

Güncel Biyokimya Çalışmaları II

Editör
Doğan YÜCEL

© Copyright 2019

Bu kitabın, basım, yayın ve satış hakları Akademisyen Kitabevi A.Ş.'ne aittir. Anılan kuruluşun izni alınmadan kitabın tümü ya da bölümleri mekanik, elektronik, fotokopi, manyetik kağıt ve/veya başka yöntemlerle çoğaltılamaz, basılamaz, dağıtılamaz. Tablo, şekil ve grafikler izin alınmadan, ticari amaçlı kullanılamaz. Bu kitap T.C. Kültür Bakanlığı bandrolü ile satılmaktadır.

ISBN

978-605-258-585-6

Kitap Adı

Güncel Biyokimya Çalışmaları II

Editör

Doğan YÜCEL

Yayın Koordinatörü

Yasin Dilmen

Sayfa ve Kapak Tasarımı

Akademisyen Dizgi Ünitesi

Yayıncı Sertifika No

25465

Baskı ve Cilt

Bizim Dijital Matbaa

Bisac Code

MED008000

GENEL DAĞITIM

Akademisyen Kitabevi A.Ş.

Halk Sokak 5 / A

Yenişehir / Ankara

Tel: 0312 431 16 33

siparis@akademisyen.com

www.akademisyen.com

ÖNSÖZ

Akademisyen Yayınevi yöneticileri, yaklaşık 30 yıllık yayın tecrübesini, kendi tüzel kişiliklerine aktararak uzun zamandan beri, ticarî faaliyetlerini sürdürmektedir. Anılan süre içinde, başta sağlık ve sosyal bilimler, kültürel ve sanatsal konular dahil 1000 kitabı yayımlamanın gururu içindedir. Uluslararası yayınevi olmanın alt yapısını tamamlayan Akademisyen, Türkçe ve yabancı dillerde yayın yapmanın yanında, küresel bir marka yaratmanın peşindedir.

Bilimsel ve düşünsel çalışmaların kalıcı belgeleri sayılan kitaplar, bilgi kayıt ortamı olarak yüzlerce yılın tanıklarındır. Matbaanın icadıyla varoluşunu sağlam temellere oturtan kitabın geleceği, her ne kadar yeni buluşların yörüngesine taşınmış olsa da, daha uzun süre hayatımızda yer edineceği muhakkaktır.

Akademisyen Yayınevi, kendi adını taşıyan “**Bilimsel Araştırmalar Kitabı**” serisiyle Türkçe ve İngilizce olarak, uluslararası nitelik ve nicelikte, kitap yayımlama sürecini başlatmış bulunmaktadır. Her yıl Mart ve Eylül aylarında gerçekleşecek olan yayımlama süreci, tematik alt başlıklarla devam edecektir. Bu süreci destekleyen tüm hocalarımıza ve arka planda yer alan herkese teşekkür borçluyuz.

Akademisyen Yayınevi A.Ş.

İÇİNDEKİLER

Bölüm 1	Tıbbi Biyokimya Laboratuvarlarında Uyuşturucu Madde Tarama Analizleri: Hangi Durumda Hangi Yöntem Seçilmeli.....	1
	<i>Saliha AKSUN</i>	
Bölüm 2	Epigenetik Mekanizmalar İle Parkinson Hastalığı Arasındaki İlişkinin Klinik Açısından Önemi.....	19
	<i>Orçun AVŞAR</i>	
Bölüm 3	Sinyal İletim Mekanizmaları ve Klinik Yansımaları.....	29
	<i>Hüseyin Fatih GÜL</i> <i>Necip İLHAN</i> <i>Yasin BAYKALIR</i>	
Bölüm 4	Biyobelirteç Olarak Supar	39
	<i>Huriye ERBAK YILMAZ</i> <i>Saliha AKSUN</i>	
Bölüm 5	1, 2, 4-Triazol Bileşiklerinin Farmakolojik Uygulamaları:anti Kanser, Anti Mikrobiyal ve Antioksidan Aktiviteleri.....	51
	<i>Akif Evren PARLAK</i>	
Bölüm 6	Vitamin K	63
	<i>Ayhan VURMAZ</i>	
Bölüm 7	Laboratuvar Tıbbında Preanalitik Hata Kaynakları ve Çözüm Önerileri	71
	<i>Aysun EKİNCİ</i>	
Bölüm 8	İnsülin Direnci ve Güncel Gelişmeler	79
	<i>Kamile YÜCEL</i>	
Bölüm 9	Toplam Analitik Hata ve Ölçüm Belirsizliğinin Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı	93
	<i>Kübranur ÜNAL</i>	
Bölüm 10	Tıbbi Laboratuvarlarda Preanalitik Süreç Yönetimi.....	105
	<i>Sibel Çiğdem TUNCER</i>	
Bölüm 11	Vitaminler	119
	<i>Sibel Çiğdem TUNCER</i>	
Bölüm 12	İnterlökin (II)-10 Geninin -1082 (G/A), -819 (C/T), -592 (C/A) Promotor Polimorfizmleri Ve İlişkili Patolojiler	127
	<i>Sibel ÖZDAŞ</i>	
Bölüm 13	Kanserde Yeni Bir Terapötik-Hedef Molekül: Crm1'ın Yapısı, Fonksiyonu ve Ekspresyonu.....	143
	<i>Sibel ÖZDAŞ</i>	

Bölüm 1

TIBBİ BİYOKİMYA LABORATUVARLARINDA UYUŞTURUCU MADDE TARAMA ANALİZLERİ: HANGİ DURUMDA HANGİ YÖNTEM SEÇİLMELİ

Saliha AKSUN¹

GİRİŞ

Madde bağımlılığı önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bağımlılık yaptığı bilinen ve tarama programlarında yer alan uyuşturucu maddeler dışında, tedavi için kullanılan ve reçete ile verilebilen bağımlılık yapıcı potansiyeli olan bazı ilaçların da kötüye kullanımı görülebilmektedir. Madde bağımlılığı testlerini yapan tıbbi laboratuvarların en çok kullanılan ve iyi bilinen maddeleri ölçebilmeleri önemlidir, değerlidir (1). Ama laboratuvarında analizi yapılan test parametreleri her durumda yeterli midir?

Bağımlılık şüphesi olan kişilerde, bireyin kullandığı maddenin analitik olarak varlığının kanıtlanması, kişinin eğitim ve takip programlarına alınabilmesi açısından önemlidir. Tıbbi olarak kullanıcının kendisinin zarar görmesi, madde etkisinde suç işlemesi ya da işyerinde kaza yapması gibi her durum geri dönüşü olmayan sonuçlara yol açabilir. O halde madde taramalarının hangi testler için yapılacağı, test panellerinin ne kadar geniş tutulması gerektiği, bölgede, söz konusu hastanede hangi maddelerin taranmasına ihtiyaç olduğu konusu ve laboratuvarında çalışılacak test listesi ihtiyacı karşılayabilecek ölçüde belirlenmelidir. Test listeleri, tıbbi biyokimya uzmanlarının koordinasyonu ile psikiyatristler, acil servis hekimleri, madde testlerine ihtiyaç duyan diğer klinisyen hekimlerle birlikte belirlenmelidir.

Yasaklı madde kullanımı ile ilgili tetkik istekleri tıbbi, idari, adli nedenlerle olabilir. Her durumda kişiden alınan biyolojik numunede madde varlığının doğru olarak saptanabilmesi önemlidir. Ülkemizde Adli tıp kurumlarında ve tıbbi biyokimya laboratuvarlarında uyuşturucu ve uyarıcı madde analizleri yapılabilmektedir.

Bu bölümde, kendi laboratuvarımızdaki deneyimlerimiz de eklenerek, hastanelerde tıbbi biyokimya laboratuvarında, tarama amaçlı olarak yapılan madde

¹ Doktor Öğretim Üyesi. İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi. salihaaksun@yahoo.com

analizleri için kullanılan yöntemler, yöntemlerin seçiminde dikkat edilecek hususlar ve pratik uygulama sırasında karşılaşılan zorluklardan söz edilmiştir.

Hastane tıbbi biyokimya laboratuvarında yapılan madde analizleri için istemler genellikle şu birimlerden yapılmaktadır:

1. Acil servislere madde kullanımını şüphesi ile klinik bulgularla getirilen hastalardan tıbbi amaçla istenmektedir.
2. Acil servise, bir kaza ya da suça karışma nedeni ile başvuru yapılan adli olaylarda yasaklı madde kullanımının olup olmadığı değerlendirilmek istenmektedir.
3. Alkol ve madde bağımlılığı tedavi merkezi (AMATEM) birimi olan hastanelerde, hastanın Amatem polikliniğine başvurarak tedavi talebinde bulunması durumunda, kullanılan maddeyi idrar örneğinde saptamak ve tedavisine başlamak üzere tedavi amacı ile istenmektedir.
4. AMATEM yataklı servislerinde yatırılarak takip ve tedavi edilen hastalardan istenmektedir.
5. Denetimli serbestlik polikliniği bulunan hastanelerde, denetimli serbestlik müdürlüğü tarafından sevki yapılan ve belirli zaman aralıkları ile takipte olan kişilerden idari amaçla istem yapılmaktadır.
6. Hastane yoğun bakım birimlerinde ya da klinik servislerinde madde etkisi altında olduğu düşünülen bireylerden tıbbi amaçla istenebilir.
7. Gemi çalışanları, fabrika çalışanları, şöför olarak çalışanlardan istek yapılabilir.

Denetimli Serbestlik Nedir?

Ülkemizde 2005 yılında madde bağımlılarının rehabilitasyonu için denetimli serbestlik sistemi kurulmuştur. Denetimli serbestliğin özelliği, uyuşturucu ya da uyarıcı madde kullananların gerek soruşturma ve kovuşturma aşamalarında, gerekse bu kişiler hakkında verilen kararların infazı aşamasında rehabilitasyonun hedeflenmesidir (2). Bu yeni sistem ile bir taraftan uyuşturucu/uyarıcı madde kullananların rehabilitasyonu sağlanmakta, diğer yandan madde kullanımının kişinin kendisine ve sosyal çevresine verdiği zarar önlenmeye çalışılmaktadır. Sonuçta madde kullanımının neden olduğu suçlarda azalma sağlanmaya çalışılmaktadır. Ülkemizde uyuşturucu madde kullanmak ve satmak suçtur. Kolluk kuvvetlerince, uyuşturucu madde kullandığı tespit edilen kişi önce denetimli serbestlik müdürlüğüne takip altına alınır. Denetimli serbestlik polikliniği bulunan bir hastaneye idari bir yazı ile sevk edilir. Sevk edilen denetimli serbestlik hastane biriminde buranın sorumlusu olan hekim tarafından takip edilir, uyuşturucu madde ile ilgili tetkikleri istenir. Tetkikler genellikle idrar örneğinde yapılmaktadır.

Bizim laboratuvarımızdan, denetimli serbestlik polikliniğinde takip edilen hastalar için denetimli serbestlik yönetmeliğine göre (3), en çok 2 ya da 3 haftaya kadar olan aralarla ardışık 3 kez tetkik istenir ve üçünde de testlerin negatif olması durumunda hastanın raporu denetimli serbestlik müdürlüğüne yazılır. Bu tetkiklerden herhangi birinde bir pozitiflik olması halinde ise hastanın ardışık kontrolleri devam eder. Bu süreçte ek olarak, hastanın madde bağımlılığında kurtulabilmesi için hastane eğitimleri başlar.

Madde bağımlılığı testleri için örnekler nerede alınabilir? Alınan örnekler laboratuvara nasıl gönderilir?

Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü'nün 2014 yılı, Yasadışı ve Kötüye Kullanılan İlaç ve Madde Analizi Yapan Tıbbi Laboratuvarlar ile Madde Bağımlılığı Teşhis ve Tedavi Merkezlerindeki Tıbbi laboratuvarların Çalışma Usul ve Esasları hakkındaki genelgesine göre (4) idrar örneklerinin alınması için en uygun yöntem şu şekilde özetlenebilir. Hasta idrarını, bir sağlık memuru bir de hastane güvenlik görevlisi olmak üzere iki kişinin gözetimi altında verir. İdrar içine, idrar özelliğini bozacak bir maddenin karıştırılmadığından ya da idrarın su ile seyreltilmediğinden emin olmak önemlidir. Bu nedenle idrar alınan tuvalet özel bir tuvalet olmalıdır. Tuvalet içerisinde hastanın mahremiyetini engellemeyecek şekilde yerleştirilmiş bir ayna düzeneği olmalıdır. İdrar örnekleri alınır alınmaz 4 dakika içinde idrarın sıcaklığı ölçülür ve kaydedilir. Hastanın onamı alınır. Numuneyi veren kişinin kimlik bilgilerini, numune alınma tarihi ve saatini içeren bir numune formu düzenlenir. Biyolojik numune ve form kilitli çantaya yerleştirilir ve bir güvenlik görevlisi ile laboratuvara gönderilir (5). Kilitli taşıma çantasının bir anahtarı örneği gönderen birimin sorumlu görevlisinde olur bir diğer anahtar laboratuvarında örnekleri teslim alan laboratuvar teknisyeninde bulunur. Hastanın laboratuvarı tanımaması, laboratuvarın yerini bilmemesi, tetkiklerin analizi aşamasında sonuçlara müdahil olma girişiminde bulunmaması açısından önemlidir. Bu nedenle örnek alma işleminin tetkikin istendiği birimde olması tercih edilmektedir.

Uyğurlatıcı uyarıcı madde taramaları için kullanılan biyolojik örnek tipi:

Madde taramaları için kullanılan numuneler kan, idrar, tükürük, saç ya da diğer vücut sıvıları olabilir. Ancak hastanelerin tıbbi biyokimya laboratuvarlarında kullanılan örnek tipi genellikle idrardır. İdrarda kullanılan madde ve metabolitleri daha uzun süre kalabildiğinden idrar örneği, tarama çalışmalarında kullanılacak en uygun örnek olarak kabul edilmektedir (1).

Hastanelerin tıbbi biyokimya laboratuvarlarında uyğurlatıcı uyarıcı madde taraması için kullanılacak yöntemler nelerdir:

Hastanelerin tıbbi biyokimya laboratuvarlarında idrar örneğinde çalışılacak uyuşturucu, uyarıcı madde testleri için farklı yöntemler bulunmaktadır. Hastanenin büyüklüğü, hasta sayısı, hizmet sunulan birimler, test panelinde yer alması istenilen testlerin çeşitliliği, tıbbi biyokimya laboratuvarının işgücü kapasitesi, testlerin sonuçlanması için gerekli olan süre tıbbi laboratuvarların madde bağımlılığı testlerini çalışma yöntemini belirlemektedir (1).

AMATEM biriminin olduğu hastanelerde istek yapılan örnek sayısı, AMATEM birimi bulunmayan, sadece acil servis ve yoğun bakımlardan gelen madde tarama isteklerine göre daha fazla olmaktadır. Bu durumda seçilen biyokimyasal yöntem tıbbi biyokimya laboratuvarına gelen örnek sayısına bağlı olarak farklılık gösterebilir. AMATEM biriminin olduğu bir hastanede ek olarak, denetimli serbestlik polikliniği hizmeti için de yetki alınmışsa ve bu hizmet veriliyorsa örnek sayısı oldukça artmaktadır.

Tıbbi biyokimya laboratuvarının çalışacağı yöntemi belirleme aşamasında, klinisyenlerin, özellikle AMATEM birimlerinde çalışan psikiyatri uzmanlarının görüşleri alınmalı ve test paneli birlikte belirlenmelidir.

Uyuşturucu madde analizi kapsamında yapılabilecek olan test parametresi sayısı oldukça çeşitlidir. Amerika Birleşik Devletleri'nde sıklıkla kötüye kullanılan maddeler aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır(6).

Kannabinoidler: Esrar (marihuana)

Uyarıcılar: Amfetamin, metamfetamin, MDMA, kokain

Narkotik analjezikler ve Opiatlar: Afyon, eroin, kodein, morfin, oksikodon, hidroksikodon, meperidin, metadon, fentanil.

Santral sinir sistemi depresanları ve trankilizanlar: Barbitüratlar, çeşitli benzo-diazepinler, metakualon, gamahidroksi bütirat (GHB).

Anestezikler: Ketamin, fensiklidin.

Halüsinojenler: LSD (lizerjik asit dietilamid).

Substance Abuse And Federal Health Service Administration (SAMSHA) adı ile ABD'de kurulan sistem Federal madde analizlerinden ve zorunlu işyeri analizlerinden sorumlu tutulmuştur. Samsha'nın işyerleri için taranmasını istediği maddeler başlangıçta SAMHSA-5 olarak bilinen sadece beş ilacı taramayı önermiş ve kullanılmıştır. Bu maddeler; Amfetamin, kokain (inaktif metaboliti benzoilekgonin), opiatlar, PCP (fensiklidin) ve marihuana (inaktif metaboliti 11-nor-9-karboksi Δ -9 tetrahidrokannabinol, THC) gruplarıdır. Ancak protokole dahil olan bu ilaçlar daha sık analiz edilmekle birlikte yine de bazı laboratuvarlar rutin kötüye kullanılan ilaç tarama ya da kapsamlı kötüye kullanılan ilaç tarama protokolle-

ri ile laboratuvarlar arasında farklılık gösterecek şekilde tarama yapmışlardır. Bu protokollerde, barbitüratlar, benzodiazepinler, oksikodon, metadon, matakualon, propoksifen yer almıştır (7,8).

SAMHSA daha sonra, taranacak maddelerin içerisine MDMA testlerini de eklemiştir ve eşik değerlerini belirtmiştir.

Ülkemizde de denetimli serbestlik polikliniği hastalarında en az beş maddenin taranması istenmektedir:

T.C. Sağlık Bakanlığı, Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Tıbbi Laboratuvar Hizmetleri Dairesi Başkanlığının 2016 yılında yayımladığı, İdrar Numunelerinde Yasadışı ve Kötüye Kullanılan İlaç ve Madde Analizi Yapan Tıbbi Laboratuvarlar ile Madde Bağımlılığı Teşhis ve Tedavi Merkezlerindeki Tıbbi Laboratuvarların İşleyiş Esasları'nda belirtildiği biçimde (5), Türkiye için taranması istenilen standart test panelinde; Amfetaminler, Benzodiazepinler, Esrar, Kokain, Opiatlar yer almaktadır. Ve resmi gazete, tıbbi literatür gibi kaynaklarda madde tanımı kapsamında yer alan tüm maddelerin ihtiyaçlara göre laboratuvar test paneline eklenebilir olduğu belirtilmektedir.

Tablo 1: Ülkemizde taranması istenilen maddeler ve belirtilen eşik değerleri:

Uyuşturucu madde ya da metaboliti	Eşik değer (ng/ml)
Amfetamin	500
3-4 Methylendioxy Metamfetamin (MDMA)	500
Kokain ya da metaboliti	150
Benzodiazepinler	300
Opiatlar	2000
11-nor- Δ^9 -THC-9-COOH (kannabinoid,THC) Esrar	50

Denetimli serbestlik polikliniği hekimi, en az bu parametreler olmak üzere daha fazla çeşitte test yapılması için laboratuvardan talepte bulunabilir. Benzer şekilde madde kullandığını belirterek tedavi isteyen kişiler için AMATEM hekimleri de Tablo 1'dekilere ek olarak, hastanın tanınması, tedavisinin başlanabilmesi ve takibi için daha fazla test parametresi isteğinde bulunabilir. Acil servislere tıbbi nedenle gelen başvurularda da özellikle sentetik esrar bileşikleri (yaygın olarak bonzai olarak tanımlanıyor) olmak üzere pek çok başka madde kullanılmış olabilmektedir. Bu maddelerin ölçülebilmesi ve test panelinde yer alması önemlidir.

Test parametresi çeşitliliğinin dışında testlerin sonuçlanması için beklenebilecek süre de test yöntemini belirlemede etkilidir. Acil servis ve yoğun bakım ünitelerinden istenilen madde bağımlılığı testleri için örneklerin laboratuvara ulaşması ve pozitif olan idrar numunelerinin hemen sonuçlandırılabilmesi bazı durumlarda kritik olarak önemlidir (1,9,10).

Bu durumda madde bağımlılığı analizleri için yöntemlerin seçilmesinde, ihtiyaç duyulan test parametre çeşitliliği ve testlerin sonuçlanması için gerekli olan zaman belirleyici etkenlerden olacaktır.

Aşağıda madde bağımlılığı testlerinin yapılması için en çok kullanılan yöntemler, birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları verilmiştir.

Klinik laboratuvarlarda uyuşturucu ve uyarıcı madde tarama analizleri için farklı biyokimyasal yöntemler tanımlanmıştır:

1. İdrar uyuşturucu madde tarama kart testleri
2. İmmün kimyasal yöntemler
3. Kromatografik yöntemler

Bu yöntemlerin her birinin birbirine göre üstünlükleri ve eksik olan yönleri vardır.

Uyuşturucu madde analizlerinde kart testlerin çalışma prensibi:

Uyuşturucu/uyarıcı madde analiz isteğinin çok olmadığı hastanelerde genellikle kart testler ile tanı yapılmaktadır. Hasta sayısının yetersiz olması, otomatize sistem kullanmak için ihale yapmayı engelleyebilmektedir. Diğer taraftan otomatize sistemler var olduğunda dahi, daha hızlı yanıt alınabilmesi nedeni ile bazı durumlarda acil servis ve yoğun bakım birimlerinde olan hastalar için kart test ile çalışılarak sonuç verilmektedir.

Kart test yöntemi en hızlı sonuç veren yöntemdir. İlaç tarama hızlı testleri kompetitif immün yöntemle çalışmaktadır. Bu yöntemle çeşitli ilaçların ve maddelerin kalitatif olarak sonucu verilmektedir (11).

Kart testler ile çalışmanın avantajı:

1. İdrar materyali toplanıp laboratuvara ulaştıktan sonra, birkaç dakika içinde sonuç verilir.
2. Diğer yöntemlere göre test maliyetleri daha ucuz olabilir
3. Kart test ile sonuç verebilmek için eğitim verebilmek kolaydır.

Kart testler ile çalışmanın dezavantajı:

1. Çalışılan testler birbiri ile çapraz reaksiyon verebilir.
2. Sonuçlar kartta oluşan rengin görsel olarak değerlendirilmesi nedeni ile görecelidir. Yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar verilerek hatalı raporlamalar

yapılabilir. Özellikle pozitif olarak sonuçlanan olgularda daha gelişmiş, kantitatif bir yöntemle tekrar çalışılması gerekli olmaktadır.

3. Bu yöntemle taranılan metabolit için sayısal değer verilememektedir, sonuçlar kalitatif olarak raporlanmaktadır.
4. Kart test üzerinde yer alan parametre çeşitleri ne kadar ise o kadar test için sonuç verilebilmektedir. Kart testte yer almayan ve hastanın kullanmış olduğunu düşündüğümüz bir madde için tayin yapılamamaktadır.

Kart testler ile sıkça kullanılan madde grupları ve metabolitleri için çalışılır. Genellikle, amfetamin, barbitüratlar, benzodiazepinler, opiatlar, kokain, kannabinoidler, sentetik kannabinoid K2.1, K2.2, K2.3, metadon, metamfetamin, metilendioksimetamfetamin (MDMA, ekstazi), buprenorfin, trisiklik antidepressanlar (TCA) için çalışma yapılabilir. Laboratuvarın isteği üzerine, kart testlerde yer alan, taranacak analit listesini, üretici firma başka maddelerin taranması için geliştirebilmektedir.

Kartlar ile taranacak olan parametreler için karta emdirilmiş olan standart antikor miktarı “ne kadar ise”, pozitif ya da negatif sonuç buna göre belli olacaktır. Kartlarda genellikle Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA)’nın önerdiği eşik konsantrasyonlar yer alabilmektedir (12). Her bir analit için laboratuvarın talep ettiği eşik değerlerde kartlar hazırlanabilir. Satın alma sürecinde laboratuvarın raporlama yapacağı eşik değeri belirtmesi, kart testi istediği parametreler ve istediği eşik değerler için satın alması gereklidir.

Kart test yönteminin prensibi nedir?

Tüm ilaç hızlı testleri benzer prensiple çalışmaktadır. Her bir kartın üzerinde çalışılacak olan parametrelerin tümü için sıra ile dizilmiş petler yer almaktadır. Hastanın idrar örneği kartta yer alan parametrelerin tümü için kartın uç kısmındaki immersiyon bölgesine ekilir ya da emdirilir. İdrar örneği daha sonra kapiller bir hareketle test sribi boyunca ilerler. İmmersiyon bölgesine, üretim sırasında test sribine her parametre için serbest konjuge antikorlar konulmuştur Bu antikorların miktarı laboratuvarın istediği eşik değerlere göre belirlenmektedir. Bu bölgedeki antikorlar test sribi boyunca idrarla birlikte hareket eder. Eğer test stripine emdirilen idrarda analit var ise başlangıç noktasında bulunan antikorlar ile bu analitler bağlanır. Ve birlikte stripin diğer ucuna doğru sürüklenirler. Test sribinin test çizgisinin olduğu diğer ucunda, yine scribe üretimde yerleştirilmiş olan serbest hedef antijenler bulunmaktadır. İmmersiyon bölgesinde bulunan serbest antikorlar idrarla birlikte test çizgisine sürüklenip kartın bu noktasında ticari olarak yer alan serbest antijenlere, yani maddelere bağlanırlar. Bu bağlanma sonrasında test çizgisinin olduğu bölümde görünebilen kırmızı bir çizgi oluşur.

Bu kırmızı çizginin oluşması, immersiyon bölgesinde bulunan antikorlardan test çizgisinde yer alan substansla bağlanacak serbest bir miktarın olduğunu gösterir. Eğer immersiyon bölgesine emdirilen hasta idrarında eşik değerin daha azı kadar analit var ise antikorların bir kısmı serbest kalamayacağı için kapiller hareketle yürüdükten sonra strip sonunda bulunan serbest antijenlere bağlanacak olan serbest antikor miktarı azalmış olacaktır. Bu durumda hasta idrarındaki analitle birleşmemiş olan sadece serbest kalan antikorlar test bölgesindeki serbest antijenle birleşecek ve yine bir çizgi oluşacaktır. Serbest kalan antikor miktarı ne kadar ise antijenle birleşme oranı o oranda olacağından akümülyasyon miktarı daha az olabilecek ve kırmızı bir çizgi yerine hafif pembe bir çizgi oluşabilecektir. Kırmızı ya da hafif bir kırmızı çizgi olduğu her durumda, scribe ekilen ve immersiyon bölgesinde serbest antikorla birleşen analit miktarı eşik değeri geçmemiştir. Ve test negatif olarak adlandırılır. İmmersiyon bölgesine ekilen idrardaki analit miktarı eşik değeri üzerinde olduğu durumlarda, bu bölgede bulunan tüm antikorlar analitle bağlanmış olacağından, sribin son noktasında test çizgisinde bulunan antijenle bağlanacak hiçbir serbest antikor kalmadığından test çizgisi oluşmayacak, bu bölge hiç renklenmeyecektir. Bu durumda idrardaki analitin eşik değeri üzerinde olduğu anlaşılır ve test pozitif olarak yorumlanır (12).

Bu çalışma yönteminde test çizgisinde belirecek olan hafif bir kırmızı-pembe çizgi dahi idrarda bulunan analitin eşik değerin altında olduğunu göstermektedir ve negatif olarak raporlanmalıdır. Ancak laboratuvarıda testi yapan kişinin sübjektif değerlendirmesine açık olan bu niteliksel yöntem yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuç vermemize neden olabilir.

Laboratuvarımızda, acil servisten mesai saatleri içinde gelen örnekler immün kimyasal yöntemle (EMIT, Siemens), mesai sonrası ve hafta sonu acil servis örnekleri ise kart testler kullanılarak çalışılmaktadır. Kart testler ile çalıştığımız sonuçları değerlendirdiğimiz bir çalışmamızda, yanlış pozitiflik oranımızı bildirdik. 548 adet kart test madde analizi çalışmasında, ekstazi testi için 60 adet sonuç gerçek pozitif verilirken, 13 sonuç yanlış pozitif olarak verilmiştir. Kart test ile çalışılan diğer parametreler için gerçek pozitif/yanlış pozitif oranı sırası ile; esrar testi için;100/10, benzodiazepin için;63/16, opiat için; 15/5'dir. Bu sonuçlara göre de görülmektedir ki bazı durumlarda kart testler ile yanlış pozitif sonuç neden olabilecek okumalar yapılabilmektedir. Mümkün olduğunca, kart testleri kullanmak yerine mesai dışı saatlerde de immünkimyasal yöntemler ile tarama yapılması daha uygun olacaktır.

Kart testlerde çalışmalarda uygulanması gerekli olan kurallar:

1. Kart test satın alınması sırasında, her bir strip üzerinde yer alması istenilen parametreler tek tek belirlenmelidir.

2. İstenilen parametreler için kullanılacak eşik değerler tanımlanmalıdır
3. Kart testler hasta için kullanılmaya başlanılmadan önce, her kutu için istenilen eşik konsantrasyonları da içeren, değeri bilinen standart kalibratörler ya da kontrol materyalleri ile kontrolleri sağlanmalıdır.
4. Kart test kutusunun üzerinde hangi eşik değerler için hazırlandığı bilgisi yer almalıdır.
5. Çalışılan her bir örnek için laboratuvarında en az iki kişi tarafından değerlendirme yapılmalıdır.
6. Kart testler için dış kalite kontrol programına üye olunmalıdır.

İmmün kimyasal analiz yöntemleri:

Kötüye kullanılan maddelerin idrarda tarama analizleri için hastane laboratuvarlarında daha sıklıkla immünkimyasal yöntemler kullanılmaktadır. İmmün yöntemler genellikle terapötik ilaç izleminde kullanılan yöntemlere benzer yöntemlerdir.

İmmün yöntemler otomatizedir, bir tek numune ile istenilen tüm uyarıcı ve uyuşturucu maddeler analiz edilebilir (1).

Bu yöntemler için yıllık hasta sayısı yeterli sayıda olan hastanelerde kit karşılığı cihaz kurmak üzere ihale yapılmaktadır. Şartnamelerde o hastane için çalışması planlanan test parametreleri ve yıllık sayıları yazılır. Her bir parametre ayrı bir kit kutusu olarak alınmış olur. Kitler rutin biyokimya otomatik analizörle çalışma tekniğinde olduğu gibi cihaza apliance edilir. İmmün kimyasal yöntem olarak adlandırılan bu yöntemde kitte reaktifin bileşenlerinden biri olarak bir antikor bulunmaktadır. Bu antikor monoklonal ya da poliklonal olarak hazırlanmıştır ve analite spesifik antikorlardır. Monoklonal bir antikor poliklonal bir antikora göre hedef analit için daha spesifik olacaktır (7). Kit immünkimyasal bir testtir ancak yöntem tam bir immünanaliz değildir. Cihaz okumayı spektrofotometrik olarak yapar. Klinisyenin isteğine göre testler bazen tek tek istenebilir ya da genellikle uyuşturucu kullanımı ile ilgili tarama yapılacağı için laboratuvarında çalışılabilen tüm uyuşturucu ve uyarıcı maddeler birlikte istenebilmektedir. Bu yöntemde laboratuvara teslim edilmiş olan idrar örneği hiçbir işlem yapılmadan direkt olarak cihaza yerleştirilebilir. Kullanılan örnek hacimleri düşüktür.

İmmün kimyasal yöntemlerin avantajları ve dezavantajları:

Bu yöntemle hızlı sonuç verilir. EMIT; CEDIA, KIMS FPIA immün kimyasal yöntemlerin birkaçıdır. Bizim hastanemizde immün kimyasal analiz yöntemi olarak EMIT (Siemens) kitleri kullanılmaktadır. İdrar örneğinde, Amfetamin, Ekstazi, Benzodiazepin, Kokain, Opiat, THC (esrar), sentetik kannabinoid K2.1, sentetik kannabinoid K2.2, Buprenorfin testleri çalışılmaktadır.

Sayılan parametreler taranması gerekli olan en az beş parametreyi karşılamaktadır. Ancak sentetik esrar kullanımı ile saptanabilen örnek sayısı az olmaktadır. Gerçekte klinik bulgulara göre kullanıldığı düşünülmekte olan ya da hasta ve yakınları tarafından kullanımı itiraf edilen ancak piyasada çok fazla çeşitte bulunan, sürekli olarak bir yenisi üretilen sentetik olarak tasarlanmış uyuşturucu maddelerin hepsinin saptanabilmesi için kit üretmek mümkün olmamaktadır. Bu durum bu yöntemle çalışmanın bir dezavantajı olarak düşünülebilir.

Bununla birlikte, örnek için bir ön işlem gerektirmemesi, ve hızla sonuç verilebiliyor olması yöntemin bir avantajıdır. Hastanemize başvuran denetimli serbestlik programında olan hastaların uyuşturucu tarama sonuçlarının aynı günde raporlandırılması ile ilgili bir zorunluluk yoktur, buradaki hastalar idrarlarını verir ve sonuçları daha sonra hekim tarafından değerlendirilebilir. Ancak AMATEM’de madde bırakma programında olan hastaların bazılarının aynı gün, sonuçlarına göre reçete almaları gerekmektedir. Hastaların bir başka gün çıkacak olan sonuç için tekrar davet edilmesi tedaviyi bırakmalarına kararlılıklarından vazgeçmelerine neden olabilir. Bu durumda hastanın ve doktorun işini kolaylaştırabilmek için laboratuvarın da destek olması, tetkikleri hızla aynı gün içinde sonuçlandırması gerekmektedir. Bu konuda en çok ihtiyaç duyulan Buprenorfin testlerinin hızlı sonuçlanmasıdır. AMATEM polikliniğinde opioidleri bırakma tedavisinde olan hastalara Suboxan adlı ilaçla yerine koyma tedavisi yapılmaktadır. Bu hastaların belirli periyotlarda poliklinik ziyaretleri olmakta ve ilaçlarını reçete ettirmektedirler. Klinisyen hastanın ilacını reçetelemek için bir önceki dönemde vermiş olduğu ilacın kullanıldığını idrarda Buprenorfin miktarı ile kontrol eder. Eğer idrar analizinde Buprenorfin testi 5ng/ml üzerinde ölçülürse bu durumda hastanın Suboksan ilacını kullandığı ve tedaviye uyumlu olduğu düşünülerek yeniden ilaç reçete edilir. Ancak daha düşük idrar Buprenorfin sonuçlarında hastanın ilacını kullanmadığı, tedaviye uyumsuz olduğu üstelik belki de bu ilacı başka amaçlarla kullandığı düşünülerek reçetesi verilmez. Laboratuvarında Buprenorfin analizi immüno kimyasal yöntemle yapıldığında hastanın sonucu çok beklemeden birkaç saat içinde rapor edilebilir.

Benzer şekilde AMATEM’de polikliniğine gelerek tedavi ve yardım isteyen hastalarda idrar numunesinde tarama sonucunun hemen sonuçlandırılması ile ne tür madde kullandığı kesinleşir ve yatarak ya da ayaktan tedavi programı aynı gün içerisinde belli olmuş olur.

Ancak ne var ki, tarama yapmak istediğiniz analit için üretilmiş mevcut ticari kit yoksa o analit için saptama yapılamaz. Bu nedenle özellikle idari olarak denetimli serbestlik durumunda bulunan hastalarda ya da tıbbi nedenlerle tetkik edilen hastalarda bu durum akılda tutulmalıdır. Laboratuvarın tarama yaptığı

maddeler dışında daha pek çok madde çeşidinden birinin kullanılmış olabileceği ve verilen sonuçta taranan maddelerin hepsi negatif olsa bile bu durumun kişinin temiz olduğunun tam kanıtı olmadığı bilinmelidir. Yukarıda belirttiğimiz sentetik kannabinoidler dışında, laboratuvar, ihale ile kitini almamış olduğu için, fentanil, tramadol, petidin, ketamin yoksa bu maddelerden herhangi birine kolay ulaştığı ve de kullandığı düşünülen bir kişinin idrar sonucunda tüm testleri negatif olarak çıkacaktır. Bu konuda verilebilecek bir diğer örnek de Pregabalinin suistimalidir.

Pregabalin; etkisini, santral sinir sisteminde, nöronlarda, $\alpha 2\delta$ -subunit-içeren voltaja bağımlı çalışan kalsiyum kanallarının inhibisyonu ile oluşturan bir ilaçtır. Pregabalin kullanımı; dopamin hariç, noradrenalin, substans P, glutamat gibi ek-sitatuar moleküllerin dışı akışını bloke etmektedir. Bu aktivite ile nöronal uyarıyı bloke etmektedir (13, 14). Bu durumda antikonvulsan, uyku modüle edici, anksiyolitik etkiler oluşmaktadır. Pregabalinin terapotik dozlarda, diğer ilaçlara göre daha az bağımlılık yapıcı potansiyeli vardır. Ancak diğer ilaçlara benzer şekilde disosiyatif ve öforik etkileri bulunmaktadır (14). Başlangıçta kötüye kullanım potansiyeli bildirilmemiş olmakla birlikte son yapılan yayınlara göre pregabalinin opiat ve opioidlerle birlikte kötüye kullanıldığı görülebilmektedir (15).

İmmüno kimyasal yöntemle tarama yapılan laboratuvarlarda eğer test listesinde pregabalin yoksa yine bu maddenin kötüye kullanımını düşündürecek kanıt elde edilememektedir. İdrarda pregabalin tarama testinin taranması için bir zorunluluk yoktur ancak bu konuda bir ihtiyacın varlığı klinisyenle konsülte edilmelidir. Pregabalin testi immüno kimyasal olarak çalışmalara kit sağlayan üreticilerin bazılarında mevcuttur.

İmmün yöntemler ile ilgili bir başka dikkat edilecek konu, bu yöntemin yanlış pozitif ve yanlış negatif olmak üzere interferanslara açık olmasıdır. İmmüno kimyasal testler ile yaptığımız analizlerde, aradığımız analitlere benzerlik gösteren bazı maddeler ile çapraz reaksiyonlar görülebilir. Hastanın tedavi için kullanmış olduğu ve kitte bulunan antikorla çapraz reaksiyon verebilecek olan tüm ilaçlar ya da gıdalar test sonucumuzun yanlış pozitif olmasına yol açacaktır (16). Bunun dışında opiat testleri için immün yöntem interferansları tanımlanmıştır.

Uyuşturucu ve madde bağımlılığı kapsamında immün kimyasal yöntemle idrarda tarama yapabilmeyi sağlayan mevcut testler:

Amfetaminler, 6-asetilmorfin, barbiturat, benzodiazepin, buprenorfin, kannabinoid (THC), kokain, kokain metaboliti benzoylecgonin, ekstasi (MDMA), EDDP, etilglukuronid (ETG), eroin, fentanil, gamahidroksibütirat, ketamin, kotin, LSD, metadon, meperidin, opiat, oksikodon, fensiklidin, propoksifen, sentetik kannabinoid JWH018, sentetik kannabinoid UR144, sentetik kannabinoid AB-PINACA, tramadol, trisiklik antidepresanlar.

Bunlara ek olarak bazı firmalarda terapötik ilaç takibi için gabapentin pregabalin kitleri vardır.

Tarama analizinde pozitif çıkan madde daha sonra idari ya da adli istekler olursa doğrulama analizi ile çalışılır. Doğrulama analizleri GC-MS ya da LC-MS/MS ile maddenin gaz ya da likid kromatografi ile ayırımını takiben kütesinin ölçülmesi ile yapılır.

Kromatografi ve Kütle Analiz Yöntemi:

Sağlık Bakanlığı tarafından yayımlanan İdrar Numunelerinde Yasadışı ve Kötüye Kullanılan İlaç ve Madde Analizi Yapan Tıbbi Laboratuvarlar ile Madde Bağımlılığı Teşhis ve Tedavi Merkezlerindeki Tıbbi Laboratuvarların işleyiş esaslarında, madde analizlerinde temel olarak tarama ve doğrulama olmak üzere iki basamaklı analiz stratejisi uygulandığı, tarama analizlerinde sıklıkla immüno kimyasal yöntemler, doğrulama analizlerinde ise kromatografik yöntemlerin kullanıldığı belirtilmektedir (5). İmmüno kimyasal yöntemler kullanılarak yapılan taramalarda test panelinde yer almayan tetkiki yapılamamış pek çok analiz nedeni ile tam bir uyuşturucu/uyarıcı madde taramasının gerçekleşemeyeceğini daha önce de belirtmiştik. Bunun dışında, belirtilmesi gerekli bir konu da şudur ki; mevcut olan her immüno kimyasal kit hastane laboratuvarının ihale listesinde yer alsın ve tarama listesine alınmış olsa, her bir testin ayrı ayrı maliyetlerinin toplamı çok yüksek olabilecektir. Her ne kadar gerek işleyiş esaslarında gerekse bu konuda kaynak olarak gösterilen kitaplarda tarama için immüno kimyasal yöntemler, doğrulama için kromatografik yöntemler önerilse de, özellikle denetimli serbestlik hastaları gibi idari olarak uyuşturucu madde kullanımının belirlenmesi istenilen kişilerde taramanın daha geniş bir yelpazede sıvı kromatografisi ile maddenin ayırımı ve ardından kütle analizi ile yapılması daha net ve kesin çözümler sağlayacaktır.

Kromatografik analizlerde bir avantaj; immüno kimyasal yöntemlerden farklı olarak maddenin ve maddenin parçalanması ile oluşan yavru iyonların kütesi ölçüldüğü için, çapraz reaksiyon endişesinin ve yanlış pozitif sonuç alınma olasılığının olmamasıdır (17-19).

Diğer bir avantaj kalibratörü bulunabilen her madde için kantitatif analiz yapılabilmesidir. Böylece pek çok madde taranabilir durumda olmaktadır.

Analizi yapılacak maddeler için internal standartlar kullanılarak elde edilen sonucun kantitasyonunun daha doğru olması mümkün olmaktadır.

Opiat, amfetamin, benzodiazepin gibi test gruplarında bu maddelerin herbirinin metabolitleri ya da bileşenleri ayrı ayrı ölçülebilmektedir. Yanlış negatif sonuç

alınmamaktadır.

Sentetik uyuşturucu maddeler daha geniş bir yelpazede taranabilmektedir. İdrar örneğinin bir enjeksiyonu ile kalibrasyonu yapılmış olan tüm maddeler için sonuç elde edilebilmektedir.

Ancak kromatografik analizler için deneyim gerekmektedir. Cihaz kurulum maliyetleri yüksektir. Bir analizin tamamlanması gerekli olan süre immüanaliz yöntemlerine göre daha uzundur.

Hastanemizin madde taraması için bu yıla kadar amfetamin, ekstazi, benzo-diazepin, kokain, opiat, barbitürat, THC, sentetik kannabinoidlerden K2.1, K2.2, K2.3 ve buprenorfin testleri taranmaktaydı. Bu seneki planlarımızda ise immün yöntemle tarama testlerinin yanı sıra ek olarak ayrı bir ihale ile LC-MS/MS yöntemi ile tarama yapılması da eklenmiştir. Planlamada, hızla cevap vermemiz gereken testler için, özellikle Buprenorfin isteğinin yer aldığı AMATEM hastaları için immün kimyasal yöntemle taramanın devam etmesi, denetimli serbestlik hastalarının idrar örnekleri gibi zaman kısıtlaması olmayan örnekler için ise kromatografik yöntemin daha ön planda kullanılması düşünülmüştür. Böylece idari yönden tetkik istenen ve pozitif sonuç alındığında, bağımlı olduğu maddeden eğitimlerle, rehabilitasyonla kurtulabilecek olan kişiler için daha geniş bir tarama şansı doğmuştur. Her iki ihale için test sayıları bu duruma göre planlanmıştır. Tüm bu kararlar klinisyenlerin de görüşleri alınarak birlikte verilmiştir. Klinisyenlere iki ayrı yöntem için ayrı kodlama alanları açılmış ve ihtiyaca göre uygun olan sadece bir yöntemi kodlamaları sağlanmıştır.

Genel olarak immüncimyasal yöntemlerin doğruluğunun değerlendirilmesinde, aynı örneğin immüncimyasal metod sonuçları, LC-MS/MS ya da GC-MS/MS ile yapılan çalışma sonuçları ile karşılaştırılmakta ve bu yöntemler referans yöntemler olarak kabul edilmektedir (20). İmmün kimyasal yöntemlerde bir maddenin kendisi ya da metabolitleri tek bir kitle ölçülmektedir. Kromatografik ayırım ve sonrasında kütle analiz yöntemlerinde ise ana madde ve türevleri farklı moleküler kütlelere sahip olduklarından ve farklı retansiyon zamanlarında kromatografik olarak elde edildiklerinden farklı farklı maddeler olarak değerlendirilmekte, kantitasyonları ayrı yapılmaktadır.

Laboratuvarımızda LC-MS/MS (Qtrap, Sciex) ile taranan test parametre listesi aşağıdaki şekildedir ve bir numune için yapılan tek enjeksiyonda tüm testler için kantitatif olarak sonuç alınmaktadır. Amfetamin, Metamfetamin, Ekstazi, MDA, MDEA, MBDB, THC-COOH, delta 9 THC, Kodein, Morfin, 6-monoasetilmorfin, eroin, benzoilgonin, kokain, pregabalın, gabapentin, buprenorfin, norbuprenorfin, alprozolam, klonazepam, diazepam, lorazepam, lormetazepam, midazolam, oksazepam, nordiazepam, nitrazepam, bromazepam, flurazepam,

flunitrazepam, klormetildiazepam, klobazepam, triazolam, JWH-018, JWH-073, JWH-122, JWH-015, JWH-018 N Pentanoik, JWH 018-N-5-OH Pentyl, JWH019, JWH-073 4OH Butyl, JWH 073 N Butanoik asit, JWH-081, JWH-200, JWH-203, JWH-250, AM-2201, AKB-48, XLR-11, RCS-4, WIN(55-212), PB-22, efedrin, norpseudoefedrin, pseudoefedrin, ketamin, fentanil, tramadol, naloksan, naltrexone, metadon, petidin, norkodein, dihidrokodein, EDDP, oksikodon, normorfin, etilmorfin, kokaetilen, propilbenzoilgonin.

Bu yöntemi kullanarak çalıştığımız yedi aylık süre içerisinde, laboratuvarımıza gelen örneklerin beşte birinde Pregabalin varlığı saptandı.

Kötüye kullanılan madde taramasında kromatografik yöntem neden tercih edilebilir:

Bazı sentetik maddeler immun yöntemler ile taranamayabilir. Çok fazla çeşitte mevcut olan sentetik esrar türevi madde bulunmaktadır. Ancak immun yöntemler ile bu maddeleri saptayabilecek kit çeşitliliği sınırlıdır. Bu nedenle de aşırı dozda sentetik bir madde ya da immun yöntemle taranamayan başka bir madde varlığında negatif toksikoloji sonucu verilebilmektedir. Kromatografik analizde ise aranılan sentetik maddenin standardı bulunabilirse o maddenin kütle analizi ile ölçülebilmesi mümkündür. bu nedenle kromatografik analiz yöntemi ile daha fazla çeşitte sentetik madde saptanabilmektedir.

İmmun yöntemler yanlış pozitif ve yanlış negatif interferanslara açık yöntemlerdir. Kromatografik ayırım ve maddenin kütleinin ölçülerek sonuç verildiği durumlarda ise analiz sonucunda bulunan madde aranılan maddedir. Doğada bu maddenin kendisinin ve yavru iyonlarının molekül ağırlığı bilinmektedir ve aynı molekül ağırlığına sahip başka bir madde bulunması ve karışması olasılığı çok düşüktür. Aynı zamanda aranılan maddenin standardı ile çalışıldığı için molekül ağırlığı ve kromatografi ile kaçınıcı dakikada elde edileceği bilinen bir madde aranmaktadır.

Diğer taraftan monoklonal ya da poliklonal antikorlar kullanılarak çalışılan immünkimyasal yöntemlerde kullanılan kitlerin maliyetleri yüksektir. Kromatografik analizlerde cihaz maliyetleri yüksektir.

Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğünün, Denetimli Serbestlik Tedavi Hizmetleri konulu 2015 yılında yayımlanan genelgesine göre, denetimli serbestlik hastalarının uyuşturucu ve uyarıcı madde analizine yönelik iş ve işlemler, Sağlık Bakanlığının, “Tıbbi laboratuvar yönetmeliği ve yasadışı ve kötüye kullanılan ilaç ve madde analizi yapan laboratuvarlar ile madde bağımlılığı teşhis ve tedavi merkezlerindeki tıbbi laboratuvarların çalışma usul ve esasları hakkında genelgesi” uyarınca yapılmaktadır. Bu genelgede tıbbi laboratuvar bölümünde, “yeni... ve yaygın kullanılan uyuşturucu ve uyarıcı maddeleri de saptayacak uy-

gun laboratuvar altyapısının kurulması beklenmektedir” denilmektedir (21). Bu genelgeye göre bir tıbbi laboratuvarın toplumda yaygın kullanıldığı bilinen maddeleri tarayabilmesi gereklidir. Bunun dışında laboratuvarın kullandığı yöntemle saptayabildiği sık kullanılan başka maddeler varsa idari kurumlarla bu bilgileri paylaşması kötüye kullanım potansiyeli olan yeni maddelerin tartışılması için bilimsel destek vermesi sorumluluğu vardır.

Ayrıca Sağlık Bakanlığı İdrar Numunelerinde Yasadışı ve Kötüye Kullanılan İlaç ve Madde Analizi Yapan Tıbbi Laboratuvarlar ile Madde Bağımlılığı Teşhis ve Tedavi Merkezlerindeki Tıbbi Laboratuvarların İşleyiş Esaslarında; “GC-MS, LC-MS/MS uygulamaları cihaz yatırım maliyetleri nedeni ile henüz tarama amaçlı yaygın olarak kullanılmamaktadır. Ancak bu yöntemler ile geniş bir madde ve ilaç paneli hızla taranabilmektedir. Diğer yöntemlerle taranması mümkün olmayan pek çok maddenin taranabilmesini sağlaması karakteristik avantajıdır. Yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar çok düşük oranlardadır. Günümüz teknolojisi ile düşük numune hacmi ile çok sayıda numunede çok sayıda maddenin taranması için uygundur” denilmektedir. Kit karşılığı cihaz ihalesi yapılan ve hasta sayısının yüksek olduğu hastanelerde, kromatografik yöntem bir kere kurulduktan sonra, geniş tarama gerekli olan hasta grubu için, idrar örneğinin bir kez enjeksiyonu ile çok sayıda madde, aynı sayıdaki maddenin immün analiz yöntemleri ile taranmasına oranla daha düşük kit maliyetiyle yapılabilmektedir. Özellikle denetimli serbestlik takibinin yeni başladığı kişilerde, denetimli serbestlik hastasının madde kullandığını itiraf etmediği düşünülmelidir. Bu durumda daha geniş bir yelpazede tetkik yapılabilmesi bağımlılığı saptayabilmek için avantajdır. Bir diğer taraftan, adli olaylarda, daha önceden taraması yapılarak sonuç verilen idrar örneği doğrulama için hastane laboratuvarından tekrar istenebilir, bu nedenle pozitif olarak tarama sonucu verilen numuneler en az altı ay, 3 ayı tüpte bozulmadan saklanmalıdır. Saklanan bu numune şahit numunedir. Ancak ne var ki rutin uygulamada mahkemelerde davaların görüşülmesi ve numunenin istenmesi için geçen süre genellikle altı aydan daha fazla olmaktadır. Genelge gereği taramayı yapan laboratuvar pozitif örneği yasal süre olan altı aydan sonra daha fazla saklayamıyorsa bu süreden sonra numune için adli makamlardan gelen isteklere cevap verilememektedir. Tarama yöntemini kromatografi seçmek elbette örneğin doğrulamasının yapıldığı anlamına gelmemektedir, numunenin doğrulama modunda çalışılması ile ilgili analitik süreç farklıdır. Ancak yine de tarama modunda bile olsa, çok noktalı kalibrasyon yapan, internal standart kullanan ve iç kalite kontrol çalışan bir laboratuvarda kromatografi ile verilen sonuçların yanlış pozitif olma riski olmayacaktır. Adli kurumlardan geç istenmesi nedeni ile örneğin verilemediği yargılama durumlarında, bu yöntemle yapılmış tarama sonuçları daha

güvenilir kanıtlar ortaya koymuş olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Madde bağımlılığı analizleri, MS/MS kromatografi, immünkimyasal analiz, kötüye kullanım, denetimli serbestlik

KAYNAKÇA

1. Kara Uzun N, Karakükçü Ç, Küme T, Pınar A. (2016). Madde Analizlerinde laboratuvar. Tıbbi Biyokimya uzmanları için bilgilendirme Klavuzu. İzmir: Türk Klinik Biyokimya Derneği.
2. Kamer Vehbi Kadri. Madde Bağımlılarının Rehabilitasyonunda Yeni Dönem Denetimli Serbestlik. TBB Dergisi, 2008; No:79, 275-307.
3. Denetimli Serbestlik Hizmetleri Yönetmeliği. 5 Mart 2013, Resmi Gazete.
4. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğünün genelgesi. sayı: 95966346, Konu: Yasadışı ve Kötüye Kullanılan ilaç ve Madde Analizi yapan Tıbbi Laboratuvarlar ile Madde Bağımlılığı Teşhis ve Tedavi Merkezlerindeki Tıbbi Laboratuvarların Çalışma Usul ve Esasları Hakkındaki Genelge. 17 Temmuz 2014. Tıbbi, Laboratuvar Hizmetleri Daire Başkanlığı.
5. İdrar Numunelerinde Yasadışı ve Kötüye Kullanılan İlaç ve Madde Analizi Yapan Tıbbi Laboratuvarlar ile Madde Bağımlılığı Teşhis ve Tedavi Merkezlerindeki Tıbbi Laboratuvarların İşleyiş Esasları. (2016). T.C. Sağlık Bakanlığı, Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Tıbbi Laboratuvar Hizmetleri Dairesi Başkanlığı. Ankara.
6. National Survey on Drug Use and Health. (2006). Washington, DC:US Department of Health and Human Services; (Office of Applied Studies).
7. Amitava D.& Jorge L.S. (2015). Tıbbi Laboratuvarlarda Doğru Sonuç. (Turan Turhan, Çev.Ed.). Ankara: Palme yayıncılık.
8. JaffeeWB, Truccp E, Teter C, Levy S, et al. Focus on alcohol and drug abuse: ensuring validity in urine drug testing. Psychiatr Serv, 2008; 59:140-2.
9. Moody DE, Fang WB, Andrenyak DM, Monti KM, Jones C. A comparative evaluation of the instant-view 5-panel test card with OnTrak TesTcup Pro 5: comparison with gas chromatography-mass spectrometry. J Anal Toxicol. 2006; Jan-Feb;30(1):50-6.
10. Aksun S, Avşar C. Madde Bağımlılığı Analizleri Ve İdrar Bütünlüğünün Önemi. Medical Sciences, 2019;14(1):22-32. DOI:10.12739/NWSA.2019.14.1.1B0063.
11. Saraç, Z.G. (2017). Uyuşturucu Madde Analizlerinde Ölçüm Belirsizliği.Yayımlanmamış uzmanlık tezi. İzmir:İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı.
12. Kim SY, Kim H, Park Y, Lim J, Kim J, Koo SH, Kwon GC. Evaluation of an Automated Reader and Color Interpretation-Based Immunoassays for Multiplexed Drug-of-Abuse Testing in Urine. J Anal Toxicol. 2017;41(5):412-420. doi: 10.1093/jat/bkx014.
13. Keskinbora K, Pekel AF, Aydınlı I. Periferik nöropatik ağrının kontrolünde gabapentin ve amitriptilinin etkinliğinin karşılaştırılması. Ağrı, 2006; 18:2.
14. Yılmaz B, Yaşar E, Köroğlu Omaç Ö, Göktepe AS, Tan AK. Gabapentin vs. Pregabalin for the Treatment of Neuropathic Pain in Patients with Spinal Cord Injury: A Crossover Study. Turk J Phys Med Rehab, 2014;61:1-5.
15. Driot D, Jouanjus E, Oustric S, et al. Patterns of gabapentin and pregabalin use and misuse: Results of a population-based cohort study in France. Br J Clin Pharmacol. 2019Jun;85(6):1260-1269. doi: 10.1111/bcp.13892.
16. Standridge JB, Adams SM, Zotos AP. Urine drug screening: a valuable Office procedure. Am Fam Physician, 2010; 81:635-640.
17. Schwartz RH, Bogema S, Thorne MM. Evaluation of the EZ-SCREEN enzyme immunoassay test for detection of cocaine and marijuana metabolites in urine specimens. Pediatr Emerg Care, 1990 Jun;6(2):147-9.
18. Taylor PJ, Tai CH, Franklin ME, Pillans PI. The current role of liquid chromatography tandem mass spectrometry in therapeutic drug monitoring of immunosuppressants and antiretroviral drugs. Clin Biochem, 2011; 44:14-20.

Güncel Biyokimya Çalışmaları II

19. Lum, G, Mushlin, B. Urine Drug Testing: Approaches to Screening and Confirmation Testing. Lab Med, 2004;35(6):368-73.
20. Verstraete AG., Heyden FV. Comparison of the Sensitivity and Specificity of Six Immunoassays for the Detection of Amphetamines in Urine. Journal of Analytical Toxicology, 2005 Jul-Ağ;29(5):359-64. DOI: 10.1093/jat/29.5.359
21. Sağlık Bakanlığı Denetimli Serbestlik Tedavi hizmetleri konulu genelgesi. (2015/11). 14500235/010.06.02/450. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü genelgesi. Ankara

Bölüm 2

EPIGENETİK MEKANİZMALAR İLE PARKİNSON HASTALIĞI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN KLİNİK AÇIDAN ÖNEMİ

Orçun AVŞAR¹

1.GİRİŞ

Parkinson hastalığı (PH), yaşla birlikte ilerleyen, çeşitli motor ve motor olmayan semptomlar içeren ve semptomların zamanla artış gösterdiği yaygın bir nörodejeneratif hastalıktır. Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığından sonra en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır ve 65 yaş üstü nüfusun %1-2'sini etkilemektedir [1]. PH, motor semptomlar olan bradikinezi, tremor, rijidite, postural instabilite ve motor olmayan semptomlar olan koku alma disfonksiyonu, depresyon, kabızlık, REM uyku davranış bozukluğu ile karakterizedir. Bu semptomlar, ilk kez 1817'de James Parkinson tarafından tanımlanmıştır [2]. Patolojik açıdan, Substantia Nigra pars compacta (SNpc)'da dopaminerjik nöronların ölümü ve etkilenen beyin bölgelerindeki nöronlarda Lewy cisimlerinin meydana gelmesi şeklinde ifade edilmektedir. Lewy cisimleri, büyük oranda α -synuclein içerirken daha az oranlarda ubiquitin ve başka proteinlerden oluşmaktadır [3]. Parkinson hastalarındaki sıvı hareketlerinin giderek azalması, Substantia Nigra pars compacta'da dopamin sentezinin azalmasından ve özellikle dorsal striatuma iletilme sorunundan kaynaklanmaktadır [4].

PH vakalarının büyük çoğunluğu (>%90) ailesel değildir ve sporadik ya da idiyopatik olarak kabul edilmektedir. Ailesel PH vakaları ise yaklaşık %5-10 oranında görülmektedir ve *PARK2*, *SNCA*, *LRRK2*, *PINK1*, *GBA* genlerinde görülen nadir mutasyonlar Mendel kalıtımı ile etki göstermektedir. Ancak, sporadik Parkinson hastalığında altta yatan nedenler hala gizemini korumaktadır [1, 5]. Bu bağlamda, tek bir neden değil bireysel farklılığın altında yatan mekanizmalar karşımıza çıkmaktadır. Ailesel Parkinson hastalığının düşük prevalansı; çevresel faktörlerin, patojenlerin, yaşam boyu hem nükleer hem de mitokondriyal DNA'da meydana gelen mutasyonların Parkinson hastalığının ortaya çıkmasında önemli rolü olduğunu göstermektedir [6]. Yaşlanma, PH için en önemli risk faktörüdür

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Hitit Üniversitesi, orcunavsar@hitit.edu.tr

ve insidansı 60'lı yaşlarda çok hızlı bir şekilde artış göstermektedir. Böcek ilacına maruz kalma ve travmatik beyin hasarı risk faktörü olarak ele alınırken tütün kullanımı ve fiziksel aktivite ise koruyucu faktörler olarak değerlendirilmektedir (Tablo 1 ve Tablo 2'de) [7]. Normal yaşlanma; oksidatif stresin artması, beyinde demir ve nöromelanin birikmesi, bozulmuş otofaji, hücre içerisinde α -synuclein birikmesi, mikroglia ve nöroenflamasyonun aktivasyonu gibi sonuçlar doğuran yollardaki bozukluk nedeniyle meydana gelmektedir ve nöron azalması ile karakterizedir. Bunlara ek olarak genetik, çevresel ve epigenetik faktörler ise normal yaşlanma sürecini artmış dopamin nörodejenerasyonu görülen Parkinson hastalığına çevirmektedir [8].

