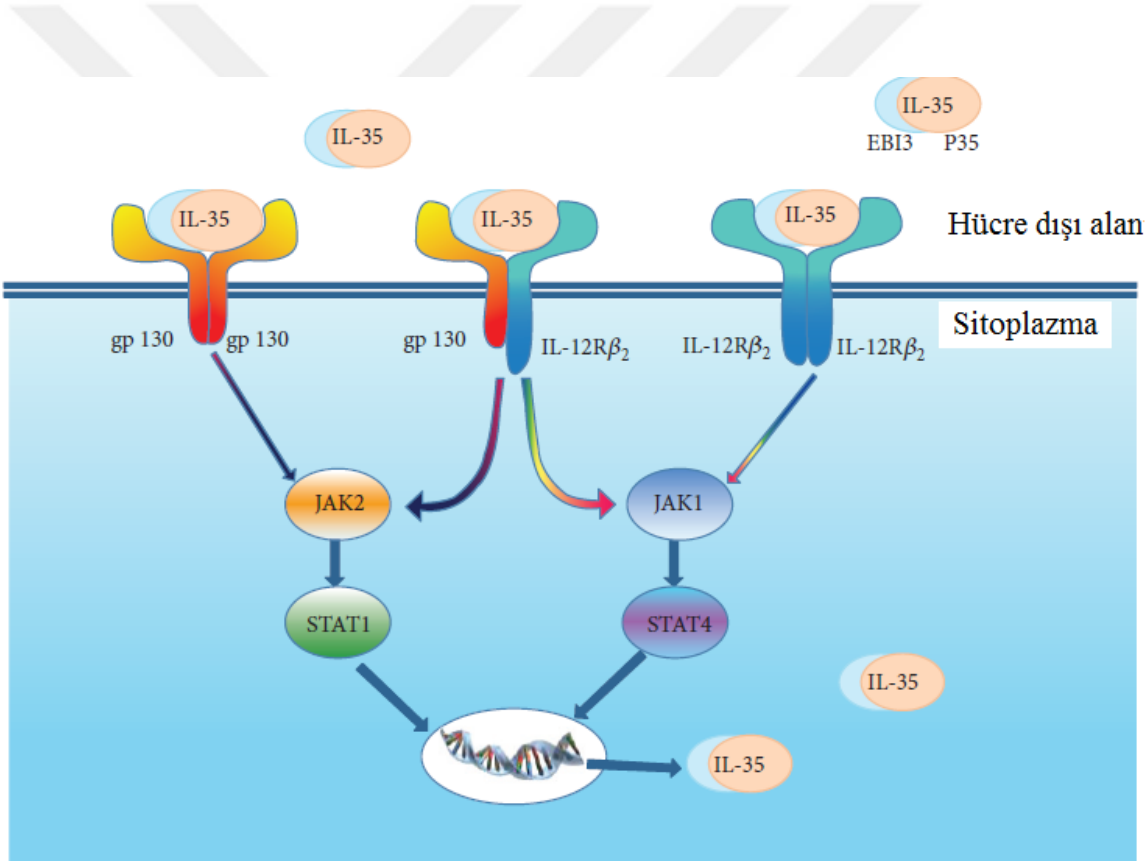
Bağışıklık yanıtı, Th hücrelerinin polarizasyonuna bağlıdır; B hücreleri tarafından sınıf değiştirme ve IgE üretimi için gereken sinyaller Th2 hücre sitokinleri IL-4 ve IL-13 salımı ve CD40-CD40 ligand etkileşimleridir (Lim ve diğ., 2005). CD40 (farklılaşma kümesi 40) antijen sunan hücrelerde aktivasyonda rol oynayan bir proteindir ve $CD4^+$ T hücresi üzerinde bulunan ligandına (CD40L) bağlanması, B hücrelerinin büyümesine ve antikor üretmesine neden olur (Kawabe ve diğ., 2011). Sağlıklı kişilerde *in vitro* periferik alerjene özgü Treg hücreleri, IgG_4'leri indükleyerek B hücresinde IgE üretimini bastırır. Treg hücreleri tarafından B-hücresi baskılanmasının, hücre-hücre teması aracılığıyla yapıldığı düşünülmektedir ve muhtemelen CTLA-4 ve TGF-β1 yoluyla gerçekleşmektedir (Lim ve diğ., 2005).

2.2.4.2. İnterlökin-35'in İmmün Yanıt Baskılamadaki Rolü

İnterlökin-35 (IL-35), IL-12 sitokin ailesinin bir üyesidir ve ilk olarak yaklaşık yirmi yıl önce Epstein-Barr ile indüklenen gen 3 (*EBI3*) ve IL-12p35 alt birimleri tarafından oluşturulan bir heterodimer olarak tanımlanmıştır (Gao ve diğ., 2017b). IL-35, monositler, T hücreleri, B hücreleri, Treg'ler ve tümör hücreleri dahil olmak üzere çok çeşitli hücre tipleri ve dokular tarafından üretilir (Niedbala ve diğ., 2007).

İnsan plasentasının trofoblast bileşeninde bulunduğu keşfedildikten sonra önemli bir immünoregülatör olduğu ileri sürülmüştür (Gao ve diğ., 2017b). IL-35, TGF-β veya IL-10 tarafından indüklenen diğer Treg'lerden belirgin bir şekilde farklı olan ve IL-35 üreten düzenleyici T hücreleri sınıfının oluşumunu indükler. Bu hücrelere IL-35 üreten iTregs (iTr35 hücreleri) adı verilmektedir. iTr35 hücreleri tarafından salgılanan IL-35 daha fazla iTr35 hücresinin üretimine neden olur ve böylece IL-35 ve iTr35 hücreleri birlikte pozitif bir feedback oluşturur (Gao ve diğ., 2017b).

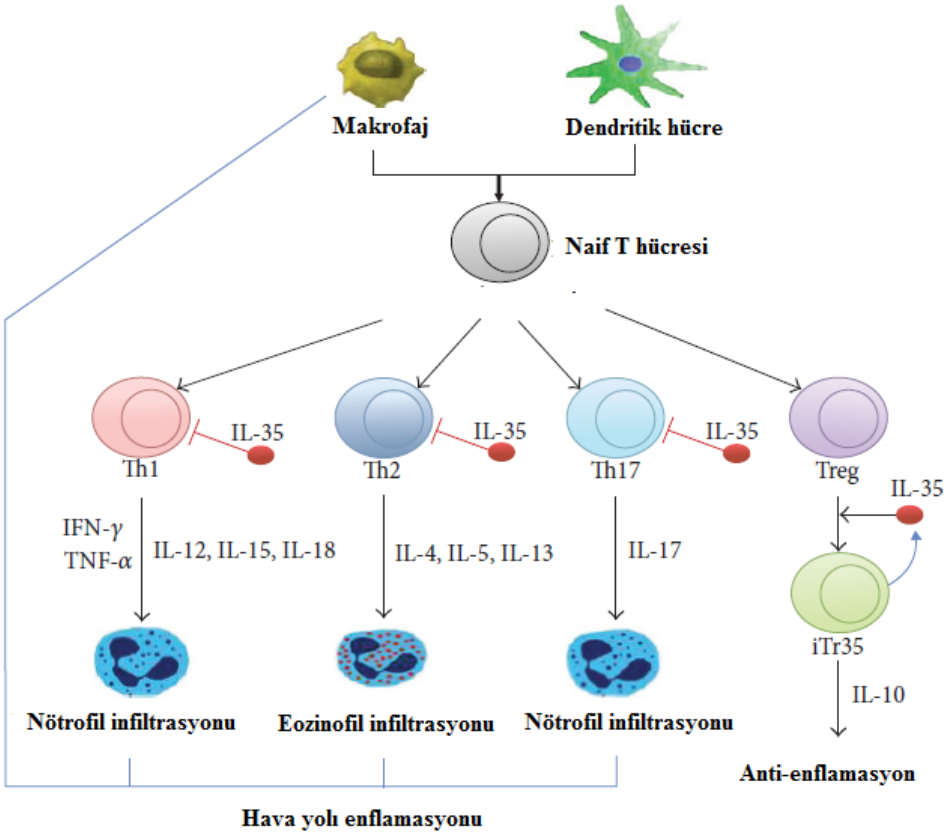
Hücre yüzeyindeki IL-35 reseptörleri, IL-12Rβ$_2$ veya gp130'un homodimerleri veya IL-12Rβ$_2$: gp130 heterodimerleri olabilir. IL-35'in reseptörlerine bağlanması, JAK-STAT sinyal yolunun aktivasyonuna yol açar ve böylece naif T hücrelerinin iTr35 hücrelerine dönüşümünü indükler. Heterodimerik IL-12Rβ$_2$: gp130 reseptörü, maksimum etkilerin elde edilmesi için gereklidir (Şekil 2.5). Birçok farklı hücre tipinde gp130 alt birimi yaygın şekilde eksprese edilirken, IL-12Rβ$_2$ alt birimi temel olarak Th1 ve doğal öldürücü (NK) hücrelerde bulunur. Uyarılmamış T hücrelerinin çoğunda, IL-12Rβ$_2$ neredeyse hiç yoktur. Bununla birlikte, IL-2, IL-12, IL-27, IFNγ ve TNF'ye maruz kalma, IL-12Rβ$_2$ ekspresyonunu hızla arttırabilir (Gao ve diğ., 2017b).



Şekil 2.3: JAK-STAT sinyal yolunun IL-35 ile aktivasyonu (Gao ve diğ., 2017b).

IL-35 farklı astım fenotiplerinin patogenezinde rol oynayabilir. Treg'ler, enflamatuvar tepkileri kontrol altında tutmak için Thl, Th2 ve Th17 efektör tepkilerini baskılayan IL-35'i salgılayabilir (Şekil 2.4). Problemli Treg ve IL-35 üretimi, hem Th2 hem de Th1 aracılı enflamatuvar hastalıkların patogenezi ile ilişkilidir (Gao ve diğ., 2017b). Bugüne kadar birçok

araştırma bazı enflamatuvar ve otoimmün hastalıkların patogenezinde IL-35'in rol oynadığını ortaya koymuştur (Collison ve diğ., 2010; Kochetkova ve diğ., 2010; Bettini ve diğ., 2012; Liu ve diğ., 2012). Deneysel astım modellerinde yapılan güncel çalışmalar, IL-35'in hava yolu enflamasyonu ve hava yolu aşırı duyarlılığını (AHR) baskılayabildiğini göstermektedir (Wang ve diğ., 2015a). Teorik öngörüler ve bazı ön verilere rağmen, IL-35'in astımdaki rolü tam olarak belirlenememiştir ve araştırmalar halen devam etmektedir.



Şekil 2.4: Astımda IL-35'in işlevi. Siyah oklar pozitif etkileri ve T şeklindeki kırmızı çizgiler negatif etkileri gösterir (Pope ve Shahrara, 2013).

2.2.5. Alerjik Astımın Patofizyoloji ve Etiyolojisi

Alerjen denilen çevresel proteinlere maruz kalmak alerjik astım semptomlarını ortaya çıkarır (Ali, 2011). Geçtiğimiz 30 yıl boyunca, alerjen kaynaklı hava yolu enflamasyonunun patogenezi hakkında oldukça detaylı bilgilere ulaşılmıştır. Ayrıca, moleküler genetikteki gelişmeler ve hayvan modellerinin kullanımı, bu karmaşık hastalığın çeşitli yönlerine ilişkin

mekanizmaların anlaşılmasını sağlamıştır. Bu alandaki ilerlemelerin astım patogenezi konusunda yeni gelişmelere yol açması beklenmektedir.

Havadaki alerjenler, atopik astım reaksiyonuna neden olabilecek en yaygın çevresel faktörlerdir. Dünyada mevsimsel astımın ana nedeni, özellikle çok yıllık çavdar ve Timothy çimi gibi otların polenleridir. İlkbahardaki semptomlar genellikle ağaç polenlerinden kaynaklanırken, yaz ve sonbaharın sonunda yabani ot polenleri ve küf sporlarından kaynaklanır (Ali, 2011). Baskın iç mekan alerjenleri ev tozu akarları, kediler, köpekler ve hamamböcekleri kaynaklıdır. Kuş tüyleri (yastıklarda) de alerjiye neden olabilir, ancak testler hastaların daha çok ev tozu akarına alerjik olduğunu göstermektedir (Ali, 2011). Ayrıca duyarlı kişilerde mesleki ve çevresel faktörler astımı tetikleyebilir. Bu nedenle, gen-çevre etkileşimleri üzerine yapılan çalışmalar, alerjik astımın karmaşık mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir. Örneğin, Toll-benzeri reseptör 4 (TLR4) ve CD14 gibi reseptörlerin, bakteriyel endotoksin ve liposakkaritleri tanıdığı ve temizlediği bilinmektedir. Bu reseptörlerin genlerindeki tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), astım gelişimiyle ilişkili olabilir. CD14, TLR4 ve diğer Toll-benzeri reseptör (TLR) genlerindeki SNP'lerin atopik bireylerde astım duyarlılığı riskini arttırdığı ileri sürülmektedir (Smit ve diğ., 2009).

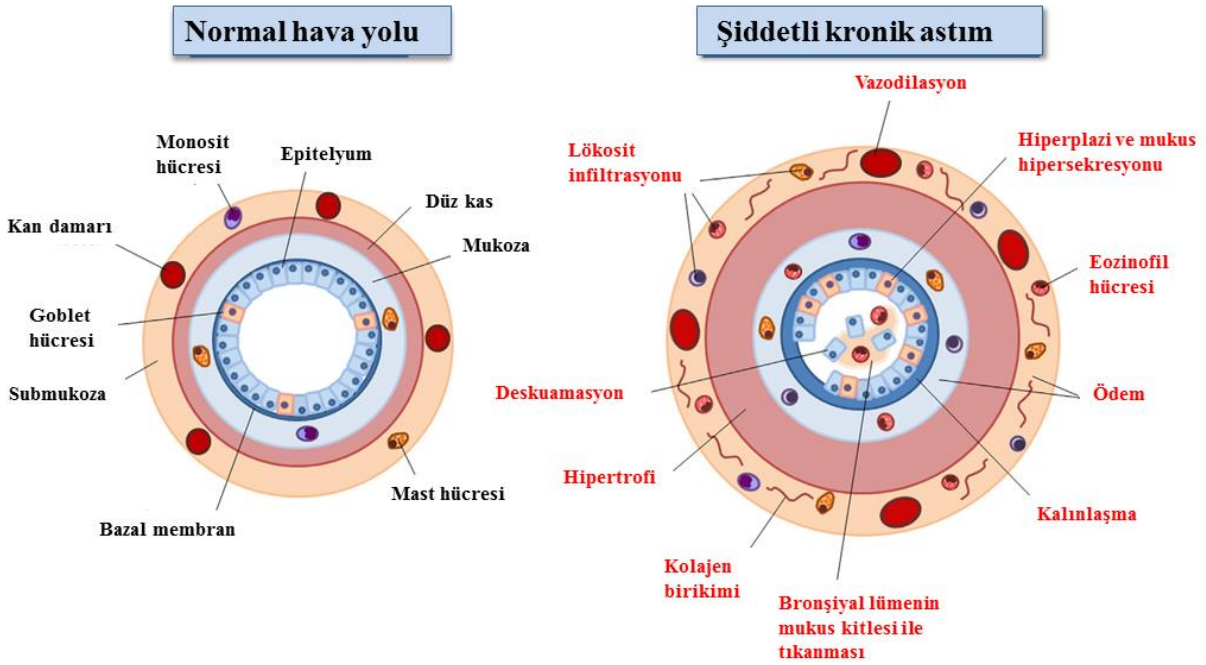
Günümüzde Batı ülkelerinde ve gelişmekte olan ülkelerde enfeksiyon sayısında azalma olduğu, buna karşın hem otoimmün hem de alerjik hastalıkların görülme sıklığının arttığı görülmektedir. Bu tür hastalıkların artış nedeni bir dereceye kadar, yaşam biçimindeki değişim ve bunun sonucunda meydana gelen mikrobiyota değişiklikleri olabilir. Diğer bir önemli konu, modern diyetin, yüksek düzeyde yağ ve düşük lif içeriğine dayanmasıdır; bu olay, bağırsakta bulunan mikrobiyom bileşimini etkilemektedir. İlginç bir şekilde, birçok araştırma astım hastaları için, sağlıklı ve doğal bir çevrede yaşamanın (örneğin, özellikle süt çiftlikleri yakınında) önemini vurgulamaktadır. Bunun nedeni muhtemelen bağışıklık sisteminin genel reaktivitesini azaltan bakteri bileşenleri içeren bir havanın solunmasıdır (Frati ve diğ., 2018).

2.2.6. Astımın Klinik Belirtileri ve Semptomları

Hem erişkin hem de çocuk popülasyonlarında tespit edilen en belirgin astım semptomları göğüste sıkışma, hışıltı, öksürük ve nefes darlığıdır (Globe ve diğ., 2015). Astımın klinik özelliklerinden sorumlu olan üç ana süreç iyi bilinmektedir: bronş daralması, mukus

hipersekresyonu ve hava yolu enflamasyonu. Bu süreçlerin patofizyolojilerinin altında farklı hücre tipleri ve bunlar tarafından salınan sitokinler rol almaktadır. Ayrıca, her bir hücresel ve hücre-altı bileşenin etkinliği ve klinik sonuçları, bireyler arasında büyük farklılıklar gösterir ve zaman içerisinde değişebilir. Ayrıca ilaç tedavisi, çevresel koşullar ve yaşam tarzı astım semptomlarını farklı şekillerde etkiler (McBrien ve Menzies-Gow, 2017).

Hava yolunun yeniden şekillenmesi, hava yolunda hücresel ve yapısal değişimleri kapsar (Fehrenbach ve diğ., 2017; Possa ve diğ., 2013). Bu değişimler sonucunda hava yolu duvarları kalınlaşır ve hava yolu daralır (Şekil 2.5). Bu yapısal değişimler tıkanmalara ve uzun süreli akciğer fonksiyon kaybına yol açar. Esas olarak kalıcı enflamasyon, yanıt olarak ortaya çıkan onarım işlemlerinden kaynaklanır ve solunum yolu disfonksiyonu ve alerjik astımda gözlenen klinik semptomlara neden olur. Başlıca yapısal değişiklikler arasında, subepitelyal fibröz, düz kas hipertrofisi/hiperplazisi, epitel hücre mukus metaplazisi ve artmış anjiyogenez sayılabilir (Possa ve diğ., 2013).



Şekil 2.5: Normal hava yolu ile şiddetli kronik astımdaki hava yolunun karşılaştırılması (Shaw ve diğ., 2014).

2.2.7. Alerjik Astımın Tanısı

Astım tanısı medikal özgeçmiş ve aile öyküsü, fizik muayene ve akciğer fonksiyonunun objektif değerlendirilmesini (tercihen, bronkodilatörden önce ve sonra spirometri ile) kapsar. Astım semptomlarının varlığına rağmen akciğer fonksiyonu ölçümleri normal olduğunda bronş provokasyon testi hava yolu daralmasını gösterebilir ve astım tanısını destekler (Quirt ve diğ., 2018). Fiziksel muayenede nefes darlığı, hışırtılı solunum, öksürük, balgam çıkarma şikayetleri gözlenebilir. Astım semptomlarının değişkenliği göz önüne alındığında, sadece fiziksel muayene astım teşhisi için yetmez. Bu nedenle steteskop ile dinlemeye ek olarak spirometre gibi solunum fonksiyon testleri kullanılmalıdır (Quirt ve diğ., 2018). Akciğerlere giren ve çıkan hava hacminin istirahatte, zorlu nefes alıp verme esnasında ve egzersizde ölçülmesine dayanan solunum fonksiyon testlerinde düşündürücü değişiklikler ve karakteristik semptomlar varsa astım tanısı koyulabilir (Quirt ve diğ., 2018).

Alerjik astıma neden olan alerjen biliniyorsa, çoğu durumda daha fazla teste ihtiyaç duyulmadan, sadece dikkatli bir klinik öykü ile tanı koyulabilir (Ali, 2011). Ailede astım öyküsü veya diğer atopik hastalıklar ve/veya kişisel atopik bozukluk (özellikle alerjik rinit)

öyküsü, astımlı hastaların tanısını destekleyen durumlardır (Quirt ve diğ., 2018). Bununla birlikte, deri prick testi veya eşdeğeri kan testleri (alerjene özgü IgE belirlenmesi), alerjik astım tanısını güçlendirebilir (Ali, 2011). Deri testi çevresel alerji tetikleyicilerini belirlemek için önerilmektedir ve hastanın astım fenotipinin tanımlanmasına yardımcı olur. Deri testinde şüpheli alerjenlerin (tipik olarak hastanın yaşadığı coğrafi bölgeyle ilgili alerjenler) ekstraktları deride oluşturulan bir delik üzerine uygulanır. Alternatif olarak, alerjenlere karşı spesifik IgE'lerin serum düzeyleri ELISA testiyle belirlenir (Ali, 2011).

2.2.8. Alerjik Astımın Tedavisi

Astım yönetiminin temel amacı, alevlenmeleri önlemek, morbidite ve mortalite riskini azaltmak için hastalığın kontrolünü sağlamaktır. Terapinin diğer amaçları, astım semptomlarının sıklığını ve ciddiyetini en aza indirgemek, rahatlatıcı ilaçlara olan ihtiyacı azaltmak, fiziksel aktiviteyi normalleştirmek ve akciğer fonksiyonunun yanı sıra genel yaşam kalitesini iyileştirmektir (Quirt ve diğ., 2018). Astım tedavisi için yaygın ve geleneksel yöntem inhale kortikosteroidler ve sistemik kortikosteroidler gibi farmakolojik ajanların kullanımıdır (Quirt ve diğ., 2018). Bununla birlikte, bazı hastalar geleneksel tedaviye dirençli olabilirler ve immünolojik tedaviye ihtiyaç duyabilirler. Spesifik immünoterapi (tam alerjen immünoterapi veya duyarsızlaştırma), hem immünolojik hem de klinik toleransı indüklemek için alerji kliniklerinde uygulanan bir tedavi yöntemdir (Ali, 2011).

Omalizumab, şiddetli atopik astım için ilave tedavi olarak kullanılan rekombinant insanlaştırılmış bir monoklonal antikordur. Dolaşımdaki IgE ile kompleksler oluşturarak çalışır; serbest IgE'nin IgE reseptörleri (FceRI ve FceRII) ile etkileşime girmesini önler. Böylece IgE'nin mast hücreleri ve bazofiller ile etkileşimini bloke eder ve ayrıca IgE'nin alerjen yakalamasını ve odaklanmasını içeren diğer yolları inhibe eder (Holgate ve diğ., 2005; Kopp, 2011; Ali, 2011).

Özel olarak eozinofilik astımın tedavisi için önerilen en yeni yaklaşım, IL-5 antagonistleri ile eozinofillerin hedef alınmasıdır. IL-5, olgun eozinofiller için önemli bir hayatta kalma (devamlılık) ve aktivasyon faktörüdür. Bu nedenle, IL-5'i hedeflemek, astım için geliştirilen biyoterapötikler için çekici bir yaklaşım olmuştur (Borish, 2016). Tedavide IL-5 antagonistinin yanı sıra IL-13 ve IL-4 gibi interlökinlerin antagonistleri de uygulanabilir. IL-4 ve IL-13'ün IgE izotip anahtarını yönlendirmedeki temel rolü göz önüne alındığında, bu

antagonistler alerjenle alevlenen astımlı hastalarda iyi bir tedavi seçeneği sunabilir (Borish, 2016).

2.3. ASTIM ve GENETİK YATKINLIK

1860 yılında Henry Hyde Salter, "Astım Üzerine: Patolojisi ve Tedavisi" adlı yazısında astım için şöyle yazdı, "Astım kalıtsal mı? Sanırım olduğundan şüphe edilemez" (Holloway ve diğ., 2010). Bundan sonra pek çok çalışma, astım ve diğer alerjik hastalıklara karşı duyarlılığın kalıtsal bir bileşeni olduğunu kesin olarak göstermiştir (Mukherjee ve Zhang, 2011). Atopik bireylerin, polen, antibiyotik ve parfüm gibi maddelere aşırı duyarlılık geliştirmeye genetik olarak yatkın oldukları düşünülmektedir. Sayısız araştırma, atopinin ailevi olduğunu göstermiştir. İlk çalışmalar, etkilenen bireylerin birinci derece akrabalarında alerjik hastalık bulunduğunu ortaya koymuştur (Sibbald ve diğ., 1980). Daha sonra, monozigotik ve dizigotik ikizlerle yapılan çalışmalar, monozigotik ikizlerde total serum IgE düzeyleri, akciğerlerde metakolin duyarlılığı ve deri testinde pozitifliğin, dizigotik ikizlere göre 2 kat daha yüksek olduğunu göstermiştir (Mukherjee ve Zhang, 2011; Thomsen, 2015). Ayrıca, astımlı ebeveynlerin çocuklarında astım gelişme olasılığı atopi öyküsü olmayan ebeveynlerin çocuklarına göre daha yüksektir (Thomsen, 2015).

İnsan ve hayvan popülasyonlarında alerjik hastalıklar üzerine yapılan genetik çalışmalar, duyarlılık genlerinin (örneğin, sınıf MHCII, FcεRIβ, CCL5, IL-4 reseptörü α, β-adrenerjik reseptör, T hücresi α reseptörünü kodlayan genler) tanımlanmasını kolaylaştırmıştır (Mukherjee ve Zhang, 2011). İnsanda atopi genlerinin 5, 6 ve 11 no.lu kromozomlar üzerinde bulunduğu gösterilmiştir (Thomsen, 2015). Son on yılda, astım genetiği ile ilgili çalışmalarda önemli gelişmeler kaydedilmiş ve astım/atopi ile ilişkili gen/veya gen lokusu sayısı giderek artmıştır. Bununla birlikte, bu genlerin birçoğunun sadece hastalık üzerindeki orta düzey etkileri araştırılmıştır ve bu etkilerin farklı popülasyonlardaki durumları çoğu zaman sistematik olarak test edilmemiştir (Thomsen, 2015).

Astıma bir gendeki tek bir mutasyon neden olmaz ve bu nedenle hastalığın nesiller boyunca geçişi Huntington hastalığı (otozomal dominant) veya orak hücreli anemi hastalığı (otozomal resesif) gibi klasik monogenik hastalıkların tipik basit Mendel kalıtımını takip etmez (Thomsen, 2015). Hastalığın genetik temelinde birkaç genin birbirleriyle etkileşime girmesi

ve çevresel faktörlerden etkilenmesi yatar (Thomsen, 2015). Çok faktörlü bozuklukların karakteristik özelliği, bir kişinin hastalık riskinin, bu kişi ile hastalığı olan akrabası arasındaki genetik ilişkiye bağlı olmasıdır. Akraba ciddi şekilde etkilenirse veya akraba erken yaşta etkilendiyse, risk genellikle daha yüksektir. Tek gen bozukluklarının aksine, astım fenotipi doğrusal olmayan şekilde ortaya çıkar ve oldukça değişkendir. Bu durum, verilen bir genotip için astım tahminini veya genotiplerin kombinasyonunu zorlaştırır (Thomsen, 2015).

Yüzden fazla gen astımla ilişkilendirilmiştir ve liste hala uzamaktadır (Mohan ve diğ., 2014). Genel olarak, astım duyarlılık genleri dört ana gruba ayrılır: (i) doğuştan gelen bağışıklık ve bağışıklık düzenleyici genler, (ii) Th2 hücre farklılaşması ve efektör fonksiyonlarıyla ilişkili genler, (iii) mukozal bağışıklık ve epitelyal biyoloji ile ilişkili genler ve (iv) akciğer fonksiyonuna, hava yolu yeniden yapılanmasına ve hastalığın ciddiyetine bağlı genler (Mukherjee ve Zhang, 2011). Bununla birlikte, bazı genler sadece astımlıların bir alt kümesinde (örneğin, çocukluk çağında başlayan astım, atopik astım, ev tozu akarına bağlı astım veya mesleki astımda) önemli olabilir ve bu nedenle farklı popülasyonlar arasında benzer sonuçlar her zaman beklenemez. Dahası, bazı genler sadece belirli çevresel koşullarda, örneğin bir kedi ile büyüyen çocuklarda veya yaşamın ilk yıllarında sigara dumanına maruz kalan çocuklarda ifade edilir (Thomsen, 2015). Astım duyarlılık genleri ile bu genlerin düzenlenmesinin altında yatan mekanizmaların belirlenmesi, astım ve alerjide çevre ile genetik arasındaki etkileşimin anlaşılması için kritik öneme sahiptir.

2.3.1. Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNP'ler)

İmmün-aracılı birçok hastalık (örneğin, çölyak hastalığı, enflamatuvar bağırsak hastalıkları, ateroskleroz, romatoid artrit, tip 1 diyabet, astım ve multipl skleroz), klinik olarak heterojen hastalıklar grubunda yer alır. Bu bozukluklar, genetik ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimin dengesizliği nedeniyle ortaya çıkmalarına rağmen, altta yatan moleküler mekanizmalar halen tamamen anlaşılmamıştır. İmmün-aracılı bozukluklarda, önemli düzenleyici yolakların düzensizliği ortak özelliktir. Yeni nesil dizileme (NGS) ile genom boyu ilişkilendirme çalışması (“genome wide association study”/GWAS) gibi yaklaşımlar, bu tür hastalıkların altında yatan genetik faktörler hakkındaki bilgimizi önemli ölçüde arttırmıştır (Minotti ve diğ., 2018; Castellanos-Rubio ve Ghosh, 2019).

Gen ekspresyonunun karmaşıklığı sadece gen dizisinden değil, aynı zamanda DNA, RNA ve proteinler arasındaki yoğun etkileşimlerden ve SNP (tek nükleotid polimorfizmi) gibi insan genlerindeki transkripsiyonel düzenlemede rol oynayan polimorfik varyasyonlardan ileri gelir (Marques ve diğ., 2016). İnsan genomu, vücudun nükleusa sahip her hücresinde bulunan 3 milyardan fazla baz çiftinden oluşur. Evrim boyunca korunmuş olan genom, iki insan arasında en az %99.5 oranında aynıdır (Karki ve diğ., 2015). DNA'nın protein kodlamayan bölgelerindeki dizi varyansları, insan genomu anlayışımızı değiştirmeye başlamıştır. Bazı çalışmalar çeşitli varyantları hastalığa duyarlılık ve ilaç cevabı ile ilişkilendirmiş olsa da, hastalıkların çoğunda çok karmaşık bir genetik imza vardır. Biyomedikal araştırmalar, bu varyasyonların işlevsel önemini ve bunların insan hastalıkları ile ilişkisini anlama yönünde ilerlemektedir (Karki ve diğ., 2015).

İnsan DNA'sındaki dizi varyantları 1993'te yayınlanan iki makale ile önem kazanmaya başlamıştır (Beaudet ve Tsui, 1993; Beutler, 1993). Nükleotid dizisinde nadiren rastlanan (frekansı %1'den az) ve çoğu zaman fonksiyon bozukluğuna veya hastalığa neden olan değişiklikler "mutasyon" olarak adlandırılır (Marshal, 2002). DNA dizisindeki bir varyasyonun popülasyonda görülme sıklığı %1 veya üzerinde olduğu zaman varyasyona polimorfizm denir (Karki ve diğ., 2015).

Mutasyona bağlı nükleotid dizisi değişiklikleri fenotipe yansıyabileceği gibi hiç bir belirti de vermeyebilir. Mutasyonlar ebeveynlerden miras alınabilir (germline mutasyonları) veya yaşam boyunca edinilebilir (somatik mutasyonlar). Mutasyonlar genellikle onarılmayan DNA hasarı, replikasyon hataları veya hareketli genetik elementlerden kaynaklanır. Birkaç büyük DNA mutasyonu sınıfı vardır. Tek bir nükleotidin eklenmesi, kaybolması (delesyonu) veya yer değiştirmesiyle "nokta mutasyonu" oluşur. Nokta mutasyonları ile birlikte, bir kromozomun tüm yapısı değişebilir, kromozomal bölgeler ters çevrilebilir, silinebilir, çoğaltabilir veya yer değiştirebilir. Başka tür bir DNA mutasyonu, "kopya sayısı değişimi" olarak tanımlanır. Bu durumda, bir genin ekspresyonu, bir lokus alellinin artmış kopya sayısı nedeniyle artar veya azalmış kopya sayısından ötürü düşer (Temizkan, 2013; Karki ve diğ., 2015).

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), insan genomu içinde, mevcut nükleotid tipinin (A, T, G veya C) bireyler arasında farklılık gösterebildiği bölgelerdir. SNP'ler insanlar arasında en yaygın genetik varyasyon türüdür (Karki ve diğ., 2015). Tek nükleotid varyasyonunun,

polimorfizm olarak kabul edilmesi için bir popülasyonun en az %1'inde bulunmasını gerekir (Chanock, 2001; Karki ve diğ., 2015). Bir polimorfizmin popülasyondaki yüksek insidansı, bunun doğal olarak meydana geldiğini, nötr ya da faydalı bir etki yarattığını göstermektedir (Chanock, 2001; Karki ve diğ., 2015) ve bu yüzden SNP'ler mutasyon olarak kabul edilmez (Marques ve diğ., 2016). Polimorfizmler, aynı mutasyonlar gibi bir veya daha fazla nükleotid değişimlerine yol açabilir (Karki ve diğ., 2015). Tek nükleotid polimorfizmi, insan genomunda her 1000 baz çiftinde ortaya çıktığı düşünülen en yaygın polimorfizm örneğidir ve genellikle protein ekspresyonu yapan genlerin içinde veya yakınında bulunur (Chanock, 2001; Karki ve diğ., 2015). SNP'lerin yoğunluğu bir kromozomun belli bölgeleri ve/veya kromozomlar arasında değişkenlik gösterir. SNP'ler, popülasyonlarda hastalıklar dahil olmak üzere belirli özelliklere yatkınlığı incelemek için genetik imzalar olarak kullanılırlar (Karki ve diğ., 2015). Bu polimorfizmlerin haritası onaylandıktan sonra, ilaç ve çevresel yanıtın tahmini, teşhis testleri, heterojenite testi, türlerin evrimsel gelişimi ve bunlara benzer çalışmalar için kullanılır (Shastry, 2002).

Bir SNP fenotipte hiç bir değişikliğe yol açmayabileceği gibi farkedilir bir değişime de neden olabilir (Chanock, 2001). SNP'ler kodlama dizilerinde, intronlarda, promotör veya intergenik bölgelerde bulunabilirler (Shastry, 2002; Thomas ve Sætrom, 2012). Bu tür polimorfizmler promotör aktivitesinin, DNA ve pre-mRNA konformasyonunun ve gen/protein ekspresyonu ve düzenlenmesinin tüm adımlarını değiştirme potansiyeline sahiptir (Chanock, 2001; Shastry, 2002; Karki ve diğ., 2015; Robert ve Pelletier, 2018).

SNP'ler, bulundukları bölgeye ve bu bölgedeki genler üzerindeki etkilerine göre sınıflandırılır. Protein kodlayan ve kodlamayan genlerde bulunan fonksiyonel SNP'ler sırasıyla düzenleyici SNP'ler (rSNP'ler) ve mikroRNA düzenleyici SNP'ler (miR-rSNP) olarak adlandırılır. Her iki tip SNP gen ekspresyonunu etkiler. Ayrıca, olgunlaşmamış (öncü) mRNA (pre-mRNA) yapısında ve olgun mRNA'da bulunan fonksiyonel SNP'lere yapısal RNA SNP'ler (srSNP'ler) denir. srSNP'lerin, mRNA yapı, stabilite ve olgunlaşması (mRNA "splicing"), miRNA ve mRNA etkileşimi, translasyon, protein olgunlaşması ve fonksiyonu üzerinde etkileri vardır (Ramírez-Bello ve Jiménez-Morales, 2017).

Promotör bölgelerdeki SNP'lerin incelenmesindeki zorluk, bu bölgelerin kodlanmadıkları için protein yapısını değiştirmemeleri, ancak transkripsiyonu kontrol etmeleridir. Transkripsiyonel düzenlenme, aynı zamanda transkripsiyon faktörleri bağlama bölgesi (TFBS) olarak da

bilinen promotör bölgesindeki kısa düzenleyici dizilere veya motiflere bağlanan proteinler ve transkripsiyon faktörleri (TF'ler) üzerindedir. Promotör bölgelerdeki bir SNP, olağan TF'ler için afiniteyi değiştirebilir ve bazı durumlarda yeni TF'lerin kullanılmasına yol açabilir. Bu nedenle ilgilenen promotör bölgesindeki bir SNP için hangi yeni TF'lerin ortaya çıktığı ve hangi TF'lerin afinitisinde kayıp olduğu" soruları ortaya çıkmaktadır (Marques ve diğ., 2016).

Bir veya daha fazla SNP içeren genler, mRNA'ların iki veya daha fazla allelik formuna yol açabilir. Tek nükleotid polimorfizm bölgelerinde farklı bazları içeren mRNA'lar, mRNA sentezi, olgunlaşması, uzunluk, taşınma (nükleo-sitoplazmik eksport), translasyon, katlanma ("folding"), stabilite veya bozulma dahil olmak üzere çeşitli süreçler ve özellikler bakımından farklılık gösterebilir (Robert ve Pelletier, 2018; Shen ve diğ., 1999). Ayrıca, kodlama dizisi içinde yer alan bir SNP (eş anlamlı olmayan bir SNP veya mutasyon olarak adlandırılır) bir amino asit değişikliğine yol açtığında, protein dizisi, yapısı ve fonksiyonunu etkiler (Robert ve Pelletier, 2018).

Yeni teknolojiler genomdaki uzun kodlamayan RNA'ları (lncRNA'lar) ve miRNA'ları ortaya çıkarmıştır. lncRNA'ların, gen ekspresyonunun her düzeyini kontrol ettikleri ve transkripsiyonun temel düzenleyicileri oldukları kabul edilmektedir. Birçok lncRNA hastalığa bağlı SNP'ler bakımından zengindir. Bu SNP'lerin, örneğin sekonder yapılarını etkileyerek lncRNA'ların fonksiyonunu değiştirebileceği düşünülmektedir (Minotti ve diğ., 2018; Castellanos-Rubio ve Ghosh, 2019). miRNA'lar, gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası regülatörleri olarak iş gören, kısa (yaklaşık 22 nt), kodlama yapmayan tek zincirli RNA'lardır. mRNA'nın 3′-UTR bölgesinde, miRNA bağlanması için bulunan hedef dizilerde bir SNP varlığı, miRNA'nın mRNA'ya bağlanmasını etkiler ve bu da sayısız fonksiyonel değişikliğe yol açabilir (Moszynska ve diğ., 2017).

