



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



**Yüksek Lisans Tezi**

**ASTIMLI HASTALARDA PLAZMA 7-KETOKOLESTEROL,  
KOLESTAN-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -TRİOL VE MALONDİALDEHİT  
DÜZEYLERİ**

**Behnoush NASR ZANJANI**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA**

**II. DANIŞMAN  
Prof. Dr. Aşlı GELİNCİK**

**Aralık, 2018**

**İSTANBUL**

Bu çalışma, 25.12.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

### Tez Jürisi

Prof. Dr. E. ř. Nazlı ARDA (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Suna BÜYÜKÖZTÜRK  
İstanbul Üniversitesi  
İstanbul Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Cenk KIĞ  
Yeni Yüzyıl Üniversitesi  
Tıp Fakültesi



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 aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

## ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimimin her aşamasında desteğini hissettiğim, çalışma azmini her zaman örnek aldığım, bana olan inancı ve güveni için ve ayrıca eğitimim boyunca bana her aşamada yol gösteren ve destek olan, çalışmamda değerli eleştirilerde ve değerlendirmelerde bulunan danışmanım Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA'ya 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 ve Alerji Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Suna BÜYÜKÖZTÜRK'e içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Klinik Patoloji Laboratuvarı'nda bana çalışma fırsatı veren Prof. Dr. İncilay LAY'a, bu tez çalışmasında daima yanımda olan ve her zaman benimle bilgilerini paylaşan arkadaşım Dr. Afshin SAMADİ'ye şükranlarımı sunarım.

Yüksek Lisans eğitimimin başlangıcından sonuna kadar benden yardım ve desteklerini esirgemeyen proteomik grubundan sevgili arkadaşım Doktora öğrencisi Behnaz FOROUHAR KALKHORAN'a, 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.

Tezimin istatistiksel verilerinin değerlendirilmesindeki katkılarından dolayı Hacettepe Üniversitesi Sosyal Bilimler Meslek Yüksekokulu öğretim elemanlarından Öğr. Gör. Dr. Selen YILMAZ IŞIKHAN'a çok teşekkür ederim.

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 anneme, babama ve ablama adanmıştır.

Aralık 2018

Behnoush NASR ZANJANI

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ .....	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ .....	xi
ÖZET .....	xv
SUMMARY .....	xvii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR</b> .....	<b>3</b>
2.1. ASTİM .....	3
2.1.1. Alerjik Astım .....	3
2.1.2. Astımın İmmünolojisi.....	4
2.1.3. Şiddetli İnflamasyonla İlişkili Hücreler .....	5
2.1.3.1. Mast Hücreleri.....	5
2.1.3.2. Doğal Lenfoid Hücreler.....	5
2.1.3.3. İmmüoglobulin E .....	6
2.1.3.4. Histamin.....	7
2.1.3.5. B-Hücresi Aktivasyon Faktörü .....	7
2.1.3.6. İmmün Hücreler.....	8
2.1.3.7. Nötrofiller .....	8
2.1.4. Astımın Klinik Belirtileri ve Semptomları .....	8
2.1.5. Astım Tanı Kriterleri .....	9
2.2. ASTİM VE OKSİDATİF STRES .....	11
2.2.1. Astımda Endojen ve Ekzojen Reaktif Türler ve Biyolojik Etkileri.....	13
2.2.2. Hava Yolunda Gelişen Oksidatif Stres.....	14
2.2.3. Astım Gelişiminde Hücrel Antioksidan Faaliyetler .....	14
2.2.5. Lipid Peroksidasyonu .....	15
2.2.6. Malondialdehit (MDA).....	17
2.2.7. Astımda Oksidan / Antioksidan Dengesizliği .....	18
2.3. OKSİSTEROLLER.....	19

2.3.1. Oksisterollerin Oluşumu.....	21
2.3.2. Hücresel Kan Düzeyleri ve Oksisterollerin Metabolizma Eliminasyonu.....	24
2.3.3. Oksisterollerin Fizyolojik Aktiviteleri ve Biyolojik Rollerini .....	25
2.3.4. Kolesterol Homeostazında Oksisterollerin Rolü .....	26
2.3.5. İnflamasyon ve Bağışıklıkta Oksisterollerin Rolü .....	27
2.3.6. Sitotoksik ve Pro-apoptotik Aktivitelere Oksisterollerin Rolü .....	28
2.3.7. Oksisterol Analizi için Yöntemler.....	28
2.3.7.1 Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS).....	30
2.3.7.2. Elektrosprey İyonizasyon Mekanizması.....	31
2.3.7.3 Kütle Spektrometrisi .....	33
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM.....</b>	<b>36</b>
3.1. KİMYASALLAR.....	36
3.2. EKİPMAN VE ENSTRÜMANLAR .....	36
3.3. ÇALIŞMA GRUBU .....	37
3.3.1. Kan Örneklerinin Eldesi: .....	37
3.4. OKSİSTEROL ANALİZİ .....	37
3.4.1. Kromatografik Koşulların ve Mobil Faz Gradyanının Optimizasyonu.....	38
3.4.2. Çözeltilerin Hazırlanması .....	40
3.4.3. Örneklerin Hazırlanması .....	41
3.4.4. MS / MS Kaynak Ayarlarının Optimizasyonu .....	42
3.4.5. Kalite, Doğruluk ve Hassasiyet .....	45
3.5. RUTİN BİYOKİMYA PARAMETRELERİNİN ÖLÇÜMÜ.....	45
3.6. PLAZMADA LİPİD PEROKSİDASYON ÜRÜNLERİNİN TAYİNİ.....	45
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ .....	46
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>47</b>
4.1. KALİBRASYON EĞRİLERİ .....	47
4.1.1. Plazma 7-Ketokolesterol ve Kolesterol-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol Kalibrasyon Eğrileri ve Kütle Spektrumları.....	47
4.1.2. Plazma MDA Kalibrasyon Eğrisi .....	49
4.2. ÇALIŞMA GRUPLARININ VE KONTROLLERİN DEMOGRAFİK VERİLERİ VE OKSİSTEROL DEĞERLERİ .....	49
4.3. ÇALIŞMA GRUPLARINDA BİYOKİMYASAL PARAMETRELERLE BİRLİKTE OKSİSTEROL DÜZEYLERİNİN KORELASYONU .....	53
4.4. ÇOK DEĞİŞKENLİ ADIMSAL REGRESYON ANALİZİ .....	58
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>60</b>

<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>63</b>
<b>EKLER</b> .....	<b>74</b>



T.C.  
**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**  
**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ**  
**KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**



Sayı : 1535  
Konu: Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA hk.

Tarih : 28.12.2017

Sayın Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA  
Fen Fakültesi

İlgi : Fen Fakültesi Dekanlığının 04/12/2017 gün ve 452780 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yüksek Lisans Öğrencisi Behnoush NASR ZANJANI' in yürüteceği 2017/1421 dosya numaralı "Alerjik Astım Hastalığında Plazma 7-Ketokolesterol ve Kolesterol-3β,5α,6β-triol Düzeylerinin Rolü" başlıklı çalışma kurulumuzun 22/12/2017 tarih ve 21 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

<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>75</b>
-----------------------	-----------

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

<b>Şekil 2.1:</b> Reaktif oksijen türleri ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik yüksek strese yol açabilir. A, Normal olarak, solunum sisteminde yeterli miktarda antioksidan var, öyle ki az miktarda reaktif oksijen türünün üretimi önemsizdir. B, antioksidanlar azalır veya reaktif oksijen üretilirse türler artar (örneğin, astım alevlenmesi sırasında), antioksidanlar ve reaktif oksijen türleri dengesi oksidatif strese doğru ilerler (Bowler ve Crapo, 2002) .....	12
<b>Şekil 2.2:</b> Hava yolu inflamasyonunda endojen ve ekzojen reaktif türlerin rolü. Oksidatif stres, hem endojen (inflamatuvar hücreler ve hava yolu doku hücreleri tarafından üretilen) hem de ekzojen (hava kirliliği, sigara, vb.) tarafından üretilir (Tredaniel J ve diğ., 1994).....	14
<b>Şekil 2.3:</b> Bir yağ asidinin enzimatik olmayan lipit peroksidasyonunun temel şeması (Basu, 2007) .....	16
<b>Şekil 2.4:</b> Malondialdehitten Schiff bazı oluşumu (Horton ve Fairhurst., 1987).....	17
<b>Şekil 2.5:</b> Tiyobarbitürik asitin MDA ile reaksiyonu (Kappus ve Sies., 1981). ....	18
<b>Şekil 2.6:</b> Yaşlanma ve yaşa bağlı hastalıklar sırasında oksisterollerin hedeflediği organlar (Zarrouk ve diğ., 2014b) .....	20
<b>Şekil 2.7:</b> Enzimatik olarak üretilen bazı oksisterollerin yapıları ve CYP enzimleri (Brown ve Jessup, 2009) .....	22
<b>Şekil 2.8:</b> Enzimatik olmayan yollarla üretilen bazı oksisterollerin yapıları ve oluşumu(Brown ve Jessup, 2009) .....	23
<b>Şekil 2.9:</b> 7-ketokolesterolden türetilen oksisteroller (Brown ve Jessup, 2009) .....	23
<b>Şekil 2.10:</b> Kolesterolün otooksidasyon ve enzimatik ürünleri (Zarrouk ve diğ., 2014a) ....	24
<b>Şekil 2.11:</b> Oksitrollerin fizyolojik ve patolojik etkilerinin bir özeti gösterilmiştir (Palozza ve diğ., 2007; Kim ve Lee., 2010) .....	28
<b>Şekil 2.12:</b> MS / MS çalışmasını şematik diyagram gösterimi (K. Murray.,2006) .....	30
<b>Şekil 2.13:</b> Kütle spektrometresinin temel bileşenleri (Banerjee ve Mazumdar, 2012) .....	31
<b>Şekil 2.14:</b> Elektrosprey iyonizasyon sürecinin şematik gösterimi (Banerjee ve Mazumdar, 2012) .....	32
<b>Şekil 2.15:</b> Dört kutuplu kütle analizöründe, farklı tarama modelleri (Glish ve Vachet., 2003) .....	34



<b>Şekil 2.16:</b> Bir veri sistemi tarafından gerçekleştirilen iki analiz ve geri besleme kontrolü ile bir kütle spektrometresi için temel diyagram.....	34
<b>Şekil 3.1:</b> MeOH ve ACN arasındaki ayırışma kıyaslaması.....	39
<b>Şekil 3.2:</b> Örnek analizi sırasında kullanılan hareketli fazların doğrusal gradyan gösterimi Kolon fırın sıcaklığı 45 ° C'de tutuldu. Bu sıcaklık oda sıcaklığının aksine daha iyi bir ayırma sağlar (Şekil 3.3). .....	39
<b>Şekil 3.3:</b> Kolon ısıtıcısı olan ve olmayan bir plazma örneğinde ayırma. ....	40
<b>Şekil 3.4:</b> 7-KC'nin DMG türevinin ürün iyon spektrumları ve parçalanma paterni. (Jiang ve diğ., 2007). .....	44
<b>Şekil 3.5:</b> kolestan-3β, 5α, 6β-triolün DMG türevinin ürün iyon spektrumları ve parçalanma paterni. (Jiang ve diğ., 2007).....	44
<b>Şekil 4.1:</b> 7-KC ve kolestan-3β, 5α, 6β-triol için kalibrasyon eğrileri.....	47
<b>Şekil 4.2:</b> 7-KC kütle spektrumları / kütle fragmentogramları .....	48
<b>Şekil 4.3:</b> Kolestan-3β, 5α, 6β triol kütle spektrumları / kütle fragmentogramları.....	48
<b>Şekil 4.4:</b> Buege ve Aust (1978)'un spektrofotometrik yöntemi ile plazmada MDA tayini için hazırlanan kalibrasyon eğrisi ve regresyon denklemi .....	49
<b>Şekil 4.5:</b> Hasta ve kontrollerin plazma 7-KC düzeyleri .....	51
<b>Şekil 4.6:</b> Hasta ve kontrollerin plazma Cholestan 3β,5α,6β-triol düzeyleri .....	52
<b>Şekil 4.7:</b> Hasta ve kontrollerin plazma Total MDA düzeyleri .....	52
<b>Şekil 4.8:</b> Hasta ve kontrollerin plazma Total IgE düzeyleri .....	53
<b>Şekil 4.9:</b> Astım hastalarında kolestan-3β,5α,6β-triol ile HDL arası negatif ve doğrusal olmayan ilişki .....	56
<b>Şekil 4.10:</b> Astım hastalarında 7-KC ile AST arası düşük düzey pozitif ilişki.....	56
<b>Şekil 4.11:</b> Astım hastalarında kolestan-3β,5α,6β-triol ile Tbil arası negatif monotonik ilişki .....	57
<b>Şekil 4.12:</b> Astım hastalarında kolestan-3β,5α,6β-triol ile GGT arası negatif monotonik ilişki .....	57
<b>Şekil 4.13:</b> Tüm bireylerde 7-KC ile MDA arası orta düzeyli pozitif ilişki .....	58
<b>Şekil 4.14:</b> Tüm bireylerde kolestan-3β,5α,6β-triol ile MDA arası orta düzeyli pozitif ilişki. ....	58

## TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
<b>Tablo 2.1:</b> Astımda yaygın semptomlar ve fizik muayene bulguları. ....	9
<b>Tablo 2.2:</b> Oksidaterollerin isimlendirilmesi ve kökeni. ....	20
<b>Tablo 3.1:</b> Kalibrasyon standart çalışma çözümlerinin hazırlanması (1 L'de). . ....	41
<b>Tablo 3.2:</b> Kütle spektrometrik parametreler. ....	43
<b>Tablo 3.3:</b> 7-KC ve kolestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol kütle geçişleri. ....	43
<b>Tablo 4.1:</b> Çalışma gruplarının klinik ve biyokimyasal karakteristikleri. ....	50
<b>Tablo 4.2:</b> Astımlı hastaların biyokimyasal parametreler ile kestirimi. ....	51
<b>Tablo 4.3:</b> Astım hastalarında oksisteroller ve diğer biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyonlar. ....	54
<b>Tablo 4.4:</b> Tüm bireylerde yaşa göre düzeltilerek elde edilen oksisteroller ve diğer biyokimyasal parametreler arasındaki kısmi korelasyonlar. ....	55

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

### Simgeler Açıklama

%	: Yüzde
$\alpha$	: Alfa
$\beta$	: Beta
°C	: Santigrad derece
dL	: Desilitre (100 mL)
kV	: Kilovolt
L	: Litre
L/min	: Dakikada litre
M	: Molar
m/z	: Kütle/yük (“mass-to-charge ratio”)
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol
rpm	: Dakikadaki dönüş
$\mu$ g	: Mikrogram
$\mu$ m	: Mikrometre

### Kısaltmalar Açıklama

7-KC	: 7-Ketokolesterol
ACAT	: Açıl CoA-kolesterol açıl transferaz
AHR	: Solunum yolu hiper-tepkiselliği (“Airway Hyperresponsiveness”)
APC	: Antijen sunan hücre (“Antigen Presenting Cell”)
APCI	: Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon
API	: Atmosferik basınç iyonizasyonu
APPI	: Atmosferik basınç fotoiyonizasyonu
ATP	: Adenozin trifosfat
BAFF	: B-hücresi aktivasyon faktörü

<b>BHT</b>	: Butillenmiş hidroksitoluen
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>CCL3</b>	: Kemokin ligandı 3
<b>CD4+</b>	: T hücreleri
<b>CNS</b>	: Merkezi sinir sistemi (“Central Nervous System”)
<b>CXCL</b>	: C-X-C motif kemokin ligandı
<b>CXCL5</b>	: C-X-C motif kemokin ligandı 5
<b>CYP</b>	: Sitokrom P450
<b>CYP46A1</b>	: Sitokrom P450 ailesi 46 alt aile bir
<b>DMG</b>	: N,N-dimetilglisin
<b>FAB</b>	: Hızlı atom bombardımanı
<b>FcγRI</b>	: Yüksek afiniteli reseptör
<b>GATA-B</b>	: Transkripsiyon faktörü BCFI'nin geni
<b>GGT</b>	: Gamma glutamil transferaz
<b>GPX</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>GS-MS</b>	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
<b>GST</b>	: Glutasyon S-transferaz
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>HDL</b>	: Yüksek yoğunluklu lipoproteinler
<b>HMG-COA</b>	: 3-Hidroksi-3-metilglutaril-CoA redüktaz
<b>HPLC</b>	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (“High Performance Liquid Chromatography”)
<b>HRH1</b>	: Histamin H1 reseptörü
<b>HRH2</b>	: Histamin H2 reseptörü
<b>HRH3</b>	: Histamin H3 reseptörü
<b>HRH4</b>	: Histamin H4 reseptörü
<b>IFNγ</b>	: İnterferon gamma
<b>IgA</b>	: İmmüoglobulin A
<b>IgE</b>	: İmmüoglobulin E
<b>IL-12</b>	: İnterlökin-12
<b>IL-13</b>	: İnterlökin-13
<b>IL-17</b>	: İnterlökin-17
<b>IL-22</b>	: İnterlökin-22
<b>IL-4</b>	: İnterlökin-4
<b>IL-8</b>	: İnterlökin-8

<b>IL-9</b>	: İnterlökin-9
<b>ILC</b>	: Doğal lenfoid hücreler (“Innate Lymphoid Cells”)
<b>KOAH</b>	: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
<b>LCAT</b>	: Lesitin-kolesterol açıl transferaz
<b>LC-MS</b>	: Sıvı kromatografisi-kütle spektrometri(e)si
<b>LC-MS/MS</b>	: Sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometrisi
<b>LDL</b>	: Düşük yoğunluklu lipoproteinler
<b>LPO</b>	: Lipid peroksidasyonu
<b>LT</b>	: Lökotrien
<b>LTC<sub>4</sub></b>	: Lökotrien C <sub>4</sub> sentaz
<b>LTD<sub>4</sub></b>	: Lökotrien D <sub>4</sub>
<b>LTE<sub>4</sub></b>	: Lökotrien E <sub>4</sub>
<b>LXR</b>	: Karaciğer X reseptörleri
<b>MAPK</b>	: Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz
<b>MBP</b>	: Majör bazik protein
<b>MCP-1</b>	: Monosit kemo-atraktan proteini-1
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>MHC</b>	: Majör doku uyumu
<b>NADP</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>Nrf2</b>	: Nükleer faktör eritroid 2
<b>PAF</b>	: Trombosit aktive edici faktör
<b>PG</b>	: Prostaglandin
<b>PGE<sub>2</sub></b>	: Prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>PUFA</b>	: Çoklu-doymamış yağ asitleri
<b>RNS</b>	: Reaktif nitrojen türleri
<b>ROR</b>	: Retinoid-ilişkili yetim (ligandı belli olmayan) reseptör (“Retinoid-related Orphan Receptor”)
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>SCAP</b>	: SREBP bölünme aktifleştirici proteinler
<b>SIM</b>	: Seçilmiş iyon izleme
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>SPE</b>	: Katı faz ekstraksiyonu
<b>SREBP</b>	: Sterol yanıt elemanı bağlayıcı protein
<b>TBA</b>	: Tiyobarbitürik asit
<b>TBARS</b>	: Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler

<b>TCA</b>	: Triklorasetik asit
<b>TEP</b>	: Tetraetoksi propan
<b>Th2</b>	: T lenfosit tip 2 (T-yardımcı hücreleri)
<b>TLC</b>	: İnce tabaka kromatografisi (“Thin Layer Chromatography”)
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktörü
<b>VLDL</b>	: Çok düşük yoğunluklu lipoproteinler



## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### ASTIMLI HASTALARDA PLAZMA 7-KETOKOLESTEROL, KOLESTAN- 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -TRİOL VE MALONDİALDEHİT DÜZEYLERİ

**Behnoush NASR ZANJANI**

**İstanbul Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Danışman : Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA**

**II. Danışman : Prof. Dr. Aslı GELİNCİK**

Astım, farklı ülkelerde nüfusun %1-%18'ini etkileyen küresel bir sağlık sorunudur. Dünyada yaklaşık 300 milyon insanın astım hastası olduğu ve bu hastalığa bağlı yılda yaklaşık 250.000 ölüm vakasının gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Hava kirliliği, iklimsel değişiklikler ve diğer çevresel uyarılara bağlı olarak özellikle alerjik astım prevalansı dünyada giderek artmaktadır. Alerjik koşullarda, bağışıklık sisteminin aktivasyonu sonucu oksidatif stres oluşur. Oksidatif stresin astımda ve diğer kronik hastalıklarda rol oynadığı bilinmektedir ve astım şiddetinin belirleyicisi olduğunu gösteren güçlü kanıtlar vardır. Lipit peroksidasyonu, yağ asitlerinin enzimatik ve/veya enzimatik olmayan reaksiyonlarla oksitlenmesini içeren bir oksidatif stres biçimidir. Kolesterolün oksidasyonu, oksisteroller olarak bilinen çok sayıda oksidasyon ürününün oluşumuna yol açar. Kolesterolün kendiliğinden veya enzimatik oksidasyonundan kaynaklanan oksisteroller, *in vivo* oksidatif stresin girişimsel olmayan potansiyel biyobelirteçleridir. Astımlı hastaların kanındaki oksisterol ve malondialdehit (lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden biri, MDA) düzeylerinin belirlenmesi, astımın

patogenezinde oksidatif stresin rolü hakkında bilgi verebilir ve tanı ve tedavi süreçlerine yeni yaklaşımlar getirebilir.

Bu çalışmada toplam 120 astım hastası (90 kadın + 30 erkek) ile (yaş ve cinsiyete göre eşleştirilmiş) 120 sağlıklı kontrol bireyin plazma 7-ketokolesterol ve kolestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol düzeyleri LC-MS/MS sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi yöntemi ile ölçüldü. Ayrıca plazma MDA düzeyleri, TBARS (tiyobarbitürik asit reaktif maddeler) ölçümüne dayanan spektrofotometrik yöntemle analiz edildi.

Hastalarda plazma 7-ketokolesterol (39.45 $\pm$ 20.37 ng/mL) ve kolestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol (25.61 $\pm$ 10.13 ng/mL) düzeylerinin, sağlıklı bireylerdekinden (sırasıyla, 17.84 $\pm$ 4.26 ng/mL ve 10.00 $\pm$ 3.90 ng/mL) anlamlı olarak (p<0.001) yüksek olduğu belirlendi. Oksistrol düzeyleri ile MDA ve total IgE düzeyleri arasında anlamlı pozitif korelasyonlar gözlemlendi. Plazma MDA düzeyi, astım hastalarında (4.98 $\pm$ 1.77nmol/mL), sağlıklı kontrollere (1.14 $\pm$ 0.31nmol/mL) kıyasla anlamlı olarak (p<0.001) daha yüksek bulundu.

Sonuç olarak, lipid peroksidasyonu yan ve son ürünleri alerjik astımın komplikasyonu ile yakından ilişkili olduğundan, plazma 7-ketokolesterol, kolestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol ve MDA düzeylerinin astımda en azından tanı ve takip için yararlı ve değerli biyokimyasal parametreler olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir.

Bu çalışma özellikle alerjik astımda lipid peroksidasyonunun yeri ve oksisterollerin rolleriyle ilgili gelecek çalışmalara güçlü bir temel oluşturmaktadır.

Aralık 2018, 93 sayfa.

**Anahtar kelimeler:** Astım, alerjik astım, oksisteroller, 7-ketokolesterol, kolestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$  - triol, LC-MS/MS, oksidatif stres, malondialdehit, MDA.



## **SUMMARY**

### **M.Sc. THESIS**

#### **PLASMA 7-KETOCHOLESTEROL, CHOLESTANE-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -TRIOL AND MALONDIALDEHYDE LEVELS IN ASTHMA PATIENTS**

**Behnoush NASR ZANJANI**

**İstanbul University**

**Institute of Graduate Studies in Sciences**

**Department of Molecular Biology and Genetics**

**Supervisor : Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA**

**Co-Supervisor : Prof. Dr. Ash GELİNCİK**

Asthma is a global health problem affecting 1%–18% of the population in different countries. An estimated 300 million people worldwide suffer from asthma, with 250.000 annual deaths attributed to this disease. Particularly, prevalence of allergic asthma gradually increases in the world, depending on air pollution, climatic changes and other environmental stimulants. In allergic conditions, oxidative stress occurs as a result of activation of the immune system. Oxidative stress is known to play a role in asthma as well as other chronic diseases, and there is strong evidences that asthma severity is a determinant. Lipid peroxidation is a form of oxidative stress that involves oxidation of fatty acids by enzymatic and/or non-enzymatic reactions. Oxidation of cholesterol leads to the formation of a large number of oxidation products known as oxysterols. Oxysterols, which resulted from spontaneous or enzymatic oxidation of cholesterol, are potentially non-invasive biomarkers of oxidative stress *in vivo*.

Determination of oxysterol and malondialdehyde (MDA, one of the end products of lipid peroxidation) levels in the blood of patients with allergic asthma can provide information about the role of oxidative stress in the pathogenesis of allergic asthma, and may exhibit new approaches to the diagnosis and treatment processes.

In this study, plasma 7-ketocholesterol and cholestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol levels of total 120 asthma patients (90 females + 30 males) and 120 healthy controls (matched by age and sex) were quantified by LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) method. In addition, plasma MDA levels were analyzed by spectrophotometric method depending on the measurement of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances).

Plasma 7-ketocholesterol ( $39.45 \pm 20.37$  ng/mL) and cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol ( $25.61 \pm 10.13$  ng/mL) levels in patients were significantly higher than those in healthy subjects ( $17.84 \pm 4.26$  ng/mL ( $p < 0.001$ ) and  $10.00 \pm 3.90$  ng/mL, respectively) ( $p < 0.001$ ). Significant positive correlations were observed between oxysterol levels and MDA and total IgE levels. The plasma MDA was found to be significantly higher in the asthmatics ( $4.98 \pm 1.77$  nmol/mL) as compared to healthy controls ( $1.14 \pm 0.31$  nmol/mL) ( $p < 0.001$ ).

In conclusion, since lipid peroxidation by- and end-products seem to be closely related to the complication of allergic asthma, plasma 7-ketocholesterol, cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol and MDA levels may represent helpful and valuable biochemical parameters for at least diagnosis and prognosis in asthma.

This study provides a strong basis for further studies on the involvement of lipid peroxidation and the roles of oxysterols, especially in allergic asthma.

December 2018, 93 pages.

**Keywords:** Asthma, allergic asthma, oxysterols, 7-ketocholesterol, cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol, LC-MS/MS, oxidative stress, malondialdehyde, MDA.

## 1. GİRİŞ

Astım önemli bir halk sağlığı problemidir. Dünya nüfusunun yaklaşık %20'si bu hastalıktan acı çekmektedir (Bousquet ve diğ., 2010). Özellikle alerjik bronşiyal astım vakalarının sayısı, artan hava kirliliği ve iklim değişikliklerine paralel olarak her geçen gün artmaktadır. Bu çevresel etkenler, sanayileşmenin hızlı bir şekilde ilerlediği ve gelişmekte olan ülkelerde daha da belirgindir (Lee ve diğ., 2013). Türkiye'de her 12-13 erişkinden biri astım hastasıdır. Astımın görülme sıklığının giderek arttığını belirten uzmanlar, hastalığın ülke ekonomisine olan yükünün de giderek artmakta olduğunu belirtmektedirler (Türkiye Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Derneği).

Oksisteroller, kolesterolün oksitlenmiş türevleridir; kolesterolün A veya B halkaları veya yan zincirine bir veya iki oksijen atomunun -OH, keto, epoksit veya peroksit grupları oluşturacak şekilde eklenmesiyle meydana gelirler. Oksisteroller, kolesterolden daha kısa biyolojik yarı-ömre sahip olup, iki şekilde meydana gelirler: 1) Sitokrom (CYP) P450 ailesine ait enzimlerin katalizlediği enzimatik yollarla veya 2) enzimatik olmayan oksidasyon (oto-oksidasyon) yoluyla. Ayrıca *in vivo* veya gıda işlenmesi sırasında enzimatik olmayan diğer yollar (serbest radikal, lipid peroksit veya iki değerlikli katyonlar oluşturan oksidatif süreçler) ile de ortaya çıkabilirler (Fessler ve Parks, 2011). Başlıca oksisterol türleri; 7 $\alpha$ -, 7 $\beta$ -, 24-, 25-, 27-hidroksi kolesteroller, 7-ketokolesterol, kolestantriol, 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ - ve 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksi kolesterollerdir. Oksisteroller, memeli dokularında çok düşük konsantrasyonlarda bulunurlar ve çok sayıda metabolik olayda rol alırlar. Patolojik durumlarda, makrofaj köpük hücreleri, aterosklerotik lezyonlar, katarakt ve safra taşları gibi dokularda miktarları artar. Oksisteroller Alzheimer hastalığı, ateroskleroz, diyabet ve Niemann Pick-C gibi dejeneratif hastalıkların patolojisinde rol oynarlar; ayrıca immün sistem üzerindeki etkileri yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Oksitlenmiş kolesterol formları otoimmüniteyi artırır. Son yıllarda gelişen LC-MS/MS ve GS-MS teknolojileri ile son birkaç yıldır oksisterol türlerinin ölçülebilir hale gelmesi bu moleküllerin oksidatif stres biyobelirteçleri olarak kullanılabileceğini ve oksidatif stresle ilişkili hastalıkların gelişimindeki rollerinin araştırılabileceğini düşündürmektedir (Liu ve diğ., 2013; Spann ve Glass, 2013; Jiang ve diğ., 2007; Miyoshi ve diğ., 2014).

