

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

İMMÜNOSUPRESYONDA LİFOCORTIN'İN YERİ

DOKTORA TEZİ
VEÇİHE NİMET İZGÜT

T529/1-1

DANISMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF. DR. GÜLSEN ÖNER

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KÜTÜPHANESİ

ANTALYA, 1991

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

İMMÜNOSUPRESYONDA LİPOCORTIN'ın YERİ

DOKTORA TEZİ
VECİHE NİMET İZGÜT

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF.DR.GÖLSEN ÖNER

Bu Çalışma Akdeniz Üniversitesi
Araştırma Fonu Tarafından
Desteklenmiştir. (Proje No:88.03.0122/02)

"Kaynakça Gösterilerek Tezinden Yararlanılabilir"

ANTALYA, 1991

İ Ç İ N D E K İ L E R

1- GİRİŞ	1 - 2
2- GENEL BİLGİLER ve AMAÇ	3 - 21
3- GEREÇ ve YÖNTEMLER	22 - 41
4- BULGULAR	42 - 53
5- TARTIŞMA ve SONUÇ	54 - 59
6- ÖZET	60 - 61
7- SUMMARY	62 - 63
8- KAYNAKLAR	64 - 76

G I R İ S

Transplantasyonun tıpta yaygın uygulanım alanı bulması immünosupresyonun önemini arttırmıştır. Bu nedenle her geçen gün immün sistemi baskılayan ajanların listesine yenileri eklenmektedir.

Günümüzde sadece greft atılımının önlenmesi amacı ile değil, aynı zamanda otoimmün hastalıklarda ve aşırı duyarlılık reaksiyonlarında etkinlikleri nedeniyle en fazla kullanılan immünosupressif etkili ilaçlar cyclosporin-A(CS-A) glukokortikoidler, azathioprine ve cyclophosphamide'dir.(38, 94) Çeşitli tedavi merkezlerinde bu ilaçlar tek veya ikili, üçlü kombinasyonlar halinde kullanılmaktadırlar. (25,38,94).

Bilinen en etkin ve eski ilaç glukokortikoidler olduğundan,etkileri hakkında en fazla bilgi birikimi olan da, bunlardır. Glukokortikoidler immünosupresyona ilaveten anti-inflamatuar etkiye de sahiptirler ve bu etkilerini sentez ve salınımına neden oldukları bir protein aracılığı ile yapmaktadırlar. Genel olarak LIPOCORTIN adı verilen bu proteinin etkisi, fosfolipaz A₂ (FLA₂) enziminin inhibisyonu üzerinden açıklanmaktadır. (12,21,22,27,31-33,39,46,49,60,62,68,69,82-84,87,89).

Lipocortin organizmada çeşitli hücreler tarafından sentez edilmekte ve bulunduğu hücre tipine göre değişik isim-

ler almaktadır. Glukokortikoidlere bağılı olarak makrofajlardan, nötrofillerden ve böbrek interstisyel hücrelerinden izole edilen tiplerine sırasıyla, Macrocortin, Lipomodulin ve Renocortin adı verilmektedir. (33,41,42,45,46,58,60,83,87).

Glukokortikoidlerin antiinflamatuvar etkileri lipocortin üzerinden açıklanırken, lenfosit fonksiyonlarını yansıtan spesifik immün cevapları baskılayıcı etkilerinden de, arachidonic acid (AA) ürünleri sorumlu tutulmaktadır. Goodwin ve ark. Lenfositlerin sitümülasyona proliferatif cevap olarak IL-2 salgılayabilmeleri için LTB_4 'ün gerekli olduğunu bildirirken (51) başka araştırmacılar AA ürünlerinden bir başkası olan prostaglandinlerin (PG) güçlü immüno-supressif etkiye sahip olduklarını ileri sürmektedirler(17, 78). Diğer taraftan gayet yaygın kullanım alanı bulan ve kuvvetli bir immüno-supressif ajan olan CS-A'nın da glukokortikoidler gibi antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu söylenmektedir (110).

Gerçi inflamasyon aracısı olan PG ve Tromboxan(Tx) gibi lipid mediatörlerin CS-A ile azaldığı hakkında deliller varsa da, bu inhibisyonun hangi basamakta olduğu da açık değildir (28,85,97).

AA ürünlerinin hem inflamasyonun önlenmesinde, hem de lenfosit proliferasyonunda rolünü ileri süren yayınlar dikkate alındığında, lipocortinin immüno-supresyonda çok önemli bir mediatör olması gerektiği ortaya çıkmaktadır. Ancak sadece antiinflamatuvar rolü bilinmektedir.

Biz, invitro olarak tertiplediğimiz bu çalışmada "Lipocortinin immüno-supresyonda rolü var mı?", "CS-A'nın sebep olduğu immün yanıt önlenmesinde de lipocortin rol oynamakta mıdır?", ayrıca "Immüno-supressif ilaçların birlikte kullanılmasının lipocortin aktivitesine etkisi nasıl olacaktır?" sorularının yanıtlarını aradık.

GENEL BİLGİLER

İnsan vücudu doku ve organlara zarar verebilen hemen her tip organizma ve toksine karşı dirençlidir. Zararlı etkene karşı gelişen fizyolojik cevapların tümü savunma sistemi tarafından düzenlenir. Bağışıklık, mikroorganizmaların vücuda girişini önleyen deri, mukoza gibi dış engellerle, savunma sistemine ait hücrelerin fonksiyonlarına bağlıdır. Bu hücreler zararlı etkeni tahrib etmek üzere doğrudan veya sentezledikleri makromoleküller ile dolaylı yoldan etki ederler (51,52,92). Bu cevaplar dikkate alındığında savunma sistemi ikiye ayrılır :

- 1- Nonspesifik savunma sistemi,
- 2- Spesifik savunma sistemi,

NONPESİFİK SAVUNMA SİSTEMİ

Zararlı etkene karşı organizmada doğal olarak bulunan veya etkenin spesifik özelliklerini ayırt etmeksizin gelişen cevaplar nonspesifik bağışıklık sistemini oluşturur. İnflamasyon bu tür cevabın en güzel örneğidir (52,53,94,102).

İnflamasyon

İnflamasyon enfeksiyon veya tahribata neden olabilecek kimyasal, fiziksel vb. etkenlere karşı, organizmanın savunma amacı ile verdiği cevapların toplamıdır (53,104). Bu cevaplar bölgedeki zararlı etkeni ortadan kaldırmak veya inaktive

etmek, oluşan değişikliklerin lokal kalmasına, tahrib olmuş dokuların tamiri amacına yöneliktir. Bu amaç doğrultusunda meydana gelen değişiklikler sırasıyla;

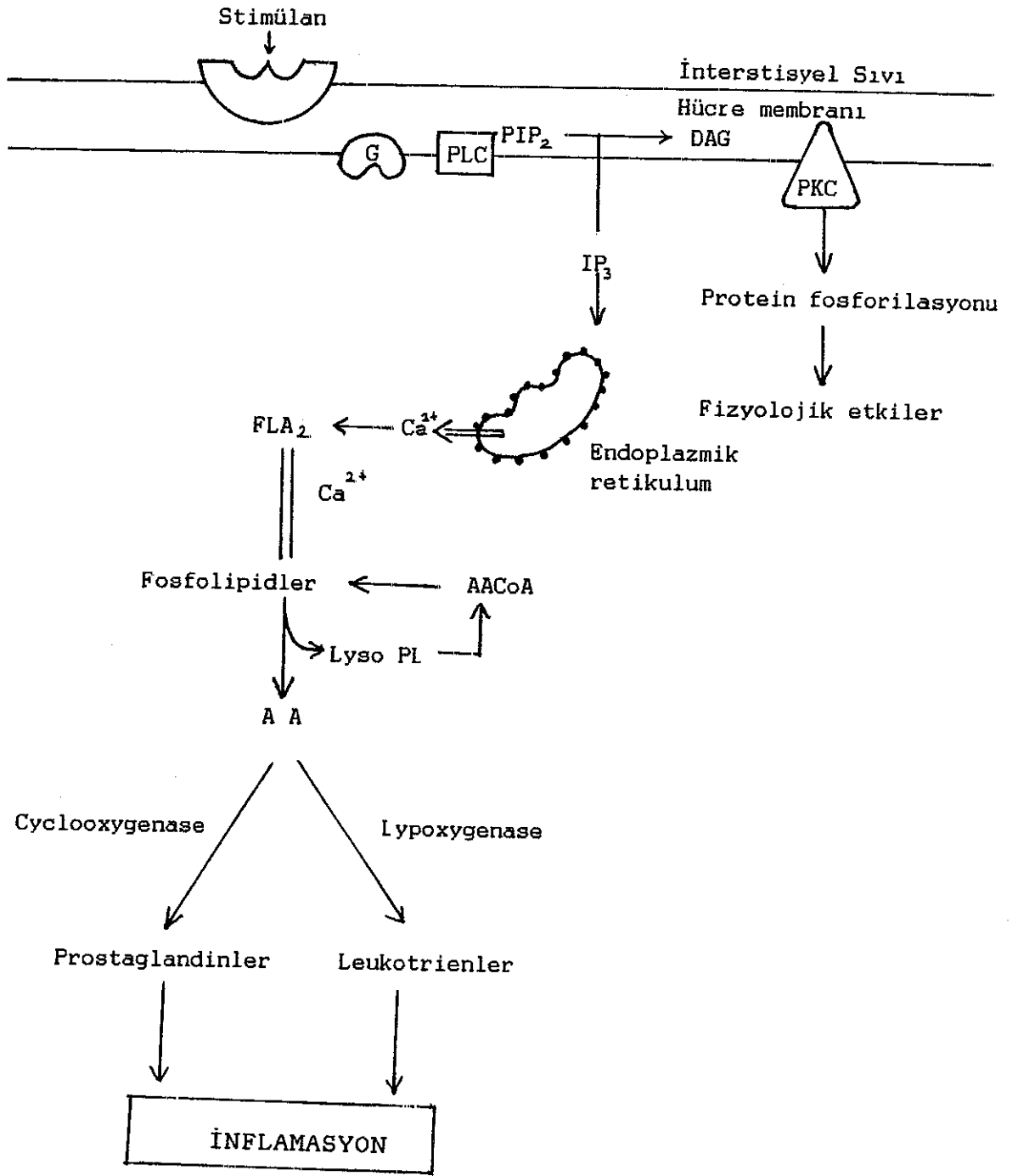
- Lokal damarlarda vazodilatasyon ve buna bağlı kan akımı artışı,

- Kapiller permeabilitenin artması sonucu interstisyel alana sıvı sızması,

- Kapiller damarlardan fibrinojen ve diğer koagulasyon proteinlerinin sızması sonucu, bölgedeki sıvının pıhtılaşmasına bağlı olarak mikroorganizma veya toksik ürünlerin doku aralıklarında yayılmasının önlenmesi ve lokal kalması ve fagositik hücreler aracılığı ile bu lokal değişikliklerin tamir edilmesi şeklinde özetlenebilir (53).

Zararlı etken ile karşılaşan hücrelerden salgılanan çeşitli mediatörlerin inflamasyonun başlamasında anahtar rol oynadığı, bu konudaki çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. (41,44,58,104). Aktif hale gelmiş veya tahrib olmuş hücrelerden salınan bu maddeler inflamasyonun başlamasına neden olacak patolojik değişikliklerin tetiğini çekmektedir.

Yapılan araştırmalarla, inflamasyonu başlatan ajanların listesi her geçen gün artmaktadır. Bu listeye dahil olan, histamin, 5-hydroxytryptamin ve kininler gibi lokal hormonların yanısıra, prostaglandinler (PG), leukotriene (LT), platelet activating factor (PAF), Thromboxane (Tx) gibi lipid mediatörler de inflamasyonun gelişiminden sorumlu tutulmaktadır (41,44,58,104). Bu mediatörlerin oluşumu için ilk basamak membran fosfolipidlerinden arachidonic acid (AA) yapımıdır (8,30,104). (Şekil 1)

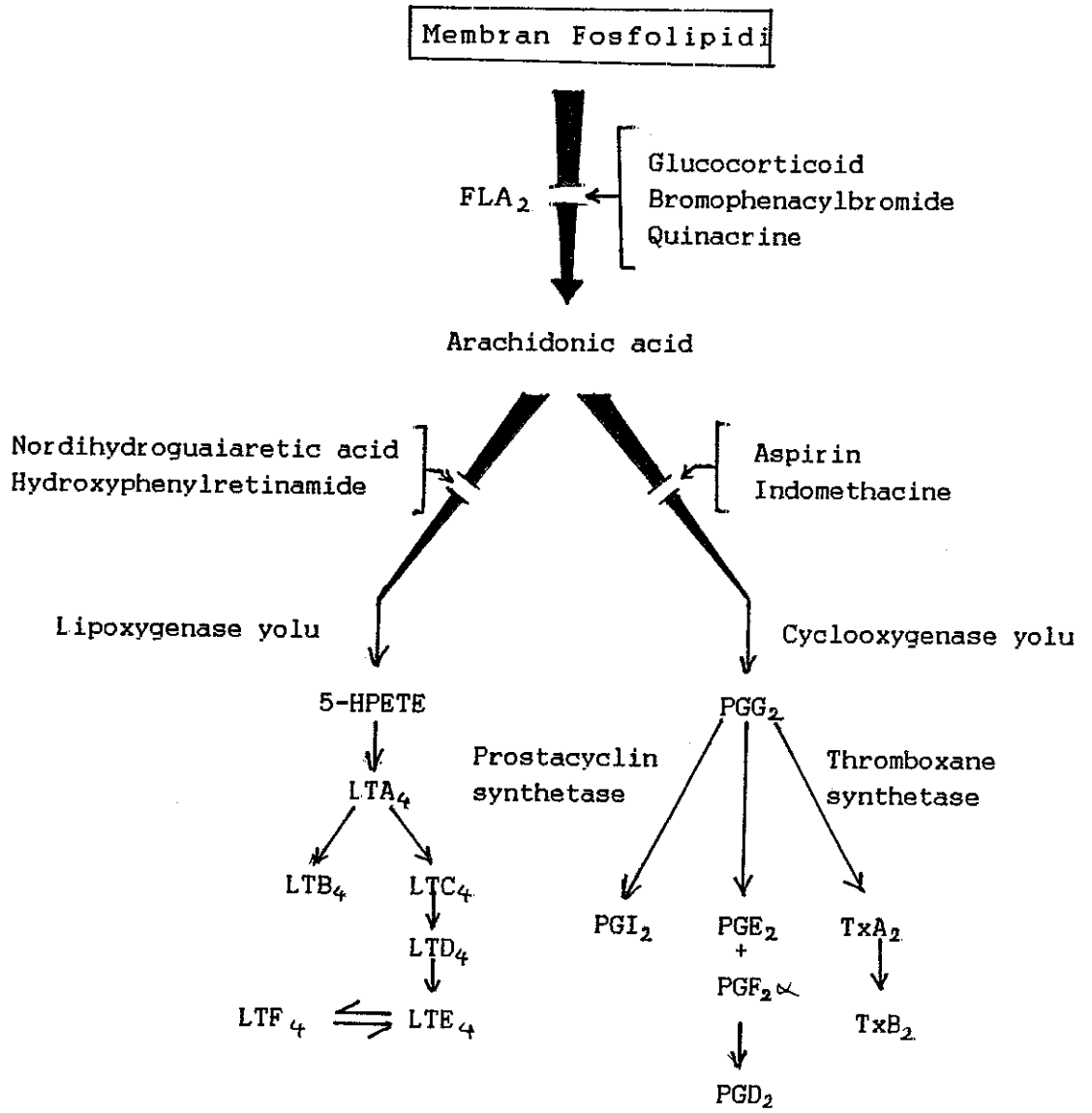


Şekil 1) İnflamatuar cevabın gelişiminde fonksiyonu olan AA ürünlerinin salınımına neden olan hücresel olaylar. PLC:Fosfolipaz C, FLA₂ :Fosfolipaz A₂, PKC:Proteinkinaz C, DAG:Diçilgliserol, AA:Arachidonic acid.

Hücre membranındaki fosfolipidlerin sn-2 pozisyonunda, esterifiye formda depolanan AA'in, hücre içindeki serbest miktarı normal koşullarda çok azdır (29,77). Hücre içi serbest kalsiyum miktarında önemli artışa yol açan fizyolojik veya patolojik sitömülüsler, membrana bağlı bir enzim olan phospholipase A₂ (FLA₂)'yi aktive ederek AA'in serbest halde açığa çıkmasına neden olur. (Şekil 2) Hücre içi kalsiyum miktarı ile FLA₂ aktivasyonu arasında pozitif ve doğrusal bir ilişki olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (2,8,30,72,75,80,101).

Tamir İşlemi

Oluşan değişikliklerin ortadan kaldırılması için organizma doku ve kandaki fagositoz yapma yeteneğine sahip hücrelerden yararlanmaktadır. Bu nedenle nonspesifik immün cevapta fagositozun yeri çok önemlidir. Polimorf nükleuslu lökositler ve dokudaki sabit ve gezici makrofajlar fagositik aktiviteleri nedeni ile nonspesifik savunmanın ana hücrelerini oluştururlar. Bu hücrelerin fagositik aktivitesinde azalmaya yol açan her türlü değişiklik nonspesifik savunma mekanizmasında da bozulmaya neden olmaktadır (102).



Şekil 2) Arachidonic acid metabolizması (Çift çizgiler inhibitörlerin etki yerlerini göstermektedir.)

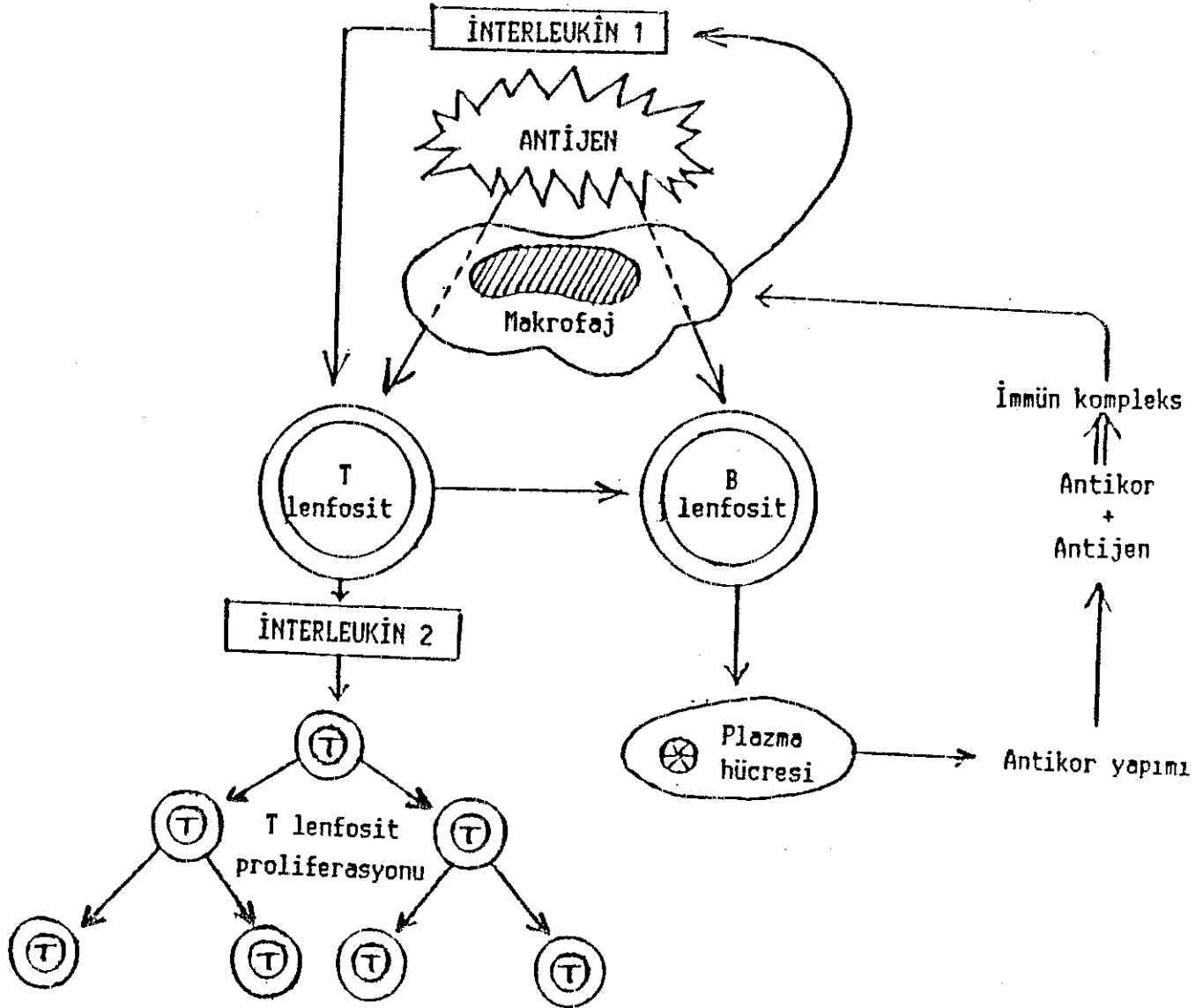
SPEŞİFİK SAVUNMA SİSTEMİ

Speşifik savunma, T ve B lenfositler aracılığı ile sağlanan ve zararlı ajanın speşifik özelliklerine bağlı olarak geliştirilen savunma cevaplarıdır. Speşifik immün cevabın başlaması için tetiği çeken yabancı moleküle antijen denir. Organizmaya antijen girdiğinde lenfositlerin aktivasyonu için bu antijenlerin makrofajlar tarafından lenfositlerin tanıyacağı şekle getirilerek sunulması gerektiğinden, speşifik ve nonspeşifik immün sistemi kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir (52,53,94,102)

Lenfositlerin, onları stimüle edecek bir ajanla karşılaşmaları vücudun herhangi bir bölgesinde olabilirse de, çoğu kez periferel lenfoid dokuda olur. Bir antijen vücuda girdiğinde ilk olarak, makrofajlar ve dendritik hücrelerle karşılaşır. Antijen bu hücreler tarafından alınıp, hazırlanarak hücre yüzeyine iletilir ve burada class II major histocompatibility complex (MHC) moleküllerine bağlı olarak yardımcı T lenfositlerin tanıyabileceği şekilde sunulur. Hazırlanmış antijene ve makrofajlardan salgılanan IL-1'e cevaben, yardımcı T lenfositlerden IL-2 salgılanır. Genel olarak lenfositlerden salgılanan ve lenfokin adı verilen maddelerin arasında gruplandırılan IL-2, olgun yardımcı, baskılayıcı ve sitotoksik T ve B lenfositin proliferasyonuna neden olur. (Şekil 3).

