

**NONSTEROİD ANTI-İNFLAMATUVAR İLAÇLARLA
ALEVLENEN HAVA YOLU HASTALIĞINDA (N-ERD)
PLATELET-LÖKOSİT KÜMELERİNİN ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF THE ROLE OF PLATELET-
LEUKOCYTE AGGREGATES IN NONSTEROIDAL ANTI-
INFLAMMATORY DRUG EXACERBATED
RESPIRATORY DISEASE (N-ERD)**

SELCAN GENÇ

DOÇ. DR. İBRAHİM ÇAĞATAY KARAASLAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022

Canim Anneanneme,

ÖZET

NONSTEROİD ANTI-İNFLAMATUVAR İLAÇLARLA ALEVLENEN HAVA YOLU HASTALIĞINDA (N-ERD) PLATELET-LÖKOSİT KÜMELERİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Selcan GENÇ

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN

Eş Danışman: Doç. Dr. Ebru DAMADOĞLU

Mart 2022, 84 sayfa

Nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlarla alevlenen hava yolu hastalığı (N-ERD), ağır astım ve nazal polip oluşumu gözlenen kronik rinosinüziti olan hastalarda, aspirin ve diğer seçici nonsteroid anti-inflamatuvar ilaç alımı sonrası ağır klinik semptomlar gösteren heterojen bir hastalıktır. Hastalık erişkin dönemde tanı almakta ve semptomlar zaman içinde gelişerek kendini göstermektedir. Hastalığın farkındalığının düşük olması nedeniyle görülme sıklığına yönelik bildirilen veriler kesinlik taşımamaktadır. Ancak, toplum genelinde N-ERD görülme sıklığının erişkin astımlı hastalarda ortalama %7 iken ağır astımlı hastalarda %15 olduğu tahmin edilmektedir. N-ERD hastalarında aspirin ve nonsteroid anti-inflamatuvar ilaç (NSAİİ) alımı sonrasında siklooksijenaz-1 (COX-1) enzim aktivitesinde kalıcı bir inhibisyon gerçekleşmektedir. Bu durum; araşidonik asit (AA) metabolizmasını 5-lipoksijenaz (5-LO) yönünde kaydırarak güçlü lipid mediyatörleri sınıfından olan sisteinil lökotrienlerin (CysLT) aşırı artmasına neden olmaktadır. Ayrıca, N-ERD patogenezinde önemli olduğu belirtilen Prostaglandin D2 (PGD2) lipid mediyatörünün, pro-inflamatuvar özellik sergileyerek N-ERD hastalığında ciddi artış gösterdiği; Prostaglandin E2 (PGE2)'nin ise anti-inflamatuvar özellik göstermesi ile N-ERD hastalığında kritik seviyelerde olduğu bilinmektedir. Son dönemde yapılan çalışmalar N-ERD hastalarında platelet-lökosit kümelerinin varlığına dikkat

çekmektedir. Özellikle N-ERD patogenezinde normal koşullar altında tek başlarına CysLT üretemeyen plateletler, P-selektin, GPIIb / IIIa (Glikoprotein CD41/CD61) ve CD40 ligand gibi yüzey reseptörleri aracılığıyla lökositler üzerinde bulunan P-selektin glikoprotein ligand 1 (PSGL-1), Makrofaj adezyon molekülü-1 (Mac-1) ve CD40 ile birleştikten sonra CysLT üretimine katkı sağlayabilmektedirler. Aspirin desensitizasyonu (AD), mast hücre aktivasyonu ve CysLT üretimi ile karakterize edilen bir astım fenotipi olan N-ERD için mevcut tek hedefli tedavidir; AD'yi takiben günlük aspirin uygulaması, birçok hastanın klinik seyirinde önemli bir iyileşme ile sonuçlanmıştır. Yakın tarihli bir çalışmada, N-ERD hastalarının %83,5'inin herhangi bir önemli komplikasyon olmaksızın desensitizasyonu tolere edebildiği gösterilmiştir. Aspirin duyarsızlaştırma ve günlük yüksek doz aspirin uygulaması N-ERD'li hastaların çoğu için başarıyla sonuçlansa da tüm hastalarda bu başarıya ulaşılamamakta ve diğer tedavi çeşitlerine de gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca, AD tedavisinin N-ERD hastalarında platelet-nötrofil kümeleri üzerindeki etkisi ve bu etkinin hastalık patofizyolojisi ile ilgisi bilinmemektedir. Ancak literatürde alternatif anti-platelet odaklı tedavilere yönelen ve N-ERD patogenezinde önemli olan platelet-lökosit kümelerinin nedenlerini araştıran çalışmalar da bulunmaktadır.

Tez kapsamında, AD uygulanan ve uygulanmayan N-ERD hastalarının kanındaki nötrofillere yapışan plateletlerin seviyeleri belirlenerek astımlı ve sağlıklı bireylerle karşılaştırılmıştır. Bu çalışmanın amacı, platelet-nötrofil kümelerinin ve potansiyel olarak bu kümeleşmeyle ilişkili moleküllerin N-ERD patogenezindeki rolünü araştırmaktır. Yapılan çalışmalar sonucunda, AA metabolitlerinden biri olan platelet türevli 12-HETE'nin seviyesi, platelet-nötrofil kümelerinin yüzdesi, sP-selektin ve PF4'ün plazma seviyeleri, sağlıklı kontrollere kıyasla N-ERD hastalarında önemli ölçüde daha yüksek seviyelerde bulunmuştur. Ayrıca, platelet-nötrofil kümelerinin yüzdesi ile üriner LTE4 konsantrasyonu pozitif korelasyon göstermiştir. Ancak, N-ERD hastalarına uygulanan AD tedavisi platelet-nötrofil kümelerinin yüzdesini değiştirmemiştir. Bu bulgulara dayanarak, N-ERD'li hastalarda platelet aktivasyonunun baskılanmasının, hastalık patogenezi için potansiyel bir terapötik hedef olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlarla alevlenen hava yolu hastalığı (N-ERD), nazal polip, astım, araşidonik asit, aspirin desensitizasyonu

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ROLE OF PLATELET-LEUKOCYTE AGGREGATES IN NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUG EXACERBATED RESPIRATORY DISEASE (N-ERD)

Selcan GENÇ

Master of Science, Department of Molecular Biology

Supervisor: Assoc. Prof. İbrahim Çağatay KARAASLAN

Co-Advisor: Assoc. Prof. Ebru DAMADOĞLU, MD.

March 2022, 84 pages

Nonsteroidal anti-inflammatory drug exacerbated respiratory disease (N-ERD) is a heterogeneous disease characterized by severe clinical symptoms in patients with severe asthma and chronic rhinosinusitis, as well as nasal polyp formation, following administration of aspirin and other selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Clinical characteristics of the disease do not normally appear all at once at the outset of the condition, but rather evolve in a pattern. Due to the disease's limited awareness, the information regarding its prevalence is highly limited. However, the general population prevalence of N-ERD is estimated to be 7% in adult asthmatic patients and 15% in severe asthmatic patients. Inhibition of cyclooxygenase-1 (COX-1) enzyme activity occurs after aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) intake in N-ERD patients. This condition occurs when arachidonic acid (AA) metabolism is shifted in the direction of 5-lipoxygenase (5-LO), resulting in an excessive rise in cysteinyl leukotrienes (CysLT), a potent lipid mediator. Furthermore, although the pro-inflammatory lipid mediator Prostaglandin D2 is critically higher in N-ERD patients, the level of prostaglandin E2, exerting anti-inflammatory activities, is significantly lower in the state of N-ERD disease. Recent studies draw attention to the presence of platelet-leukocyte aggregation in N-ERD patients. Platelets, which cannot produce CysLT alone under normal conditions, can bind

to leukocytes through their surface receptors (P-selectin, GPIIb / IIIa (Glycoprotein CD41/CD61) and CD40 for platelets; P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1), macrophage adhesion molecule-1 (Mac-1) and CD40 for leukocytes) and then these platelet-leukocyte aggregates can contribute CysLT production. Aspirin desensitization (AD) is the only targeted therapy available for N-ERD, an asthma phenotype characterized by mast cell activation and CysLT production; daily administration of aspirin following AD has resulted in a significant improvement in the clinical course of many patients. In a recent study, it was shown that 83.5% of N-ERD patients can tolerate desensitization without any major complications. Although aspirin desensitization and daily administration of high-dose aspirin are successful for most of the patients with N-ERD, this success cannot be achieved in all patients and other types of treatment are required. Furthermore, the effect of AD treatment on platelet-neutrophil aggregates in N-ERD patients, as well as the relevance of this effect to disease pathophysiology, is unknown. However, there are also studies in the literature that focus on alternative anti-platelet therapies and investigate the causes of platelet-leukocyte aggregates, which are important in the pathogenesis of N-ERD.

Within the scope of this thesis study, we determined the frequencies of platelet-adherent neutrophils in whole blood of subjects with N-ERD patients with and without AD, and then we compared them to those found in the whole blood of ATA and healthy controls. The aim of this study is to investigate the involvement of platelet-neutrophil aggregates and potentially associated molecules with this aggregation in N-ERD pathogenesis and potential N-ERD-associated molecules. As a result of the studies, the level of platelet-derived 12-HETE, one of the AA metabolites, the percentage of platelet-neutrophil aggregates, the plasma levels of sP-selectin and PF4 were found to be significantly higher in N-ERD patients compared to healthy controls. In addition, the percentage of platelet-neutrophil aggregates was positively correlated with urinary LTE4 concentration. However, AD treatment administered to N-ERD patients did not change the percentage of platelet-neutrophil aggregates. Based on these findings, suppression of platelet activation in patients with N-ERD is thought to be a potential therapeutic target for disease pathogenesis.

Keywords: Nonsteroidal anti-inflammatory drug exacerbated respiratory disease (N-ERD), nasal polyp, asthma, arachidonic acid, aspirin desensitization

TEŞEKKÜR

Lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca bana yol gösteren, tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bilime ve araştırmaya teşvikiyle ufkumu genişleten, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN'a,

Tez çalışmamda belirleyici bir rolü olan ve bu süreçte bana destek olan değerli eş danışmanım Doç. Dr. Ebru DAMADOĞLU'na,

Deneysel çalışmalarım sırasında bilgi, tecrübe ve laboratuvar imkanlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Baran ERMAN'a

Çalışmalarım süresince ilgi ve destek gösteren, engin bilgi birikimleriyle çıkan her türlü problemi çözüme kavuşturan, tezimin her sürecinde bana gösterdikleri sonsuz sabır, sevgi ve yardımları için sevgili hocam Arş. Gör. Dr. Hayriye AKEL BİLGİÇ ve değerli arkadaşım Arş. Gör. Başak Ezgi SARAÇ'a,

Yardımları ve bilgileri ile bana her zaman destek olan, birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve ne zaman ihtiyacım olsa yanımda olan sevgili çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Dilara KARAGÜZEL, Seçil SUBAŞI ve Kadriye Gizem İMRAK'a,

Her zaman yardıma hazır olan diğer tüm ECRG Laboratuvar arkadaşlarıma,

Desteklerini ve sevgilerini her zaman kalbimde hissettiğim canım arkadaşlarım Melike Zeynep SAYIN ve Berkay EVRENÖZ'e,

Tez çalışmamın tamamlanmasında TSA-2020-18855 proje koduyla maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Tez çalışmamı gerçekleştirebilmemi sağlayan hasta ve sağlıklı tüm gönüllü katılımcılarıma,

Hayatımın her aşamasında beni kayıtsız şartsız destekleyen, birçok sıkıntıya rağmen benim bugün geldiğim noktada olmamı sağlayan, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim canım annem Nurcan GENÇ, babam Candan GENÇ, kardeşim Doğukan GENÇ ve hayatım boyunca elini her zaman üzerimde hissettiğim kıymetli anneannem Selvi GÜNEŞ'e

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. N-ERD (Nonsteroid Anti-İnflamatuvar İlaçlarla Alevlenen Hava Yolu Hastalığı).....	2
2.1.1. Klinik.....	3
2.1.2. Tanı	4
2.2. N-ERD Görülme Sıklığı	6
2.3. N-ERD Patogenezi.....	6
2.3.1. İnflamatuvar Hücrelerin N-ERD ile İlişkisi.....	7
2.3.2. Araşidonik Asit Metabolizması ve N-ERD	8
2.4. Plateletlerin N-ERD Patogenezindeki Rolü	13
2.4.1. Platelet Aktivasyonu	13
2.4.2. Platelet-Nötrofil Kümeleri.....	15
2.4.3. N-ERD Hastalığına Etkisi Olan Platelet Mediyatörler	17
2.5. N-ERD ve Tedavi Yöntemleri	19
2.5.1. Biyolojik Tedaviler	19
2.5.2. Topikal Tedaviler	20
2.5.3. Araştırmaları Devam Eden Diğer Tedaviler.....	20
2.5.4. Aspirin Desensitizasyonu (AD).....	21

2.5.5. AD Tedavisinin Platelet-Lökosit Kümeleşmesi Üzerine Etkisi	22
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	24
3.1. Kontrol ve Hasta Gruplarının Belirlenmesi	24
3.2. Çalışma Popülasyonu	26
3.3. Veri Toplama	26
3.3.1. Kan Örneklerinin Toplanması	27
3.3.2. İdrar Örneklerinin Toplanması	27
3.4. Platelet-Nötrofil Kümelerinin Akış Sitometrisi ile Analizi	27
3.5. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi	29
3.5.1. ELISA DeneYlerinde Kullanılan Malzemeler	30
3.5.2. Kandaki Sitokinlerin ELISA Yöntemi ile Ölçümü	31
3.6. Üriner Lökotrien E4 Ölçümü	33
3.7. İstatistiksel Analiz	35
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	36
4.1. Çalışma Gruplarının Popülasyon Karakteristiği	36
4.2. ELISA Sonuçları	38
4.2.1. sP-selektin (CD62P) ELISA Sonuçları	38
4.2.2. CD40L ELISA Sonuçları	40
4.2.3. PF4 ELISA Sonuçları	42
4.2.4. RANTES ELISA Sonuçları	43
4.2.5. PAF ELISA Sonuçları	45
4.2.6. TXA2 ELISA Sonuçları	46
4.2.7. PGD2 ELISA Sonuçları	48
4.2.8. PGE2 ELISA Sonuçları	49
4.2.9. Üriner LTE4 ELISA Sonuçları	51
4.2.10. 12-HETE ELISA Sonuçları	52
4.2.11. 20-HETE ELISA Sonuçları	54
4.2.12. GM-CSF ELISA Sonuçları	54
4.3. Platelet-Nötrofil Kümelerinin Akış Sitometri Sonuçları	54
4.4. Korelasyon Sonuçları	57
5. YORUM	60

6. KAYNAKLAR	65
--------------------	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. N-ERD hastalığının şematik gösterimi.....	2
Şekil 2.2. N-ERD Klinik Tanı Tablosu	5
Şekil 2.3. N-ERD ile ilişkili başlıca araşidonik asit ürünleri ve hastalık patogenezindeki etkileri.	9
Şekil 2.4. Platelet aktivasyonu	14
Şekil 2.5. Platelet-nötrofil kümeleşmesi	16
Şekil 3.1. Akış Sitometri Deney Düzeneği	28
Şekil 3.2. Deney protokolünün 1. ana basamağı.	29
Şekil 3.3. ELISA Deney Düzeneği.	32
Şekil 3.4. uLTE4 Plaka Düzeneği.....	34
Şekil 4.1. sP-selektin ELISA deneyine ait standart grafik.....	39
Şekil 4.2. Çalışma gruplarındaki sP-selektin molekülünün seviyeleri.	39
Şekil 4.3. CD40L ELISA deneyine ait standart grafik.....	40
Şekil 4.4. Çalışma gruplarındaki CD40L molekülünün seviyeleri	41
Şekil 4.5. PF4 ELISA deneyine ait standart grafik.	42
Şekil 4.6. Çalışma gruplarındaki PF4 molekülünün seviyeleri.	43
Şekil 4.7. RANTES ELISA deneyine ait standart grafik	44
Şekil 4.8. Çalışma gruplarındaki RANTES molekülünün seviyeleri.....	44
Şekil 4.9. PAF ELISA deneyine ait standart grafik.	45
Şekil 4.10. Çalışma gruplarındaki PAF molekülünün seviyeleri	46
Şekil 4.11. TXA2 ELISA deneyine ait standart grafiği.....	47
Şekil 4.12. Çalışma gruplarındaki TXA2 molekülünün seviyeleri	47
Şekil 4.13. PGD2 ELISA deneyine ait standart grafiği.....	48
Şekil 4.14. Çalışma gruplarındaki PGD2 molekülünün seviyeleri.....	49
Şekil 4.15. PGE2 ELISA deneyine ait standart grafik.	50
Şekil 4.16. Çalışma gruplarındaki PGE2 molekülünün seviyeleri.	50
Şekil 4.17. Üriner LTE4 ELISA deneyine ait standart grafik.....	51
Şekil 4.18. Çalışma gruplarındaki uLTE4 molekülünün seviyeleri.....	52
Şekil 4.19. 12-HETE ELISA deneyine ait standart grafik.....	53
Şekil 4.20. Çalışma gruplarındaki 12-HETE molekülünün seviyeleri.....	53
Şekil 4.21. Kapılama stratejisi ve gruplara ait temsili analiz sonuçları	55
Şekil 4.22. (A) Gruplara ait temsili histogram sonuçları (B) Tüm katılımcılara ait platelet-nötrofil kümelerinin (CD61+CD62P+) yüzde sonuçları.....	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 2.1. N-ERD ile ilişkili platelet mediyatörler.....	18
Tablo 3.1. Antikor Listesi.....	27
Tablo 4.1. Çalışma gruplarının popülasyon karakteristiği çizelgesi.	36
Tablo 4.2. SF-36 ve SNOT-22 anket sonuçları.....	37
Tablo 4.3. N-ERD patogenezi ile ilişkili olduğu düşünülen moleküllerin ELISA analiz sonuçları	38
Tablo 4.4. Tüm katılımcılar arasında platelet-nötrofil kümelerinin N-ERD ile ilişkili moleküllerin seviyeleri ile korelasyonu.....	57
Tablo 4.5. N-ERD (AD+) hastalarında N-ERD ile ilişkili moleküllerin korelasyonu	58
Tablo 4.6. N-ERD (AD-) hastalarında N-ERD ile ilişkili moleküllerin korelasyonu	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

$\omega 6$	Omega-6 yağ asidi
α	Alfa
mg	Miligram
g	Göreceli santrifüj kuvveti
°C	Derece santigrat
μL	Mikrolitre
pg	Pikogram
mg Cr	Miligram kreatinin
ng	Nanogram
nm	Nanometre
χ^2	Ki-kare
IU	Uluslararası ünite

Kısaltmalar

N-ERD	Nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlarla alevlenen hava yolu hastalığı
ASA	Asetilsalisilik asit
NSAİİ	Nonsteroid anti-inflamatuvar ilaç
EAACI	Avrupa Alerji ve Klinik İmmünoloji Akademisi
ENDA	Avrupa İlaç Alerji Ağı
KRS	Kronik rinosinüzit
AERD	Aspirin ile alevlenen solunum yolu hastalığı
KHES	Kronik hiperplastik eozinofilik sinüzit
CysLT	Sisteinil lökotrien

LTE4	Lökotrien E4
ATA	Aspirine Toleranslı Astım
AA	Araşidonik asit
5-LO	5-Lipoksijenaz
PGD2	Prostaglandin D2
PGE2	Prostaglandin E2
COX-1	Siklooksijenaz-1
COX-2	Siklooksijenaz-2
PGF2α	Prostaglandin F2 α
TXA2	Tromboksan A2
TXB2	Tromboksan A2
PGI2	Prostasiklin
mPGES-1	Mikrozomal PGE2 sentaz 1
LTC4S	Lökotrien C4 Sentaz
CYP450	Sitokrom P450
15-HETE	15-hidroksieikosatetraenoik asit
12-HETE	12-hidroksieikosatetraenoik asit
20-HETE	20-hidroksieikosatetraenoik asit
CD62P	P-selektin
PAF	Platelet aktive edici faktör
PF4	Platelet faktör 4
RANTES	Kemokin ligand 5
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
CD40L	CD40 Ligand

1. GİRİŞ

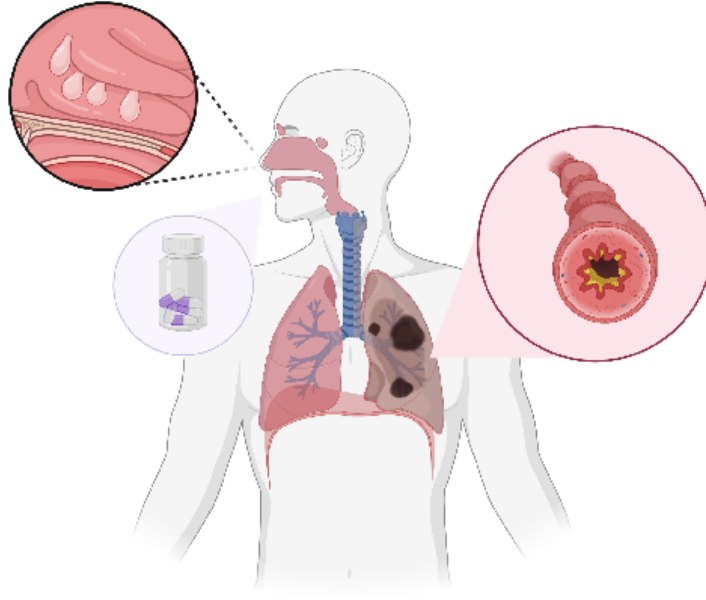
Nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlarla alevlenen hava yolu hastalığı (N-ERD), astım ve nazal polip oluşumu gözlenen hastalarda, aspirin ve diğer seçici nonsteroid anti-inflamatuvar ilaç alımı sonrasında ağır semptomlara neden olmasıyla bilinen bir hava yolu hastalığıdır. Toplum genelinde görülme sıklığına yönelik kesin veri bulunmamakla birlikte, güncel yapılan çalışmalarda N-ERD görülme sıklığının ağır astımlı hastalarda %15 iken erişkin astım hastalarında %7 olduğu bildirilmiştir. N-ERD patogenezinin altında yatan moleküler mekanizmalar kesin olarak bilinmemekle birlikte, hastalığın belirtilerine neden olan ve N-ERD biyobelirteçleri olarak kabul edilen bir dizi lipid mediyatör tanımlanmıştır. Bu biyobelirteçler arasında başlıca, sisteinil lökotrienler (CysLT) yer almaktadır. Buna ek olarak, pro-inflamatuvar olarak bilinen prostaglandin D2 seviyesinde artış gözlenirken, siklooksijenaz (COX-1) ürünü olan ve anti-inflamatuvar etkisi bilinen prostaglandin E2'nin oldukça düşük seviyelere düşmesi N-ERD patogenezinin en bilinen özelliklerindedir. N-ERD'in belirtilerine sebep olan moleküler mekanizmalarındaki diğer bir bilinmez ise; plateletlerin normal olmayan hücre fonksiyonları göstererek hastalık patogenezine etki etmeleridir. N-ERD'de plateletlerin ürettiği oldukları yüzey reseptörleri aracılığı ile lökositlere bağlanarak küme oluşturdukları ve oluşan kümeler sayesinde plateletlerin tek başlarına gerçekleştiremediği sisteinil lökotrien üretimine katkıda bulunduğu bildirilmiştir.

Günümüzde N-ERD hastalığı için kalıcı bir tedavi henüz bulunamamıştır. Ancak, aspirin desensitizasyon tedavisi, CysLT üretimi ile karakterize bir astım fenotipi olan N-ERD hastalığı için mevcut bir tedavidir. Ancak, aspirin desensitizasyonu ve günlük yüksek doz aspirin uygulaması N-ERD'li çoğu hasta için faydalı görünse de tüm hastalar için uygun bir tedavi değildir ve birçok hasta semptomları için birden fazla ilaca gereksinim duymaktadır. N-ERD hastalarına uygulanan aspirin desensitizasyon tedavisinin platelet-lökosit kümeleşmesine etkisi ve bu etkinin hastalık patogenezine katkısı tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle, N-ERD patofizyolojisinde platelet-lökosit kümelerini hedef alan anti-platelet tedavilerin geliştirilmesinin bu hastalar üzerinde etkili olacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. N-ERD (Nonsteroid Anti-İnflamatuvar İlaçlarla Alevlenen Hava Yolu Hastalığı)

Aspirin (asetilsalisilik asit-ASA) ve Nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ'ler) dünya çapında en sık reçete edilen ilaçlar olup, toplum genelinde bu ilaçlara karşı aşırı duyarlılık reaksiyonları görülmektedir [1]. Nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçların neden olduğu aşırı duyarlılık reaksiyonları, Avrupa Alerji ve Klinik İmmünoloji Akademisi (EAACI) ve Avrupa İlaç Alerji Ağı (ENDA) tarafından sınıflandırılmıştır. Sınıflandırmanın "Farmakolojik reaksiyonlar" kategorisinde yer alan Nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlarla alevlenen hava yolu hastalığı (N-ERD); NSAİİ aşırı duyarlılık reaksiyonlarından en önemli fenotipe sahip olanıdır [2]. N-ERD, orta/ağır astım ve nazal polip oluşumu gözlenen kronik rinosinüziti (KRS) olan hastalarda, aspirin ve diğer seçici NSAİİ alımı sonrası ağır klinik belirtiler gösteren heterojen bir hastalıktır (Şekil 2.1) [3]. Başlangıçta "aspirin ile indüklenen astım" olarak bilinen N-ERD, 1967 yılında Samter ve Beers tarafından üç klinik belirtiyi (astım, aspirin duyarlılığı ve nazal polip) içine alarak "Samter üçlüsü" adıyla literatüre girmiştir [4]. Ayrıca, aspirin ile alevlenen solunum yolu hastalığı (AERD) terimi de günümüzde sıklıkla tercih edilmektedir [5].



Şekil 2.1. N-ERD hastalığının şematik gösterimi. Biorender uygulaması kullanılarak çizilmiştir (biorender.com).

2.1.1. Klinik

Samter'in üçlüsü olarak bilinen N-ERD; sinüslerin mukozal şişmesine bağlı nazal polip oluşumu, astım ve NSAİİ duyarlılığı ile karakterize olan bir hastalıktır [5]. Hastalık erişkin dönemde ortaya çıkmakla birlikte semptomlar zaman içinde gelişerek kendini göstermektedir. N-ERD'li hastalarda ortaya çıkan ilk klinik bulgu; burun akıntısı, burun tıkanıklığı, hapşırma ve hipozmi/anozmi (koku alma duyusunun azalması/tamamen kaybolması) semptomlarını gösteren kronik rinittir [6]. Kronik rinit hastaların %99'unda görülebilen yaygın bir bulgu olarak kendini gösterir. Hastalar daha sonra kronik hiperplastik eozinofilik sinüzite (KHES) doğru ilerleme göstermektedir [6][7]. N-ERD'deki kronik rinosinüzit; tipik olarak nazal polipli KRS ve nazal polipleri olmayan KRS olarak sınıflandırılmaktadır [8]. N-ERD, nazal polipli KRS endotiplerine dahil edilmektedir [9]. Nazal polip gelişimi kesin olarak bilinmemekle birlikte cerrahi işlem sonrası dahi tekrar etmesi bakımından sürekli olarak ameliyat ihtiyacı gerektirmektedir [10]. N-ERD hastaları tıbbi ve cerrahi olarak tedavi edilmesi zor olan şiddetli sinüs hastalığına sahiptir [4]. N-ERD hastalığının diğer klinik bulgularından olan astım varlığı kronik rinitin başlamasından ortalama 2 yıl sonra, ASA/NSAİİ duyarlılığı ise 4 yıl sonra ortaya çıkabilmektedir. Bununla birlikte yapılan çalışmalar NSAİİ duyarlılığının hastalığın seyrinde herhangi bir zaman diliminde ortaya çıkabileceğini de göstermektedir [6]. Astım, kronik ilerleyici hava yolu inflamasyonu ile karakterize çeşitli fenotipleri ve endotipleri olan karmaşık bir hastalıktır [11]. Astım endotiplerini tanımlayan çoğu çalışmada N-ERD bağımsız bir endotip olarak tanımlanmıştır [12]. Bu nedenle N-ERD, astımın spesifik bir endotipidir. Ayrıca, N-ERD'li tüm hastalara şiddetli/ağır astımın eşlik etmediği ve klinik seyrinin de değişken olduğu bildirilmiştir [13].