Son on yılda, SNP analizi astımın genetik belirleyicilerinin tespiti ve lokalizasyonu için en yeni yaklaşım haline gelmiştir. Birçok gende (örneği, *IgE*, *IL13*, *IL4*, *IL-4R* ve *TSLP*) bu polimorfizmler üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Ramphul ve diğ., 2014; Thomsen, 2015). Bugüne kadarki astım genetiğinin en geniş ve kapsamlı araştırması, 2010 yılında dünya genelinde yüzden fazla merkezden oluşan bir birlik tarafından yapılmıştır (Moffatt ve diğ., 2010). Çok sayıda (582.892) SNP ile astım arasındaki ilişkiyi test etmek için 10.365 astımlı ve 16.110 etkilenmemiş kişiyi genotipleyen ve GABRIEL çalışması olarak literatüre geçen bu GWAS (genom boyu ilişkilendirme çalışması) sonucunda SNP içeren bir takım aday genler

tanımlamıştır (Moffatt ve diğ., 2010). Bu aday genler arasında tezde çalışılan genlerden biri olan *IL13* de yer almaktadır. *IL13* ve tezde çalışılan ikinci gen olan *FOXP3* detaylı olarak aşağıda ele alınmıştır.

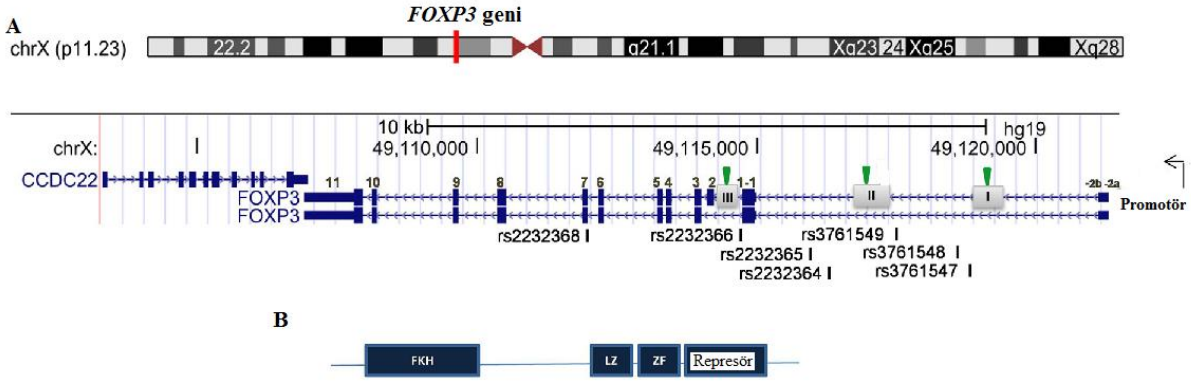
2.3.2. *FOXP3* Geni, FOXP3 Protein Yapısı ve İşlevi

Düzenliyeci T (Treg) hücrelerinin biyolojisine dair son gelişmeler büyük ölçüde farelerde X kromozomunda kodlanan transkripsiyon faktörü forkhead box P3 (FOXP3)'deki ve insan IPEX (immün disregülasyon, poliendokrinopati, enteropati, X'e bağlı) sendromu hastalarındaki mutasyonların belirlenmesi ve incelenmesiyle kaydedilmiştir (Josefowicz ve diğ., 2012; Calzada ve diğ., 2018). IPEX sendromuna, erken başlangıçlı diyabet ve endokrinopati, enteropati, egzama, gıda alerjisi ve eozinofil aracılı enflamasyon gibi otoimmün ve alerjik hastalıklar eşlik eder (Johnson ve diğ., 2008).

Forkhead box proteinleri, evrimsel olarak korunmuş bir transkripsiyon faktörü ailesidir ve yalnızca gelişim sırasında değil, yetişkin organizmada da merkezi bir role sahiptir (Marques ve diğ., 2015). Bu protein ailesinin üyeleri arasında FOXP1, FOXP2, FOXP3 ve FOXP4 bulunur. Bu çatal başlı transkripsiyon faktörleri ailesi için tanımlanmış bir üç boyutlu yapı ve DNA tanıma özelliği bulunur. Bu proteinler, 431 amino asit ve dört fonksiyonel domene sahiptirler. Bu proteinlerin yapılarında yüksek oranda korunmuş, ~110 amino asitlik, DNA'ya bağlanan bir forkhead domeni vardır (Şekil 2.6B). FOXP3 proteini, T hücreleri tarafından eksprese edilir ve temel olarak $CD4^+$ $CD25^+$ T hücrelerinin farklılaşmasına ve immün baskılama aktivitesine büyük bir katkı sağlar (Marques ve diğ., 2015).

İnsan *FOXP3* geni diğer aile üyeleri gibi, X kromozomunda (Xp11.23) bulunur, büyüklüğü 1296 bp'dir ve 11 kodlama eksonu ve 3 kodlamayan ekzon içerir. Şekil 2.6A, *FOXP3* geninin şematik bir diyagramını göstermektedir (Marques ve diğ., 2015). *FOXP3*'ün Treg hücrelerindeki rolü, bu genin fonksiyonunun baskılandığı çalışmalarla gösterilmiştir (Marques ve diğ., 2015). Periferik Treg'lerin (iTreg), nTreg'lerden daha az stabil olduğu bilinmektedir ve farklı enflamatuvar koşullar altında FOXP3 ekspresyonunu kaybedebilir ve çeşitli yardımcı T hücrelerine benzer fenotiplere dönüşebilir (Calzada ve diğ., 2018). Bazı araştırmalar *FOXP3*'ün nakavt (knockout) edilmesinden sonra Treg hücrelerinin baskılayıcı aktivitelerini yitirdiğini ve IL-2 ve Thl sitokinlerini üretmeye başladığını göstermiştir. Bu bulgularla uyumlu şekilde, *FOXP3*'ün transferi ile, Treg hücreler düzenleyici işlevlerini geri kazanırlar

ve lenfoproliferatif aktiviteyi baskılarlar (Marques ve diğ., 2015). En çok incelenen düzenleyici T hücreleri *FOXP3*'lü hücreler olmasına rağmen, *FOXP3*'ü eksprese etmeyen Treg popülasyonları da (örneğin, Tr1 ve Th3) vardır (Marques ve diğ., 2015; Calzada ve diğ., 2018).



Şekil 2.6: (A) X kromozomunun, *FOXP3* geninin ve bu gendeki bazı yaygın SNP'lerin şematik gösterimi. (B) FOXP3 protein yapısı. ZF: çinko parmak alanı, LZ: lösin fermuar alanı ve FKH: forkhead (Marques ve diğ., 2015).

FOXP3, insan Treg hücrelerinde aktif olan, asetillenmiş ve fosforile edilmiş bir proteindir ve oligomerler oluşturur; bu oligomerler de daha büyük bir moleküler kompleks oluşturabilir (Li ve Green, 2008). FOXP3 ve bağlayıcı ortakları, bazıları diğer transkripsiyon faktörleri veya kromatin faktörleri değiştirici faktörler olan 360'tan fazla farklı faktör içeren 400-800 kDa boyutunda büyük bir protein kompleksi oluşturur (Lu ve diğ., 2017). FOXP3, gelişen ve yerleşik Treg hücrelerinde 2.800'den fazla genomik bölgeye bağlanabilir (Lu ve diğ., 2017). FOXP3, enzimatik korepresörler (yardımcı baskılayıcılar) ve/veya koaktivatörler (yardımcı aktivatörler) ile birlikte çalışarak transkripsiyonu aktif bir şekilde düzenler (Li ve Green, 2008). Bu nedenle, FOXP3'ün, birçok kofaktör ile etkileşerek dolaylı bir şekilde birçok hedef genin transkripsiyonel aktivitesini pozitif veya negatif olarak kontrol edebileceği düşünülmektedir (Lu ve diğ., 2017). Treg hücrelerinin immünosupresif fonksiyonu için FOXP3'ün sürekli (konstitütif) ekspresyonu gereklidir (Calzada ve diğ., 2018). Bu transkripsiyon faktörünün düzenleyici T hücrelerindeki ekspresyonu, enflamatuvar yanıtı düzenlemek için yardımcı T hücreleri üzerindeki baskılayıcı aktivite ve Treg hücrelerinin proliferasyonu ile sonuçlanır (Marques ve diğ., 2015).

Trans-etkili faktörlerin aktivitesine ek olarak, epigenetik modifikasyonlar Treg hücrelerinin stabilitesinin korunmasında merkezi bir rol oynar. Histonları (asetilasyonla) veya doğrudan DNA'yı (*FOXP3* lokusundaki kodlamayan bölgelerde CpG motiflerinde metilasyonla) hedefleyebilen epigenetik modifikasyonlar, gen ekspresyon profilini düzenleyebilir. *FOXP3* geninde dört bölge, korunmuş kodlama yapmayan DNA dizilerinde epigenetik modifikasyonlara açıktır. Bu bölgeler promotör bölge, güçlendiriciler ("enhancer") ve öncü element bölgeleridir ("pioneer element region") (Marques ve diğ., 2015). Periferik Treg'lerin stabil olmayışının bir açıklaması, *FOXP3* geninde güçlendirici görevi olan korunmuş kodlamayan dizi 2'nin (CNS2) metilasyon durumudur. Enflamasyon koşulları altında Treg kimliğini koruma görevi gören bu bölgenin nTreg'de stabil bir şekilde hipometile olduğu, ancak periferik Treg'lerde tamamen demetile olmadığı bilinmektedir (Marques ve diğ., 2015; Calzada ve diğ., 2018). Ek olarak, bu bölgeye yakın histonlar timus türevi Treg hücrelerinde asetillenir. *FOXP3*'teki öncü eleman bölgesi, T düzenleyici hücre ailesi üyelerinin büyüklüğünü, kompozisyonunu ve stabilitesini düzenlemekten sorumludur (Marques ve diğ., 2015). Ayrıca *FOXP3* geninin transkripsiyonel evrede kontrolüne ek olarak, FOXP3 ekspresyon stabilitesi posttranskripsiyonel olarak belirlenir. Örneğin, Treg'ler pro-enflamatuvar sitokinler ve lipopolisakkaritler tarafından ortaya çıkarılan stres sinyallerine, T-efektör hücrelere benzer bir fenotip elde etmek için FoxP3 proteinini parçalayarak cevap verir (Calzada ve diğ., 2018).

Çeşitli veriler, Treg hücrelerinin *FOXP3* lokusundaki epigenetik değişikliklerin astım fenotiplerini etkilediğini göstermektedir (Marques ve diğ., 2015). *FOXP3* geninde işlev kaybına neden olan mutasyonlar (fareler ve insanlarda), diyabet, tiroidit, hemolitik anemi, hiper-IgE sendromu gibi hastalıklara neden olabilir. Önemli olarak, hastalık sadece hemizigot mutant kadınları ve erkekleri etkilerken, *FOXP3* mutasyonları heterozigot dişi taşıyıcıları etkilemez (Josefowicz ve diğ., 2012). *FOXP3* genindeki bazı SNP'lerin alerji ve diğer immün hastalıkların gelişimine daha yüksek yatkınlıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir, ancak az sayıda astım çalışması yapılmıştır (Marques ve diğ., 2015).

2.3.3. *IL13* Geni, IL-13 Protein Yapısı ve İşlevi

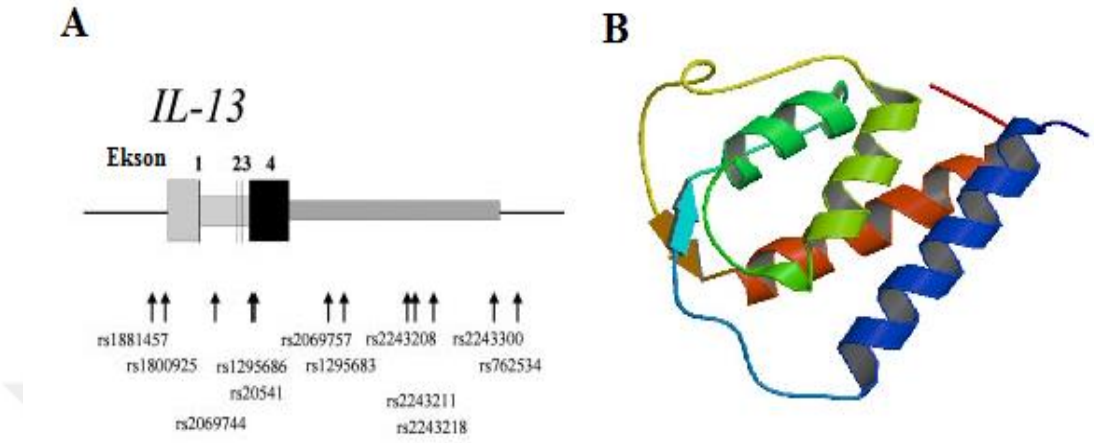
Çeşitli popülasyonlarda yapılan genetik çalışmalarda, 5q31-q33 kromozomu üzerinde astım duyarlılık geni içeren bir bölge tanımlanmıştır. Bu gen kümesinin iki üyesi olan *IL4* ve *IL13*'ün, astım ve alerjik enflamasyon patogenezine önemli katkılarda bulunduğu

gösterilmiştir (Radhakrishnan ve diğ., 2013; Smolkova ve diğ., 2017). İnterlökin-13 geni (*IL13*) 1.4 kb uzunluğundadır (Şekil 2.7A); proteini ise 132 amino asitten oluşur, 13 kDa'lık bir kütleye sahiptir ve 4 alfa-sarmal demet, A, B, C ve D şeklinde katlanır (Şekil 2.7B) (Xu ve diğ., 2017). İnterlökin-4 (IL-4) ile üst üste binen ikincil yapısal özellikleri paylaşır; bununla birlikte IL-4 ile sadece %25 dizi homolojisi gösterir ve bu interlökinden bağımsız sinyalleşme yeteneğine sahiptir (Rael ve Lockey, 2011; Radhakrishnan ve diğ., 2013). İnterlökin-13, etkisini çok-üniteli reseptör IL-4Rα ve IL-13Rα heterodimeri içeren reseptör vasıtasıyla gösterir. Ek olarak, IL-13 ve IL-4 sinerjizmi olmadan da aynı biyolojik tepkilerin çoğunu ortaya çıkarır. Bunun nedeni bu sitokinlerin ortak reseptör bileşenine, yani IL-4 reseptörünün alfa zincirine (IL-4Rα) sahip olmasıdır. IL-13Rα1 için IL-13'ün afinitesi nispeten düşük iken, IL-4Rα varlığında afinite yaklaşık olarak on kat artar. İkinci IL-13 reseptörü (IL-13Rα2), IL-4 ile paylaşılmaz; bu reseptörün sinyalde rolü olmadığı ve "decoy" reseptör (tuzak alma reseptörü) olarak hizmet edebileceği düşünülmektedir (Radhakrishnan ve diğ., 2013). Bununla birlikte, IL-13 insanda IgE'ye sınıf geçişi rekombinasyonunu indükler, murin ve insan monositleri/makrofajları üzerindeki bir IgE reseptörü olan CD23'ün ekspresyonunu arttırır (Vladich ve diğ., 2005).

IL-4 ve IL-13, alerjik astım yanıtında anahtar rol oynayan Th2 kaynaklı sitokinlerdir. İnsanlarda, IL-13 düzeyleri astımlılarda hem sistematik olarak hem de astım atakları sırasında, akciğerlerde artmaktadır (Levine ve Wenzel, 2010). IL-4, Th2 tipi T hücrelerinin farklılaşmasını ve çoğalmasını ve B hücrelerinin IgG'den IgE üretimine geçişini teşvik ederken (Levine ve Wenzel, 2010), IL-13'ün en belirgin etkileri, eozinofillerin ve mast hücrelerinin farklılaşmasının ve hayatta kalmasının desteklenmesi, fibroblastların aktivasyonu, bronşiyal aşırı duyarlılığın yükselmesi, B hücrelerinde antikor üretimi (IgM'den IgE'ye geçiş), hava yolu hiperreaktivitesi ve mukus hiper üretimidir (Levine ve Wenzel, 2010; Xu ve diğ., 2017). IL-13 inhibisyonu, mevcut tedavilere dirençli olan hastalarda yararlı olabilir. Çalışmalar IL-13'ün alerjik hava yolu hastalığı, fibroz ve böbrek hücreli karsinom gibi insan hastalıklarında rol oynayabileceğini göstermiştir (Xu ve diğ., 2017).

İnsan *IL13* geninde birkaç SNP saptanmıştır. SNP'ler IL-13'ün ekspresyonunu ve/veya fonksiyonunu etkiliyebilirler (Xu ve diğ., 2017). Bu SNP'lerden bazıları, bazı popülasyonlarda astım ve alerjik fenotiplerle ilişkilendirilmiştir (Vladich ve diğ., 2005). Ayrıca *IL13* genetik varyantlarının total IgE düzeyleri ile ilişkisi ve atopik hastalıklar üzerindeki etkisi, farklı

popülasyonlarda analiz edilmiştir ve çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (Smolkova ve diğ., 2017). Şekil 2.7A'da *IL13* üzerinde bulunan en önemli SNP'ler gösterilmektedir.



Şekil 2.7: (A) *IL13*'ün genomik yapısı ve yaygın SNP'leri (Ellis ve diğ., 2007). (B) IL-13'ün 3D protein yapısı (PDB, 2020).

2.3.4. Astımın Genetik Epidemiyolojisi

Farklı popülasyonlarda yapılan incelemeler, astımın kalıtsal bir hastalık olduğuna işaret etmektedir. İlk olarak, hastalığın ortaya çıkışında büyük coğrafi ve ırksal farklılıklar vardır (Thomsen, 2015). Örneğin, pek çok Batı popülasyonunda astım prevalansı %20'ye kadar yükselirken, gelişmekte olan ülkelerde, bazıları %1 veya daha düşük olmak üzere çok daha düşük prevalans oranları görülür. Bu durum, genetiğin astımın sebeplerinden biri olduğunu göstermektedir, çünkü farklı popülasyonların çok farklı çevresel koşulları vardır (Thomsen, 2015). Bireysel astım riskinin ailevi geçmişe bağlı olduğu açık olsa da, astımın fenotipik ifadesi, diğer genetik ve çevresel faktörler tarafından değiştirilebilir. Az sayıda genin bireysel astımda direkt olarak arka plan riskini belirlediği kabul edilmektedir; bu genlere ek olarak dizisi modifiye olmuş başka genlerin ve ayrıca çevresel faktörlerin de riski arttırması olasıdır. Örneğin, erken yaşta astım olan bireylerin, astımı daha ileri yaşlarda başlayanlara göre daha çok aile astımı öyküsü vardır, bu da genlerin hastalığın başlangıç yaşını etkilediğini göstermektedir (Thomsen ve diğ., 2010; Thomsen, 2015).

İnsan genomu yaklaşık 20.000-25.000 arası gen içerir. Tüm insan genom dizilimi, bazı hastalıkların tanısı, tedavisi ve muhtemelen de önlenmesi için eşsiz bir fırsat sunmaktadır. Bu

kaynağın kullanımındaki en büyük zorluk, yüksek işlem hacmi (bu kadar çok verinin biyoinformatik araçlarla analizi ve yorumlanması) dolayısıyla klinikte ya da genetik danışmanlıkta uygulanabilirliğinin zaman almasıdır. Kişiselleştirilmiş tıp genomik sonrası dönemde giderek daha önemli hale gelmektedir. Kişiselleştirilmiş tıbbın arkasındaki fikir, çoğunlukla hastaların hangi tedaviye en iyi şekilde yanıt vereceklerini genetik bilgiye dayanarak tahmin etmektir. Bu alan ilerledikçe, hastalara uygun ilaçların verilmesiyle gibi, genetik polimorfizmlere dayalı farmakoterapiyi bireyselleştirmek mümkün olacaktır (Thomsen, 2015).

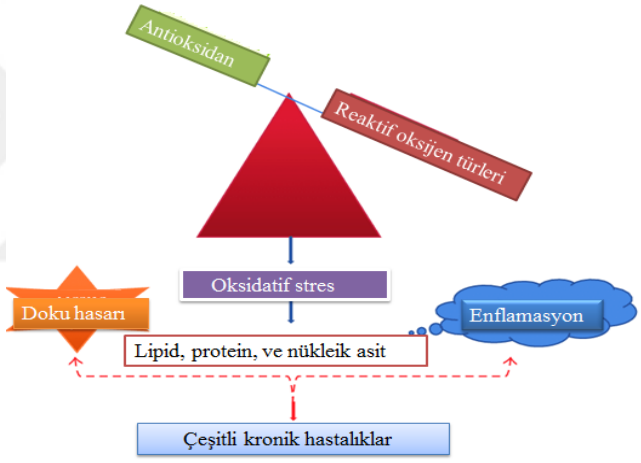
2.4. OKSİDATİF STRES ve ASTIMLA İLİŞKİSİ

2.4.1. Oksidatif Stres

Oksijen aerobik canlıların yaşamı için mutlak olan bir elementtir. Reaktivitesi, oksijenin yüksek enerjili elektron transferlerine katılmasına izin verir ve böylece oksidatif fosforilasyon yoluyla büyük miktarda adenozin-5′-trifosfat (ATP) oluşumu, dolayısıyla enerji temini sağlanmış olur (Burton ve Jauniaux, 2011; Katerji ve diğ., 2019). Ancak bir organizmada serbest radikallerin ve diğer reaktif oksijen metabolitlerinin aşırı düzeyde oluşması ve/veya bunları ortadan kaldıran antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kalması durumunda oksidatif stres meydana gelir (Şekil 2.8) (Rahman ve diğ., 2012). Radikal veya radikal olmayan reaktif oksijen/nitrojen (azot) türleri (ROT/RNT) yüksek konsantrasyonlarda bulunduklarında canlı organizmalar için tehlikeli olmaya başlar ve proteinler, lipitler, nükleik asitler gibi biyolojik moleküllere saldırarak tüm önemli hücresel bileşenlere zarar verirler (Dröge, 2002; Burton ve Jauniaux, 2011; Katerji ve diğ., 2019). Bununla birlikte, ılımlı konsantrasyonda nitrik oksit (NO), süperoksit anyonu ve bazı ROT'lar sinyalizasyon süreçlerinde düzenleyici aracılar olarak önemli görevler üstlenirler (Dröge, 2002). Oksidanlar, mitokondri ve peroksizomlardaki normal hücre içi metabolizmanın yanı sıra çeşitli sitozolik enzim sistemlerinden üretilir (Rahman ve diğ., 2012). Endojen üretimine ek olarak UV ışınları, sigara, hava kirliliği, bazı ilaçlar ve toksik kimyasallar gibi çevresel faktörlerin etkisiyle de oluşabilir (Burton ve Jauniaux, 2011).

Canlılar oksidanlara karşı geliştirdikleri karmaşık antioksidan savunma sistemleri sayesinde ROT düzeyini dengeleseler de, bazı durumlarda bu denge bozulabilir (Burton ve Jauniaux, 2011; Katerji ve diğ., 2019). Oksidan-antioksidan dengesinin oksidanlar lehine bozulması

anormal derecede yüksek ROT üretiminden ve/veya antioksidan savunmadaki yetersizliklerden kaynaklanabilir (Davies, 2000; Burton ve Jauniaux, 2011). Dengedeki ufak bozukluklar homeostatik adaptasyonla telafi edilirken, daha büyük aksaklıklar onarılamaz, hasara ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (Burton ve Jauniaux, 2011). Enflamatuvar yanıtta, hasarlı bölgelerdeki lökosit ve mast hücreleri solunumsal patlama ile ROT üretirler ve salgıladıkları mediatörlerle de oksidatif stresi arttırırlar; dolayısıyla kronik enflamasyon ve oksidatif stres karsinogenezi tetikleyebilir (Federico ve diğ., 2007). Bu konuda son yıllarda yapılan araştırmalar, oksidatif stresin hamilelik komplikasyonları da dahil olmak üzere yaşlanma süreci, nörodejeneratif bozukluklar, multipl skleroz, kardiyovasküler hastalıklar, romatoid artrit ve kanser gibi birçok hastalığın patofizyolojisinde merkezi bir rol oynadığını ortaya koymaktadır (Burton ve Jauniaux, 2011; Katerji ve diğ., 2019).



Şekil 2.8: Oksidan ve antioksidan arasındaki dengesizlik (Arulselvan ve diğ., 2016).

2.4.2. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri

Başlıca reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT) Tablo 2.1'de listelenmiştir (Halliwell ve Gutteridge, 2015). ROT'lar endojen kaynaklı (normal hücresel metabolizmanın bir sonucu olarak moleküler oksijenden üretilir) veya dış kaynaklı (UV, sigara, ozon, hipoksi, ilaçlar, hava kirliliği gibi) olabilirler (Burton ve Jauniaux, 2011). ROT'lar hem serbest radikalleri hem de radikal olmayan molekülleri kapsar (Burton ve Jauniaux, 2011). Bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren türler olarak tanımlanan serbest radikaller orbitallerindeki eksik elektron(lar) nedeniyle yüksek reaktiviteye sahiptirler.

Serbest radikaller birçok elementten üretilebilir, ancak biyolojik sistemlerde en önemlisi oksijen ve azot içerenlerdir (Burton ve Jauniaux, 2011).

Tablo 2.1: Reaktif oksijen ve nitrojen türleri.

Reaktif Oksijen Türleri (ROT)	
Radikaller	**Radikal Olmayanlar**
Süperoksit: $O_2^{\bullet-}$	Hidrojen peroksit: H_2O_2
Hidroksil: $OH^{\bullet}$	Hipokloröz asit: $HOCl^{-}$
Peroksil: $RO_2^{\bullet}$	Hipobromöz asit: HOBr
Alkoksil: $RO^{\bullet}$	Ozon: O_3
Hidroperoksil: $HO_2^{\bullet}$	Singlet oksijen: $^1O_2$
Reaktif Nitrojen Türleri (RNT)	
Radikaller	**Radikal Olmayanlar**
Nitrik oksit: $NO^{\bullet}$	Nitröz asit: HNO_2
Nitrik dioksit: $NO_2^{\bullet}$	Nitrozil katyonu: NO^{+}
Nitrat radikali: $NO_3^{\bullet}$	Nitrozil anyonu: NO^{-}
	Peroksinitrit: $ONOO^{-}$
	Peroksinitröz asit: ONOOH
	Alkil peroksinitrit: ROONO

Fizyolojik koşullar altında, en yaygın oksijen serbest radikali, ana kaynağı mitokondri olan süperoksit anyonudur ($O_2^{\bullet-}$) (Cadenas ve Davies, 2000). Solunum zincirinin enzimleri boyunca elektron transferi tam verimli değildir ve elektronların, özellikle kompleks I ve III'den sızması, $O_2^{\bullet-}$ oluşumuna neden olur. Oluşum hızı, zincirde bulunan elektronların sayısı ile belirlenir ve hipoksi veya yüksek glukoz koşullarında artar (Burton ve Jauniaux, 2011).

Süperoksit anyonu, endoplazmik retikulum (ER) içindeki daha kısa elektron taşıma zincirinden elektronların sızmasıyla da üretilebilir (Tu ve Weissman, 2004). Fizyolojik koşullar altında diğer $O_2^{\bullet-}$ kaynakları, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzimleridir. Protein katlanması sırasında disülfit bağlarının oluşumu oksidatif bir işlemdir ve hücre içinde $O_2^{\bullet-}$'in yaklaşık % 25'i ER'deki bu süreçte üretilir. Bu üretim, yüksek

salgı çıkışlı hücrelerde ve ayrıca yanlış katlanmış proteinleri tekrar katlama girişimleri gerçekleştiğinde (ER stresi altında) artabilir. (Burton ve Jauniaux, 2011).

Süperoksit dismutaz enzimleri (SOD'lar) süperoksiti hidrojen peroksite dönüştürerek detoksifiye ederler. Hidrojen peroksit serbest bir radikal değildir ve bu yüzden $O_2^{\bullet-}$'den daha az reaktiftir. Polar olmadığından hücre ve organel membranlarından yayılabilir ve bu nedenle sinyal iletim yollarında ikincil bir haberci görevi görür. Bununla birlikte, serbest radikal üretecek reaksiyonlara girebilir. Aşırı $O_2^{\bullet-}$ varlığı, H_2O_2 üzerinden çok daha tehlikeli olan hidroksil radikalinin ($OH^{\bullet}$) oluşumuna neden olabilir. Demir, bakır, kadmiyum, cıva, nikel, kurşun ve arsenik gibi ağır metal iyonları oksijen radikallerinin oluşumuna yol açabilir. Metal-aracılı serbest radikal oluşumunun en yaygın şekli, süperoksit ve H_2O_2'nin demir ve bakır gibi geçiş metalleriyle girdiği etkileşim sonucu, aşağıda gösterilen metal katalizli Haber–Weiss/Fenton reaksiyonu ile $OH^{\bullet}$ radikallerinin oluşumudur (Jozefczak ve diğ., 2012).

$$Metal^{n} + O_2^{\bullet-} \rightarrow Metal^{(n-1)} + O_2$$

$$Metal^{(n-1)} + H_2O_2 \rightarrow Metal^{n} + OH^{\bullet} + OH^{-} \text{ (Fenton reaksiyonu)}$$

$$\text{Net reaksiyon: } O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\bullet} + OH^{-} + O_2 \text{ (Haber-Weiss reaksiyonu)}$$

Hidroksil radikali, tahmini olarak 10^{-9} saniye yarı ömre sahiptir ve hemen hemen her bir biyolojik molekülle reaksiyona girer. Çok reaktif olan $OH^{\bullet}$'nin bilinen bir temizleyicisi ("scavenger") yoktur. Hidrojen peroksit katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleriyle suya dönüştürülerek detoksifiye edilir (Birben ve diğ., 2012; Burton ve Jauniaux, 2011; Halliwell ve Gutteridge, 2015). Patolojik koşullar altında, ksantin dehidrogenaz enzimi de H_2O_2 üretimine katkıda bulunur. Bu enzim, pürinleri, ksantini ve hipoksantini ürik aside dönüştürür ve normal şartlar altında elektron alıcısı olarak NAD^{+} kullanır (Birben ve diğ., 2012).

Aşırı miktarda üretilen $O_2^{\bullet-}$, nitrik oksitle ($NO^{\bullet}$) etkileşime girerek peroksinitrit ($ONOO^{-}$) oluşumuna yol açabilir. Peroksinitrit güçlü bir pro-oksidandır (Burton ve Jauniaux, 2011). Difüzyon yapabildiği (5 μm'ye kadar) için komşu hücreleri etkileyebilir. Nitrik oksit tüm omurgalılarda her yerde ve her zaman hazır bir hücreler arası habercidir; kan akışını, trombozu ve sinirsel aktiviteyi düzenler. Nitrik oksitin biyolojik üretimi, spesifik olmayan konak hücre savunması için de önemlidir, ancak $NO^{\bullet}$'nun, hücre içi patojenleri ve tümörleri doğrudan öldürmesi olası değildir (Pacher ve diğ., 2007). Nitrik oksit, hızlı bir şekilde

dokulardan kırmızı kan hücrelerine difüzlenerek uzaklaştırılır; burada oksihemoglobin ile reaksiyona girerek hızla nitrata dönüştürülür (Pacher ve diğ., 2007).

2.4.3. Antioksidan Savunma

İnsanda oksidanların etkisini dengelemek için çeşitli antioksidan sistemler bulunur. ROT'ların oluşumunu önleme veya baskılama; ROT'ları ortadan kaldırma; biyomoleküller ve membranlar üzerindeki oksidatif hasarı onarma gibi farklı süreçlerde rol alarak oksidatif stresin zararlı etkilerini azaltmaya çalışan endojen antioksidanlara ek olarak eksojen (diyetle veya katkılarla dışarıdan alınan) antioksidanlar da vardır (Gutteridge ve Halliwell, 1994; Halliwell ve Gutteridge, 2015).

Savunmanın ilk hattında serbest radikallerin ve ROT'ların oluşumunu baskılayan veya önleyen antioksidanlar yer alır. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) bu grubun kilit antioksidan enzimleridir. Demir iyonlarını bağlayan ferritin ve transferrin, bakır iyonlarını bağlayan seruloplazmin gibi proteinler de bu gruptadır (Ighodaro ve Akinloye, 2018; Davies, 2000). İkinci hattı askorbik asit (C vitamini), ürik asit, glutatyon, α-tokoferol (E vitamini), ubikinol gibi temizleyici (süpürücü, "scavenger") antioksidanlar oluşturur. Üçüncü hatta serbest radikal hasarı oluştuktan sonra devreye giren ve hasarı onaran *de novo* enzimler vardır (Ighodaro ve Akinloye, 2018). Dördüncü hatta antioksidan savunmayı harekete geçiren ve doğru antioksidanı doğru yere yönlendiren adaptasyon mekanizmasının elemanları olan serbest radikal kaynaklı sinyaller bulunur (Halliwell ve Gutteridge, 2015; Ighodaro ve Akinloye, 2018). Antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan şeklinde iki kategoride incelenebilir (Burton ve Jauniaux, 2011; Birben ve diğ., 2012; Ighodaro ve Akinloye, 2018).

2.4.3.1. Enzimatik Antioksidanlar

Ökaryotlarda antioksidan savunmada görevli enzimler ve temel fonksiyonları Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2: Ökaryotlarda antioksidan savunmada görevli önemli enzimler ve temel fonksiyonları.

Enzim	**Fonksiyon**
Süperoksit dismutaz (SOD)	Süperoksit radikalini temizler.
Katalaz (CAT)	Hidrojen peroksiti ortadan kaldırır.
Glutatyon peroksidaz (GPx)	Hidrojen peroksiti ortadan kaldırır.
Glutatyon redüktaz (GR)	Oksitlenmiş glutatyonu (GSSG) redükte formuna (GSH) indirger.
Glutatyon S-transferaz (GST)	Doymamış aldehitler, epoksitler ve hidroperoksitler gibi oksidanları etkisiz hale getirir.
Tiyoredoksin redüktaz (TrxR)	Tiyoredoksinin disülfit aktif bölgesini ve pek çok substratı redükler.

Süperoksit çeşitli kaynaklardan üretilen birincil ROT olduğundan, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile ortadan kaldırması her hücre için birincil öneme sahiptir (Birben ve diğ., 2012; Halliwell ve Gutteridge, 2015; Ighodaro ve Akinloye, 2018). Bu enzim aşağıdaki reaksiyonu katalizleyerek süperoksit anyonunu ortadan kaldırır (Ighodaro ve Akinloye, 2018).

$$2\ O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

SOD (EC 1.15.1.1) bir metalloenzimdir, aktivitesi için bir metal kofaktör gerektirir ve farklı formları vardır (Ighodaro ve Akinloye, 2018). Normalde SOD'a bağlanan metal iyonları demir (Fe), çinko (Zn), bakır (Cu) ve mangan (Mn)'dir. Buna göre, SOD'ların üç farklı formu bulunur: (i) Fe-SOD, prokaryotlarda ve bazı bitkilerin kloroplastlarında yaygın olarak bulunur, (ii) Mn-SOD, prokaryotlarda ve ökaryotların mitokondrilerinde bulunur ve (iii) Cu/Zn-SOD, ökaryotlarda baskındır ve temel olarak sitozolde lokalizedir; kloroplastlarda ve peroksizomlarda da bulunur. SOD'un çeşitli 'izozimleri' farklı genler tarafından kodlanır (Ighodaro ve Akinloye, 2018). İnsanda bulunan SOD1, SOD2 ve SOD3 izoformları, sırasıyla 21, 6 ve 4. kromozomdaki genleri tarafından kodlanır. Dimerik SOD1 sitoplazmada, tetramerik SOD2 mitokondride yer alır; SOD3 ise tetramerik yapıda ve ekstrasellülerdir. SOD1 ve SOD3 Cu ve Zn içerirken SOD2'nin aktif yerinde Mn bulunur (Wang ve diğ., 2018).

Katalaz (CAT) (EC 1.11.1.6) tetramerik bir enzimdir ve molekül ağırlığı yaklaşık 240 kDa'dur (Halliwell ve Gutteridge, 2015; Ighodaro ve Akinloye, 2018). Her bir polipeptid alt

biriminin ağırlığı 60 kDa'dır ve her biri bir hem grubu (ferriprotoporfirin) içerir (Ighodaro ve Akinloye, 2018). Katalaz, oksijen kullanan hemen hemen tüm canlı dokularda bulunan yaygın bir antioksidandır. Kofaktör olarak demir veya mangan kullanan katalaz, hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene indirgenmesini katalizler; böylece SOD tarafından yapılan detoksifikasyon işlemini tamamlar (Ighodaro ve Akinloye, 2018). Bu enzim milyonlarca hidrojen peroksit molekülünü bir saniyede parçalayabilir. Enzim peroksizomlarda bulunur, memeli hücrelerinin mitokondrilerinde yoktur (Kayama ve diğ., 2015; Ighodaro ve Akinloye, 2018). Hidrojen peroksit, memeli hücrelerinin mitokondrilerinde glutatyon peroksidaz olarak bilinen başka bir enzim tarafından su ve oksijene çevrilir (Ighodaro ve Akinloye, 2018). Katalaz aktivitesini iki adımda gerçekleştirir. İlk adımda bir hidrojen peroksit molekülü, enzimin hem grubunu oksitleyerek oksiferril'e dönüştürür ve porfirin katyon radikali ile Fe^{+4} içeren Bileşik I ve su oluşur.

$$\text{Enz (Por-Fe}^{III}\text{)} + H_2O_2 \rightarrow \text{Bileşik I (Por}^{+\cdot}\text{-Fe}^{IV} = O) + H_2O$$

İkinci adımda diğer bir hidrojen peroksit molekülü, enzimi ilk haline döndüren ve bu arada bir oksijen ve bir su molekülü üreten indirgeyici bir ajan olarak iş görür (Chelikani ve diğ., 2004; Ighodaro ve Akinloye, 2018).

$$\text{Bileşik I (Por}^{+\cdot}\text{-Fe}^{IV}= O) + H_2O_2 \rightarrow \text{Enz (Por-Fe}^{III}\text{)} + H_2O + O_2$$

Bu yaygın reaksiyona rağmen, enzim ailesinin üyeleri arasında reaktif kapasite bakımından büyük farklılıklar vardır (Chelikani ve diğ., 2004). Katalaz metanol, etanol, formik asit, formaldehit, asetaldehit ve fenol gibi hidrojen donörleri ile de etkili bir şekilde reaksiyona girer ve bu molekülleri H_2O_2 yardımıyla, aşağıdaki reaksiyona (peroksidatif aktivite) göre oksitler:

$$H_2O_2 + H_2R \rightarrow 2H_2O + R$$

Katalaz üzerinde yapılan çalışmalar, NADPH'nin, katalaza bağlanarak onu H_2O_2'ye karşı etkili bir şekilde koruduğunu ortaya koymuştur; ancak bu olay enzimin aktivitesini azaltır (Kirkman ve diğ., 1999; Sahiner ve diğ., 2011). Ayrıca bazı araştırmalar, insan eritrositlerinde NADPH'nin katalazı aktif tutma rolünün, glutatyon redüktaz/peroksidaz yolundaki rolünden daha önemli olduğunu ortaya koymuştur (Ghosh ve diğ., 2006; Sahiner ve diğ., 2011).