Speşifik immün sistemin temel elemanları olan T lenfositlerin 2 grupta toplanabilecek immünolojik fonksiyonları vardır (53,94,102).

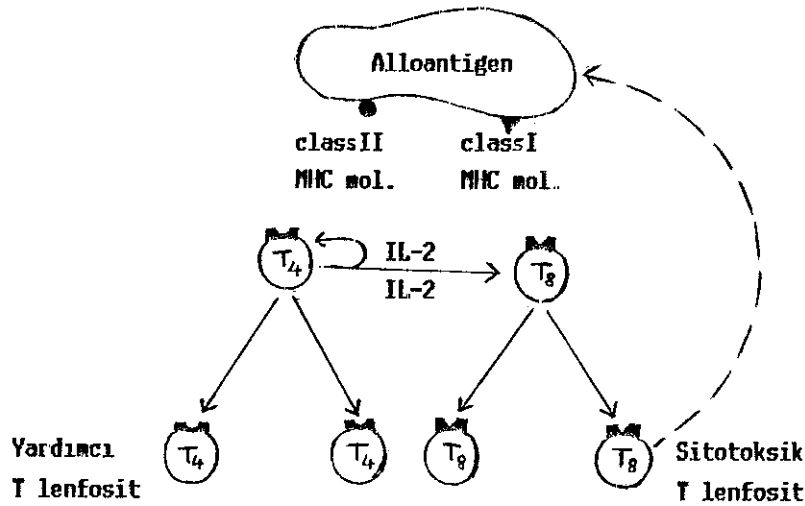
T lenfositler dolaylı olarak, B lenfositlerin immüoglobulin yapımını etkileyerek antijenin ortadan kalkmasını kolaylaştırırken, aynı zamanda lenfokin adı verilen proteinleri sentezleyip salgılayarak ve sitotoksik özellikleri ile de direkt olarak antijen üzerine etki ederler (53,94).



Şekil 3) Organizmaya giren yabancı etkene bağlı olarak immün sistem hücrelerinin aktivasyonu.

Sitotoksikite hücresel immün sistemde temel fonksiyonlardan biri olup organizmaya girmiş tüm yabancı hücelere ve bu arada transplante edilmiş doku antijenleri(alloantijen)'ne karşı, oluşan bir immün cevaptır. Bu cevap, antijen veya allogreft için sitotoksik özelliği olan T lenfositler

tarafından geliştirilir (53,94). Bu hücrelerin fonksiyon görebilmeleri için ilk olarak class II ile birlikte sunulan antijenler yardımcı T lenfositlerin aktive olması gerekir. Aktive olmuş yardımcı T lenfositlerden salgılanan IL-2, sitotoksik T lenfositlerin çoğalmasını ve olgunlaşmasını sağlar. (Şekil 4) Bundan sonra sitotoksik T lenfositler yabancı dokunun class I MHC moleküllerini tanıyarak, hücre içine boşalttıkları sitotoksik sindirici enzimler ile hücrenin ölümüne neden olurlar (94).



Şekil 4) Alloantijen ile aktive olan T-Lenfositlerin geçirdikleri değişimler.

Antijen hazırlayan hücreler tarafından sunulan antijen B lenfositlerince tanınarak, bu hücrelerin aktivasyonunu başlatır. Aktivasyon yardımcı T hücrelerinden salgılanan IL-2 ile de desteklenir. Böylece B hücreleri bölünüp çoğalarak ve plazma hücresi şekline dönüşerek antijene özgü antikor yapımına başlar.

T lenfositler aracılığı ile yürütülen spesifik immün cevaplara hücre sel immünite adı verilirken, B lenfositlerin

salgıladığı antikorlar aracılığı ile olan immün yanıtlar humoral immünite adını alır.

Humoral immünitede B lenfosit antijeni tanıdığı bölgede kalır ancak salgıladığı antikorlarını hedefe göndererek savaşırken, doğal öldürücü (Natural Killer) ve sitotoksik T hücreleri hedefe ulaşarak zararlı etkeni yok etmeye çalışırlar (102).

Organizmada virüs, kansere karşı mücadelede olduğu gibi class I antijeni içeren yabancı hücrelere karşı cevaplar T lenfositler aracılığı ile verilmektedir.

İMMÜNİTENİN BASKILANMASI

Organizmanın büyük bir özenle sürdürdüğu hücre sel savunma, bazı hallerde sorun yaratmaktadır. Bunun en güzel örneği transplante edilmiş dokunun atılımıdır.

Günümüzde transplantasyon önemli tedavi yöntemlerinden biri haline gelmiştir. Bugün için en yaygın ve başarılı şekilde transplante edilen organ böbrektir. Her 5 ile 55 yaşlarındaki 1 milyon insandan, yaklaşık 30'u terminal safhadaki böbrek yetmezliğinden ölmektedir Avrupa Diyaliz ve Transplantasyon Birliği (EDTA)'nin raporlarına göre her yıl 10.000 hastaya böbrek nakli yapılabilmektedir (25). Diğer hayati önem taşıyan organların yetmezliklerinden farklı olarak böbrek yetmezliği olan hastalar hemodiyaliz veya peritoneal diyaliz yöntemleriyle uygun böbrek bulununcaya kadar hayatta tutulabilirse de, bunların sadece %10'u transplantasyondan yararlanabilmektedir. Diğer taraftan doku naklinin cerrahi yönden başarılı olması hasta yaşamının devamlılığı için yeterli değildir. Çünkü operasyon sonrasında gelişecek immün reaksiyonlarla, doku reddi olasılığı oldukça yüksektir. Bu nedenle bağışıklık sistemini baskılayıcı

yöntemler ile bu olasılığın en düşük düzeye indirilmesi hedeflenmektedir.

Çeşitli merkezlerde immünosupresyon amacı ile çeşitli farmakolojik ajanlar, biyolojik yöntemler, iyonizan ısınlama yöntemleri kullanılmaktadır. Özellikle farmakolojik ajan olarak en fazla kullanılanlar, antimetabolitlerden azathioprine, alkilleyici maddelerden cyclophosphamide, steroidler ve CS-A olup etki mekanizmaları birbirinden farklı olan maddelerdir (25,38,94). Bunların yanısıra son yıllarda OKT-3 isimli monoklonal antikorun yaygın şekilde kullanıma girdiği de dikkati çekmektedir(20).

Immüntenin baskılanmasında yukarıda da değinildiği gibi kullanılan ilaçların listesi oldukça kabarık olup, bunlara yenilerinin ilavesi hızla devam etmekte ise de bilinmeyen veya yan etkileri nedeni ile en fazla bilgi birikimine sahip olanların tedavide daha fazla tercih edilmesi doğaldır.

Avrupa Diyaliz ve Transplantasyon Birliği(EDIA)'nin, kayıtlı 245 merkezde 1989 yılında yaptığı anketten profilaksi amacı ile en çok tercih edilen immünosupressif ajanların merkezlerin %44'ünde CS-A+Steroid+Azathioprine, %13'ünde CS-A+Steroid ve %3'ünde Azathioprin+CS-A olduğu anlaşılmıştır(38).

Sürekli immün sistem baskılanması amacı ile de aynı ilaçlar kullanılmaktadır. EDTA'nın raporuna göre merkezlerin %38.4'ünde Steroid+Azathioprine, %27.8'inde CS-A+Steroid ve %25'inde üç'lü kombinasyon olarak, daha az oranda ise bu üç ilacın tek kullanıldığı ortaya çıkmıştır (38).

Bu rakamlardan açık olarak görüldüğü gibi, immün sistemin baskılanmasında en çok başvuru olan bu üç ilactan en eski ve etkisi hakkında en fazla bilgi edinilmiş olanı glukokortikoidlerdir.

Glukokortikoidler

Glukokortikoidler ve bunların sentetik analogları, hem klinik olarak, hem de deney hayvanlarında anti-inflammatuar ve immunosupressif ajanlar olarak geniş çapta kullanılmaktadır (19,31,33,36,40,41,54,69,100,111).

Glukokortikoidlerin etki mekanizmasını açıklığa kavuşturmak amacıyla yapılan çalışmalar 1974 den beri devam etmektedir. Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda PG sentezini engellediği tesbit edilmiş, fakat bu etkinin cyclooxygenase enzimi üzerinden olmadığı bulunmuştur. daha sonra perfüze akciğerler ile yapılan çalışmalarda glukokortikoidlerin AA oluşumunu engellediği, bunu FLA₂ enzimini inhibe eden ve "Lipocortin" adı verilen bir protein aracılığı ile yaptığı saptanmıştır (12,19,31-33,36,40-42,44).

"LIPOCORTIN" YAPISI

Glukokortikoid tedavisinde veya kan glukokortikoid düzeyinin artışına bağlı olarak sentez ve salınımı artan ve "Lipocortin" olarak adlandırılan protein, organizmada çeşitli hücreler tarafından yapılmaktadır. Molekül ağırlığına ve yapıldığı hücreye göre değişik isimler alan bu proteinin, makrofajlarda yapılan ve molekül ağırlığı 15 K dalton (k) olan türü "macrocortin", nötrofillerde yapılan ve molekül ağırlığı 40 K olan türü "Lipomodulin", böbrek interstisyel hücrelerinde yapılan ve molekül ağırlığı 30 K ve 15 K olan türü "renocortin" dir (31-33,41-46,58,60,73,82,83,87).

Organizmada Lipocortin Dağılımı

Peritoneal ve alveolar makrofaj, nötrofil ve böbrek interstisyel hücreleri, bu konu ile ilgili ilk çalışmalarda lipocortin kaynağı olarak kullanılmıştır (7,21,22,27,44,88). Daha sonra yapılan çalışmalarda lipocortin, büyük miktarda timus, dalak, beyinde, daha az oranda kalp, karaciğer,

çizgili kas, mide, ileum, insan endometriumu ve plasentada saptanmıştır. Ayrıca endothelial ve mesothelial hücreler, deri fibroblastları ve eritrositlerin (3,4,6,41,45,47,62,67,89,90,92) yanısıra ekstrasellüler sıvılarda da lipocortin bulunmaktadır (37,79,95).

Lipocortin İzolasyonu ve Purifikasyonu

Purifikasyon için yapılan ilk çalışmalarda Hirata ve ark. ları, tavşan nötrofillerinin primer kültürlerini 16 saat glukokortikoid ile inkübe ettikten sonra, DEAE iyon değiştirici resin ve Sephadex G-75 kolonları ile kromatografik yöntem kullanmışlardır (12,61). Çalışma sonunda purifiye edilen proteinin, %10 glukoz içeren bir glikoprotein olduğunu tesbit etmişlerdir. Lipocortinin primer türünün molekül ağırlığı 40 K, diğer türlerinin 15 K ve 25-30 K'dur (41,42,46,83). Küçük molekül ağırlıklı olanlar, 40 K'luk proteinin proteolizisi ile oluşmaktadır. Ortama proteaz inhibitörü ilave edildiği zaman anti-FLA₂ aktivitesine sahip proteinlerden, sadece 40 K molekül ağırlığına sahip protein saptanır (12). Kültür ortamına ilave edilecek "fetal calf serum" (FCS) ısıtılarak inaktif hale getirilmelidir. Aksi takdirde FCS'un içerdiği proteaz 40 K'luk proteini parçalayarak, daha küçük formların oluşmasına neden olur (31,89).

Russo-Marie ve Duval, sıçanlardan aldıkları renomedullar hücreleri Dexamethasone ile 24 saat inkübe ettikten sonra "chromatofocusing" ve "gel-filtration" yöntemlerini kullanarak, süpernatant'dan Lipocortin purifiye etmişlerdir (90).

Ayrıca pek çok çalışmada "DEAE ion exchange chromatography" ve "gel filtration" yöntemleri kullanılarak kobayların akciğer lavaj sıvısındaki anti-FLA₂ aktivitesine sahip proteinler purifiye edilmiş ve proteinlerin, 40 K ve 15

K molekül ağırlığına sahip oldukları saptanmıştır (13).

Sıçan peritoneal lavaj sıvısındaki, FLA₂ enzimini inhibe edici aktivite, Pepinsky ve ark. ları tarafından saptanmıştır. Bu araştırmacılar yaptıkları çalışmada, 37 K luk protein ile birlikte 30 K, 24 K ve 15 K'luk türleri elde etmişlerdir. 37 K'luk protein Lipocortin-I olarak adlandırılmıştır (4).

Başlangıç çalışmalarında purifikasyon için Sephadex G-75 kolonu kullanılırken, daha sonra "gel-exclusion chromatography" ve "High pressure liquid chromatography" (HPLC) yöntemleri kullanılmıştır. Günümüzde Lipocortin purifikasyonu için, FLA₂ afinite kolonu yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu kolon özellikle yüksek molekül ağırlıklı inhibitör maddenin purifikasyonunda yararlıdır (41).

Lipocortinler sentetik olarak da elde edilmiş, ancak in vitro koşullarda FLA₂ aktivitesini inhibe etmedikleri gösterilmiştir (103).

LIPOCORTİNİN ÖZELLİKLERİ

Lipocortin, anti FLA₂ özelliğine sahip bir proteindir (31,32). Fosforile olduğu zaman bu özelliğini kaybeder (61). Proteinin bulunduğu ortama proteinkinaz ve AIP eklendiği zaman tamamen inaktif olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir. Ortama radyoaktif işaretli ATP ilave edilen bu çalışmalarda (32,41,67), lipocortin molekülüne radyoaktif fosfat inkorporasyonu olduğu ve inaktif lipocortinin alkalen fosfataz ile inkübe edilmesi sonucunda tekrar aktivitesini kazandığı gösterilmiştir (32,41,42,45).

Lipocortin türlerinden 15.000 molekül ağırlığına sahip olanı, normal koşullarda fosforile formda olup, FLA₂ enzimini inhibe edici özelliği olmadığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (60).

Lipocortinin Biyolojik Özellikleri

a- In vitro koşullarda anti enzimatik aktivite

Lipocortin familyasının aktif olan tüm türleri için temel özellik, FLA₂ enzim aktivitesinin inhibisyonudur. İlk çalışmalarda proteinin enzimi direkt etkilediği ileri sürülmüş olmasına karşın, daha hassas ölçüm yöntemlerinin kullanılması sonucu, lipocortinin membran fosfolipidlerine bağlanarak enzimin etki etmesini önlediği tesbit edilmiştir (1,74,109).

Hücre dış ortamda FLA₂ enziminin inhibisyonu ilk olarak Hirata tarafından gösterilmiştir (60). Substrat olarak fosfatidilkolinin kullanıldığı çalışmada, lipocortin ile pankreatik FLA₂ inhibisyonunun, konsantrasyona ve Ca²⁺ varlığına bağlı olduğu bulunmuştur (26,29,60).

Pankreatik FLA₂, lipocortin ile inhibe olabilen tek enzim değildir. FLA₁ (50), FLB (50), FLC (74) enzimleri'de lipocortin ile inhibe olabilmekte, fakat reaksiyonun tamamlanabilmesi için daha uzun süre gerekmektedir.

Son zamanlarda lipocortinin Ca²⁺ bağlaması ile ilgili çalışmalar oldukça yoğunlaşmıştır (4,14,18,63,92,99). Schlaepfer ve Haigler'lere göre ; lipocortin molekülünün 4 Ca²⁺ bağlama bölgesi vardır. Lipocortin Ca²⁺ ve fosfolipidlere bağlanarak kompleks oluşturup fosfolipidleri hidrolitik parçalanmadan korumuş olur (93).

b-In vitro koşullarda hücrelerde lipid mediatör yapımının baskılanması

Steroid veya lipocortin, AA ürünleri olan PG, LT ve lyso-PAF oluşumu engeller. Bu etki protein veya mRNA sentez inhibitörleri ile veya ortama eksojen AA ilavesi ile ortadan kaldırılabılır (12,41-43,45,46).

c-In vivo antiinflamatuvar etki

Lipocortinin in vivo antiinflamatuvar etkisi olduğu ve carragenin ile sıçanlarda oluşturulmuş plörezi ve pence ödemini azalttığı çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (19,36).

Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda proteinin steroid tedavisine bağılı olarak oluştuğu ve normalde mevcut olmadığı ileri sürülmüştür. Ancak daha sonraki çalışmalarda, endojen glukokortikoidin etkisi ile lipocortin oluşabileceğı düşünölmüş ve beklentiye uygun şekilde sağlıklı kişilerin plazma ve dokularında da lipocortin saptanmıştır. Ekzojen ve endojen steroid konsantrasyonu artışına bağılı olarak ekstrasellöler sıvılarda lipocortin düzeyi artmaktadır (37,79,83,95).

Lipocortin yapımını sadece glukokortikoidler sağlamaktadır. Mineralokortikoidler ve seks steroidleri lipocortin yapımına etkisizdir (84,91).

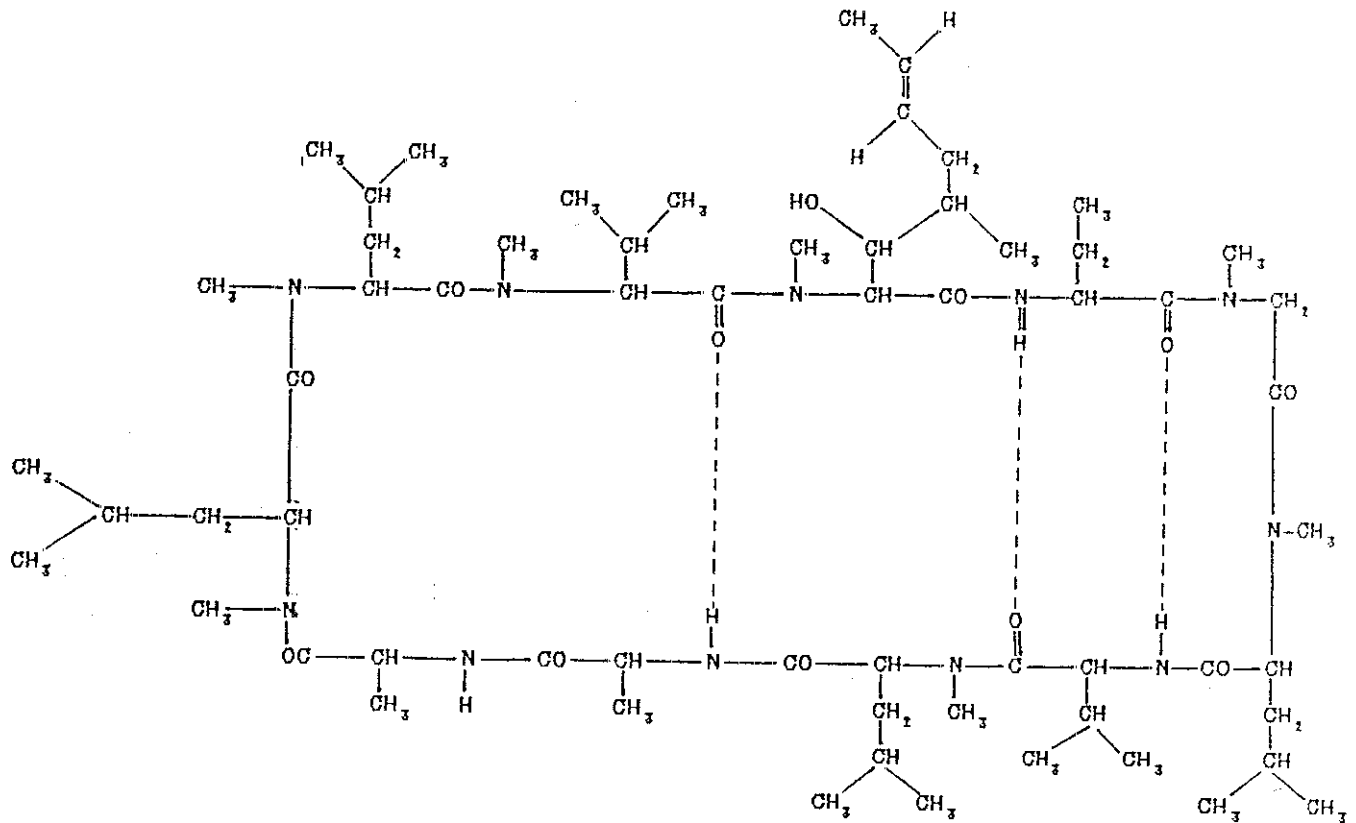
Otoimmün hastalıkların pek çoğunda lipocortine karşı oluşmuş otoantikörlerin varlığı tesbit edilmiştir. Özellikle sistemik lupus eritematosus, romatoid artritisi'li hastaların plazmalarında lipocortine karşı oluşmuş antikörlerin titresinin oldukça yüksek bulunması, bu hastalıklarda lipocortin aktivite yetmezliğinin söz konusu olduğunu düşündürmektedir (42,57,59,83).

Cyclosporin-A (CS-A)'nın immün sistemdeki yeri

Steroidler tüm immün sistem hücrelerini baskılayarak nonselektif bir immünosupresyon yaptıklarından, bir takım yan etkilerin ortaya çıkmasına yol açarlar. Bunlar arasında en önemlisi fırsatçı enfeksiyonlara karşı direnc azalışıdır. Bu nedenle nadiren yalnız, sıklıkla diğeri immün sistemi baskılayan ajanlarla birlikte kullanılırlar.