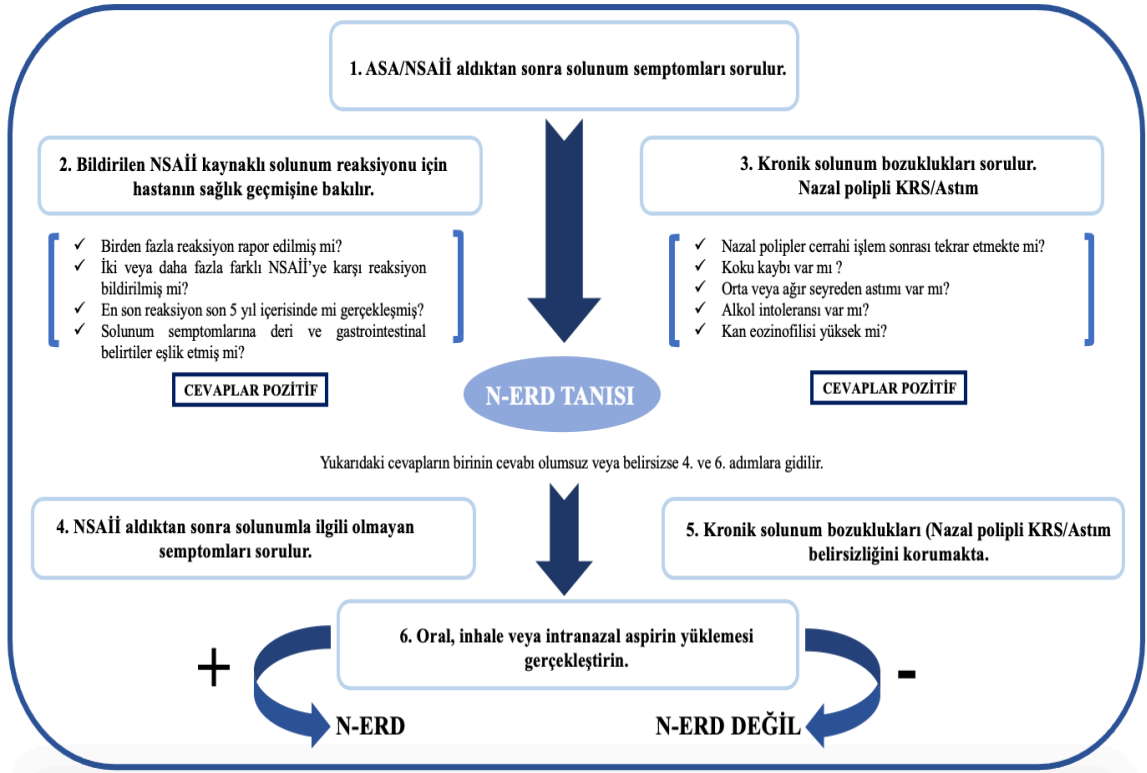
N-ERD'li hastalarda NSAİİ alımından sonraki ilk 30 ila 120 dakika içerisinde belirleyici solunum reaksiyonları gözlenir. Genel olarak üst solunum yollarında burun tıkanıklığı, burun akıntısı, hapşırma gibi reaksiyonlar görülürken alt solunum yollarında ise öksürük, hırıltı, göğüs sıkışması reaksiyonları görülmektedir [14]. Solunum reaksiyonlarına ek olarak, N-ERD'li hastaların yaklaşık üçte biri bu reaksiyonlar sırasında karın ağrısı, mide bulantısı ve ishal gibi gastrointestinal belirtiler gösterirken, distal ekstremitelerde kızarma veya kaşıntılı döküntü (ürtiker) gibi kutanöz belirtiler de geliştirebilmektedirler [5][14]. Son çalışmalar, N-ERD'li hastaların yaklaşık %20'sinde karakteristik kaşıntılı döküntü gelişebildiğini bildirmiştir [15]. Yapılan çalışmalar, N-ERD'in kadınlarda (orta yaş başlangıçlı) ve atopik olmayan hastalarda daha yaygın olduğunu göstermektedir [16].

Bunlara ek olarak, N-ERD'li hastaların %1-2'sinde aile bireylerinin de bu hastalığı taşıdığı bildirilmiştir [17].

Tanı sonrasında hastaların yaşam kaliteleri üzerine yapılan bir araştırmada N-ERD hastalarının %70'inden fazlasında hastalığın orta derecede olumsuz bir etkisi olduğu bildirilmiştir [4]. Yaşam kalitesinin düşmesine neden olan hastalık belirtileri arasında kronik rinit semptomlarının daha etkili olduğu söylenmektedir. Özellikle hipozmi/anozmi, N-ERD'li hastalarda yaşam kalitesinin düşmesine yol açan en önemli semptom olarak tanımlanmıştır [18]. Ek bir klinik bulgu olarak, alkollü içeceklerin tüketiminin N-ERD hastalarının %83'ünde üst ve/veya alt solunum yolu semptomlarını tetiklediği gözlemlenmiştir [19]. Ayrıca, bu durumun belirli bir alkol türüne özgü olmadığı bildirilmiştir [20]. Bu reaksiyonların altında yatan mekanizma henüz anlaşılmamış olsa da astımlı ve nazal polipli hastalarda alkol alımına bağlı solunum reaksiyonları öyküsünün N-ERD tanısına yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

2.1.2. Tanı

N-ERD teşhisi temelde hastanın sağlık geçmişi ile ilişkilendirilerek saptanmaktadır. N-ERD hastalığının tanısı, astım ve nazal polip oluşumu gözlenen hastada ASA/NSAİİ duyarlılığı onaylandıktan sonra yapılabilir. Ancak kesin bir sağlık geçmişi olmayan hastalarda (hasta tüm kriterleri karşılamıyorsa veya tanıda şüphe varsa), ASA/NSAİİ duyarlılığını doğrulamak veya dışlamak için oral, inhale veya intranasal olmak üzere üç tip aspirin yükleme/provokasyon testleri gerçekleştirilmelidir [21]. Aspirin yükleme testleri, N-ERD teşhisi için altın standart olarak kabul edilmektedir [22]. Hastalığa ait klinik tanı tablosu ayrıntılı olarak Şekil 2.2'te verilmiştir.



Şekil 2.2. N-ERD Klinik Tanı Tablosu [21] (Kaynağından Türkçeleştirilmiştir).

Klinik tanının yanı sıra N-ERD hastalığı için *in vitro* çalışmalar da yapılmaktadır. Ancak günümüzde N-ERD tanısı için doğrulanmış, mevcut ve güvenilir *in vitro* testler bulunmamaktadır [20]. N-ERD'li hastaların en belirgin özelliklerinden biri artmış sisteinil lökotrien (CysLT) miktarına sahip olmalarıdır. Bu nedenle CysLT'lerin tespiti N-ERD hastalarında tanı amaçlı kullanılmaktadır [23]. Lökotrien E4 (LTE4), sisteinil lökotrienlerde en son metabolize edilen mediyatör olup stabil bir şekilde idrara salınır. Bu sebeple bir biyobelirteç olarak kullanıma uygundur [24]. LTE4'ün (idrarda), N-ERD teşhisi için en güvenilir biyobelirteç olduğu bilinmektedir. Birçok çalışma, N-ERD'li hastaların başlangıçtaki üriner (idrarda) LTE4 seviyelerinin daha yüksek olduğunu ve aynı zamanda ASA/NSAİİ maruziyetinden sonra ATA (Aspirin Toleranslı Astımı olan hasta grubu) hastalarına göre idrar LTE4 seviyelerini daha fazla arttırdığını göstermiştir [25]. Üriner LTE4, sadece N-ERD ve ATA hastaları arasında ayırım yapmak için değil, aynı zamanda hastalığın prognozu için de kullanılabilir [26]. Ancak, sisteinil lökotrien yükselmelerine yol açabilecek başka hastalıkların olması N-ERD için LTE4 tespitinin tanısal duyarlılık ve özgüllük için yeterli olmadığını göstermektedir [27].

2.2. N-ERD Görülme Sıklığı

Toplumun genelinde veya astımlı hastalar arasında görülme sıklığına yönelik kesin bir veri bulunmamakla birlikte; N-ERD görülme sıklığı erişkin astımlı hastalarda ortalama %7 iken ağır astımlı hastalarda %15 olarak bildirilmiştir [28]. Bununla birlikte nazal polipozisli hastalarda %10, kronik rinosinüzitli hastalarda %9 ve genel popülasyonda %0,6-%2,5 olduğu tahmin edilmektedir [29]. Hastalığın farkındalığının özellikle klinisyenler arasında da düşük olması nedeniyle görülme sıklığına yönelik bildirilen veriler kesinlik taşımamaktadır [4]. Bu durumda sonradan tanı alan bir hastalık olan N-ERD, geç çocukluk ile yetişkinlik sırasında herhangi bir zamanda ortaya çıkabilmektedir [30]. N-ERD semptomlarının başlangıcı ile tanı yaşı arasında neredeyse 10 yıllık bir farkın olması, daha sonrasında gelişen ASA/NSAİİ duyarlılığının tanısının da gecikmesine yol açmaktadır [31]. Bunlara ek olarak, N-ERD bir yetişkin hastalığı olarak kabul edilse de, mevcut bir çalışmada çocuklarda N-ERD görülme sıklığı aspirin yükleme testi ile %5 olarak belirlenmiştir [32].

2.3. N-ERD Patogenezi

N-ERD patogenezinin altında yatan moleküler ve hücrel mekanizmalar kesin olarak bilinmemektedir. Ancak, hastalığın semptomlarına neden olan ve N-ERD biyobelirteçleri olarak kabul edilen bir dizi bronkokonstriktif (bronşların daralması) özellikte lipid mediyatör tanımlanmıştır. Bu biyobelirteçler arasında güçlü lipid mediyatörleri sınıfından olan CysLT yer almaktadır. Araşidonik asitin (AA) 5-Lipoksijenaz (5-LO) enzimi ile metabolize edilmesi sonucunda oluşan CysLT'lerin üretiminin yüksek seviyelerde olması N-ERD hastalığının ilk ve en temel özelliklerinden biridir [33]. Bu mediyatörlerin en önemli görevleri arasında; Th2 tip sitokin üretimini ve epitel hücrelerde mukus salgılanmasını arttırmak, hava yolu düz kas hücrelerinde hiperplaziye neden olmak ve damar geçirgenliğinin artmasına ek olarak kemotaktik özellikleri sayesinde eozinofil hücrelerinin inflamasyonlu bölgeye göç etmesini indüklemek sayılabilmektedir [34]. Yapılan araştırmalar ile N-ERD hastalarının sinonazal doku örneklerinde ATA hastalarına kıyasla CysLT seviyelerinde önemli artışlar kaydedilmiştir [35]. Sistemik CysLT üretiminin bir belirteci olan üriner LTE4 seviyeleri, ATA hastalarına göre N-ERD'li hastalarda başlangıçta 3 ila 5 kat daha yüksek olmakla birlikte; bu seviyeler ASA/NSAİİ alımından sonra 100 kata kadar artabilmektedir [36].

N-ERD patogenezinde önemli olduğu belirtilen diğer bir lipid mediyatörü olan Prostaglandin D2 (PGD2), pro-inflamatuvar özellik sergileyerek N-ERD hastalığında ciddi artış göstermektedir [37]. PGD2, D prostanoit 2 (DP2) olarak bilinen kemokin reseptör homolog molekülü (CRTH2) üzerinden etkisini göstererek bazofiller, eozinofiller, Th2 hücreleri ve tip 2 doğuştan gelen lenfoid hücrelere (ILC2) karşı kemotaktik özellikte bulunmaktadır [38]. PGD2 ve metabolitlerinin plazma başlangıç düzeyleri, ATA hastalarına kıyasla N-ERD hasta grubunda daha yüksek bulunmakla birlikte ASA/NSAİİ alımından sonra bu düzeyler N-ERD hastalarında daha fazla artmaktadır [39]. Ayrıca, PGD2'nin astım hastalarında bronkokonstriksiyona sebebiyet verdiği ve sağlıklı kontrollere göre astımlı hastaların PGD2 ve metabolitlerine karşı daha duyarlı olduğu gösterilmiştir [40]. N-ERD hastalığında PGD2'nin inflamasyon tetikleyici özelliklerine ek olarak vazodilatasyona (damar genişletici etki) ve bronşiyal kasılmaya neden olduğu bilinmektedir [41]. Bunlara ek olarak PGD2'nin indüklenmiş balgamda önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir [42]. Ancak, bilinen özelliklerine rağmen PGD2 mediyatörünün N-ERD hastalığındaki fonksiyonu tam olarak açığa çıkarılamamıştır [40].

Araşidonik asit türevli bir başka lipid mediyatörü olan PGE2'nin ise N-ERD hastalığında kritik seviyelere düştüğü bilinmektedir [43]. Astımlı ve N-ERD hastalarında yapılan çalışmalarda PGE2, E prostanoit 2 (EP2) reseptörü aracılığıyla inflamasyonu baskılayan etki göstermektedir [44]. Fonksiyonel çalışmalar, EP2 reseptörünün bronkodilatasyonda (bronşların genişlemesi) ve anti-inflamatuvar süreçlerde rol aldığını bildirmiştir [45]. Ancak, N-ERD hastalarında PGE2 üretiminde ve PGE2/EP2 sinyalleşmesinde bozukluklar olduğu bilinmektedir [33]. Bunun yanı sıra yetersiz üretilen PGE2'nin, 15 prostaglandin dehidrojenazın (15-PGDH) aşırı ifadesi ile aktif olmayan ürünlere metabolize edildiği ve bu sebeple miktarının azaldığı bilinmektedir [34].

2.3.1. İnflamatuvar Hücrelerin N-ERD ile İlişkisi

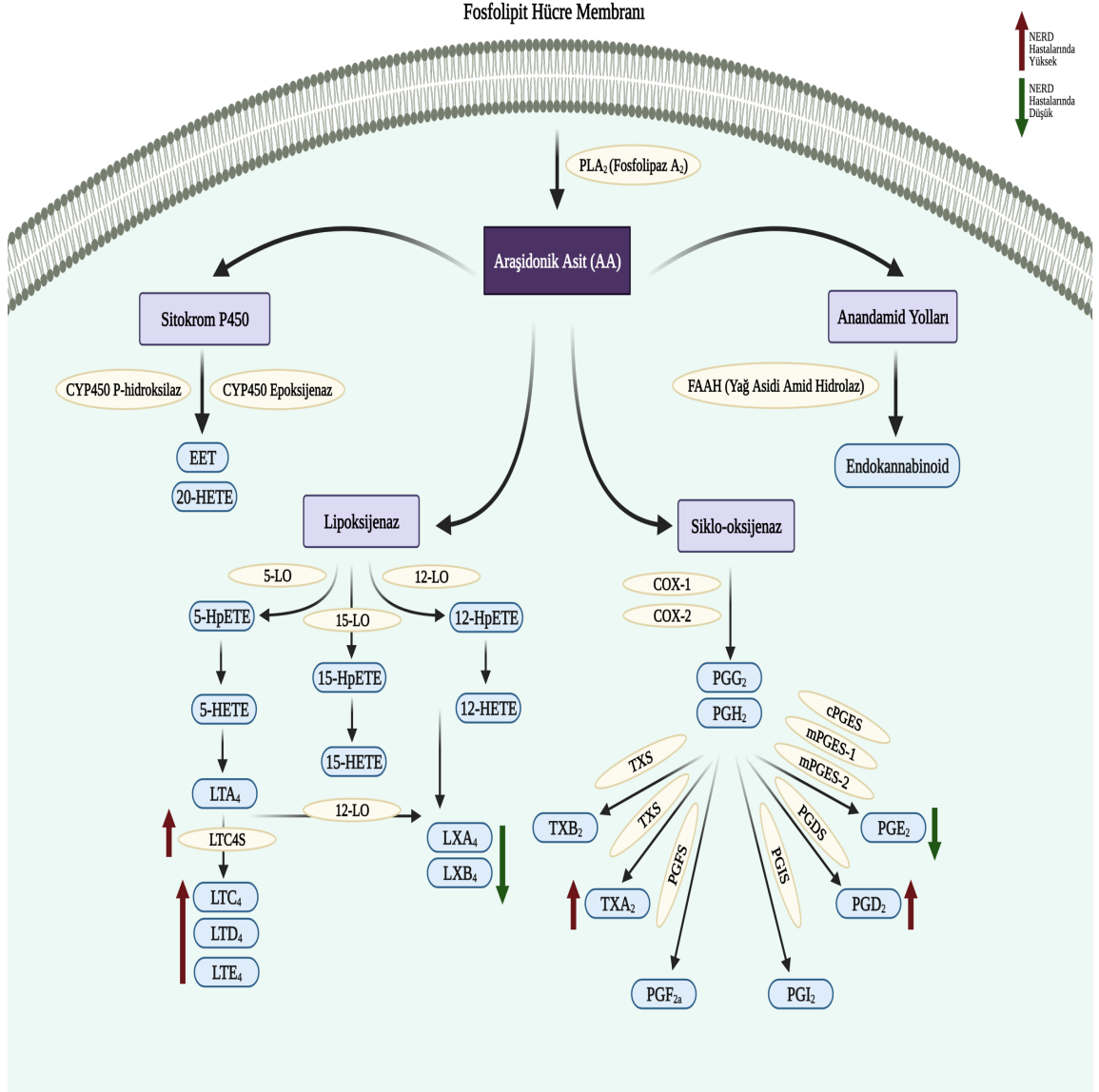
N-ERD'deki hücresel patofizyolojik mekanizma, Th2 bağışıklığının eozinofilik astım fenotipini düzenlediği yoğun bir eozinofilik inflamasyonu içermektedir. Çeşitli çalışmalar N-ERD hastalığını, yetişkin başlangıçlı eozinofilik astım ile temsil edilen fenotiplerle karakterize etmektedir. Bu nedenle balgam ve kan eozinofil sayıları, hava yolu eozinofilik inflamasyonun astım fenotipinin tespiti için öneme sahiptir [46]. Ancak, balgam ve kan eozinofil sayılarının N-ERD'nin doğrudan tanısal biyobelirteçleri olarak kullanılması zordur. Th2 bağışıklığının tüm aracılıları arasında, N-ERD ile en çok ilişkili olan biyobelirteç periostindir. Periostin, astımlı hava yolunun inflamasyonunu ve yeniden

şekillenmesini düzenlediği bilinen bir hücre dışı matris proteindir [47]. Yapılan bir çalışma ile, serum periostinin N-ERD için yararlı bir biyobelirteç olduğu ve kan/balgam eozinofilisi ve astım şiddetinin bir tanımlayıcısı olarak kullanılabileceği gösterilmiştir [48].

N-ERD ağırlıklı olarak belirgin doku eozinofilisi, aktif mast hücreleri, ILC2'ler, platelet-lökosit kümeleri ve düzensiz lipid mediyatör üretimi ile karakterize edilen bir tip 2 inflamatuvar hastalıktır. ILC2'ler nazal polip dokusunda bol miktarda bulunur ve mast hücreleri ile birlikte IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi tip 2 sitokinler üretirler. IL-4 ve IL-13, doku fibrozu, hava yolu yeniden şekillenmesi, goblet hücre hiperplazisi, mukus üretimi ve mast hücre aktivasyonu dahil olmak üzere bir dizi etkiyi gerçekleştirmektedir. IL-5, eozinofillerin aktivasyonu için gerekli olmakla birlikte N-ERD'li hastaların nazal polip dokusunda ifade olmaktadır [49]. N-ERD patogenezinde katkıda bulunan bu hücresel araçların mekanizmaları tam olarak açıklanamamakla birlikte inflamatuvar yanıtı düzenlemede kritik bir rol oynadıkları düşünülmektedir. Bunlara ek olarak bazofil hücreleri de güçlü tip 2 efektör hücrelerdir ancak N-ERD patofizyolojisine katkıları halen belirsizliğini korumaktadır [50].

2.3.2. Araşidonik Asit Metabolizması ve N-ERD

Çoklu doymamış yağ asidi (ω 6 serisi) olan 20 karbonlu araşidonik asit, homeostaz, inflamasyon ve immünregülasyonda görev almaktadır [34]. AA, membran fosfolipidlerinden salındıktan sonra siklooksijenazlar (COX1 ve COX2), lipoksijenazlar (5-LO, 15-LO ve 12-LO), sitokrom oksidazlar (Sitokrom P450/epoksijenaz) ve anandamid yolları (hidrolaz) olmak üzere 4 yolağa ayrılmaktadır. N-ERD hastalığı ile ilişkili araşidonik asit ürünlerinin yer aldığı şematik tablo Şekil 2.3'te yer almaktadır.



Şekil 2.3. N-ERD ile ilişkili başlıca araşidonik asit ürünleri ve hastalık patogenezindeki etkileri. Biorender uygulaması kullanılarak çizilmiştir (biorender.com).

Siklooksijenazlar, aynı zamanda sikloendoperoksidaz H sentaz olarak bilinir ve araşidonik asitin prostaglandinlere, prostasiklinlere ve tromboksanlara metabolize edilmesinde hız sınırlayıcı adımı katalize etmekten sorumludur [51]. Literatür çalışmaları, PTGS1 ve PTGS2 genlerinin ürünleri olan COX1 ve COX2 olmak üzere iki COX izoformu olduğunu göstermektedir [52]. COX1 enzimi hemen hemen tüm dokular tarafından ifade edilen kontrol ‘housekeeping’ gen ürünü iken, COX2 sadece inflamasyon ve tümörjenez (tümör gelişimi) gibi belirli uyaranlara yanıt sonrası ifade edilmektedir [34]. Serbest AA, COX1 ve COX2 enzimleri aracılığıyla prostaglandin E2 (PGE2), prostaglandin D2 (PGD2), prostaglandin F2 α (PGF2 α), tromboksan A2 (TXA2), tromboksan B2 (TXB2) ve prostasiklin (PGI2)’ye metabolize edilmektedir.

N-ERD hastalarında ASA ve NSAİİ'nin düşük dozları dahi COX1 enzimini kalıcı bir şekilde inhibe etmektedir [53]. Bunlara ek olarak spesifik COX2 inhibitörleri kullanımının N-ERD'li hasta profilinde solunum reaksiyonlarına neden olmadığı belirtilmiştir [5]. N-ERD'de PGE2 üretimi COX2 enzim yolağı baskılandığı için COX1 bağımlı olarak gerçekleşmektedir. Bu nedenle N-ERD hastalarının nazal mukozalarında COX2 ifadesinin azaldığı bildirilmiştir [28]. Araştırmacılar, sağlıklı kişilere aspirin verdiklerinde COX1'in inhibe olduğunu ancak PGE2 üretiminin aspirine dirençli COX2 enzimi aracılığıyla gerçekleştiğini bulmuşlardır. Bu nedenle sağlıklı kişilerde güçlü bir inflamatuvar yanıt gözlemlenmemiştir. Bunun aksine N-ERD hastalarında aynı aspirinin neden olduğu COX1 inhibisyonu PGE2 seviyelerinde önemli bir düşüşle sonuçlanmaktadır [28]. PGE2 temelde COX2 ve ortak terminal sentetik enzim olan mikrozomal PGE2 sentaz 1 (mPGES-1) tarafından üretilir. Bu enzimler, epitel hücreleri, fibroblastlar ve makrofaj hücreleri ile birlikte ifade edilmektedir [33]. N-ERD'li hastaların solunum dokularında PGE2 üretiminin ve COX2/mPGES-1 işlevinin bozulduğuna dair sonuçlar bildirilmiştir. Bu bozukluğun sebebi olarak eozinofilik inflamasyon, mast hücre aktivasyonu ve PGE2 üretimini sağlamak için COX1'e olan bağımlılık gösterilmiştir [33].

PGD2 mediyatörü, DP1 ve DP2/CRTH2 olmak üzere 2 reseptör aracılığıyla sinyal vermektedir. DP1 reseptörü hava yollarında bulunan dendritik hücrelerde, T hücrelerinde, bazofillerde, eozinofillerde ve mukus salgılayan goblet hücrelerinde bulunmaktadır. DP2 reseptörünün ifadesi ise hava yollarındaki T hücreleri, ILC2'ler, mast hücreleri, bazofiller ve eozinofiller gibi hematopoetik hücrelerde hem de epitel hücreleri ve düz kas hücreleri gibi yapısal hücrelerde gözlemlenmiştir [54]. N-ERD patogeneğinde DP2 reseptörü aracılığıyla etki gösteren PGD2, mast hücrelerinin başlıca COX ürünüdür [33]. PGD2'nin N-ERD hastalığındaki rolünü inceleyen bir çalışma, şiddetli hava yolu reaksiyonlarının PGD2 üretimi ile ilişkili olduğunu ve PGD2 üretimini engellemek için yüksek doz aspirin tedavisinin kullanılabileceğini göstermiştir [40]. Ayrıca, N-ERD hastalarına intravenöz olarak uygulanan PGI2 enjeksiyonu, aspirin ile maruziyetten sonra hava yolu reaksiyonlarını önlemede etkisiz kalmıştır [54].

AA metabolitlerinden TXA2 ise ağırlıklı olarak plateletler, nötrofiller, monositler, makrofajlar ve akciğer parankim hücreleri tarafından üretilmektedir [55]. TXA2'nin astımlı hastalarda bronşiyal daralmaya sebebiyet verdiği bilinmektedir [54]. TXA2 metabolitleri, ATA hastalarına kıyasla N-ERD'li hastaların başlangıç bronkoalveolar

lavaj (BAL) sıvılarında daha yüksek seviyede bulunmuştur. Bu sebeple TXA2'nin, potansiyel olarak solunum dokularında platelet hücrelerinin varlığını gösterdiği bildirilmiştir [33].

N-ERD patogenezindeki kalıcı COX1 inhibisyonu araşidonik asit metabolizmasını PGE2 üretiminin daha fazla azalmasıyla sonuçlanan 5-lipoksijenaz yönüne kaydırarak güçlü lipid mediyatörleri sınıfından olan CysLT'lerin aşırı artmasına neden olmaktadır (Şekil 2.3) [56]. Lökositlerde (nötrofiller, monositler, eozinofiller, mast hücreleri ve bazofiller) araşidonik asit kararsız ara ürün olan lökotrien A4'ü (LTA4) oluşturmak üzere 5-LO tarafından oksitlenir ve [57] daha sonra araşidonik asit, 5-LO enzimi ile ara basamaklar sonrası LTC4 Sentaz (LTC4S) enzimi ile lökotrien C4'e (LTC4) çevrilir ve son olarak en kararlı hali olan lökotrien E4'e (LTE4) dönüştürülür [36]. Spesifik olarak LTC4 ve LTD4'ün düz kaslarda daraltıcı etkiye neden olduğu; LTE4'ün ise bronşiyal mukozada eozinofil birikimini güçlü bir şekilde indüklediği bilinmektedir [58]. Ayrıca, bütün CysLT'lerin vasküler sızıntı, mukus üretiminde artışa, ödem ve fibroze sebebiyet vermektedir. Bu nedenle CysLT'ler, N-ERD'li hastaların solunum dokularındaki kronik inflamasyona katkıda bulunurlar [36]. N-ERD hastalarında yüksek seviyelerde bulunan CysLT'ler, CysLT reseptör 1 ve 2'ye bağlanarak inflamatuvar sinyal yollarını aktive eder ve bronşiyal daralmayı indükleyerek 5-LO ve LTC4S ifadelerinin artmasına neden olurlar [2]. Sistemik CysLT'lerin değerlendirilmesi üriner LTE4 seviyelerine bakılarak gerçekleştirilmektedir [36]. En kararlı metabolit olan LTE4'ün ATA gruplarına göre N-ERD'li hastaların idrar örneklerinde seçici ve belirgin olarak yüksek bir başlangıç seviyesi gösterdiği bulunmuştur [34]. Son dönemde yapılan çalışmalar, N-ERD hastalarındaki LTE4 metabolitinin aşırı üretiminin hava yolu mukozasındaki artan eozinofili miktarından kaynaklandığını göstermektedir [59].

Serbest araşidonik asit, COX ve 5-LO enzimatik yollarının yanı sıra sitokrom P450 (CYP450), 15-lipoksijenaz (15-LO) ve 12-lipoksijenaz (12-LO) enzim sistemlerinin dahil olduğu başka enzimatik yollar üzerinden de metabolize olabilmektedir [60]. 15-LO, insan eozinofillerinde 15-lipoksijenaz 1 enzimi ile üretilen pro-inflamatuvar araşidonik asit metabolitlerinden biridir [61]. 15-LO'nun eozinofil infiltrasyonu ve aktivasyonundaki rolü göz önüne alındığında N-ERD hastalarının üst ve alt hava yolu mukozasında eozinofil artışından ve aktivasyonundan sorumlu olabileceği rapor edilmiştir [62]. AA, 15-LO enzimi aracılığıyla 15-hidroksieikosatetraenoik asit'e (15-HETE) ve ardından 15-oksoikosatetraenoik asit'e (15-Oxo-EETE) dönüşen transmetabolik

bir süreci katalize etmektedir [63]. Eozinofil kaynaklı 15-HETE, astım hastalarında bronşiyal epitel hücreleri tarafından üretilmektedir [64]. 15-Oxo-EETE, epitelyal ve mast hücreleri arasındaki etkileşimleri içeren bir transmetabolik süreç yoluyla nazal polip dokusunda sağlıklı sinonazal dokuya kıyasla daha fazla üretilebilir [65]. Sonuç olarak, 15-Oxo-EETE sentezine yol açan 15-LO yolağı araşidonik asit metabolizmasının düzensizliğine ve N-ERD'de gözlenen artmış sinonazal hastalık şiddetine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, nazal polip dokusunda araşidonat 15-lipoksijenaz (ALOX15) gen ekspresyonu, nazal polipli KRS'li hastalarda astım varlığı ile güçlü bir şekilde ilişkilidir [66]. Güncel çalışmalar, 15-HETE ve 15-Oxo-EETE dahil olmak üzere 15-LO yolağının N-ERD'de meydana gelen inflamatuvar sürece katkıda bulunduğunu söylemektedir [66].

Araşidonik asit, 12-LO enzimatik yolağı ile son metaboliti platelet türevli olarak bilinen 12-hidroksieikosatetraenoik asit'e (12-HETE) indirgenmektedir [67]. 12-HETE, nötrofil kemotaksisinin güçlü bir aracısıdır [68]. Yapılan çalışmalarla, 12-HETE'nin platelet aktivasyonunu hem artırıcı hem de baskılayıcı etkileri olduğu bulunmuştur [69]. 12-HETE, TXA2 reseptörü ile etkileşime girerek TXA2 ile indüklenen platelet kümeleşmesini inhibe emektedir. Bu nedenle platelet ve TXA2 reseptörü, N-ERD'de meydana gelen inflamasyon için gerekli önemli faktörler olarak tanımlanmaktadır [68]. Ayrıca, aspirin uygulamasından sonra N-ERD hastalarında ve sağlıklı kontrollerde 5-HETE seviyelerinin değişmediğini ama 12-HETE seviyelerinde yükseliş olduğu saptanmıştır [70]. 12-HETE lipid mediyatörünün N-ERD patogenezinde rolü tartışmalıdır. Çünkü son yapılan sinonazal mukus örneklerindeki ultraperformans sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC-MS) sonuçları, 12-HETE'nin nazal polipli KRS hastalarına göre N-ERD hastalarında azaldığını bildirmektedir [68].

Araşidonik asitin biyoaktif ürünleri olarak bilinen eikosanoidlerinden 20-hidroksieikosatetraenoik asit (20-HETE), CYP450'ye bağımlıdır ve ağırlıklı olarak kalp, böbrek ve akciğerde bulunan bir CYP4A enzimi tarafından üretilmektedir [71]. 20-HETE'nin platelet kümeleşmesi üzerine baskılayıcı rolü vardır. Bu etkisini PGH2/TXA2 reseptörlerinin antagonist etkisi sayesinde gerçekleştirmektedir [72]. Plateletlere karşı güçlü inhibitör etkileri olduğu bilinen 20-HETE, COX1 ve 12-LO tarafından sırasıyla aktif olmayan 11,12-diHETE ve 12,20-diHETE'ye metabolize edilmektedir. Bu nedenle anti-platelet etkisinin bir nedeni olarak diHETE'lere olan metabolik dönüşüm gösterilmektedir [60]. 20-HETE'nin N-ERD patogenezindeki rolü kesin olarak

bilinmemekle birlikte; N-ERD'li hastaların sinonazal mukus örneklerinde nazal polipli KRS hastalarına göre azalmaktadır [68].