Tablo 1. Koruyucu Faktörler ve Biyolojik Etkileri [7].

Koruyucu Faktör	Biyolojik Etkileri
Tütün kullanımı	Nikotin, nikotinik asetilkolin reseptörüne bağlanarak nöral hasarı azaltır
Fiziksel aktivite	Serum ürat düzeyini, nörotrofik faktörleri artırır
Ürat	Antioksidan etki gösterir
İbuprofen	PPAR γ aktivasyonu ile anti-inflamatuvar etki gösterir
Kalsiyum kanal blokerları	Dopaminerjik nöronların mitokondrilerindeki kalsiyum kanalı ile indüklenen stresi inhibe eder
Kafein	Adenozin A2A reseptörünü bloke eder

Tablo 2. Risk Faktörleri ve Biyolojik Etkileri [7].

Risk Faktörü	Biyolojik Etkileri
Tarım ilacı	Oksidatif stres, mitokondriyel toksin
Süt ürünleri	Süt ürünlerinin üre düşürücü etkileri
Travmatik beyin hasarı	Kan beyin bariyerinin yıkılması, beyin inflamasyonu, mitokondri fonksiyonunun bozulması, α -synuclein birikmesi
Anksiyete ya da depresyon	Erken PH'de dorsal raphe nukleusundaki serotonerjik nöronların kaybı (prodromal semptom olarak düşünülebilir)
Beta-blokerler	Norepinefrin nöron kaybını ve norepinefrin eksikliğini artırma

Bu bölümde, epigenetik mekanizmaların Parkinson hastalığındaki etkilerinden ve tedavideki potansiyel özelliklerinden bahsedilecektir.

2. EPİGENETİK VE PARKİNSON HASTALIĞI (AH)

Modern epigenetik görüşün kökeni, Aristoteles'in gelişim sırasında genotip ile fenotip arasındaki farklılığı tanımlamak için kullandığı epigenез fikrini temel alan Waddington'a dayanmaktadır [9]. Günümüzde ise epigenetik daha yaygın olarak, gen ekspresyonundaki kalıtsal değişimler için kullanılmaktadır. DNA sekansında herhangi bir değişim görülmezken DNA metilasyonu, histon modifikasyonu, nukleozom konumlandırması gibi kromatin değişiklikleri epigenetik olayın meydana gelmesine sebep olmaktadır [10]. Epigenetik işlemler; DNA, histon ve çeşitli kodlama yapan ve yapmayan RNA'ların kimyasal modifikasyonlarını içermektedir. Son yıllarda, teknolojik gelişmeler sayesinde epigenetiğin sinirbilimdeki rolü büyük ölçüde araştırılmıştır. Bu nedenle, 2009 yılında PubMed'de "nöroepigenetik" terimi ortaya çıkmıştır ve günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır [11].

DNA metilasyonu, histon modifikasyonu, kodlamayan RNA düzenlemesi, RNA editleme, nukleozomların yeniden modellenmesi ve konumlandırılması, epigenetik modifikasyonları oluşturmaktadır. Bu modifikasyonlar, DNA sekansına etki etmeden gen ekspresyonunu düzenlemektedir. Epigenetik modifikasyonlar; transkripsiyon, X-kromozomu inaktivasyonu gibi temel hücreyel süreçleri düzenlemektedir ve yaşa bağlı gen ekspresyonu ile çevresel faktörler arasındaki boşluğu doldurmaktadır. Epigenetik modifikasyonlar; dinamikdir, hücreye özgüdür ve bireyler arasında farklılık göstermektedir. Ayrıca, nöron gibi bölünmeyen hücrelerde de meydana gelmektedir [12, 13].

Özellikle DNA metilasyonu; promotör veya intragenik lokuslarda gen ekspresyonunu düzenlemektedir. Ayrıca, kodlamayan (regülatör) DNA sekanslarının modifiye edilmesi yoluyla da düzenleme yapmaktadır. CpG bölgelerindeki DNA metilasyon değişikliklerini içeren epigenetik değişimler, Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda rol oynamaktadır [14, 15]. DNA metiltransferazlar (DNMT1), histon transferazlar ve metil-CpG-bağlanma proteini gibi proteinleri kodlayan epigenetik düzenleyici genlerin mutasyonları Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda etkili olmaktadır. Ayrıca, genlerde meydana gelen mutasyonlar, sekonder epigenetik modifikasyonlara da sebep olmaktadır [16, 17].

Çevre, yaşlanma ve bireyin genetik altyapısı gibi epigenetik değişiklikleri tetikleyen faktörler, nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasında etkili olmaktadır. Genel olarak yaşlanma ise, DNA metilasyon seviyelerinde meydana gelen azalma ile ilişkilidir [18].

2.1. Parkinson Hastalığında DNA Metilasyonu

DNA'nın metilasyonu, hücreyi yabancı DNA'dan korumaktadır ve yabancı genlerin ekspresyonunu engellemektedir ve büyük olasılıkla prokaryotik prote-

in metilasyonundan evrildiği düşünülmektedir. Memeli genomundaki intergenik bölgelerin büyük bir kısmı (DNA sekansının %95'ini oluşturur), DNA metilasyonu ile etkili bir şekilde baskılanan transpozon ve viral elementlerden oluşmaktadır [19, 20]. Ökaryotik genomlarda DNA metilasyonu, büyük oranda C5 pozisyonundaki sitozinleri guaninin izlediği bölgelerde (CpG adacıkları) gerçekleşmektedir. CpG adacıklarındaki sitozin metilasyonu, DNA ipliğindeki kovalan epigenetik modifikasyondur ve gen ekspresyonunu baskılamaktadır. Kadınlarda görülen X kromozomu inaktivasyonu ise bu modifikasyona önemli bir örnektir [21, 22].

Parkinson hastalığında DNA metilasyonunun rolünü araştırmaya yönelik çalışmalar her geçen gün artış göstermektedir. Parkinson hastalığının kan ve tükürükteki DNA metilasyon seviyeleri ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir [23].

Sporadik PH, günümüzde bireysel farklılıklara ek olarak yaşa bağlı değişikliklerin, genetik varyantların ve kompleks gen-çevre etkileşiminin bir sonucu olarak değerlendirilmektedir [24].

SNCA geni, dejenere dopaminerjik nöronlardaki Lewy cisimlerinin en önemli bileşeni olan α -synuclein proteinini kodlamaktadır. PH ile yapılan ilk DNA metilasyon çalışmaları *SNCA* genine odaklanmıştır ve intron 1, transkripsiyonel açıdan aktif olan ve metilasyona bağlı olan bir bölge olarak tanımlanmıştır [25]. *SNCA* genindeki CpG adacıklarının fonksiyonel önemi, bir DNMT inhibitörü olan 5-aza-2'-deoksisitidine maruz kalan dopaminerjik nöronlarda gösterilmiştir ve ilgili genin up-regüle olduğu belirlenmiştir [26]. Yapılan bir çalışmada, PH vakalarına ait beyin örneklerinde DNMT1 seviyelerinin azaldığı rapor edilmiştir [27]. İlginç bir şekilde, yapılan çalışmalarda *SNCA* metilasyon özelliklerinin beyin ve kanda paralellik gösterdiği belirtilmiştir [28]. Parkinson hastalarının kanından elde edilen DNA'da bir aday genin değişen metilasyon paterni gösterdiği kanıtlanırsa, biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Birçok çalışmada, *SNCAi1* geninin kandaki metilasyon durumu araştırılmıştır. Periferik kan mononükleer hücrelerinin analizinde, *SNCAi1* geninin PH vakalarındaki hipometilasyonu doğrulanmıştır ve yaş, cinsiyet, hastalık süresi, L-Dopa'ya maruz kalma ile korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir [29, 30, 31]. Erkek hastalarda, daha yüksek L-Dopa uygulamasının *SNCAi1* metilasyonunu artırdığı ve a-syn protein ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Ancak, L-Dopa'nın DNA metilasyonu üzerindeki farmakolojik etkileri tam olarak açıklanamamıştır. L-Dopa ile tedavi edilen Parkinson hastalarında S-adenozilmetionin (SAM)/S-adenozilhomosistein (SAH) metabolizmasının değiştiği ve homosistein düzeyinin artış gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca, azalmış SAM düzeylerinin genlerin ve proteinlerin metilasyonunu modüle edebileceği fikri öne sürülmüştür [32]. Artmış *SNCAi1* metilasyonu ile geç PH başlangıç yaşı arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Sağlıklı

erkeklerde sağlıklı kadınlara kıyasla metilasyon düzeyinin düşük olduğu ve bu durumun erkeklerin Parkinson hastalığına daha duyarlı olmasına neden olabileceği ifade edilmiştir [14, 33]. SNCA metilasyon çalışmalarının aksine, parkin geninin promotör bölgesindeki metilasyon düzeylerinin değişmediği gösterilmiştir [34]. *MAPT* promotör bölgesinin hipermetilasyonunun, *MAPT* ekspresyonunu azaltarak nöroprotektif özellik gösterdiği rapor edilmiştir [33]. Sonuç olarak, kan ve beyindeki SNCA ve *MAPT* metilasyon değişimleri PH ile güçlü bir korelasyon göstermektedir.

2.2. Parkinson Hastalığında Histon Modifikasyonları

Histonların N-terminal uçları, kromatin modifiye edici enzimlerin işlevlerini yerine getirebilecekleri bir bölgedir ve yaklaşık 25-40 amino asit içermektedir. Lizin veya arjinin kalıntılarının metilasyonu, asetilasyonu, fosforilasyonu, ubikitinasyonu, SUMOilasyonu, ADPribozilasyonu, krotonilasyonu, hidroksilasyonu ve prolin izomerizasyonu histon modifikasyonlarını oluşturmaktadır [35, 36]. Histon modifikasyonlarının, dopaminerjik nöronların gelişiminde, farklılaşmasında ve korunmasında önemli rol oynadığı ortaya konmuştur [37]. Ancak, histon modifikasyonlarının PH patogenezindeki etkileri hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır.

Parkinson hastalarının beyin dokularından dopaminerjik nöronların izole edilmesi ile yapılan bir çalışmada, yaş uyumlu kontrol bireylerine kıyasla histon H2A, H3 ve H4 proteinlerinin asetilasyon seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, çeşitli histon deasetilaz (HDAC) enzimlerinin seviyelerinde azalma görülmüştür [38].

Toksinlere maruz kalma histonlarda değişikliklere neden olmaktadır. Örneğin, bir pestisit olan dieldrin farelere uygulandığında, mezensefalik dopaminerjik nöronlarda H3 ve H4 histonlarının asetilasyon seviyelerinde artış olduğu görülmüştür. Daha sonra, bir histon asetiltransferaz (HAT) olan cAMP yanıt elemanı bağlayıcı proteininin hücrelerde biriktiği rapor edilmiştir [39]. Nörotoksik madde olan parakuat ise in vitro dopaminerjik hücrelerde histon H3 proteininin asetilasyonunu indüklemektedir [40].

Levodopa ile indüklenen diskinezi, anormal dopamin D1 reseptör transmisyonu ile ilişkilendirilmiştir. Histon H3 fosfoasetilasyonunun D1 reseptörünün inaktivasyonu ile bloke edilmesi, histon H3 fosforilasyonunun ve/veya asetilasyonunun inhibe edilmesinin diskinezinin önlenmesinde veya tedavisinde kullanılabilirliğini göstermektedir [41]. Fare modelinde, L-Dopa uygulamasının histon H3 fosforilasyonunu indüklediği gösterilmiştir. Bu durum, özellikle D1 reseptörünü eksprese eden nöronlarda görülmüştür ve motor komplikasyonlarda ya da

diskineziye etkili olabilecek genlerin anormal ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir [42].

α -synuclein'in histon asetilasyonunun inhibisyonu yoluyla histonlarla ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, α -synuclein doğrudan H1 histon proteinine bağlanmaktadır ve sıkı bir kompleks oluşturmaktadır. α -synuclein overekspresyonu, H3 histon proteininin hipoasetilasyonuna neden olmaktadır [43, 44].

Bütün bu bulgular, kromatin yapısının yeniden düzenlenmesini sağlayan histon modifikasyonlarının, PH patogenezinde oldukça etkili olabileceğini düşündürmektedir.

3. PARKİNSON HASTALIĞINDA EPİGENETİK TEMELLİ TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

Parkinson hastalığında uygulanan tedaviler genellikle semptomatiktir ve hastalığın ilerlemesi konusunda sınırlı etkilere sahiptir. Epigenetik mekanizmalar, hastalığın patofizyolojisini açıklamada büyük öneme sahiptir. Bu nedenle, yeni tedavi yöntemleri DNA metilasyonunu, histon modifikasyonlarını ve kromatinin yeniden düzenlenmesini hedef alan bazı ilaçların (epiilaç, epidrug) kullanımını içermektedir. Bu ilaçlar arasında DNA metiltransferaz aktivatörleri ve inhibitörleri, histon deasetilaz inhibitörleri, sirtuin aktivatörleri ve histon metilasyon modulatorleri yer almaktadır [45].

DNA hipometilasyonu ile ilişkili PH vakalarında DNA metilasyonunun aktive edilmesi gündeme gelmiştir. Bu nedenle, folik asit ve B vitamini tedavide iyi bir gıda takviyesi olarak düşünülmektedir [46]. İsveç ve İngiltere'de yüksek demans riskine karşılık gelen homosistein seviyelerinin yüksek olduğu hastalarda folat ve B6 vitamini reçete edilmektedir [47].

Bazı genlerin hipermetilasyonu, nörodejenerasyonu tetiklemektedir. Bu nedenle, DNA metilasyon inhibitörlerini içeren yaklaşımlar PH tedavisinde kullanılabilir. Nükleozid analogları olan 5-aza-20-deoksisitidin (Decitabine) ve 5-azasitidin (Azacitidine) ve küçük moleküller olan hidralazin ve prokainamid gibi DNMT inhibitörleri henüz klinik denemelere sunulmuş olmalarına rağmen nörodejenerasyonda potansiyel tedavi olarak düşünülmektedir. Diğer taraftan bu epiilaçlar; çeşitli kanser tipleri, talasemi, kardiyak aritmi ve hipertansiyon gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır [48, 49].

Histon deasetilaz inhibitörleri (HDACİ), antikanser ilaçları olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu ajanlar, histon deasetilaz protein ailesinin farklı üyeleri üzerindeki etkilerinden dolayı PH gibi nörodejeneratif hastalıklarda da karşımıza çıkmaktadır. Valproik asit (VPA)'in rotenon, a-syn ve MPTP

toksitesine karşı koruma sağladığı gösterilmiştir. VPA tarafından ortaya konan cevaplara, pro-inflamatuvar faktörlerin seviyelerinin azaltılması ve mikroglia apoptozis indüklenmesi aracılık etmektedir [50, 51, 52, 53]. Histon deasetilaz enzimlerini inhibe eden trikostatin A (TSA)'nın artan histon H3 asetilasyonunun eşlik ettiği mikroglia apoptozisini indükleyerek nöroprotektif ve anti-inflamatuvar özellik gösterdiği rapor edilmiştir [54]. Bununla birlikte, bu bileşiklerin bazı olumsuz özellikleri bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin, TSA'nın nöron ölümünü indüklediği, pro-apoptotik genleri aktive ettiği ve büyük olasılıkla PH patogenezinde etkisinin olduğu belirtilmiştir. Buna ek olarak, TSA'nın çeşitli dejeneratif koşullarla ilişkili olan mikroglial hücrelerde pro-inflamatuvar yanıtları artırdığı gösterilmiştir [55, 56]. HAT ve HDAC aktiviteleri arasındaki denge normal hücre fonksiyon için hayati önem taşımaktadır. Birçok çalışma, HDAC'ın Parkinson hastalığındaki terapötik potansiyelini değerlendirmekle beraber histon olmayan protein hedeflerinden dolayı nöronlarda ve diğer hücre tiplerinde istenmeyen yan etkilere sebep olacağını göstermektedir. Bu sebeple, bu umut veren potansiyel tedavi yaklaşımlarının uygulanabilirliği için ek çalışmalar gerekmektedir [57].

4. SONUÇ

Epigenetik süreçler, çok hücreli organizmalarda embriyonik gelişimi kontrol etmektedir ve genetik olarak eş hücrelerin ve bireylerin fonksiyonel farklılıklarını belirlemektedir. Epigenetik; öğrenme, hafıza ve yaşlanma gibi süreçlerde de rol oynamaktadır.

Epigenetik ve özellikle metilasyon düzeyindeki değişiklikler, Parkinson hastalığında yeni mekanizmaların ve terapötik hedeflerin tanımlanmasına katkıda bulunabilir. Yapılan çalışmalara göre ise, *SNCA* ve *MAPT*'nin metilasyonu Parkinson hastalığında büyük öneme sahiptir.

Parkinson hastalığı; DNA ve mitokondriyal hasar gibi yaşlanma ile bazı ortak özelliklere sahiptir. Yaşla prevelansın artmasıyla birlikte nöroinflamasyondaki artışın Parkinson hastalığındaki epigenomu nasıl etkilediği oldukça önemlidir. Epigenetik değişiklikler, bireysel farklılıkla ilişkili Parkinson hastalığı patofizyolojisine katkıda bulunabilir. Gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli olan, DNA ve histonlardaki moleküler modifikasyonları içeren epigenetik mekanizmaların anlaşılması Parkinson hastalığının ilerleyişi açısından büyük önem taşımaktadır. Histonların post-translasyonel modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmalar, Parkinson hastalığının progresyonunu anlamamızda da önemli ipuçları sunmaktadır. Epigenetik mekanizmaları hedef alan ajanlar, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için umut ışığı olmaktadır.

KAYNAKÇA

1. de Boni L, Wüllner U. Epigenetic analysis in human neurons: considerations for disease modeling in PD. *Frontiers in Neuroscience*, 2019;13:276.
2. Pang SY, Ho PW, Liu HF, et al. The interplay of aging, genetics and environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Translational Neurodegeneration*, 2019;8:23.
3. Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine*, 2003;348:1356–64.
4. Beitz JM. Parkinson's disease: a review. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 2014;6:65-74.
5. Del Rey NL, Quiroga-Varela A, Garbayo E, et al. Advances in Parkinson's disease: 200 years later. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2018;14:12:113
6. van Heesbeen HJ, Smidt MP. Entanglement of Genetics and Epigenetics in Parkinson's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 2019;13:277.
7. Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *The Lancet Neurology*, 2016;15:1257–72.
8. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, et al. The prevalence of Parkinson's disease: a systemic review and meta-analysis. *Mov Disord*. 2014;29:1583–90.
9. Harvey ZH, Chen Y, Jarosz DF. Protein-based inheritance: Epigenetics beyond the chromosome. *Molecular Cell*, 2018;69:195-202.
10. Holliday R, Pugh J. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 1975; 187:226–232.
11. Xylaki M, Atzler B, Outeiro TF. Epigenetics of the synapse in neurodegeneration. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 2019;19:72.
12. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol*. 2010;28:1057–1068.
13. Qureshi IA, Mehler MF. Epigenetic mechanisms underlying nervous system diseases. *Handb. Clin. Neurol*. 2018;147:43–58.
14. Wüllner U, Kaut O, deBoni L, et al. DNA methylation in Parkinson's disease. *J. Neurochem*. 2016;139(Suppl. 1):108–120.
15. Fernandez-Santiago R, Merkel A, Castellano G, et al. Whole-genome DNA hyper-methylation in iPSC-derived dopaminergic neurons from Parkinson's disease patients. *Clin Epigenetics*, 2019;23:108.
16. Klein CJ, Botuyan MV, Wu Y, et al. Mutations in DNMT1 cause hereditary sensory neuropathy with dementia and hearing loss. *Nat. Genet*. 2011;43:595–600.
17. Amir RE, Van Den Veyver IB, Wan M, et al. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat. Genet*. 1999;23:185–188.
18. Kuzumaki N, Suda Y, Iwasawa C, et al. Cell-specific overexpression of COMT in dopaminergic neurons of Parkinson's disease. *Brain*, 2019;142:1675-1689.
19. Noyer-Weidner M, Trautner TA. Methylation of DNA in prokaryotes. *EXS*, 1993;64:39–108.
20. Sandoval j, Esteller M. Cancer epigenomics: beyond genomics. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 2012;22:50–55.
21. Ahn J, Lee J. X chromosome: X inactivation. *Nat. Edu*. 2008;1:24.
22. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 2009;462:315–322.
23. Chuang YH, Paul KC, Bronstein JM, et al. Parkinson's disease is associated with DNA methylation levels in human blood and saliva. *Genome Medicine*, 2017;9:76.
24. Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, et al. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur. J. Epidemiol*. 2011;1:51–58.
25. Jowaed A, Schmitt I, Kaut O, et al. Methylation regulates alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains. *J. Neurosci*. 2010;30:6355–6359.
26. Wang Y, Wang X, Li R, et al. A DNA methyltransferase inhibitor, 5-aza-2'- deoxycytidine, exacerbates neurotoxicity and upregulates Parkinson's disease-related genes in dopaminergic neurons. *CNS Neurosci. Ther*. 2013;19:183–190.

27. Desplats P, Spencer B, Coffee E, et al. a-synuclein sequesters Dnmt1 from the Nucleus. *J. Biol. Chem.* 2011;286:9031–9037.
28. Pihlström L, Berge V, Rengmark A, et al. Parkinson's disease correlates with promoter methylation in the a-synuclein gene. *Mov. Disord.* 2015;30:577–580.
29. Ai SX, Xu Q, Hu YC, et al. Hypomethylation of SNCA in blood of patients with sporadic Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 2014;337:123–128.
30. Song Y, Ding H, Yang J, et al. Pyrosequencing analysis of SNCA methylation levels in leukocytes from Parkinson's disease patients. *Neurosci. Lett.* 2014;569:85–88.
31. Tan YY, Wu L, Zhao ZB, et al. Methylation of a-synuclein and leucinerich repeat kinase 2 in leukocyte DNA of Parkinson's disease patients. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2014;20:308–313.
32. Muller T, Woitalla D, Hauptmann B, et al. Decrease of methionine and S-adenosylmethionine and increase of homocysteine in treated patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 2001;308:54–56.
33. Coupland KG, Mellick GD, Silburn PA, et al. DNA methylation of the MAPT gene in Parkinson's disease cohorts and modulation by vitamin E in vitro. *Mov. Disord.* 2014;29:13:1606–1614.
34. De Mena L, Cardo LF, Coto E, et al. No differential DNA methylation of PARK2 in brain of Parkinson's disease patients and healthy controls. *Mov. Disord.* 2013;28:2032–2033.
- [35. Pavlou MAS, Outerio TF. Epigenetics in Parkinson's Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2017;978:363–390.
36. Lardenoije R, Iatrou A, Kenis G, et al. The epigenetics of aging and neurodegeneration. *Prog Neurobiol.* 2015;131:21–64.
37. van Heesbeen HJ, Mesman S, Veenliet J V, et al. Epigenetic mechanisms in the development and maintenance of dopaminergic neurons. *Development.* 2013;140:1159–69.
38. Park G, Tan J, Garcia G, Kang Y, Salvesen G, Zhang Z. Regulation of Histone Acetylation by Autophagy in Parkinson Disease. *J Biol Chem.* 2016;291:3531–40.
39. Song C, Kanthasamy A, Anantharam V, et al. Environmental neurotoxic pesticide increases histone acetylation to promote apoptosis in dopaminergic neuronal cells: relevance to epigenetic mechanisms of neurodegeneration. *Mol Pharmacol.* 2010;77:621–32.
40. Song C, Kanthasamy A, Jin H, et al. Paraquat induces epigenetic changes by promoting histone acetylation in cell culture models of dopaminergic degeneration. *Neurotoxicology,* 2011;32:586–95.
41. Darmopil S, Martín AB, De Diego IR, et al. Genetic Inactivation of Dopamine D1 but Not D2 Receptors Inhibits L-DOPA-Induced Dyskinesia and Histone Activation. *Biol Psychiatry.* 2009;66:603–13.
42. Södersten E, Feyder M, Lerdrup M, et al. Dopamine Signaling Leads to Loss of Polycomb Repression and Aberrant Gene Activation in Experimental Parkinsonism. *PLoS Genet.* 2014;10:e1004574.
43. Cabos SN, Bennett SA, Torrente MP. The impact of histone post-translational modifications in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019;1865:1982–1991.
44. Goers J, Manning-Bog AB, McCormack AL, et al. Nuclear localization of alpha-synuclein and its interaction with histones. *Biochemistry,* 2003;42:8465–71.
45. Tejjido O, Cacabelos R. Pharmacoeipigenomic interventions as novel potential treatments for Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Int J Mol Sci.* 2018;19.
46. Kalbe E, Kessler J, Calabrese P, et al. DemTect: A new, sensitive cognitive screening test to support the diagnosis of mild cognitive impairment and early dementia. *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* 2004;9:136–143.
47. Smith AD, Refsum H, Bottiglieri T, et al. Homocysteine and dementia: An international consensus statement. *J. Alzheimer's Dis.* 2018;62:561–570.
48. Cacabelos R, Torrellas C. Epigenetic drug discovery for Alzheimer's disease. *Expert Opin. Drug Discov.* 2014;9:1059–1086.
49. Nebbioso A, Carafa V, Benedetti R, et al. Trials with epigenetic drugs: An update. *Mol. Oncol.* 2012;6:657–682.

Güncel Biyokimya Çalışmaları II

50. Bahari-Javan S, Sananbenesi F, Fischer A. Histone-acetylation: a link between Alzheimer's disease and post-traumatic stress disorder? *Front Neurosci.* 2014;8:160.
51. Benito E, Urbanke H, Ramachandran B, et al. HDAC inhibitor-dependent transcriptome and memory reinstatement in cognitive decline models. *J Clin Invest.* 2015;125:3572–84.
52. Monti B, Gatta V, Piretti F, et al. Valproic acid is neuroprotective in the rotenone rat model of Parkinson's disease: involvement of alpha-synuclein. *Neurotox Res.* 2010;17:130–41.
53. Peng GS, Li G, Tzeng NS, et al. Valproate pretreatment protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in rat primary midbrain cultures: role of microglia. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005;134:162–9.
54. Marinova Z, Ren M, Wendland JR, et al. Valproic acid induces functional heat-shock protein 70 via Class I histone deacetylase inhibition in cortical neurons: a potential role of Sp1 acetylation. *J Neurochem.* 2009;111:976–87.
55. Wang Y, Wang X, Liu L, et al. HDAC inhibitor trichostatin A-inhibited survival of dopaminergic neuronal cells. *Neurosci Lett.* 2009;467:212–6.
56. Suuronen T, Huuskonen J, Pihlaja R, et al. Regulation of microglial inflammatory response by histone deacetylase inhibitors. *J Neurochem.* 2003;87:407–16.
57. Hegarty SV, Sullivan AM, O'Keeffe GW. The epigenome as a therapeutic target for Parkinson's disease. *Neural Regen Res.* 2016;11:1735-1738.

Bölüm 3

SİNYAL İLETİM MEKANİZMALARI VE KLİNİK YANSIMALARI

Hüseyin Fatih GÜL¹
Necip İLHAN²
Yasin BAYKALIR³

GİRİŞ

Hücreler belirli bir molekülün ortamda eşik derişimi üzerinde bulunduğunun bilgisini alır. Hücre tarafından bir molekülün ortamda var olduğu bilgisi algılanırsa, bu bilgiyi fizyolojik cevaba çevirmek için hücrede bir seri kaskad şeklinde olaylar gerçekleşir ki tüm bu süreç sinyal iletimi olarak adlandırılmaktadır (1). Başka bir ifadeyle bütün sinyaller, özel reseptörler tarafından algılanan ve çoğunlukla bir kimyasal işlem içeren hücrel tepkiye dönüştürülen bilgiyi temsil eder. Bilginin kimyasal değişikliğe bu dönüşümüne ise sinyal iletimi denir. Sinyal moleküllerinin kendi reseptörlerine bağlanmasıyla hücrede önemli fizyolojik ve biyokimyasal yanıtlar başlamaktadır.

Hücrel sinyal yolları hücrel büyüme, farklılaşma, enflamatuvar yanıt, apoptozis ve çeşitli kimyasal uyarıcıların altında hücrel yanıtların düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu yollara ait farklı proteinlerdeki fonksiyon işlev kaybı veya kazanımı bazı mutasyonlara yol açarak başta kanser olmak üzere birçok klinik vakalara yol açabilmektedir (2).

1. SİNYAL İLETİM YOLAKLARI VE HASTALIKLAR

1.1. G Protein-aracılı Reseptör Yolağı ve Klinik Önemi

G protein-coupled receptor (GPCR) yolağı, sinyal iletiminde görevli reseptör ailelerinden önemli bir tanesini oluşturmaktadır ve bu yolda G proteinleri aracılığıyla sinyaller iletilmektedir. G proteinlerinde ya da G-proteinin aracılık ettiği bu yolda görevli olan herhangi bir proteinde meydana gelen mutasyonlar işlev kaybına ya da kazanımına neden olabilir. Şöyle ki işlev kaybı mutasyon-

¹ Dr. Öğr. Üyesi., Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D., Kars, Türkiye, fth_2323@hotmail.com

² Prof. Dr., Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D., Elazığ, Türkiye, necipilhan@hotmail.com

³ Arş. Gör. Dr., Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Zootekni A.D., Elazığ, Türkiye, ybaykalir@firat.edu.tr

ları; hormon direncine sebebiyet verirken, işlev kazanımı ile ilgili mutasyonlar ise endokrin hiperfonksiyonuna neden olmaktadır (3). G proteiniyle ilgili sinyal iletim yolağındaki aksaklıkların en bilindik patolojik tabloları Kolera ve Pertussis (boğmaca) (2). Örneğin koleraya sebep olan *Vibrio cholera* G proteinlerini hedefleyen toksinleri üretmektedirler. Böylece konakçı hücrelerin normal olarak sinyalleşmesini bozarlar. *Vibrio cholera* tarafından salgılanan kolera toksini heterodimer yapıda bir proteindir. B alt birimi bağırsak epitel yüzeylerindeki kendine özgü gangliositlere bağlanır ve A alt birimlerinin hücre içine girmesini sağlar. A alt birimi konakçı hücrelerindeki G proteini olan adenosin difosfat (ADP) ribozillenme faktörüyle (ARF-6) birleşir. Bu birleşme sonucunda guanozin trifosfat (GTPaz) aktivitesini engelleyerek G proteininin sürekli aktif halde kalmasını sağlar. Bu da bağırsak epitel hücrelerindeki adenilat siklazı sürekli aktif halde tutar ve adenosin monofosfat (AMP)'den siklik adenosin monofosfat (c-AMP) üretimini uyarır. Hücre içinde c-AMP'nin artması protein kinaz a (PKA)'nın aktifleşmesine neden olur. Bunun sonucunda sodyum (Na^+) ve hidrojen iyonu (H^+) değıştiricileri fosforillenerek hücreden sodyum klorür ($NaCl$) çıkışı olur ve hücrede yaşanan bu ozmotik dengesizliğe cevap olarak su ve elektrolit kaybına yol açar. Örneğin koleranın klinik tablosu olan diyare meydana gelebilir. Boğmacada ise boğmacanın etkeni olan Bordatella pertussis tarafından üretilen pertussis toksini guanozin difosfat/guanozin trifosfat (GDP/GTP) değışimini engelleyerek konakçının solunum yollarını enfekte eder. Solunum yollarındaki yabancı maddeleri süpüren kirpikli epitel hücrelerini yok eder. Kirpikli hareket engellendiğinden dolayı konakçı sürekli öksürerek solunum yollarındaki yabancı maddeleri dışarıya atmaya çalışır (1, 2).

G proteini sinyal yolağının bozulması ayrıca tüm insan kanserlerinin %25'inde ve bazı kanser türlerinin daha büyük bir kısmından sorumludur. Genellikle Ras proteininde GTP bağlanma bölgesi veya P ilmeğı yakınlarında GTPaz aktivitesini ortadan kaldıran mutasyonlar sonucu Ras proteini içsel GTPaz varlığıyla baş başa kalması sonucunda sürekli aktif konumda kalır ve sürekli "bölün" sinyali vererek kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olur (1).

1.2. Fosfotidil İnositol, Diaçilgliserol Yolakları ve Klinik Önemi

Hücre içi sinyal yolağında bir fosfolipit olan Fosfotidil İnositol 4,5-bisfosfat (PIP₂)'ın fosfolipaz c (PLC) isimli enzim tarafından hidroliz edilmesi sonucu di-açil-gliserol (DAG) ve inositol 1,4,5-trifosfat (IP₃) isimli 2 adet ikincil haberci oluşur (4). Bu iki haberci Protein Kinaz c (PKC) ve kalsiyum iyonunu (Ca^{+2}) serbestleştirir. PLC'de bulunan Src Homology 2 (SH2) domaininin düzenleyici birçok işlevi vardır (5). DAG ise PKC'nin allosterik düzenleyicisi olarak serin ve

treonin kalıntılarını fosforillemeye görev alır. PKC ayrıca diğer hücre içi hedefleri (örneğin Mitojen activated protein kinase [MAPK] yolağı gibi) aktive ederek, gen ekspresyonu ve hücre çoğalmasında görevli olan transkripsiyon faktörlerinin fosforillenmesinden de sorumludur. Tirozin fosfatazlar ise N-uçlarında bir SH2 domaini ve C-uçlarında sitoplazmik tirozin fosfataz domainleri (SHP1 ve SHP2) içerir ve bu sayede birçok hücrel proste görev alırlar. Hücrel büyümede, SHP1 ve SHP2 progenitör hücre gelişiminde, oksidatif stres yollarında, doku enflamasyonunda, kemotaksisi de içeren hücrel yanıtların şekillenmesinde rol oynarlar (6). Bu hayati fonksiyonlarından dolayı bu fosfatazlar nörodejenerasyon ve diyabet dışında, kanser gibi hastalıkların patofizyolojisinde yer almaktadır. Bazı sinyal iletiminde görevli proteinlerin SH2 domainindeki görülen mutasyonların immün yetmezliklere, diyabete ve bazal karsinomalara neden olduğu bildirilmektedir (7).

1.3. Protein Kinaz Yolakları ve Klinik Önemi

Protein kinaz ailesi içerisinde serin/treonin kinazlar önemli bir yer oluşturmaktadır. Bu kinazların görevi, serin-treonin amino asitlerinin hidroksil gruplarına, fosfat aktarılmasını sağlamaktır. Bu yolağın içindeki bazı kinazların aktivitesi hücredeki çeşitli patofizyolojik durumlardan etkilenir. Örneğin MAPK'ın içinde yer alan Extracellular Signal Regulated Kinase (ERK) diye adlandırılan kinazların aktivitesi, bölünme sinyalleri ve stresle aktive hale gelen protein kinazlar, onkogenler ve çeşitli tümör süpresör genlerin ifadelerinin değişiminden etkilenmektedir. Enzimin aktivitesinin değişiminde hücredeki DNA hasarının dışında, cAMP/cGMP, diaçil gliserol-Ca²⁺/Kalmodulin gibi çeşitli ikincil habercilerin oranları da etkilidir. MAPK yolağında görevli olan mitogen-activated protein kinase-kinases (MAPKK) alt ailesinin üyeleri ise serin-treonin kinaz aktivitesinin yanında, tirozin kinaz aktivitesi de gösterebilmektedir. Öte yandan bu MAPK'ların üzerindeki fosfat moleküllerinin koparılması ile aktiviteleri sona ermektedir. Almaç aktivitesinin substratlar ile değişmesi (artması) ya da bu sinyal yolağındaki işlev gören bir proteinin mutasyonu ya da bu kinazlardan fosfat gruplarını uzaklaştıran çeşitli moleküllerin (fosfatazlar gibi.) eksikliği, inhibisyonu bu yolağın aktifleşmesinde rol oynayabilir (8). Protein kinazlar içinde yer alan bir diğer aile olan tirozin kinazlar ise hücrede membran ve sitoplazmik yerleşimli bulunabilir. Membranda bulunan reseptör tirozin kinazlardır; hücre zarında almaç görevi gören özelleşmiş bir seri domain içerirler ve uygun substratlar ile etkileştiklerinde yani aktifleştiklerinde otofosforilasyona uğrayarak konformasyonel değişimler göstermektedir. Reseptör tirozin kinaz ailesi içinde birçok büyüme faktörünü barındırır (EGFR, VEGF, VEGFR, FGFR gibi.). Diğer alt grubu ise sitoplazmik tirozin kinazlar oluşturmaktadır; daha çok lipofilik oldukları için hücre zarından

geçerler ve direkt çekirdekdeki gen transkripsiyonu etkilemek süreti ile hücrede metabolik bir takım yanıt oluşturlar. Örneğin; bir sitoplazmik tirozin kinaz olan Erb-B protein sinyal iletim yolağındaki yaşanan aksaklık, multipl sklerozis başta olmak üzere, Alzheimer hastalığı gibi bir çok nörodejenerasyonla seyirli hastalıkların patofizyolojisinde önemli bir yer tutmaktadır (9). Birçok deneysel çalışma, bu sinyallerin yetersizliğinin hayvanların kalp, akciğer ve beyin gibi hayati önemi haiz olan organlarında anatomik ve fonksiyonel sorunlara sebep olduğunu göstermektedir. Ayrıca artan EGFR sinyallerinin çeşitli karsinogenez süreçlerinde rol aldığı da bilinmektedir (10). VEGF'ler damar endotel hücre proliferasyonunda görevlidir ve birçok kanserde iyi bir metastaz markeri olarak gösterilmektedir (11). RET reseptörü aynı zamanda bir protoonkogendir. Reseptör tirozin kinaz ailesindeki proteinlerin artmış ekspresyonları ya da bu ailedeki mutasyonlar akciğer kanseri içinde prognostik ve prediktif değere sahip oldukları gibi (12). Bazı meme kanseri moleküler alt tiplerinde EGFR ailesinde yer alan c-erbB-2/Her-2 neu sentezi artmaktadır. Bu tip kanserler genellikle agresif yapılıdır, hücre bölünme hızları yüksektir ve hormonal tedaviye yanıt vermezler. Başka bir ifade ile günümüz koşullarında memedeki tümörün patolojik kesin tanısında c-erbB-2/Her-2 neu mutasyonu pozitif ve östrojen reseptörü negatif ise, bu olgulara hormonal tedavi yapmak bir anlam ifade etmeyeceği gibi tedavide erbB-2/Her-2 neu reseptörlerini bloke eden trastuzumab gibi rekombinant teknoloji ile üretilen monoklonal antikorların kullanılması elbette doğru bir yaklaşım olacaktır. EGFR proteinlerin artmış ekspresyonları bazı epitelyal kanserlerin yanında metastatik non-skuamöz küçük hücreli dışı akciğer kanserleri (13), kolorektal kanserler, baş boyun bölgesinin yassı hücreli kanserleri ve pankreas kanserleri ile ilişkilendirilirken, tedavide anti-EGFR monoklonal antikor (cetuximab gibi) ve tirozin kinaz aktivitesini inhibe eden (erlotinib gibi) moleküller tercih edilmektedir (14). Ayrıca yine renal hücre kanserlerinin tedavilerinde (15), gastrointestinal sistemde (GİS) tutulum gösteren mezenşimal kökenli GİS-stromal tümörlerin sağaltımında (16), yine tirozin kinaz aktivitesi gösteren çeşitli sinyal mekanizmalarının inhibisyonu hedeflenmekte ve bu doğrultuda klinikte kullanım bulmuş bir çok kemoterapötik bulunmaktadır

Janus ailesi kinazları (JAK) ve fokal adezyon kinazlar (FAK), sitoplazmik protein kinazların en bilindik üyelerini oluştururlar. Hem hücre içinden hem de dışından gelen sinyaller ile aktivite gösterebilirler. JAK'lar sitokin reseptörleri ile yakından ilişkilidir. JAK proteinine aktive olan sitokin reseptöründen bir sinyal geldiği zaman, otofosforilasyona uğrayarak fosfatlanır ve konformasyonel bir seri değişime uğrayarak aktive olur. Aktif hale gelen JAK proteini artık stoplazmada bulunan "sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü" (STAT) faktörlerini

uyararak DNA'da gen ifadelerini düzenler (17). Bu yolaktaki aksaklıklar diğer kinazlardaki gibi kanserogenez ile yakından ilişkili olduğu gibi, bu yolaktaki çeşitli genlerin susuturulmasının doğrudan immün sistemi etkileyerek çeşitli immün tolerans bozukluklara neden olduğu bildirilmektedir (18). STAT proteinin asıl görevi transkripsiyon faktörüdür. Aktive olmamış bir STAT proteini hücre içinde sürekli hareketli halde bulunur, ilgili sinyaller gelip fosforillenince çekirdeğe transloke olarak, DNA'da spesifik motifine bağlanmak koşulu ile sitokin ekspresyonundan sorumlu olan genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirir (3). STAT proteinlerinin inhibisyonundan ise tirozin fosfatazlar ve sitokin sinyal supresörleri (SOCS) ve STAT aktivasyonunu inhibe eden proteinler (PIAS) sorumludur; tirozin fosfatazlar STAT'lardaki fosfat gruplarını doğrudan uzaklaştırmak koşulu ile onları inhibe ederken diğer grup ise JAK'ların fosfotirozin bağlanma bölgelerine bağlanarak dolaylı yünden STAT'ın fosforile olmasını engellerler (19). Ayrıca PIAS'lar ise DNA'daki spesifik dizilere bağlanmak koşulu ile STAT aktivasyonunu inhibe ederler (20). JAK-STAT yolağındaki aksaklıkların (nokta mutasyonlar gibi.) kan hücrelerinde sitokinlere aşırı duyarlılık (21), polisitemiler, esansiyel trombositoz, akut miyeloid lösemi (22) gibi hematolojik miyeloproliferatif patogenezlerle ilişkili olduğu bildirilmektedir (23).

1.4. Nitrik Oksit Yolağı ve Klinik Önemi

Bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO), pek çok memeli dokusunda bulunan Ca^{+2} -bağımlı/bağımsız NO sentaz (NOS) tarafından L-arginin'in terminal guanidin grubunun NO'e çevrilmesiyle üretilir. Endotel orjinli dilatasyon faktörü (EDRF) olarak da adlandırılan nitrik oksit son orbitalinde eşleşmemiş bir elektrona sahip yüksüz bileşiktir. NO'in bu özelliği onu eşsiz bir hücre içi ve dışı haberci yapar, bu sayede üretildiği hücreden yakınındaki hücelere diffüze olur. NO, plazma zarlarından geçebilecek kadar polar olmayan özelliktedir. Hedef hücrede, guanilil siklazın hem grubuna (demir ve/veya sülfür içeren proteinlere) bağlanarak cGMP üretimini aktifleştirir. Aktif haldeki cGMP; kalpte Ca^{+2} iyonunu sitozolden uzaklaştıran iyon pompası veya pompalarını uyararak kasılmaların şiddetinin azaltılmasına, damar düz kaslarında vazodilatasyona, sinir hücrelerinde (nöronlar) iletişimin sağlanmasına sebep olurken, nörotoksitite ve iltahaplanma gibi bir seri olaylarda da rol oynar (24).

Memelilerde NO sentezleyen üç değişik NOS vardır. Nitrik oksit sentaz enzimleri, nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS- NOS1/ Ca^{+2} -Kalmodulin bağımlı), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS- NOS2/ Ca^{+2} -Kalmodulin bağımsız) ve endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS- NOS3/ Ca^{+2} -Kalmodulin bağımlı) ve olmak üzere üç ana gruba ayrılır. NO anti-aterosklerotik özelliklerinin yanında trombo-

sit kümeleşmesinde, vasküler düz kas hücrelerinin çoğalmasında ve ayrıca damar-sal süperoksit üretiminde rol oynamaktadır (25).

Sinir sisteminde major form olan nNOS tarafından sentez edilen ve merkezi ve periferik sinir sisteminde de haberci madde olarak görev yapan NO, nörokimyasal sistemin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. NO, merkezi sinir sisteminde hafıza oluşumu, sinirsel aktiviteler, serebral kan akımının koordinasyonu ve ağrının hafifletilmesi gibi birçok fizyolojik fonksiyonda rol alır (26). Ayrıca hafıza ve öğrenme fonksiyonu, koku alma ve görme işlemi ile ilgili fonksiyonlarda da rol aldığı tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyondaki NO, nörotoksik bir döngüyü başlatır. Fokal iskemide, inmede, Alzheimer ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklarda, NO'nun N-methyl-D-aspartate (NMDA) reseptörlerini etkileyerek ortaya çıkardığı aşırı miktarda glutamat'ın hücre ölümünde etkili olduğunu gösteren kuvvetli deliller vardır. NMDA'nın aktivasyonu muhtemelen intrasellüler kalsiyumda artışa neden olmakta, bu da glutamat nörotoksitesini başlatmaktadır. NO, bu tür nörotoksitenin dışında, merkezi sinir sisteminde oksijen nörotoksitesini, AIDS demansındaki gibi başka tür nörotoksitelere de kısmen aracılık edebilmektedir (27).

iNOS'dan türetilmiş NO, organizmanın birçok fizyolojik (örneğin, kan basıncı regülasyonu, yara onarımı ve konukça savunma mekanizmaları) ve patofizyolojik (iltihaplanma, enfeksiyon, neoplastik hastalıklar, karaciğer sirozu, diyabet) durumlarında önemli bir rol oynar. iNOS, en sık malign hastalıklarla ilişkili olan sentez izoformudur. Bununla birlikte, tümör gelişimi sırasındaki iNOS'un rolü oldukça karmaşık ve tam olarak anlaşılammıştır. Tümör mikro ortamındaki lokal iNOS konsantrasyonuna bağlı olarak, hem teşvik edici hem de bastırıcı etkiler tarif edilmiştir. Özellikle, malignant transformasyonu, anjiyogenez ve metastaz gibi temel etkiler iNOS ile modüle edilir (28). Diğer yandan, makrofajlardan iNOS aracılığı ile üretilen NO, tümör hücrelerinin dışında bazı parazit ve virus hücreleri üzerinde de potansiyel olarak sitotoksik/sitostatik etkiye sahiptir. NO bu etkilerini, bazı enzimlerdeki duyarlı demir gruplarına bağlanarak, çoğalmayı sağlayan anahtar metabolik yolların blokajına yol açarak ve oksijen ile birleşip, güçlü hücre-sel toksinler olan hidroksil radikali ve antioksidanları ortaya çıkararak gösterir (29).

eNOS tarafından sentezlenen endotel kaynaklı NO, bazal vasküler tonusun önemli bir belirleyicisidir. Bu şekilde sistemik dolaşımı regüle eden NO, kalp, karaciğer, beyin gibi organların lokal dolaşımının düzenlenmesine de katkıda bulunur (30,31). eNOS eksikliği hipertansiyona sebep olur. Bu ilişki deneysel çalışmalarda ispatlanmıştır; gerek NOS inhibitörlerinin kullanıldığı, gerekse eNOS genlerinin susturulduğu deneysel çalışmalarda, ratlarda hipertansiyon gelişimi gözlenilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda, kronik böbrek yetmezliklerinde

dimetilarginin'in plazma konsantrasyonlarının arttığı, bunun NOS'in aktivasyonunu inhibe ederek hipertansiyona neden olduğu tespit edilmiştir (32). Endotel kaynaklı NO'nin damar bütünlüğünün korunması, lökositlerin endotel hücrelerine yapışmasının ve düz kas hücre proliferasyonunun önlenmesi gibi etkilerinin yanında trombosit adezyonu ve agregasyonunu inhibe etme etkileri de vardır. Bu yüzden kardiyovasküler hemostazda, kritik rolü olan endotel kaynaklı NO'nun aterogenezi inhibe ettiği söylenebilir. NO'nun etkisini, Endotelin-1 (ET-1), anjiotensin-II ve tromboksan gibi damar daraltıcılar üzerinden veya prostasiklin ve hidrojen peroksidaz gibi gevşetici etkenlerin salınımı üzerinden gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Başka bir deyişle NO, damar endotelinde yeteri kadar damar daraltıcı ve gevşeticilerin salınmasını dengeleyerek damarsal gerginlik homeostazinin korunmasında önemli bir rol üstlenmektedir. Hipertansiyon, kalp ve böbrek yetmezliği, hiperlipidemi, sigara içme ve diyabet gibi ateroskleroza zemin hazırlayan çeşitli kronik faktörlerin tümü, anormal endotel fonksiyonları ve aktif NO seviyelerinde azalma ve (ET-1) ve süperoksid seviyelerinde aşırı artma ile birlikte seyretmektedir (33). Bu patolojiler, molekülün gerçek eksikliği ile ya da NO'nin oksijen türevi radikallerle reaksiyona girerek inaktive olması ile açıklanabilmektedir.

Yapılan çeşitli araştırma sonuçlarına göre, NO'nin serebral iskemide dual bir rolü olduğu anlaşılmaktadır. eNOS enzimi tarafından iskeminin akut fazında salınan NO, serebral kan akımının devamlılığını sağlamaya yönelik koruyucu bir rol oynarken, Yine hemen hemen aynı dönemde salınan nNOS kaynaklı NO ve saatler sonra salınan iNOS kaynaklı NO ise nörotoksik etki göstermektedir (34).

NO'nin en iyi bilinen biyolojik hedefleri arasında; oksijen geçiş metalleri, demir sülfür içeren proteinler ve hem içeren proteinlerle etkileşimi yer almaktadır. NO, yapısında bu maddeleri ihtiva eden enzimlerle reaksiyona girerek, mitokondriyal solunumu inhibe edip hücre içi enerji üretimini bozarak hücre ölümüne yol açtığı düşünülmektedir. Ayrıca lupus, romatoid artrit, osteoartrit gibi vaskülit ve romatizmal çeşitli otoimmün bozukluklarda, septik şok, reperfüzyon hasarı, gastroözofageal reflü, ülseratif kolit, diabetes mellitus, graft versus host reaksiyonu ve allograft rejeksiyon gibi çeşitli hastalıklarda NO aktivitesinin arttığı bildirilmektedir (35). Öte yandan iskemik hasar, hipertansiyon, ateroskleroz ve vaskülopatiler, akalazyaya, doğuştan pilor stenozu ve Hirschsprung gibi patolojilerde ise NO aktivitesinin azaldığı raporlanmıştır (36).

SONUÇ

Sonuç olarak her geçen gün sinyal iletim yollarında rolü olan yeni bir protein gün yüzüne çıkmakta ve yeni fonksiyonlarda tanımlanmaktadır. Gelecekte bu yollardaki mekanizmaların aydınlatılması ile geliştirilecek moleküller, genetik

ve epigenetik süreçlerin de etkili olduğu kanser başta olmak üzere diğer birçok ölümcül hastalığın tanı ve tedavisinde umut verici olabilir.

KAYNAKÇA

1. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Strayer, L. (2014). Biyokimya. (Adil Denizli & Ayşe Kevser Özden, Çev. Ed.). Ankara: Palme Yayıncılık
2. David, L. N. & Michael, M. C. (2013). Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. (Y. Murat Elçin, Çev. Ed.). Ankara: Palme Yayıncılık
3. Turanlıgil-Sümer NC, Uyanıklıgil Y, Cellular Signaling Pathways and Their Clinical Reflections. Archives Medical Review Journal. 2010;19:180-191.
4. Kierszenbaum A. L. (2007). Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology. (Second edit). Canada: Elsevier
5. Filippakopoulos P, Mülser S, Knapp S, SH2 domains: Modulators of nonreceptor tyrosine kinase activity. Current Opinion in Structural Biology. 2009;19:643-649.
6. Chong ZZ, Maiese K, The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury. Histology and Histopathology. 2007;22: 1251-1267.
7. Lappalainen I, Thusberg J, Shen B, et al. Genome wide analysis of pathogenic SH2 domain mutations. Proteins. 2007;72:779-792.
8. Vlahopoulos S, Zoumpourlis VC, JNK: a key modulator of intracellular signaling. Biochemistry (Mosc). 2004;69:844-854.
9. Bublil EM., Yarden Y, The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. Curr Opin Cell Biol. 2007: 19:124-134.
10. Cho HS, Leahy DJ, Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. Science. 2002;297:1330-1333.
11. Robinson CJ, Stringer SE, The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. J Cell Sci.2001;114:853-865.
12. Hirsch FR, Scagliotti GV, Langer CJ, et al. Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: perspectives for targeted therapies. Lung Cancer. 2003;41:29-42.
13. Sordella R, Bell DW, Haber DA, et al. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. Science. 2004;305:1163-1167.
14. Van den Eynde M, Baurain JF, Mazzeo F. et al. Epidermal growth factor receptor targeted therapies for solid tumours. Acta Clin Belg. 2011;66:10-17.
15. Sulkes A, Novel multitargeted anticancer oral therapies: sunitinib and sorafenib as a paradigm. Isr Med Assoc J. 2010;12:628-632.
16. Demetri GD, Wang Y, Wehrle E, et al. Imatinib plasma levels are correlated with clinical benefit in patients with unresectable/metastatic gastrointestinal stromal tumors. J Clin Oncol. 2009;27:3141-3147.
17. Rodig SJ, Meraz MA, White JM, et al. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. Cell. 1999;93:373-383.
18. Biggins JB, Koh JT, Chemical biology of steroid and nuclear hormone receptors. Curr Opin Cell Biol. 2007;11:99-110.
19. Russell RB, Breed J, Barton GJ, Conservation analysis and structure prediction of the SH2 family of phosphotyrosine binding domains. FEBS Lett. 1992;304:15-20.
20. Shuai K, Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. Cell Research. 2006;16:196-202.
21. Kozan S, Güran Ş, Bahçe M, et al. Kronik miyeloproliferatif hastalık ve miyelodisplastik sendrom olgularında Jak2 V617F mutasyonu. Gülhane Tıp Dergisi. 2009;51:137-140.
22. Benekli M, Xia Z, Donohue KA, et al. Constitutive activity of signal transducer and activator of transcription 3 protein in acute myeloid leukemia blasts is associated with short disease-free survival. Blood. 2002;99:252-257.

23. Lai SY, Johnson FM, Defining the role of the JAK-STAT pathway in head and neck and thoracic malignancies: implications for future therapeutic approaches. *Drug Resist Updat.* 2010;13:67-78.
24. Snyder SA. Nitric oxide: First in A New Class of Neurotransmitters. *Science.* 1992;257:494-496.
25. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, et al. Apparent Hydroxyl Radical production by Peroxynitrite; İmplications for Endothelial Injury from Nitric Oxide and Superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1990;87:1620-1624.
26. Garthwaite J, Boulton CL, Nitric Oxide Signalling in the Central Nervous System. *Annual Review of Physiology.* 1999;57:683- 706.
27. Meldrum B, Garthwaite J, Excitatory Amino Acid Neurotoxicity and Neurodegenerative Disease. *Trends in Pharmacological Sciences.* 1990;11:379-387.
28. Lechner M, Lirk P, Rieder J, Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin Cancer Biol.* 2005;15:277-289.
29. Keller R, The Macrophage Response to Infectious Agents; Mechanism of Macrophage Activation and Tumour Cell Killing. *Research in Immunology.* 1993;144:271-273.
30. Loscalzo J, Welch G, Nitric oxide and its Role in the Cardiovascular System. *Progress in Cardiovascular Diseases.* 2005;38:87-104.
31. Luizon MR, Pereira DA, Tanus-Santos JE, Pharmacogenetic relevance of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and gene interactions. *Pharmacogenomics.* 2018;19:1423-1435.
32. Leone A, Moncada S, Vallance P, et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 1992;339:572-575.
33. Resch H, Garhofer G, Fuchsjäger-Maryl G, et al. Endothelial dysfunction in glaucoma. *Acta Ophthalmol.* 2009;87:4-12.
34. Castillo J, Rama R, Davalos A. Nitric Oxide-Related Brain Damage in Acute Ischemic Stroke. *Stroke.* 2000;31:852-857.
35. Sarela AI, Mathie RT, The Role of Nitric Oxide in Surgical Practice. *Surgery.* 1996;14:154-156.
36. Kuyumcu A, Düzgün AP, Özmen MM, et al. Travma ve Enfeksiyonda Nitrik Oksidin Rolü. *Ulusal Travma Dergisi.* 2004;10:149 -159.

Bölüm 4

BİYOBELİRTEÇ OLARAK SuPAR

Huriye ERBAK YILMAZ¹
Saliha AKSUN²

GİRİŞ

Soluble ürokinaz plazminojen aktivatör reseptörü (SuPAR), ilk olarak 1990'lar-
da, kanserin ilerleyişinin ve enfeksiyöz hastalıkların bir biyobelirteci olarak ta-
rif edilmiş ve o zamandan beri, SuPAR klinik, tanısal, prognostik amaçlı farklı
hastalıklarda çalışılmıştır [1]. SuPAR, glikozil-fosfatidilinositol bağlı membran
proteini olan ürokinaz tipi plazminojen aktivatör reseptörünün (uPAR) çözünür
şeklidir. Membrana bağlı form olarak uPAR, monositler, aktive edilmiş T-lenfo-
sitler, endotel hücreleri, keratinositler, makrofajlar, düz kas hücreleri, fibroblastlar
ve megakaryositler, dahil olmak üzere çeşitli hücrelerde bulunur, membrana bağlı
olan uPAR'ın salınmasıyla ortaya çıkan çözünebilir form olan SuPAR plazma, id-
rar, kan, serum, beyin omurilik sıvısında immün sistemin aktivasyon derecesine
göre farklı konsantrasyonlarda saptanır [2]. Ürokinaz plazminojen aktivatör reseptörü
(uPAR) ürokinaz plazminojen aktivatörünün (uPA) reseptörüdür. uPA
ve doku plazminojen aktivatörü (tPA) plazminojenin plazmine dönüşümünde ve
böylelikle fibrinoliziste rol almaktadır. Koagülasyonda özellikle tPA, önemli bir
role sahip iken, uPA'nın ayrıca hücre göçünü, adezyonunu ve çoğalmasını düzen-
lediği ve çeşitli enflamatuvar ve immün yanıtlarda görev aldığı görülmüştür [3].
UPA'nın etkisi; endotelde, aktif T hücrelerde, nötrofil ve makrofajlarda ekspres-
edilen reseptörü olan uPAR'a bağlanarak ortaya çıkar. Enflamasyon sonucu ar-
tan kemotripsin, fosfolipaz C ve uPA gibi proteazlar hücre yüzeyinde dolaşıma
uPAR salınmasına ve çözünebilir form olan SuPAR oluşumuna neden olurlar
[4]. Enflamatuvar hücrelerin yüzeyinden proteolizisle sıyrılıp dolaşıma katılan
SuPAR ise kemotaktik özelliği ile monosit, nötrofil gibi enflamatuvar hücrelerin
toplanmasını ve hematopoetik kök hücrelerin mobilizasyonunu kolaylaştırır [5].
Böylelikle dolaşımdaki SuPAR hem enflamatuvar hücreler hem de inflamasyon
sırasında oluşan proteazların seviyesi hakkında bilgi verebilir. Artmış SuPAR se-

¹ Uzman Dr. Huriye Erbak Yılmaz İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratu-
varı ,huriyeerbak@hotmail.com,

² Dr. Öğretim Üyesi Saliha Aksun İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, salihaak-
sun@yahoo.com

viyeleri, immün ve enflamatuvar olaylarda aktivasyon belirteci olarak kabul edilir. Enflamatuvar yanıtın derecesini yansıtır ve çeşitli hastalıklarda prognostik değere sahiptir [6]. Plazma SuPAR seviyesi immün aktivasyonunu yansıtmaktadır ve HIV enfeksiyonu, aktif tüberküloz, Streptococcus pneumonia bakteriyemisi, malaraya, sepsis, bakteriyel ve viral santral sinir sistemi enfeksiyonunda artar. Ayrıca paroksizmal nokturnal hemoglobinüri, çeşitli solid tümörler ve bazı otoimmün hastalıklarda artar. Bunlara ek olarak SuPAR seviyelerinin yüksekliği, artmış inflamasyon, hastalığın prognozu ve mortalite ile ilişkilidir [2]. SuPAR'ın 24 saatte 20 dakika aralıklarla ölçüm yapılarak sirkadien ritmi incelendiğinde sonuçlar stabil bulunmuştur. SuPAR konsantrasyonları yaş ile pozitif korelasyon göstermektedir [7]. SuPAR seviyeleri kadınlarda erkeklere göre hafif yüksek bulunmuştur [8].

SUPAR MOLEKÜLÜ YAPISI

Ürokinaz plazminojen aktivötörü reseptörü (uPAR) DI, DII, DIII domainlerinden oluşmuş bir reseptördür.

Hücre membranına bağlı glikozil fosfatidilinositol molekülü ve bu moleküle tutturulmuş Domain III arasından kesilerek SuPAR molekülü serbestleştirilir.