CS-A ise selektif olarak T yardımcı hücrelerden IL-2 yapımını ve reseptörlerini bloke ederek immün sistemi baskılamakta ,supressor T hücrelerinin fonksiyonunu bozmayarak graft hoşgörüsünün devamını sağlar. Ayrıca myelotoksik olmayışı ve ilacın kesilmesi ile supressif etkinin ortadan kalkması da graft reddinin önlenmesinde ve otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın kullanılmasının nedenidir (48,66,94,106).

CS-A, şekil 5'te görüldüğü gibi kısmen tabaka şeklinde beta konfigürasyonu, kısmen de açık halka konformasyonu içeren, moleküler formülü; $C_{62} H_{111} N_{11} O_{12}$, molekül ağırlığı; 1202.6 olan, 11 aminoasitli 1 undecapeptiddir (66).



Şekil 5) CS-A'nın moleküler yapısı.

CS-A'nın Emilimi ve Vücutta Dağılımı

Çoğunlukla oral olarak alınan CS-A'nın ince barsakların üst kısmından %4-26'sı emilir. Maksimal kan düzeyine, 2-4 saatte ulaşılan CS-A bütün vücutta dağılırsa da karaciğer, pankreas ve yağ dokusunda daha fazla birikir. Kandaki CS-A'nın %50.70'i kan hücreleri, tercihan eritrositler tarafından tutulur. Plazmadaki kısım ise proteinlere bağlı olarak taşınır (66).

Metabolizması

Vücuda giren CS-A'nın %99'u çeşitli metabolitlere dönüşür ve bu metabolitlerin önemli kısmı safra yolu ile daha az kısmı ise üriner yolla atılmaktadır. Yarılanma ömrü 10 ile 27 saat arasındadır (105).

CS-A'nın Etki Mekanizması

CS-A, hedef hücrenin sitozolünde mevcut iki tip proteine bağlanarak etki göstermektedir. Bu proteinler "Calmodulin" ve "Cyclophilin" olup (10,28,47,48,55,66), Calmodulinin sitozoldeki serbest Ca^{2+} ile bağlanarak aktive olduğu ve çeşitli enzim sistemlerinin fonksiyonunki etkisi çok iyi bilinmesine karşın, cyclophilinin biyolojik önemi henüz saptanamamıştır (55). CS-A, calmoduline bağlanarak, bu molekülün aktivasyonunu engellemektedir (28).

Normal koşullarda T lenfosit aktivasyonunun başlangıç aşamasında, membrandaki fosfolipidlerin yapısında bulunan doymamış yağ asiti miktarı artar. Böylece membran akışkanlığındaki artışa bağlı olarak hücre içi Ca^{2+} düzeyi yükselir ve fizyolojik cevap ortaya çıkar (70). CS-A, stimüle hücrede, sentezlenmekte olan membran fosfolipidlerine doymamış yağ asiti girişindeki artışı inhibe eder ve hücre içi Ca^{2+} düzeyinin yükselmesini önleyerek hücre aktivasyonunu bu basamakta durdurur. Bu nedenle CS-A aktif hale gelmiş hücrelerde etkisizdir (70,71,98,109).

Araştırmalar GS-A'nın immün sistemi baskılamasının (10,11,15,48,66,76,80,81,94,108) PG yapımını azalttığını (16,23,35,56,64,97,106,107) da ortaya çıkarmıştır. Ancak etki yeri tam olarak bilinmemektedir. Diğer taraftan Wisenger-Böttcher ve ark. (110) tarafından, carragenin ile oluşturulan deneysel plörezinin GS-A ile önlenmesi ve bunu FLA₂ aktivitesinin inhibisyonu ile yaptığının gösterilmiş olması GS-A'nın immüno-supressif etkisi yanında antiinflatuar özelliğe de sahip olduğunu düşündürmektedir. Nitekim Stahl ve ark'ın (97) GS-A ile AA düzeyinin azaldığını bildiren çalışmaları bu düşünceyi destekleyicidir.

GS-A'nın güçlü bir immüno-supressif ajan oluşuna ilaveten antiinflatuar etkiyede sahip oluşu glukokortikoidlerle benzerliğini akla getirmektedir.

Glukokortikoidlerin antiinflatuar etkisinden lipocortin isimli bir fosfolipaz A₂ enzim inhibitörünün sorumlu olduğu bilinmesine karşın, AA ve PG yapımının inhibe eden GS-A'nın bu etkisinin mekanizması hakkında bilgi mevcut değildir.

AA ürünlerinin immünitenin düzenlenmesindeki yeri ise tam bir karmaşadır. LIB₄'ün T lenfosit proliferasyonunun düzenleyicisi olan IL-2'nin salınımı için elzem olması (51), AA'in artışı ile immün sistemin güçleneceğini düşündürürken, bir başka AA ürünü olan PGE₂ ile T lenfosit proliferasyonunun baskılanması AA artışı ile immün sistem baskılanması ile eş hale getirmektedir. Birbirinin tam aksi olan bu iki etki AA'in hücre sel bağışıklıkta anahtar konumunda olduğunu ve bunun yapımını baskılayan lipocortinin endojen immüno-supresör bir mediatör olarak kabul edilmesi gerektiği görüşünü ortaya çıkarmaktadır.

Bu nedenle lipocortinin immüno-supresiyondaki yerinin bilinmesinin klinik önemi fazladır. Etkisini lipocortin

üzerinden gösteren immünosupressif ajanların, bunu azaltıcı yönde etki edenlerle birlikte kullanılması tedavi etkinliğinde azalmaya, dolayısıyla doz arttırılmasının yaratacağı ilacın etkilerinin ortaya çıkmasının hızlanması yanında, tedavi maliyetinde artışına neden olacaktır.

Biz bu nedenlerle immünosupresyonda lipocortinin yerini ve sıklıkla birlikte kullanılan iki immünosupressif ilacın lipocortin üzerinden etkilerine bu birlikteliğin etkisini araştırmak amacıyla bu çalışmayı planladık.

GEREC ve YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yapılan bu çalışmada, ağırlıkları 130-170 g arasında değişen (ortalama:156.17±17.88 g) 40 adet erkek albino sıçan kullanıldı. Çalışma, "lipocortinin immünosupresyonda rolü var mı? Immünosupressif ilaçların birlikte kullanılmasının lipocortin aktivitesine etkisi nedir?" sorularına yanıt aramak üzere, sıçanlardan alınan peritoneal hücreler üzerinde invitro olarak gerçekleştirildi.

1)Bu amaçla ilk aşamada Blackwell ve ark.larının tanımladığı şekilde(12) izole edilen peritoneal hücreler, mikroskopta 40x10 büyütme ile sayıldıktan sonra 1 ml'de 10×10^6 hücre olacak şekilde RPMI-1640 medyum ile seyreltilerek, ikili çalışma yapmak üzere tüplere yerleştirildi. Deney tüpleri Tablo 1'deki protokole uygun şekilde hazırlandı.

Tablo 1)

Çalışma Grupları	Deney Sayısı (n)	Medyum RPMI-1640	Hücre sayısı (1 ml'de)	İlave edilen Immünosupressif İlaç
1	10	1 ml	10×10^6	---
2	10	1 ml	10×10^6	10^{-6} M Dex.
3	10	1 ml	10×10^6	10 µg GS-A
4	10	1 ml	10×10^6	10^{-6} M Dex. + 10 µg GS-A

Dex: Dexamethasone, GS-A: Cyclosporin-A

37°C de, %95 O₂ + %5 CO₂ karışımı altında 16 saatlik inkübasyon süresi sonunda tüm tüplere 2 µM A23187 (Ca²⁺ iyonoforu) ilave edildikten 15 dakika sonra, inkübasyona son verildi. Hücreler soğutmalı santrifüjde (Kubota, model 5800), 4°C de 2000 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Dökelti (Süpernatant)'deki lipidler, kloroform:metanol (3:1 v/v) karışımı ile ekstrakte edilerek, AA miktarı, Cockrell ve ark. larının yöntemine göre (24) Varian 5020 model High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ile ölçüldü. Immunosupressif ilaçlarla inkübe edilen hücrelerden salınan AA, kontrol hücrelerden salınan AA miktarı ile karşılaştırıldı.

2) İkinci aşamada immünosupressif ilaçların lipocortin yapımına etkisini araştırmak amacı ile, peritoneal hücre süspansiyonu 2x10⁶ hücre/ml olacak şekilde medyumla seyreltildi ve ikili tübler tablo 2'deki protokole uygun şekilde gruplara ayrılarak 16 saat süre ile 37°C de %95 O₂ + %5 CO₂ karışımı altında inkübe edildiler.

Inkübasyon öncesinde bütün tüplere oluşacak proteinlerin yıkımını önlemek amacı ile bir proteaz inhibitörü olan phenylmethylsulphonylfluoride (Sigma Kat.No:P-7626) ilave edildi ve ayrıca proteaz etkisi göstermemesi için fetal calf serumu ısıtılarak ortama ilave edildi.

Tablo 2)

Çalışma Grupları	Deney sayısı (n)	Hücre sayısı (1 ml'de)	Immünosupressif ilaç	Proteaz inhibitörü (PMSE)
1	10	2x10 ⁶	----	50 µM
2	10	2x10 ⁶	10 ⁻⁶ M Dex	50 µM
3	10	2x10 ⁶	10 µM GS-A	50 µM
4	10	2x10 ⁶	10 ⁻⁶ M Dex + 10 µg GS-A	50 µM

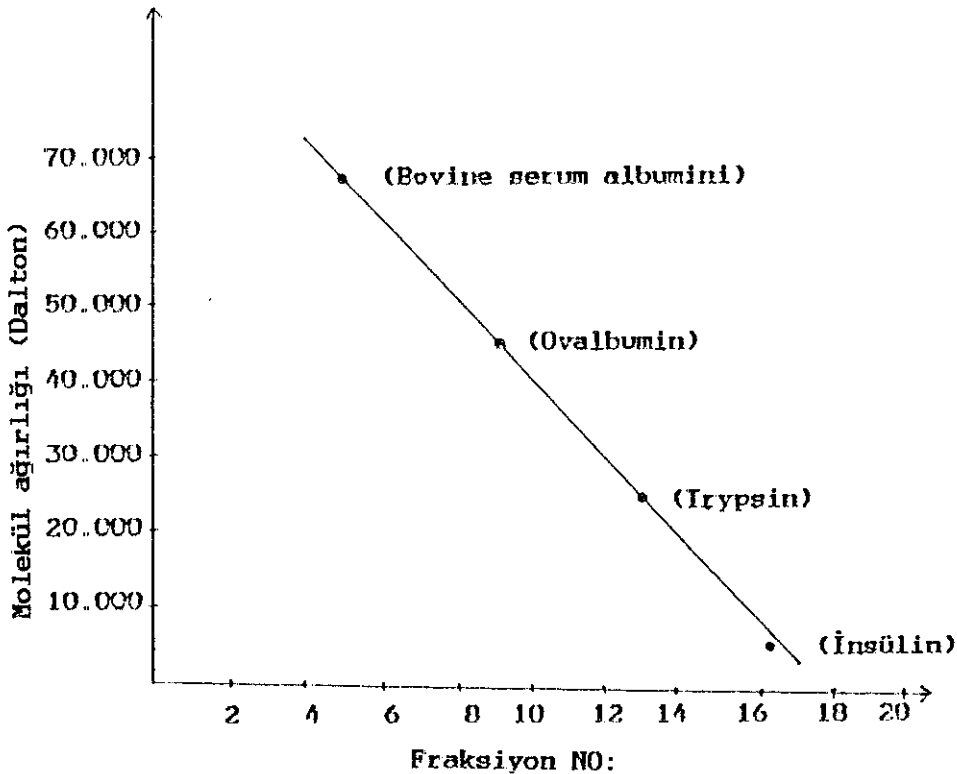
Inkübasyonu takiben, dakikada 10.000 devirli homojenizatör aracılığı ile 5 dakika süre ile hücreler parçalandı ve 4°C de 8.000 rpm de 30 dakika santrifügasyon ile elde edilen dökeltide aşağıdaki analizler yapıldı.

2. 1) 2×10^6 hücre tarafından sentezlenen protein miktarı, Lowry metodu ile ölçüldü.

2. 2) Hücrelerin sentezlediği proteinlerin molekül ağırlıklarının tesbiti için alınan dökelti, Sephadex G50-80 ile doldurulup, amonyum bikarbonat tampon çözeltisi (PH=8.0) ile dengelenerek akım hızı 0.3 ml/dak. olarak ayarlanmış kolondan geçirildi.

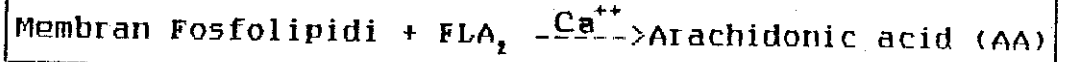
2.2.a) Amonyum bikarbonat tampon çözeltisi (PH=8.0) geçirilerek 10'ar dakika aralıklarla toplanan fraksiyonlardaki protein miktarı Lowry yöntemi (5) ile analiz edildi.

2.2.b) Elde edilen fraksiyonlardaki proteinlerin molekül ağırlıkları, aynı kolon ile hazırlanan kalibrasyon grafiği yardımı ile bulundu. (Şekil 6)



Şekil 6) Sephadex G 50-80 kolonu ile elde edilen kalibrasyon eğrisi

3) Sephadex G 50-80 kolonundan elde edilen fraksiyonlardaki proteinlerin lipocortin benzeri aktiviteye (anti-fosfolipaz A₂ etkisine) sahip olup olmadığının araştırılması;



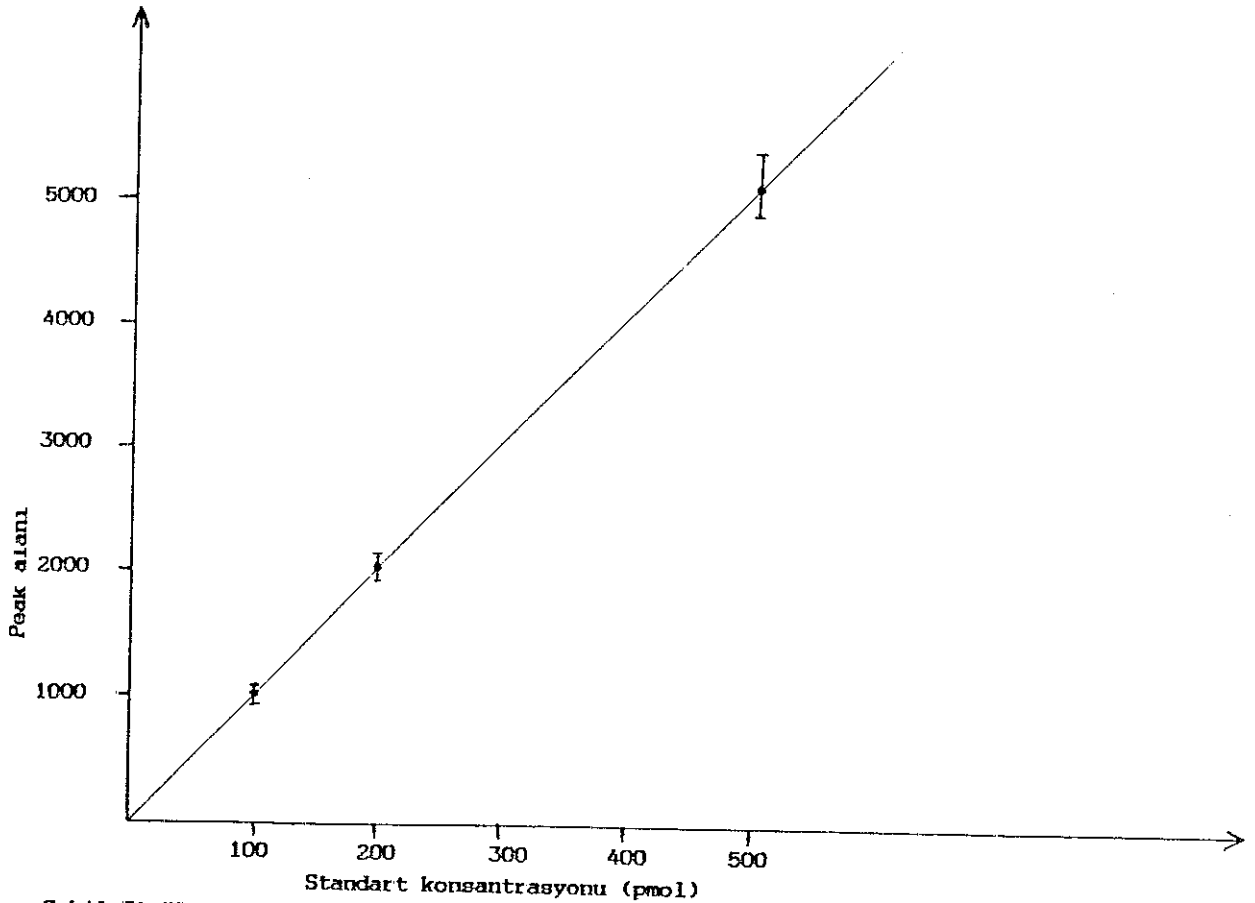
eşitliği gereğince kullanılması gereken en uygun enzim ve fosfolipid kaynağı olarak kullanılacak membran miktarı ön çalışma ile tesbit edildi. (Tablo 3)

Tablo 3) AA (Arachidonic acid) oluşumu için kullanılması gereken en uygun enzim ve membran miktarlarını saptamak amacıyla yapılan ön çalışma.

n	İnkübasyon ortamına konulan miktar		AA miktarı (pmol)
	Membran (µg protein)	FLA ₂ (ng)	
10	50 µg protein	100	18.39 ± 5.45
"	"	200	20.85 ± 7.11
"	"	400	33.70 ± 2.32
10	100 µg protein	100	92.25 ± 20.78
"	"	200	83.91 ± 18.11
"	"	400	85.32 ± 7.58
10	200 µg protein	100	173.41 ± 6.92
"	"	200	171.76 ± 18.07
"	"	400	162.17 ± 15.47
10	400 µg protein	100	277.80 ± 9.14
"	"	200	286.69 ± 42.03
"	"	400	292.60 ± 31.20

Ön çalışmaya göre AA oluşumu için deneylerde kullanılması gereken en uygun enzim miktarının 100 ng, hücre membranının ise 200 µg protein içeren miktarlar olduğu saptandı.

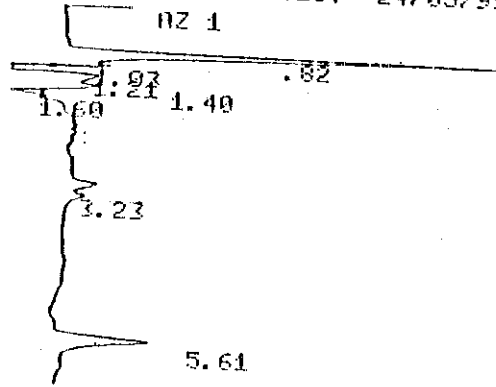
Lipocortin miktarını saptamak amacı ile tüm fraksiyonların 50 µg protein içeren miktarları, fosfolipid kaynağı olarak kullanılan eritrosit membranı ve fosfolipaz A₂ enzimi bulunan ortama ilave edildikten sonra oluşan AA miktarı, aşağıdaki koşullarda ölçüldü. (Şekil 7) ve çıkış zamanı referans olarak kullanılan AA'ine uyan (RT: 5.57±0.071 dakika) örneklerin peak'lerinin alanı değerlendirmeye alındı.



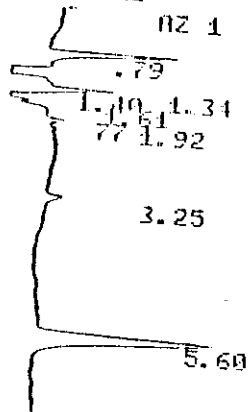
Şekil 7) "ARACIDONIC ACID" analizi için kalibrasyon eğrisi.

Analiz için; Kolon : SP-C18
Mobil faz : A(%10);su:acetic acid(99:1 v/v)
B(%90);Metanol
Akım hızı : 1 ml/dak.
Isı : 28°C
λ : 210 nm.

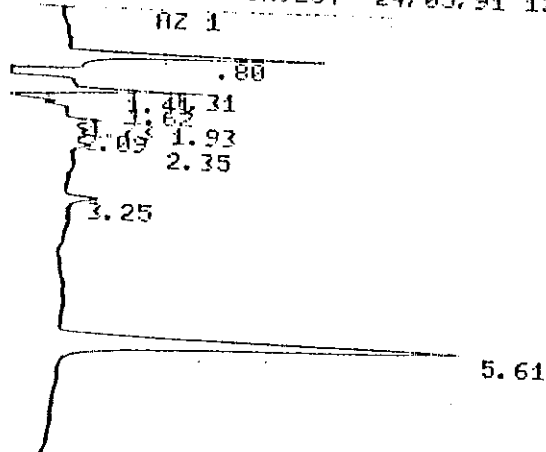
a) CHANNEL A INJECT 24/05/91 12:15:51
AZ 1



b) CHANNEL A INJECT 24/05/91 12:22:49
AZ 1



c) CHANNEL A INJECT 24/05/91 12:30:33
AZ 1



Sekil 8) HPLC ile arachidonic acid (AA) analizi,
a) 100 pmol AA,
b) 200 pmol AA,
c) 500 pmol AA.

Referans madde: Arachidonic acid(Sigma Kat.No:A-0662)

Ölçüm yöntemi : High Performance Liquid Chromatography

Kolon : SP-C18, 15 cm x 4 mm boyutunda, 3µm partikül büyüklüğü olan "reverse phase" kolon.