Astım dünya genelinde insidansi giderek artan bir hastalık olmasına ve oksidatif stresin, özellikle de oksisterollerin inflamasyon ve immünite ile doğrudan ilişkili olduğu bilinmesine rağmen, alerjik astımın oksidatif stresle bağlantısını moleküler düzeyde araştıran çalışmaların sayısı beklenenden azdır. Alerjik durumlarda bağışlık sisteminin aktivasyonu sonucunda oksidatif stres meydana gelir. Oksidatif stresin, astım şiddetinin belirleyicisi olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır (Sahiner ve diğ., 2011). Astımda da oksidatif stresle birlikte oluşan ve reaktif oksijen türleri/metabolitleri olarak bilinen moleküller özellikle lipit, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerini hasara uğratarak solunum sistemindeki dokulara zarar verir (Sagdic ve diğ., 2011). Güncel bilgiler özellikle akciğer hastalıklarında kolesterol trafiği ile lipitlerin peroksidasyonu sonucunda yan ürün olarak oluşan oksisterollerin ve son ürün olarak oluşan malondialdehit (MDA)'in önemine dikkat çekmektedir (Fessler, 2017).

Astım hastalarının kanlarındaki oksisterol ve MDA düzeylerinin belirlenmesi oksidatif stresin alerjik astım hastalığının patogenezindeki rolü hakkında bilgi sağlayabilir ve tanı/tedavi süreçlerini destekleyebilir. Bu hipotezden yola çıkarak bu tez çalışmasında alerjik astım hastalarının plazma 7-ketokolesterol, kolestan 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol ve MDA düzeyleri araştırılmıştır. Oksisterol tayinleri LC-MS/MS yöntemiyle, MDA tayini TBARS yöntemiyle gerçekleştirilmiş ve alerjik astım hastalarında her üç metabolitin plazmadaki düzeyleri yüksek bulunmuştur.

Üç merkezin (İ.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü İç Hastalıkları Anabilim Dalı Alerji Bilim Dalı ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı) işbirliği ve desteğiyle gerçekleştirilmiş bu çalışmada lipit peroksidasyonunun alerjik astımla ilişkisi kanıtlanmış ve orjinal verilere ulaşılmıştır.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. ASTIM

Astım terimi, Yunanca'da "nefes darlığı" anlamına gelen "asthma" kelimesinden gelmektedir. Başlangıçta bir hastalık olarak tanımlanmadığı, fakat çeşitli akciğer koşullarının solunumsal semptomlarını belirtmek için kullanıldığı bildirilmiştir. Bu terim, 19. yüzyılın ikinci bölümünde Henry Hyde Salter'in "Astım ve Tedavisi Üzerine" başlıklı bir makalesinin yayınlanmasıyla yeniden düzenlenmiştir. Salter, astımı, düz kasların büzülmesinden dolayı hava yollarının daraldığı bir hastalık olarak tanımlamıştır. Astım, aynı zamanda Huangdi'nin Inner Canon'u veya Yellow Emperor'un Inner Canon'u olarak bilinen Huangdi Neijing adlı tıbbi kitapta belirtildiği gibi ilk kez M.Ö. 2600 yılında gözlemlenmiştir (Holgate, 2010). Yirminci yüzyılın başlarına gelindiğinde, astım, bronşiyal tüplerin "spazmodik rahatsızlıkları" ile karakterize edilen eşsiz bir hastalık olarak görülmüştür. Doğası gereği karmaşık bir hastalık olan astımın patogenezi için oluşturulan modeller giderek daha karmaşık hale gelmiştir.

Bağlantı ve ilişki çalışmaları, astımın ayırt edici özellikleri olan çeşitli kromozom bölgeleri tanımlamıştır. İnsan alerjik astımının neden olduğu iltihaplanma, solunumsal epitelyumun, uyarlanabilir ve doğuştan gelen bağışıklık sistemlerinin etkileşimini içerir. Bu etkileşim, solunum yollarının yeniden şekillenmesine yol açan kronik bir yanıtı tetikler, hatta küçük hava yolları bile kronikleşmenin artmasına neden olur (Hall ve Agrawal, 2014).

Dünya çapında yaklaşık 300 milyon insanın astımı olduğu ve önümüzdeki 10-15 yılda bu sayının 400 milyonun üzerine çıkacağı tahmin edilmektedir.

#### 2.1.1. Alerjik Astım

Astım, kronik inflamasyon olarak tanımlanan, genetik ve çevresel bileşenlere sahip, heterojen bir hastalıktır ve hava yollarının uygunsuz bir inflamatuvar yanıtla ilişkili uzun dönemli geri dönüşümsüz yeniden şekillenmesidir. 1947'de Francis Rackman astımı "atopik veya ekstrinsik astım ve atopik olmayan veya intrinsik astım" olarak iki farklı klinik fenotipe ayırmıştır. Bu hastalığın 334 milyondan fazla insanı etkilediği bildirilmiştir (Ober ve Yao, 2011).

İnflamatuvar hücreler, hava yolu doku hücreleri ve dahil olan medyatörler astımda oksidatif stresin ana kaynaklarıdır. Oksidatif stres, bu süreçte önemli rol oynayan yüksek reaktif oksijen

(ROS) ve azot türlerini (RNS) üretir. Atopik fenotip, hava yolu aşırı duyarlılığı, mukozanın eozinofil ve T lenfosit tip 2 (Th2) hücre hakimiyeti, dolaşımdaki spesifik immünoglobulin E (IgE) ve yaygın alerjenlere karşı pozitif cilt prik testleri ile karakterize edilen alerjilerle yakından ilişkilidir (Mathur ve Viswanathan, 2014). Alerjik astım tanısı nispeten basit ve genellikle hastanın klinik geçmişine dayanır. İnfeksiyonlara bağlı olarak komplike olabilir ve aynı zamanda astımın ciddi bir formuna yol açabilen astmatik bronşit, öksürük ve rinit ile de ilişkilidir (Rackemann, 1947; Farrokhi ve diğ., 2015).

### **2.1.2. Astımın İmmünolojisi**

Astım, çoklu genetik ve çevresel etkileri içeren karmaşık bir hastalıktır. Alerjik astımının neden olduğu iltihaplanma, solunumsal epitelyumun, adaptif ve doğuştan gelen bağışıklık sistemlerinin etkileşimini içerir. Bu etkileşim kronik solunum yollarının yeniden şekillenmesine yol açan kronik bir yanıtı tetikler, hatta küçük hava yolları bile artan kroniklik ile değiştirilir (Blume ve Davies, 2013; Ishmael, 2011). En yaygın astım formu, alerjik astım olup, bireylerin sık aeroallerjenlere karşı antijen spesifik IgE aracılı bir yanıtın gelişmesi için genetik bir yatkınlığı vardır (Lemanske ve Busse, 2003; Bharadwaj ve diğ., 2007). Hava yolu epitelindeki ve submukozadaki dendritik hücreler, ev tozu akarı, polen, mantar sporları ve hamam böceği antijeni gibi inhale alerjenleri algılar. Dendritik hücreler üzerindeki yüksek afiniteli reseptörlere bağlanan IgE antikoru, bu alerjenlerin alımını ve içselleştirilmesini kolaylaştırır. Dendritik hücreler daha sonra MHC ("major histocompatibility complex") sınıf II ile T- ve B-lenfositleri aracılığıyla antijenleri işledikleri ve sundukları sekonder lenfatik sistemlere göç eder. B-lenfositleri, bazofiller ve mast hücreleri üzerindeki yüksek afiniteli Fc $\gamma$ RI'ye bağlanan IgE üretir. Alerjene yeniden maruz kalmak, histamin, prostaglandinler, lökotrienler, sitokinler ve kemokinler dahil olmak üzere, çeşitli medyatörlerin salınmasına neden olan reseptörlerin çapraz bağlanmasına yol açar. Bu araçlar hava yolu düz kas kasılması, ödem ve mukus sekresyonunu indükleyebilmektedir. Kemokinler, eozinofiller, makrofajlar, nötrofiller ve T-lenfositler gibi bir dizi inflamatuvar hücreleri tarafından tanınırlar (Agrawal ve Shao, 2010).

### 2.1.3. Şiddetli İnflamasyonla İlişkili Hücreler

#### 2.1.3.1. Mast Hücreleri

Mast hücreleri alerjik reaksiyonlarda kritik bir rol oynar. Düz kas ve inflamatuvar hücreler üzerinde etkili olan histamin, prostaglandinler, kemokinler, sitokinler ve lökotrienler de dahil olmak üzere güçlü medyatörleri serbest bırakır (Hall ve Agrawal, 2014). Hücre yüzeyinde Fc $\gamma$ RI'yi eksprese ederler, bu da IgE'nin bu reseptörlere bağlanmasını sağlar. Bu antijene yeniden maruziyet, reseptörlerin çapraz bağlanmasına neden olur ki, bu da mast hücrelerinin histamin ve triptaz gibi önceden oluşturulmuş medyatörleri salma ve lökotrien (LT) C4, prostaglandin (PG) D2, trombosit aktive edici faktör gibi yeni oluşturulmuş aracılara sentezleyen aktivasyon ve degranülasyon ile sonuçlanır (Hall ve Agrawal, 2014).

Astım hastalarında yapılan çalışmalar, akciğer alt mukozasında, düz kasta ve hava yolu epitelinde mast hücrelerinin varlığını saptamış, mast hücrelerinin astım patofizyolojisindeki rolünü kanıtlamıştır (Hall ve Agrawal, 2014). Son zamanlarda, izole edilmiş insan mast hücrelerinin, hava yollarına mast hücrelerini çeken CXCL10'un hava yolu düz kas hücresi üretimini düzenleyebileceği gösterilmiştir (Alkhouri ve diğ., 2014).

Bazofiller, mast hücrelerinininkine benzer birçok özelliğe sahiptir. Bunlar, IgE'ye çok değerlikli antijen bağlanmasıyla aktive edilir, bu da reseptörlerin çapraz bağlanmasına ve ardından granüllerin ekzositozuna neden olur (Stone ve diğ., 2010). Bazofillerden salınan ana medyatör histamin olup, aktivasyonla birlikte, LTD<sub>4</sub> ve LTE<sub>4</sub>'ü hızla sentezler (Schroeder, 2009). Bazofiller, alerjik hava yolu inflamasyonunun yayılmasına katkıda bulunur. Th2 hücresi farklılaşmasını ve çoğalmasını destekleyen IL-4 üretirler (Sokol ve diğ., 2008). Bazofiller de antijen sunan hücreler olarak işlev görme kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur. Son çalışmalar, bazofillerin, lenf düğümlerine gitme ve Th2 polarizasyonunu ilerleten T-hücrelerine antijen sunma yeteneğine sahip olabileceğini düşündürmektedir (Sokol ve diğ., 2008).

#### 2.1.3.2. Doğal Lenfoid Hücreler

Doğal lenfoid hücreler (ILC'ler) astım patogenezinde ortaya çıkan araçlardır. Hızlı sitokin bağımlı doğuştan bağışıklık, iltihaplanma, yeniden biçimlenme ve doku onarımının desteklenmesinde rol oynarlar. ILC'ler, ortak bir lenfoid progenitörün yanı sıra salgıladıkları

transkripsiyon faktörleri ve sitokinler gibi CD4+ T hücrelerine benzer birçok özellik sergilerler (Hall ve Agrawal, 2014).

Geniş olarak üç ILC grubu vardır:

1-) T-bet transkripsiyon faktörünü eksprese eden, IFN- $\gamma$  ve IL-12 üreten (Th1 hücreleri gibi) ILC<sub>1</sub>;

2-) GATA-3 transkripsiyon faktörünü eksprese eden, IL-5, IL-9 ve IL-13 üreten (Th2 hücreleri gibi) ILC<sub>2</sub>,

3-) ROR reseptörünü eksprese eden, IL-17 ve IL-22 üreten (Th17 hücreleri gibi) ILC<sub>3</sub>.

ILC<sub>2</sub>, ilk olarak farelerde tanımlanmıştır ve anti-helmantik ve alerjik tepkilerin erken faz tepkimelerine karıştığı bulunmuştur (Hall ve Agrawal, 2014). Bu hücreler antijene spesifik reseptörleri eksprese etmemekle birlikte, IL-33 ve/veya IL-25 ile aktivasyondan sonra Th2 sitokinleri salma yeteneğine sahiptirler (Halim ve McKenzie, 2013). Bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğu farelerde yapıldığı için, insan astımının patogeneğinde ILC<sub>2</sub>'lerin tutulumu hakkında çok az şey bilinmektedir (Halim ve McKenzie, 2013). Bununla birlikte, ILC<sub>2</sub>'lerin insan akciğerlerinde IL-25 ve IL-33 ile aktive edilerek IL-13 üretimini teşvik ettiğini gösteren kanıtlar vardır (Mjosberg ve diğ., 2011). Ayrıca ILC<sub>2</sub>'lerin adaptif tepkileri etkilemede bir rol oynadığı öne sürülmüştür, ancak bu süreçte yer alan mekanizmalar henüz belirlenmemiştir.

### **2.1.3.3. İmmüoglobulin E**

İmmüoglobulin E (IgE) alerjik reaksiyonlarla ilişkilidir ve birçok araştırmacı tarafından kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve gözden geçirilmiştir. Beş antikor sınıfından (IgG, IgM, IgA, IgD ve IgE), serumdaki konsantrasyonu en düşük olanı IgE'dir ki, bu kısmen, plazma hücrelerine farklılaşan ve sentezine bağlı olan B-hücrelerinin az sayıda olmasına ve dokudaki hızlı emilimine bağlıdır. Reseptörlerine sıkı sıkıya bağlıdır (Hall ve Agrawal, 2014). Farklılaşmış B-hücreleri izotip değiştirmeye başladığında IgE üretilir. Bu, moleküler düzeyde meydana gelen ve daha önce APC (antijen sunan hücreler) aracılığıyla sunulan alerjen tarafından aktive edilen T-lenfositler ile etkileşime aracılık eden bir rekombinasyon işlemidir (Davies ve O'Hehir, 2008). IgE'nin birincil işlevi, parazitler başta olmak üzere bazı patojenlere karşı savunma mekanizmasında rol almaktır. Buna karşılık, zararsız çevresel antijenlere karşı



artmış alerjen spesifik serum IgE düzeylerinin varlığı atopik hastalıklar ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Duyarlı bir kişi bir alerjenle temas ettiğinde, reseptörlere yapışmış IgE moleküllerinin çapraz bağlanması, güçlü medyatörleri serbest bırakan mast hücrelerinin degranülasyonuna neden olur (Hall ve Agrawal, 2014). IgE ayrıca geç faz yanıtlarında da rol oynar. Araştırmalar, mast hücrelerinin uyarılmasıyla birlikte IgE'nin, alerji ile bağlantılı immün hücrelerin göçüne neden olan bir dizi kemokin ve sitokin ürettiğini göstermiştir. Bunların yüksek düzeyleri alerji tanısı için önemli bir araçtır. IgE'nin yerel üretimi, dokuda genellikle kanda olduğundan daha yüksek alerjene özgü fraksiyonları açıklayabilir. Reseptörüne yüksek afiniteyle bağlanma IgE'nin ömrünü belirgin bir şekilde artırsa da, alerjene spesifik IgE, tamamen veya kısmen diğer kaynaklardan da ortaya çıkabilir (Gould ve Sutton, 2008). Serum IgE düzeylerini sürekli olarak yenileyen kaynağı kesin olarak çözmek için araştırmalar devam etmektedir.

#### **2.1.3.4. Histamin**

Histamin, mast hücreleri ve bazofillerden salınır. Histamin, yumuşak kas kasılmasını, goblet hücrelerinde mukus üretimini ve nitrik oksit üretimini indükleyebilir (Neumann ve diğ., 2010). Histamin, hem adaptif hem de doğal immün yanıtta yer alan çeşitli hücrelerde bulunan dört reseptöre (H1R, H2R, H3R ve H4R) sahiptir. H1R'ler düz kas hücreleri, epitel hücreleri ve lökositler üzerinde bulunur (Neumann ve diğ., 2010).

#### **2.1.3.5. B-Hücre Aktivasyon Faktörü**

B-hücre aktivasyon faktörü (BAFF), TNF ailesinin bir üyesidir; olgun B-lenfositlerinin oluşumunda ve devamlılığında rol oynar (Hall ve Agrawal, 2014). BAFF'ın astımdaki rolü henüz tam olarak aydınlatılmamıştır ve bugüne kadar yapılan çalışmalar çelişkili sonuçlar vermektedir. BAFF düzeylerinin, astımlı hastaların serum ve bronkoalveoler lavaj sıvısında normal bireylere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu artmış seviyeler, toplam lenfosit sayısı, nötrofil ve eozinofil ile ilişkilidir. Bu sonuçlara dayanarak, BAFF'ın antijen kaynaklı üretiminin B-hücrelerinde sınıf değiştirme rekombinasyonu ve immünooglobulin sentezine katkıda bulunabileceği ön görülmektedir. Bu bulgulara dayanarak, BAFF'ın T hücrelerinin aracılık ettiği AHR (solunum yolu hiper-tepkiselliği) üzerinde bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, etki mekanizmasını ve BAFF'ın insan astımı yanıtındaki rolünü belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Hall ve Agrawal, 2014).

### **2.1.3.6. İmmün Hücreler**

Eozinofiller, astımı içeren birçok alerjik yanıtla ilişkilidir ve akciğerlerdeki birikimi, hem insanlarda hem de hayvan modellerinde astımın tanımlayıcı bir özelliğidir (Deckers ve diğ., 2013). Öncelikli olarak IL-5'in etkisi altında gelişir ve farklılaşır, infeksiyon ve inflamasyon bölgesinden dolaşıma girer. Eozinofillerin aktivasyonu, MBP, katyonik protein, LTC<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, ve PAF gibi pro-inflamatuar medyatörlerin salınmasına yol açar (Bandeira-Melo ve diğ., 2002). Son birkaç yılda yapılan çalışmalar, eozinofillerin antijen sunan hücre (APC) olarak işlev görme ve B hücresi aktivasyonunu artırma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Klinik çalışmalar, bu süreçlerin bazı yönlerini (özellikle hava yolu yeniden şekillenmesini ve eozinofil ürünlerinin astmatik hastaların dokularında biriktiğini) doğrulamıştır (Kita, 2013).

### **2.1.3.7. Nötrofiller**

Nötrofiller, yaralanma veya alerjene maruz kalma durumunda, o bölgeye ilk giden inflamatuvar hücrelerden biridir. Nötrofiller IL-8, CXCL5, CCL3, LTB<sub>4</sub> tarafından toplanır. Nötrofillerin astım patogenezindeki rolü tartışmalıdır. Ağır astım hastalarının bronkoalveoler lavaj sıvısında yüksek miktarlarda buldukları için nötrofillerin kritik bir rol oynadıkları ortadadır. IL-17 üreten hücrelerin, IL-8'in aşırı ekspresyonuna (up-regülasyonuna) ve daha sonra nötrofillerin hava yollarına toplanmasına aracılık ettiği ileri sürülmüştür. Nötrofillerdeki artışın, hava yolu yeniden şekillenmesinin nötrofil sağkalımı ve kullanımı için uygun bir ortam sağlamasından kaynaklanabileceği, ancak gözlemlenen patojeneze aktif olarak katkıda bulunmadıkları bildirilmiştir (Hall ve Agrawal, 2014).

### **2.1.4. Astımın Klinik Belirtileri ve Semptomları**

Astım, hırıltı, nefes darlığı, hava yolu aşırı duyarlılığı, öksürük ve mukus hipersekresyonu kombinasyonu ile ortaya çıkan, tersine çevrilebilir bir hava yolu tıkanıklığı olarak tanımlanmaktadır. En sık görülen 4 semptom, hırıltılı solunum, öksürük, nefes darlığı ve subjektif göğüs darlığı hissidir (Patadia ve diğ., 2014) (Tablo 2.1).

**Tablo 2.1:** Astımda yaygın semptomlar ve fizik muayene bulguları.

Astımda yaygın semptomlar ve fizik muayene bulguları	
En sık görülen 4 semptom	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hırıltı</li> <li>• Öksürük</li> <li>• Subjektif göğüs darlığı</li> <li>• Solunum güçlüğü veya nefes darlığı</li> </ul>
Yaygın fiziksel muayene bulguları	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nefes darlığı</li> <li>• Taşikardi</li> <li>• Sesli hırıltı</li> <li>• Rinit ve egzama</li> </ul>

**Hırıltı:** En sık rastlanan hırıltı, akut astım alevlenmesinin belirtisidir. Ancak, hırıltı ne hassas ne de spesifiktir ve astımı teşhis etmek için hırıltılı olma gerekliliği yoktur. Ek olarak, hırıltılı olarak ortaya çıkabilen birçok başka hastalık süreci vardır. Hırıltı, solunum döngüsü sırasında belirgin bir şekilde değildir. Hırıltı zaman içinde ton ve süre olarak değişir. Hastada nefes alıp verirken hırıltı varsa, olası diğer hastalıkları da göz önünde bulundurmamak ve tanı için daha detaylı testleri (spirometri gibi) yapmak gerekir (Patadia ve diğ., 2014).

**Öksürük ve Mukus Üretimi:** Öksürük, astımın sık görülen başka bir semptomudur. Birçok hasta öksürüklerinin, gece yarısı gibi, özellikle gece yarısından sabahın erken saatlerine kadar mevcut olduğunu vurgular. Balgam mevcutsa, genellikle görünürde mukoid veya soluk sarıdır. Pediatrik popülasyonda, balgamda bulunan nötrofil miktarı ile ilgili öksürük sıklığı düşünüldüğünde, bu hasta grubunda infeksiyöz bir nedendir. Öksürük bazen tek semptom olduğundan, yetişkinlerde kronik öksürük, özellikle semptomlar mevsimsel ise veya öksürük tetiklendikten sonra ortaya çıkıyorsa, astımı düşündürür (Gordon, 2008).

### 2.1.5. Astım Tanı Kriterleri

**Klinik Tanı:** Astım tedavisinin başarılı olması için astım tanısının doğru koyulması çok önemlidir. Doğru tanı için; hırıltılı solunum, nefes darlığı, öksürük, göğüste sıkışma hissi gibi solunumsal semptomların karakteristik seyrinin ve değişken hava akımı kısıtlanmasının gösterilmesi gereklidir ( Tablo 2.1).

**Astım Semptomları:** Zaman zaman ortaya çıktığından ve bu hastalığa spesifik olmadıklarından hem hekim hem de hastalar tarafından yeterince önemsenmeyebilir. Astım semptomları KOAH (Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı) veya yaşlılıkta görülen solunum sıkıntıları gibi başka patolojik durumlarla karıştırılarak yanlış tanı koyulmasına neden olabilir. Yanlış tanı özellikle çocukluk yaş grubunda daha sık olmakta ve hastalık bronşitin değişik formları veya başka hastalıklarla karışmakta ve yetersiz tedavi ile hastalığın kontrol altına alınmasını geciktirebilmektedir (GINA, 2015).

**Anamnez:** Astım tanısında anamnez çok önemlidir. Bununla birlikte, semptomların tipik olmadığı hastalarda sadece anamnez ile tanı koymak güçtür ve tanısız testlere (fiziki muayene, akciğer grafisi, solunum fonksiyon testleri, alerji testleri, bronş provokasyon testi gibi) ihtiyaç duyulabilir. Tanısız testlerin pozitif olması tanıyı destekler, ancak negatif olması tanıyı dışlamaz. Genel tanı, nöbetler halinde gelen nefes darlığı, hırıltılı solunum, öksürük ve göğüste sıkışma hissi gibi semptomların varlığı ile koyulur (Türk Toraks Derneği, Astım Tanı ve Tedavi Rehberi, 2016). Astım belirtileri birkaç dakika veya gün sürebilir. Öksürük, astımda sık görülen bir şikayettir; öksürük balgam üretimiyle birlikte olabilir veya olmayabilir, gece veya aktivite ile kötüleşebilir ve/veya alerjenlere maruz kaldıktan sonra gelişebilir. Semptomların gün içinde veya mevsimsel değişkenlik göstermesi, sis, duman, çeşitli kokular veya egzersiz gibi nedenlerle tetiklenmesi, geceleri artış olması ve uygun astım tedavilerine yanıt vermesi astım tanısını destekler (Çelik, 2012).

**Özgeçmiş ve Aile Öyküsü:** Astım her yaşta ortaya çıkabilir, ancak genellikle ilk kez çocuklukta ortaya çıkar. Hastanın çocukluk çağında egzama, besin alerjisi veya rinit/astım hikayesi olması erişkin dönemde astım gelişimi ile ilişkili olması nedeniyle tanıyı destekler. Astım için risk faktörleri arasında, bir aile öyküsü ve bir aile veya atopi öyküsü (örneğin, atopik dermatit, mevsimsel alerjik rinit, konjonktivit) bulunmaktadır. Ek olarak, astım, aspirine duyarlı veya kimyasal toksinlere veya çevresel alerjenlere maruz kalan kişilerde gelişebilir. Bu nedenle, kapsamlı bir tarihsel sorgulama, astımlı hastanın değerlendirilmesinde kritik öneme sahiptir. Astım hastalarının çoğu, genellikle tiz bir müzikal ses olarak tanımlanan öksürük, nefes darlığı ve/veya hırıltılı solunum semptomlarından şikayetçidir. Ailede astım öyküsünün bulunması ve atopik hastalıkların varlığı tanıyı koymaya yardımcı olan diğer özelliklerdir (National Asthma ve Prevention, 2007).

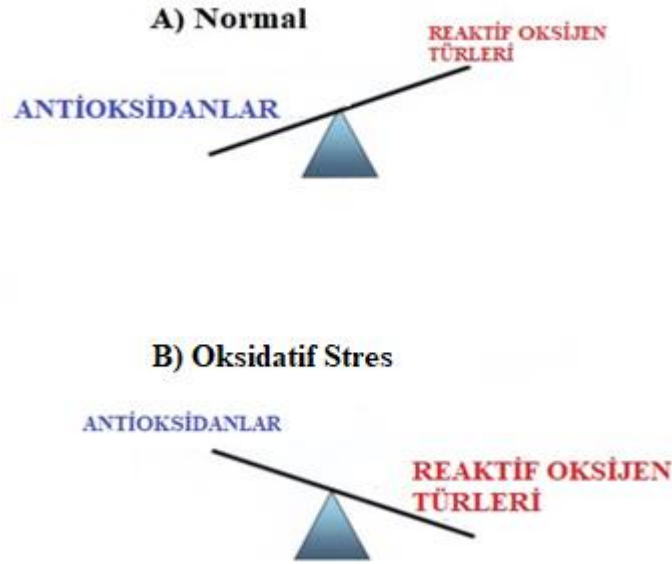
**Astım Fenotipleri:** Astım fenotipleri, astım hastalarının genetik yapısı ile çevresi arasındaki etkileşimden kaynaklanan ortak özellikleri doğrultusunda oluşturdukları gruplardır. Astım çeşitli klinik fenotiplerle seyredebilir (Wenzel, 2006; Bel, 2004). Önceleri ekstrinsik (alerjik) ve intrinsik (alerjik olmayan) astım şeklinde başlayan fenotipik yaklaşıma, zamanla erken-geç başlangıçlı astım, öksürükle seyreden astım, persistan hava akımı kısıtlanması ile seyreden astım, obeziteye bağlı astım, egzersiz astımı, noktürnal (gece ortaya çıkan) astım, aspirine duyarlı astım, premenstrüel astım, steroide dirençli/bağımlı astım, “brittle” astım, meslek astımı gibi fenotipler eklenmiştir. Bunlardan tanı koyulamayan astımların en büyük kısmını öksürükle seyreden astım oluşturur. Noktürnal ve egzersiz astımı ayrı fenotip olmayıp tedavi görmeyen hastaların büyük çoğunluğunda görülür. Yüksek performanslı sporcularda egzersiz astımı izole olarak görülebilir (%10). Son yıllarda astım hastalarının klinik, demografik ve hava yolu inflamasyonu gibi çeşitli özellikleriyle oluşturulan küme analizlerine dayanan farklı klinik fenotipler de tanımlanmıştır.

**Fizik Muayene:** Hasta semptomatik değilse solunum sistemi muayenesi normal bulunabilir fakat fizik muayenenin normal olması astım tanısını dışlamaz. En sık rastlanan muayene bulgusu hava yolu obstrüksiyonunu gösteren hırıltı ve ek sesler (ronküsler)’dir. Solunum sesleri normal bulunan bazı astımlı hastalarda oskültasyon sırasında zorlu ekspirasyon yaptırılırsa ronküs işitilebilir. Anamnez ve fizik muayene sırasında hemen her derin inspirasyondan sonra öksürük gelişmesi, hava yolu duyarlılığının indirekt göstergesidir ve astımı düşündürür. Astım ataklarındaki hiperinflasyon ve hava akımı kısıtlanması solunum eylemini belirgin düzeyde artırır. Ciddi astım ataklarında ileri derecede azalmış ventilasyon ve hava akımı nedeniyle ronküs ve hırıltı duyulmayabilir. Bu durumdaki hastalarda atağın ciddiyetini gösteren siyanoz, uykuya meyil, konuşma güçlüğü, taşikardi, yardımcı solunum kaslarının kullanımı ve interkostal çekilmeler gibi diğer fizik muayene bulguları gözlenir (GINA, 2015; Çelik, 2012). Astımlı hastaların büyük çoğunluğunda rinit görülebildiğinden, fizik muayene sırasında rinit, geniz akıntısı ve nazal obstrüksiyon bulguları açısından üst solunum yolu muayenesinin de yapılması önerilir.

## 2.2. ASTIM VE OKSİDATİF STRES

Reaktif türlerin (ROS ve RNS) ve/veya bunların yan/son ürünlerinin vücudun antioksidan savunmasını aşmasıyla meydana gelen ve moleküler hasarlara yol açan süreç, “Oksidatif Stres” olarak tanımlanır. Oksijen aerobik yaşam için çok önemlidir, ancak paradoksal olarak,

atmosferik konsantrasyonlarda bile toksik olabilir. Aerobik hücrelerde oksijen, enzimatik veya enzimatik olmayan reaksiyonlarda bir elektron alıcısı görevi görür; bununla birlikte, elektronların oksijene eklenmesi, toksik reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olabilir. Örneğin, oksijene bir elektron ilavesi süperoksit üretir, ikinci bir elektron hidrojen peroksit verir ve üçüncü bir elektron hidroksil radikalının oluşumuna yol açar. Bu 3 ara ürüne reaktif oksijen türleri denir, çünkü proteinler, lipitler ve DNA gibi diğer moleküller ile kolaylıkla reaksiyona girerler. Endojen veya eksojen olan reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS), hava yolu inflamasyonunda önemli bir rol oynar ve astımın ciddiyetini belirleyen bileşiklerdir. Oksidatif stres, reaktif türler ile antioksidanlar arasındaki dengesizlikten kaynaklanır (Şekil 2.19). Oksidatif stres birçok alerjik ve immünolojik bozuklukta ortaya çıkar. Her ne kadar alerjik ve immünolojik hastalıklarla ilgili araştırmaların çoğunluğu reaktif oksijen türlerinin toksik etkilerine odaklanmış olsa da, fizyolojik konsantrasyonlardaki reaktif oksijen türlerinin, bu süreçlerde hücre sinyal medyatörleri gibi ek roller oynayabileceğine dair kanıtlar da giderek artmaktadır (Bowler ve Crapo, 2002).