UPAR geni 19q13.2 kromozomunda kodlanır ve 7 ekzon 6 intron içerir [2, 9]. Bu gen 313 amino asitlik DI, DII, DIII (1–92, 93–191 ve 192–282 amino asitler) kısımlarından oluşan polipeptit dizisini oluşturur [9]. Posttranslasyonel modifikasyon ile yaklaşık 30 aminoasit kalıntısı yok edilir ve glikozil fosfatidilinositol bağı 283.aminoasit olan glisin C-terminal ucuna eklenir. İnsan uPAR/SuPAR molekülü moleküler ağırlığına etki eden beş adet N glikozilasyon bölgesi içerir. DI ile DII ve DIII arasındaki bağlanma bölgeleri preteazlara hassastır ve SuPAR'ın moleküler düzenlemesi için önemlidir [2].

SUPAR MOLEKÜLÜNÜN DÜZENLENME MEKANİZMASI

UPAR ekspresyonu, transkripsiyonel düzeyde sitokinler ve hormonlar tarafından yüksek oranda düzenlenirken, hücresel uPAR protein seviyeleri, mRNA seviyeleri ile sıkı bir korelasyon göstermez

UPAR'ın bölünmesi, proteinin GPI bağlantı bölümünde değil, aynı zamanda gerçek reseptör içinde de gerçekleşir. DI ve DII-III'ü birbirine bağlayan bağlayıcı bölge, uPAR'ın ligandı olan (uPA), plazmin, kimotripsin, çeşitli metalloproteinazlar (MMP'ler) ve elastazlar gibi birkaç farklı proteazla parçalanabilir [2]. uPA uPAR'a bağlandığında plazminojenin plazmine dönüşmesini katalize eder ve sonrasında çeşitli matriks metalloproteinazlarının (MMP'lerin) aktivasyonuna

katılır [10]. Çalışmalar uPAR üzerine kuruludur ancak SuPAR aynı genel yapıyı paylaştığından, bu proteazların SuPAR'ı da parçalayacağı düşünülmektedir

Ayrıca, uPA, uPAR'a bağlandığında plazminojenin plazmine dönüşmesini katalize eder ve plazmin, çeşitli matris metalloproteinazlarının (MMP'lerin) aktivasyonuna katılır [10]. Bu MMP'lerden biri insan makrofaj elastazı (MMP 12)'dir. MMP-12 ve diğer MMP'lerin bağlayıcı bölgede bulunan Thr86'da uPAR'ı doğrudan ve verimli bir şekilde parçaladığı gösterilmiştir [7]. Andersen ve ark, MMP'in uPAR'ı bölmesiyle uPAR'ın kemotaktik epitoplarının ortaya çıktığını göstermiştir [7]. MMP-12 genellikle lökositlerle ilişkili elastaz gruplarından biridir ve çözülmeyen elastinleri çözünür peptidlere indirgeme kapasitesine sahip enzimler olarak tanımlanır [11]. Ayrıca kathepsin G ve elastaz, bağlayıcı bölgedeki uPAR'ı parçalarken, buna ek olarak, bir kimotripsin benzeri katalitik aktiviteye sahip olan kathepsin G, DIII'ün C ucunu parçalamada son derecede etkilidir [11].

HÜCRE MİGRASYONUNDA SUPAR'IN ROLÜ

Dokulara hücre göçü; enflamasyon, enfeksiyona karşı immün yanıt, kanser invazyonu ve hasardan sonra dokunun yeniden biçimlendirilmesinde önemli bir bileşendir. uPAR/uPA sistemi, migrasyon ve kemotaksis ve adezyon mekanizmalarıyla doğrudan ilişkilidir. Yapılan bir çalışmada uPA-/- fareler T lenfosit, monosit makrofajın yetersiz göçü nedeniyle *Cryptococcus neoformans* enfeksiyonuna yenik düşmektedir [12]. uPAR geninden yoksun farelerde, pulmoner nötrofil alımında azalma ve uPAR geni bakımından wild tip farelere kıyasla *S. pneumoniae* enfeksiyonunda mortalite artışı gösterilmiştir [13].

uPAR, plazma zarında integrinler ve EGFR de dahil olmak üzere birçok trans-membran reseptörü ile ilişkilidir. May ve arkadaşları uPAR nakavt farelerindeki çalışmada, monositlerin tutunma ve göçünün uPAR ve integrinler arasındaki işlevsel bir etkileşimi içerdiğini göstermiştir [14]. uPAR'ın integrinlerin aktivasyon durumunu, yapışkan özelliklerini ve sinyal kapasitesini değiştirerek, fibrinojen, kollajen ve vitronektin ile integrin aracılığındaki yapışmaları etkilediği çalışmalarla desteklenmiştir

uPAR integrinlerin ve EGFR'nin aktivitesini düzenleyerek hücre büyümesini kontrol eden hücre dışı sinyallerin kontrolüne katılır.

uPA/uPAR kompleksi birçok yolağı aktive edebilir. Birçok hücre tipinde uPA, uPAR'a bağlandığında fokal adezyon kinazı (FAK) ve ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK) gibi protein tirozin kinazları aktive eder.

SUPAR'IN KLİNİK KULLANIMI

Çözünür ürokinaz plazminojen aktivatör reseptörü (SuPAR), enflamasyon ve immün aktivasyonun bir biyolojik belirteci olarak tanımlanmıştır. SuPAR konsantrasyonlarının artışı, çeşitli hasta popülasyonlarında hastalık şiddeti, mortalite ile ilişkilendirilmiştir.

SEPSİS VE ENFEKSİYOZ HASTALIKLAR

Çeşitli infeksiyonların immün sistemi aktive etmesi yüksek SuPAR düzeylerine yol açar. Bu nedenle, serum SuPAR düzeylerinin immün aktivasyonun derecesini yansıttığı düşünülmektedir [6]. Bu özellikleri nedeniyle literatürde özellikle yoğun bakım hastalarında SuPAR düzeyi ile ilişkili yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Koch ve arkadaşlarının yaptığı 197 sepsisli ve 76 sepsis olmayan 273 yoğun bakım hastasının yer aldığı bir çalışmada yoğun bakım hastalarında sağlıklılara göre SuPAR düzeyleri oldukça yüksek bulunmuş aynı zamanda sepsis olmayan ve sepsis hastaları arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). Bu çalışmada rutin kullanımda olan CRP ve prokalsitoninin (PCT), sepsis hastalarında tanısal değeri SuPAR'a göre daha iyi olarak bildirilmiştir [15]. Organ disfonksiyonu olanlarda bu belirteçlerin karşılaştırılmasında ise SuPAR en yüksek prognostik değere sahip belirteç olarak bulunmuştur [15]. Başka bir çalışmada 132 SIRS hastası incelenmiş olup, kültürde üreme gösterilen hastalar ile diğerlerinin PCT, CRP, SuPAR değerleri karşılaştırılmış ve SuPAR seviyeleri kültürde üreme olan hastalarda üreme olmayan SIRS hastalarına göre anlamlı yüksek bulunmuş olmakla birlikte bakteriyel üremeyi göstermede CRP ve PCT'ye üstünlüğü görülememiştir. Yani SuPAR'ın sepsisteki tanısal gücü rutin enflamasyon parametrelerine benzese de onlarla yarışmamaktadır, fakat prognostik gücü tanısal gücüne göre çok daha iyidir. [16].

Seppala ve arkadaşları acil servise başvurmuş ve enfeksiyon şüphesi olan 539 hastada yaptıkları prospektif kohort çalışmasında SuPAR'ın mortaliteyi öngörmedeki başarısını incelemeyi hedeflemişlerdir. Bakteriyel enfeksiyon, SIRS ve sepsise bağlı organ hasarı bulunmasına göre gruplandırma yapılmış ve organ hasarı olan sepsis grubunda SuPAR düzeyini, sadece bakteriyel enfeksiyon, sadece SIRS ya da organ hasarı olmaksızın sepsis olan gruba göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Çalışmada PCT'nin sepsis tanısında en başarılı belirteç olmasına rağmen mortaliteyi öngörmede SuPAR'ın PCT'den daha üstün olduğunu bildirmişlerdir [17].

Bakteriyemik 132 hastayla yapılan bir çalışmada da yüksek SuPAR seviyeleri, mortalite için bağımsız risk faktörü olarak belirlenmiştir. Bakteriyel hastalığın erken safhasında SuPAR ölçümünün klinisyenler için tedaviyi planlamada yol gösterici olabileceği sonucuna varılmıştır [18].

Sepsiste SuPAR, CRP ve PCT ile karşılaştırıldığında sepsis tanısında prokalsitoninden daha kısıtlı tanısal değere sahip olsa da, prognozu belirlemek açısından prokalsitonine göre daha iyi olarak saptanmıştır [6].

HIV (human immunodeficiency virus) enfeksiyonu olan hastalarda ve akciğer tüberkülozunda, artmış SuPAR seviyelerinin sağ kalımı azalttığı belirtilmiştir [19]. Aktif pulmoner tüberküloz tedavisinin başlangıç dönemlerinde SuPAR düzeylerinin yüksekliğinin mortalite riskini arttırdığı gösterilmiştir [20].

KARDİOPULMONER HASTALIKLAR

Astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) oldukça yaygın hastalıklardan olsa da, hastalığın ciddiyetini değerlendirmek ve tekrarlayan alevlenmelere yatkın hastaları tahmin etmek için güvenilir bir enflamatuvar biyobelirteç bulunmamaktadır. KOAH, solunum yolu enflamasyonu ve doku yeniden şekillenmesi ile karakterizedir. Balgamdaki suPAR düzeylerinin KOAH'lı hastalarda arttığı göz önüne alınarak, serum suPAR'ın KOAH şiddeti ile korelasyonunun değerlendirildiği bir çalışmada plazmin-plazminojen sisteminin lokal inflamasyonda rol oynadığı ancak hastalık durumunun bu çalışmada serum suPAR düzeylerince yansıtılmadığı bulunmuştur[21]. Diğer taraftan, akut KOAH alevlenmesi olan hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada başvuruda ölçülen ve 7 gün sonra ölçülen suPAR seviyelerinin, akut alevlenme ile korele olduğu gösterilmiştir. SuPAR düzeyleri 7 gün sonra tedaviyle azalmış, ancak yine de sağlıklı bireylerden daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca suPAR'ın akut KOAH alevlenmesinde fibrinojen ve CRP ile karşılaştırıldığında onlara göre daha üstün bir belirleyici olabileceği belirtilmiştir [22].

Kardiyovasküler hastalıklarda SuPAR prognostik özelliklere sahiptir. Kardiyak semptomları olan hastalarda plazma ve aterosklerotik plaktaki SuPAR seviyeleri daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca plaktaki SuPAR düzeyindeki artışın plağın yırtılma eğilimini artırdığı saptanmıştır [23]. ST yüksekliği olan miyokard enfarktüsünde SuPAR'ın, mortalite ve tekrarlayan miyokard enfarktüsü için oldukça stabil bir plazma belirteci olduğu gösterilmiştir [24]. Periferik arter hastalığı olan hastalarla, sadece koroner arter hastalığı olan hastalar karşılaştırıldığında periferik arter hastalığı olanların daha yüksek suPAR seviyelerine sahip oldukları bulunmuştur. Ayrıca, suPAR seviyeleri hem periferik arter hastalığı hem de koroner arter hastalığı olanlarda en yüksek saptanmıştır. SuPAR'ın prognostik değerine uygun olarak, yüksek suPAR düzeyleri daha yüksek ölüm oranlarıyla ilişkilendirilmiştir[25].

GASTROENTEROLOJİK HASTALIKLAR

Akut pankreatit (AP) geniş bir hastalık şiddeti spektrumuna sahip enflamatuvar bir süreçtir. Akut pankreatit hastanede yatış gerektiren sık görülen gastrointestinal hastalıklardan biridir ve AP'li hastaların %15-%20'sinde çoklu organ yetmezliği ve ölüm gibi ciddi komplikasyonlar gelişebilmektedir [26]. Bu nedenle, pankreatitin erken teşhisi ve şiddetini belirlemek erken tıbbi müdahale için çok önemlidir. SuPAR'ın AP şiddetini göstermedeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 4.75 ng/mL'lik bir suPAR cut-off değerinin, şiddetli AP ile hafif / orta AP ayırımını %93 ve duyarlılık ve özgüllük ile yapabildiği saptanmıştır. SuPAR, akut pankreatit prognostik skorlama sistemi olan BISAP (Basic Index of Severity in Acute Pancreatitis) ile karşılaştırıldığında daha iyi hassasiyet ve özgüllük göstermiştir. Ayrıca, suPAR, mortaliteyi öngörmede BISAP'tan daha üstündür [27]. Serum suPAR seviyeleri akut karaciğer yetmezliğinde çalışılmış ve yükseldiği gösterilmiştir. SuPAR düzeyleri, serum aspartat ve alanin aminotransferaz aktiviteleri ile korele bulunmuştur[28].

Kronik karaciğer hastalıklarının tanısında, siroza gidişin tespitinde ve prognozun tahmininde önemli bir belirteçdir. Sirozun dekompanse döneminde SuPAR düzeyleri daha yüksek tespit edilmiştir. Ayrıca SuPAR seviyesi yüksek saptanan hastaların, ölüm oranı ve transplantasyon ihtiyacının daha fazla olduğu tespit edilmiştir [29].

NEFROLOJİK HASTALIKLAR

Yüksek SuPAR düzeylerinin potansiyel patojenik role sahip olduğu, SuPAR'ın fokal segmental glomerüloskleroz gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. SuPAR, normal şartlarda glomerüle girip $\beta 3$ integrinle etkileşir. SuPAR seviyelerinin yüksek olması durumunda $\beta 3$ integrin aktivasyonu artar ve integrinlerin aşırı aktivasyonu ile podositler glomerül bazal membrana sınımsız bağlanarak, podosit disfonksiyonu ve devamında proteinüri oluşumuna neden olur. Fokal segmental glomerülosklerozda bu kaskad önemli rol oynamaktadır [30]. Bu nedenle SuPAR'ın, enflamatuvar hastalıklarda tedavide bir hedef olabileceği düşünülmektedir. Podosit hasarının bir biyobelirteci olan SuPAR, çeşitli böbrek hastalıklarının patogeneğinde rol oynamaktadır. Podositler üzerinde $\alpha\beta 3$ integrinleri aktive ederek, podosit hareketliliğini değiştirip, podosit fonksiyonlarını etkiler. Tüm bu veriler suPAR'ın kronik böbrek hastalıkları (KBH), fokal segmental glomerüloskleroz (FSGS) ve diyabetik nefropati (DN) dahil olmak üzere farklı patolojilerin gelişiminde rol oynadığı belirtilen bir mekanizmayı desteklemektedir[1]. Dolaşımdaki suPAR seviyelerinin, iki büyük kohort çalışmasında FSGS'li hastalarda yükseldiği bulunmuştur[31]. Ayrıca plazma suPAR konsantrasyonlarının plaz-

maferez yoluyla düşürülmesinin, podosit β 3-integrin aktivasyonunu azalttığı ve FSGS'nin rekürrensini azalttığı belirtilmiştir[32] Ayrıca, transplantasyon öncesi yüksek suPAR seviyelerinin, nakil sonrası FSGS'nin tekrar oluşması riskiyle korele olduğu gösterilmiştir[33]. Bu nedenle, suPAR, FSGS'de önemli bir biyokimyasal faktördür.

2003 ve 2009 yılları arasında kardiyak kateterizasyon geçirmiş 3683 hastanın katıldığı prospektif kohort çalışmasında SuPAR seviyelerinin GFR düşmeden renal hasarı öngörmedeki rolünü araştırmışlardır. GFR'si ölçülmüş, 60 mL/dk üstündeki 2292 hastanın SuPAR değerleri ölçülmüş ve bu hastalar SuPAR seviyelerine göre 4 gruba ayrılmışlardır. Bu grupların GFR hızlarındaki azalma takip edilmiş ve SuPAR seviyesi yüksek olan hastalarda ilerleyen zamanlarda hızlı bir GFR düşüşü saptanmıştır. Yani artmış plazma SuPAR düzeyleri, GFR'de bir düşüş olmadan önce hem beyazlarda hem de siyahlarda kronik böbrek hastalığının gelişimiyle bağımsız olarak ilişkili bulunmuştur. Buna ek olarak, aynı çalışmada plazma SuPAR düzeylerinin hastalığın prognozu hakkında da bilgi vermesi, hastalık başlangıcında hastalığın şiddetini sınıflandırmaya izin verebilir şeklinde yorumlanmıştır [34].

DERMATOLOJİK VE ROMATOLOJİK HASTALIKLAR

Çeşitli romatolojik hastalıklarda da SuPAR düzeyi çalışılmıştır. Bunların arasında en sık incelenenler SLE, romatoid artrit bunları Behçet hastalığı, sistemik skleroz ve ankilozan spondilit izlemiştir. Vasarhelyi'nin romatolojik hastalıklarda SuPAR düzeyleriyle ilgili olarak oluşturduğu derlemede SuPAR düzeyleri sağlıklı grupta 2.80 ng/ml (2.06-3.42), 120 Romatoid Artrit hastasında 4.24 ng/ml (3.19-5.40), 33 Ankilozan Spondilit hastasında 2.97 ng/ml (2.57-3.80), 89 Sistemik Lupus Eritamosus hastasında 4.58 ng/ml (3.72-6.30), 83 sistemik skleroz hastasında 4.02 ng/ml (3.19-5.53) ng/ml olarak verilmiştir. SLE ve sistemik skleroz grubu ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmuştur. Sistemik sklerozlu hastalarda sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı şekilde daha yüksek plazma SuPAR konsantrasyonları bildirilmiştir. Ayrıca SuPAR'ın plazma seviyeleri, diffüz kutanöz sistemik sklerozlu hastalarda, sınırlı kutanöz sistemik sklerozlu hastalardan daha yüksek olarak bildirilmiştir [35].

Romatoid artrit (RA) eklem hassasiyeti, eklem şişmesi ve sinovyal dokunun tahrip edilmesiyle devam eden kronik enflamasyon durumudur. Romatoid artrit (RA) hastalarının sinovyal dokusunda artmış bir uPA aktivitesi ve uPAR ekspresyonu gösterilmiştir. En yüksek plazma SuPAR konsantrasyonları çok sayıda nötrofil bulunduran enflamatuvar eksüdalarda bildirilmiştir. Periferik kan nötrofilleri ile karşılaştırıldığında, RA hastalarında sinovyal sıvıda bulunan nötrofiller tara-

findan önemli ölçüde daha fazla SuPAR salındığı tespit edilmiştir [36]. RA hasta grubunda SuPAR ve CRP seviyeleri arasında korelasyon izlenmiştir [37].

Sistemik lupus eritematosus (SLE), alevlenmeler ve remisyon dönemleri ile karakterize edilen sistemik bir romatizmal hastalıktır. SLE hastası 198 kişinin ve 100 sağlıklı kişinin katıldığı geniş çaplı bir çalışmada hasta ve kontrol grubu arasında SuPAR düzeyleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada hasta ve kontrol grubu arasında fark sınırdan anlamlı olarak tespit edilmiştir ($p=0.05$), Organ hasarı puanlaması Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ACR damage index (SDI) ile yapılmış olup SuPAR seviyeleri ile arasında anlamlı ilişki saptanmıştır [38]. Hastalardan IL-10, IL-6, IL-1 ve TNF düzeyleriyle CRP, ESH, kreatinin düzeyleri de çalışılmış ve SuPAR ile arasındaki ilişki incelenmiş ve IL-6 dışındaki diğer parametrelerle anlamlı ilişki tespit edilmiştir. SuPAR seviyelerinin organ hasarını yansıtması nedeniyle umut verici bir biyolojik belirteç olabileceğini belirtmişlerdir. [38]. SLE hastalarının %60'ında gözlenen lupus nefriti, son dönem böbrek yetmezliğine neden olabilir. Renal biyopsi ile kanıtlanmış lupus nefriti tanısı almış olan 202 hastanın takip edildiği bir kohort çalışmasında nefritik grubun ve nonrenal tutulum SLE grubunun plazma SuPAR düzeyleri ölçülmüş ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırılmıştır. Akut böbrek yetmezliği, nefrotik sendrom, noninfekseyöz lökositüriler, lupus açısından yüksek aktivite skorları olan hastalarda plazma SuPAR seviyeleri yüksek bulunmuş olup, ek olarak, yarı kantitatif bir skorlama sistemiyle yapılmış olan lupus nefriti histolojik özellik puanları ile plazma SuPAR seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir. SuPAR'ın plazma konsantrasyonu, remisyon evresindeki hasta gruplarında anlamlı şekilde azalmış olup plazma SuPAR seviyesi, uzun vadeli renal sonuçlar için bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır [39]. Ayrıca, lupus nefritli çocuklarda, dolaşımdaki SuPAR miktarının artması hem multiorgan tutulumu, hem de hastalık şiddetini yansıtan sistemik enflamasyonu işaret etmektedir [40].

Lupus nefritinde SuPAR konsantrasyonunun yüksekliği, büyüme faktörleri ve sitokinlerin (IL-1b ve TNF α) artışının uPAR ekspresyonunu arttırmasıyla ilişkilendirilebilir [41, 42]. Erken başlangıçlı lupus nefritinde, böbreklerde plazminojen aktivatör inhibitörü-1 ekspresyonu belirgin artış gösterir böylece, uPA'nın lizozomal parçalanması artar ve uPAR'ın plazmaya geri dönüşümü artar [43].

Ankilozan spondilit (AS), sakroiliak ve özellikle aksial eklemlerin etkilendiği enflamatuar eklem hastalığıdır. 33 AS hastası ve 29 kontrol ile yapılan bir çalışmada plazma SuPAR düzeyleriyle sağlıklı kontroller arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Ayrıca, Bath Ankylosing Spondilit Hastalık Aktivitesi İndeksi (BASDAI) puanları, plazma SuPAR düzeyleri ile anlamlı bir korelasyon göstermemiştir [44]. Dolayısıyla, diğer enflamatuar bozuklukların aksine, AS'deki devam eden

enflamasyon muhtemelen daha lokal olması nedeniyle yüksek plazma SuPAR konsantrasyonları ile yansıtılmamıştır.

Behçet hastalığı immünolojik mekanizmalar tarafından tetiklenen, kronik sistemik bir vaskülitir. Behçet hastalığı olan 30 kişi ve 41 sağlıklı kişiyle Kurtipek ve arkadaşlarının yaptığı küçük bir araştırmada, plazma SuPAR düzeyleri hastalarda sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, plazma SuPAR konsantrasyonu ile hastalık aktivitesi arasında hiçbir korelasyon gözlenmemiştir [45]. Bunu, SuPAR seviyelerinin aşırı yüksekliğinin sepsis, sistemik enflamatuvar yanıt sendromu (SIRS), bakteriyemi gibi daha ciddi durumlarda daha fazla yükselmesi ve Behçet hastalığı tedavisinde kullanılan kolşisisinin, plazma SuPAR düzeylerine etkisinin bilinmemesiyle açıklanmıştır [45].

Psoriasis, ABD'deki popülasyonun yaklaşık% 3'ünü etkileyen, immün aracılı dermatolojik bir hastalıktır. SuPAR psoriasisli hastaların dermisinde oldukça belirgindir, ancak serum seviyeleri hastalık şiddeti ile korele bulunmamıştır [46].

HEMATOONKOLOJİK HASTALIKLAR

SuPAR seviyeleri ayrıca hücre göçü ve anjiyojenezdeki rolü nedeniyle çeşitli solid ve likit tümörlerde araştırılmıştır. Akut miyeloid lösemili (AML) 30 hastanın suPAR seviyelerini araştıran bir çalışmada suPAR seviyesi 6.71 ng/mL yüksek olduğunda, ölüm riskinin yaklaşık iki katına çıktığı bulunmuştur. Düşük suPAR düzeyine sahip hastalar, daha yüksek SuPAR seviyesi olan hastalarla karşılaştırıldığında tam remisyona sahip olma ihtimalinin daha yüksek olduğu da görülmüştür[47]. Multipl miyelom, lenfoma, yumurtalık, meme, mide, prostat, endometrial, kolon, küçük hücreli dışı akciğer ve hepatoselüler kanserlerde de benzer prognostik kullanımlar vurgulanmıştır[1]. Ek olarak, yüksek suPAR düzeyleri lösemili hastalarının daha fazla kemoterapi seansını takiben yetersiz yanıt vermesi ile ilişkili bulunmuştur, bu da suPAR'ın lösemi karakterizasyonu ve kemosensitivite tahmininde önemini vurgulamıştır[48]. Son olarak, mevcut karaciğer bozukluğu olan hastaların takip edildiği 7 yıllık prospektif bir kohortta ve suPAR'ın, hepatoselüler karsinomu geliştirme zamanını ve sıklığını izlemede, alfafetoproteininden daha üstün olduğunu göstermiştir[49].

SONUÇ

SuPAR; biyokimyasal olarak plazma örneklerinde uzun süre stabil kalması, CRP'nin aksine açlık ve tokluktan etkilenmemesi, gün içerisinde çok değişmesi gibi özellikleri nedeniyle ideal bir belirteçtir. Daha önce yapılmış olan çalışmalar gözönünde bulundurulduğunda, SuPAR'ın daha çok organ hasarının oluş-

maya başladığı dönemde erken uyarı veren bir belirteç olarak kullanılabilceği, tanısal özelliğinden çok prognostik özelliğinin daha öne çıktığı bir biyobelirteç olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Soluble ürokinaz plazminojen aktivatör reseptörü, inflamasyon, organ hasarı, biyobelirteç

KAYNAKLAR:

1. Hamie L, Daoud G, NemerG, SuPAR, an emerging biomarker in kidney and inflammatory diseases. *Postgrad Med J*, 2018. 94(1115): p. 517-524.
2. Thuno, M., B. Macho, and J. Eugen-Olsen, suPAR: the molecular crystal ball. *Dis Markers*, 2009. 27(3): p. 157-72.
3. Arsan S, Okulu E, Akın İE Yenidoğan sepsisinde soluble ürokinaz plazminojen aktivatör reseptör (suPAR) düzeylerinin incelemesi. Proje, Ankara Üniversitesi, Ankara, 2012
4. Huttunen R, Syrjänen J, Vuento R Plasma level of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor as a predictor of disease severity and case fatality in patients with bacteraemia: a prospective cohort study. *J Intern Med*, 2011. 270(1): p. 32-40.
5. Backes Y, van der Sluijs KE, Mackie DP Usefulness of suPAR as a biological marker in patients with systemic inflammation or infection: a systematic review. *Intensive Care Med*, 2012. 38(9): p. 1418-28.
6. Bilgili, B. and İ. Cinel, The significance of soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) in ICU patients. *Journal of the Turkish Society of Intensive Care*, 2013. 11(1): p. 0-0.
7. Andersen O, Eugen-Olsen J, Kofoed K Soluble urokinase plasminogen activator receptor is a marker of dysmetabolism in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J Med Virol*, 2008. 80(2): p. 209-16.
8. Stephens RW, Pedersen AN , Nielsen HJ ELISA determination of soluble urokinase receptor in blood from healthy donors and cancer patients. *Clin Chem*, 1997. 43(10): p. 1868-76.
9. Thun, et al., suPAR: The Molecular Crystal Ball. *Disease Markers*, 2009. 27(3-4).
10. Beaufort N, Leduc D, Rousselle JC Proteolytic regulation of the urokinase receptor/CD87 on monocytic cells by neutrophil elastase and cathepsin G. *J Immunol*, 2004; 172(1): 540-9.
11. Owen CA, Campbell EJ. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol*, 1999; 65(2): 137-50.
12. Gyetko MR, Chen GH, McDonald , Urokinase is required for the pulmonary inflammatory response to *Cryptococcus neoformans*. A murine transgenic model. *J Clin Invest*, 1996; 97(8): 1818-26.
13. Rijneveld AW, Levi M, Florquin S, Urokinase receptor is necessary for adequate host defense against pneumococcal pneumonia. *J Immunol*, 2002; 168(7): 3507-11.
14. May AE, Kanse SM, Lund LR, Urokinase receptor (CD87) regulates leukocyte recruitment via2 integrins in vivo. *J Exp Med*, 1998; 188(6): 1029-1037.
15. Koch A, Voigt S, Kruschinski C, Circulating soluble urokinase plasminogen activator receptor is stably elevated during the first week of treatment in the intensive care unit and predicts mortality in critically ill patients. *Crit Care*, 2011; 15(1): R63.
16. Kofoed K, Andersen O, Kronborg G, Use of plasma C-reactive protein, procalcitonin, neutrophils, macrophage migration inhibitory factor, soluble urokinase-type plasminogen activator receptor, and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in combination to diagnose infections: a prospective study. *Crit Care*, 2007; 11(2): 31-38.
17. Uusitalo-Seppälä R, Huttunen R, Tarkka M, Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor in patients with suspected infection in the emergency room: a prospective cohort study. *J Intern Med*. 2012 ; 272(3): 247-56.

18. Huttunen R, Syrjänen J, Vuento R, Plasma level of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor as a predictor of disease severity and case fatality in patients with bacteraemia: a prospective cohort study. *Journal of Internal Medicine*, 2011 ; 270(1): 32-40.
29. Sidenius N, Sier C, Ullum H, Serum level of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor is a strong and independent predictor of survival in human immunodeficiency virus infection. *Blood*, 2000; 96(13): 4091-5.
20. Rabna P, Andersen A, Wejse C, Utility of the plasma level of SuPAR in monitoring risk of mortality during TB treatment. *PLoS One*, 2012; 7(8): e43933.
21. Wang, Z. and T. Nakayama, Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease. *Mediators Inflamm*. 2010, Available from: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2010/535918/>
22. Gumus A, Altintas N, Cinarka H Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor is a novel biomarker predicting acute exacerbation in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2015. 10: p. 357-65.
23. Edsfeldt A, Nitulescu M, Grufman H, Soluble urokinase plasminogen activator receptor is associated with inflammation in the vulnerable human atherosclerotic plaque. *Stroke*, 2012; 43(12): 3305-12.
24. Lyngbæk S, Marott JL, Møller DV, Usefulness of soluble urokinase plasminogen activator receptor to predict repeat myocardial infarction and mortality in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous intervention. *Am J Cardiol*. 2012; 110(12): 1756-63.
25. Samman Tahhan , Hayek SS, Sandesara P, Circulating soluble urokinase plasminogen activator receptor levels and peripheral arterial disease outcomes. *Atherosclerosis*, 2017. 264: p. 108-114.
26. Fagenholz PJ, Castillo CF, Harris NS ,Increasing United States hospital admissions for acute pancreatitis, 1988-2003. *Ann Epidemiol*, 2007. 17(7): p. 491-7.
27. Lipinski M, Rydzewska-Rosolowska A, Rydzewski A, Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR) in patients with acute pancreatitis (AP) - Progress in prediction of AP severity. *Pancreatology*, 2017. 17(1): p. 24-29.
28. Koch A, Zimmermann HW, Gassler N, Clinical relevance and cellular source of elevated soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) in acute liver failure. *Liver Int*, 2014. 34(9): p. 1330-9.
29. Zimmermann HW, Koch A, Seidler S, Circulating soluble urokinase plasminogen activator is elevated in patients with chronic liver disease, discriminates stage and aetiology of cirrhosis and predicts prognosis. *Liver Int.*, 2012; 32(3): 500-9.
30. Wei C, El Hindi S, Li J, Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med*. 2011; 17(8): 952-60.
31. Wei C, Trachtman H, Li J, Circulating suPAR in two cohorts of primary FSGS. *J Am Soc Nephrol*, 2012. 23(12): p. 2051-9.
32. Staeck O, Slowinski T, Lieker I, Recurrent Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis Managed With Intensified Plasma Exchange and Concomitant Monitoring of Soluble Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor-Mediated Podocyte beta3-integrin Activation. *Transplantation*, 2015. 99(12): p. 2593-7.
33. Wei C, El Hindi S, Li J, Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med*, 2011. 17(8): p. 952-60.
34. Hayek SS, Sever S, Ko YA, Soluble Urokinase Receptor and Chronic Kidney Disease, 2015; 373(20): 1916-25.
35. Legány N, Toldi G, Distler JH, Increased plasma soluble urokinase plasminogen activator receptor levels in systemic sclerosis: possible association with microvascular abnormalities and extent of fibrosis. *Clin Chem Lab Med* 2015;53: 1799–805.
36. Pliyev BK, Menshikov MY. Release of the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (SuPAR) by activated neutrophils in rheumatoid arthritis. *Inflammation.*, 2010 ; 33(1): 1-9.

37. Slot O, Brünner N, Locht H, Soluble urokinase plasminogen activator receptor in plasma of patients with inflammatory rheumatic disorders: increased concentrations in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1999 ;58(8): 488-92.
38. Enocsson H, Sjöwall C, Wetterö J, Soluble urokinase plasminogen activator receptor-a valuable biomarker in systemic lupus erythematosus? *Clin Chim Acta.* 2015; 444:234-41.
39. Qin DD, Song D, Huang J, Plasma-soluble urokinase-type plasminogen activator receptor levels are associated with clinical and pathological activities in lupus nephritis: a large cohort study from China. *Lupus.* 2015; 24(6): 546-57.
40. Soltysiak J, Zachwieja J, Benedyk A, Circulating SuPAR as a biomarker of disease severity in children with proteinuric glomerulonephritis. *Minerva Pediatr.* 2016, epub.
41. Reuning U, Bang NU, Regulation of the urokinase-type plasminogen activator receptor on vascular smooth muscle cells is under the control of thrombin and other mitogens. *Arterioscler Thromb.* 1992 ;12(10):1161-70.
42. Florquin S, van den Berg JG , Olszyna DP, Release of urokinase plasminogen activator receptor during urosepsis and endotoxemia. *Kidney Int.* 2001; 59(6): 2054-61.
43. Cubellis MV, Wun T, Blasi F, Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *Embo J* 1990; 9:1079-85.
44. Toldi G, Szalay B, Bekő G, Plasma soluble urokinase plasminogen activator receptor (SuPAR) levels in ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine.* 2013; 80(1): 96-8.
45. Saylam Kurtipek G, Kesli R, Tuncez Akyurek F, Plasma-soluble urokinase plasminogen activator receptor (SuPAR) levels in Behcet's disease and correlation with disease activity. *Int J Rheum Dis,* 2016,
46. Rubina KA, Sysoeva VY, Zagorujko EI Increased expression of uPA, uPAR, and PAI-1 in psoriatic skin and in basal cell carcinomas. *Arch Dermatol Res,* 2017. 309(6): p. 433-442.
47. Erkut N, Menteşe A, Özbaş HM The Prognostic Significance of Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor in Acute Myeloid Leukemia. *Turk J Haematol,* 2016. 33(2): p. 135-40.
48. Guo H, Zhou LX, Ma H, Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor and urokinase-type plasminogen activator receptor contribute to chemoresistance in leukemia. *Oncol Lett,* 2017. 14(1): p. 383-389.
49. Chounta A, Ellinas C, Tzanetakou V, Serum soluble urokinase plasminogen activator receptor as a screening test for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int,* 2015. 35(2): p. 601-7.

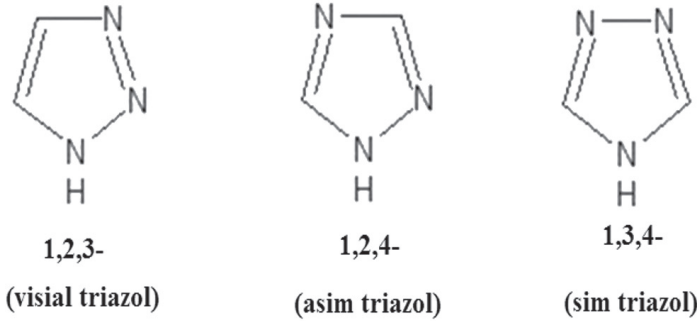
Bölüm 5

1, 2, 4-TRİAZOL BİLEŞİKLERİNİN FARMAKOLOJİK UYGULAMALARI: ANTİ KANSER, ANTİ MİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİ

Akif Evren PARLAK¹

GİRİŞ

Beş üyeli bir halkada üç azot atomu içeren sistem “triazasiklopentadien” veya kısaca triazol olarak bilinir. Heteroatomların halkadaki durumlarına göre 1,2,3- (visinal triazol) 1,2,4- (asimetrik, asim-triazol) ve 1,3,4 (simetrik, sim-triazol) olmak üzere birbirine izomer üç triazol halkası (Şekil 1) vardır (Shawmi ve Parhangi,1980:17833)



Şekil 1. İzomer üç triazol halkası.

Triazoller 1880’li yıllarda Bladin (1885) ve Andreocci (1889) tarafından bilim dünyasına tanıtılmış ve bu konudaki çalışmalar günümüze dek yoğun bir şekilde devam etmiştir. Triazoller, başta tautomerik özellikleri olmak üzere, değişik sübstitüentlerin yapısı üzerinde yerleştirilmesine uygun kimyasal aktiflikleri ile işlek bir konuyu oluşturmaktadırlar. Konuyla ilgili olarak Potts (1960) tarafından bir “Review”, Temple (1981) tarafından da “Triazols” adlı kitap yayımlanmıştır. Tri-

¹ Çevre Koruma Teknolojileri Bölümü, Keban Meslek Yüksek Okulu, Fırat Üniversitesi, Keban/Elazığ, Türkiye akifevren@firat.edu.tr

azoller H. Von Pechmann tarafından zazonlardan elde edilmiştir ve ozotriazones veya ozotriazols olarak adlandırılmıştır (Briggs vd., 1968: 727).

Triazol çekirdeği içeren herhangi bir doğal bileşiğe rastlanamamıştır. Ancak triazol yapısı, pek çok bileşiğin yapısında yer alan ve bazı önemli fizyolojik olaylarda rol oynayan maddelerin (Histamin, Histedin, B12 vitamini) yapısında bulunan imidazol'ün bir izosteri sayılabilir (Şekil 2) . Buna en çarpıcı örnek, histamindeki imidazol halkası yerine biyoizoster olarak triazol çekirdeğinin getirilmesiyle elde edilen bileşikte de histamine benzer etkilerin elde edilebilmesidir (Inaba vd., 1988:9091).



İmidazol (3)

1,2,4- Triazol

Şekil 2. İmidazol ve 1,2,4- triazol halkası .

Aromatik karakterde olan bu halkalarda hidrojen taşıyan azot atomlarının elektronik durumu, piroldeki azot atomunun elektronik durumunun aynısıdır. Diğer azot atomlarının elektronik durumu ise diazollerdeki hidrojen taşımayan azot atomlarının durumu gibidir (Gul vd., 2002: 777). 1, 2, 4-triazol halkasındaki azot ve merkapto grupları nükleofil merkezdir ve elektrofiller ile tepkimeye girebilmektedir. Örneğin S ve N atomunda bazı alkilasyon ve Mannich reaksiyonlarının gerçekleştirildiği bildirilmektedir (Birinci, 2013). Triazol halkasının sübstütüsyonu ile biyolojik aktivitesi modifiye edilir (Almajan vd.,2010:6146). Bu nedenle kullanımları yaygınlaşmıştır.

Bu derlemede, yeni sentezlenen ve iyi sonuçlar elde edilen bazı 1,2,4 triazol türevlerinin antikanser, antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri konusunda yapılan araştırmalar sunulmuştur.

ANTİKANSER AKTİVİTE

Anormal hücrelerin üretimi ve yayılması ile tanımlanan çeşitli hastalık grupları olan kanser, büyük bir küresel sorundur (Ferlay vd., 2012). Bu nedenle, modern kanser araştırmalarında yeni etkili ve seçici antikanser ilaçların keşfi ve gelişimi

büyük önem taşımaktadır. 1,2,4-Triazol türevleri, bu araştırmalarla iyi sonuçlar elde etme şansına sahiptir (Chawla ve Kaur, 2013: 72).

Tıbbi kimyada aktif bir araştırma alanı olarak yeni antikanser ilaçları aramak çeşitli yöntemlere dayanmaktadır. Tümör hücrelerinde bazı hedefleri özellikle tutuklayabilen yeni küçük moleküllerin tasarımı ve sentezi, birçok çalışmada en önemli hedeftir. Karsinogenez üzerinde etkisi olan triazol gibi farklı heterosiklik gruplarından çeşitli sentetik küçük moleküller bildirilmiştir ve bunların birçoğu şu anda klinik deneyde bulunmaktadır. Beş üyeli 1, 2, 4 triazol halkası içeren heterosiklik bileşiklerin çalışma alanı son yıllarda giderek dikkat çekmektedir. Triazollerle yapılan araştırmalar büyük oranda yeni yapısal triazol bileşiklerinin geliştirilmesi şeklindedir.

Sztanke vd. (2008:419) yeni sentezlenmiş 1,2,4 triazolli üç farklı kanser hattına; insan kolon adenokarsinom LS180 (ECACC87021202), insan rahim karsinomu SiHa (ECACC 85060701) ve insan meme karsinomu T47D (ECACC 85102201) hücre hattına karşı aktivitesini araştırmışlardır. Araştırma sonuçlarında test bileşiklerinin *in vitro* insan kolon adenokarsinom hücrelerine karşı en etkili aktiviteye sahip olduklarını bulmuşlardır. Ayrıca uyguladıkları Comet Analizi ile Imidazotriazol yapılı test bileşiklerinin meme kanseri hücre hattının (T47D) DNA yapısı üzerinde sitotoksik bir etkiye sahip olduğunu da tespit etmişlerdir.

Zhai vd. (2008:945) bir dizi yeni 1,2,4 triazol-amin türevlerini insan hepatoselüler karsinomu (Bel-7402) ve insan fibrosarkom (HT-1080) iki kanser hücresi hattına karşı *in vitro* sitotoksisite için değerlendirmişlerdir.

Elde edilen sonuçlara göre sitotoksik aktiveye sahip bileşiklerde aktivitenin C-2 pozisyonundaki yan zincirlerindeki yapıya güçlü bir şekilde bağlı olduğu ve C-7 pozisyonundaki 4 triflourometil anilinin de antikanser potansi için etkili olduğu bulunmuştur.

Yang ve Pan (Yang ve Pan, 2007:141) sentezledikleri 1,2,4-triazol-5-thione bileşiklerini insan hepatoselüler karsinom hücre hattı (Bel-7402) ve ağız epidermal karsinom hücreleri (KB hücreleri) için SRB yöntemi ile değerlendirmişler, insan promiyelositik hücreleri için MTT yöntemiyle de lösemi hücresi (HL-60) ve insan mide kanseri hücre hattına (BGC-823) karşı aktivitelerini araştırmışlardır. Bileşikler arasında, iki bileşiğin KB hücrelerine karşı oldukça etkili olduğunu ve bileşiğin Bel-7402 hücrelerine karşı da oldukça etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada Cl, Br gibi elektron grupları meta pozisyonunda içeren bileşiklerin diğer bileşiklerden daha güçlü aktivitelere sahip olduğunu belirtilmiştir.

4-amino-5-merkaptio-3-(2 - klorofenil)-1,2,4-triazol bileşiğinin antikanser aktivitesi Singh vd. (2007:141) tarafından araştırılmıştır. Bu bileşik, Ehrlich Asit Tümörleri taşıyan farelerde umut verici antikanser aktivitesi göstermiştir.

Bir dizi 4-amino-3-merkaptio-1,2,4-triazol ve bunların Schiff ve Mannich baz türevleri Sunil ve ark.'ları tarafından sentezlenmiştir . Schiff ve Mannich bazlı yapılardan bazıları, MTT testi ile insan hepatoselüler karaciğer karsinomu hücre hattına (HepG2) karşı sitotoksik aktiviteleri için taranmıştır. Bu çalışmada, bir test bileşiğinin IC50 değeri 0.018 g/l olarak bulunmuş ve standart olarak kullanılan kemoterapi ilacı doksorubisin ile karşılaştırılabilir olduğu (doksorubisin IC50 değeri 0.017 g/l olarak bulunmuştur) tespit edilmiştir (Sunil vd., 2010:1032).

Çıkla ve arkadaşları etodolac hidrazidden elde edilen, IC50 değerini 4.29 mM olan 1,2,4 - triazol-3-thione türevinin insan hepatokarsinoma kanseri hattına (Huh7) karşı dikkat çekici bir antikanser aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir (Çıkla vd.,2013:146).

Mavrovo ve arkadaşları bir dizi sentezledikleri-1,2,4-triazol-tion türevlerini timositlere karşı *in vitro* sitotoksikite için taranmışlardır. 4-Amino-5- (5-feniltiyen-2-il) -2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon bileşiğinin IC50 0.012 mM değeri ile dikkat çekici sitotoksik aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir (Mavrovo vd., 2009.69).

El-Sayed vd. (2012:32) çeşitli 1,2,4-triazol türevleri sentezlenmiş ve seçilen bileşiklerin bazılarını MCF7 ve insan epitelyal adenokarsinom hücre hattına (HeLa) karşı antikanser faaliyetleri için doksorubisin ile karşılaştırılarak araştırmışlardır. Kemoterapik ilaç doksorubisin'in MCF-7'ye karşı IC50 değerini 6.71 ve HeLa' ya karşı ise 8.0 mg/mL olarak tespit etmişlerdir. İki 1,2,4-triazol-3-thiones türevleri; 2 - {(4-klorofenilamino) metil}-5-{1-(4-klorofenil) - 5-fenil-1H-pirazol-3-il} - 5-fenil-1H-pirazol-3-il} - 4-fenil-2h-1,2,4-triazol-3(4H)-tiyon ve 5-{1-(4-klorofenil)-5-fenil-1H-pirazol-3-il}-4-fenil-2 - {(piperidin-1-il) metil}-2h-[1,2,4]triazol-3(4H)-tiyon türevlerinin MCF7 ve HeLa'ya karşı IC50 değerini sırasıyla 5.26, 5.85; 3.89, 4.20 bulmuşlardır. Bu değerlerin kemoterapik ilaç doksorubisin'in IC50 değerine göre oldukça iyi çıkması dikkat çekicidir.

Bir seri anilino-1,2,4-triazolün, insan Metiyonin Aminopeptidaz-2'ye (MetAP2) karşı oldukça etkili inhibe edici aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Özellikle, deney, triazol nitrojenleri ve MetAP2'nin aktif bölgesi arasındaki anahtar-kilit etkileşimleri doğrulanmıştır. Araştırmacılar, Furanilmetil yan zincirlerine sahip iki bileşiğin, insan endotel hücre proliferasyonunun güçlü inhibitörleri olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, anjiyogenezin bir aortik doku modelinde yeni kan damarı büyümesini doza bağlı olarak inhibe ettiği bulunmuştur (Marino vd., 2007: 3785).

Hsp27, ilaç toksisitesine karşı koruma sağlayan, ATP'den bağımsız küçük moleküler bir şaperondur. Hsp27'yi inhibe etmek, ilaçlara karşı hücre hassasiyetini artırabilir ve böylece ilaç direnci probleminin üstesinden gelebilir. Yi ve ark.ları, sentezledikleri triazol türevlerinden birinin, ilk Hsp27 inhibitörü, *in vitro* ve *in vivo* ilaca dirençli pankreatik kanserde hiçbir yan etkisi olmadan güçlü ve etkili antikanser aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir (Xia vd., 2009:6096).

Arora ve ark.larının sentezledikleri triazol türevi bileşiğin, insan kanser hücrelerini hücre döngüsünün G2-M fazında durdurduğunu, aynı zamanda birçok kanser hücre hattının hücre canlılığını inhibe ettiğini, spesifik olarak normal insan derisi fibroblast hücre hatlarına karşı sitotoksikite oluşturmadığını bildirmişlerdir (Arora vd. 2009:1915).

Araştırmacılar (Huang vd., 2011: 564), tiyofen-triazol tiyon içeren halka sistemine sahip bileşiklerin, lenfositler ve timositlere karşı belirgin sitotoksikite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Ayrıca tiyenil kısmı olan triazol halkalı bileşiklerin üzerinde kuvvetli seçici olan PI3K inhibitörleri bulunmuştur ki bu, kanser tedavisi için son derece umut verici bir sonuç olarak belirtilmiştir.

Pachuta-Stec vd. (2009: 3793) 1,2,4-triazol-propenoik asidin bazı yeni amidlerini sentezlemiş ve antikanser aktivitesini incelemişlerdir. Bu serinin üç bileşiğinin *in vitro* akciğer hücresi hattına karşı etkili olduğu bulunmuştur. *İn vitro* meme karsinom hücrelerinde iki bileşiğin belirgin olarak işaretlenmiş antiproliferatif etkisi tespit edilmiştir.

Triazollerle yapılan araştırmalardan bir bölümü ise klinik antikanser ilaçların yapısal modifikasyonu şeklindedir. Triazollerle, ısı şok protein inhibitörü, Histon Deasetilaz İnhibitörlü, Mikrotüp Polimerizasyon İnhibitörü, Aromataz İnhibitörü, Protein Tirozin Kinaz İnhibitörü gibi çeşitli inhibitörler ve farklı klinik kanser ilaçları (cladribin, decitabin, floxuridin, Pyrrolbenzodiazepinler, amonafid, elinafid) modifiye edilerek daha etkili antikanser aktiviteye sahip yapıların elde edildiği bildirilmiştir (Zhou ve Wang, 2012: 280).

ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ

Günümüzde birçok ilaca dirençli suşların artan ortaya çıkışı etkisiz klinik antibiyotiklerin çoğalmasına yol açmıştır. Böylece, yeni antimikrobiyal ajanların gelişimine yönelik araştırmalar tüm dünyada önemli hale gelmiştir. Son yıllarda, birçok araştırmacı, Sülfadiazin ve Linezolid gibi yeni ilaçlar elde edebilmek için oksazol, pirimidin, izoksazol gibi farklı heterosikliklerin antibakteriyel moleküllere sokulmasına yönelik çalışmalar yapmaya başlamıştır. Triazol bileşiklerinin

antifungal ilaçların gelişiminde benzeri görülmemiş bir başarı elde ettiği bilinirken antibakteriyel ajanlar olarak araştırılması nispeten daha geç olmuştur. Triazol bileşiklerinin antibakteriyel ilaçlar olarak büyük potansiyel sergilediğini gösteren çok sayıda araştırma mevcuttur. Mono-1,2,4-triazol, bis-1,2,4-triazol ve multi - 1,2,4-triazol gibi bazı 1,2,4-triazol bileşiklerinin son yıllarda antibakteriyel potansiyele sahip olduğu bulunmuştur (Zhou ve Wang, 2102: 280).

Bazı araştırmalarda, bazı mono-1,2,4-triazol türevlerinin antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu bulunmuştur. Örneğin yapılan bir çalışmada bir dizi yeni kumarin bazlı mono-1,2,4-triazol türevi tasarlanmış ve sentezlenmiştir.

Bu bileşiklerin antimikrobiyal değerlendirilmesinde referans ilaçlar enoksasin ve kloromisin ile karşılaştırıldığında kıyaslanabilir veya daha iyi antibakteriyel etkinlik gösterdiği bulunmuştur. Bu çalışmadaki test bileşiklerinden kumarinli mono-triazollerin, sadece kumarin içeren bileşiklerden daha iyi aktiviteler sergilediği, bis-triazol yapıları bileşiklerin de monotriazolden daha güçlü antibakteriyel ve antifungal etkinlik sergilediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar heterosiklik 1,2,4-triazol kısmının antibakteriyel aktiviteler üzerinde önemli bir etki yarattığını göstermiştir (Cai vd., 2009:608).

Yapılan başka bir çalışmada antibakteriyel aktivite göstermeyen ve bir antifungal ilaçtır Oxiconazole 'ün yapısındaki imidazol halkasını 1,2,4-triazol halkasıyla değiştirilmiş ve bunun sonucunda elde edilen bileşiklerin 6.25 µg / mL MIC değeriyle sahip mevcut klinik ilaç gentamisin ile karşılaştırıldığında, *S. aureus* ' a karşı eşdeğer biyoaktivite sergilediği belirlenmiştir. Ayrıca bu bileşiklerin bu kez de antifungal aktiviteye sahip olmadığı da tespit edilmiştir (Bhandari vd., 2009:447).

Bir diğer yapılan çalışmada ise bir nitroimidazol halkası ile birleştirilmiş Triazol türevi bileşiğin, *S. aureus*, *Bacillus proteus* ve *E. coli*'ye karşı diğer heterosiklik sübstitüe edilmiş bileşiklerden daha yüksek inhibe edici aktiviteler gösterdiği tespit edilmiştir (Atia, 2009:2446).

Eswaran vd. (2009: 4647) tarafından yapılan bir çalışmada, kinolon türevli 1,2,4-triazol yapısındaki bileşiğin standart ilaç norfloksasin ile karşılaştırılabilir çok iyi diğer bir referans ilaç siprofloksasinle ise eşit olan 6.25 µg/mL'lik MİK değerinde antimikrobiyal aktivite sergilediği ortaya konmuştur.

Sülfanilamid 1,2,4-triazol yapısındaki bir bileşiğin, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus* ve *Staphylococcus epidermidis*'e karşı ticari ajan streptomisin ile aynı antibakteriyel etkinliği gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca, bu bileşikler kloromisine göre daha yüksek bakterisit öldürücü etki göstermiştir. Araştırmalar ayrıca gram negatif bakterilerin bu bileşiklere gram pozitif türlerden daha duyarlı görüldüğünü de ortaya koymuştur (Ezabadi vd., 2008:1161).

El Sayed ve El Kazak (2010; 11) adlı araştırmacıların akridinil türevli 1,2,4 triazol yapısındaki test bileşiğinin *Pseudomonas floresens*, *Pseudomonas phaseolicola* ve *S. aureus* ve *Streptococcus pyogenes*e karşı antibakteriyel aktivite için in vitro olarak değerlendirmişler ve sonuç olarak referans ilaçlar kadar aktif olduğunu göstermişlerdir.

El-Feky vd. (2010:364) bazı 1,2,4-triazol türevlerini sentezlemişlerdir ve disk difüzyon testi kullanılarak *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı in vitro antibakteriyel aktivite için taramışlardır. Bileşiklerden 5-((3-(4-Bromobenzilideneamino)-1H-1,2,4-triazol-5-iltio)metil)-4-(4florofenil)-1H-1,2,4- triazol-5(4H) - tiyon'un *S. aureus*'a karşı referans antibakteriyel standart olarak ampisilin ile karşılaştırıldığında oldukça aktif olduğunu bulmuşlardır.

Saadeh vd. (2010:478) sentezlenen ve Metronidazolden türetilen yeni 1,2,4-triazol-3-tiolün bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesi MIC olarak belirlendi, mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. İki test bileşiğinin *Clostridium sporogenes*' e karşı referans antimikrobiyal metronidazol'den daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Plech vd. (2011: 743) bazı yeni aminometil türevli 1,2,4 triazoller sentezleyerek altı gram-pozitif ve dört gram-negatif bakteri suşlarına karşı antibakteriyel aktivitesi için incelemişlerdir. Elde ettikleri verilerde bileşiklerin bazıları referans antibiyotiğe (ampisilin) eşit güçlü antibakteriyel aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Plech vd.(2013: 2537) yaptıkları başka bir araştırmada ise Gram-pozitif bakteriyel suşlar, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus*, *B. subtilis* ve *M. Luteus*' a karşı 1,2,4 triazollü Mannich bazlarının antibakteriyel aktivitesinin, ampisilin ve sefuroksim gibi genellikle kullanılan antibakteriyel ajanların aktivitesinden benzer veya daha yüksek çıktığını bildirmişlerdir.

Bazı 1,2,4-triazollerin ve bunların Mannich bazlarının biyolojik araştırması yapılan bir çalışmada, bu bileşiklerin insan patojenik bakterileri *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Y. pseudotuberculosis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* ve *B. cereus*'a karşı nispeten iyi bir aktivite gösterdiğini gösterdiği, bunlar arasında 4-benzil-5-(furan-2-il)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon ve 4-benzil-5-(furan-2-il)-2-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon bileşiklerinin *E. Coli*, *E. Aerogenes* ve *Y. Psödötüberküloze* karşı iyi aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca standart referans ilaç Ampisilin ile karşılaştırıldığında, bu bileşiklerin *E. aerogenes* üzerinde inhibisyon bölgesi 10 mm ile eşit aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Basoğlu vd., 2013:236).

Literatürde, bazı tri-süstitüe edilmiş triazol bileşiklerinin iyi antibakteriyel faaliyetler gösterdiğini belirleyen (Fallah vd., 2011:316; Parmar vd., 2010: 161;

Khalil vd., 2010: 5277), amino grubu içeren triazol türevinin, referans değeri olan norfloksasi'ne kıyasla daha düşük olan 1.0 ug/mL MIC değerinde önemli *Escherichia coli* aktivitesi sergilediğini (MIC = 8.0 ug / mL) gösteren (Hu vd., 2006:1192), Bis-amino-triazol türevlerinin *S. aureus*'a ve *P. Vulgaris*'e karşı güçlü inhibe edici aktivite sergilediğini ortaya koyan çalışmalar da mevcuttur (Hu vd., 2006:277).

ANTIOKSİDAN AKTİVİTE

Serbest radikalın neden olduğu hücrelerin hasar görmesi, yaşlanma sürecinde ve hastalık gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Antioksidanlar serbest radikal hasarına karşı ilk savunma hattıdır. Günümüzde antioksidanlar serbest radikallere daha fazla maruz kalınması ile nedeniyle daha da önemli hale gelmiştir (Elansary, 2014)

Antioksidanlar, serbest radikalleri azaltan veya nötralize eden çok önemli bileşiklerdir, bu nedenle hücreleri oksidatif hasardan korurlar. Antioksidanlar diyabet, kanser, yaşlanma, kardiyovasküler ve diğer dejeneratif hastalıklar gibi çok sayıda yaşam tarzı hastalığının tedavisi olarak dikkat çekmektedir. Bu nedenle, birçok araştırmacı sentetik bir metodoloji ile bazı yeni antioksidanlar tasarlamakla ilgilenmektedir (Küçüküzümlü ve Çıkla, 2015:870).

Kuş vd. (2004:163) yaptıkları bir çalışmada imidazol-1,2,4-triazol-3-iyon türevli bileşikler lipit peroksidasyonu testiyle antioksidan özellikleri için incelemişlerdir. Bu çalışma sonucunda p- ve m-bromo fenil gruplu bileşiklerin pozitif bir kontrol olarak kullanılan butile hidroksitolüen ile benzer antioksidan aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir.

Ayhan-Kilcigil ve ark.'ları, 1,2,4-triazol-3-iyon yapısında olan bazı yeni benzimidazol türevlerinin sentezini ve antioksidan değerlendirmesini yaptıkları çalışmada, Triazol bileşiklerinin serbest radikal temizleme faaliyetlerini, DPPH metodu ile ölçmüşlerdir. 5-(2-(P-Klorofenil)benzimidazol-1 ilmetil)-4-metoksi-fenil-2,4-dihidro-1,2,4-triazol-3-iyon ve 5-(2-(4 piridinil)benzimidazol-1-ilmetil)-3,4-diklorofenil-2,4-dihidro-1,2,4-triazol-3-iyon bileşiklerinin DPPH radikali ile en yüksek etkileşimi gösterdiğini ve bu bileşikler için IC50 değerlerinin BHT (butilhidroksitoluen) referans standart antioksidan için daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir (Ayhan-Kilcigil vd., 2005:514).

4,5-disübstitüe-1,2,4-triazol-3-iyonların yeni türevlerinin sentezi ve antioksidan aktivite değerlendirmesi Nadeem ve ark.'ları tarafından yapılmıştır. Sentezlenen tüm bileşikler, standart olarak askorbik asit kullanılarak stabil DPPH serbest radikalının temizleme aktivitesi metodu ile antioksidan aktivite için test edilmiştir. 4-Heksil-2,4-dihidro-5 - (3-piridil) - 3H-1,2,4-triazol-3-iyon (92.5%)

ve 5-benzil-4-heksil-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon (92.3%), bileşiklerinin DPPH radikal konsantrasyonunda önemli bir azalma sağladığı gösterilmiştir (Nadeem vd., 2013:375).

Aswathanarayanappa vd. (2013:930) serbest radikal atma, anti - hemolitik aktivite, lipit peroksidasyonu ve DNA oksidatif hasara karşı koruyucu etkileri ile antioksidan özellikleri değerlendirmek için 1,2,4-triazol bazlı hazırlanan Schiff bazları sentezlemiştir. 2-(-{[3-(4-kloro-2-metilfenil) - 5-sülfanil-4H-1,2,4-triazol-4-il]imino} metil) benzen-1,4-diol bileşiğinin insan eritrositlerinin H₂O₂ kaynaklı hemolizine karşı koruyucu etkiyi gösterdiği, 5-(4-kloro-2-metilfenil)-4-[(4-metoksibenziliden)amino]-4H-1,2,4-triazol-3-tiol bileşiğinin ise lipit peroksidasyonunu etkili bir şekilde inhibe etme yeteneği olduğu bulunmuştur. Bileşik 4-[[[3-(4-kloro-2-metilfenil)-5-sülfanil-4h-1,2,4-triazol-4-il]imino}metil] fenol'ün DNA'yı oksidatif hasara karşı koruduğu de bildirilmiştir. Aswathanarayanappa ve ark. ayrıca, özellikle iki türevin aday antioksidan ajanlar olduğunu bildirdi. Bu bileşikler, sırasıyla %89.2 ve %86.8 inhibisyon seviyesinde umut verici DPPH radikal etkisizleştirme aktivitesi göstermiştir.

