

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

ASTIMLI ÇOCUKLARDA YOĞUNLAŞTIRILMIŞ NEFES HAVASINDA
OKSİDATİF STRES BELİRTEÇLERİ VE ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Dr. RAZİYE DUT

UZMANLIK TEZİ

ANKARA

2006

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

ASTIMLI ÇOCUKLARDA YOĞUNLAŞTIRILMIŞ NEFES HAVASINDA
OKSİDATİF STRES BELİRTEÇLERİ VE ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Dr. RAZİYE DUT

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. ÖMER KALAYCI

ANKARA

2006

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada beraber çalışma fırsatı bulduğum bilgisini, deneyimini, hayat tecrübesini bizlerden esirgemeyen, her ihtiyaç duyduğumda varlığını hep yanımda hissettiğim örnek bilim adamı ve klinisyen Ömer Kalaycı'ya; çalışmanın analizlerinin defalarca yapılıp kontrol edilmesi sırasında sürekli yanımda bulunan zamanını cömertçe harcayan doktor Cansın Saçkesene; istikrarlı, özverili, titiz çalışmalarıyla, saatlerce bu çalışmadaki örnekleri tekrar tekrar çalışan, moleküler biyoloji bilgisini ve dostluğunu bizimle paylaşan genç bilim kadını Esra Birben'e; samimiyeti ve çalışkanlığı ile yardımcı olmaya çalışan doktor Özge Soyer'e, nefeslerin toplanması ve yerleştirilmesinde yardımcı olan doktor Evrim Alyamaç'a, tatil gününü bizim için çalışmakla geçirmek zorunda kalan, laboratuvarı ve tecrübeleri ile katkıda bulunan Tanju Besler'e; çocuk allerji laboratuvarının sıcak ve yardımsever çalışanları Nihan Turgutoğlu, Asuman Çetin'e, bir yıl boyunca ilgilerini esirgemeyen çocuk allerji ve astım bölümünün değerleri hocaları Gönül Adalıoğlu, Ayfer Tuncer, Bülent Şekerel'e ve bölümün diğer tüm çalışanlarına çok teşekkür ederim.

ÖZET

Dut R.; Astımlı çocuklarda verilen nefes havasında oksidatif stres belirteçleri ve etki eden faktörler. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi. 2006

Oksidatif stres ve antioksidan mekanizmalar arasında oksidatif stres lehine oluşan dengesizliğin astım gelişimine katkıda bulunan mekanizmalardan biri olduğu öne sürülmektedir. Astımdaki sistemik oksidatif stres hakkında birçok çalışma olmakla beraber lokal oksidatif stres konusunda bilgiler çok sınırlıdır.

Bu çalışmanın amacı yoğunlaştırılmış nefes havasında oksidatif stres belirteçleri ve antioksidan savunma mekanizmaları ile astım tanısı, astım fenotipleri ve astım şiddeti arasındaki ilişkinin araştırılması; oksidatif strese etki eden klinik, laboratuvar demografik ve genetik faktörlerin belirlenmesidir.

Çalışmaya 6-18 yaş arasında 300 hafif astımlı, 142 orta-ağır persistan astımlı hasta, 191 sağlıklı çocuk alındı. 191 sağlıklı çocuğun tümünden ve 140 astımlı çocuktan yoğunlaştırılmış nefes havasında oksidatif stres göstergesi olarak 8-isoprostan ve malondialdehid, antioksidan olarak redükte glutatyon düzeyleri ölçüldü. Çalışmaya alınan tüm çocuklarda Total IgE, eozinofil sayısı ve FEV1 değerleri belirlendi. Saptanan sonuçlara etki edebilecek cins, yaş, aile öyküsü, sigara dumanı ile karşılaşma, evcil hayvan varlığı sorgulandı. PCR-RFLP yöntemiyle glutatyon-S-transferaz enziminin GSTT1, GSTM1, GSTP1 alt gruplarına ait genotipler belirlendi. Oksidan belirteçlere etki eden faktörler araştırıldı. Oksidan stresin astım hastalığına ve astım şiddetine olan etkileri analiz edildi.

Astım hastaları ve kontrol grubundaki çocuklarda genotiplendirilen polimorfizmlerden yaşa ve cinse göre kontrol edilerek yapılan analizlerde GSTP1 polimorfizmlerinin astımlı grupta sağlıklı kontrollerden daha sık olduğu ($p=0.00038$) ve astım şiddeti arttıkça sıklığının arttığı ($p=0.006$) bulundu. Bu geniş vaka grubundaki çalışmamız, önceki çalışmamızı destekler

şekilde GSTP1 geninin val105val genotipinin astım şiddeti ile anlamlı ve daha güçlü bir ilişki gösterdiğini ortaya koymuştur ($p=0.00038$). Sistemik dolaşımdaki oksidatif belirteçler ile GSTP1 val105val arasında anlamlı bir ilişki saptanırken, benzer bir ilişkiye yoğunlaştırılmış nefes havasındaki oksidatif belirteçlerle ko-dominant modelde çalışılan genotipler arasında rastlanmadı. GSTT1 ve GSTM1 genotiplerinin yaşa ve cinse göre kontrol edilerek yapılan analizlerinde astımlı grupta kontrol grubundan farklı olmadığı görüldü ($p>0.05$).

Yoğunlaştırılmış nefes havasında yapılan incelemelerde redükte glutatyon ve malondialdehidin astımlı hastalarla kontroller arasında belirgin olarak farklı olduğu saptandı ($p<0.0001$). 8-isoprostan düzeylerinde fark gözlenmedi ($p>0.05$). Bu fark temel olarak astımlı hastalarla sağlıklı kontroller arasındaki farktan köken alıyordu. Oksidatif belirteçlerde astım şiddeti ile paralel bir değişim saptanmadı. Glutatyon ile malondialdehid arasında güçlü bir korelasyon ($r=-0.832$, $p<0.0001$) gösterildi. Sistemik dolaşımdakinden farklı olarak glutatyon S transferaz enzimlerinin farklı genotipleri ile malondialdehid ve redükte glutatyon düzeyleri arasındaki ilişkide yalnızca GSTM1 geninde yabancı genotipe sahip astımlı çocuklarda redükte glutatyon düzeyi daha düşük saptandı ($p=0.032$), GSTT1 ve GSTP1 genotiplerinde ise fark bulunamadı.

Sonuç olarak, bu çalışma astımda sağlıklı bireylere göre doku düzeyinde de lokal çok güçlü bir oksidatif stresin varlığını göstermektedir. Sonuçlarımız, antioksidan enzimlerden GSTP1'e ait genetik varyantların da astım tanısını etkilememekle beraber oksidatif stres üzerinden astım şiddetini etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: astım, glutatyon, glutatyon-S-transferaz, malondialdehid, 8-isoprostan, polimorfizm

ABSTRACT

Dut R.; Mediators of oxidative stress in the exhaled breath condensate of asthmatic children. Hacettepe University School of Medicine, Department of Pediatrics, thesis of pediatrics, 2006

Asthma is a complex genetic disease. An imbalance between oxidants and antioxidants in favor of oxidants leading to oxidative stress is known to play an important role in the pathogenesis of asthma. Even though systemic levels of oxidant markers have been investigated in many studies, there is limited information concerning the determinants of oxidative stress in the exhaled breath.

The aim of this study was to establish the presence of oxidant stress in the exhaled breath of asthmatic children and to investigate the factors that play a role as determinants. For this purpose, we determined the levels of 8-isoprostane, malondialdehyde and glutathione in the study groups and searched for the determinants effecting their levels.

441 asthmatic and 191 healthy children were genotyped for the polymorphisms in the GSTT1, GSTM1, GSTP1 genes. Plasma levels of IgE, eosinophil numbers and FEV1 were determined. Exhaled levels of malondialdehyde, glutathione and 8-isoprostane were measured in 191 healthy and 140 asthmatic children. Multivariate logistic regression was used to determine the factors associated with severity of asthma.

GSTP1 Val/Val genotype was more frequent in the moderate-severe asthma group. In asthmatics, exhaled malondialdehyde levels were higher and exhaled glutathione levels were lower than controls but no difference was detected in 8-isoprostane levels. In contrast to oxidative markers in the systemic circulation, neither asthma severity, nor genotypes of the anti-oxidant enzymes were important determinants of the oxidative stress markers in the exhaled breath.

Our study underlines the importance of local oxidative stress in asthma and indicates that genetic polymorphisms at the GSTP1 gene may be associated with asthma severity through its effect on marker of oxidation.