Kosullar : Solvent A:%90 Metanol (Sigma Kat.No:6008)

Solvent B:%10 Su:acetic acid (99:1 v/v)

Akım hızı : 1 ml/dak

Isı : 28°C

Dalga boyu: 210 nm

Çalışmaya başlamadan önce AA analizi için kullanılacak kolonun güvenilirliğini araştırmak amacı ile kolon etkinliği naphtalene ile test edildi.

Her gruba ait protein içeren fraksiyonların AA oluşumuna etkisi, deney gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda, % inhibisyon olarak belirlendi.

4.)Anti-FLA₂ aktivitesine sahip proteinlerin T lenfosit proliferasyonuna etkisi:

Julius ve ark. larının yöntemine göre (65) izole edilmiş T lenfositler 2×10^6 /ml olacak şekilde medyumla seyreltildikten sonra 1'er ml hücre süspansiyonu deney tüplerine konuldu. Tüpler 2 gruba ayrılarak bir kısmı PHA ile stimüle edilmek üzere hazırlandı. Her deney grubuna ait anti-FLA₂ aktivitesine sahip proteinlerden 50 µg deney tüplerine ilave edilerek 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda, stimülasyon için ayrılmış tüblere 10 µg PHA eklenerek, 37°C de %95 O₂ +%5 CO₂ altında, inkübasyona 72 saat daha devam edildi. Tüm tüplerdeki hücreler sayıldıktan sonra, PHA ilave edilmeyen tüplerdeki hücre sayısı 100% olarak alındı ve PHA ile stimüle edilmiş hücrelerin sayısı ile karşılaştırılarak, bu tüplerdeki artış % olarak belirlendi. % artış olarak belirlenen cevaplar deney grupları arasında karşılaştırıldı.

5.) Anti-FLA₂ aktivitesine sahip proteinlerin makrofai fagositik aktivitesine etkisi:

Blackwell ve ark. larının yöntemine göre (12) alınan peritoneal lavaj sıvısından 0.5 ml, 50 µg anti-FLA₂ aktiviteye sahip protein ile 2 saat 37°C de inkübe edildi. süre sonunda tüblere %1 aktif karbon süspansiyonundan 0.5 ml ilave edilerek 37°C de 1 saat inkübe edildi. Süre bitiminde, thoma lamına konulan hücre süspansiyonu 100 büyötmeli objektifle incelendi. Her bir tüb için 100 makrofajın fagosite ettiği partikül sayılarak ortalaması alındı ve deney gruplarına ait sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılarak, fagositik aktivitedeki değişim değerlendirildi.

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde Microsta paket istatistik programı kullanıldı.

Y Ö N T E M L E R

1) Peritoneal Hücrelerin Elde Edilmesi:

Sıçanlar eter ile uyutulduktan sonra Linea alba'nın sağ yanından, PH=8.0 olan 10 ml Krebs Fosfat Tampon çalışma çözeltisi intraperitoneal verildi. 3 dakika hafif masaj yapıldıktan sonra, orta hat kesisi ile periton içindeki sıvı, kan karışmamasına dikkat edilerek delikli bir kanül aracılığı ile toplandı. 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlandı. Üst kısımdaki sıvı alındıktan sonra, hücreler üzerine 1 ml RPMI-1640 medyum ilave edilerek hafifçe karıştırıldı ve hücrelerin homojen dağılımı sağlandı. Mikroskopta 40x10 büyütme ile sayılan hücreler, deney protokolüne uygun şekilde aynı medyumla seyreltilerek kullanıldı.

2) Sephadex G 50-80 Jel kromatografisi:

Inkübasyon ortamındaki protein moleküllerini büyüklüklerine göre ayırtırmak amacıyla kullanılan bu yöntemin uygulanması için;

- 1 g Sephadex G 50-80 üzerine, 150 ml distile su karıştırılarak ilave edildi ve jelin homojen olması sağlandı.

- Partiküllerin şişmesi için 2 gün oda ısısında beklendikten sonra, çökelen jelin üzerindeki sıvı kısım aspire edilerek uzaklaştırıldı.

- Buchner hunisi ve aspiratör yardımı ile, jelin PH'sı 8.0 oluncaya kadar amonyum bikarbonat tampon çözeltisi ile yıkandı.

- Jel yan tarafından çıkışı olan erlenmayere alındı ve

cökmesi için bir süre beklendi. Jel üzerindeki tampon çözelti uzaklaştırıldıktan sonra, 10 dakika süre ile havası alınıp, kolonun doldurulması işlemine geçildi.

-Ucuna cam pamuğu konmuş 60x1 cm boyutundaki kolonun çeperi amonyum bikarbonat tampon çözeltisi ile yıkandı. Kolonun alt ucu kapatılarak, jel hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde dolduruldu.

-Kolonun içindeki jelin cökmesi için 1 saat beklendi. Sonra çıkışı açılarak jelin içindeki tamponun akması ve jelin paketlenmesi sağlandı. (Separasyonun iyi olması için jel içinde hava kabarcığı kalmaması ve tabakalanma olmaması gerektiğinden, kolon bir ışık kaynağının önüne konarak jelin homojen olup olmadığı incelendi.)

-Akım hızı 0.3 ml/dak. olan kolonun dengelenmesi için 200 ml tampon çözelti geçirildi.

-Separasyon sırasında jel üzerindeki 2 cm'lik sıvı sütununun yaptığı basınçla akım hızının 0.3 ml/dak. olarak sabit kalmasına dikkat edildi.

Sephadex G 50-80 kolonuna ait kalibrasyon eğrisinin elde edilmesi:

-Konsantrasyonları 200 µg/0,1 ml olacak şekilde İnsülin (M.W. 6000), Trypsin (M.W. 24000), Ovalbumin (M.W. 45000), Bovine serum albumin (M.W. 68000), Sephadex G 50-80 kolona yöntemine uygun şekilde yüklendi.

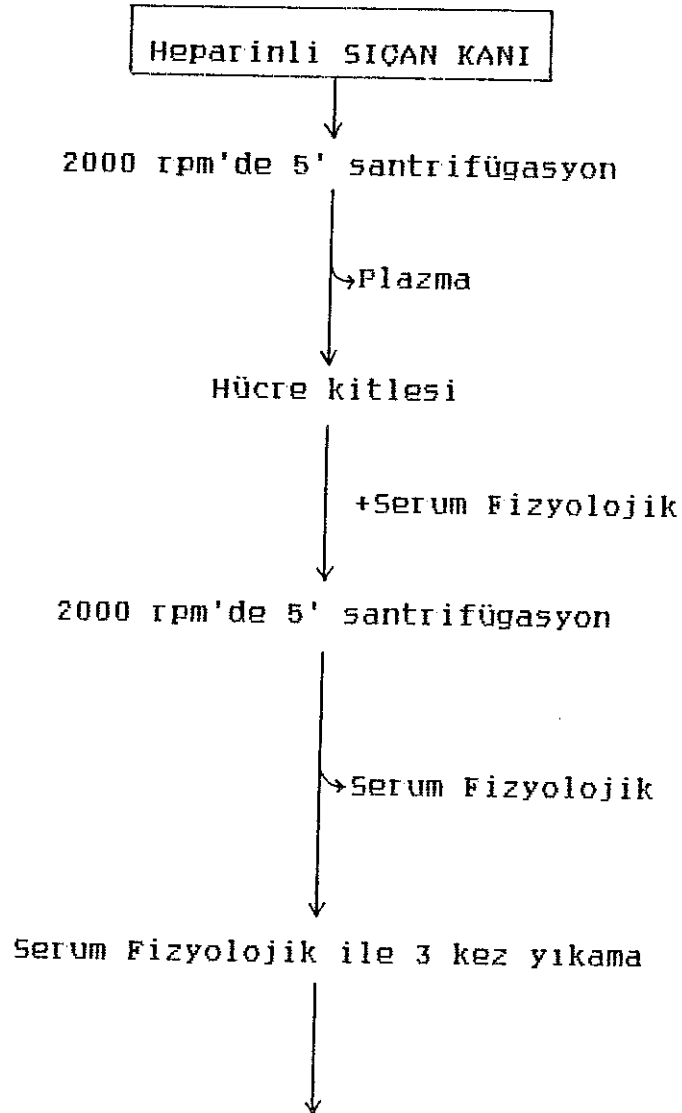
-Elusyon amonyum bikarbonat tampon çözeltisi (PH:8.0) ile yapıldı ve 10'ar dakikalık fraksiyonlar toplanarak hangi fraksiyonların protein içerdiği, $\lambda=280$ nm dalga boyunda

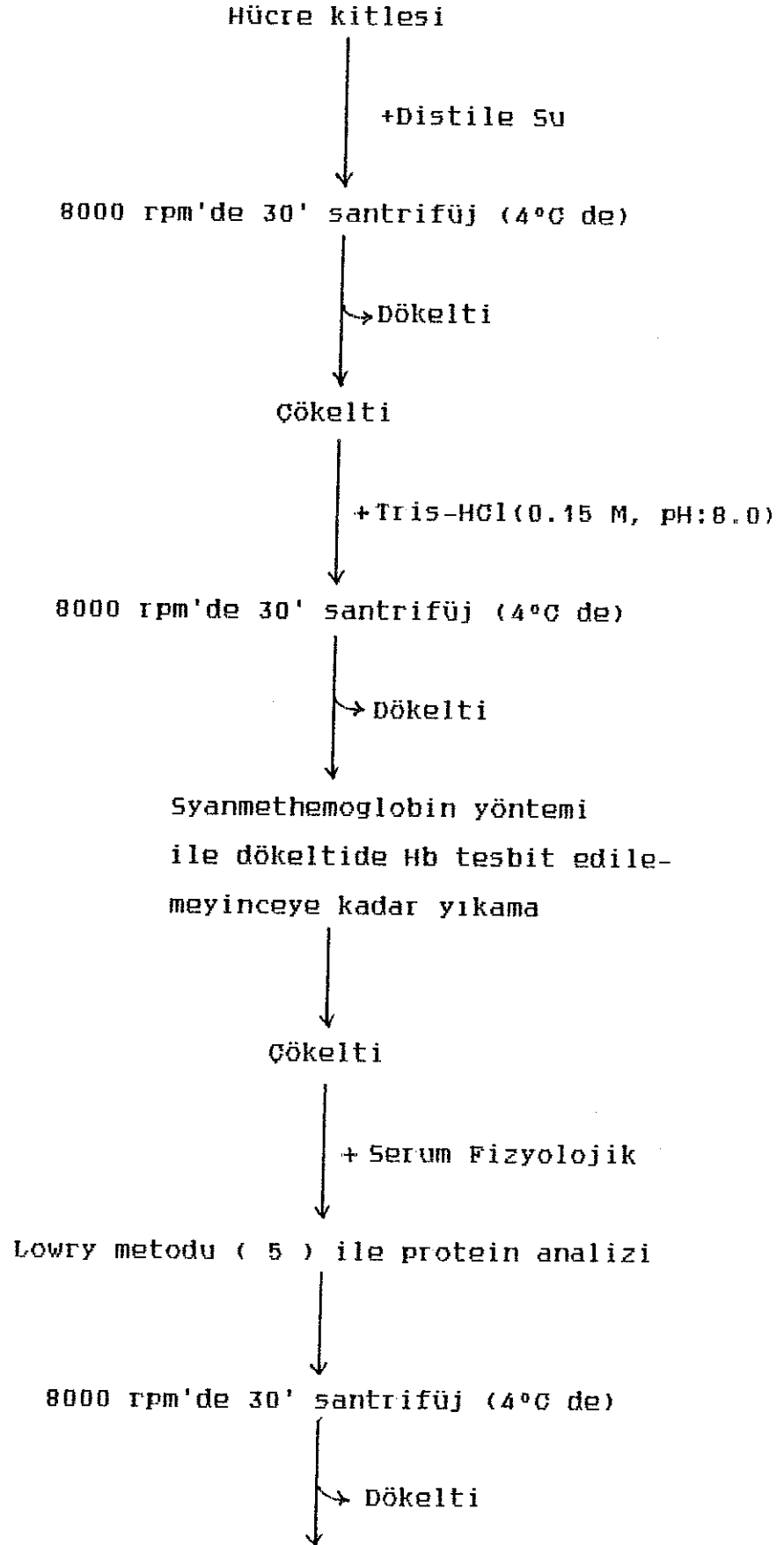
Spectronic 21 marka spektrofotometrede yapılan okuma ile tesbit edildi.

- Sonuçta Sephadex G 50-80 kolonu ile, Bovine serum albuminin 10., Trypsinin 14., İnsülin 17. fraksiyonda çıktığı gözlemlendi. (Şekil 6) Bu sonuçlara göre çizilen kalibrasyon eğrisi ile molekül ağırlığı 40.000 olan bir proteinin 11. fraksiyonda çıkması gerektiği sonucuna varıldı.

3) Eritrosit Membranının Elde Edilmesi

Sıçanlardan intrakardiak olarak alınan heparinli kandan Dodge ve ark. larının yöntemine (34) göre membran elde edildi.





Çökelti

+ Kloroform:Metanol (3:1 V/V)

60 saniye vortekslenerek lipid ekstraktı elde edildi ve ekstrakt, AA oluşumu için fosfolipid kaynağı olarak kullanıldı.

4) Lowry metodu ile protein miktarının tayini:

- 0.1 ml eritrosit membran süspansiyonu üzerine 0.4 ml serum fizyolojik ilave edildikten sonra, bu karışımdan 0.1 ml deney tübüne alındı.

- 0.1 ml membran süspansiyonuna 0.1 ml 1 N NaOH ve 1 ml D reaktifi ilave edildi.

- 20 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edildikten sonra 0.1 ml 1 N Folin reaktifi eklendi.

- 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.

- 2 ml distile su eklendi.

- Sprektrofotometrede 750 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Formülden hesaplanan sonuç dilüsyon faktörü ile carpıldı.

$$\text{Protein miktarı} (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{Örneğin absorbansı}}{\text{Standart absorbansı}} \times \text{Standart kons.} (\mu\text{g/ml})$$

5) Arachidonic acid (AA) analizi için örnek hazırlanması:

Sephadex G 50-80 kolonundan elde edilen fraksiyonlardaki proteinlerin AA oluşumuna etkisini saptamak amacıyla Blackwell ve ark.larının yöntemi (12) kullanıldı.

Bu amaçla, içinde 100 mM Tris-HCl ve 10 mM CaCl₂

bulunan deney tüplerine, 200 µg protein içeren membran lipid ekstraktı ve 50 µg protein içeren fraksiyon (Sephadex G 50-80 kolonundan toplanan) konuldu. Oda ısısında 30 dakika inkübe edildikten sonra 100 ng FLA₂ ilave edilip, inkübasyona 2 dakika daha devam edildi. Reaksiyon 50 µl 1 N HCl ile durdurulduktan sonra, AA ölçümü için ekstraksiyon işlemine geçildi.

Ekstraksiyon için ortama 2 ml kloroform eklenip 30 saniye vortekslendi, alt faz alındı. Üstte kalan kısma tekrar 2 ml kloroform eklenip, 30 saniye vortekslendi. Alınan alt faz öncekinin üzerine eklendi ve azot altında uçuruldu. AA analizi yapmak üzere tüp içine 1 ml Methanol:Su:Acetic acid (90:9:1 v/v/v) karışımı konup, 30 saniye vortekslendi ve 0.45 µm lik filtreden süzülüp, HPLC de AA analizi için kullanıldı. Analiz sonunda integratörde hesaplanan AA miktarları "pmol" olarak bulundu.

Lipocortin bir FLA₂ inhibitörü olduğu için kontrol grubunun AA miktarı % 100 kabul edilerek deney gruplarının membran fosfolipidinden FLA₂ mevcudiyetinde AA oluşumunu azaltıcı gücü, % lipocortin aktivitesi olarak kabul edildi.

6.) Mezenterik lenf nodüllerinden T lenfositlerin izole edilmesi:

Orta hat kesisi yapılmış sıçanların mezenterik lenf nodülleri çıkarıldı ve steril serum fizyolojik içinde birkaç kez yıkandı. Lenf nodülleri steril penisilin şişelerindeki 1 ml medyum içine alınarak, alevden geçirilmiş penset aracılığı ile ezildi. Hücre süspansiyonu steril santrifüj tübüne alındı, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi, üst sıvı atıldı. Hücrelerin üzerine 1 ml medyum ilave edilip, hafifçe karıştırılarak homojen dağılması sağlandı. Hücreleri izole etmeden önce hazırlanmış cam kolonun ucu kapatılarak içine 2-3 ml medyum ilave edilip, cam pamuğunun ıslanması sağlandı.

(Kolon 10 ml'lik cam enjektör içine 10 mg cam pamuğu konularak hazırlandı.) 37°C de 1 saat süre ile inkübe edilen kolon dengelenmiş oldu. Bu şekilde daha önceden hazırlanmış kolonun üzerine hücre süspansiyonu uygulandı ve kolon dik olarak 45 dk 37°C de inkübe edildi. Süre sonunda kolonun ucu açılarak hücre süspansiyonunun santrifüj tübüne, basınç uygulanmaksızın akması sağlandı. Böylece santrifüj tübüne T lenfosit alınmış oldu. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldükten sonra üst kısım atıldı. Hücrelerin üzerine 1 ml medyum ilave edildikten sonra, hafifçe alt üst edilerek homojen dağılımı sağlandı. Thoma lamı kullanılarak, 1 mm³ te kaç hücre olduğu belirlendi. Canlı hücreler 2x10⁶ /ml olacak şekilde medyumla seyreltildi.

HPLC'nin Kalibrasyonu:

Referans madde: Naphtalene (Merck Kat.No:820846)(10-50-100 ppm Standart çözeltileri ile çalışıldı.)

Koşullar : Solvent A : %55 Acetonitril (Sigma Kat.No:800015)
Solvent B : %45 Su
Akım hızı : 1 ml/dak.
Isı : 25°C
Dalga boyu: 254 nm.

Yukarıda belirtilen koşullarda yapılan analiz sonucunda;

Çıkış zamanı (RT) : 6.476 ± 0.031 dakika

Plak simetrisi (AF) : 1

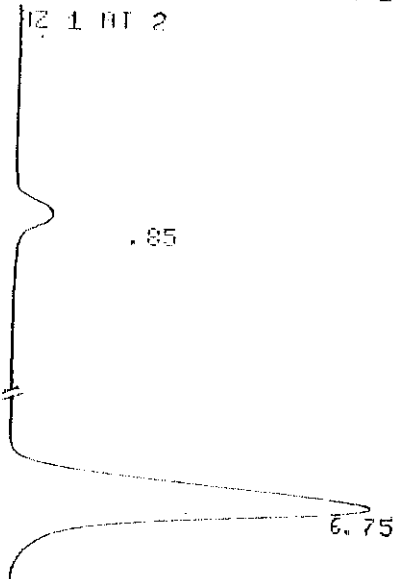
Plak sayısı (N) : 696.09

Teorik plak sayısı : 21.58

olarak saptanan değerlerin (Şekil 9) kolon için verilen güvenilirlik sınırları içinde bulunması nedeni ile AA analizi ile ilgili çalışmalara bu kolon kullanılarak başlandı ve referans olarak kullanılan AA'in kolondan çıkış zamanı (RT): 5.57 ± 0.071 dakika olarak tesbit edildi.

RT'1 eşit olan örneklerin verdiği peak'lerin alanları esas alınarak, AA miktarlarının hesaplanmasında Varian 4290 model integratör kullanıldı.

CHANNEL 0 INJECT 12-20/99 15:09:25



Şekil 9) HPLC ile Naphtalene analizi.

G Ö Z E L T İ L E R

A-Peritoneal hücrelerin elde edilmesi için:

1) Krebs Fosfat Tampon Çözeltisi:

Stok çözeltiler:

- a) 9.00 g NaCl, 1 L distile suda çözüldü.
- b) 1.15 g KCl, 100 ml distile suda çözüldü.
- c) 1.22 g CaCl₂, 100 ml distile suda çözüldü.
- d) 2.11 g KH₂ PO₄, 100 ml distile suda çözüldü.
- e) 3.82 g MgSO₄, 100 ml distile suda çözüldü.
- f) 1.30 g NaHCO₃, 100 ml distile suda çözüldü.

Çalışma Çözeltisi:

Stok çözelti a'dan 100 ml

- " " b'den 4 ml
" " c'den 3 ml
" " d'den 1 ml
" " e'den 1 ml
" " f'den 21 ml alındı.

Çözelti PH'sı 1 N HCl ile 7.35'e ayarlandı.

B-Peritoneal hücre inkübasyonu için:

1) RPMI-1640 medyum (Sigma Kat. No:R-4130): Toz halindeki medyum üzerine steril distile su ilave edildi, karıştırılarak erimesi sağlandı. Bu stok medyum çözeltisinden 10 ml alınarak 80 ml steril distile su ile seyreltildi. 5 M NaHCO₃ ile PH 'sı 7.35'e ayarlandı. Üzerine 10 ml FCS (Fetal calf serum), 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycine ilave edilerek hücrelerin inkübasyonu için hazır hale getirildi.

2) Fetal calf serumu (Sigma Kat. No: F-3010): Toz halindeki serum üzerine 20 ml distile su eklenerek hazırlandı.

3) 5 M NaHCO_3 ; 42 g NaHCO_3 , 100 ml distile suda çözüldü.

C)Jel kromatografisi için;

1) 0.02 M Amonyum bikarbonat tampon çözeltisi; 1.58 g amonyum bikarbonat 1 L distile suda çözüldü ve 1 N NaOH ile PH=8.0'e ayarlandı.

2) 1 N NaOH çözeltisi; 40 g NaOH, 1 L distile suda çözüldü.

D)Eritrosit membranı elde etmek için;

1) 0.15 M Tris-HCl tampon çözeltisi = 18.18 g Tris, 1 L distile suda eritildi, 1 N HCl ile PH=8.0'e ayarlandı.