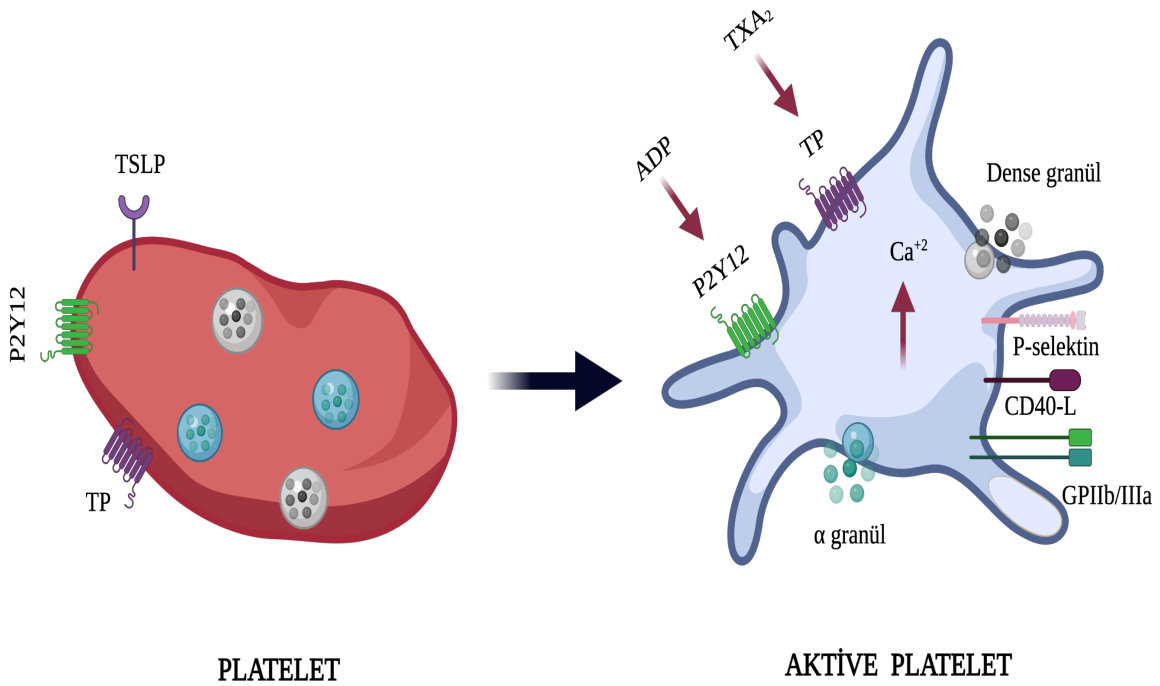
2.4. Plateletlerin N-ERD Patogenezindeki Rolü

Platelet hücreleri, bronşiyal astım dahil olmak üzere alerjik hastalıkların gelişiminde önemli bir yere sahiptir. Plateletlerin astımlı hastalarda hava yolu hiperreaktivitesine, bronkokonstriksiyona, hava yolu inflamasyonuna ve hava yolunun yeniden şekillenmesine katkıda bulunduğu dair raporlar bulunmaktadır [73]. Astımlı akciğerinden alınan doku kesitlerinde çok sayıda pulmoner megakaryosit tespit edilmiştir [74]. Astım hastalarındaki plateletler sağlıklı kontrollere kıyasla daha aktif olduğundan plateletlerin N-ERD hastalığında rol oynayabileceği düşünülmektedir [17]. Laidlaw ve arkadaşları, N-ERD'li hastaların periferik kan ve solunum yollarındaki plateletlerin spesifik olarak aktive olduğunu ve sonrasında granüositlere yapışarak kümeleştiklerini bildirmişlerdir [36]. Aktive plateletler ve granüositler arasındaki bu etkileşimin N-ERD patogenezindeki aşırı CysLT üretimine ve şiddetli eozinofilik inflamasyona yol açtığı rapor edilmiştir [73]. Hem insan hem de hayvan modelleriyle yapılan çalışmalar, platelet aktivitesinin N-ERD patofizyolojisiyle güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca, N-ERD'de meydana gelen 5-LO/LTC4S yolağının aktivitesini düzenleyen mekanizmadaki bozukluğun merkezinde platelet hücreleri gösterilmektedir [75]. Ancak son zamanlarda yapılan birkaç çalışma, plateletlerin inflamatuvar efektör hücreler olarak N-ERD'deki aşırı CysLT üretiminin bir kaynağı olarak rolünü desteklese de platelet aktivasyonunun ASA/NSAİİ kaynaklı reaksiyonların gelişiminde doğrudan bir rol oynayıp oynamadığı henüz netlik kazanmamıştır [37].

2.4.1. Platelet Aktivasyonu

Çekirdeği ve DNA'sı olmayan plateletlerin, megakaryositlerin sitoplazmik fragmentlerinden oluştuğu ve dalak tarafından uzaklaştırılmadan önce dolaşım sisteminde 8 ila 10 günlük bir yaşam süresine sahip olduğu bilinmektedir [76]. Plateletler, hasarlı damarların onarımında kritik bir rol oynamaktadır. Bu nedenle plateletlerin en temel fizyolojik görevi, damar duvarında meydana gelen hasara yanıt olarak aktive olup hasarlı kan damarı endotelinde birikerek kanın pıhtılaşma sürecini başlatmaktır. Ancak yapılan çalışmalar, plateletlerin bu klasik rollerinin yanı sıra inflamasyon ve immün yanıtta önemli işleve sahip olduğunu göstermektedir [75].

Platelet hücreleri dolaşımında pasif formda bulunurlar, ancak bakteriyel/viral enfeksiyonda, kan damarlarının hasar görmesi durumunda veya kan akışında meydana gelen bir değişiklik sonucunda endotelde meydana gelen hasarlı bölgeye doğru göç ederler. Plateletler trombin, adenosin difosfat (ADP) ve TXA₂ gibi çeşitli ajanlarla aktive olarak bölgedeki inflamatuvar hücrelerine hızlıca bağlanıp o hücrelerle küme oluşturma eğilimi gösterirler [77]. Plateletler, lökositler (beyaz kan hücreleri) ile küme oluşturduklarında, ADP ve kollajen tarafından aktive edilerek hücre içi sitoplazmik kalsiyum (Ca²⁺) miktarlarını arttırlar. Bu durum plateletin disk şeklindeki yapısını çıkıntılı (dikenli) bir küreye dönüştürür (Şekil 2.4) [78]. Bu morfolojik yapı sayesinde immün hücreler (özellikle lökositler) ile daha kolay kümeleşme gösterdiği bildirilmiştir [75].



Şekil 2.4. Platelet aktivasyonu. Biorender uygulaması kullanılarak çizilmiştir (biorender.com).

Bunlara ek olarak insan plateletlerinde yapılan çalışmalarla, fosfolipaz C aktivasyonu yoluyla kalsiyum mobilizasyonuna bağlanan ADP reseptörünün P2Y1 reseptörü olduğunu ve bu reseptörün ADP aracılı platelet şekil değişikliğinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [79]. Ayrıca, plateletler üzerinde bulunan P2Y12 reseptörü, glikoprotein IIb/IIIa reseptörünün ADP ile uyarılan aktivasyonunda rol oynayan baskın reseptördür. Glikoprotein IIb/IIIa reseptörünün aktivasyonu, artan platelet

degranülasyonu, tromboksan üretimi ve uzun süreli platelet kümeleşmesi ile sonuçlanmaktadır [80].

Aktive plateletler, aktivasyona yanıt olarak eikosanoidlere dönüşüm için membran lipidlerinden araşidonik asidi hızla serbest bırakırlar. Başlıca platelet türevli AA ürünleri olarak, 12-LO yolağına ait 12-HETE ve COX yolağına ait TXA2 ve PGD2 metabolitleri gösterilmektedir [81]. TXA2, platelet aktivasyonunu otokrin bir şekilde arttırmak için T prostanoid (TP) reseptörleri aracılığıyla sinyal göndererek lökosit alımını kolaylaştıran güçlü ve kısa ömürlü bir metabolittir [75]. Platelet türevli PGD2 ise, vazodilatasyona aracılık etmesinin yanı sıra DP1 reseptörleri aracılığıyla sinyal göndererek kümeleşme /agregasyon yanıtlarını baskılamaktadır [82]. Plateletler çekirdek içermediğinden COX2 enzimini ifade edemez ancak COX1'i ifade edebilmektedir. Bu sayede platelet türevli prostanoitleri COX1 enzimi aracılığıyla üretmektedirler. Bu nedenle aspirin gibi güçlü COX1 inhibitörleri, platelet kaynaklı prostanoitleri baskılayabilmektedir. Bu reseptörlerin baskılanmasının, N-ERD'li hastalarda ASA/NSAİİ alımından sonraki klinik belirtilerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir [75].

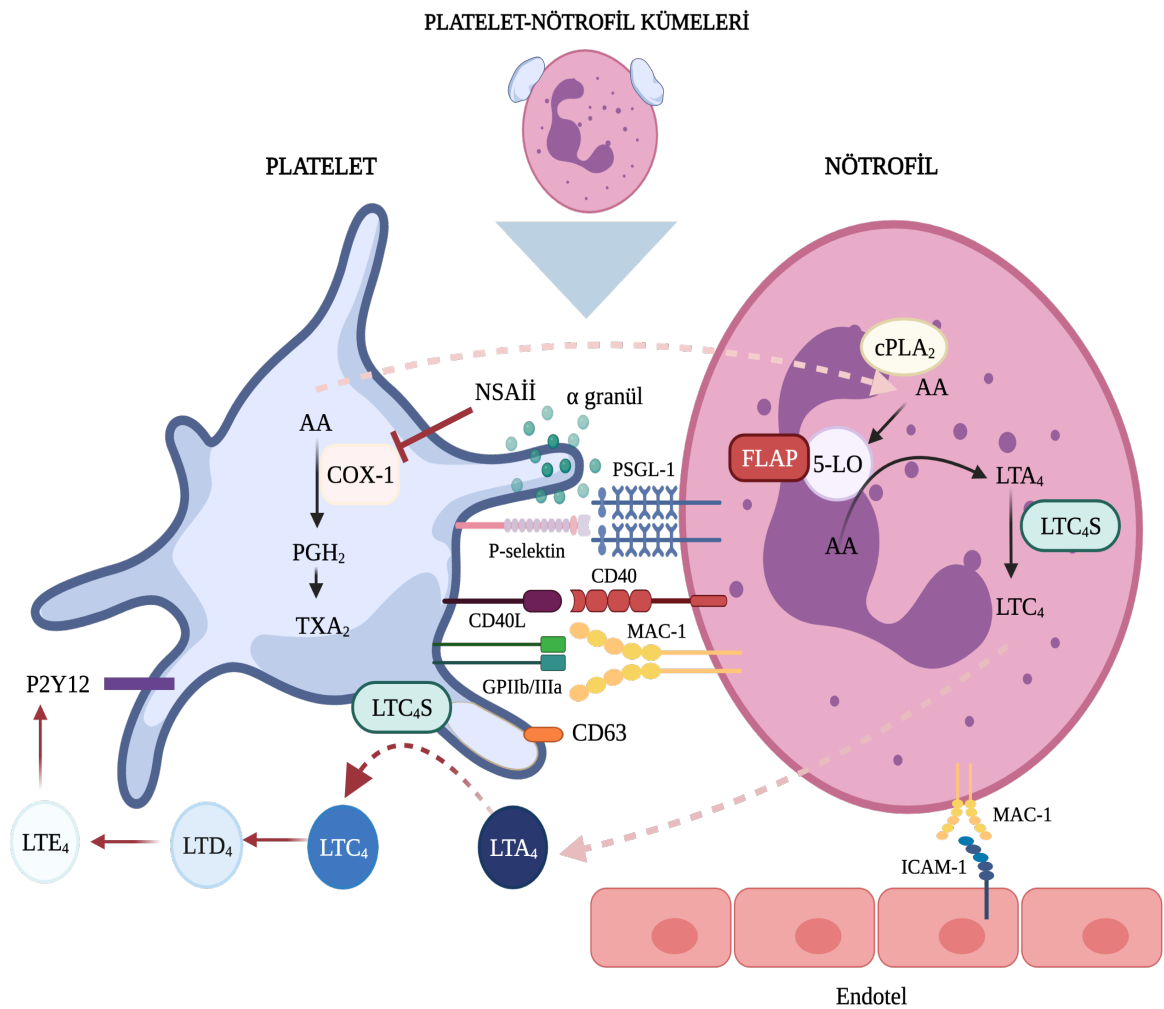
2.4.2. Platelet-Nötrofil Kümeleri

N-ERD patogeneğinde CysLT ürünlerinin ana kaynağı olarak mast hücreleri kabul edilmektedir. Buna ek olarak, yüksek miktarda LTC4S ifade eden doku eozinofilleri ve platelet-lökosit kümelerinin de ASA/NSAİİ alımı sonrası yüksek miktarda CysLT üretimine katkıda bulunduğu bildirilmiştir [17].

Plateletler aktive olduktan sonra hücre adezyon molekülü olan P-selektin'i, sitoplazmik granüllerinden hücrenin dış yüzeyindeki glikoprotein tabakasının bulunduğu ortama dağıtırlar. Bu nedenle membranda P-selektin ifadesinde meydana gelen artış platelet aktivasyonunun en önemli göstergesi olarak kabul edilmektedir [83]. Aktive plateletler, P-selektinin ligandı olan P-selektin glikoprotein ligand-1 (PSGL-1) ifade eden lökosit hücrelerine bağlanarak inflamasyon bölgesine göç ederler [84]. Plateletler, araşidonik asitin LTA4'e çevrilmesinden sorumlu olan 5-LO enzimini üretmezken; LTA4'ten LTC4 oluşumunu katalizleyen LTC4S enzimini üretebilirler [85]. Nötrofiller ise dolaşımdaki hücreler arasında 5-LO aktivitesine sahip açık ara en bol olan lökositlerdendir. Kapasitelerini aşan miktarda LTA4 enzimini üretmelerine rağmen LTA4'ü LTC4'e dönüştüremeyerek LTC4S enzimini ifade edemezler [86]. Eozinofiller, bazofiller, makrofajlar ve mast hücrelerinin hem 5-LO hem de LTC4S enzimini ifade

ederek araşidonik asitten LTC₄ oluşumunu katalizlediği ve bu sayede N-ERD'deki CysLT üretimine katkıda bulunabilecekleri gösterilmiştir [36]. Yapılan *in vivo* çalışmalar, plateletlerin metabolize edilmemiş LTA₄ enzimini nötrofillerden veya platelet ve lökosit arasında P-selektin'e bağlı bir etkileşim gerektiren bir transsellüler yolak aracılığıyla dönüştürebildiğini göstermektedir [87].

N-ERD hastalarında NSAİİ alımı sonrası aktive olan plateletler, P-selektin (CD62P) – P-selektin glikoprotein ligand 1, GPIIb / IIIa-Mac-1 ve CD40 ligand (CD40L) - CD40 aracılığı ile 5-LO enzimi bulunduran lökositlerle birleşip kümeleşmeler oluşturarak yüksek miktarda CysLT üretimine sebep olurlar (Şekil 2.5) [84].



Şekil 2.5. Platelet-nötrofil kümeleşmesi. Biorender uygulaması kullanılarak çizilmiştir (biorender.com).

Plateletler; lökositlerden eozinofil, monosit ve nötrofil ile birleşerek küme oluşturma eğilimi göstermektedirler. Monosit ve eozinofillerin tek başına CysLT üretim aktivitesinin olduğu gösterilmesine rağmen, nötrofillerin de plateletler gibi tek başına bu üretime etkisinin olmadığı ancak, bu iki hücrenin bir araya geldikten sonra CysLT üretimini arttırdıkları bilinmektedir [28]. Bu nedenle platelet-nötrofil kümelerinin N-ERD hastalarında yüksek miktarda CysLT üretimine katkıda bulunması bu durumun hastalık patogenezi açısından önemli olduğunu düşündürmektedir. Bunlara ek olarak, N-ERD hastalarında platelet-lökosit kümelerinde belirgin bir artış gözlenmektedir. N-ERD fare modellerinde yapılan bir çalışmada; platelet ve platelet-lökosit kümelerinin uzaklaştırılmasının fareleri aspirinle indüklenen hava yolu direncine ve aşırı CysLT üretimine karşı koruduğunun gösterilmesi plateletlerin N-ERD'deki önemini yansıtır niteliktedir [88].

2.4.3. N-ERD Hastalığına Etkisi Olan Platelet Mediyatörler

Plateletler, birçoğunun astım ve alerjik inflamasyonla ilişkili olması muhtemel bir dizi inflamatuvar mediyatörler üretmektedir. N-ERD hastalığı ile ilişkili platelet mediyatörler Tablo 2.1'de verilmiştir.

Histamin, TXA₂, platelet aktive edici faktör (PAF) dahil olmak üzere birçok güçlü bronkokonstriktör ajanının tamamı aktive plateletler tarafından salınmaktadır [89]. N-ERD'li hastalardan izole edilen plateletler PAF ile aktive edildiğinde sağlıklı kontrollere kıyasla hasta grubundaki plateletlerde TXB₂ salınımında önemli bir artış gözlenmiştir [90]. Platelet biyokimyasındaki farklılıkların altında yatan nedenler henüz bilinmemekle birlikte bu durumun N-ERD hastalığının ilgili bir özelliğinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Platelet faktör 4 (PF4) ise platelet aktivasyonunun bir belirteci olarak alerjik astımın antijen yükleme modellerinde çalışılmıştır. Araştırmacılar, alerjik astımlı kişilerin plazma örneklerinde PF4 seviyesinde meydana gelen artışın antijen kaynaklı erken faz sırasında oluştuğunu göstermişlerdir [91]. Ayrıca, egzersize bağlı astım ataklarından sonra plazmada PF4 düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. Bu durumun platelet proteinlerinin salınımı ile bronkokonstriksiyonun başlangıcı arasında nedensel bir ilişki olduğunu düşündürmektedir [75]. Bunlara ek olarak yapılan çalışmalarla, N-ERD'li hastaların kan örneklerinde P-selektin ve CD40 Ligand (CD40L) gibi platelet aktivasyon belirteçlerinin seviyesinin arttığı bildirilmiştir [73].

Tablo 2.1. N-ERD ile ilişkili platelet mediyatörler

MEDİYATÖR	ROLÜ
HİSTAMİN	Bronkokonstriksiyon, vazodilatasyon, eozinofil kemotaksisi, eozinofil adezyon moleküllerinin upregülasyonu [92][93].
TXA2	Bronkokonstriksiyon, platelet aktivasyonu [55].
PAF	Bronkokonstriksiyon, eozinofil kemotaksisi, plateletlerden TXA2 salınımının uyarılması, eozinofillerden LTC4 salınımının uyarılması, mast hücre aktivatörü, PAF inhalasyonu üzerine idrar LTE4'te sistemik artış [75].
PF4	Bronkokonstriksiyon, eozinofil aktivasyonu ve adezyonu, nötrofil aktivasyonu ve adezyonu, platelet aktivasyonu [94].
PGD2	Bronkokonstriksiyon, vazodilatasyon, eozinofiller, bazofiller, Th2 hücreleri ve doğal lenfoid Tip 2 hücrelerinin aktivasyonu / kemotaksisi [39].
RANTES	Eozinofil kemotaksisi ve aktivasyonu [95].
12-HETE	Nötrofil kemotaksisi, platelet aktivasyonunu azaltıcı veya arttırıcı etki [69].
20-HETE	Platelet kümeleşmesini baskılaması [72].
P-SELEKTİN	Platelet aktivasyonu, platelet-lökosit kümeleşmesi, eozinofil kemotaksisi, platelet-lökosit kümeleşmesi [96].
CD40L	Platelet aktivasyonu, platelet-lökosit kümeleşmesi [73].

2.5. N-ERD ve Tedavi Yöntemleri

N-ERD; sinonazal, pulmoner ve sistemik belirtilere neden olan ve önemli morbiditeye sahip bir hastalıktır [4]. Bu nedenle N-ERD için çeşitli tedavi seçenekleri mevcuttur. NSAİİ kaynaklı reaksiyonlar sırasında tedavi seçeneklerinin seçimi, hasta tarafından bildirilen semptomlara ve klinik gözleme bağlıdır. Bunların arasında biyolojik tedaviler, fonksiyonel endoskopik sinüs cerrahisi, topikal tedaviler, aspirin desensitizasyonu (AD) ve anti-platelet tedavi yöntemleri sayılabilmektedir [97].

2.5.1. Biyolojik Tedaviler

N-ERD'li hastalar için uygun 4 yeni biyolojik tedavi son 5 yıl içerisinde onay alarak günümüzde kullanılmaya başlanmıştır [98]. Piyasaya sürülen ilk biyolojik ilaç, başlangıçta atopik ve alerjik astım ve sonraları ürtiker tedavisi için kullanılan Omalizumab idi. Omalizumab; eozinofil, bazofil ve mast hücre aktivasyonunda doğrudan azalmaya neden olan N-ERD'de hava yolu inflamasyonunu iyileştirebilen bir anti-IgE biyolojiktir [49]. Lang ve arkadaşları omalizumabın aspirin yüklemesi sırasında klinik belirtileri durdurabileceğini ifade etmiştir; ancak bu etki omalizumab ile tedavi edilen N-ERD'li hastaları içeren geniş popülasyonda araştırıldığında tutarlı bir sonuç göstermemiştir [99]. Nazal polipozis için omalizumabın etkinliğine ilişkin son veriler ise, özellikle N-ERD popülasyonunda başarılı olabileceğini göstermektedir [100]. Sonuç olarak, omalizumab'ın N-ERD'in temel belirtilerine karşı etkinliğe sahip olmasından dolayı N-ERD için önemli bir terapötik aday olduğu bildirilmiştir [101].

Mepolizumab ve reslizumab, interlökin-5'in (IL-5) eozinofiller üzerindeki reseptörüne bağlanmasını engelleyen monoklonal antikordur. Reslizumab, şiddetli eozinofilik astımı ve nazal polipli KRS'si olan hastalarda bir tedavi seçeneği olarak düşünülmektedir [102]. Mepolizumab (anti-IL-5 monoklonal antikoru), N-ERD'li hasta grubunda incelendiğinde nazal polipozis belirtilerine iyi geldiği gözlemlenmiştir [103]. Ayrıca, N-ERD'de IL-5 inhibisyonu, inflamatuvar eikosanoidlerin üretimini azaltmaktadır [104]. Ancak, nazal polipli KRS hastalarında mepolizumab için hala devam eden çalışmalar mevcuttur. N-ERD'de mepolizumabın etkinliği ve güvenilirliği henüz sistematik olarak araştırılmamış olsa da, IL-5 ve eozinofil hücrelerinin N-ERD patogenezindeki kritik rolü nedeniyle anti-IL-5 antikordur umut verici bir tedavi seçeneği sunmaktadır [105].

Dupilumab ise, atopik dermatit, orta ila ağır astım ve nazal polipli KRS için onaylanan ve hem interlökin-4 (IL-4) hem de interlökin-13 (IL-13) sinyal yollarını inhibe eden monoklonal bir antikordur [106]. Daha büyük örneklem içeren çalışmalara ihtiyaç duyulmasına rağmen, dupilumab N-ERD'li hasta grubunda çalışıldığında nazal ve astımla ilişkili belirtileri ve akciğer fonksiyonlarını iyileştirebildiği gözlemlenmiştir [107].

2.5.2. Topikal Tedaviler

Hem astım hem de nazal polipleri olan hastalarda tedavinin temel dayanağını topikal kortikosteroidler oluşturmaktadır [98]. N-ERD'li hastalara nazal polipleri için uygulanan topikal tedaviler sonuç vermemektedir. Topikal mometazon, nazal polipozis için onaylanmış bir burun spreyi olmasına rağmen; üst solunum yolu hastalığını kontrol altına almada etkisiz kalmaktadır [108].

Son zamanlarda benzersiz bir dağıtım mekanizması bulunan flutikazon isimli inhaler sprey nazal poliplerde kullanım için onay almıştır. Flutikazon burun spreyleri ile karşılaştırıldığında, daha gelişmiş uygulama mekanizması sağlayarak nazal poliplere doğrudan daha yüksek miktarda topikal kortikosteroid verilmesine olanak tanımaktadır [98]. Bu tedavinin nazal polipozisdeki etkinliği kanıtlanmış olmasına rağmen, N-ERD hastalığındaki rolü için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.5.3. Araştırmaları Devam Eden Diğer Tedaviler

Günümüzde platelet hedefli tedavilerle yapılan klinik deneyler, N-ERD tedavisini ilerletmek için oldukça umut vericidir. Mevcut araştırmalar N-ERD hastalığı için, platelet aktivasyonunu ve lökosit hücreleriyle kümeleşmesini inhibe eden, pulmoner inflamasyonu azaltan ve aspirin yüklemesi sırasında aspirin reaksiyonlarının şiddetini azaltan bir P2Y12 reseptör antagonisti dahil olmak üzere platelet hedefli tedavileri araştırmaktadır. P2Y12 reseptörünü bloke ederek platelet aktivasyonunu inhibe eden prasugrel (P2Y12 reseptörü antagonisti) ile tedavinin N-ERD'li hastalarda aspirin alımı ile indüklenen sinonazal ve solunum semptomlarının şiddetini etkilemediği raporlanmıştır. Ancak, aspirin reaksiyonları sırasında daha yüksek bazal platelet aktivasyonu ve daha hafif üst solunum semptomları olan N-ERD'li hastaların küçük bir alt grubunda, prasugrel ile P2Y12 antagonizması, aspirinin neden olduğu tüm reaksiyon belirtilerini tamamen durdurmuştur. Sonuç olarak; prasugrel ile P2Y12 antagonizmi, N-ERD hastalarının yalnızca bir alt grubunda aspirin kaynaklı reaksiyonları önlemektedir [109]. Bunlara ek olarak, platelet reseptörleri, bronkospazmı güçlendirmedeki rolü

nedeniyle plateletlerle ilgili başka bir terapötik olarak kullanıma uygun olabilmektedir. Bu nedenle N-ERD'li hastalarda Ifetroban gibi platelet reseptör antagonistleri üzerinde araştırmalar yapılmaktadır; çünkü Ifetroban bronkokonstriksiyon sinyallerini bloke ettiği için daha avantajlı sayılmaktadır [110]. Son olarak N-ERD'de, plateletlerin inflamatuvar rolü büyük ölçüde tromboksan reseptörünün aktivasyonu yoluyla gösterilmiştir. Bu nedenle bir tromboksan reseptör antagonisti olan ifetrobanın araştırılması N-ERD için yeni tedavi anlamında umut vaat etmektedir [20].

N-ERD'de PGD2 ve inflamatuvar lipid mediyatörlerini aşırı üretimi nedeniyle son dönemlerde birçok çalışma ARRY-502 ve AZD1981 gibi CRTH2 antagonistlerine odaklanmıştır. Çünkü CRTH2 antagonistleri, alerjik reaksiyonlarda ve hatta N-ERD hastalığında hava yolu inflamasyonunun giderilmesinde etkili görünmektedir [17].

N-ERD tedavisi için kullanılan ilaçlar çok maliyetli olmakla birlikte birçoğunun henüz uzun vadeli güvenlik ve sonuç verileri mevcut değildir [111]. Bu nedenle kullanılan biyolojik ilaçlar N-ERD'li tüm hastalar için gerekli ve uygun sayılamamaktadır. Gelecekte araştırılması planlanan tedaviler içerisinde kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerine yönelerek N-ERD'li hastalar için en etkili biyolojinin tanımlanmasını destekleyen birebir çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

2.5.4. Aspirin Desensitizasyonu (AD)

Aspirin desensitizasyonu (AD), N-ERD hastalarının aspirine olan toleransını artırmaya yönelik yaygın olarak kullanılan bir tedavi yöntemidir. Bu tedavi, ASA/NSAİİ duyarlı bir hastada oral veya intranazal olarak verilen aspirin dozlarının kısa zaman aralıklarında arttırılarak aspirin toleransının indüklenmesi işleminden oluşmaktadır [21]. Aspirin desensitizasyonu, standart tıbbi tedavilerin etkili olmadığı durumlarda tercih edilen en etkili tedavi seçeneğidir [2]. Aspirin desensitizasyonu, düşük dozlarda aspirin ile başlayıp, 1 ila 3 günlük bir süre içinde kademeli olarak 650'den 1300 mg dozuna yükseltilerek yapılan zorlu bir işlemdir. Bu nedenle hastanın güvenliği açısından aspirin desensitizasyonu işlemi iyi donanımlı bir hastanede özel eğitim almış hekimlerin gözetiminde yapılması gerekmektedir. Aspirin desensitizasyonunun güvenliğini ve etkinliğini güvence altına almak için EAACI tarafından dozun 2 gün içinde kademeli olarak artırılmasına ilişkin protokol önerilmiştir [21]. Birçok çalışma, N-ERD hastalarında aspirin desensitizasyonu tedavisinin nazal polip boyutunu ve sinüs cerrahisi ihtiyacını azalttığını, hem nazal hem de bronşiyal belirtileri iyileştirmede etkili olduğunu

bildirmiştir [112]. Yapılan son çalışmalar, AD tedavisinin astım ve sinonazal belirtileri, günlük kortikosteroid kullanımını, astım nedeniyle hastaneye yatışları ve sinüs enfeksiyonlarını azalttığını rapor etmektedir [113]. AD'nin N-ERD hastalarının %70'inden fazlasında nazal polip oluşumunu azalttığı veya geciktirdiği bildirilmiştir [114]. Ayrıca, AD CysLT1R ifadesini aşağı regüle etmektedir. Bu nedenle, desensitizasyon sonrası bile CysLT oluşumundaki önemli artışlara rağmen klinik iyileşme gözlemlenmektedir [115].