Key words: asthma, glutathione, glutathione-S-transferase, malondialdehyde, polymorphism, 8-isoprostane

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. ASTİM NEDİR?	4
2.2 ASTİM DA GENETİK MEKANİZMALAR	4
2.3. ASTİM DA Kİ İNFLAMATUVAR MEKANİZMALAR	7
2.4. BRONŞİAL ASTİM İNFLAMATUVAR BİR HASTALIKTIR.....	8
2.4a. ASTİM DA REAKTİF OKSİJEN MADDELERİ.....	8
2.5. REAKTİF OKSİJEN MADDE-ASTİM İLİŞKİSİ.....	10
2.6. YOĞUNLAŞTIRILMIŞ NEFES HAVA KONDENSATI.....	12
2.6a. YOĞUNLAŞTIRILMIŞ NEFES HAVASINDA OKSİDASYON BELİRTEÇLERİ.....	15
2.6b. 8-İSOPROSTAN	15
2.6c. MALONDİALDEHİD	18
2.6d. GLUTATYON.....	22

2.7. OKSİDATİF STRESİN GENETİK YAPI İLE İLİŞKİSİ	23
2.7a. GLUTATYON-S-TRANSFERAZ	24
2.7b. GSTM1	25
2.7c. GSTT1.....	28
2.7d. GSTP1.....	29
3. MATERYAL-METOD	34
3.1. ÇALIŞMA GRUBU	34
3.2. YOĞUNLAŞTIRILMIŞ NEFES HAVASININ TOPLANMASI.....	37
3.3. REDÜKTE GLUTATYON ÖLÇÜMÜ	37
3.4. MALONDİALDEHİD ÖLÇÜMÜ	38
3.5. 8-İSOPROSTAN ÖLÇÜMÜ	38
3.6.GENOTİPLENDİRME.....	38
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	41
4. BULGULAR	43
4.1. OLGULARIN DEMOGRAFİK VERİLERİ VE ÖZELLİKLERİ	43
4.2. ASTİM TANISI İLE İLİŞKİLENDİRME ÇALIŞMASI.....	45
4.2a. ASTİM AĞIRLIK DERESESİNİ ETKİLEYEBİLECEK DEĞİŞKENLERİN LOGİSTİK RESRESYON ANALİZLERİ	46
4.2b. YOĞUNLAŞTIRILMIŞ NEFES HAVASINDA OKSİDATİF STRES BELİRTEÇLERİ.....	46
4.3. YOĞUNLAŞTIRILMIŞ NEFES HAVASINDA ANTIOKSİDAN ENZİM GENOTİPLERİ İLE OKSİDATİF BELİRTEÇLER ARASI İLİŞKİ.....	52
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	61
7. KAYNAKLAR.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

AP-1	Aktivatör protein-1
DNA	Deoksiribonükleik asit
EBC	Yoğunlaştırılmış nefes havası
FEV1	1.saniyedeki zorlu ekspiryum hacmi (Forced expiratory volume in 1 second)
FVC	Zorlu vital kapasite (forced vital capacity)
γ GCS	γ glutamil sistein sentaz
GINA	Global Initiative for Asthma
GSH	Glutasyon
GST	Glutayon-S-transferaz
SOD	Süperoksit dismutaz
IFN γ	İnterferon- γ
Ig	İmmünglobülin
IL	İnterlökin
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
8-ISO	8-isoprostan
MDA	Malondialdehid
NF- κ B	Nükleer faktör κ -B
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PPAR γ	Peroksizom proliferatör aktivite eden reseptör γ
PEF	Ekspiratuvar zirve akım hızı (Peak expiratory flow)
RFLP	Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (restriction fragment-length polymorphism)
TBARS	Thiobarbitürik asit reaktif ürünleri

Th	Yardımcı T hücresi (Hepler T cell)
TNF α	Tümör nekrozis faktörü- α

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa No
Şekil 1. Hava yolunda inflamasyon sonrası reaktif oksijen maddelerinin detoksifikasyonunun varsayılan etki şeması	9
Şekil 2. 8-isoprostan oluşumu	16
Şekil 3. Hidrojen peroksidin NADPH İle glutatyon aracılığıyla indirgenmesi.....	22
Şekil 4. GSTM1 genotiplenmesi	39
Şekil 5. GSTT1 genotiplenmesi	40
Şekil 6. GSTP1 genotiplenmesi	41
Şekil 7. Çalışma gruplarında redükte glutatyonun düzeyleri	48
Şekil 8. Çalışma gruplarında malondialdehid düzeyleri	49
Şekil 9. Çalışma gruplarında 8-isoprostan düzeyleri	50
Şekil 10. Yoğunlaştırılmış nefes havasında malondialdehid ve redükte glutatyon arasındaki korelasyon.....	51

TABLULAR

Tablo	Sayfa No
Tablo 1. Astım ve allerjide aday genler	6
Tablo 2. EBC`de farklı pulmoner hastalıklarda inflamatuvar mediatörler	14
Tablo 3. GİNA kriterlerine göre çalışmaya alınan hastaların astım şiddetinin belirlenmesi .	37
Tablo 4. Çalışmaya alınan çocukların özellikleri	44
Tablo 5. Çalışma gruplarında GST genotiplerinin dağılımı	45
Tablo 6. Astım ağırlık derecesini etkileyen faktörlerin logistik regresyon analizi	46
Tablo 7. Çalışma gruplarında yoğunlaştırılmış nefes havasında oksidatif stres belirteçleri ..	47
Tablo 8. Astımlı grup içerisinde genotiplere göre yoğunlaştırılmış nefes havasında oksidatif stres belirteçleri	53
Tablo 9. Kontrol grubu içinde genotiplere göre yoğunlaştırılmış nefes havasında oksidatif stres belirteçleri	54

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Astım, genetik ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığı geri dönüşümlü hava yolu obstruksiyonu, bronş aşırı duyarlılığı ve hava yolu inflamasyonu ile karakterize heterojen bir hastalıktır. Bu heterojenite kronik hava yolu inflamasyonunun değişken derecesi, hava yolu artmış cevabı, reverzible hava yolu obstrüksiyonunu içerir.

Astım, patogenezi ve etyolojisi az anlaşılmış bir hastalıktır. Astımla ilişkilendirilen genetik predispozisyon, immunolojik sapma ve çevresel faktörler gibi birçok etmenler vardır. Astım patogenezinde etkin olduğu düşünülen mekanizmalardan bir tanesi de oksidatif harabiyettir.

Hava Yollarında Oksidatif Stres Oluşumu

Çoğu inflamatuvar durumda olduğu gibi astımda da birçok inflamatuvar mekanizmanın aktivasyonu sonucu oksidatif patlama olur. Oksidatif stres sonucu, reaktif oksijen elemanları (ROS) ve reaktif nitrojen elemanları (RNS) oluşur. Astımda oksidatif stresin arttığı, lipid peroksidasyon ürünlerinin ve protein karbonillerinin plazmada artması; plazmada isoprostan artması ile gösterilmiştir. ROS, hayati rol oynar, çünkü lipid peroksidasyonunun artması, kemoatraktanların üretiminin artması ve salınması, vasküler permeabilitenin artması gibi astımla ilişkili birçok patofizyolojik değişikle ilişkilidir. ROS akciğerde diffüz olarak bulunur ve normal metabolizmanın ürünüdür. Mitokondri, en büyük ROS üreticisidir, elektronlar elektron transport zincirinden kaçarak superoksit formu oluşturur. Oksijenin %1-3'ü hücrelerde superoksit formunda bulunur. Oksidatif stresten etkilenen hücreden strese yanıt olarak IL-1, IL-8, TNF- α gibi sitokin ve kemokin mediyatörler salgınır. Sonuçta inflamatuvar cevap ve doku zedelenmesi artarak devam eder. Astım patogenezinde reaktif oksijen maddelerinin arttığına dair deliller hem lokal olarak hava

yollarını gösteren çalışmalardan hem de sistemik çalışmalardan elde edilmiştir. Diğer taraftan, antioksidan savunmada değişiklikler, kan, plazma ve trombositlerde glutayon-S-transferaz (GST) azalması, selenyum azalması, plazmada total antioksidan kapasitenin ve protein sülfhidridlerin azalması, BAL hücrelerinde süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin artması; ve bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısında vitamin C ve vitamin E konsantrasyonlarının azalması ile gösterilmiştir. Oksidatif stres ile antioksidan mekanizmalar arasındaki dengeyi etkileyecek faktörlerden biri de antioksidan etkiden sorumlu olan enzimlerdeki genetik farklılıklardır. Antioksidan savunmada görev alan önemli enzimler arasında SOD ve GST sayılabilir. Bu enzimlerdeki polimorfizmlerin enzim aktivitelerini etkileyebileceği öne sürülmüştür. Bu nedenle bu enzimlerdeki genetik varyantların in-vivo antioksidan aktiviteyi etkileyebileceği ve bu yolla astım ve astım fenotipleri üzerine de etki edebileceği düşünülebilir.

