

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**ASTIMLI ÇOCUKLARDA SOLUBL ENDOTELYAL  
PROTEİN C RESEPTÖRÜ (sEPCR)  
DÜZEYLERİ**

**Dr. Yetiş UÇAR**

**ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Figen DOĞU**

**ANKARA  
2008**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**ASTIMLI ÇOCUKLARDA SOLUBL ENDOTELYAL  
PROTEİN C RESEPTÖRÜ (sEPCR)  
DÜZEYLERİ**

**Dr. Yetiş UÇAR**

**ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Figen DOĞU**

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 20060809023HPD  
proje numarası ile desteklenmiştir**

**ANKARA  
2008**

**Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi**

**Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı**

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

“Astımlı Çocuklarda Solubl Endotelyal Protein C reseptörü (sEPCR) Düzeyleri”  
başlıklı Dr. Yetiş UÇAR’a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık**  
**Tezi** olarak kabul edilmiştir.

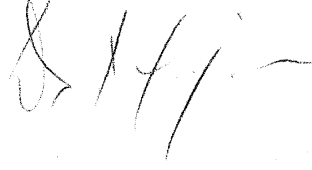
Tez savunma tarihi: 14.10.2008

**Prof. Dr. Nurten GİRGIN**

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Jüri Başkanı



**Doç. Dr. Figen DOĞU**

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Çocuk Sağ. ve Hast. İmmünoloji /Allerji

Bilim Dalı

Tez Danışmanı



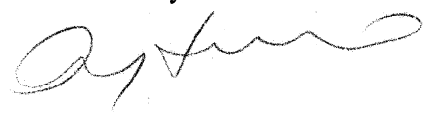
**Prof. Dr. Aydan İKİNCİOĞULLARI**

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Çocuk Sağ. ve Hast. İmmünoloji / Allerji

Bilim Dalı Başkanı

Üye



# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
TABLolar DİZİNİ .....	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tanım .....	3
2.2. Epidemiyoloji .....	3
2.3. Etyoloji .....	4
2.4. Astım Patogenezi .....	8
2.5. Astımda Koagülasyon – İnflamasyon ilişkisi.....	17
2.6. Astım - fibrinolitik sistem (Plazmin sistem) ilişkisi.....	18
2.7. Solubl endotelial protein C reseptörü (sEPCR) – Astım ilişkisi .....	19
3. MATERYAL ve METOD .....	23
3.1. Çalışma grubunun seçimi.....	23
3.2. Örneklerin toplanması.....	23
3.3. Metod.....	24
3.4. Araştırmanın kaynağı.....	25
3.5. İstatistiksel değerlendirme .....	25
4. BULGULAR .....	26
5. TARTIŞMA .....	33
6. ÖZET.....	37
7. SUMMARY .....	39
8. KAYNAKLAR .....	41

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>ADAM 33</b>	: A disintegrin and metalloproteinase domain 33
<b>ADRB2</b>	: Adrenerjik reseptör beta 2
<b>APC</b>	: Aktive protein C
<b>ASH</b>	: Antijen sunan hücre
<b>BHR</b>	: Bronşial hiperreaktivite
<b>BK</b>	: Beyaz küre
<b>CRP</b>	: C reaktif protein
<b>CTLA4</b>	: Cytotoxic T lymphocyte 4 – Sitotoksik T lenfosit antijen 4
<b>DH</b>	: Dendritik hücre
<b>ESM</b>	: Ekstraselüler matriks
<b>ECP</b>	: Eosinophil cationic protein - Eozinofilik katyonik protein
<b>EGFR</b>	: Epidermal growth factor receptor – Epidermal büyüme faktörü reseptörü
<b>EPCR</b>	: Endotelial protein C reseptörü
<b>ER</b>	: Endoplazmik retikulum
<b>FEV 1</b>	: 1 .Saniyedeki zorlu ekspiratuar volüm
<b>FGF</b>	: Fibroblast growth factor – Fibroblast büyüme faktörü
<b>FOXP3</b>	: Forkhead transkripsiyon faktör 3
<b>GINA</b>	: Global Initiative for Asthma
<b>GM-CSF</b>	: Granülosit makrofaj koloni stimüle faktör
<b>Hb</b>	: Hemoglobin
<b>Hİ</b>	: Hafif intermittan
<b>HP</b>	: Hafif persistan
<b>ICAM-1</b>	: Intercellular adhesion molecule 1 – Hücrelerarası adezyon molekülü 1
<b>IFN <math>\gamma</math></b>	: Interferon gama
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>ISAAC</b>	: International Study of Asthma and Allergies in Childhood – Uluslararası çocukluk çağında astım ve allerji çalışması
<b>KS</b>	: Kortikosteroid
<b>LTC4</b>	: Lökotrien C4
<b>MHC</b>	: Major histocompatibility complex

<b>MMP-9</b>	: Matrix metalloproteinase-9
<b>NK</b>	: Natural killer – Doğal öldürücü
<b>nTreg</b>	: Doğal T regulatuar hücreler
<b>OP</b>	: Orta persistan
<b>PAI-1</b>	: Plazminojen aktivatör inhibitör-1
<b>PC</b>	: Protein C
<b>PDGF</b>	: Platelet derive growth factor – Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
<b>RANTES</b>	: Regulated on activation normal T expressed and secreted protein – Aktivasyonla düzenlenen, normal T hücre tarafından eksprese ve sekrete edilen
<b>RSV</b>	: Respiratuar sinsityal virüs
<b>sEPCR</b>	: Solubl Endotelyal Protein C Reseptörü
<b>SLE</b>	: Sistemik lupus eritamotozis
<b>STAT</b>	: Signal transducer and activator of transcription – Sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatörü
<b>T</b>	: Trombin
<b>T-bet</b>	: T-box expressed in T cell – T hücrelerde eksprese olan T-box
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Transforming growth factor-beta – Transforme edici büyüme faktörü-beta
<b>Th</b>	: T helper – Yardımcı T hücresi
<b>THR</b>	: T hücre reseptörü
<b>TIMP1</b>	: Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 – Metalloproteinazların doku inhibitörleri
<b>TLR-4</b>	: Toll like receptor
<b>TM</b>	: Trombomodulin
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör nekrozis faktör-alfa
<b>Treg</b>	: Regulatuar T hücreleri
<b>Tr1</b>	: T regulatuar 1
<b>VCAM-1</b>	: Vascular cell adhesion molecule-1 – Vasküler hücre adezyon molekülü-1
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotelyal growth faktör – Vasküler endotelyal büyüme faktörü

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No:

<b>Şekil 2.1.</b> Antijen sunan hücre tarafından antijenin alınması, işlenmesi ve naif T hücrelerine sunumu .....	10
<b>Şekil 2.2.</b> Th1/Th2 hücre farklılaşması .....	11
<b>Şekil 2.3.</b> Th2 sitokinler ve etkileri .....	12
<b>Şekil 2.4.</b> Astım patogenezi.....	13
<b>Şekil 2.5.</b> Havayollarında remodellinge bağlı değişiklikler .....	15
<b>Şekil 2.6.</b> Remodelling mekanizması: İnflamasyon-koagülasyon .....	18
<b>Şekil 2.7.</b> Havayolu remodellingi: Plazmin sistemi .....	19
<b>Şekil 2.8.</b> APC-EPCR-sEPCR etkileşimi .....	22
<b>Şekil 4.1.</b> Astımlı olguların ve sağlıklı kontrollerin sEPCR düzeyleri .....	31

## TABLolar DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No:</u></b>
<b>Tablo 2.1.</b> Astım gelişiminden sorumlu aday genler.....	5
<b>Tablo 2.2.</b> APC'nin havayolu üzerindeki etkileri.....	21
<b>Tablo 4.1.</b> Astımlı olguların yaş ve cinsiyet özellikleri.....	26
<b>Tablo 4.2.</b> Kontrol grubunun yaş ve cinsiyet özellikleri .....	26
<b>Tablo 4.3.</b> Olguların ve kontrollerin yaş-cinsiyet dağılımları .....	27
<b>Tablo 4.4.</b> Astımlı olguların klinik ve laboratuvar özellikleri.....	28
<b>Tablo 4.5.</b> Astımlı olguların atak sırasında ve stabil dönemdeki sEPCR düzeyleri .....	29
<b>Tablo 4.6.</b> Kontrollerin sEPCR düzeyleri.....	29
<b>Tablo 4.7.</b> Astımlı olguların ve sağlıklı kontrollerin sEPCR düzeyleri .....	30



# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Astım çocukluk çağında en sık karşılaşılan kronik hastalıklardan biridir (1). Son yıllarda yapılan çalışmalar astım patogenezinde 2 temel unsurun; kronik inflamasyon ve hava yollarının yeniden yapılanması (remodelling) olduğunu ortaya koymuştur. Astımda inflamasyon pek çok hücrenin birbirleriyle kompleks etkileşimi sonucunda ortaya çıkar. İnflamatuar sitokinlerin aşırı salınımı, koagülasyon sistemin aktivasyonu, epitel hasarı, uzamış epitel tamir süreci, profibrotik büyüme faktörlerinin (TGF- $\beta$ ) aşırı üretimi, fibroblastların miyofibroblastlara farklılaşması ve çoğalması hava yollarında yeniden yapılanmayı oluşturur (2,3). Protein C (PC)'nin aktif formu olan aktive protein C (APC) hem koagülasyonun kontrolünde hemde inflamasyonun sınırlandırılmasında önemli rol oynar (4,5). APC inflamatuvar sitokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-13) salınımını ve kemotaksisi inhibe eder, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) salınımını inhibe ederek fibroblast ve düz kas hücre proliferasyonunu baskılar, Plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) inhibisyonu yoluyla fibrinolitik etki gösterir. APC ayrıca Th1/Th2 balansında değişikliğe yol açarak Th2 sitokinleri azaltarak eozinofilik inflamasyonu ve IgE sentezini baskılar (5,6,7). APC'nin anti inflamatuvar etkilerinden, ilk olarak damar endotelinde tanımlanan ancak sonra bronş epiteli de dahil birçok hücrede varlığı gösterilen endotelyal protein C reseptörü (EPCR)'nün sorumlu olduğu düşünülmektedir (8,9). Hayvan deneylerinde; astımda allerjen uyarımı sonrası bronkoalveolar sıvıda APC'nin azaldığı saptanmış, inhale ve sistemik APC uygulanmasının akciğer fibrozisi ve inflamasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (10). Solubl EPCR (sEPCR) endotel yüzeyindeki EPCR'nin inflamasyonda artan sitokinler ve metalloproteinazların etkisiyle kopması sonucu oluşur. sEPCR, APC'nin anti inflamatuvar, profibrinolitik ve antikoagülan etkilerini inhibe eder (11). Yapılan hayvan deneylerinde allerjen uyarımı sonrası astımlı farelere inhaler ve sistemik yolla verilen APC'nin inflamasyonu ve havayolu aşırı duyarlılığını baskıladığı gösterilmiş, APC-EPCR bağlanmasını inhibe eden anti-EPCR antikoru verildiğinde APC'nin anti

inflatuar etkilerinin ortadan kalktığı bronkoalveolar sıvıda eozinofillerin arttığı gözlenmiştir (10,12). Literatür tarandığında, birçok hastalıkta EPCR-sEPCR sisteminin rolü araştırılmasına rağmen astımda bu sisteminin rolünün araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada hafif-orta persistan astımlı çocuklarda (akut atakla başvuruda ve atak sonrası stabil dönemde) ve sağlıklı kontrollerde koagülasyon ve fibrinolitik sistemin anahtar moleküllerinden biri olan sEPCR'nin düzeyine plazmada bakılması ve astım patogenezindeki rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tanım

Astım; tekrarlayan öksürük, nefes darlığı, hırıltılı solunum ile seyreden; havayolu inflamasyonu, bronş hiperreaktivitesi ve geçici havayolu obstrüksiyonu ile karakterize, havayollarında eozinofil, mast hücreleri ve T lenfositler başta olmak üzere birçok değişik hücre ve hücresel elemanın rol oynadığı kronik, inflamatuvar solunum yolu hastalığıdır. Bu inflamasyon özellikle gece ve sabahın erken saatlerinde kendini gösteren tekrarlayıcı öksürük, hışıltı, nefes darlığı ataklarına neden olmaktadır. Bu ataklar genellikle spontan veya tedavi ile geri dönüşümlü olabilen havayolu daralmasından kaynaklanmaktadır (13,14).

### 2.2. Epidemiyoloji

Astım, çocukluk döneminin en sık rastlanan kronik hastalığıdır. Her yaşta görülebilen bir hastalık olmasına karşın olguların %80-90'ında semptomlar ilk 4-5 yaşta ortaya çıkar. Sıklık; ülkelere, coğrafi bölgelere, etnik kökene, çevresel etmenlere ve tanıda kullanılan yöntemlere göre değişiklik göstermektedir. İskandinav Ülkelerinde, Eskimolarda, Amerika yerlilerinde ve siyah ırkta astım prevalansı düşük iken, İngiltere, Avustralya ve Yeni Zelanda'da sıklık (%15) çok artmaktadır (1,15).

Ülkemizde yapılan astım prevalans çalışma sonuçları bölgesel farklılıklar göstermektedir. Astım prevalansı; Ankara'da %6,9, İstanbul'da %8,9, Adana'da %14,1, Şanlıurfa'da %1,9, İzmir'de %4,9, Samsun'da %2,3 olarak bulunmuştur. Son verilere göre ISAAC yöntemi ile yapılan pediatri prevalans çalışmalarında kümülatif astım sıklığı % 13.7 - % 15.3 arasında değişmektedir (16,17,18,19,20, 21).

Çocukluk çağı astım prevalansı son 20 yılda gelişmiş ülkeler başta olmak üzere tüm dünyada giderek artmaktadır. Bu artışta daha hijyenik yaşam biçimi (Hijyen hipotezi), olumsuz hava koşulları ve tanı olanaklarındaki artış neden olabilir (22,23).

Astım puberte öncesinde erkeklerde kızlara oranla 2 kat daha fazla görülmektedir. Pubertede bu risk dengelenmekte, puberte sonrasında ve erken yetişkinlikte kadınlar erkeklerden daha sık etkilenmektedir (24).

### **2.3. Etyoloji**

Astım multifaktöriyel bir hastalıktır. Genetik yatkınlık ve çevresel faktörler astımın ortaya çıkışında etkilidir.

#### **2.3.1. Genetik faktörler**

Astımlı çocukların aile bireylerinde astım, allerjik rinit, atopik dermatit gibi hastalıkların bulunması bu hastalıkların ortak bir ailesel ya da kalıtsal temeli olduğunu düşündürmektedir. Anne ya da babanın biri astımlı ise doğacak bebeğin astımlı olma riski %20-%30'larda iken, anne ve babanın her ikisi de astımlı ise bu olasılık %60-%70'lere yükselmektedir. İkizlerde yapılan çalışmalarda ise monozigotlarda dizigotlara göre çok daha yüksek oranlarda astım görüldüğü bildirilmektedir. Gözlemler astımın kalıtsal özelliğini göstermektedir ama kalıtım şekli kesin olarak belirlenememiştir. Birden fazla genin birbiri arasındaki ilişki ve bu ilişki ile çevrenin yoğun etkileşimi astım genetiğinin temelini oluşturur. Astım ile ilişkili genlerin bazılarının koruyucu etkisi olmasına karşın, büyük çoğunluğu astım gelişimine katkıda bulunur.

Genetik çalışmalar sonucunda astım ve atopi ile ilgisi olabilecek birçok gen ve kromozomal bölge saptanmıştır. Astım gelişiminden sorumlu aday genler Tablo 2.1'de verilmiştir (25,26,27,28).