N-ERD'de fayda gösteren tedavi yaklaşımları arasında, aspirin desensitizasyonu ve ardından sürekli uzun süreli aspirin uygulaması, birçok hastanın klinik seyrinde önemli iyileşme sağlamıştır. Aspirin desensitizasyon tedavisi alan hastaların yaklaşık %85'nin desensitizasyon başarısı göstererek N-ERD ile ilişkili semptomlarında düzelmeler olduğu ve yaşam kalitelerinin arttığı bildirilmiştir [116]. Son dönemde yapılan bir çalışmada, N-ERD hastalarının %83,5'nin herhangi bir önemli komplikasyon göstermeksizin desensitizasyonu tolere edebildiği gösterilmiştir [19]. Yaklaşık olarak 16 retrospektif çalışma ve dört çift kör plasebo kontrollü çalışma, N-ERD hastalığı için biyolojiklerden daha etkili bir tedavi olarak AD sonrası aspirin tedavisi olduğunu göstermiştir [5]. Bunlara ek olarak, duyarsızlaştırmadan 10 yıl sonra bile, hala günlük aspirin alan N-ERD hastalarının %85'inde, tedavinin sinonazal ve astım semptomlarını kontrol etmede ve yaşam kalitelerini iyileştirmede oldukça yardımcı olduğu raporlanmıştır [117]. Ek olarak AD, hem sık sinüs ameliyatları hem de nazal polipozis ve şiddetli tip 2 astım için mevcut olan yeni biyolojik ajanlarla karşılaştırıldığında oldukça ekonomik bir tedavi seçeneğidir. Aspirin desensitizasyonu ve günlük yüksek doz aspirin uygulaması N-ERD'li çoğu hasta için faydalı görünse de tüm hastalar için uygun bir tedavi değildir ve birçok hasta semptomları için birden fazla ilaca ihtiyaç duymaktadır. Sonuç olarak, hastaların büyük bir kısmı desensitizasyon başarısı gösterebilirken bir kısmı bu tedavi yönteminden yarar sağlayamamakta ve bunun altında yatan moleküler ve hücresel mekanizmalar henüz bilinmemektedir.

2.5.5. AD Tedavisinin Platelet-Lökosit Kümeleşmesi Üzerine Etkisi

Aspirin desensitizasyon tedavisi, mast hücre aktivasyonu ve CysLT üretimi ile karakterize bir astım fenotipi olan N-ERD hastalığı için mevcut bir tedavidir; ancak günümüzdeki çalışmalar alternatif anti-platelet odaklı tedavilere yönelerek N-ERD patogenizinde öneme sahip olan platelet-lökosit kümeleşmesinin nedenlerini

araştırmaktadır. Çünkü aktive plateletlerin pro-inflamatuvar etkilerinin N-ERD patogenezinde merkezi bir rol oynayabileceğine dair yeni kanıtlar vardır.

Literatüre ilişkin sonuçlar N-ERD'li hastaların kanındaki plateletlere bağlı eozinofiller, nötrofiller ve monositlerin seviyesinin, aspirine toleranslı kontrollerin kanındaki seviyelere göre çarpıcı biçimde arttığını göstermektedir [36]. Bir başka çalışmada ise N-ERD hastalarının ATA hasta grubu ile karşılaştırıldığında daha fazla sayıda platelet-lökosit kümeleşmesine sahip olduğunu fakat AD tedavisinin başlangıçtaki platelet-lökosit küme sayısında ve platelet aktivasyonunda (CD62P) herhangi bir değişikliğe sebebiyet vermediği bildirilmiştir [118]. Bu nedenle aspirinin her iki grupta da platelet-lökosit kümeleri ve platelet aktivasyon belirteçleri üzerinde etkisinin olmadığı ancak bu durum için ek çalışmalara ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir. Laidlaw ve arkadaşları da aspirin alımının periferik kan platelet-lökosit kümelerinin sayılarını ve platelet aktivasyonunu önemli ölçüde değiştirmedini göstermiştir [109]. Aynı zamanda N-ERD'li hastalardan alınan periferik kan ve nazal polip dokusunun, ATA grubundan önemli ölçüde daha fazla platelete bağlı lökosit içerdiğini ve dolaşımdaki lökositlerin %80'inin plateletlere yapışık olduğunu göstermişlerdir [119]. Ayrıca, günde 100 mg aspirin tedavisinin de platelet-lökosit kümeleşmesini azaltmadığı bildirilmiştir [120].

Aktive plateletler N-ERD için ek terapötik hedef olarak görülmektedir. Çünkü bu anti-platelet tedavilerin hem platelet-lökosit kümeleşmesini ve ardından dolaylı bir mekanizma ile CysLT oluşumunu ve LTE₄'ün etkisini azaltarak ve/veya bloke ederek N-ERD tedavisinde etkili olabilme olasılığı vardır. Bu sebeple, N-ERD patogenezinde platelet-lökosit kümelerini hedef alan tedavilerin geliştirilmesinin bu hastalar üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kontrol ve Hasta Gruplarının Belirlenmesi

Tez çalışmasına dahil edilen hasta grupları, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Alerji ve Klinik İmmünoloji Bilim Dalı'na başvuran ve dahil edilme kriterlerini karşılayan katılımcılardan seçilmiştir. Araştırmaya dahil edilmesi planlanan sağlıklı (kontrol) katılımcılar ise, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Alerji ve Klinik İmmünoloji Bilim Dalı/ Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı. merkezinde halen izlemde olan hastaların klinik ziyaretlerinde yanında bulunan ancak hastanın birinci derece akrabası olmayan sağlıklı kişilerden seçilmiştir. Sonuç olarak, 18 yaş üstü olacak şekilde (kadın ve/veya erkek) dahil edilme kriterlerini karşılayan 4 grup için 15'şer katılımcı olmak üzere toplam 61 katılımcı sağlanmıştır (1.Grup 16 katılımcı). Ayrıca, araştırılan 4 grubun tedavilerine hiçbir şekilde müdahalede bulunulmamıştır.

Çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri aşağıda belirtilmiştir:

Grup 1: N-ERD hastası olup aspirin kullanan

- 18-50 yaş arası, araştırmaya katılmayı kabul eden,
- Aspirin provokasyon testi ile aspirin duyarlılığı gösterdiği kanıtlanmış ve en az 8 haftadır aspirin desensitizasyonu sonrası düzenli aspirin tedavisi kullanmakta olan hastalar (**hastalara aspirin tedavisi başlanmamıştır, halihazırda kullanmakta oldukları aspirin formu değiştirilmemiş ve tedavilerine müdahil olunmamıştır**).
- Sigara kullanmayan, gebe olmayan
- Biyolojik ajan almayan, seks hormonu kullanmayan
- Covid-19 geçirmemiş olan, geçirmesi halinde üzerinden 8 ila 12 hafta geçmiş olan
- Antikoagülan veya antitrombotik ilaç kullanmayan

Grup 2: N-ERD hastası olup aspirin kullanmayan

- 18-50 yaş arası, araştırmaya katılmayı kabul eden,
- Aspirin provokasyon testi ile aspirin duyarlılığı gösterdiği kanıtlanmış fakat aspirin desensitizasyon tedavisi almayan hastalar (**hastalara aspirin tedavisi başlanmamıştır ve tedavilerine müdahil olunmamıştır**).
- Aspirin veya NSAİİ kullanmayan,
- Sigara kullanmayan, gebe olmayan

- Biyolojik ajan almayan, seks hormonu kullanmayan
- Covid-19 geçirmemiş olan, geçirmesi halinde üzerinden 8 ila 12 hafta geçmiş olan
- Antikoagülan veya antitrombotik ilaç kullanmayan

Grup 3: Astım hastası olup aspirin kullanmayan

- 18-50 yaş arası, araştırmaya katılmayı kabul eden,
- Astım hastası (**hastalara aspirin tedavisi başlanmamıştır ve tedavilerine müdahil olunmamıştır**).
- Aspirin veya NSAİİ aşırı duyarlılığı olmayan
- Nazal polipleri olmayan,
- Aspirin veya NSAİİ kullanmayan,
- Sigara kullanmayan, gebe olmayan
- Biyolojik ajan almayan, seks hormonu kullanmayan
- Covid-19 geçirmemiş olan, geçirmesi halinde üzerinden 8 ila 12 hafta geçmiş olan
- Antikoagülan veya antitrombotik ilaç kullanmayan

Grup 4: Aspirin kullanmayan (Sağlıklı Kontrol)

- 18-50 yaş arası, araştırmaya katılmayı kabul eden sağlıklı bireyler (kontrol grubuna aspirin tedavisi başlanmamıştır).
- Son 4 hafta içinde sistemik kortikosteroid ya da antibiyotik kullanmamış veya üst solunum yolu enfeksiyonu geçirmemiş
- Aspirin veya NSAİİ kullanmayan,
- Astımı, mevsimsel alerjik riniti olmayan
- Sigara kullanmayan, gebe olmayan
- İmmün yetmezliği ve otoimmün hastalığı olmayan
- Hipertansiyonu olmayan
- Bilinen bir sistemik hastalığı olmayan sağlıklı bireyler (klinikte takip edilen hastaların onam veren sağlıklı yakınları)
- Covid-19 geçirmemiş olan, geçirmesi halinde üzerinden 8 ila 12 hafta geçmiş olan
- Antikoagülan veya antitrombotik ilaç kullanmayan

3.2. Çalışma Popülasyonu

N-ERD hastalarının, doktor tarafından teşhis edilen astım ve nazal polipozis öyküsünün yanı sıra, aspirin provokasyon testi ile doğrulanan üst ve alt hava yolu tutulumuyla birlikte oral aspirine verilen klinik yanıtları vardı. Nazal polipler endoskopik sinüs cerrahisi sonucuna göre teşhis edildi. AD tedavisi alan N-ERD hasta grubu, aspirin provokasyon testi ile aspirin duyarlılığı olduğu kanıtlanan ve AD sonrası en az 8 hafta düzenli aspirin tedavisi kullanan hastalardan seçilmiştir. AD tedavisi alan hastalar 300 mg aspirin ile desensitize edilen ve günlük aspirin kullanan hastalardan oluşmaktadır.

Astımlı hastaların doktor tarafından teşhis edilen astımı vardı, mevcut nazal polipozis yoktu ve seçici olmayan herhangi bir COX inhibitörüne karşı reaksiyon öyküsü yoktur. Astım, bir metakolin yüklemesine veya bir göğüs hastalıkları uzmanı veya alerji uzmanı tarafından önceki bir tanıya dayalı olarak tanımlanmıştır. Küresel Astım Girişimi (GINA) standartlarına göre, tüm astım hastaları astım kriterlerini karşılamaktadır. En az altı haftalık süre boyunca astımlı hastalarda alevlenme veya solunum yolu enfeksiyonu geçirmemiş olanlar çalışmaya dahil edilmiştir.

Bu tez çalışması için etik onay Hacettepe Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından kabul edilmiş ve tüm katılımcılar yazılı bilgilendirilmiş onam vermiştir. Tez çalışmasının etik kurul karar numarası 2020/09-39 olup protokol kodu KA-20059'dur. Buna ek olarak, tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından TA-2020-18855 numaralı kapsamlı araştırma projesi olarak desteklenmiştir.

3.3. Veri Toplama

Dahil edilme kriterlerini karşılayan hasta ve kontrol gruplarından onamları (Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu) ve tek sefer olmak üzere kan ve idrar örnekleri alınmıştır. Gruplara herhangi bir izlem yapılmamıştır. Tüm gruplara hem burun ile ilgili şikayetlerini içeren hem de genel sağlıkla ilgili semptomlarını sorgulayan Türkçe'ye valide edilmiş Sinonazal Obstrüksiyon Testi (SNOT-22) ve Kısa Form-36 (SF-36) yaşam kalitesi anketleri uygulanmıştır. Rutin kullanıma girmiş SNOT-22 anketi, burun ve sinüslerle ilgili şikayetlerin değerlendirildiği KRS'li hastalarda kullanım için onaylanmış sık başvurulan Likert tipi bir ölçektir. Bu anketin burun (rinolojik), kulak/yüz (otolojik), uyku ve duygu ile ilgili sonuçları değerlendiren dört alt parametresi vardır. SF-36 ise,

genel sağlık bilgilerini içeren ve özellikle KRS’li hastaların değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan 8 parametrelili bir ölçektir.

3.3.1. Kan rneklerinin Toplanması

Katılımcılardan 5 mL periferik venöz kan alınarak aynı gün flow analizi gerçekleştirilmiş olup sonrasında örnekler serum ve plazmalarına ayrılmıştır. EDTA-antikoagulan tp (mor tp) içerisine alınan kan örnekleri 1600 x g’de 10 dakika santrifüjlenerek plazmasına (süpernatant) ayrılmıştır. Kırmızı tp içerisine alınan kan örnekleri ise + 4° C’de 1000 x g’de 20 dakika santrifüjlenerek serumuna (süpernatant) ayrılmıştır. Oluşan rnekler (plazma ve serum) ayrı tüpler içerisinde düşük hacimlerde alikotlanarak ELISA lmne kadar -80 ° C’de muhafaza edilmiştir.

3.3.2. İdrar rneklerinin Toplanması

Katılımcılardan kan örnekleri alındığı sırada orta akım idrar vermeleri de istenmiştir. Steril idrar kabına alınan idrar örnekleri belirli hacimlere bölünerek, riner LTE4 ELISA analizine kadar -80°C’de saklanmıştır. Buna ek olarak, toplanan idrar örneklerinin aynı gün içinde idrar kreatinin miktarları ölçülmüştür.

3.4. Platelet-Nötrofil Kümelerinin Akış Sitometrisi ile Analizi

Katılımcılardan alınan kan örnekleri 1 saat içerisinde işlenerek platelet-nötrofil kümelerinin tayini BD FACSCelestaTM akış sitometri cihazı kullanılarak tayin edilmiştir [73]. Kan rnekleri EDTA-antikoagülan solüsyon içeren tüplere alınarak analiz edilene kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Tez kapsamında akış sitometri deneyleri için kullanılan antikolar ve izotip kontrolleri detaylı olarak Tablo 3.1’de verilmiştir.

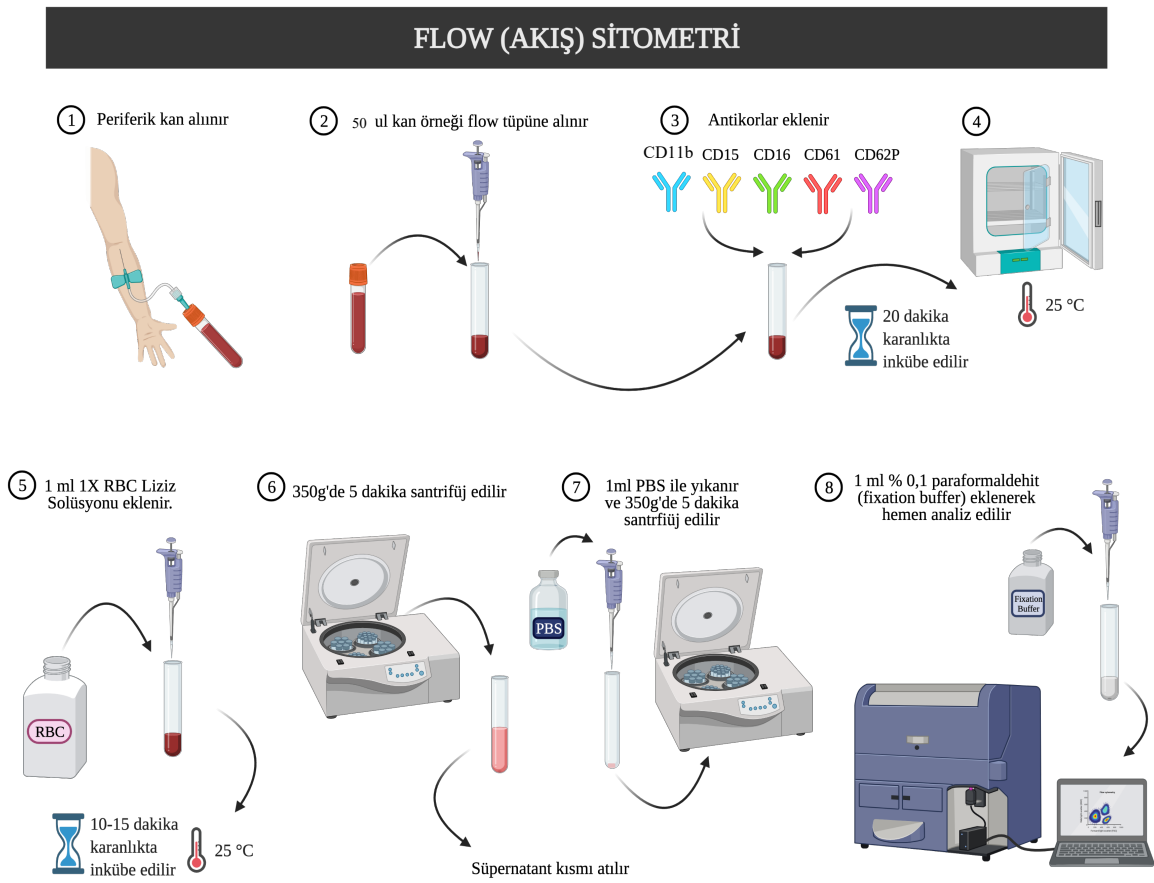
Tablo 3.1. Antikor Listesi

ANTİKOR	HÜCRE TİPİ	KLON	İZOTİP	FİRMA	KAT#	VOL/TEST
Brilliant Violet 421 Anti-Human CD15	Nötrofil	W6D3	Mouse IgG1, κ	Biologend	323040	2,5 μL
Brilliant Violet 421 Isotype Control		MOPC-21		Biologend	400158	2,5 μL
Alexa Fluor® 700 Anti-Human CD16	Nötrofil	3G8	Mouse IgG1, κ	BD	560713	2,5 μL
Alexa Fluor® 700 Isotype Control		MOPC-21		Biologend	400144	2,5 μL
FITC Anti-Human CD11b	Nötrofil	ICRF4	Mouse IgG1, κ	Elabscience	E-AB-F1146C	2,5 μL
FITC Isotype Control		MOPC-21		Elabscience	E-AB-F09792C	2,5 μL
PE Anti-Human CD61	Platelet	VI-PL2	Mouse IgG1, κ	Biologend	336406	2,5 μL
PE Isotype Control		MOPC-21		Biologend	400114	2,5 μL
Brilliant Violet 785 Anti-Human CD62P	Platelet	AK4	Mouse IgG1, κ	Biologend	304942	2,5 μL
Brilliant Violet 785 Isotype Control		MOPC-21		Biologend	400170	2,5 μL

Platelet-nötrofil küme analizi için; platelet-spesifik olarak tanımlanan CD61 ve CD62P antikoru [36][121] seçilmiş olup nötrofil-spesifik olarak CD11b, CD15 ve CD16 antikoru kullanılmıştır [36][122][123].

CD62P, aktif plateletlerin özel bir belirteçidir ve nötrofillerin yüzeyinde CD62P antijeninin varlığı, platelet-nötrofil kümelerini gösterir. Platelet-nötrofil kümeleşmesini karakterize etmek için CD61-CD62P (++) nötrofil yüzdesi kullanılmıştır.

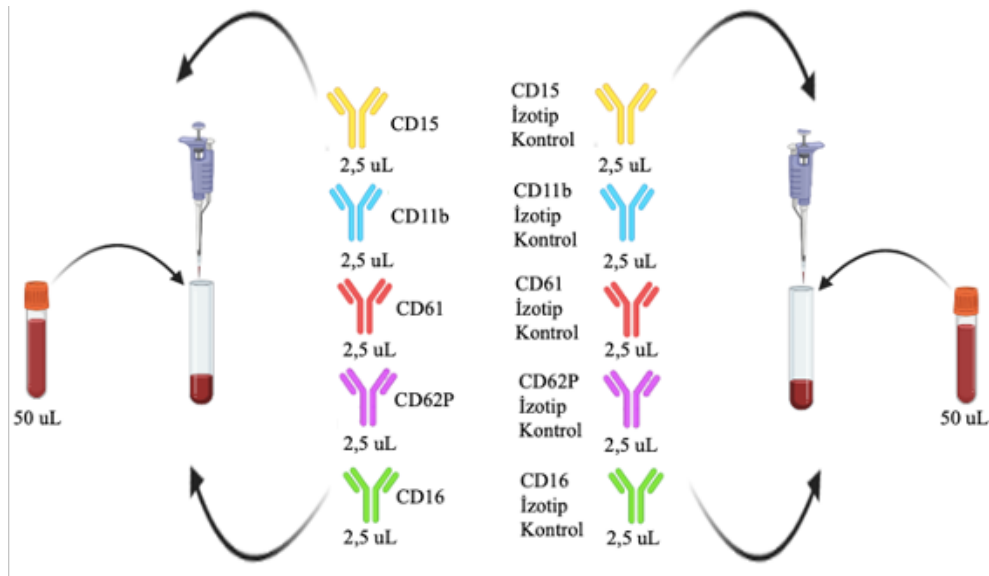
Deney protokolü optimize edilmiş olup ilgili protokol ve deney düzeneği Şekil 3.1’de yer almaktadır.



Şekil 3.1. Akış Sitometri Deney Düzeneği. Biorender uygulaması kullanılarak çizilmiştir (biorender.com).

Denev Protokolü:

1- Tüm kan (Whole Blood) örneğinin 50 µL'si flow tüpüne alındıktan sonra antikorların her birinden 2,5 µL olacak şekilde eklenerek 20 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Boyamanın 10. dakikasında Zombie NIR canlılık boyasından 0,1 µL eklenmiştir. Bütün izotip kontrol antikorları için aynı işlem başka bir flow tüpünde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Denev protokolünün 1. ana basamağı.

2- Eritrositler 1-1,5 mL 1X red blood lizis solüsyonu (RBC) ile parçalanmış ve 10 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir (1X RBC, oda sıcaklığına getirilerek kullanılmıştır).

3- 5 dakika 350 x g'de santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı dökülmüştür.

4- 1 mL PBS ile yıkandıktan sonra 5 dakika 350 x g'de santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı dökülmüştür. Yıkama işlemi 2 kere tekrar edilmiştir (Toplamda 2 yıkama yapılmıştır).

5- 1 mL %0,1 paraformaldehit-PBS (fixation buffer) eklenmiş ve hemen analiz edilmiştir.

3.5. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi

Platelet aktivasyonu ve platelet-lökosit kümelerinin oluşumuna katkı sağlayan moleküllerin (sP-selektin (CD62P), CD40L, Platelet Faktör 4 (PF4), RANTES, GM-CSF,

Tromboksan A2 (TXA2), 12-HETE, 20-HETE, PAF, PGD2 ve PGE2) miktarları ELISA yöntemi ile belirlenmiştir.

Araştırılması planlanan 4 grup için 61 katılımcı bulunmaktadır. Bu nedenle, ELISA deneylerinde meydana gelebilecek el hatalarından kaynaklı aksaklıkları indirmek için her bir örnek en az 2 tekrarlı deneyerek analiz edilmiştir.

3.5.1. ELISA Deneylerinde Kullanılan Malzemeler

ELISA deneyleri için temin edilen kitlerin çalışma aralıkları ve markaları aşağıda belirtilmiştir;

- Human sP-selektin (CD62P) ELISA Kit'i (R&D Systems, DY137) ticari olarak satın alınmış olup çalışma aralığı 125-8000 pg/mL arasında belirlenmiştir.
- Human CD40L ELISA Kit'inin (R&D Systems, DY617) çalışma aralığı 15,6-1000 pg/mL arasındadır.
- Human PF4 ELISA Kit'inin (R&D Systems, DY795) tespit aralığı 15,6-1000 pg/mL arasındadır.
- Ticari olarak satın alınan Human RANTES ELISA Kit'i (R&D Systems; DY278) için çalışma aralığı 15,6-1000 pg/mL arasında belirtilmiştir.
- Human PAF ELISA Kit'inin (Elabscience, E-EL-H2199) çalışma aralığı 78,13-5000 pg/mL arasındadır. PAF ELISA Kit'inin hassasiyeti ise 46,88 pg/mL olarak verilmiştir.
- Human TXA2 ELISA Kit'inin (Elabscience, E-EL-0057) tespit aralığı 15,63-1000 pg/mL arasında olup hassasiyeti 9,38 pg/mL'dir.
- Human PGD2 ELISA Kit'inin (Elabscience, E-EL-0066) çalışma aralığı 15,63-1000 pg/mL arasındadır. Kit'in hassasiyeti 9,38 pg/mL olarak belirtilmiştir.
- Human PGE2 ELISA Kit'inin (Cayman, 514010) tespit aralığı 7,8-1000 pg/mL arasında olup hassasiyeti 15 pg/mL olarak belirtilmiştir.
- Ticari olarak satın alınan Human LTE4 ELISA Kit'i (Cayman; 501060) için çalışma aralığı 7,8-1000 pg/mL arasında belirtilmiştir. LTE4 ELISA Kit'inin hassasiyeti yaklaşık olarak 25 pg/mL verilmiştir.

- Human 12-HETE ELISA Kit'inin (Abcam; ab133034) tespit aralığı 195-50000 pg/mL arasında olup hassasiyeti 146,3 pg/mL'dir.
- Human 20-HETE ELISA Kit'i (Abcam; ab175817) ticari olarak satın alınmış olup çalışma aralığı 0,01-1000 ng/mL arasında belirlenmiştir. Kit'in hassasiyeti 10 pg/mL olarak belirtilmiştir.
- Human GM-CSF ELISA Kit'inin (R&D Systems; DY215) tespit aralığı 15,6-1000 pg/mL arasında olup hassasiyeti 15 pg/mL olarak belirtilmiştir.

3.5.2. Kandaki Sitokinlerin ELISA Yöntemi ile Ölçümü

ELISA deneyine başlamadan önce; alınan kan örnekleri, EDTA-antikoagülan solüsyon içeren tüp içerisinde oda sıcaklığında 1600 x g'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Oluşan süpernatantlar (plazma) alikotlanarak ölçüme kadar -80 ° C'de muhafaza edilmiştir [73]. Tüm örnekler ve standartlar üç tekrar halinde yapılmıştır.

Ölçümler için kit içerisinde yer alan protokoller uygulanmış olup ilgili protokol ve deney düzeneği Şekil 3.3'te gösterilmiştir.

Plaka Hazırlanması:

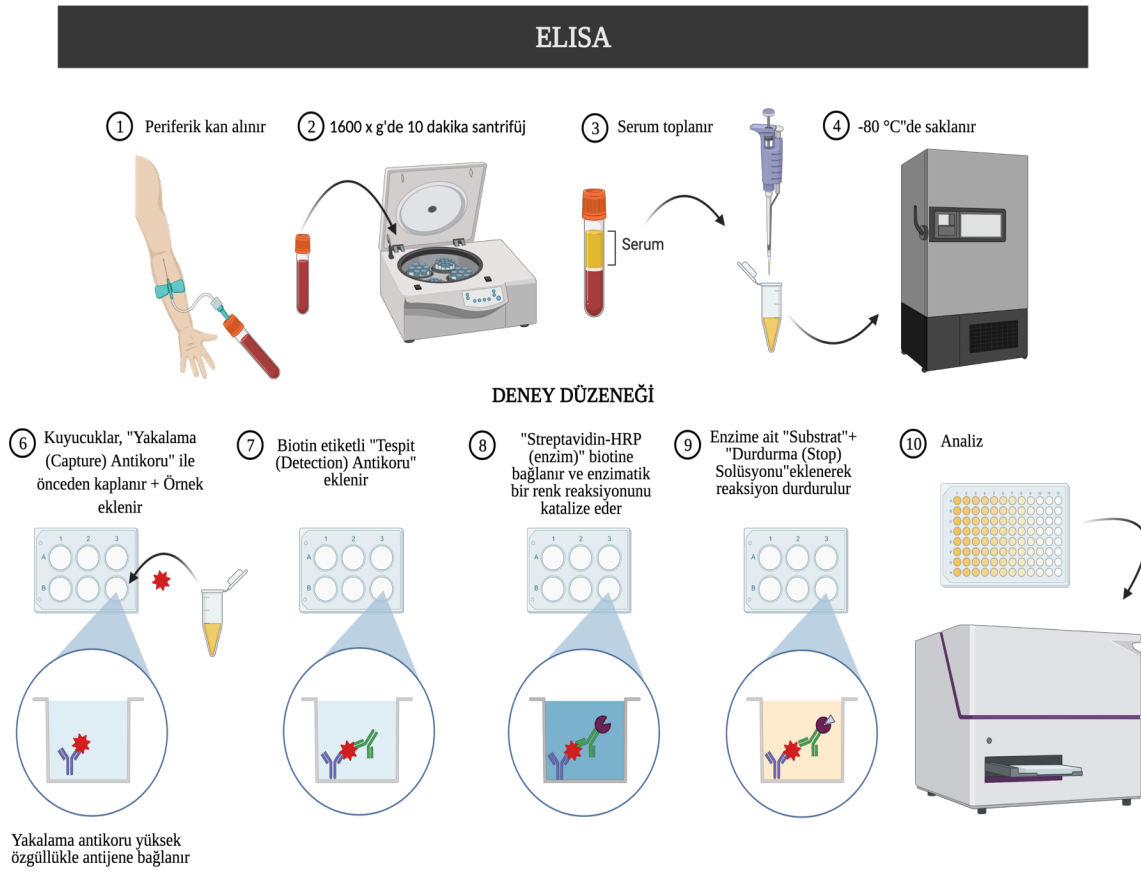
Bu aşama, Duo-Set ELISA kitleri (antikor ile kaplanmamış) için geçerli olup diğer ELISA Kitleri (pre-coated: antikor ile kaplanmış) için geçerli değildir. Tüm reaktifler ve çalışma standartları kitlerin içinde yazan prosedürlere göre hazırlandıktan sonra, plakanın yakalama antikorunu (capture antibody) ile kaplanmış olup olmadığına göre belli inkübasyon aşamaları dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir.

1- Her bir kit için kendi yakalama antikorunu kitlerde belirtilen çalışma konsantrasyonunda kit içerisindeki PBS solüsyonu ile seyreltilip 96-kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde eklenmiştir. Daha sonrasında oda sıcaklığında gece boyunca inkübe edilmiştir.

2- Her bir kuyucuk 300-400 µL olacak şekilde yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkanmıştır. Kuyucuk içindeki bütün sıvının tamamen uzaklaştırılması için plaka, her yıkamadan sonra hafif bir şekilde zemine vurulmuştur. İşlem sonrasında plakanın kurumasına izin verilmiştir.

