

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**ALERJİK RİNİTLİ RATLARIN BURUN MUKOZALARINDAKİ
AQP5 DÜZEYLERİ ÜZERİNE SPESİFİK PROTEİN KİNAZ A
İNHİBİTÖRÜ OLAN H89'UN ETKİLERİ**

Dr. Yücel KURT

**UZMANLIK TEZİ
KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Hasan YASAN**

ISPARTA – 2012

ÖNSÖZ

Asistanlığım süresince birlikte çalışma onuruna eriştiğim, eğitimime büyük katkıları bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Mustafa TÜZ'e, Prof. Dr. Ali ALTUNTAŞ'a, Prof. Dr. Murat YARIKTAŞ'a, Yard. Doç. Dr. Giray AYNALI'ya, ayrıca eğitimimde büyük hakkı olan yardımlarını esirgemeyen, aynı zamanda tez danışmanı hocam Doç. Dr. Hasan YASAN'a,

Berber cerrahinin yoğun temposunu yüklediğimiz sevgili çalışma arkadaşlarım Dr. Mustafa DOĞAN, Dr. Fatih ÜNAL, Dr. Abdurrahman YETİŞ, Dr. İsmail ÇOBAN, Dr. M. Emre SİVRİCE, Dr. Bilal SARATAŞ'a; bana emeği geçen kıdemli asistanlarım Op. Dr. İlhan KÜÇÜKKAYA, Op. Dr. Tamara AKSU, Op. Dr. Mustafa ÖZKAN, Op. Dr. Sami GÜMÜŞ, Op. Dr. Oğuz ERDOĞAN'a,

Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi çalışanlarına, biricik ameliyathane hemşiremiz, güzel insan Dilek ALTINDAL'a, tüm KBB servis hemşirelerimiz ve personelimize, odyologlarımız ve poliklinik hemşire ve sekreterlerimize, kardeşliğini ve dostluğunu her zaman hissettiğim Araş. Gör. Mustafa SAYGIN'a ve histolojik çalışmalarda gece gündüz uğraşan güler yüzlü arkadaşım Araş. Gör. İ. Aydın CANDAN'a,

2926-TU-11 proje numarası ile tezimin yazımına destek sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Hayatım boyunca ev arkadaşı olarak yaşadığım dostum Dr. Recep DİNÇER'e ve haklarını asla ödeyemeyeceğim canım Anneme, Babama, çok sevdiğim kardeşlerim Yüksel ve Esma'ya teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Yücel KURT
ISPARTA-2012

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Alerjik Rinitte Tanı ve İnsidans	2
2.2. Alerjik Rinitte İnflamasyon.....	3
2.3. Teşhis ve Muayene Yöntemleri	4
2.4. Alerji ile İlgili Tanı Testleri	7
2.4.1. Nazal Smear	7
2.4.2. In-vivo Testler	7
2.4.2.1. Cilt Testleri	7
2.4.2.2. Hedef Organa Provokasyon Testleri	8
2.4.3. In-vitro Testler	8
2.5. Alerjik Rinitin Tedavisi.....	9
2.5.1. Alerjiden Korunma ve Çevre Kontrolü	9
2.5.2. İlaç Tedavisi	10
2.5.2.1. Antihistaminikler	10
2.5.2.2. Dekonjestanlar.....	10
2.5.2.3. Mast Hücre Stabilizörleri	10
2.5.2.4. Kortikosteroidler	10
2.5.2.5. Antikolinergik Ajanlar	11
2.5.3. İmmünoterapi	11
2.6. Aquaporinler	12
2.6.1. Aquaporinlerin Yapısı.....	13
2.6.2. Aquaporinlerin Biyolojik Fonksiyonu	15
2.6.3. Aquaporinlerin Sınıflandırılması	16

2.7. Protein Kinaz A ve cAMP Sinyal İleti Sistemi.....	20
2.8. H89; Spesifik Protein Kinaz A İnhibitörü.....	22
2.9. Dimetil sülfoksit (DMSO)	22
3. MATERYAL ve METOD	24
3.1. Gruplar ve Alerjik Rinit Modelinin Oluşturulması.....	24
3.2. Topikal Uygulanan İlaçların Hazırlanışı ve Dozu Şu Şekilde Olacaktır	26
3.3. Deneysel Alerjik Rinit Oluşturulması.....	26
3.4. Sham Grubuna İlaç Uygulaması	27
3.5. H89 Grubuna İlaç Uygulaması.....	27
3.6. Dokuların Elde Edilmesi	29
3.7. Doku Takip Çalışmaları	29
3.8. İmmünohistokimyasal Çalışmalar.....	30
3.9. İncelenen Parametreler	34
3.10. İstatistik.....	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. Histolojik Değerlendirme.....	36
4.1.1. Silya Kaybı.....	38
4.1.2. Goblet Hücre Artışı.....	39
4.1.3. Bağ Dokusu Artışı.....	40
4.1.4. Vasküler Konjesyon.....	41
4.1.5. Vasküler Proliferasyon.....	42
4.1.6. Enflamatuar Hücre İnfiltrasyonu.....	43
4.1.7. Eozinofil İnfiltrasyonu	44
4.1.8. Mukozal Bezlerde Dejenerasyon	45
4.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	50
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	56
ÖZET.....	70
SUMMARY	71
KAYNAKLAR	72

KISALTMALAR DİZİNİ

AR	: Alerjik rinit
K⁺	: Potasyum
Ig	: İmmunglobulin
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
nm	: Nanometre
ECP	: Eozinofil katyonik protein
MBP	: Major basic protein
nm	: Nanometre
MIP	: Lens major intrinsic protein
Asn	: Asparajin
Pro	: Prolin
Ala	: Alanin
Phe58	: Fenilalanin
Cys191	: Sistein
Arj197	: Arjinin
TEA	: Tetraetilamonyum
i.p.	: İntraperitoneal
i.n.	: İntranazal
PKA	: Protein Kinaz A
PKG	: Protein Kinaz G
PKC	: Protein Kinaz C
OVA	: Ovalbumin
mg	: Miligram
HE	: Hemotoksilen-eozin
ICAM-1	: Hücrelerarası adezyon molekülü-1
VCAM-1	: Vasküler hücre adhezyon molekülü-1
TNF-alfa	: Tümör nekrozis faktör-alfa
NF-κB	: Nuclear factor kappa B
PDTC	: Proline dithiocarbamate
NPA	: Asparagine-Proline-Alanine

μM	: Mikromol
RAST	: Radio Allergo Sorbent Test
GPCR	: G proteinine bağlı reseptörler
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
PBS	: Phosphate Buffer Solution
Y.Ç.K.S.P.E	: Yalancı çok katlı silyalı prizmatik epitelyum
Sk	: Silya kaybı
Gha	: Goblet hücre artışı
Vask	: Vasküler konjesyon
Vasp	: Vasküler proliferasyon
Ehi	: Enflamatuar hücre infiltrasyonu
Eozinf	: Eozinofil infiltrasyonu
Bda	: Bağ dokusu artışı
Mbd	: Mukozal bezlerde dejenerasyon

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Histolojik bulgular semikantitatif değerlendirme tablosu.....	36
Tablo 2. Histolojik parametrelerin ortalama ve standart sapmaları	37
Tablo 3. Silya kaybının gruplar arası p değerleri tablosu.....	38
Tablo 4. Silya kaybının gruplar arası n değerleri ve yüzdeleri tablosu.....	38
Tablo 5. Goblet hücre artışı gruplar arası p değerleri tablosu	39
Tablo 6. Goblet hücre artışı gruplar arası n değerleri ve yüzdeleri tablosu	39
Tablo 7. Bağ dokusu artışı gruplar arası p değerleri tablosu.....	40
Tablo 8. Bağ dokusu artışı gruplar arası n değerleri ve yüzdeleri tablosu	40
Tablo 9. Vasküler konjesyon gruplar arası p değerleri tablosu	41
Tablo 10. Vasküler konjesyon gruplar arası n değerleri ve yüzdeleri tablosu	41
Tablo 11. Vasküler proliferasyon gruplar arası p değerleri tablosu	42
Tablo 12. Vasküler proliferasyon gruplar arası n değerleri ve yüzdeleri tablosu	42
Tablo 13. Enflamatuar hücre infiltrasyonu gruplar arası p değerleri tablosu.....	43
Tablo 14. Enflamatuar hücre infiltrasyonu gruplar arası n değerleri ve yüzdeleri tablosu	43
Tablo 15. Eozinofil infiltrasyonu gruplar arası p değerleri tablosu.....	44
Tablo 16. Eozinofil infiltrasyonu gruplar arası n değerleri ve yüzdeleri tablosu	44
Tablo 17. Mukozal bezlerde dejenerasyon gruplar arası p değerleri tablosu	45
Tablo 18. Mukozal bezlerde dejenerasyonun gruplar arası n değerleri ve yüzdeleri tablosu	45
Tablo 19. İmmünohistokimyasal olarak gruplar ve boyanma dereceleri	50
Tablo 20. AQP5 immünohistokimyasal boyanmasının gruplar arası p değerleri tablosu	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Alerjik rinitte inflamasyon.....	4
Şekil 2. Alerjik rinitte görülen semptomların yüzde tablosu	6
Şekil 3. Aquaporinlerin hücre membranındaki yapısı	14
Şekil 4. Aquaporinlerin hour glass yapısı	14
Şekil 5. Aquaporinlerin NPA alt üniteleri ve hücre membranındaki üç boyutlu yapısı	15
Şekil 6. H89'un moleküler yapısı	22
Şekil 7 . Gruplar arası silya kaybı karşılaştırmasını gösteren tablo	38
Şekil 8. Gruplar arası goblet hücre artışı karşılaştırmasını gösteren tablo	39
Şekil 9. Gruplar arası bağ dokusu artışı karşılaştırmasını gösteren tablo	40
Şekil 10. Gruplar arası vasküler konjesyon karşılaştırmasını gösteren tablo	41
Şekil 11. Gruplar arası vasküler proliferasyon karşılaştırmasını gösteren tablo	42
Şekil 12. Gruplar arası enflamatuar hücre infiltrasyonu karşılaştırmasını gösteren tablo.....	43
Şekil 13. Gruplar arası eozinofil infiltrasyonu karşılaştırmasını gösteren tablo.....	44
Şekil 14. Gruplar arası mukozal bezlerde dejenerasyon karşılaştırmasını gösteren tablo.....	45
Şekil 15. Gruplar arası AQP5 boyanmasının karşılaştırmasını gösteren tablo.....	51
Şekil 16. A, B, C: cAMP yolağının etki mekanizması.	62

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Wistar albino cinsi ratlar	25
Resim 2. Hassas terazi	25
Resim 3. Kullanılan ovalbumin, DMSO ve H89 şişeleri	26
Resim 4. İntranazal ilaç uygulaması	28
Resim 5. İntraperitoneal ilaç uygulaması	28
Resim 6. Parafin blokların alınması.....	33
Resim 7. Histolojik incelemede kullanılan mikroskop ve fotoğraf makinesi.....	34
Resim 8. Histolojik preparat blokları.....	34
Resim 9. Nazal mukozanın epitel yapısı normal histolojik görünümde izlenmekte (H-E X 40)	46
Resim 10. Nazal mukozanın epitel yapısı normal histolojik görünümde izlenmekte (H-E X 40)	46
Resim 11. Sham grubu. Lamina propriya tabakasındaki damarlarda vasküler konjesyon ve proliferasyon, goblet hücre artışı görülmekte. (H-E X 40) Sarı ok: Vasküler konjesyon, Mavi ok: Goblet hücre artışı	47
Resim 12. Sham grubu. Nazal mukozadaki epitel hücrelerinde silya kaybı, konjesyon, proliferasyon ve mukozal bezlerde dejenerasyon görülmekte. (H-E X 40) Kırmızı ok: Silya kaybı, Beyaz ok: Mukozal bezlerde dejenerasyon.....	47
Resim 13. Alerjik rinit grubu. Nazal mukozadaki epitel hücrelerinde silya kaybı ve goblet hücre artışı, vasküler konjesyon ve proliferasyon, bağ dokusundaki mukozal bezlerde artış ve dejenerasyon görülmekte. (H-E X 20) Beyaz ok: Mukozal bezlerde dejenerasyon, Sarı ok: Vasküler konjesyon	48
Resim 14. Alerjik rinit grubu: Nazal mukozadaki epitel hücrelerinde silya kaybı ve goblet hücre artışı, mukozal bezlerde artış ve dejenerasyon, eozinofilik ve enflamatuar hücre infiltrasyonu. (H-E X 40) Kırmızı ok: Silya kaybı, Yeşil ok: Eozinofil hücre infiltrasyonu, Mavi ok: Goblet hücre artışı	48
Resim 15. H89 grubu. Nazal mukozadaki epitel hücrelerinde silya kaybında azalma ve goblet hücre sayısında azalma, vasküler konjesyon ve proliferasyon, mukozal bez sayısında ve dejenerasyonda azalma eozinofilik ve enflamatuar hücre göçünde azalma gözlenmekte. Kırmızı ok: Silya kaybı, Sarı ok: Vasküler konjesyon.....	49
Resim 16. H89 grubu. Nazal mukozada silyalı epitel hücreleri normal histolojik görünümde. (H-E X 40)	49
Resim 17. Kontrol grubu. Nazal mukozadaki epitel hücrelerinde AQP5 boyaması negatif olarak görünmekte. (A: AQP5 X 40) (B: AQP5 X 20).....	52
Resim 18. Sham grubu. Nazal mukozadaki epitel hücrelerinde AQP5 boyaması (+) hafif olarak gözlenmekte. (A: AQP5 X 40)	53

Resim 19. Alerjik rinit grubu: Nazal mukozadaki epitel hücrelerinde AQP5 boyaması (++) (orta şiddette boyanmış) olarak gözlenmekte. (A: AQP5 X 40) (B: AQP5 X 20) 54

Resim 20. H89 grubu: Nazal mukozadaki epitel hücrelerinde AQP5 boyaması (-) (boyanma yok) olarak gözlenmekte. (A:AQP5 X 40) (B:AQP5 X20) 55

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Allerjik rinit (AR) son yıllarda toplumda %25-%35 ve hatta bazı bölgelerde %44,2 ile yüksek oranda görülebilen insanların yaşam kalitesini oldukça etkileyebilen Ig-E ile ilişkili nazal inflamasyon oluşturan bir sağlık problemidir (1).

Aquaporinler (AQP) havayollarındaki sıvı osmotik dengesi üzerinde önemli rolleri olan (2) ve daha çok 2000'li yıllardan sonra keşfedilmiş ve üzerinde ciddi araştırmalar yapılan henüz yeni bir konudur. AQP5 ise aquaporinler ailesinin seröz salgı bezleriyle ve üst hava yolları patolojileri (astım, KOAH vs.) (3) ile yakın ilişkili olduğu tespit edilen bir üyesidir. Bir transmembran su kanal proteini olan AQP5, alveolar epitel apikal yüzünde, üst hava yolları ve nazofarenks submukozal epitelinde su transportunda önemli bir rolü vardır (4). AQP5'in mukozadaki bu görevi cAMP-Protein Kinaz A yolağı üzerinden etkilediği ve bunu çeşitli kademelerde durdurmanın mümkün olduğunu son çalışmalar göstermiştir (5).

Bu çalışmada henüz yeni keşfedilmiş ve üzerinde son zamanlarda ciddi çalışmalar olan spesifik bir protein kinaz A inhibitörü olan H89 [N-(2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl)-5-isoquinolinesulfonamide, di-HCL tuzunun burun mukozasındaki AQP5 düzeyini cAMP-PKA yolağını bloke ederek azaltıp azaltmadığı ve mukozal ödem vs. gibi diğer inflamasyon bulgularını iyileştirip iyileştiremeyeceği araştırılmıştır. Ayrıca AQP5 düzeyinin allerjik rinit modelinde nasıl etkileyeceği de belirlenmeye çalışılmıştır.

Literatürde H89 ile ilgili hücre kültürü çalışmaları mevcut olup henüz canlılar üzerinde ve nazal topikal uygulaması ile ilgili bir yayına rastlanmamıştır. Çalışmamız H89 ile ilgili literatüre ciddi katkılar yapacak olan bir deneysel hayvan modeli oluşturacaktır.

Sonuç olarak toplum sağlığını sık etkileyen allerjik rinitin patofizyolojisinde keşfi henüz yeni sayılabilecek bir transport proteini olan AQP5 üzerine yine üzerindeki araştırmaların yeni olduğu ve intranazal topikal kullanımı ile ilgili çalışmaların olmadığı bir maddenin H89'un etkisi araştırılmıştır. Böylece allerjik rinitin tedavisi üzerine yeni bir etken madde araştırılması ve yeni bir metod geliştirilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alerjik Rinitte Tanı ve İnsidans

Alerjik rinit en sık rastlanılan alerjik hastalıktır. Alerjik rinit, alerjene maruz kaldıktan sonra IgE aracılığı ile oluşan nazal mukozanın kronik inflamatuvar tip 1 aşırı duyarlılık reaksiyonu olarak tanımlanabilir. Sıklığı ülke, bölge, şehir, kırsal kesime göre değişmekle birlikte genelde % 25-35 ve hatta bazı bölgelerde % 44 olarak bildirilmiştir (7). Özellikle son 20 yıldır insanların yaşam kalitesini etkileyen önemli ciddi bir hastalık olarak algılanmaya başlanmıştır. Alerjik rinit tipik olarak 40 yaşından önce başlar ve ortalama başlangıç yaşı 12-15 arasındadır. Çalışmalar çocukların %10'unun, adolesan çağındakilerin ise %20-30'unun alerjik rinitli olduklarını göstermiştir. Aile öyküsü verenlerde insidans %30-48 arasındadır (8).

Alerjik rinitte semptomları tetikleyen en önemli etken doğal olarak hastanın duyarlı olduğu antijenlerdir. Alerjenler spesifik IgE antikorunu oluşturan ve bu antikor ile reaksiyona giren antijenlerdir. Alerjenler genelde protein veya glikoprotein yapısındadır. Bir alerjen ekstraktının içinde çok sayıda antijen bulunmaktadır. Bu antijenlerin tümü duyarlılığa neden olmazlar, az sayıda hastada duyarlanmaya yol açanlar minör alerjenler olarak isimlendirilirler. Hastaların yarısından fazlasında duyarlanmaya neden olan alerjenler ise majör alerjenler olarak adlandırılırlar ve ekstraktın toplam ağırlığının %1'ini oluşturur (9).

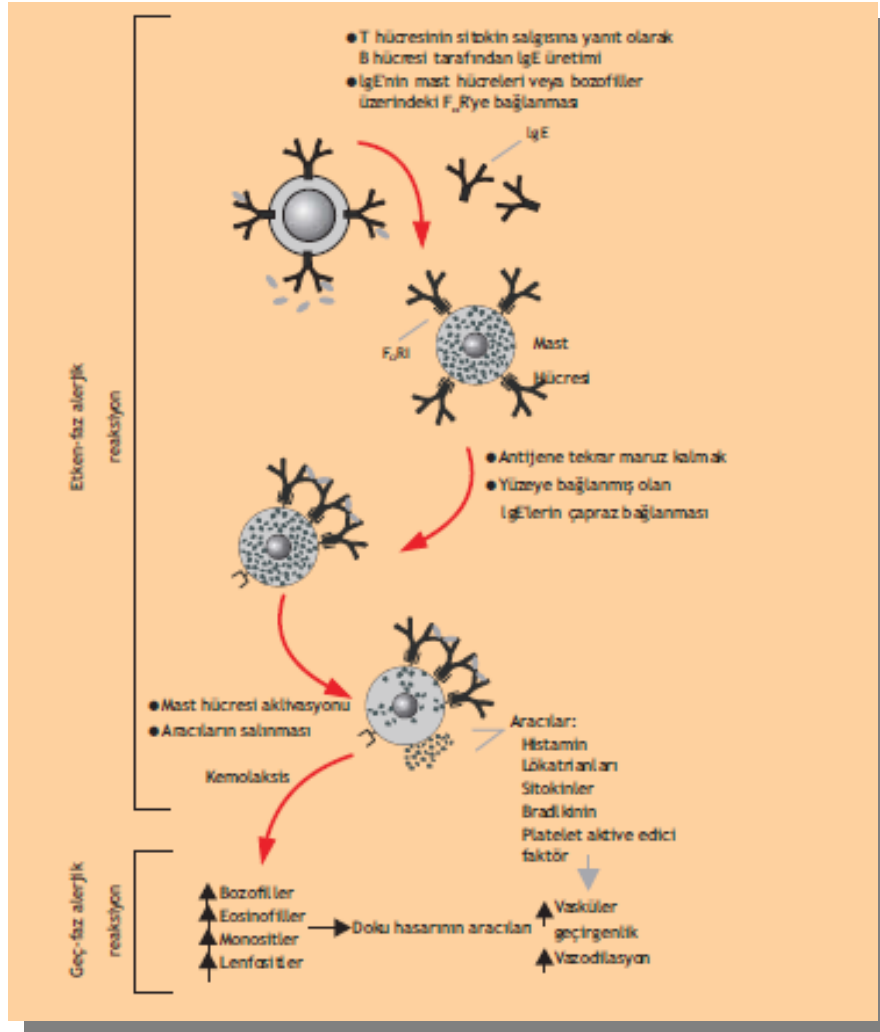
Alerjik rinit, mevsimsel alerjik rinit, perennial alerjik rinit ve mikst tip alerjik rinit olmak üzere 3 tipe ayrılır. Daha çok polenlerin sorumlu olduğu mevsimsel alerjik rinit sıklıkla burun kaşıntısı ve ardarda gelen hapşırıklara neden olur. Perennial alerjik rinit (AR) ise alerjik rinitlerin yıl boyu süren, belli bir mevsime bağlı olmayan formudur.

Semptomlar mevsimsel formla benzerlik göstermekle birlikte burun tıkanıklığı daha belirgindir. Yapılan bir çalışmada AR hastalarında %72'si mikst, %17'si mevsimsel ve %11'i perennial alerjik rinit olarak değerlendirilmiştir (10).

2.2. Alerjik Rinitte İnflamasyon

Alerjik reaksiyon atopik kişide karşılaşılan alerjenin antijeni sunan hücre tarafından işlenerek Th lenfositine sunulması, Th2 lenfositlerin aktivasyonu ile B lenfositten IgE (immünglobulin E) salınması ve bunların bazofil, mast hücresi ve eozinofil gibi Fc reseptörü bulunan hücelere bağlanarak kişinin sensitize olması ile başlar. Organizma yeniden aynı alerjene maruz kaldığında bu hücrelerdeki IgE'ye bağlanmasıyla salınan mediyatörler ve çeşitli maddelerin oluşturduğu patolojik reaksiyonlar görülür. Bu alerjenler mast hücresi üzerindeki IgE'ye bağlanırlar. Alerjenin mast hücresine bağlı en az 2 spesifik IgE molekülü ile çapraz bağlanması, mast hücresi degranülasyonu ve histamin, triptaz, prostaglandin, tromboksan A2, bradikinin, platelet aktive edici faktör ve lökotrien C4 gibi mediatörlerin salınması ile sonuçlanır. Bu mediatörlerin endotel, sinirler, damarlar ve muköz bezler üzerindeki etkisi ile vazodilatasyon, mukus yapımında artış, hapsirik, burun akıntısı ortaya çıkar (11). Bunlar Tip 1 immün yanıtın akut fazını oluştururlar. Mast hücresinden salınan histamin damar endoteli üzerinde P selektin ortaya çıkışına neden olarak lökosit adezyonunun ilk basamağı olan 'rolling' olayını başlatır. Yine, mast hücresinden tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) salınımı; E- selektin, vasküler hücre adhezyon molekülü-1 (VCAM-1), hücrelerarası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) gibi lökosit endotel adezyon moleküllerinin upregülasyonuna ve bunu izleyen lökosit-endotel adezyonu ve kemotaktik uyarılar altında transendotelial migrasyonuna neden olur. Ayrıca mast hücresinden IL-4 salınımı VCAM-1 upregülasyonu yapmakta, IL-5 salınımı ise eozinofil aktivasyonu ve kemotaksisine götürmektedir. Mast hücresi ve epitel gibi diğer hücrelerden IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 gibi sitokinler, eotaxin 1, 2, 3 gibi kemokinler ve GM-CSF gibi eozinofil growth faktörler de salınabilir. Eozinofil ve T lenfosit gibi inflamatuvar hücrelerin mukozaya göçünde sitokinler ve kemokinler ve bunların endotel üzerinde adezyon molekülleri ortaya çıkışına etkisinin önemli rolü vardır. Mukozaya göç eden eozinofiller bundan sonra eozinofil katyonik protein (ECP), major basic protein (MBP) ve diğer inflamatuvar maddeleri salarak inflamasyona katılırlar. Bu aktif eozinofiller, T lenfositler, bazofiller ve bunlar kaynaklı mediatörler, enzimler, sitokinler alerjen maruziyetini izleyen 3-6 saat sonra ortaya çıkan geç faz olaylara aracılık ederler (11). Akut fazın sürmekte olan hapsirik ve burun akıntısına bu

dönemde burun tıkanıklığı da katılarak alerjik rinitin tüm klinik tablosu tamamlanmış olur (şekil- 1).



Şekil 1. Alerjik rinitte inflamasyon

(The Allergy Report. The American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, 2000'den alınmıştır)

2.3. Teşhis ve Muayene Yöntemleri

AR tanısında anamnez ve fizik muayene bulguları ön plandadır. Hastalarda burun akıntısı, hapşırık, burunda kaşıntı ve burun tıkanıklığı en belirgin semptomlardır. Bu yakınmalar gündüzleri artan, geceleri azalan genellikle diüurnal bir ritim gösterir. Alerjik inflamasyon çoğu zaman nazal hava yoluna sınırlı kalmaz. AR sıklıkla diğer alerjik hastalıklar ve üst solunum yolu patolojileri ile birlikte görülür.

Astım, alerjik konjoktivit, sinüzit, nazal polipozis ve otitis media AR ile birlikte görülen hastalıklardır (11).

Fizik muayenede nazal mukozanın soluk pembe, mavimsi renkte ve ödemli görüntüsü dikkati çeker. Bununla birlikte alerjik selam, burunda transvers çizgi de görülebilir, endoskopik incelemede nazal polipozis saptanabilir. AR' li hastalarda ayrıntılı bir nazal muayene gereklidir (11).

Göz belirti ve Bulguları

1. Uzun, ipek gibi kirpikler
2. Dennie – Morgan çizgileri: Alt göz kapağında venöz staza bağlı olarak oluşan horizontal çizgiler
3. Konjoktivit, gözlerde yanma, kaşınma, sulanma
4. Alerjik shiner: Alt göz kapağının altındaki derinin renginin koyulaşmasıdır.

Alt göz kapağında görülen bu koyulaşmanın nedeni kronik venöz staza sekonder epidermiste hemosiderin toplanmasıdır (12).

Burun Belirti ve Bulguları

1- Kaşıntı

2- Alerjik selam: Alerji hastası, el ayası ile burun ucunu yukarı kaldırarak, hem burun kaşıntısını gidermeye çalışır, hem de bu hareket sayesinde nazal valv açısını genişleterek burun solunumunun rahatlamasını sağlar. Burun supratipinde çizginin oluşması için bu hareketin en az 2 yıldır yapılıyor olması gerekir.

3- Burun solunumunda güçlük

4- Burun ucunda maserasyon, nazal kavitede seröz sekresyon

5- Refleks olarak, yüz ve burun buruşturmak (12).

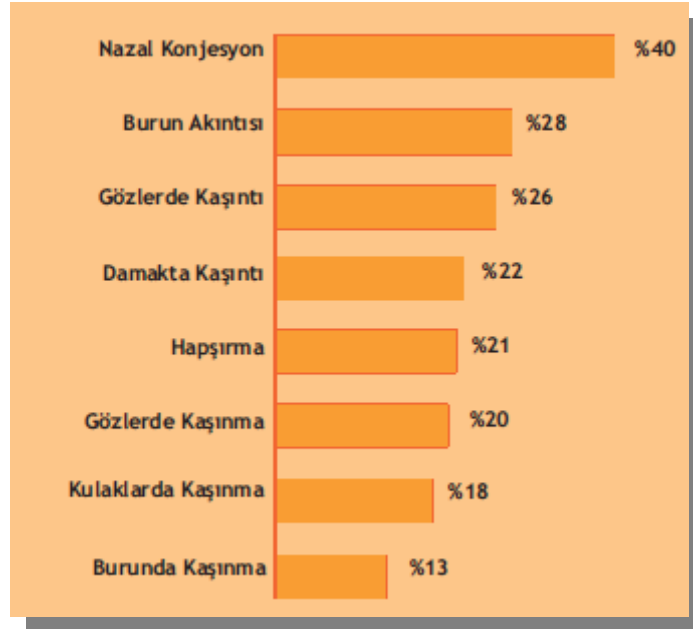
Ağız Belirti ve Bulguları

1- Damak ve genizde kaşıntı

2- Dental ark ve damakta gelişim hataları

3- Ağız solunumu ve ağız açıklığı (Adenoid yüz)

4- Ağız açıklığına bağlı olarak tükürük asiditesinin artmasına bağlı diş çürümelere (12).