E)Lowry metodu ile protein miktarının tayini için;

1)D Reaktifi: 10 ml %2 Na_2CO_3 , 0.1 ml %1 CuSO_4 , 0.1 ml %2 Sodyum potasyum tartarat.

2)1 N Folin reaktifi: 2 N Folin reaktifi (Sigma Kat.No: F-9252) distile su ile seyreltildi.

3)1 N NaOH: 40 g NaOH 1 L distile suda çözüldü.

F)Arachidonic acid (AA) olusumu için;

1)10 mM CaCl_2 içeren 100 mM Tris-HCl tampon çözeltisi: 48.44 g Tris ve 4.44 g CaCl_2 , 1 L distile suda çözüldü. İnkübasyon ortamına bu çözeltiden 0.5 ml ilave edildi.

2)Fosfolipaz A_2 (Sigma Kat.No:P-6534): 10 mg/0.6 ml'lik çözeltiden 10 μl alınıp, 16.66 ml distile su ile seyreltildi. Bu çözeltiden inkübasyon ortamına 10 μl ilave edildi.

G)Arachidonic acid (AA) analizi için;

1)Solvent C:Methanol:Su:acetic acid(90:10:1 v/v/v)

2)Standart AA çözeltisi;

Stok AA (50 mg/ml)= 50 mg AA, 1 ml metanolde çözüldü.

10 nmol AA: 10 μl stok AA, 1630 μl Solvent C'ye ilave edildi.

1000 pmol AA: 100 μl 10 nmol AA, 900 μl Solvent C'ye ilave edildi.

500 pmol AA: 1 volüm 1000 pmol AA: 1 volüm Solvent
C'ye ilave edildi.

200 pmol AA: 2 volüm 500 pmol AA, 3 volüm Solvent
C'ye ilave edildi.

100 pmol AA: 1 volüm 200 pmol AA, 1 volüm Solvent
C'ye ilave edildi.

H) Mitoiene T lenfosit proliferatif cevabının saptanması için :

1) Medyum RPMI 1640: Yukarıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

2) Phytohemaglutinin-M (PHA): 10 mg PHA, 10 ml distile su içinde çözüldü. Bu çözeltiden 10 µl 2×10^6 hücre içeren 1 ml süspansiyona ilave edildi.

I) Makrofai fagositik aktivitesinin saptanması için:

1) Krebs fosfat tampon çözeltisi: Yukarıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

2) %1 Aktif karbon çözeltisi: 1 g aktif karbon, 100 ml distile su ile süspansiyon haline getirildi.

I) Hücrelerin inkübasyonunda kullanılan ilaçlar:

1) 10 M Dexamethasone (Sigma Kat.No:D-1756); 3.925 mg Dexamethasone 10 ml medyuma eritilerek stok solüsyon hazırlandı. Bu solüsyonun 100 µl'si 9900 ml medyuma ilave edildi. Bu solüsyondan 100 µl inkübasyon ortamına eklenerek inkübasyon başlatıldı.

2) Cyclosporin-A: 50 mg/ml CS-A içeren I.V enjektabl Sandimmun preparatından cam pipetle alınan 0.1 ml 49.9 ml medyum içine ilave edildi. CS-A içeren medyundan 100 µl alınıp 1 ml hücre süspansiyonuna ilave edilerek inkübasyon başlatıldı. (Çalışmalarda cam malzeme kullanıldı.)

3) CS-A + Dexamethasone; ilaçlar yukarıda belirtilenden 2 kez daha konsantre hazırlandı ve her ikisinden de 50 µl

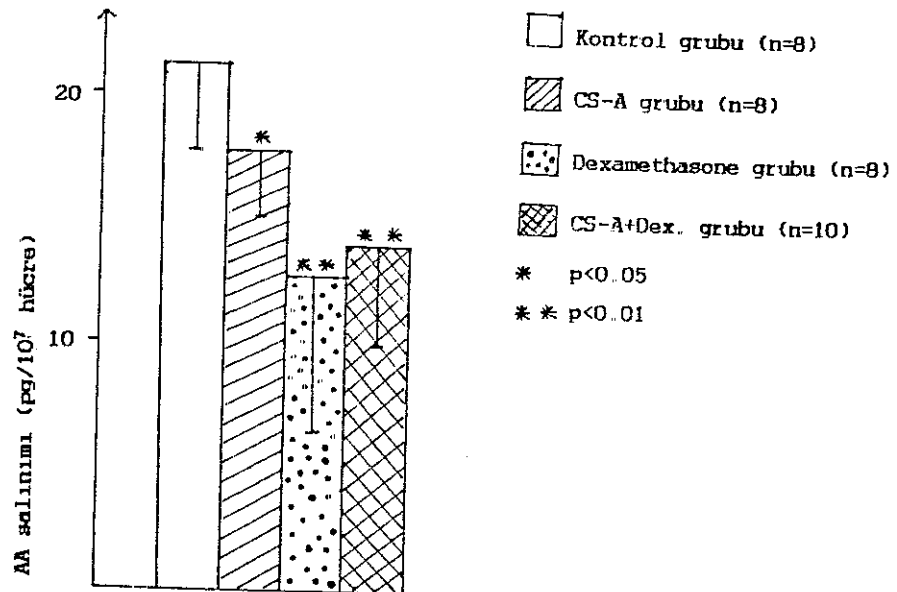
alınıp, 1 ml hücre süspansiyonuna ilave edilerek inkübasyon başlatıldı.

4) Phenylmethyisulphonylfluoride (Sigma Kat.No:P-7626):
inkübasyon ortamına 1 µg ilave edildikten sonra inkübasyon başlatıldı.

BULGULAR

1) İmmünosupressif Ajanların AA Oluşumuna Etkisi:

Çalışmanın ilk aşamasında CS-A'nın, tek veya steroidlerle kombine kullanımının AA oluşumuna etkisini araştırmak amacıyla, 10×10^6 peritoneal hücrenin bulunduğu 1 ml'lik ortama, tablo 1'de belirtilen miktarlarda immünosupressif ilaçlar ilave edildi. 16 saat inkübasyon sonucunda hücrelerde oluşan AA miktarı ölçüldüğünde, deney gruplarının tümünde inhibisyon saptandı. Kontrol grubunda 21.34 ± 3.48 pg/ml olan AA miktarı, CS-A grubunda 17.68 ± 2.38 pg/ml, Dexamethasone ve her iki ilacın birlikte kullanıldığı gruplarda ise sırayla 12.79 ± 6.41 ve 14.04 ± 4.01 pg/ml olarak saptandı. (Şekil 10) Hücrelerde 10 µg CS-A anlamlı AA azalışına neden olurken Dexamethasone ve Dexamethasone + CS-A grubunda yapımındaki baskılanma daha önemli bulundu.

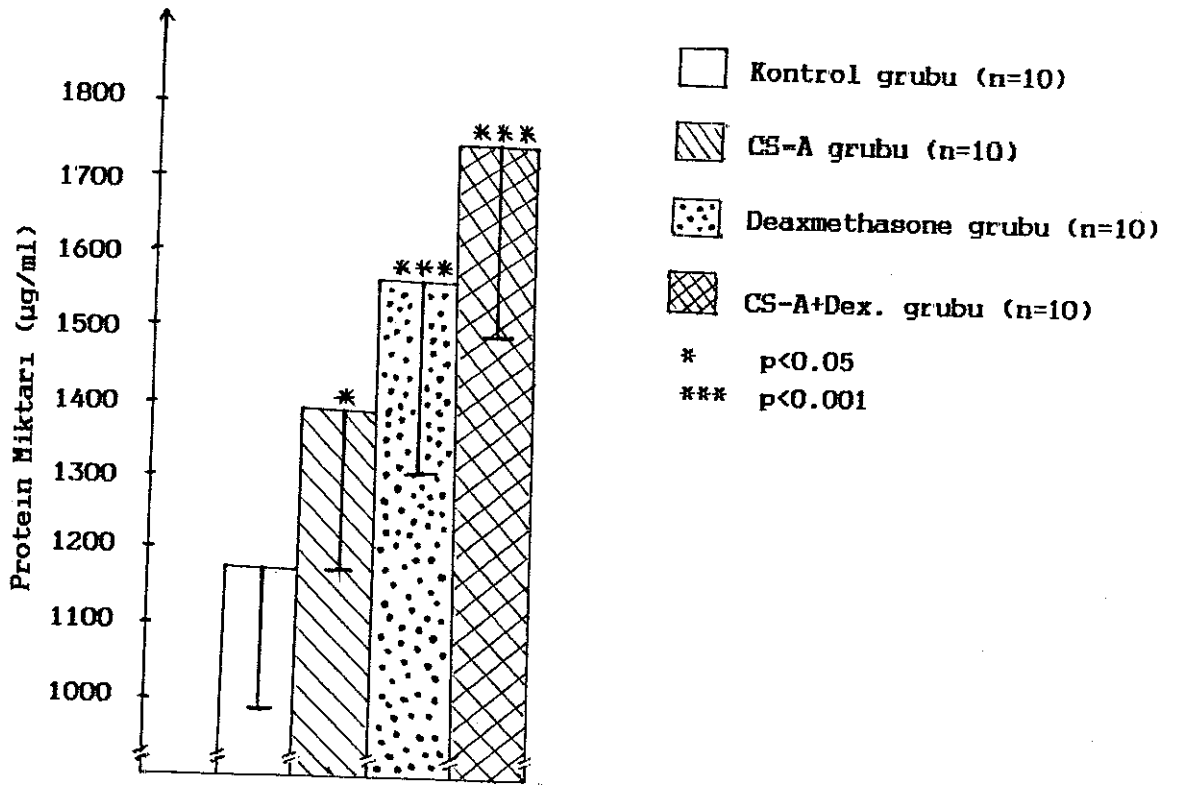


Şekil 10) Peritoneal hücrelerden salınan AA miktarına immünosupresif ilaçların etkisi.

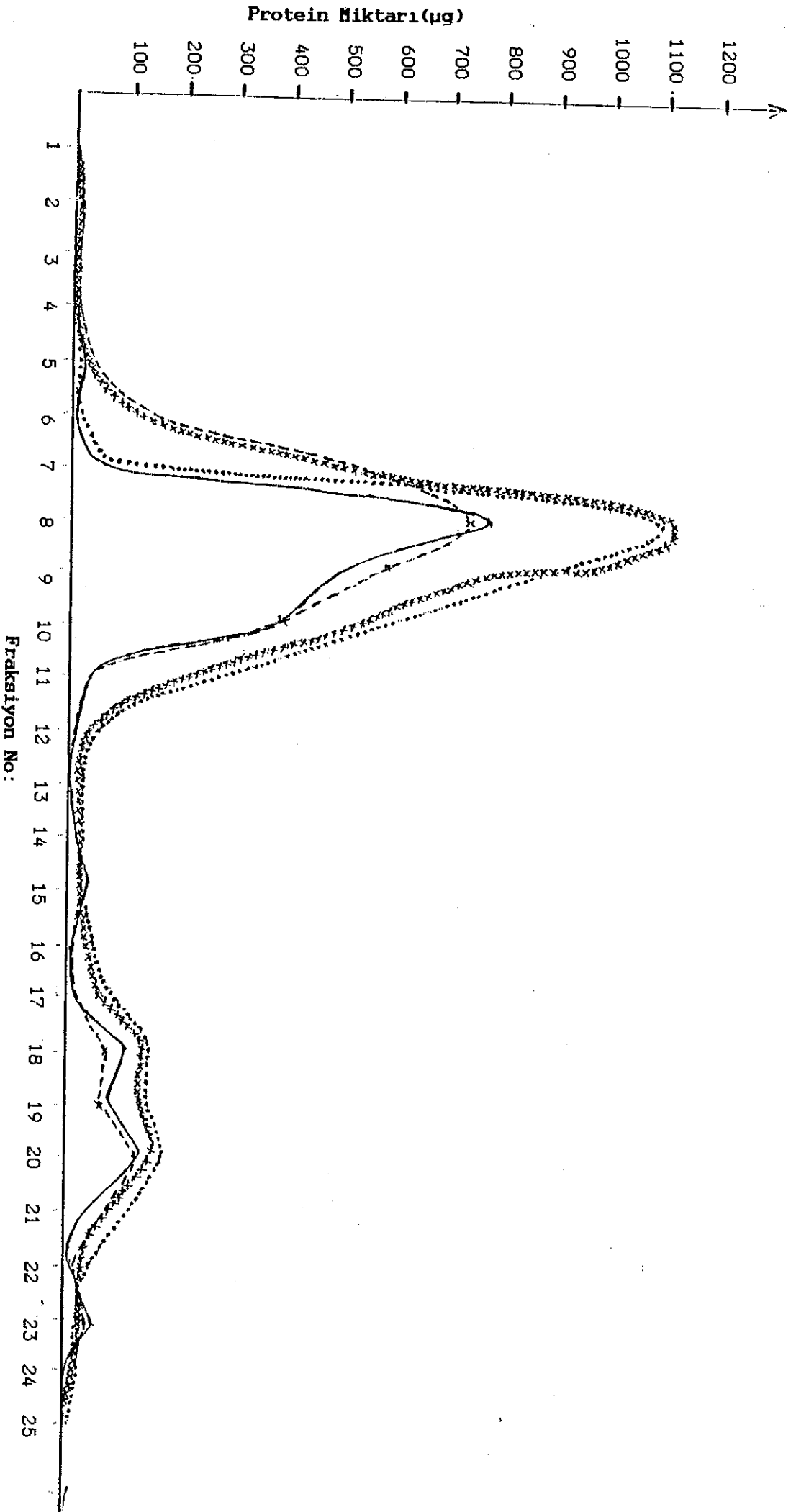
2) Immunosupressif ilacların Protein Sentezine Etkisi:

Bu amaçla 2×10^6 peritoneal hücre içeren 1 ml'lik ortama, tablo 2'de bildirilen miktarlarda immünosupressif ilaç ilave edildi ve 16 saatlik inkübasyon süresi sonunda aşağıdaki çalışmalar yapıldı:

2-a) Kontrol ve deney grubunu oluşturan peritoneal hücrelerin sentezledikleri protein miktarlarının ölçümü sonucunda, immünosupressif ilaçlarla inkübe edilen hücrelerin tümünde protein sentezinin arttığı tesbit edildi. Kontrol grubunda 1178.81 ± 190.45 $\mu\text{g/ml}$ olan protein miktarı, CS-A grubunda 1385.05 ± 202.60 $\mu\text{g/ml}$, Dexamethasone ve CS-A \pm Dexamethasone grubunda daha da artarak sırasıyla, 1658.92 ± 234.64 $\mu\text{g/ml}$ ve 1751.58 ± 296.87 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlendi (Şekil 11). Deney gruplarında saptanan artışların hepsi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu.



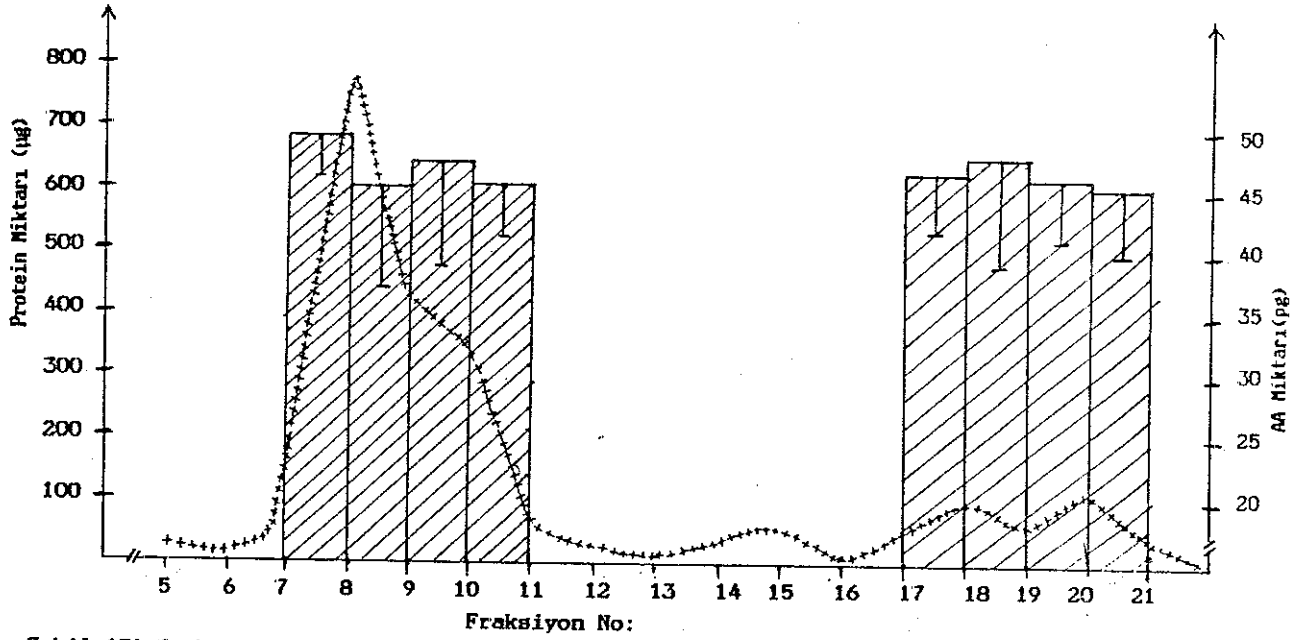
Şekil 11) Peritoneal hücrelerin inkübasyon ortamına ait protein miktarı.



Sekil 12) Sephadex G 50-80 ile elde edilen fraksiyonlardaki protein miktarı.
(—); Kontrol grubu, (---); CS-A grubu, (.....); Dexamethasone grubu, (****); CS-A+Dexamethasone grubu.

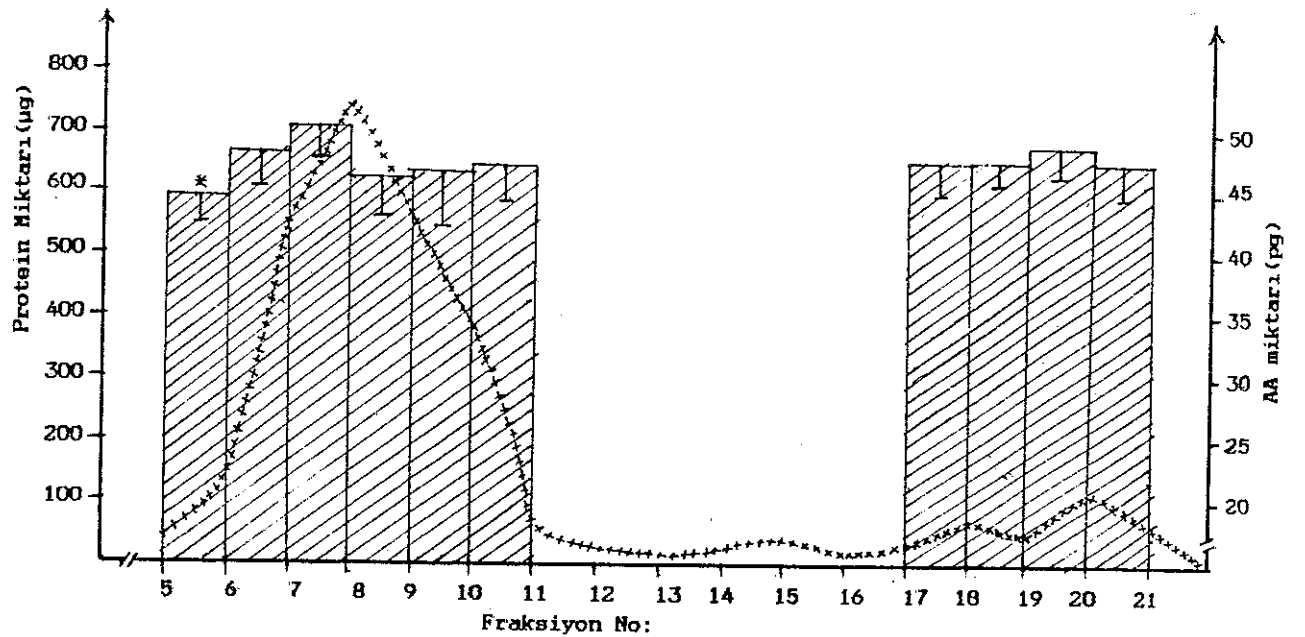
3) Lipocortinin Semipurifikasyonu :

3-a) 2×10^6 peritoneal hücrenin tablo 2'deki uyarılara cevaben 16 saat içinde sentezledikleri proteinler Sephadex G 50-80 kolonundan geçirilerek 10'ar dakikalık fraksiyonlar halinde toplandığında (Şekil 12), proteinlerin kontrol grubunda 8-11., 18-21. fraksiyonlarda tablo 4'de belirtilen miktarlarda çıktığı tesbit edildi (Şekil 13).