Peroksidazlar (EC 1.11.1.X), çeşitli biyolojik işlemlerde rol oynayan ve peroksitleri parçalayan enzimlerdir. Bu enzimlerin birçoğu için optimal substrat hidrojen peroksittir, ancak bazıları lipit peroksitler gibi organik hidroperoksitler üzerinde aktivite gösterir. Redoks döngüsü, H_2O_2 ve lipit hidroperoksitlerin (membran lipit peroksidasyonunun bir sonucu olarak üretilir) indirgenmesi için glutatyon peroksidazları (GPx'leri) (EC 1.11.1.9) kullanır. GPx'ler, aktif bölgelerinde selenosistein içeren tetramerik enzim ailesini oluştururlar (Ighodaro ve Akinloye, 2018). Bu enzimler H_2O_2 ve lipit peroksitleri indirgemek için indirgenmiş glutatyonu (GSH) kullanırlar; bu nedenle GSH-Px olarak da gösterilirler. GSH'ın rejenerasyonu glutatyon redüktaz (GR) (eski EC 1.6.4.2, yeni EC 1.8.1.7) enzimi tarafından sağlanır.

Farklı genler tarafından kodlanan dört GPx tarif edilmiştir: GPx-1 (hücresel GPx) hücrenin her yerinde ve en bol bulunan selenoperoksidazdır; H_2O_2 ve yağ asidi peroksitlerini indirger, ancak esterleşmiş peroksil lipitleri indirgeyemez (Birben ve diğ., 2012). Esterlenmiş lipitler zara bağlı GPx-4 ile, düşük molekül ağırlıklı tiyoller kullanılarak indirgenir. GPx-2 (gastrointestinal GPx) gastrointestinal epitel hücrelerinde lokalize olan ve diyete bağlı peroksitlerin indirgenmesini sağlayan bir enzimdir (Birben ve diğ., 2012). GPx-3 (hücre dışı GPx), memelilerdeki en önemli hücre dışı antioksidan enzimlerden biridir (Birben ve diğ., 2012; Comhair ve diğ., 2001).

Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroperoksitlerin (ROOH) indirgenmesinde iş gören bir diğer enzim de peroksiredoksin (Prx)'dir; bu enzim H_2O_2'yu suya, ROOH'ı alkole (ROH) indirger (Perkins ve diğ., 2015; Aoyama ve Nakaki, 2015).

Hücre içinde tiyol gruplarından okside olmuş proteinlerin indirgenmesinde oksitlenmiş glutaredoksin enzimi (Grx_{ox}) (Deponte, 2013) ile oksitlenmiş tiyoredoksin (Trx_{ox}, Trx-S_2) , tiyoredoksin redüktaz (TrxR) ve NADPH'den oluşan tiyoredoksin sistemi (Lee ve diğ., 2013; Aoyama ve Nakaki, 2015) iş görür. Tiyoredoksin redüktaz (TrxR) (EC 1.8.1.9) tiyol içeren bir enzimdir; NADPH'yi oksitlerken Trx'in indirgenmiş ditiyol formunu [Trx_{red}, Trx-$(SH)_2$] oluşturur. Bu molekül de oksitlenmiş proteinleri indirger (Lee ve diğ., 2013). TrxR'ler, insan hücrelerinde hem sitozol hem de mitokondride tanımlanmıştır (Birben ve diğ., 2012).

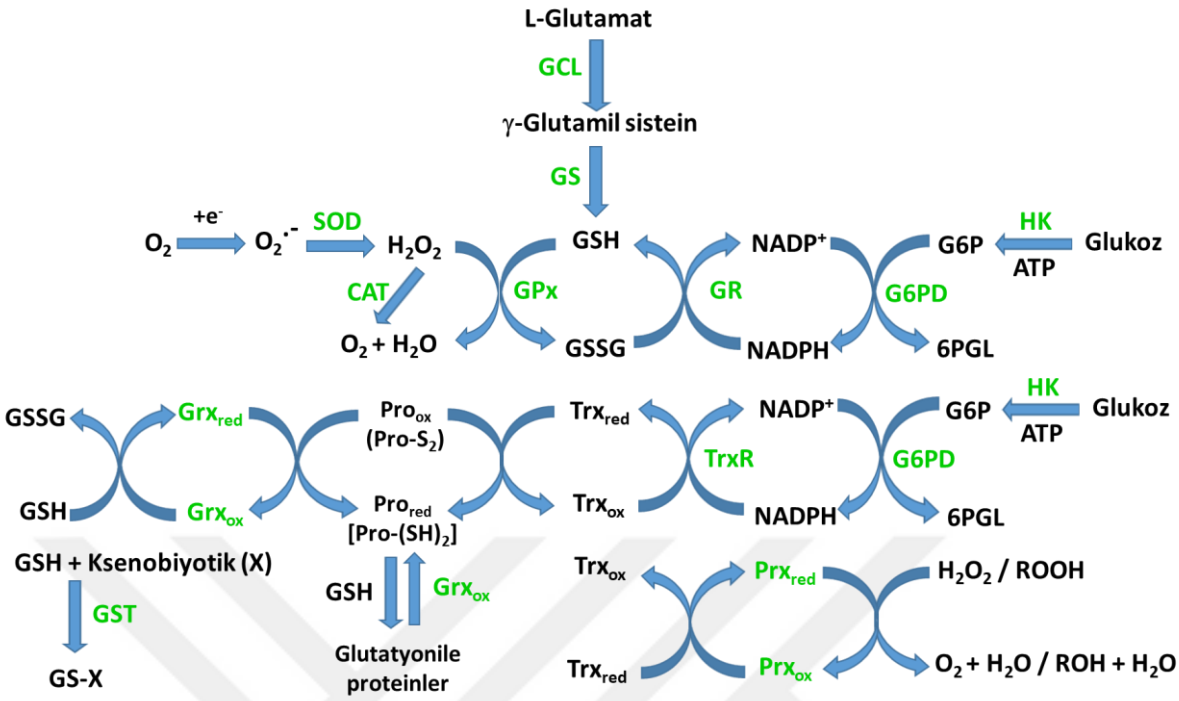
Glutaredoksin enziminin glutatyon bağlı proteinlerden bu molekülü ayırdığı da bilinmektedir (Deponte, 2013; Aoyama ve Nakaki, 2015).

Oksitlenmiş glutatyon (GSSG) ve tiyoredoksin (Trx_{ox})'in indirgenmesi ve redoks döngüsünün rejenerasyonu için gerekli en önemli metabolit NADPH'dir. Hücre içi NADPH, $NADP^+$'nin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi tarafından indirgenmesiyle üretilir. Bu enzim pentoz fosfat yolağının ilk enzimdir ve glukoz-6-fosfatı (G6P), 6-fosfoglukonolaktona (6PGL) dönüştürür. NADPH üreten glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, sitozolik GSH tamponlama kapasitesinin (GSH/GSSG) kritik bir belirleyicisidir ve bu nedenle, temel düzenleyici bir antioksidan enzim olarak kabul edilebilir (Weydert ve Cullen, 2010; Birben ve diğ., 2012; Halliwell ve Gutteridge, 2015). Bu enzimin substratı olan glukoz 6-fosfat (G6P)'ın üretimini sağlayan hekszokinaz (HK) enzimi de antioksidan sistemler için kritik öneme sahiptir (Weydert ve Cullen, 2010).

Bir başka antioksidan enzim ailesi olan glutatyon S-transferazlar (GST, EC 2.5.1.18), doymamış aldehitler, epoksitler ve hidroperoksitler gibi ikincil metabolitleri etkisiz hale getirirler. GST'lerin üç ana izoformu tanımlanmıştır: sitozolik GST, mitokondriyal GST ve mikrozomal GST. Bu enzimler ksenobiyotiklerin GSH'ye konjugasyonunu katalizlerler, böylece glutatyon-S-konjugatı (GS-X) oluşur (Commandeur ve diğ., 1995).

Bu redoks döngüsü içinde indirgenmiş glutatyonun (GSH) özel bir yeri vardır. Dolayısıyla sitoplazmada bu tripeptidin sentezi için gerekli glutamat sistein ligaz (GCL) ve glutatyon sentetaz (GS) enzimleri de antioksidan savunmanın önemli elemanları olarak değerlendirilmektedir sahiptir (Weydert ve Cullen, 2010).

Önemli antioksidan enzimler ve redoks sistemleri Şekil 2.9'da toplu halde gösterilmiştir.



Şekil 2.9: Antioksidan enzimler ve redoks döngüsü rejenerasyon sistemleri (Alfabetik sırayla kısaltmalar: 6PGL: 6-Fosfoglukonolakton, ATP: Adenozin trifosfat, CAT: Katalaz, G6P: Glukoz 6-fosfat, G6PD: Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, GCL: Glutamat sistein ligaz, GPx: Glutatyon peroksidaz, GR: Glutatyon redüktaz, Grx_{ox}: Oksitlenmiş glutaredoksin, Grx_{red}: İndirgenmiş glutaredoksin, GS: Glutatyon sentetaz, GSH: İndirgenmiş glutatyon, GSSG: Oksitlenmiş glutatyon, GST: Glutatyon S-transferaz, H_2O: Su, H_2O_2: Hidrojen peroksit, HK: Hekzokinaz, $NADP^+$: Oksitlenmiş nikotinamid nükleotid fosfat, NADPH: İndirgenmiş nikotinamid nükleotid fosfat, $O_2^{\cdot-}$: Süperoksit, O_2: Oksijen, Pro_{ox}: Oksitlenmiş protein, Pro_{red}: İndirgenmiş protein, Prx_{ox}: Oksitlenmiş peroksiredoksin, Prx_{red}: İndirgenmiş peroksiredoksin, ROH: Alkol, ROOH: Hidroperoksit, SOD: Süperoksit dismutaz, Trx_{ox}: Oksitlenmiş tiyoredoksin, Trx_{red}: İndirgenmiş tiyoredoksin).

Oksidatif hasara uğramış DNA, protein ve lipitlerin onarımını gerçekleştiren veya ortadan kaldıran onarım enzimleri de bu kategoride yer alır. Onarım enzimlerinden bazıları doğrudan, bazıları dolaylı etki gösterir. Doğrudan onarım süreçlerinden biri proteinlerdeki oksitlenmiş sülfidril gruplarının indirgenmesidir. Proteinlerdeki sülfidril grupları otooksidasyona ve/veya metal katalizli oksidasyona çok yatkındır. Proteinin fonksiyonunu olumsuz etkileyen intra- (aynı proteinde) ve intermoleküler (farklı proteinler arasında) oluşan disülfit bağları bir dereceye kadar hücre içindeki tiyoredoksin (Trx) ve glutaredoksin (Grx) enzimleri (disülfit redüktazlar) tarafından indirgenebilir. Grx, glutatyonile olmuş proteinleri de eski haline döndürür (Davies, 2000; Deponte, 2013; Lee ve diğ., 2013; Aoyama ve Nakaki, 2015) Proteindeki metiyonin amino asit(ler)inin oksitlenerek metiyonin sülfokside dönüşümü de

protein/enzim fonksiyonunda kayba yol açar. Metiyonin sülfoksit redüktaz enzimi oksitlenmiş metiyoninleri indirgeyerek onarım sağlar (Davies, 2000).

2.4.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar vitaminler (C ve E vitaminleri), β-karoten, ürik asit, alfa-lipoik asit, melatonin, koenzim Q, GSH ve bir tiyol (sülfhidril) grubu içeren düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir (Birben ve diğ., 2012; Halliwell ve Gutteridge, 2015; Ighodaro ve Akinloye, 2018). Bu grup antioksidanlar genellikle temizleyici (süpürücü) antioksidanlar olarak adlandırılır. Serbest radikalleri onlara elektron vererek nötralize eder veya temizlerler. Bu süreçte serbest radikallerin kendileri radikal olurlar, ancak daha az zararlı etkileri vardır (Ighodaro ve Akinloye, 2018).

Suda çözünür C vitamini (askorbik asit), hücre içi ve hücre dışı oksijensiz radikalleri temizleyerek sulu faz antioksidan kapasitesini sağlar. Serbest radikalleşmiş E vitaminini, E vitaminine geri dönüştürür. Plazmadaki düzeylerinin yaşla birlikte azaldığı gösterilmiştir (Mezzetti ve diğ., 1996).

Yağda çözünen E vitamini hücre zarının hidrofobik iç bölgesinde yoğunlaşmıştır ve oksidan kaynaklı membran hasarına karşı temel savunmadır. E vitamini, lipit peroksidasyonu sırasında üretilen bir elektronu peroksil radikaline aktarır. α-Tokoferol, E vitaminin en aktif formudur ve hücrede bulunan zara bağlı ana antioksidandır. E vitamini kanser hücrelerinin apoptozunu tetikler ve serbest radikal oluşumunu önler (White ve diğ., 1997).

Glutatyon, çoğu hücrede ve hücre bölmelerinde şaşırtıcı derecede yüksek seviyelerde bulunan bir antioksidan tripeptittir (γ-glutamilsisteinilglisin) (Birben ve diğ., 2012; Deponte, 2013, Pizzorno, 2014). Glutatyon, hücrelerde iki formda bulunur: indirgenmiş (GSH) ve oksitlenmiş (GSSG) glutatyon (Pizzorno, 2014). GSH'nin GSSG'ye oranı, hücrenin redoks durumunu belirler. Glutatyon ayrıca birçok proteinin sülfidril gruplarını indirgenmiş formda tutan bir tiyol tamponu olarak da kabul edilir. Glutatyon sadece sitozolde üretilir ve aktif olarak mitokondriye pompalanır (Pizzorno, 2014).

Hücresel makromoleküllerin endojen ve eksojen reaktif oksijen ve azot türlerinden korunmasında önemli bir rol oynayan glutatyon, hücrelerde 3 şekilde üretilir: (1) glutamat-sistein ligaz (GCL) ve glutatyon sentetaz (GS) enzimleri (ATP gerektirir) tarafından

katalizlenen 2 aşamalı bir işlemle *de novo* sentez, (2) glutatyon redüktaz (GR) ile oksitlenmiş GSSG'nin indirgenmiş GSH'ye rejenerasyonu (NADPH gerektirir), (3) sisteinin konjuge glutatyondan gamma-glutamil-transpeptidaz (γ-GGTP) yoluyla geri dönüşümü (NADPH gerektirir) (Pizzorno, 2014). Glutatyonun sentezinde görevli GCL ve GS ile indirgenmiş formun rejenerasyonunda görevli GR ve γ-GGTP enzimleri antioksidan savunmanın önemli elemanlarıdır (Weydert ve Cullen, 2010).

Glutatyon, antioksidan etkilerini çeşitli şekillerde gösterir. Glutatyon peroksidazın (GPx) etkisiyle hidrojen peroksit ve lipit peroksitleri detoksifiye eder. İndirgenmiş glutatyon, elektronunu H_2O_2'ye verir ve onu H_2O'ya indirger. Oksitlenmiş glutatyon, elektron verici olarak NAD(P)H kullanan glutatyon redüktaz (GR) ile GSH'ye tekrar indirgenir. İndirgenmiş glutatyon, protonları membran lipitlerine verir ve onları oksidan saldırılarına karşı korur (Birben ve diğ., 2012).

Glutatyon antioksidan aktivitesinden başka diğer özelliklere de sahiptir. Glutatyon, C ve E vitaminlerinin aktif formlarına geri dönmesinde rol oynar (Pizzorno, 2014). Ayrıca GSH, proapoptotik ve antiapoptotik yolakları ve hücre çoğalması sinyal yolaklarını düzenler (Masella ve diğ., 2005; Pizzorno, 2014). Bu molekül mitokondriyal işlev ve mitokondriyal DNA'nın (mtDNA) devamlılığı için hayati öneme sahiptir (Pizzorno, 2014). Ayrıca AP-1, NF-kB ve Sp-1 gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerini düzenler ve aktive eder (Birben ve diğ., 2012).

Hem metabolizmasının son ayrışma ürünü olan bilirubin, önemli güçlü bir endojen antioksidandır. Bir sitotoksik atık ürün olarak bilirubinin potansiyel toksisiteye sahip olduğu uzun süredir bilinmektedir, ancak bilirubinin son yıllarda güçlü antioksidan, antienflamatuvar ve immünosupresif özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir (Su ve diğ., 2019b).

Pürin katabolizmasının son ürünü olan ürik asit uzun zaman metabolik bir atık olarak kabul edilmiştir. Ürik asitin gut ve idrar yolu taşları ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir. Bununla birlikte, ürik asitin antioksidasyonda önemli bir rol oynadığı ve insan kanındaki serbest radikallerin yarısından fazlasını temizleyebildiği bulunmuştur. Antioksidan kapasitesi, C vitamini ve E vitaminden çok daha yüksektir (Su ve diğ., 2019b).

2.4.4. Oksidatif Stresin Biyomoleküller Üzerindeki Etkisi

Oksidatif stres meydana geldiğinde, hücreler tüm sistemleriyle oksidanların etkilerini azaltmaya çalışırlar. Bu arada savunma enzimlerini, transkripsiyon faktörlerini ve yapısal proteinleri kodlayan genlerin aktivasyonu veya susturulması ile redoks dengesini geri kazanmaya çalışırlar. Vücutta daha yüksek ROT üretimi, DNA yapısını değiştirebilir, proteinlerin ve lipitlerin modifikasyonu, strese bağlı birkaç transkripsiyon faktörünün aktivasyonu ve pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar sitokinlerin üretimi ile sonuçlanabilir (Birben ve diğ., 2012).

2.4.4.1. Oksidatif Stresin DNA Üzerindeki Etkileri

ROT DNA'da, baz kayıpları (apürinasyon-apirimidinasyonla abazik alanların oluşumu), tek veya çift zincir kırıkları, pürin, pirimidin veya şekere bağlı modifikasyonlar, mutasyon, delesyon veya translokasyonlar ve proteinlerle çapraz bağlanma gibi çeşitli modifikasyonlara yol açabilir. Bu DNA modifikasyonları karsinojenez, yaşlanma, nörodejeneratif, kardiyovasküler ve otoimmün hastalıklarla ilgilidir (Birben ve diğ., 2012; Halliwell ve Gutteridge, 2015). En yaygın ve kapsamlı bir şekilde incelenen DNA oksidasyonu, $OH^{\bullet}$'nin guaninin C-8 pozisyonuna eklenerek 8-okso deoksiguanozin (8-oxodG) oluşmasına yol açan modifikasyondur (Ghosh ve Mitchell, 1999). 8-oxodG, DNA replikasyonunun ilerlemesini etkili bir şekilde engellemediğinden, mutasyon frekansını arttırabilir (Ghosh ve Mitchell, 1999).

Genlerin promotör bölgeleri, transkripsiyon faktörleri için bir takım konsensüs diziler içerir. Bu bölgeler, oksidan ataklarına karşı hassas olan GC'ler bakımından zengin diziler içerir. Transkripsiyon faktörü bağlama bölgelerinde meydana gelen modifikasyonlar (örneğin; 8-oxodG oluşumu), transkripsiyon faktörlerinin (örneğin, AP-1 ve Sp-1) bağlanma durumunu değiştirebilir ve böylece ilgili genlerin ekspresyonunun susturulmasına ve değişmesine neden olur (Ghosh ve Mitchell, 1999; Birben ve diğ., 2012). Tek bir 8-oxodG'nin, AP-1 ve Sp1 transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını inhibe etmek için yeterli olduğu bildirilmektedir (Ghosh ve Mitchell, 1999).

Oksidatif stres, kısa ardışık tekrarlardan oluşan mikro satellit bölgelerinin kararsızlığına neden olur. Redoks aktif metal iyonları ve hidroksil radikalleri mikro satellit kararsızlığını arttırır. Oksidan hasaraları ve tek zincir DNA kırıkları her ne kadar hücreler tarafından hızlıca tolere

edilip onarılsa da, iyonlaştırıcı radyasyonun neden olduğu çift iplikli DNA kırıkları hücre sağkalımı için önemli bir tehdit oluşturabilir (Birben ve diğ., 2012). Gen ekspresyonuna ek olarak, DNA metilasyonu da kromatin organizasyonunu etkiliyor gibi görünmektedir. Oksidatif ataklar tarafından indüklenen yanlış DNA metilasyon paterni kromatin organizasyonunu ve ayrıca DNA onarım aktivitesini olumsuz etkiler (Birben ve diğ., 2012).

2.4.4.2. Oksidatif Stresin Lipitler Üzerine Etkisi

Hücresel zarlar veya organel membranları, içerdikleri doymamış yağ asitleri nedeniyle, "lipit peroksidasyonu" olarak adlandırılan ROT hasarına duyarlıdırlar (Su ve diğ., 2019a). Reaktif oksijen türleri, lipit peroksidasyonunu indükleyerek, membrandaki lipit çift tabaka düzenini bozabilir; membrana bağlı reseptörleri ve enzimleri etkisiz hale getirebilir ve doku geçirgenliğini arttırabilir (Girotti, 1985). Lipit peroksidasyonu fosfolipitlere doğrudan zarar verir ve ayrıca programlanmış hücre ölümünü indükleyen hücre ölüm sinyali olarak iş görebilir. Oksitlenmiş fosfolipitler birçok enflamatuvar hastalıkta önemli roller oynayabilir ve pro-enflamatuvar değişikliklere aracılık edebilir. Son zamanlarda, yeni bir programlanmış hücre ölümü formu olan ferroptozun lipit peroksidasyonundan kaynaklandığı bulunmuştur (Su ve diğ., 2019a).

Lipit peroksidasyonu sonucunda en bol bulunan aldehitler 4-hidroksi-2-nonenal (HNE), malondialdehit (MDA) ve akroleindir (Pizzimenti ve diğ., 2013). Aldehit toksisitesi esas olarak, çoğunlukla hücresel proteinlerle kovalent eklentilerin oluşumuna bağlı olan birkaç hücre fonksiyonundaki değişikliklerden kaynaklanır (Pizzimenti ve diğ., 2013). Malondialdehit ve doymamış aldehitler gibi lipit peroksidasyon ürünleri, protein çapraz bağları oluşmasına neden olur ve birçok hücresel proteini etkisiz hale getirebilir (Siu ve Draper, 1982).

2.4.4.3. Oksidatif Stresin Proteinler Üzerine Etkisi

ROT, peptid zincirinin parçalanmasına, proteinlerin elektrik yükünün değişmesine, proteinlerin çapraz bağlanmasına ve spesifik amino asitlerin oksidasyonuna neden olabilir ve bu nedenle proteolize duyarlılığın artmasına yol açabilir (Kelly ve Mudway, 2003; Birben ve diğ., 2012). Karbonil (CO) grupları (aldehitler ve ketonlar) protein yan zincirlerinde (özellikle Pro, Arg, Lys ve Thr) üretilir ve kimyasal olarak oldukça stabildir (Dalle-Donne ve diğ., 2003).

Proteinlerdeki sistein ve metiyonin kalıntıları oksidasyona daha duyarlıdır. Sülfidril gruplarının oksidasyonu proteinlerde konformasyonel değişikliklere, protein açılımına ve bozulmasına neden olur. Aktif bölgelerinde veya yakınında metal bulunan enzimler, özellikle metal katalizli oksidasyona karşı daha hassastır. Enzimlerin oksidatif modifikasyonları aktivitelerini ortadan kaldırır (Davies, 1987; Stadtman, 1990). Bazı durumlarda, proteinlerin spesifik oksidasyonu gerçekleşebilir. Örneğin, metiyonin, metiyonin sülfokside ve fenilalanin, *o*-tirozine oksitlenebilir (Stadtman ve diğ., 2003; Stadtman ve Levine, 2003).

Oksidatif hasarlar proteinlerin ve peptidlerin parçalanması, elektrik yükünün değişmesi, protein-protein çapraz bağlarının ve protein eklentilerinin oluşması, spesifik proteazlara duyarlılığın artması ve fonksiyon kaybı ile sonuçlanır (Dahl ve diğ., 2015).

2.4.5. Astımda Oksidatif Stres ve Antioksidanların Etkisi

Hücre içi oksidanların kontrolünü kaybetmek, programlanmamış hücre ölümü, hücre döngüsünün tutuklanması, neoplazi (strese duyarsızlığın tetiklediği), dejeneratif, alerjik ve otoimmün hastalıklara neden olabilir (Cho ve Moon, 2010).

Enflamatuvar hücreler (aktive edilmiş eozinofiller, nötrofiller, monositler ve makrofajlar gibi) ve yerleşik hücreler (epitelyal ve düz kas hücreleri gibi) ROT üretebilirler. Akciğerde üretilen ana reaktif azot türü NO'dur. NO'nun oksijenle otoksidasyonu nitritin oluşmasına neden olur. Oluşan nitrit, eozinofil peroksidaz (EPO) ve miyeloperoksidaz (MPO) için substrattır. Nitrik oksit, $ONOO^-$ oluşturmak için süperoksit ile reaksiyona girer ve tirozin kalıntılarını nitrolayıp proteinlere ve enzimlere yapısal ve fonksiyonel zararlar verebilir. Daha yüksek NO seviyeleri, yüksek astım riski, astım şiddeti ve bronkodilatör ajanlara aşırı yanıtla ilişkilidir (Sahiner ve diğ., 2011).

Astım hastalarında oksidatif stresin dolaylı biyobelirteçlerinden olan lipit peroksidasyon ürünleri izoprostanların, plazmadaki ve soluk kondensatındaki düzeylerinin yüksek olduğu rapor edilmiştir (Montuschi ve diğ., 1999; Wood ve diğ., 2000).

Hava yolunda, oksidanların kontrolünü kaybetmek, alerjik enflamasyonun ilk gelişim evresinde immün toleransı uyarmak yerine Th2 aracalı immün yanıtı başlatabilir. Bazı araştırmacılar antijen sunan hücrelerde (APC) ROT'un artması ve antioksidanların azalması ile, immün yanıtın Th2 sitokin tepki modeline uyduğunu bildirmiştir (Cho ve Moon, 2010;

Peterson ve diğ., 1998). Ayrıca, artan oksidatif stres, hava yolu aşırı duyarlılığının (AHR) artması, müsin salgılanmasının uyarılması ve astım ile ilgili olduğuna inanılan çeşitli pro-enflamatuvar kimyasal mediatörlerin uyarılması yoluyla hava yolu enflamasyonunun ilerlemesine katkıda bulunabilir (Cho ve Moon, 2010).

Artan ROT ile bronşiyal astımın patogenezi arasındaki ilişkiyi destekleyen çok sayıda epidemiyolojik ve klinik kanıt mevcuttur. Astımlı hastalardan alınan biyolojik örneklerde oksidatif strese neden olan moleküllerin normal kontrol deneklerine göre daha yüksek düzeyde olduğu bulunmuştur (Vachier ve diğ., 1994). Eksojen oksidanlar arasında sayılan hava kirliliğinin bulunduğu bölgelerde bronşiyal astım insidansının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Battaglia ve diğ., 2005). Astım insidansının artması antioksidan içeren gıdaların alımındaki azalma ile de ilişkili bulunmuştur (Cho ve Moon, 2010; Fogarty ve diğ., 2000).

Bu bulgulara rağmen, astımlı hava yolunda oksidatif stres artışının, sadece kronik hava yolu enflamasyonuna mı, yoksa alerjik enflamasyonun gelişmesine mi katkı sunduğu henüz net değildir. Astım fare modelinde ragweed polen ekstresi kullanılarak yapılan bir çalışmada artan oksidatif stresin bağışıklık tepkisinin verilmesinde kritik bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Bu da ROT'un antijen kaynaklı alerjik hava yolu enflamasyonunun başlatılması ve arttırılmasında önemli bir sinyal sağladığını göstermektedir (Cho ve Moon, 2010).

Akciğerlerin ana enzimatik antioksidanları süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleridir. Bu majör enzimlere ek olarak, diğer antioksidanlar, heme oksijenaz-1 ve redoks proteinleri, örneğin tiyoredoksinler (Trx'ler), peroksiredoksinler (Prx'ler) ve glutaredoksinlerin (Grx'ler), pulmoner antioksidan savunmada önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (Birben ve diğ., 2012). *SOD3* geni tarafından kodlanan Cu/Zn-SOD enzimi vasküler ve kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik hastalıklar, akciğer hastalığı, ateroskleroz, diyabet, hipertansiyon, enflamasyon ve iskemi-reperfüzyon hasarına karşı başlıca enzimatik antioksidan savunmadır (Ighodaro ve Akinloye, 2018). SOD enzimin hücre dışı formları (EC-SOD) temel olarak hücre dışı matriste, özellikle de yüksek miktarda tip I kollajen lifleri içeren bölgelerde ve pulmoner ve sistemik damarların çevresinde lokalizedir. Ayrıca bronşiyal epitel, alveolar epitel ve alveolar makrofajlarda da tespit edilmiştir. Akciğerdeki nispeten yüksek EC-SOD seviyesi, akciğer matrisini koruyan temel bir bileşen olabilir (Zelko ve diğ., 2002). Hem hayvan hem de insan çalışmaları, astım hastalarında bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvısındaki katalaz aktivitesinin sağlıklı kontrollere kıyasla daha

düşük olduğunu göstermiştir. Oksidatif streste düşük katalaz aktivitesi, nitrasyon ve oksidasyona bağlıdır (Ghosh ve diğ., 2006; Sahiner ve diğ., 2011). GPx-3, insan akciğerinde en yaygın olarak araştırılan enzimdir. Hücre dışı glutatyon peroksidaz, astımı olan hastaların akciğerlerinde normalden daha yüksektir (Comhair ve diğ., 2001). Akciğerde, TrxR bronşiyal ve alveoler epitel ve makrofajlarda eksprese edilir (Birben ve diğ., 2012).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KİMYASALLAR

Tez sırasında kullanılan kimyasallar ve tedarikçileri aşağıda listelenmiştir.

1. BsrI (BseNI) restriksiyon enzimi (Thermo Fisher/ER0881)

2. BstuI restriksiyon enzimi (Thermo Fisher/ER0922)

3. Deoksinükleosid trifosfat (dNTP) (Hibrigen)

4. 2,4-Dihidrofenilhidrazin (DNPH) (Fluka)

5. 5,5′-Ditiobis(2-nitrobenzoik asit) DNTB (Sigma / D8130)

6. DNA markır (“ladder”) 50 bç (Hibrigen, MG-LDR50-01)

7. Etanol (MERCK)

8. Etidyum bromür (EtBr, Sigma-Aldrich)

9. Etil asetat (MERCK)

10. $FeCl_3.6H_2O$ [Demir (III) kolorür heksahidrat] (MERCK)

11. $FeSO_4.7H_2O$ [Demir (II) sülfat heptahidrat] (MERCK)

12. Genomik DNA izolasyon kiti (Hibrigen, MG-KDNA-01)

13. Guanidin/ hidroklorür (Aldrich)

14. HCl (MERCK)

15. H_2O_2 (30%) (MERCK)

16. IL-35 (İnterlökin-35) ELISA kiti (ELABSCIENCE, E-EL-H2443)

17. Jel elektroforez yükleme boyası (“DNA loading dye”) (Hibrigen, MG-LDYE-01)

18. L-Glutathione reduced (GSH) (Cayman/70-18-8)

19. NIa IV restriksiyon enzimi (Thermo/ER1152)

20. Oligonükleotid-primer sentezi (Macrogen)

21. PCR pürifikasyon kiti (Hibrigen)

22. Pfu polimeraz (Hibrigen)

23. PstI restriksiyon enzimi (Thermo Fisher/ER0611)

24. Sodyum asetat trihidrat ($C_2H_3NaO_2$. $3H_2O$) (MERCK, 6131-90-4)

25. 1,1,3,3-Tetrametoksipropan (Sigma, T9889)

26. Trikloroasetik asit (TCA) (Sigma, T6399)

27. 2,4,6-Tripiridiltriazin (TPTZ) (Sigma, 93285)

3.2. EKİPMAN ve ENSTRÜMANLAR

1. Agaroz jel elektroforez sistemi (BioRad)

2. Hassas terazi (Shimadzu ATX 224)

3. İnkübasyon cihazı (KOTTERMANN)

4. Mikropipet (Capp)

5. Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre cihazı (BİOTEK, Eon)

6. Mikrosantrifüj (Abott)

7. Otoklav cihazı (Nüve)

8. PCR cihazı (BioRad)

9. pH-metre (Jenco)

10. Sonikasyon cihazı (Daihan Scientific, Wisd)

11. Saf/Ultra saf su cihazi (Millipore)

12. Santrifüj (BECKMAN COULTER)

13. Santrifüj (Sigma, 3-30K)

3.3. ÇALIŞMA GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Bu çalışma 2017-2019 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı işbirliği ile gerçekleştirildi. Çalışma, İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Ek 1). İnsan denekleri içeren tüm prosedürler, 1983 yılında alındığı üzere 1975 tarihli Helsinki Bildirgesi'ne uygun yürütüldü. Tüm deneklerden (120 hasta ve 120 sağlıklı birey) yazılı bilgilendirilmiş onam formu alındı. Hastalar, ilgili birimin İmmünoloji ve Alerjik Hastalıklar Kliniğinde takip edilen erişkin astım hastaları arasından seçildi. Tüm bireylerden yaş, ikamet, kilo, sigara/alkol kullanımı, tıbbi geçmiş, ilaç öyküsü ve alerji durumunu içeren ayrıntılı bir öykü alındı. Ayrıca tam kan sayımı, IgE düzeyi ve alerji tespiti için 12 yaygın alerjenle (Allegropharma, Reinbek, Almanya) yapılmış epidermal deri testi ("Prick test") sonuçları kaydedildi. Tüm hastalarda polen, ev tozu akarları veya her ikisine de pozitif deri testi yanıtı mevcuttu. Kronik akciğer hastalıkları, kronik romatolojik hastalıklar, kronik karaciğer yetmezliği, kronik böbrek hastalığı, kronik kalp yetmezliği ve kötü huylu tümöre sahip hastalar çalışmaya alınmadı. Kan örneklemesinden önceki dört hafta içinde hiçbir hasta herhangi bir antioksidan takviyesi ve sistematik kortikosteroid almıyordu ve ayrıca solunum yolu enfeksiyonu yoktu. Kontrol grubu için, herhangi bir alerjik veya solunum yolu hastalığı olmayan sağlıklı kişiler seçildi.

3.3.1. Astım Kontrol Testi

Hastalar astım kontrol testinde (AKT) aldıkları skora göre gruplandırıldı (Nathan ve diğ., 2004). Bu test; astımın, hastanın günlük yaşamını nasıl etkilediğini değerlendiren 5 sorudan oluşmakta (Ek 2) ve 4 haftalık dönemde astımın ne kadarının kontrol altına alındığını göstermektedir. Her bir soru 5 puan olup, toplam skor 25'tir. Bu projede, kullanılan kontrol testine göre; sırasıyla tam kontrollü (TK/skor 25), kısmen kontrollü (KK/skor 20-24 arası) ve kontrolsüz (KS/skor ≤19) olmak üzere hastalar 3 alt gruba ayrıldı. Elde edilen bazı veriler için

toplam hasta-sağlıklı karşılaştırması yapıldığı gibi bu alt hasta grupları da birbiriyle kıyaslandı.

3.3.2. Kanların Elde Edilmesi ve Kana Uygulanan İşlemler

Astım tanısı koyulan hastalardan ve sağlıklı bireylerden (kontrol grubu), birer adet biyokimya tüpüne (9 mL), bir EDTA içeren tüpe (9 mL) ve bir diğer EDTA içeren tüpe (2 mL) kan örneği alındı. Alınan kan örnekleri İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Proteomik Laboratuvarına getirildi. 9 mL'lik biyokimya tüpündeki ve EDTA'lı tüpteki örnek 2000×g'de, 4°C'de, 15 dakika santrifüj edilerek plazma ve serum ayrıştırıldı. Numuneler, 0.5 mL'lik kısımlara bölündü. Plazma ve serum örnekleri biyokimyasal ölçümler alınıncaya kadar saklanmak üzere -80°C derin dondurucuya kaldırıldı. EDTA'lı tüpe alınan 2 mL'lik kan örneğinden, ticari bir kit (HibriGen/ kandan DNA izolasyon kiti/ MG-GDNA-02) yardımıyla genomik DNA izole edildi.

3.4. POLİMORFİZM ANALİZİ

Seçilen SNP'lerin (rs3761548, rs3761549, rs20541 ve rs1881457) analizi için genomik DNA hasta ve sağlıklı bireylerden elde edildi. Uygun primer tasarlanarak SNP'lerin amplifikasyonu yapıldı ve sonra restriksiyon fragman (parça) uzunluk polimorfizmi (RFLP) analizi uygulandı. Yapılan işlemler sırasıyla aşağıda verilmiştir.

3.4.1. DNA İzolasyonu

Genomik DNA, ticari bir kit (HibriGen/Kandan DNA İzolasyon Kiti) ile tam kandan izole edildi. İzolasyon aşamaları aşağıda verilmiştir.

- 400 µL koagüle olmamış total kan 1.5 mL'lik santrifüj tüpüne koyularak, üzerine 800 µL parçalama tamponu (kit içindeki "Lysis Buffer", LB) pipetaj yapılarak eklendi. Karışım homojen hale getirildi.

- Örnek 2-3 dk oda sıcaklığında tüpler ters düz edilerek bekletildikten sonra 7.500×g'de 3 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.

• Pelletin üzerine 200 µL DS tamponu (kit içindeki "Digestion Buffer") eklendi, pipetaj yapılarak pelletin parçalanması sağlandı. Homojen bir görüntü oluşana kadar vorteks ile karıştırma işlemi gerçekleştirildi.

• Üzerine 20 µL proteinaz-K ve 220 µL bağlanma tamponu (kit içindeki "Binding Buffer", BB) eklenerek, 65°C'de 20 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında birkaç dakika ara ile tüpler ters düz edildi.