Laboratuvarımızdan gerçekleştirilen bir çalışmada astımlı hastalarda sistemik olarak çok güçlü bir oksidan stres ve buna eşlik eden anti-oksidan savunma mekanizmalarında bir zayıflama olduğu; bu obstruksiyonda anti-oksidan dengesizliğe GSTP1 genotipinin 105.inci pozisyonundaki aminoasit polimorfizminin önemli bir etkide gösterilmiştir. Ancak bu çalışmada ölçümlerin tümü sistemik dolaşımdan gerçekleştirilmiş olup, organ düzeyinde lokal oksidatif stresin derecesi belirlenmemiştir.

Ayrıca literatürde de bu konudaki bilgi küçük vaka gruplarında elde edilmiştir. Doku düzeyindeki elde edilen bilgiler BAL yöntemiyle erişkinlerden sağlanmıştır. Çocuklarda invazif yöntemlerin kullanımında ortaya çıkan sınırlamalar nedeniyle BAL'da oksidatif stres çalışmaları yapılmamıştır. Ayrıca çoklu analizde lokal oksidatif harabiyete etki eden faktörler halen bilinmemektedir. Çalışmamız bu bilinmeyen konuları aydınlatmaya yönelik olarak tasarlanmıştır.

Çalışmamızın amaçları şu şekilde özetlenebilir:

1. Yoğunlaştırılmış nefes havasında oksidatif stres belirteçleri ve determinantlarının belirlenmesi

Bu amaçla astımlı hastaların ve normal kontrollerin nefes havasında oksidatif stres belirteçlerinden 8-isoprostan ve malondialdehid; antioksidatif mekanizmanın belirteçlerinden redükte glutasyon düzeyleri ölçüldü. Ortaya konulan farkların atopi ve/veya astıma bağlı olabileceği düşünülerek hastalar ve kontroller, atopik ve nonatopik alt gruplara ayrıldı. Saptanan sonuçlara etki edebilecek cins, yaş, aile öyküsü, sigara dumanı ile karşılaşma, evcil hayvan besleme gibi faktörler analiz edildi.

2. Antioksidan enzimlerden glutasyon-S-transferazın genetik varyantlarının oksidan parametrelerle ilişkisinin saptanması ve antioksidan enzimlerdeki genetik varyantların astım tanısı ve astım fenotipleri ile ilişkisinin saptanması

PCR-RFLP yöntemiyle GSTP1, GSTM1, GSTT1 genotipleri belirlendi. Bu genotiplerin oksidan ve antioksidan belirteçlerle anlamlı bir ilişkisi olup olmadığı araştırıldı. Antioksidan enzimlerde belirlenen genetik varyantların astım oluşumuna ve astım şiddetine ne kadar etkisi olduğu belirlendi, atopi ve/veya astımla olan ilişkisi değerlendirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Astım Nedir?

Astım kronik inflamatuvar bir havayolu hastalığıdır. Değişken fakat revezible havayolu obstruksiyonu, episodik vizing, öksürük veya dispne ile karakterizedir. Kronik inflamasyon, özellikle geceleri ve sabah erken saatlerde tekrarlayan vizing, nefes darlığı, göğüs ağrısı ve öksürük ataklarına yol açan havayolu aşırı duyarlılığına neden olur. Bu ataklar sıklıkla havayolundaki darlığın derecesine göre kendiliğinden veya tedavi sonucu düzelir (1).

Astım konağa ait faktörlerle çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu çıkan kompleks genetik bir hastalıktır (2). Konağa ait faktörler genetik yatkınlık, atopi, havayolu duyarlılığı, cinsiyet ve ırktır. Çevresel faktörler ise ev içi / ev dışı allerjenleri, sigara dumanı, hava kirliliği, solunum yolu enfeksiyonları, diyet, sosyoekonomik durum ve aile büyüklüğüdür (3).

2.2. Astımda Genetik Mekanizmalar

Kompleks genetik hastalıklar birden fazla gen veya genetik bölgenin birbiriyle ve çevreyle etkileşimi sonucu ortaya çıkan multifaktöryel hastalıklardır. Mendelian hastalıklardan farklı olarak sık görülür ve bir halk sağlığı sorunudur. Kompleks genetik hastalıkların en sık görülenlerinden bir tanesi astımdır. Artık bir “astım geni” olmadığını ve tek bir gendeki değişikliklerin astıma yatkınlığı tek başına artırmadığını biliyoruz.

Kompleks genetik hastalıkların genetik özelliklerini ortaya koymaktaki ilk adım hastalığa ait fenotiplerin belirlenmesidir. Astım genetiği ile ilgili çalışmalarda fenotiplerin tanımlanması ile ilgili bazı zorluklar vardır. Bunlardan ilki yalnızca hastalığa ait kantitatif bir belirteç olmamasıdır. Bu hastalıklarda özellikle küçük yaşlarda tanıyı destekleyecek kesin fizyolojik ölçümler yoktur ve tanı genellikle subjektif semptomlara dayanır. Sıklıkla kullanılan bir yaklaşım “doktor tanısı”nın kriter olarak alınmasıdır. Ancak bu, çoğunlukla

yetersiz tanı sorununu doğurmaktadır. Alerjinin tanımı için ise genellikle yüksek IgE ve/veya bir veya birden çok allerjene özgü IgE'nin varlığı kullanılmıştır.

Fenotipin belirlenmesi ile ilgili ikinci güçlük alerjik hastalıkların bir veya birkaçının sıklıkla bir arada bulunmasıdır. Astım çalışmalarının bir çoğunda vakalar yalnızca astım tanısı göz önüne alınarak seçilmiştir. Böylece yalnızca astım olanlarla, astım + alerjik rinit veya astım + atopik dermatit olanlar aynı havuzda değerlendirilmişlerdir.

Fenotip belirlemede üçüncü büyük zorluk hastalıkların sıklıkla epizodik karakter göstermesi ve doğal seyrinin yaşam boyunca büyük değişiklikler göstermesidir. Ayrıca astım erken çocukluk çağında viral enfeksiyonlarla, ileri yaşlarda ise kronik obstruktif akciğer hastalıkları ve sigaranın yol açtığı harabiyetle karışmaktadır. Bu tipik bir fenokopya örneğidir. Yani olgu astım gibi gözükabilir ama astım değildir. Klinisyen için astım yaşa, cins ve ırka göre birden fazla farklı fenotipi olan kompleks bir hastalıktır (4).

Aile hikayesi ve genetik çalışmalar astımda güçlü bir genetik komponent olduğunu göstermektedir. Literatürde astım ve astımla ilişkili hastalıklarda yüzden fazla genetik varyant bildirilmiştir. Aile hikayesi astım şüphesinde bir genetik indekstir: anne ve babadan ikisinde astım olan çocuklarda %80, ikisinden birinde astım olan çocuklarda %40, astmatik ebeveyni olmayan çocukların %10'unda astım geliştiği gösterilmiştir (5,6).

Astım patogenezi daha iyi tanımlamak için yapılan çalışmalarda aday gen bölgeleri tanımlanmış ve aday genler astmatik fenotiple ilişkilendirilmiştir. Potansiyel astım aday genleri transkripsiyon faktörleri, reseptör genleri, sitokin genleri, immün tanıma ve lipid mediyatör salınım genlerini içermesine rağmen astım; kromozom 5, 6, 7 ve 11 ile ilişkilendirilmiştir (7-9).