Koparır ve arkadaşları (Koparır vd., 2013 : 346) sentezledikleri aminometil 1,2,4-triazol türevlerinin önemli antioksidan aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Morfolin parçası olan üç triazol bileşiğinin, tüm konsantrasyonlarda referans bileşik olan askorbik aside göre daha iyi DPPH radikal temizleme aktivitesini gösterdiğini belirlemiştir.

SONUÇ

Bu derleme çalışması, çeşitli sentetik 1,2,4 triazol türevlerinin antikanser, antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesi için kullanılmalarına keşfetmeye odaklanmıştır. Aynı zamanda umut verici biyolojik ajanlar olarak 1,2,4 triazol türevlerine ilişkin bir bakış açısı sağlama amacıyla hazırlanmıştır. Bu derlemede; antikanser, antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri dikkat çekici olan 1,2,4 triazol türevleriyle yapılan araştırmalardan önemli sayılabilecek sonuçlara sahip bazlarına yer verilmiştir. Bu derlemede yer alan araştırma sonuçları; çeşitli hastalıkların tedavisi için geleceğin farmakolojik açıdan önemli antikanser, antimikrobiyal ve antioksidan ajanlarını geliştirmeye yönelik çalışan araştırmacılar için yararlı olabilir. Tıp bilimlerinde tedavisi zor olan birçok hastalık için triazol türevlerinin daha fazla aktivitesini değerlendirmek için daha fazla araştırma yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: 1,2,4 Triazol, Anti kanser, Anti mikrobiyal, Anti oksidan

KAYNAKÇA

1. Shawmi, A.S. ve Parhangi, C., 1980., J. Heterocyclic Chem., 17833.
2. Bladin, J.A., Ber., 1885,18, 1544.
3. Andreocci, A., Ber., 1889,22 737.
4. Potts, K.,T., Chem.Revs., 1960, 60, 87.
5. Temple, C., Montgomery, J.A. 1981, "The Chemist of Heterocyclic Compounds, Triazols-1,2,4-" John Wiley and Sons, Newyork.
6. Briggs, P.R. Parker, W.L. and Shannon, T.W., 1968, Chem. Comm., 727.
7. Inaba, M., Mizuno, Y., Ozaki, M., Horii, T., 1988, [9091,062] (C.A. 113:97612p).
8. Gul, H.I., Denizci, AA., Erciyas, E. Antimicrobial evaluation of some Mannich bases of acetophenones and representative quaternary derivatives. *Arzneimittelforschung*. 2002; 52: 773-777.
9. Birinci, E. Sentezi, Karakterizasyonu Ve Farmakolojik Yeni Tiyofen İçerikli 1,2,4-Triazol-3(5)-On Türevlerinin Özelliklerinin İncelenmesi. Y.lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ocak, Trabzon 2013.
10. Almajan, G. L., Barbuceanu, S.-F., Bancescu, G., Saramet, I., Saramet, G. ve Draghici, C. Synthesis and antimicrobial evaluation of some fused heterocyclic [1,2,4]triazolo [3,4-b][1,3,4]thiadiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010; 45: 6139-6146.
11. Ferlay J., Soerjomataram I., . Ervik M, Dikshit R., Eser,S. Mathers C., Rebelo M., Parkin DM., Forman D., & Bray F. Globocan 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013.
12. Chawla A., & . Kaur P. A Systematic Review: Microwave Synthesis as A Part of Green Chemistry for the Synthesis of Novel 1,2,4-Triazole Derivatives., *IRJP*. 2013; 4 (1): 49-72.
13. Elansary HO. Natural Antioxidants and their Role against Human Cancer. *J. Plant Biochem. Physiol.*, 2014; 2 (2), 1000-125.
14. Sztanke K, Tuzimski T, Rzymowska J. Synthesis, determination of the lipophilicity, anticancer and antimicrobial properties of some fused 1,2,4-triazole derivatives. *Eur J Med Chem* 2008;43:404-419.
15. Zhai X, Zhao YF, Liu YJ, Zhang Y, Xun FQ, Liu J, Gong P. Synthesis and cytotoxicity studies of novel [1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine- 7- amines. *Chem Pharm Bull* 2008;56:941-945.
16. Yang J.G., Pan F.Y. New 3-[(4-hydroxy-6-methyl-2(1H)-pyridinones)-3-yl]- 4-substituted-(1H)-1,2,4-triazole-5-thiones: efficient synthesis, X-Ray crystallographic analysis, and antitumor activity, *Lett. Org. Chem*. 2007; 4: 137-141
17. Singh T, Singh J, Naskar A., Ghosh T, Mondal, A., Kundu M., . Harwansh R.K, Maity T.K., Synthesis and evaluation of antiproliferative activity of 1, 2, 4 triazole derivatives against EAC bearing mice model, *Ind. J. Pharm. Educ. Res*. 2012; 46: 346-351.
18. Sunil D., Isloor A.M., Shetty P, Chandrakantha B., Satyamoorthy K.. Synthesis, characterization and in vitro cytotoxic properties of some new Schiff and Mannich bases in Hep G2 cells. *Med. Chem. Res*. 2010; 20: 1024e1032.
19. Çıkla P, Arora P, Basu A., Talele T.T., Kaushik-Basu N., Küçükgül S, .G. Etodolac Thiosemicarbazides: a novel class of hepatitis C virus NS5B polymerase inhibitors. *Marmara Pharm. J*. 2013; 17: 138e146.
20. Mavrova A.T., Wesselinova D., Tsenov Y.A., . Denkova P. Synthesis, cytotoxicity and effects of some 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives on immunocompetent cells. *Eur. J. Med. Chem*. 2009; 44: 63-69.
21. El-Sayed W.A., Flefel E.M., Morsy E.M.H. Anticancer and antimicrobial activities of some synthesized pyrazole and triazole derivatives, *Pharm. Chem*. 2012; 4: 23-32.
22. Marino, J.P.J.; Fisher, P.W.; Hofmann, G.A.; Kirkpatrick, R.B.; Janson, C.A.; Johnson, R.K.; Ma, C.; Mattern, M.; Meek, T.D.; Ryan, M.D.; Schulz, C.; Smith, W.W.; Tew, D.G.; Tomazek, T.A.J.; Veber, D.F.; Xiong, W.F.C.; Yamamoto, Y.; Yamashita, K.; Yang, G.; Thompson, S.K. Highly potent inhibitors of methionine aminopeptidase-2 based on a 1.2.4-triazole pharmacophore. *J. Med. Chem.*, 2007; 50: 3777-3785

23. Xia, Y.; Liu, Y.; Wan, J.Q.; Wang, M.H.; Rocchi, P.; Qu, F.Q.; Iovanna, J.- L.; Peng, L. Novel triazole ribonucleoside down-regulates heat shock protein 27 and induces potent anticancer activity on drug-resistant pancreatic cancer. *J. Med. Chem.*, 2009; 52: 6083-6096.
24. Arora, S.; Wang, X.I.; Keenan, S.M.; Andaya, C.; Zhang, Q.; Peng, Y.Y.; Welsh, W.J. Novel microtubule polymerization inhibitor with potent antiproliferative and antitumor activity. *Cancer Res.*, 2009; 69: 1910-1915
25. Huang, Q.H.; Richardson, P.F.; Sach, N.W.; Zhu, J.J.; Liu, K.K.-C.; Smith, G.L. Development of scalable syntheses of selective PI3K inhibitors. *Org. Process Res. Dev.*, 2011; 15: 556-564.
26. Pachuta-Stec A, Rzymowska J, Mazur L, Mendyk E, Pitucha M, Rzaczyńska Z. Synthesis, structure elucidation and antitumor activity of N-substituted amides of 3-(3-ethylthio-1,2,4-triazol-5-yl)propenoic acid. *Eur J Med Chem* 2009; 44: 3788-3793.
27. Zhou C.-H. and Wang Y. Recent Researches in Triazole Compounds as Medicinal Drugs. *Current Medicinal Chemistry*, 2012; 19: 239-280
28. Cai, J.L., Li, S., Zhou, C.H., Wu, J. Advance in research of imidazoles as anti-tumor agents. *Chin. J. New Drugs*, 2009; 18: 598-608(in Chinese)
29. Bhandari, K., Srinivas, N., Shiva Keshava, G.B., Shukla, P.K. Tetrahydronaphthyl azole oxime ethers: the conformationally rigid analogues of oxiconazole as antibacterials. *Eur. J. Med. Chem.*, 2009; 44: 437-447
30. Atia, A.J.K. Synthesis and antibacterial activities of new metronidazole and imidazole derivatives. *Molecules*, 2009; 14: 2431-2446.
31. Eswaran, S., Adhikari, A.V., Shetty, N.S. Synthesis and antimicrobial activities of novel quinoline derivatives carrying 1,2,4-triazole moiety. *Eur. J. Med. Chem.*, 2009; 44: 4637-4647
32. Ezabadi, I.R., Camoutsis, C., Zoumpoulakis, P., Geronikaki, A., Sokovic, M., Glamocilija, J., Ciric, A. Sulfonamide-1,2,4-triazole derivatives as antifungal and antibacterial agents: synthesis, biological evaluation, lipophilicity, and conformational studies. *Bioorg. Med. Chem.*, 2008; 16: 1150-1161
33. Fallah Tafti, A., Akbarzadeh, T., Saniee, P., Siavoshi, F., Shafiee, A., Foroumadi, A. Synthesis and anti-*Helicobacter pylori* activity of (4-nitro-1-imidazolylmethyl)-1,2,4-triazoles, 1,3,4-thiadiazoles, and 1,3,4-oxadiazoles. *Turk. J. Chem.*, 2011; 35: 307-316
34. Parmar, K., Suthar, B., Prajapati, S., Suthar, A. Synthesis and biological activity of novel 1,3,5-trisubstituted 1,2,4-triazole derivatives. *J. Heterocycl. Chem.*, 2010; 47: 156-161
35. Khalil, N.S.A.M. Efficient synthesis of novel 1,2,4-triazole fused acyclic and 21-28 membered macrocyclic and/or lariat macrocyclic oxazathia crown compounds with potential antimicrobial activity. *Eur. J. Med. Chem.*, 2010; 45: 5265-5277
36. Hu, G.Q.; Sun, M.F.; Li, S.; Huang, W.L.; Zhang, H.B. Synthesis and antibacterial activity of 3-(4-amino-5-methyl-1,2,4-triazol-3-yl)-1-phenylpropan-1-one-5-(5-substituted phenyl-[1,3,4]oxadiazol-2-methyl)-oximes. *Acta Pharm. Sinica*, 2006; 41: 1188-1192(in Chinese)
37. Hu, G.Q.; Xie, S.Q.; Du, G.J. Synthesis and antibacterial activities of bis(amino-triazole sulfurether) and their piperonal schiff's base derivatives. *Chin. J. Appl. Chem.*, 2006; 23: 273-277.
38. El Sayed Ali T., El Kazak A.M. Synthesis and antimicrobial activity of some new 1,3-thiazoles, 1,3,4-thiadiazoles, 1,2,4-triazoles and 1,3-thiazines incorporating acridine and 1,2,3,4-tetrahydroacridine moieties, *Eur. J. Chem.* 2010; 1: 6-11.
39. El-Feky S.M., Abou-Zeid L.A., Massoud M.A., S. George.K., Eisa H.M. Synthesis, molecular modeling of novel 1,2,4-triazole derivatives with potential antimicrobial and antiviral activities, *Acta. Pharm. Sci.* 2010; 52: 353-364.
40. Saadeh H.A, Mosleh I.M., Al-Bakri A.G., Mubarak M.S. Synthesis and antimicrobial activity of new 1,2,4-triazole-3-thiol metronidazole derivatives, *Monatsh. Chem.* 2010; 141: 471-478.
41. Plech, T., Wujec, M., Kapro, B., Kosikowska, U., Malm, A. Synthesis and antibacterial activity of some novel N2-Hydroxymethyl and N2-aminomethyl derivatives of 4-aryl-5-(3-chlorophenyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione, *Heteroat. Chem.* 2011; 22: 737-743.

Güncel Biyokimya Çalışmaları II

42. Plech T., Wujec M., Majewska M., Kosikowska, U. Malm A. Microbiologically active Mannich bases derived from 1,2,4-triazoles. The effect of C-5 substituent on antibacterial activity, *Med. Chem. Res.* 2013; 22: 2531-2537.
43. Basoglu S., Yolal M., Demirci S., Demirbas N, Bektas H., Alpay Karaoglu S. Design, synthesis and antimicrobial activities of some azole derivatives, *Acta. Pol. Pharm.* 2013; 70: 229-236.
44. Küçükgül S. G., Çıkla-Süzcü, P. Recent advances bioactive 1,2,4-triazole-3-thiones *Eur J Med Chem.* 2015; 5:97:830-70
45. Kus C. , Ayhan-Kilcigil G., . Can Eke B, Iscan M. Synthesis and antioxidant properties of some novel benzimidazole derivatives on lipid peroxidation in the rat liver, *Arch. Pharm. Res.* 2004; 27: 156-163.
46. Ayhan-Kilcigil G., . Kus C , Coban T., Can-Eke B., Ozbey S., M. Iscan. Synthesis, antioxidant and radical scavenging activities of novel benzimidazoles, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2005; 20: 503-514.
47. Nadeem H., Mohsin M., Afzaal H., Riaz S., Zahid A., Muhammad S.A. Synthesis and in vitro biological activities of 4,5-disubstituted 1,2,4-triazole-3- thiols, *Adv. Microbiol.* 2013; 33:66-375.
48. Aswathanarayanappa C., Bheemappa E., Bodke Y.D., Krishnegowda P.S., . Venkata S.P. Ninge-gowda R. Synthesis and evaluation of antioxidant properties of novel 1,2,4-triazole-based Schiff base heterocycles, *Arch. Pharm. (Weinheim)* 2013; 346: 922-930.
49. Koparir M., . Orek C, . Parlak A.E, Soylemez A., Koparir P, Karatepe M., Dastan S.D. Synthesis and biological activities of some novel aminomethyl derivatives of 4-substituted-5-(2-thienyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3- thiones, *Eur. J. Med. Chem.* 2013; 63: 340-346.

Bölüm 6

VİTAMİN K

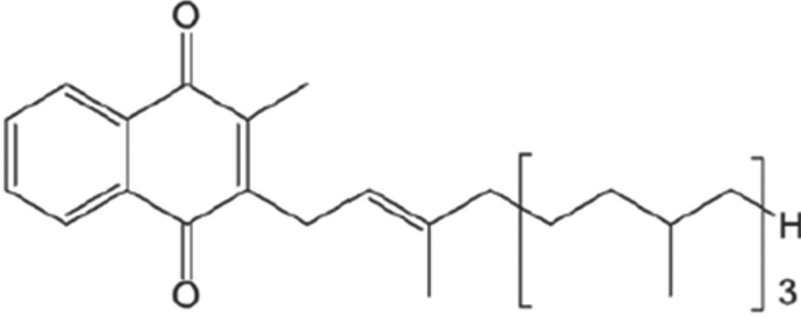
Ayhan VURMAZ¹

VİTAMİN K

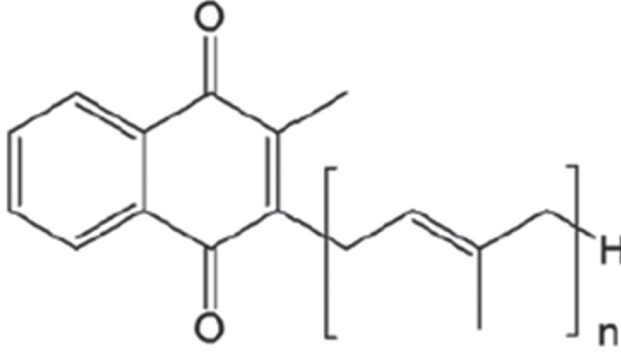
Vitamin K (VK)'nın insan fizyolojisindeki rolü ilk defa 1929'da ortaya çıktı. Danimarkalı bir bilim adamı olan Henrik Dam, kolesterolü azalmış diyetle tavukları beslediği bir deneyde kolesterolün rolünü araştırıyordu. Birkaç hafta sonra tavuklar kanamaya başladı. Arıtılmış kolesterolün diyetle tekrar girmesine rağmen kanama durmadı. Dam, kolesterolün tükenmesi prosedürü sırasında bilinmeyen bir bileşiğin gıdadan çıkarılması gerektiği sonucuna vardı. Bu hipotetik bileşiğin pıhtılaşma sorunundan sorumlu olduğunu ve "pıhtılaşma vitamini" adını verdiğini söyledi. Daha sonra, K harfi bu vitamine atfedilmiştir (1-3).

VK, iki genel kategoriye giren birçok farklı homolog içerir; VK1 (veya fillokinon Şekil 1) ve VK2 (Menakinonlar Şekil 2). VK1; VK'nın ana diyet kaynağını oluşturan bir bileşiktir ve üçü doymuş dört izopren kalıntısından oluşan bir yan zincir taşır. Bitkiler tarafından yapılır ve yeşil yapraklı sebzelerde (örneğin ıspanak, lahana) ve bazı yağlarda (soya fasulyesi, kanola ve zeytin) bol miktarda bulunur. İnsan diyetinde baskın olan VK şeklidir ve tam fonksiyonel aktiviteye sahiptir. ABD, Avrupa ve çoğu Batılı ülkedeki VK baskın diyet şekli fillokinondur, Japonya'daki en büyük form menakinon, özellikle de natto'nun bir bileşeni olan menakinon 7'dir (MK-7). Natto, Kanto, Tohoku ve Hokkaido gibi Japonya'nın doğu bölgelerinde en popüler olanıdır, ancak her alanda tüketilmektedir (4-6).

¹ PhD. Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD. ayhan.vurmaz@gmail.com



Şekil 1: Vitamin K1 (fillokinon) yapısı (7).

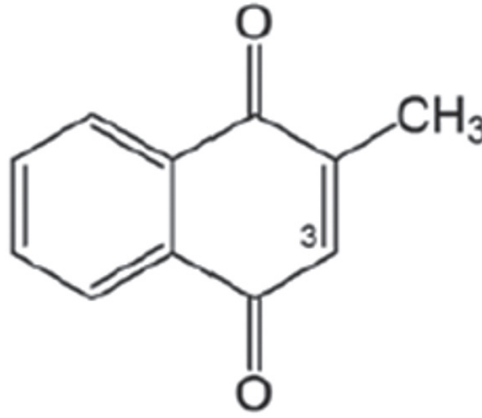


Şekil 2: Vitamin K2 (Menakinon) yapısı (7).

VK2, 4-13 çoğunlukla doymamış izopren kalıntılarında oluşan yan zincirlerinin uzunluğu farklı olan birkaç alt tipte bulunur. Bunlara menakinonlar denir ve MK-n olarak adlandırılır, burada n, izopren kalıntılarının sayısını temsil eder. VK2, bağırsak bakterileri tarafından endojen olarak sentezlenir. MK-10 ve MK-11, Bacteroides, MK-8, Enterobacteria, MK-7, Veillonella, ve MK-6, Eubacterium lentum tarafından sentezlenir. Ayrıca, hayvansal karaciğer ve bazı fermente ürünler gibi sınırlı sayıda gıdada bulunur ve tüketilir. MK-4, menakinonların geri kalan kısmından farklıdır çünkü bakteriler tarafından sentezlenmez, fakat spesifik dokularda (pankreas, testis ve damar duvarı) bir yan zincir çıkarma / ekleme mekanizması vasıtasıyla, ara molekül olarak menadionla dönüştürülür. Diyet filokinonundan dokuya spesifik dönüşümle üretilir. Filokinondan Menadion, sentetik form, hayvansal gıdalarda eklenir ve karaciğerde MK-4'e dönüştürülür. MK-4, in vitro çalışmalarda oksidatif hasara ve enflamatuvar kaskad aktivasyonuna karşı koruma sağlıyor gibi görünmektedir. Ek olarak, murin modellerinde

MK-4 tükenmesinin daha kötü bilişsel performanslarla korele olduğu bulunmuştur. Ayrıca MK-7 gibi daha uzun zincirli minkinononların da MK-4'e dönüştürülebileceğine inanılmaktadır. Her menakinon tam olarak bilinmemekle birlikte halen araştırma konusu olarak kalmaktadır (7-9).

Doğal olarak oluşan fillokinon ve menakinonlara ek olarak, filokinon ve menakinonlarda ortak olan temel yapıyı temsil eden sentetik bir K vitamini formu: menadion veya K3 vitamini (2-metil-1, 4-nafokuinon çekirdek Şekil 3) vardır (7-9).



Şekil 3: Vitamin K3 veya Menadion (2-metil-1, 4-nafokuinon) yapısı (7).

VK'nın pıhtılaşma ile ilişkisi yaygın olarak bilinmektedir. K vitaminine bağlı faktörlerin (II, VII, IX, X, protein C ve protein S) aktivasyonunu sağlayan enzim için bir kofaktör olarak görev yapar. Ayrıca, K vitamini, beyin hücreleri zarının önemli bir bileşeni olan sfingolipitlerin sentezinde bir kofaktör olarak yer almaktadır. İn vitro ve murin modellerinde yapılan birçok çalışma, bu bileşenlerin beyin metabolizmasındaki rolünü vurgulamıştır. Bazı durumlarda, insan çalışmaları ile daha da incelenebilecek nörodejeneratif hastalıklar ile bir korelasyon ortaya çıkmıştır. Bu bilgiler VK eksikliğinin bilişsel bozulmanın başlamasıyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (3,10).

Yakın zamanda keşfedilen bu işlevler, bu vitaminin büyümeyi durduran spesifik 6 protein (growth arrest spesifik 6 protein Gas-6) ve protein S'nin enzimatik aktivasyonuna katıldığını ortaya koyduğu rapor edilmiştir. İlki, anti-apoptotik, mitojenik ve miyelinleştirici bir aktiviteye sahiptir, ikincisi, in vivo ve in vitro olarak iskemik / hipoksik hasar sırasında nöronal koruma sağlar. Ayrıca, VK'nın sfingolipit sentezinin bir indükleyicisi olduğu bilinmektedir. Bu polar lipitler,

merkezi sinir sistemi (MSS) hücre zarının önemli bir parçasıdır ve nöronal proliferasyon ve farklılaşma ile bağlantılıdır (9,11).

Küresel popülasyonun ilerleyen yaşlanmasına bağlı olarak, veriler demans vakalarının 2020 ile 2040 arasında ikiye katlanacağını, 81 milyona çıkacağını ve dolayısıyla toplumun ve ulusal sağlık sistemlerinin yükünün artacağını göstermektedir. Örneğin, Alzheimer'ın ABD'deki hastalık vakaları yüzyılın ortalarında 5.4 milyondan 13.8 milyona çıkacaktır. Bu nedenle nörodejeneratif patolojilerin seyrini etkileyebilecek değiştirilebilir faktörlerin tanımlanması önem arz etmektedir (9).

Gas-6

Gas-6, sinir sisteminin gelişmesinde ve hayatta kalmasında merkezi bir role sahiptir. Ek olarak, nöronal ve glial hücrelerde anti-apoptotik, mitojenik ve miyelinleştirici bir aktivite gösterir. Gas-6, Tyro3, Axl ve Mer (TAM) familyasının reseptör tirozin kinazlarını bağlar ve aktive eder. Bu reseptörlerin aktivasyonu için GAS6'nın γ -karboksilasyonu gereklidir. Axl, çok sayıda hücre tipinin çoğalmasında ve gonadotropin salgılayan hormonun (GnRH) nöronlarının hayatta kalmasında, bulbus olfactorius'dan hipotalamusa geçişinde rol oynar. Mer primer makrofajları oksidatif stres kaynaklı apoptozdan korur (9,12).

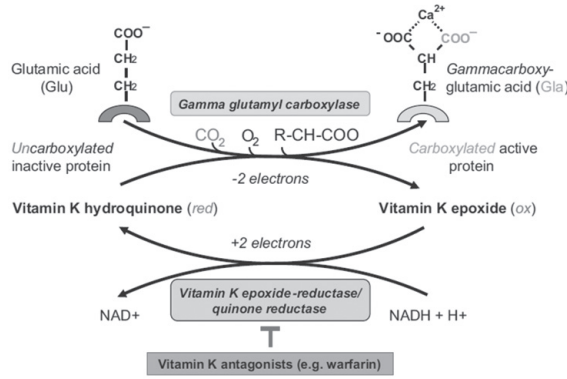
Tyro3'ün hücre sağkalımı üzerindeki spesifik rolü henüz tanımlanmamıştır. Bir *in vitro* çalışma, rekombinant Gas-6'nın, hipokampal sıçanların nöronlarını apoptozdan koruduğunu ve bu proteinin TAM proteinlerinin aktivasyonu yoluyla sağkalımı artırdığı rapor edilmiştir. Axl ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) yollarının aktivasyonu ile, Gas-6, hem nekroz hem de *in vitro* ortamda oligodendrosit sağkalımını ve mikroglial fenotipini modüle eder ve TNF- α kaynaklı apoptozu önler. ve Bu immün düzenleyici rolün, Gas-6'yı otoimmün hastalıklara, daha spesifik olarak multipl sklerozun (MS) patogenezine bağladığı bildirilmiştir (9,13).

Mikroglial hücrelerin murin kültürü kullanılarak geliştirilen çalışmalar, Gas-6'nın İnterlökin-1 β 'nin indüklediği nitrik oksit sentaz ekspresyonunu düşürdüğünü, böylece proenflamatuvar cevabı azalttığını göstermiştir (2019 The Relationships Between Vitamin K and Cognition). Ayrıca, Gas-6, Alzheimer hastalığının bir özelliği olan β -amiloid ile indüklenen apoptozun, düşük voltajlı Ca^{+2} giriş kanallarının inhibisyonu yoluyla azaldığını göstermiştir. Bununla birlikte, daha yeni bir çalışma, Gas-6'nın, etkilerinin β -amiloid birikmesini önlediği Tyro3'ü inhibe ettiği ulunmuştur.

VİTAMİN K İŞLEVİ

Vitamin K fonksiyonunun en erken keşfi, GGCX aktivitesindeki temel rolüydü. GGCX, substrat proteinlerindeki glutamat kalıntılarının gama pozisyonu

karbonuna bir karboksil grubu ekler. Modifiye edilmiş glutamat kalıntısına “Gla” kalıntısı denir. Bu reaksiyon K vitamini hidrokinonunun K vitamini epoksitine oksitlenmesini gerektirir. K vitamininin bu fonksiyonu, K vitamini döngüsel kullanımı için gerekli olan K vitamini epoksit redüktaz (VKOR) adı verilen bir enzimi inhibe ederek varfarin ile bloke edilir. Pıhtılaşma faktörleri II, VII, IX ve X, GGCX için iyi bilinen substratlardır. Pıhtılaşma faktörleri II, VII, IX ve X’in faaliyetlerinin, varfarinin anikoagülan-pıhtılaşma fonksiyonunu açıklayan bu glutamat kalıntılarının γ -karboksilasyonu ile düzenlendiği gösterilmiştir (Şekil 4) (10,11).



Şekil 4: K vitamini döngüsünde, K vitamini bağımlı gama karboksiglütamik asit (Gla) proteinleri karboksilatlanır ve aktive edilir (14).

GGCX, endoplazmik retikulumun zarında bulunur. GGCX’in tipik substratları, N-terminallerinde propeptitlere sahiptir ve substratlar, propeptit içinde korunmuş olan karboksilaz tanıma bölgesi ile GGCX’i bağlar. GGCX’in substratlarının çoğu propeptidin yanında Gla alanına sahiptir, burada çoklu glutamat kalıntılarının γ -karboksilasyonu işlemsel bir şekilde gerçekleşir (Şekil 4). Substratlar karboksilatlandıktan sonra, propeptitlerin uzaklaştırılmasıyla ile olgun bir protein haline gelirler (5,12).

Kemik ve kıkırdak kalsifikasyonunu düzenleyen osteokalsin (ayrıca kemik Gla proteini olarak da adlandırılır) ve matriks Gla proteini (MGP), GGCX’in substratlarıdır. K vitamini eksikliği varsa, K vitaminine bağlı proteinler karboksilasyon durumlarını arttıramaz (ve önemli ölçüde düşük karboksile olurlar), kalsiyum bağlama kapasitelerini kaybeder, böylece kemik metabolizması bozulabilir ve vas-küler kalsifikasyon süreci artar (5,7,12,15).

Diyetle Alımı

VK günlük alımı için öneriler belirsizlik taşımaktadır. ABD Tıp Enstitüsü Mikroblesinler Paneli, sağlıklı bireylerden temsili diyet alımı verilerine dayanarak, tahminen veri eksikliğine bağlı olarak ortalama gereksinimi erkekler için 120 g/gün ve kadınlar için 90 g/gün gibi yeterli bir alım önermiştir. Daha yüksek miktarda K vitamini tüketen kişiler için herhangi bir olumsuz etki bildirilmediği göz önüne alındığında, tolere edilebilir bir üst alım düzeyi saptanmamıştır. 2012 yılında, İtalyan Beslenme Derneği (İBD) tarafından besinler ve enerji için tahmini referans düzeyleri, yaşa göre sınıflandırılmış erkeklerde VK alımı 18-59 yaş grubu için 140 g/gün ve >60 yaş için 175 g/gün olarak önerilmiştir. İngiltere Sağlık Bakanlığı'nın Gıda Politikaları Tıbbi Yönleri Komitesi'nin (COMA) tarafından günlük alım olarak: 1 µg / kg vücut ağırlığı dozunun, muhtemelen kanın pıhtılaşması için yeterli, ancak kemik sağlığı için yetersiz olduğu rapor edilmiştir (7,16).

VK metabolizması hakkındaki bilgilerimizin çoğu özellikle bağırsak emilimi, taşınım, hücre alım ve katabolizma hakkında filokinonla ilgili olmakla birlikte, menakinonlar hakkındaki veriler daha sınırlıdır. Bitkilerden ve bakterilerden elde edilen VK formları, yağ bazlı ve işlenmiş gıdalarda bulunanlardan daha düşük bir biyoyararlanıma sahiptir. Çoğu çalışmada fillokinonun 2 nmol/L'nin altında bir konsantrasyonu olmasına rağmen, 0.22 ila 8.88 nmol/L arasında değişen ortalama plazma konsantrasyonu bildirilmiştir. Batı diyetinde günlük VK alımının 60-200 µg arasında olduğu tahmin edilmektedir. Bunun en büyük bileşeni fillokinon (yaklaşık %90) ve daha az konsantrasyonda menakinondur (%10) (7). Düşük plazma konsantrasyonlarında filokinon düşük doku rezervlerini yansıtır. Yetişkinlerde filokinon konsantrasyonları karaciğerde, kalpte ve pankreasta yaklaşık 10 pmol/g ıslak doku iken beyin, böbrek ve akciğerde (> 2 pmol / g) ise düşüktür. MK-4 konsantrasyonlarının insan beyin ve böbreklerinde (6 pmol/g) ve pankreasta (22 pmol/g) plazma ve karaciğer gibi dokulara oranla daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (17,18).

MK-4'ün fillokinonun endojen dönüşümünden kaynaklandığı göz önüne alındığında, MK-4'ün spesifik doku dağılımı, fillokinondan lokal sentezin bir göstergesidir. MK-4 testislerde, pankreasta ve kan damarlarında sentezlenir. Özellikle, filokinonun MK-4'e dönüşümü doğrudan veya menadion (K3)'e dönüşüm, ardından MK-4'e prenilasyon ile gerçekleşir (7).

VİTAMİN K METABOLİZMASI

Fillokinon bağırsakta doyurulabilir, enerjiye bağlı bir mekanizma (ATP) ile emilirken, MKn kolonda pasif difüzyon mekanizması ile absorbe edilir. Yağda çö-

zünür olan, her iki K vitamini formunun da normal bir pankreas fonksiyonuna ve emilimleri için safra tuzlarının varlığına ihtiyacı vardır. VK plazmada lipoproteinler tarafından taşınır. Bağırsak kanalında sindirimden sonra, diyet VK ve trigliseritler (TG), enterositler içinde karışık miseller oluşturmak için safra tuzları ile emülsifiye edilir ve apolipoprotein A (apoA) ve apoB içeren salgılanan şilomikronlar içinde işlenir ve ardından lenfe salgılanır ve daha sonra kana karışır. Şilomikronlar lipoprotein lipazın (LPL) etkisiyle, periferik yağ veya kas dokularında periferik olarak modifiye edilir ve dolaşıma yeniden girer, ancak VK lipoproteininin çekirdeğinde kalmaya devam eder (7,10).

VK karaciğere geçişinin, aynı lipoprotein yolunu ettiği düşünülmektedir. Aslında, şilomikronlar karaciğere endositoz yoluyla girer ve sonunda daha küçük düşük dansiteli lipoprotein (LDL) partikülleri oluşur, bu süreçte, VK'nın hala lipoproteinlerin lipofilik çekirdeğinde yer aldığı varsayılır (5,7,19).

VK kemik dokusuna alınması ile ilgili olarak, osteoblastların fillokinonlarının çoğunu şilomikronlar yolu ve MK-7'sinin çoğunu LDL yolu ile elde ettiği bilinmektedir. Osteoblastlar, şilomikronlar ve LDL ile etkileşime giren ve partiküllerin ve VK'nın endositoz sürecini başlatan lipoprotein reseptörlerini eksprese eder (5,7).

Karaciğer, aynı zamanda fillokinon ve MK'larda sık görülen K vitamini katabolik yoludur. Poli-izoprenoid yan zincirleri kısılır, ω -oksidasyona ve ardından β -oksidasyona uğrar, bu, yan zincir uzunlukları beş ve yedi karbonlu atomlu (sırasıyla 5C ve 7C metabolitler) olan iki majör aglikon metabolitin oluşumuna yol açar. Son olarak, glukuronik asitle konjügasyondan sonra, metabolitler, esas olarak glukuronitler halinde safra ve idrarla atılır. Metabolitler safrada (yaklaşık %40) ve idrarda (%20) glukuronitler halinde atılır (5,7,19,20).

KAYNAKÇA

1. Jinghe X. Vitamin K and hepatocellular carcinoma: The basic and clinic. World J Clin Cases. 2015;3(9):757.
2. Card DJ, Gorska R, Cutler J, Harrington DJ. Vitamin K metabolism: Current knowledge and future research. Mol Nutr Food Res. 2014;58(8):1590–600.
3. Hatziparasides G, Loukou I, Moustaki M, Douros K. Vitamin K and cystic fibrosis: A gordian knot that deserves our attention. Respir Med [Internet]. 2019;155(October 2018):36–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2019.07.005>
4. Mahdinia E, Demirci A, Berenjian A. Biofilm reactors as a promising method for vitamin K (menaquinone-7) production. Appl Microbiol Biotechnol. 2019;103(14):5583–92.
5. Akbari S, Rasouli-Ghahroudi AA. Vitamin K and Bone Metabolism: A Review of the Latest Evidence in Preclinical Studies. Biomed Res Int. 2018;2018.
6. Kyla Shea M, Booth SL. Concepts and controversies in evaluating vitamin K status in population-based studies. Nutrients. 2016;8(1):1–25.
7. Fusaro M, Gallieni M, Rizzo MA, Stucchi A, Delanaye P, Cavalier E, et al. Vitamin K plasma levels determination in human health. Clin Chem Lab Med. 2017;55(6):789–99.

8. Guralp O, Erel CT. Effects of vitamin K in postmenopausal women: Mini review. *Maturitas* [Internet]. 2014;77(3):294–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.11.002>
9. Alisi L, Cao R, De Angelis C, Cafolla A, Caramia F, Cartocci G, et al. The Relationships Between Vitamin K and Cognition: A Review of Current Evidence. *Front Neurol*. 2019;10(March).
10. Shearer MJ, Newman P. Thematic review series: Fat-soluble vitamins: Vitamin K: Recent trends in the metabolism and cell biology of vitamin K with special reference to vitamin K cycling and MK-4 biosynthesis. *J Lipid Res*. 2014;55(3):345–62.
11. Lacombe J, Ferron M. VKORC1L1, an enzyme mediating the effect of vitamin K in liver and extrahepatic tissues. *Nutrients*. 2018;10(8):1–16.
12. Nollet L, Gils M Van, Verschuere S, Vanakker O. The role of vitamin k and its related compounds in mendelian and acquired ectopic mineralization disorders. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9).
13. Wen L, Chen J, Duan L, Li S. Vitamin K-dependent proteins involved in bone and cardiovascular health (Review). *Mol Med Rep*. 2018;18(1):3–15.
14. Gr€ Ober U, Reichrath J, Holick M, Kisters K. Vitamin K: an old vitamin in a new perspective Vitamin K: A Review of its History. 2014;(December):1–6.
15. Villa JKD, Diaz MAN, Pizziolo VR, Martino HSD. Effect of vitamin K in bone metabolism and vascular calcification: A review of mechanisms of action and evidences. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2017;57(18):3959–70. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1211616>
16. Journal GM, Makale D, Article R. K Vitamini ve Osteoporoz. 2011;17(1):1–7.
17. Shearer MJ, Fu X, Booth SL. Vitamin K Nutrition , Metabolism , and Requirements : *Am Soc Nutr*. 2012;3(August):182–95.
18. Palermo A, Tuccinardi D, D'Onofrio L, Watanabe M, Maggi D, Maurizi AR, et al. Vitamin K and osteoporosis: Myth or reality? *Metabolism* [Internet]. 2017;70:57–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2017.01.032>
19. Schwalfenberg GK. Vitamins K1 and K2: The Emerging Group of Vitamins Required for Human Health. *J Nutr Metab*. 2017;2017:1–6.
20. Vermeer C, Knapen MHJ. Vitamin K and bone. *Diet, Nutr Bone Heal*. 2016;14(2):191–200.

Bölüm 7

LABORATUVAR TIBBİNDA PREANALİTİK HATA KAYNAKLARI VE ÇÖZÜM ÖNERİLERİ

Aysun EKİNCİ¹

Klinik laboratuvarlar hasta güvenliğini sağlamada önemli bir role sahiptir. Laboratuvarlarda kalitenin temeli hasta güvenliği, hataların ölçülmesi ve hastaya zarar verilmemesine dayanır (1).

Laboratuvarlarda test süreci üç ana faz içerir; preanalitik (analiz öncesi) faz, analitik faz, postanalitik (analiz sonrası) faz. Laboratuvar tanısında ortaya çıkan hataların yaklaşık %60-70 kadarı preanalitik dönemden kaynaklanır. Test seçimi, numune toplanması, tanımlama, etiketleme ve transfer aşamalarını içeren bu dönem pre-pre analitik faz olarak isimlendirilir (2).

Literatürde laboratuvar tıbbındaki hataları tanımlamak için kullanılan pek çok farklı terimin çoğu (örneğin, hatalar, kusurlar, aykırı değerler, kabul edilemez sonuçlar ve kalite yetersizliği), suçlama, bireysel başarısızlık ve suçluluk duygusuyla ilgili olumsuz çağrışımlara sahiptir; sınırlı sayıda toplam test süreci (TTP) adımına odaklanmaktadır. Yapılan son ve ilginç bir öneri, daha önce bildirilen terimlerle ilişkili olumsuz çağrışımları ve ilgili suçluluk ve suçlama korkusunu hafifleten “kalite başarısızlığı” gibi tarafsız bir terim kullanmaktır. Bu tanım, süreçler ve prosedürler yerine hasta bakımı ve hasta sonuçlarına net bir şekilde odaklanır. Bununla birlikte, “hata” terimi tıbbi literatürde kullanılmaktadır ve bu nedenle, özellikle daha geniş hata tanı konusunun bir parçası olduklarından, laboratuvar tıbbındaki hatalar için de kullanılmalıdır. Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO/TS 22367) tarafından yayımlanan yazıda, laboratuvar hatasını şu şekilde tanımlamaktadır:

Planlanan eylemin amaçlanan şekilde yerine getirilmemesi veya laboratuvar döngüsünün herhangi bir bölümünde meydana gelen, test isteminden raporlama sonuçlarına ve uygun şekilde yorumlama ve cevap verme gibi amaçlara ulaşmak için yanlış bir plan kullanma.

Bu kapsamlı tanımın birçok avantajı vardır ve özellikle, laboratuvar testlerinde hasta merkezli hata değerlendirmesini teşvik eder. “Hasta merkezli bakımın teş-

¹ Dr. Öğrt. Üyesi, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.
draysunekinci@gmail.com

vik edilmesinin, TTP'de ortaya çıkabilecek ve sonunda hasta üzerinde olumsuz etkiye neden olabilecek olası herhangi bir kusuru araştırma ihtiyacına çevrilmesi gerektiği vurgulanmıştır. Hastanın bakışı açısından, bir laboratuvar testiyle ilgili herhangi bir doğrudan veya dolaylı olumsuz sonuç, kaynağın analitik öncesi veya sonrası aşamada olup olmadığından bağımsız olarak göz önünde bulundurulmalıdır; ayrıca, bir hatanın laboratuvar uzmanı tarafından mı (örn. kalibrasyon veya test hatası) veya laboratuvar dışı bir operatör tarafından mı (örneğin hasta/numune yanlış tanımlaması, uygun olmayan test talebi veya yorumlanması) meydana geldiği ile ilgili değildir. Bu nedenle, TTP, hem 'geleneksel' klinik laboratuvarlarda hem de hasta başı test cihazlarında laboratuvar hatalarını tespit etmek ve tanımlamak için benzersiz bir çerçevedir.

Hataları test etmeyi ve disiplinde hasta güvenliğini arttırmayı amaçlayan girişimlere doğru atılan önemli bir adım, laboratuvar testlerinde kapsamlı bir hata tanımı üzerinde uzlaşma sağlandıktan sonra gerçekleştirilecektir. Laboratuvar tıbbındaki hatalar, tespit edilmeleri zor olduğu ve buldukları zaman diğer tıbbi hata türlerinden daha az kolay anlaşıldığı için özünde belirsizdir. Ameliyatla ya da sıklıkla göze çarpan ve belirgin olan diğer tedavi hatalarıyla ilgili advers olaylarla karşılaştırıldığında, laboratuvar hatalarını zamanında ve yerinde tespit etmek daha sinsi ve zor olma eğilimindedir. Zorluklar, büyük ölçüde, içerdiği birkaç adımın olmasına bağlıdır. İlk olarak, laboratuvar testlerinde, doktorların istemleri ve hasta sonuçları arasında zaman farkı olmasıdır. Hasta müdahalesine en yakın süreç basamaklarındaki olası hataların, aslında hastanın yaralanmasına ya da zarar görmesine neden olma olasılığı daha yüksektir. Süreçte daha önce meydana gelen başarısızlıkların, süreç bozulmasına yol açması daha muhtemeldir, ancak aktif ve pasif savunma bariyerleri - teknolojiye, insanlara dayanan, prosedürler ve idari kontroller - potansiyel zararlarını azaltabilir veya nihai advers olay üzerindeki etkilerinin tanınmasını önleyebilir. İkincisi, test süreci karmaşıktır, çok sayıda adımdan oluşur ve birden fazla sağlayıcıya uzanır. Ayrıca, yalnızca analitik faz laboratuvar kontrolüne girerken, analitik evre öncesi ve sonrası aşamalar klinisyen, hemşire, hasta ve hasta tanımlaması, veri girişi, numune toplama gibi laboratuvarlar dışındaki farklı paydaşlarla ilgilidir.

Laboratuvar tıbbında hata alanındaki ilk çalışmalar, analitik hataların tanımlanmasına ayrılmıştır; analitik faz, laboratuvar çalışmasının "çekirdeğidir" ve laboratuvar personelinin kontrolünde bulunan analitik süreçlerdir. Literatürde toplanan ve raporlanan verilerin, 1947'de Belk ve Sunderman tarafından yayınlanan ve 90'lı yıllardaki Amerikan Patologlar Koleji tarafından toplanan sonuçlarla ve son olarak da Witte ve çalışma arkadaşlarının 1997'de, hata oranlarının milyon laboratuvar başına 162.116 laboratuvar testinden (milyon başına kısım, ppm) 447

ppm'ye düştüğünü göstermektedir. Hatalardaki yaklaşık 300 katlık bu çarpıcı ve etkileyici azalma, otomasyon, gelişmiş laboratuvar teknolojisi, test standardizasyonu, iç kalite kontrolü için iyi tanımlanmış kurallar, etkili kalite güvence programları ve daha iyi eğitilmiş personelden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, yakın zamanda toplanan veriler analitik kalitenin hala önemli bir konu olduğunu göstermektedir. Westgard, yaygın klinik kimya ve pıhtılaşma testleri için σ skalasındaki tahminlerin en iyi ihtimalle 3 ila 4 σ arasında değiştiğini ve bunun tatmin edici olmadığını göstermiştir. Tatminkar olmayan analitik performans sadece klinik kimya alanında değil, aynı zamanda hematoloji, pıhtılaşma ve moleküler biyoloji testlerinde açıklanmıştır. Özellikle, ilişkili olumsuz klinik sonuçları olan immünolojik testler için nispeten yüksek bir analitik hata sıklığı belgelenmiştir. Bazı durumlarda, bağışıklık tahlillerinde analitik girişim, fena halde hatalı sonuçlara neden olmuştur. Son zamanlarda, glukoz, bilirubin, C-reaktif protein, kreatinin ve albümin dahil birçok laboratuvar ölçümünde para-proteinlerin etkileşimi hakkında toplanan veriler, bu tür hata sıklığının değişken olduğunu ve muhtemelen yeterince bildirilmediğini göstermektedir.

Daha önce vurgulandığı gibi, son birkaç on yılda elde edilen analitik hatalardaki etkileyici azalma ve sigma ölçeğinde değerlendirildiğinde analitik kalitenin tatmin edici olmadığına dar mevcut bir kanıt yoktur ve Altı Sigma amaç sağlama için mevcut en iyi yaklaşımlardan biri olmuştur. Bu nedenle, analitik kalitede elde edilen etkileyici iyileşmeye rağmen, bir kanıtlar grubu daha fazla iyileştirmenin gerekli olduğunu göstermektedir. Bu, günlük uygulamada kanıta dayalı analitik kalite spesifikasyonlarının belirlenmesi ve kullanılmasıyla sağlanmalıdır (3).

Preanalitik hataların daha önce laboratuvar işlemlerinde hataların önemli bir oranına katkıda bulunduğu ve bir dizi hasta güvenliği riskine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. ISO 15189: 2012'ye göre akreditasyon, laboratuvar Kalite Yönetim Sistemlerinin uyumsuzlukların tanımlanması ve kontrolü, sürekli iyileştirme, iç denetim ve kalite göstergeleri gibi alanlarda preanalitik süreçlerin etkisini ele almasını gerektirmektedir. Önceki çalışmalar, preanalitik kalite göstergeleri için tanım ve toplama yöntemlerinde geniş bir varyasyon olduğunu göstermiştir. Laboratuvar Hataları ve Hasta Güvenliği Uluslararası Klinik Kimya Çalışma Grubu, preanalitik aşama için bir dizi kalite göstergesini tanımlamıştır ve uyumlaştırılmış tanımların benimsenmesi, laboratuvarlar arası karşılaştırmaları ve sürekli gelişmeyi destekleyecektir. Denetim, manuel kayıt işlemleri, olay raporlama mekanizmaları ve laboratuvar bilgi sistemleri dahil olmak üzere çeşitli veri toplama yöntemleri vardır. Kıyaslama, istatistiksel süreç kontrolü, Pareto analizi ve başarısızlık modu ve etki analizi gibi kalite yönetimi süreçleri verileri gözden geçirmek için kullanılabilir ve klinik yönetim mekanizmalarına dahil edilmelidir. Laboratuvar

bilgi yönetim sistemlerinin preanalitik hatalar için bir kayıt mekanizması olarak kullanılması tavsiye edilmektedir. Çünkü bu, veri yakalamanın en kolay ve en standartlaştırılmış mekanizmasını sağlar (4).

Pre-preanalitik dönemde reddedilen numuneler, tekrar numune gönderilmesini gerektirdiğinden zaman, işgücü ve maddi kayıplara yol açmaktadır. Bu kayıpları azaltmak için numune ret sıklıklarının belirleyip hataları analiz eden pek çok çalışma yayınlanmıştır (5-9).

Sağlık Bakanlığı Kalite ve Performans Yönergesi gereği reddedilen örnekler için her laboratuvar kendi pre-pre-analitik hata sınıflamasını hazırlamalıdır. Bizim laboratuvarımız için hazırladığımız sınıflama: hemolizli numune, ikterik numune, lipemik numune, pıhtılı numune, yetersiz numune, fazla numune, yanlış tüp, yanlış istem, hatalı barkodlama, kayıt iptali, tekrarı uygundur (9).

Numune ret oranları şu formüle göre hesaplanır: (Reddedilen numune sayısı/ Toplam kabul edilen numune sayısı)×100

Numune ret oranlarını inceleyen çalışmalarda farklı oranlar bulunmuştur (%0.25, % 0.5, %1.14, %2.7, %1.29) (5-9). Yapılan çalışmalarda laboratuvar birimleri ve çalışan insan faktörü farklılık gösterdiğinden sonuçlar farklı çıkabilir.

College of American Pathologists (CAP) tarafından hazırlanan preanalitik kalite değerlendirme programlarında (10) ve yapılan diğer çalışmalarda hemolizli örneklerin en sık gözlenen hatalar olduğu belirlenmiştir (11-5). *In vitro* hemolizi tetikleyen ekipman, teknik ve kan alabilme yeteneğidir (2). Özellikle küçük ve yüzeysel venlerden kanın çok şiddetli çekilmesi (artmış aspirasyon gücü), kateterin kısmen tıkalı olması, kanı enjektörden tüpe hızla aktarma, donmuş numune, pnömatik tüplerde kuvvetli basınca maruz kalma ya da taşınırken numunenin kuvvetle sallanması, analizde gecikme *in vitro* hemoliz nedenleri arasında sayılabilir (12).

Hemoliz, analitik evre öncesi laboratuvar hatalarının önde gelen bir nedenidir. Katkıda bulunan faktörlerin belirlenmesi, hemolizin azaltılması ve önlenmesi için etkili uygulamaların geliştirilmesine yönelik önemli bir adımdır. Yapılan bir çalışmada literatürde yayınlanan 40 çalışma değerlendirilmiş, hemoliz oranlarının acil servislerde daha yüksek olduğunun gözlemlendiği tespit edilmiştir. Örnekler profesyonel flebotomistler tarafından toplanmadığında, daha büyük hacimli numune tüpleri kullanıldığında, numune tüpleri yarıdan daha az doldurulduğunda ve turnike süresi bir dakikadan fazla olduğunda oranlar daha yüksektir. Bu çalışmanın sonuçları, hastanelerin ve klinik laboratuvarların acil servislerde flebotomistleri dağıtmasını, tüm kanı bir damardan geçirmeyi, antekübital bölgeyi optimum kan toplama bölgesi olarak kullanmasını ve örneklerin laboratuvar asistanı

ya da diğer personel tarafından taşınmasını, bu pratik olarak mümkün değilse pnömatik taşıma sistemlerinin validasyonu, bakımının yapılması ve izlenmesinin sağlanmasını önermektedir. Ayrıca çalışmalar hemolizin yüksek kalitede personel eğitimi sağlanmasını ve hemolizi azaltmak için standart çalışma prosedürlerine uyulmasını tavsiye etmektedir (13).

Acil servis dışındaki birimlerde eğitilmiş flebotomistler tarafından kan alındığından hemoliz oranları daha azalmaktadır bu da eğitimin hemolize bağlı ret oranlarını azaltmada önemini göstermektedir (14-16). Hemoliz oranlarını etkileyen faktörlerin farkındalığı ve bu risk faktörlerini hafifletmek için stratejilerin benimsenmesi, hemoliz oranlarını azaltmak ve hasta bakım kalitesini artırmak için kaliteli uygulamalar oluşturma yolunda önemli bir adımdır (13).

Son yıllarda hastane bilgi yönetim sistemine Serum İndeksleri (HIL: Hemoliz, İkter, Lipemi) tanımlanmasıyla hemoliz nedenli numune red sayıları önemli ölçüde azalma göstermiştir (19,20,9). Bizim çalışmamızda hemolize bağlı numune ret oranları oldukça düşük görünmektedir. Biyokimya otoanalizör cihazımıza HIL indeksi tanımlandığından hemolizli, ikterik ve lipemik numuneler cihazda çalışılıp HIL indeksine göre hesaplanarak sonuçların verilmesi sağlanmıştır. Bu da hemoliz, ikter ve lipemiye bağlı ret oranlarını düşürmüştür (9).

Hemolizi azaltmaya yönelik tasarlanan kan alma aparat veya cihazları ile yapılan çalışmalarda, acil servis hastalarında hemoliz oranlarını azaltmaya katkı sunduğu gösterilmiştir (19,20). Bu aparat veya cihazların kullanımı özellikle hemolizli numunelerin sık görüldüğü acil servis (21) başta olmak üzere, diyaliz ve yoğun bakım ünitesi gibi özellikli birimlerde yaygınlaştırılabilir.

Hastanemiz laboratuvarında yaptığımız çalışmada ilk 3 sıradaki numune ret nedenleri sırasıyla, pıhtılı numune, yetersiz numune ve fazla numune olarak tespit edildi (9). Yapılan farklı çalışmalarda da pıhtılı numune ve yetersiz hacim en sık ret nedenleri olarak karşımıza çıkmaktadır (6,8). Pıhtılı numunenin en önemli sebebi, kanın tüpe alındıktan sonra antikoagülan madde ile karışması için yeterli miktarda alt üst edilmemesidir. Toplandıktan sonra kanın antikoagülan ile uygun olmayan şekilde karıştırılması pıhtılaştırmış örnekleri açıklayabilir. Kan tüpe alındıktan sonra nazıkçe alt üst edilerek kanın antikoagülan katkı maddesi ile karıştırılması vakumlu tüp üreticileri ve Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) belgeleri tarafından tavsiye edilir (22,23). Kliniklerde kan gazı numuneleri alındıktan hemen sonra gönderilmeyip tüm numuneler alındıktan sonra toplu şekilde gönderildiği durumlar olabilir. Bunun için hastane bilgi sisteminde konu ile ilgili yapılması gereken doğru uygulamayı duyurarak tüm birimlerin haberdar olmasını sağlayabiliriz. Hemogram numunelerindeki pıhtıya bağlı ret oranlarını

azaltmak için eğitimlerde doğru kan alma ve tüp karıştırma tekniğinin önemini vurgulanabilir. Prematüre bebekler, yenidoğan, onkoloji ve yoğun bakım ünitesinde tedavi gören hastalardan yeterli hacimde kan almanın zorluğu bilinmektedir. Bu tür hastalar için üretilen mikrotüplerin yaygın kullanımını az miktarda örnek hacmi ile doğru test sonucuna ulaşmamızı sağlayabilir.

Yetersiz numuneler sıklıkla hemogram, koagülasyon ve sedimentasyon birimlerinde çalışılan numunelerde görülmektedir (9). Her üçü de antikoagülan içeren katkı maddeleri bulundurduğundan yeterli hacimde kan ile tüplerin üzerindeki dolum çizgisine kadar doldurulması gerekmektedir.

Fazla numuneye bağlı ret oranı sıklıkla sedimentasyon çalışılan birimlerde karşımıza çıkar (9). Eğitimlerde kan alan personellere sedimentasyon tüpü üzerinde bulunan dolum çizgisini geçmeyecek şekilde kanın doldurulması gerektiği vurgulanmalıdır.

Günümüzde barkodlama sistemlerinin kullanımının yaygınlaşması nedeniyle hata oranının düşmesi beklenmektedir. Çalışmalar, elle etiketleme ve hasta bilgilerinin girilmesi ile artan sayıda hata olduğunu göstermektedir (24-27). Barkod sistemleri kullanımının zamanla artması preanalitik hataları azaltmada yarar sağlamıştır.

7 gün-24 saat hizmet veren laboratuvarlarda kalite gereklerinin uygulanması ve takibi çok önemlidir. Preanalitik hataları azaltmak için düzeltici ve önleyici faaliyetler gerçekleştirip kayıt altına alınmalıdır. Bu kapsamda çözüme yönelik pratik ve akılcı yaklaşımlarla eğitim başlıkları oluşturulmalı, böylece hatalar oluşmadan önlenmeli eğer hata oluştuysa gözden kaçmadan tespit edilmelidir.

Test sonuçlarının doğru ve güvenilir olması hastaların doğru tanı ve tedavi hizmeti almasını sağlayacaktır. Hasta güvenliği kaliteli laboratuvar hizmetlerinde önemli bir esastır. Ayrıca test sonuç verme süresini (TAT) azaltarak zaman ve gereksiz test kayıplarının önüne geçebilir, böylece ekonomiye katkı sunabiliriz (9).

KAYNAKLAR

1. Plebani M. The CCLM contribution to improvements in quality and patient safety. Clin Chem Lab Med 2013;51(1): 39-46.
2. Lippi G, Chance JJ, Church S, Dazzi P, Fontana R, Giavarina D, et al. Preanalytical quality improvement: from to reality . Clin Chem Lab Med 2011; 49(7):1113-26
3. Plebani M. The detection and prevention of errors in laboratory medicine. Ann Clin Biochem. 2010; 47 :101-10.
4. West J, Atherton J, Costelloe SJ, Pourmahram G, Stretton A, Cornes M. Preanalytical errors in medical laboratories: a review of the available methodologies of data collection and analysis. Ann Clin Biochem. 2017; 54(1): 14-19.
5. Aykal G, Yeğın A, Aydın Ö, Yılmaz N, Ellidağ HY. Preanalitik süreçteki ret oranlarının azalmasında eğitimin önemi. Turk J Biochem 2014; 39(4):562-566.

6. Öz L, Kocer D, Buldu S, Karakükcü Ç. Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarında Pre-preanalitik Hataların Analizi. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2016; 14(1): 6-11.
7. Zeytinli Akşit M, Yalçın H, Tonbaklar Bilgi P, Avcı R, Karademirci İ, Buzkan E, Abakay S, Çolak A. Acil laboratuvarımızda preanalitik kaynaklı ret nedenlerinin değerlendirilmesi. *Tepecik Eğitim Hast Derg* 2016; 26(1):41-45.
8. Sinici Lay İ, Pınar A, Akbıyık F. Classification of reasons for rejection of biological specimens based on prepreanalytical processes to identify quality indicators at a university hospital clinical laboratory in Turkey. *Clin Biochem* 2014; 47(12):1002-1005.
9. Ekinci A. Laboratuvarıda numune redlerinin analizi ve eğitimin etkisi. *Van Med J.* 2019;26 (1): 79-84.
10. Lopis M, Alvarez V, Martínez-Brú C, Gómez R, Barba N, et al. Quality Assurance in the Pre-analytical Phase. In (Ed. Ivanov O) *Applications and Experiences of Quality Control*, 2011, pp. 185-204, In Tech Open Access Publisher, Rijeka, Croatia.
11. Stark A, Jones BA, Chapman D, Well K, Krajenta R, et al. Clinical laboratory specimen rejection-association with the site of patient care and patients' characteristics: findings from a single health care organization. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131(4):588-92.
12. Dasgupta A, Sepulveda JL (2015). *Tıbbi laboratuvarıda doğru sonuç: Hataların tespiti ve düzeltilmesi için rehber*. Elsevier Inc., USA. Çeviri Editörü: Turan Turhan. Palme yayıncılık, Ankara.
13. McCaughey EJ, Vecellio E, Lake R, Li L, Burnett L, Chesher D et al. Key factors influencing the incidence of hemolysis: A critical appraisal of current evidence. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2017; 54(1):59-72.
14. Vermeer HJ, Thomassen E, deJonge N. Automated processing of serum indices used for interference detection by the laboratory information system. *Clin Chem* 2005; 51:244-7.
15. Yazar H, Yucel M, Bozkurt B, Pekgor A, Kadilar O. A New Method for the Prevention of Pre-Analytical Errors due to Hemolysis: Intensive Training. *Clin Lab.* 2016; 62:1501-05.
16. Ekinci A. Pediatri hastalarında numune red analizi ve eğitimin etkisi. *KBUD Pediatri Örneklerinde Preanalitik Değişkenler Sempozyumu*. 27 Nisan 2017, Ankara, Türkiye. S-02.
17. Agarwal S, Vargas G, Nordstrom C, Tam E, Buffone GJ, Devaraj S. Effect of interference from hemolysis, icterus and lipemia on routine pediatric clinical chemistry assays. *Clin Chim Acta.* 2015; 438: 241-5.
18. Shin DH, Kim J, Uh Y, Lee SI, Seo DM, Kim KS et al. Development of an integrated reporting system for verifying hemolysis, icterus, and lipemia in clinical chemistry results. *Ann Lab Med.* 2014 Jul;34(4):307-12.
19. Kesaplı M, Gungor F, Aykal G, Gogebakan A, Akyol C, Taylan Kilic T. et al. The Effectiveness of Using Luer-Lok (Bd Vacutainer®) In Reducing Hemolysis Rates in Busy Emergency Departments. *J Nurs Care* 2016, 5:3.
20. Ekinci A, Akcan Duman B, Arslan R, Işık B, Güloğlu C. Acil servis hastalarına Luer-Lok™ BD Vacutainer® kullanımı hemolizli kan örneği oranını azaltır mı? *KBUD Uluslararası Katılımlı Kongre & LAB EXPO 2017*, 1 – 5 Ekim, Antalya, Türkiye. SS-21.
21. Lippi G, Plebani M, Di Somma S, Cervellini . Hemolyzed specimen: a major challenge for emergency departments and clinical laboratories. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2011;48: 143-53.
22. Clinical Laboratory Standards Institute. Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests. CLSI H18-A4 document. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2010.
23. Clinical Laboratory Standards Institute. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma- Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays. CLSI H21-A5 document. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2008.
24. Bhat V, Tiwari M, Chavan P, Kelkar R. Analysis of laboratory sample rejections in the preanalytical stage at an oncology center. *Clin Chim Acta* 2012;413(15-16):1203-6.
25. Dale Jane C, Novis David A. Outpatient phlebotomy success and reasons for specimen rejection: a Q-probes study. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126(4):416-9.