• İnkübasyondan sonra örneklerin üzerine 220 µL önceden 4ºC'ye soğutulmuş etanol eklendi ve vorteks ile karıştırıldı. Karışım filtreli tüplere alınarak 12.000×g'de 2 dk santrifüj edildi, filtreden geçen ve altta kalan sıvı kısım döküldü.

• Filtrenin üzerine 500 µL yıkama tamponu (kit içindeki "Wash Buffer") eklenerek 12.000×g'de 1 dk santrifüj edildi. Filtrenin altı boşaltıldı.

• Filtre herhangi bir reaktif eklenmeden boş olarak 12.000×g'de 2 dk santrifüj edildi.

• Filtre altı atıldıktan sonra filtre yeni bir mikrotüpe yerleştirildi. Filtrenin üzerine 50 µL elüsyon tamponu (kit içindeki "Elution Buffer") eklenerek 4-5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 12.000×g'de 2dk santrifüj edilerek filtre atıldı.

• Son olarak, elde edilen DNA'lar bir mikrotüpte toplandı ve spektrofotometrede (Nanodrop) 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorpsiyonları ölçülerek miktar ve saflık kontrolleri yapıldı (Topal Sarıkaya, 2017). DNA miktarı aşağıdaki Denklem 3.1'e göre hesaplandı:

$$\text{DNA (µg/mL)} = \text{A260} \times \text{suladırma oranı} \times 50 \quad (3.1)$$

A_{260}/A_{280} oranı 1.75'in üzerinde olan DNA örnekleri saf kabul edildi.

- Örnekler ileri aşamalar için -20ºC'de saklandı.

3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyon

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), 50-100 ng DNA, 0.8 µL mM dNTP karışımı, 20 pmol ileri ve geri primer (Tablo 3.1), 2.5 µL $MgCl_2$ içeren PCR tamponu ve 0.5 U Pfu DNA polimeraz kullanılarak toplam 25 µL hacimde gerçekleştirildi.

PCR şartları;

- Başlangıç Denatürasyonu: 94°C'de 2 dk,
- Denatürasyon: 94°C'de 30 sn,
- Primer Bağlanma: 60-65 °C'de 30 sn/35 döngü,
- Uzama: 72°C'de 45 dk,
- Son Polimerizasyon: 72°C'de 7 dk olacak şekilde ayarlandı.

PCR ürünlerinin degrade olmaması için işlem bittikten sonra sıcaklık +4°C' ye ayarlandı. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi yapılana kadar buzdolabında muhafaza edildi. Tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) analizinde kullanılan ileri ve geri primerler, primerlerin kalıba bağlanma sıcaklıkları ve PCR ürününün uzunluğu Tablo 3.1'de gösterildi.

Tablo 3.1: SNP analizinde kullanılan primer dizileri, primerlerin kalıba bağlanma sıcaklıkları ve PCR ürününün uzunluğu.

SNP (Kodu)	**İleri ("Forward") Primer**	**Geri ("Reverse") Primer**	**Bağlanma Sıcaklığı (ºC)**	**PCR ürünü**
rs3761548 -3279C/A	5′-CCTCTCCGTGC TCAG TGTAG -3′	5′-CACAGCCTGACTGA CTGACAT-3′	62ºC	379 bç
rs3761549 -2383C/T	5'-CTGAGACTTTGG GAC CGTAG-3'	5'-TGCGCCGGGCTTCA TCGACA-3'	61ºC	388 bç
rs20541 +2044G/A	5'-CTTCCGTGAGGACTGAAT GAG ACG GTC-3'	5'-GCAAATAATGATGC TTTCGAAGTTTCAGTGGA-3'	61ºC	235 bç
rs1881457 -1512A/C	5'-CAACCGCCGCG CCAGCGCCTTCTC-3'	5′-CCGCTACTTGGCCGTG TGACCGC-3′	68 ºC	245 bç

3.4.3. Agaroz Jel Hazırlanması ve PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

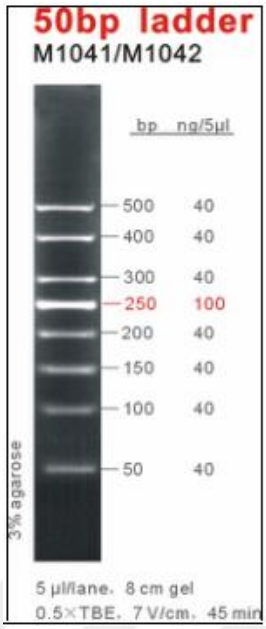
PCR işlemi sonrası, amplifiye olmuş DNA'lar agaroz jelde görüntülendi. Jel hazırlamasında kullanılan agar ve tampon miktarları Tablo 3.2'de verildi.

Tablo 3.2: Agaroz jellerin hazırlanmasında kullanılan malzemeler ve tampon miktarları.

	Agaroz %'si, hacmi	
Malzemeler	**%2 lik, 40 mL**	**%3 lik, 40 mL**
Agaroz	0.8 g	1.2 g
TAE (1X)	40 mL	40 mL
Etidyum bromür	3 µL	3 µL

Uygulanan prosedürün aşamaları aşağıdaki gibidir:

- Gerekli miktarda agaroz tartılarak erlene koyuldu,
- Uygun hacimde TAE (Tris-asetat-EDTA, 1X) eklendi.
- Karışım hafifçe çalkalanıp mikrodalga fırına koyuldu.
- Kaynama başladıktan sonra mikrodalganın ayarı düşürüldü. Agaroz tamamen eriyene kadar ara ara çalkalanarak ısıtıldı.
- Karışımın üzerine 3 µL etidiyum bromür eklendi ve çalkalayarak tüm çözeltiye homojen bir şekilde dağılması sağlandı.
- Yatay elektroforez tablasına (Bio-Rad/Mini-Sub Cell GT Systems) uygun tarak yerleştirildi ve karışım tepsiye yavaşça döküldü, polimerize olması için en az 15 dakika bekletildi.
- Jel tanka yerleştirildi ve tank jelin üstünü kapatacak şekilde TAE tamponu (1X) ile doldurudu.
- PCR ürünü (5 µL) ve yükleme tamponu (1 µL) parafilm parçası üzerinde karıştırıldı ve tamamı jeldeki kuyucuklara yüklendi. Ürünlerin boyutunu kontrol etmek amacıyla, ayrı bir kuyucuğa aşağıda jel görüntüsü verilen DNA markır (“ladder”) karışımı (50 bç, Hibrigen) uygulandı (Şekil 3.1). PCR ürünleri, uygun voltajda (70 Volt/40 dk) yürütüldükten sonra jel görüntüleyicide görüntü analizi yapıldı ve görüntü dijital ortama kaydedildi.



Şekil 3.1: 50 bç DNA markır ("ladder") (Hibrigen) için beklenen agaroz jel görüntüsü ve bantların büyüklüğü.

3.4.4. Restriksiyon Fragman (Parça) Uzunluk Polimorfizmi Analizi

Restriksiyon endonükleazları, uzun DNA'ları kısa parçalara kesen enzimlerdir. Her bir restriksiyon endonükleazı, bir DNA zincirinde farklı bir nükleotid dizisini hedefler ve bu bölgeden kesim yapar. RFLP (Restriksiyon Fragman Parça Uzunluk Polimorfizmi, "Restriction Fragment Lenght Polymorphism")-PCR yöntemi, restriksyon endonükleazlarıyla DNA'nın farklı uzunlukta fragmanlara ayrılarak incelenmesine dayanmaktadır ve tek baz değişikliklerini bile belirleyebilen bu genotipleme yöntemi, polimorfizm çalışmalarında yaygın şekilde kullanılmaktadır (Chang ve diğ., 2010). Bu çalışmada uygulanan işlemler sırası ile aşağıda verilmiştir.

3.4.4.1. RFLP-PCR Prosedürü

Her PCR ürününden 10 µL alınıp PCR tüplerine aktarıldı ve üzerlerine 1 µL restriksiyon enzimi (10U/µL) ilave edildi. Bu karışım enzimin özelliğine göre uygun sıcaklıkta (Tablo 3.3) 1-16 saat arası inkübe edildi ve sonra %2-%3'lük agaroz jelde DNA markır ile beraber yürütüldü. Agaroz jelde yürütülüp, etidyum bromür boyası ile boyandıktan sonra fragmanların uzunlukları, literatürdeki (Hosseini ve diğ., 2015; Fazelzadeh Haghighi ve diğ., 2015; Graves

ve diğ., 2000) verilere göre değerlendirildi. Kullanılan restriksiyon enzimleri ve özellikleri ile RFLP reaksiyon bileşenleri ve miktarları sırasıyla Tablo 3.3'de ve Tablo 3.4'de verildi.

Tablo 3.3: Kullanılan restriksiyon enzimleri ve özellikleri.

Enzim	Tanıma Dizisi	Üretici Firma	Çalışma Sıcaklığı
BseNI (BsrI)	5'...A C T GG N↓...3' 3'...T G A C↑C N...5'	ThermoSCIENTIFIC	65°C
Bsh1236I (BstUI)	5'...C G↓C G...3' 3'...G C↑G C...5'	ThermoSCIENTIFIC	37°C
PstI	5'...C T G C A↓G...3' 3'...G↑A C G T C...5'	ThermoSCIENTIFIC	37°C
BspLI (NlaIV)	5'...G G N↓N C C…3' 3'...C C N↑N G G...5'	ThermoSCIENTIFIC	37°C

Tablo 3.4: RFLP reaksiyon bileşenleri ve miktarları.

Reaksiyon Karışımı	Kullanılan Miktar (µL)
Tampon (10x)	2 µL
Restriksiyon Enzimi	1 µL
PCR Ürünü	10 µL (0.1-0.5 µg DNA)
Distile Su	18 µL
Toplam Hacim	31 µL

Ayrıca bu araştırmada RFLP-PCR sonuçlarını doğrulamak için her bir genotipe dizileme yaptırıldı. Bunun için PCR ürünleri agaroz jelde ayrıştırıldıktan sonra ticari kit (HibriGen) kullanılarak saflaştırıldı ve sonra Sanger metodu ile dizileme yapan özel bir labratuvara gönderilerek dizi bilgisine ulaşıldı.

3.4.4.2. Agaroz Jelden Saflaştırma ve Dizileme ile Doğrulama

PCR ürünlerini dizileme ile doğrulamak için ticari bir pürifikasyon kiti (Hibrigen, MG-PPCR-01) kullanıldı. Bu amaçla sırası ile aşağıdaki aşamalar uygulandı:

- PCR ürünü % 0.7 lik agaroz jelde yürütüldü.
- Jelden hedef bantlar ayrıldı.

- Mikrotüp tartılarak darası alındı ve sonra jelden ayrılan bantlar ayrı ayrı tüplerin içine aktarıldı ve yeniden tartıldı.
- Her 10 mg agaroz jel için, 20 µL Eritme tamponu (kit içindeki "Melting Buffer") eklendi.
- Tüpler 15 dk, 55ºC'de bekletildi.
- Erimiş jel, filtreli tüplere aktarıldı ve 12.000×*g*'de 2 dk santrifüj edildi.
- Sonra her bir tüpe 500 µL yıkama tamponu (kit içindeki "Wash Buffer") eklendi ve 12.000×*g*'de 1 dk santrifüj edildi.
- Tüplerin ağzı 2 dk açık bırakıldı.
- Filtrat temiz bir mikrotüpe alındı.
- Son olarak filtrat üzerine 25 µL elüsyon tamponu (kit içindeki "Elution Buffer") eklendi ve 1 dk 12.000×*g*'de santrifüj edildi.
- Süpernatantta elde edilen saf PCR ürünleri primerler ile beraber dizileme labratuvarına gönderildi.

3.5. SERUM IL-35 DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ

IL-35 düzeyi ELISA (enzim bağlı immünosorbent testi) yöntemi ile belirlendi. Bunun için ticari ELISA kiti (Elabscience ELISA kit, E-EL-H2443) kullanıldı. Bu kit insan biyolojik sıvılarında (serum, plazma) IL-35 düzeyinin tayini için uygundur ve çalışma prensibi sandviç-ELISA yöntemine dayanmaktadır. Mikroplaka kuyucukları insan IL-35'e özgü bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Örnek ve standartlar kuyucuklara eklenerek IL-35'in antikoruna bağlanması sağlanır. Daha sonra insan IL-35'e özgü biyotinile tespit antikoru (primer antikor) ve ardından HRP konjüge streptavidin (sekonder antikor) ile işleme sokulur. Son olarak HRP'nin substratını [TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin)] içeren reaktif eklenir ve IL-35 düzeyine göre mavi renk oluşur. Son aşamada durdurma solüsyonu eklenir ve absorbans değerleri 450 nm'de okunur. Standart ve örnek seyreltici (kitin içindeki "Reference Standard & Sample Diluent")'den oluşan kör örneğe karşı okunan absorbans değeri insan IL-35 konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Yapılan işlemler aşağıda sıralanmıştır:

- 100 µL örnek ve standart kuyucuklara eklendi ve 90 dk 37ºC sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. Kör için kuyucuğa 100 µL Standart ve örnek seyreltici eklendi.

- Örnek ve standartların fazlası kuyucuklardan uzaklaştırıldı, 100 µL biyotinile tespit antikor solüsyonu (“Biotinylated Detection Ab Working Solution”) eklendi ve sonra 60 dk 37ºC sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı.

- Biyotinile tespit antikor solüsyonunun fazlası uzaklaştırarak kuyucuklar 3 kez 350 µL yıkama tamponu (“Wash Buffer”) ile yıkandı.

- 100 µL HRP konjuge streptavidin solüsyonu (“HRP Conjugate Working Solution”) kuyucuklara eklendi ve 30 dk 37ºC sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. .

- HRP konjuge streptavidin solüsyonu uzaklaştırılarak kuyucuklar 5 kez 350 µL yıkama tamponu (“Wash Buffer”) ile yıkandı.

- Her bir kuyucuğa 90 µL substrat reaktifi (TMB) eklendi ve 20 dk 37ºC sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı.

- 50 µL durdurma solüsyonu (“Stop Solution”) kuyucuklara eklendi.

- Son aşamada Standart ve örnek seyreltici içeren kör örneğe karşı 450 nm'de absorbans okuması gerçekleştirildi.

- Serum IL-35 düzeyinin belirlemesi için ticari kitin talimatına göre bir standart eğri grafiği hazırlandı. Bunun için kitte bulunan referans standart çözeltisinden (kitin içinde “Reference Standard”) seri seyreltme yöntemi ile, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.25 pg/mL ve 15.63 pg/mL konsantrasyonlarda referans çözeltiler hazırlandı. Referans çözeltilere uygulanan ELISA testi sonucunda elde edilen absorbans değerleri y eksenine konsantrasyon değerleri x eksenine koyularak standart eğri grafiği oluşturuldu.

- Standart grafiğin doğru denkleminden yararlanarak örneklerdeki IL-35 düzeyi hesaplandı ve sonuçlar pg IL-35/mL serum cinsinden ifade edildi.

3.6. OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİNİN ANALİZİ

3.6.1. Plazmada Protein Karbonil Tayini

Plazmada protein karbonil tayini Levine ve diğ. (1990) tarafından tarif edilen yönteme göre yapıldı. Bu yöntem spektrofotometrik bir yöntemdir ve 2,4-dihidrofenilhidrazin (DNPH)'in proteindeki karbonillenmiş amino asitlerle reaksiyona girmesi ve sarı renkli DNPH türevi (protein hidrazon) oluşturması prensibine dayanmaktadır. Absorbans ölçümü 370 nm'de yapılmaktadır. Kullanılan reaktifler ve prösedür aşağıda verilmiştir:

Reaktifler:

- 2M HCl deiyonize suda (dH_2O) hazırlandı.
- 10 mM DNPH 2M HCl içinde hazırlandı.
- TCA (trikloroasetik asit) konsantrasyonu %10 ve %30 (w/v) olacak şekilde dH_2O'da, ağzı kapalı bir kapta hazırlandı.
- 6M guanidin/hidroklorür 20 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.5) içinde hazırlandı.

Prosedür:

- Plazma örnekleri fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile 10 kat sulandırıldı ve her bir tüpe 200 µL sulandırılmış plazma örneği eklendi.
- Sulandırılmış plazma üzerine 800 µL 2M HCl içinde hazırlanmış 10 mM DNPH eklendi. Kör tüpüne ise 800 µL 2M HCl eklendi.
- Tüpler 1 saat, oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra kör ve örnek tüplerine 500 µL %30'lık (w/v) soğuk TCA eklendi ve 5 dk buz üzerinde bekletilip 10.000×*g*'de, 4ºC'de, 10 dk santrifüjlendi.
- Örnek tüpüne proteinlerin çökmesi için 200 µL, %10' luk (w/v) soğuk TCA eklendi ve vortekslendi ve ardından yeniden santrifüjlendi.

- Santrifüjlemeden sonra süpernatant kısmı atıldı, örnek tüplerindeki pelletler 3 kez soğuk (1:1) (v/v) ethanol/etil asetat karışımı ile yıkandı ve 10.000×g'de santrifüjlendi.

- Son aşamada fosfat tamponu içinde hazırlanmış 1 mL 6 M guanidin/hidroklorür eklenen tüpler 15 dakika 50-60°C'de bekletildi.

- Tüpler 10.000 ×g'de, 4ºC'de, 3-5 dk santrifüjlendi.

- Absorbanslar spektrofotometrede 370 nm'de köre karşı ölçüldü ve kaydedildi.

- Örneklerdeki DNPH konsantrasyonları aşağıda verilen Denklem 3.2'ye göre hesaplandı ve nmol PK/mL plazma birimiyle ifade edildi.

$$A = \varepsilon \times d \times c \qquad (3.2)$$

A= 370 nm'de absorpsiyon

ε= DNPH'nin absorpsiyon katsayısı (22.000 M^{-1} cm^{-1})

b= ışık yolu (cm)

c= Örnekteki DNPH (M) konsantrasyonu

- Protein karbonil miktarını nmol/mg protein birimiyle ifade etmek için, her bir örnekteki total protein miktarı belirlendi. Referans olarak reaksiyonun son aşamasında belirlemek için 370 nm paralel olarak 280 nm'de yapılan absorbans ölçüldü. Son aşamada kalan total protein miktarını belirlemek için guanidin/hidroklorür ve BSA'dan kalibrasyon eğrisini hazırlandı ve 280 nm'de absorbans ölçüldü.

3.6.2. Plazmada Lipit Peroksidasyon Ürünlerinin Tayini

Plazma örneklerindeki malondialdehit (MDA) (bir lipit peroksidasyon ürünü) düzeyi, Buege ve Aust (1978) tarafından tanımlanan yönteme göre, tiyobarbitürik asit reaktif maddelerin (TBARS) ölçülmesiyle belirlendi. Bu yöntemde, plazmadaki lipit peroksitler tiyobarbitürik asit (TBA) ile aerobik koşullarda, pH 3.5'da, 95ºC'de inkübe edildiğinde 530 nm'de absorbsiyon yapan pembe renkli bir kompleks oluşturur. Standart madde 1,1,3,3-tetrametoksipropan ile hazırlanan standart eğri grafiği yardımıyla lipit peroksit düzeyleri belirlenir. Kullanılan reaktifler ve prosedür aşağıda verilmiştir:

Reaktifler:

- TBARS reaktifi, eşit hacimde %15 TCA, %0.375 TBA ve 0.25N HCl çözeltilerinin karıştırılmasıyla elde edildi.
- TCA konsantrasyonu %15 (w/v) olacak şekilde dH_2O'da, ağzı kapalı bir kapta hazırlandı.
- TBA (tiyobarbitürik asit) konsantrasyonu %0.375 (w/v) olacak şekilde dH_2O'da hazırlandı.
- 0.25N HCl dH_2O'da hazırlandı.
- %0.02 (w/v) Butillenmiş hidroksitoluen (BHT) etanol içinde hazırlandı.

Prosedür:

- 0.5 mL plazma örneği üzerine 2 mL taze hazırlanmış TBARs reaktifi eklendi. Kör için plazma yerine distile su kullanılarak üzerine 2 mL TBARs eklendi.
- Test sırasında yapay lipit peroksidasyonunu önlemek için karışımın üzerine antioksidan olarak etanol içinde hazırlanmış 20 µL %0.02 (w/v) butillenmiş hidroksitoluen (BHT) eklendi.
- Örnekler 15-30 dakika 100ºC'lik kaynar su banyosunda bekletildi, sonra soğutuldu.
- Oluşan çökelti, 4.500×g'de 15 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldı; pembemsi renkteki süpernatant alındı.
- Absorbanslar 532 nm'de köre karşı okundu.
- Standart madde olarak 1,1,3,3-Tetrametoksipropan kullanıldı. Kalibrasyon eğrisini çizmek için 1,1,3,3-Tetrametoksipropan'in 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 ve 0.312 nmol/mL'lik çözeltileri dH_2O'da hazırlandı. Konsantrasyona karşı absorbans değerleri koyularak standart eğri grafiği çizildi.
- Bu grafiğin doğru denklemi kullanılarak örneklerin MDA içeriği hesaplandı.
- Sonuçlar, nmol MDA/mL plazma cinsinden ifade edildi.

3.6.3. Plazmada İndirgenmiş Glutatyon Tayini

İndirgenmiş glutatyonun tayini için Moron ve diğ. (1979) tarafından önerilen protokol kullanıldı. Bu yöntemde GSH sülfidril grupları, Ellman reaktifi [5.5 - ditio bis 2-nitrobenzoik asit (DTNB)] ile reaksiyona girer ve sonra indirgenme oranı UV-Vis spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda ölçülür. GSH hava karşısında oksidasyona uğrar, buna bağlı hatadan kaçınmak için plazma örnekleri hızlı bir şekilde 4ºC'de ayrıştırıldı ve -80ºC'de saklandı. Analiz sırasında plazma örneklerinin daha az hava ile karşılaşması için önlemler alındı. İndirgenmiş glutatyon düzeyinin belirlemesinde kullanılan reaktifler ve ölçüm aşamaları aşağıda sıralanmıştır:

Reaktifler:

- TCA konsantrasyonu %25 (w/v) olacak şekilde dH_2O'da hazırlandı.
- 0.2 M Sodyum fosfat tamponu (pH 8) hazırlandı.
- 1 mM DTNB, 0.2 M sodyum fosfat tamponu (pH 8) içinde hazırlandı.

Prosedür:

- 200 µL plazma örneği üzerine, 200 µL %25 (w/v) TCA çözeltisi eklenerek proteinlerin çökmesi sağlandı. Kör tüpüne 200 µL dH_2O üzerine 200 µL %25 (w/v) TCA çözeltisi eklendi.
- Tüpler 5 dakika buz içinde soğutulduktan sonra, karışım 2000×g'de 5 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatant kısmından 20 µL alınarak 96 kuyucuklu mikroplakanın kuyucuğuna koyuldu ve üzerine 150 µL 0.2 M fosfat tamponu ve 50 µL taze hazırlanmış 1 mM DTNB çözeltisi ilave edildi.
- On dakika sonra oluşan sarı renkli kompleksin absorbansı mikroplaka okuyucu spektrofotometrede, 412 nm'de köre karşı ölçüldü.
- Plazma GSH miktarının belirlenmesi için, paralel olarak GSH standart eğri grafiği çizildi. GSH'nin standart eğrisi için, 1 mg/mL GSH stok çözeltisinden, sonra bu çözeltiden 53.3,

26.4, 13.2, 6.6 ve 3.3 nmol/mL konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı, fosfat tamponu ve DTNB ile işleme sokularak absorbans değeri ölçüldü.

- Konsantrasyona karşı absorbans değeri koyularak standart eğri grafiği çizildi.
- Bu grafiğin doğru denklemi kullanılarak örneklerin GSH içeriği hesaplandı.
- Sonuçlar nmol GSH/mL plazma birimiyle ifade edildi.

3.6.4. Plazma Ferrik İyon İndirgeme Antioksidan Gücünün Belirlenmesi

Ferrik iyon indirgeme antioksidan gücü (FRAP) için Benzie ve Strain (1996) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. FRAP testinde düşük pH'da ferrik iyon (Fe^{3+}), indirgenerek ferro iyona (Fe^{2+}) dönüşür ve TPTZ (2,4,6-Tripiridiltriazin) ile mavi renkli ferro-tripiridiltriazin kompleksi oluşturur. Bu kompleksin 593 nm'deki absorbansı ölçülür ve konsantrasyonu standart grafik yardımıyla belirlenir. FRAP ölçümünde kullanılan reaktifler ve ölçüm aşamaları aşağıda verilmiştir:

Reaktifler:

- 300 mM asetat tamponu için, sodyum asetat trihidrat distile suda hazırlandı ve sonra glasiyel asetik asit ekleyerek pH 3.6'ya ayarlandı.
- 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyltriazine) çözeltisi, 40 mM HCI içerisinde TPTZ'nin çözdürülmesiyle hazırlandı.
- 20 mM $FeCl_3.6H_2O$ dH_2O çözülerek hazırlandı.
- Taze FRAP çözeltisi 10:1:1 oranında sırasıyla 300 mM asetat tamponu, 10 mM TPTZ ve 20 mM $FeCl_3.6H_2O$ reaktiflerinden hazırlandı.

Prosedür:

- Plazma örnekleri distile su ile 10 kat sulandırıldı. Sulandırılmış her bir örnekten 96 kuyucuklu mikroplaka kuyucuğuna 10 µL koyuldu ve taze FRAP reaktifinden 200 µL eklendi. Kör için dH_2O eklendi.
- Mikroplaka çalkalayıcıda 1dk çalkalandı.

- Mikroplaka 37ºC sıcaklıkta, karanlıkta 30 dakika bekletildi.
- Absorbans değerleri 593 nm'de köre karşı ölçüldü ve kaydedildi.
- Standart madde olarak $FeSO_4.7H_2O$ (Demir (II) sülfat heptahidrat) kullanıldı. Standart eğri grafiğini çizmek için suda hazırlanmış 100, 80, 60, 40, 20, 10 ve 5 nmol/mL konsantrasyonlarda $FeSO_4.7H_2O$ çözeltileri kullanıldı. Standart grafik konsantrasyona karşı absorbans değerleri yerine koyularak çizildi.
- Bu grafiğin doğru denklemi kullanılarak örneklerin FRAP değerleri hesaplandı.
- Sonuçlar nmol FRAP/mL plazma birimiyle ifade edildi.

3.6.5. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Serum örneklerindeki katalaz aktivitesini belirlemek için Beers and Sizer (1952) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Bu yöntemde katalaz aktivitesi, H_2O_2'nin indirgenme miktarına göre belirlenir. Reaksiyon karışımının absorbansı UV-Vis spektrofotometrede 240 nm'de 2 dk boyunca ölçülmektedir. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edilir. Aktivite tayininde kullanılan reaktifler ve prosedür aşağıda verilmiştir:

Reaktifler:

- 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.4) dH_2O içinde hazırlandı.
- 40 mM hidrojen peroksit (H_2O_2) hazırlanmak için 453 µL %30 H_2O_2 çözeltisi, fosfat tamponu ile son hacim 100 mL olacak şekilde seyretildi.

Prosedür:

- Fosfat tampon tuz çözeltisi (PBS) ile 40 kat sulandırılmış 15 µL serum örneği 96 kuyucuklu mikroplakanın kuyucuğuna uygulandı. Kör için ayrı bir kuyucuğa 15 µL fosfat tamponu pipetlendi.
- Daha sonra örnek ve kör kuyucuklarına 136 µL fosfat tamponu eklendi.
- Her bir kuyucuğa 96 µL 40 mM H_2O_2 eklendi.

- H_2O_2 eklendikten hemen sonra 240 nm'de absorbans düşüşü 2dk boyunca kaydedildi ve dakika başına absorbans değişimi (ΔA_{240}/dk) hesaplandı.

- Serum total protein düzeyi Bradford yöntemi (1976) ile belirlendi (3.6.6) ve katalaz aktivitesi miligram protein başına ΔA_{240} / dk olarak ifade edildi.

3.6.6. Total Protein Düzeyinin Belirlenmesi

Kullanılacak serum örneklerindeki total protein miktarı Bradford (1976) yöntemi ile belirlendi. Standart olarak BSA (sığır serum albümin) kullanıldı. Kullanılan reaktifler ve prosedür aşağıdaki gibidir:

Reaktifler:

- 5x Bradford reaktifini hazırlamak için Coomassie parlak mavisi (G-250) 50 mL %95 etanol içinde 100 mg çözündürülerek üzerine 100 mL %85 (w/v) fosforik asit eklendi.

- Boya tamamen çözündükten sonra son hacim deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı.

- Kullanmadan önce Whatman # 1 kâğıdı ile filtre edildi.

Prosedür:

- 5X Bradford reaktifi 5 kez sulandırılarak 1X hazırlandı ve Whatman # 1 kâğıdı ile filtre edildi.

- 250 µL 1X Bradford reaktifi mikroplakanın her bir kuyucuğuna koyuldu.

- Serum örnekleri dH_2O ile 200 kez sulandırıldı.

- Örnek (sulandırılmış serum) ve körden (dH_2O) 5 µL kuyucuklara eklendi.

- Mikroplaka 2-3 dk hafifçe çalkalandı.

- Son aşamada mikroplaka 10 dk karanlıkta bekletildikten sonra 595 nm'de absorbans okuması gerçekleştirildi.

- Standart eğri grafiğini hazırlamak için, 0.25, 0.5, 0.75, 1 ve 1.25 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış sığır serum albümin (BSA) çözeltileriyle ölçüm gerçekleştirildi. Konsantrasyona karşı absorbans değeri koyularak standart grafik çizildi.
- Bu grafiğin doğru denklemi kullanılarak örneklerin protein miktarı hesaplandı.
- Sonuçlar, mg protein/mL serum cinsinden ifade edildi.

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler GraphPad Prism7 programı ile yapıldı. Veriler Ortalama ± SS olarak hesaplandı. Polimorfizm sonuçları ki-kare ve odds oranı ile analiz edildi. IL-35 ve oksidatif stres parametrelerine ait sonuçları, sağlıklı ve hasta grupları arasında karşılaştırmak için t-test (Student's t-test) kullanıldı. Oksidatif stres (MDA ve protein karbonil) ve antioksidan yanıt (GSH, FRAP ve katalaz aktivitesi) parametreleri bakımından astım kontrol testi (AKT) skoruna göre sınıflandırılmış hastalar arasındaki farkların analizinde tek yönlü ANOVA (one-way ANOVA) testi kullanıldı ve korelasyon ilişkileri Pearson korelasyon testi ile analiz edildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. ÇALIŞMA GRUPLARI

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tip Fakültesi İmmünoloji ve Alerjik Hastalıklar Kliniğine başvuran ve bu çalışmaya dahil edilen hastalar ile sağlıklı gönüllülere ait demografik ve klinik bilgiler Tablo 4.1'de görüldüğü gibidir.

Tablo 4.1: Alerjik astım hastaları ve sağlıklı kontrollere ait bazı demografik ve klinik bilgiler.

Özellik	Sağlıklı (n=120)	Hasta (n=120)	*p* Değeri
Kadın/Erkek	90/30	92/28	-
Yaş	37.06 ± 12.14	42.6 ± 14.65	-
Kilo	66.83 ± 10.46	71.1 ± 16.02	-
Serum Total IgE, IU/mL	57.9 ± 63.30	280.0 ± 327.00	***<0.001
Prick testi pozitif	--	120	--

Veriler ortalama ± SS (standart sapma) olarak gösterilmiştir. $p<0.05$ istatistiksel olarak önemli kabul edildi (***).

AKT skoruna göre oluşturulan hasta alt grupları Tablo 4.2'deki gibidir.

Tablo 4.2: AKT skoruna göre hasta alt grupları ve hasta sayıları.

Cinsiyet	TK (Tam kontrollü)	KK (Kısmen kontrollü)	KS (Kontrolsüz)
Kadın	40	34	18
Erkek	19	6	3

4.2. POLİMORFİZM SONUÇLARI

4.2.1. DNA Miktarı ve Saflığı

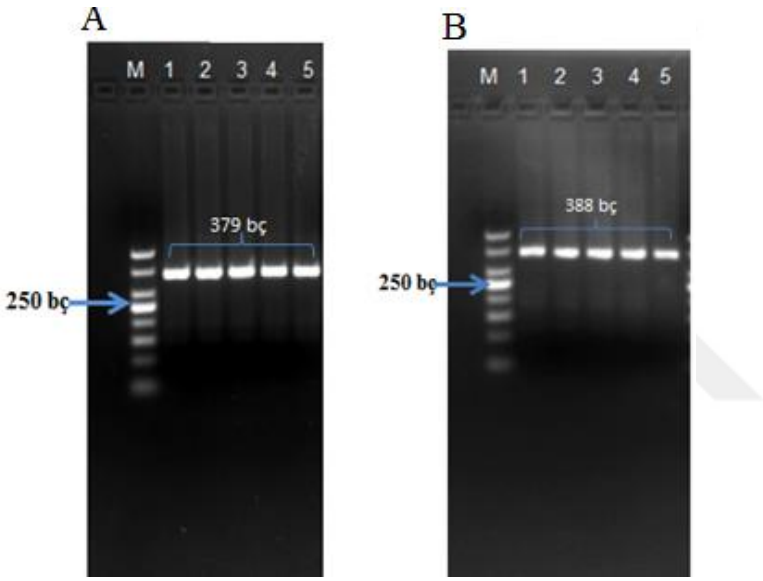
Örneklerden izole edilen DNA konsantrasyonunun 80-150 ng/µL arasında olduğu ve saflık derecelerinin istenen aralıkta bulunduğu (A_{260}/A_{280} =1.8-2.0) belirlendi.

4.2.2. PCR Ürünleri

Seçilen SNP'lerin (rs3761548, rs3761549, rs20541 ve rs1881457) PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile tespit edildi ve görüntüleri kaydedildi. Elde edilen veriler aşağıda gösterildi.

4.2.2.1. FOXP3 Genindeki rs3761548 ve rs3761549 SNP'ler

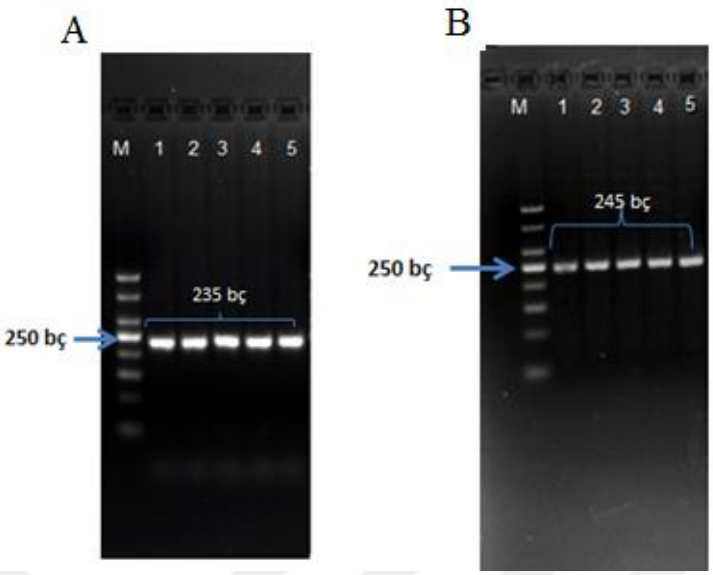
FOXP3 geninin promotör bölgesindeki rs3761548 (-3279C/A) ve rs3761549 (-2383C/T) kodlu SNP'leri içeren nükleotid dizilerinin PCR yöntemi ile çoğaltılması sonucunda elde edilen ürünlerin sırasıyla, 379 bç ve 388 bç büyüklüğünde olduğu elektroforezle belirlendi. Bu ürünlerin agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 4.1'de verildi.



Şekil 4.1: *FOXP3* genindeki A) rs3761548 (-3279C/A) SNP'ye ait 379 bç'lik bölgenin; B) rs3761549 (-2383C/T) SNP'ye ait 388 bç'lik bölgenin PCR ile amplifikasyonundan sonra agaroz jeldeki görüntüsü (M: 50 bç'lik markır, 1-5: PCR ürünleri).

4.2.2.2. IL13 Genindeki rs20541 ve rs1881457 SNP'ler

IL13 geninde bulunan rs20541 (+2044G/A) ve rs1881457 (-1512A/C) kodlu SNP'leri içeren nükleotid dizilerinin PCR yöntemi ile çoğaltılması sonucunda elde edilen ürünlerin, sırasıyla, 235 bç ve 245 bç büyüklüğünde olduğu elektroforezle belirlendi. Bu ürünlerin agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 4.2'de verildi.

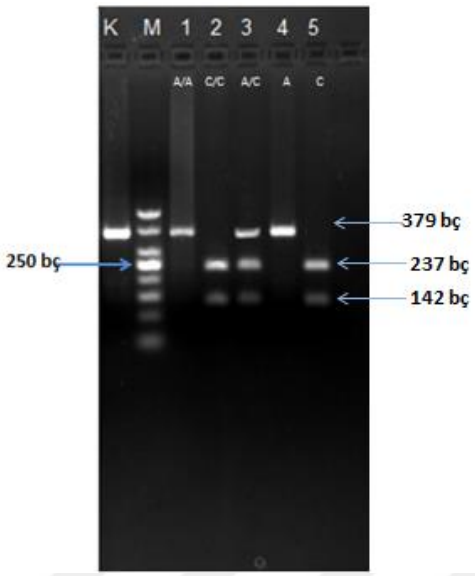


Şekil 4.2: *IL13* genindeki A) rs20541 (+2044G/A) SNP'ye ait 235 bç'lik bölgenin; B) rs1881457 (-1512A/C) SNP'ye ait 245 bç'lik bölgenin PCR ile amplifikasyonundan sonra agaroz jeldeki görüntüsü (M: 50 bç'lik markır, 1-5: PCR ürünleri).