**Tablo 2.1.** Astım gelişiminden sorumlu aday genler

Aday gen	Kromozom	Aday gen	Kromozom
IL-10	1q31	PAI-1	7q22
IL1A	2q14	TLR-4	9q32
VCAM-1	1q21	MMP-9	20q11
IL-4, IL-9, CD14	5q31	Eotaxin 2, EGFR	7q11
IL-5, IL-13	5q23	RANTES	17q21
CTLA4	2q33	ADAM 33	20p13
IL1R1	2q11	IL4RA	16p12
LTC4	5q33	ICAM-1	19p13
ADRB2	5q32	TIMP1	Xq11
TNF- $\alpha$ , MHC	6q21	TGF- $\beta$ 1	19q13
Filaggrin	1q21		

### 2.3.2. Çevresel faktörler

#### 2.3.2.1. Allerjenler

Ev içi ve dış ortam allerjenleriyle temasın duyarlı kişilerde astım ataklarına neden oldukları bilinsede astım gelişiminde spesifik rolleri henüz tam olarak anlayamamıştır (29). Genel olarak yaşamın erken dönemlerinde allerjen maruziyetinin ilerde allerji ve allerjik hastalık sıklığını artırdığı kabul edilir. Ancak bu konudaki araştırmaların sonuçları farklılıklar içermektedir. Örneğin ev tozu akarlarına ve polenlere erken maruziyetin ileride bu allerjenlere duyarlılığı ve allerjik hastalık riskini artırdığı gösterilmiştir (30). Diğer bir çalışmada ise yaşamın erken döneminde yüksek oranda kedi, köpek allerjenlerine maruziyet bu allerjenlere karşı duyarlılık riskini azaltmaktadır (31,32,33).

Sonuç olarak allerjen maruziyetinin dozu, allerjenin tipi, çocuğun yaşı ve olası genetik nedenler duyarlanmayı etkilemektedir.

### **2.3.2.2. Solunum yolu enfeksiyonları**

İki yaşın altındaki çocuklarda, astım ataklarının % 42'sinden viral enfeksiyonların sorumlu olduğu gösterilmiştir. İki yaşın altındaki çocuklarda Respiratuar sinsitial virüs ve parainfluenza ile oluşan bronşiolitlerle astım arasında sıkı bir ilişki vardır. Büyük çocuklarda ise rinovirüs ve influenza virüsü ile oluşan enfeksiyonlarla ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Mikoplazma ve klamidyalarla oluşan solunum yolu enfeksiyonlarının astımı tetiklediği düşünülmesine rağmen bakteriyel enfeksiyonların astım ile ilişkisi pek yoktur (14,34).

Üst ve alt solunum yolları enfeksiyonlarının yüksek prevalansı ile atopik hastalıkların düşük prevalansı arasındaki ilişkiyi destekleyen raporlar, erken dönemdeki geçirilen viral enfeksiyonların geç dönemde astım gelişimini önleyebildiği fikrini gündeme getirmiştir (hijyen hipotezi). Enfeksiyon ajanının tipi, enfeksiyonun yeri, şiddeti, genetik yatkınlık ve yaş yanıtı değiştirebilmektedir. Erken dönemde geçirilen RSV bronşioliti, atopi ve tekrarlayan wheezing için tetikleyici olurken, yaşamın ilk 3 yılı içinde wheezing ile seyretmeyen pnömoni geçiren çocuklarda 6 yaşında deri testi reaktivitesinin azaldığı ve total IgE düzeyinin düştüğü saptanmıştır. Solunum yolu enfeksiyonları ile allerjik hastalıkların ilişkisini araştıran çalışmaların çelişkili sonuçları vardır (23,34,35,36).

### **2.3.2.3. Sigara dumanı**

İntrauterin sigara dumanına maruziyet akciğer gelişimini bozmakta ve solunum fonksiyonlarını azaltmaktadır (37).

Erken çocuklukta sigara dumanı maruziyeti astım gelişimi için önemli bir risk faktörüdür. Sigara mukoza geçirgenliğini artırarak allerjenlerin penetrasyonunu kolaylaştırır. Mürin astım modellerinde sigara dumanına maruziyetin bronşial hiperreaktiviteyi arttırdığı ve allerjen uyarısını takiben eozinofili ve Th 2 tipinde sitokin cevabını arttırdığı gösterilmiştir. Astımlı sigara içenlerin balgamında IL-8 ve eozinofilik katyonik protein düzeylerinin arttığı, sigara içimi ile ev tozu akarlarına spesifik IgE düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır (38).

#### **2.3.2.4. Hava kirliliği**

Hava kirliliğine yol açan özellikle hidrokarbon, azot dioksit, sülfür dioksit, nitrojen dioksit, kükürt dioksit, ozon, kurşun ve diğer tanecikli maddeler astım atağını başlatabilir (39).

#### **2.3.2.5. Sosyoekonomik durum**

Kırsal kesimde yaşayan ve sosyoekonomik düzeyi düşük ailelerin çocuklarında astım ve diğer allerjik hastalıklara daha az rastlanmaktadır. Bunun nedeni; hayatın erken dönemlerinde kötü hijyen koşulları, çevresel endotoksinlere maruziyet immün sistemin gelişimini etkilemekte (Th-1/Th-2 dengesini Th-1 yönünde değiştirerek) ve allerjik hastalıkların gelişimini engellemektedir (hijyen hipotezi) (40).

#### **2.3.2.6. Kardeş sayısı**

Aile içinde kardeş sayısının fazla olmasının allerjik hastalıklara karşı koruyucu olduğu ileri sürülmektedir (41).

### **2.3.2.7. Diyet**

Allerjik hastalıkların gelişiminde diyetin rolünü araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır. Çinko, vitamin E, vitamin C, magnezyum, selenyum ve omega-3 çoklu doymamış yağlar sağlayan besinlerce fakir olan ya da omega-6 çoklu doymamış yağlardan zengin olan diyetlerin astım riskinde artışla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (42). Anne sütüyle beslenen bebeklerde ise inek sütü veya soya proteini içeren formullarla beslenenlere göre erken çocuklukta vizing sıklığı daha azdır (43).

### **2.3.2.8. Efor**

Efor sırasında hızlı solunum ile su buharı dışarı atılmakta ve bu sırada bronş epitelinde ozmolarite artmakta ve yine aynı nedenle hava yüzey ısısının düşmesi sonucu astım bulguları ortaya çıkabilmektedir. Direkt mast hücre degranülasyonu ve nöral refleks aktivasyonu egzersizle birlikte astım semptomlarını tetikleyebilmektedir (44).

## **2.4. Astım Patogenezi**

Astım patogenezinin temelini, önceden belirli bir antijene (allerjene) karşı duyarlanmış hava yollarının aynı antijen (allerjen) ile tekrarlanan uyarılara verdiği immün yanıt (Tip 1 aşırı duyarlılık reaksiyonu) sonucu gelişen ve yerleşen inflamasyon oluşturmaktadır. İnflamasyon tek başına astım gelişimi için yeterli değildir. İnflamasyona paralel olarak hava yollarında yapısal değişiklikler (remodelling) meydana gelir. Kronik inflamasyon ve hava yollarının yeniden yapılanması (remodelling) astım patogenezinin 2 temel unsurunu oluşturur (45,46).

Astımdaki inflamasyonun histopatolojik temeli ile ilgili ilk veriler; 1960'da Dunehill ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur. Ağır astım atağıyla kaybedilen hastaların postmortem biyopsi çalışmalarında; havayolu epitelinde hasar, mukozal ödem, mukus sekresyonunda artış, goblet hücrelerinde hiperplazi ve hipertrofi, hava

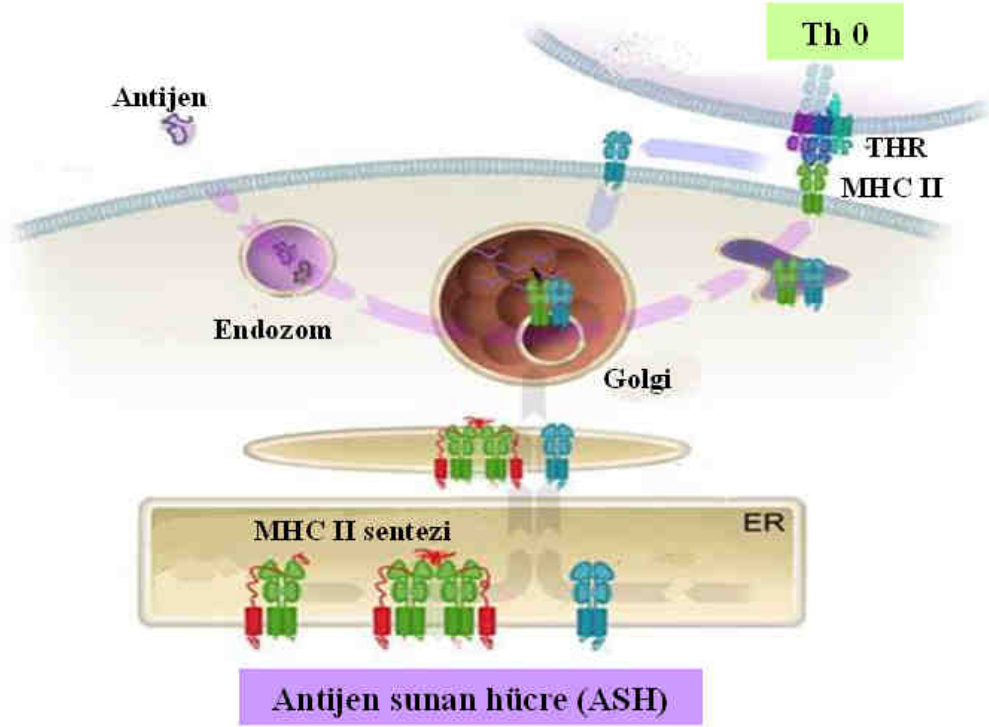


yolu duvarında mononükleer hücre ve özellikle eozinofil olmak üzere granülosit infiltrasyonu, hava yolu duvarında kalınlaşma, peribronşial düz kaslarda hipertrofi saptanmıştır (47).

#### **2.4.1. Allejik immün yanıtın gelişimi**

Astım hava yollarının erken tip hipersensitivite reaksiyonu sonucu gelişen inflamatuvar bir hastalıdır. Bu tip reaksiyon temel olarak çeşitli hücrelerden mediatör salınımını içeren “erken faz” ve hedef dokuya efektör hücre göçü ve sonraki olayları içeren “geç faz” reaksiyonlar ile gelişir.

Astımda allerjik immün yanıt allerjenin (antijenin) solunum yolu mukozasına ulaşması ile başlar. Allejen (antijen) burada antijen sunan hücre (ASH) tarafından alınır. Hava yollarında primer antijen sunan hücreler dendritik hücrelerdir (DH). DH'ler üst ve alt havayollarında hemen epitel altındaki bazal membran üzerinde bulunurlar ve astımlı olgularda sayıları artmıştır. Bu mukozal DH'ler immatürdürler, antijeni alıp işlemelerine karşın T hücrelerini uyaramazlar. Antijeni alan DH'ler daha sonra bölgesel lenf noduna göç eder ve burada olgunlaşır. Olgunlaşan DH'ler aldıkları antijeni işler ve sahip olduğu MHC II üzerinden hücre yüzeyinde, naif T helper hücrelerine (Th 0) sunar. MHC II molekülü ile naif T helper hücrelerine sunulan antijenin, T hücre reseptörüne (THR) bağlanması ile aktivasyon, proliferasyon ve diferansiyasyon başlamış olur. Antijen sunan hücre tarafından antijenin alınması, işlenmesi ve naif T hücrelerine (Th 0) sunumu Şekil 2.1'de verilmiştir (47,48,49).



**Şekil 2.1.** Antijen sunan hücre tarafından antijenin alınması, işlenmesi ve naif T hücrelerine sunumu

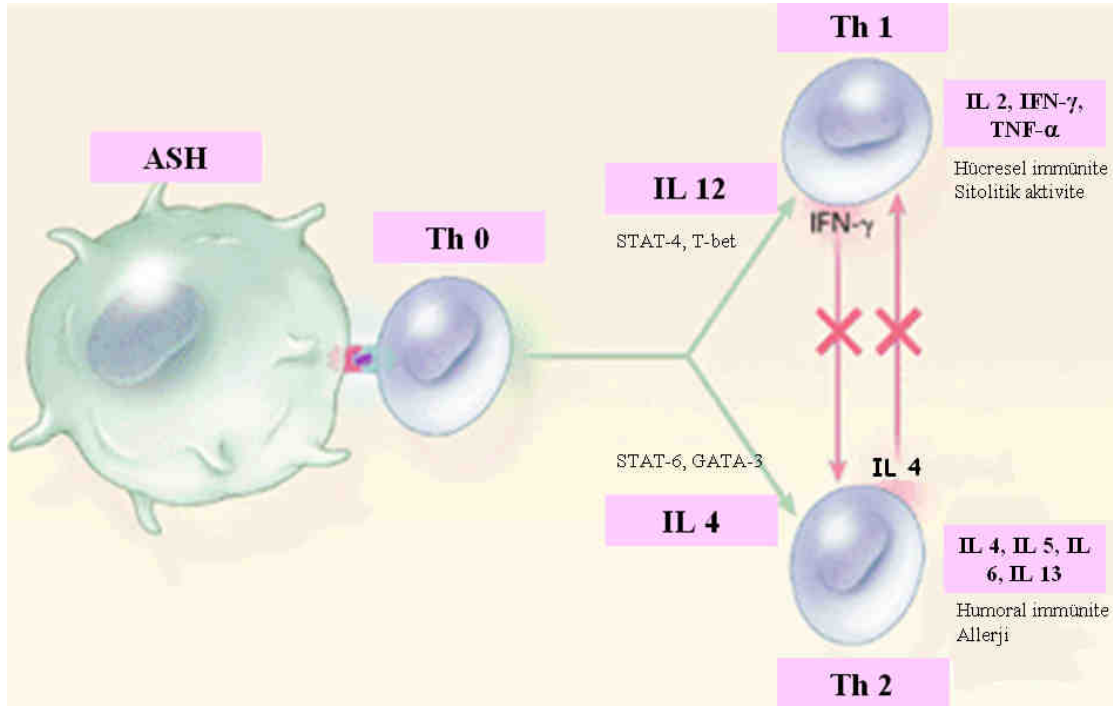
Aktivasyonun tamamlanması için MHC II-THR etkileşimine ek olarak ko-stimülatörlere ihtiyaç vardır. T hücre aktivasyonunda en iyi tanımlanmış ko-stimülatör T hücre yüzey molekülü olan CD 28'in aktive ASH'lerde eksprese edilen B 7.1 (CD 80) ve B 7.2 (CD 86)'ye bağlanmasıdır. Bu etkileşim ile naif T hücrelerinde yaşam sürelerinde uzama, antijene karşı yanıtta artış, IL-2 gibi sitokinlerin üretimi ve aktivasyon meydana gelmiş olur. Bu aktivasyon sırasında T hücreler CD 40 ligand (CD 40L) adı verilen bir molekül eksprese eder. T hücre yüzeyindeki CD 40L, ASH üzerindeki CD 40 ile etkileşerek CD80/86 ko-stimülatör moleküllerinin ekspresyonunu artırır. Ayrıca aktive olan T hücrelerden salgılanan IL-2 otokrin etkiyle T hücre proliferasyonunu artırır (50,51).