3- Kuyucuk başına 300 µL olacak şekilde ayraç seyreltme solüsyonu (reagent diluent) eklenerek en az 1 saat süre ile oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

4- 2. aşamada yer alan yıkama işlemi tekrarlanmıştır.



Şekil 3.3. ELISA Deney Düzenegi. Biorender uygulaması kullanılarak çizilmiştir (biorender.com).

Deney Protokolü:

1- Uygun miktarlarda seyreltilen standart ve örneklerden kuyucuk başına 100 µL eklenmiş ve üstü kapatılmıştır. Plaka oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakılmıştır.

2- 300-400 µL olacak şekilde her bir kuyucuk yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkanmıştır. Kuyucuk içindeki bütün sıvının tamamen uzaklaştırılması için plaka, her yıkamadan sonra hafif bir şekilde zemine vurulmuştur. İşlem sonrasında plakanın kuruması sağlanmıştır.

3- Her bir kit için kendi tespit antikoru (detection antibody) kitlerde belirtilen çalışma konsantrasyonunda kit içerisindeki Reagent Diluent ile seyreltilip 96-kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde eklenmiştir. Plaka, 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

4- 2. aşamada yer alan yıkama işlemi tekrarlanmıştır.

5- Streptavidin-HRP (enzim) çalışma konsantrasyonunda hazırlanarak kuyucuk başına 100 µL eklenmiştir. Plaka kapatılarak karanlıkta ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir.

6- 2. aşamada yer alan yıkama işlemi tekrarlanmıştır.

7- Kit içerisinde yer alan Color Reagent A ve Color Reagent B substratları eşit hacimde (1:1) karıştırılarak kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde eklenmiştir. 20 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

8- Durdurma solüsyonu (stop solution) her bir kuyucuğa 50 µL olacak şekilde eklenmiş ve plakanın iyice karışması sağlanmıştır.

9- Her bir kuyucuğun optik yoğunluğu (optical density – O.D.) 450 nm ve 540 nm'ye ayarlanmış mikropilaka okuyucu en az 30 dakika içerisinde ölçülmüştür. Spesifik olmayan hatalı okumaları düzeltmek amacıyla 540 nm'de elde edilen okumalar, 450 nm'deki okumalardan çıkarılarak hesaplanmıştır.

3.6. Üriner Lökotrien E4 Ölçümü

Spot idrar numuneleri, kan alımının aynı gününde toplanmış ve -80°C'de düşük hacimlere bölünerek saklanmıştır. Üriner LTE4 seviyesinin belirlenmesi için daha önce literatür çalışmalarında sıklıkla kullanılan Human Üriner LTE4 ELISA Kit (Cayman Chemical) kullanılmıştır. LTE4 ELISA Kiti, bir pürifikasyon adımı olmaksızın LTE4'ün idrardan ölçümü için geliştirilmiş kompetitif bir testtir. Örnekler 1:10 seyreltilmiş idrar numunelerinde değerlendirilmiştir. Ölçüm üç tekrar halinde yapılmıştır. İdrar LTE4 seviyeleri, miligram kreatinin başına pikogram (pg/mg Cr) olarak rapor edilmiştir.

Plaka Hazırlanması:

1- Protokolde belirtilen plaka düzenine göre deneyler gerçekleştirilmiş olup ilgili görsel Şekil 3.4'te yer almaktadır.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
B	Blk	S2	S2	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
C	NSB	S3	S3	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
D	NSB	S4	S4	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
E	B ₀	S5	S5	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
F	B ₀	S6	S6	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
G	B ₀	S7	S7	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
H	TA	S8	S8	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek

Blk – Blank (Boş)
TA – Total Aktivite
NSB – Spesifik Olmayan Bağlanma
B₀ – Maksimum Bağlanma
S1-S8 – Standart 1-8

Şekil 3.4. uLTE4 Plaka Düzenegi.

Denev Protokolü:

- 1- Kit içerisinde bulunan LTE4 Standardı (100 ng/mL-100 µL) temiz bir test tüpüne aktarıldıktan sonra 900 µL ultrasaf su ile seyreltilmiştir. Standart için kit protokolünde belirtilen şekilde 8 adet tüpte seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir.
- 2- Spesifik olmayan bağlanma (NSB) kuyucuklarına 100 µL ve maksimum bağlanma (B₀) kuyucuklarına 50 µL ELISA Tamponu eklenmiştir.
- 3- Standart (S1-S8) ve örneklerden 50 µL eklenmiştir.
- 4- LTE4 AChE Tracer solüsyonu Total Aktivite (TA) ve Blank (boş) kuyuları hariç her bir kuyucuğa 50 µL eklenmiştir.
- 5- LTE4 ELISA Antiserum solüsyonu TA, NSB ve Blank kuyuları hariç her bir kuyucuğa 50 µL eklenmiştir.
- 6- Plakanın üstü kapatılarak oda sıcaklığında 18 saat 4°C’de inkübasyona bırakılmıştır.
- 7- Kuyucuklar yıkama tamponu ile beş kez yıkanmıştır.
- 8- Bütün kuyucuklara 200 µL Ellman’s Reagent solüsyonu eklenmiştir. Plaka ışıktan korunmuştur.
- 9- TA kuyucuklarına 5 µL Tracer eklenmiştir.
- 10- Plakanın üstü kapatılarak karanlıkta orbital çalkalayıcı üzerinde 90-120 dakika arasında bir süre boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

11- İnkübasyon sonunda sonuç, 405-420 nm arasında bir dalga boyunda mikroplaka okuyucu kullanılarak belirlenmiştir.

3.7. İstatistiksel Analiz

Tez çalışmasının istatistiksel analizlerinde SPSS Sürüm 25.0 kullanılmıştır. Demografik verilerin dağılımı χ^2 testi kullanılarak değerlendirilmiştir. ANOVA ve Kruskal-Wallis testi 4 grubu karşılaştırmak için kullanılmıştır. Grafikler, GraphPad Prism 9.0 programı kullanılarak elde edilmiştir. Grafikler, tekrarlı ölçüm yapılan analizler için ortalama \pm standart hata (SEM) değerleri ile gösterilmiştir. Dört farklı grubun istatistiksel olarak birbirleriyle karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA ve Dunnett's post hoc testi kullanılmıştır. Korelasyonlar Spearman rank korelasyon testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Analizlerde p-değerinin 0,05'ten az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir. Anlamlılık derecesi analiz sonuçlarının altında belirtilmiştir. Akış sitometri sonuçları ise KALUZA V2.1.2 (Eğitim Lisanslı) yazılımı ile analiz edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında AD tedavisi uygulanmış ve uygulanmamış N-ERD grupları, aspirine toleranslı astımı olan grup ve sağlıklı kontroller çalışmaya dahil edilerek platelet-nötrofil kümeleri akış sitometrisi yöntemi ile tayin edilmiştir. Platelet-lökosit kümeleşmesinde etkili olduğu bilinen moleküller ELISA yöntemiyle incelenmiştir. N-ERD'de platelet-nötrofil kümelerinin hastalık patogenezi üzerine olan etkilerini ortaya koymak amacıyla oluşturulan dört farklı grup birbirleriyle karşılaştırılmış ve AD tedavisinin N-ERD hasta profilinde neden olduğu değişiklikler yorumlanmıştır.

4.1. Çalışma Gruplarının Popülasyon Karakteristiği

Tez çalışmasına 18 yaş üstünde, (kadın ve erkek) dahil edilme kriterlerini taşıyan, dört gruptan toplam 61 katılımcı dahil edilmiştir.

Katılımcıların demografik ve klinik özellikleri Tablo 4.1'de özetlenmiştir.

Tablo 4.1. Çalışma gruplarının popülasyon karakteristiği çizelgesi.

DEMOGRAFİK VERİLER	N-ERD (AD +) n=16	N-ERD (AD -) n=15	ASTİM n=15	SAĞLIKLI KONTROL n=15	P
Yaş (yıl) ^o	46.93±14.65	43.20±11.02	46.46±13.78	40.13±10.14	.414
Kadın, n (%)	13 (81.3)	10 (66.7)	12 (80)	10 (66.7)	.672
Atopi, n (pozitif, %)	5 (31.3)	5 (33.3)	5 (33.3)	na	.990
Astım Süresi (yıl)	15 (7.2-27.0)	10 (5-22)	9 (5-12)	na	.205
AKT Skor ^o	24 (13.2-25)	22 (15-25)	23 (15-25)	na	.947
Şiddetli Astım, n (%)	5 (31.1)	5 (33.3)	5 (33.3)	na	.876
Astım-Aile öyküsü, n (%)	10 (62.5)	7 (46.7)	4 (26.7)	na	.134
KRSwNP, n (%)	16 (100.0)	14 (93.3)	2 (13.3)	na	.000*
Geçirilen polipektomi sayısı ^o	2 (2-3)	2 (1-4)	0 (0-0)	na	.000*
Polip Süresi (yıl) ^o	11.5 (6.7-19.5)	13 (1-20)	0 (0-0)	na	.751
NSAİİ Duyarlılığı Süresi (yıl) ^o	8.5 (3.5-17)	10 (2-10)	na	na	.416
iKS kullanımı, n (%)	2 (12.5)	5 (33.3)	6 (40.0)	na	.205
iKS + LABA kullanımı, n(%)	13 (81.3)	7 (46.7)	4 (26.7)	na	.009*
LTRA kullanımı, n (%)	14 (87.5)	11 (73.3)	7 (46.7)	na	.044
Nazal Steroid kullanımı, n (%)	12 (75.0)	10 (66.7)	6 (40.0)	na	.117
Hemoglobin (gr/dL) ^o	13.35±1.1.54	13.91±1.64	14.05±1.22	13.50±1.69	.553
Nötrofil (x10 ³ /uL) ^o	4.4 (3.22-5.57)	5.0 (3.8-7.0)	4.4 (3.7-5.1)	4.1 (2.9-5.1)	.265
Eozinofil (x10 ³ /uL) ^o	0.3 (0.1-0.87)	0.4 (0.2-0.5)	0.1 (0.1-0.3)	0.1 (0.1-0.2)	.006*
Nötrofil (%) ^o	57.6 (52.05-61.87)	60.4 (58.7-63.3)	59.6 (56.5-65.2)	58.8 (55.8-60.8)	.333
Eozinofil (%) ^o	4.45 (2.05-10.5)	4.10 (3.2-5.8)	1.70 (0.8-3.9)	1.40 (1.0-1.9)	.004*
Platelet (x10 ³ /uL) ^o	249.5 (220.2-335.7)	267.0 (240.0-	257.0 (236.0-318.0)	277.0 (245.0-331.0)	.703
Serum Total IgE (UI/mL) ^o	99.1 (58.4-168.5)	95.5 (35.1-197.0)	73.3 (33.6-180.0)	25.8 (9.9-57.0)	.002*
İdrar Kreatinin (mg/dL) ^o	105.8 (44.9-128.7)	104.3 (42.7-183.0)	104.5 (85.5-144.7)	106.9 (60.1-204.9)	.817
Platelet-nötrofil kümeleri (%) ^o	50.9 (38.3-76.8)	43.8 (37.8-61.6)	40.3 (32.2-53.6)	32.5 (22.1-43.2)	.008*

N-ERD, nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlarla alevlenen hava yolu hastalığı; (AD+), aspirin desensitizasyon tedavisi alan; (AD -), aspirin desensitizasyon tedavisi almayan; AKT, astım kontrol testi; KRSwNP, KRS'li nazal polip; iKS, inhaler glukokortikoid; LABA, long-acting β 2 agonist; LTRA, Lökotrien reseptör

antagonist; na, uygulanabilir olmayan ° Medyan (25-75 çeyrekler arası) • Ortalama ± Standart sapma (SD) * P <.05

Yaş, cinsiyet ve atopik durum açısından 4 grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır. AD tedavisi alan ve almayan N-ERD'li hastalarda ve astımlı hastalarda astım şiddeti benzerdir ve Astım Kontrol Test (AKT) sonuçlarına göre çoğunun kısmi kontrollü astımları vardır. N-ERD'li hastaların neredeyse tümü nazal polip olan KRS tanısı almıştır (n=30). Ayrıca, N-ERD'li hastaların tamamının NSAİİ duyarlılık süreleri benzerdir. Total IgE seviyeleri sağlıklı kontrollere göre N-ERD hastalarında anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (p=0,002). 4 grubun toplam nötrofil ve platelet sayılarında ve yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Ancak, sağlıklı kontrollere kıyasla N-ERD'li hastaların hem eozinofil sayıları (p=0,006) hem de eozinofil yüzdeleri (p=0,004) anlamlı olarak daha yüksektir.

Katılımcılara ait SF-36 ve SNOT-22 anket sonuçları Tablo 4.2'de yer almaktadır.

Tablo 4.2. SF-36 ve SNOT-22 anket sonuçları.

SF-36 / SNOT-22	N-ERD (AD +) n=16	N-ERD (AD -) n=15	ASTIM n=15	SAĞLIKLI KONTROL n=15	p
SF-36 Skor					
Fiziksel Fonksiyon	65.00 (46.25-85.00)	75.00 (40.00-90.00)	75.00 (55.00-90.00)	95.00 (90.00-100.00)	.002*
Fiziksel Rol	100.00 (31.25-100.00)	50.00 (.00-75.00)	100.00 (50.00-100.00)	100.00 (75.00-100.00)	.050
Emosyonel Rol	66.67 (33.33-66.67)	33.33 (33.33-100.00)	66.67 (33.33-66.67)	66.67 (66.67-100.00)	.059
Vitalite	56.25 (37.50-62.50)	50.00 (37.50-75.00)	62.50 (37.50-75.00)	62.50 (50.00-75.00)	.411
Ruhsal Sağlık	59.45 (43.75-79.75)	62.50 (43.75-75.00)	56.25 (43.75-75.00)	68.75 (62.50-81.25)	.313
Sosyal İşlevsellik	75.00 (50.00-100.00)	75.00 (50.00-100.00)	50.00 (25.00-100.00)	100.00 (75.00-100.00)	.203
Genel Sağlık	40.00 (30.00-60.00)	45.00 (20.00-50.00)	50.00 (35.00-55.00)	70.00 (65.00-85.00)	.001*
Vücut Ağrısı	77.50 (45.00-90.00)	57.50 (45.00-100.00)	70.00 (35.00-100.00)	80.00 (67.50-100.00)	.315
SNOT-22 Skor	44.00 (20.50-66.25)	57.00 (23.00-66.00)	37.00 (24.00-59.00)	6.00 (1.00-24.00)	.003*

N-ERD, nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlarla alevlenen hava yolu hastalığı; (AD+), aspirin desensitizasyon tedavisi alan; (AD -), aspirin desensitizasyon tedavisi almayan; SF-36, Kısa form-36; SNOT-22, Sinonazal Obstrüksiyon Testi. Veriler, Medyan (25-75 çeyrekler arası) olarak gösterilmiştir. * P <.05

SF-36 yaşam kalite ölçeğinde yer alan “genel sağlık” (p=0,001) ve “fiziksel fonksiyon” (p=0,002) parametreleri N-ERD'li hastalara kıyasla sağlıklı kişilerde anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

Katılımcıların doldurdıkları SNOT-22 anket sonuçlarına göre ise, AD tedavisi almayan N-ERD'li hasta grubunun [medyan 57 (23,0-66,0)] skoru AD tedavisi alan hasta grubuna

[medyan 44 (20,50-66,25)] kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, AD tedavisi ile ilişkilendirilebilir.

4.2. ELISA Sonuçları

Tez çalışmasında platelet-lökosit kümelerinin oluşumuna ve platelet aktivasyonuna etkisi olan sP-selektin (CD62P), CD40L, RANTES, Platelet Faktör 4 (PF4), PAF, GM-CSF, TXA2, 12-HETE, 20-HETE, PGD2, PGE2 ve uLTE4 moleküllerinin seviyeleri ELISA yöntemiyle tayin edilmiştir.

Dört gruba (toplamda 61 katılımcı) ait plazma örnekleri -80 °C dondurucuda muhafaza edilmiştir. ELISA deneylerinin optimizasyonu sırasında örnekler için gerekli sulandırmalar yapılmıştır. Tüm örnekler ve standartlar üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir.

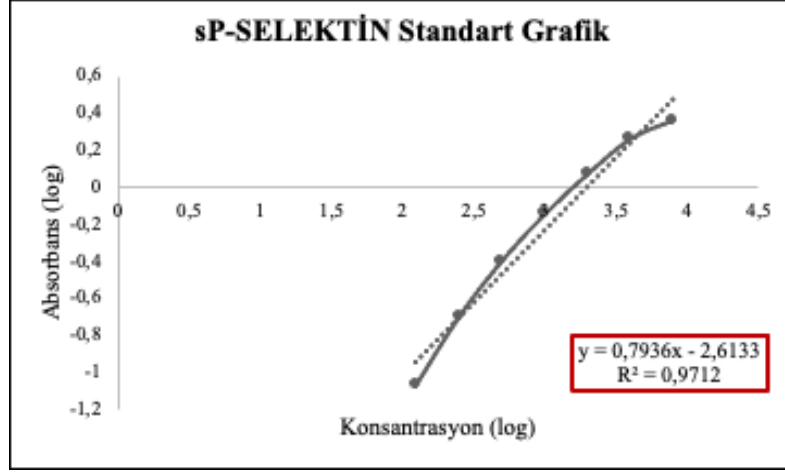
Tablo 4.3. N-ERD patogenezi ile ilişkili olduğu düşünülen moleküllerin ELISA analiz sonuçları

ELISA	N-ERD (AD +) n=16	N-ERD (AD -) n=15	ASTİM n=15	SAĞLIKLI KONTROL n=15	P
sP-Selektin (pg/mL)	34386.8 (25983.4-43379.9)	40731.3 (32990.6-106702.0)	86059.9 (54032.9-105257.4)	40214.33 (139606.8-40214.3)	.012*
CD40L (pg/mL)	447.51±511.19	341.01±343.49	583.04±528.22	557.65±501.02	.492
PF4 (pg/mL)	426059.1 (135905.8-785834.7)	1690094.2 (463727.7-5353097.3)	3025744.7 (1286068.8-3340746.3)	670025.0 (260429.9-1271084.9)	.003*
PAF (pg/mL)	1187.21±971.00	907.33±965.70	1338.81±92.28	1362.46±1142.06	.597
TXA2 (pg/mL)	415.40±75.53	455.36±148.71	513.86±151.96	474.88±110.67	.185
RANTES (pg/mL)	8093.06 (47.57.23-11179.79)	18651.1 (4837.8-23666.2)	24335.37 (15755.93-27160.08)	13326.19 (7417.52-21927.92)	.001*
PGD2 (pg/mL)	75.45 (59.43-89.48)	60.56 (51.06-81.37)	95.57 (63.89-142.80)	44.31 (39.17-62.46)	.000*
PGE2 (pg/mL)	19.03 (14.39-23.95)	48.18 (36.33-157.98)	276.90 (33.04-397.01)	69.47 (39.80-145-90)	.000*
12-HETE (pg/mL)	2445.46 (1072.72-4568.31)	4129.86 (2802.94-102049.20)	25884.26 (3456.74-36598.24)	4212.01 (2442.35-9049.16)	.003*
uLTE4 (pg/mg Cr)	70.47 (52.51-135.32)	59.55 (33.26-85.06)	53.42 (42.97-80.60)	46.40 (35.75-56.85)	.050*

N-ERD, nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlarla alevlenen hava yolu hastalığı; (AD+), aspirin desensitizasyon tedavisi alan; (AD -), aspirin desensitizasyon tedavisi almayan; Veriler, Medyan (çeyrekler arası) olarak gösterilmiştir (CD40L, PAF ve TXA2'nin plazma seviyeleri Ortalama ± Standart sapma (SD) olarak verilmiştir). * P <.05

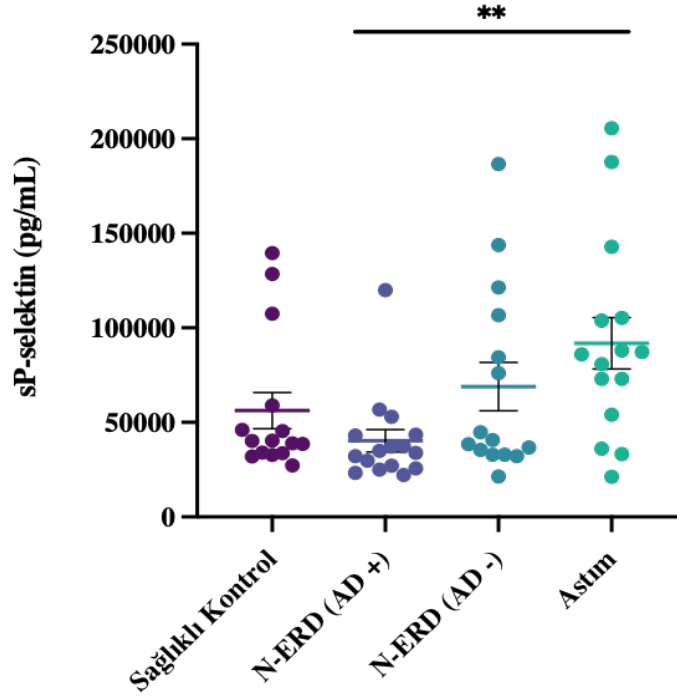
4.2.1. sP-selektin (CD62P) ELISA Sonuçları

Tüm reaktifler ve çalışma standartları kit içerisinde belirtilen protokollere göre hazırlanmış olup sP-selektin için elde edilen standart grafik Şekil 4.1'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. sP-selektin ELISA deneyine ait standart grafik.

AD tedavisi almayan N-ERD hasta grubunda plazma sP-selektin seviyeleri [medyan 40731,3 (32990,6-106702,0) pg/mL], AD tedavisi alan N-ERD hasta grubundan [medyan 34386,8 (25983,4-43379,9) pg/mL] daha yüksek çıkmıştır ancak istatistik olarak anlamlı değildir (Şekil 4.2). Ayrıca, AD tedavisi alan N-ERD hastaları ile sağlıklı kontroller karşılaştırıldığında sP-selektin plazma seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Bu durum AD tedavisinin başarısı ile ilişkilendirilebilir.



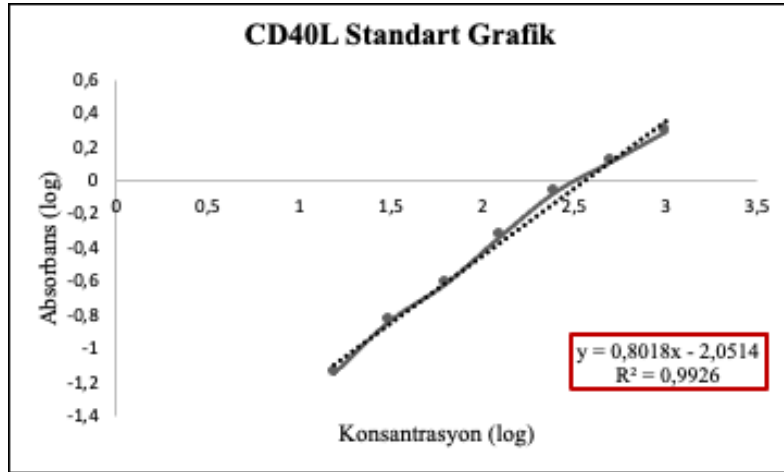
Şekil 4.2. Çalışma gruplarındaki sP-selektin molekülünün seviyeleri.

(n=61; **P < .01)

CD2P olarak bilinen sP-selektin, N-ERD hastalarında meydana gelen CysLT üretiminden sorumlu anahtar bir molekül olarak gösterilmektedir [73]. Özellikle, plateletlerin sP-selektin ve PSGL-1 arasındaki etkileşim yoluyla eozinofillere bağlandığı ve akciğerlerdeki eozinofil göçüne aracılık etmek için platelet-lökosit kümeleri oluşturduğu bilinmektedir. Böylece P-selektin molekülü eozinofilik hava yolu inflamasyonunu bu etkileşim ile etkilemektedir [124]. Hücre adezyon molekülü olan sP-selektin'in yapılan çalışmamızla N-ERD hasta profilindeki seviyeleri istatistiksel olarak anlam kazanmasa da seviyelerinde küçük bir artış tespit edilmiştir. Elde edilen bu artışın N-ERD patogenezindeki plateletlerin aktive olmalarından kaynaklanabileceği ve bu nedenle platelet-lökosit kümeleşmesine etki edebileceği düşünülmektedir. Ayrıca, çalışmamızda astımlı hastalarda plazma sP-selektin seviyelerinde [medyan 86059,9 (54032,9-105257,4) pg/mL] anlamlı bir artış gözlenmiştir (P <.01). Astımlı hastalarda plateletlerin akciğer dokusuna göç ederek hava yolu yeniden şekillenmesine katkıda bulunduğu bilinmektedir [125]. Bu nedenle, astımlı hastalardaki yüksek sP-selektin seviyesi, platelet aktivasyonu ile ilişkili hava yolu yeniden yapılanmasıyla ilişkilendirilmiştir.

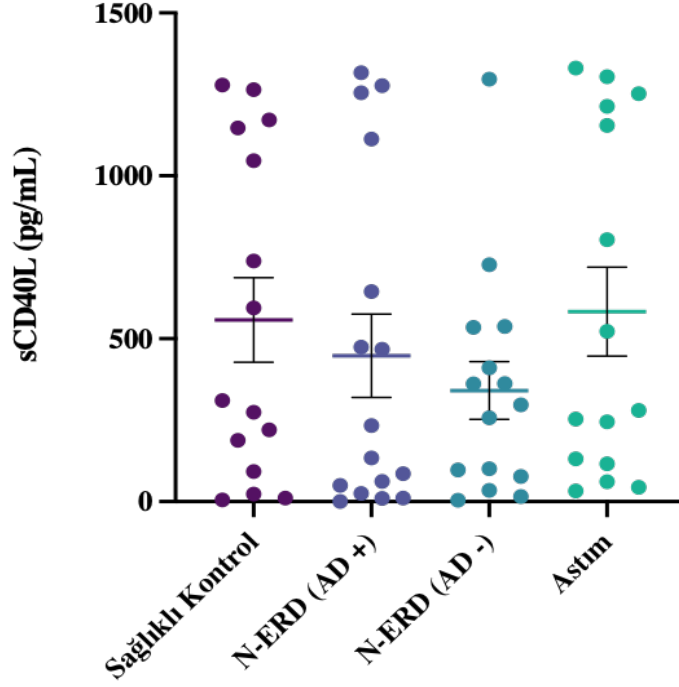
4.2.2 CD40L ELISA Sonuçları

Ölçümler için kit içerisinde yer alan protokoller temel alınmıştır. CD40L için elde edilen standart grafik Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3. CD40L ELISA deneyine ait standart grafik.

Yapılan deneyler sonucunda CD40L molekülünün gruplar arasındaki protein seviyelerinde anlamlı bir değişiklik bulunamamıştır (Şekil 4.4).

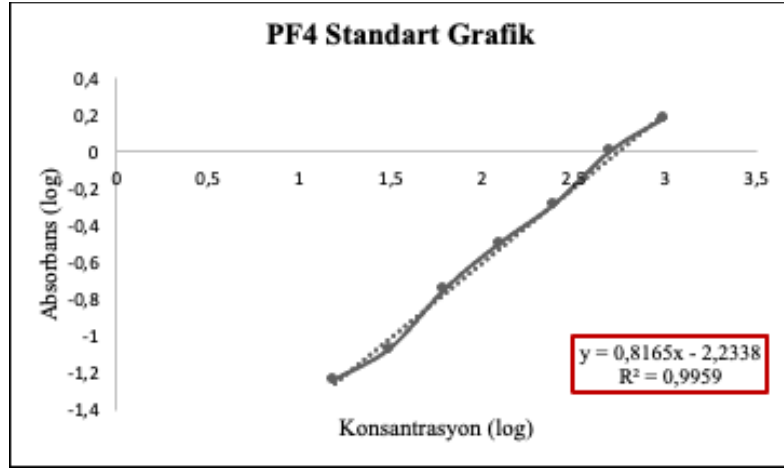


Şekil 4.4. Çalışma gruplarındaki CD40L molekülünün seviyeleri. (n=61)

CD40L, tam olarak tanımlanamayan bir süreçle aktive olan plateletlerin yüzeylerinden zamana bağlı bir şekilde salınır ve CD40L-CD40 etkileşimi ile dolaşımdaki lökositler ile küme oluşturma eğilimindedir [126]. Bu nedenle CD40L'nin N-ERD patogenezindeki platelet-lökosit kümeleşmesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Plateletlerdeki yüzey belirteçlerinden olan CD40L'nin ATA hastalarına kıyasla N-ERD hastalarının plazmalarında anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir [96]. Ancak bu sonuçlar, aspirin provokasyon testi ile duyarlılığı kanıtlanmış olan hastaların 0-1, 1-3, 3-6 ve 9-24. saatlerinde alınan kan örneklerinden yapılmış olup küçük hasta popülasyonlarında çalışılmıştır. Mitsui ve arkadaşları ise, platelet aktivasyonu ile ilişkilendirilen CD40L'nin aspirin yükleme testi sırasında değişmediğini ve ATA hastalarına göre N-ERD hastalarında anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermişlerdir [73]. Ancak aynı araştırma ekibinin bir başka çalışmasında hem N-ERD hem de ATA hastalarında CD40L plazma seviyelerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bunun bir nedeni olarak aspirinin neden olduğu reaksiyonun erken evresinde platelet aktivasyonunun meydana gelmediği öne sürülmektedir [96]. Sağlıklı gönüllüler ile yapılan bir çalışmada ise 1 haftalık düşük doz aspirinin hem plazma hem de serumda CD40L seviyesini düşürdüğü görülmüştür [127].