Şekil 2. Alerjik rinitte görülen semptomların yüzde tablosu

(Roper Public Affairs Group of NOP World. Impact of nasal congestion among allergic rhinitis sufferers. May– June 2004'den alınmıştır)

Alerjik Rinitli Hastalar için 2001 ARIA (Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma) Uzlaşma Raporu kriterlerine (6) göre:

1. Öyküde tipik alerjik rinit semptomlarının varlığı (burun akıntısı, hapşırık, burun tıkanıklığı ve burun kaşıntısı şikayetlerinden en az ikisinin hemen hergün ve 1 saatten uzun süre olması)
2. Alerjik deri testinde pozitiflik saptanması
3. Semptomların genellikle gündüz artış gösterip gece azalması (diurnal ritim)
4. Endoskopik nazal muayenede seröz ve/veya muköz akıntı; soluk, mavimsi renkte ve ödemli mukoza, nazal pasajda daralma, konkalarda hipertrofi ve/veya polipoid görünüm saptanması
5. Serum total ve/veya spesifik IgE yüksekliği.

İlk iki maddenin pozitif olması alerjik rinit olarak tanımlanır. Diğerleri ayırıcı tanı ve ilave hastalık bakımından tanıyı desteklemek için kullanılır.

2.4. Alerji ile İlgili Tanı Testleri

2.4.1. Nazal Smear

Nazal yayma, alerjik ve nonalerjik rinitlerin ayırıcı tanısında önerilen bir tanı yöntemidir. Burun akıntısı bir lam üzerine yayılarak giemza boyası ile boyanır ve ışık mikroskopu ile incelenir. Eozinofil sayısı sayılan hücrelerin %15'inden fazla ise nazal eozinofiliden bahsedilir. Sensitivitesi düşük fakat spesifitesi yüksek bir testtir. Eozinofili görülmemesi alerjik riniti ekarte ettirmez. Klinik olarak alerjik rinit tanısı konulan hastaların hepsinde nazal yayma yapmaya gerek yoktur (109).

2.4.2. In-vivo Testler

2.4.2.1. Cilt Testleri

Cilt testleri hasta cildinde spesifik alerjenle reaksiyona girecek IgE antikorların olup olmadığını tespit etmek amacıyla kullanılır. Eğer IgE antikorları varsa antijen antikor birleşmesi sonucu mast hücrelerinden histamin açığa çıkar ve test bölgesinde endürasyon ve hiperemi oluşur. Yapılan test hastada IgE antikorlarının seviyesini de dolaylı olarak verir. Birçok çalışmada cilt testleri ile klinik semptomlar ve serumda spesifik IgE ve total IgE arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Klinikte en çok kullanılan deri testleri epikütan (Prik, Stratch) ve intradermal testlerdir.

Prik test: Prik test özellikle alerjik rinite sebep olan çeşitli alerjenlerin ortaya konulmasında en güvenilir ve yaygın olarak kullanılan testlerden biridir. Prik test basittir, kolay uygulanır, hastaya az acı verir ve ucuzdur. Test solüsyonları stabildir. Sonuçları semptomlar ile çok iyi korelasyon gösterir. Komplikasyonları azdır. Sensitivite düşüklüğüne bağlı olarak ortaya çıkan yanlış negatif reaksiyon en önemli dezavantajıdır. Tüm prik test yöntemleri yanlış negatif sonuçlar verebilir. Prik testin sensitivitesi % 73.2- 82.5 arasında değişmektedir (11).

Scratch test: Bu yöntemde oldukça konsantre antijen solüsyonundan deri üzerine bir damla damlatılır ve sivri uçlu bir alet ile damlanın içinden geçilerek, cildin yüzeysel tabakasında bir çizik yapılır. Bu testin bir varyasyonunda ise, önce cildin yüzeysel tabakası çizilir ve daha sonra bu çizik üzerine antijen solüsyonu damlatılır. Derideki reaksiyon, 0'dan 4' e kadar olan bir skala ile değerlendirilir (12).

İntradermal testler: Antijen ekstraları küçük miktarlarda deri içine enjekte edilir. İntradermal test, spesifik alerjik duyarlılığın tespitinde, scratch ve prick testlere oranla daha kesin sonuçlar verir (12). Test sonuçları 15-20 dakika içinde, endürasyonun çapına göre değerlendirilir. Sensitivitesi daha yüksektir, fakat daha fazla zaman alır, ağrı verir, yalancı pozitif reaksiyon riski ve anafilaksi riski fazladır. Bronş hiperreaktivitesi olan hastalarda, çok düşük dozlar bile astım atağını başlatabilir.

2.4.2.2. Hedef Organa Provokasyon Testleri

Nazal provokasyon testi: Özellikle mesleksi rinit tanısında ve araştırma amaçlı kullanılır.

Nazal mukosilier klirens ölçümü: Araştırma amaçlı kullanılır.

Nazal havayolunun değerlendirilmesi: Rinomanometri ve akustik rinometri alerjik rinitli hastalarda havayolunun objektif olarak değerlendirilmesi için kullanılan yöntemlerdir. Görüntüleme yöntemleri AR tanısı için genellikle gerekli değildir. Ancak eşlik edebilecek üst solunum yolu patolojilerinin belirlenmesinde yardımcıdır (11).

2.4.3. In-vitro Testler

Total IgE ölçülmesi: IgE alerjik hastaların, yaklaşık %50'sinde normal bulunabilir. Dolayısıyla bu testin tanısal değeri sınırlıdır. Total Ig E yüksekliği birçok durumda ortaya çıkabilir (viral enfeksiyonlar, Parazit vs.) . Fakat total Ig E değeri yüksek bulunan hastaların, ileri tetkikler ile IgE duyarlılıklarının araştırılması gerekli olacaktır (12).

Alerjen spesifik IgE: Serum içindeki alerjen spesifik Ig E'nin tespitinde immünoradiometrik metodlar (RAST, F/N mRAST, ELISA, Chemiluminometrik

analiz vb.) kullanılır. RAST (Radio Allergo Sorbent Test) bu metodlar içinde en iyi bilinenidir. Testte kullanılan alerjen ekstraları bir protein antijeni karışımıdır. Bu karışımlar içinde 20 ile 50 arasında antijen bulunur. Antijen spesifik IgE'nin tespitinde kullanılan metodların duyarlılığı, kullanılan ekstralara bağlı olarak değişkendir. İnhalan alerjiler için RAST sisteminin duyarlılığı %60-80 ve spesivitesi % 90'dan fazladır. RAST testi pozitif ise, hastaların büyük bir çoğunluğu Ig E sensitiftir (12).

2.5. Alerjik Rinitin Tedavisi

Alerjik rinitte tedavi alerjiden korunma ve çevre kontrolü, medikal tedavi, immünoterapi olmak üzere 3 başlıkta incelenebilir (16).

2.5.1. Alerjiden Korunma ve Çevre Kontrolü

Alerjik rinit tedavisinde başarı için ilk koşul alerjiden korunmaktır (24). Genel bir kural olarak polenler ve mantar sporları gibi dış ortam alerjenleri ile temasın kontrolü, ev içi alerjenlerin kontrolünden daha güçtür. Ne yapılırsa yapılsın bazı karşılaşmaları önlemek mümkün olmayabilir. Ancak temas miktarının azaltılması bile hastanın yaşam konforunda ve ek ilaç kullanma gereksiniminde önemli iyileşmeler sağlayabilir. Özetle hastaların polen oluşturan kaynaklardan uzak durmaları (polen mevsiminde pikniğe ve açık havaya çıkmaktan sakınılması gibi), evde veya arabada kapı ve pencerelerin polen mevsimi boyunca kapalı tutulması, gerekirse maske takılması önerilebilir. Özellikle kuru ve rüzgarlı havalarda havadaki polen yükünün en yüksek seviyeye çıktığı, yağışlı havada polenlerin yere ineceği mutlaka hastalara anlatılmalıdır. Ev içi alerjenlerden korunma da ise evlerin yeterince havalandırılması ve yeterince güneş görmesi, nem ve rutubetten korunması, geçirgen olmayan yatak örtüleri, yıkanabilir yatak, yorgan ve yastık kullanılması, evde hayvan beslenmemesi ve hayvansal ürünlerden yapılmış eşyaların kullanılmaması, tozların ortadan kaldırılması gerekir. Örtü, yastık, yatak dipleri ve battaniyeler her hafta vakumlanmalı, yatak takımları sentetik olmalı, haftada bir 60 derecede yıkanmalıdır. Mobilya, pencere kenarları, perde tozları haftada bir ıslak bezle silinmelidir. Akarasitler mite sayısını azaltmada faydalı olabilir (17).

2.5.2. İlaç Tedavisi

2.5.2.1. Antihistaminikler

Antihistaminikler H1 reseptörlerini bloke ederek histaminin neden olduğu düz adele kontraksiyonu, vasküler permeabilite artışı, sekresyon artışı ve kaşıntı gibi reaksiyonların oluşmasını önler. Etki mekanizmaları dikkate alındığında antihistaminikler alerjenle karşılaşmadan önce verildiğinde maksimum ölçüde etkindirler. Klasik olarak antihistaminikler sedatif ve non-sedatifler olarak gruplandırılırlar (19). Antihistaminikler sistemik kullanımın yanısıra nazal mukozaya topikal olarak da kullanılabilirler. Antihistaminikler alejik rinit olgularının burun akıntısı, geniz akıntısı, hapşırma, kaşıntı hissi gibi semptomlarının düzeltilmesine oldukça etkilidir. Nazal konjesyona fazla etkisi yoktur (19).

2.5.2.2. Dekonjestanlar

Dekonjestanlar alfa adrenerjik reseptörlere etki ederek nazal mukozada vazokonstriksiyon oluştururlar ve geçici olarak konka ve mukozadaki şişliği azaltırlar. Dekonjestanlar nazal havayolunu açarlar ve burun tıkanıklığı semptomunun düzelmesini sağlarlar, buna karşılık alejik hastalardaki burun akıntısı, kaşıntı ve hapşırma şikayetlerine etkileri yoktur. Dekonjestanların topikal ve sistemik (oral) preparatları vardır (19).

2.5.2.3. Mast Hücre Stabilizörleri

Mast hücre stabilizörleri (kromolin sodyum ve nedokromil sodyum) sensitize olmuş mast hücreleri ile reaksiyona girerek degranülasyonu inhibe eder ve histamin, lökotrien C/D gibi enflamatuar mediatörlerin salımına engel olurlar. Antijenle temastan önce kullanıldığında hastanın erken ve geç dönem alejik reaksiyonlarını önler (19). Nazal sprey formları vardır. Proflaktik amaçla alerjenle karşılaşmadan önce ve terapotik amaçla alerji mevsimi boyunca kullanılmaktadırlar (19).

2.5.2.4. Kortikosteroidler

Alerjik rinitin tedavisinde en sık kullanılan ajan topikal nazal steroidlerdir. Kortikosteroidler güçlü anti-enflamatuar ajanlardır. Sistemik olarak verilen

kortikosteroidler primer olarak geç faz reaksiyonları etkilerken topikal kortikosteroidler birkaç haftalık bir ön tedaviden sonra erken faz reaksiyonlarını da inhibe ederler. Sistemik kortikosteroidlerin alerjik hastalıklar tedavisindeki etkinliği uzun yıllardır bilinmesine karşın yan etkileri nedeni ile yaygın kullanıma girmemişlerdir. Topikal kortikosteroid preparatları uygulandıkları bölgede sistemik kullanımdakinden daha iyi bir etkinlik gösterirken dar yan etki profilleri ile de büyük avantaj sağlamaktadırlar. Mevsimsel alerjik rinitlilerde steroid tedaviye alerjen mevsimi başlamadan günler önce başlanması ve tedavinin alerjen mevsimi boyunca sürdürülmesi önerilmektedir (20).

2.5.2.5. Antikolinergik Ajanlar

Alerjik rinitte başlıca semptomun burun akıntısı olduğu durumlarda tercih edilebilirler. Burun mukozasındaki salgı bezlerinin uyarılması parasempatik sinir sistemi ile sağlandığından topikal etkili parasempatolitik ipratropium bromide methacoline'i inhibe ederek 6 saat süreyle nazal hipersekresyonu azaltır (20).

2.5.3. İmmünoterapi

Alerjik semptomlara yol açan antijenlerin düşük dozdan başlanarak giderek artan dozlarda verilmesi ile alerjenlere karşı oluşan immün yanıtların değiştirilmesi işlemidir. İmmünoterapi ile spesifik IgE artışı engellenmekte ve IgG antikorlarının sentezlenmesi sağlanmaktadır. En iyi sonuç çayır polenlerine karşı alınmaktadır. İmmünoterapi ilaçlarla semptomların kontrol altına alınmadığı, ilaç tedavisini kabul etmeyen ya da ilaçların istenmeyen reaksiyonlara neden olduğu hastalarda uygulanabilir. İmmünoterapi ciddi immün yetmezlikte, malignitelerde, ciddi psikiyatrik bozukluklarda, beta bloker kullananlarda, ağır astımlarda, anafilaksi durumunda epinefrin verildiğinde ciddi kardiovasküler problemi olacaklarda, 5 yaşın altında ve gebelerde yapılmaz. Ancak immünoterapiye başlanmışsa gebelerde tedaviye devam edilir. Genellikle subkutan enjeksiyon ile bazı merkezlerde ise sublingual, oral ya da nazal yoldan uygulanmaktadır. Dört-altı ay sonra sonuç alınmaya başlanırsa da asıl sonuç 3 sene sonra alınır. Sonuç alındığı takdirde bu süre 5 seneye çıkarılabilir. Etki süresinin ise uzun yıllar devam ettiği bildirilmiştir (21).

2.6. Aquaporinler

Evrensel bir çözücü olarak kabul edilen su canlıların ana yapıtaşıdır. Canlılığın sürdürülebilir olması için gerekli metabolik ozmotik, termal, elektrokimyasal dengenin ve besin ve kataboliklerin hücresel taşınmasında yaşamsal görevleri bulunmaktadır.

1920'lerde hücre zarının çift katlı lipit yapısı tanımlanmasıyla suyun sınırlı miktarlarda basit difüzyon ile membranı geçtiği kabul edilmiştir. Ancak renal tubüller, eritrositler ve salgı bezleri gibi dokularda suyun geçişi basit difüzyon ile açıklanabileceğinden daha fazla olarak gerçekleşmektedir. Araştırmacılar uzun zamanlar bu hızlı su transpotunu gerçekleştirecek ek yolların var olduğunu düşünmüşlerdir. Nihayet 1988 yılında ilk olarak eritrosit membranında Rh (D) antijeni ile birlikte orijinal ismi CHIP28 (kanal bağımlı integral protein, 28 kDa) olan su kanalı Peter Agree arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (22). 1992 yılında CHIP28 *Xenopus* oositleri üzerinde Preston ve arkadaşları tarafından tespit edilmesinden sadece 1 yıl sonra 1993 yılında Fushimi ve arkadaşları, renal toplayıcı kanalda su kanalının bir başka formunu tanımlanmıştır (23). Bu su kanal proteinlerine Agree ve arkadaşları, 1993 yılında "aquaporin" adını vermişlerdir (24). Agree aquaporinlerin yapı ve fonksiyonlarına yönelik çalışmalarından dolayı 2003 yılında Nobel kimya ödülünü almaya hak kazanmıştır.

Aquaporinler başlangıçta sadece su transpotunda görevli olduğu düşünülürken ilerleyen zamanlardaki çalışmalarda gliserol ya da üre gibi küçük, yüksüz solütlerin hücre membranlarından transportuna izin veren integral-membran su kanalı proteinleri olduğu anlaşıldı. Membran potansiyelinin ve intrasellüler pH'nın korunması, iyonların, özellikle de protonların geçişlerinin inhibe edilmesini gerektirmektedir (25).

Günümüzde insanlarda 13 tane aquaporin tanımlanmıştır. Bitki ve bakterilerde bu sayı 100'ü bulmaktadır (26).

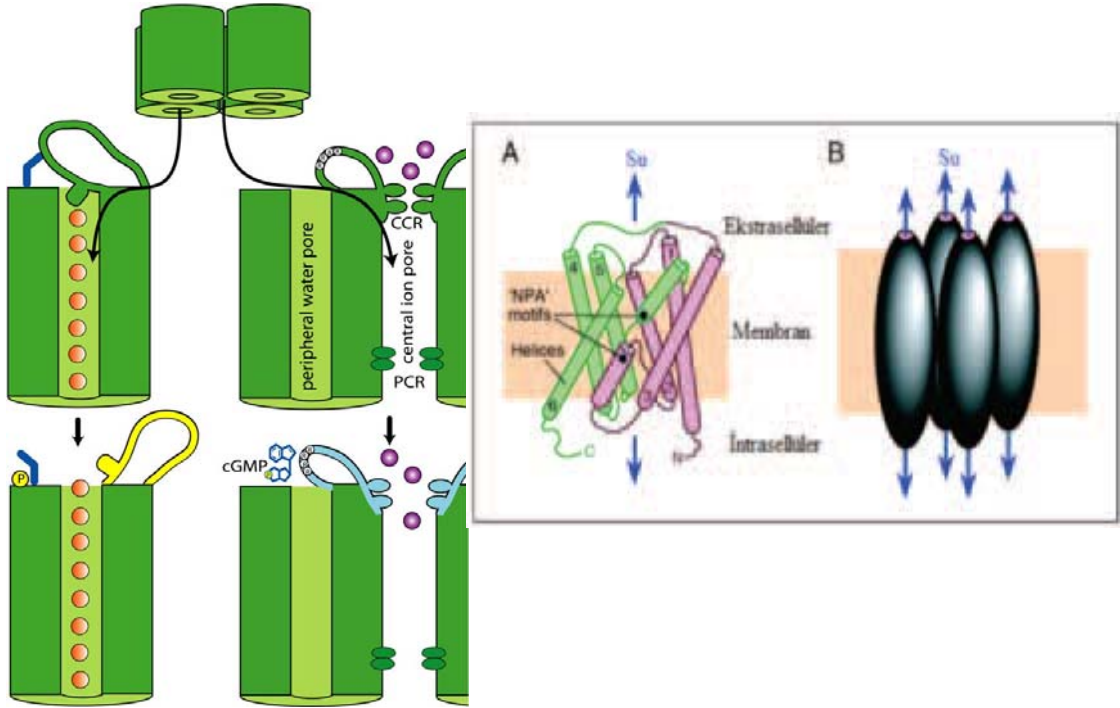
Dokuların suya permeabilitesi, aquaporin dağılımına bağlanabilir ve insan vücudundaki bütün dokular su dengesini ve hücre hacmini düzenleyen kendine has bir aquaporin dizisine sahiptir. Nefrojenik diyabetes insipidus, Sjögren sendromu, konjenital katarakt, ıslak akciğer sendromu, konjestif kalp yetmezliği ve beyin

ödemi gibi oldukça farklı hastalıkta aquaporinlerin yokluğu ya da disfonksiyonunun söz konusu olduğu düşünülmekte ve aquaporinler üzerinden tedavi yöntemleri üzerinde son zamanlarda birçok yeni araştırmalar yapılmaktadır (25).

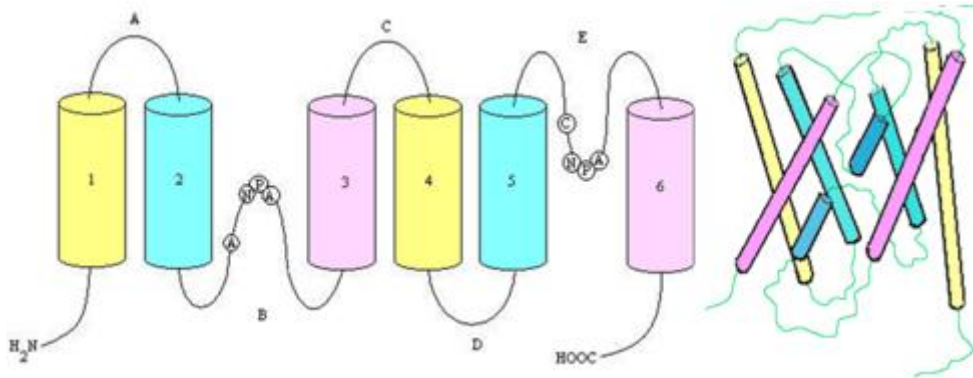
2.6.1. Aquaporinlerin Yapısı

Aquaporinler hücre membranlarında her biri yaklaşık 30 kDa büyüklüğündeki monomerlerden oluşan ve 7 nanometre (nm) yan uzunluğundaki "tetramer" yapısındadır. NH₂ and COOH uçlarına sahip olan her monomer her iki yöne su transportu sağlayabilen su porlarını çevreleyen sekiz adet transmembran segmentten oluşur. Bunlardan altı tanesi heliks yapıda diğer iki tanesi ise kısa segmenttir. Kısa segmentlerin bir tanesi 2-3 diğeri 5-6 helikal segmentler arasındadır. Kısa segmentler asparajin (Asn), prolin (Pro), alanin (Ala) içermektedir. Bunlara kısaca; Asparajin-Prolin-Alanin (NPA) sekansları denilmektedir. Bu segmentlerin döngüsel yapısı ile "hourglass" denilen kum saati yapısı oluşmaktadır. NPA içeren kısa heliksler porun ortasına doğru karşılıklı uzanırlar ve böylece yalnızca su geçişine izin veren spesifik bir filtre meydana getirirler. Monomerler arası boşluklar por görevi üstlenmiştir. Tek başına su moleküllerinin geçişine izin veren her monomer bir tane transmembran poruna sahiptir. Kanal altında, su gibi küçük moleküllerin geçişine izin veren, özellikli bir boğaz bölgesi mevcuttur. Boğazı meydana getiren yan zincirler fenilalanin (Phe58), histidin (His182), sistein (Cys191) ve arjininden (Arj197) meydana gelmektedir. Aquaporin 1 monomerinden uzanan rezidüel genellikle nonpolardır. Fakat su, geçiş esnasında peptid omurgasındaki karbonil grupları ile hidrojen bağı meydana getirir. Ayrıca NPA halkasındaki iki Asn rezidüsü su ile hidrojen bağı meydana getirir (Asn76,192). NPA sekansındaki Arj ve His pozitif yük oluşturarak su için itici kuvvet oluştururlar (26).

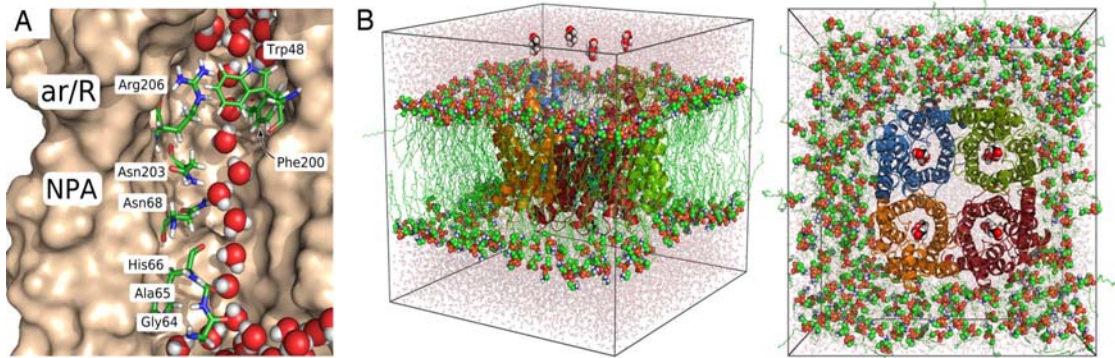
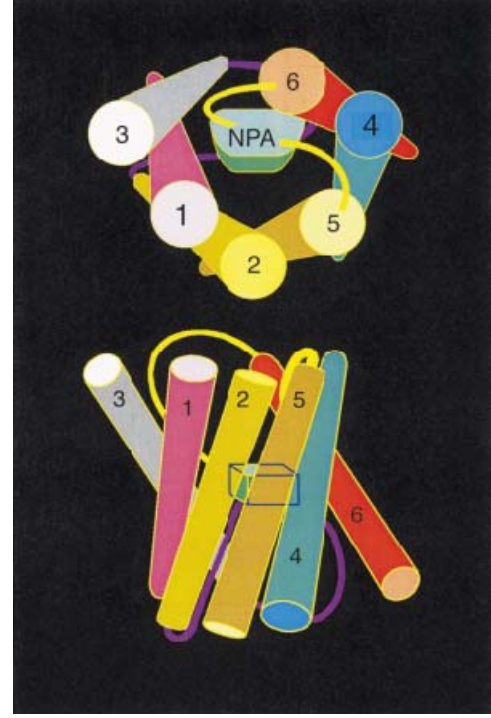
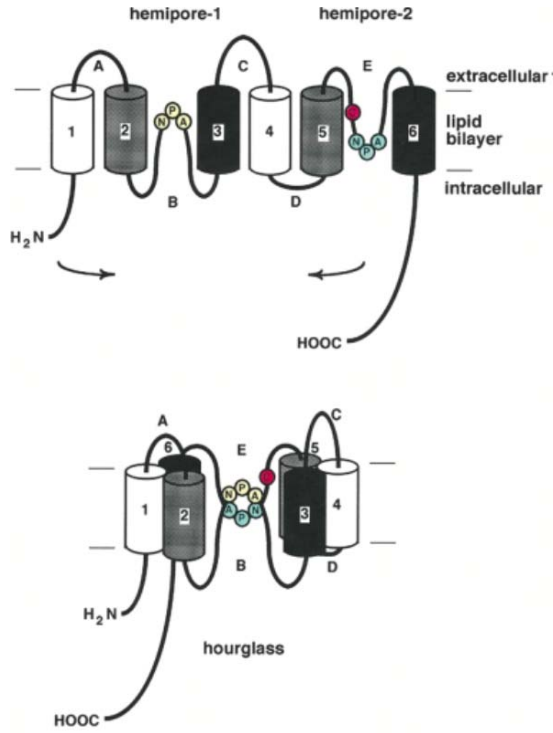
AQP2, AQP6 ve AQP8 istisnai olarak intrasellüler lokasyon göstermelerine karşın geri kalan diğerleri hücre membranına yerleşmiştir (27, 28, 29).



Şekil 3. Aquaporinlerin hücre membranındaki yapısı



Şekil 4. Aquaporinlerin hour glass yapısı



Şekil 5. Aquaporinlerin NPA alt üniteleri ve hücre membranındaki üç boyutlu yapısı

2.6.2. Aquaporinlerin Biyolojik Fonksiyonu

Temel fonksiyon olarak su transportunda görev alan aquaporinler ek olarak AQP1 CO₂, AQP (3, 7 ve 9) gliserol, üre ve AQP9 karbamid, poliol, pürin, arsenit ve purimidin taşımaktadırlar. Bazılarının ise hücre iskeleti ve hücre adezyonunda görev aldığı düşünülmektedir.

AQP4 en yüksek su geçirgenliğine sahipken AQP0 ve AQP3 en düşük geçirgenliğe sahiptir (30).

Su molekülleri aquaporin1 kanalından çok hızlı geçerler. Yaklaşık olarak bir saniyede 109 su molekülü kanaldan geçmektedir. Bu hız metabolik olaylar için oldukça fazla bir hızdır. Reaksiyon hızları organizmada iki şekilde artırılabilir. İlki ortam sıcaklığını arttırmak ki, bu protein yapısını bozacağı için tercih edilmez. İkincisi ise; serbest aktivasyon enerjisini düşürmek yoluyla reaksiyon hızını arttıran enzimlerdir. Karşılaştırma olarak; bilinen en yüksek turnover sayısına sahip enzim olan katalaz saniyede 4×10^7 substratı ürüne çevirmektedir. Katalazdan bile çok hızlı çalışan aquaporinler su moleküllerinin geçişine imkan vermektedir. Osmotik gradient boyunca suyun bu hızlı hareketi düşük aktivasyon enerjisi ile açıklanabilir ($G^+ < 15$ kJ/mol).

Aquaporinler protonların geçişine izin vermezler (Hidronyum iyonları, H_3O^+). Zaten böyle hızlı geçişte bu mümkün olsaydı, membranın elektrokimyasal gradienti bozulurdu.

2.6.3. Aquaporinlerin Sınıflandırılması

a) Klasik aquaporinler (AQP-1, -2, -4 ve -5), özellikle suya geçirgendirler.

b) Aquagliseropporinler (AQP-3, -7, -9 ve -10), suyla birlikte gliserol ve üre gibi küçük nonpolar solütlere ve bazıları karbamid, polioll, pürin, arsenit ve purimidine geçirgendirler.

c) Anortodoks aquaporinler (AQP-6, -8, -11, and -12), İyona geçirgen AQP 6, 8 veya aquaporin protein ailesinin yapısal özelliklerini kaybetmiş olan AQP 11,12 bu sınıflandırmanın dışında tutulabilir (31).

Aquaporin 0

AQP1'in tanımlanmasından önce lens fiber hücrelerinde yaygın bir protein olan AQP0 keşfedilmiş (35,36) ve lens major intrinsic protein (MIP) de olarak adlandırılmış fakat tam fonksiyonu anlaşılamamıştı. Bu aquaporin karaciğer ve lens dokusunda bulunur.

Oositlerde MIP (AQP0) uyarılmasıyla su geçirgenliğini artırması ve AQP1 den farklı olarak cıvayla inhibe olmaması MIP isminin AQP0 olarak değişmesini

sağladı (37). Diğer aquaporinlerden farklı olarak hücresel adezyonda (38) ve hücre iskeletinde görev alır (39).