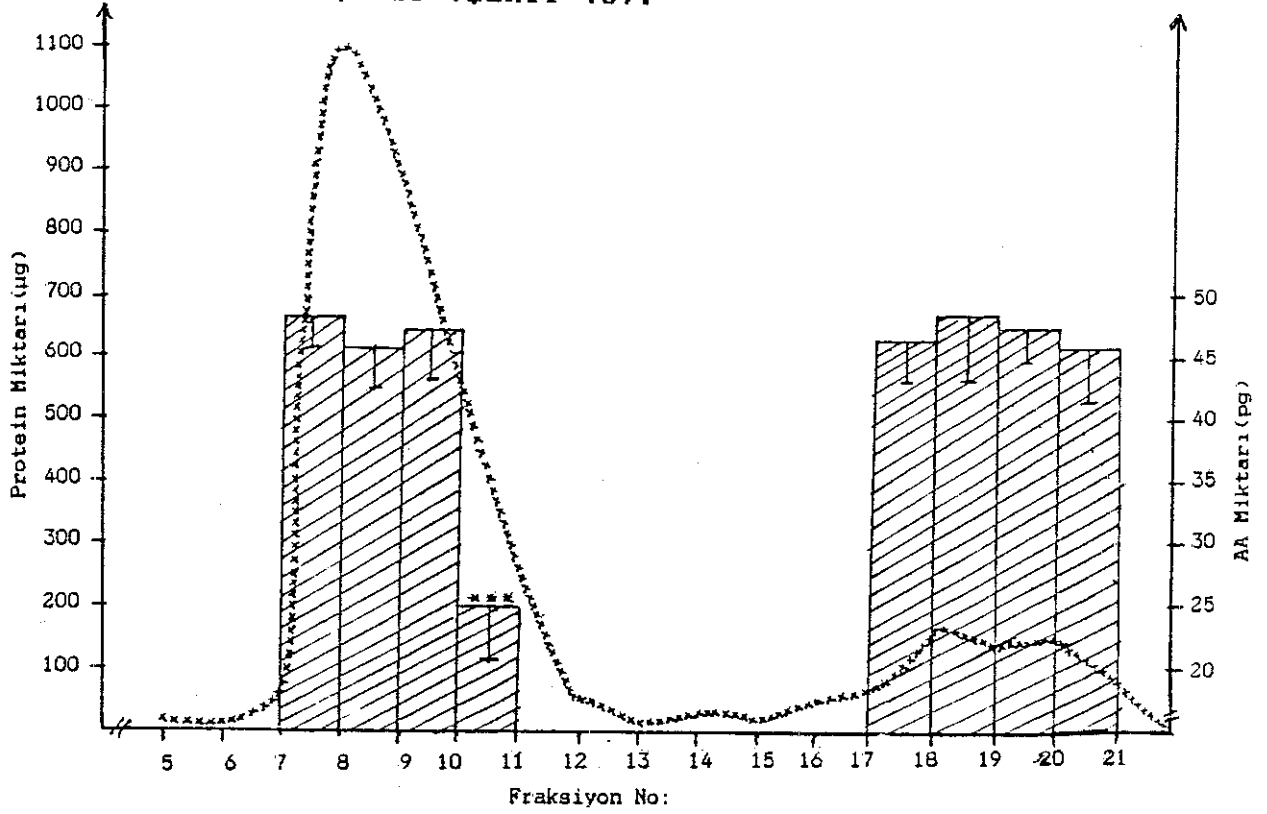
Şekil 13) Sephadex G 50-80 kolonundan elde edilen "KONTROL" grubuna ait fraksiyonların FLA₂ aktivitesi (***) ;Fraksiyonlardaki protein miktarı, (▨) ;AA miktarı

CS-A ile inkübe edilen hücrelerde ise kontrol grubunda bulunmayan ve 6-7. fraksiyonlarda çıkan ilave proteinlerin sentezlendiği dikkati çekti (Şekil 14).

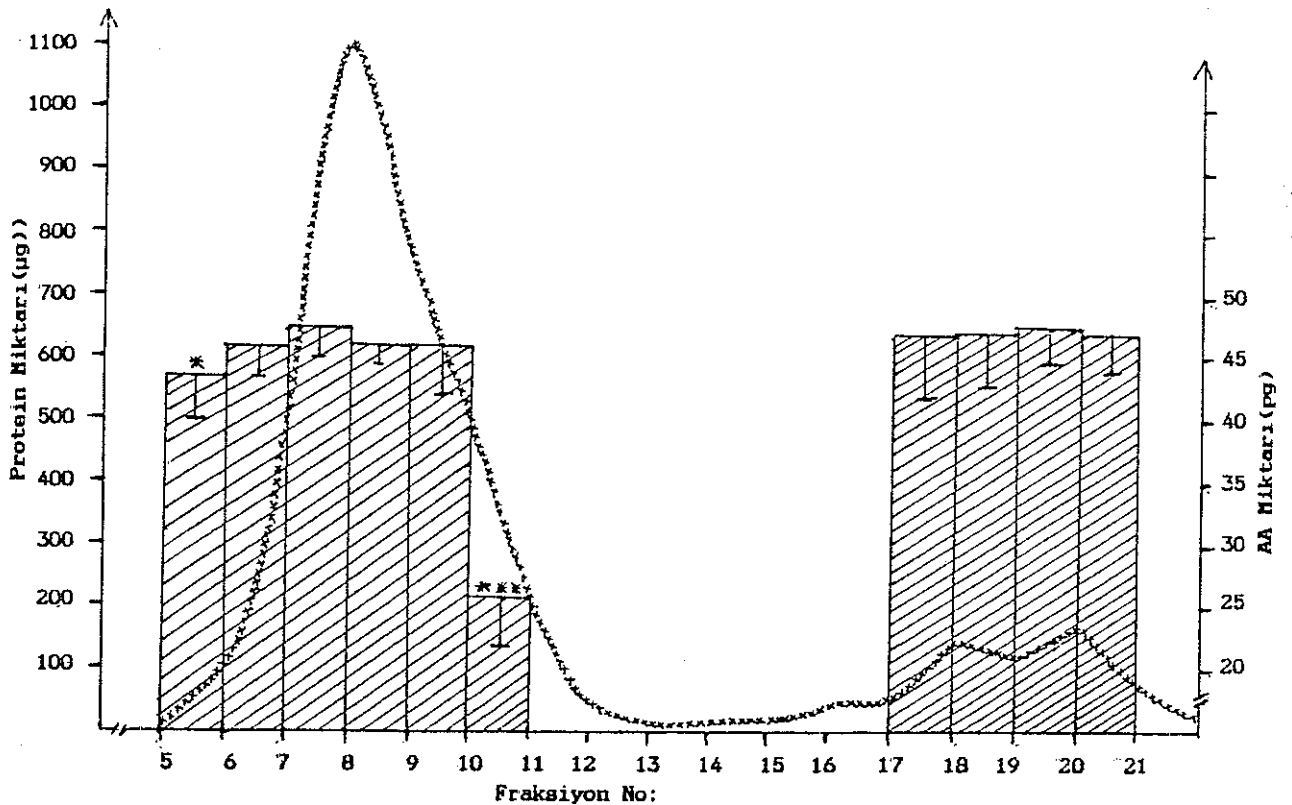


Şekil 14) Sephadex G 50-80 kolonundan elde edilen, "CS-A" grubuna ait fraksiyonların FLA₂ aktivitesine etkisi; (***) ;Fonksiyonlarındaki protein miktarı, (▨) ;AA miktarı, * p<0.05

Hücrelerin Dexamethason ile sitümlasyonu sonucu 8-11., 18-21. fraksiyonlarda çıkan proteinlerin miktarında artış olduğu gözlemlendi. Bunun yanısıra kontrol grubunda eser miktarda çıkan 12. fraksiyondaki proteinlerin miktarında da artış dikkati çekti (Şekil 15).



Şekil 15) Sefadex G 50-80 kolonundan elde edilen, "DEXAMETHASONE" grubuna ait fraksiyonların FIA aktivitesine etkisi; (***)Fraksiyonlardaki protein miktarı, (Z);AA miktarı, *** p<0.001



Şekil 16) Sefadex G 50-80 kolonundan elde edilen, "CS-A + DEXAMETHASONE" grubuna ait fraksiyonların FIA₂ aktivitesine etkisi; (***)Fraksiyonlardaki protein miktarı, (Z);AA miktarı, * p<0.05, *** p<0.001

Dexamethasone ve GS-A'nın birlikte uygulandığı hücrelerin her iki ilaca ait proteinleri sentezlemesine karşın miktarlarında, ilaçların yalnız uygulanmasına göre farklılık bulunmadı (Şekil 16).

3-b) Fraksiyonlardaki Proteinlerin Molekül Ağırlıkları:

Bu proteinler molekül ağırlıkları yönünden incelendiğinde stimülasyona maruz kalmayan kontrol hücrelerin bu 16 saatlik inkübasyon esnasında fraksiyon 8-11. arasında çıkan ve molekül ağırlığı 37.500-55.000 olan proteinleri sentezledikleri dikkati çekti

GS-A ise bu proteinlere ilaveten, molekül ağırlığı 55.000-67.500 arası proteinlerin sentezlenmesine neden oldu ve bu proteinler 6.-7. fraksiyonda tesbit edildi.

Hücreler Dexamethasone'a cevaben 8-11. fraksiyonlarda çıkan proteinlerin daha fazla sentezlediler. Kontrol hücrelerde çok az miktarda olduğu halde dexamethasone ile tedavili hücrelerde 11. fraksiyonda artan proteinin molekül ağırlığı 37.500-42.500 dalton olarak saptandı. Ayrıca molekül ağırlığı 32.500-37.500 olan proteinin 12.fraksiyonda arttığı gözlemlendi (Tablo 3).

3-c) Antiinflamatuvar etkili fraksiyonun saptanması:

Toplanan fraksiyonlardaki proteinlerin hangisinin antiinflamatuvar etkili olduğunu saptamak amacıyla yapılan ölçümlerin sonuçları Şekil 13, 14, 15, 16'de gösterilmiştir.

100 ng FLA₂ 'nin, 200 µg protein içeren membrandan oluşturduğu AA miktarı kontrol koşullarda 46.70±3.95 pg dir. Bu ortama ilave edilen 50 µg protein içeren fraksiyonun AA oluşumuna etkisi incelendiğinde, kontrol grubunun 8-10. ve

18-21. fraksiyonlarının AA oluşumunda herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlendi. (Şekil 13) Sadece 11. fraksiyonda %14.34 ± 5.87 lik inhibisyon yapabilecek bir antifosfolipaz A₂ aktivitesi saptandı.

CS-A ile inkübe edilen hücrelerin sentezlediği ve 6. fraksiyonda çıkan 127.89 ± 45.81 µg proteinin 50 µg lık kısmı %8.12 ± 3.86 oranında AA inhibisyonuna neden oldu. Halbuki CS-A etkisi ile sentezlenen ve 7. fraksiyonda çıkan 548.91 ± 87.03 µg proteinin antifosfolipaz A₂ aktivitesine sahip olmadığı ve dolayısıyla bu fraksiyonun önemli bir AA inhibisyonu yapmadığı gözlemlendi (Şekil 14). 11. fraksiyonda çıkan ve antifosfolipaz A₂ aktivitesine sahip olan proteinin miktarı CS-A'dan etkilenmedi.

Dexamethasone ile stimülasyona cevaben sentezlenen proteinlerden sadece 11. fraksiyondaki 260.37 ± 46.35 µg proteinin çok önemli antifosfolipaz A₂ aktivitesine sahip olduğu tesbit edildi. Molekül ağırlığı 37.500-42.500 arasında olan bu proteinin 40.000 olan lipocortine uyduğu kanısına ulaşıldı (Şekil 15).

CS-A ve dexamethasone'un birlikte uygulanması hem 6. ve 7., hem de 11 ve 12. fraksiyonlarda protein artışına neden oldu, fakat sadece 6. (p<0.05) ve 11. (p<0.001) fraksiyonlardaki proteinlerin antifosfolipaz A₂ aktivitesine sahip olduğu saptandı (Şekil 16).

Böylece total lipocortin benzeri aktivite dikkate alınarak incelendiğinde (tablo 5) kontrol grubunda sadece 11. fraksiyonda toplam %14.34 ± 5.87'lik AA inhibisyonu yapabilen antifosfolipaz A₂ aktivitesi varken CS-A uygulanan hücrelerde 6 ve 11. fraksiyonlarda olmak üzere toplam %20.76 ± 9.65 ve %10.80 ± 9.32 inhibitör aktivite olduğu dikkati çekti.

Dexamethason tedavisinde sadece lipocortinin bulunduğu fraksiyonda güçlü AA inhibisyonuna, CS-A + Dexamethason grubuna

Tablo 4) Sephadex G50-80 kolonu ile elde edilen fraksiyonlardaki protein miktarları;

Fr. No:	KONTROL (μ g)	C5-A (μ g)	DEX (μ g)	C5-A+DEX (μ g)
1	2.025 \pm 0.84	7.68 \pm 11.82	7.68 \pm 5.52	7.29 \pm 4.95
2	2.83 \pm 0.96	8.91 \pm 9.51	6.48 \pm 6.93	6.06 \pm 5.13
3	7.68 \pm 3.54	5.67 \pm 7.17	9.30 \pm 6.60	6.87 \pm 5.04
4	2.43 \pm 3.39	6.30 \pm 7.32	5.82 \pm 5.76	5.67 \pm 5.10
5	19.44 \pm 6.54	29.37 \pm 9.87	11.76 \pm 8.43	11.34 \pm 7.32
6	5.67 \pm 2.82	127.89 \pm 45.81	4.86 \pm 2.64	102.96 \pm 10.59
7	26.73 \pm 8.58	548.91 \pm 87.03	69.90 \pm 35.13	499.86 \pm 68.91
8	765.81 \pm 124.32	729.33 \pm 117.24	1097.43 \pm 112.77	1110.81 \pm 73.50
9	484.86 \pm 100.50	544.44 \pm 120.60	873.66 \pm 146.08	769.44 \pm 71.94
10	385.53 \pm 63.0	383.49 \pm 44.73	552.81 \pm 80.58	516.06 \pm 98.73
11	38.07 \pm 9.18	45.78 \pm 12.51	260.37 \pm 46.35	237.30 \pm 36.03
12	17.01 \pm 7.35	17.82 \pm 15.75	44.16 \pm 23.37	40.53 \pm 12.96
13	6.06 \pm 4.77	8.10 \pm 9.93	10.11 \pm 9.00	8.49 \pm 6.72
14	10.92 \pm 9.54	6.87 \pm 5.40	20.64 \pm 13.50	17.34 \pm 3.06
15	32.40 \pm 10.29	21.87 \pm 18.87	14.16 \pm 11.34	21.87 \pm 18.72
16	6.87 \pm 9.75	5.67 \pm 5.79	45.78 \pm 25.62	42.93 \pm 23.88
17	9.12 \pm 5.76	21.66 \pm 12.78	59.43 \pm 60.51	51.06 \pm 14.43
18	105.39 \pm 35.19	77.04 \pm 48.75	159.30 \pm 63.36	149.07 \pm 28.83
19	70.92 \pm 20.67	61.20 \pm 21.15	139.02 \pm 71.82	120.39 \pm 42.84
20	143.91 \pm 26.13	132.96 \pm 36.75	175.11 \pm 48.03	165.54 \pm 56.52
21	37.68 \pm 9.54	84.72 \pm 17.97	69.69 \pm 25.68	68.88 \pm 13.23
22	10.92 \pm 8.52	11.73 \pm 10.86	26.25 \pm 13.62	27.15 \pm 13.77
23	38.88 \pm 13.26	25.92 \pm 22.14	18.90 \pm 9.48	18.63 \pm 9.18
24	10.53 \pm 4.74	4.44 \pm 6.72	20.97 \pm 10.68	19.02 \pm 16.53
25	3.63 \pm 4.02	3.24 \pm 3.72	10.53 \pm 3.39	8.10 \pm 4.55

Tablo 5) Anti-FLA₂ aktivite saptanan fraksiyonlardaki proteinlerin molekül ağırlıkları ve inhibitör etkileri (% İnhibisyon)

GRUPLAR	6. Fraksiyon			11. Fraksiyon		
	Molekül ağır. (D)	Total İnhibitör Aktivite (%)	50µg Proteinin İnhibitör Akt. (%)	Molekül ağır. (D)	Total İnhibitör Aktivite (%)	50µg proteinin İnhibitör Akt. (%)
KONTROL (n=10)	-	-	-	37.500-42.500	14.34 ± 5.87	1.86 ± 2.94
CS-A (n=10)	62.500-67.500	*** 20.76 ± 9.65	*** 8.12 ± 3.86	"	N.S 10.80 ± 9.32	N.S 2.63 ± 4.33
DEX (n=10)	-	-	-	"	*** 212.88 ± 43.68	*** 46.74 ± 8.40
CS-A+DEX. (n=10)	62.500-67.500	*** 17.44 ± 13.80	*** 6.56 ± 5.21	"	*** 209.77 ± 35.38	*** 44.20 ± 7.45

*** p<0.001

ait 6. fraksiyonun inhibitör aktivitesi eklenmişse de, bu kombinasyonun antiinflamatuvar etkiyi potansiyalize etmediği görüldü.

4) Anti-FLA₂ Aktivitesine sahip proteinlerin (Lipocortin) T Lenfosit proliferasyonuna etkisi:

Aktivite gözlenen 6ve 11. fraksiyonlardaki proteinlerin T lenfositlerin aktivasyonunun ölçütü olarak alınan, proliferasyonlarına etkisi araştırıldığında 72. saatte kontrole göre farklılık saptanmadı (Tablo 6) ve her gruba ait fraksiyon 11 ve 6'nın proliferatif etkileri benzer bulundu. (Tablo 7)

Tablo 6) Anti-FLA₂ aktivitesi olan fraksiyonların T lenfosit proliferasyonuna etkisi:

Ortama ilave edilen PHA (1 µg/ml)	Ortama ilave edilen 11. fraksiyon	Ortama ilave edilen 6. fraksiyon	% Proliferasyon
-	-	-	11.47 ± 8.33 n=24
+	-	-	25.76 ± 3.32 n=20
+	+	-	26.12 ± 5.22 n=10
+	-	+	24.92 ± 3.60 n=10

Tablo 7) Anti-FLA₂ aktivitesi olan fraksiyonların T lenfosit proliferasyonuna etkisinin karşılaştırılması:

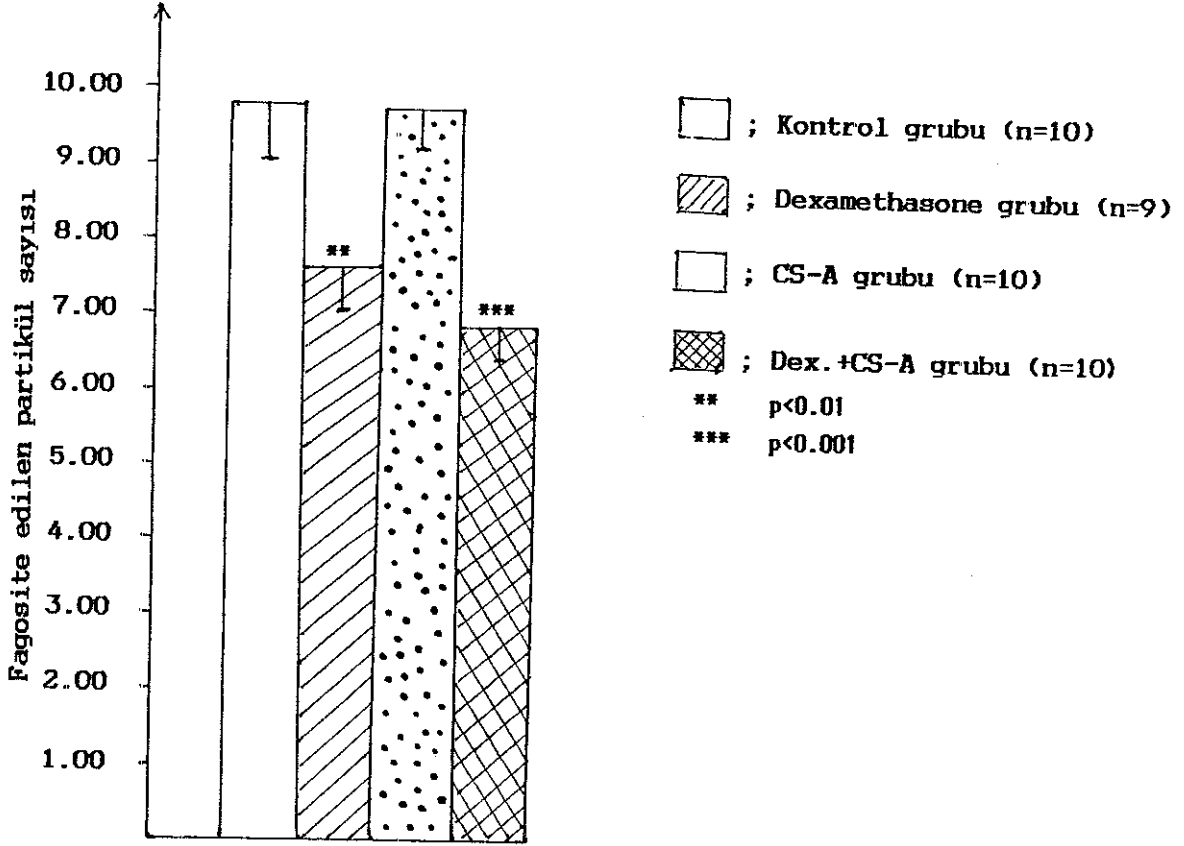
Gruplar	Fraksiyon 6 (% proliferasyon)	Fraksiyon 11 (% proliferasyon)
Kontrol	--	26.12 ± 5.22
Dexam.	--	25.30 ± 3.10
CS-A	24.72 ± 3.58	24.92 ± 3.60
Dexam.+CS-A	22.81 ± 4.32	25.12 ± 4.72

5) Anti FLA aktiviteye sahip proteinlerin makrofaj fagositik aktivitesine etkisi:

Anti-FLA₂ aktivitesi olduğu saptanan ve lipocortin olduğu düşünülen 11. fraksiyondaki molekül ağırlığı 37.500 - 42.500 arası proteinlerin makrofaj fagositik aktivitesine etkisi incelendiğinde CS-A grubunun dışındaki tüm gruplarda inhibisyon olduğu görüldü.

Dexamethasonun oluşturduğu lipocortin (fraksiyon 11)'in makrofaj fagositik aktivitesini anlamlı inhibe ettiği halde CS-A grubundan elde edilen fraksiyon 11.'deki proteinin fagositoza etkisi kontrolden farklı bulunmadı. (Şekil 17) Diğer yan

dan Dexamethason + CS-A'nın birlikte uygulandığı gruptan elde edilen fraksiyon 11'in fagositozu baskılayıcı gücü Dexamethasonunkine eşdeğer idi.