4.2.3. RFLP-PCR ve Dizileme Bulguları

4.2.3.1. FOXP3 -3279C/A (rs3761548) Gen Bölgesinde PstI Enzimi ile Kesim ve Dizileme Sonuçları

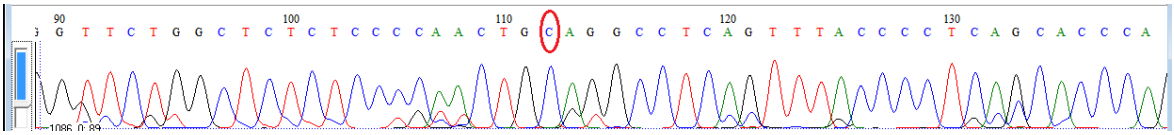
FOXP3 geni X kromozomu üzerinde bulunduğundan, polimorfizm sonuçları erkek ve kadın bireylerde ayrı ayrı değerlendirildi. PstI enzimi ile yapılan kesimlerin sonucu Şekil 4.3'de şematik olarak gösterildi. Ürünler %2'lik agaroz jel üzerinde ayrıldı ve etidyum bromür ile görselleştirildi. Elde edilen sonuçlarda, 379 bç tek fragman (kadınlarda AA ve erkeklerde A), 142 ve 237 bç 2 fragman (kadınlarda CC ve erkeklerde C) veya 379, 142 ve 237 bç 3 fragman (kadınlarda CA) tespit edildi. Sağlıklı ve hasta gruplarında *FOXP3* -3279C/A (rs3761548) polimorfizmlerinin genotip ve allel sıklıkları ve dağılımları Tablo 4.3'de gösterildi. Ayrıca dizileme sonuçları Şekil 4.4-4.8'de gösterildi. Dizileme SANGER yöntemi ile yapıldı.



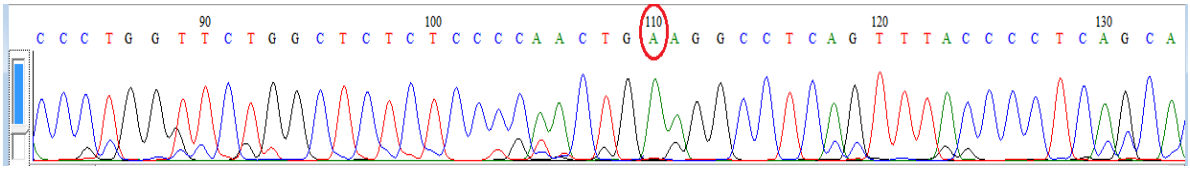
Şekil 4.3: *FOXP3* geninin -3279C/A bölgesinin PstI enzimi ile kesim sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin jelde görüntülenmesi [K: kesilmemiş 379 bç PCR ürünü, M:50 bç'lik markır, 1-5: kesilmiş PCR ürünleri (tek fragman kadınlarda AA ve erkeklerde A, 2 fragman kadınlarda CC ve erkeklerde C, 3 fragman kadınlarda AC genotipi)].

Tablo 4.3: Alerjik astım hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda *FOXP3* geni rs3761548 SNP'deki genotip ve allel sıklıkları ve dağılım yüzdeleri.

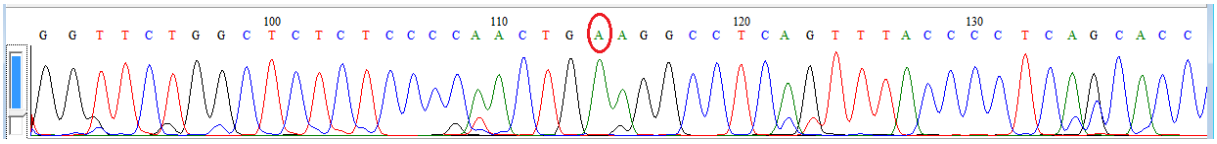
Pozisyon	Cinsiyet	Genotip/ Allel	Sağlıklı Birey Sayısı /(%)	Hasta Birey Sayısı /(%)	Dağılım *p* Değeri	Odds Oranı (95% CI)	Odds Oranı *p* Değeri
-3279A/C	Kadın	AA	19 (21.1)	19 (20.7)	**0.004**	1:00/Referans	
		CC	13 (14.4)	33 (34.8)		2.46 (0.9-6.0)	**0.04**
		AC	58 (64.5)	40 (44.5)		0.71 (0.3-1.4)	
	Erkek	A	17 (56.7)	7 (25)	**0.01**	1:00/Referans	
		C	13 (43.3)	21 (75)		3.92 (1.3-11.6)	**0.01**
	Allel	A	113 (53.8)	86 (40.6)	**0.006**	1:00/Referans	
		C	97 (46.2)	126 (59.4)		1.7 (1.1-2.5)	**0.006**



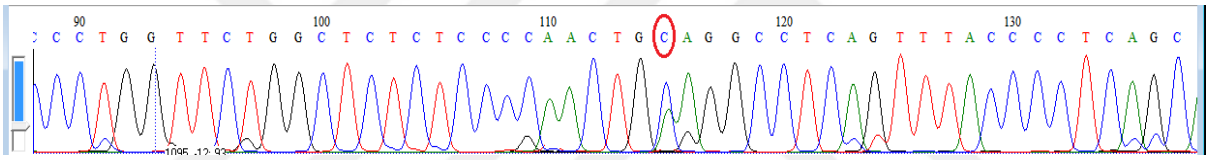
Şekil 4.4: *FOXP3* geni -3279 pozisyonunda C genotipi taşıyan erkek bireye ait DNA dizi analizi örneği.



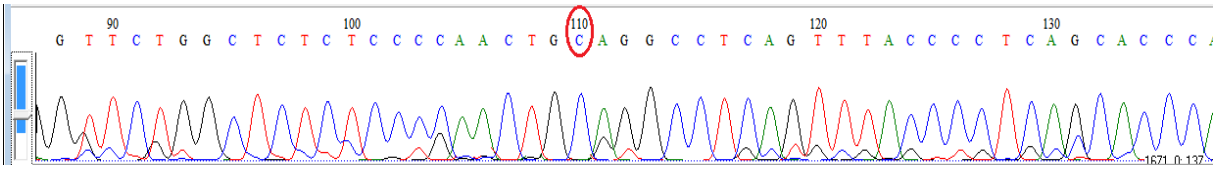
Şekil 4.5: *FOXP3* geni -3279 pozisyonunda A genotipi taşıyan erkek bireye ait DNA dizi analizi örneği.



Şekil 4.6: *FOXP3* geni -3279 pozisyonunda AA genotipi taşıyan kadın bireye ait DNA dizi analizi örneği.



Şekil 4.7: *FOXP3* geni -3279 pozisyonunda CA genotipi taşıyan kadın bireye ait DNA dizi analizi örneği.



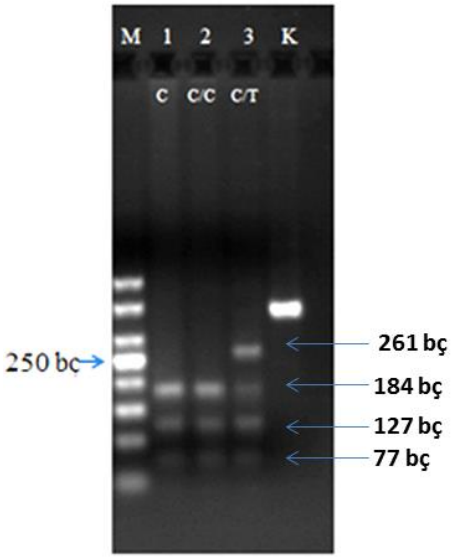
Şekil 4.8: *FOXP3* geni -3279 pozisyonunda CC genotipi taşıyan kadın bireye ait DNA dizi analizi örneği.

Tablo 4.3'de gösterildiği gibi, *FOXP3* geninde rs3761548 SNP'de AA, AC ve CC genotiplerinin sıklığı ("frequency") sırasıyla, sağlıklı kadınlarda %21.1, %14.4 ve %64.5 ve alejik astımlı kadınlarda %20.7, %34.8 ve %44.5 idi. Ayrıca A ve C genotiplerinin sıklığı sırasıyla, sağlıklı erkeklerde %56.7 ve %43.3 ve alerjik astımlı erkeklerde %25 ve %75 olarak bulundu. rs3761548 SNP'nin genotip dağılımı açısından sağlıklı bireyler ve hasta bireyler arasında anlamlı bir fark vardı (kadınlarda p = 0.004 ve erkeklerde p = 0.01). Hasta

grubumuzda kadınlarda CC genotipi ve erkeklerde C genotipi daha yaygın iken, sağlıklı bireylerde kadınlarda AC genotipi ve erkeklerde A genotipi yaygındı. Kadınlarda CC (odds oranı 2.46, 95% CI 0.96 -6.03, p = 0.04) ve erkeklerde C genotipi (odds oranı 3.92, 95% CI 1.35-11.64, p = 0.01), alerjik astım gelişim riskinin yüksek olması ile ilişkilendirildi.

4.2.3.2. FOXP3 -2383C/T (rs3761549) Gen Bölgesinde BseNI Enzimi ile Kesim ve Dizileme Sonuçları

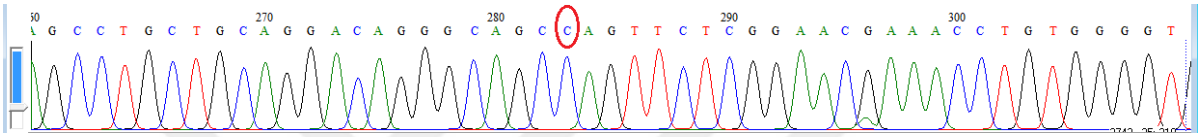
FOXP3 geni X kromozomu üzerinde bulunduğundan, polimorfizm sonuçları erkek ve kadın bireylerde ayrı ayrı değerlendirildi. BseNI (BsrI) enzimi ile yapılan kesimlerin sonucu Şekil 4.9'da gösterildi. Ürünler %2 agaroz jel üzerinde ayrıldı ve etidyum bromür ile görselleştirildi. Elde edilen bantlar 184, 127 ve 77 bç'lik üç fragman (kadınlarda CC ve erkeklerde C) veya 261,184, 127 ve 77 bç'lik dört fragman (kadınlarda CT) tespit edildi. Bu çalışmada 261 ve 127 bç'lik iki fragmana ait bantlar (kadınlarda TT ve erkeklerde T genotipi) gözlenmedi. Hasta ve sağlıklılarda *FOXP3* -2383C/T (rs3761549) polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları ve dağılımları Tablo 4.4'de verildi. Ayrıca dizileme sonuçları Şekil 4.10-4.12'de gösterildi. Dizileme SANGER yöntemi ile yapıldı.



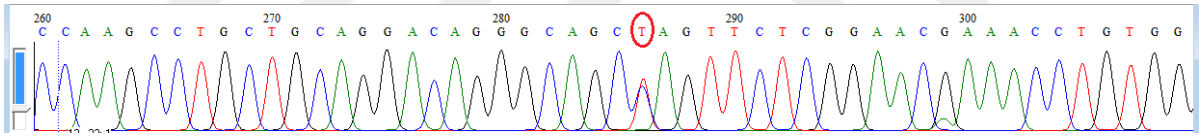
Şekil 4.9: *FOXP3* geni -2383C/T bölgesinin BseNI enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin jelde görüntülenmesi [M:50 bç'lik markır, 1-3: kesilmiş PCR ürünleri (3 fragman kadınlarda CC ve erkeklerde C, 4 fragman kadınlarda CT genotipi), K kesilmemiş 388 bç PCR ürünü]. Bu çalışmada kadınlarda TT ve erkeklerde T genotipi bulunmadı.

Tablo 4.4: Alerjik astım hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda *FOXP3* geni rs3761549 SNP'deki genotip ve allel sıklıkları ve dağılım yüzdeleri.

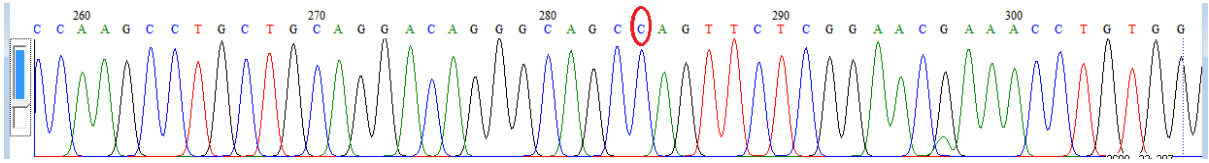
Pozisyon	Cinsiyet	Genotip/ Allel	Sağlıklı Birey Sayısı (%)	Hasta Birey Sayısı (%)	Dağılım *p* Değeri	Odds Oranı (95% CI)	Odds Oranı *p* Değeri
-2383C/T	Kadın	CC	78 (86.7)	69 (75.0)	**0.045**	1:00/Referans	
		TT	--	--		--	
		CT	12 (13.3)	23 (25.0)		2.17 (1.03-4.7)	**0.045**
	Erkek	C	30 (100)	28 (100)	--	1:00/Referans	
		T	--	--		--	
	Allel	C	198 (94.3)	189 (89.1)	>0.05	1:00/Referans	
		T	12 (5.7)	23 (10.9)		2.1 (0.9 -4.0)	>0.05



Şekil 4.10: *FOXP3* geni -2383 pozisyonunda C genotipi taşıyan erkek bireye ait DNA dizi analizi örneği.



Şekil 4.11: *FOXP3* geni -2383 pozisyonunda CT genotipi taşıyan kadın bireye ait DNA dizi analizi örneği.



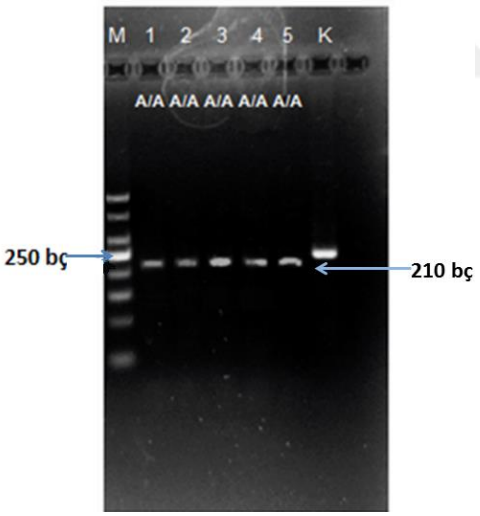
Şekil 4.12: *FOXP3* geni -2383 pozisyonunda CC genotipi taşıyan kadın bireye ait DNA dizi analizi örneği.

Hasta ve sağlıklı gruplarda, kadınlarda TT ve erkeklerde T genotipine rastlanmadı. *FOXP3* geninde SNP rs3761549 pozisyonunda CC ve CT genotiplerinin sıklığı sırasıyla, sağlıklı kadınlarda %86.7 ve %13.3 ve alejik astım kadın hastalarında %75.0 ve %25.0 idi. SNP

rs3761549'in genotip dağılımı (distribution) açısından sağlıklı bireyler ve hasta bireyler arasında anlamlı bir fark vardı (kadınlarda p=0.045). Kadınlarda CT genotipi, alerjik astım gelişim riskinin yüksek olması ile ilişkilendirildi (odds orani 2.17, 95% CI 1.036-4.72, p = 0.045).

4.2.3.3. IL13 +2044G/A (rs20541) Gen Bölgesinde BspLI (NlaIV) Enzimi ile Kesim ve Dizileme Sonuçları

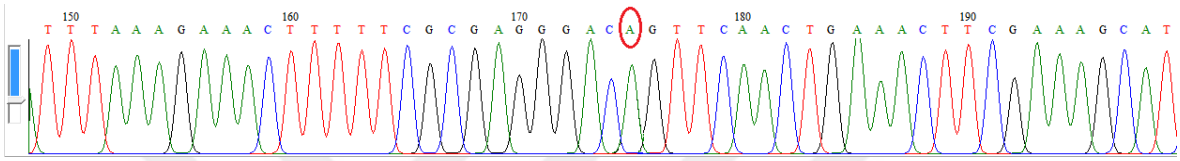
BspLI (NlaIV) enzimi ile yapılan kesimlerin sonucu Şekil 4.13'te gösterildi. Ürünler %3'lük agaroz jel üzerinde ayrıldı ve etidyum bromür ile görselleştirildi. Elde edilen bantlar 25 ve 210 bç'lik iki fragmanı (kadınlarda ve erkeklerde AA) göstermektedir. Bu araştırmada G alleline rastlanmadı ve 178 ve 57 bç'lik iki fragman (kadınlarda ve erkeklerde GG), 25, 178 ve 32 bç'lik üç fragman (kadınlarda ve erkeklerde AG) gözlenmedi (Tablo 4.5). Elde edilen sonuçlar gen dizileme ile desteklendi. Sağlıklı ve hasta grubunda *IL13* +2044G/A (rs20541) polimorfizmlerinin genotip ve allel sıklıkları Tablo 4.5'de verildi. Ayrıca SANGER yöntemi ile yapılan dizileme sonuçları Şekil 4.14 ve 4.15'de gösterildi.



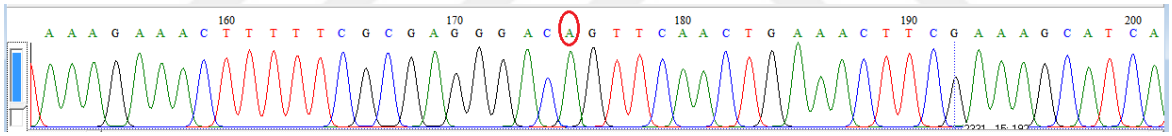
Şekil 4.13: *IL13* geninin +2044G/A (rs20541) bölgesinin BspLI (NlaIV) enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin jelde görüntülenmesi [M:50 bç'lik markır, 1-5: kesilmiş PCR ürünleri (210 bç tek fragman AA genotipini göstermektedir), K: kesilmemiş 235 bç PCR ürünü]. Bu araştırmada +2044 bölgesinde G alleli bulunmadı.

Tablo 4.5: Alerjik astım hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda *IL13* geninde rs20541 SNP'deki genotip ve allel sıklıkları ve dağılım yüzdeleri.

Pozisyon	Cinsiyet	Genotip/Allel	Sağlıklı Bireyler Sayı /(%)	Hasta Bireyler Sayı/ (%)	Dağılım *p* Değeri	Odds Oranı (95% CI)
+2044G/A	Kadın/Erkek	GG	--	--	>0.05	1:00/Referans
		AA	120	120	--	--
		GA	--	--	--	--
	Allel	G	--	--	>0.05	1:00/Referans
		A	240	240	--	--



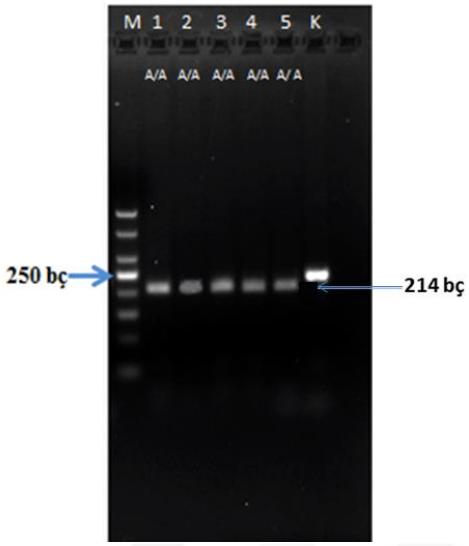
Şekil 4.14: *IL13* geni +2044 pozisyonunda AA genotipi taşıyan erkek bireye ait DNA dizi analizi örneği.



Şekil 4.15: *IL13* geni +2044 pozisyonunda AA genotipi taşıyan kadın bireye ait DNA dizi analizi örneği.

4.2.3.4. IL13 -1512A/C (rs1881457) Gen Bölgesinde Bsh1236I (BstUI) Enzimi ile Kesim ve Dizileme Sonuçları

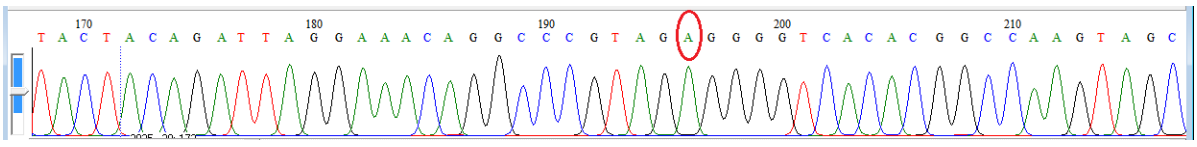
Bsh1236I (BstUI) enzimi ile yapılan kesimlerin sonucu Şekil 4.16'da gösterildi. Ürünler %3 agaroz jel üzerinde ayrıldı ve etidyum bromür ile görselleştirildi. Elde edilen bantlar 214, 20, 9 ve 2 bç'lik fragmanları (kadınlarda ve erkeklerde AA) göstermektedir. Bu araştırmada C alleline rastlanmadı ve 192, 22, 20, 9 ve 2 bç'lik fragmanlar (kadınlarda ve erkeklerde CC), 214, 192, 22, 20, 9 ve 2 bç'lik fragmanlar (kadınlarda ve erkeklerde AC) bulunamadı (Tablo 4.6). Elde ettiğimiz sonuçlar gen dizileme ile desteklendi. Sağlıklı ve hasta gruplarında *IL13* -1512A/C (rs1881457) polimorfizmlerinin genotip ve allel sıklıkları Tablo 4.6'da verildi. Ayrıca dizileme sonuçları Şekil 4.17 ve 4.18'de gösterildi. Dizileme SANGER yöntemi ile yapıldı.



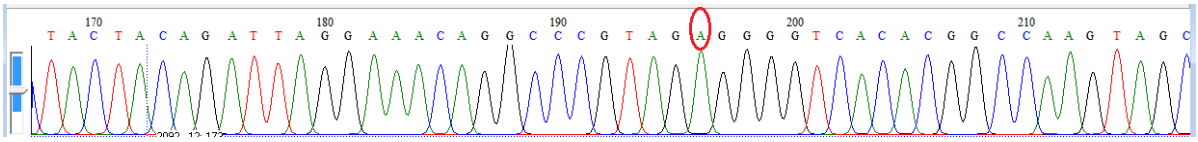
Şekil 4.16: *IL13* geninin -1512A/C (rs1881457) bölgesinin Bsh1236I (BstUI) enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin jelde görüntülenmesi [M:50 bç'lik markır, 1-5: kesilmiş PCR ürünleri (214 bç tek fragman AA genotipini göstermektedir), K: kesilmemiş PCR ürünü]. Bu araştırmada -1512 bölgesinde C alleli bulunmadı.

Tablo 4.6: Alerjik astım hastalar ve sağlıklı kontrol grubunda *IL13* geninde SNP rs1881457'deki genotip ve allel sıklıkları ve dağılım yüzdeleri.

Pozisyon	Cinsiyet	Genotip /Allel	Sağlıklı Bireyler Sayı /(%)	Hasta Bireyler Sayı/ (%)	Dağılım *p* Değeri	Odds Oranı (95% CI)
-1512A/C	Kadın/Erkek	CC	--	--	>0.05	1:00/Referans
		AA	120	120	--	--
		CA	--	--	--	--
	Allel	C	--	--	>0.05	1:00/Referans
		A	240	240	--	--



Şekil 4.17: *IL13* geni -1512 pozisyonunda AA genotipi taşıyan erkek bireye ait DNA dizi analizi örneği.

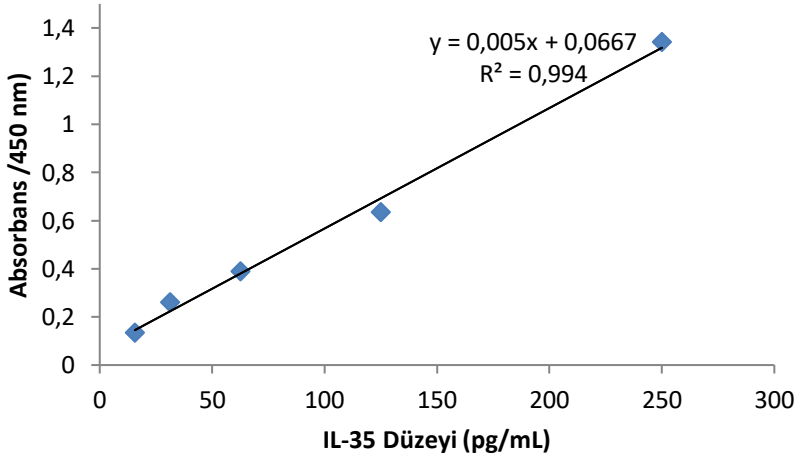


Şekil 4.18: *IL13* geni -1512 pozisyonunda AA genotipi taşıyan kadın bireye ait DNA dizi analizi örneği.

4.3. SERUM IL-35 DÜZEYİ

4.3.1. IL-35 Standart Eğrisi

Serumda IL-35 tayini için standart eğri, ticari kit protokolüne göre hazırlandı. Sonuçlar pg/mL olarak ifade edildi. Hazırlanan eğri Şekil 4.19'da gösterildi.



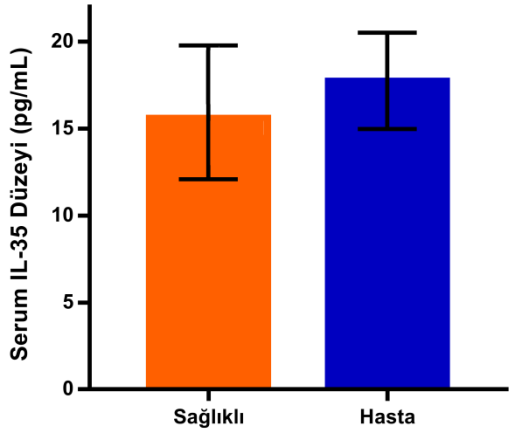
Şekil 4.19: Sandviç ELISA yöntemiyle serumda IL-35 düzey tayini için hazırlanan standart eğri.

4.3.2. Hasta ve Sağlıklı Bireylerde IL-35 Düzeyleri

Serum IL-35 düzeyi için elde edilen bulgular Tablo 4.7 ve Şekil 4.20'de gösterildi. Alerjik astım hastalarında, sağlıklı bireylere kıyasla serum IL-35 düzeyi daha yüksek olsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla, 17.74 ± 2.76 pg/mL ve 15.62 ± 1.9 pg/mL, $p>0.05$).

Tablo 4.7: Hasta ve sağlıklı gruplarında IL-35 düzeyi.

Gruplar/Sayı	IL-35 Düzeyi (Ortalama ± SS)	*p* Değeri
Hasta Bireyler/120	17.74 ± 2.76	>0.05
Sağlıklı Bireyler/120	15.62 ± 1.9	



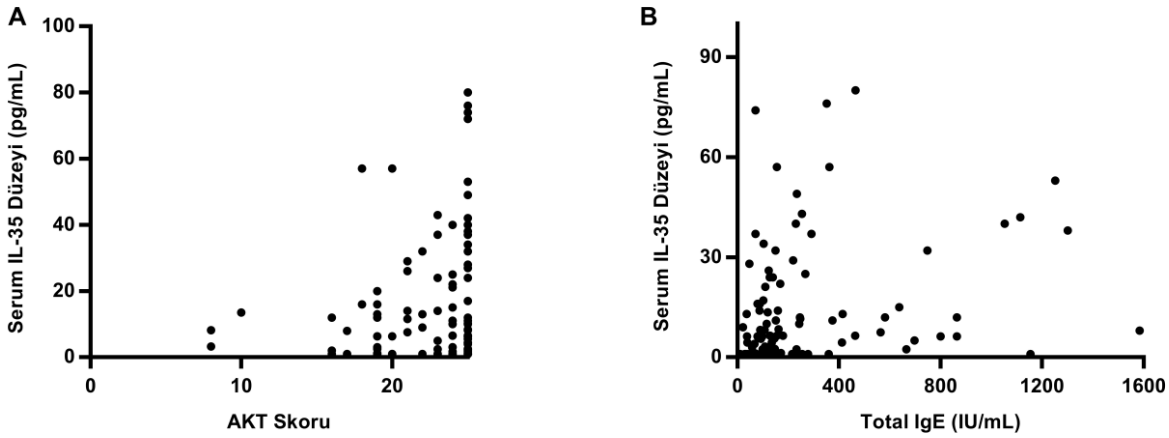
Şekil 4.20: Sağlıklı ve hasta gruplarında serum IL-35 düzeylerinin grafiksel gösterimi.

4.3.3. Hasta Grubunda IL-35 Düzeyi ile IgE ve AKT Skoru Arasındaki Korelasyonlar

Şekil 4.21'de gösterildiği gibi, hasta grubunda serum IL-35 düzeyleri ile AKT skorları arasında anlamlı bir ilişki ve korelasyon gözlenmedi (r = -0.05, p>0.05, Tablo 4.8). Hastalarda IL-35 ve IgE arasında pozitif yönde bir ilişki bulundu (r = +0.365, p<0.001) (Tablo 4.8, Şekil 4.21).

Tablo 4.8: Hastalarda serum IL-35 düzeyi ile AKT skoru ve IgE düzeyi arasındaki korelasyonlar.

Hasta Grubu	Korelasyon Katsayısı (r)	*p* Değeri
IL-35 (pg/mL) / AKT Skoru	r = -0.05	>0.05
IL-35 (pg/mL) / IgE (IU/mL)	r = +0.365	**<0.001**



Şekil 4.21: (A) Hastalarda serum IL-35 ve AKT skoru arasındaki ilişki (B) Hastalarda serum IL-35 ve IgE düzeyi arasındaki ilişki.

4.3.4. Serum IL-35 Düzeyinin *FOXP3* Genotiplerine Bağlı Değişimi

IL-35 düzeyi ile rs3761548 SNP'deki genotipler arasındaki ilişki Tablo 4.9'da gösterildi. Kadın hasta grubunda IL-35 düzeyi AC genotipinde CC genotipine göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p<0.05). Bu grupta AA genotipinde IL-35 düzeyi CC genotipine göre yüksek olsa da fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05). AA genotipindeki sağlıklı kadınlarda serum IL-35 düzeyi, CC genotipine göre anlamlı bir fark gösterdi (p<0.05). Ayrıca IL-35 AC genotipine sahip sağlıklı kadınlarda istatiksel olarak anlamlı olmasa da CC genotipine göre daha yüksekti (p>0.05). Erkek hasta ve kontrol gruplarında A ve C genotipleri arasında IL-35 düzeyinde anlamlı bir fark bulunmadı; buna rağmen IL-35 düzeyi A genotipinde daha yüksekti. Tüm katılımcılara baktığımızda AA ve AC genotipinde serum IL-35 düzeyi anlamlı olarak CC genotipine göre yüksekti (her ikisi için de p<0.05). Elde edilen bulgulara göre, AC ve AA genotipi ve A alleli taşıyan kişilerde IL-35 düzeyi CC genotip veya C alleline sahip olan kişilerden daha yüksekti.

Tablo 4.9: Alerjik astım hastaları ve ve sağlıklı bireylerde *FOXP3* rs3761548 pozisyonundaki genotipe göre serum IL-35 düzeyleri.

Gruplar	**Cinsiyet**	**Genotip**	**IL-35 Düzeyi (Ortalama ± SS) (pg/mL)**	***p* Değeri**
Hasta Bireyler	Kadın	AA	19.06 ± 9.26	**<0.05**
		CC	6.93 ± 2.32	
		AC	25.26 ± 5.86	
	Erkek	A	19.05 ± 5.95	>0.05
		C	13.2 ± 2.9	
Sağlıklı Bireyler	Kadın	**AA**	25.24 ± 4.99	**<0.05**
		CC	7.1 ± 1.99	
		AC	14.79 ± 2.53	
	Erkek	A	19.61 ± 7.48	>0.05
		C	8.577 ± 5.15	
Tüm katılımcılar	Kadın	**AA**	22.15 ± 5.22	**<0.05**
		CC	6.98 ± 1.74	
		AC	19.13± 2.87	
	Erkek	A	19.32 ± 4.68	>0.05
		C	10.59 ± 3.15	

Serum IL-35 düzeyinin rs3761549'daki genotiplerle ilişkisi Tablo 4.10'da gösterildi. Hem hastalarda hem de sağlıklı bireylerde, genotiplere göre serum IL-35 düzeyi bakımından anlamlı bir fark gözlenmedi (p>0.05).

Tablo 4.10: Alerjik astım hastaları ve ve sağlıklı bireylerde *FOXP3* rs3761549 pozisyonundaki genotipe göre serum IL-35 düzeyleri.

Gruplar	Cinsiyet	Genotip	IL-35 Düzeyi (Ortalama ± SS) (pg/mL)	*p* Değeri
Hasta Bireyler	Kadın	CC	18.47 ± 4.31	>0.05
		TT	--	
		CT	16.52 ± 4.48	
	Erkek	C	29.0 2± 3.8	--
		T	--	
Sağlıklı Bireyler	Kadın	CC	15.42 ± 1.99	>0.05
		TT	--	
		CT	18.65 ± 7.89	
	Erkek	C	14.83 ± 4.83	--
		T	--	
Tüm katılımcı	Kadın	CC	16.86 ± 2.28	>0.05
		TT	--	
		CT	17.29 ± 3.978	
	Erkek	C	15.86 ± 3.12	--
		T	--	

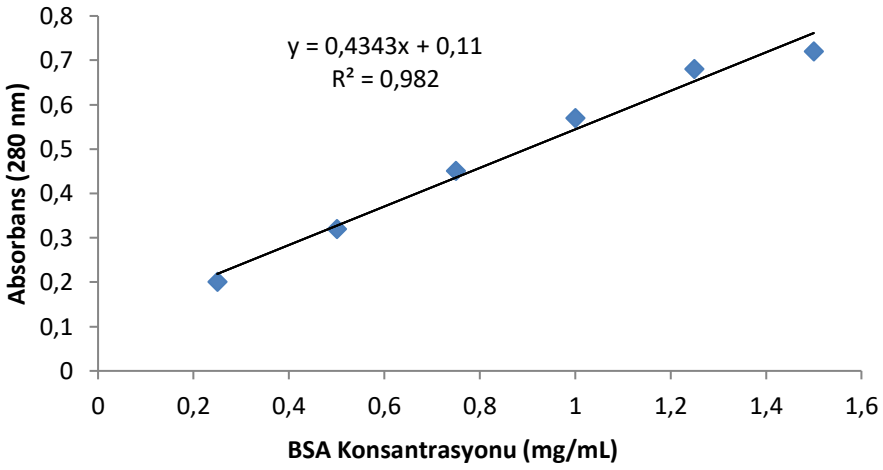
4.4. OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ

4.4.1. Standart Eğriler

4.4.1.1. Total Protein Standart Eğrisi

Protein karbonil miktarını nmol/mg plazma proteininde ifade etmek için reaksiyonun son aşamasında, 370 nm'de yapılan okumalara ek olarak 280 nm'de absorbans değerleri okundu. Total protein hesaplaması için, farklı konsantrasyonlarda BSA çözeltileri guanidin/hidroklorür içinde hazırlandı. Standart eğri, 0.25 mg/mL ile 1.75 mg/mL arasında değişen BSA konsantrasyonları için hazırlandı ve sonra bir spektrofotometrede 280 nm'de okundu. Sonuçlar mg/mL olarak ifade edildi. Şekil 4.22'de hazırlanan eğri gösterildi. Protein karbonil miktarı aşağıdaki Denklem 4.1'e göre hesaplandı ve birimler nmol/mg plazma protein birimiyle ifade edildi.

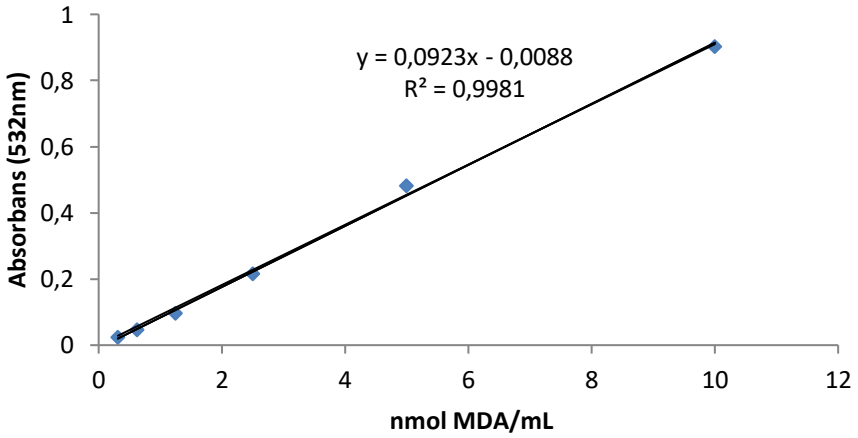
$$\text{Protein karbonil (PK) miktarı} = (\text{PK nmol/mL}) \,/\, (\text{Total protein mg/mL}) \qquad (4.1)$$



Şekil 4.22: Plazmada protein karbonil tayini için BSA ile hazırlanan standart eğri.

4.4.1.2. TBARS Standart Eğrisi

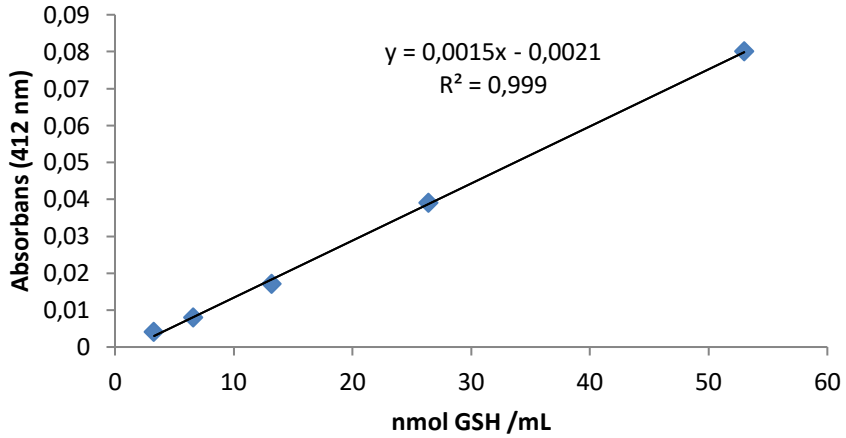
1,1,3,3-tetrametoksipropan ile hazırlanan standart eğri Şekil 4.23'de verildi. Kalibrasyon eğrisi konsantrasyona karşı absorbans değerleri yerine koyularak çizildi. Sonuçlar nmol/mL olarak ifade edildi.



Şekil 4.23: Plazmada MDA tayini için hazırlanan standart eğri.