Güncel Biyokimya Çalışmaları II

26. Goswami B, Singh B, Chawla R, Mallika V. Evaluation of errors in a clinical laboratory: a one-year experience. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48(1):63-6.
27. Wiwanitkit V. Types and frequency of preanalytical mistakes in the first Thai ISO 9002:1994 certified clinical laboratory, a 6-month monitoring. *BMC Clin Pharmacol* 2001;1:5.

Bölüm 8

İNSÜLİN DİRENCİ VE GÜNCEL GELİŞMELER

Kamile YÜCEL¹

GİRİŞ

Diyabet hastalığının sıklığı son yıllarda giderek artmaktadır. TURDEP-II (Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II) sonuçları ülkemizde diyabet sıklığının %13,7'ye kadar yükseldiğini göstermektedir. Erişkinlerde olduğu gibi çocuklarda da obezite sıklığındaki artışa paralel olarak insülin direnci, tip 2 diyabet, metabolik sendrom sık görülmekte ve yol açtığı sorunlar yaşam süresini kısaltmaktadır. Bu artışa insülin direnci insidansındaki yükselişin sebep olduğu düşünülmektedir (Satman İ, 2010).

İnsülin direncine geçmeden önce insülin hormonu ve reseptöründen yerinde olacaktır.

İnsülin Sentezi ve Sekresyonu

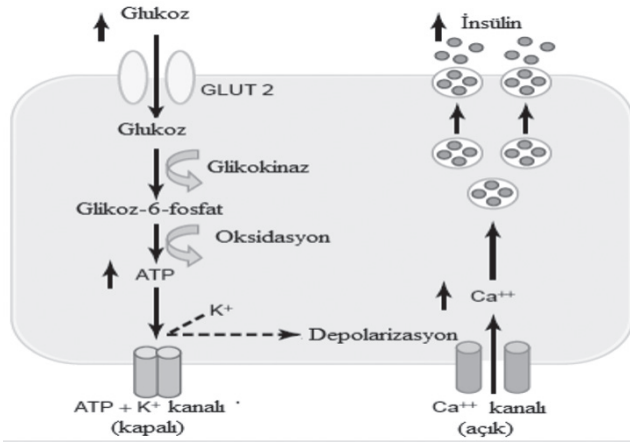
Saflaştırılan, kristalleştirilen ve sentezlenen ilk hormon olan insülin, tüm peptid hormonlar için bir model oluşturmaktadır. 1921 yılında Banting ve Best tarafından asit-etanol karışımı kullanılarak pankreas dokusundan hipoglisemik etkili insülin adı verilen bir adacık hücre faktörü izole edilmiştir. Kısa bir süre içinde diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Molekül ağırlığı 5.8 kDa olan insan insülini, iki polipeptid zinciri (A, B) içeren küçük globüler bir proteindir. Bu iki zincir A7'yi B7'ye ve A20'yi B19' a bağlayan iki tane zincirler arası disülfid köprüsüyle birbirine bağlanmıştır. Zincirler arasında yer alan bu disülfid köprülerinin yanı sıra üçüncü bir disülfid köprüsü A zincirin 6. ve 11. amino asitlerini birbirlerine bağlamaktadır. İnsülin yapısında yer alan disülfid köprüleri biyolojik aktivite için gerekli olan kısımlardır. İnsülin molekülü ile ilgili türler arasında belirlenen farklılıklar A ve B zincirlerinin değişik konumlarındaki amino asitlerin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Bu iki zincir birbirinden ayrıldığında, insülin molekülünün işlevsel etkinliği ortadan kalkmaktadır (Guyton AC, 2006).

Pankreasta preproinsülin adı verilen, N terminal amino ucunda salgı keseciklerine geçişini yönlendiren, pre sinyal dizisine sahip, tek zincirli, inaktif bir öncül

¹ Dr. Öğr. Üyesi, KTO Karatay Üniversitesi, kamile_yucel@hotmail.com

olarak sentezlenir. Proinsülin oluşturmak üzere kısmi proteolizle ER'da parçalanır ve pankreasın β hücrelerindeki salgı granüllerinde depolanır. Kan glikozu, insülin salgılanmasını tetikleyecek seviyeye yükseldiğinde, proinsülinin yapısındaki iki peptit bağının golgide koparılmasıyla aktif insülin oluşturulur. İnsülinin plazmadaki yarı ömrü 3-5 dakika kadar olduğundan hemen plazmadan temizlenir (çoğunlukla karaciğer olmak üzere böbrek ve plasenta tarafından). İnsan pankreası 40-50 ünite insülin salgılamakta olup bu da bezde depolanmış hormonun %15-20'sini temsil eder.

İnsülin sentezini ve salınımını en güçlü fizyolojik uyarıcı plazma glikoz konsantrasyonunun artmasıdır. İnsülin salınımı için eşik değer yaklaşık 80 mg/dL'dir. İnsülin salınırken yeni insülin moleküllerinin sentezi de uyarılır. Bu şekilde salgılama kan glikoz düzeyi düşene kadar devam eder. En yüksek insülin seviyelerine karbonhidrattan zengin bir yemekten yaklaşık 30-45 dakika sonra ulaşılır. Bu düzeyler yemekten yaklaşık 120 dakika sonra, kan glikoz konsantrasyonunun düşmesi ile birlikte bazal seviyelere geri döner. Kan glikozu yükseldiğinde glikoz transporter 2 (GLUT 2) taşıyıcıları glikozu pankreas β hücrelerine taşır ve glikoz burada hemen heksokinaz tarafından glikoz-6-fosfata çevrilerek glikolize girer. Glikoz katabolizmasının hızı arttığında ATP artarak hücre zarındaki ATP-kapılı K^+ kanallarının kapanmasına sebep olur. K^+ çıkışının azalması zarda depolarizasyona neden olur. Bu da voltaj-kapılı Ca^{+2} kanallarını açar ve sitozolde meydana gelen Ca^{+2} artışı ekzositoz yoluyla insülin salgılanmasını tetikler (Şekil 1). Parasempatik ve sempatik sinir sistemi uyarıları da insülin salınımını etkiler (Tip 2 diabetes mellitus tedavisinde kullanılan sülfonilüre grubu ilaçlar, K^+ kanallarının kapanmasını ve insülin salgılanmasını uyarır).



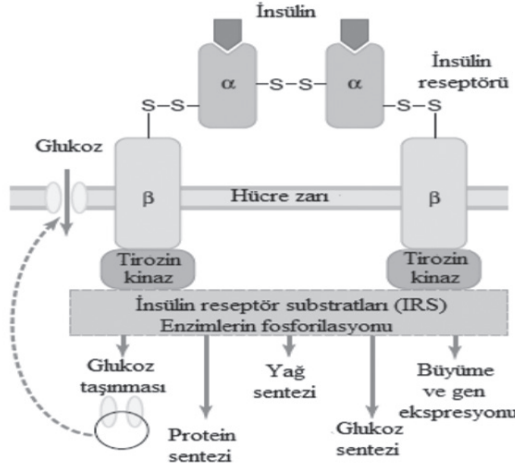
Şekil 1. Pankreastan insülin salgılanmasının glikoz ile uyarılması (Betacell Bilyo, 2004)

İnsülin salgılanmasını glikoz, arginin ve lösin gibi monomerler ve çeşitli hormonlar düzenlemektedir. Bununla birlikte proteinden zengin bir yemek sonrasında salınan insülin miktarı karbonhidrattan zengin bir yemek tarafından salınandan çok daha düşüktür. Yemek yenilmesinden sonra salınan bağırsak hormonları olan Gastrik İnhibitör Polipeptit (GİP) ve Glukagon Benzeri Peptit 1 (GLP-1) de insülin salınmasının başlamasına yardım ederler. Açlık, stres, travma ve aşırı egzersize yanıt olarak salgılanan adrenalin, insülin salınımını azaltır. Adrenalin salınımı enerji kullanıldığını bildirir ve insülin enerji depolanmasını uyardığı için daha az miktarda insülin salgısına ihtiyaç olduğuna işaret eder. Büyüme hormonu, kortizol, östrojenler ve progesterinlerin yüksek düzeylerine uzun süre maruz kalma insülin salgılanmasını artırır. Gebeliğin son evrelerinde insülin salgılanmasında ortaya çıkan artışın sebebi de budur (Pacini G, 2017).

İnsülinin Etki Mekanizması

İnsülin hücre içine giremez, ancak plazma zarı reseptöründen sitozoldeki insülin duyarlı enzimlere ve belirli genlerin ifadesini uyardığı çekirdeğe uzanan çok dallı bir yolak boyunca giden bir sinyal başlatır. İnsülinin etkilerini oluşturan insülin değil, aktifleşmiş reseptördür. Hormonun ilk mesajı aktive edilmiş reseptör ve ikinci haberci tarafından hücre içi enzimlere aktarılır.

İnsülin reseptörü, 'Büyüme Faktörü Reseptör Ailesi' üyesidir. Sürekli yapı- lıp yıkılmaktadır. İnsülin reseptörünün iki alt ünitesi bulunmaktadır: Tamamen ekstraselüler olan ve yapısında sisteinden zengin bölgeler bulunan α alt ünitesine insülin bağlanır ve daha büyüktür. Transmembran proteini olarak işlev gören ve sinyal iletiminden sorumlu olan β -alt ünitesinin sitozoldeki kısmı, ATP'den belirli hedef proteinlere bir fosfat grubu aktarılmasını sağlayan tirozin kinaz aktivitesine ve otofosforilasyon noktasına sahiptir (Şekil 2). β subunit ile α subunit disülfid bağı ile bağlıdır. İnsülin, kendi reseptörlerinin yanı sıra daha düşük düzeylerde somatomedinler ve insülin benzeri bazı büyüme faktörlerine ait reseptörlere de bağlanabilmektedir (Hubbard SR, 2007).



Şekil 2. İnsülin reseptörünün şematik görünümü (Guyton AC, 2006)

İnsan vücudunda, birçok hücrede insülin reseptörü mevcuttur. İnsülin reseptörleri insülini hızlı, yüksek özgüllükle ve pikomolar düzeyde bile tanıyarak bağlarlar. İnsülin reseptör bağlantısı sonrasında β alt birimin otofosforilasyonu, lokal tirozin kinazı aktive eder ve sinyal proteinler uyarılır. İnsülinin belirli genlerin ifadenmesini düzenlediği sinyal yolağı, her biri diğerinin aktifleşmesine yol açan bir protein kinazlar kademesinden oluşur. İnsülin reseptörü, sinyal proteinlerinden insülin reseptör substrat-1 (IRS-1) olarak bilinen başka bir grup hücre içi enzimin fosforilasyonuna neden olur ve IRS-1, insülinin metabolik etkilerinden sorumlu molekülleri aktive eder. Bu moleküllerden biri fosfotidlinositol-3-kinaz (PI-3-kinaz) dır. PI-3-kinazdır en önemli görevi intraselüler bölümden hücre zarına insüline bağımlı glukoza transportundan sorumlu GLUT-4 translokasyonunu sağlamaktır, böylece glükozun hücre içine alınımını artırır. Böylelikle periferik dokuda insülin, GLUT-4 aracılığıyla glükozun hücre içine alınıp kullanılmasını sağlar (Thong F, 2005).

İnsan vücudunda kan glükozunu yükselten çok sayıda hormon ve mekanizma vardır. Kan glükozunu düşürmek görevinin ise sadece insülin hormonuna ait olması dikkat çekicidir. Ağırlıklı olarak karbonhidrat metabolizması üzerine olan etkileri ön plana çıkan insülin, organizmada karbonhidrat metabolizmasının yanı sıra diğer bazı metabolik olayları da etkilemektedir. İnsülinin etkili olduğu temel hedef hücreler kas, karaciğer ve adipöz doku hücreleridir.

İnsülinin karbonhidrat metabolizmasına etkisinin net sonucu kan glükoz düzeyini azaltmaktır. İnsülin salınımının yetersiz olduğu durumlarda ortaya çıkan hiperglisemi ve glükozüri bunun en önemli kanıtıdır. Karaciğerde insülin, glu-

kokinaz, fosfofruktokinaz ve pürivat kinaz gibi anahtar enzimlerin miktarını ve aktivitesini arttırarak glikolizi ve glikoz tüketimini hızlandırmaktadır. Kas ve karaciğerde insülinin glikojen yapımını uyarıcı etkisi bulunmaktadır. Yine fosfoenolpürivat karboksikinaz (PEPCK) enzimi glikoneogenezde hız kısıtlayıcı basamağı katalizler ve bu enzimin sentezi insülin tarafından düşürülür ve glikoneogenez azalır. Kan glikoz konsantrasyonu azaldığında, insülin salgısı da azalır ve karaciğer depoladığı glikojeni glikoza çevirip kana verir. Böylece kan glikoz konsantrasyonunun normal sınırlar içerisinde tutulması sağlanır (Litwack G, 2006).

Protein metabolizması üzerine anabolik etkili olan insülin, protein sentezini uyarmakta ve protein yıkımını baskılamaktadır. İnsülin ile amino asitlerin hücre içine özellikle kaslara taşınması kolaylaşmakta, karaciğer, iskelet ve kalp kasında protein sentezi düzenlenmekte, RNA ve DNA sentezi de artmaktadır.

Lipogenik bir hormon olan insülin, karaciğer ve adipoz dokuda epinefrin ve glukagon gibi lipolitik hormonların etkisi ile artan doku cAMP düzeylerini baskılayarak ve hormona duyarlı lipazın aktivitesini azaltarak lipolizi engellemektedir. Lipolizin engellenmesine bağlı olarak dolaşıma salıverilen serbest yağ asitleri ve gliserol miktarı azalmaktadır. İnsülin dokularının çoğu tarafından glikoz tüketimini arttırdığından yağ kullanımını azaltıcı etki sergilemektedir. Ayrıca karaciğer hücrelerinin içine, tüketebileceğinden veya glikojen halinde depo edebileceğinden fazla glikoz girdiğinde, insülin bu fazla glikozun yağ asitlerine dönüşümünü hızlandırır. Bu yağ asitleri daha sonra triaçilgliserol halinde paketlenir ve kan yoluyla yağ dokusuna taşınarak depolanır. Özet olarak insülinin etkisiyle kan glikozunun fazlası iki depo formuna çevrilir: glikojen ve triaçilgliserol.

İNSÜLİN DİRENCİ NEDİR?

Dolaşımda normal konsantrasyonda bulunan veya ekzojen verilen insüline karşı azalmış biyolojik yanıt olarak tanımlanır. Daha genel bir ifade ile 'hücrelerin insüline karşı duyarsızlaşması' olarak tanımlanabilir. İnsülin üretilmektedir fakat insülin-yanıt sisteminin bazı özellikleri bozulmuştur. Sürekli vidalanan bir vida yuvasının yalama olması gibi, hücreler de sürekli ve yüksek miktarda insülin uyarısına maruz kalınca insüline cevap vermemeye başlarlar (Garbossa SG, 2017, Kasuga M, 2006).

Vücudumuzun en önemli enerji kaynağı olan glikozun, kullanılabilmesi için insülin hormonu aracılığıyla hücrelerin içine girmesi gerekmektedir. İnsülin, bu düzenlemeyi yaparken hedef hücrelerin plazma membranında bulunan, yüksek afiniteli, transmembran glikoprotein yapıdaki özel "insülin reseptörü"ne bağlanır ve aktive olur. Bu reseptörde insüline karşı bir duyarsızlık gelişirse, insülin sinyal

yolunda yetersizlik olursa, iskelet kası, kalp kası ve adipoz dokuda GLUT-4 izoformunda defekt olursa veya başka nedenlerle (gen mutasyonu vs) insülin reseptöre bağlanamazsa, glikozun dokulara alınarak kullanılması zorlaşır. Gen mutasyonu açısından GLUT-4 ve glikojen sentazı kodlayan genler ile birlikte diğer potansiyel aday genlerde çok az mutasyon tanımlanmıştır (Thong F 2005, Gutch M, 2015).

Sağlıklı insanlarda metabolizma, glikozu 1 ünite insülin ile kontrol altında tutabiliyorken, insülin direnci olan insanlarda vücut 2-3 ünite insülin salgılayarak glikozu kontrol etmeye çalışır. İnsülin duyarlılığındaki azalma, glikoz kullanımını ve depolanmasını bozar, kan glikozu artar. Pankreas kandaki glikoz artınca daha fazla insülin salgılar. Amaç glikozu hücre içine sokup kan şekerini aşağı çekmektir. Fakat direnç başlamışsa sonuç hücreye giremeyen glikoz ve onu hücreye sokmaya çalışan ama başaramayan insülin fazlalığı olarak karşımıza çıkar. Peki kanda dolaşan bunca glikoz ne olacak? İnsülin hormonu glikozu hücreye sokamayınca yağ olarak depolamaya başlar ve bireylerin vücut yağlanması da artar. Bu yağlar özellikle bel ve göbek çevresinde depolanır. Kanda giderek yükselen glikoz ise, endotel fonksiyonunu bozarak, tip 2 diyabet yüksek tansiyon, Alzheimer ve kardiyovasküler hastalıklara giden yolculuğu başlatmıştır aslında. Yine 2015 yılında yapılan bir araştırma insülin direnci ve Alzheimer arasındaki güçlü ilişkiye dikkat çekmiştir (Willette AA, 2015).

Hedef dokularda insülin veya reseptör kusuru karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasında anormalliklere yol açmaktadır. Yine artan glikoz, hücre dışı sıvılara büyük ozmotik basınç uygular ve glikoz konsantrasyonu çok büyük düzeylere çıkacak olursa bu dehidratasyona neden olabilir. Kan glikoz düzeyinin artan derecede yükselmesi glikozun idrarla atılmasına sebep olur. İdrarla glikoz kaybı böbreklerde ozmotik diürez yaparken, vücut sıvı-elektrolit dengesini de bozar. Glikoz düzeyindeki uzun süreli yükselme, endotel başta olmak üzere birçok dokuda hasara yol açabilir.

İNSÜLİN DİRENCİ MOLEKÜLER MEKANİZMASI

Direncin moleküler mekanizması hakkında net bilgilerimiz sınırlı olsa da insülin direnci temel olarak reseptör bozukluğundan çok, post reseptör sinyal yollarındaki aksaklıklardan kaynaklanmaktadır. Post reseptör insülin direnci, sinyal iletim bozuklukları, iskelet kası, kalp kası ve adipoz dokuda GLUT-4 izoformundaki mutasyonlar sebebiyle ortaya çıkmaktadır. Böylelikle insülin hormonu, reseptörüne bağlanmasına rağmen, reseptör sonrası mekanizmalardaki aksaklık sebebi ile etkisini gösterememektedir. İnsülin sinyalizasyon sisteminin başlatılması kadar durdurulması da önemli bir basamaktır. İnhibisyon, fosfatazlar aracılığıyla sağlanabildiği gibi, serin/treonin fosforilasyonunun aktivasyonu ile de oluşabil-

mektedir. İnhibisyonda meydana gelen aksaklıklar da insülin direncine yol açabilmektedir (Richter EA, 2013).

İnsülin direncinin altta yatan en önemli mekanizmalarından biri de serbest yağ asitlerinin fazla miktarda olması ve bu nedenle IRS-1 sinyal iletiminin baskılanmasıdır. Son yıllardaki çalışmalarla, yağ asitlerinin IRS-1'in tirozin fosforilasyonunu bozduğu gösterilmiştir. Şişmanlık, akromegali gibi plazma insülin düzeyinin arttığı tablolarda insülin reseptörünün sayısının azaldığı ve hedef dokular insüline karşı daha az duyarlı hale geldiği gösterilmiştir.

İnsülin reseptör gen mutasyonları, reseptör izoform aktivite farklılıkları insülin direnci patogenezinde rol alabilmektedir. İnsülin reseptöründe çok sayıda mutasyon belirlenmiştir. Çok nadir olan ve genellikle sadece tek bir hastada veya tek bir ailede görülen bu mutasyonlarda aşırı insülin direnci görülmektedir (Richter EA, 2013, Bach D, 2005).

İnsülin direncini değerlendirmede D vitamini göz ardı etmemekte fayda vardır. D vitamini, dokuların insüline karşı olan direncini azaltır, böylece insülin direnci nedeniyle glikozuna artışa bağlı olarak artan insülin salınımını azaltmakta ve dokuların insülin duyarlılığını artırmaktadır. D vitamini yetersizliğinin insülin direnci ve β hücre işlev bozukluğu ile olan ilişkisi çalışmalarla da desteklenmiştir (Cefalo CMA, 2018, Dutta D, 2014, Leung PS, 2016).

Epinefrin, sempatik sinir sisteminin uyarıldığı stres durumlarında plazma glikoz konsantrasyonunun yükseltilmesinde önem taşır. Epinefrin, diğer hormonlardan farklı olarak aynı anda hormon duyarlı lipazı aktive ederek, plazma yağ asidi konsantrasyonunu da artırır. Epinefrinin, insülinin reseptörüne bağlanmasını, GLUT-4 translokasyonunu ve IRS-1 aktivitelerini inhibe ederek periferik insülin direncine neden olduğu gösterilmiştir (Richter EA, 2013).

Glikoz ve lipit metabolizmasının kontrolünde fonksiyonu bulunan krom, insülinin etkisini güçlendirmektedir. Krom yetmezliğine bağlı olarak insüline direnç gelişebilmekte ve insülin, krom olmadan glikoz düzenleyicisi olarak etkisiz kalmaktadır.

Periferik insülin direncinin oluşum mekanizmaları ve fizyopatolojisi hakkında halen bilgilerimiz yeterli değildir ve bu konuda çalışmalar devam etmektedir. Yeni aday moleküllerin bulunması sadece fizyolojiyi anlamada değil, ileride yeni tedavi hedefleri belirlemede de önemlidir. Son zamanlarda "tumor necrosis factor α " (TNF- α), anjiyotensinojen, plazminojen aktivasyon inhibitörü-1, leptin ve kompleman gibi peptit mediyatörler ile insülin direnci arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmaların sayısı artmaktadır (Bach D, 2005).

İNSÜLİN DİRENCİNİN NEDENLERİ

İnsülin direncinin patogenezi halen tam olarak aydınlatılamamıştır. WHO, ailede tip 2 diyabet öyküsü, polikistik over sendromu (PKOS), hipertansiyon ve koroner kalp hastalığı bulunmasının önemli risk faktörleri arasında olduğunu vurgulanmaktadır. Obezite, yüksek triaçilgliserol düzeyleri, D vitamini eksikliği, sedanter yaşam tarzı, uyku problemleri, genetik faktörler, hormonlar, steroid ilaç kullanımı, artan yaş ve sigara da insülin direncine neden olabilir. Yine vücut kütle indeksi 25 kg/m^2 'nin üzerinde olan, bel çevresi kadınlarda 88 cm, erkeklerde 102 cm'den fazla olan kişilerde insülin direnci mutlaka araştırılmalıdır (Szosland K, 2016, WHO, 2008).

Bel çevresinin kalınlaşması başta olmak üzere, obezite ile insülin direnci arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır. Vücuttaki yağ oranının artması insülin direncine, insülin direnci de vücutta yağ oranının artmasına ve obeziteye sebep olur. Adipoz doku sadece triaçilgliserol için basit bir depo görevi görmez, aynı zamanda birçok hormon, sitokinler ve büyüme faktörleri salgılayan aktif bir endokrin organdır. Salgılanan maddeler arasında, leptin, adiponektin, rezistin, TNF- α sayılabilir. Adipoz dokudan salınan bu maddeler enerji metabolizmasını ve insülin duyarlılığını etkiler. Son zamanlarda insanlardaki insülin direncinde adipoz dokunun çok önemli olduğu konusu üzerinde fazlaca durulmaktadır.

Hareketsiz bir yaşam insülin direnci ve obeziteye davetiye çıkarmak demektir. Vücuttaki glikozun büyük kısmı kas hücreleri tarafından kullanılmaktadır. Kas, önce depoladığı glikozu kullanır, sonra kan glikozunu depolamada kullanır ve böylece kan glikozunun normal sınırlar içerisinde kalmasını sağlar. Egzersizden sonra kaslar güçlenir, kan glikoz seviyesinin kontrolü kolaylaşır, insüline duyarlılık artar ve insüline karşı kolay kolay direnç gelişmez. Hatta egzersiz, kasların insüline ihtiyaç duymadan daha fazla glikoz kullanmasına yardımcı olur.

İnsülin direnci nedenleri arasında genetik faktörleri de hesaba katmak gerekmektedir. İnsülin hormonunun sentez ve salınımında meydana gelen aksaklıklar, insülin reseptör mutasyonları, reseptör sonrası sinyal yollarındaki proteinlerin bozuklukları genetik sebepleri düşündürmelidir. Ayrıca insülin hormonuna karşı gelişen antikorlar da insülin direnci gelişiminde etkin rol oynamaktadır.

Yine ileri yaşla birlikte insülin sekresyonunda azalma olması ve/veya dokuların insüline yanıtının azalması, endotel fonksiyonundaki değişim sonucu glikoz homeostazında bozulma görülmektedir.

İNSÜLİN DİRENCİ BELİRTİLERİ

Bir oturuşta koca bir tabak baklava yiyenlerden misiniz???

İnsülin direncinin belirtileri, ortaya çıkardığı sorunlar hastalığın aşamalarına göre değişiklik gösterir ve insülin direnci olan kişiler genellikle kilo almaya yatkındır. Tatlı krizleri veya karbonhidratlı gıdalara, düşkünlük, durup durup acıkma, geç doyma, bel bölgesinde kalınlaşma kilo kontrolünde güçlük en açık belirtileridir. Yemek yenilmezse kişide el-ayak çekilmesi, el titremesi, fenalık-baygınlık hissi ve soğuk terleme gibi reaktif hipoglisemi belirtileri de insülin direnciyle beraber görülen glikoz ve insülin değerlerinde dalgalanmanın sonucudur. Bunun dışında karaciğerde yağlanma, koltuk altı, kasık, boyun bölgelerinde esmerleşme (akantozis nigrikans), kadınlarda adet düzensizlikleri, tüylenme varsa insülin direncinden şüphelenmek gerekir.

Kilo problemi var ve bu kilolar özellikle bel ve göbek çevresinde toplanıyorsa, kolay kilo alıyor fakat zor veriyorsanız, vücudunuz adeta kilo vermemek için direniyorsa, sık sık acıkıyor ve açlığa tahammülünüz yoksa, yemek sonrası uykunuz geliyorsa, canınız hep tatlı unlu gıdalar çekiyorsa insülin direnci belirtileriniz başlamıştır.

İnsülin direncinin bir başka boyutu da hipoglisemi ataklarıdır. Bu atak sırasında eliniz ayağınız kesilir, gözleriniz kararır, soğuk soğuk terlersiniz ve baygınlık hissi başlar. Vücut 8-10 saat açlıkta bile kan şekerini düzenleyebilecek şekilde çalışır ama sistem bozulunca vücut kan şekerini dengelemekte zorlanmaya başlar. Sistem bir kere bozulmuşsa açlığa dayanamaz hale gelirsiniz.

PKOS son yıllarda kadınların korkulu rüyası haline gelen, genellikle peripubertal dönemden itibaren başlayan menstrüel düzensizlikler, hiperandrojenizm bulguları (hirsütizm, inatçı akne, ciltte yağlanma), kilo problemi gibi belirtilerle ortaya çıkan hormonal bir problemdir. Sendromun prevalansı yaklaşık %6-8 olarak bildirilmektedir. PKOS olan kadınlar hamile kalmakta zorlanır ve hamile kalsalar bile hamilelikleri düşükle sonlanır. İnsülin direnci ile birlikte hormonal dengenin bozulması kadınlık hormonunun düşüşüne erkeklik hormonunun artmasına yol açabilir. Ayrıca, LH düzeylerinde ve LH/FSH oranında artış olabilir. Hormonal dengenin bu yönde bozulması PKOS'tan kısırlığa kadar pek çok probleme yol açabilir. Çocuk sahibi olamayan kadınların pek çoğu bu sorunun arkasında PKOS olduğunun farkında bile değildir. Kadınların yaşamını kabusa çeviren bu problemin, yaklaşık %25-60 olguda insülin yüksekliği ve insülin direnci problemi ile yakın ilişkilidir. PKOS'ta tanı almamış diyabet sıklığı %10'dur (Hart R, 2015, Legro RS, 2013). Bu nedenlerle PKOS tip 2 diyabet gelişimi için bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir ve PKOS'lu hastalar insülin direnci ve diyabet

yönünden değerlendirilmelidir. PKOS'u tetikleyen faktör insülin direncidir, beslenme yanlışlarıdır. Beslenme modeli düzelmeden PKOS tedavi edilemez.

İNSÜLİN DİRENCİ NASIL TEŞHİS EDİLİR?

İnsülin direnci ölçümü için altın standart 'hiperinsülinemik öglisemik klemp' metodudur. Testin temel prensibi hiperinsülinemik bir ortam oluşturup, serum glikozunu sabit tutmak için sabit insülin infüzyonu ve değişken glikoz infüzyon hızlarını kullanır ve bu ortamda glikoz düzeyini normal aralıkta tutmak için verilen glikozun, kullanılma hızını belirlemeye dayanır. Bu metodun pahalı ve invaziv olması pratikte kullanımını zorlaştırmaktadır. Alternatif olarak, 'HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance)' metodu basitleştirilmiş ve sık kullanılan yöntemdir. Bu test insülin direncinin olup olmadığını ve bu direncin seviyesini gösterir. Bu metot açlık kan glikozu ve insülin değerleri ile hesaplama yapılması esasına dayanır. 10-12 saatlik açlıktan sonra alınan kan örneğinde kan glikozu (mg/dL) ve açlık insülin (μ IU/mL) seviyesi ölçülür. Sonra da bu iki değer birbiri ile çarpılarak, 405'e bölünür. Çıkan sonuç 2.5 mg/dL ve üzerinde ise, kişide insülin direnci var demektir (Deugarte CM, 2005, Gayoso-Diz P, 2013).

$$\text{HOMA IR} = \text{Fasting insülin } (\mu\text{IU/mL}) \times \text{Fasting glucose (mg/dL)} / 405$$

HOMA-IR indeksinin değeri insülin direnciyle doğru orantılıdır ve bu rakam ne kadar yüksekse direnç de o kadar fazladır. Örneğin kan glikozunuzun 85 ve açlık insülin değerinizin 14 olduğunu varsayarsak; $85 \times 14 = 1190$ çıkacak ve bu değeri 405'e böldüğünüzde 2.93 HOMA indeksiniz olacaktır.

İnsülin direnci ile ilişkili metabolik durumun değerlendirilmesinde, açlık ve tokluk kan şekeri, HbA1c değerleri bakılmalıdır. Gerekli durumlarda şeker yükleme testi (oral glikoz tolerans testi) yapılabilir.

İNSÜLİN DİRENCİ NASIL KIRILIR?

Tek amaç hastalık için ilaç vermek olmamalı!!!

İnsülin direnci ve diyabet tedavisinde egzersiz, beslenme ve ilaç tedavisinin planlanması çok önemlidir. Çalışmalar diyetle kısıtlama, düzenli egzersiz ve insülin duyarlılığını ya da üretimini iyileştiren ilaçların insülin direnci ve diyabette kişinin sağlık durumunu düzelteren 3 faktör arasında olduğunu göstermektedir. Ancak ilerlemiş evrelerde kan glikozunu dengede tutmak için insülin kullanımı gereklidir. Sporla insülini harcamak ve insülin üreten gıdalardan uzak durmak en temel amacımız olmalı. Düzenli bir beslenme programı ve dozu giderek artırılan sürdürülebilir bir spor programı ile insülin direnci kırılır. Hastalara porsiyonların azaltılması, kalorisi düşük, ancak posa içeriği yüksek, tok tutan, probiyotikli gıda-

ların tüketilmesi (ev yapımı yoğurt kefir, turşu, sirke, peynir vs) bunların aksine karbonhidratlar, işlenmiş basit şekerler ve glisemik indeksi yüksek besinlerden (pirinç, patates, beyaz ekmek, hazır meyve suları, şerbetli tatlılar vs) uzak durmaları önerilmelidir. İnsülin direncinin kırılması için bahsedilen önlemlerin yaşam tarzı haline getirilmesi gerekmektedir ve bu hastalar diyabet, metabolik sendrom ve kardiyovasküler hastalıklar açısından yakın takip edilmelidir. Dengeli bir beslenmenin sırrı sağlıklı yağlardan geçer. Çünkü sağlıklı yağlar tok tutar, kan glikozunuzu dengeler ve kilo vermenizi sağlar ve insülin direnciyle savaşır.

Modern çağın beslenme modelinde içi şeker dolu gazlı içecekler, tatlılar, çikolatalar, ekmek, makarna varken insülin direncini kırmak hayli zor. Sürekli bir şeker bombardımanı ile karşı karşıyayız. Yüzyıllar boyunca sağlıklı yağlarla beslenen insanoğlunun şu an diyetini bu sağlıksız gıdalar süslemektedir. ‘Tatlıyla aram yok neden insülin direnci yaşıyorum’ diyorsanız yediğiniz ekmeğin de glisemik indeksi yüksek bir besin olduğunu ve kan şekerinizi diğer tatlılar gibi etkileyebileceğini unutmayın. Bir yiyeceğin glisemik indeksi ne kadar yüksekse, bu yiyecek kan şekerini o kadar hızlı yükseltir. Mesela etin, yumurtanın, tereyağının, salatalığın glisemik indeksi çok düşüktür.

Şeker ve karbonhidrat zengini bir diyet, bağırsak floramızı bozar. Endüstriyel olarak üretilmiş, içinde bol katkı maddesi bulunan yiyecekler, gelişigüzel alınan antibiyotikler de bu sürecin gelişimini hızlandırır. Bağırsak florasındaki bu değişikliğin, yani probiyotik kaybının depresyondan kansere kadar pek çok hastalığa zemin hazırladığı bir gerçektir. Vücudunuzdaki probiyotiklerinizi kaybetmeniz insülin direnci gelişim riskinizi de artırıyor. Tip 2 diyabetli hastalarla normal sağlıklı grubun bağırsak florasını karşılaştıran bir araştırma, her iki grubun barsak florasının birbirinden farklı olduğunu bulmuştur (Qin J, 2012).

Güncel çalışmalarda glikoz, fruktoz, mısır şuruplarını içeren gıdaların fazla miktarda tüketilmesinin insülin direnci gelişimini hızlandırdığı, kilo kaybının insülin direncini azaltabildiği, tip 2 diyabetin önlenebileceği veya geciktirilebileceği, egzersiz yaptıktan sonra kasların insüline karşı daha duyarlı olduğu ve insülin direncinin tersine çevrilebileceği vurgulanmaktadır (Stanhope KL, 2015).

Eskiden D vitamininin sadece sağlıklı kemik gelişimi üzerine etkisinin olduğu düşünülürdü. Fakat şu an tüm yaşamsal fonksiyonlarda rol aldığı, eksikliğinin kanserden depresyona kadar pek çok hastalığa zemin hazırladığı biliniyor. 2014’te yapılan bir çalışmada D vitamini eksikliğinin pre-diyabet ve tip 2 diyabet hastası olma ihtimalinin arttığı ortaya konmuştur ve D vitamininin, hücrelerin insülin hassasiyetini %60 oranda arttırdığı vurgulanmaktadır (Clemente-Postigo M, 2015, Deluca HF, 2004). Tüm insülin direnci ve pre-diabet hastalarının tedavisinde D vitamini değeri ölçümü artık altın kural haline getirilmelidir.

Yine yaşlanmayı hızlandıran, hücrel faaliyetlerin bozulmasına sebep olan toksinlere oksidanlara karşı savunma hattımız antioksidanlardır. Aldığımız besinlerin antioksidan değerleri de bizim için önem taşımaktadır. İnsülin direncinden kurtulmada sadece kan glikozunu dengede tutmak değil, serbest radikal hasarını da önlemek önemlidir. Hücreleriniz ne kadar sağlıklı olursa insülin direnci ve diyabetle o kadar etkin bir şekilde savaşabilirsiniz.

Kan glikozunu dengelemede en önemli yardımcınız egzersizdir. Bilimsel araştırmalar egzersizin insülin direncini kırmakta son derece etkili olduğunu gösteriyor. Hatta 2013 yılında yapılan bir çalışmaya göre egzersiz süresi arttıkça hücrelerin insülin hassasiyeti de doğru oranda artmaktadır (Nelson RK, 2013).

Yine marketten satın aldığınız ve raf ömrü uzun olan hemen hemen tüm yiyeceklerin içinde pek çok farklı isimde tehlikeli koruyucular bulunmaktadır ve bunların gizli tehlikeleri henüz açığa çıkmamıştır. Bu paketteki gizli tehlikelerden de uzak durmak gerekmektedir.

Çalışmalar, egzersiz yaptıktan sonra kasların insüline karşı daha duyarlı olduğunu, insülin direncini tersine çevirdiğini ve kan glikoz düzeylerini düşürdüğünü göstermektedir (Bach D, 2005, Sigal RJ, 2006). Egzersiz ayrıca kasların insüline ihtiyaç duymadan daha fazla glikoz emmesine yardımcı olur.

İnsülin direnci tedavi sürecinde, direnç kırılmaya başladıkça hastalar daha az acıktıklarını, daha az tatlı ve karbonhidrat ihtiyacı hissettiklerini, kilo kaybetmeye başladıklarını, enerjilerinin arttığını fark eder. İnsülin direncini doğal yollardan kıran ve tedavi eden en basit şey düzenli spor yapmaktır. Çünkü spor, insülin duyarlılığını artırarak insülin direncinin kırılmasına neden olur.

İnsülin direncinde temel husus, uzun dönem monitorizasyondur ve kan glikoz seviyelerinin, kan lipit profilinin, gerektiği hallerde glikoz yükleme testlerinin periyodik olarak yapılması tedavi takibi açısından önemlidir.

Bizleri daha az harekete ve daha fazla karbonhidrat tüketmeye iten, çağdaş hayatın hediyesi insülin direncini yenmenin yolu hareket etmekten ve doğru beslenmekten geçiyor. Sağlıklı ve kaliteli bir yaşam için yediğimiz gıdalar, egzersiz ve hormonal dengenin bir düzen içinde olması şarttır.

Unutmayalım ki insülinin yokluğu da çokluğu da hastalık...

KAYNAKÇA

- Satman İ. Türkiye Diyabet Epidemiyoloji (TURDEP II) Çalışması Genel Sonuçları (20 yaş üstü). 32. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Kongresi, TURDEP Paneli, 13-17 Ekim, Antalya, Kongre Kitabı. 2010.
- Guyton AC. Tıbbi Fizyoloji (çeviri: H. Çavuşoğlu, B. Çağlayan Yeğen). 11.basım. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2006;968-70.
- Betacell Biology Consortium, 2004. http://www.betacell.org/content/briefview/brief_id/40.

- Pacini G, Ahrén B. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic peptide: effects alone and in combination on insulin secretion and glucose disappearance in mice. *Physiol Rep*. 2017 Jun;5(11).
- Hubbard SR, Miller WT. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin. Cell Biol*. 2007;19:117-123.
- Thong F, Dugani C, Klip A. Turning Signals On and Off: GLUT4 Traffic in the Insulin-Signaling Highway. *Physiology* 2005;20:271-84.
- Litwack G, Schmidt TJ. In *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 6th edn. Biochemistry of Hormones. 2006;891-948.
- Garbossa SG, Folli F. Vitamin D, sub-inflammation and insulin resistance. A window on a potential role for the interaction between bone and glucose metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* 2017; 18: 243-58.
- Kasuga M. Insulin Resistance and Pancreatic β Cell Failure. *J. Clin. Invest*. 2006;116:1756-1760.
- Gutch M, Kumar S, Razi SM, et al. Assessment of insulin sensitivity/resistance. *Indian J Endocrinol Metab* 2015; 19: 160-4.
- Willette AA, Bendlin BB, Starks EJ, et al. Association of Insulin Resistance With Cerebral Glucose Uptake in Late Middle-Aged Adults at Risk for Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*. 2015 Sep;72(9):1013-20.
- Richter EA, Hargreaves M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol Rev* 2013;93:993-1017.
- Bach D, Naon D, Pich S, et al. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes* 2005;54:2685-93.
- Cefalo CMA, Conte C, Sorice GP, et al. Effect of vitamin D supplementation on obesity-induced insulin resistance: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Obesity (Silver Spring)* 2018; 26: 651-7.
- Dutta D, Mondal SA, Choudhuri S, et al. Vitamin-D supplementation in prediabetes reduced progression to type 2 diabetes and was associated with decreased insulin resistance and systemic inflammation: an open label randomized prospective study from Eastern India. *Diabetes Res Clin Pract* 2014; 103: e18-23.
- Leung PS. The potential protective action of vitamin D in hepatic insulin resistance and pancreatic islet dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Nutrients* 2016; 8: 147.
- Szosland K, Lewiński A. In quest for method of insulin resistance assessment in everyday clinical practice – insulin resistance indices. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* 2016; 10S: S120-5.
- World Health Organization. Obesity and Overweight Fact Sheet. WHO 2008;3110-17.
- Hart R, Doherty DA. The potential implications of a PCOS diagnosis on a woman's long-term health using data linkage. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100: 911-9.
- Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, et al. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 4565-92.
- DeUgarte CM, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. *Fertil Steril* 2005;83: 1454-60.
- Gayoso-Diz P, Otero-Gonzalez A, Rodriguez-Alvarez MX, et al. Insulin resistance (HOMA-IR) cut-off values and the metabolic syndrome in a general adult population: effect of gender and age: EPIRCE cross-sectional study. *BMC Endocr Dis* 2013; 13: 47.
- Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012 Oct 4;490(7418):55-60.
- Stanhope KL, Medici V, Bremer AA, et al. A dose-response study of consuming high-fructose corn syrup-sweetened beverages on lipid/lipoprotein risk factors for cardiovascular disease in young adults. *Am J Clin Nutr*. 2015 Jun;101(6):1144-54.
- Clemente-Postigo M, Muñoz-Garach A, Serrano M, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and adipose tissue vitamin D receptor gene expression: relationship with obesity and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Apr;100(4):E591-5.

Güncel Biyokimya Çalışmaları II

- DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1689S-96S.
- Nelson RK, Horowitz JF, Holleman RG, et al. Daily physical activity predicts degree of insulin resistance: a cross-sectional observational study using the 2003-2004 National Health and Nutrition Examination Survey. *Int J Behav Nutr Phys Act.* 2013 Jan 28;10:10.
- Sigal RJ, Kenny GP, Wasserman DH, et al. Physical activity/exercise and type 2 diabetes: a consensus statement from the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2006;29:1433-8.

Bölüm 9

TOPLAM ANALİTİK HATA VE ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİNİN KLİNİK LABORATUVARLARDA KULLANIMI

Kübranur ÜNAL¹

GİRİŞ

Klinik laboratuvar testleri hastalıkların tanı, tedavi ve takibinde çok önemli bir yer tutmaktadır. Bu nedenle klinik laboratuvarların mümkün olan en yüksek kalitede hizmet vermesi beklenir. Sağlık kuruluşlarına başvuran kişilerin büyük bir kısmına laboratuvar testi yapılmaktadır. Laboratuvar hataları; yanlış taniya, yanlış tedaviye, gecikmiş taniya ve zaman kaybına yol açtığı için klinik laboratuvarların uluslararası standartlarda kaliteli ve doğru sonuçlar vermesi hedeflenir (Howanitz, 2005).

Klinik laboratuvarlarda toplam kalite yönetimi kapsamında analitik performans değerlendirmesi önemlidir. Analitik performans değerlendirmesinde Toplam Analitik Hata (TAH) ve/veya Ölçüm belirsizliği kullanılabilir. TAH bir test sonucuna yansıyan rastgele ve sistematik hataların toplamı şeklinde ifade edilmektedir. Ölçüm belirsizliği ise elde edilen test sonucunun gerçek değerinin bulunabileceği değer aralığını tanımlamaktadır (JCGM 100, 2008). Klinik laboratuvarlarda verilen hasta test sonuçlarının gerçek değeri tam olarak yansıtmadığı ve ölçülen büyüklük için atfedilen yaklaşık bir değer olduğu artık bilinmektedir.

Günümüzde TAH ve ölçüm belirsizliğinin analitik kalite hedeflerine uygunluğunun değerlendirilmesinde Toplam İzin Verilebilir Hata (TEa) limitleri ile karşılaştırılması yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. TEa hem kesinlik (rastgele hata) hem bias (sistematik hata) için tek bir ölçümde ya da tek bir test sonucunda kabul edilebilir limitleri belirleyen analitik kalite spesifikasyonudur (CLSI C24-A3, 2006). Laboratuvarın her bir test için hesapladığı TAH değerinin kriter olarak kabul edilen TEa değerlerinden düşük olmasını hedeflenmelidir (Carl&ark., 2012). Ancak son zamanlarda, Ölçüm Belirsizliğinin uygunluğunun değerlendirilmesinde TEa Limitleri ile karşılaştırmanın metodolojik olarak uygun olmadığı ileri

¹ Uzman Doktor. Ankara Gazi Mustafa Kemal Devlet Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı, e-mail: dr.kubranur_unal@outlook.com

sürülmektedir (Haeckel &ark., 2015a). Ölçüm Belirsizliğinin Analitik Performans Değerlendirmesinde 'İzin Verilebilir Ölçüm Belirsizliği Limitleri' kullanılması konusunda çalışmalar giderek artmaktadır (Oosterhuis & Theodorsson, 2016, Westgard, 2016a).

TAH, laboratuvarın Analitik Performansını değerlendirmek için günümüzde yaygın olarak kullanılan bir ölçüttür. Ancak bu kullanımının yanı sıra Ölçüm Belirsizliğinin de Analitik Performans Değerlendirmesinde kullanılması konusunda çalışmalar giderek artmaktadır. Bu nedenle hastalıkların takibinde çok önemli bir yer tutan, tanı ve prognoz aşamalarında klinisyene yardımcı olan klinik laboratuvar sonuçlarının Analitik Performans Değerlendirmesinde Ölçüm Belirsizliği ve Toplam Analitik Hata limitlerinin kullanımı incelenmelidir. Bu çerçevede Klinik Laboratuvarlar, Analitik Kalite Yönetimi için öncelikle Analitik Kalite Planı oluşturmalı ve bu planı uygun prosedürlerle uygulamalıdır. Analitik Kalite Planı aşağıdaki basamaklardan oluşturulabilir (Westgard, 2016b, Burnett, 2013).

ANALİTİK KALİTE PLANI

1. Basamak: Analitik Kalite Hedefinin Tanımlanması
2. Basamak: Analitik Performans Özelliklerinin Hesaplanması
3. Basamak: Analitik Performansın Değerlendirilmesi
4. Basamak: Analitik Kalitenin Geliştirilmesi
5. Basamak: Analitik Performansının Belirli Periyotlarda Kontrolü

1.Basamakta yapılan Analitik Kalite Hedeflerini tanımlaması Analitik Kalite Yönetiminin başlangıcıdır. Milan Konsensüsü, Klinik Laboratuvarların her analit için ayrı Kalite Hedefleri tanımlamalarını önermektedir. Böylece hangi analitin Analitik Kalite geliştirmesine ihtiyacı olduğu kolayca tespit edilebilir (Sciacovelli&ark., 2004).

2.Basamakta Analitik Kalite Hedefine uygun Performans Özelliklerinin hesaplanmasında Ölçüm Kavramları kullanılmaktadır. Ölçüm Kavramlarından, kesinliğin (prezisyonun) belirlenmesinde genellikle iç kalite kontrol verileri, gerçekliğin (trueness) belirlenmesinde ise genellikle dış kalite programlarından elde edilen veriler kullanılmaktadır. TAH, bu iki bileşeni tek bir ifade de birleştirerek performans karakteristiğini oluşturmaktadır. Bu sayede tek bir ifade ile analitik kalite değerlendirilmesi sağlanabilmektedir. Ölçüm Belirsizliği ise kesinlik ve gerçeklik için ayrı ayrı değerlendirme yapar.

3.Basamakta sonuçlar belirlenen analitik kalite hedefi ile karşılaştırarak analitik performans değerlendirilmesi yapılır. Bu değerlendirmedeki performans karakteristikleri ve belirlenen analitik kalite hedefinin metodolojik uyumu çok

önemlidir. TAH değerlendirmesi analitik kalite hedefi olan TEa ile yapılmalıdır. Ölçüm Belirsizliğinin ise Ölçüm Belirsizliğinin İzin Verilebilir Limitleri ile değerlendirilmesi önerisi yaygınlaşmaktadır.

4.Basamakta analitik kalite hedeflerine göre kalitenin geliştirilmesi gerekmektedir.

5.Basamakta ise belirli periyotlarda analitik kalitenin kontrolü ve gelişiminin denetlenmesi gerekmektedir.

TOTAL ANALİTİK HATA

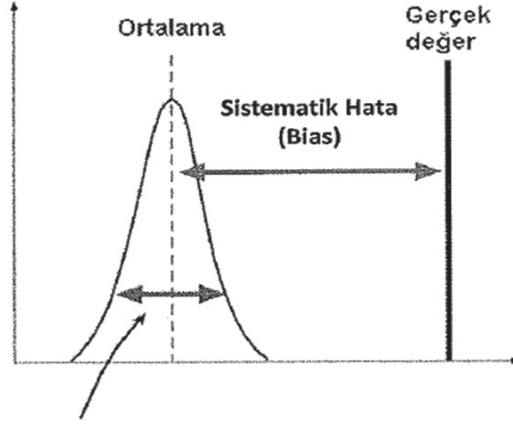
Toplam analitik hata (TAH); rastlantısal hata ve sistematik hatanın lineer toplamıdır (EP21, 2016). Rastlantısal hata negatif veya pozitif olabilir, yönü ve büyüklüğü önceden tahmin edilemez. Sistematik hata ise analiz sonucunu sabit ve belirli düzeyde değiştiren, nedeni belirlenebilen ve ölçülebilen kesin değerlere sahip hatalardır, daima tek yönde olur ve analiz sonucunun doğruluğunu etkiler. Rastlantısal hata tahmini için iç kalite kontrol uygulamalarından elde edilen Varyasyon Katsayısı (Coefficient of Variation, %CV) kullanılır. Sistematik Hatanın tahmini ise dış kalite kontrol uygulamalarından elde edilen Bias (Sapma) ile değerlendirilir. Diğer bir anlamda iç kalite kontrol uygulamaları ile ölçümün rastlantısal hatası, dış kalite kontrol uygulamaları ile sistematik hatası tespit edilebilir.

TAH; Westgard ve arkadaşları tarafından $TAH = \%Bias + (Z \times \%CV)$ olarak formüle edilmiştir (Westgard, 1974). Z değeri Gauss dağılımı göz önüne alındığında %95 olasılık düzeyinde tek yönlü olarak 1,65 değerine karşılık gelir (Biswas&ark.,2015). Total hatanın hesaplanmasında şu formül kullanılır:

$$TAH = \%Bias + (1.65 \times \%CV)$$

TAH =Rastlantısal hata + Sistematik hata. TAH bileşenleri Şekil 1’de gösterilmiştir.

TAH hesaplamasıyla amaçlanan TEa sınırlarının içerisinde kalıp kalınmadığını değerlendirmek ve gerçek değere en yakın sonucu vermektir (ISO 15189, 2012). Hasta sonuçlarının güvenilirliği ve doğruluğu açısından TAH’ın TEa’yı aşmaması gerekir. Sonuç olarak hesaplanan TAH değeri, TEa sınırları içerisinde ise ölçüm sisteminin tanısal yeterliliği iyi anlamına gelir. TAH kavramını iyi kavrayabilmek için rastlantısal hata ve sistematik hata kavramlarına daha ayrıntılı bakılabilir.



Şekil 1. Total Analitik Hata bileşenlerinin grafik olarak gösterilmesi

SİSTEMATİK HATA- %BİAS

Gerçeklik (trueness), çok sayıda test sonucundan elde edilen ortalama ile kabul edilmiş referans değer arasındaki yakınlıktır (ISO 5725, 1994). Sistemik hataların bir ölçüsü olarak kullanılır. Sistemik Hata %Bias olarak ifade edilir (EP09-A2, 2002). Bias (Sapma), bir seri tekrar ölçümden elde edilen ortalama değerle kabul edilen referans değer arasındaki farklılıktır. %Bias, dış kalite değerlendirme programında testin kendi sonucunun eş grup değerinden farkının eş grup değerine bölünmesi ile bulunur.

$$\%Bias = [(eş\ grup\ değeri - Laboratuvar\ sonucu) / eş\ grup\ değeri] * 100$$

RASTLANTISAL HATA-%CV

Kesinlik (presizyon-tekrarlanabilirlik), belirli koşullar altında aynı parametreye ait bağımsız tekrarlanan ölçümler arasındaki uyuşmanın yakınlığıdır (JCGM 200, 2012). Rastgele hatanın değerlendirilmesinde kullanılır. Rastlantısal hata %CV ile ifade edilebilir (EP05-A3, 2014). %CV, iç kalite kontrol verilerinden elde edilen standart sapmanın aritmetik ortalamaya bölünüp 100 ile çarpılmasıyla hesaplanır. Farklı seviyelere ait iç kalite kontrol %CV değerleri ile her seviye için ayrı TAH hesabı yapılabilir.

İZİN VERİLEN TOPLAM HATA (TEA)

Hem rastgele hata hem sistemik hata için tek bir ölçümle kabul edilebilir limitleri belirleyen analitik kalite hedefidir (CLSI C24-A3, 2006). TEa, analitin klinik önemine ve klinik deneyimlere, analitin biyolojik değişkenliğine, ulaşılan

analitik yetkinliğe veya analitik hataların düzeyine göre belirlenebilir. Bu bağlamda hedef TEa limitleri için farklı öneriler sunulmuştur (RiliBAK, 2015, CLIA, 1992, Ricos & ark., 1999). Bu öneriler üç başlıkta sınıflandırılabilir: 1. Yayımlanmış profesyonel öneriler; 2. CLIA ve RiliBAK gibi örgütlerin belirlediği değerler; 3. Biyolojik varyasyon (BV) verileri. Laboratuvarlar bu seçeneklerden kendilerine uygun kriteri hedef olarak belirlemelidir. Her bir test için hesaplanan toplam hataların, kriter olarak kabul edilen TEa değerlerinden düşük olması hedeflenmelidir (Carl&ark., 2012). Testin klinik yararını ortadan kaldırmayacak boyuttaki hatalar TEa limitini aşmadığı kabul edilir.

Ülkemizde bu konu ile alakalı olarak 2016 yılında yürürlüğe giren İzin Verilen Toplam Analitik Hata genelgesi yayınlanmıştır (T.C Sağlık Bakanlığı, 2016a). Genelge, uygulamaya yönelik özet bir bilgilendirme ve ilgili 15 parametre için % TEa ve izin verilen en yüksek % CV değerlerini içermektedir. Genelgeye göre TAH'nın TEa Limitlerine uygunluğunun değerlendirilmesinden önce öncelikli olarak %CV'ye göre uygunluğunun değerlendirilmesi gerekmektedir. Böylelikle bias ve impresiyonun lineer toplanmasından kaynaklanan bilgi kaybı önlenir. Genelgede sınırlar dışında çıkan sonuçların düzeltici önleyici faaliyetler ile sınırlar içerisinde çıkana kadar ayda bir tekrarlanmasını önermektedir.

ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİ

Bir test için yapılan ölçüm değeri mutlak değildir ve ölçümün büyüklüğüne bağlı olarak tekrarlayan ölçümler arasında bir miktar farklılık gözlenebilir. Ölçüm belirsizliği, ölçüm sonucuna karşılık gelebilecek değerlerin dağılımını karakterize eden bir parametredir (JCGM 200, 2012).

Bu bağlamda Ölçüm Belirsizliğinin nasıl hesaplanması gerektiğini anlatmak ve ölçüm sonuçlarının Uluslararası karşılaştırılmasına temel oluşturmak amacı Ölçüm Belirsizliği rehberi "Guide to Expression of Uncertainty in Measurement (GUM)" hazırlanmıştır (JCGM 100 , 2008). GUM pek çok ülkede geniş kabul görmüş ve Ulusal Standart Laboratuvarları Konferansı (NCLS) GUM'u temel alarak ölçüm belirsizliklerinin saptanması ve raporlanmasını konu alan pratik yaklaşımları içeren bir metni (RP-12) yayınlamıştır. Tıbbi laboratuvarların kalitelerinin artırılması için geliştirilmiş olan ISO 15189 kalite standardizasyon dökümanında laboratuvarlardan her bir ölçüm prosedürüne ait ölçüm belirsizliğinin tespiti için tanımlı bir yönteminin olmasını, performans kriterlerinin belirlenmesini ve ölçüm belirsizliği verilerinin düzenli olarak gözden geçirilmesini istemektedir (ISO 15189, 2012). Ölçüm belirsizliği ölçüm sonucunun kalitesinin ve güvenilirliğinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu sebeple ölçüm belirsizliği kavramı kalite gereklilikleri göz önüne alındığında tıbbi laboratuvarlar için önem kazanmak-

tadır. T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yayımlanan “Sağlıkta Kalite Standartları (SKS) – Hastane” dökümanında, “ölçüm belirsizliği sonuçların değerlendirilmesi, ölçüm sonuçlarına göre karar verilmesi, ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması, limit değerlere göre uygunluğunun belirlenmesi ve testi yapan laboratuvarın performansının ortaya konulması amacıyla değerlendirilmelidir.” ifadesi opsiyonel olarak yer almaktadır (T.C Sağlık Bakanlığı, 2016b). Ülkemizde şu an her test için ölçüm belirsizliği hesaplaması Sağlık Bakanlığınca zorunlu tutulmamakla beraber gönüllülük esasına dayanan akreditasyon sürecinde bu madde önem taşımaktadır (TÜRKAK, 2016).

Klinik laboratuvarlar tarafından ölçüm belirsizliği hesaplanarak test sonucu ile verildiğinde, test sonucunun hangi sınırlar içinde yer alabileceğini gösterir. Bir test sonucunun yanına ölçüm belirsizliğinin göstergesi olarak “ \pm bir değer” eklenmesi, ilk bakışta hekim ve hastalarda bir kafa karışıklığı yapabilse de ölçüm belirsizliği laboratuvarların kalitesini ortaya koyan önemli bir parametredir (Eurochem/Citac, 2007). Bu çerçevede ölçüm belirsizliği hesaplaması üzerinde durmak yerinde olacaktır.

ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİNİN HESAPLANMASI

Ölçüm belirsizliğinin hesaplanmasında pek çok yöntem ve formül tanımlanmıştır. Bu yöntemler genel olarak aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya yaklaşımı olmak üzere iki temel yaklaşıma ayrılabilir (Lee&ark., 2014).

GUM ölçüm belirsizliği hesaplamasında aşağıdan yukarıya yaklaşımını kullanır. GUM prosedürü sistematik ve rastgele hatayı birbirinden ayrı değerlendirip tüm olası belirsizlik kaynaklarının belirlenerek her biri için belirsizlik tahmini bir Standart Sapma (SD) olarak atfetmektedir (JCGM 100, 2008). Ancak ölçüm belirsizliği oluşturan kaynakların hepsini belirleme gereksinimi zaman alıcı ve maliyet gerektirdiği için, bu yöntem anlaşılması zor ve karmaşık bir süreç olarak yorumlanabilmektedir.

Ölçüm belirsizliğinde yukarıdan aşağıya yaklaşım ise, laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrar elde edilebilirlik sonuçlarından hesaplanır. Bu yaklaşımda, kullanılan kontrol materyallerinin hasta örneklerine benzer şekilde performans gösterdiği kabul edilir. Bu yöntemin avantajı pratik ve kolay uygulanabilir oluşudur. Bu yaklaşımın dezavantajı, tüm belirsizlik bileşenlerinin birleşik belirsizliğe katkısının detaylı olarak değerlendirilememesidir (Krouwer, 2003). Ölçüm Belirsizliğinin hesaplanması konusunda GUM’un belirlediği esaslara göre yayımlanan rehberler (EUROCHEM, VAM, NAPAAC, AACB, NORDTEST) arasında belirsizlik kaynaklarının seçiminden hesaplama şekline kadar farklılıklar gözlemlenmektedir ve bu konu ile ilgili standardizasyon bulunmamaktadır.