Tablo 1. Astım ve allerjide aday genler

Yerleşim	Aday gen	İşlev
1q31-q32	IL-10	İnflamatuvar mediatör
17q11q12	RANTES	Eozinofilik kemokin
2q33-2q34	CD28	T hücre proliferasyonu
3p	Kemokin grubu	T hücre ve monosit kemotaksisi
5q	IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, CD14	İnflamatuvar mediatör Lipopolisakkarit (LPS) reseptörü
6p	HLA	Antijen sunumu
	Tumor nekroz faktörü (TNF)	İnflamatuvar mediatör
12q	Nitrik oksit sentaz (NOS)	İnflamatuvar.
	Interferon-gamma (IFN γ)	Bronkodiator
	Stem cell faktörü (SCF)	İnflamatuvar
	Signal Transducer and activator of transcription (STAT)-6	Mast hücre farklılaşması Transkripsiyon faktörü
16p12.1-p11.2	IL-4 reseptörü	İnflamatuvar mediatör, IgE sentezi

Kromozom 5 (IL-3,-4, -5, -9 ve -13 içerir, kromozom 11 (Fc ϵ RI β zinciri), kromozom 12 (stem cell faktör, interferon (IFN)- γ , IgF, ve Stat-6) ve kromozom 16 (IL-4R) astım ve alerji gelişimi ile ilişkilidirler. Ek olarak genler antijen sunan (major histokompatibilite kompleks (MHC) klas 2 genleri), T hücre cevabı (T hücre reseptör α zinciri) ve diğer immunolojik olayları içerir. Astım gelişiminde tek major genetik risk faktörü yoktur. Hastalığın gelişimi birçok genle çevresel faktörlerin etkileşimine bağlıdır (10).

İmmün sistem alanında astımda önemli olabilecek Toll-like reseptörler, Th2 yolağındaki detayları, Th1/Th2 virus cevabını, doğal immün sistemi, β^2 adrenoreseptör halotiplerini, akut astımda inflamatuvar belirteçleri, pasif sigara içiciliğinin etkilerini ve matriks metalloproteinaz-1 ve matriks metalloproteinaz-9 polimorfizmlerini içeren yeni çalışmalar yapılmaktadır (11).

2.3. Astımdaki İnflamatuvar Mekanizmalar

Antijenle karşılaşmadan sonra genetik olarak yatkın kişilerde antijen sunan hücreler tarafından alınan antijen T lenfositlerine sunulur (12). CD4+ T hücrelerinin Th2 alt tipi alerjik reaksiyonlarda temel ayarlayandır. Th2 hücreler inflamatuvar bölgeye taşıdıkları kemoreseptörler aracılığı ile ulaşır IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 ve IL-13 salgılayarak inflamasyonda gözlenen antikor yanıtını oluşturur (13). Oluşan allerjen spesifik IgE aracılığı ile mast hücre, makrofaj ve bazofilden histamin, proteolitik ve glikolitik enzimler, heparin, prostaglandin D2, lökotrien C4, adenozin salınır. Bu mediyatörlerle havayolu düz kası kasılması, mukus sekresyonu, vazodilatasyon ve mikrovasküler geçirgenlik artışı ile sonuçlanan erken alerjik faz oluşur (14,15).

Allerjenle temastan 4-6 saat sonra erken faz sırasında salgılanan mast hücre kökenli mediyatörler postkapiller endotel hücreler üzerine etki ederek, dolaşan lökositlerin endotel hücrelerine adezyonunu kolaylaştıran damar hücresi adezyon molekülü ve e-selektin ekspresyonunu artırır. IL-5 gibi kemoatraktan sitokinler de eozinofiller, nötrofiller, bazofiller, T lenfositleri ve makrofajların mukozayı infiltre etmesini kolaylaştırırlar. Allerjen ile karşılaşmadan 4-8 saat sonra bu hücreler aktive olur ve erken fazın birçok proinflamatuvar reaksiyonlarını aktive eden inflamatuvar mediatörler (histamin, kinin, majör basic protein, eozinofil kökenli nörotoksin gibi) salgılar. Bu hücreler salgıladıkları mediatörler ile bir yandan doku harabiyeti yapmakta diğer yandan da apokrin ve parakin bir şekilde inflamasyonu artırırlar. Böylece alerjik hastalığın klinik ve histolojik görünümü olan epitel hasarına yol açarlar. Th2 lenfositleri IL-3, IL-4, IL-5 ve IgE yapımını, eozinofil kemoatraksiyonunu, mast hücrelerin toplanmasını artıran diğer sitokinleri salgılayarak alerjik cevabı güçlendirir (14,15).

Allerjik hastaların semptomlarının kronikliğinden inflamatuvar hücrelerin dokuda birikmesi sorumludur.

2.4. Bronşial Astım İnflamatuvar Bir Hastalıktır

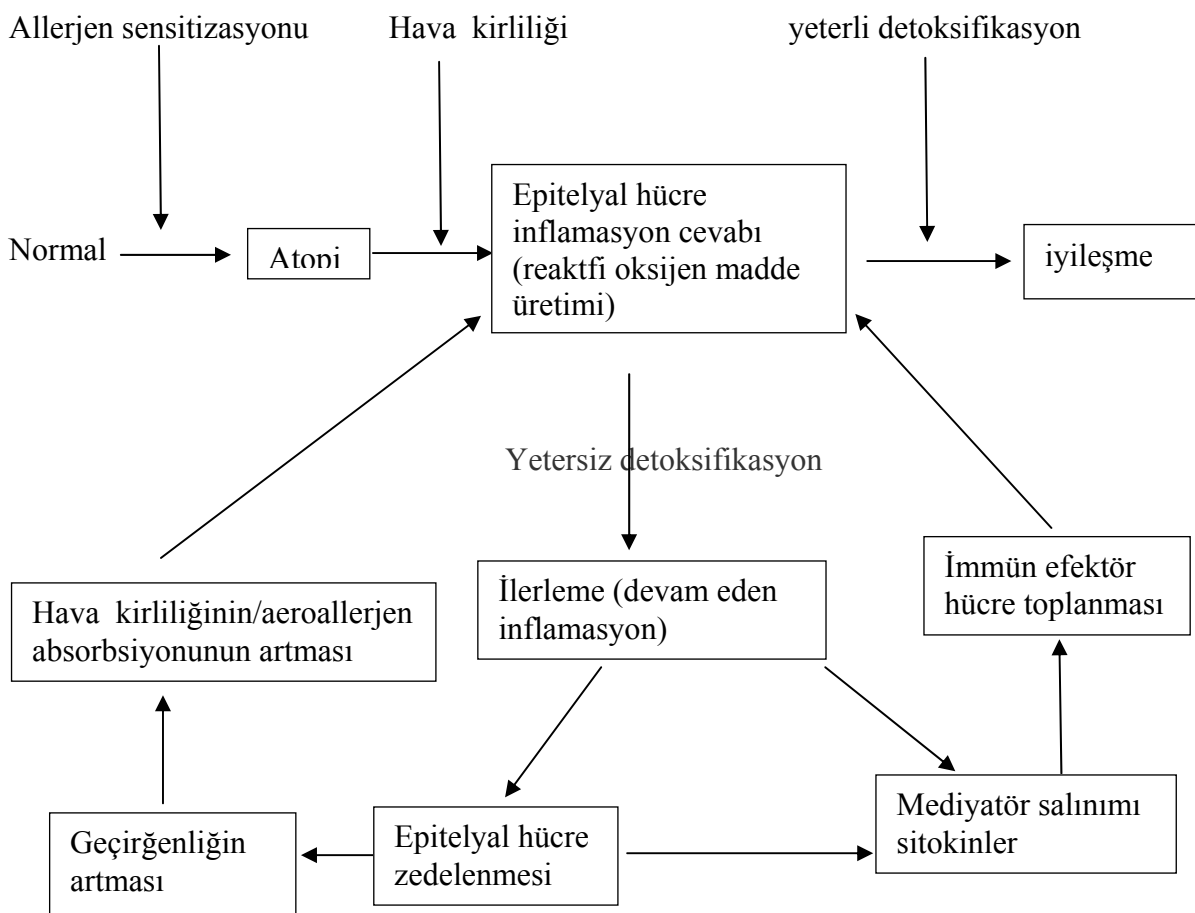
Astım çok sayıda inflamatuvar hücre ve mediatörün katılımı sonucu ortaya çıkan havayolu obstruksiyonu ile karakterize inflamatuvar bir hastalıktır (16). Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çocukluk çağı kronik hastalıklarının prevalansı incelendiğinde bronşiyal astımın en üst sıraya yerleştiği görülmektedir. Farklı ülkelerde prevalansı %5 ile %45 arasında değişen bronşiyal astımın (17) ülkemizdeki sıklığı değişik yörelere göre farklı olmakla beraber yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada Ankara ilinde %6.9 bulunmuştur (17,18). Astımda var olan genetik yatkınlık üzerine aeroallerjenler, ozon, sigara dumanı, hava kirliliği gibi çevresel faktörlerin etkisi ile mast hücresi, lenfosit ve eozinofillerden zengin bir inflamasyon ortaya çıkar. Bu inflamatuvar hücreler saldıkları mediyatörler ile doku harabiyetine yol açarlar. Bu mediyatörler arasında reaktif oksijen ürünleri önemli yer tutar.