4.4.1.3. GSH Standart Eğrisi

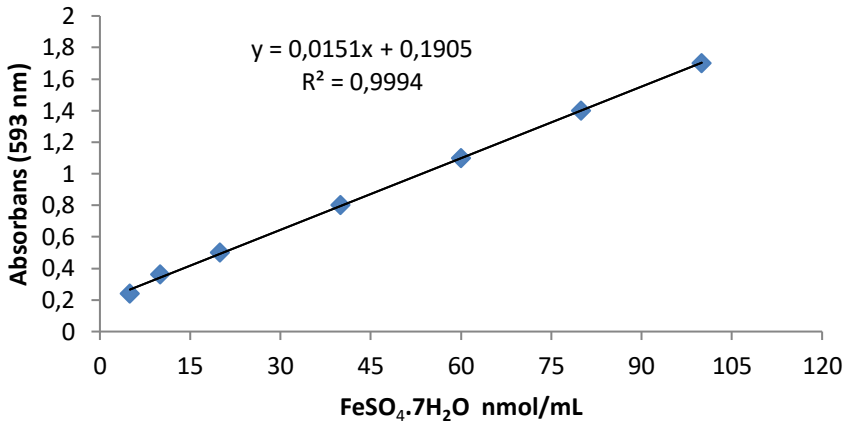
GSH'nin standart eğrisi için, %5'lik TCA içinde 1 mg/mL GSH stok çözeltisi hazırlandı. Elde edilen absorbans değerleri ile hazırlanan standart eğri Şekil 4.24'de verildi. Sonuçlar nmol GSH/mL olarak ifade edildi.



Şekil 4.24: Plazmada GSH tayini için hazırlanan standart eğri.

4.4.1.4. FRAP Standart Eğrisi

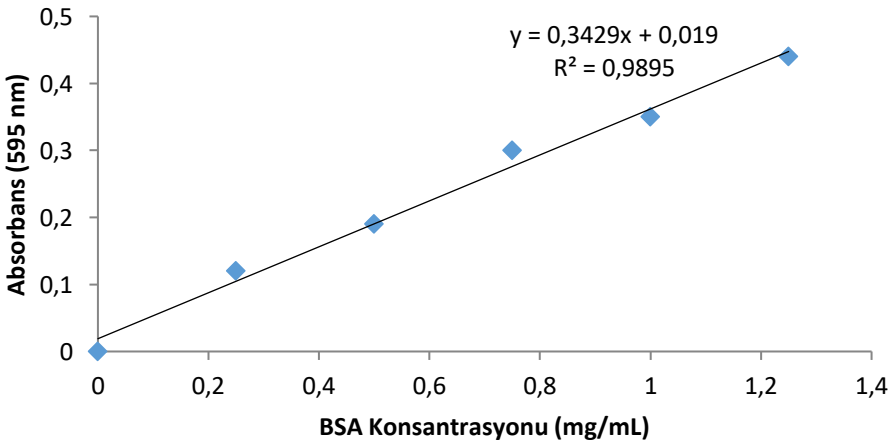
FRAP testi için standart eğri $FeSO_4.7H_2O$ ile hazırlandı ve Şekil 4.25'de verildi. Sonuçlar nmol/mL olarak ifade edildi.



Şekil 4.25: Plazmada FRAP tayini için hazırlanan standart eğri.

4.4.1.5. Bradford Standart Eğrisi

Total proteinin tayinlerinde, 0.25 mg/mL ile 1.25 mg/mL arasında değişen sığır serum albümin (BSA) konsantrasyonları ile hazırlanan standart eğri Şekil 4.26'da verildi. Sonuçlar mg/mL olarak ifade edildi.



Şekil 4.26: Bradford yöntemiyle total protein tayini için hazırlanan standart eğri.

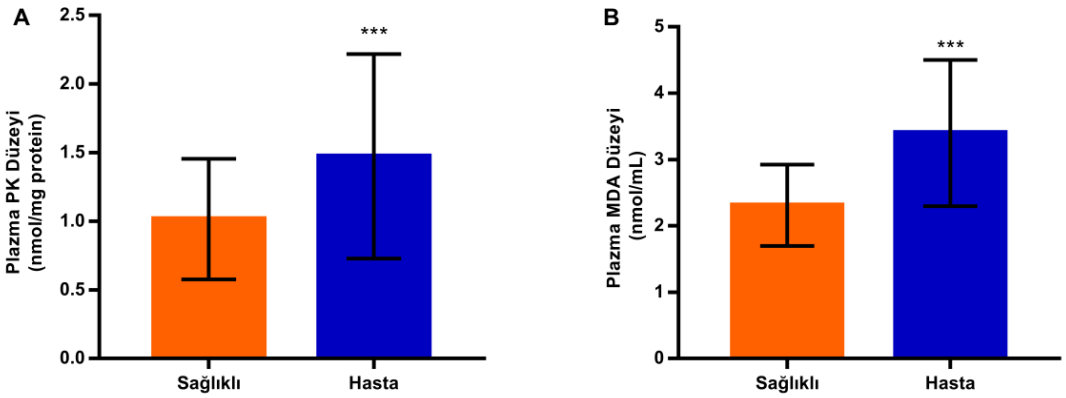
4.4.2. Hasta ve Kontrol Gruplarında Oksidatif Stres Parametreleri

Hasta ve kontrol gruplarının PK, MDA, GSH, FRAP ve serum katalaz aktivite değerleri karşılaştırıldı ve sonuçlar Şekil 4.27-4.29 ile Tablo 4.11'de özetlendi. Sonuçlar Ortalama ± SS olarak verildi.

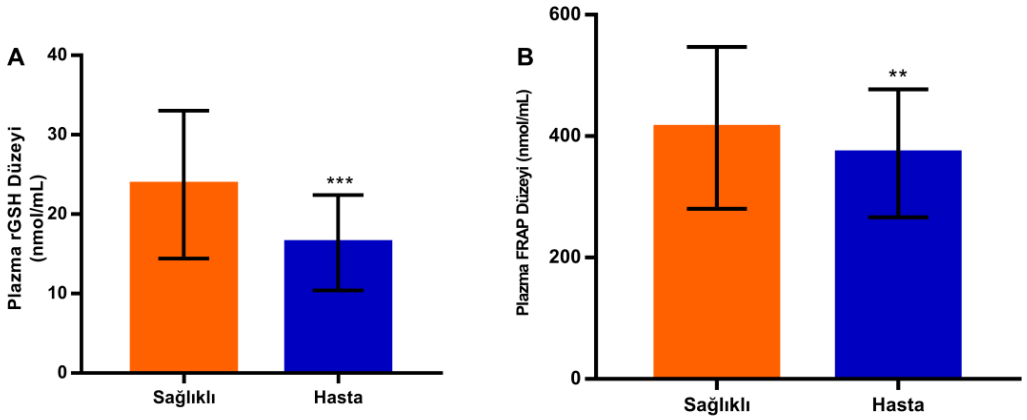
Tablo 4.11: Protein karbonil, MDA, GSH, FRAP değerleri ile katalaz aktivitesinin gruplar arasında karşılaştırılması.

Parametre	**Sağlıklı**	**Hasta**	***p* Değeri**
PK (nmol/mg protein)	1.01 ± 0.43	1.47 ± 0.74	**<0.001**
MDA (nmol/mL)	2.31 ± 0. 61	3.39 ± 1.10	**<0.001**
GSH (nmol/mL)	23.74 ± 9.30	16.41 ± 6	**<0.001**
FRAP (nmol/mL)	413.70 ± 133	371.7 ± 105	**<0.01**
Katalaz aktivitesi (U/mg protein)	0.42 ± 0.18	0.35 ± 0.25	**<0.05**

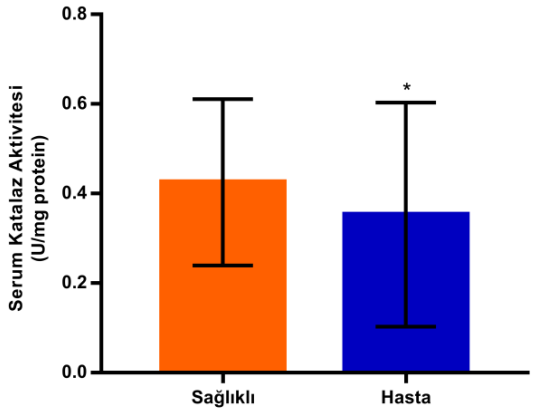
İki grup arasında PK (nmol/mg protein), MDA (nmol/mL), GSH (nmol/mL), FRAP (nmol/mL) ve katalaz aktivitesi açısından anlamlı farklılıklar tespit edildi (p<0.05). Hastaların plazma PK ve MDA düzeyleri kontrollere kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0.001). Ayrıca hastalardaki plazma GSH düzeyi ve total antioksidan gücü sağlıklı grubuna göre anlamlı derecede düşüktü (sırasıyla p<0.001 ve p<0.01). Benzer şekilde katalaz aktivitesi hastalarda sağlıklı grubuna göre daha düşüktü (p<0.05).



Şekil 4.27: Sağlıklı ve hasta gruplarında (A) PK, (B) MDA düzeylerinin karşılaştırılması (****p*<0.001 anlamlı olduğunu göstermektedir).



Şekil 4.28: Sağlıklı ve hasta gruplarında (A) GSH ve (B) FRAP düzeylerinin karşılaştırılması (** *p* <0.01,****p*<0.001 anlamlı olduğunu göstermektedir).



Şekil 4.29: Sağlıklı ve hasta gruplarında serum katalaz aktivitesinin karşılaştırılması (* p<0.05 anlamlı olduğunu göstermektedir).

4.4.3. Hasta Alt Gruplarında Oksidatif Stres Parametreleri

Hasta grubu astım kontrol testi (AKT) skoruna göre üç alt gruba ayrıldı: tam kontrollü (TK), kısmen kontrollü (KK) ve kontrolsüz (KS) gruplar.

PK düzeyi KS alt grubunda TK grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksekti (p<0.05). MDA, KS grubunda diğer iki alt gruba (TK ve KK) göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla p<0.01 ve p<0.05). Plazma GSH düzeyi ve FRAP tüm alt gruplarda birbirine yakındı (p>0.05). Serum katalaz aktivitesi KK alt grubunda TK grubuna göre anamlı olarak yüksek bulundu (p<0.05). Bu karşılaştırmanın sonuçları Tablo 4.12 ve Şekil 4.30-4.32'de verildi.

Ayrıca sağlıklı grup ile hasta alt grupları arasında bu parametreler için ayrı bir karşılaştırma daha yapıldı. Tüm alt gruplarda plazma PK ve MDA düzeyleri sağlıklı bireylerden istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulundu (p<0.001). GSH miktarı sağlıklı grubunda tüm hasta alt gruplarından anlamlı olarak yüksekti (p<0.001). Sağlıklı bireylerde total antioksidan güç (FRAP) sadece KS alt grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti (p<0.05) (Tablo 4.12).

Tablo 4.12: Sağlıklı ve hasta alt gruplarında PK, MDA, GSH, FRAP düzeyi ile katalaz aktivitesinin karşılaştırılması.

Parametre	**Sağlıklı**	***p* Değeri**	**Hasta Alt Gruplar**			***p* Değeri**
			TK (n=59)	**KK (n=40)**	**KS (n=21)**	
Protein karbonil (nmol/mg protein)	1.01 ± 0.43	**<0.001**[a]	1.37 ± 0.58	1.41 ± 0.84	1.85 ± 0.61	**<0.05**[c]
MDA (nmol/mL)	2.31 ± 0.61	**<0.001**[a]	3.18 ± 1.04	3.33 ± 1.11	4.15 ± 0.96	**<0.01**[c], **<0.05**[d]
GSH (nmol/mL)	23.74 ± 7.20	**<0.001**[a]	16.50 ± 6.09	17.41 ± 6.41	14.23± 4.44	>0.05
FRAP (nmol/mL)	413.7 ± 133	**<0.05**[b]	372 ± 95	393.5 ± 129	329 ± 65	>0.05
Katalaz aktivitesi (U/mg protein)	0.425 ± 0.18	>0.05	0.310 ± 0.18	0.433 ± 0.32	0.318 ± 0.20	**<0.05**[e]

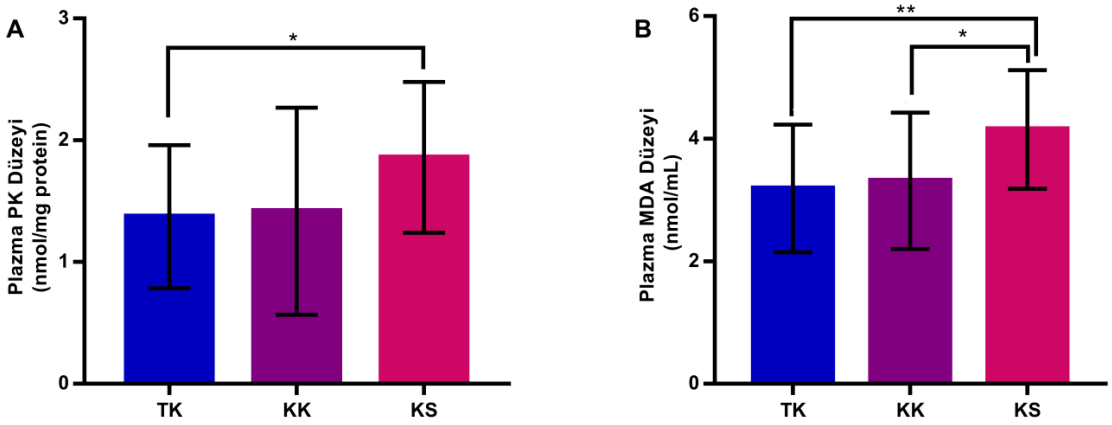
[a] Sağlıklı ve tüm hasta alt grupları arasında anlamlı fark göstermektedir.

[b] Sağlıklı ve hasta KS alt grubu arasında anlamlı bir fark göstermektedir.

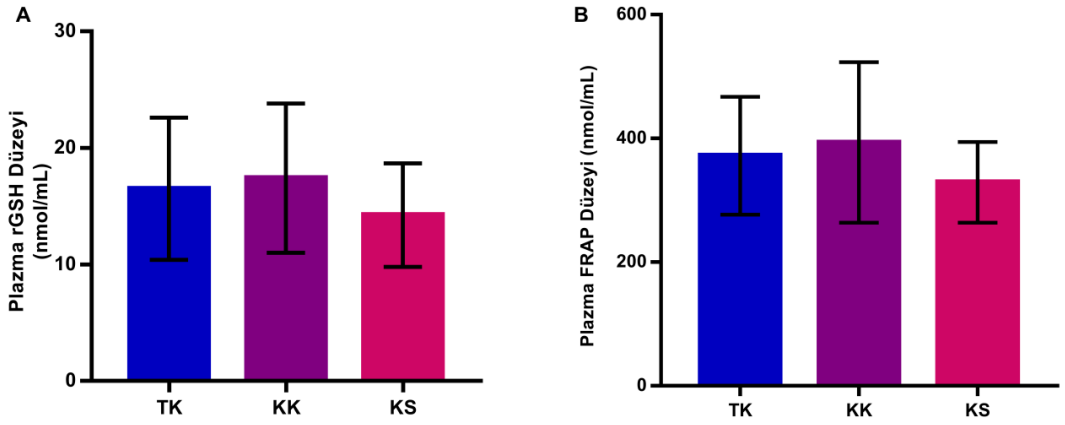
[c] TK ve KS hasta alt grupları arasında anlamlı bir fark göstermektedir.

[d] KK ve KS hasta alt grupları arasında anlamlı bir fark göstermektedir.

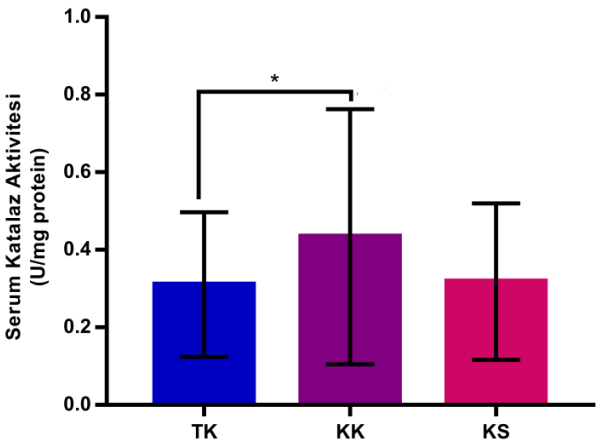
[e] TK ve KK hasta alt grupları arasında anlamlı bir fark göstermektedir.



Şekil 4.30: Hasta alt gruplarında (A) PK ve (B) MDA düzeylerinin karşılaştırılması (*p<0.05 ve **p<0.01 anlamlı olduğunu göstermektedir).



Şekil 4.31: Hasta alt gruplarında (A) GSH ve (B) FRAP düzeylerinin karşılaştırılması.



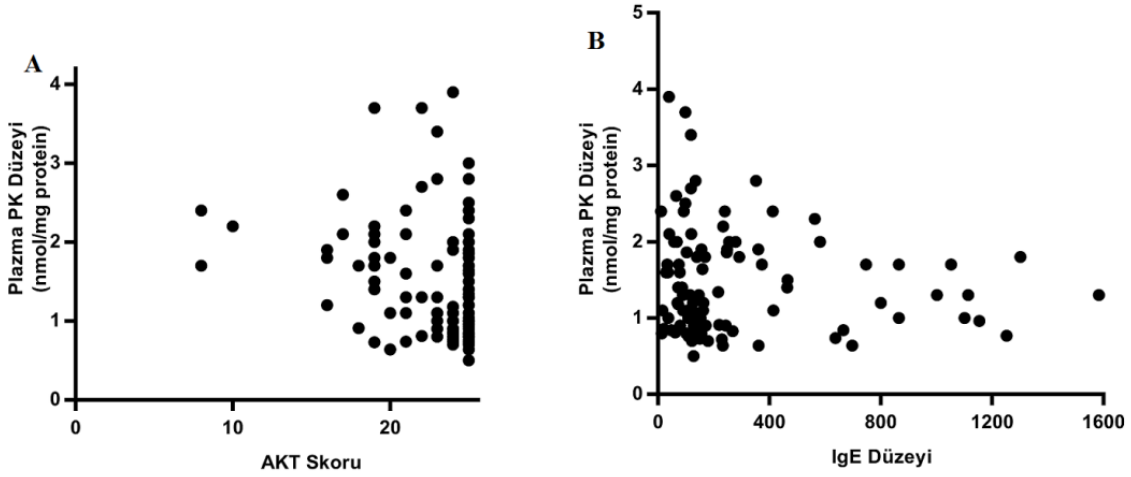
Şekil 4.32: Hasta alt gruplarında serum katalaz aktivitesinin karşılaştırılması (*p<0.05 anlamlı olduğunu göstermektedir).

4.4.4. Hasta Grubunda PK ve MDA Düzeyleri ile AKT Skoru ve IgE Düzeyleri Arasındaki Korelasyonlar

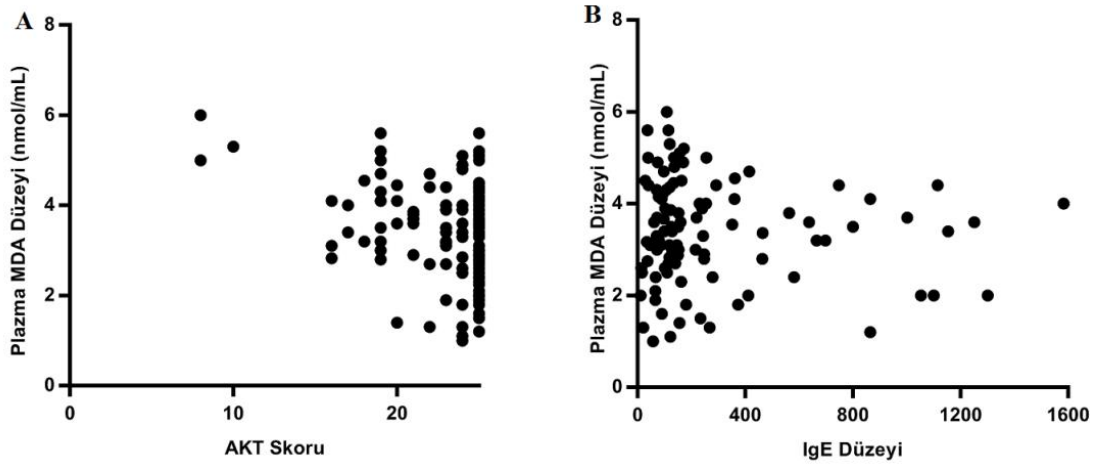
Alerjik astım hastalarında PK ve MDA düzeyleri ile AKT skoru arasında düşük derecede zayıf negatif ve anlamlı bir ilişki bulundu. MDA ve PK parametreleri ve IgE düzeyleri arasında negatif yönde anlamlı olmayan bir ilişki mevcuttu (Tablo 4.13, Şekil 4.33-4.34).

Tablo 4.13: Hasta grubunda PK ve MDA düzeyleri ile AKT ve IgE düzeyleri arasındaki korelasyonlar.

	PK		**MDA**	
	Korelasyon Katsayısı	*p* Değeri	Korelasyon Katsayısı	*p* Değeri
AKT Skoru	**-0.21**	**<0.01**	**-0.27**	**<0.01**
Total IgE (IU/mL)	-0.10	>0.05	-0.06	>0.05



Şekil 4.33: Alerjik astım hastalarında (A) PK ile AKT skoru arasındaki negatif yöndeki ilişki. (B) PK ile total IgE düzeyi arasındaki monoton ilişki.



Şekil 4.34: Alerjik astım hastalarında (A) MDA ile AKT skoru arasındaki negatif yönde zayıf ilişki. (B) MDA ile total IgE düzeyi arasındaki monoton ilişki.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Moleküler biyolojideki son gelişimler, alerjik astımda naif ve adaptif immün hücreler ile solunum yolundaki yapısal hücreler ve enflamasyon sürecinde yer alan sitokinler arasında karmaşık bir etkileşimin mevcut olduğunu göstermektedir. Artan kanıtlar, interlökinlerin enflamasyon ve immün tepkileri arttırmada kritik öneme sahip olduğunu göstermiştir. İnterlökinler, lökositlerin çapraz-etkileşimine ("cross-talking") aracılık eden ve en önemlisi immün hücre çoğalmasını, büyümesini, farklılaşmasını, hayatta kalmasını, aktivasyonunu ve fonksiyonlarını düzenleyen çok fonksiyonlu immünomodülatörlerdir (Xu ve diğ., 2017). Bu güne kadar Th2 hücre kaynaklı sitokinlerin alerjik astım patogenezini düzenlediği mekanizmaların deşifre edilmesi için yoğun çaba sarf edilmiştir (Gour ve Wills-Karp, 2015).

Genetik faktörlerin, alerjik ve enflamasyonlu hastalıklara duyarlılıkta rol alan etkenlerden biri olduğu iyi bilinmektedir. Bu genetik faktörler arasında genomdaki en yaygın varyasyonlar olan SNP'ler önemli bir paya sahiptir (Marques ve diğ., 2015).

Son birkaç yıl içinde, astımda birçok gen polimorfizmi araştırılmış ve bu genler arasında, T hücreleriyle ilişkili sitokinler ve sitokin sinyallerine ait genler de yer almıştır (March ve diğ., 2013).

Düzenleyici T hücreleri (Tregler) bağışıklık sistemini birkaç baskılayıcı mekanizmayla düzenler; ancak bu mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır (Wei ve diğ., 2017). FOXP3, Treg'lerin gelişiminde ve fonksiyonunda ana düzenleyici olarak iş görür. FOXP3 protein düzeyinin azalması, Treg hücrelerinin fonksiyonunu etkiler ve Th hücre proliferasyonunun ve sitokin üretiminin artmasına neden olabilir (Hartl ve diğ., 2007; Provoost ve diğ., 2009). Farklı çalışmalar, astımlı hastalarda Treg hücre sayısının veya FOXP3 üretiminin önemli ölçüde azaldığını göstermiştir (Wang ve diğ., 2009; Hartl ve diğ., 2007; Provoost ve diğ., 2009). Düzenleyici T hücrelerinin baskılayıcı aktivitelerini arttırmak için *FOXP3* ekspresyonunu indüklemek etkili bir tedavi yöntemi olabilir (Mays ve diğ., 2013; Zhang ve diğ., 2014). Bununla birlikte, yapılan bir çalışmada, alerjik astımlı hastalarda sağlıklı bireylerden daha yüksek Treg sayısı gözlenmiştir (Raedler ve diğ., 2015). Astımlı hastalarda, Treg hücre sayısının artmış olması, enflamasyonu kontrol etmede yetersiz kalan bir düzenleyici mekanizmaya işaret edebilir (Marques ve diğ., 2015). Bu farklı sonuçlar,

çalışmalar arasındaki metodolojik farklılıklar, çevresel etkiler veya çalışmada incelenen kan örneklerinin farklı Treg alt tiplerini ve periferik kan monosit hücrelerini (PBMC) içermesinden kaynaklanıyor olabilir (Marques ve diğ., 2015).

FOXP3 ekspresyonunun indüklenmesi, yeni bir terapötik yaklaşım olarak, fareler üzerinde test edilmiştir (Mays ve diğ., 2013; Zhang ve diğ., 2014). Zhang ve diğ. (2014) tarafından yapılan çalışmada, astımlı farelerde *FOXP3* ekspresyonunun moleküler yaklaşımlarla indüksiyonu sonucunda Th2 immün yanıtın ve hava yolu enflamasyonunun azaldığı gözlemiştir.

FOXP3'ün farklı bölgelerindeki SNP'ler, bu genin ekspresyon düzeyini, son ürünün nükleusa göçünü ve diğer genlerin promotör bölgelerine bağlanmasını etkiler. *FOXP3* geni, yüzden fazla SNP içerir ve bunlardan 20 kadarı farklı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Marques ve diğ., 2015). Özellikle promotör bölgesindeki polimorfizmler, transkripsiyon faktörlerinin bağlanması ve gen ekspresyonu üzerindeki etkileri nedeniyle Treg hücre aktivasyonunun doğal seyrini değiştirdiklerinden oldukça önemlidirler (Pereira ve diğ., 2018). Promotördeki bir SNP, olağan transkripsiyon faktörlerinin promotöre bağlanma afinitesini azaltabilir ve bazı durumlarda bu SNP nedeniyle promotöre yeni transkripsiyon faktörleri bağlanabilir (Marques ve diğ., 2016). *FOXP3* genindeki polimorfizmler bazı otoimmün ve alerjik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir, ancak bu polimorfizmlerin alerjik astım gelişimindeki rolleri yeterince araştırılmamıştır.

FOXP3 geninde en çok çalışılan tek nökleotid polimorfizmi rs3761548 SNP (-3279C/A)'dir ve bu SNP immünolojik ve alerjik hastalıklar dahil olmak üzere farklı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Marques ve diğ., 2015). Bu SNP bölgesinde C nükleotidi yerine A nükleotidinin bulunması *FOXP3* ekspresyonunu etkiler. A allelinin bulunması, E47 ve c-Myb transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerinin değişimine yol açar ve dolayısıyla gen ekspresyonunu azaltır (Shen ve diğ., 2010). A allel varyasyonu, Spl transkripsiyon faktörünün *FOXP3* genine bağlanmasında da rol oynar (Song ve diğ., 2013; Chatrabnous ve diğ., 2018; Pereira ve diğ., 2018).

Macaristan'da yapılan bir çalışmada, C allelinin kadınlarda alerjik rinit (AR) gelişiminde etkili olduğu bulunmuştur (Fodor ve diğ., 2011). Bu çalışma CC ve CA genotipi olan kadınların AR'ye karşı daha yüksek risk taşıdıklarını, AA genotipi ve A allelinin ise koruyucu olduğunu

bildirmektedir (Fodor ve diğ., 2011). Benzer bir çalışmada, Çin popülasyonunda heterozigot CA genotipi ile AR arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Zhang ve diğ., 2009). Tam tersine, Hassannia ve diğ. (2011) ise İran'da AR hastalarıyla yaptıkları bir çalışmada, kadınlarda rs3761548 CA genotipinin ve erkeklerde C genotipinin AR için koruyucu genotip olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca, CA ve CC genotipli kadınların AA genotipi taşıyan kadınlara göre daha düşük total IgE düzeylerine sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Hassannia ve diğ. (2011)'ne göre, A alleli AR'ye yakalanma riskini arttıran allel olabilir.

Hollanda'da yaşayan atopili çocuklarda rs3761548 SNP ile IgE düzeyi arasında anlamlı bir korelasyon olmadığı; ancak, bu SNP'nin yumurta alerjenlerine karşı duyarlılıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Bottema ve diğ., 2010a).

Alerjik hastalıklarla ilişkisi iyi bilinen *FOXP3* genindeki rs3761548 SNP'yi, astımlı hastalarda inceleyen sadece bir çalışmaya rastlanmıştır (Figueiredo ve diğ., 2018). Bu çalışmada astım şiddeti ile *FOXP3* varyantları arasındaki ilişki araştırılmış ve rs3761548 SNP'nin farklı genotipleri ile astım şiddeti arasında bir ilişki olmadığı rapor edilmiştir (Figueiredo ve diğ., 2018).

Bu tez çalışmasında hasta grubunda CC ve C genotiplerinin, sağlıklı bireylerde ise AC ve A genotiplerinin daha yüksek bir frekansa sahip olduğu bulunmuştur (Tablo 4.3). İncelediğimiz hastaların çoğunda AR bulunduğu bilindiğinden, kadınlarda CC ve erkeklerde C genotipinin AR gelişim riskini arttırabileceği, dolayısıyla alerjik astıma yatkınlığın da göstergelerinden biri olabileceği sonucuna varılmıştır.

FOXP3 promotör bölgesinde bulunan diğer bir tek nükleotid polimorfizmi, rs3761549 SNP (-2383C/T)'dir. Bu SNP'deki varyasyonların, Hashimoto tiroiditi (CC genotipi) (Inoue ve diğ., 2010), otoimmün tiroiditi (CT genotipi) (Bossowski ve diğ., 2014), Sedef hastalığı (C allel) (Song ve diğ., 2012) gibi bazı immün sistem hastalıkları; interstisyel akciğer hastalığı (CC genotipi) (Yao ve diğ., 2018), akciğer kanseri (T alleli) (Fazelzadeh Haghighi ve diğ., 2015) ve endometriozise bağlı kısırlık (T alleli) (Andre ve diğ., 2011) ile ilişkilendirilmiştir. Hashimoto hastalarında C allelinin transkripsiyon faktörü Ying Yang 1'in (YY1) gene bağlanma yerini değiştirdiği öne sürülmekte; CC genotipinin, efektör T hücrelerinin aktivitesini arttırarak Treg hücrelerinin düzenleyici işlevini azalttığı ve tiroid dokusunda ciddi tahribata neden olduğu bildirilmektedir (Inoue ve diğ., 2010). Bu SNP'nin atopik

çocuklardaki durumunu araştıran bir çalışma bulunmaktadır (Bottema ve diğ., 2010a), ancak alerjik astımlı yetişkinlerdeki durumu ilk kez bu tezde araştırılmış ve kadınlarda CT genotipinin alerjik astıma yatkınlıkla ilişkili olabileceği ortaya koyulmuştur (Tablo 4.4). *FOXP3* genindeki varyasyonların metabolik etkilerini öngörebilmek için daha fazla veriye ihtiyaç vardır.

Tipik olarak Th2 hücreleri tarafından üretilen IL-13 sitokini de, alerjik enflamasyonun merkezi bir aracısıdır ve alerjik astımda temel yolakların çoğunu indükler (Vladich ve diğ., 2005). Kromozom 5q31 üzerindeki *IL13* lokusu, yaygın SNP'ler içerir. Bu polimorfizmler, *IL13* gen anlatımını ve fonksiyonunu etkileyebilir, böylece astımın patojenitesinde rol oynayabilir. En çok çalışılan SNP'lerden ikisi, promotörde bulunan rs1881457 (-1512A/C) ve ekson 4'te bulunan rs20541 (+2044G/A) SNP'leridir (Hunninghake ve diğ., 2007).

Birçok çalışma çeşitli popülasyonlarda *IL13*'teki SNP'leri, alerjik fenotipler ve atopi ile ilişkilendirmektedir. Özellikle, *IL13* +2044G/A (rs20541), artan total serum IgE, astım, atopi, atopik dermatit ve eozinofili, IgE ve pozitif cilt testlerine göre gruplanmış fenotiplerle güçlü bir şekilde ilişkili bulunmuştur (Graves ve diğ., 2000; Vladich ve diğ., 2005). Araştırmalar, *IL13* geninde +2044G/A bölgesindeki Arg130Gln değişiminin (sinonim olmayan değişim), IL-13'ün α-2 tuzak reseptörüne (IL-13Rα2) afinitesini azalttığını ve astımlı hastalarda IL-13′ün ekspresyonunun arttığını göstermektedir (Hunninghake ve diğ., 2007). Bu veri arjinin amino asidinin IL-13′ün IL-13Rα2'ye bağlanması için önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Vladich ve diğ., 2005). Bu tuzak reseptör, hem hücreler üzerinde, hem de çözünür halde IL-13'e yüksek afinite ile bağlanır, ancak sinyal iletmez. IL-13Rα2 reseptörü, IL-13'ü sıkı bir şekilde kontrol etmek için eksprese edilir ve IL-13 tepkilerinin önemli bir negatif regülatörüdür (Vladich ve diğ., 2005). Heinzmann ve diğ., (2000) İngiliz ve Japon popülasyonlarında Arg130Gln değişiminin astım ve atopi ile ilişkili olduğunu rapor etmiştir. Hunninghake ve diğ. (2007) alerjik astımlı çocuklar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, rs20541 SNP'de A allelinin yüksek eozinofil sayısı ve serum total IgE düzeyi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca diğer bir çalışmada, bu SNP'nin, FEV1 (birinci saniyedeki zorlu ekspiratuar volüm) ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmaya göre +2044G/A polimorfizmi çocuklarda ve ergenlerde düşük akciğer fonksiyonu için risk faktörü olabilmektedir (Park ve diğ., 2008).

Beghé ve diğ., (2010) astımlı hastalarda, rs1881457 (-1512A/C) ve rs20541 (+2044G/A) SNP'lerini atopi riski ile ilişkilendirmektedir. Shazia ve diğ. (2013) rs1881457 ile atopi ve alerjik astım arasında ilişki bulunurken, rs20541'nin ilişkili olmadığını bildirmişlerdir.

Amerika Birleşik Devletleri ve Almanya'daki hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada rs1881457 SNP ile toplam serum IgE düzeyi arasında güçlü ilişki bulunduğu belirlenmiştir (Graves ve diğ., 2000). Benzer bulguların elde edildiği başka yayınlar da vardır (Kim ve diğ., 2006; Maier ve diğ., 2006).

Bu tez kapsamında her iki SNP de incelenmiş ve her ikisi için de alerjik astımlı hasta ve sağlıklı kadın ve erkeklerde sadece AA genotipi ve A allelinin bulunduğu gözlenmiştir (Tablo 4.5 ve 4.6). Önceki araştırmaların sonuçlarına bakıldığında farklı toplumların birçoğunda rs20541 SNP'de A alleli, astım ve atopi ile ilişkilendirilmiştir. Bu araştırmada hem hasta hem de sağlıklı bireylerde AA genotipinin bulunması, Türk toplumunun alerjik astıma yatkınlığını gösteriyor olabilir. Ancak, polimorfizmlerin her etnik popülasyonda farklı olduğu göz önüne alınırsa, bunun kesin olarak anlaşılması için daha büyük bir Türk popülasyonunda araştırılması gerekmektedir.

Bağışıklık yanıtını baskılayan sitokinlerin (IL-35, IL-10 ve TNF) üretimi de, Treg hücrelerinin immünosupresif işlevlerini yerine getirmesi için önemli bir moleküler mekanizmadır (Wei ve diğ., 2017). IL-10 ve IL-35 gibi immünosupresif sitokinlerin üretimi iki farklı Treg alt kümesi tarafından yapılır (Wei ve diğ., 2017). IL-12 sitokin ailesinin bir üyesi olan IL-35'in, yeni bir anti-enflamatuvar ve baskılayıcı sitokin olduğu bildirilmektedir (Gao ve diğ., 2017b). Li ve diğ. (2012) TGF-β'nın aksine, IL-35'in insan dokularında devamlı (konstitütif olarak) eksprese edilmediğini, ancak enflamatuvar uyaranlara yanıt olarak indüklenebilir olduğunu göstermişlerdir. İnterlökin-35'in farklı astım fenotiplerinin patogenezinde etkili olduğu görülmüştür. Bu sitokin Th17 ve Th2'yi baskılayarak nötrofilik ve eozinofilik astımın kontrolünde önemli rol oynar (Gao ve diğ., 2017b).

Bu tez çalışmasında, alerjik astımlı hastaların serum IL-35 düzeyleri sağlıklı bireylere kıyasla daha yüksek bulunmuş olmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (Tablo 4.7 ve Şekil 4.20). Khoshkhui ve diğ. (2017) de astımlı çocuklarla yaptıkları çalışmada, benzer bir sonuç elde etmişlerdir. Buna karşın, Wang ve diğ. (2015b) alerjik astımlı hastalarda IL-35 mRNA ve dolaşımdaki IL-35 protein düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna göre azaldığını

bildirmişlerdir. Ayrıca, *in vitro*'da IL-35 dozu arttıkça $CD4^+$ T lenfositlerinin ve dolayısıyla IL-4 üretiminin azaldığı gözlenmiştir (Wang ve diğ., 2015b). Ma ve diğ. (2014) de astımlı çocuklarda IL-35 mRNA ve protein düzeylerinin düşük olduğunu bildirmektedirler. Ayrı bir çalışmada, alerjik astım hastalarında plazma IL-35 düzeylerinin, IL-4 üreten $CD8^+$ T hücre sayısı ve IL-4 konsantrasyonu ile negatif korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir (Wang ve diğ., 2015a).

Serum IgE düzeyinin yükselmesi alerjik astım sürecinin güçlü bir belirleyicisi olarak kabul edilir (Xu ve diğ., 2017). İnterlökin-35'in, B hücrelerinden IgE üretimini inhibe ettiği ve Th2 hücrelerini baskılayıcı iTR35 (IL-35 ile indüklenmiş düzenleyici T hücreleri) hücrelerine dönüştürdüğü rapor edilmiştir (Shamji ve diğ., 2019). Bu nedenle, IL-35'in IgE düzeyini düşürmesi ve alerjik yanıtı hafifletmesi muhtemeldir. Bu tez çalışmasında, hasta grubunda serumda total IgE ve IL-35 düzeyleri arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon gözlenmiştir (Şekil 4.21). IL-35 ile IgE arasındaki bu korelasyon, immün yanıtın dengesini korumak için IgE anlatımının durdurulmasını sağlayan bir yanıta bağlı olabilir. Bu tez çalışması kapsamında IL-35 düzeyi ile AKT skoru arasında korelasyon olup olmadığı da analiz edilmiş ve bu iki parametre arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Wong ve diğ. (2015) ise alerjik astımlı hastalarda plazma IL-35 düzeyleri ile astım semptomlarının şiddeti arasında pozitif yönde anlamlı bir ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Wong ve diğ., 2015).