Aktive naif T hücreler, farklı aktivasyon koşullarında değişik sitokinler salgılayan ve değişik fonksiyonlar gösteren Th1 ve Th2 alt tiplerine farklılaşır. Bu

farklılaşmada immün yanıtın erken dönemindeki uyarılar (sitokinler) etkili olmaktadır. IL-12 Th1 farklılaşmasına yol açarken, IL-4 Th2 farklılaşmasına yol açar (52).

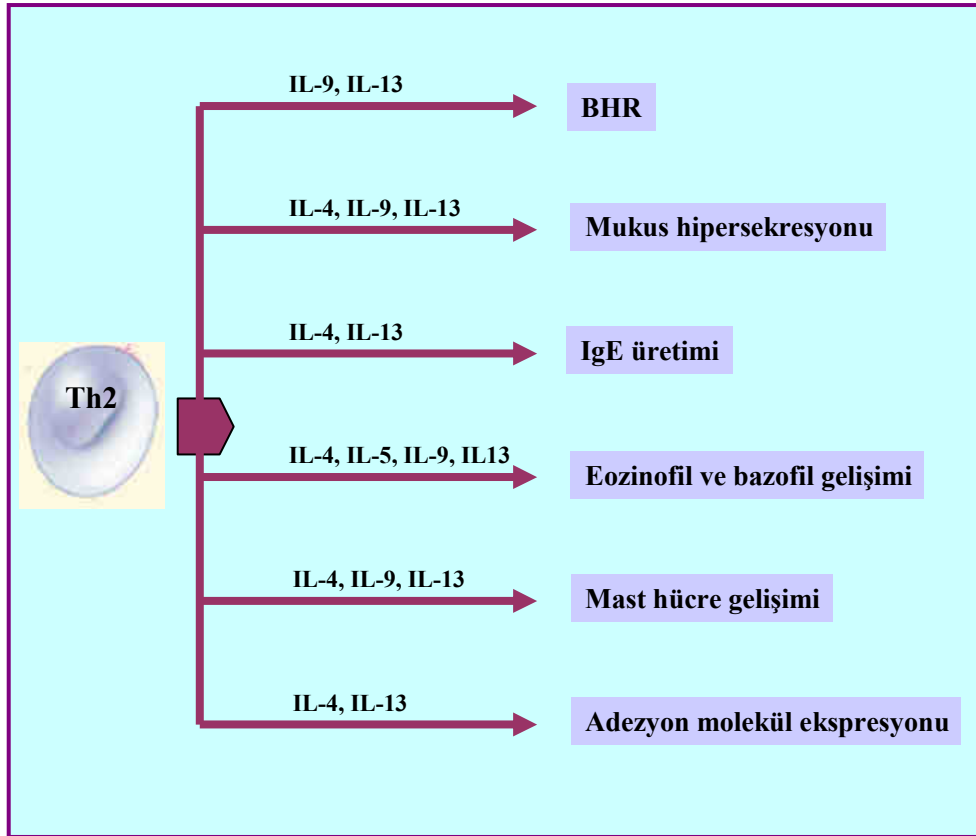
Makrofaj ve DH'lerden intraselüler mikroorganizmalara yanıt olarak IL-12 salınmakta ve IL-12 de T lenfosit ve doğal öldürücü (NK) hücrelerden IFN  $\gamma$  salınımına neden olmaktadır. Sonuç olarak hem IL-12 hem de IFN  $\gamma$  Th1 yönünde farklılaşmaya neden olmaktadır. Transkripsiyon faktörlerinden T-bet (T-box expressed in T cell) ve STAT-4 (signal transducer and activator of transcription) aktivasyonu ile başlamış olan Th1 aktivasyonu devam ettirilir. Th1 hücreler de IFN  $\gamma$  salgılayarak makrofajları aktive eder ve özellikle intraselüler mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonlara karşı oluşan immünolojik yanıtı başlatır (53,54).

Helmintler ve allerjenlere yanıt olarak, allerjik reaksiyonlarda santral rol oynayan Th2 farklılaşması meydana gelmektedir. Bu farklılaşmada mikroçevrede var olan IL-4 ve transkripsiyon faktörlerinden STAT-6 ve GATA-3 aktivasyonu rol oynamaktadır (53,54). Th1/Th2 hücre farklılaşması şekil 2.2'de verilmiştir.



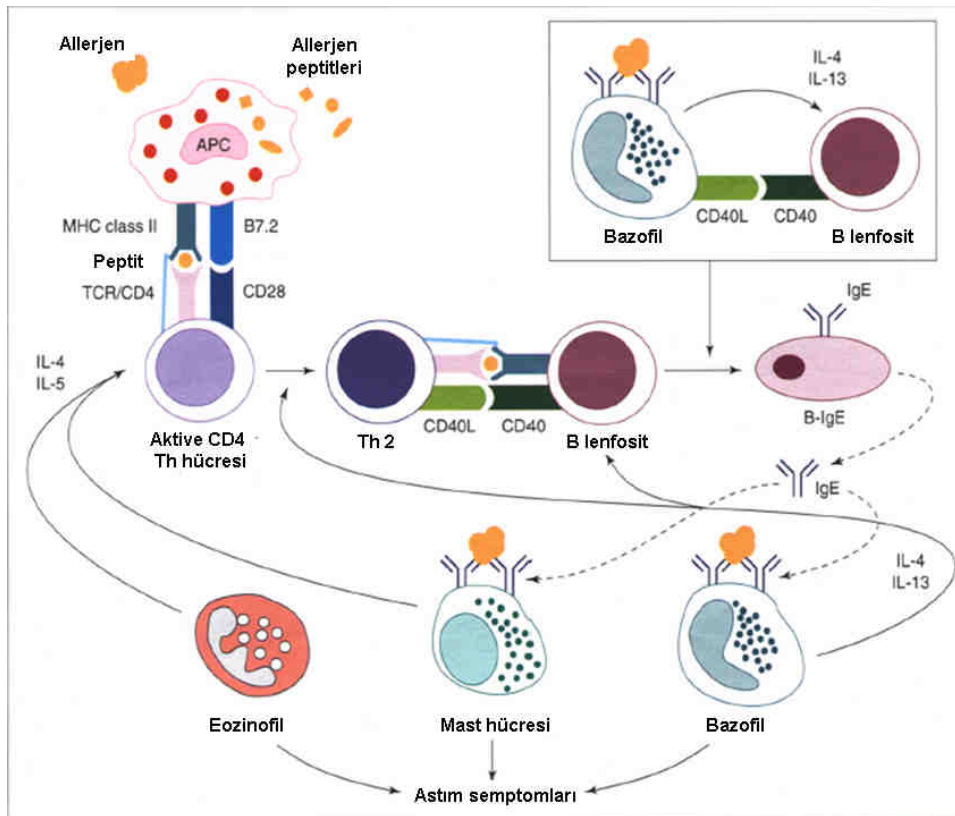
Şekil 2.2. Th1/Th2 hücre farklılaşması

Th2 hücreler, Th2 sitokinler olarak bilinen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 ve IL-13 üretirler. Th2 sitokinler ve etkileri şekil 2.3’de özetlenmiştir. IL-4 ve IL-9 mast hücre gelişiminde rol alır. IL-4 ve IL-13, B hücrelerinde  $\epsilon$ -germline transkripsiyonunu tetikleyerek ağır zincir izotip değişimi ile IgE sentezini uyarır. Bu işlem sonucunda B lenfositlerden allerjen spesifik IgE üretilir. IgE yapısındaki allerjen spesifik antikorlar bazofil ve mast hücrelerinde eksprese edilen yüksek afiniteli IgE reseptörlerine (Fce RI) bağlanır. Allerjen ile tekrar karşılaşılması halinde bazofil ve mast hücreleri üzerindeki IgE antikorları allerjeni bağlar ve IgE antikorları köprüleşir. Bu işlem sonucunda mast hücreleri ve bazofiller aktif hale gelerek daha önceden sentezledikleri mediatörleri (histamin, lökotrienler, IL-4, IL-5, IL-13, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) ortama salarlar. Histamin ve lökotrien C4 (LTC4) ve diğer mediatörler; bronş düz kaslarında bronkokonstriksiyona, vasküler geçirgenlikte artış sonucu mikrovasküler kaçağa ve mukus sekresyonunda artışa neden olurlar (51,55). (Allerjik inflamasyonun erken fazı).



**Şekil 2.3.** Th2 sitokinler ve etkileri

Bu reaksiyon ardından 2-6 saat sonra geç allerjik yanıt başlar. Mast hücrelerinden salınan  $TNF-\alpha$ , endotelial epitelyal adezyon moleküllerinin ekspresyonunu sağlar.  $TNF-\alpha$  ile birlikte IL-4 ve IL-13 endotel hücresinden VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule) ekspresyonunu arttırarak eozinofil ve nötrofillerin inflamasyon alanına toplanmasını sağlar. Geç allerjik yanıtın ana hücreleri eozinofil ve nötrofillerdir. Eozinofiller LTC<sub>4</sub>, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13,  $TNF-\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, FGF, VEGF, MMP-9 gibi birçok mediatör salgılar. Allerjik yanıtın erken ve geç evre reaksiyonları sonucunda pek çok hücre ve mediatörün kompleks etkileşimi ile havayollarında kronik bir inflamasyon meydana gelir. Hava yolu mukoza ve lümeninde eozinofiller, mast hücreleri, aktive T lenfositler, makrofajlar ve nötrofillerden oluşan infiltrasyon ile başlayan inflamasyon, hava yolunun yerli hücreleri olan epitel, endotel, düz kas hücreleri ve fibroblastların ürettikleri mediatör, sitokin ve kemokinlerle devam ettirilir. İnflamatuar yanıtı bağılı olarak hava yollarında bronkokonstriksiyon, ödem, bronş epitelinde dökülme, mukus sekresyonunda artış, mukus tıkaçları sonucunda daralma meydana gelir (55,56,57). Astım patogenezi şekil 2.4’de verilmiştir.



Şekil 2.4. Astım patogenezi

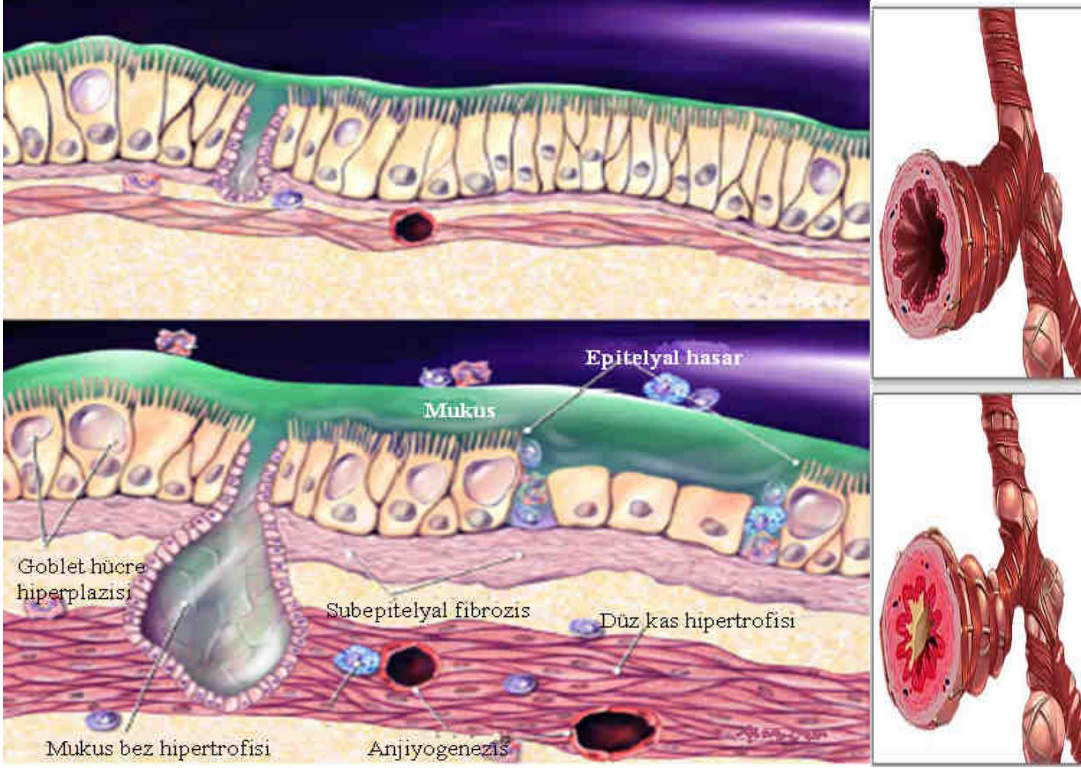
#### 2.4.2. Remodelling (Yeniden yapılanma)

Erken ve geç faz yanıt sırasında oluşan inflamasyona paralel olarak seyreden ve hastalığın semptomlarında önemli rol oynayan hava yollarında ortaya çıkan kalıcı yapısal değişiklikler remodelling olarak tanımlanır.

Remodellingin ana komponentleri, epitelyal kalınlaşma, goblet hücre hiperplazisi, bazal membranda kalınlaşma (subepitelyal fibrozis), düz kas hücreleri ve miyofibroblastlarda hiperplazi sonucu düz kas tabakasında kalınlaşma, fibröz dokuda artış ve anjiyogenezisten oluşur. Bu değişiklikler sonucunda astım kliniğine yol açan ana neden olan hava yolunda daralma sürekli hale gelmiş olur. Bu yapısal değişiklikler ayrıca hava yollarında aşırı duyarlılığa neden olmaktadır (2).

Son zamanlarda havayolu epitelinin doku remodelinginde anahtar rol oynadığı üzerinde durulmaktadır. Astımda inflamasyon sonucunda bronş epitelinde hasar oluşur. Epitelde oluşan bu hasara yanıt olarak epitel hücrelerinden tamir mekanizmalarında rol alan büyüme faktörleri ve profibrotik mediatörler (TGF- $\beta$ 1, FGF, endotelin, VEGF) salınır. Bunun sonucunda fibroblast ve miyofibroblast gibi bazal membran altında bulunan mezanşimal hücreler, kollajen (tip 3 ve tip 5 kollajen) ve ekstraselüler matriks proteinlerini üretirler. Mezanşimal hücreler tarafında üretilen kollajen ve ekstraselüler matriks proteinlerine ek olarak mast hücrelerinden salınan serin protezlar ve büyüme faktörlerine yanıt olarak ortaya çıkan düz kas hiperplazisi hava yolunda kalınlaşmaya neden olur. Bronşial düz kas hücreleri ve fibroblastlardan salınan PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) fibrinolizisi inhibe ederek akciğer fibrozisinde rol alır. IL-4, IL-5 ve IL-13 goblet hücre hiperplazisine, metaplazisine ve mukus sekresyonunda artışa neden olur (58,59,60).

Remodellinge bağlı değişiklikler şekil 2.5’de verilmiştir (2,61).



Şekil 2.5. Havayollarında remodellinge bağlı değişiklikler

Astımda BHR'nin epitelial tamir mekanizmalarındaki bozukluğa bağlı olduğu düşünülmektedir (62). Bronş epiteli, atmosfer havası ile akciğer parankimi arasında bir bariyer görevi dışında bir çok mediyatör (IL-1, IL-6, IL-8, endotelin, GM-CSF, TGF beta, fibronektin, PDGF, LTC4, LTD4) salgılamaktadır. Kronik hava yolu inflamasyonunda oluşan bronş epitel yıkımı sonucu ortaya çıkan sensoriyel sinir uçları ve ödemle oluşan permabilite artışı ile birlikte hücreler arası sıvının lümene kayması ve uyarıların daha kolay mukozaya ulaşması da BHR'ne katkıda bulunur. Ayrıca hasarlanan epitelden salınan bir çok mediyatör de inflamatuvar hücrelerin hava yoluna göçüne ve mukozal inflamasyona neden olur (62).