Şekil 17) Anti-FLA₂ aktivitesi saptanan 11. fraksiyonun makrofaj fagositik aktivitesine etkisi.

T A R T I Ő M A

Lipocortinin immünosupresyondaki rolünü saptamak amacıyla yapılan ve sıçanlardan elde edilen peritoneal hücreler üzerinde gerçekleştirilen bu araştırmada, dexamethasone ve CS-A'nın tek başına veya birlikte kullanımında AA miktarının belirgin şekilde azaldığı tesbit edilmiştir.

Dexamethasone'un, AA miktarını lipocortin aracılığı ile inhibe ettiği çok detaylı çalışmalarla gösterilmiştir(9, 21,27,31,33). Ancak CS-A'nın AA oluşumuna etkisi ile ilgili çalışmalardan elde edilen bulgular çelişkili olup (16,28,35, 86,97,99,106), mekanizması hakkındaki bilgiler yeterli değildir. Bu konuda çalışan araştırıcıların bir kısmı CS-A'nın AA yapımını azalttığını(28,85,97), bir kısmı arttırdığını (96) ileri sürerken, etkisiz olduğunu savunanlar da vardır (16,35, 86,106).

Steroid yapılı hormonlardan glukokortikoidlerin sentetik şekli olan dexamethasone, hedef hücrenin membranını geçtikten sonra sitozoldeki özel reseptöre bağlanarak etki göstermektedir. Sitozoldeki reseptör-hormon kompleksi, kromatin üzerinde bulunan akseptöre tutunarak yeni protein sentezi için mRNA oluşumuna neden olmaktadır (51,52,103). Bu klasik bilgilerin, çalışmamızda saptanan, dexamethasone ile inkübe edilen hücrelerde sentezlenen proteinlerin miktarındaki anlamlı artış ile uyum içinde olduğu gözlenmiştir.

Glukokortikoidlerin antiinflamatuvar etkisinden sorumlu olan lipocortin de bir glikoproteindir. Dexamethasone'a cevap olarak hücrelerde miktarı artmaktadır (12,21,22,27,31-33). Lipocortin sentezi mRNA veya protein inhibitörleri ile bloke edildiği zaman glukokortikoidlerin inflamatuvar hastalıkların tedavisinde etkisiz kalması, lipocortinin bu hasta-

lıklardaki önemini vurgulamaktadır (41,42). Çalışmamızda dexamethasone etkisi ile miktarı 6.85 misli artan ve 11. fraksiyonda çıkan proteinin AA inhibe edici güce sahip oluşu, molekül ağırlığınının 37.500-42.500 arasında bulunuşu, bunun lipocortin olduğunun kanıtıdır.

Lipocortinler hakkındaki çalışmalar, molekül ağırlığı 15.000, 30.000 ve 40.000 olmak üzere birden fazla türünün bulunduğunu ortaya çıkarmıştır (41,42,46,83). Bu bilgiler dikkate alındığında, dexamethasone ile muamele edilen hücrelerde sadece 40.000 molekül ağırlıklı protein içeren fraksiyonda anti-FLA₂ aktivitesi elde etmemiz, 15.000 ve 30.000 molekül ağırlıklı lipocortinlere rastlayamayışımız yadsınabilir. Ancak bu bir deney veya izolasyon hatası olmayıp, deneylerimizde proteaz inhibitörleri kullanılması ve FCS'un ısıtılarak ilave edilmesine bağlıdır. Çeşitli araştırmacıların peritoneal hücrelerden salgılanan lipocortinin proteazların etkisi ile 15.000 ile 30.000 molekül ağırlıklı parçalara ayrıldığını bildiren çalışmaları (60,89), bizim sadece 11. fraksiyonda lipocortin aktivitesini elde edişimizi çok iyi açıklamaktadır.

CS-A ile inkübe edilen hücrelerde dexamethasone grubunda olduğu gibi hem AA miktarında azalış, hem de protein miktarında artış ortaya çıkmıştır. Ancak CS-A, lipocortin olarak kabul ettiğimiz ve 11. fraksiyonda çıkan protein miktar ve aktivitesinde herhangi bir değişmeye neden olmamıştır. Dexamethasone daha çok 8-12. fraksiyonlardaki daha küçük molekül ağırlıklı proteinlerin sentezinin artışına yol açtığı halde CS-A, 6 ve 7. fraksiyonlarda çıkan daha büyük molekül ağırlıklı proteinlerde artışa neden olmuştur.

AA inhibisyonu üzerinden ölçülen anti-FLA₂ aktivitesi dikkate alındığında, CS-A'nın AA azaltıcı etkisinin lipocortin üzerinden olmayıp, sephadex G 50-80 kolonunun 6.

fraksiyonunda çıkan ve molekül ağırlığı 62.500-67.500 arası bir protein veya proteinler aracılığı ile olabileceği kanısına varılmıştır.

C5-A etkisiyle sentezlenen bu protein veya proteinlere kontrol hücrelerde ve dexamethasone ile sitümüle hücrelerde rastlanmadığı gibi, bunların anti-FLA₂ gücü de dexamethasone'a cevaben salgılanan ve fraksiyon 11 de çıkan lipocortinden oldukça zayıftır. Kontrol grubuna ait fraksiyon 11 deki 50 µg proteinin AA inhibe edici gücü %1.86±2.94 iken, dexamethasone grubuna ait aynı fraksiyondaki 50 µg proteinin AA oluşumunda %46.74 ± 8.40 oranında inhibisyon yapıcı güce sahip olduğu dikkati çekmiştir. Bir başka ifade ile dexamethasone, lipocortinin hem miktarında, hem de biyolojik gücünde artışa neden olmuştur. C5-A'ya cevaben oluşan 6. fraksiyondaki proteinlerin anti-FLA₂ aktivitesi var ise de, lipocortinin ki ile karşılaştırıldığında oldukça az olduğu dikkati çekmiştir. 6. fraksiyondaki 50 µg proteinin %8.12 ± 3.86 lık bir AA inhibisyonu yaptırıcı güce sahip oluşu bunun güzel bir göstergesidir.

C5-A etkisi ile sentezlenen fraksiyon 7 deki proteinin ise AA azaltıcı etkisi hiç bulunmadığından özellikleri bu araştırmaya konu edilmemiştir.

Lipocortin aktivitesine sahip 11. fraksiyondaki proteinlerin PHA ile stimüle edilmiş T hücrelerinin proliferasyonuna etki etmeyişi Goodwin ve ark.(51)'in PHA ile sitümülasyonla artan LTB₄'ün T hücrelerinde IL-2 yapımından sorumlu olduğunu ve ortama dexamethasone ilavesi ile IL-2 yapımının azaldığını gösteren çalışmalarının sonuçları ile uyumlu bulunmamıştır. Ancak bu konu ile ilgili bulgular oldukça karışıktır. Glukokortikoidlerin etkisi ile nötrofillerde yapılan lipomodulin (lipocortin) timositlerin

mitojenlere proliferatif cevabının düzenleyicisi olduğunu ileri süren Hirata ve Iwata (59) lipomodulinin bu etkisinde olgunlaşmamış supressor T hücrelerini hedef aldığını ve yardımcı T hücrelerinin fonksiyonlarını ise fazla etkilemediğini bildirmişlerdir. Lipomodulin antikörlerinin mevcut olduğu SLE ve Rheumatoid arthritis gibi otoimmün hastalıkların glukokortikoid tedavisinden yararlanması da lipomoduline karşı antikör yapımını baskılayan supressor T hücrelerinde bir bozukluğu düşünen Hirata ve Iwata'yı teyid etmektedir (59).

Glukokortikoidlerin lenfopeni yapıcı etkisi klasikleşmiş bir bilgi olmasına karşın mekanizması açık değildir. Goodwin ve ark. bunu LTB_4 azalışı üzerinden açıklarken, Minakuchi ve ark. (78) ile Brunda ve ark. (17) bir başka AA ürünü olan PGE_2 'nin tam aksi etkiye sahip olduğunu ileri sürmeleri bu karmaşaya en güzel örnektir.

Hirata ve Iwata lipomodulinin sadece supressor T hücrelerinde immünomodülatör olduğunu bildiren bulguları dikkate alındığında, bizim lipocortin ile ön inkübasyondan sonra T hücrelerinin proliferasyonlarını değişmemiş bulmamız kullandığımız hücrelerin çoğunluğunu yardımcı T hücrelerinin oluşturmasından ileri gelebilir. Lenf nodlarından izole edilen hücrelere ön inkübasyon için ilave edilen 50 μ g lipocortin aktiviteli proteinin miktar bakımından yetersiz kalması da bu uyumsuzluğun bir başka açıklaması olabilir.

Fraksiyon 6 ve 11 deki proteinlerin T hücrelerinde proliferasyon yaptırıcı güce sahip olmayışı, hem GS-A, hem de dexamethasone'un spesifik immünosupressif etkisinden lipocortinin sorumlu olmayıp, sadece nonspesifik immün sistemdeki antiinflamatuvar etkiden sorumlu olabileceğini düşündürmüştür. Sonuçlarımız ayrıca fraksiyon 6 daki proteinin sadece GS-A'ya özgü bir protein olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Çalışmamızda saptanan ilginç bir gözlem ise dexamethasone etkisi ile elde edilen lipocortinin literatürde de belirtildiği şekilde (31) fagositik aktiviteyi azaltmasına karşın GS-A'nın uygulandığı hücrelerden elde edilen lipocortinin fagositik gücü etkilememiştir. Bunun nedeni dexamethasone'a cevap olarak salgılanan lipocortinin miktar olarak artışı yanında anti-FLA aktivitesinin de artmış olması olabilir. Çünkü ortama ilave edilen dexamethasone grubuna ait 50 µg lipocortinin biyolojik aktivitesi, kontrol grubundan ve GS-A grubundan elde edilen aktiviteden 25,12 misli daha fazla bulunmuştur.

GS-A'nın dexamethasone ile birlikte kullanılması 6. fraksiyonda çıkan proteinin miktarını değiştirmedeği gibi dexamethasone'un antiinflamatuvar etkisinde, yani AA inhibe edici gücünde de bu birlikteliğin olumlu bir katkısı gözlenmemiştir.

Sonuç olarak ,immünosupresyonda lipocortinin rolünün incelendiği bu çalışmamızın bulguları glukokortikoidleri lenfositler aracılığı ile gelişen immün cevapları baskılayıcı etkisinde,peritoneal makrofajlardan salgılanan lipocortinin rolü olamayacağını düşündürmüştür. Lipocortinin sadece nonspesifik immün yanıtın baskılanmasında antiinflamatuvar etki göstererek makrofaj fagositik aktivitesini inhibe ederek rol oynadığı kanısına ulaşılmıştır.

Ayrıca araştırmamızdan elde edilen bulgular GS-A'ya bağımlı molekül ağırlığı 60.000 den büyük olan bir proteinin peritoneal hücrelerden sentezlendiğini, spesifik immün sisteme etkili olmadığını, ancak antiinflamatuvar etkiden sorumlu olabileceğini göstermiştir. Benzeri bir çalışmaya rastlanmadığı için bu bulgunun yorumunda literatür desteği sağlanamayışı, fraksiyon 6 da çıkan protein hakkında yorum yapmayı zorlaştırmakta ise de, çalışmalarımız bu proteinin,

CS-A'nın yan etkilerinden sorumlu olup olmadığı sorusunun yanıtını bulma yönünde derinleştirilmektedir.

Böylece bu invitro çalışmadan elde edilen bulgular bize, lipocortinin hem dexamethasone, hem de CS-A'nın T hücrelerinin yanıtı üzerinden spesifik immün cevaplarda doğrudan etkili olmayıp, daha çok etkisini endojen antiinflamatuvar bir ajan olarak yaptığını düşündürmüştür.

Ö Z E T

Lipocortinin immünosupresyondaki yerini saptamak amacı ile tertiplenen bu invitro çalışmada ağırlıkları 130-170 g arasında olan erkek albino sıçanlardan elde edilen peritoneal hücreler kullanıldı.

RPMI 1640 medyum içinde seyreltilmiş 10×10^6 hücre ihtiva eden tüpler %95 O₂ ve %5 CO₂ karışımı altında 37°C'lik çalkalayıcı su banyosunda 16 saat süre ile inkübe edildiler. Kontrol grubunu oluşturan tüplere sadece medyum ilave edilirken, diğer tüplere sıra ile 10^{-6} M Dexamethason, 10 µg/ml GS-A ve her ikisi birlikte ilave edilerek oluşan AA miktarları ölçüldü.

16 saatlik inkübasyondan sonra santrifügasyonla elde edilen süpernatantlardaki AA miktarı kontrol tüplerde 21.34 ± 3.48 pg/ml, Dexamethason grubunda 12.79 ± 6.41 pg/ml, GS-A ve her iki ilacın birlikte kullanıldığı tüplerde ise sıra ile 17.68 ± 2.38 pg ve 14.04 ± 4.01 pg/ml olarak saptandı. Immünosupressif ajanların ilavesi ile AA miktarlarında gözlenen değişiklikler çok önemli idi.

Inkübasyon periodu sonunda kontrol hücrelerin sentezlediği toplam protein miktarı 1178.81 ± 190.45 µg/ml iken Dexamethason ve GS-A ile inkübe edilen hücrelerde sırası ile 1658.92 ± 234.64 ve 1385.05 ± 202.60 µg/ml olarak bulundu. Her iki immünosupressif ilacın birlikte kullanıldığı tüplerde ise 1751.58 ± 296.87 µg/ml protein mevcuttu. Protein miktarlarında kontrol grubuna göre saptanan artışlar istatis-

tiksel çok anlamlı idi.

İmmüno-supressif ajanlarla inkübe edilen 2×10^6 hücrenin süpernatantının sephadex G 50-80 kolonundan geçirilmesi ile elde edilen 10 dakikalık fraksiyonlardaki proteinlerin miktarı, molekül ağırlıkları ve antifosfolipaz A_2 aktivitesi incelendi.

Dexamethasonun etkisi ile 8-12. fraksiyonlarda çıkan ve molekül ağırlıkları 32.500 ile 47.500 arasında değişen proteinlerde artış olduğu halde C5-A, molekül ağırlıkları 52.500 ile 67.500 arasında olan ve 6 ile 7. fraksiyonlarda çıkan proteinlerde artışa neden oldu. Bu fraksiyonlardan sadece C5-A'nın neden olduğu 6. fraksiyondaki ve Dexamethasonun neden olduğu 11. fraksiyonda çıkan proteinlerin AA'yi inhibe edici aktivitesi mevcuttu.

Fraksiyon 6 ve 11'de çıkan antifosfolipaz A_2 aktiviteli proteinlerin her ikisinde T hücre proliferasyonunu etkilemediği gibi makrofajların fagositik aktivitesini de sadece Dexamethasonun etkisi ile oluşan ve 11. fraksiyondan çıkan lipocortinin azalttığı gözlemlendi.

Sonuç olarak Dexamethasona bağlı olarak peritoneal hücrelerde sentezlenen lipocortin aktiviteli proteinin T hücrelerinin proliferasyonunu etkilemediği, fakat fagositik aktiviteyi anlamlı şekilde azalttığı, C5-A ile oluşan 62.500-67.500 molekül ağırlığı arasındaki proteinin lipocortin aktivitesine sahip olmakla birlikte T hücresi ve makrofaj fagositik aktivitesine etkisiz olduğu, dolayısıyla lipocortinin spesifik immün sistemde doğrudan etkili olmadığı halde, antiinflamatuvar etki ile nonspesifik immün sistemde rol oynadığı ortaya çıktı. Bu iki immüno-supresif ajanın birlikte kullanılmasının ne lipocortin miktarında, ne de aktivitesinde önemli katkısı gözlenmedi.

SUMMARY

The purpose of this study was to investigate the effect of the immunosuppressive agents on the in vitro rat peritoneal cells responses. In this study, the albino rats weighing 130-170 g were used in this study.

Peritoneal cells were incubated at 37°C under 5% CO₂ and 95% O₂ for 16 hrs in RPMI-1640 medium containing immunosuppressive agents such as glucocorticoids and cyclosporin-A which are the most frequently used for the suppressing the immune system.

The synthesis of the amount of protein as well as their molecular weights and anti-phospholipase A₂ activities and arachidonic acid content of incubated cells as a response to 10⁻⁶ M Dexamethasone, 10 µg/ml Cyclosporin-A and combination of these two drugs were measured at the end of the incubation period.

The mean protein level in the cells incubated with 10⁻⁶ µg/ml of CS-A roused significantly from the control value of 1178.81 ± 190.45 µg/ml to 1658.92 ± 234.64 and 1385.05 ± 202.60 µg/ml respectively. The combination of these two drugs also caused an increase in the mean levels of synthesized proteins (1751.58 ± 296.87 µg/ml, p < 0.01).

The mean arachidonic acid released from the cells incubated in the control conditions was 21.34 ± 3.48 pg/ml. Incubation with dexamethasone and CS-A + dexamethasone caused

a significant decreased in AA production. The mean level was 12.79 ± 6.41 and 14.04 ± 4.01 pg/ml respectively. Where as GS-A alone produced a mild inhibition of AA levels during this period.

The supernatants of the incubated cells were loaded on the column of sephadex G 50-80 and the eluent of ten minutes were collected and subjected for the analyses of their anti-phospholipase A₂ by HPLC as well as their molecular weights.

Dexamethasone stimulated the synthesis of the proteins which are fractioned between 8 to 12 where as GS-A caused an increase in the levels of proteins with the higher molecular weights.

The anti-phospholipase A₂ activities were detected only in the fraction of 11 of Dexamethasone group and fraction 6 of the GS-A treated cells. Both fractiones which have lipocortin activity showed no effect on the proliferation of T cells, only protein from fraction 11 had an inhibitory effect on phagocytic activities of macrophages.

KAYNAKLAR

- 1- Aarsman A.J., H. Mynbeek, H. van den Bosch, B. Rothhut, B. Prieur, G. Comera, L. Jordan, F. Russo-Marie: Lipocortin inhibition of extracellular and intracellular phospholipases A₂ is substrate concentration dependent. FEBS Lett. 219(1): 176-180, 1987.
- 2- Aderem A.A., A. Rosen, K.A. Barker: Modulation of prostaglandin and leukotriene biosynthesis. Cur. Opin. Immunol. 1:56-62, 1988.
- 3- Ahn N.G., D.C. Teller, M.J. Bienkowski, McMullen, E.W. Lipkin, G. de Haen: Sedimentation equilibrium analysis of five lipocortin-related phospholipase A₂ inhibitors from human placenta. J. Biol. Chem. 263(35):18667-18663, 1988.
- 4- Ando Y., S. Imamura, Y.M. Hong, M.K. Owada, T. Kakunaga, R. Kannagi: Enhancement of calcium sensitivity of lipocortin I in phospholipid binding induced by limited proteolysis and phosphorylation at the amino terminus as analysed by phospholipid affinity column chromatography. J. Biol. Chem. 264(12): 6948-6955, 1989.
- 5- Ann M., K. Markwell, S.M. Haas: Protein determination by Lowry method. Methods in Enzymology 72:296-303, 1981.
- 6- Antonicelli F., B. Rothhut, L. Martiny, G. Agvie-Agvie, B. Lambert, G. Bellon, F. Russo-Marie, G. Jacquemin, B. Haye: Purification

- and characterization of phospholipase A_2 inhibitory proteins from pig thyroid gland. FEBS Lett. 235(1,2): 252-256, 1988.
- 7- Authi K.S., A.Solanky, J.R.Traynor: Inhibition of an inflammatory exudate phospholipase A_2 by an endogenous inhibitor of polymorphonuclear leucocytes. Pharmac. Res. Commun. 14(5): 401-407, 1982.
- 8- Ballou L.R., W.Y.Cheung: Human platelet phospholipase A_2 , an enigma. Adv. Inflamm. Res. Vol:10, Ed by: F.Russo-Marie et al. Raven Press, New York: 37-49, 1985.
- 9- Becker J.L., R.J.Grasso, J.S.Davis: Dexamethasone action inhibits the release of arachidonic acid from phosphatidylcholine during the suppression of yeast phagocytosis in macrophage cultures. Biochem. Biophys. Res. Commun. 153(2): 583-590, 1988.
- 10- Benson A., H.K.Ziegler: Macrophages as targets for inhibition by cyclosporine. Transplantation. 47(4): 696-703, 1989.
- 11- Bijsterbosch M.K., G.G.B.Klaus: Cyclosporine does not inhibit mitogen-induced inositol phospholipid degradation in mouse lymphocytes. Immunology, 56: 435-440, 1985.
- 12- Blackwell G.J., R.Garnuccio, M.Di Rosa, R.J.Flower, G.S.J. Langham, L.Parente, P.Persico, N.C.Russel-Smith, D.Stone: Glucocorticoids induce the formation and release of anti-inflammatory and anti-phospholipase proteins into the peritoneal cavity of the rat. Br. J. Pharmacol. 76: 185-194, 1982.
- 13- Blackwell G.J., R.J.Flower, F.P.Nijkamp, J.R.Vane: Phospholipase A_2 activity of guinea-pig isolated perfused: stimulation and inhibition by anti-inflammatory steroids. Br. J. Pharmac. 62: 79-89, 1978.
- 14- Blackwood R.A., J.D.Ernst: Characterization of Ca^{2+} dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane

- fusion by annexins. *Biochem. J.* 266(1):195-200, 1990.
- 15-Bloemena E., M.H.J. van Oers, S.Weinreich, S.L.Yong, P.T.A. Schellekens: Prednisolone and Cyclosporine-A exert differential inhibitory effects on T cell proliferation in vitro. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 48:380-391, 1988.
- 16-Brown Z., G.H.Neild, G.P.Lewis: Inhibition of prostacyclin formation by cyclosporin is not due to reduced availability of arachidonic acid in membrane phospholipids of cultured human endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* 39(6): 1136-1138, 1990.
- 17-Brunda M.J., R.B.Herberman, H.T.Holden: Inhibition of murine natural killer cell activity by prostaglandins. *J. Immunol.* 124(6): 2682-2687, 1980.
- 18-Burns A.L., K.Magendzo, A.Shirvan, M.Srivastava, E.Rojas, M.R.Alijani, H.B.Pollard: Calcium channel activity of purified human synexin and structure of the human synexin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3798-3802, 1989.
- 19-Galignano A., R.Carnuccio, M.DiRosa, A.Ialenti, S.Moncada: The anti-inflammatory effect of glucocorticoid-induced phospholipase inhibitory proteins. *Agents and Actions.* 16(1/2): 60-62, 1985.
- 20-Ganafax A., G.A.Draxler: Monoclonal antilymphocyte antibody (OKT 3) treatment of acute renal allograft rejection. *Pharmacotherapy*, 4(4): 121-124, 1987.
- 21-Carnuccio R., M.DiRosa, R.J.Flower, A.Pinto: The inhibition by hydrocortisone of prostaglandin biosynthesis in rat peritoneal leucocytes is correlated with intracellular macrocortin levels. *Br. J. Pharmac.* 74: 322-324, 1981.
- 22-Carnuccio R., M.DiRosa, P.Persico: Hydrocortisone-induced inhibitor of prostaglandin biosynthesis in rat leucocyte *Br. J. Pharmac.* 68: 14-16, 1980.