Serum IL-35 düzeyi ile *FOXP3* geninin promotör bölgesindeki polimorfizmler (rs3761548 ve rs3761549) arasındaki olası ilişki ilk kez bu tezde analiz edilmiştir. Bulgularımıza göre, hastalarda ve sağlıklı bireylerde rs3761548 SNP'de sırasıyla AC ve AA genotipleri, CC genotipine göre daha yüksek IL-35 düzeyine sahiptir (Tablo 4.9). Tüm katılımcılar (alerjik astım hastaları ve sağlıklı denekler) dikkate alındığında, rs3761548 SNP'de AA ve AC genotipine sahip olan kadınlarda serum IL-35 düzeylerinin, CC genotipine sahip olanlara göre önemli ölçüde yüksek olduğu görülmektedir. Erkeklerde A genotipinde IL-35 düzeyi C genotipine göre yüksek olsa da, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu bulgulara göre, rs3761548 SNP, kadınlarda IL-35 sitokin üretimini etkileyerek alerjik astım patogenezine katkıda bulunabilir. Benzer bir analiz IL-35 düzeyi ile rs3761549 SNP arasında da yapılmış ve aralarında bir ilişki olmadığı bulunmuştur (Tablo 4.10).

Astım kontrolü için yapılan araştırmalar ve teorik olasılıklara rağmen, IL-35'in astımdaki rolü hala tam olarak belirlenememiştir ve tartışmalıdır (Gao ve diğ., 2017b). Deneysel

sonuçlardaki bu çelişkiler astımdaki hava yolu enflamasyonunun heterojenliği ve çalışılan astım alt tiplerindeki farklılıklar ile açıklanabilir. Bu sonuçlar IL-35 düzeyi ve alerjik astım arasındaki ilişkiyi açıklamada daha çok araştırmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Huang ve diğ. (2011) bronkoalveoler lavaj sıvısı içindeki IL-4, IL-5 ve IL-13'ün, rekombinant tek zincirli IL-35 kodlayan plazmid DNA uygulamasıyla inhibe edildiğini göstermişlerdir. Suzuki ve diğ., (2017) ilk kez rekombinant IL-35'in (rIL-35) farelerde nazal alerjik yanıtları ve semptomları inhibe ettiğini ve servikal lenf düğümlerindeki düzenleyici T hücrelerinin sayısını arttırdığını rapor etmişlerdir. Ayrıca rIL-35'in internazal uygulaması ile alerjik rinitin hafiflediğini ileri sürmektedirler (Suzuki ve diğ., 2017). Dolayısıyla IL-35'in, alerjik astıma karşı gelecekte geliştirilecek yeni immün tedavi yöntemlerinde yer alacağı öngörülmektedir (Wang ve diğ., 2015a; Shamji ve diğ., 2019). Tezde elde edilen sonuçların da bu alana katkı sağlaması beklenmektedir.

Özet olarak, bu tez çalışmasındaki verilerle, *FOXP3* geni üzerinde bulunan rs3761548 SNP için CC ve C genotiplerinin, rs3761549 SNP için de CT genotipinin alerjik astım riskini arttırabileceği düşünülmektedir. Hasta ve sağlıklı bireylerin IL-35 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmasa da, rs3761548 SNP'ye bağlı anlamlı düzey değişikleri gözlemlenmiştir. Dolayısıyla rs3761548 SNP, alerjik astıma duyarlılığı ve serum IL-35 konsantrasyonunu etkileyebilir. IgE düzeyi yüksek hastalarda IL-35 düzeyinin artmış olması bu interlökinin alerjik immün yanıtı baskılama aktivitesiyle açıklanabilir.

İnterlökin-13 geni (*IL13*) üzerinde bulunan rs1881457 (-1512A/C) ve rs20541 (+2044G/A) SNP'leri ile alerjik astım arasında bir bağlantı bulunmamıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında alerjik astım için analiz ettiğimiz polimorfizmler, Türk popülasyonunu karakterize etmede bir başlangıç adımı olarak görülebilir. Ancak, bu polimorfizmlerin alerjik astım üzerindeki rolünü aydınlatmak için, daha geniş popülasyonlarda ve genom boyutunda çalışılması gerektiği düşünülmektedir. Genom boyu ilişkilendirme çalışması [Genome-wide association study (GWAS)] insan hastalıklarında rol alan genlerin tanımlanmasına ışık tutan yeni bir yaklaşımdır. Bu çalışma herhangi bir özellik veya hastalık ile ilişkili fonksiyonel bölgeleri ve genetik varyasyonları tüm genom boyutunda analiz eder. GWAS'ın nihai hedefi, kimlerin ilgili hastalığa daha yatkın olduğunu belirlemek ve bireylerin bu hastalığa yakalanma riskini öngörmektir. Bu yolla, hastalığa yatkınlığın temelleri daha iyi anlaşılabilir, hastalığın önlenmesi ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirmesi

mümkün olabilir (Bush ve Moore, 2012). Gelecekte alerjik astımın tanı ve tedavisinde ilerleme kaydetmek için de benzer çalışmalar yürütülebilir.

Tek nükleotid varyasyonlarının alerjik hastalıklar üzerinde etkileri ve mekanizmalarını daha iyi anlamak ve açıklayabilmek için, tüm genom analizlerine ek olarak genotip/fenotip ilişkisinin araştırılması gerekir. Bu yaklaşım hastalığın gelişimine ilişkin birçok cevapsız soruyu ortadan kaldıracaktır. Bunun için *in vitro* ve *in vivo* olarak bu genlerde bulunan SNP'lerin gen anlatımı, protein fonksiyonu ve gen-protein etkileşimi düzeylerinde de araştırılması yararlı olacaktır. Ayrıca bu tarz araştırmalar tedavi için alternatif immün tedavi ve kişiye özel tedavi yaklaşımlarının da gündeme gelmesine yardımcı olabilir (Marques ve diğ., 2015).

Oksidatif stres, ROT ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması anlamına gelir (Betteridge, 2000; Hasbal ve diğ., 2010). Bugüne kadar yapılan çalışmalar diyabet, kanser, nörodejeneratif bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar ve alerjik solunum yolu hastalıkları gibi hastalıklarda oksidatif stresin varlığını ve bu hastalıkların ilerlemesindeki rolünü açık bir şekilde ortaya koymaktadır (Bowler ve Crapo, 2002; Giustarini ve diğ., 2009; Liguori ve diğ., 2018; Ighodaro ve Akinloye, 2018). Astımlı hastalar üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda oksidatif stresin arttığı bildirilmiştir (Rahman ve diğ., 1996; Nadeem ve diğ., 2003; Ahmad ve diğ, 2012). Astımda artmış oksidatif stresin en önemli nedeni, enflamatuvar hücrelerin (eozinofiller, nötrofiller monositler ve makrofajlar) aktivasyonu ve yerleşik hücrelerin (epitelyal ve düz kas hücreleri gibi) ROT'un aşırı üretimine yol açmasıdır (Sagdic ve diğ., 2011; Sahiner ve diğ., 2011; Aldakheel ve diğ., 2016). Üretilen ROT hücresel biyomoleküllere (lipitler, proteinler ve DNA) saldırır ve endotel disfonksiyonuna ve doku hasarına neden olur (Bjelland ve Seeberg, 2003; Aldakheel ve diğ., 2016; Marrocco ve diğ., 2017). Bu durumda, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar yeterli düzeyde değilse veya düzgün çalışmazlarsa, ROT daha ciddi hasarlara neden olabilir (Bjelland ve Seeberg, 2003; Marrocco ve diğ., 2017).

Malondialdehit (MDA) ve protein karbonilleri (PK), patolojik süreçlerde oksidatif stresin varlığını gösteren yaygın biyobelirteçlerdir (Dalle-Donne ve diğ., 2003; Khoubnasabjafari ve diğ., 2015). Astımlı hastalardan alınan plazma, serum ve BAL (bronkoalveoler lavaj sıvısı) örneklerinde MDA ve PK düzeylerinin yüksek olduğu daha önce rapor edilmiştir (Foreman ve diğ., 1999; Schock ve diğ., 2003).

Bu çalışmada da alerjik astımı olan hastalarda MDA ve PK düzeylerinin, dolayısıyla oksidatif stresin sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Astımdaki oksidatif stresle ilgili önceki çalışmaların çoğunda, hastalığın tipi (alerjik ya alerjik olmayan) belirsizdir. Bununla birlikte elde ettiğimiz sonuçların önceki raporlarla (Rahman ve diğ., 1996; Nadeem ve diğ., 2003; Ahmad ve diğ., 2012) uyumlu olduğu söylenebilir. Dolayısıyla alerjik astımda oksidatif stresin arttığı bir kez daha doğrulanmıştır.

Daha da ileri olarak, oksidatif stres parametreleri, astım kontrol testi (AKT) ile tam kontrollü (TK), kısmen kontrollü (KK) ve kontrolsüz (KS) olarak tanımlanan hasta alt grupları arasında da karşılaştırılmıştır. MDA ve PK düzeylerindeki artışların KS alt grubunda çok belirgin olduğu saptanmıştır. Sonuçlarımız TK alt grubunda bile MDA ve PK düzeylerinin sağlıklı bireylere göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, astımlı hastalarda asemptomatik aşamalarda ve tedaviden sonra bile oksidatif stresin hala mevcut olduğunu belirten çalışmalarla (Powell ve diğ., 1994; Ozaras ve diğ., 2000; Alzoghaibi ve Bahammam, 2007; Sagdic ve diğ., 2011) çok uyumludur.

Antioksidan savunmanın en güçlü silahlarından biri glutatyondur. Glutatyon, ROT'ları ortadan kaldırır ve böylece bunların biyolojik moleküllere vereceği hasarları azaltır (Forman ve diğ., 2009; Michelet ve diğ., 1995; Rahman ve MacNee, 2000). Bu tripeptit, akciğer yüzeyinde, plazma, sitozol ve hücre dışı boşluklarda bulunur (Forman ve diğ., 2009; Valko ve diğ., 2007). İndirgenmiş glutatyon (GSH), peroksidaz gibi bazı antioksidan enzimler için bir kofaktör görevi görür; hidrojen peroksit ve süperoksiti temizler; C vitamini ve E vitamini gibi bazı antioksidanları yeniden indirgeyebilir (Valko ve diğ., 2007; Forman ve diğ., 2009).

Bu çalışmada GSH düzeyi hasta bireylerde anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Ercan ve diğ. (2006) hafif ve orta şiddetli astımı olan çocuklarda GSH düzeyinin kontrollere kıyasla sistematik olarak azaldığını, MDA düzeyinin ise arttığını bildirmişlerdir. Buna karşın, astım hastalarında yüksek GSH düzeyi rapor eden bir araştırmaya da literatürde rastlanmıştır (Vural ve Uzun, 2000).

Astımlı hastalarda GSH düzeyindeki düşüş bu molekülün aşırı tüketiminden (Ercan ve diğ., 2006) veya glutatyon yapısında bulunan amino asitlerin eksikliğinden (Sackesen ve diğ., 2008) kaynaklanabilir. Astımlı çocuklarda glisin ve glutamik asit düzeyinin düşük olduğu bulunmuş ve bunun nedeninin, serbest radikallerle başa çıkmak üzere daha fazla glutatyon

üretmek için bu amino asitlerin aşırı kullanımından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (Sacksen ve diğ., 2008). Ayrıca, çeşitli çalışmalar astımlı hastaların oksitlenmiş glutatyon (GSSG) ve toplam glutatyon (GSH ve GSSG) düzeylerinin eritrosit hemolizatında, plazmada, bronşiyal yıkama ve BAL sıvılarında daha yüksek olduğunu göstermiştir (Mak ve diğ., 2004; Kelly ve diğ., 1999; Rahman ve MacNee, 2000; Vural ve Uzun, 2000; Smith ve diğ., 1993). Bu çalışmaların sonucuna göre, glutatyon düzeyindeki artış veya azalış, oksidatif stresin şiddetine bağlı bir cevap olabilir (Hasbal ve diğ., 2010).

Ferrik indirgeyici antioksidan güç (FRAP) testi, toplam antioksidan kapasiteyi belirlemek için dolaylı bir yöntemdir (Benzie ve Strain, 1996). Bazı çalışmalar astımlı hastalarda toplam antioksidan kapasitenin azaldığını göstermiştir (Rahman ve diğ., 1996; Yadav ve Saini, 2016; Ahmad ve diğ., 2012). Bu çalışmada da alerjik astım hastalarında FRAP düzeyleri, önceki raporlarla uyumlu şekilde, düşük bulunmuştur. Toplam antioksidan kapasitedeki bu düşüklük antioksidan moleküllerin, özellikle GSH'ın az olmasına bağlı olabilir. Çünkü GSH birçok antioksidanın ve vitaminin indirgenmesine ve geri kazanımına katkısı büyük olan bir moleküldür.

Hasta alt grupları (TK, KK ve KS) arasında antioksidan savunma belirteçleri (plazma GSH ve FRAP düzeyleri) bakımından anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuç alerjik astım hastalarında antioksidan savunmanın, astım kontrolünden bağımsız şekilde zayıf olduğunu düşündürmektedir.

Katalaz, oksidatif strese karşı ilk savunma hattında yer alan antioksidan bir enzimidir (Ighodaro ve Akinloye, 2018). Bu metalloprotein hidrojen peroksiti suya çevirir (Day, 2009; Nandi ve diğ., 2019). Astımda katalaz aktivitesi hakkında tartışmalı sonuçlar vardır. Çeşitli çalışmalara göre astımlı hastaların BAL sıvısında (Ghosh ve diğ., 2006), kırmızı kan hücrelerinde (Novak ve diğ., 1991; Ahmad ve diğ., 2012) ve serumunda (Yadav ve Saini, 2016) katalaz aktivitesi düşüktür. Katalaz aktivitesinde hasta ve kontrol arasında fark olmadığını (Nadeem ve diğ., 2003) veya hastalarda artış olduğunu (Mak ve diğ., 2004; Yang ve diğ., 2011) bildiren yayınlar da vardır.

Bu çalışmada, alerjik astımlı hastalarda serum katalaz aktivitesi sağlıklı kontrol bireylere göre daha düşük bulunmuştur. Bununla birlikte, hasta alt grupları arasında istatistiksel bir karşılaştırma yaptığımızda, kısmen kontrol edilen (KK) alt grupta katalaz aktivitesi, şaşırtıcı

bir şekilde, diğer alt gruplardakinden belirgin şekilde daha yüksek çıkmıştır. Bu nedenle, katalaz aktivitesinin, en azından alerjik astımda antioksidan savunmanın güvenilir bir belirteci olmadığı sonucuna varılmıştır.

Genel olarak, astımın tedaviden sonra bile tamamen kontrol edilemediği konusunda fikir birliği vardır (Janson ve diğ., 2019). Çalışmamız şu ana kadar alerjik astımlı hastalarda AKT skoru ile oksidatif stres belirteçleri arasındaki ilişkiyi araştıran ilk rapordur. Sonuçlarımıza göre, alt gruplar arasında belirgin farklılıklar gösteren plazma MDA düzeyi alerjik astım hastalarında astım kontrol düzeyinin güvenilir bir göstergesi gibi görünmektedir. Şüphesiz ki bu değerlendirme daha büyük kohortlarla yapılacak çalışmalarla doğrulanmaya muhtaçtır. Ayrıca astım kontrol düzeylerini yansıtan biyokimyasal parametrelere ilişkin daha güvenilir veriler elde etmek amacıyla hastaların yaşam tarzlarının, yaşam ortamlarının ve beslenme durumlarının sorgulanması yerinde olacaktır.

Sonuç olarak bulgularımız, alerjik astımlı hastalarda, kontrollü koşullar altında bile oksidatif stresin yükseldiğini ve antioksidan savunmanın zayıfladığını ortaya koymuştur. Bu nedenle antioksidan desteğinin oksidatif stresi azaltarak alerjik astım hastalarının yaşam kalitesini arttırabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

AAAAI (American Academy of Allergy Asthma & Immunology), 2020, *Asthma statistics*, https://www.aaaai.org/about-aaaai/newsroom/asthma-statistics, [Ziyaret Tarihi: 10 Haziran 2020].

Ahmad, A., Shameem, M. and Husain, Q., 2012, Relation of oxidant-antioxidant imbalance with disease progression in patients with asthma, *Annals of Thoracic Medicine*, 7(4), 226-232.

Al-Abdulla, N. O., Al-Naama, L. M. and Hassan, M. K., 2010, Antioxidant status in acute asthmatic attack in children, *Journal of the Pakistan Medical Association*, 60(12), 1023-1027.

Aldakheel, F.M., Thomas, P. S., Bourke, J. E., Matheson, M. C., Dharmage, S. C. and Lowe, A. J., 2016, Relationships between adult asthma and oxidative stress markers and pH in exhaled breath condensate: a systematic review, *Allergy*, 71(6), 741-757.

Ali F. R., 2011, Does this patient have atopic asthma?, *Clinical Medicine (London, England)*, 11(4), 376–380.

Allakhverdi, Z., Comeau, M. R., Jessup, H. K., Yoon, B. R., Brewer, A., Chartier, S., Paquette, N., Ziegler, S. F., Sarfati, M. and Delespesse, G., 2007, Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells, *The Journal of Experimental Medicine*, 204(2), 253-258.

Alzoghaibi, M. A. and Bahammam, A. S., 2007, Lipid peroxides in stable asthmatics receiving inhaled steroids and long-acting beta2-agonists, *Respirology*, 12, 439–442.

Andre, G. M., Barbosa, C. P., Teles, J. S., Vilarino, F. L., Christofolini, D. M. and Bianco, B., 2011, Analysis of FOXP3 polymorphisms in infertile women with and without endometriosis, *Fertility and Sterility*, 95, 2223-2227.

Aoyama, K. and Nakaki, T., 2015, Glutathione in cellular redox homeostasis: association with the excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1), *Molecules*, 20(5), 8742-8758.

Arulselvan, P., Fard, M. T., Tan, W. S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M. E. and Kumar, S. S., 2016, Role of antioxidants and natural products in inflammation, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 5276130.

Backman, H., Räisänen, P., Hedman, L., Stridsman, C., Andersson, M., Lindberg, A., Lundbäck, B. and Rönmark, E., 2017, Increased prevalence of allergic asthma from 1996 to 2006 and further to 2016-results from three population surveys, *Clinical & Experimental Allergy*, 47, 1426–1435.

Baos, S., Calzada, D., Cremades-Jimeno, L., Sastre, J., Picado, C., Quiralte, J., Florido, F., Lahoz, C., and Cárdaba, B, 2018, Nonallergic asthma and its severity: biomarkers for its discrimination in peripheral samples, *Frontiers in Immunology*, 9, 1416.

Bardel, E., Larousserie, F., Charlot-Rabiega, P., Coulomb-L'Herminé, A. and Devergne, O., 2008, Human $CD4^+$ $CD25^+$ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35, *Journal of Immunology*, 181(10), 6898–6905.

Battaglia, S., den Hertog, H., Timmers, M. C., Lazeroms, S. P., Vignola, A. M., Rabe, K. F., Bellia, V., Hiemstra, P. S., and Sterk, P. J., 2005, Small airways function and molecular markers in exhaled air in mild asthma, *Thorax*, 60(8), 639–644.

Beaudet, A.L. and Tsui, L.C., 1993, A suggested nomenclature for designating mutations, *Human Mutation*, 2(4), 245–248.

Beers, R.F. and Sizer, J.W., 1952, Spectrophotometric method for measuring breakdown of hydrogen peroxide catalase, *Journal of Biological Chemistry*, 195, 133–140.

Beghé, B., Hall, I. P., Parker, S. G., Moffatt, M. F., Wardlaw, A., Connolly, M. J., Fabbri, L. M., Ruse, C. and Sayers, I., 2010, Polymorphisms in IL13 pathway genes in asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *Allergy*, 65(4), 474481.

Belperio, J. A., Dy, M., Burdick, M. D., Xue, Y. Y., Li, K., Elias, J. A. and Keane, M. P., 2002, Interaction of IL-13 and C10 in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 27(4), 419–427.

Benzie, I.F. and Strain J.J., 1996, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay, *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.

Betteridge, D. J., 2000, What is oxidative stress?, *Metabolism*, 49(2), 3–8.

Bettini, M., Castellaw, A. H., Lennon, G. P., Burton, A. R., and Vignali, D. A., 2012, Prevention of autoimmune diabetes by ectopic pancreatic β-cell expression of interleukin-35, *Diabetes*, 61(6), 1519–1526.

Beutler. E., 1993, The designation of mutations, *American Journal of Human Genetics*, 53, 783–785.

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. and Kalayci, O., 2012, Oxidative stress and antioxidant defense, *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19.

Bjelland, S. and Seeberg, E., 2003, Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation, *Mutation Reaserch*, 531(1-2), 37-80.

Blyth, D. I., Wharton, T. F., Pedrick, M. S., Savage, T. J. and Sanjar, S., 2000, Airway subepithelial fibrosis in a murine model of atopic asthma: suppression by dexamethasone or anti-interleukin-5 antibody, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 23(2), 241–246.

Borish, L., 2016, The immunology of asthma: asthma phenotypes and their implications for personalized treatment, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 117(2), 108–114.

Bossowski, A., Borysewicz-Sańczyk, H., Wawrusiewicz-Kurylonek, N., Zasim, A., Szalecki, M., Wikiera, B., Barg, E., Myśliwiec, M., Kucharska, A., Bossowska, A., Gościk, J., Ziora, K., Górska, M. and Krętowski, A., 2014, Analysis of chosen polymorphisms in FoxP3 gene in children and adolescents with autoimmune thyroid diseases, *Autoimmunity*, 47(6), 395–400.

Bottema, R. W., Kerkhof, M., Reijmerink, N. E., Koppelman, G. H., Thijs, C., Stelma, F. F., Smit, H. A., Brunekreef, B., van Schayck, C. P. and Postma, D. S., 2010a, X-chromosome forkhead box p3 polymorphisms associate with atopy in girls in three Dutch birth cohorts, *Allergy*, 65(7), 865–874.

Bottema, R. W., Nolte, I. M., Howard, T. D., Koppelman, G. H., Dubois, A. E., de Meer, G., Kerkhof, M., Bleecker, E. R., Meyers, D. A. and Postma, D. S., 2010b, Interleukin 13 and interleukin 4 receptor-α polymorphisms in rhinitis and asthma, *International Archives of Allergy and Immunology*, 153(3), 259–67.

Bowler, R. P. and Crapo, J. D., 2002, Oxidative stress in allergic respiratory diseases, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110(3), 349–356.

Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.

Bryce, P. J., Mathias, C. B., Harrison, K. L., Watanabe, T., Geha, R. S. and Oettgen, H. C., 2006, The H1 histamine receptor regulates allergic lung responses, *The Journal of Clinical Investigation*, 116(6), 1624–1632.

Buege, J. A. and Aust, S. D., 1978, Microsomal lipid peroxidation, *Methods in Enzymology*, 52, 302–10.

Burton, G. J. and Jauniaux, E., 2011, Oxidative stress, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(3), 287–299.

Bush, W. S. and Moore, J. H., 2012, Genome-wide association studies, *PLOS Computational Biology*, 8(12), 1002822.

Cadenas, E. and Davies, K. J., 2000, Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3-4), 222–230.

Calzada, D., Baos, S., Cremades-Jimeno, L. and Cárdaba, B., 2018, Immunological mechanisms in allergic diseases and allergen tolerance: the role of Treg cells, *Journal of Immunology Research*, 2018, 1-10.

Castellanos-Rubio, A. and Ghosh,S., 2019, Disease-associated SNPs in inflammation-related lncRNAs, *Frontiers in Immunology*, 10, 420.

Chang, H. W., Cheng, Y. H., Chuang, L. Y. and Yang, C. H., 2010, SNP-RFLPing 2: an updated and integrated PCR-RFLP tool for SNP genotyping, *BMC Bioinformatics*, 11, 173.

Chanock, S., 2001, Candidate genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the study of human disease, *Diseases Markers*, 17(2), 89-98.

Chatrabnous, N., Ghaderi, A., Ariafar, A., Razeghinia, MS., Nemati, M. and Jafarzadeh, A., 2018, Serum concentration of interleukin-35 and its association with tumor stages and *FOXP3* gene polymorphism in patients with prostate cancer, *Cytokine*, 113, 221-227.

Chelikani, P., Fita, I. and Loewen, P.C., 2004, Diversity of structures and properties among catalases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 192–208.

Cho, Y. S. and Moon, H-B., 2010, The role of oxidative stress in the pathogenesis of asthma, *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 2(3), 183–187.

Cianferoni, A. and Spergel, J., 2014, The importance of TSLP in allergic disease and its role as a potential therapeutic target, *Expert Review of Clinical Immunology*, 10(11), 1463–1474.

Cipriani, F., Calamelli, E. and Ricci, G., 2017, Allergen avoidance in allergic asthma, *Frontiers in Pediatrics*, 5, 103.

Collison, L. W., Chaturvedi, V., Henderson, A. L., Giacomin, P. R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C. J., Brown, S. A., Rehg, J. E., Jones, M. L., Ni, H. T., Artis, D., Turk, M. J. and Vignali, D. A., 2010, IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population, *Nature Immunology*, 11(12), 1093–1101.

Comhair, S. A., Bhathena, P. R., Farver, C., Thunnissen, F. B. and Erzurum, S. C., 2001, Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells, *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 15(1), 70-78.

Commandeur, J. N., Stijntjes, G. J. and Vermeulen, N. P., 1995, Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics, *Pharmacological Reviews*, 47(2), 271–330.

Corren, J., 2013, Asthma phenotypes and endotypes: an evolving paradigm for classification, *Discovery Medicine*, 15(83), 243-9.

Croft, M., So, T., Duan, W. and Soroosh, P., 2009, The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease, *Immunological Reviews*, 229(1), 173–191.

Cuadrado, E., van den Biggelaar, M., de Kivit, S., Chen, Y. Y., Slot, M., Doubal, I., Meijer, A., van Lier, R.A.W., Borst, J. and Amsen, D., 2018, Proteomic analyses of human regulatory T cells reveal adaptations in signaling pathways that protect cellular identity, *Immunity*, 48(5), 1046–1059.

Curotto de Lafaille, M.A., Kutchukhidze, N., Shen, S., Ding, Y., Yee, H. and Lafaille, J.J., 2008, Adaptive Foxp31 regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation, *Immunity*, 29, 114-126.

Dahl, J. U., Gray, M. J. and Jakob, U., 2015, Protein quality control under oxidative stress conditions, *Journal of Molecular Biology*, 427(7), 1549–1563.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A. and Colombo, R., 2003, Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, *Clinica Chimica Acta*, 329(1-2), 23–38.

Davies K. J., 1987, Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects, *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 9895–9901.

Davies, K.J.A., 2000, Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems, *IUBMB Life*, 50, 279–289.

Day, B. J., 2009, Catalase and glutathione peroxidase mimics, *Biochemical Pharmacology*, 77(3), 285–296.

Dröge W., 2002, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95.

Dunford, P. J., O'Donnell, N., Riley, J. P., Williams, K. N., Karlsson, L. and Thurmond, R.L., 2006, The histamine H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells, *The Journal of Immunology*, 176(11), 7062-7070.

Eckl-Dorna, J., Villazala-Merino, S., Linhart, B., Karaulov, A. V., Zhernov, Y., Khaitov, M., Niederberger-Leppin, V. and Valenta, R., 2019, Allergen-specific antibodies regulate secondary allergen-specific immune responses, *Frontiers in Immunology*, 17(9), 3131.

Ellis, M. K., Zhao, Z. Z., Chen, H. G., Montgomery, G. W., Li, Y. S. and McManus, D. P., 2007, Analysis of the 5q31 33 locus shows an association between single nucleotide polymorphism variants in the IL-5 gene and symptomatic infection with the human blood fluke, *Schistosoma japonicum*, *Journal of Immunology*, 179(12), 8366–8371.

Emin, O., Hasan, A., Aysegul, D. and Rusen, D., 2012, Total antioxidant status and oxidative stress and their relationship to total IgE levels and eosinophil counts in children with allergic rhinitis, *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 22(3), 188-192.

Ercan, H., Birben, E., Dizdar, E. A., Keskin, O., Karaaslan, C. and Soyer, O. U., 2006, Oxidative stress and genetic and epidemiologic determinants of oxidant injury in childhood asthma, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(5), 1097-1104.

Fahy, J. V., Fleming, H. E., Wong, H. H., Liu, J. T., Su, J.Q., Reimann, J., Fick, R. B. and Boushey, H. A., 1997, The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on the early- and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 155(6), 1828-1834.

Fazelzadeh Haghighi, M., Ghayumi, M. A., Behzadnia, F. and Erfani, N., 2015, Investigation of *FOXP3* genetic variations at positions -2383 C/T and IVS9+459 T/C in Southern Iranian patients with lung carcinoma, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 18, 5.

Federico, A., Morgillo, F., Tuccillo, C., Ciardiello, F. and Loguercio, C., 2007, Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis, *International Journal of Cancer*, 121(11), 2381–2386.

Fehrenbach, H., Wagner, C. and Wegmann, M., 2017, Airway remodeling in asthma: what really matters, *Cell and Tissue Research*, 367, 551–569.

Figueiredo, C., Carneiro, N., Fiuza, B., Silva, H., Silva, R., Carneiro, T., Silva, M., Carneiro, V., Costa, R., Fernandes, J., Cardoso, L., Filho, A. C. and Freitas, H., 2018, *FOXP3* genetic variants are associated with asthma severity in Brazilian women, *European Respiratory Journal*, 52, 4995.

Fitzpatrick, A. M., Jones, D. P. and Brown, L. A., 2012, Glutathione redox control of asthma: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities, *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(2), 375–408.

Flood-Page, P., Menzies-Gow, A., Phipps, S., Ying, S., Wangoo, A., Ludwig, M. S. and Kay, A. B., 2003, Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics, *The Journal of Clinical Investigation*, 112(7), 1029–1036.

Fodor, E., Garaczi, E., Polyanka, H., Koreck, A., Kemeny, L. and Szell, M., 2011, The rs3761548 polymorphism of *FOXP3* is a protective genetic factor against allergic rhinitis in the Hungarian female population, *Human Immunology*, 72(10), 926–929.

Fogarty, A., Lewis, S., Weiss, S. and Britton, J., 2000, Dietary vitamin E, IgE concentrations, and atopy, *The Lancet Journal*, 356(9241), 1573–1574.

Foreman, R. C., Mercer, P. F., Kroegel, C. and Warner, J. A., 1999, Role of the eosinophil in protein oxidation in asthma: possible effects on proteinase/antiproteinase balance, *International Archives of Allergy and Immunology*, 118(2-4), 183–186.

Forman, H. J., Zhang, H. and Rinna, A., 2009, Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis, *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1-2), 1-12.

Frati, F., Salvatori, C., Incorvaia, C., Bellucci, A., Di Cara, G., Marcucci, F. and Esposito, S., 2018, The role of the microbiome in asthma: the gut-lung axis, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), 123.

Gao, H., Ying, S. and Dai, Y., 2017a, Pathological roles of neutrophil-mediated inflammation in asthma and its potential for therapy as a target, *Journal of Immunology Research*, 3743048.

Gao, P., Su, Z., Lv, X. and Zhang, J., 2017b, Interluekin-35 in asthma and its potential as an effective therapeutic agent, *Mediators of Inflammation*, 5931865.

Genetics Home Reference, 2020, https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genomicresearch/snp, [Ziyaret Tarihi: 7 Temmuz 2020].

Ghosh, R. and Mitchell, D. L., 1999, Effect of oxidative DNA damage in promoter elements on transcription factor binding, *Nucleic Acids Research*, 27(15), 3213–3218.

Ghosh, S., Janocha, A. J., Aronica, M. A., Swaidani, S., Comhair, S. A., Xu, W., Zheng, L., Kaveti, S., Kinter, M., Hazen, S. L. and Erzurum, S. C., 2006, Nitrotyrosine proteome survey in asthma identifies oxidative mechanism of catalase inactivation, *Journal of Immunology*, 176(9), 5587–5597.

Girotti, A. W., 1985, Mechanisms of lipid peroxidation, *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 1(2), 87-95.

Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Tsikas, D. and Rossi, R., 2009, Oxidative stress and human diseases: origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 46(5-6), 241–281.

Globe, G., Martin, M., Schatz, M., Wiklund, I., Lin, J., Maltzahn, R. V. and Mattera, M. S., 2015, Symptoms and markers of symptom severity in asthma-content validity of the asthma symptom diary, *Health and Quality Life Outcomes*, 13, 21.

Gould, H. J. and Wu, Y-C. B., 2018, IgE repertoire and immunological memory: compartmental regulation and antibody function, *International Immunology*, 30(9), 403–412.

Gour, N. and Wills-Karp, M., 2015, IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease, *Cytokine*, 75(1), 68–78.

Graves, P. E., Kabesch, M., Halonen, M., Holberg, C. J., Baldini, M., Fritzsch, C., Weiland, S. K., Erickson, R. P., von Mutius, E. and Martinez, F. D., 2000, A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105(3), 506–513.

Gri, G., Piconese, S., Frossi, B., Manfroi, V., Merluzzi, S., Tripodo, C. and Pucillo, C. E. 2008, $CD4^{+}CD25^{+}$ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction, *Immunity*, 29(5), 771–781.

Gutteridge, J. M. C. and Halliwell, B., 1994, Antioxidants in Nutrition, Health and Disease, Oxford University Press, Oxford, UK, ISBN-13: 978-0198549024.

Hall, S. and Agrawal, D. K., 2014, Key mediators in the immunopathogenesis of allergic asthma, *International Immunopharmacology*, 23(1), 316–329.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., 2015, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5nd ed, Oxford University Press, New York, ISBN-13: 9780198717478.

Han, H., Headley, M. B., Xu, W., Comeau, M. R., Zhou, B. and Ziegler, S. F., 2013, Thymic stromal lymphopoietin amplifies the differentiation of alternatively activated macrophages, *Journal of Immunology*, 190(3), 904–912.

Hartl, D., Koller, B., Mehlhorn, A. T., Reinhardt, D., Nicolai, T., Schendel, D. J., Griese, M. and Krauss-Etschmann, S., 2007, Quantitative and functional impairment of pulmonary $CD4^{+}CD25hi$ regulatory T cells in pediatric asthma, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(5), 1258–1266.

Hasbal, C., Aksu, B. Y., Himmetoglu, S., Dincer, Y., Koc, E. E., Hatipoglu, S. and Akcay, T., 2010, DNA damage and glutathione level in children with asthma bronchiale: effect of antiasthmatic therapy, *Pediatric Allergy and Immunology*, 21, 674–678.

Hassannia, H., Abediankenari, S. and Ghaffari, J., 2011, *FOXP3* and TGF-beta gene polymorphisms in allergic rhinitis, *Iranian Journal of Immunology*, 8(4), 218–225.

Heinzmann, A., Mao, X. Q., Akaiwa, M., Kreomer, R. T., Gao, P. S., Ohshima, K., Umeshita, R., Abe, Y., Braun, S., Yamashita, T., Roberts, M. H., Sugimoto, R., Arima, K., Arinobu, Y., Yu, B., Kruse, S., Enomoto, T., Dake, Y., Kawai, M., Shimazu, S. ve diğ., 2000, Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy, *Human Molecular Genetics*, 9(4), 549–559.

Holgate, S. T., 2008, Pathogenesis of asthma, *Clinical and Experimental Allergy*, 38, 872–897.

Holgate, S. T., 2010, A brief history of asthma and its mechanisms to modern concepts of disease pathogenesis, *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 2(3), 165-171.

Holgate, S., Casale, T., Wenzel, S., Bousquet, J., Deniz, Y. and Reisner, C., 2005, The anti-inflammatory effects of omalizumab confirm the central role of IgE in allergic inflammation, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(3), 459–465.

Holloway, J.W., Yang, I. A. and Holgate, S. T., 2010, Genetics of allergic disease, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), 81-94.

Horak, F., Doberer, D., Eber, E., Horak, E., Pohl, W., Riedler, J. and Studnicka, M., 2016, Diagnosis and management of asthma - Statement on the 2015 GINA Guidelines, *Wiener Klinische Wochenschrift*, 128(15-16), 541–554.

Hosseini, A., Shanehbandi, D., Estiar, M. A., Gholizadeh, S., Khabbazi, A., Khodadadi, H., Sakhinia, E. and Babaloo, Z., 2015, A single nucleotide polymorphism in the foxp3 gene associated with Behçet's disease in an Iranian population, *Clinical Laboratory*, 61(12), 1897–1903.

Huang, C. H., Loo, E. X., Kuo, I. C., Soh, G. H., Goh, D. L., Lee, B. W. and Chua, K. Y., 2011, Airway inflammation and IgE production induced by dust mite allergen-specific memory/effector Th2 cell line can be effectively attenuated by IL-35, *Journal of Immunology*, 187(1), 462–471.

Humbert, M., Bousquet, J., Bachert, C., Palomares, O., Pfister, P., Kottakis, I., Jaumont, X., Thomsen, S. F. and Papadopoulos, N. G., 2019, IgE-mediated multimorbidities in allergic asthma and the potential for omalizumab therapy, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology In Practice*, 7(5), 1418–1429.

Hunninghake, G. M., Soto-Quirós, M. E., Avila, L., Su, J., Murphy, A., Demeo, D. L., Ly, N. P., Liang, C., Sylvia, J. S., Klanderman, B. J., Lange, C., Raby, B. A., Silverman, E. K. and Celedón, J. C., 2007, Polymorphisms in IL13, total IgE, eosinophilia, and asthma exacerbations in childhood, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(1), 84-90.

Idani, E., Raji, H., Madadizadeh, F., Cheraghian, B., Haddadzadeh Shoshtari, M. and Dastoorpoor, M., 2019, Prevalence of asthma and other allergic conditions in adults in Khuzestan, southwest Iran, *BMC Public Health*, 19, 303.

Ighodaro, O. M. and Akinloye, O. A., 2018, First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287-293.

Inoue, N., Watanabe, M., Morita, M., Tomizawa, R., Akamizu, T., Tatsumi, K., Hidaka, Y. and Iwatani, Y., 2010, Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of FOXP3 with prognosis of autoimmune thyroid diseases, *Clinical and Experimental Immunology*, 162(3), 402–406.

Janson, C., Accordini, S. and Cazzoletti, L., 2019, Pharmacological treatment of asthma in a cohort of adults during a 20-year period: results from the European Community Respiratory Health Survey I, II and III, *European Respiratory Open Reaserch*, 5(1), 73-76.