AQP0'ın dağılımının ve fonksiyonundaki bozukluklar katarakt oluşumu ile ilişkili olduğu görülmüştür (27, 29, 32).

Aquaporin 1

AQP1, eski adı ile CHIP-28 olarak 1988 yılında eritrosit membranında ilk tespit edilen su kanal proteini. Eritrositlerin hareketi ve bu hücrelerdeki hızlı su transportu AQP1'in keşfi ile anlaşılmıştır. AQP1 ayrıca böbreklerde proksimal tüplerde ve Henlenin inen kolunda, akciğer dokusunda endotelial hücrelerde ve pnömositlerde, koroid pleksusve silier hücrelerde bulunmaktadır. Suyun transportu için çok önemli olan AQP1'in bu özelliği cıva ile inhibe edilebilmektedir. CO₂'e de geçirgenliği tespit edilen AQP1 gözde humor aközün sekresyon ve absorpsiyonunda ciddi görevi tespit edilmiştir. Bu nedenle glukom hastalığının patogenezinde rol aldığı düşünülmektedir. Altuntaş ve ark. yaptığı çalışmada nazal polip dokusunda normal mukozaya göre artmış AQP1 tespit etmişlerdir (27, 29, 32, 105). Hücre migrasyonunun düzenlenmesinde aquaporinlerin rolleri ilk kez melanoma tümörü implante edilmiş farelerde AQP1 ve vasküler endotelial hücreler için rapor edilmiştir (33). Genel olarak aquaporinlerin yokluğu hücre migrasyonunu 2-3 kat yavaşlatır (33, 34).

Aquaporin 2

Aquaporin 2 esas olarak renal toplayıcı tübüllerde bulunmakla beraber testislerde de yer alır. AQP2 istirahat halinde intraselüler yerleşimli iken aktif olduklarında hücre membranına doğru migrasyon yaparlar. Birçok fizyolojik ve patolojik olayın AQP2'nin ekspresyonu üzerine etkisi bulunmuştur. Bunlardan lityum, hipokalemi, hiponatremi, hiperkalsemi, renal hastalıklar ve karaciğer sirozu ekspresyonu azaltırken; konjestif kalp yetmezliği, anemi ve gebelik ise AQP2 ekspresyonunu arttırmaktadır. AQP2'nin fonksiyon bozukluğu nefrojenik diabetes insipitusa neden olmaktadır (27, 28, 40).

Son yıllarda meniere hastalığında Aquaporin 2'nin özel bir önemi olduğu keşfedildi. Aquaporin 2, guinea pig'de ve insanda endolenfatik kesede eksprese olmaktadır (41). Meniere hastalığının iç kulaktaki aquaporin-vazopressin sisteminin

bir disregülasyonu nedeniyle ortaya çıktığı öne sürülmüştür (42). Meniere hastalığında arjinin vazopressin plazma seviyeleri de daha yüksektir (43).

Aquaporin 3

AQP3, böbrek, gastrointestinal sistem, solunum sistemi, deri ve göz gibi oldukça geniş bir dokuda bulunmaktadır. Aquaporin 3, su haricinde gliserol ve üreye de geçirgendir. Fizyolojik karakteri tam aydınlatılmamış olmasına rağmen bu kanalların fonksiyonunun bozulması çeşitli renal hastalıklarla ilişkili bulunmuştur (27, 28, 40).

Aquaporin 3, endolenfatik kesede aquaporin 2 ve 4 ile ko-ekspresedir (44). Ancak farelerde aquaporin 3 hasarlanırsa bile normal işitme eşikleri ve normal iç kulak morfolojisi sergilenmektedir (45). İntraperitoneal steroid uygulamasını takiben, endolenfatik kesede bir aquaporin 3 mRNA up-regülasyonunun gerçekleştiğini göstererek tedavi edici potansiyeli bulunan birtakım yeni klinik girişimler geliştirilebilir (46).

Aquaporin 4

Aquaporin 4, merkezi sinir sistemindeki temel aquaporindir, astrosit ayaklı çıkıntılarında bol miktarda eksprese edilmektedir ve aquaporinler içinde en yüksek su permeabilitesine sahiptir. AQP4 ayrıca retina, gastrointestinal sistem, akciğer ve iskelet kaslarında bulunur. Beyinde, BOS üretimi ve absorpsiyonu, kan-beyin bariyeri arasındaki su transportu ve beyin ödemi fizyopatolojisinde görev alır. Retinada AQP4 kalsiyum kanalı ile beraber lokalize olur. İç kulakta tespit edilen aquaporin 4, farelerde hasarlandığı zaman işitme kaybı oluşmuştur (47, 48). AQP4 iskelet kaslarının sarkolemmasında da bulunur ve Duchenne ve Becker muskuler distrofisinde düzeylerinin arttığı saptanmıştır (28, 40, 49).

Aquaporin 5

İlk olarak submandibuler bezde tespit edilen AQP5 (50), submukozal bezlerin sekretuar hücrelerin apikal membranlarında tükürük bezleri, korneal epitel, tip-I alveoller, lakrimal ve tükürük bezleri gibi daha birçok dokuda da bulunur (51). Korneada hidrasyon, transparanlık ve yara iyileşmesi üzerine rolü olduğu düşünülmektedir. AQP5'in fonksiyon bozukluğunda astım, hiperhidrozis,

hipohidrozis, tükürük salgılanmasında bozukluk ve Sjögren sendromu gibi birçok hastalıkla ilişkili bulunmuştur (28, 52, 53). İnsanlarda özellikle akciğer ve solunum yolları hastalıklarında AQP5'in önemi vardır (40). AQP5 sıçan akciğerinde alveol tip 1 döşeyen epitel hücrelerinin apikal membranlarında lokalize edilmiştir (40). Bazı astım formlarının, içinde AQP5 kodlarının da yer aldığı kromozom 12q ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (54).

Aquaporin 5, sıçan kohleasının üst kıvrımlarındaki skala medyanın spiral çıkıntısında yer alan eksternal sulkus hücrelerinde bulunmaktadır (56). Ancak, Merves ve ark. (57), erişkin aquaporin 5 hasarlı farelerin işitme duyularının normal olduğunu ve iç kulak yapısal gelişiminin de normal bir şekilde yürüdüğünü bildirmişlerdir. Yang ve ark. (5) fare akciğer hücre kültürüne cpt-cAMP uyguladıklarında AQP5 düzeyinin arttığını ve bir protein kinaz A inhibitörü olan H89 ile müdahale edildiğinde AQP5 düzeyinin azaldığını göstermişlerdir. Parvin ve arkadaşları da barsak hücre kültürüne H89 uygulayarak AQP5 düzeylerinde azalma tespit ettiler (99).

AR modelinde nazal mukozaya Nuclear factor kappa B (NF-κB) inhibitörü olan proline dithiocarbamate (PDTC), uygulandığında AQP5 düzeylerinde azalma tespit ederek alerjik rinitte AQP5 üzerinden alternatif tedavi yolları olabileceğini keşfetmiştir (61).

Aquaporin 6

AQP6 da aynı AQP2 gibi intraselüler yerleşimli bir proteindir. AQP6 özellikle böbrek toplayıcı tübülleri ve alfa interkalar hücrelerde yer alır. Bu aquaporinler H⁺-ATP-az kanalları ile beraber yerleşimlidir ve düşük pH ile aktive olarak asit sekresyonu ve asit-baz dengesinde görev aldığı düşünülmektedir. Kronik asidoziste düzeyi değişmeyen AQP-6'in kronik alkolozis ve su yüklenmesinde seviyesinin arttığı görülmüştür (40, 28).

Aquaporin 7

AQP7 başlıca yağ dokusu, böbrekler ve spermatozoidlerde yerleşmektedir. Fonksiyonundaki bozuklukların şişmanlık üzerine etkisi bulunduğu üzerine çalışmalar bulunan AQP7'nin üre ve gliserola da geçirgenliği dikkat çekmektedir (40, 28).

Aquaporin 8

AQP8 ratlarda karaciğer, kolonun enterosit hücrelerinde, testislerin seminifer tübüllerinde epididim, eksokrin pankreas hücreleri, tükürük bezleri, böbrek ve bronşlarda yer alır (58, 59, 60). Farelerde ayrıca kalp, akciğer ve plasentada da tespit edilmiştir. İnsanlarda ise sadece testis ve pankreasda tespit edilmiştir (60).

Aquaporin 9

AQP9 karaciğer akciğer, dalak, lökositler, testis ve beyin dokusunda bulunan bir aquaporindir. AQP9 suyun yanı sıra gliserol, arsenit, karbamidler, polioller, pürinler ve pirimidinlerin transportunda görev almaktadırlar. AQP9 ayrıca glukoneogenez için gliserol sağlanmasında görev alır. Löseminin ilaçla tedavisinde arsenit geçirgenliği bir tedavi seçeneği olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (40, 28).

Aquaporin-10

AQP10, duodenum ve jejunumun enterositlerinin villuslarında oldukça yaygın olarak tespit edilmiştir. AQP3 ve AQP9 ile yakın ilişkisi olan AQP10'un diş, kas ve gingiva gelişiminde rol aldığı düşünülmektedir (66).

Aquaporin -11

AQP11, AQP12 ile yakından ilişkili olup testis, karaciğer, böbrek gibi dokularda tespit edilmiştir. Bazı çalışmalarda da beyin kalp, yağ dokusu, barsakta ve hipokampusun CA1, CA2 nöronlarında ve purkinje hücrelerinin dentritlerinde de tespit edilmiştir (68).

Aquaporin- 12

AQP12 insanlarda AQP8 ve farelerde AQP0 ve AQP6 ile yakın ilişkisi tespit edilmiştir (69). AQP12 özellikle ekzokrin pankreasın asiner hücrelerinde bulunmuş olup (69) bazı araştırmacılar barsak ve trakeada da olduğunu öne sürmüşlerse de AQP12 tam olarak öneminin ne olduğu tam olarak bilinmemektedir.

2.7. Protein Kinaz A ve cAMP Sinyal İleti Sistemi

Proteinlerin üç boyutlu uzaysal konfigürasyonları sabit değildir. Birçok mekanizma ile uzaysal konfigürasyonları değişir. Bunların en önemlisi yapılarına

fosfor eklenmesidir. Proteinlere fosfor eklenmesiyle üç boyutlu uzaysal konfigürasyonları değişir. Böylelikle diğer proteinler ile etkileşimleri aktive ya da inhibe edilmiş olur. Proteinlerin fosforilasyonunda anahtar rolü oynayan enzimler protein kinazlardır. Protein kinazların birçok çeşidi vardır. Siklik Adenozin Monofosfat (cAMP)'a bağımlı Protein Kinazlar (PKA) bunlardan birisidir. PKA'lar cAMP düzeyinin artışı ile etkinleşirler. Hücre büyümesi, farklılaşması ve iyon kanal modülasyonunda rol oynarlar.

Yaklaşık 50 yıldan beri bilinen cAMP, ilk olarak hormonların intraselüler etkilerine aracılık eden haberci proteinler olarak tanımlanmıştır. Ancak daha sonra etkilerinin endokrin sistemle sınırlı olmadığı aksine bilinen en yaygın intraselüler ikincil haberci proteinlerden birisi olarak homeostazisin idamesinde kritik öneme sahip olduğu bulunmuştur (62).

cAMP'nin sitoplazma içine salınımında G Proteinine Bağlı Reseptörler (GPCR) rol oynarlar. GPCR ismi Guanozindifosfat ve Guanozintrifosfat ile çalıştıkları için verilmiştir. Bütün GPCR'lar hücre zarını 7 kez geçen tek bir proteinden oluşurlar. GPCR'lar hücre zarının bir parçası değildir ve Alfa, Beta, Gama adı verilen birbirine bağlı üç protein alt birimden oluşurlar. GPCR'lar işlevleri ve yapıları farklı alfa alt birimlerine göre sınıflandırılırlar. Beta ve Gama alt birimleri ortaktır.

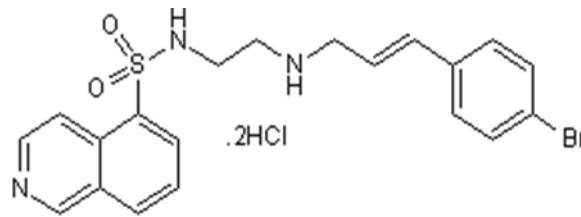
cAMP birçok kritik öneme sahip proteini aktifleştirebilir. Bununla birlikte cAMP'nin temel intraselüler hedefi Protein Kinaz-A (PKA)'dır. PKA ilk olarak 1968' de Krebs ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. cAMP'nin hücre içinde artışı PKA'yı aktifleştirir. Aktif hale gelen PKA hedef proteinlerin spesifik serin threonin kalıntılarına Adenozin Tri Fosfat (ATP)'tan fosfor transferini gerçekleştirir. Uzaysal konumu değişen proteinlerin aktiviteleri değişir. İntraselüler substratların PKA bağımlı fosforilasyonu hücre motilitesi, metabolizması, farklılaşması, sinaptik ileti, iyon kanal aktiviteleri, büyüme ve gen transkripsiyonu gibi bir çok hücre fonksiyonunu kontrol eder (63).

PKA serin-treonin kinaz aktivitesine sahip bir holoenzimdir. Dört alt birimi vardır. İki alt birimi düzenleyicidir. R sembolü ile gösterilir. Diğer iki alt birimi ise katalitiktir. C sembolü ile gösterilir. Katalitik alt birimler C alfa, C beta, C gama

olmak üzere üç farklı gen tarafından eksprese edilirler. Düzenleyici alt birimler ise R1 alfa, R1 beta, R2 alfa, R2 beta olmak üzere dört farklı gen tarafından eksprese edilirler (64).

2.8. H89; Spesifik Protein Kinaz A İnhibitörü

H-89, cAMP'ye bağlı protein kinaz A (PKA)'nin selektif potent bir inhibitörüdür. Hücre kültürlerinde etkisini 10 μ M ile 30 μ M (70,71) arasında uygulandığında göstermektedir. Molekül formülü $C_{20}H_{20}BrN_3O_2S \cdot 2HCl$ olan H89; inhibitör etkisini kinaz katalitik subünitesine yarışmalı olarak bağlanarak göstermektedir (72). PKA'ya ilave olarak Protein Kinaz G (PKG) ve Protein Kinaz C (PKC)'ye de 500 nM'lık uygulamanın ardından değişik oranlarda bloke edici etkisi görülmüştür (73).



Şekil 6. H89'un moleküler yapısı

2.9. Dimetil sülfoksit (DMSO)

Formülü $(CH_3)_2SO$ olan organokükürt bileşiğidir. Molekül ağırlığı 78.13, erime noktası $18.3^\circ C$ 'dir. Rensiz ve sıvı halde olan bileşik önemli bir polar çözücüdür. Cilde kolayca nüfuz eder, ağızda sarımsak gibi bir tad bırakır. Dimethylsulfide'in oksijen ya da nitrogen dioxide ile oksidasyonu DMSO'yu verir. DMSO kimyasal reaksiyonlarda çözücü tuz olarak ve özellikle de Finkelstein reaksiyonları ve diğer nükleofilik yerdeğiştirme içeren kimyasal reaksiyonlar için çözücü olarak kullanılmaktadır. DMSO kağıt yapım bir kimyasal yan üründür ve endüstriyel bir çözücü, aynı zamanda ilaç olarak kullanılmıştır. İlaç olarak ağırlıklı lokal ağrı kesici olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bölgesel uygulamalarda anti-enflamatuar ve antioksidan olarak kullanılmaya başlanmıştır. Çünkü DMSO ciltten verilen bileşiklerin emilimini artırmakta, sadece ciltten değil tırnaklardan da nüfuz etmektedir. 1978'de FDA ABD'de DMSO' nun mesane iltihabında dokuların

tedavisinde kullanımını ve 2007'de FDA beyin dokusunda travmatik beyin hasarında şişmenin azaltılması için DMSO'nun klinik çalışmalarda kullanımını onaylamıştır(112).

DMSO'nun oksidatif bir formu olan Methylsulfonylmethane (MSM), ise aynı zamanda dimethyl sulfone (DMSO₂) ve methyl sulfone olarak bilinir ve doğada çeşitli meyve, sebze, tahıl ve hayvanlarda bulunabilen bir organik sülfür bileşenidir. Vücuda alınan DMSO'nun % 15'i MSM'ye metabolize olur (113). MSM'in , iktiyozis, horlama, spor yaralanmaları, romatoid artrit, otoimmün hastalıklar ve alerjik rinitte ve hatta kanser tedavisinde kullanılabileceği ile ilgili birçok çalışmalar yapılmış olup henüz üzerinde çalışmalar devam etmektedir (114).

3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvan Laboratuvarında yapılmıştır. Yaşları 12-16 ay olan, ağırlıkları 250-350 gr arasında değişen 32 adet beyaz Wistar Albino cinsi erkek rat çalışmaya dahil edildi. Çalışma, “2926-TU-11” proje numarası ile Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimince desteklenmiştir.

Hayvanlar her grupta 8 rat olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

3.1. Gruplar ve Alerjik Rinit Modelinin Oluşturulması

Hayvanlar her grupta 8 rat olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Gruplar sırası ile Kontrol, Sham, Alerjik Rinit, H89 olarak adlandırıldı.

1. Grup (Kontrol): Hiçbir işlem yapılmayan grup.

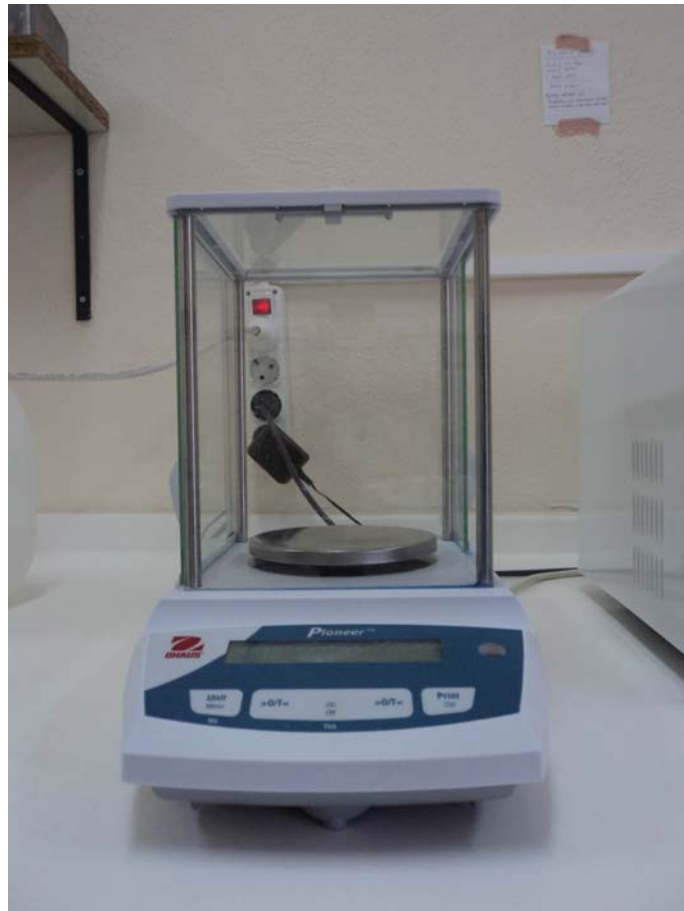
2. Grup (Sham): Chicken serum albumin (OVA, grade III) ile alerjik rinit oluşturulup daha sonra Dimethyl sulfoxide (DMSO) (tedavi edici özelliğini araştırdığımız H89 maddesinin çözüleceği solüsyon) verilen grup.

3. Grup (Alerjik Rinit): Chicken serum albumin (OVA, grade III) ile sensitize edildikten sonra deneysel alerjik rinit modeli oluşturulan ve başka ilaç verilmeyen grup.

4. Grup (H89): Yine OVA ile sensitize edilerek alerjik rinit modeli oluşturulan ratlara sadece H89 (LC laboratories Woburn MA, USA) adlı ilaç sprey şeklinde topikal intranazal olarak verilen grup.



Resim 1. Wistar albino cinsi ratlar



Resim 2. Hassas terazi

3.2. Topikal Uygulanan İlaçların Hazırlanışı ve Dozu Şu Şekilde Olacaktır

DMSO; ikinci gruba (sham) verdiğimiz bu maddeyi saf halde ucuna pipet taktığımız spreylemlerle intranazal 8, 9, 10 ve 14 ‘üncü günlerde verilen intranazal ovalbuminden 1’er saat önce tatbik edildi.

İntraperitoneal Ovalbumin; % 0.9 serum fizyolojik içinde OVA (25µgr/ml) ve alüminyum hidroksit (5mg/ml) olacak şekilde 200 ml’lik solüsyon hazırlandı.

Intranazal ovalbumin; 20 ml SF içinde 0,02 gr OVA çözülerek % 10’luk solüsyon hazırlandı.

H89 (LC laboratories Woburn MA, USA); 30 mikro molarlık 15 ml solüsyon hazırlandı.



Resim 3. Kullanılan ovalbumin, DMSO ve H89 şişeleri

3.3. Deneysel Alerjik Rinit Oluşturulması

Ratlarda deneysel alerjik rinit oluşturmak için modelimizde Ovalbumin (OVA) ile sensitizasyon tekniği kullanılmış olup, uygulamamız aşağıda açıklandığı şekilde yapılmıştır.

İntraperitoneal uygulama için hazırlanan ovalbumin solüsyonundan 2, 3 ve 4'üncü gruba, 1, 2, 3, 7 ve 10'uncu günlerde 1 ml intraperitoneal olarak verildi. Yedinci günden itibaren yine intranasal uygulama için hazırlanan ovalbumin solüsyonundan günde iki kez her iki burun deliğinden, her dozda 0.1 ml olacak şekilde ikişer puff 8, 9, 10 ve 14'üncü günlerde 2, 3 ve 4. gruplara nazal spreyle uygulanmıştır.

3.4. Sham Grubuna İlaç Uygulaması

Hazırlanan Ovalbumin çözeltisi Sham grubu olan 2. gruba 1, 2, 3, 7 ve 10'uncu günlerde 1 ml intraperitoneal olarak verildi. Hazırlanan DMSO solüsyonu ilk i.p. OVA uygulamasından sonraki 8, 9, 10 ve 14'üncü günlerde intranasal yolla her burun deliğine ikişer puff olacak şekilde verildi. Böylece her puffta 0.1 ml ikişer puff DMSO uygulandı. Her intranasal DMSO uygulamasının ardından 1 saat sonra hazırlanmış olan OVA solüsyonundan yine intranasal yolla her burun deliğine ikişer puff verildi.

3.5. H89 Grubuna İlaç Uygulaması

H89 grubu olan dördüncü gruba; yine hazırlanan Ovalbumin çözeltisi 1, 2, 3, 7 ve 10'uncu günlerde 1 ml intraperitoneal olarak verildi. Hazırlanan H89 solüsyonu ilk i.p. OVA uygulamasından sonraki 8, 9, 10 ve 14'üncü günlerde intranasal yolla her burun deliğine ikişer puff olarak verildi. Her intranasal H89 uygulamasından 1 saat sonra hazırlanmış olan OVA solüsyonunu yine intranasal yolla her burun deliğine ikişer puff verildi.

Böylece alerjik rinit oluşturulan ratlarda H89'un tedavi edici etkisinin olup olmadığı ve H89'un çözücüsü olarak kullandığımız DMSO'nun etkisinin ne derece olduğunu araştırmak için bir model oluşturmuş olduk.



Resim 4. İnanazal ilaç uygulaması



Resim 5. İnanperitoneal ilaç uygulaması

3.6. Dokuların Elde Edilmesi

Deneyisel çalışma sonunda, ratlar, intraperitoneal olarak uygulanan % 10'luk ketamin (Alfamin, Alfasan, Holland) %2'lik anestezisi altında dekapite edildi. Ratlar sakrifiye edildikten sonra nazal kaviteden makas, elevatör ve bistüri yardımıyla alt konkalar bilateral çıkartılarak nazal mukoza dokusu elde edildi ve formaldehit içerisine konuldu.

3.7. Doku Takip Çalışmaları

Nötral formaldehit ve paraformaldehit solüsyonunda, immersiyon fiksasyon yöntemi uygulanarak tespit edilen dokular yıkama işleminden sonra aşağıda gösterilen işlemlerden geçirildi.

A) Dehidratasyon

Dokular dereceli alkollerde aşağıdaki sürelerde bekletildi.

Alkol derecesi ve Süreleri

%50 1 saat

%70 1 saat

%80 1 saat

%90 1 saat

%96 1 saat

%100 1 gece beklendi.

B) Şeffaflaştırma İşlemi

Ksilolde 5-15 dk bekletildi.

C) Emdirme İşlemi

Ksilol+parafin (60° C etüvde) 15 dakika,

Yumuşak parafin (60° C etüvde) 1 saat,

Sert parafin (60° C etüvde) 4 saat bekletildi.

D) Gömme İşlemi

Sert parafin kullanılarak dokular bloklandı. Hazırlanan parafin bloklardan, Leica marka kızaklı mikrotom kullanılarak 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Histolojik değerlendirme için preparatlara Hematoksilen- Eozin ile rutin boyama yapıldı.

3.8. İmmunohistokimyasal Çalışmalar

a) Kesitlerin elde edilmesi:

Elde edilen tüm doku örnekleri, immersiyon fiksasyon yöntemiyle %10'luk nötral formaldehit solüsyonuna alındı ve 24 saat formaldehit solüsyonunda bekletildi. Daha sonra yukarıda sayılan rutin histolojik yöntemler kullanılarak dokular parafine gömülerek mikrotom (Leica tipi kızaklı mikrotom) ile alınan 4 µm kalınlığında seri kesitler lizinli lamlara alındı.

İmmunohistokimyasal boyamada kullanılan kimyasallar ve hazırlanışları:

Primer antikolar:

- VCAM-1 (Mouse Anti-ICAM-1 antibody) (Thermo Scientific, CA).
- iNOS (Mouse Anti-iNOS antibody) (Bioss, USA).

V-CAM antikoru 1:100 oranında, Antibody diluent (Bioss, USA) solüsyonu ile sulandırılacaklar. iNOS antikoru aynı şekilde, Antibody diluent (Bioss, USA) solüsyonu ile 1:50 oranında sulandırıldı.

Sekonder antikor:

Sekonder antikor olarak kullanılan goat-anti rabbit IgG (Abcam, UK) 1:200 oranında dilue edildi.

Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS; Phosphate Buffer Solution), (Thermo Scientific, CA):

Hazır PBS tabletlerin her biri 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı ve taze olarak kullanıldı.

Sodyum Sitrat Solüsyonu:

16,5 gr sodyum sitrat, 500 gr distile su ile karıştırılarak pH=6 olacak şekilde ayarlandı ve her boyama için taze solüsyon hazırlanarak kullanıldı.

%3'lük Hidrojen Peroksit Solüsyonu:

90 ml metanol üzerine 10 ml %30'luk hidrojen peroksit (Thermo Scientific, CA) eklenerek karıştırılır ve her boyama için taze solüsyon hazırlandı.

Kromojen:

DAB (diaminobenzidin), Horse-radish-peroksidaz enziminin substratı olarak kullanıldı. Üretici firmanın (Thermo Scientific, CA) önerisine göre 2 ml substrat için 1 damla kromojen içerecek şekilde karıştırıldı. Her karışım kullanımından yaklaşık 20 dk önce taze olarak hazırlandı.

Zıt Boyama:

Zıt boyamada amaç dokudaki antijenik olmayan hücre ve hücre yapılarını boyamaktır. Zıt boyama için hematoksilen (J.T. Baker, Holland) kullanıldı.

İmmünohistokimyasal Boyama İşlemi:

- 4 µm kalınlığında elde edilen parafin kesitler 37° C' de etüvde bir saat bekletildi,
- Deparafinizasyon işlemi için Ksilol-1'de 10 dk bekletildi,
- Deparafinizasyon işleminin devamı Ksilol-2'de 10 dk bekletildi,
- Dehidratasyon işlemi için sırasıyla %100'lük alkolde 5 dk bekletildi,
- %96'luk alkolde 5 dk,
- %90'luk alkolde 5 dk,
- %80'lik alkolde 5 dk,
- %70'lik alkolde 5 dk bekletildi.
- PBS solüsyonunda 5 dk bekletildi.
- Kesitler sodyum sitrat tamponunda 600W'a ayarlı mikrodalga fırında 1 dk ısıtılacaklar ve 20 dk oda sıcaklığında dokularla birlikte soğumaya bırakıldı.
- Kesitler üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.

- PAP Pen (Beckman Coulter, France) kalem ile polilizinli lamların üzerindeki doku kesitlerinin etrafı çizildi. Bu işlem ileriki safhalarda da gerekli görülerek 2 kere tekrarlandı.

- Dokuların üzerini kaplayacak şekilde ve diğer dokularla karışmamasına dikkat edilerek %3'lük H₂O₂ solüsyonu damlatıldı ve takiben 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.

- Kesitler üç ayrı PBS (Thermo Scientific, CA) solüsyonunda 3'er dk bekletildi.

- Dokunun üzerini kapatacak şekilde Ultra V Block (Thermo Scientific, CA) damlatıldı ve 10 dk bekletildi.