- 23-Churchill P.G., N.F.Rossi, M.G.Churchill, A.K.Bidani, F.D. McDonald: Acute cyclosporine-induced renal vasoconstriction: Lack of effect of theophylline. *Am. J. Physiol.* 258(Renal Fluid Electrolyte Physiol.27): F41-F45, 1990.
- 24-Cockrell C.S., E.F.Ellis: Simple single-step high-performance liquid chromatographic method for the separation of cyclooxygenase and lipoxygenase enzyme metabolites of arachidonic acid. *J. Chromatog.* 308: 316-321, 1984.
- 25-Colin G.: Organ Transplantation. A review. The Medicine Publishing Foundation, Oxford, 3-66, 1983.
- 26-Conricode K.M., R.S.Ochs: Mechanism for the inhibitory and stimulatory actions of proteins on the activity of phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta.* 1003(1): 36-43, 1989.
- 27-Cloix J.F., O.Colard, B.Rothhut, F.Russo-Marie: Characterization and partial purification of "renocortins": two polypeptides formed in renal cells causing the anti-phospholipase-like action of glucocorticoids. *Br. J. Pharmac.* 79: 313-321, 1983.
- 28-Colombani P.M., A.D.Hess: T-lymphocyte inhibition by cyclosporine. *Biochem. Pharmacol.* 36(22): 3789-3793, 1987.
- 29-Davidson F.F.E.A.Dennis, M.Powell, J.R.Glenney: Inhibition of phospholipase A by "Lipocortins" and calpactins. *J. Biol. Chem.* 262(4): 1698-1705, 1987.
- 30-Diez E., J.Balsinde, F.Mollinedo: Subcellular distribution of fatty acids, phospholipids and phospholipase A in human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta* 1047:83-89, 1990.
- 31-DiRosa M., A.Galignano, R.Carnuccio, A.Ialenti, L.Sautebin: Multiple control of inflammation by glucocorticoids. *Agents and Actions.* 17(3/4): 284-289, 1985.
- 32-DiRosa M., R.J.Flower, F.Hirata, L.Parente, F.RUSSO-Marie:

Anti-phospholipase proteins. Prostaglandins, 28(4):441-442, 1984.

- 33-DiRosa M.; Role in inflammation of glucocorticoid-induced phospholipase inhibitory proteins. Prog. Biochem. Pharmacol. 20: 55-62, 1985.
- 34-Dodge J.T., G.Mitchell, D.J.Hanahan: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Arch. Biochem.Biophys. 100:119-130, 1963.
- 35-Erman A., B.Chen-Gal, J.Rosenfeld: Cyclosporin treatment alters prostanoid and thromboxane production by rat isolated kidney mitochondria. J.Pharm. Pharmacol.42(3): 181-185, 1990.
- 36-Errasfa M., F.Russo-Marie:A purified lipocortin shares the anti-inflammatory effect of glucocorticosteroids in vivo in mice. Br. J.Pharmacol. 97(4): 1051-1058, 1989.
- 37-Etienne J., A.Grüber, J.Polonovski: Inhibitory factor of phospholipase A₂ in normal human serum.Biochem.Biophys. Res. Commun. 122(3): 1117-1124, 1984.
- 38-Fassbinder W., F.P.Brunner, H.Brynger, J.H.H.Ehrich, W. Geerlings, A.E.G.Raine, G.Rizzoni, N.H.Selwood, G. Tufveson, A.J.Wing: Combined report on regular dialysis and transplantation in europe, XX, 1989. Neph. Dial. Transplant. 6(Suppl. 1): 5-35, 1991.
- 39-Fejes-Toth A.N., B.Rosenkranz, J.G.Frölich, G.Fejes-Toth: Glucocorticoid effect on arachidonic acid metabolism in vivo. J. Steroid Biochem. 30(1-6): 155-159, 1988.
- 40-Flower R.J., Blackwell G.J.: Anti-inflammatuary steroids induce biosynthesis of a phospholipase A₂ inhibitory protein which prevents prostaglandin generation. Nature 278: 456-459, 1979
- 41-Flower R.J. :Lipocortin and the mechanism of action of the

- glucocorticoids. Br.J.Pharmacol. 94: 987-1015, 1988.
- 42-Flower R.J.: Macro cortin and the antiphospholipase protein
Adv. Inflamm. Res. 8: 1-34, 1984.
- 43-Flower R.J.: Macro cortin. Adv. Inflamm. Res. 10 : 363-366, 1984.
- 44-Flower R.J., J.N.Wood, L.Parente: Macro cortin and the
mechanism of action of the glucocorticoids. Adv. Inflamm.
Res. 7: 61-70, 1984
- 45-Flower R.J.: Lipocortin. Biochem. Soc. Trans. 17(2):276-278,
1989.
- 46-Flower R.J.: Lipocortins. Adv. Prost. Throm. Leukot. Res.
vol:17, ed by: B.Samuelsson, R.Paoletti and P.W.Ramwel
Raven Press, New York, pp: 577-580, 1987.
- 47-Foxwell B.M.J., G.Frazer, M.Winters, P.Hiestand, R.Wenger,
B.Ryffel: Identification of cyclophilin as the
erythrocyte cyclosporin-binding protein. Biochim. Biophys.
Acta. 938: 447-455, 1988.
- 48-Foxwell M.J., B.Ryffel: The mechanism of action of
cyclosporin. Transplant. Immun. 9(1): 79-93, 1989.
- 49-Fradin A., B.Rothhut, B.Poincelot-Canton, M.Erassfa, F.
Russo-Marie: Inhibition of eicosanoid and PAF formation
by dexamethasone in rat inflammatory polymorphonuclear
neutrophils may implicate lipocortin's. Biochim. Biophys.
Acta. 963: 248-257, 1988.
- 50-Gassama-Diagne A., J.Fauvel, H.Chap: Calcium-Independent
phospholipases from guinea pig digestive tract as
probes to study the mechanism of lipocortin. J. Biol.
Chem. 265(8): 4309-4314, 1990.
- 51-Goodwin J.S., D.Atluru, S.Sierakowski, E.A.Lianos: Mechanism
of action of glucocorticoids. J. Clin. Invest. 77:1244-
1250, 1986.
- 52-Grossman G.J.: Immunomodulation in Basic and Clinical
Endocrinology. Ed by: F.S.Greenspan. Third edition,

- Appleton&Lange: 40-53, 1991.
- 53-Guyton A.C.: Blood Cells, Immunity and Blood Clotting in Textbook of Medical Physiology. Sixth edition, Igaku Shoin/Saunders Int., Tokyo, pp: 74-82, 1986.
- 54-Hahn B.H., R.P.MacDermott, S.B.Jacobs, L.S.Pletscher, M.G. Beale: Immunosuppressive effects of low doses of glucocorticoids: Effects on autologous and allogeneic mixed leucocyte reactions. *J. Immunol.* 124(6): 2812-2817, 1980.
- 55-Harding M.W., R.E.Handschumacher: Cyclosporin and its receptor, cyclophilin. *Adv. Inflam. Res.* vol:12, ed by: A.Lewis et al., Raven Press, New York: 283-294, 1988.
- 56-Hattori Y., K.Kasai, T.Emoto, M.Hiraiwa, S.Shimoda: The inhibitory effect of cyclosporine on prostacyclin production by cultured endothelial cells from porcine aorta. *Transplant. Proc.* 21(3): 3461-3463, 1989.
- 57-Hirata F., R.Del Carmine, G.A.Nelson, J.Axelrod, E.Schiffmann A.Warabi, A.L.De Blas, M.Nirenberg, V.Manganiello, M. Vaughan, S.Kumagai, I.Green, J.L.Decker, A.D.Steinberg Presence of autoantibody for phospholipase inhibitory protein, lipomodulin, in patients with rheumatic disease *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78(5): 3190-3194, 1981.
- 58-Hirata F.: Biology of lipocortin and glucocorticoids in inflammatory disease. *Adv. Inflam. Res.* 10: 366-370, 1984.
- 59-Hirata F., M.Iwata: Role of lipomodulin, a phospholipase inhibitory protein in immunoregulation by thymocytes. *J. Immunol.* 130(4): 1930-1936, 1983.
- 60-Hirata F., Y.Notsu, M.Iwata, L.Parente, M.Di Rosa, R.J. Flower: Identification of several species of phospholipase inhibitory protein(s) by radioimmunoassay for lipomodulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109(1): 223-230, 1982.

- 61-Hirata F.: The regulation of lipomodulin, a phospholipase inhibitory protein, in rabbit neutrophils by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 256(15): 7730-7733, 1981.
- 62-Hullin F., P.Raynal, J.M.F.Ragab-Thomas, J.Fauvel, H.Chab: Effect of dexamethasone on prostaglandin synthesis and on lipocortin status in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 264(6): 3506-3513, 1989.
- 63-Ikebuchi N.W., D.M.Waisman: Calcium-dependent regulation of actin filament bundling by lipocortin-85. *J. Biol. Chem.* 265(6): 3392-3400, 1990.
- 64-Jorkasky D.K., G.A.Fisher, R.F.Stahl, V.P.Addonizio, J.D. Glickman: The effects of cyclosporine on human platelet aggregation and thromboxane release. *Transplant. Proc.* 21(1): 948-949, 1989.
- 65-Julius M.H., E.Simpson, L.A.Herzenberg: A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 3: 545, 1973.
- 66-Kahan B.D.: Cyclosporine. *N.Eng. J. Med.* 321(25): 1725-1738, 1989
- 67-Khanna N.G., M.Tokuda, D.M.Waisman: Purification of three forms of lipocortin from bovine lung. *Cell Calcium*, 8: 217-228, 1988.
- 68-Koltai M., Z.Kovacs, G.Nemecz, I.Mecs, L.Szekeres: Glucocorticoid-induced low molecular mass anti-inflammatory factors which do not inhibit phospholipase A₂. *Eur. J. Pharmac.* 134: 109-112, 1987.
- 69-Kragballe K.: Topical corticosteroids: Mechanism of action *Acta. Derm. Venereol (Stockh)*, 69 (Suppl. 151): 7-10, 1989.
- 70-Kroggel R., M.Goppelt-Strübe, M.Martin, K.Resch: The immunosuppressive activities of different cyclosporins are correlated to inhibition of the early membrane phospholipid metabolism in activated lymphocytes. *Immunobiol.* 175: 159-171, 1987.

- 71-Kumagai N., S.H. Benedict, G.B. Mills, E.W. Gelfand: Cyclosporin A inhibits initiation but not progression of human T cell proliferation triggered by phorbol esters and calcium ionophores. *J. Immunol.* 141(11): 3747-3752, 1988.
- 72-Lapetina E.G., M.F. Grouch: Relationship of inositol phospholipid metabolism to phospholipase A₂. *Adv. Prost. Thrombox. Leukot. Res.* vol:19, ed bys: B. Samuelsson, P.Y. K. Wong, F.F. Sun, Raven press, New York: 621-632, 1989.
- 73-Longenecker J.P., J.W. Rose, K. Giffin, D. Shepard, L.K. Johnson: Isolation of a human endogenous phospholipase A₂ inhibitory, antiinflammatory protein. *Adv. Prost. Thrombox. Leukot. Res.* vol:17, ed bys: B. Samuelsson, R. Paoletti, P.W. Ramwell, Raven press, New York, pp: 581-586, 1987.
- 74-Machoczek K., M. Fischer, H.D. Söling: Lipocortin I and lipocortin II inhibit phosphoinositide and polyphosphoinositide-specific phospholipase C. *FEBS Lett.* 251(1,2) 207-212, 1989.
- 75-Marki F. R. Franson: Endogenous suppression of neutral-active and calcium-dependent phospholipase A₂ in human polymorphonuclear leucocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 879: 146-156, 1986.
- 76-Marx M., M. Weber, F. Merkel, K.H. Meyer zum Büschenfelde, H. Köhler: Additive effects of calcium antagonists on cyclosporin A-induced inhibition of T cell proliferation. *Nephrol. Dial. Transplant.*: 1038-1044, 1990.
- 77-Mayes P.A.: Bioenergetics, the metabolism of carbohydrates, lipids in Harper's Biochemistry. Ed bys: R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell. Twenty second edition, Appleton & Lange: 218-226, 1990.
- 78-Minakuchi R., M.G. Wacholtz, L.D. Davis, P.E. Lipsky:

Delination of the mechanism of inhibition of human T cell activation by PGE₂. J. Immunol. 145(8): 2616-2625, 1990.

- 79-Miwa M., I.Kubota, T.Ichihaski, H.Motojima, M.Matsumoto: Studies on phospholipase A₂ inhibitor in blood plasma. I.Purification and characterization of phospholipase A₂ inhibitor in bovine plasma. J. Biochem. 96: 761-773, 1984.
- 80-Nakaguchi K., J.Nishijima, M.Ogava, T.Mori, H.Tojo, I.Yamano, M.Okamoto: Purification and some properties of membrane associated phospholipase A₂ of human spleen. Enzyme 35: 2-12, 1986.
- 81-Paetkau V., G.Havele, J.Shaw: Direct and indirect modes of action of cyclosporine on cytotoxic T lymphocytes. Ann. N. Y. Acad. Sci. 532: 405-412, 1988.
- 82-Parente L., M.DiRosa, R.J.Flower, P.Ghiara, R.Mell, P. Persico, J.A.Salmon, J.N.Wood: Relationship between the anti-phospholipase and anti-inflammatory effects of glucocorticoid-induced proteins. Eur. J. Pharmac. 99: 33-239, 1984.
- 83-Peers S.H., R.J.Flower: The role of lipocortin in corticosteroid actions. Am. Rev. Respir. Dis. 141(2 Pt 2): 518-521, 1990.
- 84-Peters-Golden M., J.Bathon, R.Flores, F.Hirata, D.Newcombe: Glucocorticoid inhibition of zymosan-induced arachidonic acid release by rat alveolar macrophages. Am. Rev. Respir. Dis. 130: 803-809, 1984.
- 85-Phair P.G., H.R.Powell, D.A.McCredie, R.G.Walker, A.J.F.D. Apice: Low red cell arachidonic acid in cyclosporine-treated patients. Clin. Nephrol. 32(2): 57-61, 1989.
- 86-Rosenthal R.A., N.A.Chukwuogo, V.H.Ocasio, K.U.Kahng: Cyclosporine inhibits endothelial cell prostacyclin

- production. *J. Surg. Res.* 46: 593-596, 1989.
- 87-Rothhut B., F.Russo-Marie: From renocortin to lipocortin. *Adv. Inflam. Res.* 10: 360-363, 1984.
- 88-Rothhut B., C.Comera, B.Prieur, M.Errasfa, G.Minassian, F.Russo-Marie: Purification and characterization of a 32-kDa phospholipase A inhibitory protein(lipocortin from human peripheral blood mononuclear cells. *FEBS Lett.* 219(1): 169-175, 1987.
- 89-Rothhut B., F.RUSO-Marie, J.Wood, M.DiRosa, R.J.Flower: Further characterization of the glucocorticoid-induced antiphospholipase protein"renocortin".*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117(3): 878-884, 1983.
- 90-Russo-Marie F., D.Duval: Dexamethasone-induced inhibition of prostaglandin production does not result from a direct action on phospholipase activities but is mediated through a steroid-inducible factor. *Biochim. Biophys. Acta.* 712: 177-185, 1982.
- 91-Russo-Marie F., M.Paing, D.Duval: Involvement of glucocorticoid receptors in steroid-induced inhibition of prostaglandin secretion. *J. Biol. Chem.* 254(17):8498-8504, 1979.
- 92-Sato E.F., M.Miyahara, K.Utsumi: Purification and characterization of a lipocortin-like 33 kDa protein from guinea pig neutrophils. *FEBS Lett.* 227(2): 131-135, 1988.
- 93-Schlaepfer D.D., H.T.Haigler: Characterization of Ca dependent phospholipid binding and phosphorylation of lipocortin I. *J. Biol. Chem.* 262(14): 6931-6937, 1987.
- 94-Seaman W.E.: Immunomodulation in Basic and Clinical Immunology. Ed bys: D.P.Stites, J.D.Stobo, J.V.Wells. Sixth edition, Appleton&Lange, Norwalk, Connecticut:

228-237, 1987.

- 95-Sorenson D.K., T.M.Kelly, D.K.Murray, D.H.Nelson: Corticosteroids stimulate an increase in phospholipase A₂ inhibitor in human serum. *J. Steroid. Biochem.* 29(2): 271-273, 1988.
- 96-Sraer J., M.Bens, R.Ardailou: Dual effects of cyclosporine a on arachidonate metabolism by peritoneal macrophages (Phospholipase activation and partial thromboxane synthase blockage). *Biochem. Pharmacol.* 38(12): 1947-1954, 1989.
- 97-Stahl R.A.K., S.Adler, P.J.Baker, R.J.Johnson, Y.P.Chen, P.Pritzl, W.G.Couser: Cyclosporin A inhibits prostaglandin E formation by rat mesangial cells in culture *Kidney Int.* 35: 1161-1167, 1989.
- 98-Szamel M., P.Berger, K.Resch: Inhibition of T lymphocyte activation by cyclosporin A: Interference with the early activation of plasma membrane phospholipid metabolism. *J. Immunol.* 136(1): 264-269, 1986.
- 99-Iait J.F., M.Sakata, B.A.McMullen, G.H.Miao, I.Funakoshi, L.E.Hendrickson, K.Fujikawa: Placental anticoagulant proteins: Isolation and comparative characterization of four members of the lipocortin family. *Biochemistry*, 27: 6268-6276, 1988.
- 100-Tenabe A., A.Dietmann-Molard, M.Kapps, G.Pauli: Mécanisme d'action et mode d'administration d'une corticothérapie inhalée a forte dose dans le traitement de l'asthme. *rev. Pneumol. Clin.* 44(6): 273-277, 1988.
- 101-Teramoto T., H.Tojo, T.Yamano, M.Okamoto: Purification and some properties of rat spleen phospholipase A₂. *J. Biochem.* 93: 1353-1360, 1983.
- 102-Vander A.J., J.H.Sherman, D.S.Luciano: Immunology: Defense Mechanism of the Body in Human Physiology.

- Fifth Edition, Mc.Graw Hill Pub.Comp.:654-686, 1990.
- 103-van Binsbergen J., A.J.Slotboom, A.J.Aarsman, G.H.de Haas
Synthetic peptide from lipocortin I has no phospho-
lipase A inhibitory activity. FEBS Lett. 247(2): 293-
297, 1989.
- 104-Vane J.R., R.M.Botting: The mode of action of anti-inflam-
matory drugs. Postgrad.Med.J.66(Suppl 4): 52-517, 1990.
- 105-von Wartburg A., R.Traber: Chemistry of the natural
cyclosporine metabolites. Prog. Allergy, 38: 28-45,
1986.
- 106-Voss B.L., K.K.Hamilton, E.N.Scott-Samara, P.A.McKee:
Cyclosporine supression of endothelial prostacyclin
generation. Transplantation, 45(4): 793-796, 1988.
- 107-Walker R.J., V.A.Lazzaro, G.G.Duggin, J.S.Horvath, D.J.
Iillier: Dietary eicosapentanoic acid does not modify
cyclosporin-induced inhibition of angiotensin-II
stimulated prostaglandin synthesis in mesangial cells
Ren. Fail. 11(2-3): 125-132, 1989.
- 108-Wasik M., B.Stepien-Sopniewska, Z.Lagodzinski, A.Gorski:
Effects of FK-506 and cyclosporine on human T and B
lymphoproliferative responses. Immunopharmacology, 20
57-61, 1990.
- 109-Wiedman T.S., T.Frouard, S.C.Shekar, M.polikandritou,
Y.Rahman: Interaction of cyclosporin-A with dipalmitoyl
choline. Biochim. Biophys. Acta. 1023: 12-18, 1990.
- 110-Wiesenber-Böttcher I., K.Wanner, W.Pignat: Anti-Inflam-
matory effects of cyclosporin-A(CsA) in carragheenan
induced pleurisy in rats. Agents and Actions.
29(1/2): 105-107, 1990.
- 111-Zor U., E.Her, J.Ialmon, S.Mashonov: A new mechanism of
hydrocortisone actions in allergy and inflammation.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 524: 456-458, 1988.

TESEKKÜR

Tezimin yazılması ve basılması sırasında yardımlarını
esirgemeyen Sağlık Bilimleri Enstitüsü elemanları, Sayın Halil
UGUR, Sayın Turhan TAT ve Sayın Aysun SAĞLAM'a sonsuz
teşekkürlerimi sunarım.

Vecihe Nimet IZGÖT
Antalya, 1991