Astımdaki BHR'nin diğer bir nedeni de otonomik nöronal kontrol mekanizmalarındaki değişikliklerdir. Havayolları ikisi eksitatör, ikisi inhibitör olmak üzere dört ayrı sinirsel uyarının kontrolü altındadır. Baskın eksitatör nöral kontrol vagus

siniri içindeki parasempatik sinirler aracılığıyla olur. Astımlı olgularda artmış parasempatik tonus (kolinerjik aktivitede artış), artmış  $\alpha$  adrenerjik yanıt ve nonadrenerjik nonkolinerjik inhibitör sistem defekti sonucunda oluşan bronkokonstrüksiyonun, BHR'den sorumlu olduğu üzerinde durulmaktadır. Vagal efferent sinir uçlarından asetilkolin salınımının presinaptik olarak değiştirilebildiği ve asetilkolin salınımını azaltan bir dizi inhibitör mekanizmalar olduğu belirlenmiştir. Bu mekanizmalardan birisi asetilkolinin presinaptik muskarinik  $M_2$  reseptörleri üzerine olan etkisidir. Prostaglandin E2 ve  $\beta_2$  agonistlerin asetilkolin salınımını inhibe ettiği, eozinofil kaynaklı MBP ve tromboksan A2'nin ise asetilkolin salınımını arttırdığı gösterilmiştir. Sempatik sinir sisteminin havayolu düz kas hücreleri üzerinde direkt inervasyonu yoktur. Havayollarında ayrıca lokal aksonal refleksler bulunmaktadır. Afferent sinir liflerinin uyarılması; substans P ve diğer nörokininler gibi havayolu düzkaslarında kontraksiyona, sekresyon oluşumuna ve mukozal ödeme yol açabilen nöropeptitlerin salınımına yol açar. Havayolu epitelindeki hasarlanma afferent liflerin daha fazla uyarılmasına ve aksonal reflekse neden olur (63,64).

Astım patogenezinde güncel konulardan birisi de reglatuvar T (Treg) hücreleridir. İmmün sistemin; konağın self (kendine ait) antijenlerine karşı tolerans gösterme, patojenlere karşı gelişen reaksiyonların aşırıya kaçmasını engelleme gibi kendi kendini kontrol etme mekanizmaları vardır. Oтореaktif T ve B hücrelerin delesyonu self antijenlerin pek çoğuna karşı toleransın gelişmesinde rol oynar. Son yıllarda farelerde toleransta rol oynayan, otoimmün hastalıkları baskılayan, IL 2 reseptörünün  $\alpha$  subunitini (CD25) yapısal olarak üzerinde taşıyan CD4+ hücreler tanımlanmış ve bu hücrelerin insandaki eşdeğerleri reglatuvar T hücreleri (Treg) olarak adlandırılmıştır (65). Treg hücreler; doğal Treg (nTreg) ve adaptif-indükte edilebilir Treg (aTreg) olarak iki gruba ayrılır (66).

Doğal Treg hücreleri, timusta gelişir ve yapısal olarak CD25, sitotoksik T lenfosit antijen 4 (CTLA-4), glukokortikoidlerle indüklenen tümör nekrozis faktör (TNF) reseptörü ve bir transkripsiyon faktörü olan forkhead/winged helix transkripsiyon faktörü 3 (FOXP3) ekspres eder (67). nTreg hücreleri hem CD4+ hem de CD8+ hücreleri suprese eder (68). Bu supresyon hücre-hücre etkileşimi ile olur ve



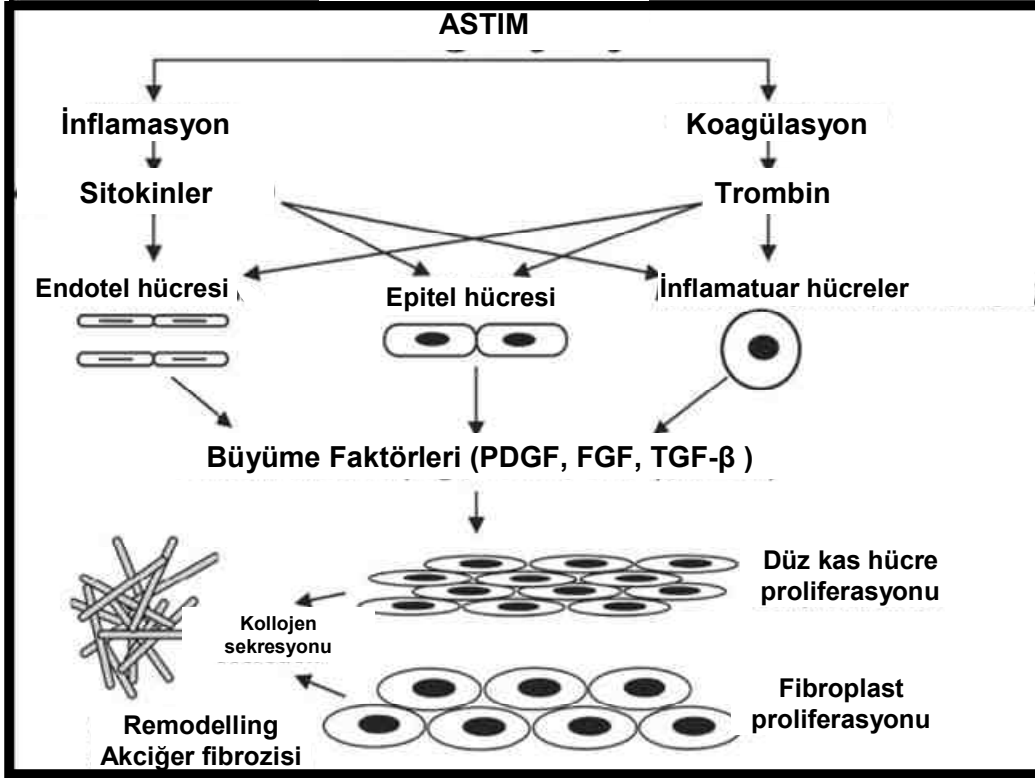
sitokinlerden (IL 4, IL 10, TGF  $\beta$ ) bağımsızdır (69). nTreg hücre yüzeyindeki CTLA 4 ile aktive CD4+ hücre yüzeyindeki CD80/CD86 birleşerek supresyona neden olur (70). Ayrıca CTLA 4, ASH yüzeyindeki CD80/CD86 aracılığıyla indolamin 2,3 dioksijenazı aktive ederek triptofan metabolizmasını hızlandırır ve azalan triptofan T hücrelerin aktive olmasını engeller (71). nTreg hücreleri esas olarak self antijenlere karşı toleransta rol alır. nTreg hücre gelişiminden sorumlu FOXP3 mutasyonlarında tip 1 diabetes mellitus gibi otoimmün hastalıklar ve egzama, gıda allerjisi gibi allerjik hastalıkların sıklıkla görüldüğü IPEX denilen lenfoproliferatif bir hastalık ortaya çıkar. Yapılan çalışmalarda nTreg hücrelerin Th2 tipi sitokin yanıtını aktif olarak baskıladığı gösterilmiştir (72).

Adaptif-indükte edilebilir Treg (aTreg) hücreler; allerjen spesifik immünoterapinin ana hücreleri olan tip 1 reglatuvar (Tr1) hücreler ve oral antijenle indüklenen tip 3 T yardımcı (Th3) hücreler olarak iki gruba ayrılır. aTreg hücreler antijenle karşılaşma sonucunda oluşur, antijen spesifiktirler ve IL 10, TGF  $\beta$  gibi supresif sitokinler üretirler. Bu sitokinler aracılığıyla Th2 aracılı reaksiyonları ve BHR'ni baskılar (66,73).

## **2.5. Astımda Koagülasyon – İnflamasyon ilişkisi**

Astım gibi akciğerde inflamasyonla giden bir çok hastalıkta, havayollarında ve akciğer parankiminde birtakım kalıcı değişiklikler meydana gelir (Remodelling). Kronik inflamasyon lokal büyüme faktörlerinin (PDGF, FGF, TGF- $\beta$ 1) ve sitokinlerin aşırı salınımına (TNF- $\alpha$ , IL 1 $\beta$ ), koagülasyon sisteminin aktivasyonuna ve azalmış fibrinolizis sonucunda remodellinge neden olur (74). Koagülasyon sisteminin ana başlatıcısı doku faktörüdür ve esas olarak akciğerde hasara yanıt olarak endotelyal/epitelyal hücreler ve alveolar makrofajlar tarafından sentezlenir (75). Koagülasyon sisteminin aktivasyonu artmış trombin oluşumuna neden olur. Artmış trombin oluşumu hem inflamatuvar yanıtı tetikler hemde lokal büyüme faktörlerinin yapımını ve fibrin oluşumunu arttırarak remodellinge katkıda bulunur (6,76). Trombin havayollarına lenfosit ve monosit kemotaksisini arttırmakta, fibroblast ve düz kas

hücrelerinde proliferasyona neden olmakta ve direkt etki ile kollajen-proteoglikan gibi matriks komponentlerinin sentezini uyarmaktadır (77). Remodelling mekanizması: İnflamasyon-koagülasyon birlikteliği şekil 2.6’da verilmiştir.

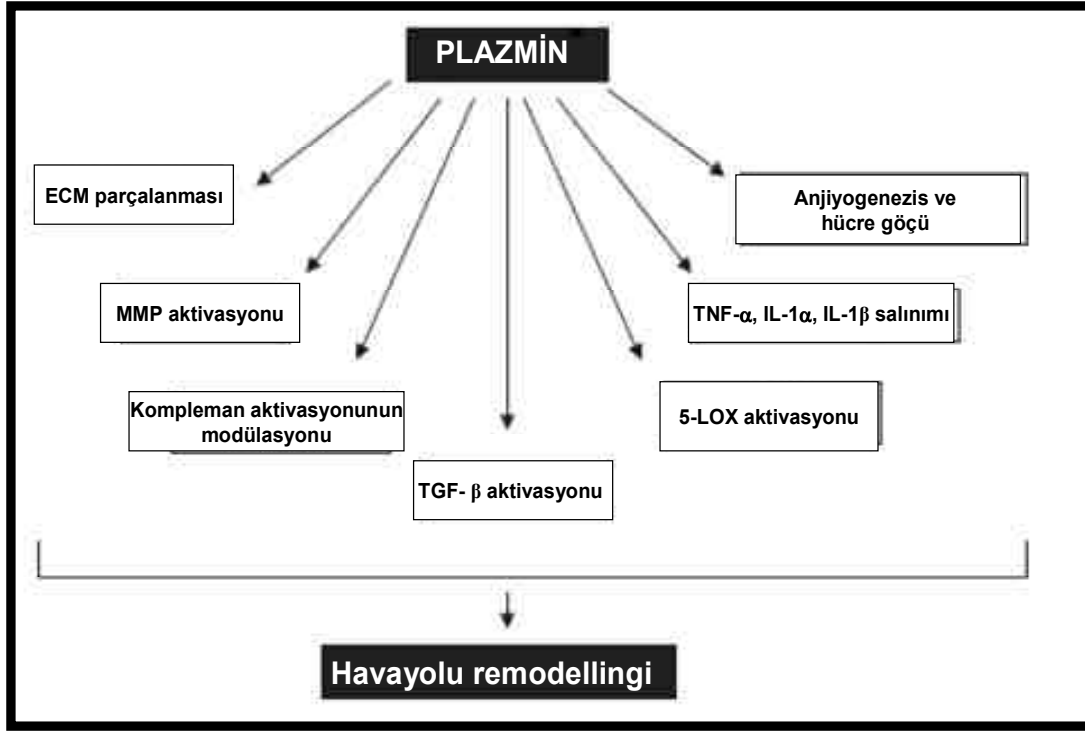


Şekil 2.6. Remodelling mekanizması: İnflamasyon-koagülasyon

## 2.6. Astım - fibrinolitik sistem (Plazmin sistem) ilişkisi

Doku remodelinginde fibrinolitik sisteminin de önemli rolü vardır. Fibrinolitik sistemin ana mediyatörlerinden biri olan plazmin; ESM parçalanması, MMP aktivasyonu, kompleman sisteminin modülasyonu, TGF-  $\beta$  aktivasyonu, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  gibi sitokinlerin salınımı, anjiyogenezis ve hücre göçünün regülasyonu gibi birçok olaydan sorumludur (78,79,80). PAI-1, plazminojenden plazmin oluşumunu inhibe eder. Hayvan deneylerinde PAI-1 gen mutasyonu taşıyan farelerde akciğerlerde hasara yanıt olarak daha az kollajen birikimi olduğu ve fibroze direnç geliştiği gösterilmiştir (81). Yine fare astım modelinde PAI-1’in fibrin yıkımını inhibe ederek akciğerlerde

fibrin ve kollajen birikimine sonuç olarak fibrozise neden olduğu gösterilmiştir (82). Yapılan çalışmalarda astımda havayollarında plazmin sisteminin aktive olduğu ve bu sistemin düzenlenmesindeki bozukluğun remodellinge neden olduğu saptanmıştır (83,84). Plasmin sisteminin havayolu remodellingindeki yeri şekil 2.7’de verilmiştir.



Şekil 2.7. Havayolu remodellingi: Plazmin sistemi

## 2.7. Solubl endotelial protein C reseptörü (sEPCR) – Astım ilişkisi

Protein C (PC), K vitaminine bağımlı olarak karaciğerde sentezlenen ve plazmada inaktif olarak bulunan bir glikoproteindir (85). Trombin (T) – trombomodulin (TM) kompleksi tarafından aktif hale gelen protein C (APC); protein S kofaktörlüğünde koagülasyon faktörlerinden faktör 5a ve faktör 8a’yı inaktive ederek antikoagülan etki gösterir (86). APC’nin koagülasyon sisteminin kontrolü dışında, inflamatuvar yanıtın sınırlandırılmasında da önemli rolü vardır (86,87). Yapılan çalışmalarda APC’nin;

inflatuar sitokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL 1- $\beta$ , IL-6, IL-8) salınımının inhibisyonu, lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonunun blokajı ve lökosit-endotel interaksyonunun blokajı, monosit-nötrofil kemotaksis inhibisyonu gibi potent antiinflatuar etkilerinin olduğu saptanmıştır (88,89,90,91,92). Hayvan deneylerinde letal E. Coli sepsisinde APC kullanımının sepsis kliniğini engellediği gösterilmiş ve APC'nin ağır sepsiste kullanımı Faz III klinik denemelerden başarıyla geçmiş (mortalite de azalma) ve FDA onayı (2002) almıştır (93,94,95).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda plazmin sistemi dışında protein C sisteminin de akciğer ve havayolu remodellinginde önemli rol aldığı saptanmıştır (6). Hayvan deneylerinde astımlı farelerde koagülasyon sisteminin aktive olduğu, APC düzeyinin azaldığı, trombin üretiminin arttığı görülmüştür (10). Fizyolojik durumlarda trombin sisteminin ve plazmin sisteminin aktivasyonu ile birlikte PC sisteminin aktivasyonu bir denge içindedir. Astım gibi patolojik durumlarda bu denge bozulmaktadır. Artmış trombin jenerasyonu, azalmış PC aktivasyonu sonucunda havayollarında inflamatuvar yanıtta artış, kollajen birikimi ve fibrozis, büyüme faktörlerinin salınımı sonucu artmış fibroproliferatif yanıt ve sonuçta remodelling meydana gelmektedir. Hayvan deneylerinde inhale olarak uygulanan APC'nin havayolu inflamasyonunu ve aşırı duyarlılığını azalttığı sonuç olarak da remodelling ve fibrozisi önlediği saptanmıştır (10). APC'nin havayolu üzerindeki etkileri tablo 2.2'de verilmiştir.