Nordtest (Handbook For Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories) kılavuzu, ölçüm belirsizliği hesabında yaygın, anlaşılabilir ve pratik bir uygulama sunmaktadır. Kılavuz yukarıdan aşağıya yaklaşımı esasına dayanır, belirsizlik kaynaklarının belirlenmesi ve sonra tamamının hesaplanıp birleştirilmesi şeklindedir. Ölçüm belirsizliği bileşenleri Şekil 2'de gösterilmiştir. Nordtest kılavuzuna göre belirsizlik hesaplamasının 5 aşamada nasıl yapıldığını örnek olarak gösterebilir (Magnusson&ark., 2012):

1. Kesinlik kaynaklı belirsizlik (u_{Rw}) hesabı için farklı seviyelerdeki laboratuvar iç kalite kontrol materyalleri kullanılarak, sonuçların varyasyon katsayısı hesaplanır.

$$u_{Rw} = \sqrt{(1.\text{seviye kontrol } \%CV^2 + 2.\text{seviye kontrol } \%CV^2)/2}$$

2. Gerçeklik kaynaklı belirsizliği ($u(\text{bias})$) hesaplamak için RMS bias ve $u(C_{\text{ref}})$ kullanılır. En az altı ay dış kalite kontrol verilerinden alınan bias değeri kullanılarak RMS bias hesaplanır. Dış kalite kontrol raporundaki hedef değerinin belirsizliği $u(C_{\text{ref}})$ için $\%CV$ değeri kullanılır.

$$\text{RMS bias} = \sqrt{\sum (Dış kalite kontrol bias)^2/n}$$

$$(n = \text{dış kalite kontrol programına katılım ay sayısı})$$

$$u(C_{\text{ref}}) = \%CV / \sqrt{n}$$

$$(n = \text{aynı metod ve aynı cihazı kullanan laboratuvar sayısı})$$

3. Hesaplanan değerler standart belirsizliğe çevrilir.

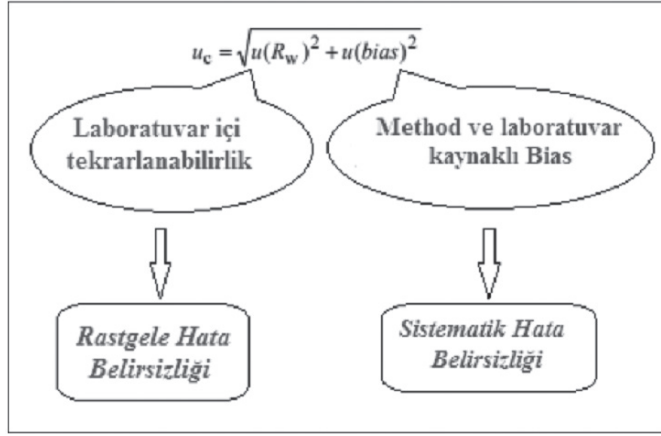
$$u(\text{bias}) = \sqrt{\text{RMS bias}^2 + u(C_{\text{ref}})^2}$$

4. Kombine belirsizlik (u_c) değeri hesaplanır:

$$u_c = \sqrt{u(Rw)^2 + u(bias)^2}$$

5. Kombine standart belirsizliğin %95 güven aralığında ifade edilmesi için çarpım faktörü kullanılarak (k değeri: 2) genişletilmiş ölçüm belirsizliği hesaplanır.

$$U = 2 \times u_c.$$



Şekil 2. Ölçüm Belirsizliği bileşenleri

İzin Verilebilir Ölçüm Belirsizliği Limitleri (Hedef Ölçüm Belirsizliği)

Alman Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıp Derneği (DGKL) ölçüm belirsizliği değerlendirmesinde 'Ölçüm Belirsizliği İzin Verilebilir Limitleri (Hedef Ölçüm Belirsizliği)' kullanılmasını önermektedir (Haeckel &ark., 2015a). DGKL çalışma grubunun 2015 yılında sunduğu bu önerisinin en büyük avantajlarından biri ölçüm belirsizliği bileşenlerinden bias ve imprecizyon için ayrı ayrı hedef uygunluğunun değerlendirilebilmesidir.

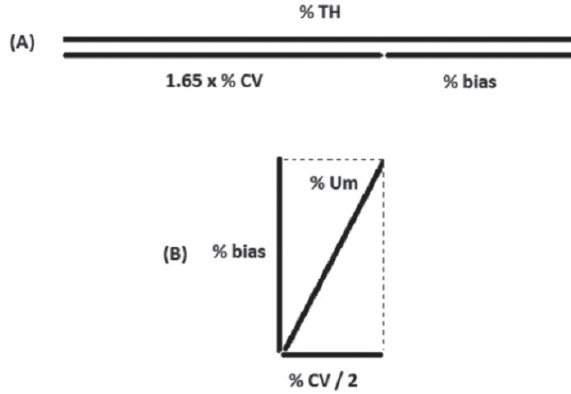
Ölçüm Belirsizliği İzin Verilebilir Limitleri (Hedef Ölçüm Belirsizliği) hesaplaması ve değerlendirilmesi genel olarak şu şekildedir;

1. Referans Aralık Değerlerinin logaritmik dönüşümünden CVE (Ampirik Varyasyon Katsayısı) elde edilir.
2. Hesaplanan CVE değerlerinden hareketle pCVA (İzin Verilebilir İmpresizyon), pBu (İzin Verilebilir Bias) ve %pU (Genişletilmiş Belirsizlik için İzin Verilebilir Limit) hesaplanır.
3. Hedef uygunluğunun değerlendirmesinde ölçüm belirsizliği bileşenleri İzin Verilebilir Ölçüm Belirsizliği limitleri ile karşılaştırılır.

SONUÇ

Klinik laboratuvarlarda analitik performans değerlendirilmesinin önemi günümüzde artık daha iyi bilinmektedir. Analitik performans değerlendirmesi için iç ve dış kalite kontrollerden elde edilen veriler kullanılabilir. İç kalite kontrol ile analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve kesinliği günlük olarak takip edilirken, dış kalite kontrol ile uzun dönem takibi sağlanır. Kalite kontrol işlemleriyle analitik kalite hedeflerine ulaşılması amaçlanır. Analitik performansının değerlendirilmesinde klinik laboratuvarlarda TAH uzun zamandır kullanılmaktadır. Rutinde her laboratuvar kendi testleri için TAH'ı hesaplar ve kabul ettiği analitik kalite hedefi olan TEa ile kıyaslayarak analitik kalitesini denetler. TAH, analitik performansın tek bir sayısal ifade ile değerlendirmesine olanak sağlayan basit ve pratik bir yöntemdir. Ancak son yıllarda TAH'nın teorik temelini yeterli olmadığı ve laboratuvarların analitik performansını tam olarak belirleyemediğine yönelik eleştiriler bulunmaktadır (Panteghini & Sandberg, 2016, Kallner, 2016). Bu sebeple ölçüm belirsizliğinin analitik performans değerlendirmesinde TAH'ın yerine kullanılması konusunda çalışmalar giderek artmaktadır (Haeckel&ark.,2015b, Westgard, 2016a). Bu konu şu an klinik laboratuvarlarda analitik kalite konusundaki en sıcak konulardan biri olarak durmaktadır.

Uluslararası organizasyonlar, tıbbi laboratuvarların çalıştıkları testlere ait ölçüm belirsizliği hesaplamasının önemini belirtmektedir (Sandberg&ark., 2015). Ayrıca, doğru ve güvenilir test sonuçlarının elde edilmesi için bir test için hesaplanan belirsizliğin ölçüm sonucu ile birlikte verilmesi gerektiği de vurgulanmaktadır. Ölçüm Belirsizliğinin önemi özellikle ölçüm sonucunu kullanarak tıbbi karar verirken, ölçüm sonuçlarını karşılaştırırken ve limitlere uygunluğa karar verirken daha da artar (Burnett&ark., 2010). Analitik kalite değerlendirmesinde performans karakteristiği olarak ölçüm belirsizliğinin seçilmesinin en büyük avantajı presizyon ve trueness için ayrı ayrı değerlendirme yaparak, olası hata kaynaklarını bir neden-sonuç ilişkisi içinde tespit edilmesine olanak sağlamasıdır. Ölçüm belirsizliği ve TAH arasındaki metodolojik farklılıklardan birisi; ölçüm belirsizliğinde "gerçek değer" kavramı kullanılmazken TAH'da "gerçek değer" kavramı kabul edilir. Ayrıca ölçüm belirsizliği hesaplamasında Pisagor Teoremindeki "Kareler Toplamının Kare Kökü" metodu kullanılması, TAH modelinde ise hata kaynaklarını lineer olarak toplaması TAH değerlerinin ölçüm belirsizliği değerlerinden daha yüksek çıkmasına neden olmaktadır (Oosterhuis, 2011, Theodorsson&ark.,2014). Ölçüm belirsizliği ve TAH hesaplama modellerinin karşılaştırılması Şekil 3'de gösterilmiştir. Ancak ölçüm belirsizliğinin hesaplanması konusunda farklılıklar gözlemlenmektedir ve hesaplama ile ilgili hala bir standardizasyon bulunmamaktadır.



Şekil 3. TAH ve Ölçüm Belirsizliği hesaplama modelleri

TAH ve ölçüm belirsizliğinin analitik kalite hedeflerine uygunluğunun değerlendirilmesinde yaygın olarak TEa limitleri kullanılmaktadır. Ancak TEa hesaplanırken farklı veri kaynakları kullanılmasından (Biyolojik Varyasyon, State of the art) ve hesaplama yöntemlerindeki farklılıklardan dolayı farklı limit önerileri vardır. Bu sebeple ölçüm belirsizliği metodolojisine uygun analitik kalite hedefi olarak klinik laboratuvarlar için yeni bir analitik kalite spesifikasyonu olan 'Ölçüm Belirsizliği İzin Verilebilir Limitleri'nin kullanılmasının uygunluğu DGKL tarafından Milan Konsensüsünde sunulmuştur.

Klinik laboratuvarlarda analitik performans değerlendirilmesi yapılırken hem ölçüm belirsizliği hem de TAH'ın kendine göre avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Teşhis belirsizliği ile baş edebilmek adına her iki yöntemin de yeterince geliştirilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte analitik performans değerlendirilmesinde her iki yöntem de birbirini tamamlayan ve sık kullanılan yöntemler olmaya devam etmektedir.

KAYNAKÇA

- Biswas S S, Bindra M, Jain V, Gokhale P. (2015) Evaluation of Imprecision, Bias and Total Error of Clinical Chemistry Analysers. *Ind J Clin Biochem*, 30(1):104 – 108.
- Burnett D. A . (2013) *Practical Guide to ISO 15189 in Laboratory Medicine*. London, ACB Ventures Publications,
- Burnett, D., Ceriotti, F., Cooper, G., et al. (2010) Collective opinion paper on findings of the 2009 convocation of experts on quality control. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 48(1), 41-52.
- Carl A. Burtis, PhD; Edward R. Ashwood, M.D. and David E. Bruns, MD (Ed.). (2012). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry And Molecular Diagnostics (5th Edition)*. USA.: Saunders, an imprint of Elsevier Inc.
- CLIA (1992) Requirements for Analytical Quality. ((24/06/2019 tarihinde <https://www.westgard.com/clia.htm> adresinden ulaşılmıştır).

- CLSI C24-A3 (2006) Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions. (24/06/2019 tarihinde https://clsi.org/media/1365/c24ed4_sample.pdf adresinden ulaşılmıştır).
- EP05-A3 (2014) Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods. (24/06/2019 tarihinde https://clsi.org/media/1438/ep05a3_sample.pdf adresinden ulaşılmıştır)
- EP09-A2 (2002) Method comparison and bias estimation using patient samples. (24/06/2019 tarihinde http://www.zxyjhjy.com/upload/attached/file/20170406/20170406155102_6304.pdf adresinden ulaşılmıştır)
- EP21 (2016) Evaluation of Total Analytical Error for Quantitative Medical Laboratory Measurement Procedures. (24/06/2019 tarihinde https://clsi.org/media/1427/ep21ed2_sample.pdf adresinden ulaşılmıştır)
- Eurochem / Citac Guide (2007) Use of uncertainty information in compliance assessment. (24/06/2019 tarihinde https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/Interpretation_with_expanded_uncertainty_2007_v1.pdf adresinden ulaşılmıştır).
- Haeckel R, Wosniok W, Gurr E, Peil B. (2015a) Permissible limits for uncertainty of measurement in laboratory medicine. *Laboratory Medicine, Clin Chem Lab Med*, 53(8):1161-71
- Haeckel R, Wosniok W, Streichert T. (2015b) Optimizing the use of the 'state-of-the-art' performance criteria, *Clin Chem Lab Med*, 53(6):887-91
- Howanitz PJ. (2005) Errors in laboratory medicine: practical lessons to improve patient safety. *Arch Pathol Lab Med*, 129(10):1252-1261.
- ISO 15189 (2012) Medical laboratories—requirements for quality and competence. Geneva, International Organization for Standardization.
- ISO 5725 (1994) Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. (24/06/2019 tarihinde <https://www.sis.se/api/document/preview/611331/> adresinden ulaşılmıştır)
- JCGM 100 (2008). Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in Measurement. (24/06/2019 tarihinde https://www.bipm.org/utills/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf adresinden ulaşılmıştır.
- JCGM 200 (2012) International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms. (24/06/2019 tarihinde https://www.bipm.org/utills/common/documents/jcgm/JCGM_200_2012.pdf adresinden ulaşılmıştır)
- Kallner A. (2016) Is the combination of trueness and precision in one expression meaningful? On the use of total error and uncertainty in clinical chemistry, *Clin Chem Lab Med*, 54(8):1291-7
- Krouwer JS. (2003) Critique of the Guide to the expression of uncertainty in measurement method of estimating and reporting uncertainty in diagnostic assays. *Clin Chem*, 49(11):1818-21
- Lee JH, Choi JH, Youn JS, Cha YJ, Song W, Park AJ. (2014) Comparison between bottom-up and top-down approaches in the estimation of measurement uncertainty. *Clin Chem Lab Med*. 53(7):1025-32.
- Magnusson B, Naykki T, Hovind H and Krysell M. (2012) Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories. Oslo, Nordic Innovation.
- Oosterhuis WP, Theodorsson E. (2016) Total error vs. measurement uncertainty: revolution or evolution. *Clin Chem Lab Med*, 54(2):235-9.
- Oosterhuis, W. P. (2011). Gross overestimation of total allowable error based on biological variation. *Clinical chemistry*, 57(9): 1334-1336.
- Panteghini M, Sandberg S. (2016) Total error vs. measurement uncertainty: the match continues. *Clin Chem Lab Med*, ;54(2):195-6.
- Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, Minchinela J, Perich C, Simon M. (1999) "Current Databases on Biologic Variation: Pros, Cons and Progress." *Scand J Clin Lab Invest*, 59(7):491-500.
- RilibAK (2015) German Guidelines for Quality. (24/06/2019 tarihinde <https://www.westgard.com/rilibak.htm> adresinden ulaşılmıştır.)

Güncel Biyokimya Çalışmaları II

- Sandberg, S., Fraser, C. G., Horvath, A. R., et al. (2015). Defining analytical performance specifications: consensus statement from the 1st Strategic Conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 53(6):833-835
- Sciacovelli L, Zardo L, Secchiero S, Plebani M. (2004) Quality specifications in EQA schemes: from theory to practice. *Clin Chim Acta*, 346:87-97.
- T.C. Sağlık Bakanlığı (2016) İzin Verilen Toplam Hata Sınırları. (24/06/2019 tarihinde <https://dosyamerkez.saglik.gov.tr/Eklenti/2581,genelge-201618izin-verilen-toplam-hata-sinirlaripdf.pdf?0> adresinden ulaşılmıştır).
- T.C. Sağlık Bakanlığı (2016) Sağlıkta Kalite Standartları (SKS). (24/06/2019 tarihinde <https://dosyahastane.saglik.gov.tr/Eklenti/7273,sks-saglikta-kalite-standartlari-2pdf.pdf?0> adresinden ulaşılmıştır).
- Theodorsson, E., Magnusson, B., & Leito, I. (2014). Bias in clinical chemistry. *Bioanalysis*, 6(21): 2855-2875.
- TÜRK Akreditasyon Kurumu (2016) Laboratuvar Akreditasyonu Nasıl Gerçekleştirilir. (24/06/2019 tarihinde http://www.turkak.org.tr/turkaksite/kurumsalbirimlerlabakrdbskligi_1.aspx adresinden ulaşılmıştır).
- Westgard JO, Carey RN, Wold S. (1974) Criteria for judging precision and accuracy in method development and evaluation. *Clinical Chemistry*, 20(7):825-33.
- Westgard JO. (2016b) Useful measures and models for analytical quality management in medical laboratories, *Clin Chem Lab Med*, 54(2): 223-233.
- Westgard S (2016a) Comparing Verdicts from Different Goals, Models, and Specifications. (24/06/2019 tarihinde <https://www.westgard.com/goal-verdict-comparison1.htm> adresinden ulaşılmıştır).

Bölüm 10

TIBBİ LABORATUVARLARDA PREANALİTİK SÜREÇ YÖNETİMİ

Sibel Çiğdem TUNCER¹

Günümüzde hastalıkların teşhisinde, hastalara uygulanan tedavinin takibinde ve toplumdaki sağlık taramalarında laboratuvar testlerinin önemi çok büyüktür. Bu süreçte laboratuvarlardan beklenen tek durum; doğru sonuç üretmesidir. Doğru sonuç üretmek için dikkat edilmesi gereken bir çok faktör vardır. Bu faktörler belirlenip, süreç iyi bir şekilde yönetilmelidir. Süreç genel olarak;

- Doğru hastadan doğru testin doğru zamanda istenmesi ile başlar,
- Doğru numunenin doğru zamanda alınması,
- Doğru şekilde laboratuvara iletilmesi,
- Laboratuvarında testlerin doğru bir şekilde analiz edilmesi ve test sonuçlarının doğru şekilde yorumlanması,
- Kliniklere doğru bir şekilde iletilmesi ile sonuçlanır (1).

Genel olarak laboratuvar süreçlerini kontrollü bir şekilde yönetmek ve denetlemek için 3 döneme ayrılır: Bunlar analizden önceki dönem (peranalitik dönem), analiz dönemi (analitik dönem) ve analiz sonrası dönemdir (post analitik dönem) 'dir. Bu dönemlerdeki laboratuvar hata oranları ayrı ayrı değerlendirildiğinde hataların ; %62 analiz öncesinde (peranalitik dönem), %15 analiz sırasında (analitik dönem), %23 analiz sonrasında (post analitik dönem) olduğu görülür (2).

Laboratuvar hatalarının %70 -97'si insan, geri kalanını ise cihaz kaynaklıdır. Hataların en çok olduğu dönem de preanalitik dönemdir(1).

Preanalitik Dönem

Analiz öncesi (preanalitik) dönemde test sonuçlarını etkileyen faktörlere 'preanalitik değişkenler' denilmektedir. Preanalitik değişkenler kontrol edilebilen ve kontrol edilemeyen faktörler olarak olmak üzere iki grupta değerlendirilir. Kontrol edilemeyen preanalitik faktörleri; cinsiyet, yaş, ırk ve kişisel değişimler olarak sıralayabiliriz. Kontrol edilebilen faktörleri ise de; egzersiz, diyet, gebelik, kahve, sigara, alkol alımı, postür, örnek alım kriterleri, örnek taşıma ve örneğin laboratuvar da gördüğü işlemler olarak sıralayabiliriz. Bu faktörlerin etkilerini minu-

¹ Aksaray Üniversitesi Tıp Fakültesi. Email: drozturkc@yahoo.com

muma indirmek için hastanın hazırlanması, numunenin alınması ve numunenin taşınması gibi işlemler için belli standartlar belirlenip, bu standartlara bağlı olarak yapılması büyük önem taşır(3).

Preanalitik dönemi etkileyen faktörleri 3 ana grupta inceleriz (Şekil I).

Preanalitik Dönemde Etkili Faktörler
1-Numunenin alınmasından önceki faktörler
2-Numunenin alınması sürecindeki faktörler
3-Numunenin alınmasından sonraki faktörler.

Şekil I. Preanalitik Dönemde Etkili Faktörler

1-Numunenin Alınmasından Önceki Faktörler: Bu faktörleri; hasta ile ilgili fiziksel özellikler, hasta ile ilgili tıbbi durum-çevresel faktörler, siklik biyolojik varyansları, hastanın test isteminin yapılması, hastanın hazırlanması olarak sıralaya biliriz.

2-Numunenin alınması sürecindeki faktörler: Bu faktörleri; kanın alınma zamanı, kan alma teknikleri, kan alınma tüpleri, tüplerdeki koruyucu ve antikoagülan maddeler, kanın tüplere alınma sırası hasta, kan alma personelinin aldığı numuneye uyguladığı işlemler gibi sıralayabiliriz.

3-Numunenin alınmasından sonraki faktörler: Bu faktörleri; numunenin transportu, numunenin işlenmesi, numunenin uygun koşullarda saklanması, numunenin uzun süre bekletilmemesi gibi sıralayabiliriz.

Preanalitik süreçlerde laboratuvar dışı birimler de yer aldığından standardize edilmesi analitik ve postanalitik üreçlere göre daha zordur (4).

Tüm bu faktörler değerlendirildiğinde preanalitik dönemdeki hataları Şekil II deki gibi sıralaya biliriz.

Preanalitik Dönemdeki Hata Kaynakları
Test istemlerinin yapılması
Bilgi işleme
Hastalardan örnek alımı
Kimlik belirleme
Örnek tüpü seçimi
Uygun tüp kullanılması
Örnek tüpüne hasta kimliğinin tanımlanması
Örnek alımı sırasında uygulama ve zamanlama
Örneğin laboratuvara ulaştırılması, süre ve koşul şartları
Laboratuvarda örneğin analize hazırlığı
Örneklerin karışması

Şekil II. Preanalitik Dönemdeki Hata Kaynakları

Klinisyenlerin en sık yaptığı preanalitik hataları:

- Rastgele ve çok sayıda test analizi istemesi,
- Acil olmayan vakalarda acil istek yapması,
- Test istemi yaparken hastanın aldığı ilaçları ve yiyecekleri göz önünde bulundurumaması gibi sıralayabiliriz.

Kan alan sağlık personellerinin hasta hazırlama ve numune alımı sırasında yaptığı preanalitik hatalarıda:

- Numune alımı sırasında hastanın kimlik doğrulamasını yapmaması,
- Tüpleri hazırlarken yanlış borkodlama yapması,
- Kirli malzeme kullanması,
- Islak malzeme kullanması,
- Venöz staza sebebiyet vererek numune alması,
- İnfüzyon yapılan koldan numune alması,
- Almak isteği numuneye uygun tüpü seçmemesi,
- Numune alma sırasında tüp alma sırasını uygun yapmaması,
- Numuneyi aldıktan sonra numune aldığı tüpe gereken işlemleri uygulamaması,
- Numuneyi alması gereken doğru zamanda almaması gibi sıralayabiliriz.

Numune alındıktan sonrada yapılan preanalitik hatalar ise numune bekletilecek ve uygun olmayan koşullarda, alınan numuneye zarar gelecek şekilde laboratuvarlara transfer edilmesidir.

Laboratuvardada numunenin yanlış işlenmesi, uzun süre bekletilmesi ve uygun olmayan şartlarda saklanması da laboratuvar içi preanalitik hatalardır.

Kan Numunesi Alımı Sırasında Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar:

Kan duruma göre venden, arterden veya kapiller damarlardan alınır. Genelde erişkin ve çocuklarda venöz kan alımı tercih edilirken, yenidoğanlarda kapiller kan tercih edilir. Kan gazı analizi içinde arteriyel kan alınır. Venden kan alma işlemine flebotomi denir.

Kan örnekleri günlük biyolojik değişkenlik sebebiyle mümkünse sabah 07.00 – 09.00 saatleri arasında, açlık durumunda alınması gereken testler için 8-12 saat açlıktan sonra alınmalıdır.

Gerekli olan tüpler önceden hazırlanmalı, borkodlama işlemi yapılmalı ve numune alma işleminden önce hasta kimliği doğrulanmalıdır.

Venöz kan örneği alınırken:

- Hasta rahat bir şekilde oturtularak ya da sırt üstü yatılarak en az 10-15 dakika hasta bu pozisyonda dinlendirilmelidir.
- Kan alınacak noktanın 10-15 cm üzerine turkike uygulanmalıdır.
- Kan alınacak bölge %70 izopropanol ile temizlenir ve ıslak kalmamasına dikkat edilmelidir (alkol hemolize neden olabildiği için temizleme de tercih edilmemelidir).
- Kan alımı holder ya da enjektör ile yapılmalıdır (Enjektör kullanılıyor ise alınan kanın hemoliz olmaması için iğne enjektörden uzaklaştırılmalı, tüpün kapağı açılarak tüpün kenarından yavaşça kaydırılarak boşaltılmalıdır).
- Tüplerin içinde katkı maddesi veya antikoagulan madde var ise tüpler yavaşça birkaç kez alt üst edilmeli, çalkalanmamalıdır. Kan, katkı madde ile iyice karışmadığı takdirde hatalı analiz sonuçları elde edilebilir. Kan alımı şu sıra ile yapılmalıdır:
- Mikrobiyolojik kan kültürü tüpleri,
- Katkı içermeyen boş tüpler,
- Sitratlı koagülasyon tüpleri,
- Serum için antikoagulan içermeyen tüpler (pıhtı aktivatörü, jelli veya jelsiz)
- Antikoagulan; heparinli tüpler (jelli veya jelsiz)
- Antikoagulan; EDTA 'lı tüpler,
- Asit sitrat dekstrozu tüpler,
- Glikolitik inhibitörlü tüpler (1).
- Kan alma işleminden sonra kesinlikle tüpler arasında kan aktarımı yapılmamalıdır.

Numuneler uygun şartlarda bekletilmeden laboratuvarlara transfer edilmelidir. Numuneler laboratuvara geldikten sonra her laboratuvarın kendi numune kabul ve ret kriterlerine göre değerlendirilir (5).

TIBBİ LABORATUVAR NUMUNE KABUL VE RET KRİTERLERİ

I-Hematoloji, Seroloji, ELISA ve Biyokimya laboratuvarlarının

Numune Kabul Kriterleri:

1. Kliniklerden ve kan alma laboratuvarından gelen numunelerin üzerinde mutlaka hasta barkotu veya hastanın numune barkotu olmalıdır.
2. Hangi numunenin çalışılması isteniyorsa o numunenin bilgisayar girişinin yapılmış olması gerekiyor. Laboratuvara gelen numunenin bilgisayar girişi laboratuvar sekreteri tarafından kontrol edilir, girişi varsa kabul edilir.
3. Bilgisayar girişi ile gelen numune birbirini tutuyorsa numune kabul edilir.
4. Polikliniklerden gelen hastalardan alınması gereken numuneler laboratuvar teknisyeni ve kan almada görevli hemşireler tarafından alınarak numune kabul edilir.
5. Doğru hasta- Doğru giriş – uygun numune- uygun zamanda – yeterli miktarda geldiğinde kabul edilir.
6. Barkot tüp üzerine uygun şekilde yapıştırılmamışsa barkot çıkartılarak düzgün yapıştırıldıktan sonra kabul edilir. Ancak barkot kaldırıldıktan sonra altında isim olup olmadığı kontrol edilir eğer barkodun altında aynı hastaya ait isim varsa yeni barkot basarak kabul yapılır.
7. Numunelerin bulunduğu taşıma kap ve tüplerinde kırık çatlak yok ise kabul edilir
8. Numunelerin bulunduğu taşıma kap ve tüplerinde yabancı madde yoksa kabul edilir.

II-Hematoloji, Seroloji, ELISA ve Biyokimya laboratuvarlarının

Numune Ret Kriterleri:

1. Hasta adı ve soyadının bulunmadığı, örnek tanımının yapılmadığı hatalı yapıldığı veya istem formu ile örnek kabındaki bilgilerin uyumsuz olduğu durumlarda numune kabulü yapılmaz. Ayrıca barkodu olmayan numuneler laboratuvara kabul edilmez. Bir numunede 2-3-4 vs değişik hastaya ait hasta barkotu varsa numune kabul edilmez.
2. Barkod tüp üzerine uygun şekilde yapıştırılmamışsa altında isim olup olmadığı kontrol edilir eğer barkotun altında başka hastaya ait isim varsa o numune kabul edilmez. Barkot ve altındaki isim aynı ise ve yeni barkod basarak yapılır.
3. Uygun tüplere alınmayan numuneler laboratuvara kabul edilmez; servis ve polikliniklerden yeni numune istenir.
4. Tüp içindeki numune miktarı yeterli değilse numune kabul edilmez.
5. Antiküagulanlı tüplerde alınması gereken pıhtılı numuneler kabul edilmez
6. Hemolizli numuneler laboratuvara kabul edilmez.

7. Lipemik numuneler geldiğinde LIS' in açıklama kısmında belirtilir.
8. Laboratuvara uygun transfer koşullarında gelmeyen örnekler kabul edilmez.
9. Özellikle ilaç düzeyi ve diurnal varyasyonu olan hormon analizlerinde, gereken bekleme süresine uyulmamışsa, numune kabul edilmez.
10. Önerilen sürelerin dışında (Naklinde gecikme olan örnekler) bekletilmiş numuneler laboratuvara kabul edilmez.

Numunelerin laboratuvarlara kabulü yapıldıktan sonra kan şekilli elemanlardan santrifüj işlemi ile ayrılarak plazma veya serum elde edilir. Bazı özel örnekler, hastadan alındıktan sonra analize kadar soğukta tutulması gerekli olabilir ve buna dikkat edilmelidir. Gerekirse serum veya plazma ayırımı soğutmalı santrifüjde yapılır. Analiz hemen yapılmayacaksa serum +4, -20, -40° veya -700C ağzı kapalı olarak saklanmalıdır(1).

Serum veya plazma elde edildikten sonra 4 saat içinde çalışılmalıdır. En geç 4 saat içinde çalışılmayacaksa +40C'de ağzı kapalı olarak 1 gün saklanabilir. Ancak ışığa ve havaya duyarlı testler belirlenmeli, hemen çalışılmalıdır. Ayrıca dondurulmuş serum çalışılacağı zaman eritilip oda sıcaklığına getirilmelidir. Bununla beraber kanı serum veya plazmasına ayırmadan dondurmamak hemolize neden olur, bu nedenle serum ve plazmasına ayırdıktan sonra dondurma işlemi yapılmalıdır (1).

KAYNAKÇA

1. Dasgupta, A., Sepulveda, J. (2015). Tibbi Laboratuvarlarda Doğru Sonuç. Ankara: Palme yayıncılık.
2. Carraro P., Zago T. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. Clin Chem, 2007;53(7), 1338-13342.
3. Romero A., Cobos A., López-León A..Preanalytical mistakes in samples from primary care patients. Clin Chem Lab Med 2009;47(12),1549-1552.
4. Lippi G., Salvagno G., Brocco G..Preanalytical variability in laboratory testing: influence of the blood drawing technique. Clin Chem Lab Med 2005; 43(3), 319-325.
5. Manor PG. Turnaround times in the laboratory: a review of the literature. Clin Lab Sci 1999;12(2), 85-89.

Bölüm 12

VİTAMİNLER

Sibel Çığdem TUNCER¹

Vitaminler; insanlar tarafından sentezlenemeyen bu nedenle doğal besin kaynaklarından alınması gereken, eksikliğinde spesifik bozukluk ve hastalığa sebebiyet veren organik bileşiklerdir (1).

Vitaminlerin Sınıflandırılması

Vitaminler kendi içinde suda çözünen vitaminler ve yağda çözünen vitaminler olarak başlıca iki ana gruba ayrılırlar (Şekil 1).

Vitaminler	
I - Suda Çözünen Vitaminler 1- Tiamin (B1 Vitamini) 2 - Riboflavin (B2 Vitamini) 3 - Niasin (B3 Vitamini) 4 - Pantotenik Asit (B5 Vitamini) 5 - Pridoksin (B6 Vitamini) 6 - Biotin (B7 Vitamini) 7 - Folik Asit (B11 Vitamini) 8 - Kobalamin (B12 Vitamini) 9 - Askorbik Asit (C Vitamini)	II - Yağda Çözünen Vitaminler 1 - A Vitamini 2 - D Vitamini 3 - K Vitamini 4 - E Vitamini

Şekil-1 Vitaminler

Suda çözünen vitaminler:Vitamin B1 (tiamin), vitamin B2 (riboflavin), vitamin B3 (niasin), vitamin B5 (pantotenik asit), vitamin B6 (piridoksin), vitamin B11 (folik asit), vitamin B12 (siyanokobalamin), vitamin B7 (biotin), vitamin C (askorbik asit)'dir (Şekil 1). Vitamin B12 ve vitamin C dışındaki diğer suda çözünen vitaminlerin vücutta depo şekilleri yoktur; diyetle düzenli olarak sürekli alınmaları gerekmektedir. Genellikle bitkisel besinlerde bulunurlar ve pişirmekle kolay bozulurlar. Suda çözünen vitaminler, enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin koenzimi veya kosubstratı olarak görev alırlar ve kofaktör olarak rol oynarlar (2).

Yağda çözünen vitaminler: Vitamin A, vitamin D, vitamin E, vitamin K'dır. Yağda çözünen vitaminlerin hepsi izopren türevi apolar moleküllerdir (3). Diyetteki yağ molekülü ile emilir ve taşınırlar. İdrarla atılamazlar, başlıca karaciğer ve

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Aksaray Üniversitesi Tıp Fakültesi, drozturke@yahoo.com

yağ dokusunda olmak üzere vücutta depo edilirler. Besinlerdeki yağ miktarının yetersiz olduğu durumlarda, sindirim bozukluklarında, safra ve pankreas bezi bozukluklarına yol açan hastalıklarda eksiklik belirtileri ortaya çıkar.

Yukarıda belirtilen vitaminlerin dışında vitamin gibi etki gösteren fakat genel sınıflamaya dahil edilmeyen bazı bileşikler vardı. Bu bileşiklere vitamin benzeri maddeler veya vitajenler denir. Bu vitamin benzeri bileşikler; kolin, α -lipoik asit, karnitin, PABA (p-aminobenzoat), inozitol ve koenzim Q gibi bileşiklerdir. Bu bileşikler suda çözünürler ve bazı biyokimyasal tepkimelerde katalitik etkilidirler. Ayrıca vücutta sentezlemezler, bu nedenle besin maddeleri içinde alınmaları gerekir (2).

I-Suda Çözünen Vitaminler:

Tiamin (B1 Vitamini): Vücutta enerji metabolizmasında rolü olan vitamindir. Biyolojik olarak aktif formu Tiyamin Pirofosfattır (TPP) ve TPP da çeşitli enzimatik reaksiyonlarda aldehit grubunun transferinde görev alan bir koenzimdir (2).

B1 vitamini, et, karaciğer, yumurta, süt, kuru baklagiller, buğday, mısır, pirinç, ceviz ve fıındıkta bulunur. Günlük gereksinimi yaşa göre değişmekle birlikte erişkinde 1,5 mg alınması yeterlidir (4).

B1 vitamini eksikliğinde beriberi hastalığı ortaya çıkar. Bu hastalık karbonhidrattan zengin, tiaminden fakir beslenme sonucunda oluşur. Beriberi hastalığının ilk ortaya çıkan belirtileri; periferik nöropati, demans, yorgunluk ve iştahsızlıktır. Hastalığın daha ilerleyen dönemlerinde ödem, kardiovasküler, nörolojik ve kas iskelet sistemi patolojileri ortaya çıkar. Wernike-Korsakoff sendromu da daha kötü beslenen kronik alkoliklerde tiamin alımının yetersiz olması ya da barsaklardan emilimin bozulması sonucunda görülür. Bu sendromda hafıza kaybı ve istemsiz kas kasmaları ön plandadır (4).

Riboflavin (B2 Vitamini): Riboflavin de denilen B2 vitamini; karbonhidrat, protein ve lipit metabolizmasında görev alan düzenleyici bir vitamindir. Biyolojik olarak flavin mononükleotid (FMN) ve flavin adenin dinükleotid (FAD) olmak üzere iki aktif formu vardır. Birçok enzimde flavin mononükleotid (FMN) veya flavin adenin dinükleotit (FAD) şeklinde prostetik grup olarak bulunur (2).

B2 vitaminin bulunduğu besinler; karaciğer, et, süt ve süt ürünleri, yumurta, balık, yeşil yapraklı sebzeler ve tahıllardır. B2 vitamini ısıya dayanıklı, ancak ışığa karşı duyarlı bir vitamindir. Bu nedenle B2 vitamini bulunan yiyecekler ışıktan bekletilmemelidir. Erişkinlerde günlük gereksinimi 3 mg'dır. Ancak büyüme, gebelik, hipertiroidizm gibi metabolizmanın hızlandığı durumlarda B2 vitamin ihtiyarcıda artmaktadır.

B2 vitamini eksikliğinde; dermatit gibi deri rahatsızlıkları, dudaklarda çeliozis-angular lezyon, glossit, sinir sisteminde bozukluklar, gözde yanma ve kızarıklık, ishal, anemi, çocuklarda büyüme yavaşlaması, kilo kaybı gibi sorunlar görülür.

Niasin (B3 Vitamini): Niasin de denilen B3 vitamini karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmasında yeralan piridin türevi bir vitamindir. Biyolojik olarak aktif formu; nikotinamid adenin di nükleotid (NAD+) ve bunun fosforillenmiş şekli nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP+) olmak üzere iki tanedir. NAD+ ve NADP+, çok sayıda oksidoredüksiyon reaksiyonlarında dehidrojenazların koenzimi olarak görev yaparlar (2).

B3 vitaminin bulunduğu besinler; et, karaciğer, balık, kümes hayvanları, maya, tahıllar, kuru baklagiller ve yeşil yapraklı sebzelerdir. B3 vitamini su ve alkolde çözünen; asit, alkali, ışık ve ısıya dayanıklı bir vitamindir. Erişkinlerde günlük gereksinimi ortalama 15-18 mg 'dır. Gebelik, stres, egzersiz ve bazı hastalık durumlarında gereksinim artmaktadır (4).

B3 vitamini eksikliğinde; dermatit, diyara, demans (3D) ile karakterize Pellegra tablosu ortaya çıkar. Hastalık tedavi edilmezse ölüm ile sonuçlanır. Niasin eksikliğine yol durumlar; triptofan emilim bozukluğuna yol açan Hartnup hastalığı, karsinoid tümörler ve izoniazid türevi ilaçlarla tedavidir (4).

Pantotenik Asit (B5 Vitamini): Pantotenik asit de denilen B5 vitamini karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmasında görev alan bir Koenzim A bileşenidir. Pantotenik asit sinir sisteminde, bazı hormonların çalışmasında ve yağların sentezinde etkilidir (3). Tüm hayvansal ve bitkisel besinleri tüketmekle yeterli kadar B5 vitamini alımı sağlanır. B5 vitamini tüm hayvansal ve bitkisel besinlere bulunmakla birlikte en önemli kaynakları yumurta, karaciğer ve bira mayasıdır. Erişkinlerde günlük gereksinimi ortalama 6 mg'dir.

B5 vitamini besinlerde yaygın olarak bulunduğu ve bağırsak florası tarafından sentez edildiğinden dolayı eksikliği görülmez.

Piridoksin (B6 Vitamini): B6 vitamini piridin türevi olan piridoksin, piridoksal ve piridoksaminin ortak adıdır. Vitaminin aktif formu piridoksal fosfat ve piridoksamin fosfatdır. Aktif formları çok sayıda enzim için, özellikle de aminoasitleri içeren reaksiyonları katalizyenler için koenzim görevi görür (1).

B6 vitamini özellikle et, karaciğer, böbrek, tahıllar ve kuru baklagillerde bulunur. Erişkinlerde B6 vitamini eksikliği nadir görülen bir durumdur. Erişkinlerde günlük gereksinimi ortalama 2 mg'dir. Eksikliğinde konvülsiyon, huzursuzluk, anemi, çocuklarda büyüme geriliği, deri bulguları görülür.

Biotin (B7 Vitamini): Biotin de denilen B7 vitamini organizmada karboksilasyon reaksiyonlarını katalize eden karboksilaz enzim sistemlerinin prostetik grubu olarak görev yapar (5).

B7 vitamini, günlük tüketilen besinlerde yeterli miktarda bulunduğundan eksikliği pek görülmez. Ancak yumurta akında bulunan ve avidin adı verilen bir glikoprotein, biotine sıkıca bağlanıp barsaktan emilmesini engeller. Diyetinde protein kaynağı olarak çiğ yumurta akı bulunan kişilerde dermatit, glossit, bulan-tı, iştah kaybı gibi biotin eksikliği belirtileri ortaya çıkar.

Folik Asit (B9 Vitamini): Folik asitin temel fonksiyonu B12 vitamini ile birlik-te hücre bölünmesi veya çoğalması için gerekli DNA sentezini sağlamaktır. Aktif formu tetrahidrofolattır. Tetrahidrofolat organizmada tek karbon atomlu grupla-rın bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlayan enzimlerin kofaktörüdür (2).

Folik asit yetersizliği; gereksinimin artması (gebelik ve emzirme gibi), ince bağırsakta emilim bozulması, alkolizm gibi durumlarda görülür.

Folik asit eksikliğinde pürin, timin sentezi ve dolayısıyla nükleik asit biyosen-tezi bozulur ki bu, megaloblastik anemi, lökopeni ve trombositopeni gibi kan tab-losunun bozulmasına yol açar.

Kobalamin (B12 Vitamini): B12 vitamini (Kobalamin); temel fonksiyonu folik asit ile birlikte hücre bölünmesi veya çoğalması için gerekli DNA sentezlenmesin-de görev alır. Ayrıca diğer suda eriyen vitaminlerin aksine vücutta depo edilir (2) .

B12 vitaminin esas kaynağı hayvansal gıdalar olup; en fazla karaciğer ve böb-ekte daha az oranda et, süt, peynir de bulunur.

B12 vitamini ince barsağın ileum kısmından emilir ve emilebilmesi mideden salgılanan intrinsek faktöre (IF) ihtiyaç vardır. Hayvansal gıda tüketimi olan, mide, ince barsak hastalığı olmayan kişilerde B12 vitamini eksikliği olması pek mümkün değildir. Eksikliği sonucunda megaloblastik anemi oluşur (5).

Askorbik Asit (C Vitamini): C vitaminin aktif şekli askorbik asittir. Suda çözünen vitaminler arasında en az stabil olanıdır. Bu vitaminin asıl görevi vü-cuttaki bazı önemli hidroksilasyon reaksiyonlarında redükleyici ajan olarak yer almasıdır. Dolayısıyla C vitamini, vücutta kollejenin sentezi sağlayarak normal bağ dokusunun oluşması ve yara iyileşmesi için gerekli bir koenzimdir. Ayrıca C vitamini bağırsaklardan demir emilimini kolaylaştırmaktadır.

C vitamini yeşil sebze ve meyvelerde özellikle turuncgillerde bulunur. C vi-tamini yetersizliğinde kolay zedelenen kan damarları, diş etlerinde çekilme, şiş eklemler ve anemi ile karakterize skorbut hastalığı ortaya açar.

II-Yağda Çözünen Vitaminler:

A Vitamini (Retinol): Retinoidler görme, üreme, büyüme ve epitel dokula-rının sağlamlılığı için gerekli olan vitamindir. A vitamini biyolojik olarak aktif pek çok molekülün ortak adıdır. Aktif formları retinol, retinal ve retinoik asittir.

Retinol, retinal ve retinoik asidin kendilerine özgü biyolojik fonksiyonları vardır: Retinol, bir hormon olarak işlev görür. Retinal, görme pigmenti rodopsinin gerekli ön maddesidir. Retinoik asit ve metabolitleri, epitel farklılaşması üzerinde etki gösterirler (3).

A vitamini karaciğer, böbrek, yumurta sarısı, tereyağı ve süt gibi hayvansal gıdalarda bulunur. Barsaklardan emilen A vitamini şilomikron molekülü içinde karaciğere taşınır. Şilomikrondaki retinol esterleri karaciğer tarafından tutulur ve depolanır. Vücudun ihtiyarcı doğrultusunda karaciğerden salınan retinol; plazma retinol-bağlayıcı protein (RBP) ile dokulara taşınır ve oluşan retinol-RBP kompleksi periferel doku hücrelerinin yüzeyindeki özel reseptörlere bağlarak hücre içine alınır.

A vitamini görme döngüsü, üreme, büyüme ve epitel dokularının sağlamlılığı için gereklidir. A vitamini eksikliğinin en erken belirtilerinden biri gece körlüğüdür. Ayrıca görme eşiği yükselir ve loş ışıkta göremeyi zorlaştırır. Ciddi A vitamini eksikliği kseroftalmiden körlüğe kadar neden olabilir. Deride de A vitamini eksikliği psöriasis ve akne gibi hastalıklara neden olur.

Aşırı A vitamini alınması hipervitaminoz A denilen toksik bir sendroma neden olur. Günde 7,5 mg'dan fazla A vitamini alınımından kaçınılmalıdır. Kronik A hipervitaminozu ciltte kuruma ve kaşıntı, karaciğerde büyüme, sinir sisteminde de beyin tümörü belirtilerini taklit eden tabloya neden olur.

D Vitamini: Vitamin D kolesterolden sentezlenen, hormon benzeri görevleri olan steroid yapılu bir vitamindir. D vitaminin aktif formu 1.25-dihidroksikolekalsiferol (1.25-di OH D3) olup, en önemli görevi vücutta kalsiyum ve fosfor dengesini düzenlemektir (3).

D vitaminin 2 kaynağı vardır. Ya diyetle bitkilerde bulunan ergokalsiferol (D2) ve hayvan dokularında bulunan kolekalsiferol (D3) şeklinde alınır ya da kolesterol sentezinde ara molekül olan 7- dehidrokolesterolden güneş ışığının etkisi ile derinin dermis ve epidermiş tabakasında kolekalsiferol şeklinde endojen olarak sentezlenir (2).

Diyetle alınan D2 ve D3 vitaminleri biyolojik olarak aktif değildir, vücutta iki hidroksilasyon reaksiyonu ile aktif formu olan 1.25-di OH D3 dönüşür. İlk hidroksilasyon reaksiyonu karaciğerde gerçekleşir ve 25 hidroksikolekalsiferol (25 OH D3) oluşur. 25 OH D3 D vitaminin vücuttaki depo şeklidir. İkinci hidroksilasyon işlemi böbreklerde gerçekleşir ve D vitaminin aktif formu olan 1.25-di OH D3 oluşur.

1.25-di OH D3 ana fonksiyonu plazmada ki kalsiyum (Ca), fosfor (P) dengesini düzenlemektir. Bu fonksiyonu başlıca barsaktan Ca tutulumunu arttırarak, böbrekten Ca kaybını azaltarak ve ihtiyaç durumunda kemik rezorbsiyonunu sağlayarak yerine getirir.

D vitamini başlıca yağlı balıklarda, karaciğerde ve yumurta sarısında bulunur. D vitamini eksikliği çocuklarda rikets, yetişkinlerde osteomalazi denilen kemik hastalıklarına neden olur. Ayrıca böbrek yetmezliği olan hastalarda olanlarda aktif forma dönüşümün azalmasına bağlı olarak renal osteodistrofi tablosu gelişir (4).

D vitamini diğer yağda eriyen vitaminler gibi vücutta depo edilir. Toksik dozlarda iştahsızlık, bulantı, yorgunluğa sebep olur. Ayrıca Ca emilim ve kemik yıkılımının artmasına bağlı hiperkalsemi, hiperkalsemiye bağlı olarakta özellikle arter ve böbreklerde olmak üzere pek çok organda kalsiyumun birikimine yol açar.

K Vitamini: Vitamin K kanın pıhtılaşması için gerekli olup değişik formları bulunan yağda eriyen bir vitamindir. Bitkilerde bulunan formuna filokinon, bağırsak bakteri florasında bulunan formu ise menakino 'dur. Tedavi için kullanılan K vitamini formu ise sentetik türevi olan menadion'dur (3).

K vitamini protrombin, kanın pıhtılaşma faktörlerinden VII, IX ve X 'un karaciğerde sentezlenmesi için gereklidir.

K vitamini lahana, karnıbahar, ıspanak, yumurta sarısı, karaciğerde bulunur. Ayrıca ince barsak bakterileri tarafından sentezlendiği için vücutta eksikliğinin görülmesi nadirdir. Ancak yeni doğanların bağırsakları sterildir ve K vitamini sentez edemezler bu nedenle yeni doğanlara tek doz K vitamini uygulaması önerilir. Yüksek dozda K vitamini verilmesi bebeklerde hemolitik anemi tablosuna yol açabilir.

E Vitamini: E vitamini; sadece bitkiler tarafından üretilen ve benzer yapılara sahip olan 8 farklı vitamin formunu kapsamaktadır. Bu formlar trimetil (α), dimetil (β veya γ) ve monometil (δ) tokoferol ve her birine karşılık gelen tokotrienollerdir. E vitamini vücuttaki en önemli anti oksidanlardan biridir (4).

E vitamini en çok bitkisel yağlarda bulunmakla birlikte hayvansal gıdalardan karaciğer ve yumurtada bulunur. E vitamini eksikliği prematür yenidoğanlarda görülür. Yetişkinlerde genellikle lipit emilim bozukluğuna bağlı gelişir. E vitamini eksikliğinde oksidatif strese bağlı hücre membran hasarı, eritrositlerde peroksidlere karşı duyarlılık meydana gelir.

E vitamini toksitesi diğer yağda eriyen vitaminlere göre çok daha nadir görülür.

KAYNAKÇA

1. Burtis C. A., Ashwood E. R. (2005). Analitler. Diler Aslan (Ed), Klinik Biyokimyada Temel ilkel Tietz 5. Baskı (543-567). Ankara: Palme Yayıncılık.
2. Champe P. C., Harvey R. A., Ferrier D. R. (2007). Vitaminler. Engin Ulukaya (Ed.), Biyokimya. Biyokimya Lippincott's Illustrated Reviews 3. Baskı (371-391). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
3. Murray R. K., Granner D., Mayes P. A., Rodwell V. W. (2004). Yağda Çözünür Vitaminlerin Ya-

Güncel Biyokimya Çalışmaları II

- pısı ve işlevi. Nurten Dikmen, Tuncay Özgünen (Ed.), Harper Biyokimya 25. Baskı (642-652). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
4. Gürdöl F, Ademoğlu E. (2006). Beslenme. Figen Güröl (Ed.), Biyokimya (583-604). İstanbul: Nobel Kitabevleri.
 5. Montgomery R., Conway T., Spector A. (2000). Beslenme. Nilgün Altan (Ed.), Biyokimya Olgu Sunumlu Yaklaşım (13-19). Ankara: Palme Yayıncılık.

Bölüm 11

VİTAMİNLER

Sibel Çiğdem TUNCER¹

Vitaminler; insanlar tarafından sentezlenemeyen bu nedenle doğal besin kaynaklarından alınması gereken, eksikliğinde spesifik bozukluk ve hastalığa sebebiyet veren organik bileşiklerdir (1).

Vitaminlerin Sınıflandırılması

Vitaminler kendi içinde suda çözünen vitaminler ve yağda çözünen vitaminler olarak başlıca iki ana gruba ayrılırlar (Şekil 1).

Vitaminler	
I - Suda Çözünen Vitaminler 1- Tiamin (B1 Vitamini) 2 - Riboflavin (B2 Vitamini) 3 - Niasin (B3 Vitamini) 4 - Pantotenik Asit (B5 Vitamini) 5 - Pridoksin (B6 Vitamini) 6 - Biotin (B7 Vitamini) 7 - Folik Asit (B11 Vitamini) 8 - Kobalamin (B12 Vitamini) 9 - Askorbik Asit (C Vitamini)	II - Yağda Çözünen Vitaminler 1 - A Vitamini 2 - D Vitamini 3 - K Vitamini 4 - E Vitamini

Şekil-1 Vitaminler

Suda çözünen vitaminler:Vitamin B1 (tiamin), vitamin B2 (riboflavin), vitamin B3 (niasin), vitamin B5 (pantotenik asit), vitamin B6 (piridoksin), vitamin B11 (folik asit), vitamin B12 (siyanokobalamin), vitamin B7 (biotin), vitamin C (askorbik asit)'dir (Şekil 1). Vitamin B12 ve vitamin C dışındaki diğer suda çözünen vitaminlerin vücutta depo şekilleri yoktur; diyetle düzenli olarak sürekli alınmaları gerekmektedir. Genellikle bitkisel besinlerde bulunurlar ve pişirmekle kolay bozulurlar. Suda çözünen vitaminler, enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin koenzimi veya kosubstratı olarak görev alırlar ve kofaktör olarak rol oynarlar (2).

Yağda çözünen vitaminler: Vitamin A, vitamin D, vitamin E, vitamin K'dır. Yağda çözünen vitaminlerin hepsi izopren türevi apolar moleküllerdir (3). Diyetteki yağ molekülü ile emilir ve taşınırlar. İdrarla atılamazlar, başlıca karaciğer ve

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Aksaray Üniversitesi Tıp Fakültesi, drozturke@yahoo.com

yağ dokusunda olmak üzere vücutta depo edilirler. Besinlerdeki yağ miktarının yetersiz olduğu durumlarda, sindirim bozukluklarında, safra ve pankreas bezi bozukluklarına yol açan hastalıklarda eksiklik belirtileri ortaya çıkar.

Yukarıda belirtilen vitaminlerin dışında vitamin gibi etki gösteren fakat genel sınıflamaya dahil edilmeyen bazı bileşikler vardı. Bu bileşiklere vitamin benzeri maddeler veya vitajenler denir. Bu vitamin benzeri bileşikler; kolin, α -lipoik asit, karnitin, PABA (p-aminobenzoat), inozitol ve koenzim Q gibi bileşiklerdir. Bu bileşikler suda çözünürler ve bazı biyokimyasal tepkimelerde katalitik etkilidirler. Ayrıca vücutta sentezlemezler, bu nedenle besin maddeleri içinde alınmaları gerekir (2).

I-Suda Çözünen Vitaminler:

Tiamin (B1 Vitamini): Vücutta enerji metabolizmasında rolü olan vitamindir. Biyolojik olarak aktif formu Tiyamin Pirofosfattır (TPP) ve TPP da çeşitli enzimatik reaksiyonlarda aldehit grubunun transferinde görev alan bir koenzimdir (2).

B1 vitamini, et, karaciğer, yumurta, süt, kuru baklagiller, buğday, mısır, pirinç, ceviz ve fıındıkta bulunur. Günlük gereksinimi yaşa göre değişmekle birlikte erişkinde 1,5 mg alınması yeterlidir (4).

B1 vitamini eksikliğinde beriberi hastalığı ortaya çıkar. Bu hastalık karbonhidrattan zengin, tiaminden fakir beslenme sonucunda oluşur. Beriberi hastalığının ilk ortaya çıkan belirtileri; periferik nöropati, demans, yorgunluk ve iştahsızlıktır. Hastalığın daha ilerleyen dönemlerinde ödem, kardiovasküler, nörolojik ve kas iskelet sistemi patolojileri ortaya çıkar. Wernike-Korsakoff sendromu da daha kötü beslenen kronik alkoliklerde tiamin alımının yetersiz olması ya da barsaklardan emilimin bozulması sonucunda görülür. Bu sendromda hafıza kaybı ve istemsiz kas kasmaları ön plandadır (4).

Riboflavin (B2 Vitamini): Riboflavin de denilen B2 vitamini; karbonhidrat, protein ve lipit metabolizmasında görev alan düzenleyici bir vitamindir. Biyolojik olarak flavin mononükleotid (FMN) ve flavin adenin dinükleotid (FAD) olmak üzere iki aktif formu vardır. Birçok enzimde flavin mononükleotid (FMN) veya flavin adenin dinükleotit (FAD) şeklinde prostetik grup olarak bulunur (2).

B2 vitaminin bulunduğu besinler; karaciğer, et, süt ve süt ürünleri, yumurta, balık, yeşil yapraklı sebzeler ve tahıllardır. B2 vitamini ısıya dayanıklı, ancak ışığa karşı duyarlı bir vitamindir. Bu nedenle B2 vitamini bulunan yiyecekler ışıktan bekletilmemelidir. Erişkinlerde günlük gereksinimi 3 mg'dır. Ancak büyüme, gebelik, hipertiroidizm gibi metabolizmanın hızlandığı durumlarda B2 vitamin ihtiyarcıda artmaktadır.

B2 vitamini eksikliğinde; dermatit gibi deri rahatsızlıkları, dudaklarda çeliozis-angular lezyon, glossit, sinir sisteminde bozukluklar, gözde yanma ve kızarıklık, ishal, anemi, çocuklarda büyüme yavaşlaması, kilo kaybı gibi sorunlar görülür.

Niasin (B3 Vitamini): Niasin de denilen B3 vitamini karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmasında yeralan piridin türevi bir vitamindir. Biyolojik olarak aktif formu; nikotinamid adenin di nükleotid (NAD+) ve bunun fosforillenmiş şekli nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP+) olmak üzere iki tanedir. NAD+ ve NADP+, çok sayıda oksidoredüksiyon reaksiyonlarında dehidrojenazların koenzimi olarak görev yaparlar (2).

B3 vitaminin bulunduğu besinler; et, karaciğer, balık, kümes hayvanları, maya, tahıllar, kuru baklagiller ve yeşil yapraklı sebzelerdir. B3 vitamini su ve alkolde çözünen; asit, alkali, ışık ve ısıya dayanıklı bir vitamindir. Erişkinlerde günlük gereksinimi ortalama 15-18 mg 'dır. Gebelik, stres, egzersiz ve bazı hastalık durumlarında gereksinim artmaktadır (4).

B3 vitamini eksikliğinde; dermatit, diyara, demans (3D) ile karakterize Pellegra tablosu ortaya çıkar. Hastalık tedavi edilmezse ölüm ile sonuçlanır. Niasin eksikliğine yol durumlar; triptofan emilim bozukluğuna yol açan Hartnup hastalığı, karsinoid tümörler ve izoniazid türevi ilaçlarla tedavidir (4).

Pantotenik Asit (B5 Vitamini): Pantotenik asit de denilen B5 vitamini karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmasında görev alan bir Koenzim A bileşenidir. Pantotenik asit sinir sisteminde, bazı hormonların çalışmasında ve yağların sentezinde etkilidir (3). Tüm hayvansal ve bitkisel besinleri tüketmekle yeteri kadar B5 vitamini alımı sağlanır. B5 vitamini tüm hayvansal ve bitkisel besinlere bulunmakla birlikte en önemli kaynakları yumurta, karaciğer ve bira mayasıdır. Erişkinlerde günlük gereksinimi ortalama 6 mg'dir.

B5 vitamini besinlerde yaygın olarak bulunduğu ve bağırsak florası tarafından sentez edildiğinden dolayı eksikliği görülmez.

Piridoksin (B6 Vitamini): B6 vitamini piridin türevi olan piridoksin, piridoksal ve piridoksaminin ortak adıdır. Vitaminin aktif formu piridoksal fosfat ve piridoksamin fosfatdır. Aktif formları çok sayıda enzim için, özellikle de aminoasitleri içeren reaksiyonları katalizyenler için koenzim görevi görür (1).

B6 vitamini özellikle et, karaciğer, böbrek, tahıllar ve kuru baklagillerde bulunur. Erişkinlerde B6 vitamini eksikliği nadir görülen bir durumdur. Erişkinlerde günlük gereksinimi ortalama 2 mg'dir. Eksikliğinde konvülsiyon, huzursuzluk, anemi, çocuklarda büyüme geriliği, deri bulguları görülür.

Biotin (B7 Vitamini): Biotin de denilen B7 vitamini organizmada karboksilasyon reaksiyonlarını katalize eden karboksilaz enzim sistemlerinin prostetik grubu olarak görev yapar (5).

B7 vitamini, günlük tüketilen besinlerde yeterli miktarda bulunduğundan eksikliği pek görülmez. Ancak yumurta akında bulunan ve avidin adı verilen bir glikoprotein, biotine sıkıca bağlanıp barsaktan emilmesini engeller. Diyetinde protein kaynağı olarak çiğ yumurta akı bulunan kişilerde dermatit, glossit, bulantı, iştah kaybı gibi biotin eksikliği belirtileri ortaya çıkar.

Folik Asit (B9 Vitamini): Folik asitin temel fonksiyonu B12 vitamini ile birlikte hücre bölünmesi veya çoğalması için gerekli DNA sentezini sağlamaktır. Aktif formu tetrahidrofolattır. Tetrahidrofolat organizmada tek karbon atomlu grupların bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlayan enzimlerin kofaktörüdür (2).