2.4a. Astımda reaktif oksijen ürünleri

İnflamatuvar hücreler süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hipoklorik asit ve hidroksil radikali gibi toksik reaktif oksijen ürünleri ile nitrik oksit gibi reaktif nitrojen ürünleri oluşturmaktadırlar (19-22). Süperoksit bakteriyel ölüm; nitrik oksit ise düz kas gevşemesi ile vazodilatasyon ve bronkodilatasyon için gereklidir. Bu ürünlere normal fizyolojik işlevler için gereksinim vardır. Özellikle inflamasyon doku harabiyetine neden olmaya başladıktan sonra reaktif oksijen ürünleri, lipid peroksidasyonu, havayolu reaktivitesi ve sekresyonların artması, kemoatraktanların üretilmesi ve vasküler geçirgenliğin artması gibi astımda görülen patofizyolojik değişikliklerin oluşmasına da katkıda bulunurlar (23).

Reaktif oksijen maddelerinin oluşturduğu toksisiteye karşı vücudun antioksidan savunma mekanizmaları vardır. Oksidan mediyatörleri detoksifiye edebilen glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon, vitamin E ve vitamin C yi içeren antioksidanlar havayolu epitelinden ve vasküler endotelden salınmaktadır. Bu antioksidanlar,

oksidatif maddeleri detoksifiye ederek organizmayı korur (24-26). Bu ürünler yeterince detoksifiye edilmediklerinde gerek oksidasyona bağlı harabiyet, gerekse oksidasyon tarafından indüklenen inflamasyon artar. Epitelyal geçirgenlik, aeroallerjen ve havadaki zararlı maddelerin emilimi artar, zedelenen epitel hücrelerden sitokinlerin salınmasıyla immün efektör hücreler ortama toplanır. Toplanan immün efektör hücreler aracılığıyla reaktif oksijen madde üretimi daha da çoğalır ve kısır döngü oluşur (şekil 1) (27).



Şekil 1. Hava yolunda inflamasyon sonrası reaktif oksijen maddelerinin detoksifikasyonunun varsayılan etki şeması (27)

Astım patogeneğinde reaktif oksijen maddelerinin arttığına dair deliller hem lokal olarak havayollarında yapılan çalışmalardan hem de sistemik çalışmalardan elde edilmiştir.

Lokal olarak astımlı hastaların ekspiryum havasında hidrojen peroksit ve nitrit oksit seviyeleri yüksek ölçülmüştür (28-30). Astımlı hastalarda reaktif oksijen ürünlerinin kaynağı havayollarındaki inflamatuvar hücrelerdir. Astımlı hastaların havayollarında makrofajların kontrol grubuna göre daha fazla süperoksit ürettiği (31) antijenle duyarlanma sonrası havayolundaki eozinofillerden spontan reaktif oksijen madde oluşumu arttığı (32) ve interferon gammanın allerjik hastalardaki bu cevabı engellemeye çalıştığı görülmüştür (33). Havayollarındaki inflamatuvar hücreler gibi dolaşımdaki inflamatuvar hücreler de reaktif oksijen maddeleri için kaynak olabilirler. IgE, membran reseptörüne bağlandığında periferik kandaki monositlerden süperoksit oluşumunu aktive eder (34) antijenle duyarlılaştırıldıktan 24 saat sonra astımlı hastalardan izole edilen eozinofillerden hidrojen peroksit daha fazla üretildiği gösterilmiştir (35). Sonuç olarak kontrol grubuna göre astımlı hastaların kanındaki eozinofil ve monositler reaktif oksijen maddelerini daha fazla üretir (31-36). Astımlı hastaların hem havayollarında hem de intravasküler alanlarda inflamatuvar hücreler oksidatif stresin artmasına yardımcı olur.

2.5. Reaktif Oksijen Madde-Astım İlişkisi

Pek çok çalışma astımda oluşan reaktif oksijen maddelerin akciğerdeki biyolojik moleküllerin yıkımına neden olduğunu göstermiştir. Reaktif oksijen maddelerin hedefleri açık olmamakla birlikte bunlar arasında reseptör kinazlar, fosfatazlar, fosfolipidler, nonresöptör tirozin kinazlar sayılabilir (37). Epitelyel ve endotelyal membranlardaki lipid yapının zarar görmesinin sonucu olarak havayolunda isoprostan (38) ve etan (39), idrarda ise isoprostanın (40) arttığı görülür. Bronkoalveolar lavaj sıvısında nitrotirosin ve klorotirosin seviyesinin artmış olarak bulunması ise protein yapının zarar görmesinin bir göstergesidir (41,42). Yani oksidan maddeler hem lipid hem protein harabiyetine neden olur ve bunların yıkımı oksidatif

uyarının arttığını gösterir. Steroid tedavisinin hidrojen peroksit, nitrotirosin ve etan formasyonunu etkilemesi inflamasyon ve oksidatif stres arasındaki korelasyonu düşündürür.

Reaktif oksijen maddeleri astımdaki fizyolojik cevabı da etkilerler. Bu bağlamda reaktif oksijen maddelerinin akciğerdeki beta adrenerjik fonksiyonu azaltarak asetilkoline bağlı düz kas kasılmasını arttırdığı öne sürülmüştür (43,44). Reaktif oksijen maddelerinden hidrojen peroksit trakeal miyositlerde kinazları aktive ederek düz kas kasılmasını uyarır (37,45) ve müsin üretimini artırır (46). Yani oksidan stresin artması astımın en önemli bulgularından olan bronkokonstriksiyonu artırabilir.

Astımda oksidan stres/antioksidan dengenin bozulduğuna ait deliller hem plazmada hem de bronkoalveolar lavaj sıvısında elde edilmiştir. Astımda tam kan, plazma ve trombositlerde glutatyonun (47,48), plazmada protein sülfidrillerin ve total antioksidan kapasitenin (49), bronkoalveolar lavaj sıvısında vitamin E ve C konsantrasyonunun azaldığı rapor edilmiştir (50). Astımlı hastalarda yapılan bir diğer çalışmada lökositlerde süperoksit oluşumu, plazmada lipid peroksidasyon ürünleri, nitrit, nitrat, protein karbonilin arttığı, protein sulfidrillerin azaldığı, oksidatif stresin arttığı görülürken; eritrositlerde süperoksit dismutaz aktivitesi, total kan glutatyonunun arttığı; eritrosit ve lökositlerde glutatyon peroksidaz aktivitesinin azaldığı; eritrosit katalaz aktivitesi ve plazma total antioksidan kapasitenin değişmediği saptanmıştır (51). Astımlı hastalarda denge oksidatif stres artması yönündedir. Ayrıca reaktif oksijen maddeleri ile FEV1 arasında da ilişki olduğu öne sürülmüştür (52). Tüm bu sonuçlar astımda antioksidan savunmanın da etkisi olabileceğini düşündürür (51).

Çalışmalarda oksidan ve antioksidan mekanizmaların nerede ölçülmesi gerektiği de göz önünde bulundurulması gereken bir sorundur. Bronkoalveolar lavaj sıvısı çalışmalar için havayolu hücrelerinin direk olarak yansıtmasına rağmen bu yöntem invazivdir. Kan örneği, vücudun antioksidan defans havuzunu temsil etmesi, periferik kandan havayollarına

inflamatuvar hücrelerin geçmesi ve aktive olmuş lökositlerin reaktif oksijen maddelerini arttırması, kolayca erişilebilmesi nedeniyle özellikle çocuklardaki çalışmalar için yeterli görülebilir (51). Ancak çocukluk çağı astımında; noninvazif veya minimal invazif metodlar kullanılarak takibin yapılması gerektiği vurgulanmaktadır (53). Nefes hava kondensatı kullanılarak yoğunlaştırılmış nefes havasında yapılan ölçümler noninvazif bir metod olarak çocukluk yaş grubunda kullanılabilir. Astımda havayolu inflamasyonunu göstermek için yoğunlaştırılmış nefes havasında moleküler belirteçler araştırılmaktadır. Yoğunlaştırılmış nefes havası kondensatı (EBC) havayolu inflamasyonunun ve oksidatif stress ürünlerinin bir kaynağıdır (54).

2.6. Yoğunlaştırılmış Nefes Hava Kondensatı

Astmatik havayolu tip2 T-helper lenfositlerden kaynaklanan kemokinler ve sitokinlerin baskınlığı ile karakterizedir. Astım kontrolü klinik semptomlar ve solunum fonksiyon testi ile yapılır. Havayolu inflamasyonunu değerlendirmek için birçok invazif teknik vardır. Astımlı hastalarda akciğer inflamasyonunu göstermek için noninvazif metodlarda eksiklik vardır. EBC soğutulan nefes havasının toplanmasıdır. EBC toplanması; havayolu fonksiyonu veya inflamasyonunu değiştirmez ve küçük çocuklarda dahi kolaylıkla uygulanabilir (55).