Jesenak, M., Zelieskova, M. and Babusikova, E., 2017, Oxidative stress and bronchial asthma in children-causes or consequences?, *Frontiers Pediatrics*, 5, 162.

Johnson, A. D., Zhang, Y., Papp, A. C., Pinsonneault, J. K., Lim, J-E., Saffen, D., Dai, Z., Wang, D. and Sadée, W., 2008, Polymorphisms affecting gene transcription and mRNA processing in pharmacogenetic candidate genes: detection through allelic expression imbalance in human target tissues, *Pharmacogenetics and Genomics*, 18(9), 781–791.

Josefowicz, S. Z., Lu, L. F. and Rudensky, A.Y., 2012, Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function, *Annual Review of Immunology*, 30, 531–564.

Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J. and Cuypers, A., 2012, Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses, *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3145–3175.

Karki, R., Pandya, D., Elston, R. C. and Ferlin, C., 2015, Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics, *BMC Medical Genomics*, 8, 37.

Kasaian, M. T., Page, K. M., Fish, S., Brennan, A., Cook, T.A., Moreira, K., Zhang, M., Jesson, M., Marquette, K., Agostinelli, R., Lee, J., Williams, C. M., Tchistiakova, L.

and Thakker, P., 2014, Therapeutic activity of an interleukin-4/interleukin-13 dual antagonist on oxazolone-induced colitis in mice, *Immunology*, 143(3), 416–427.

Katerji, M., Maria Filippova, M. and Duerksen-Hughes, P., 2019, Approaches and methods to measure oxidative stress in clinical samples: research applications in the cancer field, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1279250.

Kawabe, T., Matsushima, M., Hashimoto, N., Imaizumi, K. and Hasegawa, Y., 2011, CD40/CD40 ligand interactions in immune responses and pulmonary immunity, *Nagoya Journal of Medical Science*, 73(3-4), 69–78.

Kayama, Y., Raaz, U., Jagger, A., Adam, M., Schellinger, I.N., Sakamoto, M. and Suzuki, H., 2015, Diabetic cardiovascular disease induced by oxidative stress, *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 25234–25263.

Kelly, F. J. and Mudway, I. S., 2003, Protein oxidation at the air-lung interface, *Amino Acids*, 25(3-4), 375–396.

Kelly, F. J., Mudway, I., Blomberg, A., Frew, A. and Sandström, T., 1999, Altered lung antioxidant status in patients with mild asthma, *Lancet*, 354(9177), 482–483.

Khoshkhui, M., Alyasin, S., Kamali Sarvestani, E., Amin, R. and Ariaee, N., 2017, Evaluation of serum interleukin-35 level in children with persistent asthma, *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 35, 91–95.

Khoubnasabjafari, M., Ansarin, K. and Jouyban, A., 2015, Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders, *Bioimpacts*, 5(3), 123–127.

Kim, H.B., Lee, Y.C., Lee, S.Y., Jung, J., Jin, H.S., Kim, J.H., Kim, B.S., Kang, M.J., Jang, S.O. and Kim, J., 2006, Gene-gene interaction between IL-13 and IL-13Ralpha1 is associated with total IgE in Korean children with atopic asthma, *Journal of Human Genetics*, 51, 1055–1062.

Kirkman, H. N., Rolfo, M., Ferraris, A. M. and Gaetani, G. F., 1999, Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry, *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 13908–13914.

Kochetkova, I., Golden, S., Holderness, K., Callis, G. and Pascual, D. W., 2010, IL-35 stimulation of CD39+ regulatory T cells confers protection against collagen II-induced arthritis via the production of IL-10, *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(12), 7144–7153.

Kopp, M. V., 2011, Omalizumab: Anti-IgE therapy in allergy, *Current Allergy and Asthma Reports*, 11(2), 101–106.

Korošec, P., Gibbs, B. F., Rijavec, M., Custovic, A. and Turner, P. J., 2018, Important and specific role for basophils in acute allergic reactions, *Clinical & Experimental Allergy*, 48(5), 502–512.

Kudo, M., Ishigatsubo, Y. and Aoki, I., 2013, Pathology of asthma, *Frontiers in Microbiology*, 4, 263.

Larché, M., Robinson, D. S. and Kay, A. B., 2003, The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(3), 450–463.

Lee, S., Kim, S. M. and Lee, R. T., 2013, Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance, *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(10), 1165–1207.

Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S. and Stadtman, E. R., 1990, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods in Enzymology*, 186, 464–478.

Levine, S. J. and Wenzel, S. E., 2010, The role of Th2 immune pathway modulation in the treatment of severe asthma and its phenotypes: are we getting closer?, *Internal Medicine*, 152(4), 232–237.

Li, B. and Greene, M. I., 2008, Special regulatory T-cell review: *FOXP3* biochemistry in regulatory T cells-How diverse signals regulate suppression, *Immunology*, 123(1), 17-19.

Li, X., Mai, J., Virtue, A., Yin, Y., Gong, R., Sha, X., Gutchigian, S., Frisch, A., Hodge, I., Jiang, X., Wang, H. and Yang, X. F., 2012, IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine-a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines, *PLoS One*,7(3), e33628.

Li, Y. and Hua, S., 2014, Mechanisms of pathogenesis in allergic asthma: role of interleukin-23, *Asian Pacific Society of Respirology*, 19, 663–669.

Li, Z., Zhang, Y. and Sun, B., 2011, Current understanding of Th2 cell differentiation and function, *Protein Cell*, 2(8), 604–611.

Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D. and Abete, P., 2018, Oxidative stress, aging, and diseases, *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757–772.

Lim, H.W., Hillsamer, P., Banham, A.H. and Kim, C.H., 2005, Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells, *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(7), 4180–4183.

Liu, J.Q., Liu, Z., Zhang, X., Shi, Y., Talebian, F., Carl, J.W., et al., 2012, Increased Th17 and regulatory T cell responses in EBV-induced gene 3-deficient mice lead to marginally enhanced development of autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology*, 188(7), 3099-3106.

Lloyd, C. M. and Hessel, E. M., 2010, Functions of T cells in asthma: more than just TH2 cells, *Nature Reviews Immunology*, 10(12), 838–848.

Lotvall, J., Akdis, C. A., Bacharier, L. B., Bjermer, L., Casale, T. B., Custovic, A., Lemanske, R. F., Wardlaw, A.J., Wenzel, SE. and Greenberger, P.A., 2011, Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(2), 355–360.

Lu, L., Barbi, J. and Pan, F., 2017, The regulation of immune tolerance by FOXP3, *Nature Reviews Immunology*, 17(11), 703–717.

Ma, Y., Liu, X., Wei, Z., Wang, X., Xu, D., Dai, S., Li, Y., Gao, M., Ji, C., Guo, C., Zhang, L. and Wang, X., 2014, The expression of a novel anti-inflammatory cytokine IL-35 and its possible significance in childhood asthma, *Immunology Letters*, 162(1 Pt A), 11–17.

Maier, L.M., Howson, J.M.M., Walker, N., Spickett, G.P., Jones, R.W., Ring, S.M., McArdle, W.L., Lowe, C.E., Bailey, R. and Payne, F., 2006, Association of IL13 with total IgE: evidence against an inverse association of atopy and diabetes, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117, 1306–1313.

Mak, J. C., Leung, H. C., Ho, S. P., Law, B. K., Lam, W. K. and Tsang, K. W., 2004, Systemic oxidative and antioxidative status in Chinese patients with asthma, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(2), 260–264.

March, M. E., Sleiman, P. M. and Hakonarson, H., 2013, Genetic polymorphisms and associated susceptibility to asthma, *International Journal of General Medicine*, 6, 253-265.

Marques, C. R., Costa, R. S., Costa, G. N., Silva, T. M., Teixeira, T. O., Andrade, E. M. M., Galvão, A. A., Carneiro, V. L. and Figueiredo, C.A., 2015, Genetic and epigenetic studies of FOXP3 in asthma and allergy, *Asthma Reserch and Practice*, 1, 10.

Marques, H., Freitas, J., Medeiros, R. and Longatto-Filho, A., 2016, Methodology for single nucleotide polymorphism selection in promoter regions for clinical use. An example of its applicability, *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, 7(3), 126–136.

Marrocco, I., Altieri, F. and Peluso, I., 2017, Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 6501046.

Marshal, J.H., 2002, On the changing meanings of mutation, *Human Mutation*, 19, 7678.

Masella, R., Di Benedetto, R., Varì, R., Filesi, C. and Giovannini, C., 2005, Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(10), 577–586.

Mathur, S. K. and Viswanathan, R. K., 2014, Relevance of allergy in adult asthma, *Current Allergy and Asthma Reports*, 14(5), 437.

Mays, L. E., Ammon-Treiber, S., Mothes, B., Alkhaled, M., Rottenberger, J., Müller-Hermelink, E. S., Grimm, M., Mezger, M., Beer-Hammer, S., von Stebut, E., Rieber, N., Nürnberg, B., Schwab, M., Handgretinger, R., Idzko, M., Hartl, D. and Kormann, M. S., 2013, Modified Foxp3 mRNA protects against asthma through an IL-10-dependent mechanism, *The Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 1216–1228.

Mazzoni, A., Young, H. A., Spitzer, J. H., Visintin, A. and Segal, D. M., 2001, Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization, *The Journal of Clinical Investigation*, 108(12), 1865–1873.

McBrien, C. N. and Menzies-Gow, A., 2017, The biology of eosinophils and their role in asthma, *Frontiers of Medicine*, 4, 93.

Mezzetti, A., Lapenna, D., Romano, F., Costantini, F., Pierdomenico, S. D., De Cesare, D., Cuccurullo, F., Riario-Sforza, G., Zuliani, G. and Fellin, R., 1996, Systemic oxidative stress and its relationship with age and illness. Associazione Medica "Sabin", *Journal of The American Geriatrics Society*, 44(7), 823–827.

Michelet, F., Gueguen, R., Leroy, P., Wellman, M., Nicolas, A. and Siest, G., 1995, Blood and plasma glutathione measured in healthy subjects by HPLC: relation to sex, aging, biological variables, and life habits, *Clinical Chemistry*, 41(10), 1509–1517.

Min, B., 2017, Heterogeneity and stability in Foxp3+ regulatory T cells, *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 37(9), 386-397.

Minotti, L., Agnoletto, C., Baldassari, F., Corrà, F. and Volinia, S., 2018, SNPs and somatic mutation on long non-coding RNA: new frontier in the cancer studies? *High Throughput*, 7(4), 34.

Mishra, V., Banga, J. and Silveyra, P., 2018, Oxidative stress and cellular pathways of asthma and inflammation: therapeutic strategies and pharmacological targets, *Pharmacology & Therapeutics*, 181, 169–182.

Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P. and Malik, A. B., 2014, Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury, *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(7), 1126–1167.

Moffatt, M. F., Gut, I. G., Demenais, F., Strachan, D. P., Bouzigon, E., Heath, S., von Mutius, E., Farrall, M., Lathrop, M., Cookson, W. and Consortium, G., 2010, A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma, *The New England Journal of Medicine*, 363(13), 1211–1221.

Mohan, A., Roberto, A. J., Whitehill, B. C., Mohan, A. and Kumar, A., 2014, Exploration of the genetic epidemiology of asthma: a review, with a focus on prevalence in children and adolescents in the Caribbean, *West Indian Medical Journal*, 63(7), 687–692.

Monteseirín, J., 2009, Neutrophils and asthma, *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunol*ogy, 19(5), 340–354.

Montuschi, P., Corradi, M., Ciabattoni, G., Nightingale, J., Kharitonov, S. A. and Barnes, P. J., 1999, Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160, 216–220.

Moron MS, Kepierre J. W. and Mannervick, B., 1979, Levels of glutathione reductase and glutathione-S-transferase activities in rat lung and liver, *Biochimica et Biophysica Acta*, 582, 67–68.

Moszynska, A., Gebert, M., Collawn, J.F. and Bartoszewski, R., 2017, SNPs in microRNA target sites and their potential role in human disease, *Open Biology*, *7*(4), 170019.

Mukherjee, A. B. and Zhang, Z., 2011, Allergic asthma: influence of genetic and environmental factors, *The Journal of Biological Chemistry*, 286(38), 32883–32889.

Nadeem, A., Chhabra, S. K., Masood, A. and Raj, H. G., 2003, Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(1), 72–78.

Nakajima, H. and Takatsu, K., 2007, Role of cytokines in allergic airway inflammation, *International Archives of Allergy and Immunology*, 142, 265–273.

Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K. and Das, N., 2019, Role of catalase in oxidative stress- and age-associated degenerative diseases, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 9613090.

Nathan, R. A., Sorkness, C.A., Kosinski, M., Schatz, M., Li, J. T., Marcus, P. and Murray, J. J., 2004, Development of the asthma control test: a survey for assessing asthma control, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113, 59–65.

NIH (National Institutes of Health), 2020, *Genetics Home Reference: Allergic asthma*, https://ghr.nlm.nih.gov/condition/allergic-asthma#statistics, [Ziyaret Tarihi: 10 Haziran 2020].

Niedbala, W., Wei, X. Q., Cai, B., Hueber, A. J., Leung, B. P., McInnes, I. B. and Liew, F. Y., 2007, IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells, *European Journal of Immunology*, 37(11), 3021–3029.

Noureldin, M., Haroun, M., Diab, I., Elbanna, S. and Abdelwahab, N., 2014, Association of interleukin 13 +2044G/A polymorphism with bronchial asthma development, severity and immunoglobulin E levels in an Egyptian population, *Clinical Medicine and Diagnostics*, 4(4), 71-77.

Novak, Z., Németh, I., Gyurkovits, K., Varga, S. I. and Matkovics, B., 1991, Examination of the role of oxygen free radicals in bronchial asthma in childhood, *Clinica Chimica Acta*, 201(3), 247–251.

Oettgen, H. C. and Geha, R. S., 2001, IgE regulation and roles in asthma pathogenesis, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(3), 429–440.

Ohtomo, T., Kaminuma, O., Yamada, J., Kitamura, N., Abe, A., Kobayashi, N., Suko, M. and Mori, A., 2010, Eosinophils are required for the induction of bronchial hyperresponsiveness in a Th transfer model of BALB/c background, *International Archives of Allergy and Immunology*, 1, 79–82.

Ozaras, R., Tahan, V., Turkmen, S., Talay, F., Besirli, K. and Aydin, S., 2000, Changes in malondialdehyde levels in bronchoalveolar fluid and serum by the treatment of asthma with inhaled steroid and beta2-agonist, *Respirology*, 5, 289–292.

Pacher, P., Beckman, J. S. and Liaudet, L., 2007, Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, *Physiological Reviews*, 87(1), 315–424.

Park, H.W., Lee, J. E., Kim, S. H., Kim, Y. K., Min, K. U., Kim, Y. Y. and Cho, S. H., 2008, Genetic variation of IL13 as a risk factor of reduced lung function in children and adolescents: A cross-sectional population-based study in Korea, *Respiratory Medicine*, 103, 284–288.

Pawankar, R., 2014, Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action, *The World Allergy Organization Journal*, 7(1), 12.

PDB (Protein Data Bank), 2020, *Solution Structure of Human IL-13*, https://www.rcsb.org/structure/1IJZ, [Ziyaret Tarihi: 10 Mayıs 2020].

Pereira, L., Amoras, E., da Silva Conde, S., Demachki, S., Monteiro, J. C., Martins-Feitosa, R. N., da Silva, A., Ishak, R. and Vallinoto, A., 2018, The *-3279C>A* and *-924A>G* polymorphisms in the *FOXP3* gene are associated with viral load and liver enzyme levels in patients with chronic viral liver diseases, *Frontiers in Immunology*, 9, 2014.

Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B. and Karplus, P. A., 2015, Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling, *Trends in Biochemical Sciences*, 40(8), 435–445.

Peterson, J. D., Herzenberg, L. A., Vasquez, K. and Waltenbaugh, C., 1998, Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 3071–3076.

Pizzimenti, S., Ciamporcero, E., Daga, M., Pettazzoni, P., Arcaro, A., Cetrangolo, G. and Barrera, G., 2013, Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins, *Frontiers in Physiology*, 4, 242.

Pizzorno J., 2014, Glutathione!, *Integrative Medicine*, 13(1), 8–12.

Pope, R. M. and Shahrara, S., 2013, Possible roles of IL-12-family cytokines in rheumatoid arthritis, *Nature Reviews Rheumatology*, 9(4), 252–256.

Pope, S. M., Brandt, E. B., Mishra, A., Hogan, S. P., Zimmermann, N. and Matthaei, K. I., 2001, IL-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an IL-5-andeotaxin-dependent mechanism, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108, 594–601.

Possa, S. S., Leick, E. A., Prado, C. M., Martins, M. A. and Tibério, I. F., 2013, Eosinophilic inflammation in allergic asthma, *Frontiers in Pharmacology*, 4, 46.

Powell, C. V., Nash, A. A., Powers, H. J. and Primhak, R. A., 1994, Antioxidant status in asthma, *Pediatric Pulmonology*, 18(1), 34–38.

Price, D., Dale, P., Elder, E. and Chapman, K. R., 2013, Types, frequency and impact of asthma triggers on patients' lives: a quantitative study in five European countries, *Journal of Asthma*, 51(2), 127–135.

Provoost, S., Maes, T., van Durme, Y. M., Gevaert, P., Bachert, C., Schmidt-Weber, C. B., Brusselle, G. G., Joos, G. F. and Tournoy, K. G., 2009, Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma, *Allergy*, 64(10), 1539–1546.

Qu, J., Li, Y., Zhong, W., Gao, P. and Hu, C., 2016, Recent developments in the role of reactive oxygen species in allergic asthma, *Journal of Thoracic Disease*, 9(1), 32-43.

Quirt, J., Hildebrand, K. J., Mazza, J., Noya, F. and Kim, H., 2018, Asthma, *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 14(2), 50.

Radermecker, C., Louis, R., Bureau, F. and Marichal, T., 2018, Role of neutrophils in allergic asthma, *Current Opinion in Immunology*, 54, 28–34.

Radhakrishnan, A. K., Raj, V. L., Tan, L-K. and Liam, C-K., 2013, Single nucleotide polymorphism in the promoter of the human interleukin-13 gene is associated with asthma in Malaysian adults, *BioMed Research International*, 981012.

Raedler, D., Ballenberger, N., Klucker, E., Böck, A., Otto, R., Prazeres da Costa, O., Holst, O., Illig, T., Buch, T., von Mutius, E. and Schaub, B., 2015, Identification of novel immune phenotypes for allergic and nonallergic childhood asthma, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(1), 81–91.

Rael, E. L. and Lockey, R. F., 2011, Interleukin-13 signaling and ıts role in asthma, *World Allergy Organization Journal*, 4(3), 54–64.

Rahman, I. and MacNee, W., 2000, Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation, *European Respiratory Journal*, 16(3), 534–554.

Rahman, I., Morrison, D., Donaldson, K. and MacNee, W., 1996, Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 154(4 pt 1),1055–1060.

Rahman, T., Hosen, I., Islam, M. M. T. and Shekhar, H. U., 2012, Oxidative stress and human health, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, 997–1019.

Ramírez-Bello, J. and Jiménez-Morales, M., 2017, Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases, *Gaceta Medica de Mexico*, 153(2), 238–250.

Ramphul, K., Lv, J., Hua, L., Liu, Q. H., Fang, D. Z., Ji, R. X. and Bao, Y. X., 2014, Single nucleotide polymorphisms predisposing to asthma in children of Mauritian Indian and Chinese Han ethnicity, *The Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47(5), 394–397.

Resende, E. P., Todo-Bom, A., Loureiro, C., Mota Pinto, A., Oliveiros, B., Mesquita, L. and Silva, H. C., 2017, Asthma and rhinitis have different genetic profiles for IL13, IL17A and GSTP1 polymorphisms, *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 23(1), 10–16.

Reuter, S., Stassen, M. and Taube, C., 2010, Mast cells in allergic asthma and beyond, *Yonsei Medical Journal*, 51(6), 797–807.

Ricci, G., Astolfi, A., Remondini, D., Cipriani, F., Formica, S., Dondi, A. and Pession, A., 2011, Pooled genome-wide analysis to identify novel risk loci for pediatric allergic asthma, *PLoS ONE*, 6(2), 16912.

Rivas, M. N. and Chatila, T. A., 2016, Regulatory T cells in allergic diseases, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(3), 639–652.

Robert, F. and Pelletier, J., 2018, Exploring the impact of single-nucleotide polymorphisms on translation, *Frontiers in Genetics*, 9, 507.

Robinson, D. S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A. M., Corrigan, C., Durham, S. R. and Kay, A. B. 1992, Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma, *The New England Journal of Medicine*, 326(5), 298–304.

Rosenberg, H. F., Dyer, K. D. and Foster, P.S., 2013, Eosinophils: changing perspectives inhealth and disease, *Nature Reviews Immunology*, 13(1), 9–22.

Sackesen, C., Ercan, H., Dizdar, E., Soyer, O., Gumus, P. and Tosun, B. N., 2008, A comprehensive evaluation of the enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems in childhood asthma, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(1), 78–85.

Sagdic, A., Sener, O., Bulucu, F., Karadurmus, N., Özel, H. E., Yamanel, L., Tasci, C., Naharci, I., Ocal, R. and Aydin, A., 2011, Oxidative stress status and plasma trace elements in patients with asthma or allergic rhinitis, *Allergologia et Immunopathologia*, 39(4), 200–205.

Sahiner, U. M., Birben, E., Erzurum, S., Sackesen, C. and Kalayci, O., 2011, Oxidative stress in asthma, *World Allergy Organization Journal*, 4(10), 151–158.

Salazar, F. and Ghaemmaghami, A. M., 2013, Allergen recognition by innate immune cells: critical role of dendritic and epithelial cells, *Frontiers in Immunology*, 4, 356.

Schleich, F., Demarche, S. and Louis, R., 2016, Biomarkers in the management of difficult asthma, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(14), 1561–1573.

Schock, B. C., Young, I. S., Brown, V., Fitch, P. S., Shields, M. D. and Ennis, M., 2003, Antioxidants and oxidative stress in BAL fluid of atopic asthmatic children, *Pediatric Research*, 53(3), 375–381.

Shah, R. and Newcomb, D. C., 2018, Sex bias in asthma prevalence and pathogenesis, *Frontiers in Immunology*, 9, 2997.

Shamji, M. H., Layhadi, J. A., Achkova, D., Kouser, L., Perera-Webb, A., Couto-Francisco, N. C., Parkin, R. V., Matsuoka, T., Scadding, G., Ashton-Rickardt, P. G. and Durham, S. R., 2019, Role of IL-35 in sublingual allergen immunotherapy, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(3), 1131-1142.

Shamri, R., Xenakis, J. J. and Spencer, L. A., 2011, Eosinophils in innate immunity: an evolving story, *Cell and Tissue Research*, 343(1), 57–83.

Shastry B. S., 2002, SNP alleles in human disease and evolution, *Journal of Human Genetics*, 47(11), 561–566.

Shaw, D., Portelli, M. and Sayers, I., 2014, *Asthma*, Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine, Chapter 28, University of Nottingham, UK, 617-631.

Shazia, M., Kanza, M., Mehwish, I., Irum, S., Farida, A. and Asifa, A., 2013, IL-13 gene polymorphisms and their association with atopic asthma and rhinitis in Pakistani patients. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 12(4), 391–396.

Shen, L. X., Basilion, J. P. and Stanton, V. P., Jr., 1999, Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(14), 7871–7876.

Shen, Z., Chen, L., Hao, F., Wang, G. and Liu, Y., 2010, Intron-1 rs3761548 is related to the defective transcription of Foxp3 in psoriasis through abrogating E47/c-Myb binding, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(1-2), 226–241.

Sibbald, B., Horn, M. E.C., Brain, E. A. and Gregg, I., 1980, Genetic factors in childhood asthma, *Thorax*, 35, 671-674.

Simpson, J. L., Scott, R., Boyle, M. J. and Gibson, P. G., 2006, Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum, *Respirology*, 11(1), 54–61.

Siu, G. M. and Draper, H. H., 1982, Metabolism of malonaldehyde *in vivo* and *in vitro*, *Lipids*, 17(5), 349–355.

Smit, L. A., Siroux, V., Bouzigon, E., Oryszczyn, M. P., Lathrop, M., Demenais, F. and Kauffmann, F., 2009, CD14 and toll-like receptor gene polymorphisms, country living, and asthma in adults, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 179(5), 363–368.

Smith, L. J., Houston, M. and Anderson, J., 1993, Increased levels of glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma, *The American Review of Respiratory Disease*, 147(6 Pt 1), 1461–1464.

Smolkova, B., Tulinska, J., Palkovicova Murinova, L., Buocikova, V., Liskova, A., Rausova, K. and Fuortes, L., 2017, Impact of interleukin 13 (IL13) genetic polymorphism Arg130Gln on total serum immunoglobulin (IgE) levels and interferon (IFN)-γ gene expression, *Clinical and Experimental Immunology*, 188(1), 45–52.

Song, P., Wang, X. W., Li, H. X., Li, K., Liu, L., Wei, C., Jian, Z., Yi, X. L., Li, Q., Wang, G., Li, C. Y. and Gao, T. W., 2013, Association between FOXP3 polymorphisms and vitiligo in a Han Chinese population, *The British Journal of Dermatology*, 169(3), 571–578.

Song, Q. H., Shen, Z., Xing, X. J., Yin, R., Wu, Y. Z., You, Y., Guo, H., Chen, L., Hao, F. and Bai, Y., 2012, An association study of single nucleotide polymorphisms of the FOXP3 intron-1 and the risk of *Psoriasis vulgaris*, *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 49(1), 25–35.

Stadtman E. R., 1990, Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences, *Free Radical Biology & Medicine*, 9(4), 315–325.

Stadtman, E. R. and Levine, R. L., 2003, Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins, *Amino Acids*, 25, 207–218.

Stadtman, E. R., Moskovitz, J. and Levine, R. L., 2003, Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences, *Antioxidants & Redox Signaling*, 5, 577–582.

Steinke, J. W. and Borish, L., 2001, Th2 cytokines and asthma-interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists, *Respiratory Research*, 2(2), 66–70.

Su, L. J., Jang, J. H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F. and Peng, Z. Y., 2019a, Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 5080843.

Su, Q., Li, X., Mo, W. and Yang, Z., 2019b, Low serum bilirubin, albumin, and uric acid levels in patients with Crohn's disease, *Medicine (Baltimore)*, 98(19), 15664.

Suzuki, M., Yokota, M., Nakamura, Y., Ozaki, S. and Murakami, S., 2017, Intranasal administration of IL-35 inhibits allergic responses and symptoms in mice with allergic rhinitis, *Allergology International*, 66(2), 351–356.

Temizkan, G., 2013, Moleküler Genetik, *NOBEL Kitabevi*, İstanbul, ISBN: 9786053350217.

Thomas, L. F. and Sætrom, P., 2012, Single nucleotide polymorphisms can create alternative polyadenylation signals and affect gene expression through loss of microRNA-regulation, *PLOS Computational Biology*, 8(8), 1002621.

Thomsen, S. F., Duffy, D. L., Kyvik, K. O. and Backer, V., 2010, Genetic influence on the age at onset of asthma: a twin study, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(3), 626–630.

Thomsen, S. F., 2015, Genetics of asthma: an introduction for the clinician, *European Clinical Respiratory Journal*, 2, 24643.

Tliba, O. and Panettieri, R. A., 2019, Paucigranulocytic asthma: uncoupling of airway obstruction from inflammation, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(4), 1287–1294.

Togbe, D., Fauconnier, L., Madouri, F., Marchiol, T., Chenuet, P., Rouxel, N., Ledru, A., Erard, F., Quesniaux, V. and Ryffel, B., 2013, Thymic stromal lymphopoietin enhances Th2/Th22 and reduces IL-17A in protease-allergen-induced airways inflammation, *ISRN Allergy*, 971036.

Topal Sarıkaya, A., 2017, *Nükleik Asitlerin Analizi,* Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri: Genomik ve Proteomik Analizler, G. Temizkan ve N. Arda (eds.), Bölüm 10, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, ISBN: 978-605-355-362-1.

Tu, B. P. and Weissman, J. S., 2004, Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences, *Journal of Cell Biology*, 164(3), 341–346.

Vachier, I., Chanez, P., Le Doucen, C., Damon, M., Descomps, B. and Godard, P., 1994, Enhancement of reactive oxygen species formation in stable and unstable asthmatic patients, *European Respiratory Journal*, 7(9), 1585–1592.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Iternational Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84.

Vladich, F. D., Brazille, S. M., Stern, D., Peck, M. L., Raffaella Ghittoni, R. and Vercelli, D., 2005, IL-13 R130Q, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector mechanisms essential for human allergic inflammation, *Journal of Clinical Investigation*, 115(3), 747–754.

Vural, H. and Uzun, K., 2000, Serum and red blood cell antioxidant status in patients with bronchial asthma, *Canadian Respiratory Journal*, 7(6), 476-480.

Walford, H. and Doherty, T. A., 2014, Diagnosis and management of eosinophilic asthma: a US perspective, *Journal of Asthma and Allergy*, 11(7), 53–65.

Wang, L. H., Lin, Y. H., Yang, J. and Guo, W., 2009, Insufficient increment of $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells after stimulation *in vitro* with allergen in allergic asthma, *International Archives of Allergy and Immunology*, 148(3), 199–210.

Wang, W., Li, P. and Yang, J., 2015a, Decreased circulating interleukin-35 levels are related to interleukin-4-producing $CD8^+$ T cells in patients with allergic asthma, *Iranian Journal of Allergy, Asthma, and Immunology*, 14(4), 379–385.

Wang, W., Li, P., Chen, Y. F. and Yang, J., 2015b, A potential immunopathogenic role for reduced IL-35 expression in allergic asthma, *Journal of Asthma*, 52(8), 763–771.

Wang, Y., Branicky, R., Noë, A. and Hekimi, S., 2018, Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling, *The Journal of Cell Biology*, 217(6), 1915–1928.

Wei, X., Zhang, J., Gu, Q., Huang, M., Zhang, W., Guo, J. and Zhou, X., 2017, Reciprocal expression of IL-35 and IL-10 defines two distinct effector treg subsets that are required for maintenance of immune tolerance, *Cell Reports*, 21(7), 1853–1869.

Weydert, C. J. and Cullen, J. J., 2010, Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue, *Nature Protocols*, 5(1), 51–66.

White, E., Shannon, J. S. and Patterson, R. E., 1997, Relationship between vitamin and calcium supplement use and colon cancer, *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 6(10), 769-774.

Wong, C. K., Leung, T. F., Chu, I. M., Dong, J., Lam, Y. Y. and Lam, C. W., 2015, Aberrant expression of regulatory cytokine IL-35 and pattern recognition receptor NOD2 in patients with allergic asthma, *Inflammation*, 38(1), 348–360.

Wood, L. G., Fitzgerald, D. A., Gibson, P. G., Cooper, D. M. and Garg, M. L., 2000, Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma, *Lipids*, 35, 967–974.

Wynn, T. A., 2004, Fibrotic disease and the Th1/Th2 paradigm, *Nature Reviews Immunology*, 4(8), 583–594.

Xu, Y., Li, J., Ding, Z., JLi, J., Li, B., Yu, Z. and Tan, W., 2017, Association between IL-13 +1923C/T polymorphism and asthma risk: a meta-analysis based on 26 case-control studies, *Bioscience Reports*, 37(1), 20160505.

Yadav, A. S. and Saini, M., 2016, Evaluation of systemic antioxidant level and oxidative stress in relation to lifestyle and disease progression in asthmatic patients, *Journal of Medical Biochemistry*, 35, 55–62.

Yang, L. L., Huang, M. S., Huang, C. C., Wang, T. H., Lin, M. C., Wu, C. C., et al, 2011, The association between adult asthma and superoxide dismutase and catalase gene activity, *International Archives of Allergy and Immunology*, 156(4), 373–380.

Yang, Y. L., Pan, Y. Q., He, B. S. and Zhong, T. Y., 2013, Regulatory T cells and Th1/Th2 in peripheral blood and their roles in asthmatic children, *Translational Pediatrics*, 2(1), 27–33.

Yao, J., Zhang, T., Zhang, L., Han, K. and Zhang, L., 2018, *FOXP3* polymorphisms in interstitial lung disease among Chinese Han population: a genetic association study, *The Clinical Respiratory Journal*, 12(3), 1182–1190.

Zelko, I. N., Mariani, T. J. and Folz, R. J., 2002, Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression, *Free Radical Biology & Medicine*, 33(3), 337–349.

Zhang, L., Zhang, Y., Desrosiers, M., Wang, C., Zhao, Y. and Han, D., 2009, Genetic association study of FOXP3 polymorphisms in allergic rhinitis in a Chinese population, *Human Immunology*, 70(11), 930–934.

Zhang, M., Qian, Y. Y., Chai, S. J., Liang, Z. Y., Xu, Q., Wu, Z. Q. and Wang, K., 2014, Enhanced local Foxp3 expression in lung tissue attenuates airway inflammation in a mouse model of asthma, *Journal of Asthma*, 51(5), 451–458.

Zhang, Y., Duan, S., Wei, X., Zhao, Y., Zhao, L. and Zhang, L., 2012, Association between polymorphisms in *FOXP3* and *EBI3* genes and the risk for development of allergic rhinitis in Chinese subjects, *Human Immunology*, 73(9), 939-945.

Ziegler S. F., 2012, Thymic stromal lymphopoietin and allergic disease, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(4), 845–852.

EKLER

EK 1. Etik Kurul Onayı

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı : 1438 Tarih : 13.12.2017
Konu: Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA hk.

Sayın Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

İlgi : Fen Fakültesi Dekanlığının 04/12/2017 gün ve 452781 sayılı yazısı

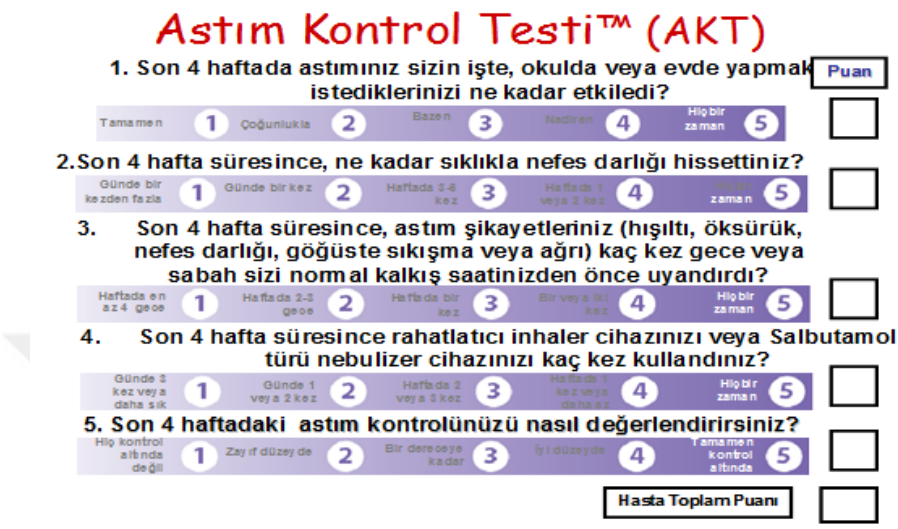
Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz ve Behnaz FOROUHAR KALKHORAN' ın yürüteceği 2017/1420 dosya numaralı "Astım Hastalarında Genetik Yatkınlık, Duyarlılık ve Oksidatif Stres Göstergelerinin Moleküler Analizi" başlıklı çalışma kurulumuzun 08/12/2017 tarih ve 20 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

EK 2. Astım Kontrol Testi Formu



AKT tedavi öncesi: Tedavi 1. yılında: Tedavi sonunda:

SFT tedavi öncesi: SFT tedavinin 1. Yılında: SFT tedavi sonunda:

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Behnaz KARADOĞAN
Doğum Yeri	Tahran
Doğum Tarihi	30.03.1980
Uyruğu	☑ T.C. ❒ Diğer:
Telefon	05078422808
E-Posta Adresi	forouhar_f@yahoo.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri Lisans	
Üniversite	Mashhad Tıbbi Bilimler Üniversitesi
Fakülte	Mashhad Tıbbi Bilimler Üniversitesi
Bölümü	Tıbbi Biyoloji
Mezuniyet Yılı	02.02.2004

Yüksek Lisans	
Üniversite	Tarbiyat Modarres Üniversitesi
Enstitü Adı	Tıp Fakültesi
Anabilim Dalı	Tıbbi Viroloji
Programı	Tıbbi Viroloji

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler

Behnaz Forouhar-Kalkhoran , Behzadian, F., Sabahi, F., Karimi, M., Mirshahabi, H., 2013, Construction and eukaryotic expression of recombinant large hepatitis delta antigen, Reports of Biochemistry & Molecular Biology , Vol. 2, No.1.

Alborzi, A. M., Bamdad, T., Ghaderi, M., Salimi, H., Davoodian, P., Merat, S. h., Hossainpor ,M., Jabbari, H., Sharifi ,A. H., Sheykholeslami, A., Pourhossein, B., **Behnaz Forouhar-Kalkhoran**, 2012, Comparison of HCV Plus-and Minus-Strand RNA in PBMCs of Responders and non-Responders of Chronically Infected Patients Receiving Ribavirin and Interferon Therapy, Iranian Journal of Virology , 6(2): 18-25.

Behnaz Forouhar-Kalkhoran, 2017, A Short Review on Virus-Like Particles as Vaccine and Delivery Systems, Journal of Molecular Biology and Genetics.

Farzane Sabahi, **Behnaz Forouhar-kalkhoran**, Farida Behzadian, Mohsen Karimi, Construction of an expression vector for production of L-HDAg in Huh7 cells. Poster presented at Pennsylvania State University, American Society for Virology, 32nd Annual Meeting, July 20 - 24, 2013.

Farzaneh Sabahi, **Behnaz Forouhar-Kalkhoran**, Farida Behzadian Construction of an expression vector for production of L-HDAg in Huh7 cell line. Poster presented at 6th Iranian Congress of Virology, Department of Virology, School of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, 2012.

Behnaz Karadoğan, Şengül Beyaz, Aslı Gelincik, Suna Büyüköztürk, Nazlı Arda, Interleukin-35 levels in patients with allergic asthma, Poster presented at "7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey" (Molbiokon-2019).

Behnaz Karadoğan, Şengül Beyaz, Aslı Gelincik, Suna Büyüköztürk, Nazlı Arda, Oxidative stress and antioxidant defense in allergic asthma, Poster presented at at "7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey" (Molbiokon-2019).