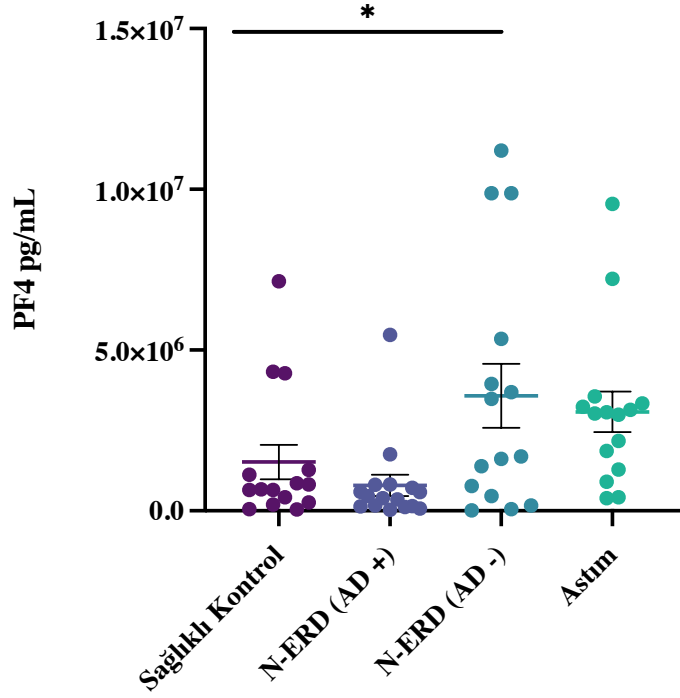
4.2.3. PF4 ELISA Sonuçları

Çalışma standartları kit içerisinde belirtilen prosedürlere göre hazırlanmış olup PF4 için elde edilen standart grafik Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. PF4 ELISA deneyine ait standart grafik.

Çalışmamızda, PF4 molekülünün sağlıklı kontrollere [medyan 670025,0 (260429,9-1271084,9) pg/mL] ve AD tedavisi alan N-ERD hastalarına [medyan 426059,1 (135905,8-785834,7) pg/mL] kıyasla AD tedavisi almamış N-ERD grubunda [medyan 1690094,2 (463727,7-535309,3) pg/mL] daha yüksek seviyelerde olduğu bulunmuştur (P <.05) (Şekil 4.6).



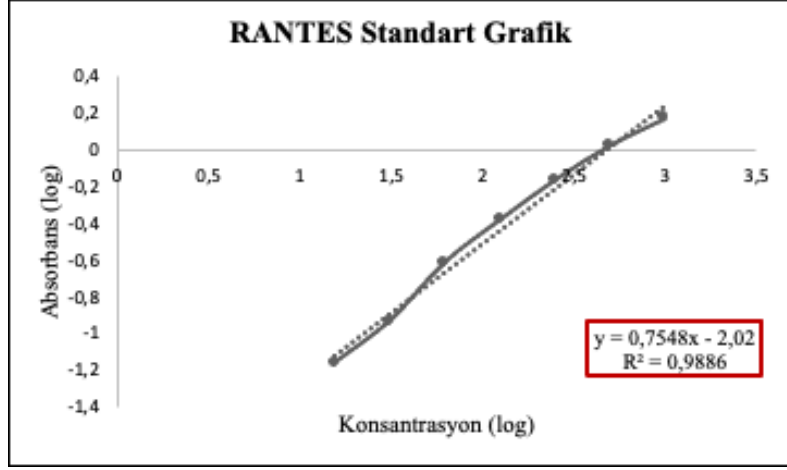
Şekil 4.6. Çalışma gruplarındaki PF4 molekülünün seviyeleri.

(n=61; *P < .05)

Platelet aktivasyonunun alerjik astımdaki rolü ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Platelet aktivasyon belirteçlerinden olan PF4'ün plazma seviyelerinin astımlı hastalarda yüksek düzeylerde olduğu bilinmektedir [75]. Literatüre uygun olarak, çalışmamızda da astımlı hastalarda oldukça yüksek seviyelerde bulunmuştur [medyan 3025744,7 (1286068,8-3340746,3) pg/mL]. Başka bir çalışmada ise, alerjik astım hastalarının ev tozu akarı alerjenine maruziyeti, periferik kan plateletlerinin aktivasyonu ile sonuçlanmıştır ve bu aktivasyon, plazma PF4 seviyesindeki artışla gösterilmiştir [128]. Ayrıca, polene bağlı mevsimsel alerjik rinit ve astımı olan hastalarda, plazma PF4 seviyesi bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır [129]. PF4 molekülünün alerjik astımdaki rolüyle ilişkili literatür bilgisine karşın, N-ERD patogenezinde bronşların daralmasına, nötrofillerin ve eozinofillerin aktivasyonuna sebebiyet verebileceği bildirilmiştir. Ancak, elde edilen veriler PF4 molekülünün N-ERD patogenezindeki yerini aydınlatmada yetersiz kalmaktadır.

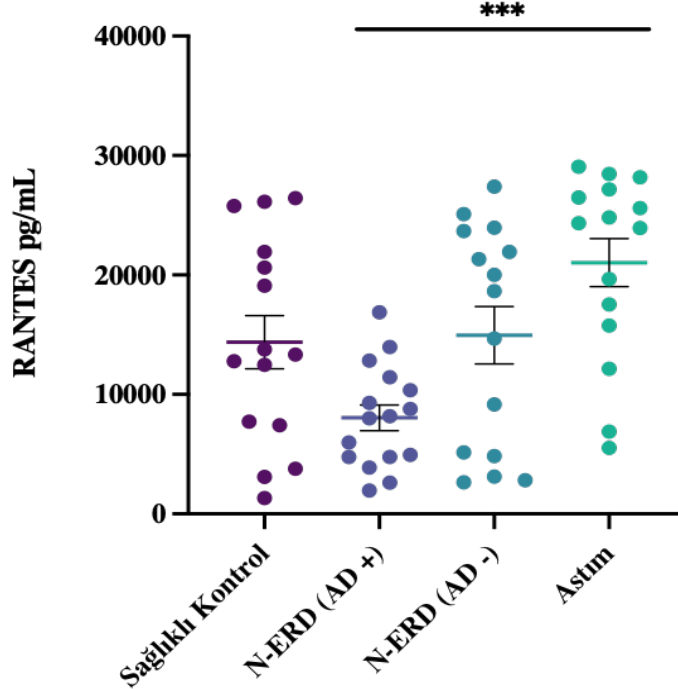
4.2.4. RANTES ELISA Sonuçları

RANTES için elde edilen standart grafik Şekil 4.7'de yer almaktadır.



Şekil 4.7. RANTES ELISA deneyine ait standart grafik.

RANTES ELISA sonuçları, AD tedavisi almayan N-ERD hasta grubunun plazma RANTES seviyelerinin [medyan 18651,1 (4837,8-23666,2) pg/mL], AD tedavisi alan N-ERD hasta grubundan [medyan 8093,06 (4757,23-11179,79) pg/mL] ve sağlıklı kontrollerden [medyan 13326,19 (7417,52-21927,92) pg/mL] daha yüksek olduğu görülmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.8). Ayrıca, astımlı hastaların plazma RANTES seviyelerinde de anlamlı bir artış gözlenmiştir ($P < .001$).



Şekil 4.8. Çalışma gruplarındaki RANTES molekülünün seviyeleri.

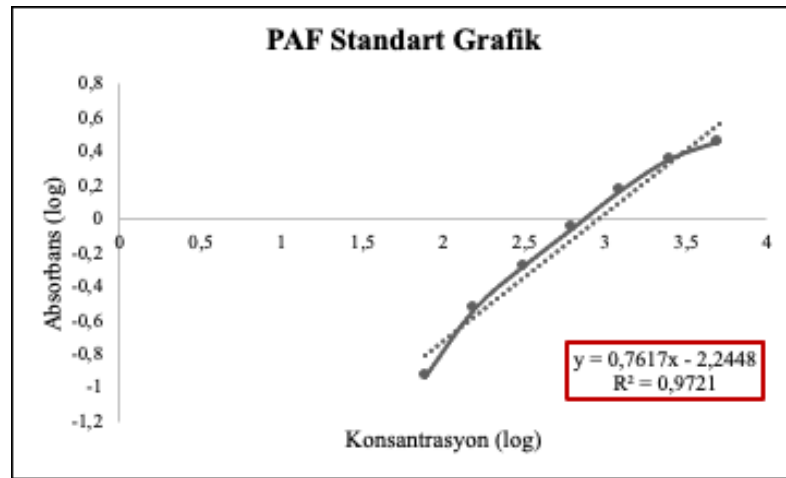
(n=61; *** $P < .001$)

Literatürde polipozis, astım, aspirin intoleransı gibi durumlarda etkili kemokin faktörlerinden biri olan RANTES molekülünün inflamasyon bölgesinde inflamatuvar hücreleri tarafından yoğun bir şekilde üretildiği bilinmektedir [130]. Bu nedenle, RANTES'in hem alerjik hem de alerjik olmayan nazal poliplerde yüksek miktarlarda üretildiği bildirilmiştir [131]. Başka bir çalışmada ise, N-ERD hastalarının nazal sıvılarında RANTES salınımının aspirin provokasyonundan sonra arttığı tespit edilmiştir [132].

N-ERD hastalarında eozinofil aktivasyonu ile ilişkilendirilen RANTES ifadesinin N-ERD hasta profilinde yüksek olduğu ve hastalık patofizyolojisiyle ilişkisi gösterilmiştir [133]. Ancak, RANTES'in N-ERD ve ATA hastalarında astım fenotiplerini ayırt etmede tek başına yeterli olmadığı düşünülmektedir.

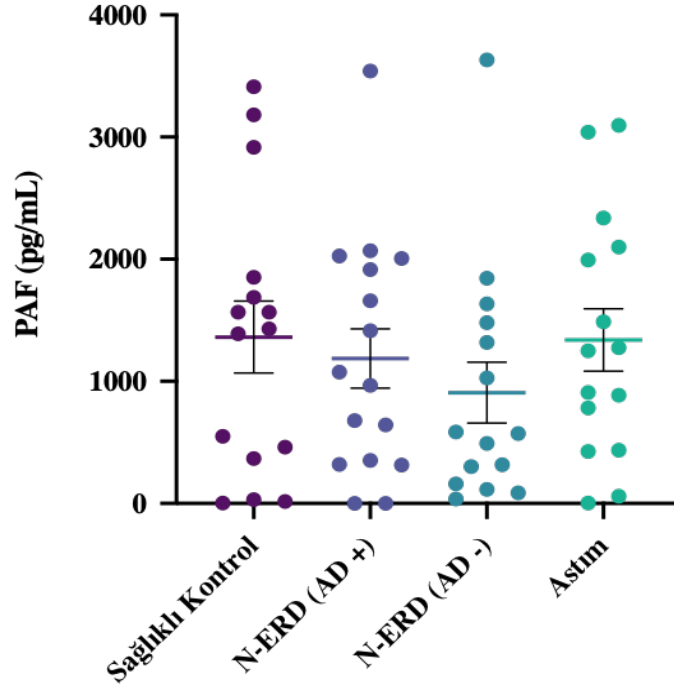
4.2.5. PAF ELISA Sonuçları

Tüm solüsyonlar ve standartlar kit içerisinde yer alan prosedürlere göre yapılmıştır. PAF için elde edilen standart grafik Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. PAF ELISA deneyine ait standart grafik.

Aktive plateletler tarafından salınan PAF'ın analizinde gruplar arasında istatistiksel anlam bulunamamıştır (Şekil 4.10).

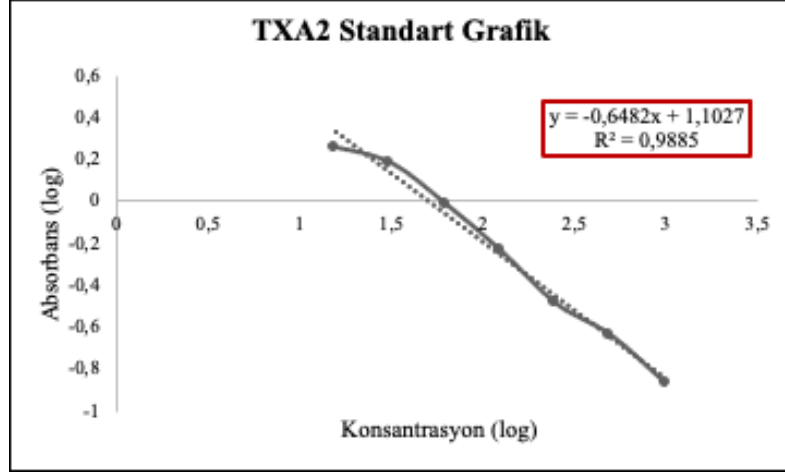


Şekil 4.10. Çalışma gruplarındaki PAF molekülünün seviyeleri. (n=61)

PAF molekülünün astım patofizyolojisinde hava yolu aşırı duyarlılığına, bronşların daralmasına ve mukus hipersekresyonuna sebebiyet verdiği bildirilmiştir [134]. Son yıllarda yapılan bir çalışmada, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında PAF protein seviyelerinin kronik spontan ürtikeri olan hastalarda daha yüksek düzeylere çıktığı tespit edilmiştir [135]. Ayrıca, PAF molekülünün N-ERD hastalarında bronşların daralmasına, plateletlerden TXA2 ve eozinofillerden LTC4 salınımına sebebiyet verebileceği rapor edilmiştir [75]. N-ERD hastalarından izole edilen plateletlerin, PAF ile aktive edildiğinde, sağlıklı kontrollerden alınan plateletlere göre yaklaşık iki kat daha fazla ATP ürettiği ve yalnızca N-ERD'li hastalardan alınan plateletlerde TXB2 salınımında önemli bir artışa neden olduğu bildirilmiştir. Ancak, bu bulguların altında yatan moleküler mekanizmalar netlik kazanmamıştır [136]. Literatür sonuçları, PAF'ı astım ve anafilaksi ile ilişkilendirmesine rağmen, N-ERD patogenezindeki verileri sınırlı sayıda kalmaktadır.

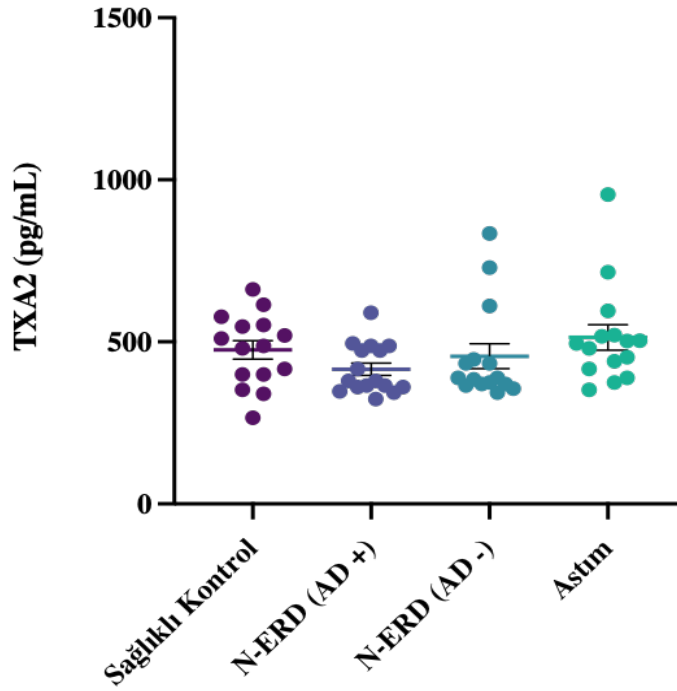
4.2.6. TXA2 ELISA Sonuçları

Çalışma standartları kit içerisinde belirtilen talimatlara göre hazırlanmış olup TXA2 için elde edilen standart grafik Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11. TXA2 ELISA deneyine ait standart grafiği.

Araşidonik asit metabolitlerinden olan TXA2'nin gruplar arasındaki protein sonuçları istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (Şekil 4.12).



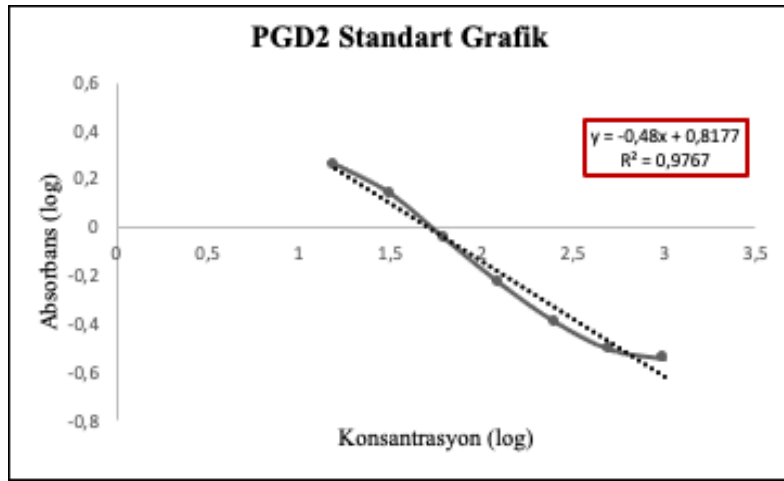
Şekil 4.12. Çalışma gruplarındaki TXA2 molekülünün seviyeleri. (n=61)

COX tarafından indüklenen pro-inflamatuvar bir prostanoit olan TXA2, platelet aktivasyonu ve kümeleşmesi ile lökosit kemoatraksiyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan araştırmalar, plateletler tarafından üretilen TXA2'nin aspirin gibi NSAİİ'ler üzerinde doğrudan etkileri olduğunu bildirmektedir [137]. Ek olarak, PGD2'ye benzer şekilde, TXA2'nin aşırı üretiminin N-ERD patogenezi ile ilişkili olduğu

gösterilmiştir [113]. Laidlaw ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada TXA2 metabolitlerinin, ATA hastalarına kıyasla N-ERD'li hastaların BAL sıvılarında daha yüksek seviyede bulunduğu bildirilmiştir [33]. Ayrıca, TXA2 molekülünün N-ERD hastalarında, özellikle tedavi olarak AD tedavisini tolere edemeyenlerde daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir [40]. Ancak, TXA2'nin N-ERD patogenezi üzerindeki platelet-nötrofil kümeleşmesine etkisi halen netlik kazanmamıştır [113].

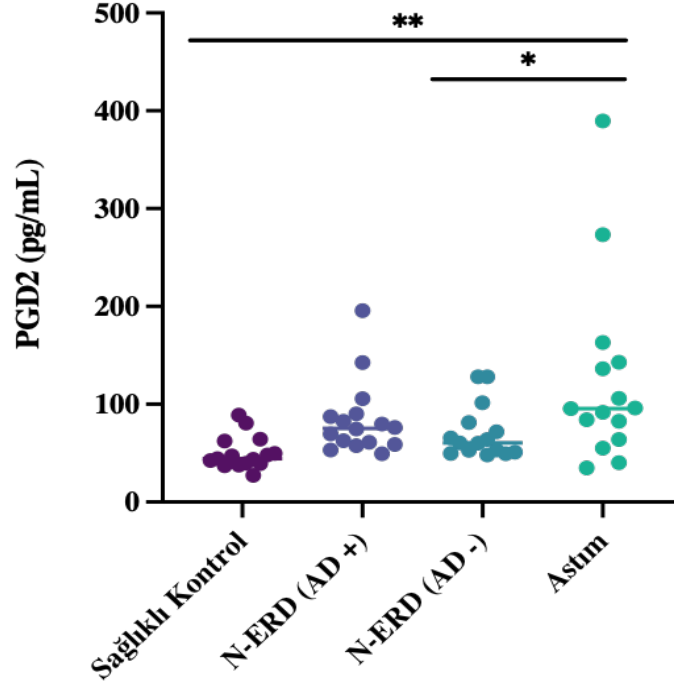
4.2.7. PGD2 ELISA Sonuçları

Ölçümler için kit içerisinde yer alan protokollere bağlı kalınmıştır. PGD2 için elde edilen standart grafik Şekil 4.13'te verilmiştir.



Şekil 4.13. PGD2 ELISA deneyine ait standart grafiği.

Yapılan deneyler sonucunda, AD tedavisi almış [medyan 75,45 (59,43-89,48) pg/mL] ve almamış N-ERD gruplarının [medyan 60,56 (51,06-81,37) pg/mL] ve astım grubunun plazma PGD2 seviyelerinin [medyan 95,57 (63,89-142,80) pg/mL] sağlıklı kontrollere [medyan 44,31 (39,17-62,46) pg/mL] kıyasla daha yüksek seviyelerde çıktığı saptanmıştır (Şekil 4.14).



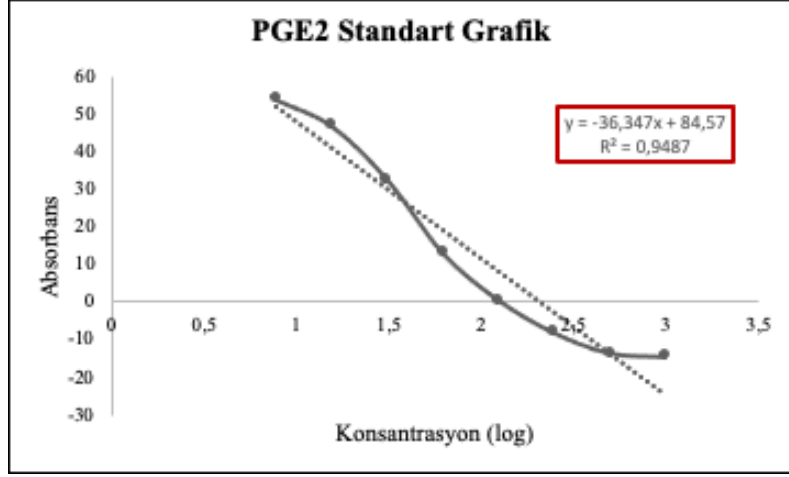
Şekil 4.14. Çalışma gruplarındaki PGD2 molekülünün seviyeleri.

(n=61; *P < .05, **P < .01)

COX türevli bir metabolit olan PGD2, N-ERD patogeneğinde aşırı ifade olması ile bilinmektedir [54]. Son dönemde yapılan araştırmalar, PGD2 seviyelerinin N-ERD'de yüksek olmakla birlikte, desensitizasyonda daha da arttığını ve ardından günlük aspirin tedavisi sırasında belirgin şekilde azaldığını göstermiştir [117]. Ayrıca, PGD2'nin özellikle şiddetli astımda sayısının arttığı ve astımlı akciğerinin düzensiz işlevinin bir göstergesi olduğu bildirilmiştir [138]. Başka bir çalışma ile, sağlıklı kontrollere göre astımlı hastaların PGD2 ve metabolitlerine karşı daha duyarlı olduğu gösterilmiştir [40]. Lee ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, N-ERD ve astımlı bireylerdeki plazma PGD2 seviyesinin sağlıklı kontrollere göre artış gösterdiği ve bu seviyenin astımlılarda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [139]. Buna ek olarak, şiddetli astımda PGD2 seviyesinin yükseldiği ve buna bağlı olarak belirgin eozinofil ve mast hücre aktivasyonu görüldüğü bildirilmiştir [98]. PGD2, bir COX ürünü olmasına rağmen N-ERD hastalarındaki beklenmedik artışının sebebi halen bilinmemektedir.

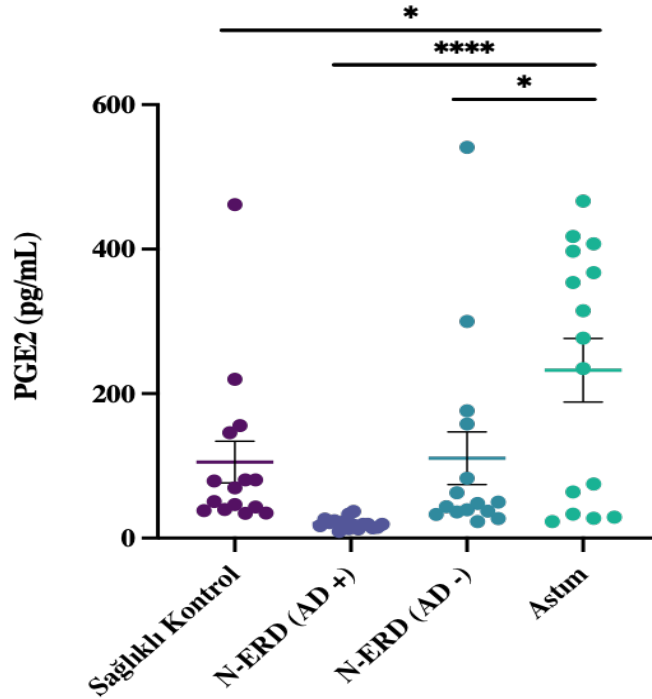
4.2.8. PGE2 ELISA Sonuçları

Çalışma standartları kit içerisinde belirtilen protokollere göre hazırlanmıştır. PGE2 için elde edilen standart grafik Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.15. PGE2 ELISA deneyine ait standart grafik.

Yapılan analizler sonucunda, PGE2 molekülünün AD tedavisi alan N-ERD grubunda anlamlı olarak düşük seviyelerde olduğu görülmüştür ($P < .0001$). Ayrıca, plazma PGE2 seviyelerinin sağlıklı hastalara kıyasla [medyan 69,47 (39,80-145,90) pg/mL] hem AD tedavisi almış N-ERD grubunda [medyan 19,03 (14,39-23,95) pg/mL] hem de AD tedavisi almamış N-ERD grubunda [medyan 48,18 (36,33-157,98) pg/mL] oldukça düşük çıktığı görülmüştür (Şekil 4.16). Ayrıca, astımlı hastaların plazma PGE2 seviyelerinde de anlamlı bir artış gözlenmiştir [medyan 276,90 (33,04-397,01) pg/mL].



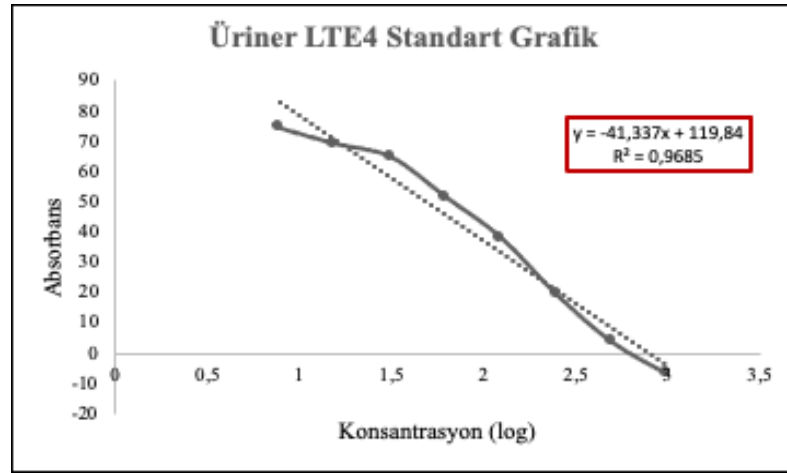
Şekil 4.16. Çalışma gruplarındaki PGE2 molekülünün seviyeleri.

(n=61; * $P < .05$, **** $P < .0001$)

PGD2'nin aksine, N-ERD'deki PGE2 seviyelerinin periferik kan hücrelerinde çok düşük seviyelerde olduğu bilinmektedir [140]. PGE2 molekülü sinyal verdiği reseptöre bağlı olarak anti-inflamatuvar veya pro-inflamatuvar özellik sergilemektedir [141]. N-ERD patogenezinde PGE2 üretimi, EP2 reseptörü ifadesinin azalması veya PGE2 / EP2 sinyalleşmesindeki düzensizlikten kaynaklı oldukça düşük seviyelerdedir [44]. PGE2 üretimindeki bu dengesizlik 5-LO aktivasyonuna ve mast hücre stimülasyonuna yol açmaktadır. PGE2 biyosentezi, COX-1'i inhibe eden herhangi bir NSAİİ tarafından durdurulduğunda, LTC4 ve PGD2 salınımı ile mast hücrelerinin degranülasyonu meydana gelmektedir [142]. Düşük PGE2 seviyeleri, araşidonik asit metabolizması yolunun lökotrien sentezine doğru kaymasına katkıda bulunmaktadır [113].

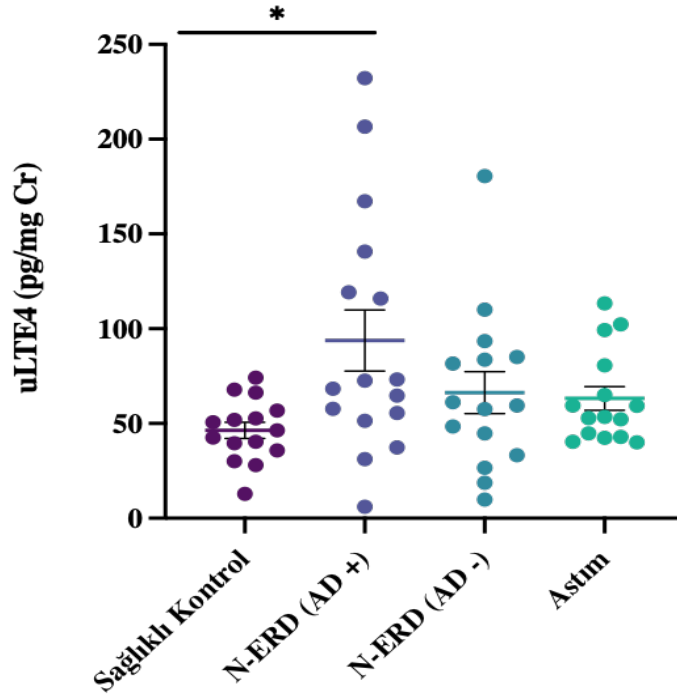
4.2.9. Üriner LTE4 ELISA Sonuçları

Yapılan deneyler sonucunda LTE4 için elde edilen standart grafik Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.17. Üriner LTE4 ELISA deneyine ait standart grafik.

Üriner LTE4 seviyesinin, sağlıklı kontrollere [medyan 46,40 (35,75-56,85) pg/mL] göre AD tedavisi alan N-ERD hasta grubundaki sonuçlarında [medyan 70,47 (52,51-135,32) pg/mL] istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemlenmiştir ($P < .05$) (Şekil 4.18). Bu değişim literatürdeki diğer çalışmalar ile uyumludur. Ayrıca, AD tedavisinin NERD hastaları arasında anlamlı bir farka neden olmadığı tespit edilmiştir.