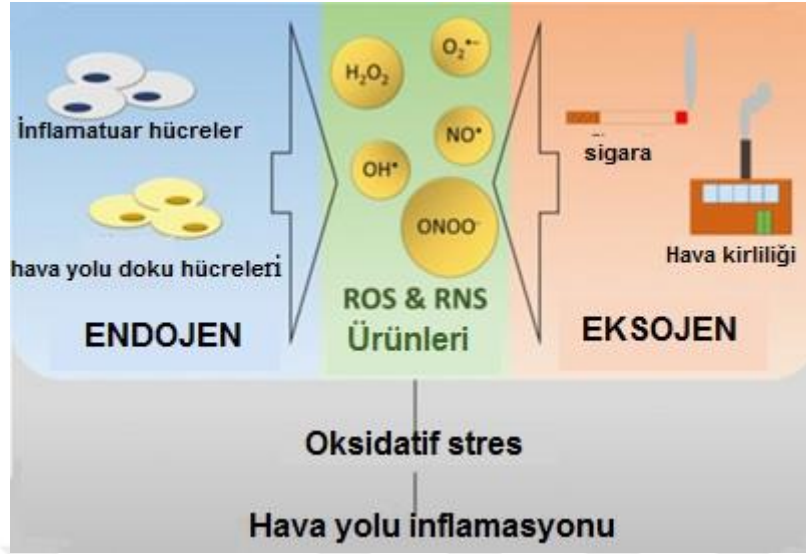
**Şekil 2.1:** Reaktif oksijen türleri ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik. A) Normal olarak, solunum sisteminde yeterli miktarda antioksidan var, öyle ki az miktarda reaktif oksijen türünün üretimi önemsizdir. B) Antioksidanlar azalır veya reaktif oksijen türlerinin üretimi artarsa (örneğin, astım alevlenmesi sırasında), antioksidanlar ve reaktif oksijen türleri dengesi oksidatif strese doğru ilerler (Bowler ve Crapo, 2002) .

Birçok gözlem, oksidatif stresin astım patogeneğinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Astımlı hastalarda ROS ölçümlerinin doğrudan yapılması zor olmakla birlikte, astım hastalarının ekshale edilmiş gazları ile ilgili çalışmalar yapılmış olup hidrojen peroksit ve nitrik oksit seviyelerinin artışı gösterilmiştir (Emelyanov ve diğ., 2001; Ichinose ve diğ., 2000; Zue ve diğ., 2014). Bu artışların muhtemel kaynağı hava yolu inflamatuvar hücreleridir. Örneğin, astım hastalarından alınan hava yolu makrofajları daha fazla süperoksit üretir. Antijenle mücadele, astımlı hastalarda hava yolu eozinofillerinin spontan ROS salımını artırır. Astımlı hastalarda kandaki eozinofiller ve monositler de daha fazla ROS üretirler (Barnes,1990). Böylece hem hava yolu hem de intravasküler inflamatuvar hücreler astımda yüksek oksidatif strese katkıda bulunurlar. Astım alevlenmesi sırasında ROS artışı, endojen antioksidan savunma mekanizmalarını altüst edebilir (Bowler ve Crapo, 2002).

### **2.2.1. Astımda Endojen ve Ekzojen Reaktif Türler ve Biyolojik Etkileri**

Oksidatif stres, hem endojen (inflamatuvar hücreler ve hava yolu doku hücreleri) hem de ekzojen kaynaklar (hava kirliliği, sigara vb.) tarafından üretilen reaktif türlerden kaynaklanabilir (Şekil 2.2). İnflamatuvar hücreler (mast hücreleri, eozinofiller, makrofajlar ve nötrofiller) ve hava yolu doku hücreleri (epitelyum ve düz kas), çeşitli uyarıcılarla aktive edildikten sonra ROS üretir. Örneğin, süperoksit anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ), nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) oksidaza bağlı kompleks, sitosolik ksantin oksidaz sistemi ve mitokondrideki elektron taşınması ile üretilir. Bu tür daha sonra enzimatik olarak veya kendisiyle reaksiyona girerek hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) dönüştürülür.  $H_2O_2$ , bir serbest radikal olmadığı halde,  $Fe^{+2}$  veya diğer geçiş metallere varlığında Fenton reaksiyonu ile, aynı zamanda da  $O_2^{\cdot-}$  radikalinin varlığında Haber-Weiss reaksiyonu ile en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) oluşturur.

Aslında,  $O_2^{\cdot-}$  ve  $H_2O_2$ 'nin neden olduğu hasarın büyük kısmı  $OH^{\cdot}$  radikalinin oluşumundan kaynaklanmaktadır. Astımda ROS artışının en önemli biyolojik etkileri doku (özellikle havayolu) hasarı ve inflamasyonun artırılmasıdır.



Şekil 2.2: Hava yolu inflamasyonunda endojen ve eksojen reaktif türlerin rolü (Tredaniel ve diğ., 1994).

### 2.2.2. Hava Yolunda Gelişen Oksidatif Stres

Epidemiyolojik çalışmalar, alerjik astım insidansının son yıllarda artmış olduğunu göstermiştir. Bu değişimin en temel nedeni dış ortamdaki olumsuz değişikliklerdir. Hava kirliliğindeki artış, oksidan ilaç kullanımının artması ve antioksidanların azalması gibi faktörler, hava yolundaki oksidatif stresini artırır, bu da hava yolu inflamasyonuna neden olabilir. Hava yolunda gelişen oksidatif stresin düzeyi, hücre içi antioksidan savunma mekanizmalarının etkinliğine de bağlıdır, dolayısıyla bireysel varyasyonlarla da ilişkili olabilir. Örneğin, hücre içi antioksidan savunma sistemindeki kısmi bir eksiklik, oksidatif stresin daha çabuk ortaya çıkmasına yol açabilir. Çevresel etkenlerle artan oksidatif stres, antioksidan sistemleri immün hücrelere uygulanan oksidatif stres yükünü kaldıramayan, genetik olarak yatkın kişilerde immün toleransın kırılmasına neden olarak alerjik havayolu inflamasyonuna katkıda bulunabilir (Sahiner ve diğ., 2011).

### 2.2.3. Astım Gelişiminde Hücresel Antioksidan Faaliyetler

Hücre içi antioksidan olarak iş gören çeşitli moleküller, artan oksidatif stresle mücadele ederler. Hücre içi oksidan düzeyinin uygun aralıkta tutulmasında hücre içi glutatyon konsantrasyonu kritik öneme sahiptir. Hücre içi glutatyon ve ilişkili enzimlerin (GPX, GST), astım ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Rahman ve diğ., 2000). Nrf2, hücrelerde oksidatif stres oluştuğunda birçok antioksidan enzimi ve molekülü indükleyebilen önemli bir transkripsiyon faktörüdür (Cho ve Moon, 2010). Literatürdeki veriler, hücre içi antioksidan savunma



sistemindeki bozuklukların, artan oksidatif stres altında astım gelişimine önemli katkıda bulunabileceği fikrini kuvvetle desteklemektedir. Astım insidansındaki son artışlar, sadece ortamda artan oksidatif strese değil aynı zamanda protein fosfatazları, Nrf2, glutatyon ve peroksidaz sistemi gibi intraselüler antioksidan savunma mekanizmalarındaki intrinsik fonksiyonel değişkenliğe de atfedilebilir (Li ve diğ., 2006; Cho ve Moon, 2010 ).

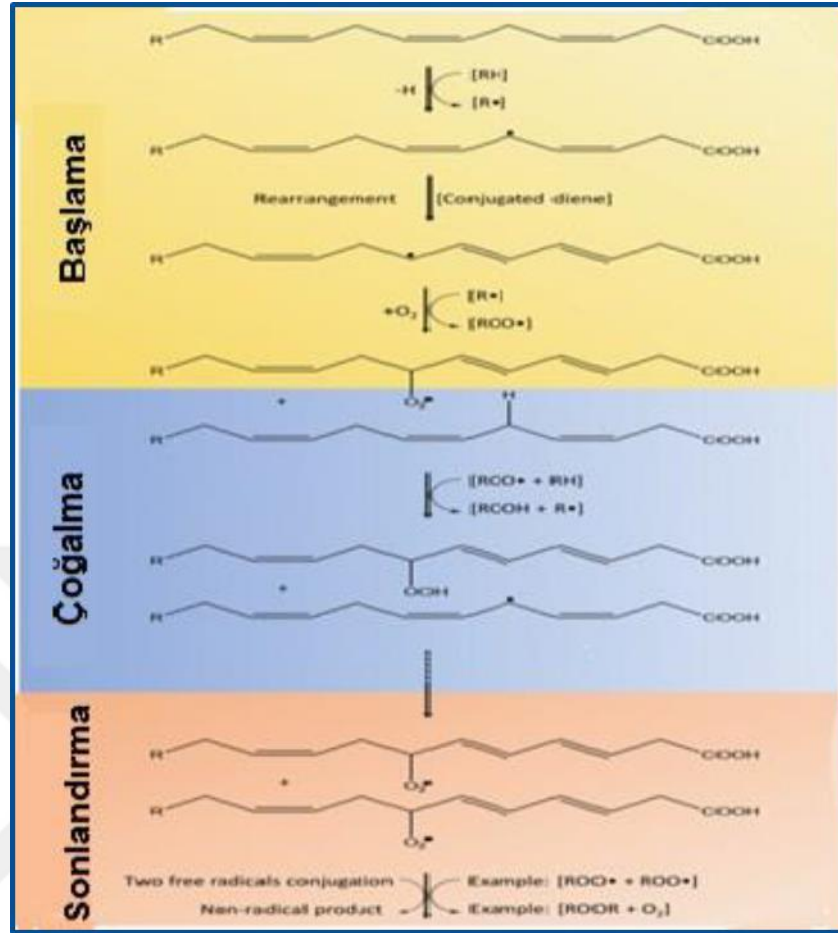
#### **2.2.4. Astımda Oksidatif Stresin Genetik Bileşeni**

Astımla oksidatif stres ilişkisini belirleyen en önemli faktörlerden biri de genetik özelliklerdir. Akciğerlerde birkaç sınıf GST enzimi eksprese edilir (Fitzpatrick ve diğ.,2012). Bu enzimleri şifreleyen genlerde toplumdaki frekansı yüksek farklı polimorfizmler söz konusudur. Bazı polimorfizmler, bu enzimlerin sentezinde bir kayba yol açarak, solunum yolu inflamasyonuna yol açabilir. Bu patofizyolojik değişiklik de, örneğin organizma ozona maruz kaldığında solunum semptomlarında artışa neden olur. Benzer bir etki, SOD genindeki bir mutasyonun, proteinin ikincil yapısında bir değişikliğe yol açarak, mitokondriye protein hedeflemesini etkilemesi durumunda da ortaya çıkar (Sahiner ve diğ., 2011).

#### **2.2.5. Lipid Peroksidasyonu**

Lipid peroksidasyonu (LPO), genel olarak serbest radikal kaynaklı zincir reaksiyonları ile özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidasyonuna neden olan ve böylece membran lipidlerinin yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan bir olay olarak tanımlanır (Thomas ve Aust, 1986; Cochrane, 1991). Oksidatif stresin sonuçlarından biri lipid peroksidasyonudur ve bu süreç yağ asitlerinin *in vivo* oksidasyonunu içerir (Şekil 2.3).

Lipid peroksidasyonu membran akıcılığını azaltır, membranların biyofiziksel özelliklerini etkiler (Cheeseman, 1993). Lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan hasar nedeni ile homeostaz bozularak, iyonlara özellikle kalsiyuma olan geçirgenlik artar, kalsiyum pompasının aktivitesi bozulur (Jones ve diğ., 1983).



**Şekil 2.3:** Bir yağ asidinde meydana gelen enzimatik olmayan lipid peroksidasyonunun temel aşamaları (Basu, 2007; Repetto ve diğ., 2016).

Enzimatik olmayan reaksiyonlar yoluyla ortaya çıkan lipid peroksidasyonu, esas olarak üç aşamaya bölünmüş karmaşık bir süreçtir: başlama, çoğalma ve sonlandırma. İşlemin başlatılması, bir hidrojen soyutlandığında veya bir çoklu doymamış yağ asidine (PUFA), bir oksidatif hasara yol açan bir radikal eklendiğinde ortaya çıkar. PUFA'lar, bir metilen grubuna bitişik çift bağlara sahip olduklarından doymuş yağ asitlerinden daha hassastır. Bu metilen grubunun C-H bağı zayıftır ve hidrojen soyutlanmaya yatkındır. Ortaya çıkan molekül, bir peroksil radikali oluşturan oksijen ile birleşen bir konjuge dien oluşturan yeniden düzenlemeye maruz kalır. Bu tür ayrıca başka bir PUFA'dan bir hidrojen soyutlama yeteneğine de sahiptir. Oluşan radikal merkezler, farklı peroksil radikalleri oluşturan  $O_2$ 'ne büyük bir afinite gösterirler. Ortaya çıkan oksitlenmiş lipidler, vazokonstriktör, vazodilatatör, bronkokonstriktör olarak iş görebilir ve astımdaki karakteristik inflamasyona neden olabilirler. Ek olarak,

membran akışkanlığını ve dolayısıyla bununla ilişkili enzimleri ve reseptörlerini değiştirme kabiliyetine sahiptirler.

Lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan lipid peroksitler kararsız yapılardır ve ikincil, üçüncül reaksiyonlara girmeye müsaittirler. Girdikleri dekompozisyon reaksiyonları sonucu zincir ayrılma ürünleri oluşur. Bu ürünler n-alkanaller, 2-alkanaller, 2,4-alkadenaller, malondialdehit (MDA), alkoller, ketonlar, furanlar, laktonlar, alkanlar ve alkenlerdir (Kappus ve Sies, 1981).

### 2.2.6. Malondialdehit (MDA)

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan Malondialdehit (MDA), kimyasal olarak aktif bir moleküldür, çevre hücre ve dokulara kolayca difüze olarak moleküler düzeyde, özellikle proteinler üzerinde zararlı etkiler gösterebilir (Parantainen ve diğ., 1986; Nielsen ve diğ., 1997). MDA, kanser, psikiyatri, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, astım veya kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok sağlık probleminde oksidatif stresin en sık kullanılan biyobelirtecidir (Khoubnasab Jafari ve diğ., 2015). Malondialdehit, bir Schiff bazı oluşturmak için iki amin grubu ile reaksiyona girebilen bifonksiyonel bir aldehittir (Şekil 2.4).



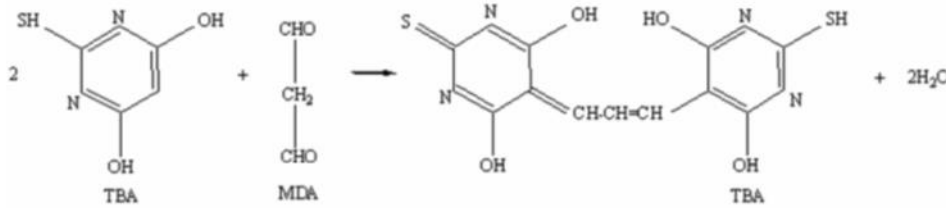
MDA



**Şekil 2.4:** Malondialdehit'den Schiff bazı oluşumu (Horton ve Fairhurst, 1987).

MDA üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşur. MDA düzeyi lipid peroksidasyonunun yaygınlığı ile korelasyon gösterir (Cochrane, 1991). MDA tiyobarbutirik asit (TBA) ile reaksiyon verdiği için, lipid peroksidasyon düzeyi TBARs olarak ifade edilir (Knight ve diğ., 1988). MDA'nın proteinlerle çapraz bağ oluşturması sonucunda ilgili proteinin fonksiyonları (örneğin, iyon taşıma özellikleri ve enzim aktivitesi) zarar görür.

MDA, kolaylıkla difüze olabildiğinden DNA'nın azotlu bazlarıyla da reaksiyon vererek yapılarını bozar (Draper ve Hadley, 1990). Malondialdehit, *in vivo* enzimatik LPO ürünü olarak ortaya çıktığı gibi prostaglandin metabolizmasında siklooksijenaz reaksiyonunun ürünü olarak da meydana gelmektedir. Vitamin E yetersizliği, demir veya karbontetraklorüre maruziyet gibi LPO'nu indükleyen durumlarda ve dokuların PUFA açısından zengin olduğu ortamlarda total MDA atılımı artar (Halliwell ve Gutteridge, 1988; Grievink ve diğ.,1998). MDA veya tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) yöntemi, 1950'lerden beri membran ve biyolojik sistemlerde lipit peroksidasyonunu tahmin etmek için yaygın olarak kullanılmıştır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunun ikincil son ürünü olan MDA, 532 nm'de bir absorbansa sahip bir pembemsi-kırmızı kromojen bir ürün veren, asit katalizli nükleofilik ekleme tepkimesi yoluyla iki tiyobarbitürik asit (TBA) molekülü ile reaksiyona girer (Şekil 2.5) (Kappus ve Sies, 1981). TBARS testi hızlı, basit ve ekonomik oluşu nedeniyle popülerliğini korumaktadır.



**Şekil 2.5:** Tiyobarbitürik asitin MDA ile reaksiyonu (Kappus ve Sies, 1981).

Önceleri MDA testinde ölçülen MDA miktarının tümünün LPO sırasında oluştuğu düşünülmekteydi. Ancak deney sırasında (özellikle ısıtma ve ortamı asidik yapma) gerçekleşen reaksiyonlar sonucunda bir miktar daha MDA açığa çıkabilir. Bu yüzden yöntem için TBARS adlandırması daha uygundur (Slater, 1984).

### 2.2.7. Astımda Oksidan / Antioksidan Dengesizliği

Antioksidanlar, hücreleri ve dokuları, ROS ve RNS'nin sürekli oksidasyonundan korur (Heffner ve Repine, 1989). Solunum yollarının redoks homeostazisi durumunda bir dengesizlik astımın başlangıcında ve şiddetinde belirleyici bir faktördür. Sonuç olarak, astım, hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidan aktivitenin kaybı ile karakterize edilir. SOD, CAT ve GPX

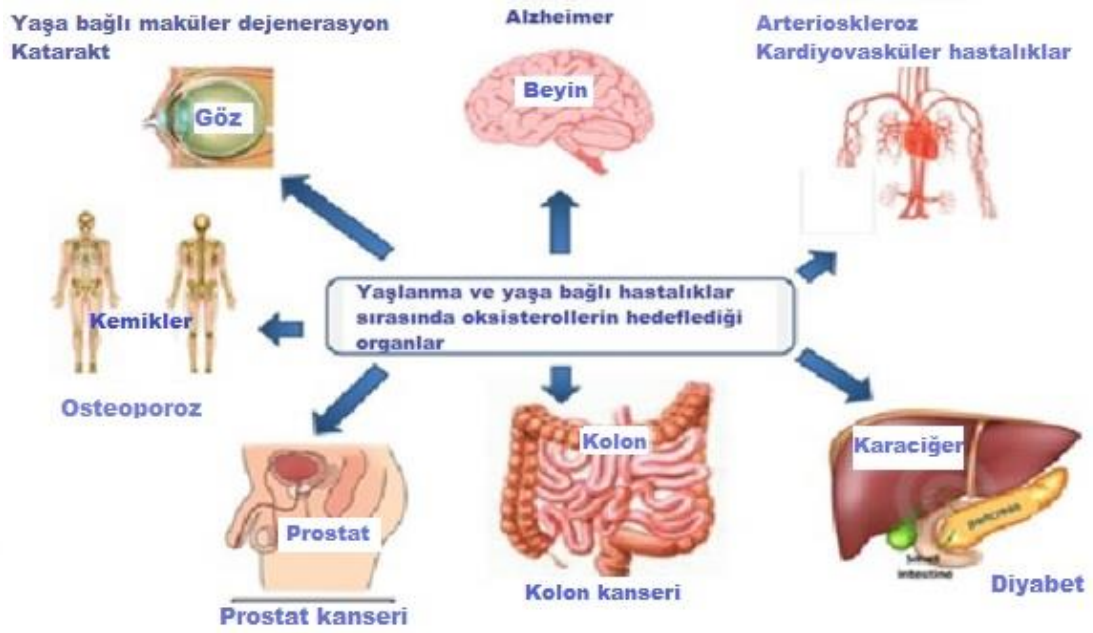
gibi antioksidan enzim aktivitesinin kaybı, astımlı hastaların hava yollarındaki oksidatif stresi yansıtır (Heffner ve Repine, 1989).

### 2.3. OKSİSTEROLLER

Kolesterol, tüm memeli dokularında bulunur. Ayrıca hücre zarlarının önemli bir yapısal bileşenidir. Kolesterolün oksidasyonu, “oksisteroller” olarak bilinen çok sayıda oksidasyon ürününün oluşumuna yol açar. Oksisteroller kolesterol ile aynıdır, ancak kolesterol A veya B halkaları veya yan zincirinde bir veya daha fazla oksijen içeren fonksiyonel gruplar içerirler. Bu nedenle, oksisteroller, kolesterol / fitosterollerin -hidroksi, -keto veya -epoksi oksidasyon ürünleri veya kolesterol biyosentez sürecinin son ürünleridir (Brown ve diğ., 2000). Enzimatik etki veya oto-oksidasyon ile oluşurlar ve çok sayıda biyolojik aktiviteye sahiptirler (Olkkonen ve diğ., 2012).

Bazı oksisterollerin zarar verici olduğu düşünülürken, bazılarının da önemli fizyolojik roller üstlendiği bilinmektedir. Bazı spesifik oksisteroller kolesterol biyosentezini kontrol etme veya kolesterolün normal hücre fonksiyonlarına doğrudan müdahale etme potansiyeline sahiptir (Brown ve Jessup, 2009).

Bazı ana oksisteroller, kolesterolü safra asitleri ve steroid hormonlarına dönüştüren yollarda ara madde olarak oluşur (Zarrouk ve diğ., 2014a). Ayrıca sterol biyosentezinde ara maddelerdir ve sinyal elementleri olarak görev yaparlar (Bjorkhem ve Diczfalusy, 2002; Vaya ve diğ., 2011). Oksisteroller ayrıca kendi başlarına biyoaktif moleküllerdir, nükleer reseptörlere karşı ligandlar ve ayrıca steroid regülatör element bağlayıcı proteinlerin (SREBP'ler) kolesterol ve yağ asidi biyosentezini düzenleyen transkripsiyon faktörleri olarak aktif formlarına işlenmesini düzenleyen düzenleyicilerdir (Griffiths ve diğ., 2016). Oksisteroller ayrıca sterolün taşınabilir formlarıdır (Schroepfer, 2000). Bu bileşikler, çeşitli hastalıkların patogeneğinde de rol oynarlar (Şekil 2.6) (Griffiths ve diğ., 2016).



**Şekil 2.6:** Yaşlanma ve yaşa bağlı hastalıklar sırasında oksisterollerin hedeflediği organlar (Zarrouk ve diğ., 2014b).

Oksisteroller, spontan veya kolesterolün enzimatik oksidasyonu ile üretilir (Jessup ve Brown, 2005). Oksisteroller endojen olarak ROS etkisiyle oluşturulabilir (Murphy ve Johnson, 2008; Iuliano, 2011). Fizyolojik açıdan önemli olan oksisterol türlerinin çoğu, hücrelerdeki sitokrom P450 (CYP) ailesine ait mitokondriyel enzimler veya endoplazmik retikulum kolesterol hidroksilazları tarafından üretilir (Luoma, 2007). Bazı önemli oksisteroller Tablo 2.2’de gösterilmektedir.

**Tablo 2.2:** Oksisterollerin isimlendirilmesi ve kökeni.

Kısaltma	Yaygın isim	IUPAC ismi
22(R) OHC	22(R)- Hidroksikolesterol	Kolest-5-en-3 $\beta$ ,22(R)-diol
24(S) OHC	24(S)- Hidroksikolesterol	Kolest-5-en-3 $\beta$ ,24(S)-diol
25 OHC	25- Hidroksikolesterol	Kolest-5-en-3 $\beta$ ,25-diol
27 OHC	27- Hidroksikolesterol	Kolest-(25R)-5-ene-3 $\beta$ ,27-diol
4 $\beta$ OHC	4 $\beta$ - Hidroksikolesterol	Kolest-5-ene-3 $\beta$ ,4 $\beta$ -diol
7 $\alpha$ OHC	7 $\alpha$ - Hidroksikolesterol	Kolest-5-en-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol
7 $\beta$ OHC	7 $\beta$ -Hidroksikolesterol	Kolest-5-en-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol
7 KC	7- Ketokolesterol	Kolest-5-en-3 $\beta$ -ol-7-one
5 $\alpha$ 6 $\alpha$	5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Epoksi kolesterol	Kolestan-5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoksi-3 $\beta$ -ol
5 $\beta$ 6 $\beta$ EC	5 $\beta$ ,6 $\beta$ -Epoksikolesterol	Kolestan-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksi-3 $\beta$ -ol
Zymo*	Zymosterol	5 $\alpha$ -kolesta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol
Desmo*	Desmosterol	3 $\beta$ -hidroksi-5,24-kolestadiene
7DHC*	7- Dehydrocholsterol	Kolesta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol

### 2.3.1. Oksisterollerin Oluşumu

Oksisterollerin kolesterolden türetildiği bazı yollar vardır. Biyolojik oksisteroller genel olarak iki ana kategoriye ayrılabilir; yan zincirde oksijenlenenler ve sterol halka yapısı üzerinde oksijenlenenler. Yan oksijenli oksisteroller çoğunlukla enzimatik olarak oluşturulurken, halka oksijenli oksisteroller genellikle enzimatik olmayan bir kökene sahiptir (Gill ve diğ., 2008). Bu kuralın birkaç istisnası, hem enzimatik hem de enzimatik olmayan yollarla üretilen 25-hidroksikolesterol ve 7 $\alpha$ -hidroksikolesterol'dür (Brown ve Jessup, 2009).

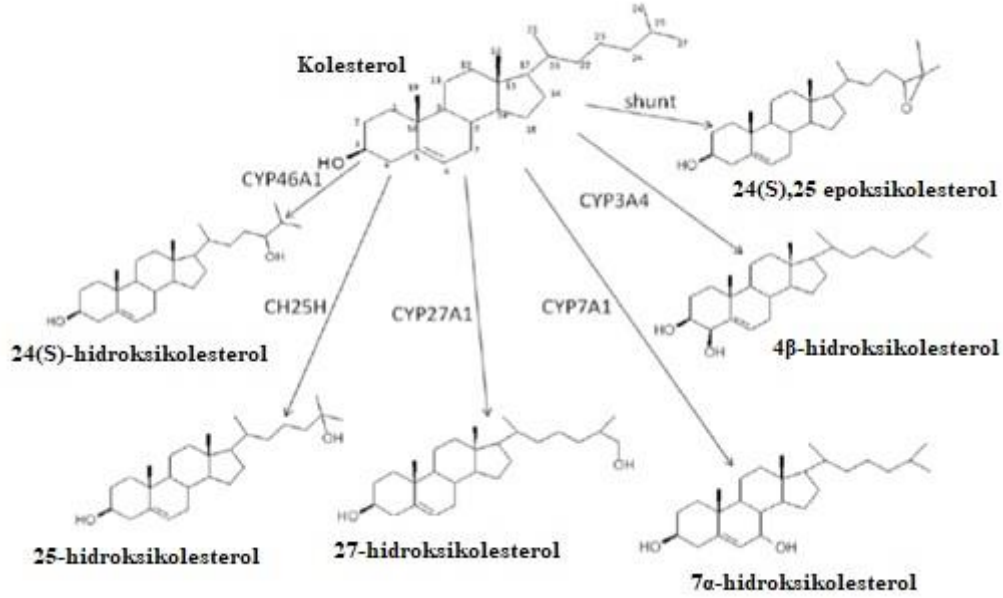
#### **Enzimatik Oksidasyon:**

Yan zincir oksijenli oksisteroller çoğunlukla enzimatik olarak oluşur (Şekil 2.7). Kolesterol yan zincirinin hidroksilasyonu, CYP ailesine ait mitokondriyel veya endoplazmik retikulum kolesterol hidroksilaz aktivitesi ile gerçekleşir (Schroepfer, 2000; Bjorkhem ve Diczfalusy, 2002).

#### **Enzimatik olarak ortaya çıkan başlıca oksisteroller şunlardır:**

- 24 (S) -hidroksikolesterol [24 (S) OHC]. Kolesterol 24-hidroksilaz enziminin (CYP46A1) etkisi ile merkezi sinir sisteminde (CNS) sentezlenir. Nöronal dokulardan kolesterol atılımı için anahtar yoldur ve bu nedenle CNS sterol homeostazı ve akıntısında önemli bir rol oynar (Bjorkhem, 2007).
- 27-hidroksikolesterol (27 OHC). Karaciğerde ve birkaç karaciğer dışı hücrede sterol 27-hidroksilaz (CYP27A1) ile sentezlenir. Alternatif ve safra asidi sentezi yolunda bir ara üründür. 27 OHC, CYP27A1 ile 3 $\beta$ -hidroksi-5-kolestenoik aside oksitlenir (Bjorkhem ve Eggertsen, 2001).
- 7 $\alpha$  -hidroksikolesterol (7 $\alpha$  OHC). Karaciğerde kolesterol 7 $\alpha$ -monooksijenaz (CYP7A1) ile sentezlenir ve klasik safra asidi sentezi yolunda bir ara ürün olarak işlev görür (Bjorkhem ve Eggertsen, 2001).
- 4 $\beta$ -hidroksikolesterol (4 $\beta$  OHC). Karaciğerde bir ilaç metabolize edici enzim olan tauroknodeoksikolat 6-alfahidroksilaz (CYP3A4) tarafından üretilir ve bazı anti-epileptik ilaçlar üzerindeki hastalarda uyarılır (Bodin ve diğ., 2002; Diczfalusy ve diğ., 2011).
- 25-hidroksikolesterol (25 OHC). Sitokrom P450 enzimi tarafından üretilir. Kolesterol bağımlı transkripsiyonel regülasyon için sterol düzenleyici element bağlayıcı protein (SREBP) yolunun düzenleyicisidir (Russell, 2000).