**Tablo 2.2.** APC'nin havayolu üzerindeki etkileri

<b>Etki</b>	<b>Mekanizma</b>
İnflamasyonu ↓	TNF- $\alpha$ , IL 1- $\beta$ , IL-6, IL-8, NF- $\kappa$ B ekspresyonunu ↓
Koagülasyon sisteminin aktivasyonu ve trombin üretimini ↓	F5a, F8a inhibisyonu
PAI-1 inhibisyonu	Profibrinolitik aktivite, kollajen depolanmasında ↓
Matriks metalloproteinaz aktivasyonu	ESM birikimi ↓
PDGF ekspresyonu ↓	Fibroproliferatif yanıt ↓
Th1/Th2 balansında değişiklik	Eozinofilik inflamasyon ve IgE sekresyonunu ↓

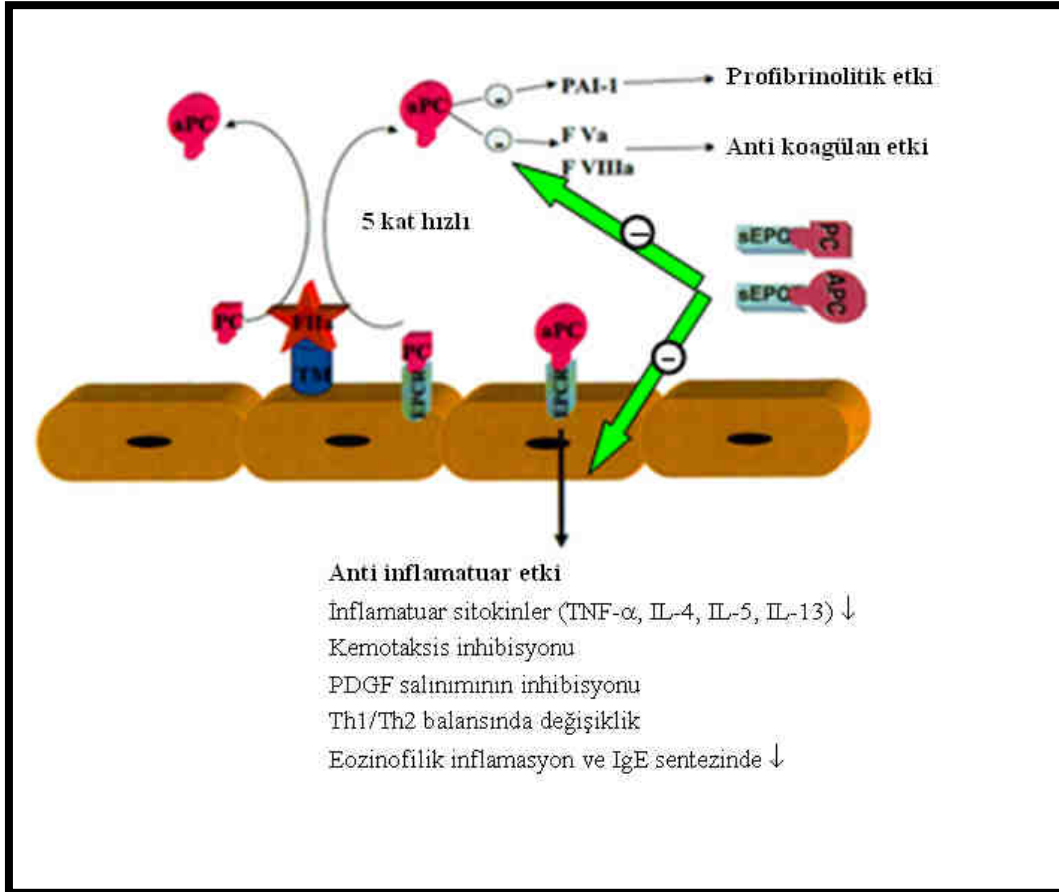
İlk olarak damar endotelinde saptanan ancak sonra bir çok hücre yüzeyinde varlığı gösterilen endotelial protein C reseptörü (EPCR) APC'nin antikoagülan ve antiinflamatuvar etkilerine aracılık eder. PC'nin T-TM kompleksi tarafından aktivasyonu, PC EPCR'ye bağlı iken 5 kat daha hızlı olmaktadır (96,97). Yapılan çalışmalarda EPCR; APC'nin antikoagülan etkilerini arttırmakta ve APC'nin antiinflamatuvar etkilerinde ana rol almaktadır (86,97). Hayvan deneylerinde APC-EPCR etkileşimini bloke edildiğinde APC'nin hem antikoagülan hemde antiinflamatuvar etkilerinin ortadan kalktığı, sitokin salınımında ve lökosit ekstravazasyonunda artış olduğu gözlenmiştir. Mürin astım modelinde APC'nin havayolu remodellingi üzerine olumlu etkilerinin inhale veya sistemik yolla uygulanan anti-EPCR antikoru ile ortadan kalktığı saptanmıştır (10).

Solubl EPCR (sEPCR) endotel yüzeyindeki EPCR'nin inflamasyonda artan sitokinler ve metalloproteinazların etkisiyle kopması sonucu açığa çıkar. sEPCR, EPCR ile benzer afinite APC'ye bağlanır ve APC'nin EPCR ile etkileşimini engelleyerek APC'nin anti inflamatuvar, profibrinolitik ve antikoagülan etkilerini inhibe eder

(98,99,100). sEPCR düzeyi Wegener granülamatozisi, SLE ve sepsis gibi hastalıklarda artmış olarak saptanır ve hastalık aktivitesi ve endotel hasarının derecesini gösterir (101). Hayvan deneylerinde PC-EPCR bağlanması engellendiğinde subletal dozdaki E.coli sepsisi letal sepsis ile sonuçlanmaktadır ve septik şokun ana mediyatörlerinden TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve endotoksinler EPCR sentezini baskılamakta ve sEPCR düzeyini arttırmaktadır (102,103,104).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda sEPCR düzeylerinin genetik ve çevresel faktörlerden etkilendiği gösterilmiştir (105,106). sEPCR düzeylerinin trombin düzeyleri ile korele olduğu, artmış sEPCR düzeylerinin APC-EPCR aracılı koagülasyon kontrolünde bozukluğa yol açarak tromboza yatkınlık oluşturduğu gösterilmiştir (106,107,108).

APC-EPCR-sEPCR etkileşimi şekil 2.8’de verilmiştir.



Şekil2.8. APC-EPCR-sEPCR etkileşimi

### **3. MATERYAL ve METOD**

#### **3.1. Çalışma grubunun seçimi**

Çalışmaya; Nisan 2006 ile Nisan 2007 tarihleri arasında, Ankara Üniversitesi Pediatrik İmmunoloji-Allerji Bilim Dalı Polikliniğinde uluslararası rehberlerde belirlenen kriterlere göre astım tanısı alan ve tedavi edilen akut atakla başvuran 2-16 yaş arasında 22 olgu alındı. Hastalarda atakla başvuruda; tam kan sayımı, CRP, oksijen satürasyonu ölçümü yapıldı, gerek görülen olgularda PA akciğer grafisi çekildi. Atopi, sık karşılaşılan aero allerjenlere karşı spesifik IgE ve/veya cilt prick testi pozitifliği ile değerlendirildi. Son bir ay içerisinde sistemik steroid kullanan hastalar, kanama diatezi, tromboz veya buna ait aile öyküsü olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

Kontrol grubu astım, allerjik hastalık veya herhangi bir kronik hastalık öyküsü ve enfeksiyon bulgusu olmayan benzer yaş grubunda 18 sağlıklı ve gönüllü çocuktan oluşturuldu.

Çalışmaya alınan olgulara ait bulguların kaydedildiği bir çalışma formu hazırlandı. Bu çalışma formunda olguların yaşı, cinsiyeti, tanısı, ek allerjik hastalıkları (allerjik rinokonjonktivit, atopik dermatit), aile bireylerinde allerjik hastalık (astım, allerjik rinokonjonktivit, atopik dermatit) öyküsü, total IgE düzeyi, spesifik IgE değerleri, cilt prick testi sonuçları yer aldı.

#### **3.2. Örneklerin toplanması**

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alındıktan sonra çalışmaya başlandı. Çalışma öncesi hasta ve kontrollerin ebeveynlerinden bilgilendirilmiş onam alındı. Olgulardan ilk atakla başvuruda ve ataktan 2-3 hafta sonra stabil dönemde

sodyum sitratlı tüpe alınan venöz kan örnekleri 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip plazmaları ayrılarak -20°C'de çalışma gününe kadar saklandı.

### 3.3. Metod

sEPCR düzeyi mikroElisa (Diagnostics Stago, France, Asserachrom) yöntemiyle Pediatrik İmmunoloji-Allerji Araştırma laboratuvarında ölçüldü. Her test için üretici firmanın ürün prospektüsünde önerdiği yöntem kullanıldı.

sEPCR (Katalog numarası 00264) için minimum ölçülebilir düzey; 10 ng/ml idi.

Test Protokolü;

A1 kuyucuğu blank olarak seçildi. Blank kuyucuğuna hasta plazması dışında diğer tüm solüsyonlar konuldu.

1. Kalibratör ve kontrol serumları B1/B2 pozisyonundan H1/H2 pozisyonları dahil olmak üzere double çalışıldı. Blank kuyucuğuna sadece 200 µl Dilution Buffer (R4) konuldu.
2. Örnek kuyucuklarına dilüe edilen plazma örnekleri 200 µl dağıtıldı.
3. Üstü kapatılan plate, oda ısısında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon sonunda tüm kuyucuklar, çok kanallı pipet kullanılarak (300 µl yıkama solüsyonu ile) 5 kez yıkandı.
5. Yıkama sonunda tüm kuyucuklara 200 µl Anti sEPCR Peroxidase (R2) solüsyonu dağıtıldı.
6. Üstü kapatılan plate, oda ısısında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
7. İnkübasyon sonunda tüm kuyucuklar, çok kanallı pipet kullanılarak (300 µl yıkama solüsyonu ile) 5 kez yıkandı.



8. Yıkama sonunda tüm kuyucuklara 200 µl TMB (R3) solüsyonu dağıtıldı.
9. Plate oda ısısında 5 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra tüm kuyucuklara 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solüsyonundan 50 µl dağıtıldı.

Plate, ELISA okuyucusunda 450 nm de okumaya alındı. Okuma sonunda, konsantrasyonu bilinen kalibratörlere karşılık gelen optik dansite (OD) sonuçlarına göre bir grafik çizildi. Grafik çizerken log-log grafik kağıdı kullanıldı. X eksenine konsantrasyon, Y eksenine OD değerleri yerleştirildi. Oluşan eğri kullanılarak OD sonucu bilinen hastaların sEPCR konsantrasyonuna ulaşıldı. Grafikten elde edilen konsantrasyon sonuçları, dilüsyon faktörü göz önüne alınarak 51 ile çarpıldı ve çalışma grubunun sEPCR değerleri elde edildi.

### **3.4. Araştırmanın kaynağı**

Bu tez Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından 20060908023HPD proje numarası ile desteklenmiştir.

### **3.5. İstatistiksel değerlendirme**

Çalışmanın istatistiksel analizi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda SPSS ver 12 programı kullanılarak yapıldı. Grupların karşılaştırılmasında demografik veriler için T-testi ve Ki-Kare testi, sEPCR düzeyleri için Mann-Whitney U testi ve Wilcoxon Signed Ranks testi kullanıldı. P<0.05 anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik İmmünoloji Allerji bilim dalında tanı alan ve izlenen 22 astımlı olgunun, akut atak döneminde ve atak sonrası stabil dönemde plazma sEPCR düzeyleri değerlendirildi. Çalışmaya benzer yaş grubunda 18 sağlıklı birey kontrol grubu olarak alındı. Astımlı olguların yaş ve cinsiyet özellikleri tablo 4.1’de kontrollerin yaş ve cinsiyet özellikleri ise tablo 4.2’de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Astımlı olguların yaş ve cinsiyet özellikleri

Astımlı hasta grubu			
	Olgu	Yaş (Yıl)	Cinsiyet
1	M.E.Ç.	7,5	E
2	M.M.Ö.	3,5	E
3	İ.K.	6	K
4	Y.Y.Ç.	4	E
5	İ.U.	7	E
6	Y.D.	9,5	K
7	B.D.	6,5	E
8	C.K.	7,5	E
9	F.N.G.	7	K
10	M.K.E.	3,5	E
11	B.C.	4,5	K
12	D.A.	8	K
13	S.K.	4	K
14	E.A.	2	K
15	A.A.	7	K
16	F.S.	4	E
17	B.B.	7	E
18	H.D.	5,5	E
19	K.İ.K.	4	E
20	B.Y.	7	E
21	Y.Y.	4,5	E
22	B.Ç.	5,5	E

**Tablo 4.2.** Kontrol grubunun yaş ve cinsiyet özellikleri

Kontrol grubu			
	Olgu	Yaş (Yıl)	Cinsiyet
1	D.D.	11	K
2	H.G.	14	K
3	F.K.	7	E
4	E.A.	10	K
5	B.K.	2	E
6	G.Y.	10	E
7	E.Ç.	4	K
8	E.K.	7	E
9	A.Y.	4	K
10	S.Ö.	4	K
11	E.B.S.	5	E
12	B.K.	8	E
13	M.B.	10	K
14	İ.U.	4	E
15	Y.B.	9	K
16	Ş.U.	5	K
17	N.A.	4,5	K
18	M.G.	10	E

Olguların % 63,6'sı erkek, % 36,4'ü kızdı. Yaşları ortalama  $5,68 \pm 1,86$  median 5,75 yıl (range; 2-9,5) olarak saptandı. Kontrol grubunu oluşturan sağlıklı çocuklarınsa % 44,4'ü erkek, % 55,6'si kızdı. Yaşları ortalama  $7,13 \pm 3,26$  median 7 yıl (range; 2-14) olarak saptandı. Olguların ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet dağılımları tablo 4.3'de verilmiştir.

**Tablo 4.3.** Olguların ve kontrollerin yaş-cinsiyet dağılımları

	<b>Astım (n:22)</b>	<b>Kontrol (n:18)</b>
<b>Median yaş</b>	5,75	7
<b>(Min-Max)</b>	(2-9,5)	(2-14)
<b>Cins (E/K)</b>	14/8	8/10

Çalışmaya alınan 22 olgudan 8'i atopik, 14'ü nonatopik astım tanısı ile izlenmekteydi. Atopik olguların % 62,5'inde ailede atopi, % 50'sinde eşlik eden diğer allerjik hastalıklar (rinit, konjunktivit, atopik dermatit) nonatopik olguların ise % 21,4'ünde ailede atopi, % 21,4'ünde eşlik eden diğer allerjik hastalıklar mevcuttu.

Astımlı olgulardan 12 olgu hafif intermittan (Hİ), 7 olgu hafif persistan (HP), 3 olgu ise orta persistan (OP) astım tanısı ile izlenmekteydi.

Astımlı olguların klinik ve laboratuvar özellikleri tablo 4.4'de verilmiştir.