- Lamlardaki son kesitlere kontrol amacıyla sekonder antikor, diğer kesitlerin üzerine de primer antikor damlatılıp lamlar nemli kabin içerisinde +4°C'de bir gece bekletildi.

- Ertesi gün kesitler PBS-1, PBS-2 ve PBS-3'te 3'er dk bekletildi.

- Sekonder antikor (Abcam, UK), dokuların üzerini kaplayacak şekilde damlatılarak 10 dk beklendi.

- Kesitler üç ayrı PBS (Thermo Scientific, CA) solüsyonunda 3'er dk bekletildi.

- Dokunun üzerini tamamen kaplayacak şekilde Streptavidin Horseradish Peroksidaz (Thermo Scientific, CA) damlatılıp 10 dk beklendi.

- Kesitler üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.

- DAB solüsyonu (Thermo Scientific, CA), dokuların üzerine damlatılıp reaksiyon vermesi için 10dk beklendi.

- Kesitler üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.

- Zıt boyama Hematoksilen (JT Beker, Holland) ile 10 sn süresince yapıldı.

- Çeşme suyunda 5 dk yıkanacak. Sırasıyla %70, %80, %90 ve %100'lük alkol serilerinden batır çıkar yapılarak geçirildi.

- Kesitler şeffaflaşana kadar ksilolde bekletildi.

- Entellan kullanılarak kapama yapıldı.

Boyanan örnekler Olympus BX50 tipi binoküler mikroskopta incelendi ve fotoğraflar elde edilerek değerlendirildi.



Resim 6. Parafin blokların alınması



Resim 7. Histolojik incelemede kullanılan mikroskop ve fotoğraf makinesi



Resim 8. Histolojik preparat blokları

3.9. İncelenen Parametreler

Boyanan örnekler Olympus BX50 tipi binokuler mikroskopta incelendi ve kesitlerden mikrofotografılar alınarak değerlendirildi. Işık mikroskobu altında her bir

hayvana ait kesitler ayrı ayrı, silya kaybı, vasküler proliferasyon, enflamatuar hücre infiltrasyonu, eozinofil infiltrasyonu, bağ dokusu artışı, mukozal bezlerde dejenerasyon, goblet hücre artışı, vasküler konjesyon değerlendirilerek skorlandı. Skorlama, Ercan ve ark. (1) tarafından yapılan çalışmada olduğu gibi semikantitatif olarak, her parametre için eğer herhangi bir değişiklik yoksa “0”, hafif derecede değişiklik varsa “1”, belirgin derecede değişiklik varsa “2”, ileri derecede değişiklik varsa “3” puan üzerinden yapıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak Mann-Whitney U testi, korelasyonlar parametrik t-test ile değerlendirildi. Sonuçlar SPSS paket programında Mann-Whitney U ve Ki-Kare (Chi-Square) testleri ile analiz edildi. 0.05’ten küçük olanlar anlamlı olarak kabul edildi.

Nazal mukoza dokularının immünohistokimyasal incelenmesinde dokularda eksprese edilmiş AQP5 düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldı.

3.10. İstatistik

Çalışmamızda parametrik olmayan tek yönlü varyans analizi yöntemi olan Kruskal Wallis testi ile Mann-Whitney U ve Ki-Kare (Chi-Square) testi kullanıldı. Kullanılan faktörün 7 seviyesi bulunmaktadır. Bu faktörlerin değerlendirilmesi aşağıdaki formüle göre yapılmaktadır.

$$y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij}$$

$$y_{ij} = \text{X-ray ölçüm değerleri}$$

$$\mu = \text{Bulunan değerlerin genel ortalaması}$$

$$a_i = \text{Grupların etki payı}$$

$$e_{ij} = \text{Şansa bağlı hata}$$

Ölçüm değerlerinin ortalama ve standart sapmaları verildi. Gruplar arasında ölçüm değerleri ortalamaları açısından farklılığa, koşullarda Kruskal Wallis testi ile bakıldı.

İstatistiksel analizler, üniversitemizin lisanslı SPSS for Windows 15.0 paket programı ile yapıldı. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Histolojik Değerlendirme

Tablo 1. Histolojik bulgular semikantitatif değerlendirme tablosu

Gruplar	Sk	Gha	Bda	Vask	Vasp	Ehi	Eozinf	Mbd
Kontrol-1	0	0	1	0	0	1	0	0
Kontrol-2	0	0	0	1	0	0	1	0
Kontrol-3	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol-4	0	0	1	1	0	0	1	0
Kontrol-5	0	0	1	1	0	0	0	0
Kontrol-6	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol-7	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol-8	0	0	1	1	0	1	0	0
Sham-1	0	0	0	0	0	0	0	0
Sham-2	0	0	2	2	1	0	0	1
Sham-3	0	0	1	1	0	0	0	1
Sham-4	1	0	0	1	0	0	1	1
Sham-5	1	0	1	1	0	0	2	0
Sham-6	1	0	1	1	0	0	1	0
Sham-7	0	0	0	2	1	1	1	0
Sham-8	1	1	1	1	0	0	1	1
Alerjik Rinit-1	1	1	1	0	0	1	1	1
Alerjik Rinit-2	1	2	1	2	2	2	2	3
Alerjik Rinit-3	1	1	1	2	1	0	2	1
Alerjik Rinit-4	1	2	0	1	1	0	1	2
Alerjik Rinit-5	2	2	1	2	1	1	2	2
Alerjik Rinit-6	2	2	1	2	2	2	2	2
Alerjik Rinit-7	1	2	0	2	2	1	2	1
Alerjik Rinit-8	1	1	1	3	2	2	2	2
H89-1	0	1	0	1	0	1	1	1
H89-2	1	0	2	1	1	1	0	0
H89-3	1	0	1	2	2	2	2	2
H89-4	0	0	0	1	1	1	1	1
H89-5	1	1	1	1	1	0	1	1
H89-6	0	1	1	1	1	2	1	1
H89-7	1	0	2	1	1	0	1	0
H89-8	0	1	1	1	1	1	1	1

Sk: Silya kaybı, **Vasp:** Vasküler proliferasyon, **Ehi:** Enflamatuar hücre infiltrasyonu, **Eozinf:** Eozinofil infiltrasyonu, **Bda:** Bağ dokusu artışı, **Mbd:** Mukozal bezlerde dejenerasyon, **Gha:** Goblet hücre artışı, **Vask:** Vasküler konjesyon

Tablo 2. Histolojik parametrelerin ortalama ve standart sapmaları

	N	Ortalama	Std. Sapma
Sk	32	0,56	0,619
Gha	32	0,56	0,759
Bda	32	0,75	0,622
Vask	32	1,13	0,751
Vasp	32	0,66	0,745
Ehi	32	0,63	0,751
Eozinf	32	0,94	0,759
Mbd	32	0,78	0,832
grp	32	1,50	1,136

Işık mikroskobunda kontrol grubuna ait ratların konka dokusunda yapılan değerlendirmeler neticesinde, bu grupta normal histolojik bulgular dışında herhangi bir patolojik duruma rastlanmamıştır (Resim 9, 10).

Ovalbumin verilen H89 grubunun incelenmesi neticesinde ise özellikle silya kaybı (Sk), goblet hücre artışı (Gha), vasküler konjesyon (Vask), vasküler proliferasyon (Vasp), eozinofil infiltrasyonu (Eozinf), enflamatuar hücre infiltrasyonu (Ehi), bağ dokusundaki mukozal bezlerde dejenerasyon (Mbd) gözlemlendi. Sonuçlarımız istatistiksel olarak kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı olarak elde edildi ($p=0,000$, $p=0,000$, $p=0,008$, $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,030$, $p=0,000$) (Resim 13, 14).

DMSO+H89 verdiğimiz tedavi grubunda histolojik incelemeler sonucunda silya kaybı, goblet hücre artışı, eozinofil infiltrasyonu, vasküler konjesyon ve mukozal bezlerin dejenerasyonunda alerjik rinit grubuna kıyasla anlamlı olarak azalma gözlemlendi ($p=0,015$, $p=0,003$, $p=0,013$, $p=0,049$, $p=0,026$). Ancak bağ dokusu artışı ve vasküler proliferasyon gibi sham grubu ve alerjik rinit grubunda gözlenen patolojik durumlarla kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p=0,469$, $p=0,215$) (Resim 15, 16).

Sadece DMSO verdiğimiz sham grubunda da silya kaybı, goblet hücre artışı, eozinofil infiltrasyonu, enflamatuar hücre infiltrasyonu, vasküler proliferasyon ve mukozal bezlerde dejenerasyonda alerjik rinit grubuna kıyasla anlamlı olarak azalma gözlemlendi ($p=0,015$, $p=0,001$, $p=0,009$, $p=0,012$, $p=0,0007$, $p=0,004$).

4.1.1. Silya Kaybı

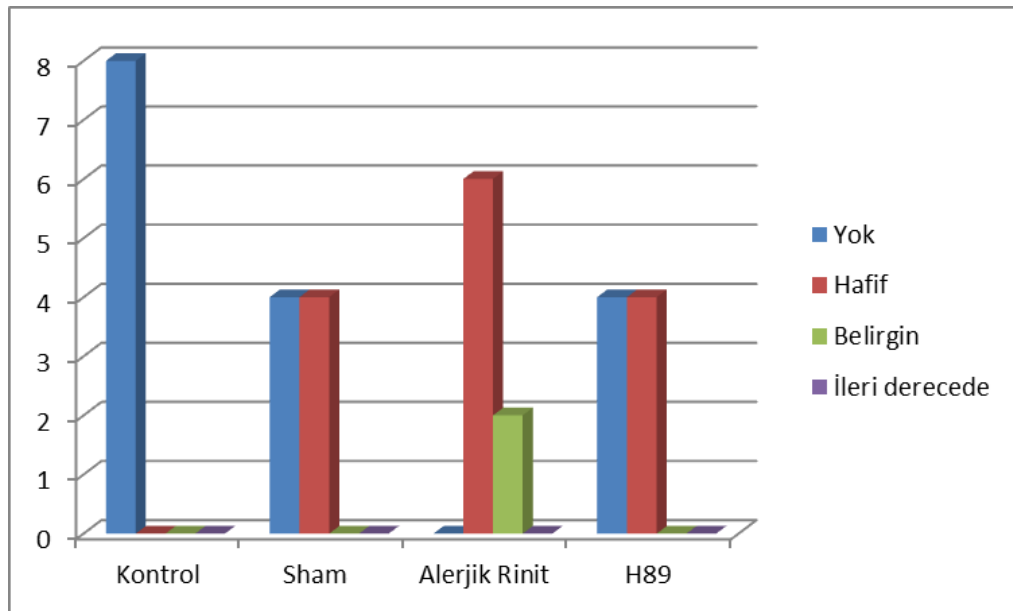
Solunum mukozasını oluşturan silya yapılarının kaybolması alerjik rinit grubunda gözlenmiş olup, DMSO verdiğimiz sham grubunda ve H89 grubunda tedavi ile anlamlı olarak düzelmeye saptanmıştır (Tablo 3, 4. Şekil 7).

Tablo 3. Silya kaybının gruplar arası p değerleri tablosu

Gruplar	P değeri
Kontrol- Sham	0,025
Kontrol- Alerjik Rinit	0,000
Kontrol- H89	0,025
Sham- Alerjik Rinit	0,015
Alerjik Rinit- H89	0,015
Sham- H89	1,000

Tablo 4. Silya kaybının gruplar arası n değerleri ve yüzdeleri tablosu

	Kontrol		Sham		Alerjik Rinit		H89	
	n	%	n	%	N	%	n	%
Yok	8	100	4	50	0	0	4	50
Hafif	0	0	4	50	6	75	4	50
Orta	0	0	0	0	2	25	0	0
Şiddetli	0	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 7 . Gruplar arası silya kaybı karşılaştırmasını gösteren tablo

4.1.2. Goblet Hücre Artışı

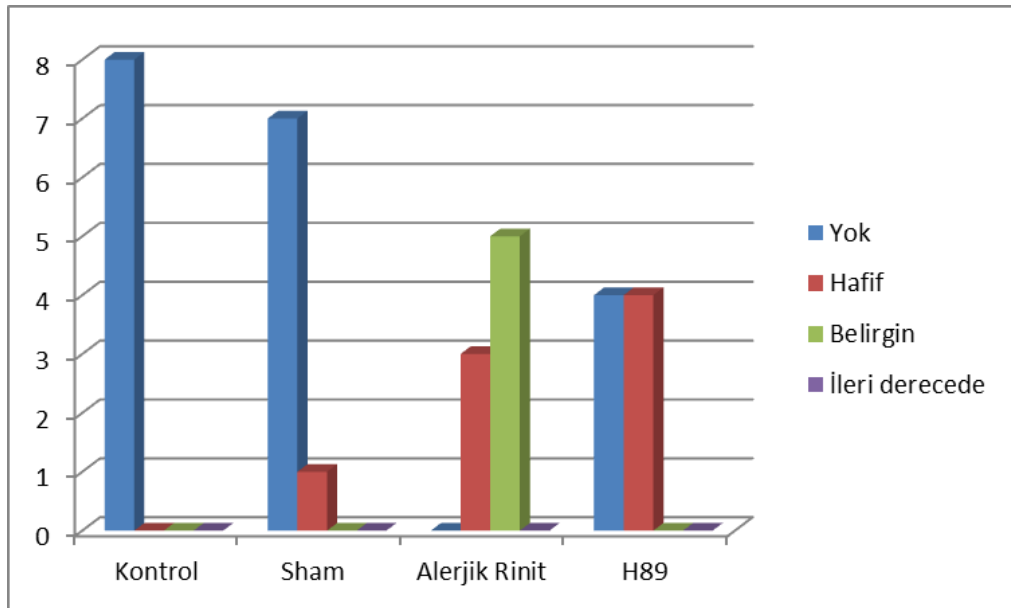
Kronik inflamatuvar süreçte metaplaziye bağlı ortaya çıkan goblet hücre artışı, alerjik rinit grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır. Alerjik rinit ile sham ve H89 grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ve tedavi grubunda ve DMSO verdiğimiz sham grubunda goblet hücre sayısı azalmıştır (Tablo 5, 6. Şekil 8).

Tablo 5. Goblet hücre artışı gruplar arası p değerleri tablosu

Gruplar	P değeri
Kontrol- Sham	0,317
Kontrol- Alerjik Rinit	0,000
Kontrol- H89	0,025
Sham-Alerjik Rinit	0,001
Alerjik Rinit- H89	0,003
Sham- H89	0,117

Tablo 6. Goblet hücre artışı gruplar arası n değerleri ve yüzdeleri tablosu

	Kontrol		Sham		Alerjik Rinit		H89	
	n	%	n	%	N	%	n	%
Yok	8	100	7	87,5	0	0	4	50
Hafif	0	0	1	12,5	3	37,5	4	50
Orta	0	0	0	0	5	62,5	0	0
Şiddetli	0	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 8. Gruplar arası goblet hücre artışı karşılaştırmasını gösteren tablo

4.1.3. Bağ Dokusu Artışı

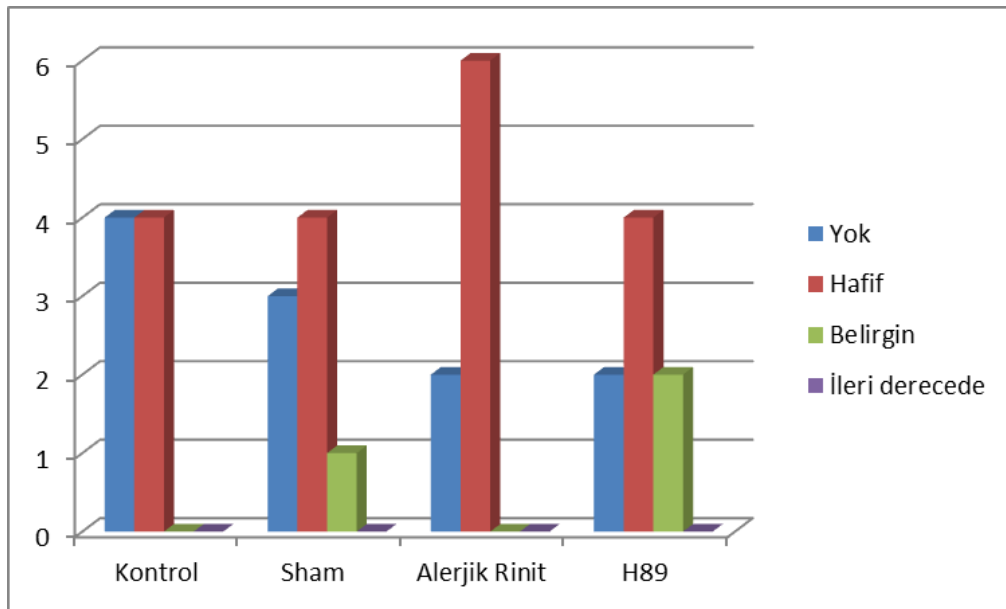
Bağ dokusundaki artış gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 7, 8. Şekil 9).

Tablo 7. Bağ dokusu artışı gruplar arası p değerleri tablosu

Gruplar	P değeri
Kontrol- Sham	0,480
Kontrol- Alerjik Rinit	0,317
Kontrol- H89	0,165
Sham- Alerjik Rinit	0,902
Alerjik Rinit- H89	0,469
Sham- H89	0,492

Tablo 8. Bağ dokusu artışı gruplar arası n değerleri ve yüzdeleri tablosu

	Kontrol		Sham		Alerjik Rinit		H89	
	n	%	n	%	N	%	n	%
Yok	4	50	3	37,5	2	25	2	25
Hafif	4	50	4	50	6	75	4	50
Orta	0	0	1	12,5	0	0	2	25
Şiddetli	0	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 9. Gruplar arası bağ dokusu artışı karşılaştırmasını gösteren tablo

4.1.4. Vasküler Konjesyon

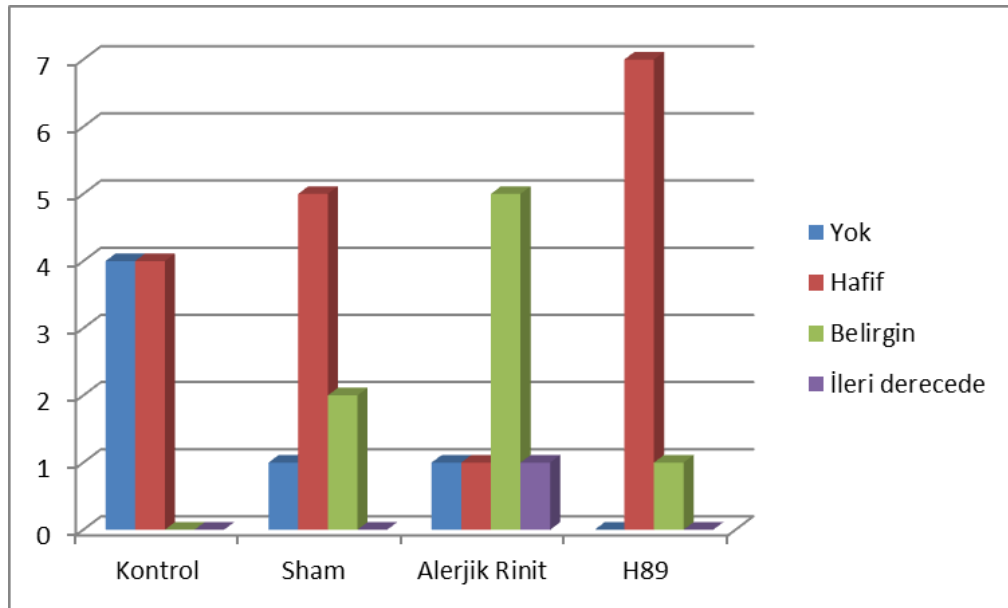
Nazal mukozada ve konka parenkiminde damarlanmada ve damar çapında artış olan konjesyon alerjik rinit grubunda oluşmuş, alerjik rinit grubuna göre H89 grubunda verilen tedavi ile istatistiksel olarak anlamlı düzelme sağlanmıştır. Sham grubuyla alerjik rinit grubunda ise fark saptanmamıştır (Tablo 9, 10. Şekil 10).

Tablo 9. Vasküler konjesyon gruplar arası p değerleri tablosu

Gruplar	P değeri
Kontrol- Sham	0,59
Kontrol- Alerjik Rinit	0,008
Kontrol- H89	0,020
Sham- Alerjik Rinit	0,090
Alerjik Rinit- H89	0,049
Sham- H89	0,945

Tablo 10. Vasküler konjesyon gruplar arası n değerleri ve yüzdeleri tablosu

	Kontrol		Sham		Alerjik Rinit		H89	
	n	%	n	%	N	%	n	%
Yok	4	50	1	12,5	1	12,5	0	0
Hafif	4	50	5	62,5	1	12,5	7	87,5
Orta	0	0	2	25	5	62,5	2	12,5
Şiddetli	0	0	0	0	1	12,5	0	0



Şekil 10. Gruplar arası vasküler konjesyon karşılaştırmasını gösteren tablo

4.1.5. Vasküler Proliferasyon

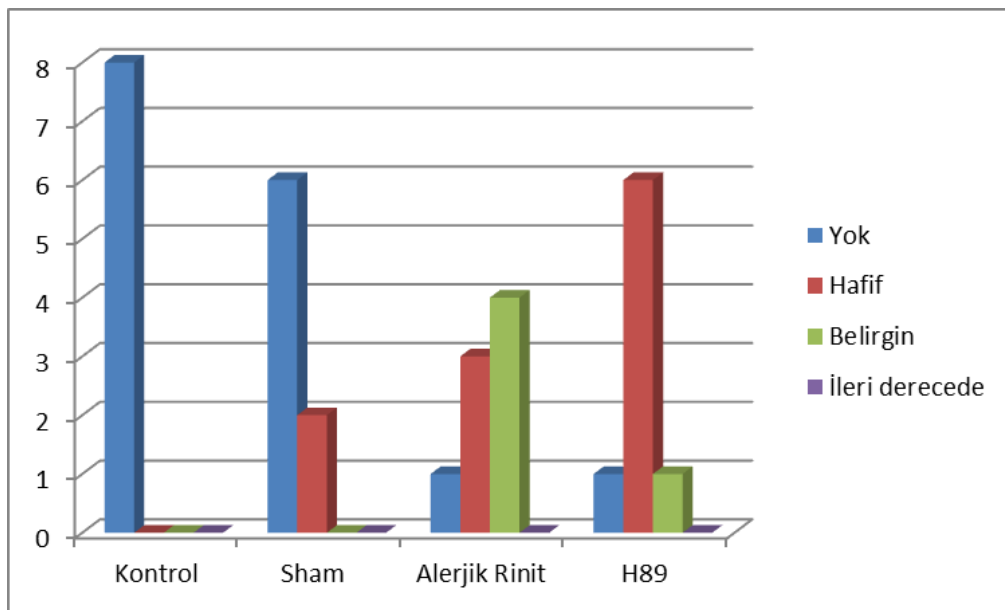
Alerjik rinit grubunda özellikle lamina propria tabakasında çok sayıda vasküler proliferasyona (Vasp) rastlandı ve H89 grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak sonuçlar anlamlı olmasına rağmen alerjik rinit ve H89 grubu arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. DMSO verilen sham grubunda ise alerjik rinit grubuna göre vasküler proliferasyonun azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 11, 12. Şekil 11).

Tablo 11. Vasküler proliferasyon gruplar arası p değerleri tablosu

Gruplar	P değeri
Kontrol- Sham	0,143
Kontrol- Alerjik Rinit	0,001
Kontrol- H89	0,001
Sham-Alerjik Rinit	0,007
Alerjik Rinit- H89	0,215
Sham- H89	0,013

Tablo 12. Vasküler proliferasyon gruplar arası n değerleri ve yüzdeleri tablosu

	Kontrol		Sham		Alerjik Rinit		H89	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Yok	8	100	6	75	1	12,5	1	12,5
Hafif	0	0	2	25	3	37,5	6	75
Orta	0	0	0	0	4	50	1	12,5
Şiddetli	0		0	0	0	0	0	0



Şekil 11. Gruplar arası vasküler proliferasyon karşılaştırmasını gösteren tablo

4.1.6. Enflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu

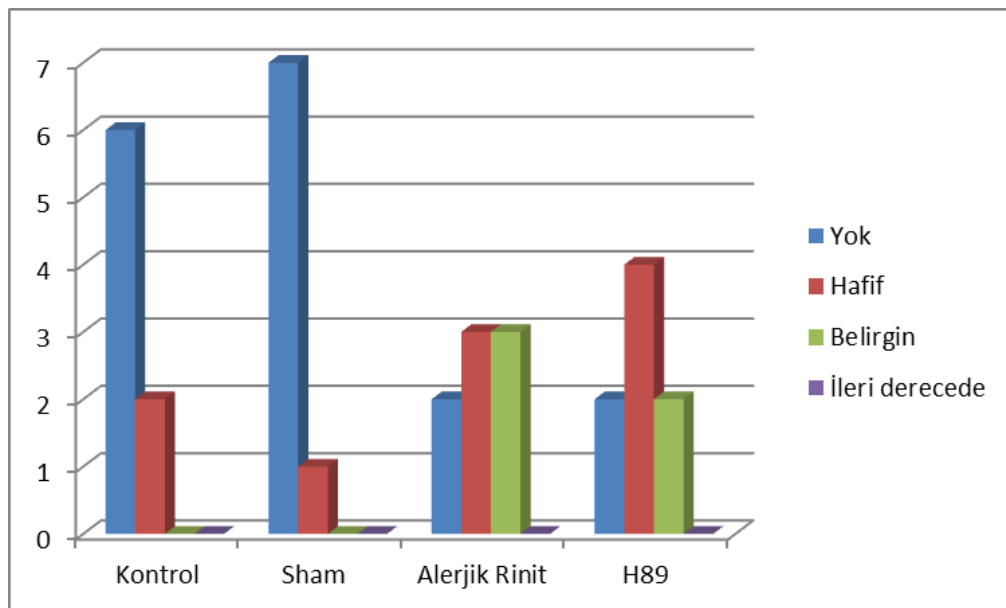
Yoğun olarak lenfositlerden oluşan enflamatuvar hücre infiltrasyonu alerjik rinit grubunda tespit edilmiş olup, alerjik rinit ve H89 grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir. Ancak sham grubunda enflamatuvar hücre infiltrasyonu açısından H89 ve alerjik rinit grubuna göre azalma tespit edilmiştir (Tablo 13, 14. Şekil 12).

Tablo 13. Enflamatuvar hücre infiltrasyonu gruplar arası p değerleri tablosu

Gruplar	P değeri
Kontrol- Sham	0,535
Kontrol- Alerjik Rinit	0,030
Kontrol- H89	0,037
Sham- Alerjik Rinit	0,012
Alerjik Rinit- H89	0,736
Sham- H89	0,013

Tablo 14. Enflamatuvar hücre infiltrasyonu gruplar arası n değerleri ve yüzdeleri tablosu

	Kontrol		Sham		Alerjik Rinit		H89	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Yok	6	75	7	87,5	2	25	2	25
Hafif	2	25	1	12,5	3	37,5	4	50
Orta	0	0	0	0	3	37,5	2	25
Şiddetli	0	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 12. Gruplar arası enflamatuvar hücre infiltrasyonu karşılaştırmasını gösteren tablo

4.1.7. Eozinofil İnfiltrasyonu

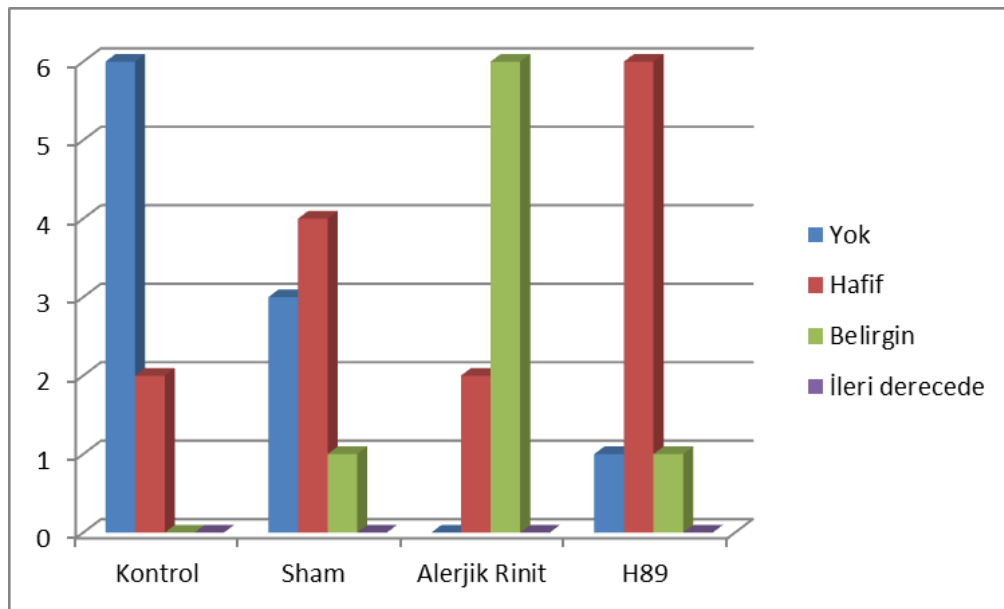
Yoğun olarak eozinofillerden oluşan infiltrasyon alerjik rinit grubunda tespit edilmiş olup, alerjik rinit ile H89 ve sham grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak H89 ve sham grubunda anlamlı ölçüde düzelme olduğu görülmüştür (Tablo 15, 16. Şekil 13).