- 25-epoksikolesterol [24 (S)]. Kolesterol biyosentezinin mevalonik asit yolunun bir şantından elde edilir (Nelson ve diğ., 1981).



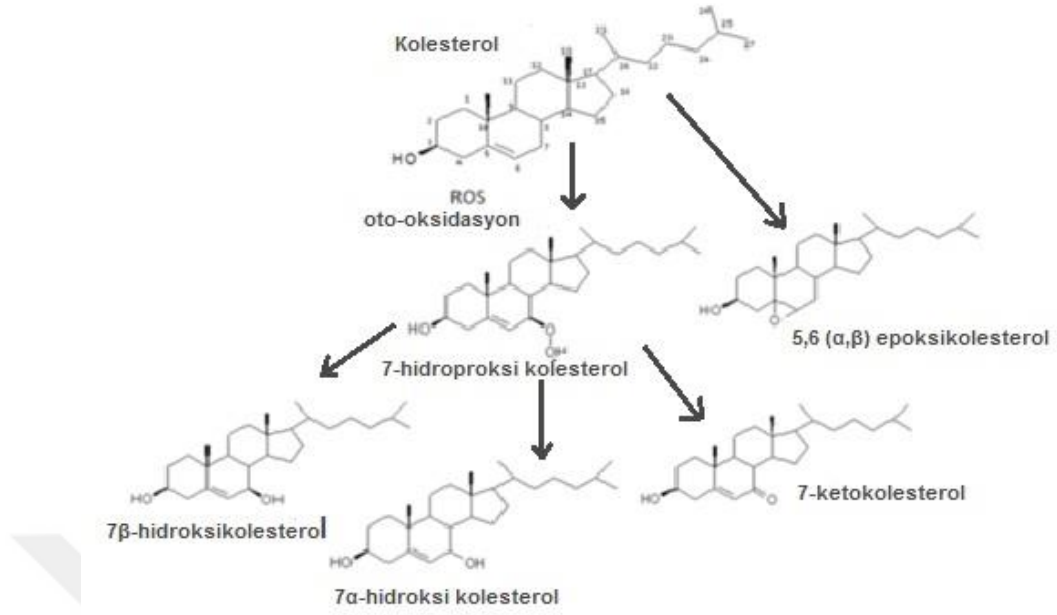
**Şekil 2.7:** Enzimatik olarak üretilen bazı oksisterollerin yapıları ve CYP enzimleri (Brown ve Jessup, 2009).

#### Enzimatik Olmayan Oksidasyon:

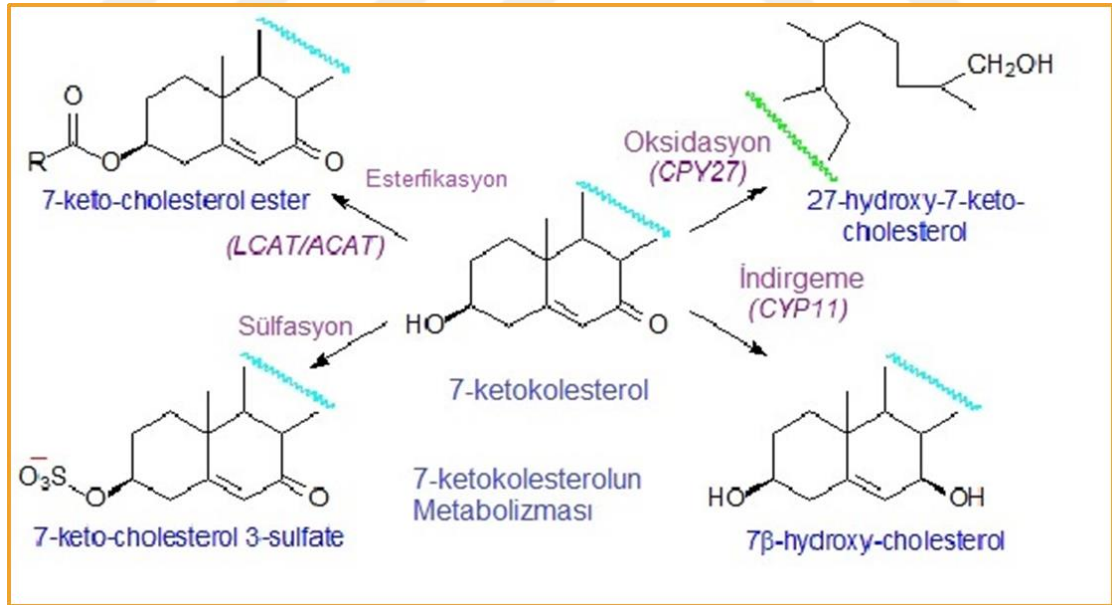
Kolesterolün enzimatik olmayan oksidasyon ürünleri Şekil 2.8’de özetlenmiştir. Hidroksil radikali, C7-konumunda hidrojen eliminasyonuna yol açarak kolesterolü doğrudan etkileyebilir. Üretilen karbon merkezli radikal ayrıca moleküler oksijen ile reaksiyona girer ve bir kolesterol peroksi radikali oluşturur. Bu tür, okside edilmemiş lipitleri daha da artırır, stabil kolesterol hidroperoksitler üretmek için bir zincir reaksiyonu başlatır (Brown ve diğ., 1997). Geçiş metallerinin iz seviyelerinin mevcudiyetinde, hidroperoksitler enzimatik olmayan bir bozulma ve 7α -hidroksikolesterol (7αOHC), 7β -hidroksikolesterol (7β OHC) ve 7-KC gibi daha kararlı hidroksi ürünleri yapmak için daha fazla reaksiyona girer (Brown ve Jessup, 1999). Şekil 2.9 7-KC’den türevlenen oksisterolleri göstermektedir.

Bu oksisteroller önemli sitotoksik ve pro-apoptotik özelliklere sahiptir. Epimerik 5,6 (α / β) - epoksikolesterol, bir hidroperoksitin çift bağ ile enzimatik olmayan etkileşimini içeren radikal olmayan bir reaksiyon ile üretilebilir. Bu süreç düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) ve makrofajlarda görülür (Zhang ve diğ., 1990).



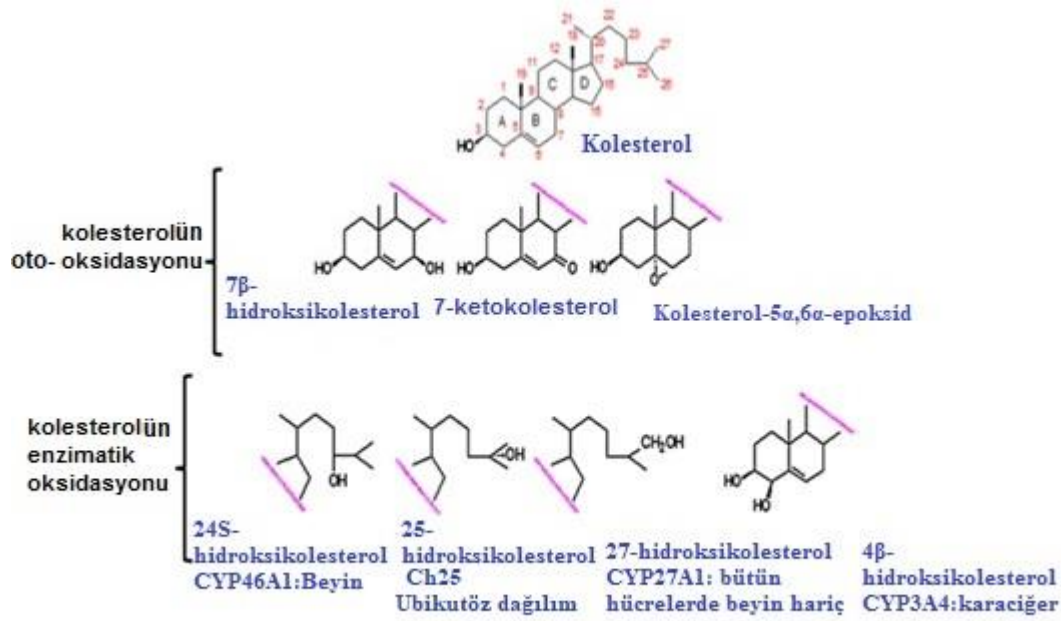


Şekil 2.8: Enzimatik olmayan yollarla üretilen bazı oksisterollerin yapıları ve oluşumu (Brown ve Jessup, 2009).



Şekil 2.9: 7-Ketokolesterolde türetilen oksisteroller (Brown ve Jessup, 2009).

Kolesterolün otooksidasyon ve enzimatik oksidasyon ürünleri Şekil 2.10'da özetlenmiştir.



**Şekil 2.10:** Kolesterolün otooksidasyon ve enzimatik oksidasyon ürünleri (Zarrouk ve diğ., 2014a).

Oksisteroller, ısıtma işlemlerinin neden olduğu lipit oksidasyon reaksiyonları, oksijen ile temas ve güneş ışığına maruz kalma nedeniyle çeşitli gıda maddelerinde de mevcuttur (Otaegui-Arrazola ve diğ., 2010). Oksisteroller özellikle süt ürünleri, yumurtalar, kurutulmuş yumurta tozu, arıtılmış tereyağı, et ürünleri ve kurutulmuş balıklar gibi kolesterol açısından zengin gıdalarda bulunur (Guardiola ve diğ., 2002; Otaegui-Arrazola ve diğ., 2010). Bunlar bağırsakta emilir ve şilomikronlar içinde dolaşıma aktarılır. Bu bileşikler, bağırsaklarda kolesterol ile karşılaştırıldığında daha hızlı emilir ve dokular tarafından hızla toplanırlar (Krut ve diğ., 1997).

### 2.3.2. Hücresel Kan Düzeyleri ve Oksisterollerin Metabolizma Eliminasyonu

Oksisteroller, lipoproteinler içinde ve sağlıklı dokulardaki hücre zarında, çok yüksek miktarda kolesterol bulunmasına (genellikle  $10^3$ - $10^6$  kat) yol açabilir (Schroepfer, 2000; Brown ve Jessup, 2009).

Düşük yoğunluklu lipoproteinlerde (LDL'ler), yüksek yoğunluklu lipoproteinlerde (HDL'ler) ve çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerde (VLDL'ler) yüksek seviyede oksisterol bulunabilir (Babiker ve Diczfalusy, 1998). Oksisteroller kolesterol gibi hidrofobiktir ve hücre zarları içinde yer alırlar (Brown ve Jessup, 2009). Yapıları kolesterole çok benzeyen oksisterollerin membran yapısı üzerinde önemli etkileri vardır (Wang ve diğ., 2004). *In vivo* oksisteroller, kolesterole

benzer şekilde, esas olarak yağ asitleriyle esterleşmiş olarak bulunurlar. Lesitin-kolesterol açıl transferaz (LCAT) ve Açıl CoA-kolesterol açıl transferaz (ACAT) hücrelerde ve dolaşımdaki aşırı yüklü kolesterolün yanı sıra oksisterollerin esterleştirilmesinden de sorumludur (Szedlacsek ve diğ., 1995; Zhang ve diğ., 2003). Oksisteroller memeli dokularında çok düşük konsantrasyonlarda bulunurlar (Olkkonen ve diğ., 2012). Kolesterolde daha kısa bir biyolojik yarı ömre sahiptirler ve aynı zamanda kolesterol molekülünü katabolizmaya yönlendirmek için bir yol olarak düşünülürler (Olkkonen ve diğ., 2012). Oksisteroller, kolesterole göre yüksek olan polariteleri nedeniyle hücrelerden daha kolay çıkabilirler. Kolesterol metabolizmasının ilk adımı, bir oksisterol oksidasyonudur (Schroepfer, 2000). Kolesterol öncülleri de oksisterole dönüştürülebilir (Javitt, 2008). Kolesterolü metabolize eden enzimatik yolların çoğu, aynı zamanda, oksisteroller için de geçerlidir (Gill ve diğ., 2008). Hem ACAT hem de LCAT enzimleri, sırasıyla hücrelerde ve plazmada oksidatörleri verimli bir şekilde esterleştirmektedir (Brown ve Jessup, 2009a). Sterol 27-hidroksilaz (CYP27A1), kolesterol ve birkaç halka-oksijenli sterol üzerinde etkili olabilir (Brown ve diğ., 2000).

Oksisterol eliminasyonu kolesterol gibidir. Oksisterol sentezi ayrıca steroid hormon ve safra asidi sentezinin önemli bir parçasıdır ve patojenlere karşı immün yanıtta önemlidir (Griffiths ve diğ., 2016). Steroid hormon biyosentezinde ilk adım, kolesterolün 22R-hidroksikolesterol (22R-HC) ve 20R, 22R-dihidroksikolesterol (20R, 22R-diHC) ve en sonunda CYP11A1 enzimine göre pregnenolona oksidasyonudur (Ruan ve diğ., 1999).

### **2.3.3. Oksisterollerin Fizyolojik Aktiviteleri ve Biyolojik Roller**

Oksisteroller, inflamatuvar ve immün tepkilere katılan sinyalleme moleküllerine ek olarak, nükleer reseptörlere ve G proteinine bağlı reseptörlere ilgisi olan ligandlar olarak kolesterol biyosentezinin biyolojik olarak dinamik düzenleyicileridir (Olkkonen ve diğ., 2012). Lipid-protein etkileşimleri, özellikle kolesterol metabolizmasındaki anahtar proteinlerin düzenlenmesinde oksisterollerin hücrel aktiviteleri için çok önemlidir (Leonarduzzi ve diğ., 2002). Vücutta steroid hormonların fizyolojik rolleri iyi bilinmektedir. Oksisteroller, reseptör-ligand bağlanması, sinyal transdüksiyonu ve morfogenezin aktivasyonu yoluyla hücrel membran etkileşimleri üzerinden steroidal yapıları düzenleyici etkilere sahiptir.

Bu etkileşimler, apoptoz indüksiyonunun yanı sıra sitotoksisteye de neden olabilir (Bjorkhem ve Diczfalusy, 2002; Kuver, 2012). Genel olarak, oksisterol eylemleri, LXR membran

dinamiklerini, protein etkileşimlerini ve nükleer reseptör bağlanmasını içeren üç farklı kategoriye ayrılabilir (De Boussac ve diğ., 2013). Oksisteroller ayrıca bağışıklık sisteminin işleyişini de düzenler (Griffiths ve diğ., 2013a). Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, adaptif bağışıklığı oksisterollerle düzenler. Makrofaj türevli oksisteroller B hücreleri tarafından IgA üretimini baskılamaktadır. Parazit benzeri reseptörlerin aktivasyonu ile birlikte, makrofajlar normal plazmada eser miktarlarda bulunan 25-hidroksikolesterol üretirler (Poli ve diğ., 2013). Oksisteroller, kolesterol homeostazının düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik süreçle de ilişkilidirler (Javitt, 2008). Ayrıca, hücre ve vücut lipit homeostazını koruyan ve hücre kaderini belirleyen molekülleri de işaret ederler (Olkonen ve diğ., 2012). Bu bileşikler, mezenkimal hücrelerin, monositlerin, keratinositlerin, lens epitel hücrelerinin ve osteoblastların farklılaşmasını uyarır (Richardson ve diğ., 2007; Aghaloo ve diğ., 2007). Günümüzde bazı oksisterollerin pro-oksidatif ve pro-inflamatuar aktivitelerin indüksiyonu gibi biyolojik aktiviteleri ile hücre ölümüne kadar varan zararlar verdiği iyi bilinmektedir (Meynier ve diğ., 2005). Bu nedenle nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere önemli hastalıkların başlaması ve gelişmesine yol açabilirler. 7-KC ve 7 $\beta$ -hidroksikolesterol gibi bazı oksisteroller, okside düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (oxLDL'ler) ana bileşenleridir (Malvitte ve diğ., 2008). Oksisteroller biyolojik membranlara entegre edilmiştir ve farklı oksisteroller membran lipid ambalajı üzerinde belirgin etkilere sahiptir (Ikonen ve Vainio, 2005; Patra, 2008). Membrandaki biyokimyasal özelliklerin oksisterollerle modifikasyonu, bu bileşiklerin neden olduğu sitotoksitede önemli bir rol oynar (Olkonen ve Hynynen, 2009). Bazı spesifik oksisteroller safra asidi sentezinde, dokular arasında sterol taşınmasında ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde araçlardır (Brown ve Jessup, 2009). Bazı oksisteroller osteogenezde önemli yararlı etkinliklere sahiptirler ve osteoporozu önleyebilen kritik sinyal yollarının güçlü modülatörleridir (Kha ve diğ., 2004). Bazı çalışmalar, oksisterollerin güçlü bir apoptoz indükleyicisi olduğunu bildirmektedir (Panini ve Sinensky, 2001). Oksisteroller çeşitli hücre tiplerinde nekroz veya onkozu (çok sayıda tümör oluşumunu) da indükleyebilirler (Li ve diğ., 2001; Malvitte ve diğ., 2008).

#### **2.3.4. Kolesterol Homeostazında Oksisterollerin Rolü**

Oksisteroller, sensörler ve regülatörler olarak görev yaparak kolesterol seviyelerini kontrol altında tutmaya önemli ölçüde katkıda bulunurlar. 3-Hidroksi-3-metil glutaril-CoA redüktaz (HMG-CoA redüktaz) kolesterol biyosentezinde temel bir enzimdir (Lange ve diğ., 2008). 24

(S), 25-epoksi kolesterol ve 27 OHC de dahil olmak üzere OHHG-CoA redüktaz degradasyonunu hızlandıran bazı oksisteroller yüksek kolesterol seviyelerinin bir geri bildirim olarak kabul edilirler (Sever ve diğ., 2003). SREBP (sterol yanıt elemanı bağlayıcı protein), endoplazmik retikulumda (ER) inaktif bir prekürsör olarak sentezlenir ve ER membranlarında kolesterol seviyelerinin bir sensörü olarak işlev gören SREBP bölünme aktifleştirici proteinlere (SCAPs) bağlanır. Bu yol kolesterol biyosentezi ve alımı için hücresel mekanizmayı kontrol eder (Goldstein ve diğ., 2006). Kritik bir eşik altında düşük hücresel kolesterol seviyeleri SCAP tarafından algılanır, bu da konformasyonda bir değişikliğe neden olur ve SREBP'nin ER'den Golgi'ye refrakter aktivasyonunu ve kolesterol biyosentezinin nihai aktivasyonunu sağlar.

Karaciğer X reseptörleri (LXR'ler) yüksek kolesterol dalgalanmaları yaşayan dokularda serbest kolesterolü sınırlamak için bir güvenlik regülatörü olarak görev yapan nükleer transkripsiyon faktörleridir (Cummins ve Mangelsdorf, 2006). Karaciğer X reseptörleri (LXR'ler), makrofajlarda lipit metabolizması ve immün fonksiyonlarını birbirine bağlamaya yarayan, inflamatuvar gen ekspresyonunun lipide bağımlı düzenleyicileri olarak tanımlanırlar (Joseph ve diğ., 2003). Oksisteroller, beyindeki kolesterol homeostazında kritik bir rol oynar, bu da tüm vücut kolesterolünün % 25'ini, esasen esterlenmemiş formda içerir. Kolesterolün kendisi kan beyin bariyerini geçemez ve beyinden gelen akıntısı, 24 OHC'ye dönüşerek oluşur (Bjorkhem ve Eggertsen, 2001).

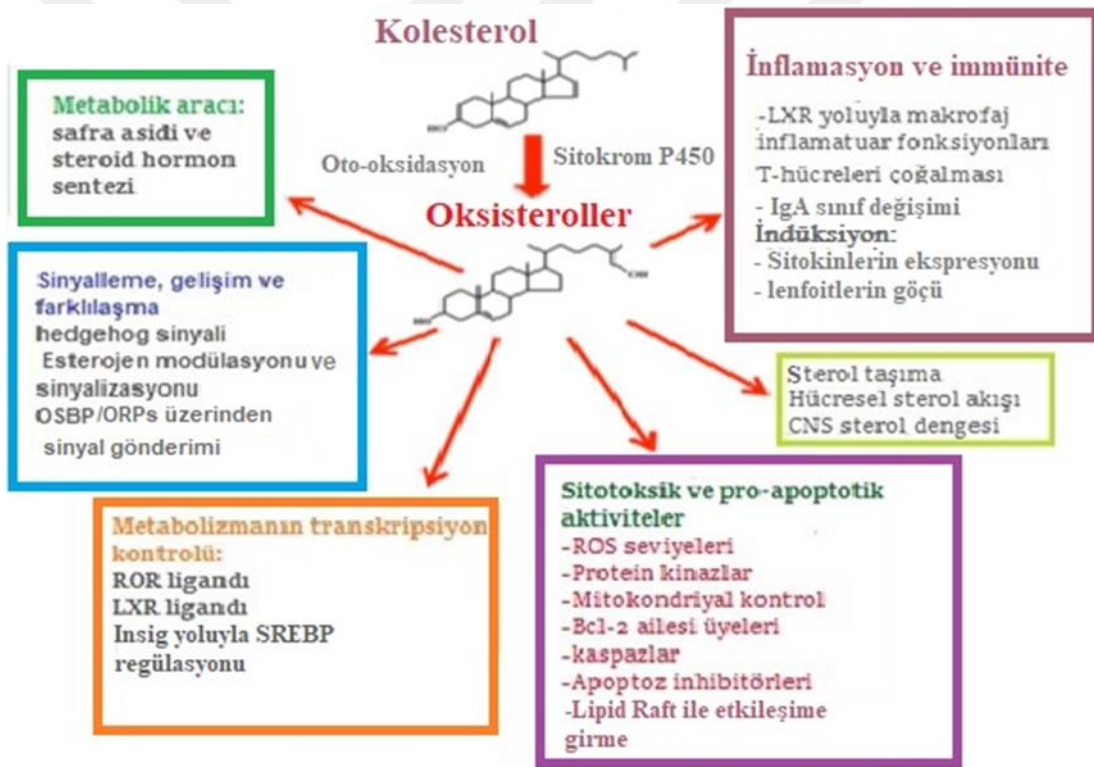
### 2.3.5. İnflamasyon ve Bağışıklıkta Oksisterollerin Rolü

Embriyonik gelişiminde kritik rol oynayan Hedgehog (Hh) sinyal yolunda oksisterollerin gerekli olduğu ortaya çıkmıştır (Lum ve Beachy, 2004). Kemik iliği stromal hücrelerinin adipositlere farklılaşması üzerine osteoindüktif etkiler ve inhibitör etkiler, 20 (S) - hidroksikolesterol ve 22 OHC gibi yan zincir oksijenli oksisteroller tarafından Hh sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla gösterilmektedir (Kim ve diğ., 2007; Dwyer ve diğ., 2007). 7-KC, 25-OHC ve 7 $\beta$ -OHC gibi bazı oksisterollerin proinflamatuvar sinyaller aktive ettiği, makrofajlar ve diğer hücre tipleri tarafından interlökin-8 (IL-8) ve monosit kemo-atraktan protein-1 (MCP-1) gibi inflamatuvar mediatör ekspresyonunu arttırdığı bildirilmektedir (Prunet ve diğ., 2006).

### 2.3.6. Sitotoksik ve Pro-apoptotik Aktivitelere Oksisterollerin Rolü

25 OHC, 5 $\beta$ , 6 $\beta$  EC, 7-KC ve 7 $\beta$  OHC gibi oksisteroller, kabul edilen iki yolla apoptozu indükleyebilir; mitokondriyal (intrinsik) ve ölüm reseptörü (ekstrinsik) yollar. Apoptoz ve sitotoksik etkilerde rol oynayan mitojenle aktive edilmiş protein kinazların (MAPK'lar) 7- KC ve 5 $\beta$ , 6 $\beta$  EC ile modüle edildiği bildirilmiştir (Anticoli ve diğ., 2010). Oksisteroller ayrıca, lipid raflarına müdahale ederek (sitoksisite ve apoptoz uygulayarak), pro-apoptotik Bak / Bax proteinleri ile Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik proteinleri arasındaki dengeyi ve ROS'un inhibisyonunu düzenlerler (Palozza ve diğ., 2007; Kim ve Lee, 2010).

Oksisterollerin fizyolojik ve patolojik etkileri Şekil 2.11'de toplu halde özetlenmiştir.



Şekil 2.11: Oksisterollerin fizyolojik ve patolojik etkilerinin özet gösterimi (Palozza ve diğ., 2007; Kim ve Lee, 2010).

### 2.3.7. Oksisterol Analizi için Yöntemler

Oksisterol analizi çeşitli analitik teknikler geliştirilmiştir; bununla birlikte, hücrelerel ve hücre içi oksisterol düzeylerinin belirlenebilmesine olanak sağlayan az sayıda güvenilir yöntem vardır. Bu, esas olarak, fazla kolesterolün varlığında, biyolojik örneklerde aşırı düşük

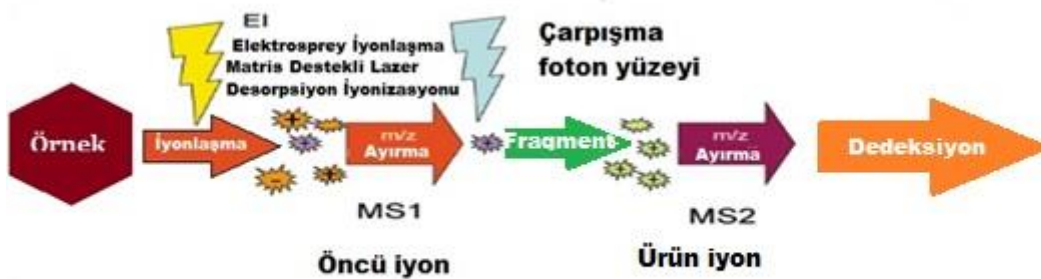
konsantrasyonlarda oksisterol ölçümlerinin yapılması ile ilgili komplikasyona bağlıdır (van Reyk ve Jessup, 1999). Ayrıca, enzimatik olmayan şekilde üretilen oksisterollerin varlığı (depolama, numune hazırlama ve analiz süresince küçük miktarlardaki kolesterol oto-oksidasyonları nedeniyle), ölçülen oksisterollerin düzeyinde belirgin değişiklikler yapabilir (Kulig ve diğ., 2016). Oksisterol analizinde göz ardı edilen bir özellik de, oksistrollerin çoğunlukla *in vivo* esterler şeklinde bulunmasıdır. Yukarıdaki nedenlerle, *in vivo* oksisterol düzeylerinin güvenilirliği azdır (van Reyk ve Jessup, 1999). Oksisterol seviyeleri, ince tabaka kromatografisi (TLC) gibi geleneksel teknikler ve yüksek arka plandaki kolesterolün varlığından ötürü yetersiz olan UV dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak analiz edilmiştir. TLC, sentetik reaksiyon karışımlarının ayrılması için kullanılabilir kolay bir tekniktir (Schroepfer, 2000). Karmaşık oksisterol karışımları HPLC kullanılarak ayrıştırılmıştır, ancak düşük analit seviyeleri ve çoğu oksisterolde güçlü bir kromofor eksikliği, UV tespitinin biyolojik düzeylerdeki oksisterollerin ölçmek için yeterince duyarlı olmadığını göstermektedir. Daha iyi bir UV absorbansına sahip madde elde etmek için, oksisterollerin enzimatik değişimini içeren kompleks sıvı kromatografi yöntemleri geliştirilmiştir (Zhang ve diğ., 2001). Son yıllarda, kütle spektrometrisi yöntemleri, oksisteroller ve yüksek kolesterol arka plan arasındaki izomerik varyasyon problemlerini çözme yeteneklerinden dolayı tercih edilir hale gelmiştir (Griffiths ve Wang, 2011). Gaz kromatografisi kütle spektrometrisi (GC-MS), oksisterol tahmini için en erken ve yaygın olarak kullanılan yöntemdir. GC-MS yöntemleri, serbest esterleştirilmiş oksisterollerin serbest kalması için sabunlaştırma, katı faz ekstraksiyonu (SPE) dahil olmak üzere analizden önce çoklu fonksiyonel grupların türevlendirilmesi de dahil olmak üzere karmaşık numune hazırlama ve ekstraksiyon aşamalarını içerir (Dzeletovic ve diğ., 1995). GC-MS dışındaki tekniklerin en önemli yararı, analitin uçucu bir formda türetilme zorunluluğunun olmamasıdır (Castrillo ve diğ., 2003).

LC-MS/MS analizinin temel örnek hazırlama süreci, hedefin serbest mi yoksa toplam oksisterol mü olduğuna bağlıdır. İnsan plazmasındaki oksisterollerin % 70'inden fazlası yağ asitleriyle esterleşmiştir, bu nedenle yöntemlerin çoğu toplam seviyelere odaklanmıştır. Kolesterol kandaki plazmada çoğu oksisterolden 1000 kat daha yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu için, % 0.1 oksidasyon bile oksisterol seviyelerinde büyük artışlara neden olabilir (Griffiths ve diğ., 2013a). Oksistrollerin LC ile ayırımını takiben elektrosprey iyonizasyon (ESI) veya atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) yöntemiyle elde edilen fragment

iyonlarının kütle spektrumları analiz edilebilir (Burkard ve diğ., 2004; DeBarber ve diğ., 2008; Honda ve diğ., 2009). ESI yöntemi, uygulanacak olan ilk LC-MS arayüzü olmuştur, ancak esas olarak daha iyi iyonizasyon gösteren APCI arayüzü ile değiştirilmiştir (Griffiths ve diğ., 2013b). LC-MS / MS analizinin karmaşıklığı ve zorluğu, bazı grup oksisterollerin, benzer kütle spektrumları verme eğilimine sahip olan özdeş moleküler iyonlara sahip izobarik bileşikler olmasıdır. Bu bilinmeyenlerin tanınmasını zorlaştırır ve kütle tespitinden önce oksisterol izobarlarının kromatografik çözünürlüğünü gerektirir (Griffiths ve diğ., 2013b).