**Tablo 4.4.** Astımlı olguların klinik ve laboratuvar özellikleri

Olgu	Atopik dermatit	ARK	Ailede atopi	Total IgE (IU/ml)	Phadiatop	Spesifik IgE pozitifliği	Cilt testi pozitifliği	Astım şiddeti	Hb (mg/dL)	BK (/mm <sup>3</sup> )	Trombosit (/mm <sup>3</sup> )	Sedim	CRP mg/dL
1	M.E.Ç.	Yok	Yok	8	Neg	Neg	-	Hİ	14,5	14100	360000	15	0,313
2	M.M.Ö.	Yok	Var	3	Neg	Neg	-	HP	12,8	4000	309000		0,631
3	İ.K.	Yok	Var	8,19	Neg	Neg	-	Hİ	12,9	6000	466000	30	0,67
4	Y.Y.Ç.	Var	Yok	203,6	(+3)	D1 (+6), D2 (+4)	-	HP	11,9	13600	240000	26	0,726
5	İ.U.	Yok	Var	-	-	Mite,Mould, Grass.Tree: (+2) Weed,Gıda: (+1)	-	Hİ	13,3	7300	281000	20	0,9
6	Y.D.	Yok	Var	-	-	-	687 (+5)	HP	12,6	8400	314000	10	0,313
7	B.D.	Yok	Yok	-	Neg	Neg	neg	Hİ	14,1	12000	368000	27	1,17
8	C.K.	Yok	Yok	2848	Neg	Neg	neg	Hİ	12,4	9900	388000	28	2,41
9	F.N.G.	Yok	Yok	3,96	Neg	Neg	-	HP	14,2	21300	390000	24	2,6
10	M.K.E.	Yok	Var	35,64	Neg	Neg	-	HP	12,6	6700	235000	18	0,313
11	B.C.	Yok	Var	61,4	(+2)	-	314 (+3)	Hİ	13,4	5500	328000		0,313
12	D.A.	Yok	Var	38,19	(+3)	DP,DF: (+3), Food Mix: (+1)	-	Hİ	12,5	11700	371000	18	0,313
13	S.K.	Var	Yok	146	(+1)	Gıda Mix, İnek Sütü, Yumurta Aki: (+2),Ağaç Mix: (+1)	-	HP	13	28300	146000		4,54
14	E.A.	Yok	Yok	14,7	Neg	Neg	-	Hİ	11,4	4100	323000	19	0,926
15	A.A.	Yok	Yok	65,19	Neg	Neg	neg	Hİ	15,3	18300	121000	12	2,28
16	F.S.	Yok	Yok	58,59	Neg	Neg	-	OP	11,1	9700	277000	32	1,95
17	B.B.	Yok	Yok	52	Neg	Neg	-	Hİ	15	8000	299000		0,298
18	H.D.	Yok	Yok	10,05	Neg	Neg	neg	Hİ	13,1	9200	591000	20	0,922
19	K.İ.K.	Yok	Var	83,9	(+2)	DP,DF: (+3), Ev Tozu Akarı, House Dust Mix: (+3), Gıda Mix: (+1)	-	Hİ	13,7	8300	292000	30	1,36
20	B.Y.	Yok	Yok	383,3	(+3)	Grass Pollen Mix: (+4), Tree Pollen Mix, House Dust Mix, Weed Pollen Mix: (+2)	-	HP	16,5	11900	496000	5	0,298
21	Y.Y.	Var	Yok	243	Neg	Neg	-	OP	14	21800	459000		5,75
22	B.Ç.	Yok	Yok	9,28	Neg	Neg	-	OP	11,4	13000	366000		0,313

Astımlı olguların atak sırasında ve atak sonrası stabil dönemdeki sEPCR düzeyleri tablo 4.5’de kontrollerin sEPCR düzeyleri tablo 4.6’da verilmiştir.

**Tablo 4.5.** Astımlı olguların atak sırasında ve stabil dönemdeki sEPCR düzeyleri

	<b>Olgu</b>	<b>sEPCR (atak) ng/ml</b>	<b>sEPCR (stabil) ng/ml</b>
1	M.E.Ç.	80	85
2	M.M.Ö.	56	68
3	İ.K.	165	290
4	Y.Y.Ç.	75	83
5	İ.U.	45	85
6	Y.D.	63	70
7	B.D.	75	90
8	C.K.	265	340
9	F.N.G.	80	110
10	M.K.E.	76	100
11	B.C.	100	85
12	D.A.	75	195
13	S.K.	200	260
14	E.A.	50	65
15	A.A.	195	280
16	F.S.	65	115
17	B.B.	67	150
18	H.D.	110	119
19	K.İ.K.	100	130
20	B.Y.	97	100
21	Y.Y.	200	320
22	B.Ç.	90	112

**Tablo4.6.** Kontrollerin sEPCR düzeyleri

	<b>Kontrol</b>	<b>sEPCR-ng/ml</b>
1	D.D.	130
2	H.G.	112
3	F.K.	112
4	E.A.	70
5	B.K.	87
6	G.Y.	87
7	E.Ç.	90
8	E.K.	85
9	A.Y.	57
10	S.Ö.	120
11	E.B.S.	127
12	B.K.	120
13	M.B.	105
14	İ.U.	105
15	Y.B.	110
16	Ş.U.	145
17	N.A.	140
18	M.G.	150

Astımlı olgularla sağlıklı kontroller karşılaştırıldığında; yaş ve cinsiyet dağılımları arsında anlamlı farklılık saptanmadı ( $p>0,05$ ). Plazma sEPCR düzeyleri astımlı hastalarda atak sırasında (median:80ng/ml (45-265ng/ml)) ve stabil dönemde (median:111ng/ml (65-340ng/ml)) kontrollere (median:111ng/ml (57-150ng/ml))

göre farklı bulunmadı. ( $p > 0,05$ ). Buna karşın astımlı olgularda atak sırasında düşük olan sEPCR düzeylerinin, atak sonrası stabil dönemde 22 olgudan 21'inde yükseldiği ve farkın anlamlı olduğu belirlendi. ( $p < 0,001$ ). (Tablo 4.7) (Şekil 4.1) .

Atopik ve nonatopik astımlı olgular arasında sEPCR düzeyleri açısından akut atak ve stabil dönemde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. ( $p > 0,05$ ).

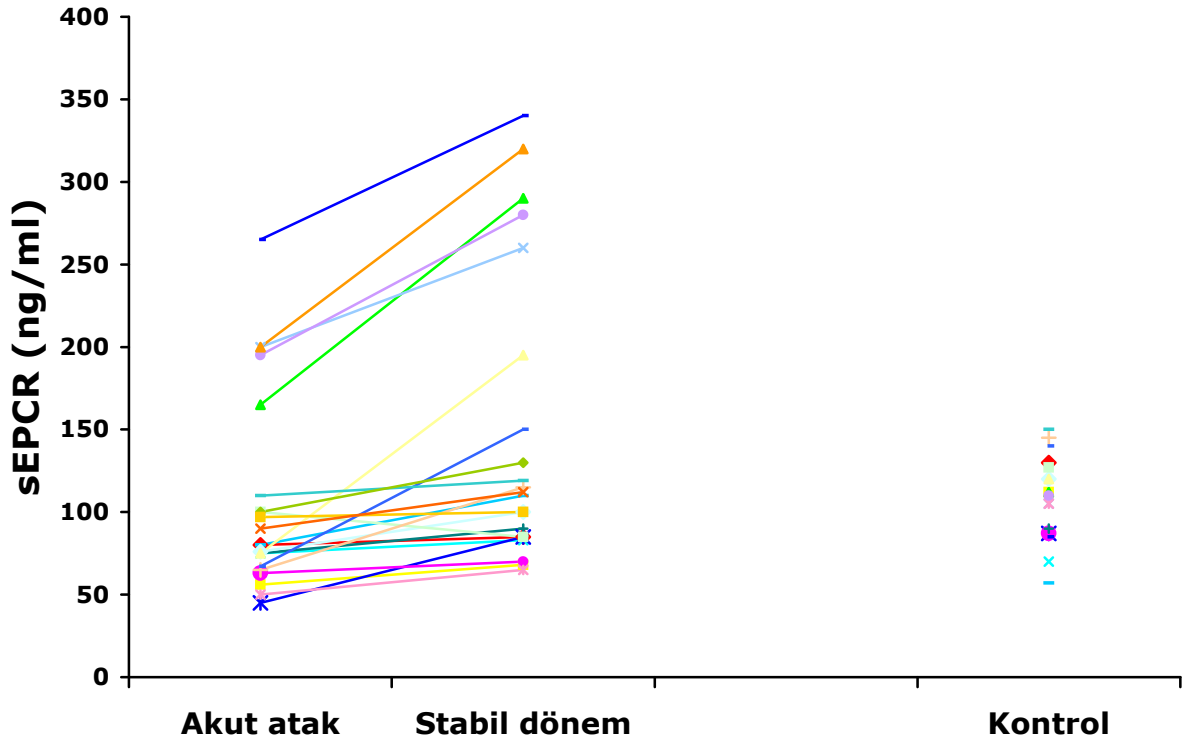
Astımlı olguların akut atak sırasındaki sEPCR düzeyleri ile BK değerleri (Lökositöz varlığı) ve CRP değerleri karşılaştırıldı, anlamlı korelasyon bulunmadı. ( $p > 0,05$ ).

sEPCR düzeylerinin astım şiddetine göre değişiklik göstermediği belirlendi. ( $p > 0,05$ ).

sEPCR düzeylerinin yaş ile korelasyonuna bakıldı ve hem astımlı hasta gurubunda hemde kontrol grubunda korelasyon göstermediği saptandı ( $p > 0,05$ ).

**Tablo 4.7.** Astımlı olguların ve sağlıklı kontrollerin sEPCR düzeyleri

	<b>Astım (n:22)</b>		<b>Kontrol (n:18)</b>		<b>P</b>
	Median (min-max)	Ortalama $\pm$ SD	Median (min-max)	Ortalama $\pm$ SD	
<b>Stabil sEPCR (ng/ml)</b>	111 (65-340)	147,81 $\pm$ 89,24	111 (57-150)	108,44 $\pm$ 25,57	0,737
<b>Atak sEPCR (ng/ml)</b>	80 (45-265)	105,86 $\pm$ 59,49	111 (57-150)	108,44 $\pm$ 25,57	0,100
<b>P</b>	0,001				



Şekil 4.1. Astımlı olguların ve sağlıklı kontrollerin sEPCR düzeyleri

#### Bulgular ve sonuçların özeti

- Astımlı çocuklarda atak sırasındaki sEPCR düzeylerinin sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında düşük olduğu görüldü ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.
- Astımlı çocuklarda stabil dönemdeki sEPCR düzeylerinin sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında benzer olduğu görüldü.
- Astımlı olguların atak ile stabil dönemi karşılaştırıldığında; ataktaki sEPCR düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük olduğu görüldü. ( $p < 0,001$ ).
- sEPCR düzeyleri ile BK ve CRP değerleri arasında korelasyon bulunmadı.

- sEPCR düzeylerinin astım şiddeti ile ilişkili olmadığı görüldü.
- sEPCR düzeylerinin atopik ve nonatopik olgularda farklılık göstermediği bulundu.
- sEPCR düzeyleri ile yaş arasında korelasyon bulunmadı.



## 5. TARTIŞMA

Astım; tekrarlayan öksürük, nefes darlığı, hırıltılı solunum ile seyreden, geçici havayolu obstrüksüyonu ile karakterize, kronik inflamatuvar bir hastalıktır (13). Etyolojisinde genetik ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığı astım, çocukluk çağının en sık görülen kronik hastalığıdır ve prevalansı son 20 yılda tüm dünyada giderek artmaktadır (1). Ülkemizde yapılan astım prevalans çalışmalarına göre sıklık % 13.7 - % 15.3 arasında bulunmuştur (21).

Kronik inflamasyon ve havayolu remodellingi astım patogenezinin temelini oluşturmaktadır (2,45). Astım tedavisinde ana hedeflerden biri havayolunda kalıcı değişiklikler oluşmadan erken dönemde antiinflamatuvar tedavi başlamaktır. Günümüzde antiinflamatuvar tedavide en sık kullanılan ilaçlar kortikosteroidler olup uzun süreli kullanımda ciddi yan etkiler oluşabilmektedir. Bu nedenle astım patogenezi ve yeni antiinflamatuvar tedaviler üzerindeki çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir.

Son yıllarda giderek artan sayıda çalışmada koagülasyon-inflamasyon arasındaki ilişkiye dikkat çekilmektedir. PC sistemi koagülasyon ve inflamasyonda kritik öneme sahiptir (86,87). PC sisteminin aktivasyonu endotel yüzeyine bağlı T-TM kompleksi tarafından PC→APC dönüşümü ile olur. Fizyolojik durumlarda artmış trombin oluşumuna artmış PC aktivasyonu eşlik eder, koagülasyon ve inflamasyon dengede tutulur. Patolojik durumlarda trombin / APC arasındaki denge bozulmakta, artmış trombin oluşumuna karşın PC aktivasyonu azalmakta, sonuç olarak koagülasyon ve inflamasyon yanıtı oluşmaktadır (108,109). Yapılan çalışmalarda astımlı hastalarda APC / trombin oranının belirgin olarak azaldığı, havayollarında yetersiz APC oluşumu ve solubl TM arttığı gösterilmiştir (5).

EPCR tip 1 transmembran proteindir ve MHC Class I molekülü ile benzerlik gösterir (110). İlk olarak büyük damarların endotelinde saptanmıştır (111). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda dendritik hücre ve lökositler birçok hücre yüzeyinde

varlığı gösterilmiştir. Dendritik hücre yüzeyinde de saptanan EPCR'nin immün sistem ile ilişkisi üzerinde durulmaya başlanmıştır (91,112). EPCR geni 20. kromozomda 20q11.2 lokalizasyonundadır ve EPCR geni ile ilişki değişik mutasyon ve polimorfizmler sonucu artmış tromboz riskleri ve şiddetli sepsis riskleri tanımlanmıştır (101,105).

APC, antikoagülan ve antiinflamatuvar etkilere sahiptir ve bu etkilere EPCR aracılık eder (86,87,97). İn hale APC uygulamasının havayollarında inflamasyonu baskıladığı hayvan deneylerinde gösterilmiştir (10). Yapılan çalışmalarda EPCR; APC'nin antikoagülan etkilerini arttırmakta ve APC'nin antiinflamatuvar etkilerinde ana rol almaktadır. Hayvan deneylerinde APC-EPCR etkileşimini bloke edildiğinde APC'nin hem antikoagülan hemde antiinflamatuvar etkilerinin ortadan kalktığı, sitokin salınımında ve lökosit ekstrasvazasyonunda artış olduğu gözlenmiştir (10).

Solubl EPCR (sEPCR) endotel yüzeyindeki EPCR'nin inflamasyonda artan sitokinler ve metalloproteinazların etkisiyle kopması sonucu oluşur (99). sEPCR düzeyi Wegener granülamatozisi, SLE ve sepsis gibi hastalıklarda artmış olarak saptanır ve hastalık aktivitesi ve endotel hasarının derecesini gösterir (101). sEPCR düzeyinin esas olarak trombin oluşumu ile korele olduğu üzerinde durulmaktadır ancak iv vivo önemi halen tam bilinmemektedir. sEPCR düzeyleri retinal ven trombozu, behçet hastalığı, pediatrik inme vakaları gibi birçok hastalıkta bakılmış ve artmış sEPCR düzeylerinin tromboza yatkınlık oluşturduğu ve yaygın inflamasyonla giden hastalıklarda düzeyinin arttığı gösterilmiştir (106,113,114,115). Sonuç olarak sEPCR, APC-EPCR etkileşimini bozarak prokoagülan ve proinflamatuvar etki gösterir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda sEPCR'nin faktör VIIa'yı da bağlayarak inhibe ettiği gösterilmiştir (116).