Folik asit yetersizliği; gereksinimin artması (gebelik ve emzirme gibi), ince bağırsakta emilim bozulması, alkolizm gibi durumlarda görülür.

Folik asit eksikliğinde pürin, timin sentezi ve dolayısıyla nükleik asit biyosentezi bozulur ki bu, megaloblastik anemi, lökopeni ve trombositopeni gibi kan tablosunun bozulmasına yol açar.

Kobalamin (B12 Vitamini): B12 vitamini (Kobalamin); temel fonksiyonu folik asit ile birlikte hücre bölünmesi veya çoğalması için gerekli DNA sentezlenmesinde görev alır. Ayrıca diğer suda eriyen vitaminlerin aksine vücutta depo edilir (2).

B12 vitaminin esas kaynağı hayvansal gıdalar olup; en fazla karaciğer ve böbrekte daha az oranda et, süt, peynir de bulunur.

B12 vitamini ince barsağın ileum kısmından emilir ve emilebilmesi mideden salgılanan intrinsek faktöre (IF) ihtiyaç vardır. Hayvansal gıda tüketimi olan, mide, ince barsak hastalığı olmayan kişilerde B12 vitamini eksikliği olması pek mümkün değildir. Eksikliği sonucunda megaloblastik anemi oluşur (5).

Askorbik Asit (C Vitamini): C vitaminin aktif şekli askorbik asittir. Suda çözünen vitaminler arasında en az stabil olanıdır. Bu vitaminin asıl görevi vücuttaki bazı önemli hidroksilasyon reaksiyonlarında redükleyici ajan olarak yer almasıdır. Dolayısıyla C vitamini, vücutta kollejenin sentezi sağlayarak normal bağ dokusunun oluşması ve yara iyileşmesi için gerekli bir koenzimdir. Ayrıca C vitamini bağırsaklardan demir emilimini kolaylaştırmaktadır.

C vitamini yeşil sebze ve meyvelerde özellikle turuncgillerde bulunur. C vitamini yetersizliğinde kolay zedelenen kan damarları, diş etlerinde çekilme, şiş eklemler ve anemi ile karakterize skorbut hastalığı ortaya çıkar.

II-Yağda Çözünen Vitaminler:

A Vitamini (Retinol): Retinoidler görme, üreme, büyüme ve epitel dokularının sağlamlılığı için gerekli olan vitamindir. A vitamini biyolojik olarak aktif pek çok molekülün ortak adıdır. Aktif formları retinol, retinal ve retinoik asittir.

Retinol, retinal ve retinoik asidin kendilerine özgü biyolojik fonksiyonları vardır: Retinol, bir hormon olarak işlev görür. Retinal, görme pigmenti rodopsinin gerekli ön maddesidir. Retinoik asit ve metabolitleri, epitel farklılaşması üzerinde etki gösterirler (3).

A vitamini karaciğer, böbrek, yumurta sarısı, tereyağı ve süt gibi hayvansal gıdalarda bulunur. Barsaklardan emilen A vitamini şilomikron molekülü içinde karaciğere taşınır. Şilomikrondaki retinol esterleri karaciğer tarafından tutulur ve depolanır. Vücudun ihtiyacı doğrultusunda karaciğerden salınan retinol; plazma retinol-bağlayıcı protein (RBP) ile dokulara taşınır ve oluşan retinol-RBP kompleksi periferel doku hücrelerinin yüzeyindeki özel reseptörlere bağlanarak hücre içine alınır.

A vitamini görme döngüsü, üreme, büyüme ve epitel dokularının sağlamlılığı için gereklidir. A vitamini eksikliğinin en erken belirtilerinden biri gece körlüğüdür. Ayrıca görme eşiği yükselir ve loş ışıkta göremeyi zorlaştırır. Ciddi A vitamini eksikliği kseroftalmiden körlüğe kadar neden olabilir. Deride de A vitamini eksikliği psöriasis ve akne gibi hastalıklara neden olur.

Aşırı A vitamini alınması hipervitaminoz A denilen toksik bir sendroma neden olur. Günde 7,5 mg'dan fazla A vitamini alınımından kaçınılmalıdır. Kronik A hipervitaminozu ciltte kuruma ve kaşıntı, karaciğerde büyüme, sinir sisteminde de beyin tümörü belirtilerini taklit eden tabloya neden olur.

D Vitamini: Vitamin D kolesterolden sentezlenen, hormon benzeri görevleri olan steroid yapılu bir vitamindir. D vitaminin aktif formu 1.25-dihidroksikolekalsiferol (1.25-di OH D3) olup, en önemli görevi vücutta kalsiyum ve fosfor dengesini düzenlemektir (3).

D vitaminin 2 kaynağı vardır. Ya diyetle bitkilerde bulunan ergokalsiferol (D2) ve hayvan dokularında bulunan kolekalsiferol (D3) şeklinde alınır ya da kolesterol sentezinde ara molekül olan 7- dehidrokolesterolden güneş ışığının etkisi ile derinin dermis ve epidermiş tabakasında kolekalsiferol şeklinde endojen olarak sentezlenir (2).

Diyetle alınan D2 ve D3 vitaminleri biyolojik olarak aktif değildir, vücutta iki hidroksilasyon reaksiyonu ile aktif formu olan 1.25-di OH D3 dönüşür. İlk hidroksilasyon reaksiyonu karaciğerde gerçekleşir ve 25 hidroksikolekalsiferol (25 OH D3) oluşur. 25 OH D3 D vitaminin vücuttaki depo şeklidir. İkinci hidroksilasyon işlemi böbreklerde gerçekleşir ve D vitaminin aktif formu olan 1.25-di OH D3 oluşur.

1.25-di OH D3 ana fonksiyonu plazmada ki kalsiyum (Ca), fosfor (P) dengesini düzenlemektir. Bu fonksiyonu başlıca barsaktan Ca tutulumunu arttırarak, böbrekten Ca kaybını azaltarak ve ihtiyaç durumunda kemik rezorbsiyonunu sağlayarak yerine getirir.

D vitamini başlıca yağlı balıklarda, karaciğerde ve yumurta sarısında bulunur. D vitamini eksikliği çocuklarda rikets, yetişkinlerde osteomalazi denilen kemik hastalıklarına neden olur. Ayrıca böbrek yetmezliği olan hastalarda olanlarda aktif forma dönüşümün azalmasına bağlı olarak renal osteodistrofi tablosu gelişir (4).

D vitamini diğer yağda eriyen vitaminler gibi vücutta depo edilir. Toksik dozlarda iştahsızlık, bulantı, yorgunluğa sebep olur. Ayrıca Ca emilim ve kemik yıkılımının artmasına bağlı hiperkalsemi, hiperkalsemiye bağlı olarakta özellikle arter ve böbreklerde olmak üzere pek çok organda kalsiyumun birikimine yol açar.

K Vitamini: Vitamin K kanın pıhtılaşması için gerekli olup değişik formları bulunan yağda eriyen bir vitamindir. Bitkilerde bulunan formuna filokinon, bağırsak bakteri florasında bulunan formu ise menakino 'dur. Tedavi için kullanılan K vitamini formu ise sentetik türevi olan menadion'dur (3).

K vitamini protrombin, kanın pıhtılaşma faktörlerinden VII, IX ve X 'un karaciğerde sentezlenmesi için gereklidir.

K vitamini lahana, karnıbahar, ıspanak, yumurta sarısı, karaciğerde bulunur. Ayrıca ince barsak bakterileri tarafından sentezlendiği için vücutta eksikliğinin görülmesi nadirdir. Ancak yeni doğanların bağırsakları sterildir ve K vitamini sentez edemezler bu nedenle yeni doğanlara tek doz K vitamini uygulaması önerilir. Yüksek dozda K vitamini verilmesi bebeklerde hemolitik anemi tablosuna yol açabilir.

E Vitamini: E vitamini; sadece bitkiler tarafından üretilen ve benzer yapılara sahip olan 8 farklı vitamin formunu kapsamaktadır. Bu formlar trimetil (α), dime-til (β veya γ) ve monometil (δ) tokoferol ve her birine karşılık gelen tokotrienol-lerdir. E vitamini vücuttaki en önemli anti oksidanlardan biridir (4).

E vitamini en çok bitkisel yağlarda bulunmakla birlikte hayvansal gıdalardan karaciğer ve yumurtada bulunur. E vitamini eksikliği prematür yenidoğanlarda görülür. Yetişkinlerde genellikle lipit emilim bozukluğuna bağlı gelişir. E vitamini eksikliğinde oksidatif strese bağlı hücre membran hasarı, eritrositlerde peroksitlere karşı duyarlılık meydana gelir.

E vitamini toksitesi diğer yağda eriyen vitaminlere göre çok daha nadir görülür.

KAYNAKÇA

1. Burtis C. A., Ashwood E. R. (2005). Analitler. Diler Aslan (Ed), Klinik Biyokimyada Temel ilkeler Tietz 5. Baskı (543-567). Ankara: Palme Yayıncılık.
2. Champe P. C., Harvey R. A., Ferrier D. R. (2007). Vitaminler. Engin Ulukaya (Ed.), Biyokimya. Biyokimya Lippincott's Illustrated Reviews 3. Baskı (371-391). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
3. Murray R. K. , Granner D., Mayes P. A., Rodwell V. W. (2004). Yağda Çözünür Vitaminlerin Yapısı ve İşlevi. Nurten Dikmen, Tuncay Özgünen (Ed.), Harper Biyokimya 25. Baskı (642-652). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
4. Gürdöl F., Ademoğlu E. (2006). Beslenme. Figen Güröl (Ed.), Biyokimya (583-604). İstanbul: Nobel Kitabevleri.
5. Montgomery R., Conway T., Spector A. (2000). Beslenme. Nilgün Altan (Ed.), Biyokimya Olgu Sunumlu Yaklaşım (13-19). Ankara: Palme Yayıncılık.

Bölüm 12

İTERLÖKİN (İL)-10 GENİNİN -1082 (G/A), -819 (C/T), -592 (C/A) PROMOTOR POLİMORFİZMLERİ VE İLİŞKİLİ PATOLOJİLER

Sibel ÖZDAŞ¹

GENETİK POLİMORFİZM

Belirli bir türün farklı bireyleri genetik olarak birbirinin aynı değildir. DNA dizileri bir dereceye kadar farklılık gösterir ve bu farklılıklar bir türün bilinen genetik çeşitliliğin temelini oluşturur (Lewontin vd., 1966; Harris vd., 1966). Bu DNA dizi varyasyonları beslenme ve üreme stratejileri, geliş bulaşıcı hastalıkların yönetimi gibi yeni özellikler kazandırarak bir türün adaptasyon kapasitesini artırır, bu nedenle gen ve genom dizileri, biyolojik evrime yön vermiştir (Vander vd., 2012; Forcada ve Hoffman, 2014 Hake ve Ross-Ibarra, 2015; Soares ve Weiss, 2015).

Bir kromozomun spesifik bir lokusunda bulunan DNA dizi alternatiflerine “alel” denir. İnsan otozomal kromozomunun her bir lokusunda anne ve babadan gelen iki allel bulunur ve belirgin bir karakterin genetik bilgisini temsil eder. Popülasyonlarda bir allelin bulunma sıklığı değişken olup, populasyonun tüm genlerine ait allel frekansları karakterize edilebilir (Basaran N. 1999). İnsan genomunun yaklaşık %0.1’i allelik varyasyon göstermekte olup, bu varyasyonların kaynağı sıklıkla polimorfizmler olmakla birlikte, insersiyon, delesyon gibi mutasyonlar ve rekombinasyonla da olabilir (Cooper vd., 1985). Varyasyonlar her zaman fenotipe yansımaya da bir kısmı işlevsel öneme sahip olup, anatomik-fizyolojik-metabolik farklılıklar, hastalıklara karşı koruyuculuk, hastalıklara yatkınlık, hastalıkların ilerlemesi, terapötik yanıt, ilaç direnci, istenmeyen ilaç reaksiyonları ve karakter özellikleri gibi insanlar arasında bulunan çeşitliliğin temelidir (Collins vd., 1997; Quintana-Murci ve Clark, 2013; Bodmer, 2015).

Polimorfizmler soyların takibinde kromozomal kalıtım paterni olarak kullanılabilmesi gibi insan hastalıklarıyla ilişkili genetik faktörlerin araştırılmasında önemli araçlardır (Johnson ve Todd, 2000; Risch, 2000). DNA’yı enzimatik

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Genetik ve Moleküler Mühendisliği ABD, Adana, Türkiye, e-mail: sozdas@atu.edu.tr

ve kimyasal yöntemlerle manüple edilebilen teknolojilerin gelişmesi, DNA dizi varyasyonlarının incelenmesi mümkün hale getirmiştir (Lewin, 1994). Gün geçtikçe insan genom analizine duyulan talep arttıkça, analitik enstrümantasyonlar ilerleyerek, polimorfizm tespit teknolojileri hızla gelişmektedir. Bugün bilenen önceden raporlanmış bilinen polimorfizmler için genotipleme, bilinmeyenler için DNA sekans analizi kullanılmaktadır. Polimorfizm tespitinde kullanılan teknolojiler gün geçtikçe daha hassas, verimli ve ekonomik hale gelmiş ve maliyeti düşmüş olup, artık büyük ölçekli genetik çalışmalar kısa zamanda tamamlanabilmektedir (Stein, 2004).

İki tip polimorfizm bulunmakta olup, bunlar tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphisms; SNP) ve DNA dizi tekrarlarıdır (Hartl ve Jones 2002). SNP, DNA dizinde belirli bir nükleotidin polimorfizmi olup, popülasyonda bu tek nükleotidlik bölge farklılık gösterir. Bir popülasyondaki bir bireyin DNA'sının belirli bir bölgesi bir TA baz çiftine sahipken, diğer bireyin DNA'sının aynı bölgesinde bir CG baz çifti olabilir, SNP bu farklılığı temsil eder. SNP'ler genomun her yerinde bulunabilir, insan genomunun kodlamayan DNA dizisinin her 1000 baz çiftinde (bp)'de bir, kodlayıcı DNA dizinin ise her 3000 bp'de bir SNP varlığı muhtemeldir (Bodmer ve Bonilla, 2008). SNP'ler, bir popülasyonda %1'den daha sık görülen allelik varyasyonlar olup, bireyler arasındaki en yaygın genetik farklılığı ifade ederken, nadir genetik varyantlar görülme sıklığı %1'den küçük olup, genellikle bireyde zararlı etki gösterirler.

İnsan popülasyonunda bugün yaygın olarak bilinen yaklaşık 3 milyon SNP tanımlanmış olup, bunların, nispeten 1 milyonu kalp-damar hastalıkları, hipertansiyon, kollajen doku hastalıkları, kanser ve diyabet gibi birçok kompleks hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Cargill vd., 1999; Palalı vd., 2014; Özdaş S vd., 2018).

SNP'ler biallelik (iki alleli), triallelik veya tetra-allelik olabilirler ancak SNP'ler bir popülasyondaki bireylerde sıklıkla bialleliliği tanımladıkları için SNP'ler "biallelik markılar" veya "dialelik markılar" olarak isimlendirilir (Goto vd., 2001). SNP genotipleri ve haplotipleri katılımla aktarılır. Haplotipler, tek bir SNP'le karşılaştırıldığında daha fazla hastalık veya fenotiplerle bağlantı gösterebilir ve bu nedenle güçlü bir tanısal değeri vardır (Stephens vd., 2001; Babademez vd., 2016; Atilla vd., 2018).

Yaygın olmasa da kodlayıcı bölgelerde yer alan SNP'ler kusurlu ürüne veya ürününün erken sonlanmasına neden olarak orak hücre anemisi, kistik fibrozis gibi patolojik durumlara neden olabilir. SNP'ler DNA transkripsiyon faktörü bağlanma dizileri, promotör bölgeleri, genlerin intron-ekzon sınırlarında gibi kodlama yapmayan bölgelerde yer alarak gen ifade düzeyini veya transkripsiyon işlemlerini etkileyebilir (Li ve Pritchard, 2000; Artiga vd., 2002; Meyer UA. 1997; Palalı

vd., 2014; Özdaş S vd., 2018). SNP'lerin varlığı hastalıktan koruyuculuk, hastalığa yatkınlık, hastalık şiddetinde artma eğilimine gibi çeşitli fenotiplere eşlik eder, bu nedenle SNP'ler, hastalık teşhisi, hastalık-yatkınlık taraması ve diğer uygulamalarda oldukça kullanışlı araçlardır (The international HapMap Consortium, 2003; Stein, 2004, Özdaş vd., 2015; Özdaş vd., 2017).

İNTERLÖKİN 10'UN FONKSİYONU VE *IL-10* GENİ

Sitokinler hücreler arasındaki iletişimden sorumlu olup, inflamatuvar süreçlerde fizyolojik ve patolojik olarak önemli bir rol oynarlar. Uyarılan hücreler tarafından de novo olarak salınan sitokinler depolanmayan küçük proteinler veya glikoproteinler (80 kDa'dan küçük) olup, özgül reseptör-ligandlarına bağlanır. Sinyal iletimini başlatarak veya ikincil-haberci yolları aktive ederek, başka hedef hücreleri veya salındığı hücreyi kontrol eder veya düzenlerler (Sabat, 2010). Sitokinler çeşitli gen aktivasyonu veya inaktivasyonu ile geniş çaplı bir etkileşim ağı oluşturarak, birçok doku, organ ve sistemleri kontrol etmektedir. Sitokinler fonksiyonu, üreten hücre tipi gibi bazı kriterlere göre gruplandırılabilir. Ancak sitokinler sıklıkla fonksiyonuna göre proinflamatuvar T helper 1 (Th1) (Interferonlar (INFs), Tümör nekrozis faktör- α (TNF) ve İnterlökin-1 (IL)...gibi) ve anti-inflamatuvar Th2 (IL-10 ve IL-4...gibi) sitokinler olarak değerlendirilmesine karşın bazıları her iki etkiyi de gösterebilir (Keen, 2002). İnsan immün cevabın oluşması, oldukça karmaşık sistemler ağı tarafından düzenlenmekte olup, özellikle pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar sitokinler arasındaki ilişki belirleyici olabilir (Opal ve DePalo, 2000).

ILs, aktive edilmiş lökositler tarafından salgılanan küçük glikoproteinler olup, makrofajlarda ve T lenfosit aktivasyonunda, proliferasyonunda ve toksisitesinde rol oynarlar. İnterlökin üretimindeki bozukluklar birçok hastalık patogenezi ile ilişkilendirilmiştir. Bugüne kadar yeni sitokinlerle (başlıca İnterlökin-10 homologları) birlikte yaklaşık kırk adet IL keşfedilmiş olup, kronolojik sırasına göre numaralandırılmıştır (Zdnaov, 2004).

IL-10, 36 kDa ağırlığında homodimerik bir sitokin olup, keşfedildiğinde T hücrelerinde sitokin üretimini baskıladığı için "sitokin sentez-inhibitör faktörü" olarak raporlanmıştır (Fiorentino vd., 1989). Son yıllarda, önemli bir amino asit dizi benzerliğine sahip birçok IL-10 ile yapısal olarak benzer birçok molekül keşfedilmiş olup, IL-10 altı ailesi, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28 ve IL-29 içeren bu sitokinler IL-10 analogları olarak da bilinen dokuz üyeden oluşmaktadır (Gallagher vd., 2000; Blumberg vd., 2001; Xie vd., 2000; Caudell vd., 2002; Kotenko vd., 2003; Sheppard vd., 2003; Fickenscher ve Pirzer, 2004). IL-10 aktivitesine, class II sitokin reseptör ailesinin bir üyesi olan IL-10 reseptörü (IL-10R) aracılık

eder. IL-10R, non-kovalent etkileşimler ile R1 ve R2 zincirlerinin bağlanarak, heterodimer yapı oluşturur ve IL-10'nun, R1 zincirine afinitesi yüksektir (50-200 pM). R2'nin reseptör kompleksine eklenmesiyle, ligand bağlanır ve sinyal iletimini mümkün kılar (Kotenko vd., 1997; Rutz ve Ouyang, 2016). IL-10, Janus kinaz (JAK) / Sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) yoluyla hücre içine sinyal iletirler (Rutz ve Ouyang, 2016).

Yapılan in-vivo çalışmalar, monositlerin, makrofajların, nötrofillerin, eozinofillerin, dendritik hücrelerin, B lenfositlerin, naturel killer (NK) hücrelerin, mast hücrelerin, sitotoksik T hücrelerin önemli IL-10 kaynakları olduğu bildirilmiştir. IL-10, monositlerde antijen sunumunda, immün mediatörlerin salınımında ve fagositozda görev yapar. Ayrıca keratinositler, epitel ve tümör hücreleri de IL-10'un kaynakları arasındadır (Moore vd., 2001). IL-10, farklı hücreleri hedefleyerek pro-inflamatuvar sitokinlerin ve sitokin-reseptör ekspresyonunu çeşitli baskılar ve inflamatuvar yanıtın oluşumunu engeller. IL-1, IL-2, IL-12, TNF- α ve kemokinler gibi pro-inflamatuvar aracı moleküllerin ve majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf II, CD80, CD86 gibi kostimulatörlerin, adezyon moleküllerinin salınımını baskılar ve antijen sunum kapasitesini azaltarak inflamasyonda kritik rol oynar. IL-10, B lenfositlerinde, apoptozisi önleyerek, hücre proliferasyonunu artırır (Sabat, 2010).

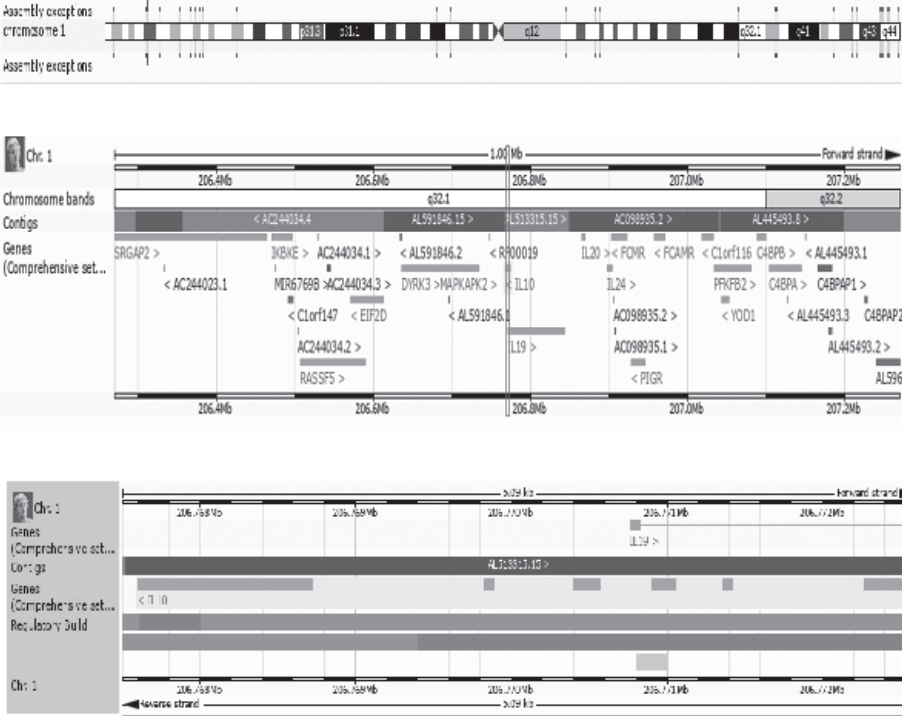
IL-10 geni (Ensembl No, ENSG00000136634), 1. kromozomda q31-32 bölgesinde lokalize olmuştur (Moore KW vd 2001). *IL-10*, beş ekzon ve dört introndan oluşan 4.7 kb'lık bir DNA dizisidir (Spits vd., 1992). *IL-10* geni, yaklaşık 200 kb'lık bir segmente gen kümesi içinde bitişik birkaç gen ile birlikte yer alır (Şekil 1)

IL-20 ve *IL-19* genleri, *IL-10*'un yaklaşık 90 kb yukarısında bulunurken, *MAPKAP2K* ve *DYRK3* genleri ise *IL-10*'un aşağısında lokalizedir. Bu gen kümesinde, *IL-10* gen transkripsiyonu diğerlerine ters yönde ilerler. *IL-10* üreten tüm hücrelerde *IL-10* gen promotörleri benzer ve dolayısıyla transkripsiyonu başlatan transkripsiyon faktörleri korunur. Korunan transkripsiyon faktörlerine rağmen aksine, *IL-10*'u indükleyen sinyal yolları genellikle hücre tiplerine özgüdür. Bununla birlikte *IL-10* gen bölgesini içeren kromatin farklı hücrelerde birbirinden farklı olarak modifiye edilebilir ve post-transkripsiyonel modifikasyonlar da hücreye özgü olabilir.

IL-10 geninde birinci metiyonin kodonundan yukarıda 91-88 bp arasında tipik bir TATAAAA dizisi bulunmakta olup, ekspresyonunun promotör aracılığı ile düzenlenmektedir (Tone vd., 2000). Ayrıca *IL-10* geninde -233 ve -237 bp arasında bir CCAAT kutusu bulunmaktadır. Uyarana yanıt olarak farklı hücre tiplerinde *IL-10* geni yapısal olarak yaklaşık 2 bir kb'lık mRNA ile ifade olması ile birlikte genin 7 transkripti, 177 ortologu, 4 paralogu, bulunmaktadır. Bununla birlikte *IL-10*

gen ifadesi post-transkripsiyonel translayon gibi farklı mekanizmalarda çeşitli düzeylerde kontrol edilmesine rağmen sıklıkla transkripsiyonel seviyede düzenlenir (Bienvenu., 1995). *IL-10*'nun transkripsiyon hızı ve ürünün transkripsiyonu sıklıkla genin yapısal düzenlenmesi ile ilişkilidir (Crawley vd., 1999; Eskdale vd., 1998).

Kromozom 1: 204,164,064-204,171,003



Şekil 1. IL-10 Geni (<https://www.ensembl.org>)

Gen ifadesinin yapısal ve/veya farklı düzeylerdeki kontrolü, enflemasyon yanıtının ve homeostatik yanıtın hızlı oluşumunu sağlar (Moore vd., 2001). *IL-10* gen ifadesi, T hücreleri, B hücreleri, monositler, makrofajlar ve NK hücrelerinde ayrıntılı olarak incelenmiştir. Sp1, Sp2, STAT3, C/EBP β , AP-1 (aktivatör protein-1), c-Maf (c muskuloaponevrotik fibrosarkoma) gibi transkripsiyon faktörleri *IL-10* gen ifadesini pozitif olarak düzenlenir ve bu transkripsiyon faktörleri *IL-10* gen promotörü üzerindeki GC kutusuna bağlanır (Tone vd., 2000).

IL-10 GENİ PROMOTOR POLİMORFİZMLERİ VE İLİŞKİLİ HASTALIKLAR

Çalışmalar IL-10 üretim kapasitesinin çevreyle birlikte genetik faktörlerden etkilendiğini ve IL-10 seviyesinin erkeklerde kadınlara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Takanashi vd., 1999). Reuss vd ve Westendorp RG vd, aileler ile yaptıkları çalışmada, IL-10 üretim seviyesinde bireysel farklılıkların olduğu ve üretim seviyesindeki varyasyonun, 0.5-0.75'inin çevresel etmenlerden ziyade genetik faktörlerin sorumlu olabileceğini bildirmiştir.

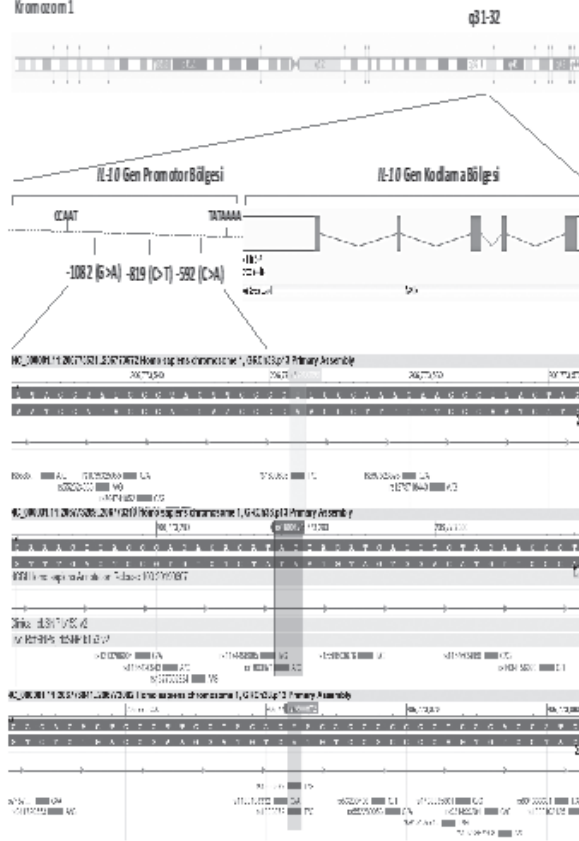
IL-10 geni polimorfiktir ve bu varyasyonlar bireylerde üretilen IL-10 düzeylerinde farklılıklara neden olur (Kalish vd., 2004). İn- vitro çalışmalar IL-10 üretim düzeyindeki çeşitliliğin, temelde genetikle ilişkili olduğunu göstermiş ve bu farklılığın hastalığın şiddeti ve hastalığa yatkınlık ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle *IL-10* geni promotör bölge varyasyonları hastalık patogenezindeki genetik predispozisyonun moleküler altyapısını açıklayabilir (Westendorp vd., 1997).

IL-10 geninin 5' ucunda bazı polimorfizmler dikkat çekici olup, uzak promotör bölgesinde -2763, -2849, -575 birçok genetik varyantı olmasına rağmen çalışmaların birçoğu, transkripsiyon başlama noktasından 1.2 ve 4 kb yukarısındaki iki dinükleotidlik tekrarlardan (mikrosatellitler) oluşan IL10.R - IL10.G (Vieira vd., 1991; Eskdale ve Gallagher, 1995; Eskdale vd., 1996) ve üç adet tek nükleotid polimorfizm (SNPs) -1082 (G>A) (SNP ID: rs1800896), -819 (C>T) (SNP ID: rs1800871) ve -592 (C>A) (SNP ID: rs1800872) ve onların haplotipleri GCC, ACC, ATA, *IL-10*'nun promotöründen 5'-3' yönünde sırasıyla üzerinde odaklanmıştır (Şekil 2) (Eskdale vd., 1997; Trifunović vd., 2015).

Her ne kadar IL-10 salınımını endojen ve eksojen faktörler etkilese de hücrelerden salınan IL-10 miktarı aynı zamanda genin bu promotör bölgesindeki IL10.R, IL10.G ve SNPs'lerine bağlıdır. Özellikle *IL-10* -1082, -819 ve -592 SNP'lerinde güçlü bir bağlantı dengesizliği olduğu ve bu bağlantının *IL-10* ifade düzeyi ile ilişkili gösterilmiş ancak farklı sonuçlar elde edilmiştir (Crawley vd., 1999; Eskdale vd., 1999; Huang vd., 2005).

Elektroforetik mobilite deneylerinde, -1082A alelinin, 1082G allele karşılaştırıldığında nükleer faktörlerin daha güçlü bir bağlanma afinitesi gösterdiği ve bu promotör bölgesinin Ets-faktörünün bağlanma bölgesi olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca Ets transkripsiyon faktörleri ailesi, immün yanıt ve hücre proliferasyonunda rol oynayan genlerin başlıca düzenleyicileridir (Crepieux vd., 1994). Ayrıca -592. pozisyonda bir STAT3'in bağlanma bölgesi yer alabilir ve negatif düzenleyici olduğu varsayılmaktadır (Gibson vd., 2001, Crawley vd 1999). *IL-10* geninin promotöründeki -571. bölgesi Sp1-bağlama motifli bir bölge olup, bu pozisyondaki

SNP'in *IL-10* promotör aktivitesini değiştirerek, *IL-10* seviyesinin değiştirebileceği düşünülmektedir (Steinke vd., 2004).



Şekil 2. *IL-10* Geni ve Promotor Bölgesi

Birçok araştırmadan elde edilen sonuçlar *IL-10*, gen ifadesinin, polimorfik kontrolünün, immün sistemin düzenlenmesinde ve çeşitli hastalıklara yatkınlık veya hastalık şiddeti ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Yapılan literatür taramasında *IL-10* -1082, -819 ve -592 SNP'leri allelleri, genotipleri ve haplotipleri, sistemik lupus eritematozus, astım, psoriasisde, çeşitli kanser tipleri, inflamatuvar barsak hastalığı, romatoid artrit, graft versus-host hastalığı ve hematopoetik hücre nakli sonrası hayatta kalma, Crohn's hastalığı ve tüberküloz gibi hastalık patogenezi ile ilişkilendirilmiştir (Bidwell vd., 1999; Lin vd. 2003; Kingo vd., 2005). Buna rağmen, bu polimorfizmlerin patolojiye nasıl katkıda bulunduğunu gösterir "sebe-sonuç" çalışmaları oldukça az sayıdadır (Turner vd., 1997; Gonzales-Amaro vd., 1998; Rood vd., 1999; Crawley vd., 1999; Nieters vd., 2001; Moore vd., 2001;

Liu vd., 2013; Song vd., 2013). Genotip, allel ve haplotip frekansları etnik farklılıklardan nedeniyle popülasyonlar arasında değişkenlik göstermekte olup, bazı polimorfizmler sadece bazı popülasyonlarda bulunabilir (Ma vd., 2005; Lei vd., 2003). Bu gibi farklılıklar hastalık ve polimorfizm arasındaki ilişkinin perdelenmesine neden olabilir (Ma vd., 2005).

IL-10 genin polimorfizmi ile erken doğum arasındaki ilişkiyi bildirmiş olup, *IL-10* -1082G allelini taşıyan kadınlarda *IL-10* mRNA seviyesinin yüksek olduğu ve bu kadınların yaklaşık 1.72 kat erken doğum yapma riskine sahip olduğu bildirilmiştir (Pandey vd., 2017).

Sistemik lupus eritematozus, B lenfosit hiperaktivitesi ve çift sarmallı DNA'ya karşı antibadilerin üretimi ve T lenfositlerinin işlevsizliği ile karakterize kompleks bir otoimmün hastalıktır. *IL-10*'nun artmış üretiminin B lenfositleri indüklemesi nedeniyle, *IL-10*'nun sistemik lupus eritematozus patogenezinde önemli olduğu raporlanmıştır (Peng vd., 2013). Farklı popülasyonlarda yapılan çok sayıda çalışmada *IL-10* geni -1082, -819, ve -592 polimorfizmleri ve sistemik lupus eritematozus arasındaki ilişki değerlendirilmiş ve artmış *IL-10* üretimine neden olan -1082G allelini veya *IL-10* GCC haplotipini taşıyan bireylerin sistemik lupus eritematozus riskinin yüksek olduğu raporlanmıştır (Gonzales-Amaro vd., 1998, Rood vd., 1999; Moore vd., 2001; Liu vd., 2013; Song 2013). Ayrıca gerçekleştirilen meta-analiz çalışmalarında, *IL-10* -1082G ve -819C allelinin Asyalılarda, *IL-10* -1082G alleli ve *IL-10* GCC haplotipinin ise Avrupalılarda, artmış sistemik lupus eritematozus riskine eşlik ettiği bildirilmiştir (Nath vd., 2005; Song vd., 2013; Zhou vd., 2013).

Astım, hem genetik hem de çevresel risk faktörlerinin hastalığın patogenezinde önemli bir rol oynadığı karmaşık bir hastalıktır. Astım şiddeti ile *IL-10* konsantrasyonu arasındaki ters ilişkili olduğu bildirilmiştir (Chatterjee vd., 2005), *IL-10* promotöründe, ATA haplotipinin astıma yatkınlık ile daha şiddetli astım biçimleriyle bağlantılı polimorfizmler, düşük *IL-10* üretim seviyesi ile ilişkilendirilmiştir (Lim vd., 1998). Yapılan meta-analizlerde ile *IL-10* -1082AA, -592AC ve -592AA genotiplerini taşıyan Asyalıların astıma duyarlı olduğu bildirilmiştir (Nie vd., 2012; Zheng vd., 2014). Ayrıca etnik ve yaş tabakalaşma çalışmaları *IL-10* -1082G allelinin Doğu Asyalıları ve yetişkinler için artmış astım riski ile ilişki olduğunu göstermiştir (Hyun vd., 2013; Trifunović vd., 2015).

Psoriasisin patogenezinde ve hastalığın klinik seyrinde düşük *IL-10* seviyesinin kritik öneme sahip olduğu varsayılmaktadır. Karam vd., 2014). Psoriasisde, *IL-10* gen promotör bölgesinin polimorfizmleri sıklıkla araştırılmış ve *IL-10* ATA haplotipinin psoriasisle yatkınlıktan sorumlu olduğu ve hastalığın şiddetinde belirleyici rol oynadığı gösterilmiştir Kingo vd., 2003; Trifunović vd., 2015).

IL-10 geninde -1082. lokasyondaki SNP'in ve *IL-10* -819C alelinin enflamatuar bağırsak hastalığına, *IL-10* -1082GA ve GG genotiplerinin ise Crohn's hastalığına duyarlılığı artırdığı gözlenmiştir (Zhu vd., 2013; Lv vd., 2014; Trifunović vd., 2015).

Romatoid artrit hastalarında serum *IL-10* düzeyindeki düşüşün önemli olduğu, yüksek *IL-10* -1082GA ve *IL-10* -592CC genotip, *IL-10* -592C allel frekansının romatoid artritte eşlik ettiği bildirilmiştir (Lapadula vd., 1995; Lee 2012; Trifunović vd., 2015).

IL-10 -1082G alleli ve AA ve AG genotiplerinin Avrupalılar ve Amerikalılarda, *IL-10* -819C allel ile 592CC ve AC genotiplerinin Asyalılarda tüberküloz riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Scola vd., 2003; Liang vd. 2014; Trifunović vd., 2015).

IL-10 -1082A, -819T ve -592A alelleri ve bu alelleri içeren genotiplerinin ve ATA haplotipinin obstrüktif uyku apne riskini artırdığı bildirilmiştir (Özdaş vd., 2016).

IL-10 -1082A, -819T ve -592A alelleri, bu alelleri içeren genotipler ve GTC, ACC ve GCA haplotiplerinin nazal polipozis için yüksek risk olduğu raporlanmıştır (Özdaş, 2018).

Kanser, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle ortaya çıkan bir hastalık olup, sitokinlerin kanser patogeneğinde kritik bir rolü vardır. *IL-10*'nun yüksek tümörojenik potansiyele sahip olduğu, angiogenezi arttırdığı bildirilmiş ve kanserogeneze rolü ve polimorfizmleri çeşitli kanser türlerinde yaygın olarak çalışılmıştır (Huang vd., 1996; Stearns vd., 1999; Howell ve Rose-Zerilli, 2006). *IL-10* transkripsiyonun normal dokuda gözlenmezken, primerden metazatik melanoma geçişte arttığı bildirilmiştir (Kriiger-Krasagakes, 1994; Eijun vd., 2011; Trifunović vd., 2015).

IL-10 ATA haplotipinin melanomaya duyarlılıkla ilişkilidir (Vuoristo 2007). *IL-10* -1082G, -819C ve -592C allelinin, küçük hücreli olmayan akciğer kanserine (Shih vd., 2005) *IL-10* -1082G allelinin ise lenfoma (Cao vd., 2013), nazofarengeal kanseri (Huang vd., 2016) servikal ve baş boyun kanseri (Vairaktaris vd., 2008) için artmış riske eşlik ettiği bildirilmiştir. Ayrıca *IL-10* -819CT genotipinin rahim ağzı ve yumurtalık kanseri için önemli bir risk faktörü olduğu gözlenmiştir (Yu vd., 2013). Düşük *IL-10* üretimine neden olan *IL-10* -819TT ve -592AA genotipleri artan prostat ve kolon kanseri riskiyle ilişkili bulunmuştur (Faupel-Badger vd., 2008; Cacev vd., 2008). Bununla birlikte, prostat kanserinin kötü prognozu ile *IL-10* -1082G, -819C ve -592C allel ve *IL-10* GCC haplotip frekansının yüksek olduğu gözlenmiştir (Liu vd., 2010; Trifunović vd., 2015).

SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsan genomunun yaklaşık %0.1'i allelik varyasyon göstermekte olup, bu varyasyonların kaynağı özellikle SNP polimorfizmlerdir. Bir antiinflamatuvar sitokin IL-10, immün cevabın düzenlenmesinde kritik rol oynadığından, yapılan çalışmalar birçok patolojinin moleküler mekanizmasına katkısı olan önemli bir aday gen olduğunu göstermiştir. *IL10* geni polimorfik olmasına rağmen özellikle promotör bölgesindeki -1082, -819, -592 SNP'lerinin genin ifade düzeyini manüple ederek, ürün miktarını değiştirebileceği gösterilmiştir. *IL-10* 1082, -819, -592 SNP allel, genotip ve haplotip dağılımlarının popülasyonlar arasında farklı olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda *IL-10* -1082G allelinin yüksek ifade düzeyine neden olarak, erken doğum, sistemik lupus eritematozus, tüberküloz, astım riski akciğer kanseri, lenfoma, nazofarengeal, prostat, servikal ve baş boyun kanseri gibi patolojiler için riski arttırdığı bildirilmiştir. Bununla birlikte *IL-10* -819C allelinin sistemik lupus eritematozus, tüberküloz enflamatuvar bağırsak hastalığı ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, -592A allelinin ise obstrüktif uyku apnesi ve nazal polipozis riskini artırdığı raporlanmıştır. Düşük *IL-10* düzeyi ile ilişkili *IL-10* -1082AA, -592AC, -592AA genotipleri astım, obstrüktif uyku apne, -819TT ve -592AA genotipleri ise prostat ve kolon kanseri riskiyle ilişkilidir. Düşük *IL-10* üretimine neden *IL-10* ATA haplotipinin astıma, psoriasis, obstrüktif uyku apnesine, melanomaya yatkınlıktan sorumlu olduğu ve hastalığın şiddetinde belirleyici rol oynadığı gösterilmiştir. Buna rağmen artmış *IL-10* üretimi *IL-10* GCC haplotipinin frekansı prostat kanseri ve sistemik lupus eritematozuslu hastalarda kontrole kıyasla yüksektir. *IL-10*'nun artan veya azalan düzeyinin patolojik bir önemi olup, *IL-10* gen polimorfizmlerinin patolojilerle ilişkisini ve hastalık patogenezindeki fonksiyonunu anlamak için ileri düzey çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKÇA

- Artiga, M. J., Saez, A. I., Romero, C., Sanchez-Beato, M., Mateo, M. S., Navas, C. et al. (2002) A short mutational hot spot in the first intron of BCL-6 is associated with increased BCL-6 expression and with longer overall survival in large B-cell lymphomas. *Am J Pathol*, 160, 1371-1380. Doi: 10.1016/S0002-9440(10)62564-3
- Atila, M. H., Özdaş, S., Özdaş T., Baştımur, S., Muz, S. E., Öz, I., Kurt, K., İzbirak, A., Babademez, M. A., Vatandaş, N. (2018); Association of Ugrp2 gene polymorphisms with adenoid hypertrophy in the pediatric population. *Braz J Otorhinolaryngol*, 84(5), 599-607. Doi: 10.1016/j.bjorl.2017.07.004.
- Babademez, M. A., Özdaş, T., Özdaş S. (2016) The common genetic variants of toll-like receptor and susceptibility to adenoid hypertrophy: a hospital-based cohort study. *Turk J Med Sci*, 17, 46(5):1 449-1458. Doi: 10.3906/sag-1511-16.
- Basaran, N. (1999). *Tıbbi Genetik Ders Kitabı*. 7. Baskı, 10-12, Bursa: Günes ve Nobel Tıp Kitabevleri.
- Bidwell, J., Keen, L., Gallagher, G., Kimberly, R., Huizinga, T., McDermott, M.F., Oksenberg, J., McNicholl, J., Pociot, F., Hardt, C., D'Alfonso, S. (1999) Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun*, 1, 3-19. Doi: 10.1038/sj.gene.6363645

- Bienvenu, J., Doche, C., Gutowski, M.C., Lenoble, M., Lepape, A., Perdrix, J.P. (1995) Production of proinflammatory cytokines and cytokines involved in the TH1/TH2 balance is modulated by pentoxifylline. *J Cardiovasc Pharmacol*, 25 (Suppl 2), S80-S84. Doi: 10.1097/00005344-199500252-00017
- Blumberg, H., Conklin, D., Xu, W.F., Grossmann, A., Brender, T., Carollo, S., Eagan, M., Foster, D., Haldeman, B.A., Hammond, A., Haugen, H., Jelinek, L., Kelly, J.D., Madden, K., Maurer, M.F., Parrish-Novak, J., Prunkard, D., Sexson, S., Sprecher, C., Waggle, K., West, J., Whitmore, T.E., Yao, L., Kuechle, M.K., Dale, B.A., Chandrasekher, Y.A. (2001) Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell*, 104, 9-19. Doi: 10.1016/s0092-8674(01)00187-8
- Bodmer, W., Bonilla, C. (2008) Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nat Genet*, 40(6), 695-701. Doi:10.1038/ng.f.136.
- Bodmer, W. (2015) Genetic characterization of human populations: from ABO to a genetic map of the British people. *Genetics*, 199, 267-279. Doi: 10.1534/genetics.114.173062
- Cacev, T., Radosevic, S., Krizanac, S., Kapitanovic, S. (2008) Influence of interleukin-8 and interleukin-10 on sporadic colon cancer development and progression. *Carcinogenesis*, 29, 1572-1580. Doi: 10.1093/carcin/bgn164
- Cao, H.Y., Zou, P., Zhou, H. (2013) Genetic association of interleukin-10 promoter polymorphisms and susceptibility to diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis. *Gene*, 519, 288-294. Doi: 10.1016/j.gene.2013.01.066
- Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Sklar, P., Ardlie, K., Patil, N., Patil N., Shaw, N., Lane, C. R., Lim, E. P., Kalyanaraman, N., Nemesh, J., Ziaugra L., Friedland, L., Rolfe, A., Warrington, J., Lipschutz, R., Daley, G. Q., Lander, E. S. (1999) Characterization of single nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet*, 22, 231-238. Doi: 10.1038/10290
- Caudell, E.G., Mumm, J.B., Poindexter, N., Ekmekcioglu, S., Mhashilkar, A.M., Yang, X.H., Retter, M.W., Hill, P., Chada, S., Grimm, E.A. (2002) The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24. *J Immunol*, 168:6041-6046. Doi: 10.4049/jimmunol.168.12.6041
- Chatterjee, R., Batra, J., Kumar, A., Mabalirajan, U., Nahid, S., Niphadkar, P.V., Ghosh, B. (2005) Interleukin 10 promoter polymorphisms and atopic asthma in North Indians. *Clin Exp Allergy*, 35, 914-919. Doi: 10.1111/j.1365-2222.2005.02273.x
- Crawley, E., Kay, R., Sillibourne, J., Patel, P., Hutchinson, I., Woo, P. (1999) Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 42, 1101-1108. Doi: 10.1002/1529-0131(199906)42:6<1101::AID-ANR6>3.0.CO;2-Y
- Collins, F. S., Guyer, M. S., Charkravarti, A. (1997) Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science*, 278, 1580-1581. Doi: 10.1126/science.278.5343.1580
- Cooper, D. N., Smith, B. A., Cooke, H. J., Niemann, S., Schmidtke, J. (1985) An estimate of unique DNA sequence heterozygosity in the human genome. *Hum Genet*, 69, 201-205. Doi: 10.1007/bf00293024
- Crepieux, P., Coll, J., Stehelin, D. (1994) The Ets family of proteins: weak modulators of gene expression in quest for transcriptional partners. *Crit Rev Oncog*, 5, 615-638.
- Edwards-Smith, C.J., Jonsson, J.R., Purdie, D.M., Bansal, A., Shorthouse, C., Powell, E.E. (1999) Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology*, 30, 526-530. Doi: 10.1002/hep.510300207
- Eskdale, J., Kube, D., Tesch, H., Gallagher, G. (1997) Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics*, 46, 120-128. Doi: 10.1007/s002510050250
- Eskdale, J., Keijsers, V., Huizinga, T., Gallagher, G. (1999) Microsatellite alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) locus. *Genes Immun*, 1, 151-155. Doi: 10.1038/sj.gene.6363656

- Eskdale, J., Gallagher, G., Verweij, C.L., Keijsers, V., Westendorp, R.G., Huizinga, T.W. (1998) Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 9465–9470. Doi: 10.1073/pnas.95.16.9465
- Eskdale, J., Gallagher, G. (1995) DOI: 10.1073/pnas.95.16.9465. *Immunogenetics*, 42, 444-445.
- Eskdale, J., Kube, D., Gallagher, G. (1996) A second polymorphic dinucleotide repeat in the 5 flanking region of the human IL10 gene. *Immunogenetics*, 45, 82–83. Doi:10.1007/s002510050174
- Faupel-Badger, J.M., Kidd, L.C., Albanes, D., Virtamo, J., Woodson, K. (2008) Tangrea JA. Association of IL-10 polymorphisms with prostate cancer risk and grade of disease. *Cancer Causes Control*, 19, 119-124. Doi: 10.1007/s10552-007-9077-6
- Fickenscher, H., Pirzer, H. (2004) Interleukin-26. *Int Immunopharmacol*, 4, 609–613. Doi: 10.1016/j.intimp.2004.01.004
- Fiorentino, D.F., Bond, M.W., Mosmann, T.R. (1989) Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 170(6), 2081-2095. Doi: 10.1084/jem.170.6.2081
- Forcada, J. & Hoffman, J. I. (2014) Climate change selects for heterozygosity in a declining fur seal population. *Nature* 511, 462–465. Doi: 10.1038/nature13542
- Gallagher, G., Dickensheets, H., Eskdale, J., Izotova L.S., Mirochnitchenko O.V., Peat J.D., Vazquez, N., Pestka, S., Donnelly, R.P., Kotenko, S.V. (2000) Cloning, expression and initial characterization of interleukin-19 (IL-19), a novel homologue of human interleukin-10 (IL 10). *Genes Immun*, 1, 442-450. Doi: 10.1038/sj.gene.6363714
- Gibson, A.W., Edberg, J.C., Wu, J., Westendorp, R.G., Huizinga, T.W., Kimberly, R.P. (2001) Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 166, 3915-3922. Doi: 10.4049/jimmunol.166.6.3915
- Gonzalez-Amaro, R., Portales-Perez, D., Baranda, L., Abud-Mendoza, C., Llorente L, Richaud-Patin Y., Alcocer-Varela, J., Alarcón-Segovia, D. (1998) Role of IL-10 in the abnormalities of early cell activation events of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*, 11, 395-402. Doi: 10.1006/jaut.1998.0228
- Goto, Y., Yue, L., Yokoi, A., Nishimura, R., Uehara, T., Koizumi, S., Saikawa, Y. (2001) A novel single-nucleotide polymorphism in the 30-untranslated region of the human dihydrofolate reductase gene with enhanced expression. *Clin Cancer Res* 7, 1952-1956.
- Hake, S. & Ross-Ibarra, J. (2015) Genetic, evolutionary and plant breeding insights from the domestication of maize. *eLife* 4, e05861. Doi: 10.7554/eLife.05861
- Harris, H. (1966) Enzyme polymorphisms in man. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 164, 298–310. DOI: 10.1098/rspb.1966.0032
- Hartl, D. L., Jones, E. W. (2002) Mechanisms of mutation and DNA repair. Essential genetic sage-nomics perspective, 3rd ed. London: Jones and Bartlett Publishers, 249-85.
- Howell, W.M., Rose-Zerilli, M.J. (2006) Interleukin-10 polymorphisms, cancer susceptibility and prognosis. *Fam Cancer*, 5, 143–149. Doi: 10.1007/s10689-005-0072-3
- Huang, S., Xie, K., Bucana, C.D., Ullrich, S.E., Bar-Eli, M. (1996) Interleukin 10 suppresses tumor growth and metastasis of human melanoma cells: potential inhibition of angiogenesis. *Clin Cancer Res*, 2, 1969–1979. Doi: Published December 1996
- Huang, Y.C., Tsukamoto, K., Sharma, V. (2005) Interleukin-10 promoter gene polymorphisms have no clear influence on interleukin-10 protein secretion in AIDS-associated B-cell lines. *Biochem and Biophys Res Commun*, 335, 529-535. Doi: 10.1016/j.bbrc.2005.07.107
- Huang, H., Wu, Y., Liao, D., Zhang, H. (2016) Quantitative assessment of the association between interleukin-10 promoter gene polymorphisms and nasopharyngeal carcinoma susceptibility. *Minerva Med*, 107(2), 92-100.
- Hyun, M.H., Lee, C.H., Kang, M.H., Park, B.K., Lee, Y.H. (2013) Interleukin-10 Promoter Gene Polymorphisms and Susceptibility to Asthma: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 8:e53758. Doi: 10.1371/journal.pone.0053758
- <https://www.ensembl.org>; Erişim tarihi 25 Ağustos 2019

- Itakura, E, Huang, R.R., Wen, D.R., Paul, E., Wunsch, P.H., Cochran A.J. (2011) IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. *Mod Pathol*, 24, 801–809. Doi: 10.1038/modpathol.2011.5
- Iyer, S.S., Cheng, G. (2012) Role of interleukin 10 transcriptional regulation in in amma on and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*, 32, 23– 63.
- Johnson, G. C. and Todd, J. A. (2000) Strategies in complex disease mapping. *Curr Opin Genet Dev*, 10, 330-334. Doi: 10.1093/hmg/ddv260.
- Kalish, R.B., Vardhana, S., Gupta, M., Perni, S.C., Witkin, S.S. (2004) Interleukin-4 and -10 gene polymorphisms and spontaneous preterm birth in multifetal gestations. *Am J Obstet Gynecol*, 190: 702-706. DOI: 10.1016/j.ajog.2003.09.066
- Karam, R.A., Zidan, H.E., Khater, M.H. (2014) Polymorphisms in the TNF- α and IL-10 gene promoters and risk of psoriasis and correlation with disease severity. *Cytokine*, 66, 101-105. Doi: 10.1016/j.cyto.2014.01.008
- Keen, L.J. (2002) The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. *Transpl Immunol* 10, 143-146. Doi: 10.1016/S0966-3274(02)00061-8
- Kingo, K., Ratsep, R., Koks, S., Karelson, M., Silm, H., Vasar, E. (2005) Influence of genetic polymorphisms on interleukin-10 mRNA expression and psoriasis susceptibility. *J Dermatol Sci* 37, 111-113. Doi: 10.1016/j.jdermsci.2004.10.002
- Kingo, K., Köks, S., Silm, H., Vasar, E. (2003) IL-10 promoter polymorphisms influence disease severity and course in psoriasis. *Genes Immun* 4, 455-457. Doi: 10.1038/sj.gene.6364004
- Kotenko, S.V., Gallagher, G., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N.K., Langer, J.A., Sheikh, F., Dickensheets, H., Donnelly, R.P. (2003) IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*, 4, 69–77. Doi: 10.1038/ni875
- Kotenko, S.V., Krause, C.D., Izotova, L.S., Pollack, B.P., Wu, W., Pestka, S. (1997) Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *Embo Journal*, 16(19), 5894-5903. Doi: 10.1093/emboj/16.19.5894
- Krüger-Krasagakes, S., Krasagakis, K., Garbe, C., Schmitt, E., Hüls, C., Blankenstein, T., Diamantstein, T. (1994) Expression of interleukin 10 in human melanoma. *Br J Cancer*, 70, 1182-1185. Doi: 10.1038/bjc.1994.469
- Lapadula, G., Iannone, F., Dell'Accio, F., Covelli, M., Pipitone, V. (1995) Interleukin-10 in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 13, 629-632.
- Lee, Y.H., Bae, S.C., Choi, S.J., Ji, J.D., Song, G.G. (2012) Associations between interleukin-10 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*, 39, 81-87. Doi: 10.1007/s11033-011-0712-7
- Lei, S.F., Deng, F.Y., Liu, X.H., Huang, Q.R., Qin, Y., Zhou, Q., Jiang, D.K., Li, Y.M., Mo, X.Y., Liu, M.Y., Chen, X.D., Wu, X.S., Shen, H., Dvornyk, V., Zhao, L., Recker, R.R., Deng, H.W. (2003) Polymorphisms of four bone mineral density candidate genes in Chinese populations and comparison with other populations of different ethnicity. *J Bone Miner Metab*, 21, 34-42. Doi: 10.1007/s007740300006
- Lewin, B. (1994) Restriction sites can be used as genetic markers. In: *Genes IV*, 134-142, Oxford University Press USA.
- Lewontin, R. C. & Hubby, J. L. (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54, 595–609.
- Li, M, Pritchard, P. H. (2000) Characterization of the effects of mutations in the putative branchpoint sequence of intron 4 on the splicing within the human lecithin: cholesterol acyltransferase gene. *J Biol Chem* 275, 18079-18084. Doi: 10.1074/jbc.M910197199
- Liang, B., Guo, Y., Li, Y., Kong, H. (2014) Association between IL-10 gene polymorphisms and susceptibility of tuberculosis: evidence based on a meta-analysis. *PLoS One*, 9, e88448. Doi: 10.1371/journal.pone.0088448
- Lim, S., Crawley, E., Woo, P., Barnes, P.J. (1998) Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma. *Lancet*, 352, 113. Doi: 10.1016/S0140-6736(98)85018-6

- Lin, M.T., Storer, B., Martin, P.J., Tseng, L.H., Gooley, T., Chen, P.J., Hansen, J.A. (2003) Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med*, 349, 2201–2210. Doi: 10.1056/NEJMoa022060
- Liu, J., Song, B., Bai, X., Liu, W., Li, Z., Wang, J., Zheng, Y., Wang, Z. (2010) Association of genetic polymorphisms in the interleukin-10 promoter with risk of prostate cancer in Chinese. *BMC Cancer*, 10, 456-462. Doi: 10.1186/1471-2407-10-456
- Liu, P., Song, J., Su, H., Li, L., Lu, N., Yang, R., Peng, Z. (2013) IL-10 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 8:e69547. Doi: 10.1371/journal.pone.0069547
- Lv, H., Jiang, Y., Li, J., Zhang, M., Shang, Z., Zheng, J., Wu, X., Liu, P., Zhang, R., Yu, H. (2014) Association between polymorphisms in the promoter region of interleukin-10 and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Mol Biol Rep*, 41, 1299-1310. Doi: 10.1007/s11033-013-2975-7
- Ma, S.L., Tang, N.L., Lam, L.C., Chiu, H.F. (2005) The association between promoter polymorphism of the interleukin-10 gene and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 26, 1005-1010. Doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.08.010
- Meyer, U.A., Zanger, U.M. (1997) Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37, 269-296. Doi: 10.1146/annurev.pharmtox.37.1.269
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra, A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19, 683-765. Doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683
- Nath, S.K., Harley, J.B., Lee, Y.H. (2005) Polymorphisms of complement receptor 1 and interleukin-10 genes and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Hum Genet*, 118, 225-234. Doi: 10.1007/s00439-005-0044-6
- Nie, W., Fang, Z., Li, B., Xiu, Q.Y. (2012) Interleukin-10 promoter polymorphisms and asthma risk: a meta-analysis. *Cytokine*, 60, 849-855. Doi: 10.1016/j.cyto.2012.08.023
- Nieters, A., Brems, S., Becker, N. (2001) Cross-sectional study on cytokine polymorphisms, cytokine production after T-cell stimulation and clinical parameters in a random sample of a German population. *Hum Genet*, 108, 241–248. Doi: 10.1007/s004390100464
- Opal, S. M., DePalo V. A., (2000) Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 117(4), 1162-72. Doi: 10.1378/chest.117.4.1162
- Özdaş, S., Özdaş, T. (2018) Differentially expressed Secretoglobulin 1C1 gene in nasal polyposis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 31, 64(1), 97-102. Doi: 10.14715/cmb/2018.64.1.17
- Özdaş, S., İzbirak, A., Özdaş, T., Özcan, K. M., Erbek, S. S., Köseoğlu, S., Dere, H. (2015) Single-Nucleotide Polymorphisms on the RYD5 Gene in Nasal Polyposis. *DNA Cell Biol*, 34(10), 633-42. Doi: 10.1089/dna.2015.2897.
- Özdaş, T., Özdaş, S., Babademez, M. A., Muz, S. E., Atilla M. H., Baştımur, S., İzbirak, A., Kurt, K., Öz, I. (2017) Significant association between SCGB1D4 gene polymorphisms and susceptibility to adenoid hypertrophy in a pediatric population. *Turk J Med Sci*, 27, 47(1), 201-210. Doi: 10.3906/sag-1512-93.
- Özdaş S. (2018). Combinations of Interleukin-10 gene promoter polymorphisms with -1082A, -819T, -592A minor allele are associated with sinonasal polyposis. *Hittite Journal of Science and Engineering*, 5(4), 285-292. Doi: 10.17350/HJSE19030000105
- Özdaş, S., Özdaş, T., Acar, M., Erbek, S. S., Köseoğlu, S., Göktürk, G., İzbirak, A. (2016) Association of Interleukin-10 gene promoter polymorphisms with obstructive sleep apnea. *Sleep Breath*, 20(2), 855-66. Doi: 10.1007/s11325-015-1216-9.
- Palalı, M., Özcan, K.M., Özdaş, S., Köseoğlu, S., Özdaş, T., Erbek, S. S., Yıldırım, E., Ensari, S., Dere, H. (2014) Investigation of SCGB3A1 (UGRP2) gene arrays in patients with nasal polyposis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 271(12), 3209-14. Doi: 10.1007/s00405-014-3020-8.
- Pandey, M., Awasthi, S., Singh, U., Mahdi, A. A. (2018). Association of IL-10 gene polymorphism (-819C>T, -592C>A and -1082G>A) with preterm birth in north Indian population. *Indian J Pediatr*, 85(2), 93-101. Doi: 10.1007/s12098-017-2496-9.
- Peng, H., Wang, W., Zhou, M., Li, R., Pan, H.F., Ye, D.Q. (2013) Role of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*, 32, 1255-1266. Doi: 10.1007/s10067-013-2294-3