### 2.3.7.1 Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS)

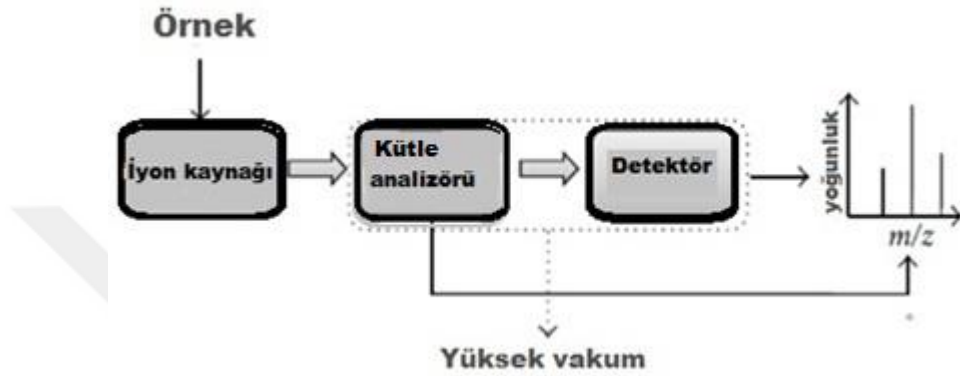
Sıvı kromatografisi (LC)-ardışık kütle spektrometrisi (MS/MS), bir numunede farklı bileşiklerin ayrılması, tanınması ve nicelendirilmesi için kullanılan hassas bir analitik tekniktir. Bu teknik, güçlü bir ayırma yönteminin (yüksek performanslı sıvı kromatografisinin, HPLC), ardışık kütle spektrometresiyle (MS/MS) arayüzlenmesini içerir. LC-MS/MS'in yüksek özgüllük ve duyarlılığı ve karmaşık karışımları ele alma yeteneği, bu yöntemi laboratuarlarda protein, peptid ve oligonükleotid analizi, ilaç keşfi ve klinik ilaç testi gibi farklı çalışmalar için kullanılabilir son derece kesin bir yöntem haline getirir. LC sistemi ile ayırmayı takiben, kütle spektrometreleri ilk olarak, bir iyon kaynağı tarafından analit moleküllerini iyonlaşmış bir duruma dönüştürerek çalışır. İyonlaşma, numune çözücüsünü nebulize eden, damlacıkları şarj eden ve daha sonra iyonize edilmiş analitler üreten yüklü parçacıkları desolve eden sistem arayüzü içinde gerçekleştirilir. İyonlar ayrıca kütle analizöründeki kütle/yük ( $m/z$ ) oranına göre ayrılır ve analiz edilir, daha sonra da dedektör tarafından nicelleştirilir (Şekil 2.12). Son veri  $m/z$  oranının bir fonksiyonu olarak üretilen iyonların bolluğunun bir çizimi olan kütle spektrumu biçimindedir (Şekil 2.13) ( Woldegebriel ve diğ., 2015)



Şekil 2.12: MS / MS çalışmasının şematik gösterimi (Murray, 2006).



İyon kaynağı, analit molekülünü moleküler iyonlara iyonize etmeye ve bunları hareketli fazdan ayırmaya yarar. Atmosferik Basınç İyonizasyonu (API) ve Elektrosprey İyonizasyon (ESI), en yaygın kullanılan iyonizasyon teknikleridir. Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyon (APCI) ve Atmosferik Basınç Fotoiyonizasyonu (APPI) da mevcuttur. Diğer iyonizasyon yöntemleri Matrix Destekli Lazer Desorpsiyonu (MALDI) ve Hızlı Atom Bombardmanı (FAB)'dir. Bu tezde kullanılan iyonizasyon tekniği ESI'dir.



**Şekil 2.13:** Kütle spektrometresinin temel bileşenleri ve nihai kütle spektrumu (Banerjee ve Mazumdar, 2012).

### 2.3.7.2. Elektrosprey İyonizasyon Mekanizması

Bir analit, çözeltilen ESI vasıtasıyla gaz fazına transfer edildiğinde, analit çözeltisi üç ana işleme tabi tutulur. Bunlar (a) analit çözeltisinin enjekte edildiği yüksek voltajlı kılcal uçtan yüklü damlacıkların üretilmesi; (b) tekrarlanan çözücü buharlaştırma (yüklü damlacıktan) ve damlacık parçalanması (yüklü analiti üretebilen çok küçük bir damla oluşmasıyla sonuçlanır); (c) son olarak gaz fazı iyonunun oluşturulduğu bir mekanizma (Banerjee ve Mazumdar, 2012) (Şekil 2.14).

#### A) Yüklü Damlacıkların Üretimi

Analit çözeltisi, yüksek voltajlı kılcal (emitör) içinden pompalanır, polaritesine bağlı olarak metal kılcaldan veya ona gelen bir elektron akışına neden olan çözücü ile elektrokimyasal bir reaksiyona girer (Cech ve Enke, 2001). Herhangi bir redoks aktif analitin yokluğunda, çözücünün oksidasyonu pozitif iyon modunda gerçekleşirken, çözücünün indirgenmesi negatif iyon modunda gerçekleşir (Diehl ve Karst, 2002). Bu redoks reaksiyonları, yayıcı elektrodun polaritesine bağlı olarak çözeltilerde pozitif veya negatif iyonlar sağlar. ESI-MS deneylerinde,

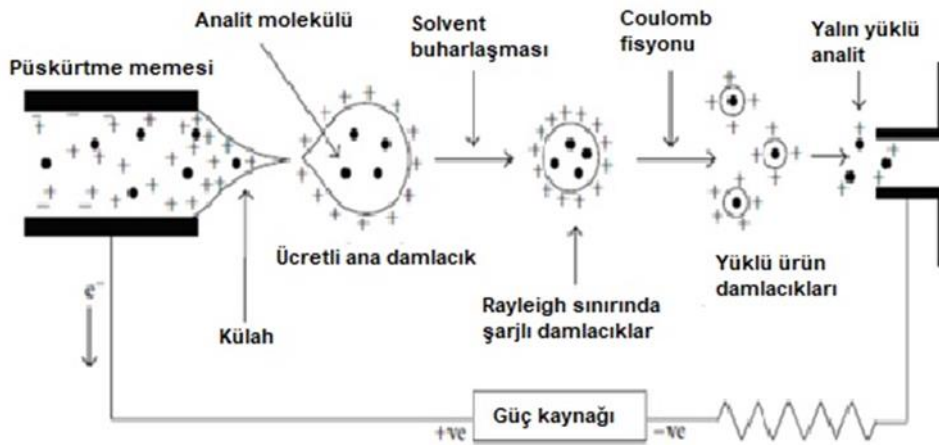
“spraying nozzle” daki elektrokimyasal reaksiyonlar için genellikle su, metanol, asetonitril gibi polar çözücüler kullanılır (Del Rio ve diğ., 2005).

### B) Yüklü Damlacıkların Dağılımı

Damlacıklardaki yükler potansiyel enerjiyi en aza indirmek için yüzeylerinde merkezi boşluklar ile yayılır (Fenn, 1993). Yüklenen damlacıklarda zıt yönlerde hareket eden iki kuvvet vardır. Bunlardan biri, damlanın küresel şeklini korumaya çalışan yüklü damlacık yüzey gerilimidir ve diğeri, yüzeydeki benzer yükler arasında itme kuvveti etkisidir ve bu, yüklü damlacığın dairesel şeklini parçalamaya çalışır (Nguyen ve Fenn, 2007). Solvent buharlaşması, damlacıklar püskürtme memesi ve ısıtılmış kapiler arasındaki boşluğu geçtiğinde gerçekleşir. Buna göre kütle ve damlacık büyüklüğü hedefe ulaşana kadar azalır (Nguyen ve Fenn, 2007).

### C) Yüklü Damlacıklardan Gaz Fazı Analit İyonlarının Oluşumu

Yük kalıntısı modelini ve iyon buharlaşma modelini içeren iki standart mekanizma, çok küçük oranda yüklü E damlacıklarından gaz fazı analit iyonlarının yapısını hesaba katmak üzere planlanmıştır ve bunlar yük kalıntısı modelidir (Nguyen ve Fenn, 2007).



Şekil 2.14: Elektrosprey iyonizasyon sürecinin şematik gösterimi (Banerjee ve Mazumdar, 2012).

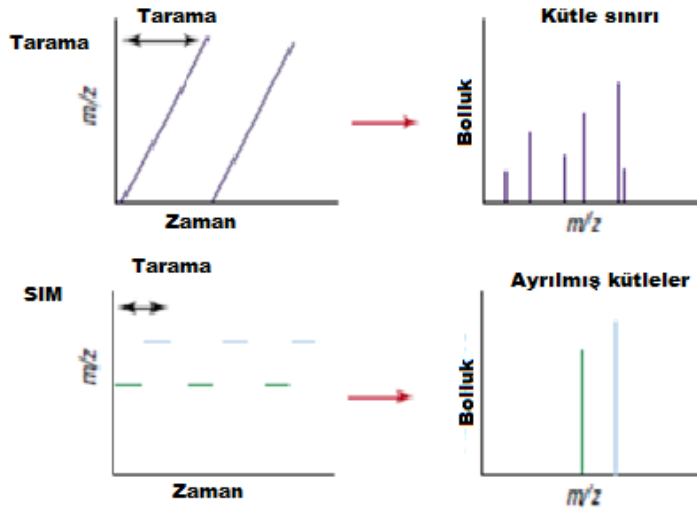
### 2.3.7.3 Kütle Spektrometrisi

Son yıllarda kütle spektrometrisinde hızla ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu yöntem için kullanılan yüksek teknoloji ürünü cihazın (kütle spektrometresinin) özellikleri, tespit limitleri, eşitsizliği, hız ve uygulama çeşitliliği nedeniyle yöntemi, analitik yöntemler arasında olağanüstü bir konuma getirmiştir. Kütle spektrometrisi, moleküler iyonların ve fragmentlerin göreceli kütlelerini bulmak için, manyetik bir alan tarafından yönlendirilen yüklü parçacıkların sapma derecesini kullanan analitik bir tekniktir. Kütle spektrometrisi, elektrik veya manyetik alanda iyon olarak adlandırılan yüklü bir parçacığın hareketine dayanır. İyonun kütle/yük, diğer bir deyişle kütle şarj oranı ( $m/z$ ) bu hareketi etkiler (Glish ve Vachet, 2003). Bileşiklerin kütle spektrometrik analizindeki ilk adım, elektron iyonizasyonu ile bileşiğin gaz fazı iyonlarının üretilmesidir. Molekül iyonu normal olarak parçalanmaya uğrar ve molekülün kütle spektrumu üretilir. Bu sonucu, iyon bolluğuna karşı kütle-to-ücret oranının bir çizimi olarak sunar. LC / MS için kullanılacak dört tip kütle analizörü vardır. Bunlar: dört kutuplu, uçuş süresi, iyon tuzağı ve Fourier dönüşüm-iyon siklotron rezonansı (FT-ICR veya FT-MS)'dır. Her birinin belirli bir analizin gerekliliklerine bağlı olarak dezavantajları ve avantajları vardır. Bir dört kutuplu kütle analizörü, bir kare içinde düzenlenmiş dört paralel çubuktan oluşur. Analit iyonları karenin merkezine doğru yönlendirilir. Çubuklara uygulanan voltajlar elektromanyetik alanlar oluşturur. Bu alanlar, belirli bir zamanda hangi kütle ilavesinin filtreden geçebileceğini belirler. Dört kutuplular en basit ve en pahalı kütle analizörleridirler (Glish ve Vachet, 2003).

#### **Dört kutuplu kütle analizörleri iki şekilde çalışabilir:**

- Tarama modu
- Seçilen iyon izleme (SIM) modu

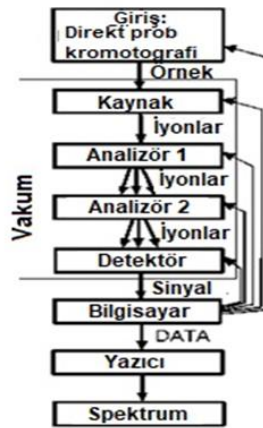
Tarama modunda, kütle analizörü bir dizi kütle/hacim oranını izler. SIM modunda, kütle analizörü sadece birkaç kütle/şarj oranını izler. SIM modu, tarama modundan önemli ölçüde daha hassastır, ancak daha az iyon hakkında bilgi sağlar (Glish ve Vachet, 2003). Tarama modu, tipik olarak kalitatif analizler için veya tüm analit kütleleri önceden bilinmediğinde kantitasyon için kullanılır. SIM modu, hedef bileşiklerin miktarının belirlenmesi ve izlenmesi için kullanılır (Şekil 2.15).



Şekil 2.15: Dört kutuplu kütle analizöründe farklı tarama modelleri (Glish ve Vachet., 2003b).

### Kütle Spektrometresinin İşletim Şeması

Bir kütle spektrometresinin işletim sistemi, Şekil 2.16'da gösterilen elemanları içerir: analiz edilen bileşiğin uygulandığı giriş (INLET), örneklemden iyonları üretmek için gerekli bir iyonizasyon kaynağı (SOURCE), çeşitli iyonları ayırmak için bir veya birkaç kütle analizörü (ANALYZER 1, 2), son analizörden çıkan iyonları 'saymaya' yarayan bir dedektör (DETECTOR) ve son olarak kütle spektrumunu uygun bir biçimde üreten veri işleme sistemleri (COMPUTER-PRINTER).



Şekil 2.16: Bir kütle spektrometresinin işletim sistemi ve geri besleme kontrolü (de Hoffmann ve Stroobant, 2007).

**Bazı temel terimler ve kısaltmalar:**

**Analit:** Bir biyolojik matriste bozulmamış ilaç, biyomolekül veya bunun türevi, metaboliti ve/veya bozunma ürününü içeren spesifik bir kimyasal bileşik.

**Analitik çalışma:** Doğrulama için uygun sayıda standart ve QC ile yürütülen bir dizi çalışma.

**Biyolojik matris:** Kan, serum, plazma, idrar, dışkı, tükürük, balgam ve çeşitli dokuları içeren biyolojik kökenli bir materyal.

**Kalite kontrol (QC) örneği:** Biyoanalitik bir yöntemin performansını izlemek ve bireysel bir grupta analiz edilen bilinmeyen örneklerin sonuçlarının doğruluğunu ve geçerliliğini değerlendirmek için kullanılan çivili bir örnek.

**İç standart (IS):** Örnek hazırlama ve analiz sırasında deneysel değişkenlik düzeltimini kolaylaştırmak için bilinen ve sabit konsantrasyonda kalibrasyon standartlarına, QC'lere ve bilinmeyen numunelere eklenen yapısal olarak benzer analog veya kararlı izotop etiketli bileşiklerin test bileşikleri.

**Kalibrasyon / Standart Eğri (Lineerlik):** Enstrüman cevabı ile bilinen analit konsantrasyonları arasındaki ilişki kalibrasyon eğrisi olarak adlandırılır. Çok analitli bir çalışma için, her analit için bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmalıdır. Kalibrasyon standartları, çalışılan örneklerle aynı matriste hazırlanmalıdır. Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için kullanılan standartların sayısı, analitik değerlerin muhtemel aralığına ve analit / cevap ilişkisinin doğasına bağlıdır. Bir kalibrasyon eğrisi, dahili standart olmadan işlenen bir boş matris örneğinden, dahili standart ile işlenen bir boş matris numunesinden ve beklenen aralık veya analit konsantrasyonunu kapsayan beş ila sekiz sıfır-olmayan standart noktadan oluşmalıdır.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. KİMYASALLAR

1. 3 $\beta$ -Hidroksi-5-kolestan-7-on-d7 (7 ketokolesterol-D7), (Avanti, Catalog No T700046P)
2. 3 $\beta$ -Hidroksi-5-kolestan-7-on (7 ketokolesterol), (Avanti, Catalog No 700015P)
3. 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ - Trihidroksikolestan, (Toronto, Catalog No T795100)
4. 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ - Trihidroksikolestan, D7, (Toronto, Catalog No T795102)
5. N-(3- Dimetil amino propil)-N'- etil karbodiimid hidroklorür (EDC) (Sigma, E1769)
6. N,N- Dimetilglisin hidroklorür (DMG) (Sigma, D6382)
7. 4-(Dimetilamino) piridin, Reagent Plus, (DMAP) (Sigma,107700)
8. Kloroform, Chromasolv® (R) plus, for HPLC, >=99.9%, 0.5-1.0% Etanol (Merck)
9. Heksan Chromasolv® for HPLC, >97.0% (Merck)
10. Formik asit LC-MC Ultra, eluent katkı maddesi UHPLC-MS (Sigma, Catalog No 56302 Fluka )
11. Asetonitril, LC-MS Ultra Chromasolv® (Sigma, Catalog No, 34967)
12. 1,1,3,3-Tetra etoksi propan (TEP) ALDRICH
13. Tiyobarbitürik asit (TBA) SIGMA-ALDRICH
14. Trikloroasetik asit (TCA) SIGMA
15. Hidroklorik asit (HCl) MERCK
16. Bütil hidroksi toluen (BHT) SAFC

#### 3.2. EKİPMAN VE ENSTRÜMANLAR

1. LC-MS/MS (Shimadzu model 8040)
2. Ependorf santrifüj (Abott)
3. Santrifüj (Sigma)
4. Su banyosu (Nuve B5)
5. HPLC glass inserts (Sigma)
6. Santrifüj (Sigma ve Labofuge 200 Heraeus)
7. Çok Kuyucuklu Buharlaştırma Sistemi (Univapo 150H)
8. Vakum furnace (Kendro B6420)

9. Cam test tüpleri (10 mL) (Fisher Scientific)
10. Orbital çalkalayıcı (Heidolph tetramax 101)
11. LC-MS/MS kolon, Symmetry C18 (3-5 $\mu$ m, 21\*50 mm) (WAT 200650)
12. Hassas terazi (Shimadzu ATX 224)

### 3.3. ÇALIŞMA GRUBU

Bu çalışma alerjik astım tanısı almış 120 hasta (D, Deney grubu) ve 120 sağlıklı birey (K, Kontrol grubu) ile gerçekleştirilmiştir. İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları-Alerji Bilim Dalında astım tanısı almış, kandaki IgE düzeyleri belirlenmiş ve onayı alınmış hastalardan ve gönüllü sağlıklılardan kan örnekleri alınmıştır. Kan örnekleri hastaların bilgilendirilmiş imzalı onam formları eşliğinde İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvarına MDA analizi yapmak üzere ve sonra da Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında LC-MS/MS çalışmalarını yapmak üzere soğuk zinciriyle iletilip analiz edilmiştir. Çalışma protokolü Helsinki Kılavuz Bildirgesi'ne bağlı kalınarak gerçekleştirilmiştir ve İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (2017/1421).

#### 3.3.1. Kan Örneklerinin Eldesi:

- Prof. Dr. Aslı Gelincik tarafından çalışmaya dahil edilmesine karar verilen ve onayı alınmış hastalardan kan örnekleri alındı.
- Çalışma grubundaki hastalar ve kontrol grubundaki erişkin gönüllülerden 1 kez kan örneği (10 mL'lik 1 adet EDTA-K<sub>2</sub> içeren tüpe ve serum eldesi için 1 adet biyokimya tüpüne) alındı.
- Kontrol ve çalışma grubunu oluşturan bireylerin yaş ve cinsiyet sayıları ile yaş ortalamalarının benzer olmasına dikkat edildi.

### 3.4. OKSİSTEROL ANALİZİ

Oksisterol analizi, LC-MS/MS sistemi (Shimadzu Scientific Instruments, 8040) kullanılarak gerçekleştirildi. 7-ketokolesterol ve kolestan 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triolün plazma seviyeleri ölçüldü. LC sistemi, yüksek basınçlı bir karıştırma teli, bir DGU 14A çözücü gazdan arındırma ünitesi, bir SIL 20A otomatik örnekleyici, bir CTO sütun fırını ve bir seri SPDM10A fotodiyodu dizisi

(PDA detektörü) tarafından birleştirilen iki, çift başlı, LC10 ADVp yüksek basınçlı çözücü pompalarından oluşur. Kütle spektrometreleri, birbiriyle değiştirilebilir ESI içeren bir 2010A tek dört kutuplu dedektör ile seri olarak bağlandı. Sistem bir bilgisayar üzerinden kontrol edildi. MS detektörü için azot beslemesi, bir sıvı nitrojen tankından düzenlenen bir havalandırma ile sağlandı.

### 3.4.1. Kromatografik Koşulların ve Mobil Faz Gradyanının Optimizasyonu

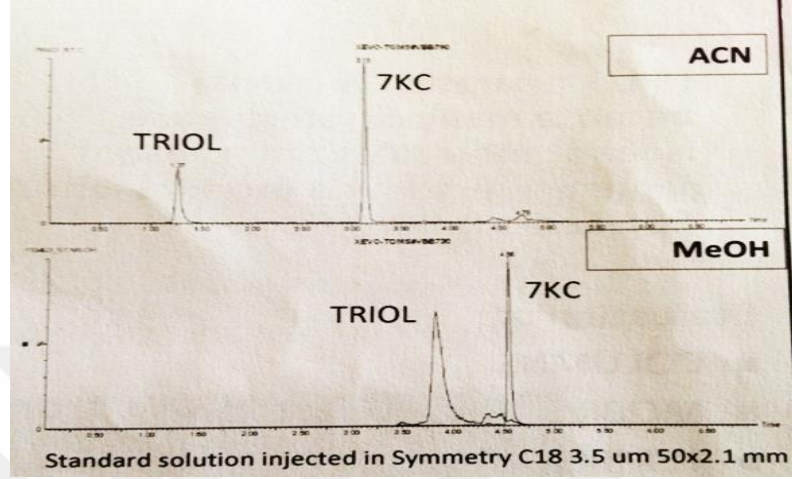
Bu aşama HPLC ayrımı çok önemlidir, çünkü oksisterollerin çoğu, aynı öncü ve ürün iyon fragmentlerini oluşturan izobarik moleküllerdir. LC yönteminin optimizasyonu için kolonların değerlendirilmesi, mobil fazlar, katkılar ve sıcaklık ayarı gereklidir. Daha iyi bir ayırma elde etmek için 7-KC ve kolestan 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol için en yüksek çözünürlüğün elde edilmesini sağlayan optimum akış oranı ve hareketli faz gradyanı araştırıldı. En iyi kromatografik çözünürlük sağlayan kombinasyona karar vermek için, akış hızının etkin değerlendirmesi, ACN yüzdesi (başlangıçta ve gradyan sırasında) ve kolon fırınının sıcaklığı bir seferde bir parametre değiştirilerek gerçekleştirildi. Bu amaçla iki çeşit sütun kullanılır; normal faz sütunu ve ters faz sütunu. Normal faz kolonu iyi bir ayırma sağlar, ancak oksisterol türlerinin (türevlendirilmemiş) düşük tekrarlanabilirliği ve pH değişikliklerine duyarlıdır. Ters faz kolonu, türetilmiş oksisteroller için uygundur. Türevlemeden sonra, bağlanan polar grup, molekülün kolondaki tutma özelliklerini değiştirerek moleküllerin hidrofilitelerini artırır. Bu analiz için seçilen kolon bir ters faz kolonu, Simetri C18 (3-5  $\mu$ m, 21 x 50 mm) (C / N 5020-01742) (Sigma Aldrich, St.Louis, MO) idi. Ters faz kolonu bu moleküllerin iyi bir şekilde ayrılmasını sağlamıştır. LC yönteminde farklı moleküllerin ayrılması için mobil (hareketli) faz olarak metanol (MeOH) ve asetonytril (ACN) yaygın olarak kullanılır. MeOH, steroidler için önerilmiştir ve ACN'ye göre daha polardır. Bununla birlikte, ACN MeOH ile karşılaştırıldığında daha iyi bir ayırma elde eder (Şekil 3.1). MeOH, kolonda yüksek geri basınç uyarır. Ek olarak, MeOH ile tutulma süresinin tahmini çok zordur. Bu çalışmada iki çözücünden (Solvent A ve Solvent B) oluşan hareketli faz kullanıldı.

Mobil faz:

- Solvent A: (1 mM amonyum format, pH 3)
- Solvent B: Asetonytril (ACN): 1 mM amonyum format (95: 5), pH 3.

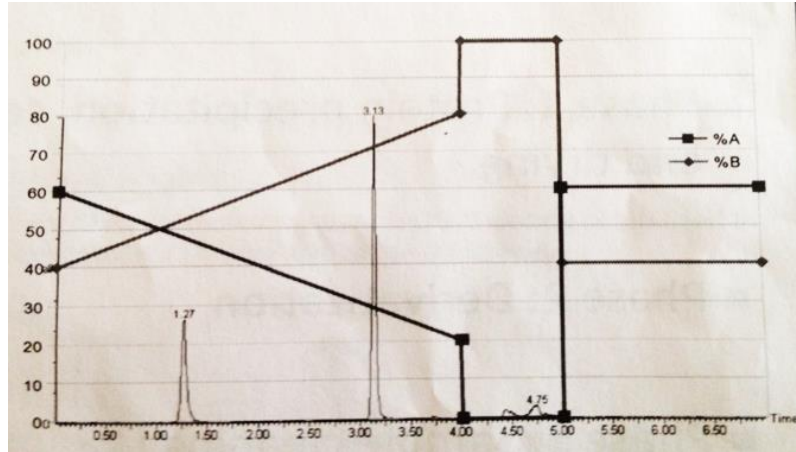


Solvent A'nın hazırlanması için, 1 L su içinde 63 mg amonyum format çözüldürüldü ve pH formik asit ile 3'e ayarlandı. Solvent B'nin hazırlanması için, 50 mL hareketli faz A, 950 mL ACN ile karıştırıldıktan sonra formik asit ile pH 3'e ayarlandı.

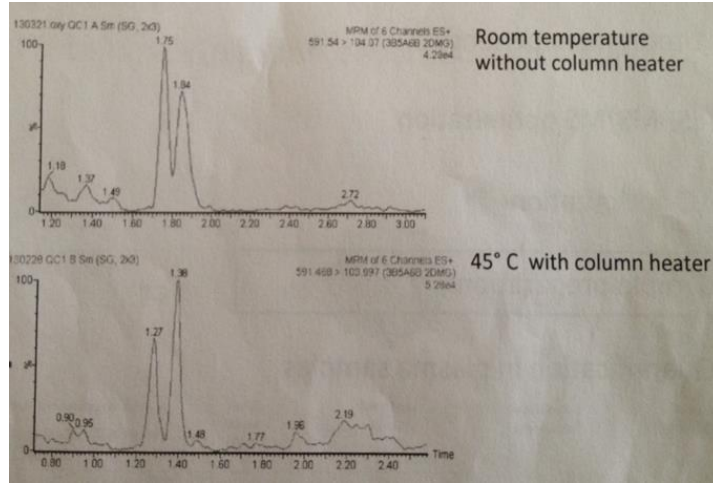


Şekil 3.1: MeOH ve ACN arasındaki ayrışma kıyaslaması.

Kromatografik ayırım, Şekil 3.2'de grafiksel olarak gösterilen bir gradyan ile gerçekleştirildi.



Şekil 3.2: Örnek analizi sırasında kullanılan hareketli fazların doğrusal gradyan gösterimi. (Kolon fırın sıcaklığı 45 ° C'de tutuldu. Bu sıcaklık oda sıcaklığının aksine daha iyi bir ayırma sağlar) (bkz. Şekil 3.3).



**Şekil 3.3:** Kolon ısıtıcısı olan ve olmayan bir plazma örneğinde ayırma.

### 3.4.2. Çözeltilerin Hazırlanması

- Standartlar ve Stok Çözeltileri:

7-KC ve kolestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol'ün ana stok çözeltileri, yüksek saflıkta (HPLC grade) metanol (MeOH) içinde 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı. 7-KC ve kolestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol stok çözeltisi, yüksek saflıkta MeOH kullanılarak 1: 200 oranında seyretilerek ara stok elde edildi. Tüm stoklar -20 °C'de saklandı.

- Çalışmada kullanılan çözeltiler kolestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6'-triol 7 ve 7-KC-d7 metanol içerisinde hazırlandı.

- Kalibrasyon Standart Çalışma Çözeltileri: Kalibrasyon standartlarının hazırlanması için ticari insan plazma defibrine ve delipidize diagnostik dereceli plazma kullanıldı.

Kalibrasyon aralığı, normal sağlıklı bir insanda yaklaşık biyolojik oksisterol seviyelerine göre belirlendi ve kalibrasyon eğrileri iki oksisterol (7-KC ve kolestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol) için üretildi. Tablo 3.1'de gösterildiği gibi standartların stok çözeltilerinden 8 kalibrasyon standardı (8-Mix kalibratör) birincil karışımı hazırlandı. Ara stok çözeltilerinin tek ilavesiyle hazırlanan bu standart kalibratörler ve standartlar hazırlandıktan sonra -80°C'de saklandı.