Bizim çalışmamızda astımlı olgularda, atak sırasında ve atak sonrası stabil dönemde plazma sEPCR düzeylerine baktık. Benzer yaş gurubunda sağlıklı kontrollerle karşılaştırdık. Astımlı çocuklarda atak sırasındaki sEPCR düzeylerinin sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında düşük olduğu görüldü ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Astımlı olguların atak ile stabil dönemi karşılaştırıldığında ise; ataktaki sEPCR düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük olduğu

görüldü. ( $p < 0,001$ ). Literatürde astımlı olgularda sEPCR düzeyi ile ilgili yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Daha önceki yapılan çalışmalarda Wegener granülamatozisi, SLE ve sepsis gibi yaygın endotel hasarı ile giden hastalıklarda sEPCR'nin artışı saptanmış ve düzeyinin endotel hasarı ve hastalık şiddeti ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Bizim çalışmamızda astımlı olgularda atak sırasında sEPCR'nin artmış olmasını bekledik ancak tam tersi olarak azalmış olarak bulduk. Astımlı olgularda atak sırasında sEPCR'nin düşük bulunmasını 2 şekilde yorumladık. Astımda inflamasyon süreci yaygın endotel disfonksiyonu içermeyip sepsis gibi akut inflamasyonla giden hastalıklardan farklılık gösterebilir. Astımda atak sırasında sEPCR düşüklüğü bir önceki basamakta yer alan antiinflamatuvar savunma mekanizmalarının özellikle de APC'nin artışına ikincil olabilir.

Sağlıklı kişilerde sEPCR düzeylerinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma vardır. Stearns ve arkadaşları sağlıklı erişkinlerde sEPCR düzeylerinin bimodal dağılım gösterdiğini, %80 olguda sEPCR düzeylerinin 100-200 ng/ml, %20 olguda ise 200-800ng/ml arasında olduğunu bulmuşlardır (117). Yüksek sEPCR düzeylerinin EPCR gen mutasyonu ile ilişkili olabileceği üzerinde durulmaktadır. Saposnik ve arkadaşları EPCR gen mutasyonlarında (A3 haplotip) artmış plazma sEPCR düzeyleri ve bununla ilişkili artmış venöz tromboz riskini göstermişlerdir (118). Ulu ve arkadaşları pediatrik inmeli hastalarda A3 haplotipi ile sEPCR düzeylerini kıyaslamış ve A3 haplotipi taşıyan grubun sEPCR düzeylerinin A3 haplotipi taşımayanlara göre anlamlı olarak yüksek olduğunu saptamışlardır (106). Bu çalışmada ayrıca A3 haplotipi taşıyan olguların sEPCR düzeylerinin hepsinin normal olarak kabul edilen 100ng/ml değerinin altında olmadığı belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada sEPCR düzeyleri ile olguların yaşları arasında korelasyona bakılmış ve anlamlı korelasyon bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda da benzer olarak olguların yaşları ile sEPCR düzeyleri arasında korelasyon saptanmadı.

Sağlıklı çocuklarda sEPCR düzeyleri ile ilgili bilgi de çok azdır. Yürürer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sağlıklı çocuklarda median sEPCR düzeyini 90ng/ml olarak bulmuşlardır (113). Bizim çalışmamızda sağlıklı kontrollerin median sEPCR düzeyi 111ng/ml olarak bulundu.

Bu çalışmada sEPCR düzeyleri ile CRP düzeyleri arasında her ne kadar korelasyon bulunmamış olsada olgular ayrıntılı incelendiğinde CRP düzeyi yüksek olan olgularda sEPCR düzeylerinin de yüksek olduğu görülmüştür. Ancak aynı olguların atak sonrasında stabil dönemde de sEPCR düzeylerinin yüksek olması bu ilişkinin bir akut faz reaktanı olan CRP ile korelasyondan çok genetik yapı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Bizim çalışmamız insanda astım-sEPCR ilişkisini araştıran ilk çalışmadır. Elde ettiğimiz sonuçlar, astım patogenezinde koagülasyon - inflamasyon ilişkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu düşündürmektedir. Bu ilişkiyi aydınlatmak için daha geniş serilere ve özellikle de olgularda sEPCR düzeyleri ile eşzamanlı APC ve trombin düzeylerinin bakılmasına ihtiyaç vardır.

## 6. ÖZET

### ASTIMLI ÇOCUKLARDA sEPCR DÜZEYLERİ

Kronik inflamasyon ve hava yollarının yeniden yapılanması (remodelling) astımın karakteristik özelliklerindedir. Protein C (PC)'nin aktif formu olan aktive protein C (APC) koagülasyonun kontrolü dışında inflamasyonun sınırlandırılmasında da önemli rol oynar. APC'nin anti inflamatuvar etkilerinden endotelial protein C reseptörü (EPCR)'nün sorumlu olduğu düşünülmektedir. Solubl EPCR (sEPCR) endotel yüzeyindeki EPCR'nin inflamasyonda artan sitokinler ve metalloproteinazların etkisiyle kopması sonucu oluşur. sEPCR, APC'nin anti inflamatuvar, profibrinolitik ve antikoagülan etkilerini inhibe eder. Yapılan hayvan deneylerinde allerjen uyarımı sonrası astımlı farelere inhaler ve sistemik yolla verilen APC'nin inflamasyonu ve havayolu aşırı duyarlılığını baskıladığı gösterilmiş, APC-EPCR bağlanmasını inhibe eden anti-EPCR antikoları verildiğinde APC'nin anti inflamatuvar etkilerini ortadan kaldırdığı bronkoalveolar sıvıda eozinofillerin arttığı gözlenmiştir.

Bu çalışmada astımlı çocuklarda ve sağlıklı kontrollerde plazmada sEPCR düzeyine bakılması ve astım patogenezindeki rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya Pediatrik Allerji-İmmunoloji polikliniğinde uluslararası rehberlere göre astım tanısı alan ve izlenen akut atakla başvuran 2-16 yaş arasında 22 astımlı olgu ve benzer yaş grubunda 18 sağlıklı kontrol alındı. Astımlı olgulardan atakta ve ataktan 2-3 hafta sonra stabil dönemde venöz kan örnekleri alındı. sEPCR düzeyine plazmada ELISA (Diagnostica Stago, France, Asserachrom) yöntemi ile bakıldı.

Plazma sEPCR düzeyleri astımlı hastalarda atak sırasında (median:80ng/ml (45-265ng/ml)) ve stabil dönemde (median:111ng/ml (65-340ng/ml)) kontrollere (median:111ng/ml (57-150ng/ml)) göre farklı bulunmadı. Buna karşın astımlı

olgularda atak sırasında düşük olan sEPCR düzeylerinin, atak sonrası stabil dönemde 22 olgudan 21'inde yükseldiği ve farkın anlamlı olduğu belirlendi. ( $p<0,001$ ).

Astımlı olgularda atak sırasında sEPCR'nin düşük bulunması 2 şekilde yorumlandı. Astımda inflamasyon süreci yaygın endotel disfonksiyonu içermeyip sepsis gibi akut inflamasyonla giden hastalıklardan farklılık gösterebilir. Astımda atak sırasında sEPCR düşüklüğü bir önceki basamakta yer alan antiinflamatuvar savunma mekanizmalarının özellikle de APC'nin artışına ikincil olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Astım, APC, EPCR, sEPCR

## 7. SUMMARY

### PLASMA sEPCR LEVELS IN ASTHMATIC CHILDREN

Chronic inflammation and airway remodelling are the characteristic features of asthma. Addition to its role in coagulation, activated protein C (APC) which is the active form of protein C (PC), plays an important role in limiting the inflammation. Endothelial protein C receptor (EPCR) is thought to be responsible from the anti-inflammatory effects of APC. Solubl EPCR (sEPCR) is formed by the cleavage of EPCR from the endothelial surface by the increasing levels of cytokines and metalloproteinases. sEPCR inhibits the anti-inflammatory, profibrinolytic and anticoagulant effects of APC. The inhibition of the inflammation and the hypersensitivity of the airways in asthmatic mice by the inhalation or systemic administration of APC, and the blockage of anti-inflammatory effect of APC and an increase in the number of eosinophils in the bronchoalveolar secretions by the inhalation of anti-EPCR which inhibits the binding of APC-EPCR, has been shown in animal studies.

In this study we investigated the effects of sEPCR in the pathogenesis of asthma by evaluating the sEPCR levels in children with asthma and in healthy controls.

Twenty two asthmatic children who were diagnosed at Ankara University Medical Faculty Pediatric Allergy-Immunology Department were included in the study. The asthma diagnosis was made by using the international guidelines. The control group consisted of 18 healthy children within the same age group. Venous peripheral blood was obtained from patients with asthma during an acute attack and at a stable period; 2-3 weeks following the attack. sEPCR levels were studied by using ELISA (Diagnostica Stago, France, Asserachrom) method.

Median plasma sEPCR levels in children with asthma were 80ng/ml (45-265ng/ml) and 111ng/ml (65-340ng/ml) during the attack and the stable period respectively and was not statistically significant when compared to the control group (111ng/ml (57-150ng/ml)). However in 21 of 22 cases of asthmatic children, the sEPCR levels which were low during the acute attack increased significantly during the stable period ( $p < 0,001$ ).

There could be two explanations for the low levels of sEPCR during the acute attack period in children with asthma. The inflammation mechanisms in asthma may be different from other diseases where acute inflammation is part of the pathogenesis, such as sepsis and may not have generalized endothelial dysfunction and/or the low levels of sEPCR during the acute attack could be secondary to the increased defense mechanisms at an earlier step, especially the increase in APC.

**Keywords:** Asthma, APC, EPCR, sEPCR



## 8. KAYNAKLAR

1. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema:ISAAC. *Lancet* 1998;351:1225-1232
2. Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Bonsignore G. Airway remodelling in asthma. *Chest* 2003;123:417-422
3. Banach-Wawrzeńczyk E, Dziedziczko A, Rość D. Fibrinolysis system in patients with bronchial asthma. *Med Sci Monit* 2000;6 (1):103-107
4. Esmon CT. Inflammation and the Activated Protein C Anticoagulant Pathway. *Semin Thromb Hemost* 2006;32:49–60
5. Hataji O, Taguchi O, Gabazza EC, Yuda H, Fujimoto H, Suzuki K, Adachi Y. Activation of Protein C Patway in the Airways. *Lung* 2002;180:47-59
6. Suzuki K, Gabazza EC, Hayashi T, Kamada H, Adachi Y, Taguchi O. Protective role of activated protein C in lung and airway remodeling. *Crit Care Med* 2004;32 (5):262-265
7. Oka S, Gabazza EC, Taguchi Y, Yamaguchi M, Nakashima S, Suzuki K, Adachi Y, Imoto I. Role of activated protein C in Helicobacter pylori-associated gastritis. *Infect Immun* 2000; 68:2863–2869
8. Liaw PC, Neuenschwander PF, Smirnov MD, Esmon CT. Mechanisms by Which Soluble Endothelial Cell Protein C Receptor Modulates Protein C and Activated Protein C Function. *J Biol Chem* 2000;275:5447-5452

9. Marlies Van de Wouwer, Desire Collen, Edward M. Conway. Thrombomodulin-Protein C-EPCR System Integrated to Regulate Coagulation and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1374-1383
10. Yuda H, Adachi Y, Taguchi O, Gabazza EC, Hataji O, Fujimoto H, Tamaki S, Nishikubo K, Fukudome K, D'Alessandro-Gabazza CN, Maruyama J, Izumizaki M, Iwase M, Homma I, Inoue R, Kamada H, Hayashi T, Kasper M, Lambrecht BN, Barnes PJ, Suzuki K. Activated protein C inhibits bronchial hyperresponsiveness and Th2 cytokine expression in mice. *Blood* 2004; 103:2196–2204
11. Gandrille S. Endothelial cell protein C receptor and the risk of venous thrombosis. *Haematologica* 2008;93 (6):812-816
12. Taylor FB Jr, Chang A, Esmon CT, D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Blick KE. Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of *Escherichia coli* infusion in the baboon. *J Clin Invest* 1987; 79:918–925
13. Nadel JA, Busse WW. Asthma. *Am. J. Respir Crit Care Med.* 1998 Apr; 157 (4 pt 2):130-8
14. Türктаş H. Astım Patogenezi. Bozkır matbaası, Ankara 1996; 95-106.
15. Martinez FD. Development of wheezing disorders and asthma in preschool children. *Pediatrics* 2002 Feb; 109 (2 Suppl):362-7
16. Zeyrek CD, Zeyrek F, Sevinc E, Demir E. Prevalence of Asthma and Allergic Diseases in Sanliurfa, Turkey, and the Relation to Environmental and Socioeconomic Factors: Is the Hygiene Hypothesis Enough? *J Investig Allergol Clin Immunol* 2006; Vol. 16 (5): 290-295

17. Anlar FY, Sancak R, Oztürk F. Childhood allergic disorders in Samsun, Turkey: discrepancy between reported and diagnosed. *Pediatr Allergy Immunol* 2006; 17: 635–638
18. Bayram I, Güneşer-Kendirli S, Yılmaz M, Altıntaş DU, Alparslan N, Bingöl-Karakoç G. The prevalence of asthma and allergic diseases in children of school age in Adana in Southern Turkey. *Turk J Pediatr* 2004; 46: 221–5
19. Demir AU, Karakaya G, Bozkurt B, Sekerel BE, Kalyoncu AF.. Asthma and allergic diseases in schoolchildren: third cross-sectional survey in the same primary school in Ankara, Turkey. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; 15: 531–538
20. Wong GW, Chow CM. *Pediatric Pulmonology* 2008;43:107–116
21. Akcakaya N, Kulak K, Hassanzadeh A, Camcioglu Y, Cokugras H. Prevalence of bronchial asthma and allergic rhinitis in Istanbul school children. *Eur J Epidemiol* 2000;16 (8): 693-9
22. Strachan DP. Hay fever, hygiene and household size. *BMJ* 1989;299:1259-60
23. von Hertzen LC. The hygiene hypothesis in the development of atopy and asthma-still a matter of controversy? *Q J Med* 1998;91:767-771
24. Weis ST. Asthma Epidemiology risk factors and natural history in: Bierman CW, Peartman DS (eds). *Allergy, asthma and immunology from infancy adulthood*. W. B. Saunders. Company, Philadelphia 1995; 6th ed. p: 472-484
25. Steinke JW, Borish L, Rosenwasser LJ. Genetics of hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:495-501
26. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma. A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. *Nat Genet* 1997; 15: 389-92