- Quintana-Murci, L. & Clark, A. G. (2013) Population genetic tools for dissecting innate immunity in humans. *Nat Rev Immunol*, 13, 280–293. Doi: 10.1038/nri3421.
- Reuss, E., Fimmers, R., Kruger, A., Becker, C., Rittner, C., Hohler, T. (2002) Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors—a twin study. *Genes Immunity*, 3, 407–413. Doi: 10.1038/sj.gene.6363920
- Risch, N. J. (2000) Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*, 405, 847–856. Doi: 10.1038/35015718
- Rood, M.J., Keijsers, V., van der Linden, M.W., Tong, T.Q., Borggreve, S.E., Verweij, C.L., Breedveld, F.C., Huizinga, T.W. (1999) Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus is associated with imbalance in interleukin 10 promoter haplotypes. *Ann Rheum Dis*, 58, 85–89. Doi: 10.1136/ard.58.2.85
- Rutz, S., & Ouyang, W. (2016). Regulation of Interleukin-10 Expression. *Adv Exp Med Bio*, 941, 89–116. Doi: 10.1007/978-94-024-0921-5_5
- Sabat, R., (2010) IL-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21(5), 315–324. Doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.11.001
- Scola, L., Crivello, A., Marino, V., Gioia, V., Serauto, A, Candore, G., Col-onna-Romano, G., Caruso, C., Lio, D. (2003) IL-10 and TNF- α polymorphisms in a sample of Sicilian patients affected by tuber- culosis: implication for ageing and life span expectancy. *Mech Ageing Dev*, 124, 569–572. Doi: 10.1016/S0047-6374(03)00038-1
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeier, S., Whitmore, T.E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C., Roraback, J., Ostrander, C., Dong, D., Shin, J., Presnell, S., Fox, B., Haldeman, B., Cooper, E., Taft, D., Gilbert, T., Grant, F.J., Tackett, M., Krivan, W., McKnight, G., Clegg, C., Foster, D., Klucher, K.M. (2003) IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*, 4, 63–68. Doi: 10.1038/ni873
- Shih, C.M., Lee Y.L., Chiou, H.L., Hsu, W.F., Chen, W.E., Chou, M.C., Lin, L.Y. (2005) The involvement of genetic polymorphism of IL-10 promoter in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 50, 291–297. Doi: 10.1016/j.lungcan.2005.07.007
- Soares, M. P. & Weiss, G. (2015) The Iron Age of host– microbe interactions. *EMBO Rep*, 16, 1482–1500. Doi: 10.15252/embr.201540558
- Song, G.G., Choi, S.J., Ji, J.D., Lee, Y.H. (2013) Associations between interleukin-10 polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Hum Immunol*, 74, 364–370. Doi: 10.1016/j.humimm.2012.11.020
- Spits, H., De Waal Malefyt, R. (1992) Functional characterization of human IL-10. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 99, 8–15. Doi: 10.1159/000236329
- Stearns, M.E., Wang, M. (1998) Antimetastatic and antitumor activities of interleukin 10 in transfected human prostate PC-3 ML clones: orthotopic growth in severe combined immunodeficient mice. *Clin Cancer Res*, 4, 2257–2263
- Stein, L. D. (2004). Human genome: end of the beginning. *Nature*, 431(7011), 915–6.
- Steinke, J.W., Barekzi, E., Hagman, J., Borish, L. (2004) Functional analysis of –571 IL-10 promoter polymorphism reveals a repressor element controlled by sp1. *J Immunol*, 173, 3215–3222. Doi: 10.4049/jimmunol.173.5.3215
- Stephens, J. C., Schneider, J. A., Tanguay, DA., Choi, J., Acharya, T., Stanley, S. E., et al. (2001) Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science*, 293, 489–493. Doi: 10.1126/science.1059431
- Takanashi, S., Hasegawa, Y., Kanehira, Y., Yamamoto K, Fujimoto K, Satoh K, Okamura K (1999) Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur Respir J*, 14, 309–314. Doi: 10.1034/j.1399-3003.1999.14b12.x
- The international HapMap Consortium (2003). The international HapMap project. *Nature*, 426(6968), 789–96. Doi: 10.1038/nature02168
- Tone, M., Powell, M.J., Tone, Y., Thompson, S.A., Waldmann, H. (2000) IL-10 Gene Expression Is Controlled by the Transcription Factors Sp1 and Sp3. *The Journal of Immunol*, 165, 286–291. Doi: 10.4049/jimmunol.165.1.286

- Trifunović, J., Miller L., Debeljak, Ž., Horvat, V. (2015) Pathologic patterns of interleukin 10 expression-a review. *Biochem Med (Zagreb)*, 25(1), 36-48. Doi: 10.11613/BM.2015.004.
- Turner, D.M., Williams, D.M., Sankaran, D., Lazarus, M., Sinnott, P.J., Hutchinson, I.V. (1997) An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*, 24, 1-8. Doi: 10.1111/j.1365-2370.1997.tb00001.x
- Vairaktaris, E., Yapijakis, C., Serefoglou, Z., Derka, S., Vassiliou, S., Nkenke, E., Vylliotis, A., Spyridonidou, S., Neukam, F.W., Schlegel, K.A., Patsouris, E. (2008) The interleukin-10 (-1082A/G) polymorphism is strongly associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, 28, 309-314
- Vander Wal, E., Garant, D., Festa-Bianchet, M., Pelletier, F. (2012) Evolutionary rescue in vertebrates: evidence, applications and uncertainty. *Phil. Trans. R. Soc. B* 368, 20120090. Doi: 10.1098/rstb.2012.0090.
- Vieira, P., Malefyt, R.W., Dang, M-N, Johnson, K.E., Kastelein, R., Fiorentino, D.F., DeVries, J.E., Roncarolo, M.G., Mosmann, T.R., Moore, K.W. (1991) Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: Homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRFI. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 1172-6. Doi: 10.1073/pnas.88.4.1172
- Vuoristo, M.S. (2007) The polymorphisms of interleukin-10 gene influence the prognosis of patients with advanced melanoma. *Cancer Genet Cytogen*, 176, 54-57. Doi: 10.1016/j.cancergen-cyto.2007.03.002
- Warlea, M.C., Farhan, A., Metselaar, H.J., Hop, W.C., Perrey, C., Zondervan, P.E., Kap, M., Kwekkeboom, J., Ijzermans, J.N., Tilanus, H.W., Pravica, V., Hutchinson, I.V., Bouma, G.J. (2003) Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? *Liver Transpl*, 9, 170-181. Doi: 10.1053/jlts.2002.50014
- Westendorp, R.G., Langermans, J.A., Huizinga T.W., Elouali, A.H., Verweij, C.L., Boomsma, D.I., Vandenbroucke, J.P. (1997) Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 349, 170-173. Erratum in: *Lancet* 349: 656. Doi: 10.1016/s0140-6736(96)06413-6
- Xie, M.H., Aggarwal, S., Ho, W.H., Foster, J., Zhang, Z., Stinson, J., Wood, W.I., Goddard, A.D., Gurney, A.L. (2000) Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J Biol Chem*, 275, 31335-31339. Doi: 10.1074/jbc.M005304200
- Yilmaz, V., Yentur, S.P., Saruhan-Direskeneli, G. (2005) IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. *Cytokine* 30, 188-194. Doi: 10.1016/j.cyto.2005.01.006
- Yu, Z., Liu, Q., Huang, C., Wu, M., Li, G. (2013) The interleukin 10 -819C/T polymorphism and cancer risk: a HuGE review and meta-analysis of 73 studies including 15,942 cases and 22,336 controls. *OMICS*, 17, 200-214. Doi: 10.1089/omi.2012.0089
- Zdnaov, A. (2004) Structural features of the interleukin-10 family of cytokines. *Current Pharmaceutical Design*, 10: 3873-3884. Doi: 10.2174/1381612043382602
- Zheng, X.Y., Guan, W.J., Mao, C., Chen, H.F., Ding, H., Zheng, J.P., Hu TT, Luo MH, Huang YH, Chen Q (2014) Interleukin-10 promoter 1082/-819/-592 polymorphisms are associated with asthma susceptibility in Asians and atopic asthma: a meta-analysis. *Lung*, 192, 65-73. Doi: 10.1007/s00408-013-9519-8.
- Zhou, M., Ding, L., Peng, H., Wang, B., Huang, F., Xu, W.D., Li, J.H., Ye, X.R., Pan, H.F., Ye, D.Q. (2013) Association of the interleukin-10 gene polymorphism (-1082A/G) with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Lupus*, 22, 128-135. Doi: 10.1177/0961203312468623
- Zhu, H., Lei, X., Liu, Q., Wang, Y. (2013) Interleukin-10-1082A/G polymorphism and inflammatory bowel disease susceptibility: A meta-analysis based on 17,585 subjects. *Cytokine*, 61:146-153. Doi: 10.1016/j.cyto.2012.09.009

Bölüm 13

KANSERDE YENİ BİR TERAPÖTİK-HEDEF MOLEKÜL: CRM1'İN YAPISI, FONKSİYONU VE EKSPRESYONU

Sibel ÖZDAŞ¹

NÜKLEOSTOPLAZMİK TAŞINIM

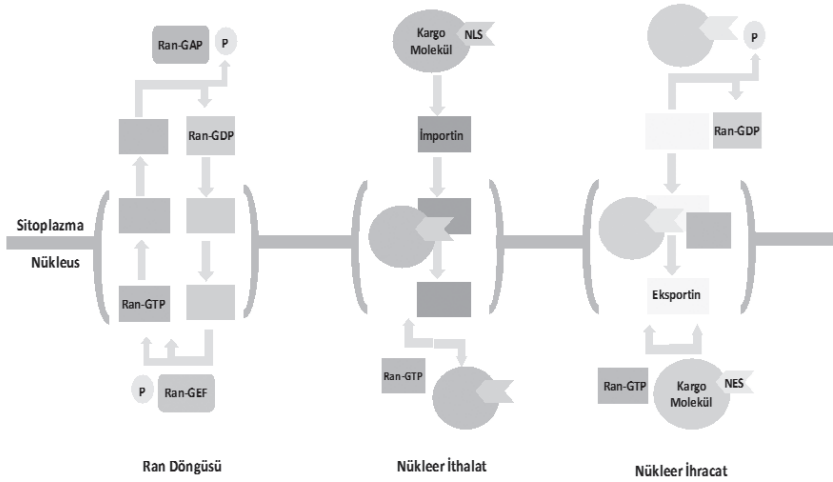
Birçok molekül çekirdek ve sitozol arasında taşınmaktadır. Hücre çekirdeğine moleküllerin giriş ve çıkışı nükleer por kompleksleri (NPC) tarafından sıkıca kontrol edilir. Küçük moleküller (≤ 30 kDa) NPC'yi difüzyon ile geçebilmektedir. Ancak RNA ve proteinler gibi büyük boyutlu moleküllerin hücre çekirdeğine giriş-çıkışı transport faktörleri olan “karyoferinler” isimli proteinler aracılığıyla gerçekleşir (Wente, 2000). Karyoferin (nükleer-sitoplazmik transport reseptör ailesi), ökaryotik bir hücrenin sitoplazması ve çekirdeği arasındaki moleküllerin taşınması ile ilgili reseptör ailesi olup, 19'dan fazla (İmportinler, Ekspartinler ve Transportinler) üyesi vardır (Wente, 2000; Watson vd., 2004). Çekirdeğin içinde yani karyoplazmada (veya çekirdek plazması) buldukları için “karyoferinler” olarak adlandırılırlar. İmportinler, kargo molekülünü sitoplazmadan-nükleusa taşıırken, Ekspartinler taşınım sürecini tersine çevirerek, kargo molekülünü nükleustan-sitozole taşırlar, ancak Transportinler ise hem nükleustan-sitoplazmaya hem de sitoplazmadan-nükleusa taşıyabilir (Izaurrealde vd., 1998; Misteli, 2008).

Karyoferinler kargo molekülünü hedef dizilerinden tanıyarak, seçer ve nükleer mebran boyunca taşır (Wente, 2000; Watson vd., 2004). Nükleer hedef dizisi, kısa amino asit dizisi olup, kargo molekülünün nükleusa giriş-çıkışı için, taşıyıcı karyoferinler tarafından tanınmasını sağlayan bir etiket olup, taşınım yönünü belirler (Chook ve Blobel, 2001). Kargo molekülü sitoplazmadan-nükleusa taşınırken İmportinler tarafından tanınan bu nükleer hedef dizisi, “nükleer lokalizasyon sinyali” (NLS) olarak adlandırılır ve taşınım için İmportinlerin tanıdığı bir etiket gibi davranır. NLS dizisi yaygın olarak hidrofilik amino asitlerden (özellikle lizin amino asidi) oluşur (Watson vd., 2004; Izaurrealde ve Adam, 1998). Kargo molekülü nükleustan-sitoplazmaya taşınırken Ekspartinler tarafından tanınmasını sağlayan bu hedef dizisi ise “nükleer eksport sinyali” (NES) denir (Watson vd., 2004).

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Genetik ve Moleküler Mühendisliği ABD, Adana, Türkiye, e-mail: sozdas@atu.edu.tr

Alberts vd., 2002; Izaurrealde vd., 1998; Misteli, 2008). NES dizisi, 10-15 amino asitlik kısa bir peptid olup, içinde 3-4 düzenli lösine zengin hidrofobik amino asit tekrarları yer alır (genel olarak korunmuş dizi ϕ 1-X2-3- ϕ 2-X2-3- ϕ 3-X- ϕ 4, ϕ : Lösine, Valin, İzölösine, Fenilalanin veya Metiyonin ve X: herhangi bir amino asiti temsil eder) (la Cour vd., 2004). Fosforilasyon, asetilasyon, sumolasyon... vb. post-translasyonel modifikasyonlar, mutasyonlar veya protein etkileşimleri gibi çeşitli mekanizmalar kargo molekülünde yeni NES/NLS dizileri oluşturarak, hedef diziyi maskeleyerek veya dizinin kaybolmasına neden olarak, karyoferinlerin kargo molekülüne olan afinitesini değiştirerek, kargo molekülünün hücre içi lokasyonunu değişmesine neden olmaktadır (Powell vd., 1992; Pichler ve Melchior, 2002).

NPC'yi difüzyon ile geçemeyen 30 kDa'dan büyük moleküllerin NPC'den transferi enerji bağımlı bir olay olup, İmportin ve Eksportinlerin fonksiyonu küçük Ras ile ilişkili GTPaz ve Ran tarafından düzenlenir. İmportinler Ran/GDP'ye ve Eksportinler ise Ran/GTP'ye bağımlı olarak fonksiyonlarını gerçekleştirebilirler. Eksportinler, kargo molekülü ve RanGTP'e bağlanarak, Kargo:Eksportin:Ran/GTP birlikte nukleusta üçlü bir kompleks oluşturur. Kompleksin NPC'den sitozole geçmesiyle Ran/GTP hidroliz olur, Ran/GDP oluşur ve Eksportin kargo molekülünü sitoplazmada serbest bırakarak, nukleusa döner (Pemberton vd., 2005; Kau vd., 2004). İmportinler ise, RanGTP bağlanarak, kargo proteinini serbest bırakır (Watson vd., 2004; Lodish vd., 2004) (Şekil 1).



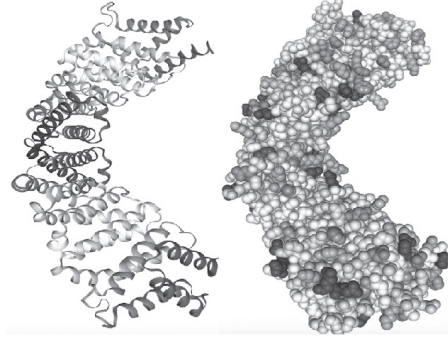
Şekil 1. Makromoleküllerin, aktif Ran-GTP nükleer taşıma döngüsü olarak adlandırılan bir siklus ile nükleer membran boyunca taşınması

CRM1

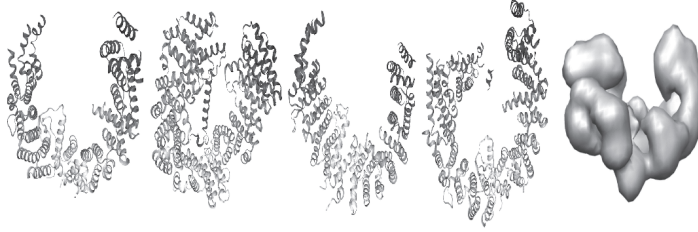
Nükleer İhraç Faktörü CRM1'n Yapısı ve Fonksiyonu

Karyoferinlerin önemli bir üyesi Eksportinler makromolekülleri nükleustan sitoplazmaya taşıyan proteinler olup, insan genomunda bu proteinleri kodlayan tanımlanmış altı *Eksportin* geni olup, vardır ve bunlar arasında *CRM1* en önemlisidir. Exportin-1 veya Crm1 proteini, insanlarda *XPO1* diğer adıyla *CRM1* (Ensembl No: ENSG000000828987) geni tarafından kodlanan bir proteindir. Hücre çekirdeği ve sitoplazma arasında nükleer taşıma reseptörü olarak bir mekik işlevi görür (Fornerod vd., 1997a; Kudo vd., 1997). *CRM1* geni, 1989 yılında Adachi ve Yanagida tarafından, *Schizosaccharomyces cerevisiae* ve *Schizosaccharomyces pombe* hücrelerinde keşfedilmiştir. İlk olarak mutant maya soylarında gözlenen *CRM1* genindeki mutasyonun kromozom yapısında deformasyona neden olması ile kromozomun yapısının korunmasıyla ilgili bir gen olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle gen ürünü, "CRM1 (kromozom bölgesi bakım 1)" olarak adlandırılmıştır (Adachi ve Yanagida, 1989). *Schizosaccharomyces pombe* CRM1 proteini, orjinalde CC112 olarak adlandırılan insan proteini ile homoloji göstermektedir. Bu homoloji nedeniyle "CC112" adlandırılmasından vazgeçirilerek, CRM1 adı ile kullanılmaya başlanmıştır. *CRM1* geni, insanlarda ikinci kromozom üzerinde 2p16 bölgesine yerleşmiştir. Toplam 60.778 baz uzunluğundadır. 24 intron tarafından ayrılarak 25 ekzon halinde düzenlenmiştir. Genin 24 transkript varyantı bulunmaktadır. *CRM1* gen ürünü 112 kDa'luk bir proteindir. 1071 amino asitten oluşmuş olgun bir polipeptittir (Fornerod vd., 1997a). Çok sayıda fonksiyonel domainden oluşan modüler bir proteindir. CRM1 proteini (UniProtKB No: O149803), N-terminal bölgesi GTPaz/Ran ile etkileşime girerken, C-terminal bölgesi (707-1034 rezidüleri) ile kargo moleküllerine olan afinitesinin değiştiği düşünülmektedir (Fornerod vd., 1997b) (<http://www.uniprot.org/uniprot/O14980>).

Crm1 proteininin C-terminal bölgesi (amino asit 707–1027) "U" şeklinde iki antiparalel α -heliks olup, HEAT-tekrar (15A–21A) kristal yapısı 2004'te raporlanmıştır. Protein Veri Bankasında (PDB) sadece Crm1'in veya farklı proteinlerle etkileşim komplekslerinin kristal yapısı gösterir 26 adet veri mevcuttur (Petosa vd., 2004) (Şekil 2). X-ışını kristalografisi ve elektron mikroskopisi (EM) gibi çeşitli yöntemler bir transportör proteini olarak Crm1'in büyük konformasyonel esnekliğe sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 3) (Saito ve Matsuura, 2013).

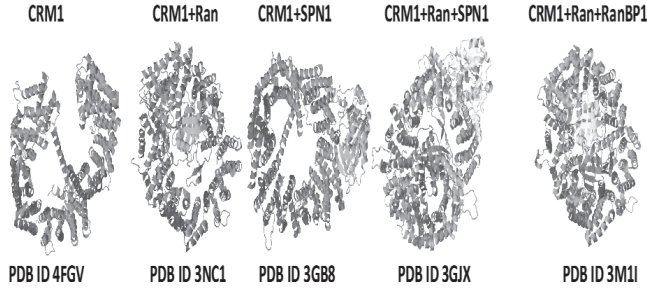


Şekil 2. CRM1 proteininin C-terminal bölgesinin kristal yapısı (PDB ID 1W9C)



Şekil 3. CRM1'in yapısı (PDB IDs 4FGV, 3VYC, 4BSN, 4BSM; EMD-2111)

CRM1:RanGTP:SPN1 ve CRM1:RanGTP:RanBP1 komplekslerinin X-ray yapısına da ışık tutmuştur. HEAT 9, kargo proteinin NES dizisi ile temasta olup, alosterik bir inhibitör olarak davranır ve kompleksin oluşmasını kontrol etmektedir. CRM1 proteinin N-terminal bölgesi GTPaz/RAN ile etkileşime girerken, C-terminal bölgesi ile kargo proteinlerine olan afinitesininin değiştiği düşünülmektedir (Koyama ve Matsuura, 2010; Saito ve Matsuura, 2013). Fakat RanBP1'e bağlanma ve RanGTP'den ayrılma mekanizmaları diğer eksportinlerden farklıdır (Şekil 4) (Koyama ve Matsuura, 2010).



Şekil 4. CRM1 ve komplekslerinin kristal yapısı (PDB IDs 4FGV, 3NC1, 3GB8, 3GJX; 3M1I)

CRM1, nükleusta RanGTP'e ve kargo molekülüne NES dizisine bağlanması zayıftır. Ancak, CRM1 RanGTP ve kargo molekülüne aynı anda bağlanırken her ikisine afinitesi yaklaşık 500-1000-kat artar ve üçlü bir kompleks oluşturarak, NPC'den sitozole geçer (Dong vd., 2009). Sitoplazmada Ran/GTP'nin Ran/GDP'ye hidrolizi, CRM1'in protein yapısında konformasyonel değişime neden olarak kargo molekülüne olan afinitesini azaltır ve molekülü serbest bırakmaya teşvik eder (Pemberton vd., 2005; Kau vd., 2004). CRM1 ve RanGDP yeni taşıma döngüsü için NPC'den geçerek nükleusa döner (Dong vd., 2009; Watson vd., 2004; Lodish vd., 2004).

İnsan *CRM1* geni, hücre siklusuna bağımlı olarak ifade olur, mRNA transkripsiyonu hücre siklusunun G1 fazında başlar ve G2/M fazında üst seviyededir (Ptasznik vd., 2004). CRM1 proteini tercihen interfaz süresince hücrelerin çekirdeğin içinde ve çekirdek zarına yakın lokalizedir (Ptasznik vd., 2004; Grunewald, 2006). Kalp, beyin, plasenta, akciğer, karaciğer, iskelet kası, pankreas, dalak, timüs, prostat, testis, yumurtalık, ince bağırsak, kolon ve periferik kan lökositlerinde yüksek ifade olur (Kudo vd., 1997; Fornerod vd., 1997b).

CRM1, viral/hücrel mRNA'lar, rRNA, tRNA ve küçük nükleer RNA'lar (snRNA'lar) dahil olmak üzere bazı RNA türleri ve ribozomal alt birimi gibi çeşitli makromolekülleri ve lösin amino asidi yönünden zengin NES taşıyan proteinleri hidrofobik rezidüel barındıran kısa peptit uzantılarını, mekik proteinlerini, özellikle tümör baskılayıcı proteinleri, hücrel veya HIV-1, HTLV-1 ve influenza A gibi çeşitli virüslerin splaylanmamış veya eksik splaylı RNA'ları ve birçok virüsün etkileşim halinde olduğu HIV-1 Rev ve HTLV-1 Rex proteinlerini, Ran/GTP bağımlı şekilde NPC'den nükleustan sitozole nakliyesine aracılık eder (Fornerod vd., 1997b; Koyama ve Matsuura, 2010; Fukuda vd., 1997. Ossareh-Nazari vd., 1997; Fei vd., 2010; Misteli, 2008).

Çalışmalar, 40S ve 60S ribozomal alt birimlerin adaptör protein NMD3 bağlanarak, CRM1 bağımlı olarak sitoplazmaya taşındığını, göstermektedir. CRM1'in spesifik ajan ile fonksiyonunun bloklanması, 28S rRNA'nın işlenmesini ve pre-47S rRNA'nın sentezini inhibe ettiğini göstermiştir (Bai vd., 2013). Bu nedenle CRM1 ribozomal biyogenezde kritik öneme sahiptir. Ayrıca *CRM1*, p53 tarafından negatif MYC tarafından ise pozitif olarak düzenlenir. MYC'nin ribozomal biyogenezde mastır düzenleyici olarak ribozomal protein genleri ve *CRM1*'i transkripsiyonel olarak teşvik ederek, artan ribozomal protein seviyesinin nükleer transport makinesiyle sitoplazmaya daha fazla taşınmasına katkı sağlar (Wu vd., 2008). Nükleofozmin (NPM1) ribozomal proteinlerin ve alt birimlerin nükleer ihracatında da rol oynar ve CRM1 ile birlikte MYC hedef molekül olarak ribozomal biyogenezde görev alır.

Maya hücrelerinin proteomik analizinde CRM1 tarafından düzenlenen 285 protein tespit edilmiş olup, yaklaşık %45'inin bilinen NES dizileri taşıdığı raporlanmıştır (Matsuyama vd., 2006). CRM1 için NES dizileri, İzölösün, Lösin, Metiyonin, Fenilalanin ve Valin dahil olmak üzere hidrofobik amino asitlerden oluşur (Kutay ve Guttinger, 2005). NES dizileri hidrofobik karakterli 10-15 (HX2-3HX2-3HXH) amino asit içeren bir ortak korunmuş bir motife sahiptir. H, bir hidrofobik amino asiti (yani, izolösün, lösün, metiyonin, fenilalanin veya valin); X, herhangi bir amino asiti ve rakam ise potansiyel tekrar sayısını gösterir (Turner, vd., 2012).

Bu hidrofobik bu amino asitler bir alfa-heliks-loop ve/veya tüm loop yapısını oluşturarak, CRM1'in hidrofobik cebine bağlanmasına olanak verir (Dong et al., 2009). Ancak NES dizileri henüz yeterince tanımlanmamış olup, %40'dan azı bilinmektedir (la Cour vd., 2004). Kargo molekülünün üç boyutlu yapısının; mutasyon, fosforilasyon, defosforilasyon ile değişikliğe uğraması, CRM1'in bağlanacağı yeni NES'lerin ortaya çıkmasına neden olabilir (Vogt vd., 2005; Craig vd., 2002; Powell vd., 1992). Ayrıca; sumolasyon (Pichler ve Melchior, 2002) ubikitinasyon (Bonifacino ve Traub, 2003; Vogt vd., 2005), asetilasyon (Vogt vd., 2005) ya da proteinine özel ko-faktörlerin bağlanması gibi ek modifikasyonlarda NES dizisinin kaybolmasına, maskelenmesine veya yeni dizilerin ortaya çıkmasına neden olarak CRM1'in kargo molekülüne afinitesini değiştirir (Kutay ve Guttinger, 2005; Yoneda vd., 1999; Poon ve Jans, 2005).

CRM1'İN EKSPRESYONU VE PROGNOSTİK ROLÜ

CRM1 aracılı nükleer ihracat, kanser, yara iyileşmesi, iltihaplanma ve viral enfeksiyon gibi çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. CRM1; insan T-hücresi lösemi virüsü tip 1, Huntington ve ailesel adenomatöz polipozis, kanser, inflamasyon, viral enfeksiyonlar gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilidir (Paraskeva vd., 1999).

Birçok viral proteinin, STAT, NF-Kb, NPM1, RASSF2, Merlin gibi proteinlerin, estradiol reseptörün ve APC, p53, p73, FOXOs, gibi tümör baskılayıcı, Ikb, BCR-ABL, eIF4E, BRAC1, retinoblastoma, p21CIP, p27Kip1 gibi büyümeyi düzenleyici/pro-enflamatuvarlar, NPM and AP-1 gibi anti-apoptotik proteinler ve Cox-2, c-MYC, epidermal büyüme faktör reseptörü, HIF-1 gibi onkojenik proteinlerin nükleer eksportu hücre döngüsü ve hücre çoğalması için oldukça kritik öneme sahip olup, nükleer eksportları Crm1 tarafından gerçekleşir (Fornerod vd., 1997a; Fabbro ve Henderson, 2003; Rensen vd., 2008). Ayrıca, CRM1 tümör baskılayıcı proteinlerin ve onkojenlerin aktivitesini düzenleyerek kanserogeneze katkı sağlar. CRM1; Rev ve U snRNAs'nin nükleer eksportunu inhibe ederken,

siklin B, MPAK, MAPKAP kinaz 2'nin, p21, p33 ve p27 ve Survivin'in lokalizasyonunu düzenleyerek, birçok hücre içi süreçleri kontrol eder (Fornerod vd., 1997a; Fabbro ve Henderson, 2003; Rensen vd., 2008). NFY/CBP, Sp1 ve p53 transkripsiyon faktörleri, *CRM1* geninin promotörü ile ilişkili oldukları ve genin promotörünü aktive ederek, kanser hücrelerinin transformasyonunda önemli rol oynadıkları bildirilmiştir (van der Watt ve Leaner, 2011). *CRM1* geni hücre çoğalmasının kontrolünde rol oynar ve çeşitli yolaklar aracılığıyla kanser hücrelerinin proliferasyonunda hücrenin kontrolünü kaybetmesini etkiler. Bir nükleer ihraç faktörü olarak, *CRM1* tümör baskılayıcı proteinlerin, hücre döngüsü düzenleyicilerinin ve pro-apoptotik proteinlerin doğrudan hücre içi lokalizasyonu düzenler ve bu nedenle nükleer ihracat dizileri ihtiva eden bu proteinlerin yer değişimi onkojenlerin aktivitesini de düzenleyerek kanserogeneze ve ilaç-direnç mekanizmalarının gelişimine katkı sağlar.

CRM1'in genotipik varyasyonları, ekspresyon düzeyini değiştirerek nükleer-sitoplazmik tanışım makinesinin fonksiyonunu etkileyerek bazı hastalık fenotiplerinin ortaya çıkmasına neden olabilir. *CRM1*'deki tek nükleotit polimorfizm (SNP) c.1871A>G; (pD624G), özofagus skuamöz hücreli karsinom ve kronik lenfositik lösemi ile ilişkili bulunmuştur (Lin 2014; Landau vd., 2013). Yapısal modelleme çalışmaları, *CRM1* proteininin 624. pozisyonundaki aspartik asit amino asitinin *CRM1*'in hedef kargo moleküle bağladığı alanda 144. pozisyonundaki Iizin amino asiti ile kritik bir tuz köprüsü oluşturmasının gerekli olduğunu göstermiştir. Proteinin 624. pozisyonundaki amino asitin glisin amino asitine dönüşümü bu önemli tuz köprüsünün kaybına neden olarak *CRM1*'in kargo molekülüne olan afinitesini değiştirerek nükleer-sitoplazmik taşınım verimliliğini artırabileceği raporlanmıştır (Lin 2014). Ayrıca, *CRM1* SNP rs6735330 ise otizme yatkınlıkla ilişkilidir (Liu vd., 2011). *CRM1* SNP rs7600515 ise Crohn's hastalığı için prognostik bir faktör olarak raporlanmıştır (Pernat vd., 2018). *CRM1* SNP rs4430924 antitüberküloz ilaçlarına bağlı hepatotoksisite gelişim riskiyle ilişkilidir (He vd., 2019).

Yumurtalık kanserinde (Noske vd., 2008), rahim ağzı kanseri (van der Watt vd., 2009), gliom (Shen vd., 2009), osteosarkom (Yao vd., 2009) pankreas kanseri (Huang vd., 2009) ve özafagus kanserinde (van der Watt vd., 2014; Yang vd., 2014) akciğer kanseri (Liu ve Gao, 2017), gastrik kanseri (Zhou vd., 2013) baş boyun kanseri (Özdaş ve Özdaş., 2018), renal hücre karsinomu (Inoue vd., 2013) hepatoselüler karsinoma (Zheng vd., 2014) akut miyeloid/lenfoid lökemiya (AML/ALL) (Kojima vd., 2013; Conway vd., 2015) kronik miyeloid/lenfoid lösemi (CML/CLL) multiple miyeloma (MM) (Lapalombella vd., 2012) mantolu hücre lenfoma (MCL) (Zhang vd., 2013; Yoshimura vd., 2014) plazma hücre lösemi (Tai vd., 2014) ve akut miyeloid lösemi (Wang vd., 2018) *CRM1*'nin ifade düzeyinde artış

tespit edilmiş ve bu artışın metastaz, histolojik grade, artan tümör boyutu ve azalmış genel sağkalımla ilişkili olduğu bildirilmiştir. *CRM1*'in artmış ifadesi; aşırı nükleositoplazmik taşıyım ile tümör baskılayıcı, hücre döngüsü düzenleyici ve/veya pro-apoptotik proteinlerin sitoplazmada birikmesi veya mislokalisasyonuna neden olduğu gibi ribozomal biyogenezi deregüle ederek, karsinogenezisi derinleştirir ve kemoterapiye direnç gelişimine eşlik eder. Ayrıca mitoz ve kromozomların dağılması kontrolünde aktif, nükleer ve kromozomun korunaklı yapısının sürdürülebilmesinde önemli olduğundan, bu yolları kullanarak kanser patogenezinde rol oynar (Dasso., 2006). *Crm1*'in aşırı ekspresyonu ve çeşitli malignitelerdeki negatif klinik tabloyla korelasyonu göz önüne alındığında, onkolojide cazip potansiyel bir töröpatik hedef molekül haline gelmiştir (Huang vd., 2009; Noske vd., 2008; Shen vd., 2009; Yao vd., 2009; Yoshimura vd., 2014).

SPESİFİK CRM1 PROTEİN İNHİBİTÖRLERİ

CRM1-aracılı nükleer ihracatın spesifik ajanlarla bloke edilmesinin veya *CRM1*'e spesifik siRNA ile gen ifadesinin baskılanmasının apoptotik yolları aktive ettiği ve doksorubisin, etoposid (Turner vd., 2009), sisplatin (Takenaka vd., 2004) ve imatinib mezilat (Aloisi et al., 2006) gibi kemoterapötik ilaçlara karşı tümör hücrelerinin duyarlılığını arttırdığı bildirilmiştir (Turner vd., 2009).

Leptomisin B (LMB), *CRM1* proteininin fonksiyonunu bloke eden ilk inhibitör molekül olarak ortaya çıkmıştır (Kudo vd., 1997; Kudo vd., 1999). LMB, *CRM1* proteininin reaktif bölgesinde spesifik sistein (Cys528) kalıntısından kovalent olarak bağlanır ve *CRM1*'in hedef kargo molekülüne bağlanmasını inhibe eder (Kudo vd., 1999). İn vitro çalışmalar, transforme hücrelerin normal hücrelere kıyasla LMB muamelesine daha duyarlı olduğu ve LMB'nin nanomolar konsantrasyonlarda oldukça sitotoksik olduğunu raporlanmıştır (Mutka vd., 2009). Ayrıca LMB'nin, anti-kanser ajanı olarak kullanılmak üzere faz-I çalışmaları devam etmektedir (Turner vd., 2009). Buna rağmen LMB düşük töröpatik indeksi ve yüksek toksisitesi nedeniyle henüz klinikte kullanıma girememiştir (Newlands vd., 1996).

Bir KPT türevi SINE, in-silico moleküler modelleme stratejisine dayanarak üretilmiştir (Lapalombella vd., 2012). SINE transforme olmamış hücrelere toksik etkili olmayıp, in vivo çalışmada oral kullanımının hafif gastrointestinal semptomlara neden olduğu ve değiştirilen beslenme rejimi ile birlikte inhibitörün aktivitesini koruduğu gözlenmiştir (Etchin vd., 2013). SINE, Farklı KPT türevleri *CRM1*'in kristal yapısının analizi için kullanılmış olup, *CRM1*-aracılı nükleer ihracatı inhibe etme potansiyeli gösterilmiştir (Etchin vd., 2013; Lapalombella vd., 2012). KPT türevleri kanser hücrelerinde apoptozisi indükler ve hücreleri hü-

re-döngüsü G1 fazında tutuklar (Etchin vd., 2013; Lapalombella vd., 2012).

KOS-2464, en etkili LMB analogu olup, düşük nanomolar konsantrasyonlarda apoptozisi indüklediği bildirilmiştir (Mutka vd., 2009; Turner ve ark., 2012). KOS 2464 düşük toksisite ve yüksek anti-tümör aktivitesi çeşitli kanser hücre hatlarında ve ksenograft fare modellerinde gösterilmiştir (Mutka vd., 2009).

CBS9106 CRM1'in reaktif bölgesine bağlanarak degrade olmasına neden olan farklı bir inhibitörü olup, in vitro çeşitli kanser hücre hatlarında ve in vivo ksenograft hayvan modelde anti-tümör aktivitesi gösterilmiştir (Turner vd., 2012).

Ratjadon, *Sorangium cellulosum*'dan izole edilmiş olup inhibisyon mekanizması LMB'ye benzer ve anti-proliferatif etkilere sahiptir (Meissner vd., 2004).

Anguimisinler, güçlü inhibitörler olup, transforme hücrelere seçici sitotoksosite gösterirler (Hayakawa vd., 1995).

PKF050-638, HIV-1 Rev proteininin nükleer ihracatını engelleyerek HIV-tedavisinde kullanılan bir CRM1-inhibitörü olup, anti-kanser etkisi henüz araştırılmamıştır (Daelemans vd., 2002; Turner vd., 2012).

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmalar, CRM1'in karsinogenezdeki kritik rolü ve terapötik hedef olma potansiyelinin göstermiş ve bu nedenle son yıllarda CRM1 yeni tümör-tedavi stratejilerinin geliştirilmesi çabalarının odak noktası haline gelmiştir. Bu çabalarla geliştirilen yeni nesil spesifik CRM1-inhibitörlerinin ve diğer ajanlarla kombinasyonlarının tedavi amaçlı klinik kullanımları oldukça umut vericidir. Spesifik inhibisyonu veya interferans teknikleriyle gen ifadesinin baskılanması yoluyla gerçekleştirilen artan sayıda çalışmalarla, CRM1'in malignitellerdeki biyolojik fonksiyonu, ilişkili hücre içi mekanizmaları açıklığa kavuşturulmakta ve tedavi sırasında gelişen ilaç-direnç mekanizmaları daha iyi anlaşılmaktadır. CRM1'in hedeflenmesi, çeşitli apoptotik yolların aktive olmasına neden olarak, ilaç-direnç mekanizmalarının gelişmesinin önüne geçerek tedavi stratejilerinde birçok avantaj vadetmektedir.

KAYNAKÇA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) Molecular Biology of the Cell, 4th ed, Garland Science.
- Bai, B., Moore, H.M., Laiho, M. (2013) CRM1 and its ribosome export adaptor NMD3 localize to the nucleolus and affect rRNA synthesis. *Nucleus*, 4(4), 315–325. Doi: 10.4161/nucl.25342
- Bonifacino, J. S., Traub, L. M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem*, 72, 395-447. Doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161800
- Chook, Y. M., Blobel, G. (2001). Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol*, 11, 703-715. Doi: 10.1016/S0959-440X(01)00264-0

- Conway, A.E., Haldeman, J. M., Wechsler, D. S., Lavau, C. P. (2015) A critical role for CRM1 in regulating HOXA gene transcription in CALM-AF10 leukemias. *Leukemia*, 29, 423–432. Doi: 10.1038/leu.2014.221
- Craig, E., Zhang, Z. K., Davies, K. P., Kalpana, G. V. (2002) A masked NES in INI1/hSNF5 mediates hCRM1-dependent nuclear export: implications for tumorigenesis. *Embo J*, 21, 31-42. Doi: 10.1093/emboj/21.1.31
- Daelemans, D., Afonina, E., Nilsson, J., Werner, G., Kjems, J., De Clercq, E., et al. (2002) A synthetic HIV-1 Rev inhibitor interfering with the CRM1-mediated nuclear export. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(22), 14440–14445. Doi: 10.1073/pnas.212285299
- Dasso, M. (2006) Ran at kinetochores. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 5), 711-5. Doi: 10.1042/BST0340711
- Dong, X., Biswas, A., Suel, K. E., Jackson, L. K., Martinez, R., Gu, H., Chook, Y. M. (2009) Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1. *Nature*, 458(7242), 1136–1141. Doi: 10.1038/nature07975
- Etchin, J., Sanda, T., Mansour, M. R., Kentsis, A., Montero, J., Le, B. T., Christie, A. L., McCauley, D., Rodig, S. J., Kauffman, M., Shacham, S., Stone, R., Letai, A., Kung, A. L., Thomas, Look, A. (2013) KPT-330 inhibitor of CRM1 (XPO1)-mediated nuclear export has selective anti-leukemic activity in preclinical models of Tcell acute lymphoblastic leukaemia and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 161(1), 117–127. Doi: 10.1111/bjh.12231
- Fabbro, M., Henderson, B. R. (2003) Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. *Experimental Cell Research (Exp Cell Res)*, 15, 282(2), 59-69. Doi: 10.1016/S0014-4827(02)00019-8
- Fei, E., Ma, X., Zhu, C., Xue, T., Yan, J., Xu, Y., Zhou, J., Wang, G. (2010) Nucleo cytoplasmic shuttling of dysbindin-1, a schizophrenia-related protein, regulates synapsin I expression. *J Biol Chem*, 285, 38630-38640. Doi: 10.1074/jbc.M110.107912
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., Mattaj I.W. (1997a) CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*, 90(6), 1051-60. Doi: 10.1016/S0092-8674(00)80371-2
- Fornerod, M., van Deursen, J., van Baal, S., Reynolds, A., Davis, D., Murti, K. G., Franssen, J. and Grosveld, G. (1997b) The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88. *EMBO J*, 16(4), 807-816. Doi: 10.1093/emboj/16.4.807
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., Nishida, E. (1997) CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature*, 390(6657), 308-11. Doi:10.1038/36894
- Grunewald, T.G.P., Kammerer, U., Schulze, E., Schindler, D., Honig, A., Zimmer, M. and Butt, E. (2006) Silencing of LASP-1 influences zyxin localization, inhibits proliferation and reduces migration in breast cancer cells. *Experimental Cell Research*, 312, 974-982. Doi: 10.1016/j.yexcr.2005.12.016
- Hayakawa, Y., Sohda, K. Y., Shin-Ya, K., Hidaka, T., Seto, H. (1995) Anguinomycins C and D, new antitumor antibiotics with selective cytotoxicity against transformed cells. *J Antibiot (Tokyo)*, 48(9), 954–961. Doi: 10.7164/antibiotics.48.954
- He, X., Zhang, H., Tao, B., Yang, M., Chen, H., Lu, L., Yi, H., Pan, H., Tang, S. (2019) The A/A Genotype of XPO1 rs4430924 Is Associated with Higher Risk of Antituberculosis Drug-Induced Hepatotoxicity in Chinese Patients. *J Clin Pharmacol*. [Epub ahead of print] Doi: 10.1002/jcph.1398
- <http://www.uniprot.org/uniprot/O14980> (Son erişim tarihi 11 Mayıs 2019).
- Huang, W. Y., Yue, L., Qiu, W. S., Wang, L. W., Zhou, X. H., Sun, Y. J. (2009) Prognostic value of CRM1 in pancreas cancer. *Clin Invest Med*, 1, 32(6), E315.
- Inoue, H., Kauffman, M., Shacham, S., Landesman, Y., Yang, J., Evans, C. P., Weiss R. H. (2013) CRM1 blockade by selective inhibitors of nuclear export attenuates kidney cancer growth. *J Urol*, 189, 2317-2326. Doi: 10.1016/j.juro.2012.10.018
- Izaurralde, E., Adam, S. (1998) Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *RNA*, 4(4), 351-64.

- Kau, T. R., Way, J. C., Silver, P. A. (2004) Nuclear transport and cancer: from mechanism to intervention. *Nat Rev Cancer*, 4, 106-17. Doi: 10.1038/nrc1274
- Kojima, K., Kornblau, S. M., Ruvolo, V., Dilip, A., Duvvuri, S., Davis, R. E. Zhang, M., Wang, Z., Coombes, K. R., Zhang, N., Qiu, Y. H., Burks, J. K., Kantarjian, H., Shacham, S., Kauffman, M., Andreeff, M. (2013) Prognostic impact and targeting of CRM1 in acute myeloid leukemia. *Blood*, 121, 4166–4174. Doi: 10.1182/blood-2012-08-447581
- Koyama, M., Matsuura, Y. (2010) An allosteric mechanism to displace nuclear export cargo from CRM1 and RanGTP by RanBP1. *EMBO J*, 29(12), 2002-13. Doi: 10.1038/emboj.2010.89
- Koyama, M., Matsuura, Y. (2010) An allosteric mechanism to displace nuclear export cargo from CRM1 and RanGTP by RanBP1. *EMBO J*, 29(12), 2002-13.
- Kudo, N., Khochbin, S., Nishi, K., Kitano, K., Yanagida, M., Yoshida, M., Horinouchi, S. (1997) Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of mammalian CRM1, a protein involved in nuclear export of proteins. *J Biol Chem*, 272 (47), 29742-51. Doi: 10.1074/jbc.272.47.29742
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M., Horinouchi, S. (1999) Leptomycin B inactivates Eksportin-1/exportin 1 by covalent modification at acysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 9112-7. Doi: 10.1073/pnas.96.16.9112
- Kutay, U., Guttinger, S. (2005) Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends Cell Biol*, 15, 121-4. Doi: 10.1016/j.tcb.2005.01.005
- la Cour, T., Kiemer, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., Brunak, S. (2004) Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel*, 17, 527-536. Doi: 10.1093/protein/gzh062
- Landau, D. A., Carter, S. L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M. S., Sougnez, C., Stewart, C., Sivachenko, A., Wang, L., Wan, Y., Zhang, W., Shukla, S. A., Vartanov, A., Fernandes, S. M., Saksena G., Cibulskis, K., Tesar, B., Gabriel, S., Hacohen, N., Meyerson, M., Lander, E. S., Neuberg, D., Brown, J. R., Getz, G., Wu, C. J. (2013) Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, 152, 714–726. Doi: 10.1016/j.cell.2013.01.019
- Lapalombella, R., Sun, Q., Williams, K., Tangeman, L., Jha, S., Zhong, Y. Goettl, V., Mahoney, E., Berglund, C., Gupta, S., Farmer, A., Mani, R., Johnson, A. J., Lucas, D., Mo, X., Daelemans, D., Sandanayaka, V., Shechter, S., McCauley, D., Shacham, S., Kauffman, M., Chook, Y. M., Byrd, J. C. (2012) Selective inhibitors of nuclear export show that CRM1/XPO1 is a target in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 120, 4621–4634. Doi: 10.1182/blood-2012-05-429506
- Lapalombella, R., Sun, Q., Williams, K., Tangeman, L., Jha, S., Zhong, Y., Goettl, V., Mahoney, E., Berglund, C., Gupta, S., Farmer, A., Mani, R., Johnson, A.J, Lucas D, Mo X, Daelemans D, Sandanayaka V, Shechter S, McCauley D, Shacham S, Kauffman M, Chook YM, Byrd JC. (2012) Selective inhibitors of nuclear export show that CRM1/XPO1 is a target in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 120(23), 4621–4634. Doi: 10.1182/blood-2012-05-429506
- Lin, D. C., Hao, J. J., Nagata, Y., Xu, L., Shang, L., Meng, X., Sato, Y., Okuno, Y., Varela, A. M., Ding, L. W., Garg, M., Liu, L. Z., Yang, H., Yin, D., Shi, Z. Z., Jiang, Y. Y., Gu, W. Y., Gong, T., Zhang, Y., Xu, X., Kalid, O., Shacham, S., Ogawa, S., Wang, M. R., Koeffler, H. P. (2014) Genomic and molecular characterization of esophageal squamous cell carcinoma. *Nat Genet*, 46(5), 467-473. Doi: 10.1038/ng.2935
- Liu, X., Malenfant, P., Reesor, C., et al. (2011) 2p15-p16.1 Microdeletion syndrome: molecular characterization and association of the OTX1 and XPO1 genes with autism spectrum disorders. *Eur J Hum Genet*, 19(12), 1264-1270. Doi:10.1038/ejhg.2011.112
- Liu, Z, Gao, W. (2017) Leptomycin B reduces primary and acquired resistance of gefitinib in lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 15, 335, 16-27. Doi: 10.1016/j.taap.2017.09.017
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L., Darnell J. (2004) *Molecular Cell Biology*. 5th ed. New York, WH Freeman.
- Matsuyama, A, Arai, R, Yashiroda, Y, Shirai, A, Kamata, A, Sekido, S. (2006) ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol*, 24, 841-7. Doi: 10.1038/nbt1222

- Meissner, T., Krause, E., Vinkemeier, U. (2004) Ratjadone and leptomycin B block CRM1-dependent nuclear export by identical mechanisms. *FEBS Lett*, 576(1-2), 27-30. Doi: 10.1016/j.febslet.2004.08.056
- Misteli, T. (2008) Physiological importance of RNA and protein mobility in the cell nucleus. *Histochem Cell Biol*, 129(1), 5-11. Doi: 10.1007/s00418-007-0355-x
- Mutka, S. C., Yang, W. Q., Dong, S. D., Ward, S. L., Craig, D. A., Timmermans, P. B., Murli, S. (2009) Identification of nuclear export inhibitors with potent anticancer activity in vivo. *Cancer Res*, 69(2), 510-517. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0858
- Newlands, E. S., Rustin, G. J., Brampton, M. H. (1996) Phase I trial of elactocin. *Br J Cancer*, 74(4), 648-649.
- Noske, A., Weichert, W., Niesporek, S., Roske A., Buckendahl, A.C., Koch, I., Sehouli, J., Dietel, M., Denkert, C. (2008) Expression of the nuclear export protein chromosomal region maintenance/exportin 1/Xpo1 is a prognostic factor in human ovarian cancer. *Cancer*, 15, 112(8), 1733-43. Doi: 10.1002/cncr.23354
- Ossareh-Nazari, B., Bachelerie F., Dargemont C. (1997) Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science*, 278(5335), 141-4. Doi: 10.1126/science.278.5335.141
- Özdaş, S. (2018) Nuclear entrapment of p33ING1b by inhibition of exportin-1: A trigger of apoptosis in head and neck squamous cell cancer. *Cell Mol Biol (Noisy le Grand)*, 64(5), 66-72. Doi: 10.14715/cmb/2018.64.5.11
- Özdaş, S., Özdaş, T. (2018) Crm1-knockdown by specific small interfering RNA reduces cell proliferation and induces apoptosis in head and neck cancer cell lines. *Turk J Biol*, 42, 2, 132-143. Doi: 10.3906/biy-1711-8
- Paraskeva, E., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Huber, J., Kutay, U., Hartmann, E., Luhrmann, R. and Gorlich, D. (1999) CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J. Cell Biol*, 145(2), 255-264.
- Pemberton, L. F., Bryce, M. P. (2005) Mechanisms of Receptor-Mediated Nuclear Import and Nuclear Export. *Traffic*, 6(3), 187-198. Doi: 10.1111/j.1600-0854.2005.00270.x
- Pernat Drobez, C., Repnik, K., Gorenjak, M., Ferkolj, I., Weersma, R. K., Potocnik, U. (2018) DNA polymorphisms predict time to progression from uncomplicated to complicated Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 30(4), 447-455. Doi: 10.1097/MEG.0000000000001055
- Petosa, C., Schoehn, G., Askjaer, P., Bauer, U., Moulin, M., Steuerwald, U., Soler-Lopez, M., Baudin, F., Mattaj, I. W., Muller, C. W. (2004) Architecture of CRM1/Exportin1 suggests how cooperativity is achieved during formation of a nuclear export complex. *Mol Cell*, 16, 761-775. Doi: 10.1016/j.molcel.2004.11.018
- Pichler, A., Melchior, F. (2002) Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic*, 3, 381-7. Doi: 10.1034/j.1600-0854.2002.30601.x
- Poon, I. K., Jans, D. A. (2005) Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation. *Traffic*, 6, 173-86. Doi: 10.1111/j.1600-0854.2005.00268.x
- Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N. Vogelstein B, Kinzler KW (1992) APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, 359, 235-7. Doi: 10.1038/359235a0
- Ptasznik, A., Nakata, Y., Kalota, A., Emerson, S. G., Gewirtz, A. M. (2004) Short interfering RNA (siRNA) targeting the Lyn kinase induces apoptosis in primary, and drug-resistant, BCR-ABL1(+) leukemia cells. *Nat Med*, 10(11), 1187-9. Doi: 10.1038/nm1127
- Rensen, W. M., Mangiacasale, R., Ciciarello, M., Lavia, P. (2008) The GTPase Ran: regulation of cell life and potential roles in cell transformation. *Front Biosci*, 1, 13, 4097-121.
- Saito, N., Matsuura, Y. (2013) A 2.1-Å resolution crystal structure of unliganded CRM1 reveals the mechanism of autoinhibition. *J Mol Biol*, 425, 350-364. Doi: 10.1016/j.jmb.2012.11.014
- Shen, A., Wang, Y., Zhao, Y., Zou, L., Sun, L., Cheng, C. (2009) Expression of CRM1 in human gliomas and its significance in p27 expression and clinical prognosis. *Neurosurgery*, 65(1), 153-9. Doi: 10.1227/01.NEU.0000348550.47441.4B

- Steinmetz, R., Wagoner, H. A., Zeng, P., Hammond J. R., Hannon T. S., Meyers J. L. and Pescovitz, O. H. (2004) Mechanisms regulating the constitutive activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Signaling Pathway in ovarian cancer and effect of Ribonucleic Acid Interference for ERK ½ on cancer cell proliferation. *Molecular Endocrinology*, 18, 2570-2582. Doi: 10.1210/me.2004-0082
- Tai, Y. T., Landesman, Y., Acharya, C., Calle, Y., Zhong, M.Y., Cea, M. Tannenbaum, D., Cagnetta, A., Reagan, M., Munshi, A. A., Senapedis, W., Saint-Martin, J. R., Kashyap, T., Shacham, S., Kauffman, M., Gu, Y., Wu, L., Ghobrial, I., Zhan, F., Kung, A. L., Schey, S. A., Richardson, P., Munshi, N. C., Anderson, K. C. (2014) CRM1 inhibition induces tumor cell cytotoxicity and impairs osteoclastogenesis in multiple myeloma: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Leukemia*, 28, 155-165. Doi: 10.1038/leu.2013.115
- Turner, J. G., Dawson, J., Sullivan, D. M. (2012) Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. *Biochem Pharmacol*, 83(8), 1021-1032. Doi: 10.1016/j.bcp.2011.12.016
- Turner, J. G., Marchion, D. C., Dawson, J. L., Emmons, M. F., Hazlehurst, L. A., Washausen, P., Sullivan, D. M. (2009) Human multiple myeloma cells are sensitized to topoisomerase II inhibitors by CRM1 inhibition. *Cancer Res*, 69(17), 6899-6905. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0484
- Turner, J. G., Sullivan, D. M. (2008) CRM1-mediated nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. *Curr Med Chem*, 15(26), 2648-55. Doi: 10.2174/092986708786242859
- van der Watt, P. J., Leaner, V. D. (2011) The nuclear exporter, Crm1, is regulated by NFY and Sp1 in cancer cells and repressed by p53 in response to DNA damage. *Biochim Biophys Acta*, 1809(7), 316-26. Doi: 10.1016/j.bbagr.2011.05.017
- van der Watt, P. J., Maske, C. P., Hendricks, D. T., Parker, M. I., Denny, L., Govender, D., Birrer, M. J., Leaner, V. D. (2009) The Karyopherin proteins, Crm1 and Karyopherin beta1, are overexpressed in cervical cancer and are critical for cancer cell survival and proliferation. *Int J Cance*, 15, 124(8), 1829-40. Doi: 10.1002/ijc.24146
- van der Watt, P. J., Zemanay W., Govender, D., Hendricks, D. T., Parker, M. I., Leaner, V. D., (2014) Elevated expression of the nuclear export protein, Crm1 (exportin 1), associates with human oesophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 32(2), 730-8. Doi: 10.3892/or.2014.3231
- Vogt, P. K., Jiang, H., Aoki, M. (2005) Triple layer control: phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins. *Cell Cycle*, 4, 908-13. Doi: 10.4161/cc.4.7.1796
- Wang, A. Y., Weiner, H., Green, M., Chang, H., Fulton, N., Larson, R. A., Odenike, O., Artz, A. S., Bishop, M. R., Godley, L. A. Thirman, M. J., Kosuri, S., Churpek, J. E., Curran, E., Pettit, K., Stock, W., Liu, H. (2018) A phase I study of selinexor in combination with high-dose cytarabine and mitoxantrone for remission induction in patients with acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*, 5, 11(1), 4. Doi: 10.1186/s13045-017-0550-8
- Watson, J. D, Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., Losick, R. (2004) Ch9-10, *Molecular Biology of the Gene*. 5th ed, Peason Benjamin Cummings, CSHL Press. New York.
- Wente, S. R. (2000) Gatekeepers of the nucleus. *Science*, 288(5470), 1374-7. Doi: 10.1126/science.288.5470.1374
- Wu, C. H., Sahoo, D., Arvanitis, C., Bradon, N., Dill, D. L., Felsher, D. W. (2008) Combined analysis of murine and human microarrays and ChIP analysis reveals genes associated with the ability of MYC to maintain tumorigenesis. *PLoS Genet*, 4(6), e1000090. Doi: 10.1371/journal.pgen.1000090
- Yang X., Cheng L., Yao L., Ren H., Zhang S., Min X., Chen X., Zhang J., Li M. (2014) Involvement of chromosome region maintenance 1 (CRM1) in the formation and progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Med Oncol*, 31(9), 155. Doi: 10.1007/s12032-014-0155-9
- Yao, Y., Dong, Y., Lin, F., Zhao, H., Shen, Z., Chen, P., Sun, Y. J., Tang, L. N., Zheng, S. E. (2009) The expression of CRM1 is associated with prognosis in human osteosarcoma. *Oncol Rep*, 21(1), 229-35. Doi: 10.3892/or_00000213
- Yoneda, Y., Hieda, M., Nagoshi, E., Miyamoto, Y. (1999) Nucleocytoplasmic protein transport and recycling of Ran. *Cell Struct Funct*, 24, 425-33. Doi: 10.1247/csf.24.425

Güncel Biyokimya Çalışmaları II

- Yoshimura, M., Ishizawa, J., Ruvolo, V., Dilip, A., Quintas-Cardama, A., McDonnell, T. J., Neelapu, S. S., Kwak, L. W., Shacham, S., Kauffman, M., Tabe, Y., Yokoo, M., Kimura, S., Andreeff, M., Kojima, K. (2014) Induction of p53-mediated transcription and apoptosis by exportin-1 (XPO1) inhibition in mantle cell lymphoma. *Cancer Sci*, 105, 795–801. Doi: 10.1111/cas.12430
- Zhang, K., Wang, M., Tamayo, A.T., Shacham, S., Kauffman, M., Lee, J., Zhang, L., Ou, Z., Li, C., Sun, L., Ford, R. J., Pham, L. V. (2013) Novel selective inhibitors of nuclear export CRM1 antagonists for therapy in mantle cell lymphoma. *Exp Hematol*, 41, 67–78, e4. Doi: 10.1016/j.exp-hem.2012.09.002
- Zheng, Y., Gery, S, Sun, H., Shacham, S., Kauffman, M., Koeffler, H. P. (2014) KPT-330 inhibitor of XPO1-mediated nuclear export has anti-proliferative activity in hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemoth Pharm*, 74, 487–495. Doi: 10.1007/s00280-014-2495-8
- Zhou, F., Qiu, W., Yao, R., Xiang, J., Sun, X., Liu, S. Lv, J., Yue, L. (2013) CRM1 is a novel independent prognostic factor for the poor prognosis of gastric carcinomas. *Med Oncol*, 30, 726. Doi: 10.1007/s12032-013-0726-1