**Tablo 3.1:** Kalibrasyon standart çalışma çözeltilerinin hazırlanması (1 L'de)

Calibratorler	7-KC ve kolestan 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol	7-KC ve kolestan 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol 5000 ng/mL	7-KC ve kolestan 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol 500 ng/mL	7-KC and kolestan 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol 50 ng/mL
CAL 1	3.125 ng/mL	-	-	62.5 mL
CAL 2	6.25 ng/mL	-	12.5 mL	-
CAL 3	12.5 ng/mL	-	25 mL	-
CAL 4	25 ng/mL	-	50 mL	-
CAL 5	50 ng/mL	-	100 mL	-
CAL 6	100 ng/mL	20 mL	-	-
CAL 7	200 ng/mL	40 mL	-	-
CAL 8	400 ng/mL	80 mL	-	-

#### • Kalite Kontrol Örneklerinin Hazırlanması:

Kalite kontrol (QC) örnekleri, LC-ESI-MS/MS yöntemiyle ortalama endojen 7-KC ve kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol konsantrasyonunu oluşturmak için havuzlanmış plazma numuneleri ile hazırlandı. Düşük ve yüksek plazma kalite kontrol (LQC, HQC) örnekleri, endojen seviyeyi (sırasıyla, 150/150 ng/mL ve 40/40 ng/mL) elde etmek için bilinen miktarlarda 7-KC ve kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol standartlarının eklenmesiyle hazırlandı. Birincil karışım QC numunesi aynı şekilde hazırlandı, ancak standartların stok çözeltilerinden ayrı ayrı hazırlandı. QC numunelerinin hazırlanmasından sonra tüm standartlar mikrotüplerde stoklandı ve -80°C'de saklandı.

#### 3.4.3. Örneklerin Hazırlanması

Örnek hazırlama üç aşamadan oluşmaktadır. Faz 1, üç adımı (protein çöktürme, ayırma ve kurutma) içerir. Faz 2, türetme fazıdır ve Faz 3, numune temizliğidir. Çalışma örnekleri, QC'ler ve standartlar 2 mL ependorf tüplerine bölündü. LC-MS/MS deneyi, sadece, serbest veya esterleşmemiş oksisterollerini ölçmek üzere dizayn edildi. Örnek hazırlama sırasında plazma örneklerinin sabunlaşması, toplam oksisterol türlerinin ölçümü için gerekli değildir. Bu aşamanın giderilmesi, alkalın hidroliz prosedürü sırasında meydana gelen oksisterollerin bozunmasını ve toplam oksisterol konsantrasyonlarının aşırı tahmin edilmesini önler.

Literatürde hazırlık için çeşitli protokoller mevcuttur. Bu çalışmada Xuntian Jiang ve arkadaşları tarafından geliştirilen protokol kullanıldı (Jiang ve diğ., 2007).

Faz 1; kalibrasyon standartları için, QC örnekleri ve astımlı hasta plazma örnekleri, 50 µL numune 2 mL'lik bir ependorf tüpüne eklendi. 250 µL MeOH'nin eklendiği boş matriks örnekleri hariç tüm örneklere dahili standart çalışma solüsyonu (300 µL, 20 ng/mL) ilave edildi. Ependorf tüpleri 30 saniye vortekslendi ve daha sonra oda sıcaklığında 13000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra, süpernatantlar 2 mL ependorf tüplerini temizlemek üzere transfer edildi, daha sonra organik tabaka bir Çok Kuyucuklu Buharlaştırma Sisteminde (Univapo 150) 35°C'de kuruyana kadar buharlaştırıldı.

Faz 2; Bu faz türevlendirme fazı olarak adlandırılır. Kloroformda 20 µL 0.5 M DMG/2M DMAP ve kloroformda 20 µL 1M EDC, ekstrakte edilen örneklere eklendi. Bu karışımlar kapatıldıktan ve vortekslendikten sonra 1 saat boyunca bir su banyosunda 45 °C'de ısıtıldı. Su banyosundan sonra, ependorfların içindeki sıvı karışımın rengi koyu sarı olmalıdır. Bu renk, iyi bir türevlenme olduğunu gösterir. Türevlendirilmiş örneklere 250 µL H<sub>2</sub>O ve 500 µL heksan ilave edildi ve örnekler, 1000 rpm'de 5 dakika boyunca bir orbital çalkalayıcı üzerinde çalkalandı. Numuneler, oda sıcaklığında 10 dakika boyunca 13000 rpm'de santrifüj edildi. Yüzer yüzeye 500 µL heksan eklendi. Örnekler, orbital bir çalkalayıcıda 1000 rpm'de 5 dakika çalkalandı. Örnekler tekrar 10 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatantlar (heksan) buharlaştırıldı. Buharlaştırmadan sonra 300 µL %80 MeOH eklendi. Örnekler 20 saniye vortekslendi ve 0.25 mL sınırlı hacimli konik viyal insertler ile 1.5 mL HPLC otomatik örnekleyici flakonlarına aktarıldı ve LC-MS / MS üzerinde analizlere tabi tutuldu.

Faz 3; LC tarafından örnek temizleme aşamasıdır. Bu adım, MS/MS'deki sinyali artırmaz, fakat kirli kaynak koni üzerindeki kirliliği azaltır.

#### **3.4.4. MS / MS Kaynak Ayarlarının Optimizasyonu**

Kütle spektrometrisi koşulları, pozitif iyon modundaki ESI arayüzünü ve seçici iyon izlemeyi (SIM) içerecek şekilde ayarlandı. Optimize edilen parametreler Tablo 3.2'de özetlendi.

**Tablo 3.2:** Kütle spektrometrik parametreler.

Parametreler	Optimize edilmiş ayar değeri
IG vakum	1.4e -
Dedektör gerilimi	0.0 kV
Sıcaklık sınırı	85°C
DI sıcaklık	250°C
Nebulize gaz akışı	3.0 L/min
Isı bloğu	450°C

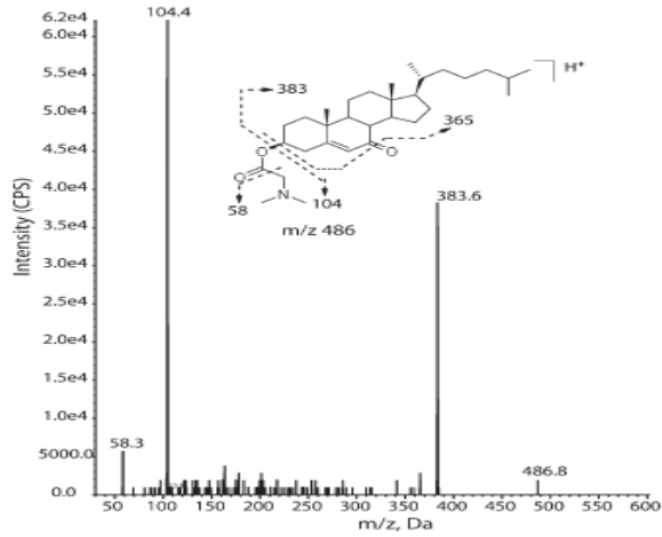
7-KC ve kolestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol'ün kütle tespiti için, oksisteroller N,N-dimetilglisin (DMG) esterlerine dönüştürüldü. DMG'nin tanıtımı, Q2 kuadropolde (çarpışma hücresi), ayırma verimliliğini ve oksisterollerin genel yanıtını büyük ölçüde arttırdı. 7-KC ve kolestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol triolün çoklu reaksiyon izleme (MRM) kütle geçişleri Tablo 3.4'te gösterildi. M+H<sup>+</sup> içindeki 7-KC ve kolestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol DMG esterlerinin m/z'si sırasıyla 486.0 ve 591.5 idi. M+H<sup>+</sup> içindeki 7-KC D7 ve kolestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol D7'nin m/z'si ise sırasıyla 493.0 ve 598.5 idi. Ürün iyonları aşağıdaki gibiydi:

- m/z 104: protonlanmış DMG
- m/z 383: DMG kaybindan kaynaklanan oksisterol parçası
- m/z 488.5: DMG kaybindan kaynaklanan oksisterol parçası

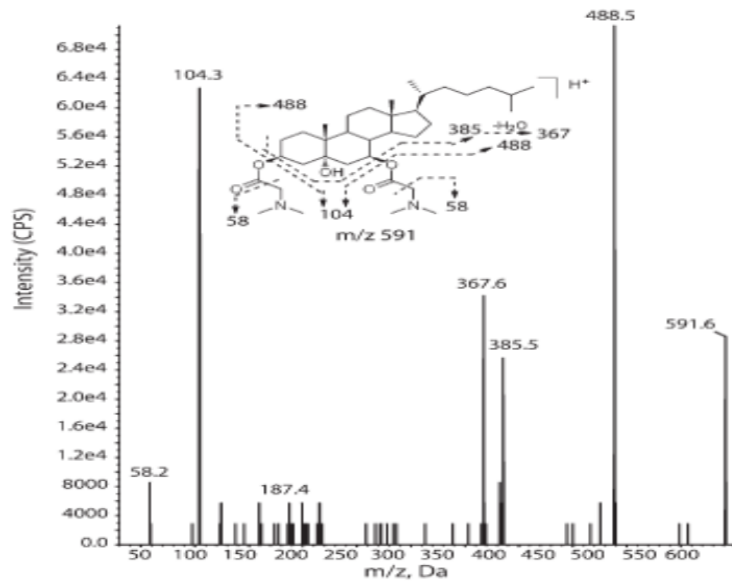
**Tablo 3.3:** 7-KC ve kolestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol'ün kütle geçişleri.

DMG türevleri	Parent ion	Ürün iyon
7-KC	486.0	104
	486.0	383
7-KC D7	493.0	104
Kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol	591.5	104
	591.5	488.5
Kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol D7	598.5	104

Oksisterol-DMG türevleri için MRM kütle geçişleri kolestetan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol ve m/z 486  $\rightarrow$  383 (niceleyici) için m/z 591.5  $\rightarrow$  104 (niteleyici) ve 591.5  $\rightarrow$  488.5 (niteleyici) ve 7-KC için 486  $\rightarrow$  104 (niteleyici) olarak gözlemlendi. Çalışılan iki oksisterolün DMG türevlerinin ürün iyon spektrumları ve parçalanma paternleri Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'te gösterildiği gibidir.



Şekil 3.4: 7-KC'nin DMG türevinin ürün iyon spektrumları ve parçalanma paterni (Jiang ve diğ., 2007).



Şekil 3.5: Kolestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triolün DMG türevinin ürün iyon spektrumları ve parçalanma paterni (Jiang ve diğ., 2007).

### 3.4.5. Kalite, Doğruluk ve Hassasiyet

Çalışma içi doğruluk ve kesinlik, her bir analit için bir dizi kalibratörle birlikte LQC ve HQC dahil olmak üzere iki düzeydeki iki tekrar numunesi analiz edilerek belirlendi. Doğruluk, nominal konsantrasyondan yüzde sapma olarak ve doğruluk, yüzde değişim katsayısı (% CV) cinsinden ifade edildi. Hassasiyet, her bir QC seviyesindeki enterpolasyon konsantrasyonu, nominal değer in % 20'sinden daha az olabileceği LLOQ hariç, nominal değer in % 15'i içinde kaldığından kabul edilebilir olarak kabul edildi. Hassasiyet kabul kriterleri, her konsantrasyon seviyesinde % CV'nin % 15'i geçmemesi olarak seçildi.

### 3.5. RUTİN BİYOKİMYA PARAMETRELERİNİN ÖLÇÜMÜ

Hastaların sabah aç karnına alınan kan örneklerinde, her biyokimyasal parametre için özel kitler ve reaktifler kullanılarak Beckman Coulter AU 680 cihazı ile ölçülen biyokimyasal parametrelerine ilişkin veriler ilgili birimin veri tabanından temin edildi.

### 3.6. PLAZMADA LİPİD PEROKSİDASYON ÜRÜNLERİNİN TAYİNİ

Plazmada LPO tayini için Buege ve Aust'un (1978) tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemi kullanıldı. Yöntem, plazmada peroksidize lipidlerin yıkımı sonucu oluşan, TBA ile reaksiyon verebilen maddelerin (TBARs) verdiği renkli ürünün spektrofotometrik tayini prensibine dayanmaktadır.

- 0.5 mL plazma örneği üzerine 2 mL taze hazırlanmış TBARs reaktifi (%15 TCA+ %0.375 TBA+ 0.25 N HCl çözeltileri eşit oranda karıştırılır) eklendi. TCA (trikloroasetik asit) dH<sub>2</sub>O'da, ağzı hemen kapatılan bir kaptta hazırlandı. TBA (tiyobarbitürik asit) dH<sub>2</sub>O'da hazırlandı. Bu madde çok zor çözüldüğü için sonikasyon ve ısıtma işlemi uygulandı. HCl (hidroklorik asit), derişik formunun uygun derişimde sulandırılmasıyla hazırlandı.
- Karışımın üzerine etanol içinde hazırlanmış 20 µL %0.02 BHT (butillenmiş hidroksitoluen) eklendi. BHT, bir antioksidan olarak test sırasında artificial lipid peroksidasyonunu önler.
- Örnekler 15-30 dakika 100°C'lik kaynar su banyosunda bekletildi, soğutuldu.
- Oluşan çökelti, 4.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldı; Pembemsi renkteki süpernatant alındı.

- Absorbanslar 532 nm’de köre (0.1 mL plazma yerine eşit hacimde distile su üzerine 1 mL TBARs reaktifi ve 20 µL BHT konularak hazırlandı) karşı okundu.
- Standard madde olarak TEP (1,1,3,3-tetraetoksi propan) kullanıldı. Kalibrasyon eğrisini çizmek için TEP’in suda 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 ve 0.312 nmol/mL’lik çözeltileri hazırlandı. Kalibrasyon eğrisi konsantrasyona karşı absorbans değerleri yerine konularak çizildi.
- Sonuçlar, nmol MDA/mL cinsinden ifade edildi.

### 3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve detrended) grafikler ve Kolmogorov Smirnov normallik testi kullanılarak incelendi. Kategorik değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri frekans değerleri ile, sürekli değişkenlerin ise ortalama ve standart sapmalar yardımıyla özetlendi. Kategorik değişkenlerin gruplar arası farklılıklarını analiz etmede Pearson ve kesin (Fisher’ Exact test)  $\chi^2$  testleri kullanıldı. İki grup için olan sayısal karşılaştırmalarda dağılım yapısına uygun olarak bağımsız gözlemlerde t testi ya da Mann-Whitney U testi kullanıldı. Astım hastalığını etkileyebilecek faktörleri belirlemek amacıyla ileriye doğru seçim ve geriye doğru eleme (olabilirlik oranı) yöntemlerine göre Lojistik regresyon analizi yapıldı. 7-KC ve kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol düzeylerini etkileyen faktörleri belirlemek için Adımsal (stepwise) değişken seçim yöntemine dayalı olarak Doğrusal Regresyon analizi gerçekleştirildi. Tüm istatistiksel analizler için IBM SPSS istatistiksel paket programı versiyon 20 (Armonk, NY: IBM Corp) kullanıldı. P<0.05 olan anlamlılık değerleri istatistiksel olarak önemli varsayıldı.

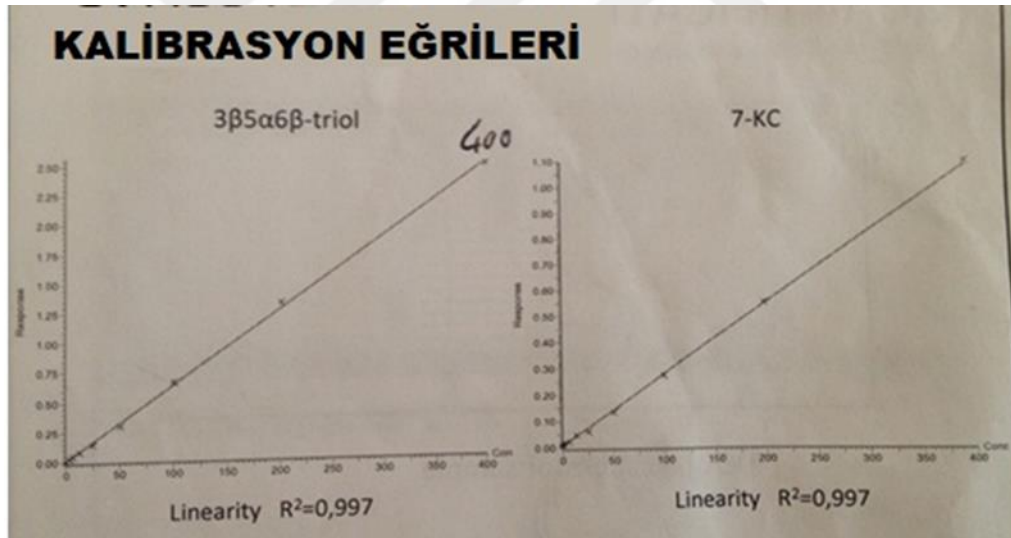


## 4. BULGULAR

### 4.1. KALİBRASYON EĞRİLERİ

#### 4.1.1. Plazma 7-Ketokolesterol ve Kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol Kalibrasyon Eğrileri ve Kütle Spektrumları

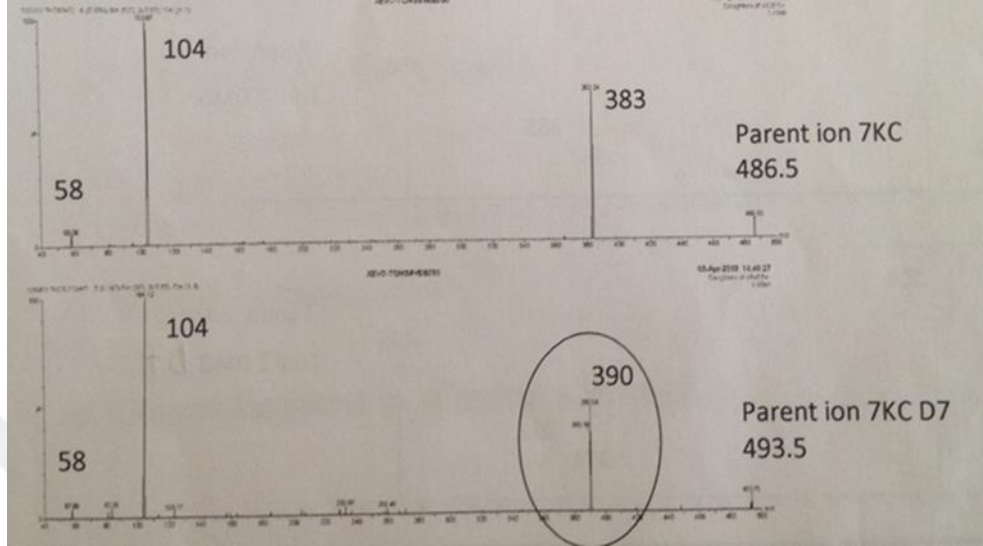
Tüm kalibrasyon eğrileri, x eksenini üzerindeki kalibratör analit konsantrasyonuna karşı y-ekseni üzerindeki analit alanı / IS alanının oranının çizilmesiyle oluşturuldu. Kalibrasyon noktaları, 8 seviyesinde (C1 ila C8) kalibratörler kullanılarak elde edildi. C8-C2 kalibrasyon standartlarının geri hesaplanan konsantrasyonlarının nominal değerinin  $\pm$ % 15'i içinde olması ve C1'in  $\pm$ % 20'nin içinde olması durumunda bir kalibrasyon eğrisi kabul edildi. En az % 75 standart bu kriterleri karşılamalıdır. Şekil 4.1'de gösterildiği gibi, iki oksisterol için de kalibrasyon eğrileri ve bir dizi enjektörde edilmiş kalibratör üzerinde doğrusaldır ( $R^2 = 0.997$ ).



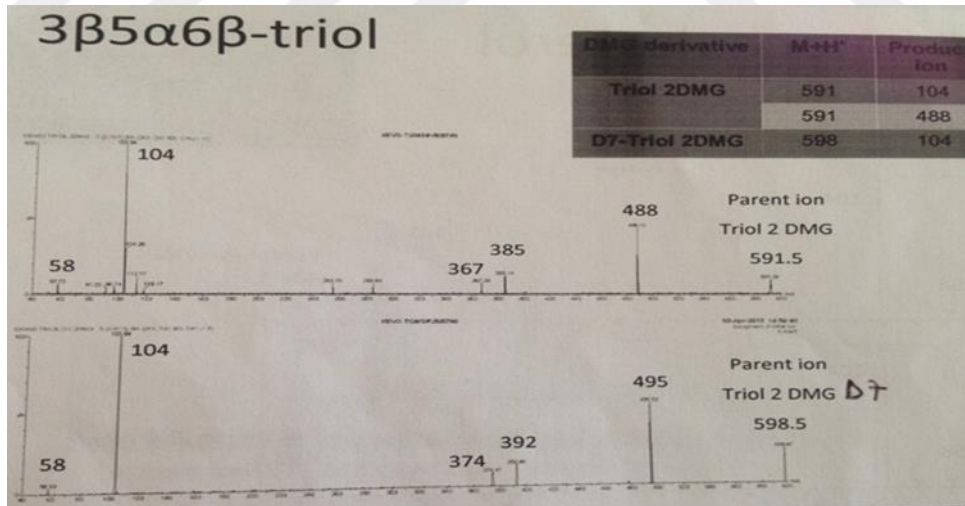
Şekil 4.1: 7-KC ve kolestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol için kalibrasyon eğrileri.

Şekil 4.2 ve 4.3, 7-Keto kolesterol ve kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triolün kütle spektrum / kütle fragmentogramlarını gösterilmiştir. 7-KC için ana iyon 486.5 (m/z) idi ve 7-KC D7 için ana iyon 493.5 (m/z) idi. Kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol ve kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol D7 için ana iyon sırasıyla 591.5 (m/z) ve 598.5 (m/z) idi. Ürün iyonları için tepeler de 7-KC için 383 (m/z) (niceleyici) ve 104 (m/z) (niteleyici) olarak gözlendi. Ürün iyonları için tepeler, kolestan-

$3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol için 488 (m/z) (niceleyici) ve 104 (m/z) (niteleyici) idi. Tüm plazma örneklerinin analizinde, 7-KC'nin tepeleri standartlarla aynı tutulma süresinde gözlemlendi.



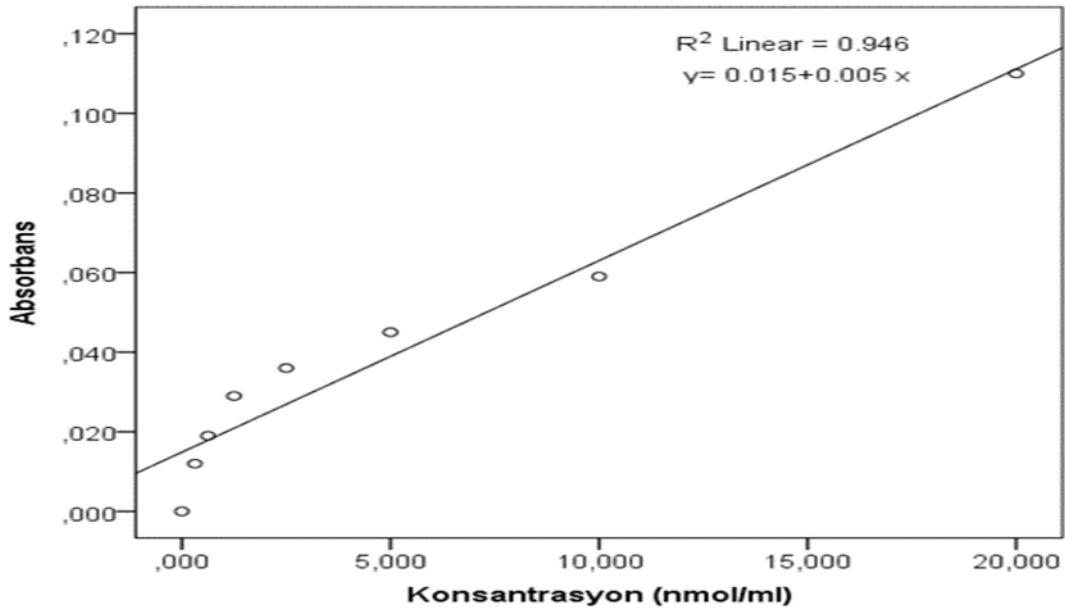
Şekil 4.2: 7-KC kütle spektrumları / kütle fragmentogramları.



Şekil 4.3: Kolesterol- $3\beta, 5\alpha, 6\beta$  triol kütle spektrumları / kütle fragmentogramları.

#### 4.1.2. Plazma MDA Kalibrasyon Eğrisi

Standart madde olarak kullanılan TEP (tetraetoksi propan)'in suda hazırlanmış 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 ve 0.312 nmol/mL'lik çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.4'de verildi.



Şekil 4.4: Buege ve Aust (1978)'un spektrofotometrik yöntemi ile plazmada MDA tayini için hazırlanan kalibrasyon eğrisi ve regresyon denklemi.

#### 4.2. ÇALIŞMA GRUPLARININ VE KONTROLLERİN DEMOGRAFİK VERİLERİ VE OKSİSTEROL DEĞERLERİ

Kontrol ve hasta gruplarının yaş, MDA, total kolesterol, total IgE, HDL, trigliserit, Tprot, Fe ve oksisteroller gibi temel klinik ve biyokimyasal parametreleri karşılaştırıldı ve sonuçları Tablo 4.1'de özetlendi.

**Tablo 4.1:** Çalışma gruplarının klinik ve biyokimyasal karakteristikleri.

	<b>Kontrol (n=120)</b>	<b>Hasta (n=120)</b>	<b>P Value</b>
<b>Kadın:Erkek</b>	94:29	90:30	0.542
<b>Yaş</b>	39.47±14.15	44.52±13.78	<b>0.005</b>
<b>7-Ketokolesterol (ng/mL)</b>	17.84±4.26	39.45±20.37	<b>&lt;0.001</b>
<b>Kolestan- 3β,5α,6β-triol (ng/mL)</b>	10.00±3.90	25.61±10.13	<b>&lt;0.001</b>
<b>MDA (nmol/mL)</b>	1.14±.31	4.98±1.77	<b>&lt;0.001</b>
<b>Total IgE (IU/mL)</b>	64.67±34.85	229.78±353.00	<b>&lt;0.001</b>
<b>LDL (U/L)</b>	94.24±14.13	106.97±35.02	<b>&lt;0.001</b>
<b>HDL (U/L)</b>	46.20±6.72	59.44±33.60	<b>&lt;0.001</b>
<b>Total kolesterol (mg/dL)</b>	160.67±22.25	151.93±46.49	0.065
<b>VLDL (U/L)</b>	28.01±6.60	37.31±22.80	<b>&lt;0.001</b>
<b>Trigliserid (mg/dL)</b>	125.95±7.05	116.38±43.48	<b>0.019</b>
<b>ALT (U/L)</b>	22.23±6.23	18.63±8.07	<b>&lt;0.001</b>
<b>AST (U/L)</b>	21.08±5.24	20.87±8.06	0.813
<b>Total protein (Tprot) (U/L)</b>	7.29±.57	6.86±1.03	<b>&lt;0.001</b>
<b>Ürik asit (mg/dL)</b>	4.74±1.18	4.58±1.86	0.412
<b>Total bilirubin (Tbil) (U/L)</b>	.60±.32	2.28±6.67	<b>0.007</b>
<b>GGT (U/L)</b>	23.01±10.57	28.61±24.03	<b>0.021</b>
<b>Fe (g/dL)</b>	95.24±43.38	71.42±32.87	<b>&lt;0.001</b>
<b>K (mmol/L)</b>	4.31±.70	4.24±.73	0.474

İki grup arasında yaş, 7-KC (ng/mL), kolestan-3β,5α,6β-triol (ng/mL), MDA (nmol/mL), total IgE (IU/mL), LDL (U/L), HDL (U/L), VLDL (U/L), trigliserid (mg/dL), ALT (U/L), total protein, total bilirubin, GGT ve Fe açısından anlamlı farklılıklar tespit edildi. Hastaların yaş ortalaması (44.52±13.78) kontrollere göre (39.47±14.15) yüksekti (p<0.01). Hastaların 7-ketokolesterol (ng/mL) ve kolestan-3β,5α,6β-triol (ng/mL) düzeyleri kontrollere kıyasla anlamlı derecede yüksekti. Hastalardaki MDA düzeyi (4.98±1.77 nmol/mL) kontrol grubundan (1.14±.31 nmol/mL) anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0.001). Benzer şekilde total IgE düzeyi hastalarda (229.78±353.00 IU/mL) kontrollere kıyasla (64.67±34.85 IU/mL) daha

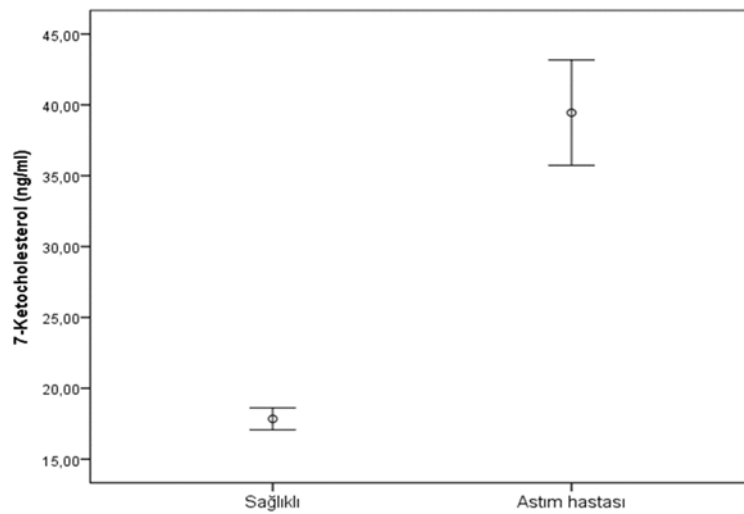
yüksekti. Hastaların LDL ve VLDL düzeyleri de kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti. Yaş, 7KC, kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol, MDA, Total IgE, VLDL, ALT ve Tprot ölçümleri açıklayıcı değişken olarak dikkate alınarak Lojistik regresyon analizi gerçekleştirildiğinde, tekli analizlerdeki anlamlılığına göre modele dahil edilen değişkenler içinden ileriye doğru değişken seçim metodu ile yaş ve MDA düzeyi astım hastası olma riskini etkileyen faktörler olarak belirlendi (Tablo 4.2). Bu sonuca göre yaştaki bir birim artış astım hastası olma riskini 1.13 kat artırırken, MDA düzeyindeki bir birimlik artış ise bu riski 45 kat arttırmaktadır. Hosmer Lemeshow testine göre modelin veriye oldukça iyi bir uyuma sahip olduğu belirlendi (p=0.98). Bu model astım görülmesindeki varyansın %71'ini açıklamakta ve gözlemlerin % 97'sini doğru sınıflandırmaktadır.