27. Daniels SE, Bhattacharrya S, James A, Leaves NI, Young A, Hill MR, Faux JA, Ryan GF, le Söuef PN, Lathrop GM, Musk AW, Cookson WO. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature*. 1996 Sep 19; 383 (6597): 247-50
28. McLean WH, Palmer CN, Henderson J, Kabesch M, Weidinger S, Irvine AD. Filaggrin variants confer susceptibility to asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008 May;121 (5):1294-5
29. Global Initiative For Asthma 2006
30. Wahn U, Lau S, Bergmann R, Kulig M, Forster J, Bergmann K, Bauer CP, Guggenmoos-Holzmann I. Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Jun;99 (6 Pt 1):763-9
31. Ownby DR, Johnson CC, Peterson EL. Exposure to dogs and cats in the first year of life and risk of allergic sensitization at 6 to 7 years of age. *JAMA*. 2002 Aug 28;288 (8):963-72
32. Gern JE, Reardon CL, Hoffjan S, Nicolae D, Li Z, Roberg KA, Neaville WA, Carlson-Dakes K, Adler K, Hamilton R, Anderson E, Gilbertson-White S, Tisler C, Dasilva D, Anklam K, Mikus LD, Rosenthal LA, Ober C, Gangnon R, Lemanske RF Jr. Effects of dog ownership and genotype on immune development and atopy in infancy. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Feb;113 (2):307-14
33. Peat JK, Tovey E, Toelle BG, Haby MM, Gray EJ, Mahmic A, Woolcock AJ. House dust mite allergens. A major risk factor for childhood asthma in Australia. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 Jan; 153 (1):141-6
34. Martinez Fd. Role of viral infections in the inception of asthma and allergies during childhood:Could they be protective? *Thorax* 1994;49:1180-1190

35. Openshaw PJM, Hewitt C. Protective and harmful effects of viral infections in childhood on wheezing disorders and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:40-43
36. Asher I, Boner A, Chuchalin A, Custovic A, Dagli E, Haus M, Hemmo-Lotem M, Holgate ST, Holt PG, Høst A, Iikura I, Johansson SG, Kowalski ML, Naspitz CK, Odhiambo J, Vichyanond P, Volovitz B, Wahn U, Warner JO, Weiss K, Zhong NS. Prevention of allergy and asthma: interim report. *Allergy*. 2000 Nov;55 (11):1069-88.
37. Martinez FD, Antognoni G, Macri F, Bonci E, Midulla F, De Castro G, Ronchetti R. Parental smoking enhances bronchial responsiveness in nine-year-old children. *Am Rev Respir Dis* 1998;138:518-523
38. Seymour BW, Schelegle ES, Pinkerton KE, Friebertshauser KE, Peake JL, Kurup VP, Coffman RL, Gershwin LJ. Second-hand smoke increases bronchial hyperreactivity and eosinophilia in a murine model of allergic aspergillosis. *Clin Dev Immunol* 2003;10:35-42
39. Lee JT, Kim H, Song H, Hong YC, Cho YS, Shin SY, Hyun YJ, Kim YS. Air pollution and asthma among children in Seol, Korea *Epidemiology* 2002;13:481-484
40. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the “hygiene hypothesis”. *Thorax* 2000; 55 (Suppl): S2-S10
41. Karmaus W, Botezan C. Does a higher number of siblings protect against the development of allergy and asthma? A review. *J Epidemiol Community Health* 2002;56:209-217
42. Devereux G, Seaton A. Diet as a risk factor for atopy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1109-17

43. Friedman NJ, Zeiger RS. The role of breast-feeding in the development of allergies and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Jun;115 (6):1238-48
44. Gilbert IA, Fouke JM, McFadden ER Jr. Intra-airway thermodynamics during exercise and hyperventilation in asthmatics. *J Appl Physiol* 1988 May;64 (5):2167-74
45. Hogg JC. Pathology of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1993 Jul; 92 (1 Pt 1): 1-5
46. Tattersfield AE, Knox AJ, Britton JR, Hall IP. Asthma. *Lancet* 2002 Oct 26; 360 (9342):1313-22
47. Krishna MT, Salvi SS, Holgate ST. Pathogenesis of asthma. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzin BL, Schroder Jr HW, eds. *Clinical Immunology Principles and Practise*. 2nd ed. London: Mosby, 2001;49:1-12
48. Tattersfield AE, Knox AJ, Britton JR, Hall IP. Asthma. *Lancet*. 2002 Oct 26; 360 (9342):1313-22.
49. Holt PG. Dendritic cells as sentinel cells in asthma. *Clinical Experimental Allergy Review* 2001;1:77-79
50. Andrade RM, Wessendarp M, Gubbels MJ, Striepen B, Subauste CS. CD40 induces macrophage anti-Toxoplasma gondii activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *J Clin Invest* 2006 Sep;116 (9):2366-77
51. Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:486-494
52. Georas SN, Guo J, De Fanis U, Casolaro V. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. *Eur Respir J* 2005 Dec;26 (6):1119-37

53. Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:450-463
54. Pykäläinen M, Kinos R, Valkonen S, Rydman P, Kilpeläinen M, Laitinen LA, Karjalainen J, Nieminen M, Hurme M, Kere J, Laitinen T, Laheesmaa R. Association analysis of common variants of STAT6, GATA3, and STAT4 to asthma and high serum IgE phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:80-87
55. Vignola AM, La Grutta S, Chiappara G, Benkeder A, Bellia V, Bonsignore G. Cellular network in airway inflammation and remodelling. *Pediatric Respiratory Review* 2002;3:41-46
56. Hansen I, Klimek L, Mosges R, Hormann K. Mediators of inflammation in the early and late phase of allergic rhinitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004 Jun;4 (3):159-63
57. Marone G. Asthma: recent advances. *Immunology Today* 1998;19:5-19
58. Schwartz LB, Bradford TR. Regulation of tryptase from human lung mast cells by heparin: Stabilization of the active tetramer. *J Biol Chem* 1986;261:7372
59. Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJ, Angel P, Heath JK. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 1987 Jul;6 (7):1899-904
60. Morishima Y, Nomura A, Uchida Y, Noguchi Y, Sakamoto T, Ishii Y, Goto Y, Masuyama K, Zhang MJ, Hirano K, Mochizuki M, Ohtsuka M, Sekizawa K. Triggering the induction of myofibroblast and fibrogenesis by airway epithelial shedding. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001 Jan;24 (1):1-11
61. Vignola AM, Kips J, Bousquet J. Tissue remodelling as a feature of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:1041-1053

62. Pohunek P, Warner JO, Turzíkóvá J, Kudrmann J, Roche WR. Markers of eosinophilic inflammation and tissue re-modelling in children before clinically diagnosed bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2005 Feb;16 (1):43-51
63. Barnes PJ. Neural control of human airways in health and disease. *Am Rev Respir Dis* 1986;134:1289-314
64. Barnes PJ. The third nervous system in the lung: physiology and clinical perspectives. *Thorax* 1984;39:561-7
65. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995 Aug 1;155 (3):1151-64
66. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003 Mar;3 (3):253-7
67. Sakaguchi S. Naturally arising FOXP-3 expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and to nonself. *Nat Immunol* 2005;6:345-52
68. Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol* 2004 Jun 1;172 (11):6519-23
69. von Boehmar B. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005;6 (4):338-344
70. Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 Jul 13;101 (28):10398-403



71. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 2004 Oct;4 (10):762-74
72. Myers AK, Perroni L, Costigan C, Reardon W. Clinical and molecular findings in IPEX syndrome. *Arch Dis Child* 2006 Jan;91 (1):63-4
73. Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor beta: the role of regulatory cells. *Immunolgy* 2006 Apr;117 (4):433-42
74. Welty-Wolf KE, Carraway MS, Ortel TL, Piantadosi CA. Coagulation and inflammation in acute lung injury. *Thromb Haemost* 2002; 88:17–25
75. Ruf W, Riewald M: Tissue factor-dependent coagulation protease signaling in acute lung injury. *Crit Care Med* 2003; 31:S231–S237
76. Welty-Wolf KE, Carraway MS, Ortel TL, Piantadosi CA. Coagulation and inflammation in acute lung injury. *Thromb Haemost* 2002; 88:17–25
77. Glusa E: Vascular effects of thrombin. *Semin Thromb Hemost* 1992; 18:296–304
78. Ryan TJ, Lai L, Malik AB. Plasmin generation induces neutrophil aggregation: dependence on the catalytic and lysine binding sites. *J Cell Physiol* 1992;151:255– 61
79. Chang WC, Shi GY, Chow YH, Chang LC, Hau JS, Lin MT, Jen CJ, Wing LY, Wu HL. Human plasmin induces a receptor-mediated arachidonate release coupled with G proteins in endothelial cells. *Am J Physiol* 1993;264:C271– 81
80. Hummel S, Beck E, Brachmann I. D-dimer level in BAL and exhalation of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), pulmonary sarcoidosis and exogenous allergic alveolitis (EAA). *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:A315

81. Oh CK, Ariue B, Alban RF, Shaw B, Cho SH. PAI-1 promotes extracellular matrix deposition in the airways of a murine asthma model. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:1155– 60
82. Eitzman DT, McCoy RD, Zheng X, Fay WP, Shen T, Ginsburg D, Simon RH. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor- 1 gene. *J Clin Invest* 1996;97:232– 7
83. Syrovets T, Jendrach M, Rohwedder A, Schule A, Simmet T. Plasmin-induced expression of cytokines and tissue factor in human monocytes involves AP-1 and IKKbeta-mediated NF-kappaB activation. *Blood* 2001;97:3941–50
84. Kucharewicz I, Kowal K, Buczko W, Bodzenta-Łukaszyk A. The plasmin system in airway remodeling. *Thrombosis Research* 2003;112:1 –7
85. Stenflo J, Fernlund P. Amino acid sequence of the heavy chain of bovine protein C. *J Biol Chem* 1982;257:12180-12190
86. Marlies Van de Wouwer, De'sire' Collen, Edward M. Conway. Thrombomodulin-Protein C-EPCR System. Integrated to Regulate Coagulation and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1374-1383
87. Charles T, Esmon PhD. The Protein C Pathway. *Chest* 2003;124:26-32
88. Murakami K, Okajima K, Uchiba M, Johno M, Nakagaki T, Okabe H, Takatsuki K. Activated protein C attenuates endotoxin-induced pulmonary vascular injury by inhibiting activated leukocytes in rats. *Blood.* 1996;87:642-647

89. Grey ST, Tsuchida A, Hau H, Orthner CL, Salem HH, Hancock WW. Selective inhibitory effects of the anticoagulant activated protein C on the response of human mononuclear phagocytes to LPS, IFN-gamma, or phorbol ester. *J Immunol.* 1994;153:3664-3672
90. White B, Schmidt M, Murphy C, Livingstone W, O'Toole D, Lawler M, O'Neill L, Kelleher D, Schwarz HP, Smith OP. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line. *Br J Haematol.* 2000;110:130-134
91. Sturn DH, Kaneider NC, Feistritzer C, Djanani A, Fukudome K, Wiedermann CJ. Expression and function of the endothelial protein C receptor in human neutrophils. *Blood.* 2003;102:1499-1505
92. Esmon CT: Protein C anticoagulant pathway and its role in controlling microvascular thrombosis and inflammation. *Crit Care Med* 2001; 29:S48–S51
93. Taylor FB, Chang A, Esmon CT, D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Blick KE. Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of Escherichia coli infusion in the baboon. *J Clin Invest.* 1987;79:918-925
94. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr; Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;334:699-709
95. Derhaschnig U, Reiter R, Knobl P, Baumgartner M, Keen P, Jilma B. Recombinant human activated protein C (rhAPC; drotrecogin alfa [activated]) has minimal effect on markers of coagulation, fibrinolysis, and inflammation in acute human endotoxemia. *Blood.* 2003;102:2093-2098

96. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:10212–10216
97. Charles T. Esmon. The Endothelial Cell Protein C Receptor. *Thromb Haemost* 2000;83:639-43
98. Stearns-Kurosawa DJ, Swindle K, D'Angelo A, Della Valle P, Fattorini A, Caron N, Grimaux M, Woodhams B, Kurosawa S. Plasma levels of endothelial protein C receptor respond to anticoagulant treatment. *Blood* 2002;99:526-530
99. Xu J, Qu D, Esmon NL, Esmon CT. Metalloproteolytic release of endothelial protein C receptor. *J Biol Chem*. 2000;275:6038-6044
100. Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, Hidari N, Esmon CT. Identification of functional endothelial protein C receptor in human plasma. *J Clin Invest* 1997;100:411-8
101. Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, Carson CW, D'Angelo A, Della VP, Esmon CT. Plasma levels of endothelial cell protein C receptor are elevated in patients with sepsis and systemic lupus erythematosus: lack of correlation with thrombomodulin suggests involvement of different pathological processes. *Blood*. 1998;91:725-727
102. Taylor FJ, Chang A, Esmon CT, Hinshaw LB. Baboon model of *Escherichia coli* sepsis: Description of its four stages and the role of tumor necrosis factor, tissue factors, and the protein C system in septic shock. *Curr Stud Hematol Blood Transfus*. 1991;58:8–14
103. Taylor FB, Chang A, Esmon CT, D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Blick KE. Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of *Escherichia coli* infusion in the baboon. *J Clin Invest*. 1987;79:918–925

104. Taylor FB, Jr., Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Ferrell G, Chang AC, Laszik Z, Kosanke S, Peer G, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against *Escherichia coli* sepsis. *Blood*. 2000;95:1680–1686
105. Saposnik B, Reny JL, Gaussem P, Emmerich J, Aiach M, Gandrille S. A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis. *Blood* 2004;103:1311-8
106. Ulu A, Gunal D, Tiras S, Egin Y, Deda G, Akar N. EPCR gene A3 haplotype and elevated soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) levels in Turkish pediatric stroke patients. *Thromb Res*. 2007;120:47-52
107. Stearns-Kurosawa D, Swindle K, D'Angelo A et al. Plasma levels of endothelial protein C receptor respond to anticoagulant treatment. *Blood* 2002; 99: 526–30
108. Suzuki K. Protein C. In: High KA, Robert HR, eds. *Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis*. Tokyo: Marcel Dekker; 1995:395-423
109. Kobayashi H, Gabazza EC, Taguchi O, Wada H, Takeya H, Nishioka J, Yasui H, Kobayashi T, Hataji O, Suzuki K, Adachi Y. Protein C anticoagulant system in patients with interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:1850-1854
110. Fukudome K, Esmon CT. Identification, cloning and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 1994;269:26486-91
111. Laszik Z, Mitro A, Taylor FB Jr, Ferrell G, Esmon CT. Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation* 1997; 96:3633–3640

112. Galligan L, Livingstone W, Volkov Y, Hokamp K, Murphy C, Lawler M, Fukudome K, Smith O. Characterization of protein C receptor expression in monocytes. *Br J Haematol* 2001;115:408–414
113. Yürürer D, Teber S, Deda G, Egin Y, Akar N. The Relation Between Cytokines, Soluble Endothelial Protein C Receptor, and Factor VIII Levels in Turkish Pediatric Stroke Patients. *Clin Appl Thromb Hemost* 2008 Jun 29 [Epub ahead of print]
114. Gumus K, Kadayifcilar S, Eldem B, Saracbası O, Ozcebe O, Dundar S, Kirazlı S. Is elevated level of soluble endothelial protein C receptor a new risk factor for retinal vein occlusion? *Clin Experiment Ophthalmol*. 2006 May-Jun;34 (4):305-11
115. Yalçındağ FN, Batioğlu F, Ozdemir O, Cansızoğlu E, Egin Y, Akar N. Soluble endothelial protein C receptor levels in Behçet patients with and without ocular involvement. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008 DOI 10.1007/s00417-008-0873-9
116. Molina E, Hermida J, López-Sagaseta J, Puy C, Montes R. The functional properties of a truncated form of endothelial cell protein C receptor generated by alternative splicing. *Haematologica* 2008; 93 (6):878-884
117. Stearns-Kurosawa DJ, Burgin C, Parker D, Comp P, Kurosawa S. Bimodal distribution of soluble endothelial protein C receptor levels in healthy populations. *J Thromb Haemost* 2003;1:855-6
118. Saposnik B, Reny JL, Gaussem P, Emmerich J, Aiach M, Gandrille S. A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis. *Blood* 2004;103:1311-8