Tablo 15. Eozinofil infiltrasyonu gruplar arası p değerleri tablosu

Gruplar	P değeri
Kontrol- Sham	0,120
Kontrol- Alerjik Rinit	0,001
Kontrol- H89	0,013
Sham- Alerjik Rinit	0,009
Alerjik rinit- H89	0,013
Sham- H89	0,393

Tablo 16. Eozinofil infiltrasyonu gruplar arası n değerleri ve yüzdeleri tablosu

	Kontrol		Sham		Alerjik Rinit		H89	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Yok	6	75	3	37,5	0	0	1	12,5
Hafif	2	25	4	50	2	25	6	75
Orta	0	0	1	12,5	6	75	1	12,5
Şiddetli	0	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 13. Gruplar arası eozinofil infiltrasyonu karşılaştırmasını gösteren tablo

4.1.8. Mukozal Bezlerde Dejenerasyon

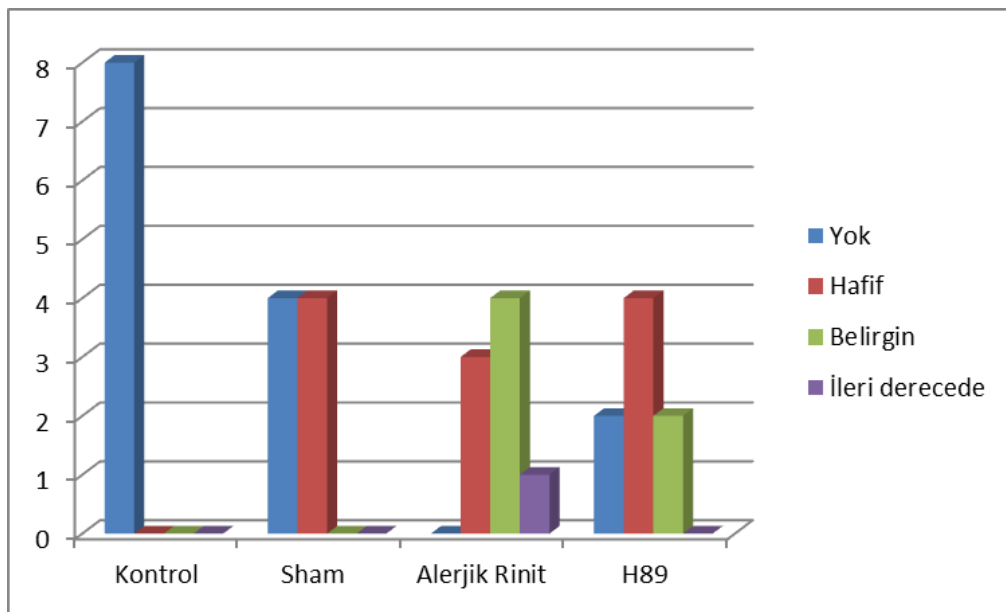
Mukozal bezlerde dejenerasyonun alerjik rinit grubunda olduğu görülmüştür. Kontrol ile H89 ve sham grubunun karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Alerjik rinit grubuna göre sham ve H89 grubunda anlamlı azalma tespit edilmiştir (Tablo 17, 18. Şekil 14).

Tablo 17. Mukozal bezlerde dejenerasyon gruplar arası p değerleri tablosu

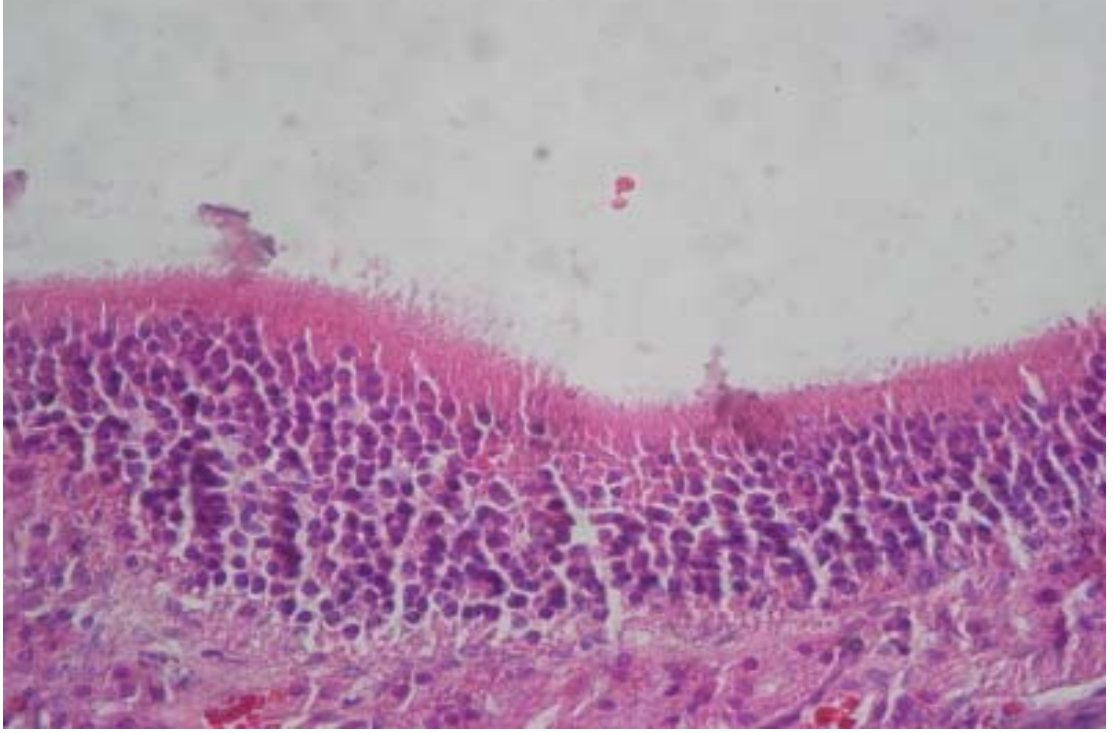
Gruplar	P değeri
Kontrol-Sham	0,025
Kontrol- Alerjik Rinit	0,000
Kontrol- H89	0,003
Sham- Alerjik Rinit	0,004
Alerjik Rinit- H89	0,026
Sham- H89	0,232

Tablo 18. Mukozal bezlerde dejenerasyonun gruplar arası n değerleri ve yüzdeleri tablosu

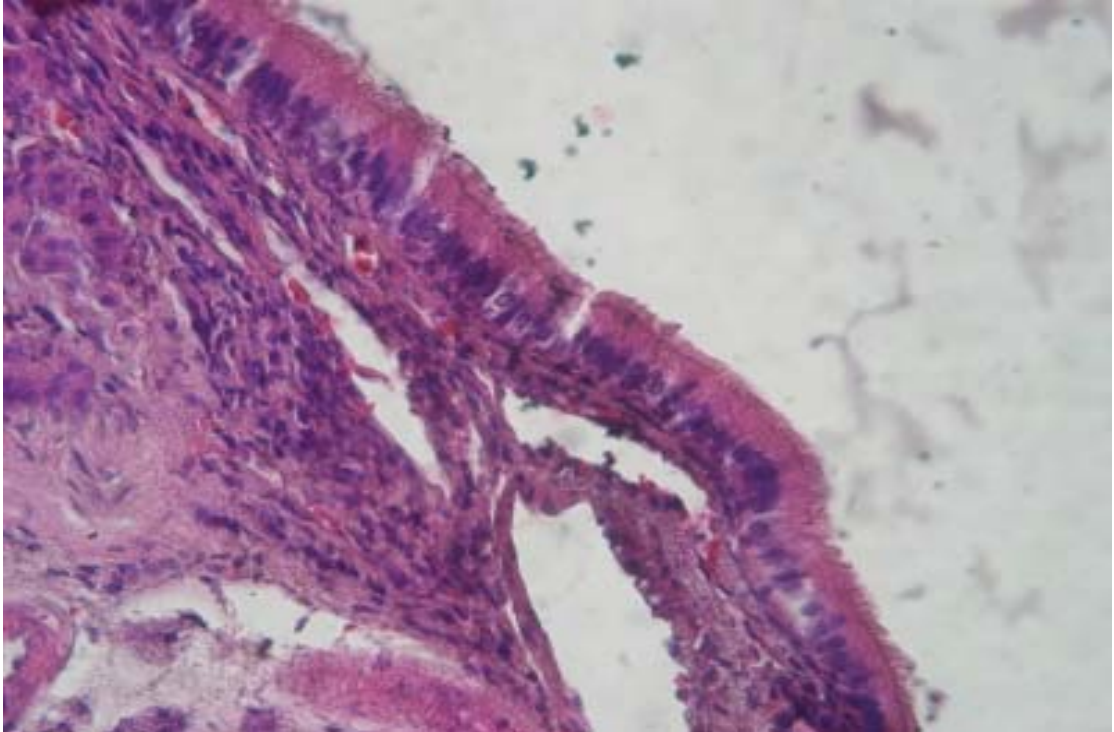
	Kontrol		Sham		Alerjik Rinit		H89	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Yok	8	100	4	50	0	0	2	25
Hafif	0	0	4	50	3	37,5	5	62,5
Orta	0	0	0	0	4	50	1	12,5
Şiddetli	0	0	0	0	1	12,5	0	0



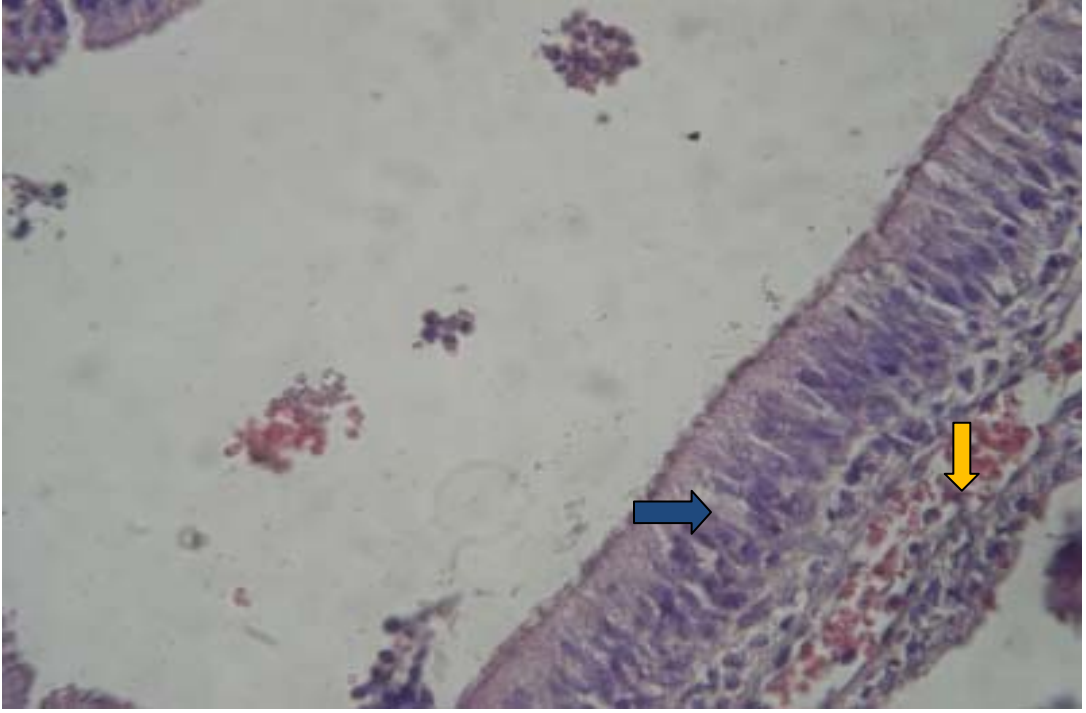
Şekil 14. Gruplar arası mukozal bezlerde dejenerasyon karşılaştırmasını gösteren tablo



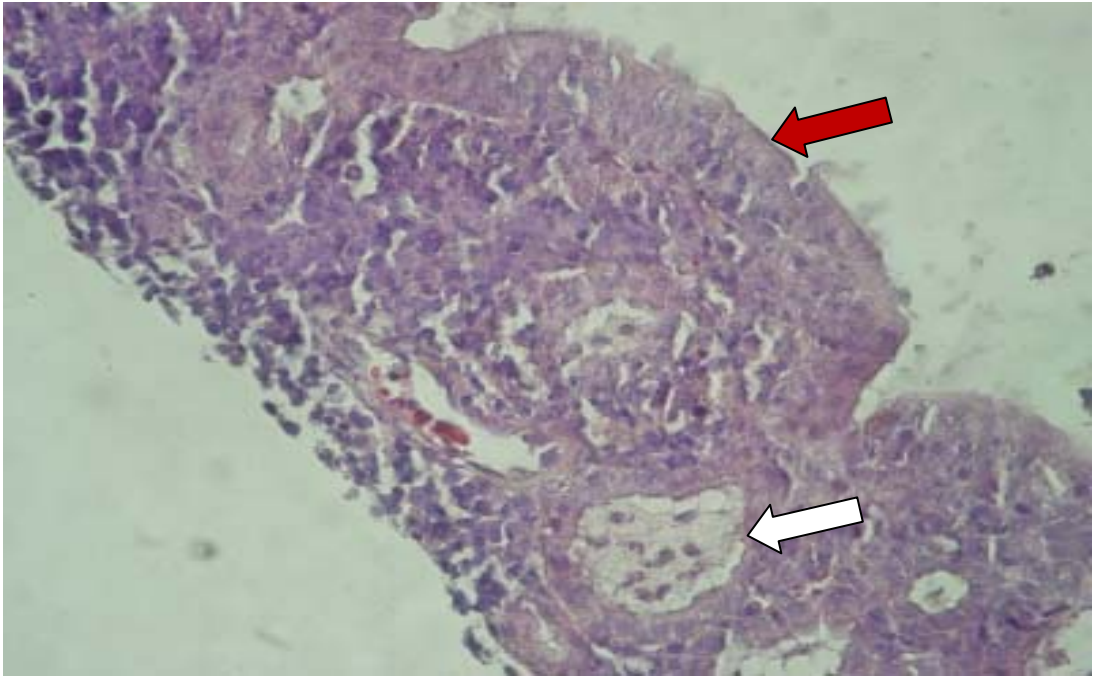
Resim 9. Nazal mukozanın epitel yapısı normal histolojik görünümde izlenmekte (H-E X 40)



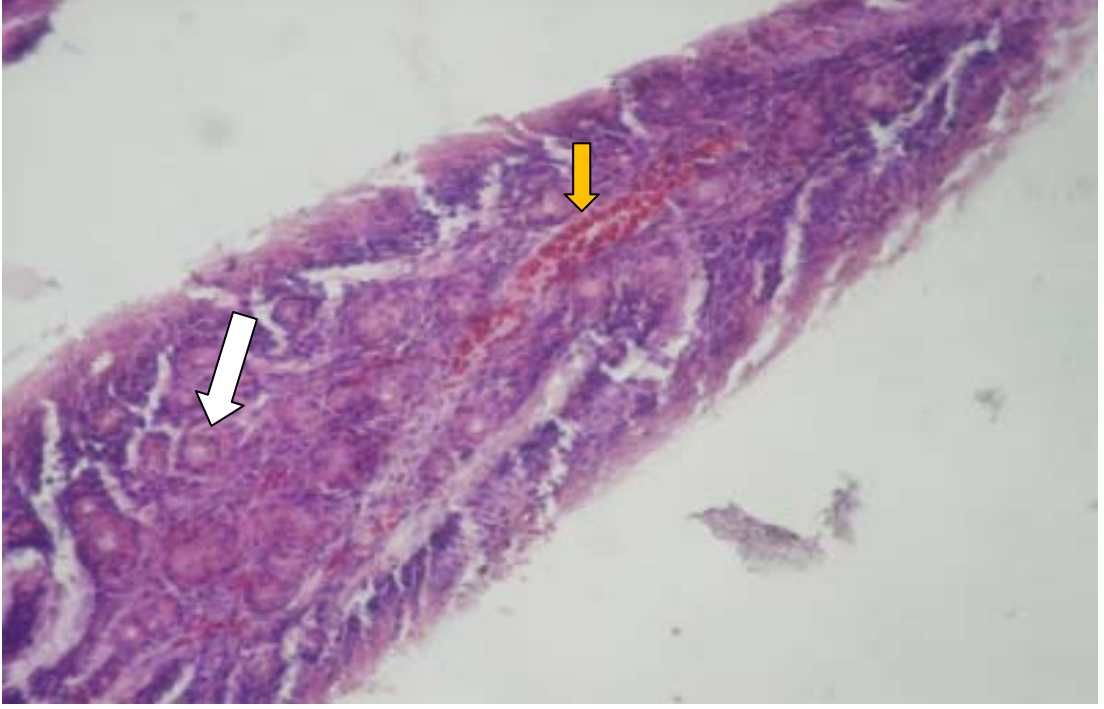
Resim 10. Nazal mukozanın epitel yapısı normal histolojik görünümde izlenmekte (H-E X 40)



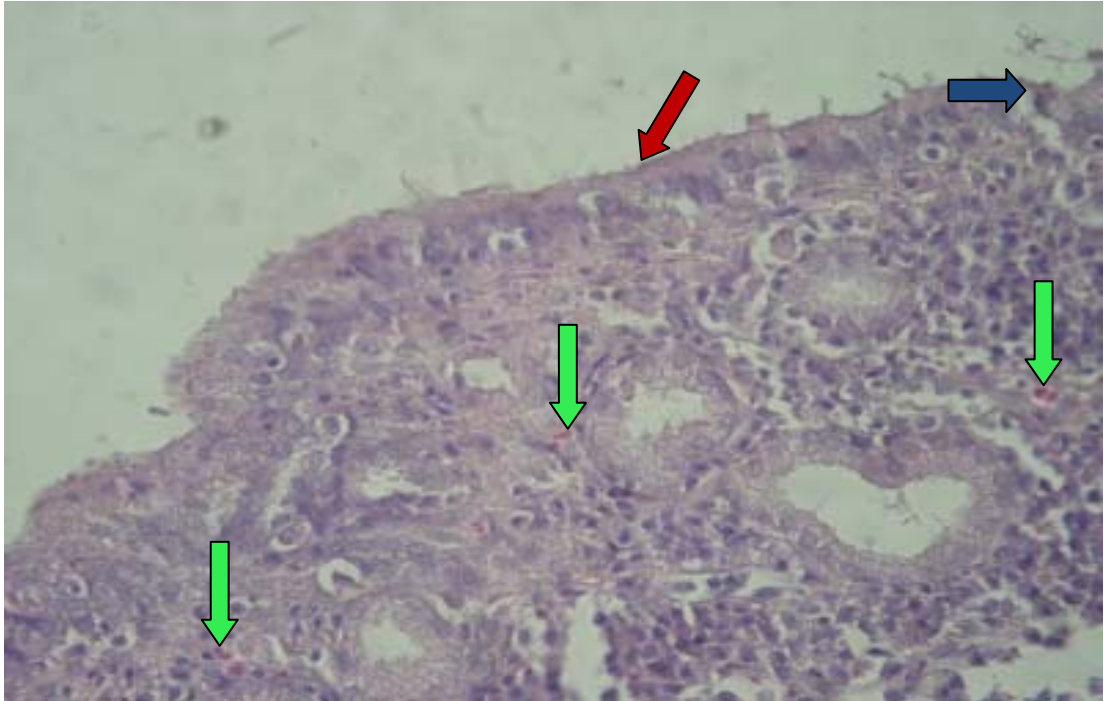
Resim 11. Sham grubu. Lamina propriya tabakasındaki damarlarda vasküler konjesyon ve proliferasyon, goblet hücre artışı görülmekte. (H-E X 40) Sarı ok: Vasküler konjesyon, Mavi ok: Goblet hücre artışı



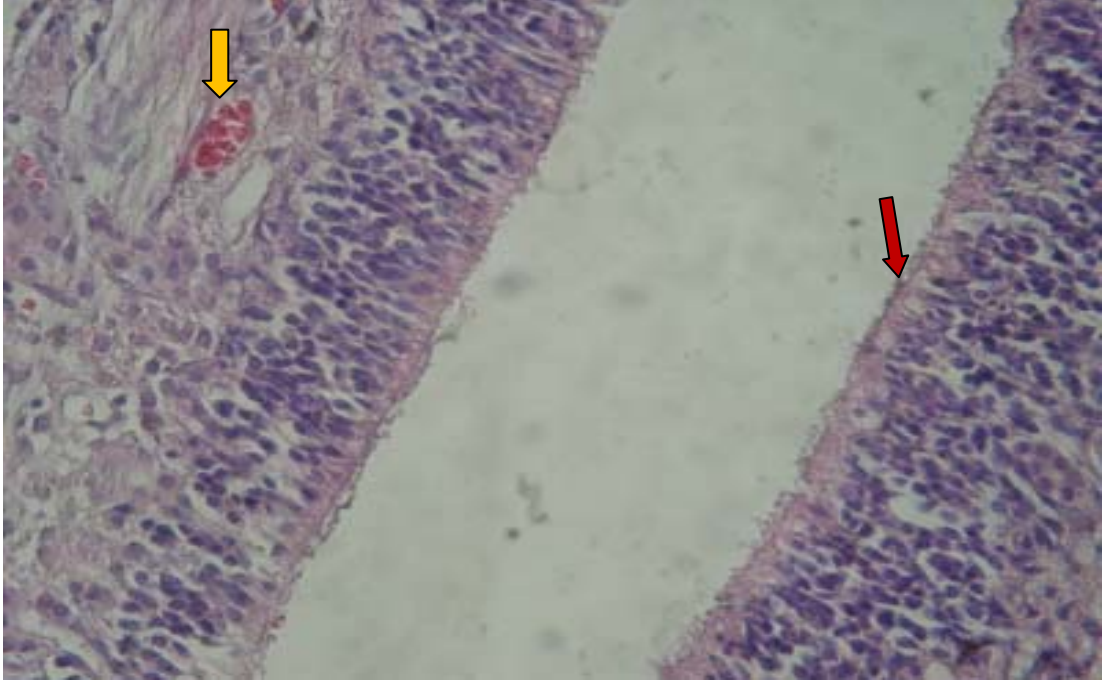
Resim 12. Sham grubu. Nazal mukozadaki epitel hücrelerinde silya kaybı, konjesyon, proliferasyon ve mukozal bezlerde dejenerasyon görülmekte. (H-E X 40) Kırmızı ok: Silya kaybı, Beyaz ok: Mukozal bezlerde dejenerasyon



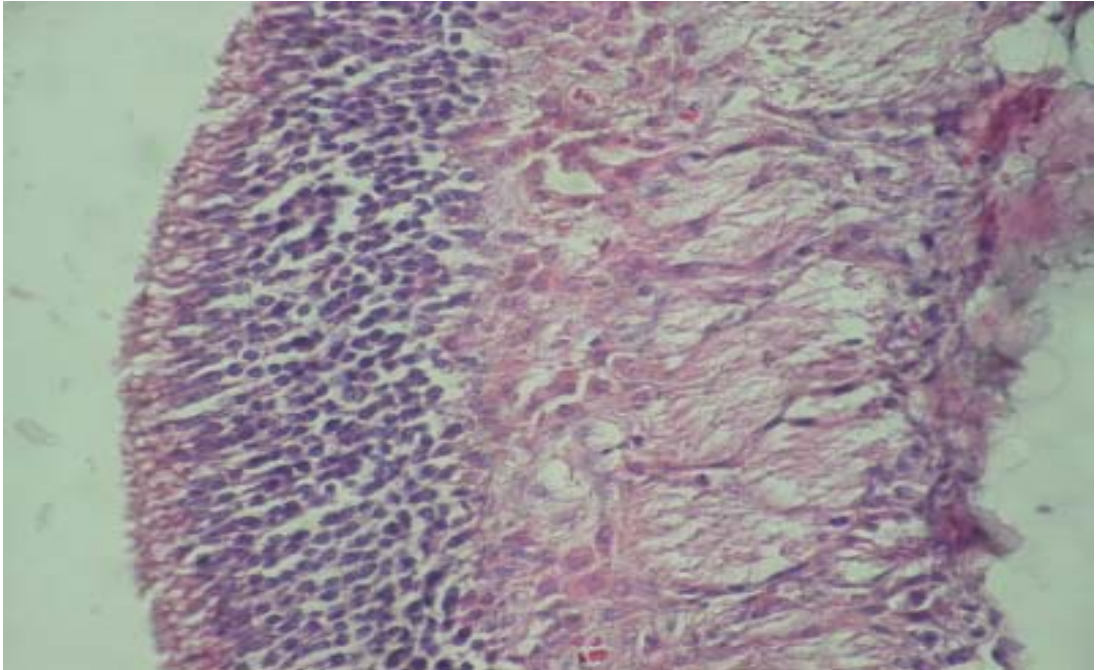
Resim 13. Alerjik rinit grubu. Nazal mukozadaki epitel hücrelerinde silya kaybı ve goblet hücre artışı, vasküler konjesyon ve proliferasyon, bağ dokusundaki mukozal bezlerde artış ve dejenerasyon görülmekte. (H-E X 20) Beyaz ok: Mukozal bezlerde artış ve dejenerasyon, Sarı ok: Vasküler konjesyon



Resim 14. Alerjik rinit grubu: Nazal mukozadaki epitel hücrelerinde silya kaybı ve goblet hücre artışı, mukozal bezlerde artış ve dejenerasyon, eozinofilik ve enflamatuvar hücre infiltrasyonu. (H-E X 40) Kırmızı ok:Silya kaybı, Yeşil ok: Eozinofil hücre infiltrasyonu, Mavi ok: Goblet hücre artışı



Resim 15. H89 grubu. Nazal mukozadaki epitel hücrelerinde silya kaybında azalma ve goblet hücre sayısında azalma, vasküler konjesyon ve proliferasyon, mukozal bez sayısında ve dejenerasyonda azalma eozinofilik ve enflamatuvar hücre göçünde azalma gözlenmekte. Kırmızı ok:Silya kaybı, Sarı ok:Vasküler konjesyon



Resim 16. H89 grubu. Nazal mukozada silyalı epitel hücreleri normal histolojik görünümde. (H-E X 40)

4.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Tablo 19. İmmünohistokimyasal olarak gruplar ve boyanma dereceleri

İmmünohistokimya Boyanma Dereceleri	Kontrol	Sham	Alerjik Rinit	H89
AQP5				
1	-	+	+	-
2	-	++	+	-
3	-	++	++	+
4	+	+	+	-
5	-	++	++	-
6	-	++	++	-
7	+	++	++	-
8	-	+	++	+

Deneyisel parametrelerin immünohistokimyasal boyanma derecelerinin değerlendirilmesi skorlandı.

(-) skor (negatif skor): boyanma yok,

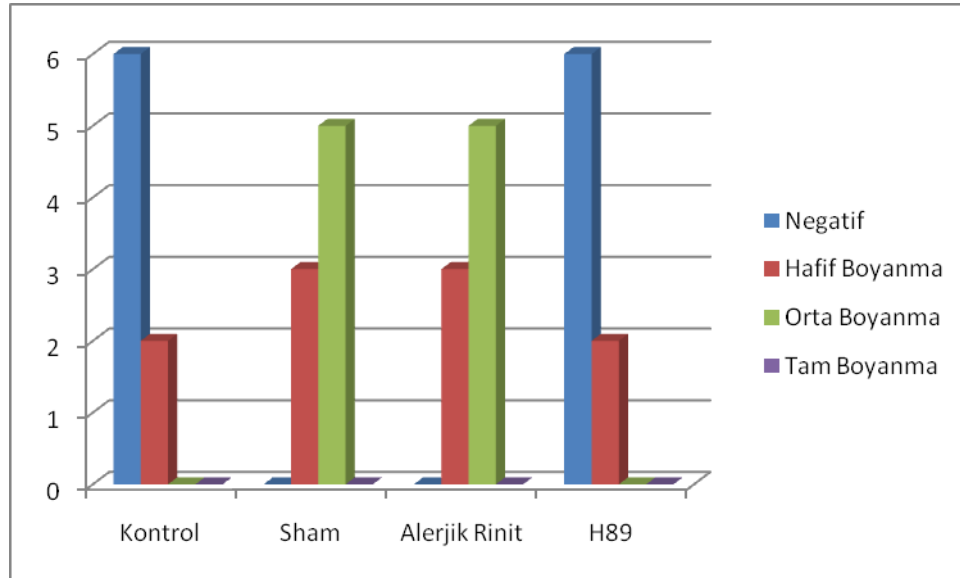
(+) skor (1 pozitif skor): hafif derecede,

(++) skor (2 pozitif skor): orta derecede,

(+++) skor (3 pozitif skor): Tam boyanma var.