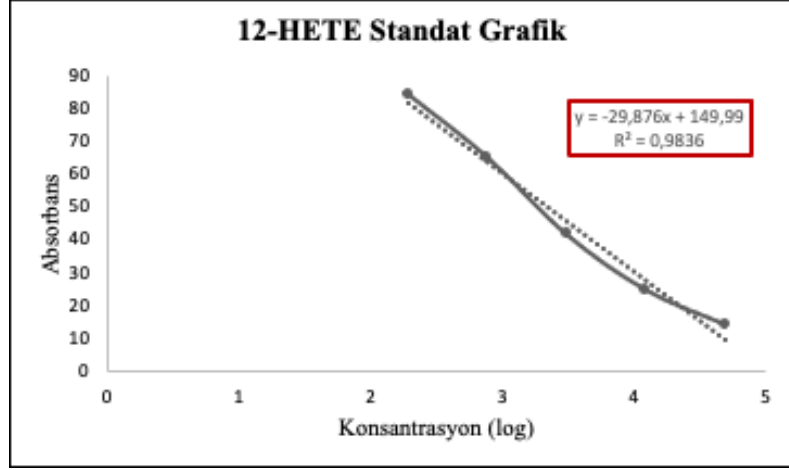


Şekil 4.18. Çalışma gruplarındaki uLTE4 molekülünün seviyeleri. İdrar LTE4 seviyeleri, miligram kreatinin başına pikogram (pg/mg Cr) olarak gösterilmiştir. (n=61; *P < .05)

Üriner LTE4'ün, N-ERD tanısı için en güvenilir biyobelirteç olduğu bilinmektedir [2]. Birçok çalışma, N-ERD'li hastaların başlangıçtaki üriner LTE4 seviyelerinin daha yüksek olduğunu ve aynı zamanda NSAİİ alımından sonra ATA hastalarına göre idrar LTE4 seviyelerini daha fazla arttırdığını göstermişlerdir [143]. Son dönemde yapılan bir başka çalışma ise N-ERD hastalarına uygulanan aspirin tedavisinin üriner LTE4 düzeylerini arttırdığını göstermektedir [17]. Sonuç olarak, N-ERD'de artmış bazal LTE4 seviyeleri vardır ve bu LTE4 seviyeleri AD sonrası daha da artmaktadır. Cahill ve arkadaşları da, 8 hafta boyunca yüksek doz aspirin tedavisi alan N-ERD'li hastalarda idrar LTE4 düzeylerinin arttığını göstermişlerdir [118].

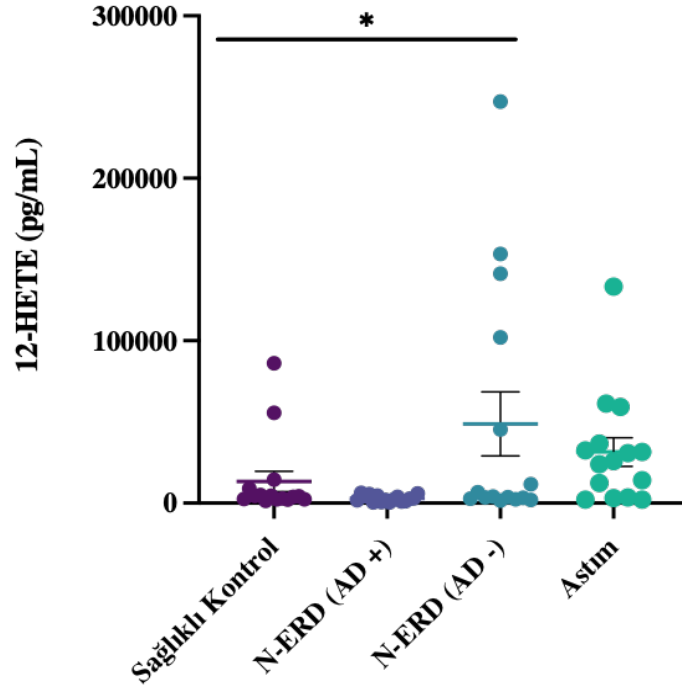
4.2.10. 12-HETE ELISA Sonuçları

Çalışma standartları kit içerisinde belirtilen protokollere göre hazırlanmış olup 12-HETE için elde edilen standart grafik Şekil 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.19. 12-HETE ELISA deneyine ait standart grafik.

Platelet aktivasyonu üzerine etkileri olan 12-HETE molekülünün, yapılan deneyler sonucunda AD tedavisi alan N-ERD hasta grubunda [medyan 2445,46 (1072,72-4568,31) pg/mL] oldukça düşük çıktığı görülmüştür. Ancak, AD tedavisi almamış hasta grubunda [medyan 4129,86 (2802,94-102049,20) pg/mL] anlamlı olarak daha yüksek seviyelerde tespit edilmiştir ($P < .05$) (Şekil 4.20). 12-HETE metabolitlerinin AD tedavisine farklı yanıtı, bu eikosanoidlerin N-ERD mekanizmasındaki olası bir etkisine işaret etmektedir.



Şekil 4.20. Çalışma gruplarındaki 12-HETE molekülünün seviyeleri (n=61; * $P < .05$).

Literatür çalışmaları 12-HETE metabolitinin sağlıklı kontrollere kıyasla astımlı hastalarda yüksek seviyelerde olduğunu kanıtlamıştır [144]. 12-HETE molekülünün N-ERD patogenezindeki rolü ise tartışmalı olup sağlıklı kontrollere kıyasla N-ERD hasta grubunda yüksek seviyelerde çıktığı bildirilmiştir [69]. Fakat, 12-HETE'nin N-ERD popülasyonlarında yapılan çalışmaları yetersiz kalmakla birlikte bu metabolitlerin platelet-nötrofil kümeleşmesine etkisi tam olarak bilinmemektedir.

4.2.11. 20-HETE ELISA Sonuçları

Tüm reaktifler ve standartlar kit içerisinde belirtilen protokollere göre hazırlanmıştır. Ancak, elde edilen deneyler sonucunda plazma örneklerinden protein analizi yapılamamıştır.

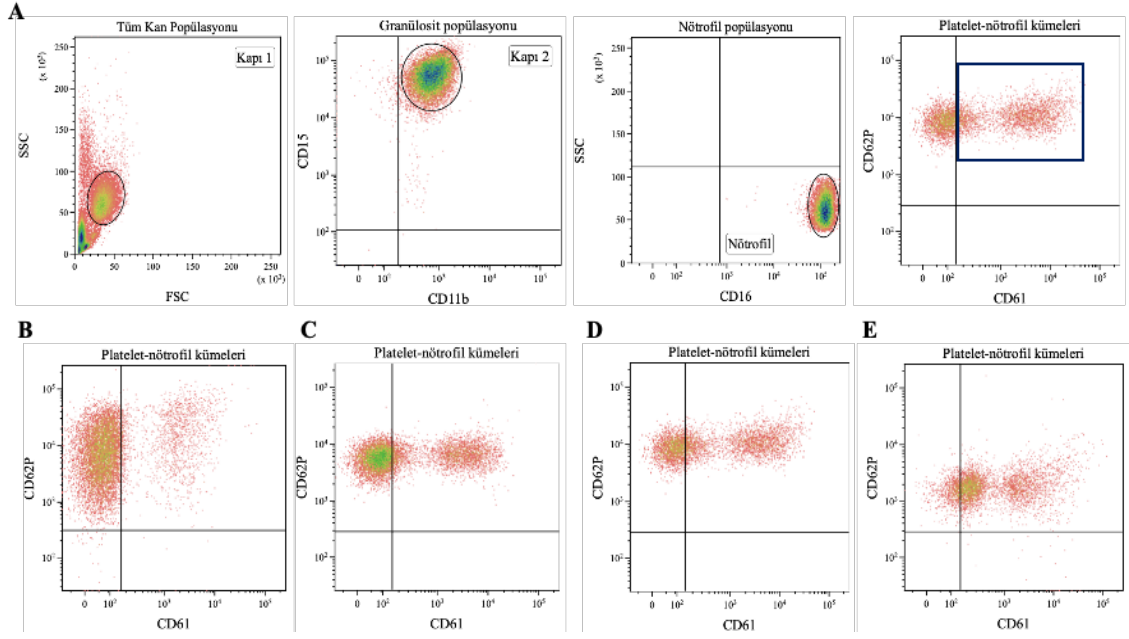
4.2.12. GM-CSF ELISA Sonuçları

Deneyler sonucunda GM-CSF'nin standart grafiği elde edilmiş ancak protein düzeyleri standart grafiğin altındaki seviyelerde kaldığı için seviyeleri ölçülememiştir. GM-CSF miktarının tespit aralığının altında olduğu sonucuna varılmıştır.

4.3. Platelet-Nötrofil Kümelerinin Akış Sitometri Sonuçları

Tez kapsamında platelet-nötrofil küme analizinde; plateletler için CD61 ve CD62P antikoru seçilmiş olup nötrofiller için ise CD11b, CD15 ve CD16 antikoru referans alınmıştır. CD62P, aktif plateletlerin özel bir belirteçidir ve nötrofillerin yüzeyinde CD62P antijeninin varlığı, platelet-nötrofil kümelerini gösterir. Platelet-nötrofil kümeleşmesini karakterize etmek için nötrofil kapısı tanımlanarak CD61(+)CD62P(+) nötrofil yüzdesi kullanılmıştır.

Akış sitometri deneyleri KALUZA programında analiz edilmiş ve her gruba ait kapılama stratejisi ve temsili analiz sonuçları Şekil 4.21'de verilmiştir.



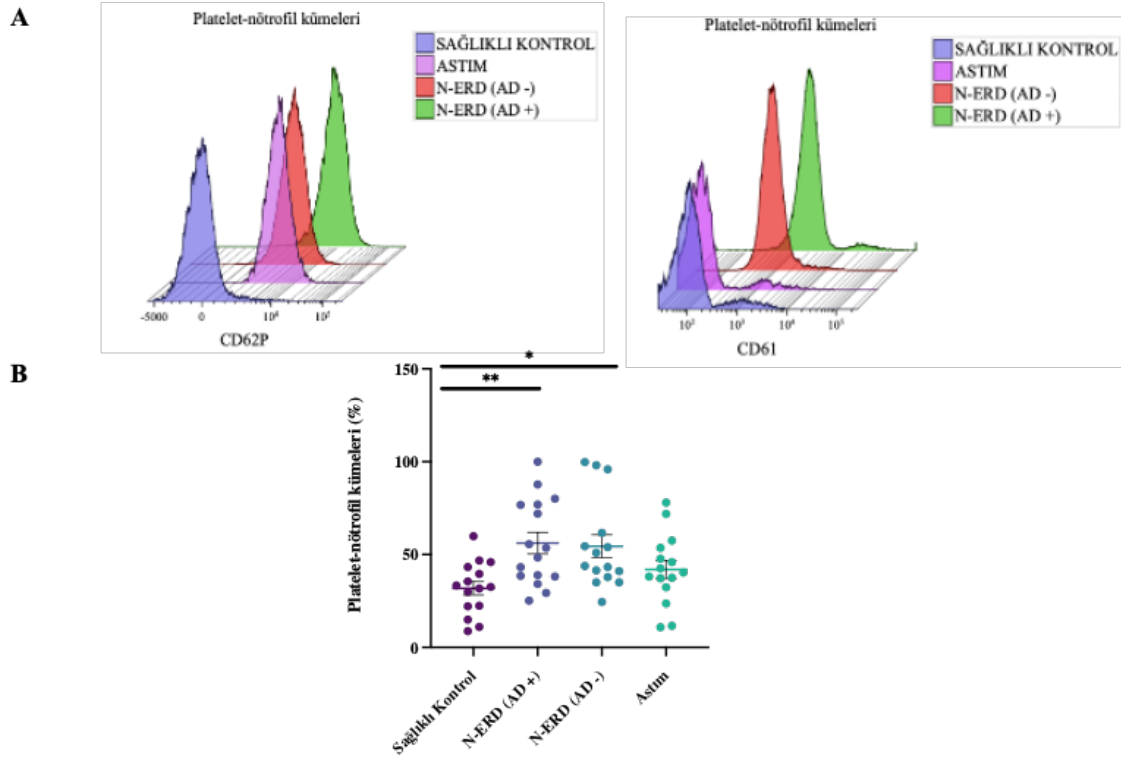
Şekil 4.21. Kapılama stratejisi ve gruplara ait temsili analiz sonuçları. (A) Tüm kan populasyonu tanımlanır. Granulosit populasyonu CD15(+)/CD11b(+) olarak doğrulanmıştır. Nötrofil populasyonu granulosit populasyonu üzerinden kapı alınarak (Kapı 2) CD16 (+) olarak gösterilmiştir. Nötrofil populasyonu üç antikor (CD15-CD11b-CD16) üzerinden tanımlanmıştır. Platelet-nötrofil kümeleri nötrofil kapısı üzerinden CD61(+)/CD62P(+) olarak gösterilmiştir. (B) Sağlıklı Kontrol (C) Astım (D) N-ERD (AD-) (E) N-ERD (AD+)

Analiz sonuçlarına göre, N-ERD hastalarında saptanan platelet-nötrofil kümeleri yüzdesi diğer gruplarda görülenlere göre anlamlı olarak daha yüksektir. Platelet-nötrofil kümelerinin yüzdeleri AD tedavisi alan N-ERD hastalarında [medyan 50,9 (38,3-76,8) %], AD tedavisi almayan hastalarda [medyan 43,8 (37,8-61,6) %]'dir. Astımlı hastalarda [medyan 40,3 (32,2-53,6) %] iken sağlıklı kontrollerde [medyan 32,5 (22,1-43,2) %] olarak bulunmuştur.

Laidlaw ve arkadaşları AD tedavisi alan N-ERD'li hastaların kanındaki platelete bağlı eozinofiller, nötrofiller ve monositlerin yüzdelerinin, ATA veya astımlı olmayan kontrollerden çok daha yüksek olduğunu göstermişlerdir [36]. Bir diğer çalışmada N-ERD hastalarının aspirin provokasyon testi yapıldıktan 24 saat sonra kanları toplanmış ve platelet-lökosit kümelerinin seviyelerine bakılmıştır. N-ERD'li hastaların kanındaki platelet-eozinofil kümelerinin yüzdeleri ATA hastalarına ve sağlıklı kontrollere göre yüksek çıkarken platelet-nötrofil kümelerinin seviyelerinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir [73]. Ayrıca, N-ERD'li hastaların dolaşımdaki eozinofillerinin neredeyse

%80'nin plateletlere yapıştığı saptanmıştır [75]. N-ERD hastalarının nazal poliplerinde plateletlerin lökositlerle küme halinde bulunduğu bildirilmiştir [124]. Literatür çalışmaları, N-ERD hastalarından alınan kan ve sinonazal dokulardaki platelet-nötrofil, eozinofil ve monositlerin yüzdesinin sağlıklı kontrollere kıyasla çok daha fazla olduğunu ve bu durumun üriner LTE4 seviyeleri ile ilişkili olduğunu rapor etmektedir [142]. Bunlara ek olarak, Laidlaw ve arkadaşları N-ERD hastalarında aspirine maruz kalmanın periferik kan platelet-lökosit küme sayılarını veya platelet aktivasyon durumunu önemli ölçüde değiştirmedığını göstermiştir. Ayrıca, günde 100 mg aspirin tedavisinin de platelet-lökosit kümeleşmesini azaltmadığı bildirilmiştir [120]. Ancak, hastalara platelet aktivasyon inhibitörü olan prasugrel ile ön tedavi uygulandığında, uLTE4 ve idrar PGD2 metabolit üretiminde azalma meydana geldiğinden bazal platelet-lökosit kümeleri daha yüksek olan bir hasta alt grubu tanımlanmıştır [145].

Yapılan analizler sonucunda, AD tedavisi alan ve almayan N-ERD'li hastaların kanındaki nötrofillere bağlı plateletlerin yüzdelerinin, astımlı ve sağlıklı kontrollerden çok daha yüksek çıktığı görülmüştür (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. (A) Gruplara ait temsili histogram sonuçları (B) Tüm katılımcılara ait platelet-nötrofil kümelerinin (CD61+CD62P+) yüzde sonuçları. (n=61; *P < .05, **P < .01 CD62P: Aktif platelet belirteci, CD61: Aktif olmayan platelet belirteci)

Yapılan deney sonucunda, AD tedavisi alan N-ERD hastalarının dolaşımdaki platelet-nötrofil kümelerini yüzdesi [medyan 50,9 (38,3-76,8) %] olarak gözükmektedir. AD tedavisi almayan N-ERD hastalarının platelet-nötrofil kümelerinin yüzdesi ise [medyan 43,8 (37,8-61,6) %] olarak analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, platelet-nötrofil kümelerinin yüzdeleri tüm gruplarda tanımlanmış olmasına rağmen AD tedavisi almış (P < .05) ve almamış (P < .01) N-ERD hastalarına kıyasla sağlıklı kontrollerde anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur.

4.4. Korelasyon Sonuçları

Tez çalışmasında, uLTE4 seviyeleri platelet-nötrofil kümelerinin yüzdesi ile pozitif korelasyon gösterdi (r=290 p=0,023) (Tablo 4.4). Sonuçlarımız, platelete bağlı lökositlerin yüzdesinin uLTE4 seviyeleri ile korele olduğunu gösteren Laidlaw ve arkadaşlarının sonuçlarıyla uyumludur [36]. Yapılan analizler sonucunda AD tedavisi alan N-ERD hasta grubundaki sP-selektin (r=540 p=0,031) ve PF4 (r=533 p=0,034) gibi platelet yüzey belirteçlerinin platelet-nötrofil kümeleri ile korele olduğu bulunmuştur (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Tüm katılımcılar arasında platelet-nötrofil kümelerinin N-ERD ile ilişkili moleküllerin seviyeleri ile korelasyonu.

	Platelet-nötrofil kümeleri									
	N-ERD (AD+)		N-ERD (AD -)		Astm		Sağlıklı Kontrol		Tüm Katılımcılar	
	r	p. değeri	r	p.değeri	r	p. değeri	r	p. değeri	r	p. değeri
uLTE4 (pg/mg Cr)	.147	.588	.196	.483	.314	.254	.754**	.001	.290*	.023
sP-selectin (pg/mL)	.540*	.031	.193	.491	-.329	.232	.289	.296	.030	.818
PF4 (pg/mL)	.533*	.034	-.100	.723	-.304	.271	-.132	.639	.028	.828
12-HETE (pg/mL)	-.276	.301	.282	.308	-.250	.369	.286	.302	.121	.352
RANTES (pg/mL)	.024	.930	.275	.321	-.171	.541	.136	.630	-.055	.674
PGD2 (pg/mL)	-.114	.674	-.239	.390	.407	.132	.100	.723	.045	.730
PGE2 (pg/mL)	.005	.985	.189	.499	-.250	.369	.400	.140	-.055	.674

n=61; *. Korelasyon 0,05 düzeyinde (2-kuyruklu) **. Korelasyon 0,01 düzeyinde (2-kuyruklu)

AD tedavisi alan N-ERD hasta grubunda uLTE4 seviyeleri platelet türevli 12-HETE molekülünün seviyeleri ile pozitif korelasyon gösterdi ($r=0,544$ $p=0,029$). (Tablo 4.5)

Tablo 4.5. N-ERD (AD+) hastalarında N-ERD ile ilişkili moleküllerin korelasyonu

	N-ERD (AD+)													
	uLTE4		sP-selectin		PF4		12-HETE		PGD2		PGE2		RANTES	
	r	p. değeri	r	p. değeri	r	p. değeri	r	p. değeri	r	p. değeri	r	p. değeri	r	p. değeri
uLTE4 (pg/mg Cr)	-		-.082	.762	.294	.269	.544*	.029	-.188	.485	-.053	.846	.332	.208
sP-selektin (pg/mL)	-.082	.762	-		.326	.217	.126	.641	.138	.610	.415	.110	.385	.141
PF4 (pg/mL)	.294	.269	.326	.217	-		.109	.688	-.062	.820	-.271	.311	.703**	.002
12-HETE (pg/mL)	.544*	.029	.126	.641	.109	.688	-		.241	.368	.124	.649	.335	.204
RANTES (pg/mL)	.332	.208	.385	.141	.703**	.002	.335	.204	.203	.451	.003	.991	-	
PGD2 (pg/mL)	-.188	.485	.138	.610	-.062	.820	.241	.368	-		-.032	.905	.203	.451
PGE2 (pg/mL)	-.053	.846	.415	.110	-.271	.311	.124	.649	-.032	.905	-		.003	.991

$n=16$; *. Korelasyon 0,05 düzeyinde (2-kuyruklu) **. Korelasyon 0,01 düzeyinde (2-kuyruklu)

Ayrıca, AD tedavisi alan N-ERD hastalarında, PF4 molekülü RANTES ile korele bulunmuştur ($r=0,703$ $p=0,002$). Hem PF4 hem de RANTES molekülü alerjik astımda eozinofil aktivasyonunda ve kemotaksisinde önemli rol oynamaktadır [75]. Bu durum, RANTES ve PF4'ün N-ERD hastalığında eozinofilik inflamasyonla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

AD tedavisi almayan N-ERD hasta grubunda ise, sP-selektin seviyeleri 12-HETE ($r=0,954$ $p=0,000$), RANTES ($r=0,739$ $p=0,002$) ve PGE2 ($r=0,679$ $p=0,005$) moleküllerinin seviyeleri ile pozitif korelasyon gösterdi. Ancak, PGD2 düzeyleri ile negatif korelasyon göstermiştir ($r=-0,518$ $p=0,048$) (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. N-ERD (AD-) hastalarında N-ERD ile ilişkili moleküllerin korelasyonu

	N-ERD (AD-)													
	uLTE4		sP-selectin		PF4		12-HETE		PGD2		PGE2		RANTES	
	r	p. değeri	r	p. değeri	r	p. değeri	r	p. değeri	r	p. değeri	r	p. değeri	r	p. değeri
uLTE4 (pg/mg Cr)	-		.264	.341	-.279	.315	.268	.334	-.311	.260	.225	.420	.364	.182
sP-selektin (pg/mL)	.264	.341	-		.189	.499	.954**	.000	-.518*	.048	.679**	.005	.739**	.002
PF4 (pg/mL)	-.279	.315	.189	.499	-		.271	.328	-.304	.271	.182	.516	.029	.919
12-HETE (pg/mL)	.268	.334	.954**	.000	.271	.328	-		-.546*	.035	.586*	.022	.693**	.004
RANTES (pg/mL)	.364	.182	.739**	.002	.029	.919	.693**	.004	-.496	.060	.664**	.007	-	
PGD2 (pg/mL)	-.311	.260	-.518*	.048	-.304	.271	-.546*	.035	-		-.457	.087	-.496	.060
PGE2 (pg/mL)	.225	.420	.679**	.005	.182	.516	.586*	.022	-.457	.087	-		.664**	.007

$n=15$; *. Korelasyon 0,05 düzeyinde (2-kuyruklu) **. Korelasyon 0,01 düzeyinde (2-kuyruklu)

AD tedavisi almayan N-ERD hasta grubunda, sP-selektin seviyeleri 12-HETE molekülünün seviyeleri ile korelasyon göstermiştir. 12-HETE'nin pro-inflamatuvar süreçlerde yer aldığı ve plateletler tarafından üretildiği bilindiğinden [69], platelet aktivasyon belirteci olan sP-selektin ve 12-HETE'nin N-ERD hastalığında platelet aracılı inflamasyonda rol oynadığı düşünülmektedir.

5. YORUM

Tez çalışması kapsamında AD tedavisi almış ve almamış N-ERD hastalarının yanı sıra, aspirine karşı duyarlılığı olmayan astım hastalarında ve sağlıklı bireylerde platelet ile ilişkili moleküller ve platelet-nötrofil kümelerinin seviyeleri incelenmiş ve elde edilen veriler karşılaştırılarak gruplar arasındaki farklar saptanmıştır. Katılımcılardan alınan kan örnekleri 1 saat içinde işlenerek platelet-nötrofil kümelerinin seviyeleri akış sitometrisi ile incelenmiştir. Ayrıca, N-ERD patogenezi ile ilişkili olduğu düşünülen birçok mediyatör (PGD₂, PGE₂, LET₄, sP-selektin (CD62P), CD40L, PAF, PF₄, TXA₂, RANTES, GM-CSF) ELISA yöntemi kullanılarak protein düzeyinde araştırılmıştır. Buna ek olarak, araşidonik asitin metabolize edildiği diğer alternatif yolların metabolitlerinin (12-HETE ve 20-HETE) seviyeleri ise yine ELISA yöntemi ile tespit edilerek ilişkilendirme çalışmaları yapılmıştır.

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir;

- Sisteinil lökotrienlerde en son metabolize olup idrara salınan LTE₄, N-ERD hastalığının *in vitro* tanısında sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan deneyler sonucunda sağlıklı kontrollere göre AD tedavisi alan N-ERD hasta grubundaki üriner LTE₄ sonuçlarında anlamlı derecede bir artış olduğu saptanmıştır. Ayrıca, AD tedavisinin NERD hastaları arasında anlamlı bir farka neden olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu durum literatür bilgileriyle uyumlu olmakla birlikte LTE₄ reseptörünün azalmış ifadesi ile ilişkilendirilmiş olup aspirin tedavisinin CysLT reseptör ekspresyonunu modüle ettiği mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir.
- CD62P olarak da bilinen sP-selektin molekülünün AD tedavisi almayan N-ERD hasta grubundaki sonuçları AD tedavisi alan N-ERD hasta grubundan ve sağlıklı kontrollerden daha yüksektir. Bu durum literatür ile benzerlik göstermektedir. AD tedavisi almayan N-ERD hasta profilindeki elde edilen bu artışın platelet-lökosit kümeleşmesini arttırabileceği olası çıkarımlar arasındadır. Ayrıca, AD tedavisi alan N-ERD hasta grubunun sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında sP-selektin plazma seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu durum N-ERD hasta grubuna günlük olarak uygulanan AD tedavisinin başarısı ile ilişkilendirilebilir. Bunlara ek olarak, AD tedavisi almış hasta grubunda platelet-nötrofil kümelerinin

yüzdesi, sP-selektin seviyeleri ile pozitif korelasyon göstermiştir. Bu durum N-ERD hastalarındaki aktive plateletlerin yüksek olduğunu kanıtlar niteliktedir.

- CD40L molekülünün gruplar arasındaki protein seviyelerinin karşılaştırıldığı çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunamamıştır. Ancak, literatür sonuçları CD40L üzerinden N-ERD hastalığının platelet-lökosit kümeleşmesindeki rolünü araştırmada yetersiz kalmaktadır. Ayrıca, bu tez çalışması uzun vadeli hasta takibi ve klinik ilişkileri ele almak için tasarlanmadığından bu sonuçların CD40L kullanan gelecekteki çalışmalar hakkında fikir verebileceği düşünülmektedir. CD40L molekülünün N-ERD hastalığındaki platelet-lökosit kümeleriyle ilişkisi bildirilmesine rağmen, CD40L'nin platelet fonksiyonundaki doğrudan rolü hakkındaki bilgiler oldukça sınırlıdır.
- PF4'ün AD tedavisi alan N-ERD hastalarına ve sağlıklı kontrollere kıyasla AD tedavisi almamış N-ERD grubunda daha yüksek seviyelerde olduğu bulunmuştur. AD tedavisi almayan N-ERD hasta grubunda ve astımlı grupta yüksek seviyelerde çıkan PF4 molekülünün N-ERD belirteci olarak kullanılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Çünkü, PF4 molekülünün alerjik astımdaki rolü belirgin olmakla birlikte N-ERD patogenezindeki etki mekanizması halen kesinlik kazanmamıştır.
- Plazma RANTES seviyelerinin özellikle AD tedavisi almayan N-ERD grubunda ve astımlı hasta profilindeki sonuçları kontrollere ve AD tedavisi alan N-ERD grubuna göre oldukça yüksek düzeyde bulunmuştur. Bu durum literatür sonuçları ile uyumludur. N-ERD hastalarında eozinofil aktivasyonu ile ilişkilendirilen RANTES'in N-ERD patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. Ancak, RANTES molekülünün N-ERD ve ATA hastalarında astım fenotiplerini ayırt etmede tek başına yeterli olmadığı düşünülmektedir. Bunlara ek olarak, platelet-lökosit kümeleşmesine etkisi de halen bilinmemektedir.
- PAF molekülünün astımla doğrudan ilişkili olduğu gösterildiğinden N-ERD patogenezinde de etki etmesi beklenmektedir. Ancak, yapılan deneyler sonucunda gruplar arasındaki plazma PAF protein seviyelerinde istatistiksel anlam bulunamamıştır. PAF molekülünün astımdaki rolüyle ilişkili literatür bilgisine karşın N-ERD patogenezinde bronşların daralmasına, plateletlerden TXA2 ve

eozinofillerden LTC4 salınımına sebebiyet verebileceği bildirilmiştir. Ancak, elde edilen veriler PAF molekülünün N-ERD patogenezindeki yerini aydınlatmada yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle daha geniş hasta popülasyonundaki çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

- TXA2 protein düzeyleri gruplar arasında farklı bulunmamıştır. Ancak, platelet kaynaklı bir prostanoid olan TXA2'nin PGD2'ye benzer şekilde, N-ERD patogenezi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. TXA2 molekülünün AD tedavisini tolere edemeyen grupta yüksek seviyelere çıktığı bilinmekle birlikte N-ERD'deki rolü ve platelet-lökosit kümeleşmesine etkisi halen tam olarak bilinmemektedir.
- AD tedavisi almış ve almamış N-ERD gruplarının ve astım grubunun plazma PGD2 seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek seviyelerde çıktığı saptanmıştır. PGD2'nin özellikle N-ERD hastalarında ve şiddetli astımda arttığı bilindiğinden sonuçlarımız literatürle uyumludur. Ancak, bir COX metaboliti olan PGD2'nin, NSAİİ kullanımı sonrası COX yolağı kalıcı bir şekilde inhibe olan N-ERD hastalarında neden yüksek olduğu halen bilinmemektedir.
- N-ERD hastalığında anti-inflamatuvar özellikleri bilinen PGE2 mediyatörünün AD tedavisi alan N-ERD hasta gruplarında anlamlı olarak düşük seviyelerde çıktığı görülmüştür. Sonuçlarımızın literatürle uyumlu olduğu tespit edilmiştir.
- Platelet türevli 12-HETE molekülünün elde edilen deneyler sonucunda özellikle AD tedavisi almamış hasta grubunda ve astımlı grupta anlamlı olarak yüksek seviyelerde çıktığı görülmüştür. AD tedavisi almamış N-ERD hasta grubundaki elde edilen bu artışın N-ERD patogenezindeki AA metabolizmasının 12-HETE yönüne de kayabileceği olasılığını düşündürmektedir. Buna ek olarak, 12-HETE metabolitlerinin AD tedavisi üzerinden değerlendirildiğinde, bu eikosanoidlerin N-ERD patogenezinin önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca, AD tedavisi alan N-ERD hasta grubunun sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında 12-HETE plazma seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Bu nedenle 12-HETE molekülünün AD tedavisi almamış N-ERD hasta grubunda gösterdiği bu artış platelet-lökosit kümeleri ile ilişkilendirilebilir ve bu durum çalışmanın özgün yönlerinden birisidir. AA metabolitlerinden olan 12-HETE'nin, kullanımlarını doğrulamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmasına rağmen, N-ERD için olası biyolojik belirteçlerdir.