Çoğu çalışmada havayolu inflamasyonu bronkoalveolar lavaj sıvısı ve bronşiyal biyopsi (56,57) veya balgam indüksiyonu (58) gibi tekniklerle gösterilmiştir. İnflamatuvar mediatörler akciğerden ziyade sistemik inflamasyonu gösteren plazma ve idrarda ölçülmüştür. Oysa ki inflamatuvar belirteçlerin yoğunlaştırılmış nefes havasında ölçülmesi tamamen noninvazif olmakla birlikte solunum yollarındaki inflamasyonu yansıtır (59,60). Verilen nefes havasının her ml 'inde 0.1-4 damla su buharı bulunur. Bu damlalar 0.09-3 çapındadırlar ve

havayolu yüzeyindeki sıvıdan elde edilirler. Bu da akciğerlerdeki fizyolojik ve inflamatuvar durumların noninvazif olarak gösterilmesini sağlar (61).

1980' lerde, Sovyetler Birliğinde araştırmacılar yoğunlaştırılmış nefes havası kondensatı çalışmalarına başlamışlardır. Çıkarılan hava görünmeyen sıvı kaybının temel mekanizmasıdır. Bu metodun meslek hastalıklarının, akciğer hastalıklarının araştırılmasını kolaylaştırdığına dair uluslararası yayınlanmış yüzden fazla makale vardır. Bu ilgi, ekshale hava kondensatının, akciğerin biyokimyasal komponentlerinin ve inflamatuvar ürünlerini, noninvazif olarak değerlendirilmesini sağlamaktan kaynaklanmaktadır. Toplama için gerekli süre 10 dakika veya daha uzundur, nk örnek toplayıcı duvarına yeterli sıvı birikene kadar tutulur (62).

Bu işlem için kullanılan iki standart metod vardır:

1-ECoscreen (Hoechberg, Almanya):

Soğuk hava değişiminden modifiye edilen bir elektrikli buzdolabı sistemidir.

Solunum fonksiyon laboratuvarları için tasarlanmıştır.

Uzun kolu olması, hastanın karşısına bir sandalyeye oturup, soğutulmuş bir çembere flemesine izin verir.

Toplama zamanı sırasında 5-15 dakika (-10 0C) soğuk bir ısı sağlar.

Kolay taşınabilir değildir.

2- RTp (Charlottesville, VA, USA) :

Toplama zamanı daha azdır ve taşınabilirdir.

Kullanıldıktan sonra atılabilir bir polipropilen toplama çemberinin etrafında alüminyum soğutucu bir boru vardır.

Soğutucu borunun ısısı araştırmacı tarafından seçilir.

Alet, tükrük kontaminasyonunu engeller.

Filtre kullanılması enfeksiyöz partiküllerin taşınmasını engeller.

6 yaş ve üzeri çocuklar kooperedir ve zorluk veya ağrı olmadan uygulanabilir (63).

Bölümümüzde yakın zamanda her iki cihazda kullanıma sokulmuş ve bunlarla ilgili yeterli deneyim oluşmuştur. Buna göre ön çalışmalarımız Ecoscreen cihazının özellikle toplanan hacim ve protein, lipid mediatör konsantrasyonu bakımından RTüp cihazına üstünlükleri olduğunu göstermiştir (64). Bu çalışmamızda da verilen nefes havasının toplanması için Ecoscreen cihazı kullanılmıştır.

EBC ile volüm, Ph, H₂O₂, Na, K, Ca, Cl, NO₂, NO₃, elektrolitler, eser elementler, LTB₄, LTE₄, PGE₂, PGD₂-methoxime, thromboxane B₂, sistenil-lökotrienler, 8-isoprostan, IL-6, aldehidler (malondialdehid, hekzanal, heptanal, nonanal), 3-nitrotirozin, nitrozotioller, glutatyon, vitronektin, endotelin-1 ve fosfolipidler çalışılabilir (65).

Tablo 2. EBC`de farklı pulmoner hastalıklarda inflamatuvar mediatörler (63)

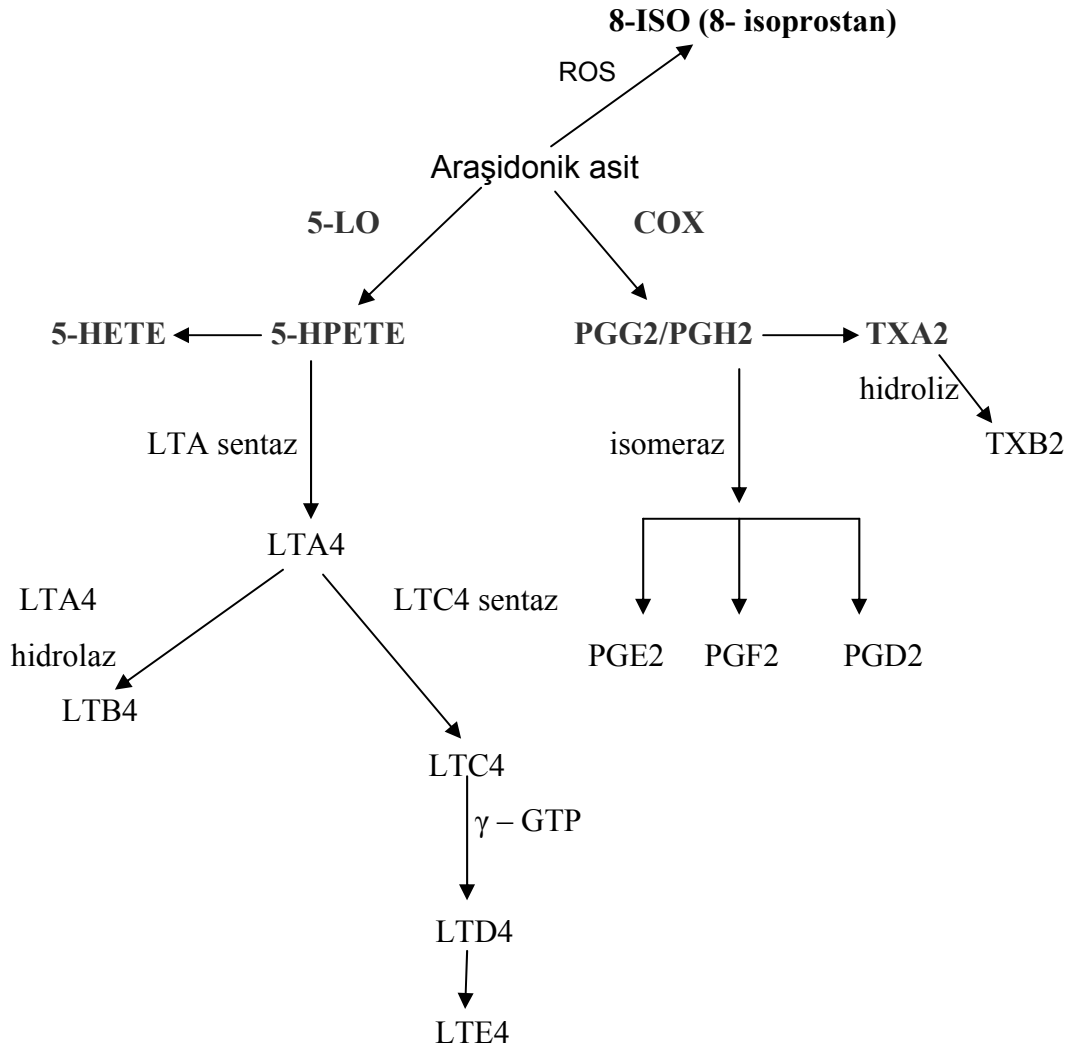
Pulmoner hastalık	Mediatör
Kronik obstruktif pulmoner hastalık	H ₂ O ₂ , 8-isoprostan, serotonin, sitokinler (IL-1, Sı1 2R, TNF- α)
Astım	H ₂ O ₂ , 8-isoprostan, Nitrotrosin, Tiobarbiturik Asit-reaktif ürünleri, Lökotrienler, Ph
Kronik bronşit	Lökotrienler
Bronşektazi	H ₂ O ₂
Kistik fibrozis	H ₂ O ₂ , Nitrit, 8-isoprostan, IL-8
ARDS	H ₂ O ₂ , 8-isoprostan, PGE ₂

2.6a. Yoğunlaştırılmış nefes havasında oksidasyon belirteçleri

Yoğunlaştırılmış nefes havasında oksidatif stres belirteci olarak 8-isoprostan, malondialdehid ve glutatyon kullanılmıştır.