Tablo 20. AQP5 immünohistokimyasal boyanmasının gruplar arası p değerleri tablosu

Gruplar	P değeri
Kontrol-Sham	0,001
Kontrol- Alerjik Rinit	0,001
Kontrol- H89	0,535
Sham- Alerjik Rinit	1,000
Alerjik Rinit- H89	0,001
Sham- H89	0,001



Şekil 15. Gruplar arası AQP5 boyanmasının karşılaştırmasını gösteren tablo

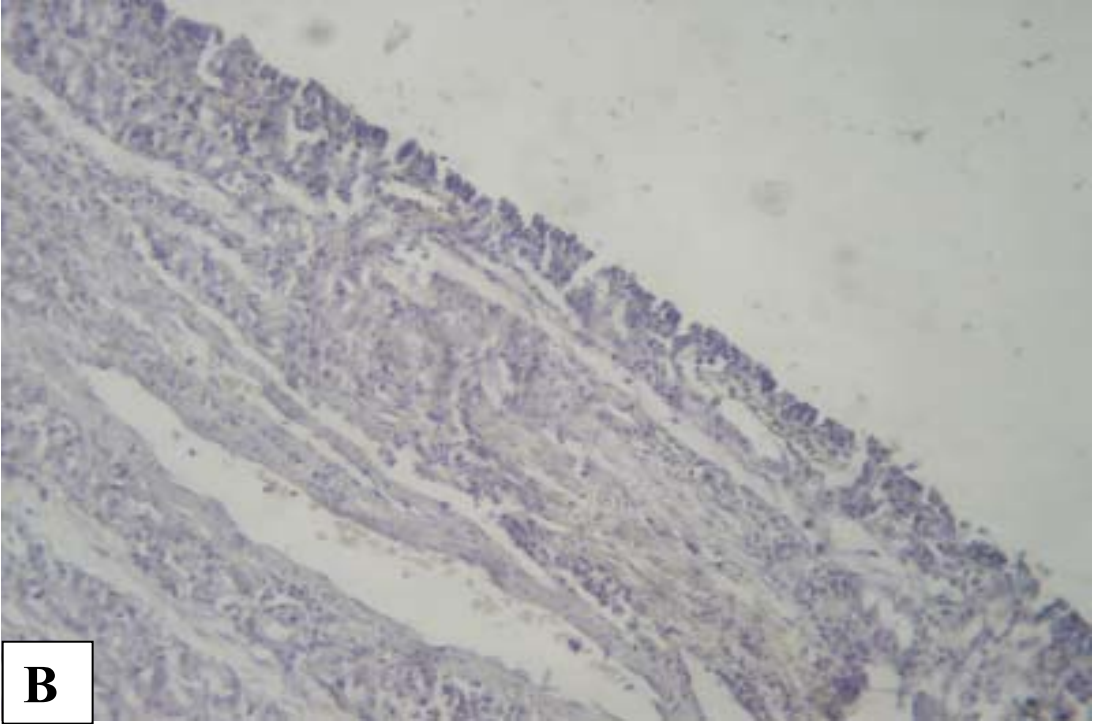
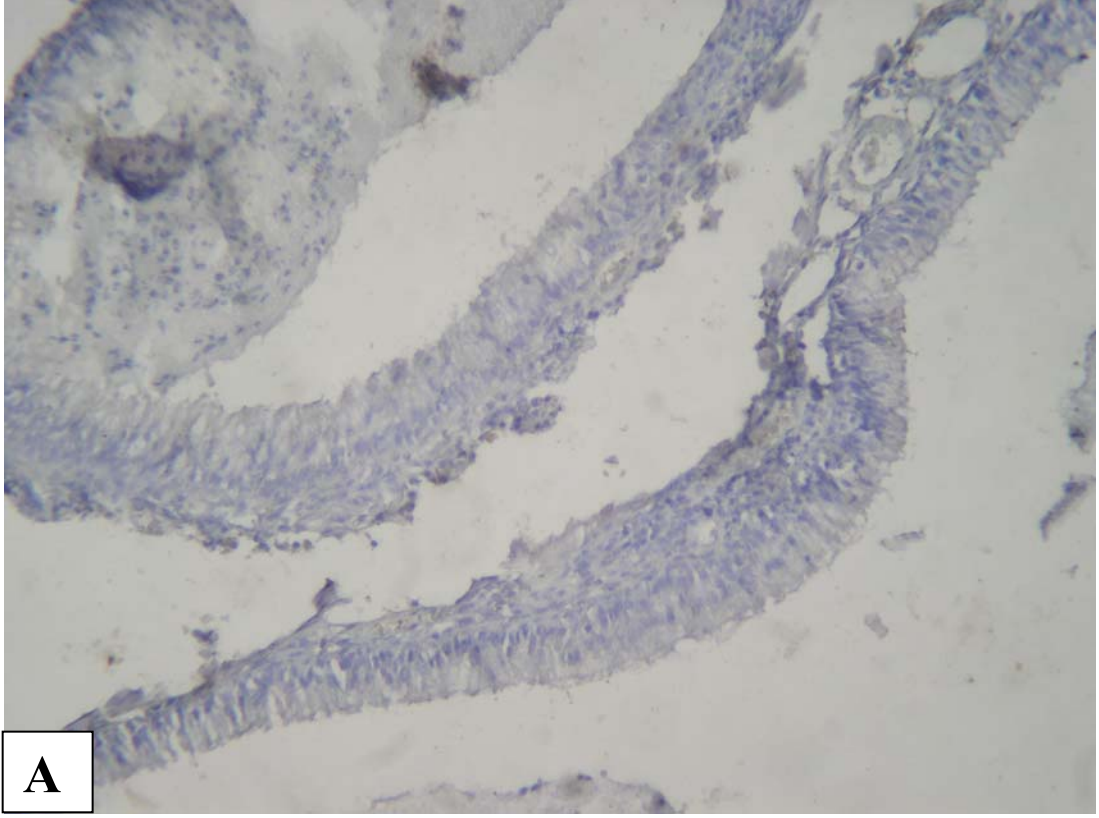
İmmünohistokimyasal bulgularımızın değerlendirilmesinde Mann-Whitney Test ve Kruskal-Wallis Testleri uygulandı.

Doku kesitlerinin immünohistokimyasal incelemesinde, kontrol grubuna ait konka dokusu içerisinde yerleşmiş olan arteriol ve venlerde AQP5 boyanmasının oldukça az olduğu gözlemlendi (Resim 17). Ayrıca istatistiksel olarak diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı sonuçlar elde edildi ($p < 0,05$).

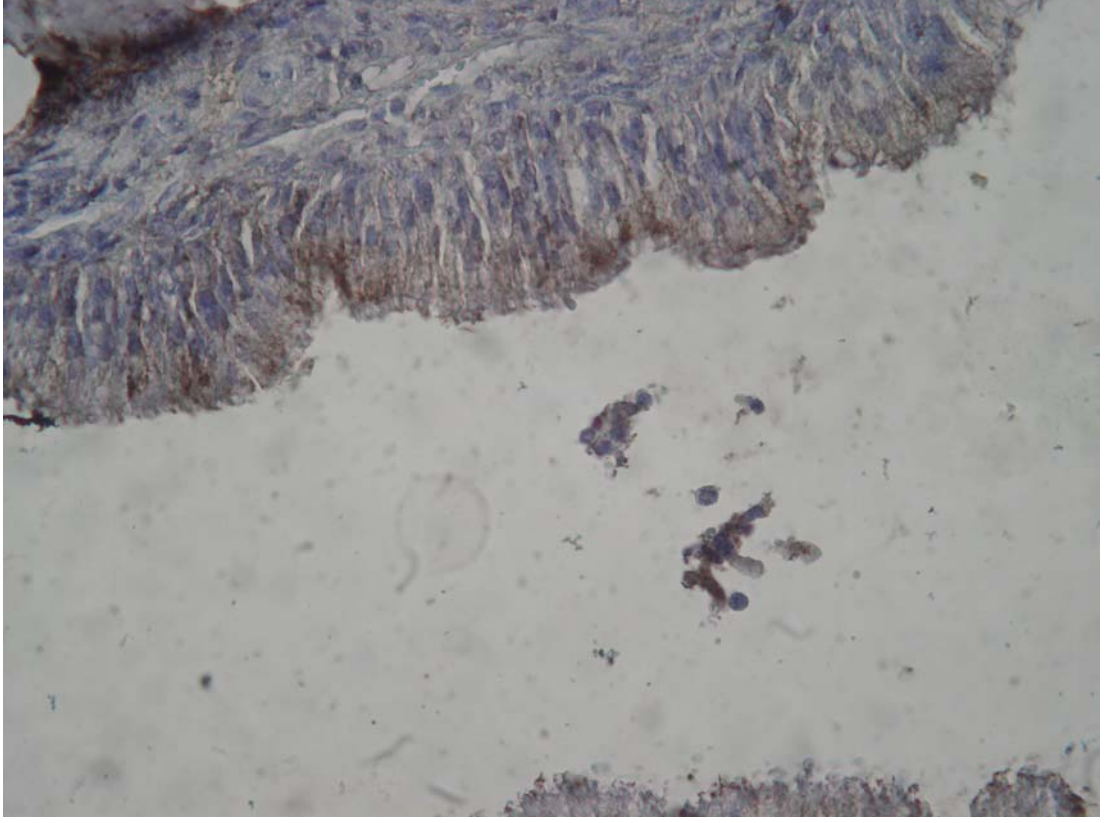
Sham grubundaki yalancı çok katlı silyalı prizmatik epitel (Y.Ç.K.S.P.E) hücrelerinde ise istatistiksel olarak orta diye nitelendirdiğimiz (++) AQP5 boyamaları gözlemlendi (Resim 18).

Ovalbumin verdiğimiz gruptaki (Alerjik rinit grubu) Y.Ç.K.S.P.E hücrelerinde de yine orta olarak nitelendirdiğimiz (++) AQP5 boyamaları saptandı (Resim 19). İstatistiksel olarak diğer gruplarla karşılaştırıldığında alerjik rinit ve sham grubunun AQP5 boyanması açısından daha fazla boyandığı gözlemlendi ($p < 0,05$).

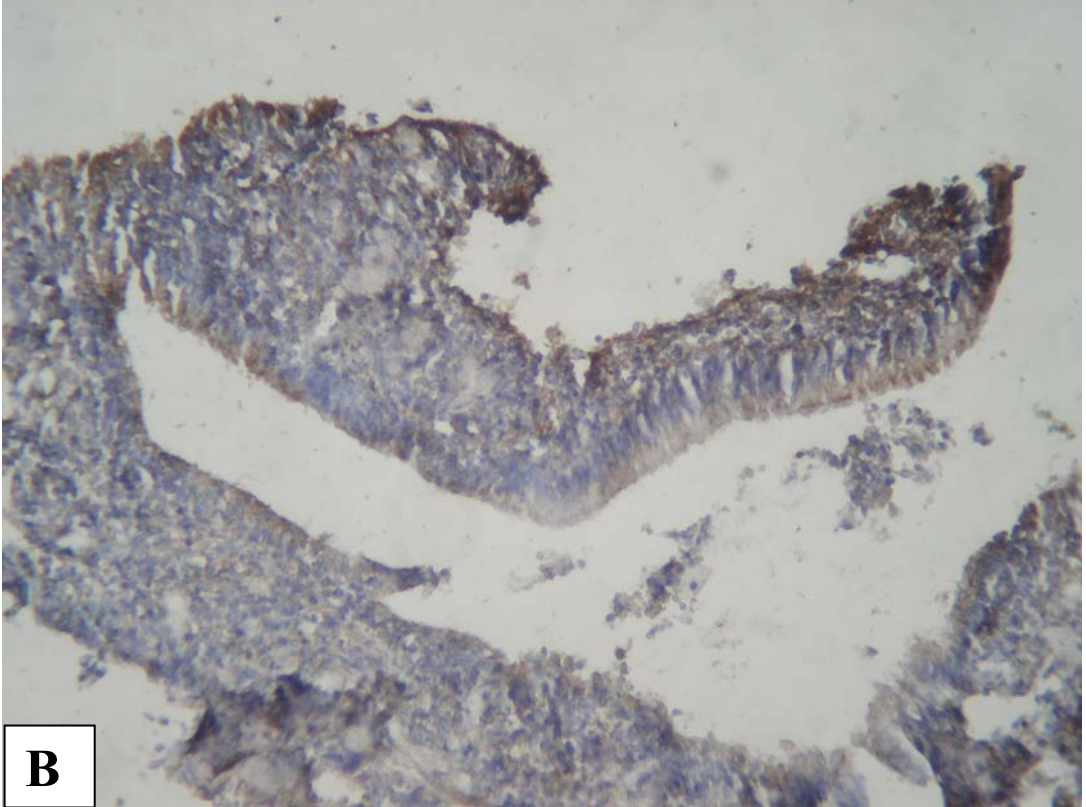
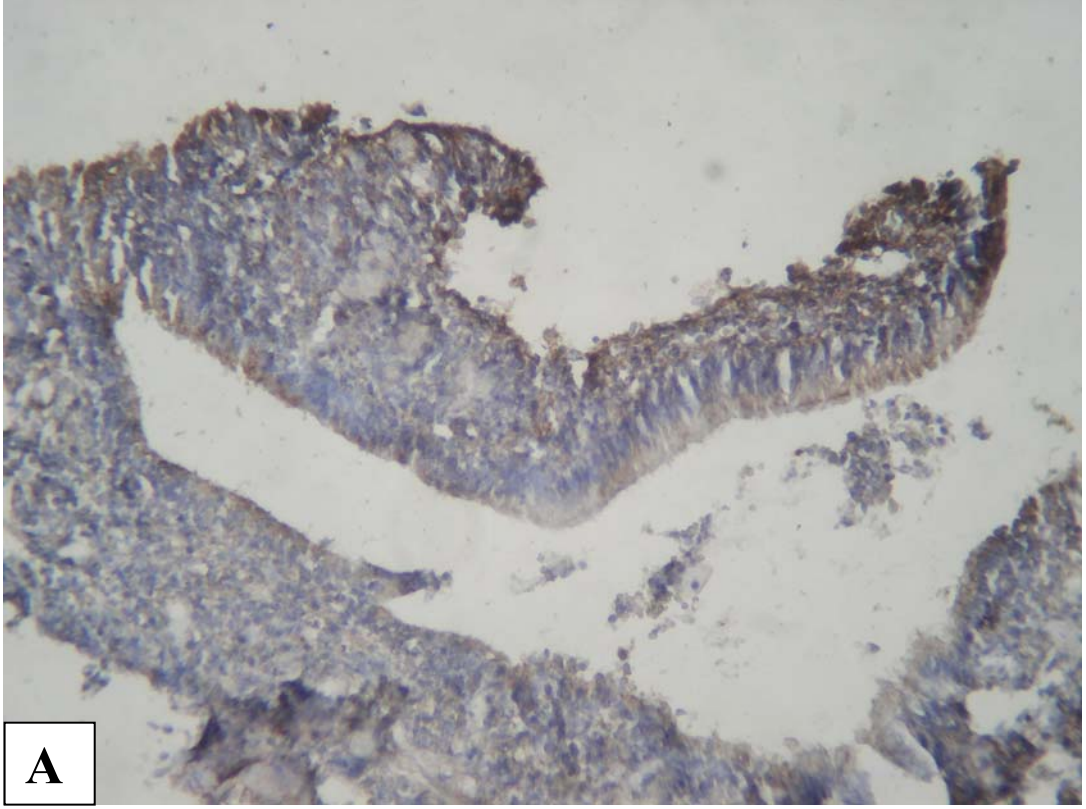
H89 adını verdiğimiz tedavi grubuna ait Y.Ç.K.S.P.E hücrelerinin AQP5 boyamalarında alerjik rinit grubuna kıyasla hafif (+) boyamalar veya hiç boyanma olmaması tespit edildi (Resim 20). H89 grubumuzun kontrol kıyaslandığında anlamsız ($p > 0,05$), sham grubuyla ve alerjik rinit grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı ($p < 0,05$) çıktığı tespit edildi (Tablo 19, 20. Şekil 15).



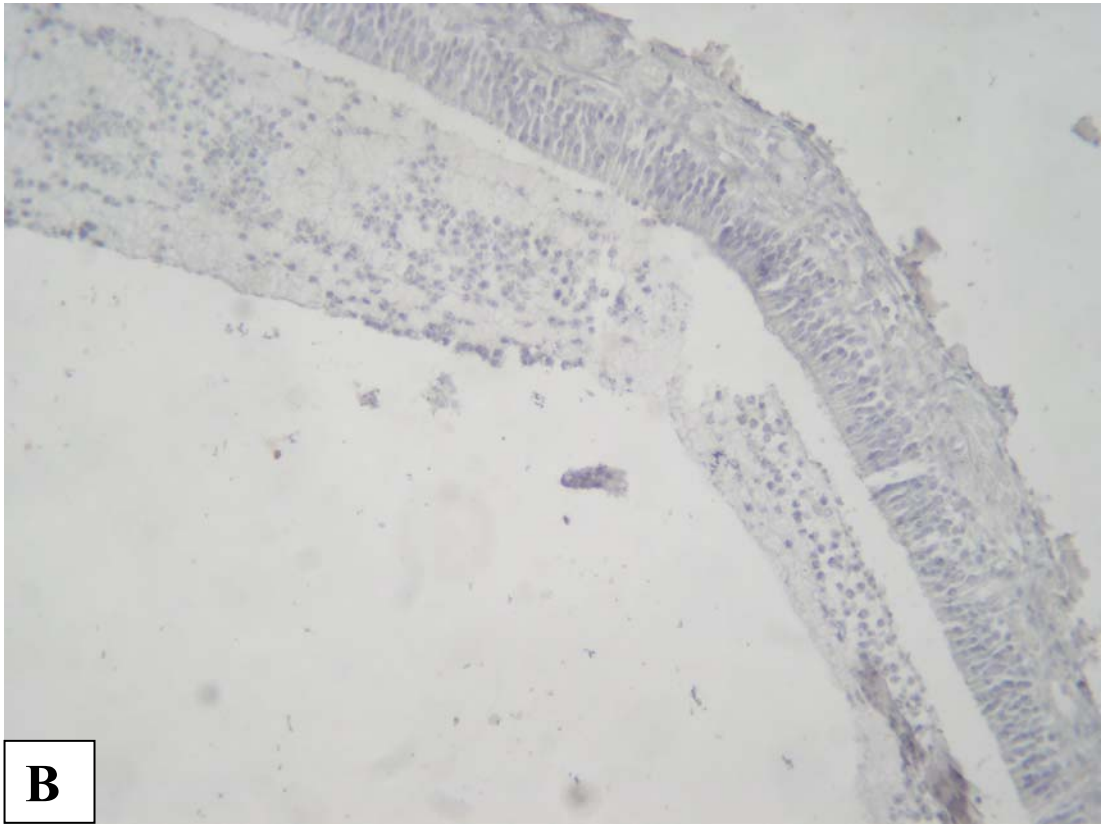
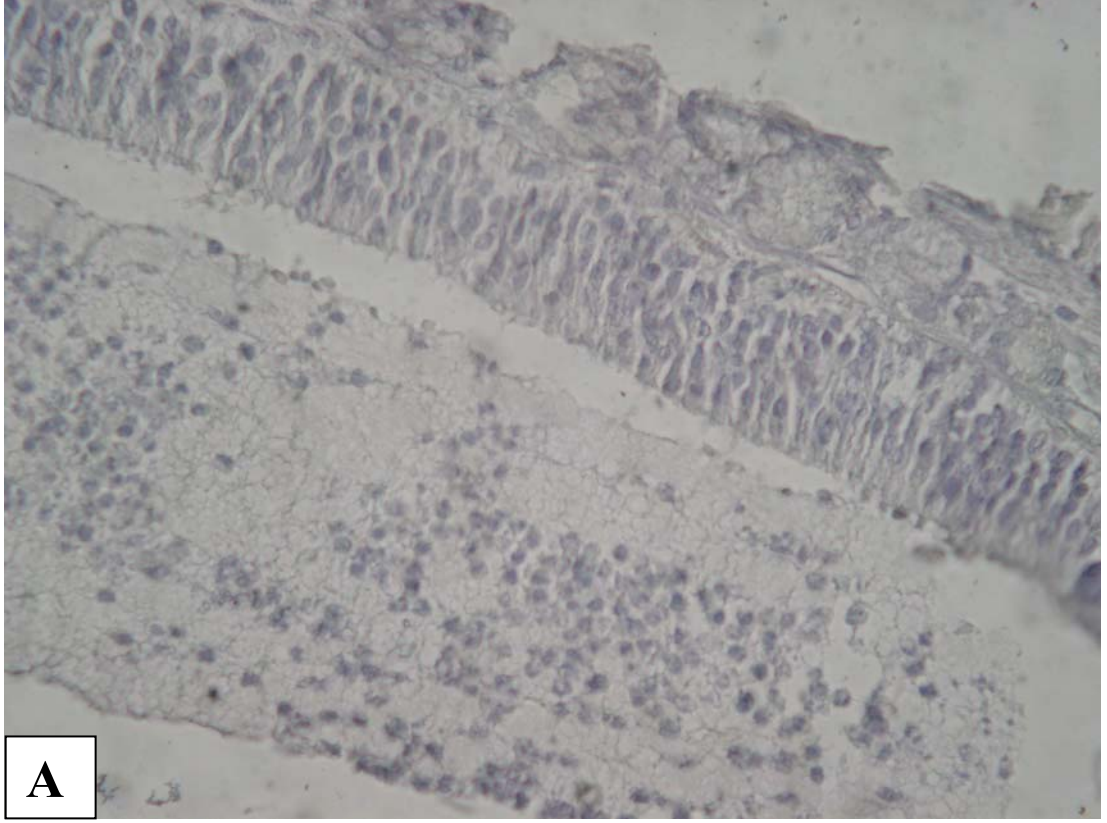
Resim 17. Kontrol grubu. Nazal mukozadaki epitel hücrelerinde AQP5 boyaması negatif olarak görünmekte. (A: AQP5 X 40) (B: AQP5 X 20)



Resim 18. Sham grubu. Nazal mukozadaki epitel hücrelerinde AQP5 boyaması (+) hafif olarak gözlenmekte. (A: AQP5 X 40)



Resim 19. Alerjik rinit grubu: Nazal mukozadaki epitel hücrelerinde AQP5 boyaması (++) (orta şiddette boyanmış) olarak gözlenmekte. (A: AQP5 X 40) (B: AQP5 X 20)



Resim 20. H89 grubu: Nazal mukozadaki epitel hücrelerinde AQP5 boyaması (-) (boyanma yok) olarak gözlenmekte. (A:AQP5 X 40) (B:AQP5 X20)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Alerjik rinit; nazal semptomlar, yorgunluk, baş ağrısı ve çeşitli derecelerde hayat kalitesinde ve verimliliğinde düşmelere neden olabilir. Ataklar halinde semptomları olan hastalar, kronik semptomu olan ve ciddi rahatsızlık çekmedikçe ilaç kullanmayan hastalara göre ilaç kullanımı konusunda daha hassaslardır (75). Çocuklar için bu durum özellikle üzerinde durulması gereken bir rahatsızlıktır. Çoğu durumda, alerjik rinit kalıcı bir durumdur ve hastanın çoğu hayatlarının bir döneminde alerji tedavisi mutlaka almaktadırlar.

Tedavi arayışları sırasında, alerjik rinit modeli oluşturmak ve bazı ilaçların etkilerini araştırmak için çok sayıda hayvan deneyleri yapılmıştır. Hayvan deneylerinde alerjik rinit oluşturmak için çeşitli alerji yapıcı maddeler kullanılmıştır. Bu maddelerden bazıları, chicken egg albumin (yumurta beyazı albumini) denilen ovalbumin ve diğeri Japon sedir ağacı polenidir.

Shimuzu ve ark.'ın (78) fareler üzerinde yaptığı çalışmada immunizasyon için ovalbumin 1, 2, 3 ve 10. günlerde intraperitoneal olarak 200 µg dozda 10 mg aluminyum hidroksit jel ve pertussis toksin ile birlikte verilmiş, ilk immunizasyondan 18 gün sonra üç gün süreyle 0.1 ml serum içinde 5 mg ovalbumin olan solüsyondan intranasal olarak uygulamıştır. Bu hayvanların bir kısmına Th2 sitokin inhibitörü olan suplatstat tosilat verilmiş ve bu hayvanlarda nazal eozinofilinin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür.

Terada ve ark. (79) guinea piglerde yaptığı çalışmada deneysel alerjik rinit oluşturmak için aluminyum hidrositte adsorbe edilen sedir ağacı poleni ekstresini intranasal olarak günde iki kez bir hafta süreyle vermişlerdir.

Makino ve ark. (80) yaptığı çalışmada sedir ağacı poleni ile guinea piglerde sensitizasyon yapmışlardır. Gyokuheifu-san (GHS) adlı maddenin alerjik rinitte koruyucu ve tedavi edici etkileri değerlendirilmiştir. Polen inhalasyonundan sonra hayvanlarda hapsirik, burun kaşıma ve gözde yaşarma gibi alerjik rinit semptomları ortaya çıkmış fakat GHS ile tedavi edilen grupta daha az hapsirik görülmüştür. Sato ve ark.(81) farelerde yaptıkları çalışmada alerji oluşturmak için ovalbumini önce intraperitoneal olarak sonra intranasal olarak yedi gün boyunca vermişlerdir.

Wen ve ark.'ın (77) sıçanlar üzerinde yaptığı çalışmada immünizasyon için ovalbumin önce intraperitoneal 0.3 mg dozda 30 mg alüminyum hidroksit ve 1 ml % 0.9 serum fizyolojik ile birlikte 2 günde bir defa 14 gün boyunca verilmiş; daha sonra alerjik rinit modeli oluşması için yedi gün boyunca 10 µl % 10 ovalbumin intranasal olarak uygulanmıştır. Tedavi grubuna bunlara ek olarak alerjik semptomları önlemeye yönelik olarak 10 U botox uygulanmıştır. OVA ile sensitize edilen grupta hapşırma, burun kaşıma, burun akıntısı gibi tipik alerjik semptomları görülürken tedavi grubunda bu semptomlarda belirgin azalma olduğu saptanmıştır. OVA ile sensitize edilen grupta nazal mukozada eozinofil artışı, vasküler dilatasyon, konjesyon, ödem ve seröz glandlarda hiperplazi saptanırken, botoks uygulamasının bu değişiklikleri önemli ölçüde azalttığı görülmüştür.

Biz de çalışmamızda intraperitoneal uygulama için hazırlanan 25µgr/ml'lik ovalbumin solüsyonundan 2 ,3 ve 4'üncü gruba, 1, 2, 3, 7 ve 10'uncu günlerde 1 ml intraperitoneal olarak verdik. Yedinci günden itibaren yine intranasal uygulama için hazırlanan ovalbumin solüsyonundan günde iki kez her iki burun deliğinden, her dozda 0.1 ml olacak şekilde ikişer puff 8 ,9 ,10 ve 14'üncü günlerde 2 ,3 ve 4. gruplara nazal spreyle uyguladık..

Alerjik rinit hastalarının burun dokularına yönelik yapılan immunohistokimyasal çalışmalar, lamina propria ve epitel içinde yoğun eozinofil, bazofil/mast hücresi biriktiğini göstermiştir (76). Buna ek olarak alerjik rinitli hastalarının burun salgılarında da yoğun olarak eozinofillerin bulunduğu saptanmıştır (83). Bizim çalışmamızda ovalbumin verilerek sensitize edilen 3 grupta goblet hücre artışında, vasküler konjesyon artışında, enflamatuvar hücre infiltrasyonunda, vasküler proliferasyon artışında, eozinofil hücre infiltrasyonunda anlamlı olarak değişiklikler saptanmış ve alerjik rinit oluşturulduğu histolojik olarak tespit edilmiştir (Tablo 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15)

Biz bu çalışmamızda alerjik rinitlerin tedavi metodlarından olan ilaçla tedavi seçeneklerine yeni bir ajan olan H89'un etkisi olup olmadığını tespit etmeyi amaçladık. Şu ana kadar var olan tedavilerden antihistaminikler alerjik rinit tedavisinin en önemli araçlarından birisi olmuştur. Son zamanlarda geliştirilen antihistaminiklerde belirgin antiinflamatuvar etkiler de vardır. Topikal uygulanan

antihistaminikler, hangi antihistaminik seçilirse seçilsin, allerjik rinitin rinore, hapşırma, kaşıntı gibi "yaş semptomları"nı azaltır. Etkilerini organdaki histamin reseptörleri ile kompetesyona girerek gösterirler. Burun tıkanıklığı ve konka ödemeine karşı etkili değildirler (65).

Dekonjestanlar (Alfa-Adrenerjik Agonistler) vazokonstriksiyon yaparak ödemli bölgeye kan akımını azaltır. Topikal kullanımları oral kullanımlarından daha etkilidir. Dekonjestanlar, solunum yolları mukozasındaki alfa adrenerjik reseptörlere vazokonstriksiyon yaptırarak ödemi azaltır. Efedrin, psödoefedrin veya fenilpropanolamin gibi yaygın kullanılan dekonjestanların bir antihistaminige eklendiği preparatlar, kısa süreli kullanımda klinik etkinliği arttırabilir. Dekonjestanlar oral yoldan, topikal sprey veya damla olarak verilebilir. Topikal uygulamanın etkinliğinin daha fazla olmasına rağmen, hızlı rebound rinit ve sonuçta rinitis medikamentoza gelişimi potansiyeli, topikal dekonjestanların kullanımını kısa süreli olarak kısıtlar (65).