**Tablo 4.2:** Astımlı hastaların biyokimyasal parametreler ile kestirimi.

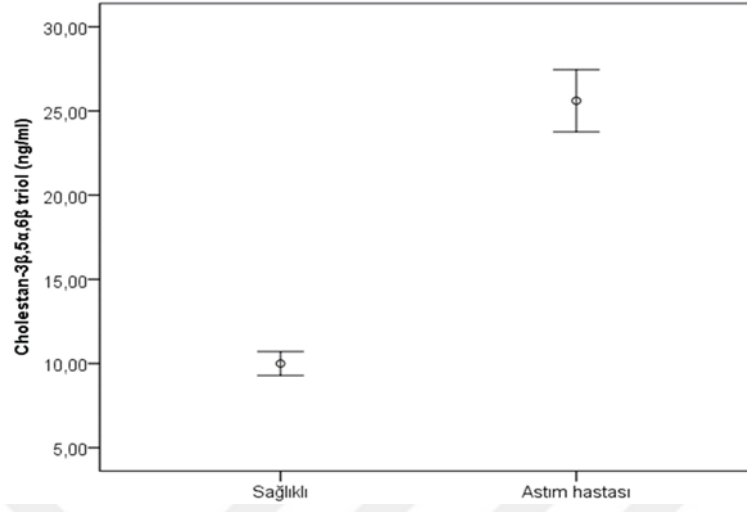
Faktör	B	SS	Wald	P değeri	Odds ratio	GA (alt-üst)	
Yaş	0.12	0.04	7.39	0.007	1.13	1.037	1.249
MDA	6.12	1.38	19.53	<0.001	45.39	30.17	68.73

HL Test:  $\chi^2=1.023$ , p= 0.98, Nagelkerke R<sup>2</sup>=0.719, DSY: % 97

Plazma 7-KC and kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol düzeyleri astımlı hastalarda kontrol grubuna göre daha yüksekti (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

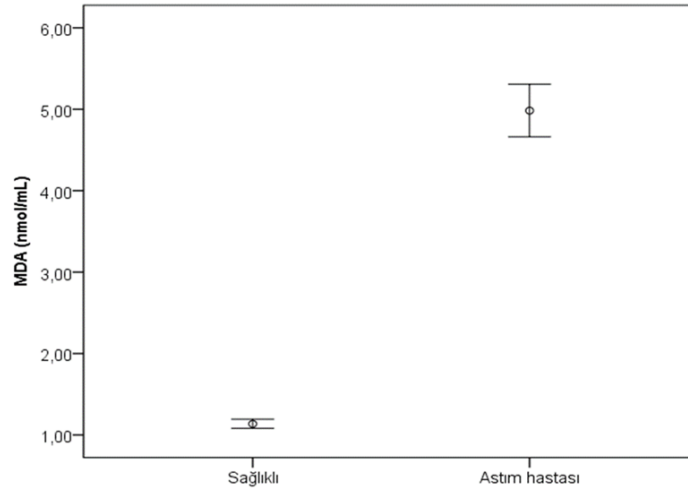


**Şekil 4.5:** Hasta ve kontrollerin plazma 7-KC düzeyleri.

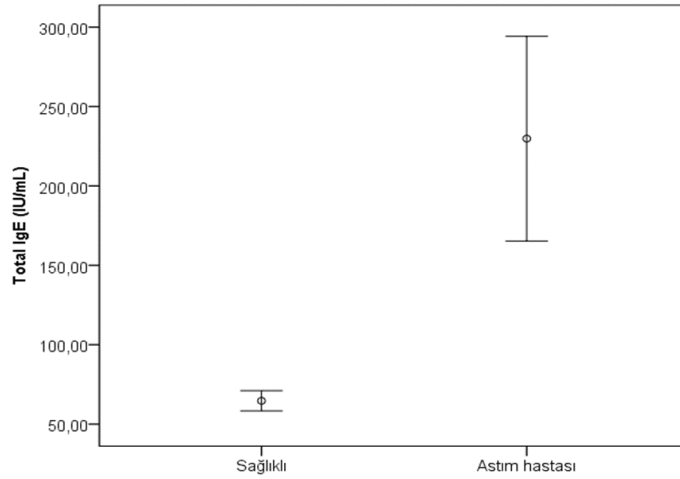


**Şekil 4.6:** Hasta ve kontrollerin plazma kolestan 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol düzeyleri.

MDA (nmol/mL) ve Total IgE (IU/mL) düzeylerinin de Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te gösterildiği üzere sağlıklılara kıyasla astım hastalarında önemli derecede yüksek olduğu görüldü.



**Şekil 4.7:** Hasta ve kontrollerin plazma total MDA düzeyleri.



**Şekil 4.8:** Hasta ve kontrollerin plazma total IgE düzeyleri.

#### 4.3. ÇALIŞMA GRUPLARINDA BİYOKİMYASAL PARAMETRELERLE BİRLİKTE OKSİSTEROL DÜZEYLERİNİN KORELASYONU

Astım hastalarında 7-KC ile ALT ve AST düzeyleri arasında düşük derecede pozitif ve anlamlı ilişki bulundu. MDA, LDL, HDL, VLDL, GGT, Tbil ile 7-KC arasında negatif, zayıf ve anlamlı olmayan ilişki mevcuttu (Tablo 4.3). Kolesterol-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol ile total kolesterol, trigliserid, AST, Tprot ve ürik asit arasında düşük düzeyli, pozitif ve anlamlı ilişki belirlendi. Bunun aksine, HDL, VLDL ve kolesterol-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol arasında orta düzeyde ve negatif ilişki tespit edildi (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3:** Astım hastalarında oksisteroller ve diğer biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyonlar.

	7-Ketokolesterol		Kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol	
	Korelasyon Katsayısı	P Değeri	Korelasyon Katsayısı	P Değeri
MDA (nmol/mL)	-0.048	0.600	0.105	0.252
Total IgE (IU/mL)	0.100	0.279	0.196	<b>0.032</b>
LDL (U/L)	-0.106	0.248	-0.069	0.452
HDL (U/L)	-0.171	0.062	-0.486	<b>&lt;0.001</b>
Total kolesterol (mg/dL)	0.000	0.999	0.387	<b>&lt;0.001</b>
VLDL (U/L)	-0.167	0.069	-0.478	<b>&lt;0.001</b>
Trigliserid (mg/dL)	0.043	0.637	0.242	<b>0.008</b>
ALT (U/L)	0.234	<b>0.010</b>	0.008	0.928
AST (U/L)	0.316	<b>&lt;0.001</b>	0.315	<b>&lt;0.001</b>
Tprot (U/L)	0.191	<b>0.036</b>	0.367	<b>&lt;0.001</b>
Ürik asit (mg/dL)	0.072	0.437	0.408	<b>&lt;0.001</b>
Tbil (U/L)	-0.176	0.055	-0.495	<b>&lt;0.001</b>
GGT (U/L)	-0.169	0.065	-0.440	<b>&lt;0.001</b>
Fe (g/dL)	0.126	0.171	0.316	<b>&lt;0.001</b>
K (mmol/L)	0.069	0.456	-0.026	0.775

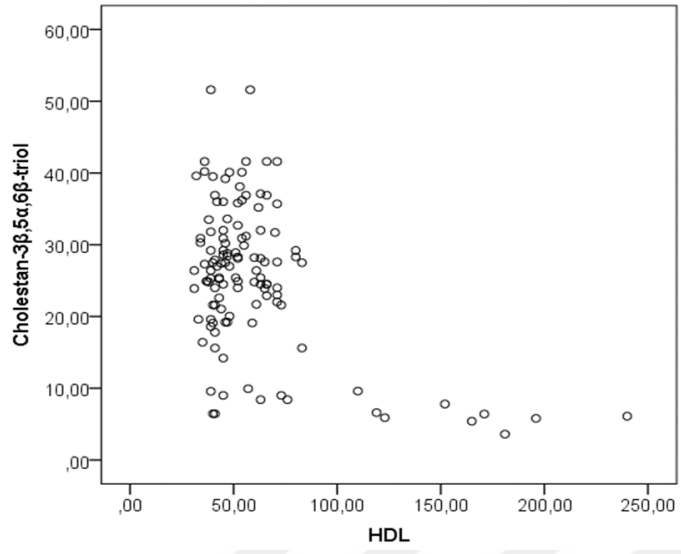
Tüm bireyler ve yaşa göre düzeltme yapılan korelasyon sonuçları dikkate alındığında; 7-KC ile MDA arasında pozitif ve orta düzeyde, 7-KC, Total IgE ve AST arasında ise düşük düzeyde ve pozitif korelasyon olduğu belirlendi. Ayrıca, kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol'ün MDA ile arasında pozitif ve orta düzeyli korelasyon bulunurken total IgE ile ise pozitif ve düşük düzeyde korelasyon mevcuttu. Bunun aksine, HDL, VLDL, ALT, Tbil, GGT ile kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol arasında negatif, zayıf ve anlamlı ilişkiler tespit edildi.

Bu ilişkilerin grafiksel gösterimi Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14 arasında verildi.

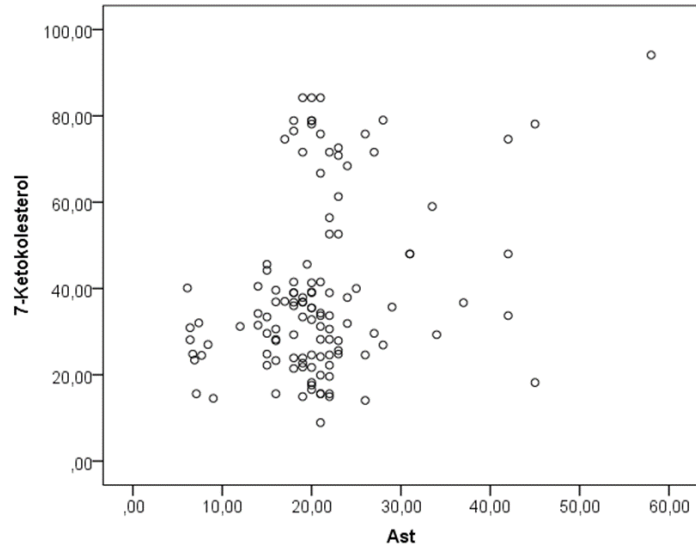


**Tablo 4.4:** Tüm bireylerde yaşa göre düzeltilerek elde edilen oksisteroller ve diğer biyokimyasal parametreler arasındaki kısmi korelasyonlar.

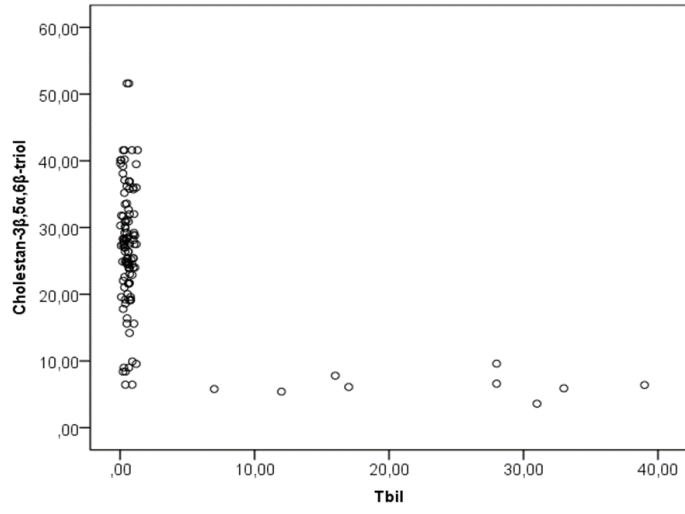
	<b>7-Ketokolesterol</b>		<b>Kolestan-3<math>\beta</math>,5<math>\alpha</math>,6<math>\beta</math>-triol</b>	
	Korelasyon Katsayısı	P Değeri	Korelasyon Katsayısı	P Değeri
<b>MDA (nmol/mL)</b>	0.575	<b>&lt;0.001</b>	0.631	<b>&lt;0.001</b>
<b>Total IgE (IU/mL)</b>	0.290	<b>&lt;0.001</b>	0.462	<b>&lt;0.001</b>
<b>LDL (U/L)</b>	0.061	0.346	0.130	<b>0.045</b>
<b>HDL (U/L)</b>	0.021	0.744	-0.122	0.060
<b>Total kolesterol (mg/dL)</b>	-0.099	0.127	0.144	<b>0.026</b>
<b>VLDL (U/L)</b>	0.031	0.636	-0.104	0.111
<b>Trigliserid (mg/dL)</b>	-0.051	0.431	0.053	0.414
<b>ALT (U/L)</b>	-0.010	0.877	-0.177	<b>0.006</b>
<b>AST (U/L)</b>	0.200	<b>0.002</b>	0.155	0.061
<b>Tprot (U/L)</b>	-0.014	0.828	0.026	0.688
<b>Ürik asit (mg/dL)</b>	0.019	0.772	0.191	0.064
<b>Tbil (U/L)</b>	-0.038	0.564	-0.196	<b>0.002</b>
<b>GGT (U/L)</b>	-0.038	0.556	-0.153	<b>0.018</b>
<b>Fe (g/dL)</b>	-0.110	0.091	-0.085	0.193
<b>K (mmol/mL)</b>	0.017	0.799	-0.045	0.489



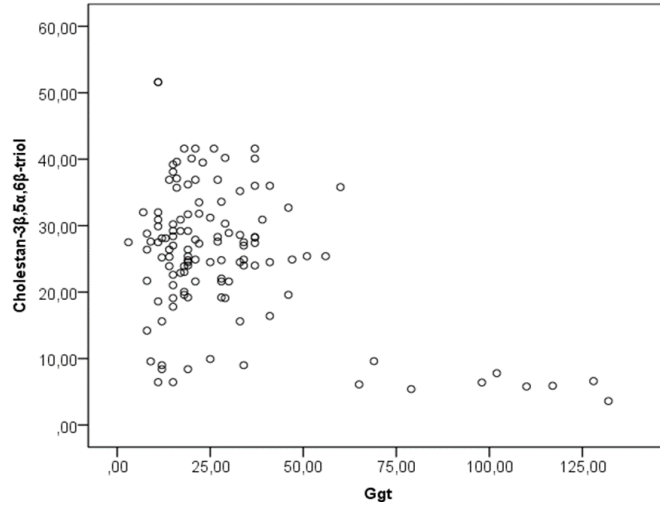
Şekil 4.9: Astım hastalarında kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol ile HDL arası negatif ve doğrusal olmayan ilişki.



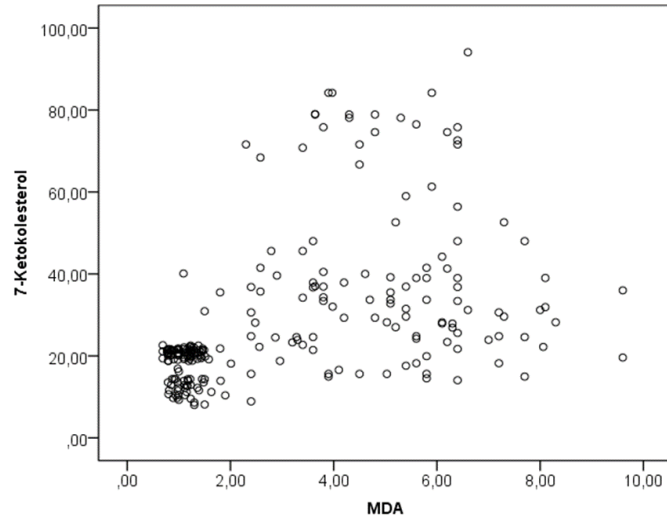
Şekil 4.10: Astım hastalarında 7-KC ile AST arası düşük düzey pozitif ilişki.



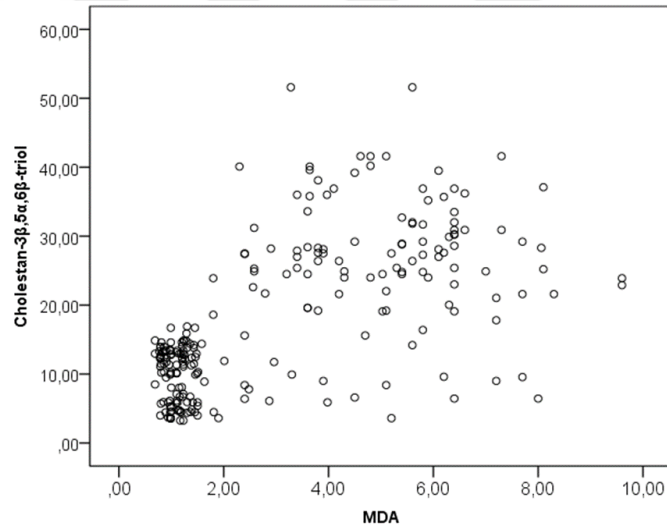
Şekil 4.11: Astım hastalarında kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol ile Tbil arası negatif monotonik ilişki.



Şekil 4.12: Astım hastalarında kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol ile GGT arası negatif monotonik ilişki.



Şekil 4.13: Tüm bireylerde 7-KC ile MDA arası orta düzeyli pozitif ilişki.



Şekil 4.14: Tüm bireylerde kolestan-3β,5α,6β-triol ile MDA arası orta düzeyli pozitif ilişki.

#### 4.4. ÇOK DEĞİŞKENLİ ADIMSAL REGRESYON ANALİZİ

Astım hastalarında 7-KC ve kolestan-3β,5α,6β-triol düzeylerini kestirmek amacıyla çok değişkenli adimsal (stepwise) regresyon analizi uygulandı. 7-KC için dikkate alınan biyokimyasal parametreler HDL, ALT, AST, VLDL, Tprot, Tbil ve GGT iken kolestan-3β,5α,6β-triol için dikkate alınan biyokimyasal parametreler Total IgE, HDL, Total kolesterol, VLDL, Trigliserit, AST, Tprot, ürik asit, Tbil, GGT ve Fe'dir (Tablo 4.5).

**Tablo 4.5:** Tüm bireylerde 7-KC ve kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol oksisterollerini etkileyen faktörler.

Bağımlı Değişken	Faktör	Regresyon Katsayısı (95% Güven aralığı)	P Değeri	R <sup>2</sup>
<b>7-KC</b>	MDA	3.66 (2.79, 4.52)	<0.001	0.275
	AST	0.59 (0.28, 0.90)	<0.001	
	Total Kolesterol	-0.08 (-0.13, -0.02)	0.009	
<b>Kolestan-3<math>\beta</math>,5<math>\alpha</math>,6<math>\beta</math> triol</b>	MDA	2.84 (2.37, 3.31)	<0.001	0.469
	Tbil	-0.48 (-0.70, -0.27)	<0.001	
	Total IgE	0.006 (0.002, 0.01)	0.005	

Sonuçlar incelendiğinde; 7-KC'ye etki eden faktörler MDA, AST ve total kolesterol iken kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$  triol üzerinde anlamlı etkiye sahip değişkenler MDA, Tbil ve Total IgE olarak belirlendi (p<0.05). MDA'daki 1 birimlik artış 7-KC üzerinde ortalama 3.66 birimlik bir artışa neden olmaktadır. AST'deki 1 birim artış da 7-KC üzerinde ortalama 0.59 birimlik bir artışa neden olmaktadır. Total kolesterol düzeyindeki bir birimlik artış 7-KC'de -0.08 birim kadar azaltıcı etkiye sahiptir. Kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$  triol için elde edilen sonuçlarda; yine MDA'daki 1 birimlik artış kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$  triol düzeyinde ortalama olarak 2.84 kat artışa neden olmaktadır. Total IgE düzeyindeki 1 birimlik artış kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$  triol ortalama düzeyini 0.006 kat arttırırken, Tbil'deki 1 birim artış ise kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$  triol ortalama düzeyini 0.48 kat azaltmaktadır. Buna rağmen modellerin kestirim başarıları değerlendirildiğinde MDA, Ast ve total kolesterol 7-KC'deki değişkenliğin % 28'ini açıklamakta iken, MDA, Tbil ve Total IgE birlikte kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$  triol'deki değişkenliğin % 47'sini açıklayabilmektedir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Alerji ile yakından ilişkili olduğu kabul edilen astım, vücuttaki birçok hücre ve hücre ürününün rol oynadığı, solunum yollarında kronik inflamasyonun olduğu heterojen bir hastalıktır. Erişkinlerde gelişen astımların %68.9 oranında alerjiye bağlı olduğu bildirilmektedir (Mathur ve Viswanathan, 2014). Astım hastalarında artmış oksidatif stresin inflamasyona bağlı bir sonuç mu, yoksa hastalığın patogenezinde rol oynayan bir etken mi olduğu hala tartışılmakla birlikte, son çalışmalar oksidatif stresin kronik inflamatuvar hastalıklardaki kritik rolüne dikkat çekmektedir (Bowler ve Crapo, 2002; Boldogh ve diğ., 2005; Park ve diğ., 2009; Cho ve Moon, 2010; Sahiner ve diğ., 2011; Rijt ve diğ. 2017). Bazı çalışmalarda artmış oksidatif stresin hava yolu inflamasyonunun gelişimi ve devamında belirleyici olduğu sonucuna varılmış olmasına rağmen, hava yolu inflamasyonu tedavisi için denenen antioksidanların terapötik etkileri beklendiği kadar iyi değildir (Grievink ve diğ., 1998). Ancak bu yanıltıcı bulgu hastalığa özgü oksidatif hasarın tam olarak belirlenememiş olmasından, doğru antioksidanın seçilememiş olmasından veya kullanılan antioksidanın biyoyararlılığının düşük olmasından da kaynaklanıyor olabilir.

Bütün inflamatuvar hastalıklarda olduğu gibi alerjik inflamasyonda da oksidatif stres artmıştır. Makrofajlar, eozinofiller ve nötrofiller, DNA, proteinler, karbohidratlar, lipitler gibi hücrel molekülleri hasara uğratan çeşitli tipte reaktif oksijen türleri (ROS) üretirler. Birçok araştırmacı, astım sırasında ortaya çıkan ROS artışının, akciğerde geniş bir biyolojik moleküller dizisi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Russell, 2000). Yapılan bir çalışmada astımlı hastalarda kontrol grubuna göre lipid peroksidasyon ürünlerinin plazmada yükseldiği rapor edilmiştir (Rahman ve diğ., 1996).

Kolesterolün oksidasyonu, oksisteroller olarak bilinen çok sayıda oksidasyon ürününün oluşumuna yol açar. Kolesterolün kendiliğinden veya enzimatik oksidasyonundan kaynaklanan oksisteroller, çok sayıda biyolojik aktiviteye sahiptirler ve hücreiçi oksidatif stresin non-invaziv potansiyel biyobelirteçleri olarak kabul edilmektedirler (Iuliano ve diğ., 2010; Samadi ve diğ., 2018). Çeşitli tipte türevlerin (hidroksi, keto, epoksi) yer aldığı geniş bir grup oluşturan oksisteroller, hücre ölümü, inflamasyon, immün baskılama, hücre proliferasyonu, sitokin üretimi ve trombosit aktivasyonunu teşvik ederler ve son zamanlarda biyoaktif lipitler olarak önerilmişlerdir. Lipit peroksidasyonu ürünlerinden malondialdehit (MDA) de güvenilir

oksidatif stres göstergelerinden biridir (Neilsen ve diğ., 1997). Oksidatif stres arttıkça MDA düzeyi de artmaktadır.

Bu çalışmada astımlı hastalarda lipid peroksidasyon ürünlerinden iki oksisterolün (7-ketokolesterol ve kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$  triol) ve MDA'nın düzeyleri belirlenmiştir. Ayrıca, klinik ve biyokimyasal parametrelerin korelasyonları demografik veriler ışığında araştırılmıştır. Oksisterol analizi gelişmiş bir teknolojik yöntem olan LC-ESI-MS/MS ile belirlenmiştir. MDA düzeyinin ölçümünde ise spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Parametreler arası korelasyonlar istatistik yöntemlerle ortaya koyulmuştur.

Biyolojik materyallerdeki oksisterollerin laboratuvar analizi, kolesterol ile yakından ilişkili yapılara sahip olan ve konsantrasyonları ile kolesterol konsantrasyonu arasında büyük farklılıklara sahip çeşitli bileşiklerin varlığı nedeniyle kolay değildir. Bu çalışma, oksisterol türlerini analiz etmek için rapor edilen bazı GC-MS sınırlamalarının üstesinden gelebilecek bir LC-ESI-MS/MS yaklaşımını tarif etmektedir (Murakami ve diğ., 2000). Bu çalışma ile oksisterol türlerini ölçme konusunda rapor edilmiş önceki çalışmalar arasındaki fark, kullanılan LC-ESI-MS/MS metodunun duyarlılığı ve mükemmel seçiciliğidir. Kolesterol oksidasyon ürünlerini analiz etmek için LC-MS/MS yönteminin, diğer yöntemlerden daha hassas ve güvenilir olduğunu belirtmek gerekir (Wood ve diğ., 2003).

Elde edilen veriler, astımlı hastalarda iki oksisterolün ve MDA'nın kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Astımlı hastalarda LDL düzeylerinin de yüksek bulunması, oksisterol ve MDA düzeylerindeki artışın, yüksek LDL düzeyiyle ilişkili olduğunu düşündürmektedir (Quinn ve diğ., 1987; Porkkala-Sarataho ve diğ., 2000). Kolesterol artışına paralel olarak, oksisterollerin de artışı beklenen bir sonuçtur.

Literatürde, 7-KC and kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triolü çoğu hastalıkta, örneğin nörodejeneratif hastalıklar ve diyabette, önemli biyobelirteçler olarak tanımlanmış çalışmalar mevcuttur (Leoni ve Caccia, 2011, Samadi ve diğ., 2018). Oksisterollerin inflamasyon ve immünite ile doğrudan ilişkisi olduğu bilinmesine rağmen, bugüne kadar astımdaki rollerine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda, astımlı hastalarda 7-KC and kolestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol düzeyleri ilk kez ölçülmüştür. 7-KC ve kolestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol'ün astım hastalığında oksidatif stresin potansiyel belirteçleri olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada yaş

ve MDA düzeyinin astım hastası olma riskini etkileyen faktörler olarak belirlenmesi (Tablo 4.2) de, hastalığın artan oksidatif stresle ilişkisinin destekler niteliktedir.

Total IgE seviyeleri, genetik, çevre ve bağışıklık sistemi gibi faktörlere göre değişmekle beraber, klinik ve araştırma perspektiflerinden önemlidir, çünkü belirli bir astım fenotipini gösterebilir ve tedavi stratejisinde bir yön sağlayabilir. Genişleyen biyobelirteçler listesinin bir parçası olarak, IgE astım fenotiplerinin ve tedavisinin tanımlanmasında köklü bir role sahiptir (Rath ve diğ., 2018). Bu çalışmada total serum IgE düzeyi hastalarda ( $229.78 \pm 353.00$  IU/mL) sağlıklı kontrollere kıyasla ( $64.67 \pm 34.85$  IU/mL) daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak, bu çalışma, hiperlipidemi, metabolik sendrom ve Alzheimer gibi hastalıklarda, oksidatif stresin yararlı belirteçleri olarak öne sürülen plazma oksisterol düzeylerini astım hastalarında ortaya koyan ilk rapordur. Kolesterol oksidasyon ürünlerinin seviyelerindeki sistemik artış, rutin klinik pratiğinde yararlı olabilecek, dokularda kolesterol oksidasyonunun güvenilir bir biyobelirleyicisi gibi görünmektedir. Ancak lipit peroksidasyonunun alerjik astımdaki rolüne ilişkin daha detaylı bilgilere ulaşmak için oksisterollerin diğer türlerini, etkileşim ortaklarını, hasara uğrattıkları molekülleri belirlemek gibi daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca oksisterol düzeylerinin koroner risk faktörleriyle korelasyonunu açıklamak üzere, ilgili biyokimyasal parametrelerin yanı sıra, hastaların yaş, cinsiyet, genetik yatkınlık, vücut kitle indeksi vb. karakteristikleri dikkate alınarak yapılacak ileri çalışmalara gerek duyulmaktadır. Bu çalışma özellikle lipit peroksidasyonunun astım patogenezindeki rolüne dikkat çeken kesin ve güvenilir kantitatif veriler ortaya koymuştur.



## KAYNAKLAR

- Aghaloo, T. L., Amantea, C. M., Cowan, C. M., Richardson, J. A., Wu, B. M., Parhami, F. and Tetradis, S., 2007, Oxysterols enhance osteoblast differentiation *in vitro* and bone healing *in vivo*, *J Orthop Res*, 25, 1488-97.
- Agrawal, D. K. and Shao, Z., 2010, Pathogenesis of allergic airway inflammation, *Curr Allergy Asthma Rep*, 10, 39-48.
- Alkhoury, H., Cha, V., Tong, K., Moir, L. M., Armour, C. L. and Hughes, J. M., 2014, Human lung mast cell products regulate airway smooth muscle CXCL10 levels, *J Allergy (Cairo)*, 2014, 875105.
- Anticoli, S., Arciello, M., Mancinetti, A., De Martinis, M., Ginaldi, L., Iuliano, L. and Balsano, C., 2010, 7-Ketocholesterol and 5,6-secoesterol modulate differently the stress-activated mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in liver cells, *J Cell Physiol*, 222, 586-95.
- Babiker, A. and Diczfalusy, U., 1998, Transport of side-chain oxidized oxysterols in the human circulation, *Biochim Biophys Acta*, 1392(2-3), 333-9.
- Bandeira-Melo, C., Bozza, P. T. and Weller, P. F., 2002, The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function, *J Allergy Clin Immunol*, 109(3), 393-400.
- Banerjee, S. and Mazumdar, S., 2012, Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte, *Int J Anal Chem*, 2012, 282574.
- Barnes, P. J., 1990, Reactive oxygen species and airway inflammation, *Free Radic Biol Med*, 9, 235-43.
- Basu, S., 2007, The enigma of *in vivo* oxidative stress assessment: isoprostanes as an emerging target, *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*, 51, 48-61.
- Bel, E. H., 2004, Clinical phenotypes of asthma, *Curr Opin Pulm Med*, 10, 44-50.
- Bharadwaj, A. S., Bewtra, A. K. and Agrawal, D. K., 2007, Dendritic cells in allergic airway inflammation, *Can J Physiol Pharmacol*, 85, 686-99.
- Bjorkhem, I., 2007, Rediscovery of cerebrosterol, *Lipids*, 42, 5-14.
- Bjorkhem, I. and Diczfalusy, U., 2002, Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers?, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 734-42.
- Bjorkhem, I. and Eggertsen, G., 2001, Genes involved in initial steps of bile acid synthesis, *Curr Opin Lipidol*, 12, 97-103.
- Blume, C. and Davies, D. E., 2013, *In vitro* and *ex vivo* models of human asthma, *Eur J Pharm Biopharm*, 84, 394-400.