2.6b. 8-isoprostan

Oksidatif stres hücre membranında lipid peroksidasyonuna ve isoprostanlar olarak adlandırılan yeni bir grup prostanoidlerin oluşumuna yol açar (66). 8-isoprostan PGF2 α en iyi bilinen izomerdir, serbest radikallerin katalizasyonu sonucu araşidonik asit peroksidasyonundan, siklooksijenazdan bağımsız olarak oluşur (67). İsooprostan kimyasal olarak stabildir, in-vivo oluşur, lipid peroksidasyonu için spesifiktir, antioksidanların klinik farmakolojisini tanımlamak için kullanılır (68). 8-isoprostan insan bronşiyal düz kasının in vitro kontraksiyonu gibi potent biyolojik aktiviteye sahiptir. Bu da astım patofizyolojisinde önemlidir (69). 8-isoprostan baskın olarak non-enzimatik reaksiyon ile araşidonik asitten oksidatif metabolizma tarafından üretilir, fakat 8-isoprostanın küçük bir miktarı siklooksijenaz yolağında üretilir. 8-isoprostan ölçümü oksidatif stresin güvenilir bir belirteci olabilir (70).



Şekil 2. 8-isoprostan oluşumu (70).

EBC kullanılarak birçok havayolu oksidatif stres belirteci araştırılmıştır, yüksek 8-isoprostan düzeyleri kronik obstrüktif pulmoner hastalıkta (71,72), kistik fibroziste (76), ve astımda (73) bildirilmiştir. 8-isoprostan astmatik erişkinlerde EBC'de yüksek ve konsantrasyonunun astım ciddiyeti ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (74).

8-isoprostanın EBC'de ölçümü ile gerçekleştirilen çalışmalardan bazıları şöyle sıralanabilir:

Steroid kullanmayan 5-17 yaş arası astımlı çocuklar üzerinde yapılan çalışmada: 13 steroid kullanmayan, 12 inhale steroid kullanan ve 11 sağlıklı çocukta 8-isoprostan ölçülmüştür. Steroid kullanmayan astımlı çocuklar sağlıklı çocuklarla karşılaştırıldığında 8-

isoprostan 9.3 ± 1.7 ve 3.8 ± 0.6 pg/mL ($p<0.01$), fakat inhale steroid kullanan astımlı çocuklarla sağlıklı çocuklar karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamamıştır 6.7 ± 0.7 ve 3.8 ± 0.6 pg/ml ($p=0.11$). Bu çalışmada astımlı çocuklarda yoğunlaştırılmış nefes havasında 8-isoprostanın yükseldiği ancak astım süresiyle ilişkili olmadığı ve inhale kortikosteroid tedavisiyle normale dönmediği gösterilmiştir (73).

Sağlıklı 12, steroid kullanmayan 12 astımlı ve inhale steroid tedavisi alan 30 stabil hafif - orta persistan astımlı çocukta yoğunlaştırılmış nefes havasındaki 8-isoprostanın radyoimmünoassay yöntemi ile ölçüldüğü bir çalışmada sağlıklı çocuklarda 34.2 ± 4.5 pg/mL, inhale steroid alan grupta 47.2 ± 2.3 pg/mL ($p<0.05$) tedavi almayan grupta ise 56.4 ± 7.7 pg/mL; ($p<0.01$) saptanmıştır, İki astımlı grup arasında ise fark saptanmamıştır ($p=0.14$), astımlı çocuklarda stabil durumda 8-isoprostan konsantrasyonunun arttığı fakat inhale kortikosteroidle tedaviye dirençli olduğu gösterilmiştir (74).

Sigara içmenin yoğunlaştırılmış nefes havasındaki 8- isoprostana etkisi 12 sigara içen ve 10 sağlıklı sigara içmeyen, 25 kronik obstrüktif akciğer hastalığı olması nedeniyle sigarayı bırakan, 15 kronik obstrüktif akciğer hastalığı olup sigara içmeye devam eden hastada ölçülmüştür. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı olması nedeniyle sigarayı bırakan grupta (40 ± 3.1 pg/mL) ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı olup sigara içmeye devam eden grupta (45 ± 3.6 pg/mL) sağlıklı sigara içenlerle karşılaştırıldığında 1.8 kat arttığı [sağlıklı sigara içenlerde 24 ± 2.6 pg/mL, $p<0.001$], sağlıklı sigara içmeyenlerde daha düşük konsantrasyonlarda [10.8 ± 0.8 pg/mL, $p<0.05$] ölçülmüştür. Bu çalışmada kronik obstrüktif akciğer hastalığında serbest radikallerin arttığı ve sigaranın oksidatif strese akut artışa neden olduğu bulunmuştur (75).

Erişkinlerde yoğunlaştırılmış nefes havasında 8- isoprostanın sağlıklılarda, 12 hafif astımlı, 17 orta astımlı ve 15 ağır astımlı hastada ölçülerek yapılan diğer bir çalışmada; inhale steroid almayan hafif astımlı hastalarda 33.7 ± 2.8 pg/mL, $p<0.001$, inhale steroid alan orta

şiddetli astımlılarda 38.3 ± 3.7 pg/mL, $p < 0.001$, ciddi astımlılarda (oral steroid alan) 48.9 ± 5.0 pg/mL, $p < 0.001$ ve sağlıklı grupta 15.8 ± 1.6 pg/mL olarak bulunmuştur. Astımlı hastalarda oksidatif stres artışının yoğunlaştırılmış nefes havasında 8-isoprostan konsantrasyonu ile gösterilebileceği bildirilmiştir (71).

Astım, bronşektazili erişkinlerde balgamda 8-isoprostanın gösterildiği bir çalışmada; 71 stabil astım hastası, 23 bronşektazili, 29 sağlıklı grup ve 39 akut atakta olan astımlı hasta incelendiğinde; balgamdaki 8- isoprostan konsantrasyonları stabil astımlılarda 216(103-389)ng/L, bronşektazili hastalarda 698(264-1,613)ng/L, kontrollerde 123(41-290)ng/L ($P < 0.001$) ve ataktaki hafif intermitant astımlılarda 115(42-153)ng/L, hafif persistan olanlarda 116(89-229)ng/L, orta persistan olanlarda 183(110-317)ng/L, ağır persistan grupta 387(102-587)ng/L ($P = 0.010$) tespit edilmiştir. Ataktan 4-6 hafta sonra bakıldığında 8- isoprostan düzeylerinin azaldığı ($p < 0.001$) bulunmuştur. Bu çalışmada inflamatuvar hava yolu hastalığının patofizyolojisinde 8-isoprostanın olduğu, hastalığın tipi, paterni ve aktivitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (77).

Bu çalışmalar yoğunlaştırılmış nefes havasında 8-isoprostanın ölçülebilirliğini göstermektedir, ancak vaka sayıları azdır.

2.6c. Malondialdehid

İnflamasyonda oluşan hidroksil radikali, hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen ürünleri hücre zarındaki poliunsature yağ asitlerini hasara uğratar (78). Hasarlı hücre zarı lipidleri ve lipid peroksidasyonunun son ürünleri, hücrelerin hatta dokuların canlılığı için risk oluşturur. Biyolojik sistemlerde oksidanlarca lipid hidroperoksidasyonu ile hücre zarı yüzeyindeki okside yağ asitleri ve poliunsatüre lipidlerin yıkılması sonucunda aldehidler oluşur (79). Malondialdehid [thiobarbitürik asid reaktif ürünleri (TBARS)] de bu sırada oluşan bir çeşit aldehittir ve dokular, bronkoalveolar lavaj sıvısı ve serum gibi vücut

sıvılarında reaktif oksijen maddelerinin oluşturduğu lipid peroksidasyonunun dolaylı bir göstergesidir (79).Biyolojik ortamlarda MDA hem serbest hem de proteinler, nükleik asitler gibi makromoleküllerin SH ve NH₂ gruplarına bağlı olarak bulunur. Biyolojik örneklerde çok küçük miktarlarda serbest MDA bulunur. Bundan dolayı, genellikle total (serbest ve bağlı) MDA değerlendirilir (79). DNA ve proteinlerle etkileşimi potansiyel olarak mutajenik ve kanserojenik olduğunu göstermiştir. Biyolojik örneklerde MDA' nın esas kaynağı iki veya daha fazla metilenle çift bağı kesilen poliansature yağ asitleri peroksidasyonudur.