Kromolin Sodyum, duyarlılaşmış mast hücreleri içeren muköz membrana topikal olarak uygulanır ve mast hücresi membranı üzerinden kalsiyum taşınmasını azaltarak degranülasyonu ve medyatör salınımını engeller. İlaç en çok allerjen yüklemesi öncesi kullanıldığında etkilidir ve en iyi etki mevsim öncesi yüksek IgE'si olan hastalarda görülmektedir. Bu preparat allerjik şikayetleri olan hastalarda profilaksizde kullanılır. Bu maddenin etkinliğini araştıran bir çalışmada Meltzer ve ark. kromolin sodyum içeren nazal solüsyonların mevsimsel allerjik rinitte plasebo ile karşılaştırdı. Hastalar rastgele iki gruba ayrıldı ve ilk gruba kromolin sodyumlu nazal sprey verilirken, diğer gruba plasebo sprey verildi. Çalışmanın sonucunda kromolin sodyum plasebo ile karşılaştırıldığında allerjik semptomların azalmasında daha etkili olduğu görüldü (84).

Sistemik steroid tedavisi allerjik rinitte hiçbir zaman ilk adım tedavi değildir, son çaredir. İlk olarak sistemik ajanlar formunda mevcut olan kortikosteroidlerin iyi belgelenmiş yan etkileri ve dolayısıyla kısıtlı hale gelen kullanımları, intranazal formülasyonların geliştirilmesine yol açmıştır (86, 87).

Kortikosteroidler allerjik rinit tedavisinde en etkili farmakoterapi yöntemidir. 1973 yılında beclomethasone'un allerji sektörüne adım atmasından bu yana topikal

kortikosteroidler allerjik rinit tedavisinde başarıyla kullanılmaktadır. Son yıllarda birçok topikal kortikosteroid geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur. Bu gruptaki başlıca örnekler; budesonide, flunisolide, fluokortinbutil, flutikazon propionat, mometasone fruat ve triamsinolon asetonit'dir. Topikal kortikosteroidlerin gerek erişkinler, gerekse çocuklarda düzenli kullanımı ile burun tıkanıklığı, akıntı, hapşırma ve kaşıntı gibi allerjik belirtiler oldukça efektif bir şekilde azaltmaktadır. Tüm nazal semptomlar göz önüne alındığında allerjik rinit tedavisinde antihistaminiklere üstünlüğü doğrulanmıştır (85)

Topikal steroidlerin nazal blokaj üzerine etkisi antienflamatuar kapasiteleri nedeniyle özellikle perennial allerjik rinitte diğer tedavi modellerine göre daha üstündür. Allerjik inflamasyonu azaltıp nazal semptomları ortadan nasıl kaldırdıkları açık değildir. Etkisini bir kısmını mediatör hücrelerin akışını engelleyerek yaparlar. Ancak erken hapşırma, rinore gibi allerjene maruz kalındığında oluşan semptomları ortadan kaldırma mekanizmaları açık değildir. Yüzey mast hücre/bazofil sayısı düşüktür. IgE'ye bağlı histamin salınımını engellerler ama bunu nasıl yaptıkları tam olarak bilinmemektedir. İntranazal kortikosteroidler allerjik rinitli hastalarda erken faz mast hücrelerden histamin salınımına bağlı oluşan kaşıntıyı, hapşırıkları ve rinoreyi azaltır (97).

Bende ve ark.'nın (91) tavşanlar üzerinde yaptığı çalışmada, maksiler sinüzit oluşturularak tavşanların bir maksiler sinüsüne oksimetazolin, diğer tarafa plasebo olarak fosfat tamponlu salin solüsyonu uyguladılar. Daha sonra kesitler alarak lökosit infiltrasyonu, mukozal ödem ve epitelyal metaplazi yönünden değerlendirerek, çalışma sonunda oksimetazolin ile tedavi edilen tarafta mukozal inflamatuvar cevabın anlamlı olarak fazla olduğunu tespit ettiler.

Yine allerjik rinite alternatif bir tedavi olarak Narita ve ark. (94) ovalbumin ile sensitize ettikleri Dunkin-Hartley guinea piglerde siklosporin ve glukokortikoidlerin allerjik rinitte süpresif etkilerini araştırmışlar. Siklosporini 50 mg/kg dozunda peroral, glukokortikoidleri (beklometazon propionat 1 mg/kg dozunda, flutikazon propionat 0.5 mg/kg dozunda) intraperitoneal olarak vermişler. Nazal antijen uygulaması ile artan histamin hipersensitivitesinin siklosporin ve glukokortikoidlerle azaldığını tespit etmişlerdir.

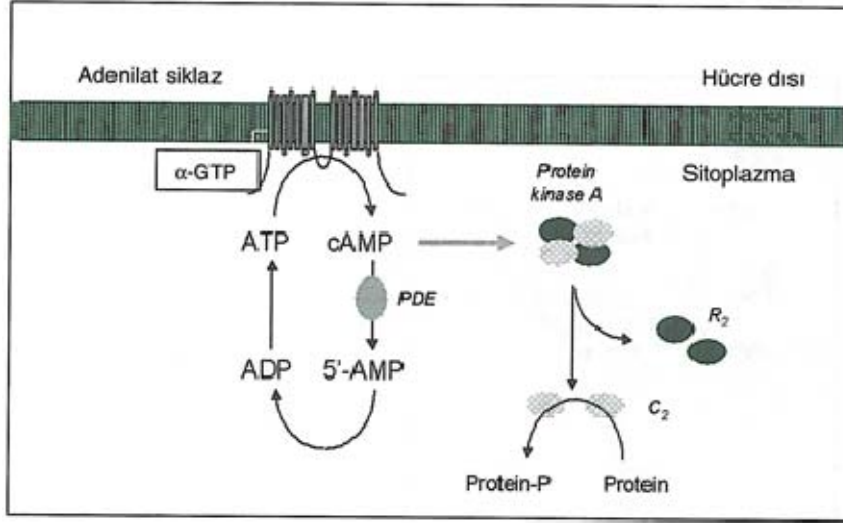
Biz çalışmamızda topikal sprey şeklinde H89 'un alerjik rinitte burun mukozasındaki etkinliğini araştırdık ve histolojik olarak tedavide anlamlı sonuçlar elde ettik.

İlk olarak sistemik ajanlar formunda mevcut olan kortikosteroidlerin iyi belgelenmiş yan etkileri ve dolayısıyla kısıtlı hale gelen kullanımları, intranasal formülasyonların geliştirilmesine yol açmıştır (86, 87). Topikal formülasyonların geliştirilmesinin ardında yatan bir diğer neden de, nazal mukoza içerisindeki reseptör bölgelerinde yüksek ilaç konsantrasyonlarına ulaşmak ve bu düzeyleri korumaktır. Bu, bir yandan etkinlikte iyileşme sağlamaya yardımcı olurken, diğer taraftan sistemik yan etki riskini en aza indirecektir (92, 93). İntranazal kortikosteroidlerin etki göstermesi 4-12 saat içerisinde olmaktadır, günler boyu kullanımda bile düşük sistemik emilimleri ve mükemmel bir etkinlik ve güvenlik profili vardır. Roper Anketi'ndeki hastalar (96), konjesyonun rahatlatılmasının intranasal kortikosteroid kullanımı ile elde edilen en büyük fayda olduğunu bildirmiştir. Her ne kadar bu ajanların kesin etki mekanizması tam olarak açıklığa kavuşmamışsa da, enflamatuvar yanıtın ortaya çıkışını inhibe ederek ve mast hücrelerinin de aralarında yer aldığı enflamatuvar hücrelerin sayısını azaltarak fonksiyon gösterdikleri düşünülmektedir (100). Dahası, nazal mukozanın enflamatuvar hücrelere ve araçılara karşı vasküler geçirgenliğindeki azalma, enflamatuvar semptomların düzeltilmesini ve rahatlamayı sağlamaktadır. İntranazal kortikosteroidler nazal konjesyon semptomlarında iyileşme sağladıkları gibi, aralarında rinore, hapşırma ve kaşıntının da yer aldığı diğer gece ve gündüz semptomlarını da rahatlatmaktadırlar. Bu ilaçlar, oküler semptomların tedavisinde de kısmen etkilidirler (92). Tam hücre ekstraktlarında gerçekleştirilen in vitro glukokortikoid reseptör bağlanma tayinleri, intranasal bir glukokortikoidin rekombinan insan glukokortikoid reseptörüne olan göreceli afinitesi açısından bilgi vermekte ve in vivo etki gücünü belirlemektedir. Oluşum esnasında, glukokortikoid-reseptör kompleksi çekirdeğe doğru yönelir ve glukokortikoid yanıt bileşenleri olarak isimlendirilen spesifik DNA sekanslarına bağlanırlar. Bu kompleks, alerjik rinit ile ilişkili enflamatuvar semptomları hafifletmek üzere anti enflamatuvar proteinlerin ekspresyonunu aktive eder. Hücre kültürü serilerinde yapılan çalışmalar, mometazon furoat gibi glukokortikoidlerin bu açıdan etki gücü olduğunu ortaya koymuştur (101).

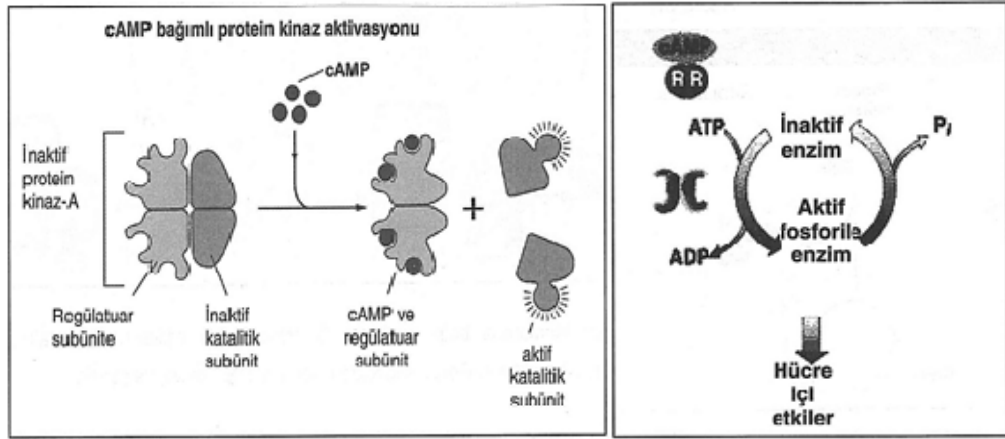
Alerjik rinit tedavisinde en fazla başvuru alan tedavi seçeneklerinden olan topikal steroidler fosfolipaz A₂'yi inhibe ederek prostasiklinleri azaltır ve alerjinin semptomlarını azaltmasını sağlar. Buna alternatif bir yol olarak bizim çalışmamızda kullandığımız H89, bir spesifik protein kinaz A inhibitörü olup etki mekanizmasını adenilat siklaz sisteminde gösterir. α ve β 2 adrenerjik reseptörler gibi membran reseptörlerinin uyarılması ile adenilat siklaz sistemi aktivitesinde bir artma ve azalma olur. Adenilat siklaz ATP'yi 3'5' AMP 'ye (cAMP) çeviren membrana bağlı bir enzimdir. Kimyasal sinyaller sıklıkla hormonlar ve nörotransmitterlerdir ve her biri tek tip membran reseptörüne bağlanır. Bu nedenle birden fazla kimyasal sinyale cevap veren dokularda, herbiri adenilat siklaza bağlı birkaç tip reseptör bulunabilir. Adenilat siklaz membrana bağlı enzimdir. G proteinleriyle etkileşir. Gs tarafından aktive, Gi tarafından inhibe edilmektedir. Görevi sitozolden aldığı ATP'leri cAMP'ye çevirmektir. cAMP adenilat siklaz sistemindeki sekonder mesajcıdır ve görevi sitoplazmik enzim olan protein kinaz A'yı aktifleştirmektir (102).

cAMP ikinci mesajcı sisteminde anahtar bağlantı ise cAMP bağımlı protein kinazlar veya protein kinaz A olarak adlandırılan bir grup enzimin cAMP ile uyarılmasıdır.

Protein kinaz molekülü 2 düzenleyici alt birim ve 2 katalitik alt birim olmak üzere 4 alt birimden oluşmaktadır. cAMP protein kinazı 2 düzenleyici alt birimden bağlayıp aktif katalitik alt birimlerini serbest bırakmaktadır. Protein kinaz A'nın serbest katalitik alt birimleri ki bunlar protein kinaz A'nın aktif şekilleridir; ATP'den aldıkları terminal fosfor grubunu proteinlerdeki serin ve treoninlere transferini katalize eder. Fosforillenmiş proteinler de; direkt olarak hücrenin iyon kanallarına etki edebilir veya enzimleri aktive veya inhibe edebilir. Protein kinaz A DNA'nın bağlayıcı bölgelerine bağlanan spesifik proteinleri fosforilleyerek spesifik genlerin daha fazla ekspresyonuna neden olarak hücre içi etkileri oluşur. Böylece bizim çalışmamızdaki AQP ekspresyonunun inhibe edilmesi bu yolakla açıklanabilmektedir.



A)



B)

C)

Şekil 16. A, B, C: cAMP yolağının etki mekanizması.

Aquaporinler havayollarının ozmotik dengesinde önemli bir rol oynarlar.

2000'li yıllardan sonra yapısı ve fonksiyonu üzerine birçok çalışma ve keşifler yapılan AQP'ler; bazı hastalıkların fizyopatolojisinde önemli yeri olduğu ve aynı zamanda tedavi seçeneklerine alternatifler geliştirilebilecek bakir alan olması nedeniyle önemlidir. Biz de alerjik rinitte AQP ekspresyonu ve üzerine hücre kültürü çalışmaları bulunan ama henüz in vivo hiçbir çalışma yapılmamış olan cAMP yolağında spesifik protein kinaz A'yı inhibe eden H89 etkileri üzerine bir çalışma yaptık.

Birçok hastalıkla ilişkili olan AQP'lerin aynı zamanda alerjik rinitle ilgili bozukluklarda da önemli yeri vardır. AQP5 seröz bezlerin salgılanmasında yakından ilişkili olan aquaporin ailesinin bir üyesidir (4). Son yapılan çalışmalara göre AQP-5 'in bulunma sıklığı ve dağılımı cAMP-PKA yolağı ile düzenlenmektedir (5, 98).

Yang ve ark. yaptıkları bir çalışmada cpt-cAMP ile muamele ettikleri fare akciğer hücre kültüründe AQP5 seviyesinin dört kat arttığını göstermiştir (5). Yang ve ark. aynı hücre kültürlerine spesifik bir protein kinaz A inhibitörü olan H89 ile muamele ettiklerinde ise bu etkinin azaldığını göstermişlerdir.

Yine Sidhaye ve arkadaşları cAMP'ye veya cAMP içeren terbutalin ve forskolin içeren ilaçlara maruz kalan akciğer epitel hücrelerinde AQP5 miktarının apikal plazma membranında azaldığını göstermişlerdir. H89 ile bu hücre kültürlerinde yine AQP5 seviyesinin azaldığı da görülmüştür (98).

Bu bulgularda bizim yaptığımız çalışmadaki immünohistokimyasal olarak nazal epitel dokuda H89 verilen grupta AQP boyanması açısından anlamlı değişiklikler saptanmış ve AQP5 miktarının plazma membranın apikal kısmında azaldığını göstermiş olduk.

Parvin ve arkadaşları da (99) invitro olarak vazoaktif intestinal polipeptid (VIP) ile muamele edilen duodenal kesitlerde apikal hücre membranında AQP5'in anlamlı şekilde arttığını göstermişler ve H89 hücre kültürüne ilave edilince artmış ekspresyonu bloke ettiğini göstermişlerdir. Bu çalışmadaki H89'un AQP5'i inhibe edici özelliği bizim çalışmamızdaki ile uyumludur.

AQP'lerin ekspresyonunu azaltarak birçok hastalık mekanizmasında kullanılabilecek ilaçlar geliştirilebilir. Aquaporin hedefli tedavilerde, insan ve fare fizyolojisinde çeşitli farklılıklar olmasına rağmen AQP fonksiyon bozukluğu olan farelerdeki hastalıklar birtakım hastalıklara karşı aquaporin modülatörlerinin yeni bir takım tedavi yöntemleri olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Altuntaş ve arkadaşlarının (105) 34 hastadan aldıkları nazal poliplerde AQP1 ve AQP4 ekspresyonunun immünohistokimyasal tekniklerle araştırılmış ve özellikle AQP1 miktarının anlamlı şekilde arttığı gösterilmiş. Sonuçta nazal polipteki ödem formasyonunun AQP'lerle ilişkili olabileceği sonucuna varmışlardır

Diğer inhibitör olarak kullanılan maddelerden biri de tetraetilamonyum (TEA)'dur.

TEA'nın, oositler ve böbreklerde AQP1 ile ilişkili su permeabilitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (107, 108). Daha detaylı bir çalışmada TEA'nın beyin dokusu ve ödemiyle ilgili AQP olan AQP4'ün aktivitesini etkilediği görülmüştür. TEA bir K-voltaj kanalı, Ca bağımlı K⁺ kanalı ve nikotinik asetil kolin reseptör blokleri olması nedeniyle non spesifik bir inhibitördür (104). Ancak cıva kadar toksik olmaması ve reversibl etkisi nedeniyle AQP çalışmalarında kullanılan daha iyi bir maddedir.

Aquaporinler direkt olarak fizyopatolojinde yer almadığı hastalıkların da tedavisi için alternatif bir tedavi seçeneği oluşturabilir. Mesela hiponatremi, konjestif kalp yetmezliği, karaciğer sirozu ve düzensiz antidiüretik hormon salınımı hastalığında görülebilen ciddi bir elektrolit bozukluğudur. Günümüzdeki tedavi yollarından olan hipertonic sıvı takviyesi ve diüretik kullanımında, reaksiyonel olarak hiponatremiyi agreve edecek şekilde hiponatremi oluşabilmektedir. Bunun için yeni ve etkin bir tedavi seçeneği olarak aquaporin inhibisyonu yapılarak sıvı atılımını arttırmak ve böylece hiponatremi tedavisinde daha doğru ve etkili bir tedavi olabileceği düşünülmüştür (106).

Allerjik riniti ve allerjik astımı olan hastaların alındığı popülasyon bazlı bir çalışmada, takip (medyan süre 7 yıl, 10 ay) sırasında yapılan tekrar değerlendirme ile polene karşı allerjik astımı olan tüm hastaların allerjik rinitinin de olduğu bulunmuştur (72). Takip süresi 23 yıl olan ve takip esnasında astımlı hastaların %85'inde allerjik rinitin geliştiği kolej öğrencileri ile yapılan bir çalışmada, benzer sonuçlar alınmıştır. Allerjik rinit, atopik dermatit, bronşial astma gibi atopik hastalıklarda, ortak çevresel antijenlere karşı cevap olarak Ig E üretimi artmıştır. Eozinofil akümülyasyonu için gerekli olan interlökin 4 (IL-4) ve interlökin 5 (IL-5)'in önemi çeşitli hayvan modellerinde gösterilmiştir. Bronşial astımlı hastaların serumunda ya da bronkoalveolar sıvısında hastalığın sıklığı ya da şiddeti ile orantılı olarak IgE seviyeleri artmıştır (83). Dolayısıyla, allerjik rinit ve astım, aynı hastalığın manifestasyonları olabilir (88, 103). Biz de çalışmamızda AQP5'in allerjik rinitin mukozal etkilerini ve H89'un etkisini araştırdık.

Yang ve arkadaşlarının (5) Aquaporin 5 ekspresyonunun protein kinaz A üzerinden transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel olarak siklik AMP tarafından

düzenlenmesi adlı çalışmasında fare akciğer epitel hücre kültüründe (MLE-12) AQP5 sentezlenmesini arttıran ve azaltan maddeler ve bunların etki yolları üzerinde araştırma yapmışlardır. Klorofeniltio-cAMP (cpt-cAMP) eklenen hücrelerde AQP5 mRNA, protein seviyeleri ve AQP5'in apikal plazma membranına translokasyonunda 4 kat artış olduğunu tespit etmişlerdir. Forskolin ve isoproteranol ile tedavi ise yine benzer şekilde bir AQP5 artışı göstermiştir. Bir RNA polimeraz II inhibitörü olan Aktinomisin D ve sikloheksimit ilave edilmesinin ise hücre kültürlerinde cAMP bağımlı AQP5 artışını ortadan kaldırdığı ve AQP5 mRNA'sının yarı ömründe uzama olmadığını göstermişlerdir. Yine aynı çalışma bizimde üzerinde çalıştığımız madde olan H89 ilavesiyle protein kinaz A'yı inhibe ederek cpt-cAMP 'ye bağlı AQP5 sentezini inhibe olduğunu göstermiştir. Bunun için Yang ve arkadaşları hücre kültürüne AQP5 ekspresyonu arttırması için verilen 200 M cpt-cAMP 'den 30 dakika önce 30 µM H89 vererek protein kinaz A 'yı inhibe etmeye çalışmışlar. Etkisini ölçebilmek için 6 ve 24 saat sonra Northern blot analiz yöntemiyle çalışmışlar. Sonuçta H89'un %60 oranında cpt-cAMP 'nin AQP5 mRNA'sı üzerindeki etkisini azalttığı görülmüş.

Yine Western blot analiz yöntemiyle ise H89'un cpt-cAMP 'nin AQP5 protein ekspresyonu üzerine etkisine komple bir durdurucu etkisi olmuş. Ancak H89; cpt-cAMP 'nin AQP5'in mRNA seviyesindeki etkisini tam olarak bloke etmemiştir yani tam bloke edici etkisini cpt-cAMP 'nin AQP5 protein seviyesinde göstermiştir. Bu da protein kinaz A'nın AQP5 sentezindeki etkisinin hem transkripsiyonel hem de post transkripsiyonel seviyede gösterdiğinin anlaşılmasını sağlamıştır.

Sidhaye ve arkadaşları (98) yine fare akciğer hücre kültüründe yaptıkları çalışmada 100 µM pCPT-cAMP ile 30 dakika ve 8 saat muamele ettikleri hücrelerdeki uzun ve kısa dönemdeki AQP5 değişikliğini PKA inhibitörü olan H89'un varlığında ve yokluğunda değerlendirmişler. Hücre zarının biotinizasyonu tekniğiyle hücre zarında AQP5 düzeylerini 30 µM H89 ile hem kısa dönem hem de uzun dönemde ölçmüşler. Sonuçta PKA inhibisyonu cAMP'nin AQP5 dağılımı üzerine kısa ve uzun dönemde etkilerini bloke ettiği ortaya çıkmıştır. Biz de çalışmamızda 30 µmolarlık H89 solüsyonundan ilk i.p. OVA uygulamasından sonraki 8, 9, 10 ve 14'üncü günlerde intranazal yolla her burun deliğine ikişer puff

olarak alerjik rinit oluşturulmak için verilen intranasal OVA solüsyonunun 1 saat önce verdik.

Biz çalışmamızda AQP inhibitörü olarak H89 'ü kullandık ve histopatolojik olarak solunum mukozasını oluşturan silya yapılarının kaybolması alerjik rinit grubunda gözlenmiş olup, DMSO verdiğimiz sham grubunda ve H89 grubunda tedavi ile anlamlı olarak düzelmeye saptanmıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırılınca H89 grubuyla ve DMSO'nun aynı etkiye sahip olduğu görüldü (Tablo 3, 4. Şekil 7).

Kronik inflamatuvar süreçte metaplaziye bağlı ortaya çıkan goblet hücre artışı, alerjik rinit grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır. Alerjik rinit ile sham ve H89 grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ve tedavi grubunda ve DMSO verdiğimiz sham grubunda goblet hücre sayısı azalmıştır. Kontrol grubuyla DMSO verdiğimiz sham grubu ve DMSO + H89 verdiğimiz tedavi grubu karşılaştırılınca ikisinde etkili ama sham grubunun daha etkili olduğu saptanmıştır (Tablo 5, 6. Şekil 8).

Nazal mukozada ve konka parenkiminde damarlanma ve damar çapında artışa bağlı olarak ortaya çıkan konjesyon, alerjik rinit grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı olarak fazla çıkmıştır. H89 grubunda verilen tedavi ile istatistiksel olarak anlamlı düzelmeye sağlanmıştır. Sham grubuyla alerjik rinit grubunda ise anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo 9, 10. Şekil 10).

Alerjik rinit grubunda özellikle lamina propria tabakasında çok sayıda vasküler proliferasyona (Vasp) rastlandı ve H89 grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak sonuçlar anlamlı olmasına rağmen alerjik rinit ve H89 grubu arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. DMSO verilen sham grubunda ise alerjik rinit grubuna göre vasküler proliferasyonun azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 11, 12. Şekil 11).

Yoğun olarak lenfositlerden oluşan inflamatuvar hücre infiltrasyonu alerjik rinit grubunda tespit edilmiş olup, alerjik rinit ve H89 grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir. Ancak sham grubunda inflamatuvar hücre infiltrasyonu açısından H89 ve alerjik rinit grubuna göre azalma tespit edilmiştir. Uygulanan DMSO etkili bulunmuştur (Tablo 13, 14. Şekil 12).

Yoğun olarak eozinofillerden oluşan infiltrasyon alerjik rinit grubunda tespit edilmiş olup, alerjik rinit ile H89 ve sham grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak H89 ve sham grubunda anlamlı ölçüde düzelme olduğu görülmüştür. Kontrol grubuyla karşılaştırılınca sadece DMSO verilen grubun DMSO + H89 verilen gruba göre daha etkili olduğu görülmüştür (Tablo 15, 16. Şekil 13).

Mukozal bezlerde dejenerasyonun alerjik rinit grubunda olduğu görülmüştür. Kontrol ile H89 ve sham grubunun karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Alerjik rinit grubuna göre sham ve H89 grubunda anlamlı azalma tespit edilmiştir (Tablo 17, 18. Şekil 14).

Histolojik incelemeler sonucu özellikle enflamatuar hücre infiltrasyonu, eozinofil infiltrasyonu, vasküler proliferasyon, goblet hücre artışı, mukozal bezlerde dejenerasyon açısından sadece DMSO verilen grupla, DMSO + H89 verilen grup karşılaştırılınca ikisinin de düzeltici etkisinin olmasına rağmen sadece DMSO'nun daha etkili olduğu görülmüştür. Silya kaybı açısından sadece DMSO verilen grupla, DMSO+H89 verilen grup karşılaştırılınca iki grubunda eşit miktarda etkili olduğu görüldü. Sadece vasküler konjesyon açısından DMSO'nun etkili olmadığı ancak H89 verilen grubun alerjik rinitli grupta düzeltici etkisi olduğu görüldü. Bu sonuçlara dayanarak DMSO'nun alerjik rinitte anti-enflamatuar özelliği nedeniyle birçok histolojik bulguyu düzelttiği ve H89'un ise DMSO ile karıştırılıp verilmesinin sadece DMSO verilmesine göre vasküler konjesyonu düzeltmesi haricinde bir üstünlüğü saptanmadı. İstatistiksel olarak DMSO'yu alerjik rinitte histolojik olarak daha etkili bulduk. Zaten kağıt yapımda bir kimyasal yan ürün olan DMSO, endüstriyel bir çözücü, aynı zamanda ilaç olarak kullanılmıştır. İlaç olarak ağırlıklı lokal ağrı kesici olarak kullanılmıştır. Bölgesel uygulamalarda anti-enflamatuar ve antioksidan olarak kullanılmaya başlanmıştır. 1978'de FDA ABD'de DMSO'nun mesane iltihabında dokuların tedavisinde kullanımını onaylanmıştır. 2007'de FDA beyin dokusunda travmatik beyin hasarında şişmenin azaltılması için DMSO'nun klinik çalışmalarda kullanımını onaylamıştır (111, 112). Barrager ve ark. DMSO'nun oksidatif formu olan Methylsulfonylmethane (MSM) ise oral yolla kullanımın alerjik rinitte etkili olduğunu göstermiştir (110). Ancak literatürde şu ana kadar DMSO'nun topikal olarak alerjik rinitli rat modelinde kullanımıyla ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamız bu açıdan bir ilk olmuştur.

İmmunhistokimyasal olarak sham grubundaki yalancı çok katlı silyalı prizmatik epitel (Y.Ç.K.S.P.E) hücrelerinde istatistiksel olarak orta diye nitelendirdiğimiz (++) AQP5 boyamaları gözlemlendi (Resim 18). Ovalbumin verdiğimiz gruptaki (Alerjik rinit grubu) Y.Ç.K.S.P.E hücrelerinde de yine orta olarak nitelendirdiğimiz (++) AQP5 boyamaları saptandı (Resim 19).

H89 adını verdiğimiz tedavi grubuna ait Y.Ç.K.S.P.E hücrelerinin AQP5 boyamalarında alerjik rinit grubuna kıyasla hafif (+) boyamalar veya hiç boyanma olmaması tespit edildi (Resim 20). H89 grubumuzun kontrol kıyaslandığında anlamsız ($p>0,05$), sham grubuyla ve alerjik rinit grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0,05$) çıktığı tespit edildi (Tablo 19, 20. Şekil 15).