- Bodin, K., Andersson, U., Rystedt, E., Ellis, E., Norlin, M., Pikuleva, I., Eggertsen, G., Bjorkhem, I. and Diczfalusy, U., 2002, Metabolism of 4 beta-hydroxycholesterol in humans, *J Biol Chem*, 277, 31534-40.
- Boldogh, I., Bacsı, A., Choudhury, B.K., Dharajiya, N., Alam, R., Hazra, T.K., Mitra, S., Goldblum, R.M. and Sur, S., 2005, ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation, *J Clin Invest*, 115, 2169-79.
- Bousquet, J., Mantzouranis, E., Cruz, A. A., Ait-Khaled, N., Baena-Cagnani, C. E., Bleecker, E. R., Brightling, C. E., Burney, P., Bush, A., Busse, W. W., Casale, T. B., Chan-Yeung, M., Chen, R., Chowdhury, B., Chung, K. F., Dahl, R., Drazen, J. M., Fabbri, L. M., Holgate, S. T., Kauffmann, F., Haahtela, T., Khaltaev, N., Kiley, J. P., Masjedi, M. R., Mohammad, Y., O'byrne, P., Partridge, M. R., Rabe, K. F., Togias, A., van Weel, C., Wenzel, S., Zhong, N. and Zuberbier, T., 2010, Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: document presented for the World Health Organization consultation on severe asthma, *J Allergy Clin Immunol*, 126, 926-38.
- Bowler, R.P. and Crapo, J.D., 2002, Oxidative stress in allergic respiratory Diseases, *J Allergy Clin Immunol*, 110-349-56.
- Brown, A. J. and Jessup, W., 1999, Oxysterols and atherosclerosis, *Atherosclerosis*, 142, 1-28.
- Brown, A. J. and Jessup, W., 2009, Oxysterols: sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis, *Mol Aspects Med*, 30, 111-22.
- Brown, A. J., Leong, S. L., Dean, R. T. and Jessup, W., 1997, 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque, *J Lipid Res*, 38, 1730-45.
- Brown, A. J., Watts, G. F., Burnett, J. R., Dean, R. T. and Jessup, W., 2000, Sterol 27-hydroxylase acts on 7-ketocholesterol in human atherosclerotic lesions and macrophages in culture, *J Biol Chem*, 275, 27627-33.
- Burkard, I., Rentsch, K. M. and Von Eckardstein, A., 2004, Determination of 24S- and 27-hydroxycholesterol in plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *J Lipid Res*, 45, 776-81.
- Castrillo, A., Joseph, S. B., Marathe, C., Mangelsdorf, D. J. and Tontonoz, P., 2003, Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages, *J Biol Chem*, 278, 10443-9.
- Cech, N. B. and Enke, C. G., 2001, Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals, *Mass Spectrom Rev*, 20, 362-87.
- Cheeseman, K. H., 1993, Mechanisms and effects of lipid peroxidation, *Mol Aspects Med*, 14, 191-7.
- Cho, Y.S. and Moon, H-B., 2010, The role of oxidative stress in the pathogenesis of asthma, *Allergy Asthma Immunol Res*, 2(3), 183-187.

- Cochrane, C. G., 1991, Cellular injury by oxidants, *Am J Med*, 91, 23S-30S.
- Cummins, C. L. and Mangelsdorf, D. J., 2006, Liver X receptors and cholesterol homoeostasis: spotlight on the adrenal gland, *Biochem Soc Trans*, 34, 1110-3.
- Davies, J. M. and O'Hehir, R. E., 2008, Immunogenetic characteristics of immunoglobulin E in allergic disease, *Clin Exp Allergy*, 38, 566-78.
- De Boussac, H., Alioui, A., Viennois, E., Dufour, J., Trousson, A., Vega, A., Guy, L., Volle, D. H., Lobaccaro, J. M. and Baron, S., 2013, Oxysterol receptors and their therapeutic applications in cancer conditions, *Expert Opin Ther Targets*, 17, 1029-38.
- Debarber, A. E., Lutjohann, D., Merkens, L. and Steiner, R. D., 2008, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of plasma 24S-hydroxycholesterol with chromatographic separation of 25-hydroxycholesterol, *Anal Biochem*, 381, 151-3.
- Deckers, J., Branco Madeira, F. and Hammad, H., 2013, Innate immune cells in asthma, *Trends Immunol*, 34, 540-7.
- De Hoffmann, E. and Stroobant V., 2007, *Mass Spectrometry Principles and Applications*, 3rd ed., WILEY, England, ISBN 978-0-470-03310-4.
- Del Rio, D., Stewart, A. J. and Pellegrini, N., 2005, A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress, *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 15, 316-28.
- Diczfalusy, U., Nylen, H., Elander, P. and Bertilsson, L., 2011, 4Beta-hydroxycholesterol, an endogenous marker of CYP3A4/5 activity in humans, *Br J Clin Pharmacol*, 71, 183-9.
- Diehl, G. and Karst, U., 2002, On-line electrochemistry-MS and related techniques, *Anal Bioanal Chem*, 373, 390-8.
- Draper, H. H. and Hadley, M., 1990, A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde, *Xenobiotica*, 20, 901-7.
- Dwyer, J. R., Sever, N., Carlson, M., Nelson, S. F., Beachy, P. A. and Parhami, F., 2007, Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells, *J Biol Chem*, 282, 8959-68.
- Dzeletovic, S., Breuer, O., Lund, E. and Diczfalusy, U., 1995, Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry, *Anal Biochem*, 225, 73-80.
- Emelyanov, A., Fedoseev, G., Abulimity, A., Rudinski, K., Fedoulov, A., Karabanov, A. and Barnes, P. J., 2001, Elevated concentrations of exhaled hydrogen peroxide in asthmatic patients, *Chest*, 120, 1136-9.
- Farrokhi, S., Gheybi, M. K., Movahed, A., Tahmasebi, R., Iranpour, D., Fatemi, A., Etemadan, R., Gooya, M., Zandi, S., Ashourinejad, H., Alavizadeh, S. and Khoddami, S., 2015, Common aeroallergens in patients with asthma and allergic rhinitis living in southwestern

- part of Iran: based on skin prick test reactivity, *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 14, 133-8.
- Fenn, J. B., 1993, Ion formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time, *J Am Soc Mass Spectrom*, 4, 524-35.
- Fessler, M. B. and Parks, J. S., 2011, Intracellular lipid flux and membrane microdomains as organizing principles in inflammatory cell signaling, *J Immunol*, 187, 1529-35.
- Fessler, M. B., 2017, A new frontier in immunometabolism. Cholesterol in lung health and disease, *Ann Am Thorac Soc*, 14(Suppl.5), S399-S405.
- Fitzpatrick, A.M, Jones, D.P. and Brown, L.A.S., 2012, Glutathione redox control of asthma: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities, *Antioxid Redox Signal*, 17(2), 375-408.
- Gill, S., Chow, R. and Brown, A. J., 2008, Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised, *Prog Lipid Res*, 47, 391-404.
- GINA (2015). Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention, [http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA\\_Report\\_2015.pdf](http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2015.pdf), [Ziyaret tarihi: 2 Ağustos 2018].
- Glish, G. L. and Vachet, R. W., 2003, The basics of mass spectrometry in the twenty-first century, *Nat Rev Drug Discov*, 2, 140-50.
- Goldstein, J. L., Debose-Boyd, R. A. and Brown, M. S., 2006, Protein sensors for membrane sterols, *Cell*, 124, 35-46.
- Gordon, B. R., 2008, Asthma history and presentation, *Otolaryngol Clin North Am*, 41, 375-85.
- Gould, H. J. and Sutton, B. J., 2008, IgE in allergy and asthma today, *Nat Rev Immunol*, 8, 205-17.
- Grievink, L, Smit H.A., Ocke, M.C. and van 't Veer P, Kromhout, D., 1998, Dietary intake of antioxidant (pro)-vitamins, respiratory symptoms and pulmonary function: the MORGEN study, *Thorax*, 53:166-71.
- Griffiths, W. J., Abdel-Khalik, J., Crick, P. J., Yutuc, E. and Wang, Y., 2016, New methods for analysis of oxysterols and related compounds by LC-MS, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 162, 4-26.
- Griffiths, W. J., Crick, P. J. and Wang, Y., 2013a, Methods for oxysterol analysis: past, present and future, *Biochem Pharmacol*, 86, 3-14.
- Griffiths, W. J., Crick, P. J., Wang, Y., Ogundare, M., Tuschl, K., Morris, A. A., Bigger, B. W., Clayton, P. T. and Wang, Y., 2013b, Analytical strategies for characterization of oxysterol lipidomes: liver X receptor ligands in plasma, *Free Radic Biol Med*, 59, 69-84.

- Griffiths, W. J. and Wang, Y., 2011, Analysis of oxysterol metabolomes, *Biochim Biophys Acta*, 1811, 784-99.
- Guardiola, F., Dutta, P.C., Codony, R. and Savage, G.P., 2002, Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects, 1st Edition, AOCS Publishing, USA, ISBN: 1893997340.
- Halim, T. Y. F. and Mckenzie, A. N. J., 2013. New kids on the block: group 2 innate lymphoid cells and type 2 inflammation in the lung, *Chest*, 144, 1681-1686.
- Hall, S. and Agrawal, D. K., 2014, Key mediators in the immunopathogenesis of allergic asthma, *International Immunopharmacology*, 23, 316-329.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M., 1988, Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease, *Hum Toxicol*, 7, 7-13.
- Heffner, J. E. and Repine, J. E., 1989, Pulmonary strategies of antioxidant defense, *Am Rev Respir Dis*, 140, 531-54.
- Holgate, S. T., 2010, A brief history of asthma and its mechanisms to modern concepts of disease pathogenesis, *Allergy Asthma Immunol Res*, 2, 165-71.
- Honda, A., Yamashita, K., Hara, T., Ikegami, T., Miyazaki, T., Shirai, M., Xu, G., Numazawa, M. and Matsuzaki, Y., 2009, Highly sensitive quantification of key regulatory oxysterols in biological samples by LC-ESI-MS/MS, *J Lipid Res*, 50, 350-7.
- Ichinose, M., Sugiura, H., Yamagata, S., Koarai, A. and Shirato, K., 2000, Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways, *Am J Respir Crit Care Med*, 162, 701-6.
- Ikonen, E. and Vainio, S., 2005, Lipid microdomains and insulin resistance: is there a connection?, *Sci STKE*, 2005(268), pe3.
- Ishmael, F. T., 2011, The inflammatory response in the pathogenesis of asthma, *J Am Osteopath Assoc*, 111, S11-7.
- Iuliano, L., 2011, Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms, *Chem Phys Lipids*, 164, 457-68.
- Iuliano, L., Diczfalusy, U., 2010, Oxysterols: Potential Biomarkers of Oxidative Stress in "Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles and Practical Applications", Eds. Giancarlo Aldini, Kyung-Jin Yeum, Etsuo Niki, Robert M. Russell, Chapter 7, 99-115, *Blackwell Publishing Ltd.*, USA, ISBN:9780813815350.
- Javitt, N. B., 2008, Oxysterols: novel biologic roles for the 21st century, *Steroids*, 73, 149-57.
- Jessup, W. and Brown, A. J., 2005, Novel routes for metabolism of 7-ketocholesterol, *Rejuvenation Res*, 8, 9-12.

- Jessup, W., Gelissen, I. C., Gaus, K. and Kritharides, L., 2006, Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains in cholesterol export from macrophages, *Curr Opin Lipidol*, 17, 247-57.
- Jiang, X., Ory, D. S. and Han, X., 2007, Characterization of oxysterols by electrospray ionization tandem mass spectrometry after one-step derivatization with dimethylglycine, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 21, 141-52.
- Jones, D. P., Thor, H., Smith, M. T., Jewell, S. A. and Orrenius, S., 1983, Inhibition of ATP-dependent microsomal Ca<sup>2+</sup> sequestration during oxidative stress and its prevention by glutathione, *J Biol Chem*, 258, 6390-3.
- Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. A., Mangelsdorf, D. J. and Tontonoz, P., 2003, Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors, *Nat Med*, 9, 213-9.
- Kappus, H. and Sies, H., 1981, Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation, *Experientia*, 37, 1233-41.
- Kha, H. T., Basseri, B., Shouhed, D., Richardson, J., Tetradis, S., Hahn, T. J. and Parhami, F., 2004, Oxysterols regulate differentiation of mesenchymal stem cells: pro-bone and anti-fat, *J Bone Miner Res*, 19, 830-40.
- Khoubnasab Jafari, M., Ansarin, K. and Jouyban, A., 2015, Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders, *Bioimpacts*, 5, 123-127.
- Kim, W. K., Meliton, V., Amantea, C. M., Hahn, T. J. and Parhami, F., 2007, 20(S)-hydroxycholesterol inhibits PPAR $\gamma$  expression and adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells through a hedgehog-dependent mechanism, *J Bone Miner Res*, 22, 1711-9.
- Kim, Y. J. and Lee, C. S., 2010, Tyrosine kinase inhibitor AG126 reduces 7-ketocholesterol-induced cell death by suppressing mitochondria-mediated apoptotic process, *Neurochem*, 35(4):603-12.
- Kita, H., 2013, Eosinophils: multifunctional and distinctive properties, *Int Arch Allergy Immunol*, 161 Suppl 2, 3-9.
- Kulig, W., Cwiklik, L., Jurkiewicz, P., Rog, T. and Vattulainen, I., 2016, Cholesterol oxidation products and their biological importance, *Chem Phys Lipids*, 199, 144-160.
- Kuver, R., 2012, Mechanisms of oxysterol-induced disease: insights from the biliary system, *Clin Lipidol*, 7, 537-548.
- Lange, Y., Ory, D. S., Ye, J., Lanier, M. H., Hsu, F. F. and Steck, T. L., 2008, Effectors of rapid homeostatic responses of endoplasmic reticulum cholesterol and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, *J Biol Chem*, 283, 1445-55.
- Lee, S. Y., Chang, Y. S. and Cho, S. H., 2013, Allergic diseases and air pollution, *Asia Pac Allergy*, 3, 145-54.

- Lemanske, R. F., Jr. and Busse, W. W., 2003, Asthma, *J Allergy Clin Immunol*, 111(2)(suppl.2), S502-19.
- Leonarduzzi, G., Sottero, B. and Poli, G., 2002, Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review), *J Nutr Biochem*, 13, 700-710.
- Leoni, V. and Caccia, C., 2011, Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases, *Chem Phys Lipids*, 164, 515-24.
- Li, W., Dalen, H., Eaton, J. W. and Yuan, X. M., 2001, Apoptotic death of inflammatory cells in human atheroma, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 1124-30.
- Li, N., Nel, A.E., Role of the Nrf2-mediated signaling pathway as a negative regulator of inflammation: implications for the impact of particulate pollutants on asthma. *Antioxid Redox Signal*, 8(1-2):88-98.
- Liu, S. Y., Aliyari, R., Chikere, K., Li, G., Marsden, M. D., Smith, J. K., Pernet, O., Guo, H., Nusbaum, R., Zack, J. A., Freiberg, A. N., Su, L., Lee, B. and Cheng, G., 2013, Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase broadly inhibits viral entry by production of 25-hydroxycholesterol, *Immunity*, 38, 92-105.
- Lum, L. and Beachy, P. A., 2004, The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers, *Science*, 304, 1755-9.
- Luoma, P. V., 2007, Cytochrome P450-physiological key factor against cholesterol accumulation and the atherosclerotic vascular process, *Ann Med*, 39, 359-70.
- Malvitte, L., Montange, T., Vejux, A., Joffre, C., Bron, A., Creuzot-Garcher, C. and Lizard, G., 2008, Activation of a caspase-3-independent mode of cell death associated with lysosomal destabilization in cultured human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) exposed to 7beta-hydroxycholesterol, *Curr Eye Res*, 33, 769-81.
- Mathur, S.M. and Viswanathan, R.K., 2014, Relevance of allergy in adult asthma, *Curr Allergy Asthma Rep*, 14(5): 437.
- Meynier, A., Andre, A., Lherminier, J., Grandgirard, A. and Demaison, L., 2005, Dietary oxysterols induce *in vivo* toxicity of coronary endothelial and smooth muscle cells, *Eur J Nutr*, 44, 393-405.
- Miyoshi, N., Iuliano, L., Tomono, S. and Ohshima, H., 2014, Implications of cholesterol autoxidation products in the pathogenesis of inflammatory diseases, *Biochem Biophys Res Commun*, 446, 702-8.
- Mjosberg, J. M., Trifari, S., Crellin, N. K., Peters, C. P., van Drunen, C. M., Piet, B., Fokkens, W. J., Cupedo, T. and Spits, H., 2011, Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161, *Nat Immunol*, 12, 1055-62.
- Murakami, H., Tamasawa, N., Matsui, J., Yasujima, M. and Suda, T., 2000, Plasma oxysterols and tocopherol in patients with diabetes mellitus and hyperlipidemia, *Lipids*, 35, 333-8.

- Murphy, R. C. and Johnson, K. M., 2008, Cholesterol, reactive oxygen species, and the formation of biologically active mediators, *J Biol Chem*, 283, 15521-5.
- National Asthma Education and Prevention Program, 2007, Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma-Summary Report 2007, *J Allergy Clin Immunol*, 120, S94-138.
- Nelson, J. A., Steckbeck, S. R. and Spencer, T. A., 1981, Biosynthesis of 24,25-epoxycholesterol from squalene 2,3;22,23-dioxide, *J Biol Chem*, 256, 1067-8.
- Neumann, D., Beermann, S. and Seifert, R., 2010, Does the histamine H4 receptor have a pro- or anti-inflammatory role in murine bronchial asthma?, *Pharmacology*, 85, 217-23.
- Nguyen, S. and Fenn, J. B., 2007, Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions, *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 1111-7.
- Nielsen, F., Mikkelsen, B.B., Nielsen, J.B., Andersen, H.R., Grandjean, P., 1997, Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors, *Clin Chem*, 43(7), 1209-14.
- Ober, C. and Yao, T. C., 2011, The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective, *Immunological Reviews*, 242, 10-30.
- Olkkonen, V. M., Beaslas, O. and Nissila, E., 2012a, Oxysterols and their cellular effectors, *Biomolecules*, 2, 76-103.
- Olkkonen, V. M. and Hynynen, R., 2009, Interactions of oxysterols with membranes and protein., *Mol Aspects Med*, 30, 123-33.
- Otaegui-Arrazola, A., Menendez-Carreno, M., Ansorena, D. and Astiasaran, I., 2010, Oxysterols: a world to explore, *Food Chem Toxicol*, 48, 3289-303.
- Palozza, P., Serini, S., Verdecchia, S., Ameruso, M., Trombino, S., Picci, N., Monego, G. and Ranelletti, F. O., 2007, Redox regulation of 7-ketocholesterol-induced apoptosis by beta-carotene in human macrophages, *Free Radic Biol Med*, 42, 1579-90.
- Panini, S. R. and Sinensky, M. S., 2001, Mechanisms of oxysterol-induced apoptosis, *Curr Opin Lipidol*, 12, 529-33.
- Parantainen, J., Vapaatalo, H. and Hokkanen, E., 1986, Clinical aspects of prostaglandins and leukotrienes in migraine, *Cephalalgia*, 6 Suppl 4, 95-101.
- Park, C.-S., Kim, T.-B., Lee, K.-Y., Moon, K.-A., Bae, Y.-J., Jang, M.K., Cho, Y.S. and Moon, H.-B., 2009, Increased oxidative stress in the airway and development of allergic inflammation in a Mouse model of asthma, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 103(3), 238-247.
- Patadia, M. O., Murrill, L. L. and Corey, J., 2014, Asthma: symptoms and presentation, *Otolaryngologic Clinics of North America*, 47, 23-32.






- Patra, S. K., 2008, Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer, *Biochim Biophys Acta*, 1785, 182-206.
- Poli, G., Biasi, F. and Leonarduzzi, G., 2013, Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases, *Redox Biol*, 1, 125-30.
- Porkkala-Sarataho, E., Salonen, J. T., Nyysönen, K., Kaikkonen, J., Salonen, R., Ristonmaa, U., Diczfalusy, U., Brigelius-Flohe, R., Loft, S. and Poulsen, H. E., 2000, Long-term effects of vitamin E, vitamin C, and combined supplementation on urinary 7-hydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine, serum cholesterol oxidation products, and oxidation resistance of lipids in nondepleted men, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 2087-93.
- Prunet, C., Montange, T., Vejux, A., Laubriet, A., Rohmer, J. F., Riedinger, J. M., Athias, A., Lemaire-Ewing, S., Neel, D., Petit, J. M., Steinmetz, E., Brenot, R., Gambert, P. and Lizard, G., 2006, Multiplexed flow cytometric analyses of pro- and anti-inflammatory cytokines in the culture media of oxysterol-treated human monocytic cells and in the sera of atherosclerotic patients, *Cytometry A*, 69(5), 359-73.
- Quinn, M. T., Parthasarathy, S., Fong, L. G. and Steinberg, D., 1987, Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 2995-8.
- Rackemann, F. M., 1947, A working classification of asthma, *Am J Med*, 3, 601-6.
- Rahman, I., Morrison, D., Donaldson, K. and Macnee, W., 1996, Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers, *Am J Respir Crit Care Med*, 154, 1055-60.
- Rahman, I., MacNee, W., 2000, Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation, *Eur Respir J*, 16:534-54.
- Rath, N., Raje, N. and Rosenwasser, L., 2018, Immunoglobulin E as a biomarker in asthma, *Immunol Allergy Clin North Am*, 38, 587-597.
- Richardson, J. A., Amantea, C. M., Kianmahd, B., Tetradis, S., Lieberman, J. R., Hahn, T. J. and Parhami, F., 2007, Oxysterol-induced osteoblastic differentiation of pluripotent mesenchymal cells is mediated through a PKC- and PKA-dependent pathway, *J Cell Biochem*, 100, 1131-45.
- Ruan, B., Wilson, W. K. and Schroepfer, G. J., Jr., 1999, An improved synthesis of (20R,22R)-cholest-5-ene-3beta,20,22-triol, an intermediate in steroid hormone formation and an activator of nuclear orphan receptor LXR alpha, *Steroids*, 64, 385-95.
- Russell, D. W., 2000, Oxysterol biosynthetic enzymes, *Biochim Biophys Acta*, 1529, 126-35.
- Sagdic, A., Sener, O., Bulucu, F., Karadurmus, N., Ozel, 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, *Allergol Immunopathol (Madr)*, 39, 200-5.
- Sahiner, U. M., Birben, E., Erzurum, S., Sackesen, C. and Kalayci, O., 2011, Oxidative stress in asthma, *World Allergy Organ J*, 4, 151-8.

- Samadi, A., Gurlek, A., Sendur, S. N., Karahan, S., Akbiyik, F. and Lay, I., 2018, Oxysterol species: reliable markers of oxidative stress in diabetes mellitus, *J Endocrinol Invest*, 42(1), 7-17.
- Schroeder, J. T., 2009, Basophils beyond effector cells of allergic inflammation, *Adv Immunol*, 101, 123-61.
- Schroepfer, G. J., Jr., 2000, Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes, *Physiol Rev*, 80, 361-554.
- Sever, N., Yang, T., Brown, M. S., Goldstein, J. L. and Debose-Boyd, R. A., 2003, Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain, *Mol Cell*, 11, 25-33.
- Slater, T. F., 1984, Overview of methods used for detecting lipid peroxidation, *Methods Enzymol*, 105, 283-93.
- Sokol, C. L., Barton, G. M., Farr, A. G. and Medzhitov, R., 2008, A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses, *Nat Immunol*, 9, 310-8.
- Spann, N. J. and Glass, C. K., 2013, Sterols and oxysterols in immune cell function, *Nat Immunol*, 14, 893-900.
- Stone, K. D., Prussin, C. and Metcalfe, D. D., 2010, IgE, mast cells, basophils, and eosinophils, *J Allergy Clin Immunol*, 125, S73-80.
- Szedlacsek, S. E., Wasowicz, E., Hulea, S. A., Nishida, H. I., Kummerow, F. A. and Nishida, T., 1995, Esterification of oxysterols by human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase, *J Biol Chem*, 270, 11812-9.
- Thomas, C. E. and Aust, S. D., 1986, Free radicals and environmental toxins, *Ann Emerg Med*, 15, 1075-83.
- Türk Toraks Derneği, Astım Tanı ve Tedavi Rehberi, 2016, *Turkish Thoracic Journal*, 17 (Suppl. 1).
- Türkiye Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Derneği, 2017, *XXIV. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi, 18-22 Kasım 2017, Antalya, Türkiye, Bildiri Özet Kitabı, Turkish National Society of Allergy And Clinical Immunology*, 15(Suppl.2).
- Van Reyk, D. M. and Jessup, W., 1999, The macrophage in atherosclerosis: modulation of cell function by sterols, *J Leukoc Biol*, 66, 557-61.
- Van Rijt, L.S., Utsch, L., Lutter, R. and van Ree, R., 2017, Oxidative Stress: Promoter of Allergic Sensitization to Protease Allergens?, *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1112; 2-15.
- Vaya, J., Szuchman, A., Tavori, H. and Aluf, Y., 2011, Oxysterols formation as a reflection of biochemical pathways: summary of *in vitro* and *in vivo* studies, *Chem Phys Lipids*, 164, 438-42.

- Wang, J., Megha, A. and London, E., 2004, Relationship between sterol/steroid structure and participation in ordered lipid domains (lipid rafts): implications for lipid raft structure and function, *Biochemistry*, 43, 1010-1018.
- Wenzel, S. E., 2006, Asthma: defining of the persistent adult phenotypes, *Lancet*, 368, 804-13.
- Woldegebriel, M. and Vivó-Truyols, G., 2015, Probabilistic model for untargeted peak detection in LC-MS using bayesian statistic., *Analytical chemistry*, 87, 7345-7355.
- Wood, L. G., Gibson, P. G. and Garg, M. L., 2003, Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma, *Eur Respir J*, 21, 177-86.
- Xiao, J. F., Zhou, B. and Resson, H. W., 2012, Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 32, 1-14.
- Zarrouk, A., Vejux, A., Mackrill, J., O'Callaghan, Y., Hammami, M., O'Brien, N. and Lizard, G., 2014a, Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes, *Ageing Res Rev*, 18, 148-62.
- Zarrouk, A., Vejux, A., Mackrill, J., O'Callaghan, Y., Hammami, M., O'Brien, N. and Lizard, G., 2014b, Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes, *Ageing Research Reviews*, 18, 148-162.
- Zhang, H. F., Basra, H. J. and Steinbrecher, U. P., 1990, Effects of oxidatively modified LDL on cholesterol esterification in cultured macrophages, *J Lipid Res*, 31, 1361-9.
- Zhang, Y., Yu, C., Liu, J., Spencer, T. A., Chang, C. C. and Chang, T. Y., 2003, Cholesterol is superior to 7-ketocholesterol or 7 alpha-hydroxycholesterol as an allosteric activator for acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 1, *J Biol Chem*, 278, 11642-7.
- Zhang, Z., Li, D., Blanchard, D. E., Lear, S. R., Erickson, S. K. and Spencer, T. A., 2001, Key regulatory oxysterols in liver: analysis as delta4-3-ketone derivatives by HPLC and response to physiological perturbations, *J Lipid Res*, 42, 649-58.
- Zuo, L., Koozechian, M. S. and Chen, L. L., 2014, Characterization of reactive nitrogen species in allergic asthma, *Ann Allergy Asthma Immunol*, 112, 18-22.

**EKLER**

	<p style="text-align: center;"><b>T.C.</b> <b>İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ</b> <b>İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ</b> <b>KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU</b></p>	
<p><b>Sayı : 1535</b> <b>Konu: Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA hk.</b></p>		<p><b>Tarih : 28.12.2017</b></p>
<p><b>Sayın Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA</b> <b>Fen Fakültesi</b></p> <p><b>İlgi : Fen Fakültesi Dekanlığının 04/12/2017 gün ve 452780 sayılı yazısı</b></p> <p>Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz ve Yüksek Lisans Öğrencisi Behnoush NASR ZANJANI' in yürüteceği 2017/1421 dosya numaralı "Alerjik Astım Hastalığında Plazma 7-Ketokolesterol ve Kolesterol-3β,5α,6β-triol Düzeylerinin Rolü" başlıklı çalışma kurulumuzun 22/12/2017 tarih ve 21 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.</p> <p>Bilgilerinizi rica ederim.</p>		
<p> <b>Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN</b> <b>İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar</b> <b>Etik Kurul Başkanı</b></p>		
<p><b>Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu</b></p>		

## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Behnoush NASR ZANJANI
Doğum Yeri	İRAN
Doğum Tarihi	29.01.1991
Uyruğu	<input type="checkbox"/> T.C. <input checked="" type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	5394638183
E-Posta Adresi	behnush.nz@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İslamic Azad University Of Zanjan
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji Ve Genetik
Mezuniyet Yılı	06.06.2013

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji Ve Genetik
Programı	Moleküler Biyoloji Ve Genetik

Makale ve Bildiriler
Nasr Zanjani B, Samadi A, Gelincik A, Büyüköztürk S, Lay I and Arda N 2018. Plasma 7-Ketocholesterol, Cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol and Malondialdehyde Levels in Allergic Asthma Patients. <i>ENOR 8th Symposium Oxysterols and Sterols: from lipidomics to food sciences</i> , Italy.