- Yapılan akış sitometri analizleri sonucunda, AD tedavisi alan ve almayan N-ERD'li hastalarının kanındaki nötrofile bağlı plateletlerin yüzdelerinin, astımlı ve sağlıklı kontrollerden çok daha yüksek çıktığı görülmüştür. Çalışılan gruplar arasında N-ERD'deki nötrofillerin yapıştığı dolaşımdaki plateletlerin toplam yüzdelerinde gözlemlenen bu çarpıcı fark, N-ERD patogenezindeki platelet aktivasyonunu destekler niteliktedir. Aynı zamanda en azından bazı hastalarda aspirin ve NSAİİ tarafından tetiklenen inflamatuvar durumunu açıklamaya yardımcı olmaktadır. Analiz sonuçlarına göre artmış CysLT'lerin olası bir kaynağı olan dolaşımdaki platelet-nötrofil kümeleri, yüksek doz aspirin tedavisi ile değişmemektedir.

Bu tez çalışmasının sınırlaması olarak plateletlerin alımı sırasında aktive olma riskleri gösterilebilir. Bu nedenle riski azaltmak için, katılımcılarda 21 gauge iğne kullanılarak EDTA'lı tüpe dikkatlice kan alımı yapılmış ve akış sitometri deneyleri 1 saat içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak; AA metabolitlerinden biri olan 12-HETE'nin seviyesi, platelet-nötrofil kümelerinin yüzdesi, sP-selektin ve PF4'ün plazma seviyeleri, sağlıklı kontrollere kıyasla N-ERD hastalarında önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. AD tedavisi alan N-ERD hasta grubundaki sP-selektin ve PF4 gibi platelet yüzey belirteçleri platelet-nötrofil kümeleri ile pozitif korelasyon göstermiştir. Sonuçlarımız AD tedavisinin N-ERD hastalarında platelet aktivitesi üzerinde direkt olarak baskılayıcı etki göstermediği sonucunu düşündürmektedir. AD tedavisi alan N-ERD hasta grubunda uLTE4 seviyeleri platelet türevli 12-HETE molekülünün seviyeleri ile pozitif korelasyon göstermiştir. Bu durum, N-ERD patogenezindeki AA metabolizmasının 12-HETE yönüne de kayabileceği olasılığını düşündürmektedir. AD tedavisi almayan N-ERD hasta grubunda ise, sP-selektin seviyeleri 12-HETE molekülünün seviyeleri ile korelasyon göstermiştir. 12-HETE'nin pro-inflamatuvar süreçlerde yer aldığı ve plateletler tarafından üretildiği bilindiğinden sP-selektin ve 12-HETE arasındaki pozitif korelasyonu açıklamak zor değildir. Ayrıca, 12-HETE metabolitinin AD tedavisi ile seviyesi düşmüştür. Bunlara karşılık, N-ERD hastalarına uygulanan AD tedavisi platelet-nötrofil kümelerinin yüzdesini değiştirmemiştir. Aspirin desensitizasyonu, N-ERD'li hastaların kanında görülen platelet-nötrofil kümeleşmesi üzerinde bir etkisi olmamakla birlikte CysLT üretimini arttırmaktadır.

Çalışma sonuçlarımız N-ERD'li hastalarda platelet aktivasyonunun baskılanmasının, hastalık patogenezi için potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] I. Doña, N. Blanca-López, M.J. Torres, J. García-Campos, I. García-Núñez, F. Gómez, M. Salas, C. Rondón, M.G. Canto, M. Blanca, *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 22 (2012) 363–371.
- [2] S.D. Woo, Q.Q. Luu, H.S. Park, *Front. Pharmacol.* 11 (2020) 1–11.
- [3] M.L. Kowalski, *Curr. Opin. Pulm. Med.* 25 (2019) 64–70.
- [4] C. Dominas, S. Gadkaree, A.Z. Maxfield, S.T. Gray, R.W. Bergmark, *Laryngoscope Investig. Otolaryngol.* 5 (2020) 360–367.
- [5] M.D. Andrew A. White, M.D., and Donald D. Stevenson, *N. Engl. J. Med.* 379 (2018) 1060–1070.
- [6] J.C. Rodríguez-Jiménez, F.J. Moreno-Paz, L.M. Terán, E. Guaní-Guerra, *Respir. Med.* 135 (2018) 62–75.
- [7] K. Mascia, L. Borish, J. Patrie, J. Hunt, C.D. Phillips, J.W. Steinke, *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 94 (2005) 652–657.
- [8] M.J. Marino, J.O. Garcia, M.A. Zarka, D. Lal, *Laryngoscope Investig. Otolaryngol.* 4 (2019) 573–577.
- [9] G. Brescia, D. Parrino, L. Nicolè, C. Zanotti, C. Lanza, U. Barion, F. Marino, G. Marioni, *Am. J. Otolaryngol. - Head Neck Med. Surg.* 39 (2018) 293–298.
- [10] W.W. Stevens, R.P. Schleimer, R.K. Chandra, A.T. Peters, *J. Allergy Clin. Immunol.* 133 (2014) 1503-1503.e4.
- [11] T. Erdogan, *Clin. Respir. J.* 15 (2021) 400–405.
- [12] S.E. Wenzel, *Nat. Med.* 18 (2012) 716–725.
- [13] J.-H. Kim, G.-S. Choi, J.-E. Kim, H.-J. Jin, Y.-M. Ye, S.-H. Kim, H.-S. Park, *Pharmacogenomics* 15 (2014) 449–457.
- [14] T.M. Laidlaw, K.N. Cahill, *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 5 (2017) 537–545.
- [15] T.M. Laidlaw, D.H. Gakpo, J.C. Bensko, K. Buchheit, *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 8 (2020) 3170–3171.
- [16] H.K.T. Trinh, D. Le Pham, Y. Choi, H. Kim, S. Kim, H. Park, *Clin. Exp. Allergy* 48 (2018) 1464–1473.
- [17] M. Taniguchi, C. Mitsui, H. Hayashi, E. Ono, K. Kajiwara, H. Mita, K. Watai, Y. Kamide, Y. Fukutomi, K. Sekiya, N. Higashi, *Allergol. Int.* 68 (2019) 289–295.
- [18] T.M. Laidlaw, *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 3 (2015) 719–720.
- [19] A.M. Sweis, T.B. Locke, K.I. Ig-Izevbekhai, T.C. Lin, P.K. Gleeson, A.M. Civantos, A. Kumar, A.M. Corr, M.A. Kohanski, J.N. Palmer, içinde: *Int. Forum Allergy Rhinol.*, Wiley Online Library, 2021, ss. 115–119.
- [20] T.M. Laidlaw, J.M. Levy, *Curr. Allergy Asthma Rep.* 20 (2020) 10.
- [21] M.L. Kowalski, I. Agache, S. Bavbek, A. Bakirtas, M. Blanca, G. Bochenek, M.

- Bonini, E. Heffler, L. Klimek, T.M. Laidlaw, J. Mullol, E. Nizankowska-Mogilnicka, H.S. Park, M. Sanak, M. Sanchez-Borges, S. Sanchez-Garcia, G. Scadding, M. Taniguchi, M.J. Torres, A.A. White, A. Wardzyńska, *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 74 (2019) 28–39.
- [22] H.S. Chang, J.S. Park, A.S. Jang, S.W. Park, S.T. Uh, Y.H. Kim, C.S. Park, *Allergy, Asthma Immunol. Res.* 3 (2011) 256–264.
- [23] J.H. Lee, C.G. Jung, H.S. Park, *Expert Rev. Respir. Med.* 12 (2018) 137–143.
- [24] M. Sanak, *Allergy. Asthma Immunol. Res.* 8 (2016) 481–490.
- [25] S.A.A. Comhair, G. Bochenek, S. Baicker-McKee, Z. Wang, T. Stachura, M. Sanak, J.P. Hammel, S.L. Hazen, S.C. Erzurum, E. Nizankowska-Mogilnicka, *Respir. Res.* 19 (2018) 210.
- [26] P.J. Daffern, D. Muilenburg, T.E. Hugli, D.D. Stevenson, *J. Allergy Clin. Immunol.* 104 (1999) 559–564.
- [27] R. Divekar, J. Hagan, M. Rank, M. Park, G. Volcheck, E. O’Brien, J. Meeusen, H. Kita, J. Butterfield, *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 4 (2016) 665–670.
- [28] H. Wangberg, A.A. White, *Curr. Opin. Immunol.* 66 (2020) 9–13.
- [29] E.G. Muhonen, K. Goshtasbi, P. Papagiannopoulos, E.C. Kuan, *World J. Otorhinolaryngol. - Head Neck Surg.* 6 (2020) 235–240.
- [30] J.M. Fahrenholz, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 24 (2003) 113–124.
- [31] K. Buchheit, J.C. Bensko, E. Lewis, D. Gakpo, T.M. Laidlaw, *World J. Otorhinolaryngol. Neck Surg.* 6 (2020) 203–206.
- [32] R.-S. Chung, Y.-C. Huang, Y.-H. Chen, L.-S. Fu, C.-H. Lin, *Pediatr. Neonatol.* 61 (2020) 475–480.
- [33] T.M. Laidlaw, J.A. Boyce, *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 33 (2013) 195–210.
- [34] A. Narayanankutty, J.M. Reséndiz-Hernández, R. Falfán-Valencia, L.M. Teran, *Clin. Biochem.* 46 (2013) 566–578.
- [35] J.H. Choi, J.H. Kim, H.S. Park, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 15 (2015) 21–26.
- [36] T.M. Laidlaw, M.S. Kidder, N. Bhattacharyya, W. Xing, S. Shen, G.L. Milne, M.C. Castells, H. Chhay, J.A. Boyce, *Blood* 119 (2012) 3790–3798.
- [37] T.M. Laidlaw, *World J. Otorhinolaryngol. - Head Neck Surg.* 4 (2018) 162–168.
- [38] A.R. Parker, A.G. Ayars, M.C. Altman, W.R. Henderson, *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 36 (2016) 749–763.
- [39] X. Feng, M.K. Ramsden, J. Negri, M.G. Baker, S.C. Payne, L. Borish, J.W. Steinke, *J. Allergy Clin. Immunol.* 138 (2016) 1089-1097.e3.
- [40] K.N. Cahill, J.C. Bensko, J.A. Boyce, T.M. Laidlaw, *J. Allergy Clin. Immunol.* 135 (2015) 245–252.
- [41] R.C.W. Beasley, R.L. Featherstone, M.K. Church, P. Rafferty, J.G. Varley, A. Harris, C. Robinson, S.T. Holgate, *J. Appl. Physiol.* 66 (1989) 1685–1693.

- [42] L. Mastalerz, N. Celejewska-Wójcik, K. Wójcik, A. Gielicz, R. Januszek, A. Cholewa, P. Stręk, M. Sanak, *Allergy* 69 (2014) 1550–1559.
- [43] K.M. Woessner, *Curr. Allergy Asthma Rep.* 17 (2017) 1–9.
- [44] M. Rusznak, R.S. Peebles, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 19 (2019) 38–45.
- [45] L. Machado-Carvalho, J. Roca-Ferrer, C. Picado, *Respir. Res.* 15 (2014) 1–9.
- [46] S.J. Szefler, S. Wenzel, R. Brown, S.C. Erzurum, J. V Fahy, R.G. Hamilton, J.F. Hunt, H. Kita, A.H. Liu, R.A. Panettieri Jr, *J. Allergy Clin. Immunol.* 129 (2012) S9–S23.
- [47] S.J. Conway, K. Izuhara, Y. Kudo, J. Litvin, R. Markwald, G. Ouyang, J.R. Arron, C.T.J. Holweg, A. Kudo, *Cell. Mol. Life Sci.* 71 (2014) 1279–1288.
- [48] M.-A. Kim, K. Izuhara, S. Ohta, J. Ono, M.K. Yoon, G.Y. Ban, H.-S. Yoo, Y.S. Shin, Y.-M. Ye, D.-H. Nahm, *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 113 (2014) 314–320.
- [49] K.M. Buchheit, T.M. Laidlaw, J.M. Levy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 148 (2021) 348–350.
- [50] W.W. Stevens, A.G. Staudacher, K.E. Hulse, J.A. Poposki, A. Kato, R.G. Carter, L.A. Suh, J.E. Norton, J.H. Huang, A.T. Peters, *J. Allergy Clin. Immunol.* 148 (2021).
- [51] W.L. Smith, D.L. Dewitt, R.M. Garavito, *Annu. Rev. Biochem.* 69 (2000) 145–182.
- [52] W.L. Smith, R. Michael Garavito, D.L. DeWitt, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 33157–33160.
- [53] S.W. Shin, J.S. Park, Y.J. Kim, T.J. Oh, S. An, C.S. Park, *Mol. Genet. Genomics* 287 (2012) 361–371.
- [54] K. Lee, S.H. Lee, T.H. Kim, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1851.
- [55] K.-H. Ruan, *Mini-Reviews Med. Chem.* 4 (2004) 639–647.
- [56] R.A. Simon, K.M. Dazy, J.D. Waldram, *Curr. Allergy Asthma Rep.* 15 (2015) 5.
- [57] G.K. Reid, S. Kargman, P.J. Vickers, J.A. Mancini, C. Leveille, D. Ethier, D.K. Miller, J.W. Gillard, R.A.F. Dixon, J.F. Evans, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 19818–19823.
- [58] G.M. Gauvreau, K.N. Parameswaran, R.M. Watson, P.M. O’Byrne, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164 (2001) 1495–1500.
- [59] B. Jakiela, J. Soja, K. Sladek, M. Przybyszowski, H. Plutecka, A. Gielicz, A. Rebane, G. Bochenek, *J. Allergy Clin. Immunol.* 147 (2021) 1269–1280.
- [60] J. Yeung, M. Hawley, M. Holinstat, *J. Mol. Med.* 95 (2017) 575–588.
- [61] S. Feltenmark, N. Gautam, Å. Brunnström, W. Griffiths, L. Backman, C. Edenius, L. Lindbom, M. Björkholm, H.E. Claesson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 680–685.
- [62] Y.S. Song, E.M. Yang, S.H. Kim, H.J. Jin, H.S. Park, *Int. Arch. Allergy Immunol.*

- 159 (2012) 157–161.
- [63] M. Kumlin, M. Hamberg, E. Granström, T. Björck, B. Dahlén, H. Matsuda, O. Zetterström, S.E. Dahlén, *Arch. Biochem. Biophys.* 282 (1990) 254–262.
- [64] P. Bradding, A.E. Redington, R. Djukanovic, D.J. Conrad, S.T. Holgate, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151 (1995) 1201–1204.
- [65] J. Zhao, B. Maskrey, S. Balzar, K. Chibana, A. Mustovich, H. Hu, J.B. Trudeau, V. O'Donnell, S.E. Wenzel, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179 (2009) 782–790.
- [66] W.W. Stevens, A.G. Staudacher, K.E. Hulse, R.G. Carter, D.R. Winter, H. Abdala-Valencia, A. Kato, L. Suh, J.E. Norton, J.H. Huang, A.T. Peters, L.C. Grammer, C.P.E. Price, D.B. Conley, S. Shintani-Smith, B.K. Tan, K.C. Welch, R.C. Kern, R.P. Schleimer, *J. Allergy Clin. Immunol.* 147 (2021) 600–612.
- [67] T. Izumi, S. Hoshiko, O. Radmark, B. Samuelsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 7477–7481.
- [68] W.C. Scott, K.N. Cahill, G.L. Milne, P. Li, Q. Sheng, L.C. Huang, S. Dennis, J. Snyder, A.M. Bauer, R.K. Chandra, N.I. Chowdhury, J.H. Turner, *J. Allergy Clin. Immunol.* 147 (2021) 1318–1328.
- [69] B. Porro, P. Songia, I. Squellerio, E. Tremoli, V. Cavalca, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 964 (2014) 26–40.
- [70] W.M. Elina Jerschow, Matthew L. Edin, Teresa Pelletier, F.B. Abuzeid, Nadeem A. Akbar, Marc Gibber, Marvin Fried, G. Lih, Artiom Gruzdev, J. Alyce Bradbury, Weiguo Han, D.R. Hudes, Taha Keskin, Victor L. Schuster, Simon Spivack, Darryl C. Zeldin, *J Allergy Clin Immunol Pr.* 5 (2017) 998–1007.
- [71] P.R. Cooper, A.C. Mesaros, J. Zhang, P. Christmas, C.M. Stark, K. Douaidy, M.A. Mittelman, R.J. Soberman, I.A. Blair, R.A. Panettieri, *PLoS One* 5 (2010).
- [72] E. Hill, F. Fitzpatrick, R.C. Murphy, *Br. J. Pharmacol.* 106 (1992) 267–274.
- [73] C. Mitsui, K. Kajiwara, H. Hayashi, J. Ito, H. Mita, E. Ono, N. Higashi, Y. Fukutomi, K. Sekiya, T. Tsuburai, K. Akiyama, K. Yamamoto, M. Taniguchi, *J. Allergy Clin. Immunol.* 137 (2016) 400–411.
- [74] C.M. Herd, C.P. Page, *Platelets* 4 (1993) 293–303.
- [75] T.M. Laidlaw, J.A. Boyce, *J. Allergy Clin. Immunol.* 135 (2015) 1407–1414.
- [76] J. Sahler, K. Grimshaw, S.L. Spinelli, M.A. Refaai, R.P. Phipps, N. Blumberg, *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 8 (2011) e9–e14.
- [77] T. Takeda, H. Morita, H. Saito, K. Matsumoto, A. Matsuda, *Allergol. Int.* 67 (2018) 326–333.
- [78] B.Z.S. Paul, J.L. Daniel, S.P. Kunapuli, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 28293–28300.
- [79] J. Jin, J.L. Daniel, S.P. Kunapuli, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 2030–2034.
- [80] P. Damman, P. Woudstra, W.J. Kuijt, R.J. De Winter, S.K. James, *J. Thromb. Thrombolysis* 33 (2012) 143–153.
- [81] W.-L. Song, J. Stubbe, E. Ricciotti, N. Alamuddin, S. Ibrahim, I. Crichton, M.

- Prempeh, J. Lawson, R. Wilensky, L.M. Rasmussen, E. Puré, G. FitzGerald, J. Clin. Invest. 122 (2012) 1459–1468.
- [82] B.J.R. Whittle, S. Moncada, J.R. Vane, Prostaglandis 16 (1978) 373–388.
- [83] M. Merten, P. Thiagarajan, Circulation 102 (2000) 1931–1936.
- [84] N. Li, J. Leukoc. Biol. 83 (2008) 1069–1078.
- [85] J.F. Penrose, J. Spector, B.K. Lam, D.S. Friend, K. Xu, R.M. Jack, K.F. Austen, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 152 (1995) 283–289.
- [86] A. Sala, S. Zarini, G. Folco, R.C. Murphy, P.M. Henson, J. Biol. Chem. 274 (1999) 28264–28269.
- [87] J. MACLOUF, C. ANTOINE, P.M. HENSON, R.C. MURPHY, Ann. N. Y. Acad. Sci. 714 (1994) 143–150.
- [88] T. Liu, T.M. Laidlaw, H.R. Katz, J.A. Boyce, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110 (2013) 16987–16992.
- [89] L.J. Smith, A.H.E. Rubin, R. Patterson, Am. Rev. Respir. Dis. 137 (1988) 1015–1019.
- [90] S.C. Pitchford, H. Yano, R. Lever, Y. Riffo-Vasquez, S. Ciferri, M.J. Rose, S. Giannini, S. Momi, D. Spina, B. O’Connor, P. Gresele, C.P. Page, J. Allergy Clin. Immunol. 112 (2003) 109–118.
- [91] J. Lomas, G.M. Anderson, K. Domnick-Pierre, E. Vayda, M.W. Enkin, N Engl J Med 321 (1989) 1306–1311.
- [92] N.E.L. Meessen, C.P.M. Van Der Grinten, S.C.M. Luijendijk, H.T.M. Folgering, Thorax 51 (1996) 1192–1198.
- [93] M.E. Kuruvilla, K. Vanijcharoenkarn, J.M. Levy, J. Asthma Allergy 13 (2020) 463.
- [94] N. Hayashi, J. Chihara, Y. Kobayashi, T. Kakazu, D. Kurachi, T. Yamamoto, S. Nakajima, Int. Arch. Allergy Immunol. 104 (1994) 57–59.
- [95] C. Moritani, S. Ishioka, Y. Haruta, M. Kambe, M. Yamakido, Chest 113 (1998) 452–458.
- [96] C. Mitsui, K. Kajiwara, H. Hayashi, J. Ito, H. Mita, E. Ono, N. Higashi, Y. Fukutomi, K. Sekiya, Immunol. Disord. Immunother. 1 (2016) 1–3.
- [97] M.L. Kowalski, I. Ansotegui, W. Aberer, M. Al-Ahmad, M. Akdis, B.K. Ballmer-Weber, K. Beyer, M. Blanca, S. Brown, C. Bunnag, World Allergy Organ. J. 9 (2016) 1–42.
- [98] A.A. White, K. Woessner, R. Simon, World J. Otorhinolaryngol. - Head Neck Surg. 6 (2020) 241–247.
- [99] D.M. Lang, M.A. Aronica, E.S. Maierson, X.F. Wang, D.C. Vasas, S.L. Hazen, Ann. Allergy, Asthma Immunol. 121 (2018) 98–104.
- [100] P. Gevaert, C. Bachert, J. Corren, J. Mullol, J. Han, R. Ow, L. Islam, M. Howard, R. Owen, K. Wong, Ann. Allergy, Asthma Immunol. 123 (2019) S17.

- [101] H. Hayashi, Y. Fukutomi, C. Mitsui, K. Kajiwara, K. Watai, Y. Kamide, Y. Nakamura, Y. Hamada, Y. Tomita, K. Sekiya, T. Tsuburai, K. Izuhara, K. Wakahara, N. Hashimoto, Y. Hasegawa, M. Taniguchi, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 201 **(2020)** 1488–1498.
- [102] S.F. Weinstein, R.K. Katial, P. Bardin, S. Korn, M. McDonald, M. Garin, E.D. Bateman, F.C.L. Hoyte, M. Germinaro, *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 7 **(2019)** 589-596.e3.
- [103] C. Bachert, A.R. Sousa, V.J. Lund, G.K. Scadding, P. Gevaert, S. Nasser, S.R. Durham, M.E. Cornet, H.H. Kariyawasam, J. Gilbert, *J. Allergy Clin. Immunol.* 140 **(2017)** 1024–1031.
- [104] K.L. Tuttle, K.M. Buchheit, T.M. Laidlaw, K.N. Cahill, *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 6 **(2018)** 1045.
- [105] D. Le Pham, J.H. Lee, H.S. Park, *Curr. Opin. Pulm. Med.* 23 **(2017)** 89–96.
- [106] S.S. Mustafa, K. Vadamalai, B. Scott, A. Ramsey, *Am. J. Rhinol. Allergy* 35 **(2021)** 399–407.
- [107] T.M. Laidlaw, J. Mullol, C. Fan, D. Zhang, N. Amin, A. Khan, J. Chao, L.P. Mannent, *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 7 **(2019)** 2462-2465.e1.
- [108] P.D. Neubauer, Z.G. Schwam, R.P. Manes, içinde: *Int. Forum Allergy Rhinol.*, Wiley Online Library, **2016**, ss. 233–237.
- [109] T.M. Laidlaw, K.N. Cahill, J.C. Cardet, K. Murphy, J. Cui, B. Dioneda, P. Kothari, B.A. Raby, E. Israel, J.A. Boyce, *J. Allergy Clin. Immunol.* 143 **(2019)** 316–324.
- [110] K.M. Buchheit, T.M. Laidlaw, *Allergy. Asthma Immunol. Res.* 8 **(2016)** 298–304.
- [111] A.D. Workman, B.S. Bleier, *World J. Otorhinolaryngol. Neck Surg.* 6 **(2020)** 230–234.
- [112] J. Waldram, K. Walters, R. Simon, K. Woessner, J. Waalen, A. White, *J. Allergy Clin. Immunol.* 141 **(2018)** 250–256.
- [113] E. Sehanobish, M. Asad, M. Barbi, S.A. Porcelli, E. Jerschow, *Front. Immunol.* 12 **(2021)** 2460.
- [114] T.M. Laidlaw, *Allergy Asthma Proc.* 40 **(2019)** 4–6.
- [115] J.A. Boyce, *J. Allergy Clin. Immunol.* 144 **(2019)** 875–881.
- [116] K.M. Walters, J.D. Waldram, K.M. Woessner, A.A. White, *Am. J. Rhinol. Allergy* 32 **(2018)** 280–286.
- [117] W.W. Stevens, E. Jerschow, A.P. Baptist, L. Borish, J. V Bosso, K.M. Buchheit, K.N. Cahill, P. Campo, S.H. Cho, A. Keswani, *J. Allergy Clin. Immunol.* 147 **(2021)** 827–844.
- [118] K.N. Cahill, J. Cui, P. Kothari, K. Murphy, B.A. Raby, J. Singer, E. Israel, J.A. Boyce, T.M. Laidlaw, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 200 **(2019)** 704–711.
- [119] J. Hill, T. Burnett, R. Katial, *Immunol. Allergy Clin.* 36 **(2016)** 735–747.
- [120] U. Klinkhardt, R. Bauersachs, J. Adams, J. Graff, E. Lindhoff-Last, S. Harder,

- Clin. Pharmacol. Ther. 73 (2003) 232–241.
- [121] Z. Xiao, P. Thérroux, J. Am. Coll. Cardiol. 43 (2004) 1982–1988.
- [122] K. Ueno, Y. Nomura, Y. Morita, T. Eguchi, K. Masuda, Y. Kawano, Circ. J. 79 (2015) 1349–1356.
- [123] M. Mauler, J. Seyfert, D. Haenel, H. Seeba, J. Guenther, D. Stallmann, C. Schoenichen, I. Hilgendorf, C. Bode, I. Ahrens, J. Leukoc. Biol. 99 (2016) 781–789.
- [124] L. Luo, J. Zhang, J. Lee, A. Tao, Cells 10 (2021) 2038.
- [125] C. Page, S. Pitchford, Clin. Exp. Allergy 44 (2014) 901–913.
- [126] E.A. Middleton, A.S. Weyrich, G.A. Zimmerman, Physiol. Rev. 96 (2016) 1211–1259.
- [127] V. Valdes, M.A. Nardi, L. Elbaum, J.S. Berger, J. Thromb. Thrombolysis 40 (2015) 83–87.
- [128] K. Kowal, A. Pampuch, O. Kowal-Bielecka, L.M. DuBuske, A. Bodzenta-Łukaszyk, Clin. Exp. Allergy 36 (2006) 426–432.
- [129] A. Kasperska-Zajac, Z. Brzoza, B. Rogala, J. Asthma 45 (2008) 485–487.
- [130] R. Pods, D. Ross, S. Van Hülst, C. Rudack, S. Maune, Allergy 58 (2003) 1165–1170.
- [131] D.L. Hamilos, D.Y. Leung, D.P. Huston, A. Kamil, R. Wood, Q. Hamid, Clin. Exp. allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol. 28 (1998) 1145–1152.
- [132] M.L. Garcia Cruz, M.A. Jimenez-Chobillon, L.M. Teran, J. Allergy 2012 (2012) 1–8.
- [133] J.R. Velazquez, G. Soid-Raggi, L.M. Teran, G.F. Romero-Pavon, F. Ramírez-Jimenez, Health (Irvine. Calif). 09 (2017) 1467–1474.
- [134] B.A. Smart, Pediatrics 122 (2008) 28–35.
- [135] B. Ulambayar, E.-M. Yang, H.-Y. Cha, Y.-S. Shin, H.-S. Park, Y.-M. Ye, Clin. Transl. Allergy 9 (2019) 1–8.
- [136] H. Yasuba, 4 (1991) 5–21.
- [137] H.-I. Rhyou, Y.-H. Nam, H.-S. Park, Allergy. Asthma Immunol. Res. 14 (2022) e17.
- [138] G. Bochenek, K. Nagraba, E. Nizankowska, A. Szczeklik, J. Allergy Clin. Immunol. 111 (2003) 743–749.
- [139] J.-U. Lee, H.S. Chang, H.J. Lee, D.-J. Bae, J.-H. Son, J.-S. Park, J.S. Choi, H.G. Hwang, C.-S. Park, Respir. Med. 123 (2017) 71–78.
- [140] M.L. KOWALSKI, R. PAWLICZAK, J. WOZNIAK, K. SIUDA, M. PONIATOWSKA, J. IWASZKIEWICZ, T. KORNIATOWSKI, M.A. KALINER, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 161 (2000) 391–398.
- [141] D.L. Simmons, R.M. Botting, T. Hla, Pharmacol. Rev. 56 (2004) 387–437.

- [142] J. Mullol, J. Boyce, S.-E. Dahlén, B. Dahlén, C. Picado, I. Bobolea, *J. Allergy Clin. Immunol.* 148 (2021) 1157–1160.
- [143] J.B. Hagan, T.M. Laidlaw, R. Divekar, E.K. O'Brien, H. Kita, G.W. Volcheck, C.R. Hagan, D. Lal, H.G. Teaford III, P.J. Erwin, *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 5 (2017) 990–997.
- [144] N. Celejewska-Wójcik, A. Kania, K. Górka, P. Nastalek, K. Wójcik, A. Gielicz, L. Mastalerz, M. Sanak, K. Sładek, *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 16 (2021) 1415–1424.
- [145] K.N. Cahill, *J. Allergy Clin. Immunol.* 148 (2021) 344–347.