Bu sonuçlara bakarak ise H89'un yukarıda örnek verdiğimiz literatürdeki yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu ve AQP5 seviyesini azalttığı görüldü. Ancak AQP5 deki bu azalmanın alerjik rinitte görülen özellikle enflamatuar hücre infiltrasyonunda, eozinofil infiltrasyonunda, vasküler proliferasyonda, goblet hücre artışında, mukozal bezlerin dejenerasyonunda ve silya kaybında sadece DMSO verilen ve AQP5'in fazla azalmadığı sham grubuna bir üstünlüğü olmadığı görüldü. H89 verilen grubun sadece vasküler konjesyon açısından DMSO verilen gruba üstünlüğü görüldü.

Bu sonuçlar göz önüne alındığında H89'un topikal olarak alerjik rinitli ratlara uygulanmasının nazal mukozada AQP5 seviyesini azalttığı ancak histolojik olarak alerjik bulgulara vasküler konjesyon haricinde etki etmediği ve alerjik rinitli ratlara DMSO'nun topikal olarak uygulanmasının histolojik olarak alerjik bulguları düzeltebileceği ancak AQP5 seviyesi üzerine etki etmediği düşünülmüştür. Bu sonuçlarla alerjik rinitlerde mukozada AQP5'in azalmasının enflamatuar hücre infiltrasyonu, eozinofil infiltrasyonu, vasküler proliferasyon, goblet hücre artışı, mukozal bezlerde dejenerasyonu ve silya kaybı gibi alerjik bulguları değiştirmedeği düşünülmektedir. H89'un sadece vasküler konjesyon açısından olumlu bir katkısı olmuştur. Alerjinin histolojik bulgularının düzelmesi açısından farklı aquaporinler ve yolaklar etkili olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışma, aynı zamanda alerjik rinitli ratların burun mukozasına topikal olarak H89 ve DMSO'nun ilk defa uygulanması ve alerjik rinitte etkinliğine bakılması açısından faydalı olduğu düşünülmektedir.

Alerjik rinit için bir dizi tedavi seçeneği mevcut olmakla birlikte alternatif tedaviler araştırılmaktadır. Biz de çalışmamızda H89 gibi bir spesifik protein kinaz A inhibitörünün ve DMSO'nun etkinliğini araştırdık. Sonuçta alerjik rinit deneysel tedavisi için anlamlı sonuçlar elde ettik. Ancak, H89'un ve DMSO'nun etki, yan etki profillerinin belirlenmesi için daha ileri deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

Alerjik Rinitli Ratların Burun Mukozalarındaki AQP5 Düzeyleri Üzerine Spesifik Protein Kinaz A İnhibitörü Olan H89'un Etkileri

Bu çalışmanın amacı bir spesifik protein kinaz A inhibitörü olan H89'un topikal intranasal uygulamasının, nazal mukozadaki Aquaporin 5 dağılımını inhibe ederek alerjik rinitte görülen tipik semptomları ve enflamatuvar hücre infiltrasyonunu azaltabileceğini göstermektir. H89'un ve çözücü olarak kullandığımız Dimethyl sulfoxide (DMSO)'in alerjik rinit tedavisindeki etkisini araştırarak tedavide alternatif bir seçenek olup olamayacağını değerlendirmektir.

Bu çalışmada, ağırlıkları 250-350 gr. arasında değişen 32 adet beyaz Wistar albino cinsi yetişkin erkek rat çalışmaya dahil edildi. Hayvanlar her grupta 8 rat olmak üzere 4 gruba ayrıldı. 1. gruba hiçbir şey yapılmadı (Kontrol grubu). 2. grup chicken serum albumin ile sensitize edildi ve 2 hafta süreyle DMSO topikal intranasal olarak verildi. 3. Grup Ovalbumin ile sensitize edildi ve başka ilaç verilmedi. 4. grup Ovalbumin ile sensitize edildi ve H89 topikal intranasal yedi gün süreyle verildi.

Deney sonrası sıçan konkalari blok olarak çıkarılarak Hematoksilen- Eozin ve AQP5 antikoları ile boyanarak histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilerek skorlandı.

H89 grubunda silya kaybı, goblet hücre artışı, vasküler konjesyon, eozinofil infiltrasyonu, mukozal bezlerde dejenerasyon alerjik rinit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük tespit edildi ($p=0.015$, $p=0.003$, $p=0.049$, $p=0.013$, $p=0.026$). Bağ doku artışında, vasküler proliferasyonda ve enflamatuvar hücre infiltrasyonu ise istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p=0.469$, $p=0.215$, $p=0.736$). Ancak sadece DMSO verilen sham grubunda bu düzelmelerin vasküler konjesyon haricinde daha fazla olduğu tespit edildi. H89 grubundaki histolojik düzelmelerin çözücü olarak kullandığımız DMSO'ya bağlı olabileceğini düşündük.

İmmünohistokimyasal değerlendirilmede H89 grubunda AQP5 boyamalarında alerjik rinit grubuna kıyasla hafif (+) boyamalar tespit edildi. H89 grubu alerjik rinit grubuyla karşılaştırıldığında AQP5 dağılımının istatistiksel olarak anlamlı olarak azaldığı ($p=0.001$) tespit edildi. Sham grubunda ise AQP5 seviyesinde alerjik rinit grubuna göre anlamlı azalma tespit edilmedi ($p=1.000$).

Sonuç olarak; H89, AQP5 seviyesini azaltan ancak mukozadaki alerjik bulgular üzerinde çok etkili bir madde olmadığını düşündük. Çözücü olarak kullandığımız DMSO'nun AQP5 seviyesine etki etmediği ancak nazal inflamasyonu azalttığını tespit ettik. Ancak hayvanlarda daha kapsamlı ve ultrastrüktürel çalışmalar ve sonrasında insan çalışmalarının yapılmasına gerek duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Aquaporin, H89, ovalbumin, alerjik rinit, protein kinaz A,

DMSO

SUMMARY

Effects of H89, A Specific Protein Kinase-A Inhibitor, on the Level of AQP 5 in Nasal Mucosa of Rats with Allergic Rhinitis

The aim of this study was to determine whether topical intranasal administration of H89 which is a specific protein kinase A inhibitor could relieve the typical symptoms of allergic rhinitis and attenuate the inflammatory cell infiltration by inhibition of AQP5 expression. Thus, to elucidate the functions of H89 in allergic rhinitis and evaluate whether H89 and DMSO- we used as the solvent- could be an alternative treatment in allergic rhinitis.

In this study, 32 white Wistar albino adult male rats which the weights ranging 250-350 gram were used. Animals divided into 4 groups that each group contains 8 animals. In the first group, no drug was administered (control group). In the second group, sensitization was completed by chicken serum albumin and DMSO (Dimethyl sulfoxide) was administered topical intranasal for 2 weeks. In the third group, sensitization was completed by OVA and no other drug was administered. In the fourth group, sensitization was completed by OVA and after this H89 was administered for 7 days.

After the experiment rat conchas were dissected out as block and all the sections were evaluated as histopathologically immunohistochemically by stained with Hematoxylen-Eosine and AQP5 anticors.

In group H89 statistically significantly gave rise to lesser inflammatory cells accumulation, ciliary loss of epithelial cells, goblet cell hyperplasia, vascular congestion, eosinophile infiltration, degeneration of mucosal glands compared to allergic rhinitis group ($p=0.015$, $p=0.003$, $p=0.049$, $p=0.013$, $p=0.026$). There was no statistically significantly quantity of goblet cells, vascular proliferation, severity of inflammatory cell infiltration ($p=0.469$, $p=0.215$, $p=0.736$). However, in the sham group which was given only DMSO, these improvements were found more. DMSO is used as a solvent; may be due to improvements in H89 group thought that the histological.

In group H89, examination by staining AQP5 immunohistochemically there was low staining (+) compared to allergic rhinitis. In group H89 statistically significantly gave rise to lesser AQP5 expression compared to allergic rhinitis group ($p=0.001$). In group sham there was no statistically significance compared to allergic rhinitis group for AQP5 expression ($p=1.000$)

In conclusion; we thought that H89 can give rise to lesser AQP5 expression but can not effect allergic mucosal signs. DMSO, the solution as we used solvent, can not effect AQP5 expression but DMSO can give rise to lesser nasal inflammation.

However, human studies should be performed following more comprehensive and ultrastructural studies on animals.

Key words: Aquaporin, H89, ovalbumin, allergic rhinitis, protein kinase A, DMSO

KAYNAKLAR

1. Ercan İ, Çakır B, Başak T, Özbal E, Şahin A, Balcı G, Turgut S. Effects of topical application of methotrexate on nasal mucosa in rats. A preclinical assessment study. *Otolaryngol-Head and Neck Surgery*, 2006;134; 751-755.
2. Song Y, Jayaraman S, Yang B, Matthay MA, Verkman AS. Role of aquaporin water channels in airway fluid transport, humidification, and surface liquid hydration. *J Gen Physiol*, 2001;117:573-582.
3. Verkman AS, Matthay MA, Song Y. Aquaporin water channels and lung physiology. *AM J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;278(5):L867-L879.
4. Song Y, Verkman AS. Aquaporin-5 dependent fluid secretion in airway submucosal glands. *J Biol Chem*. 2001;276:41288-41292.
5. Yang F, Kawedia JD, Menon AG. Cyclic AMP regulates aquaporin 5 expression at both transcriptional and post-transcriptional levels through a protein kinase A pathway. *J Biol Chem*. 2003;278:32173-39.
6. Bousquet J, Van-Cauwenberge P, Khaltaev N, and the ARIA group. Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108 (suppl):147-333
7. Cagnani CE, Sole' D, Di'az SN et al. Allergic rhinitis update and its impact on asthma (ARIA 2008). Latin American perspective. *Rev Alerg Mex* 2009;56:56-63.
8. Çanakçıoğlu S, Tahami RV: Alerjik rinit. *Medikal Dergi*. 1994;100: 36-40.
9. Solomon WR, Platts-Mills TAE. Aerobiology and inhalant allergens. In Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Buse WW eds. *Allergy, Volume II*. 5th edition. St Louis, Missouri: Mosby-Year Book Inc, 1998:367-403.
10. Ciprandi G, Cirillo I, Vizzaccaro A. Seasonal and perennial allergic rhinitis: is this classification adherent to real life? *Allergy*. 2005; 60, 882-887.
11. Topuz B. Alerjik rinit tanısında kullanılan testler, in; *Kulak Burun Bogaz Hastalıklarında Alerji*. 2001: 25-41.
12. Şahin F, Şahin A. Alerjik rinitte tanı In: Önerci M. *Alerjik rinosinüzitler*. Ankara 2002:62-107.
13. Baranjuk IN, Pathogenesis of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;99:763-772.
14. Topuz B, Kara C. Alerjik rinitte tedavi . Doğru H, Topuz B. *Kulak Burun Boğazda Alerjik Hastalıklar*. Birinci baskı, İstanbul 155-182;2001.
15. Desrosiers M, Baroody FM, Naclerio RM (Çeviri: D Şenocak). Alerjik rinit. Ballenger JJ, Snow JB (Eds), (Çeviri Editörü: D Şenocak). *Otorinolaringoloji baş ve boyun cerrahisi'inde*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2000:135-152.
16. Uzun H, Rinit. Çelik Ö (Editör). *Kulak burun boğaz hastalıkları ve baş boyuncerrahisi'inde*. İstanbul: Turgut Yayıncılık, 2002:377-410.
17. Mabry RL, Allergic rhinitis. In: Cummings CW, Fredrickson JM, Harker LA, Krause CJ, Richardson MA, Schuller DE (Eds.). *Otolaryngology head and neck surgery*. 3 th ed. V01.2, St. Louis: Mosby Year Book, 1998:902-909.
18. Desrosiers M, Baroody FM, Naclerio RM (Çeviri: D Şenocak). Alerjik rinit. Ballenger JJ, Snow JB (Eds), *Otorinolaringoloji baş ve boyun cerrahisi'inde*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2000:135-152.

19. Ünlü H. Antihistaminikler, dekonjestanlar, mast hücre stabilizörleri. Önerci M.(Editor). Rinitler'de. Ankara: Kutsan Ofset, 1999: 181-190
20. Akmer M: Rinitlerde topikal, sistemik kortikosteroidler ve antikolinergik ajanların kullanımı. Önerci M.(Editör). Rinitler'de. Ankara: Kutsan Ofset, 1999: 195-197.
21. Kalaycı CO: Alerjik rinit tedavisinde immunoterapi. Önerci M.(Editör). Rinitler'de. Ankara: Kutsan Ofset, 1999: 199-207.
22. Denker BM, Smith BL, Kuhajda FP, Agre P. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem.* 1988;263:15634-42.
23. Fushimi K, Uchida S, Hara Y, et al. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature.* 361: 549-552.
24. Agre P, Sasaki S, Christensen MJ. Aquaporins: a family of water channel proteins. *Am J Physiol Renal Physiol.* 265: F461.
25. Agre P, Kozono D. Aquaporin water channels: molecular mechanism for human diseases. *FEBS Lett* 2003; 555:72-78.
26. Nelson D L, Cox M M. Principles of Biochemistry. 4th ed. New York: W H Freeman Company, 2005: 406-409.
27. Engel A, Fujiyoshi Y, Agre P, The Importance of water channel protein structures. *The EMBO Journal.* 2000;19(5): 800-806.
28. Verkman AS, Mitra AK. Structure and function of aquaporin water channels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2000;278: F13-F28.
29. Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S, 2002. Aquaporin water channels-from atomic structure to clinical medicine. *Journal of Physiology.* 542(1): 3-16.
30. Harjanto. Aquaporin Water Channels: Physiology and Medicine. *Folia Medica Indonesiana,* 2004; 40(1): 3-9.
31. Rojek A, Praetorius J, Frøkiaer J, Nielsen S, Fenton RA. A current view of the mammalian aquaglyceroporins. *Annu Rev Physiol.* 2008;70:301-27.
32. Francis P, Chung J-J, Yasui M, Berry V, Moore A, Wyatt MK, Wistow G, Bhattacharya SS, Agre P. Functional impairment of lens aquaporin in two families with dominantly inherited cataracts. *Human Molecular Genetics.* 2000;9(15): 2329-2334.
33. Saadoun S, Papadopoulos MC, Hara-Chikuma M, Verkman AS. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature* 2005;434, 786-792.
34. Papadopoulos MC, Saadoun S, Verkman AS. Aquaporins and cell migration. *Pflügers Arch.* 2008;456, 693-700.
35. Gorin, M., Yancey, S., Cline, J., Revel, J. & Hotwiz, J. The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane. *Cell* 1984;39, 49-59.
36. Zampighi, G. A., Hall, J. E., Ehring, G. R. & Simon, S. A. The structural organization and protein composition of lens fiber junctions. *Journal of Cell Biology* 1989: 108, 2255-2275.

37. Mulders, S. M, Preston, G. M, Deen, P. M, Guggino, W. B, Van Os, C. H. & Agre, P. Water channel properties of major intrinsic protein of lens. *Journal of Biological Chemistry*. 1995: 270, 9010–9016.
38. Fotiadis, D, Hasler, L, Muller, D. J, Stahlberg, H, Kistler, J. & Engel, A. Surface tongue-and-groove contours on lens MIP facilitate cell-to-cell adherence. *Journal of Molecular Biology* .2000: 300, 779–789.
39. Van dort, H. M., Knowles, D. W., Chasis, J. A., Lee, G., Mohandas, N. & Low, P. S. Analysis of integral membrane protein contributions to the deformability and stability of the human erythrocyte membrane. *Journal of Biological Chemistry* .2001: 276, 46968–46974.
40. Nielsen S, Frokler J, Marples D, Kwon T, Agre P, Knepper MA, Aquaporins in the Kidney: From Molecules to Medicine. *Physiol Rev*. 2001: 82:205-244.
41. Couloigner V, Berrebi D, Teixeira M, et al. Aquaporin-2 in the human endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol*. 2004: 124:449-453.
42. Takeda T, Sawada S, Takeda S, et al. The effects of V2 antagonist (OPC-31260) on endolymphatic hydrops. *Hear Res*. 2003: 182:9-18.
43. Takeda T, Kakigi A, Saito H. Antidiuretic hormone and endolymphatic hydrops. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1995:519:219-222.
44. Beitz E, Kumagami H, Krippeit-Drews P, et al. Expression pattern of AQP water channels in the inner ear of the rat: the molecular basis for a water regulation system in the endolymphatic sac. *Hear Res*. 1999: 132:76-84.
45. Li J, Verkam AS. Impaired hearing in mice lacking AQP-4 water channels. *J Biol Chem*. 2001: 276:31233- 31237.
46. Fukushima M, Kitahara T, Fuse Y, et al. Changes in AQP expression in the inner ear of the rat after IP injection of steroids. *Acta Otolaryngol Suppl*. 2004: 553:13-17.
47. Mhatre AN, Stern RE, Li J, Lalwani AK. AQP 4 expression in the mammalian inner ear and its role in hearing. *Biochem Biophys Res. Commun*. 2002: 297:987-996.
48. Takumi Y, Kagelhus EA, Eidet J, et al. Select types of supporting cell in the inner ear express AQP-4 water channel protein. *Eur J Neurosci*. 199 10:3584- 3595.
49. Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Krishna S, Bell BA. Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002: 262-265.
50. Raina, S, Preton, G. M., Guggino, W. B. & Agre, P. Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 1995 :270, 1908–1912.
51. Nielsen, S., King, L. S., Christensen, B. M. & Agre, P. Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *American Journal of Physiology*. 1997a: 273, C1549–1561.
52. Song Y, Sonawane N, Verksman AS, Localization of aquaporin-5 in sweat glands and functional analysis using knocked out mice. *Journal of Physiology*. 2002. 541(2): 561-568.
53. Sjuhada A, Role of Aquaporin in Salivary Secretion. Surabaya: Seminar IAIFI Cabang Surabaya. 2004.

54. Lee M. D, Bhakta K. Y, Raina S, Yonescu R, Griffin C. A, Copeland N. G, Gilbert D. J, Jenkins N. A, Preston G. M. & Agre P. The human aquaporin-5 gene. Molecular characterization and chromosomal localization. *Journal of Biological Chemistry* 1996. 271, 8599–8604.
55. Tsubota K, Hirai S, King L. S, Agre P. & Ishida N. Defective cellular trafficking of lacrimal gland aquaporin-5 in Sjogren's syndrome. *Lancet* 2001. 357, 688–689.
56. Mhatre AN, Steinbach S, Hribar K, et al. Identification of aquaporin 5 (AQP5) within the cochlea: cDNA cloning and in situ localization. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;264:157-162.
57. Merves M, Krane CM, Dou H, et al. Expression of aquaporin 1 and 5 in the developing mouse inner ear and audiovestibular assessment of an AQP5 null mutant. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2003: 4:264-275.
58. Koyama Y, Yamamoto T, Kondo D, Funaki H, Yaoita E, et al. 1997. Molecular cloning of a new aquaporin from rat pancreas and liver. *J. Biol. Chem.* 272:30329–33
59. Ishibashi K, Kuwahara M, Kageyama Y, Tohsaka A, Marumo F, Sasaki S. Cloning and functional expression of a second new aquaporin abundantly expressed in testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997:237,714–18.
60. Koyama N, Ishibashi K, Kuwahara M, Inase N, Ichioka M, et al. Cloning and functional expression of human aquaporin8 cDNA and analysis of its gene. *Genomics.* 1998. 54:169–72.
61. Wang W, Zheng M, Nuclear factor kappa B pathway down regulates aquaporin 5 in the nasal mucosa of rats with allergic rhinitis *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011, 268:73–81.
62. Meinkoth et al. Signal transduction through the cAMP dependent protein kinase. *Mol. Cell Biochem.* 1993;127-128: 179-86.
63. Pierce et al. Seven transmembrane receptors. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2002;3, 639–650.
64. Corbin, J. D, Keely, S. L. Characterization and regulation of heart adenosine 3':5' – monophosphate dependent protein kinase isozymes. *J. Biol. Chem.* 1977 :252, 910–918.
65. http://medicine.inonu.edu.tr/public_html/anabilimdallari/kbb/documents/dersnot/5.pdf :25-30 [erişim tarihi:03.04.2012].
66. Wang W, Hart PS, Piesco NP, Lu X, Gorry MC, Hart TC. Aquaporin expression in developing human teeth and selected orofacial tissues. *Calcif. Tissue Int.* 2003: 72:222–27.
67. Ishibashi K, Morinaga T, Kuwahara M, Sasaki S, Imai M. Cloning and identification of a new member of water channel (AQP10) as an aquaglyceroporin. *Biochim. Biophys. Acta* 2002: 1576:335–40.
68. Morishita Y, Matsuzaki T, Hara-Chikuma M, Andoo A, Shimono M, et al. Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. *Mol. Cell Biol.* 2005: 25:7770–79.
69. Itoh T, Rai T, Kuwahara M, Ko SB, Uchida S, et al. Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005: 330:832–38.
70. Chijiwa, T. et al. *J Biol Chem.* 1990: 265, 5267–72.

71. Meja, K.K. et al. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309, 833–44.
72. Linneberg A, Henrik Nielsen N, Frolund L, Madsen F, Dirksen A, Jorgensen T. The link between allergic rhinitis and allergic asthma: a prospective population- based study. *The Copenhagen Allergy Study. Allergy.* 2002;57,1048–1052.
73. Johannes, F.J. et al. *Eur J Biochem.* 1995;227, 303–7.
74. Engh, R.A. et al. *J Biol Chem.* 1996;271, 26157–64.
75. Kremer B, den Hartog HM, Jolles J. Relationship between allergic rhinitis, disturbed cognitive functions and psychological well-being. *Clin Exp Allergy.* 2002; 32:1310.
76. Bentley AM, Jacobson MR, Cumberworth V. Immunohistology of the nasal mucosa in seasonal allergic rhinitis: increases in activated eosinophils and epithelial mast cells. *Allergy Clin Immunol.* 199;89,877-883.
77. Wen WD, Yuan F, Wang JL, Hou YP. Botulinum toxin therapy in the ovalbuminsensitized rat. *Neuroimmunomodulation.* 2007;14,78–83.
78. Shimizu S, Hattori R, Majima Y. Th2 cytokine inhibitor suplastat tonsilate inhibits antigen-induced mucus hypersecretion in the nasal epithelium of sensitized rats. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2009; 118:67-72.
79. Terada T, Nabe T, Mizutani N, Takenaka H, Kohno S. Effect of oral antigen administration on nasal blockage in experimental allergic rhinitis in guinea pigs. *Inflammation research.* 2002; 51,206-212.
80. Makino T, Ito Y, Sasaki S, Fujimura Y, Kano Y. Preventive and curative effects of Gyokuheifu-san, a Formula of traditional Chinese medicine, on allergic rhinitis induced with Japanese cedar pollens in guinea pig. *Biol. Pharm. Bull.* 2004; 27(4): 554-558.
81. Sato J, Asakura K, Murakami M, Uede T, Kataura A. Suppressive effects of CTLA4-Ig on nasal allergic reactions in presensitized murine model. *Life Sciences* 1999; 64,785-795.
82. Sugahara S, Nabe T, Mizutani N, Takenaka H, Kohno S. Kinins are involved in the development of allergic nasal hyperresponsiveness in guinea pigs. *European Journal of Pharmacology.* 2003; 476:229-237.
83. Wilson S, Lau L, Howarth PH. Inflammatory mediators in naturally occurring rhinitis. *Clin Exp Allergy.* 1998;28,220-227.
84. Meltzer Eli O. Efficacy and Patient Satisfaction with Cromolyn Sodium Nasal Solution in the Treatment of Seasonal Allergic Rhinitis: A Placebo-Controlled Study. *Clinical Therapeutics*, vol. 24, No:6, 2002:942-952.
85. Korkut N. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Allerjiler Sempozyumu, Allerjik Rinitte Medikal Tedavi İstanbul, 15-16 Mart 2001: s. 95-104.
86. Fokkens WJ. Nasal corticosteroids, first choice in moderate to severe allergic rhinitis. What prevents general practitioners from using them? *Allergy* 2003;58:724–726.
87. Naclerio RM. Allergic rhinitis. *N Engl J Med.* 1991;325,860–869.
88. Braunstahl GJ, Fokkens W. Nasal involvement in allergic asthma. *Allergy* 2003;58,1235–1243.
89. Skoner D, Rachelvsky, Meltezer E.O, Chervinsky P, Morris R.M, Seltzer J.M, Storms W.W. Wood R.A. Detection of growth suppression in Children During Treatment with Intranasal Beclomethasone Dipropionate. *Pediatrics.*2000; 105(2): E23.

90. Findlay C.A, Macdonald J.F, Wallance A.M. Geddes N, Donaldson M.D.C. Childhood Cushing's Syndrome Induce by Betamethasone Nose Drops, and Repeat Presscriptions. *Br Med J*.1998: 317, 739-740.
91. Bende M,Arfors K,Stierna P. Effect of Oxymetasoline Nose Drops on Acute Sinusitis in the Rabbit. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1996: 105,22-225.
92. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Bachert C, Canonica GW, Demoly P, Durham SR. Requirements for medications commonly used in the treatment of allergic rhinitis. European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA). *Allergy* 2003;58,192–197.
93. Transgrud AJ, Whitaker AL, Small RE. Intranasal corticosteroids for allergierhinitis. *Pharmacotherapy*. 2002;22,1458–1467.
94. Narita S, Asakura K, Shiraski H, Isobe M, Ogasawara H, Saito H, Katura A. Effects of cyclosporin A and glucocorticosteroids on antigen-induced hypersensitivity to histamine in a guinea pig model of allergic rhinitis. *Inflamm. res*.1998: 47,62-66.
95. Yoo John K, Seikaly Hadi, Calhoun Karen H. Extented Use of Topical Nasal Decongestants. *The Laryngoscope*. 1997: 107,40-43.
96. Roper Public Affairs Group of NOP World. Impact of nasal congestion among allergic rhinitis sufferers. May– June 2004.
97. Mygind, N, Nielsen L.P, Hoffmann H.Y, Shukla A, Blumberga G. Mode of Action of Intranasal Corticosteroids, *J Allegy Clin Immunol*. 2001: 108,16-25.
98. Sidhaye V, Jason D. Hoffer, and Landon S. King cAMP Has Distinct Acute and Chronic Effects on Aquaporin-5 in Lung Epithelial Cells Received for publication, September 24, 2004, and in revised form, November 5, 2004 Published, JBC Papers in Press, November 9, 2004, DOI 10.1074/jbc.M411038200.
99. Parvin MN, Kurabuchi S, Murdiastuti K et al. Subcellular redistribution of AQP5 by vasoactive intestinal polypeptide in the Brunner's gland of the rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288,G1283–G1291.
100. Corey JP, Houser SM, Ng BA. Nasal congestion: a review of its etiology, evaluation, and treatment. *Ear Nose Throat J*. 2000;79,690–693.
101. Schering-Plough. Once-a-day Nasonex Clinical Monograph.
102. Çubukçu A, Akin O. Biotus Biyokimya Sentez Matbaacılık İstanbul. Mayıs 2007: 65-69.
103. Tamarcaz P, Gibson PG. The effectiveness of intranasal corticosteroids in combined allergic rhinitis and asthma syndrome. *Clin Exp Allergy*. 2004;34,1883–1889.
104. Latorre R, Vergara C, Hidalgo C. Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca²⁺-dependent K⁺ channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982: 79, 805-9.
105. Altuntaş A, Yılmaz MD, Aktepe F; Kahveci OK, Derekoy S, Dilek H, Serteser M, Expression and distribution of aquaporin-1 in nasal polyps: Does it have any significance in edema formation? Source: *American Journal of Rhinology*, Volume 20, Number 1, January-February 2006 : pp. 128-131(4).
106. Antonio Frigeri, Grazia Paola Nicchia and Maria Svelto Current Pharmaceutical Design, Bentham Science Publishers Ltd.Aquaporins as Targets for Drug Discovery. 2007: 13, 2421-2427 1381-6128/07.

107. Brooks HL, Regan JW, Yool AJ. Inhibition of aquaporin-1 water permeability by tetraethylammonium: involvement of the loop E pore region. *Mol Pharmacol* 2000;57, 1021-6.
108. Yool AJ, Brokl OH, Pannabecker TL, Dantzler WH, Stamer WD. Tetraethylammonium block of water flux in Aquaporin-1 channels expressed in kidney thin limbs of Henle's loop and a kidneyderived cell line. *BMC Physiol.* 2002.
109. Crobach M, Hermans J, Kaptein A, Ridderikhoff J, Mulder J. Nasal smear eosinophilia for the diagnosis of allergic rhinitis and eosinophilic non-allergic rhinitis. *Scand J Prim Health Care.* 1996;14(2),116-21.
110. Barrager E, Veltmann JR, Schauss AG, Schiller RN. A multi-centered, open-label trial on the safety and efficacy of methylsulfonylmethane in the treatment of seasonal allergic rhinitis. *J Altern Complement Med.*2002;8(2):167-73.
111. Childs SJ. Dimethyl sulfone (DMSO₂) in the treatment of interstitial cystitis. *Urol Clin North Am* 1994;21:85-88.
112. <http://tr.wikipedia.org/wiki/DMSO> [erişim tarihi:03.04.2012].
113. Hucker HB, Ahmed PM, Miller EA, et al. Metabolism of dimethyl sulphoxide to dimethyl sulphone in the rat and man. *Nature.*1966;209:619-620.
114. http://www.camline.ca/professionalreview/pr_references. [erişim tarihi:03.04.2012].