Bölümümüzde yapılan bir çalışmada 14 astımlı çocuğun atak sırasında ve remisyonda malondialdehid düzeyleri kontrol grubundaki 12 sağlıklı çocuğunki ile karşılaştırıldı (80,81). Astımlı çocukların remisyondaki serum malondialdehid düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış bulundu ($p=0.018$). Ayrıca astımlı hastaların atak sırasındaki serum malondialdehid düzeyleri remisyon sırasındaki malondialdehid düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı miktarda arttığını gösterdi ($p<0.001$). Özaras ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada 14 hafif astımlı hastanın malondialdehid düzeyleri kontrol grubundaki 24 sağlıklı kişiyle karşılaştırıldı (82). Astım hastalarının serum ve bronkoalveolar lavaj sıvılarında malondialdehid düzeylerinin arttığı saptandı. Fluticason propianat tedavisi sonrasında astım hastalarının serumlarında malondialdehid düzeyinin tedavi öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı miktarda azaldığı gösterildi ($p=<0.001$). Aynı çalışmada hastaların tedavi öncesi ve sonrasındaki FEV₁ değişimi ile serum ve bronkoalveolar lavaj sıvısındaki malondialdehid seviyesindeki değişim arasında negatif ilişki gösterildi ($r =-0.4$, $p=<0.05$ ve $r =-0.5$, $p=<0.05$). Bu çalışmalar, malondialdehidin çocukluk çağında akut fazda yüksekken, tedavi sonrasında düşmesinin astım için klinik durumu iyi yansıttığını düşündürür. Ancak her iki çalışmada da hasta ve kontrol grubu vaka sayısı azdır ve oksidatif stresi belirleyen faktörler ortaya konmamıştır.

MDA, serumda ve diğer vücut sıvılarında lipid peroksidasyonunu göstermek için en sık kullanılan üründür. 1960 ' dan beri bu molekülün oksidatif streste seviyesini ölçmek için birçok in-vivo ve in-vitro metod geliştirilmiştir. Çoğu çalışmada, MDA ölçümü esas olarak tiyobarbitürik asit (TBA) ile türevlenmesine dayanır ve spektrofotometre ile kolay ölçülür. MDA' dan başka oksidasyondan kaynaklanan birçok bileşikle de reaksiyona girebilir. Akciğerdeki oksidatif stresi değerlendirmek için kronik hava yolu inflamasyonunun bir göstergesi olan malondialdehid sabit, güvenilir bir yöntemle yoğunlaştırılmış nefes havasında ölçülebilir. Nefes kondensatında MDA ölçümü için high performance liquid chromatography (HPLC)' nin hassas bir metod olduğu gösterilmiştir (84).

Corradi ve arkadaşları tarafından kronik hava yolu inflamasyonunda balgamda ve yoğunlaştırılmış nefes havasında oksidatif stres belirteçlerinin karşılaştırılmasını içeren bir çalışma yapılmıştır (85).

Astım ve kronik obstruktif akciğer hastalığı olan (10 hafif – orta astım, 11 hafif-orta ve ciddi kronik obstruktif akciğer hastası) 21 kişilik grupta balgamdaki ve yoğunlaştırılmış nefes havasındaki aldehid konsantrasyonları ölçülmüştür. Balgamda MDA konsantrasyonu 132.5 nM (82.5-268.8) ve yoğunlaştırılmış nefes kondensatında 23.7nM (9-53.7) olarak bulunmuştur. Çoğu aldehid konsantrasyonunun balgamda nefes yoğunlaştırılmış havasından daha yüksek olduğu, lipid peroksidasyon ürünlerini yoğunlaştırılmış nefes havasında ve balgamda ölçmenin bağımsız teknikler olduğu bildirilmiştir. Aynı grup tarafından yapılan bir diğer çalışmada astım atağında olan çocuklarda yoğunlaştırılmış nefes havasında aldehidler ve glutasyon düzeyleri ölçülmüştür (86). Astım hastalığı olan 12 vaka astım atağı sırasında ve 5 günlük prednizon tedavisi sonrası değerlendirilmiştir. Astımlı hastalarda atak sırasında MDA düzeyleri (30.2 ± 2.4 nM) kontrol grubundan (19.4 ± 1.9 nM, $p=0.002$) daha yüksek bulunmuştur ve steroid tedavisi sonrasında (18.5 ± 1.6 nM , $P=0.001$) azaldığı gösterilmiştir. Glutasyon düzeyleri atak sırasında astımlı grupta (5.96 ± 0.6 nM), kontrol

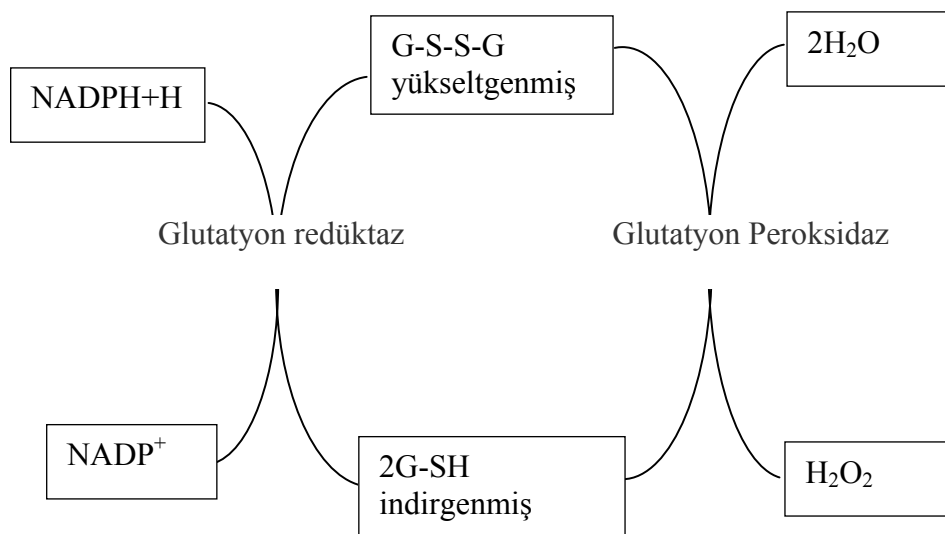
grubunda (14.1 ± 0.8 nM, $p < 0.0001$) ve tedavi sonrası astımlı grupta (8.44 ± 1.2 nM, $p = 0.04$) bulunmuştur (87). Bu çalışma astımlı ve sağlıklı çocuklarda yoğunlaştırılmış nefes kondensatında MDA ve glutatyon düzeylerinin ölçülebileceğini, astım atağı döneminde MDA düzeylerinin arttığı, glutatyon düzeylerinin azaldığını ve 5 günlük oral steroid tedavisi sonrasında MDA düzeylerinin azalırken glutatyon düzeylerinin arttığını göstermiştir.

Kronik obstruktif akciğer hastalığı olan hastalarda EBC'de aldehidlerin ölçüldüğü bir çalışmada, aldehidler liquid kromatografi-tandem mass spektrometri ile ölçülmüş; sigara içen kontrol grubu (35.6 ± 4.0 nM/L, $P = 0.007$) ile karşılaştırıldığında MDA, kronik obstruktif akciğer hastalığında (62.3 ± 4.7 - 54.2 ± 2.4 nM) artmış olarak bulunmuştur ve sigara içmeyen kontrol grubunda MDA (17.7 ± 5.5 nM/L, $P < 0.0001$) daha düşük olarak ölçülmüştür (88). Bu çalışmada aldehidlerin EBC'de ölçümüne etki edebilecek faktörler de araştırılmıştır. MDA'nın EBC'deki konsantrasyonuna verilen nefes havasının üflenme hızının etki etmediği (200, 150, 100, 50 ml/sn üfleme hızlarında MDA değerleri 19.5 ± 3.2 , 17.5 ± 1.2 , 17.4 ± 0.1 ve 17 ± 1.6 nM/L), verilen nefes havası 10 dakikada toplandığında MDA düzeyleri 16.4 ± 2.4 mL, 20 dakikada toplandığında 17.1 ± 1.7 mL toplama süresinin yoğunlaştırılmış nefes hava völümünü etkileyebileceği ama nefesteki aldehid miktarına etki etmeyeceği, sigara içmeden önce EBC'de MDA 31.0 ± 5.2 nM/L, bir sigara içtikten sonra ise 36.6 ± 8.8 nM/L olduğu gösterilmiştir (92). Antioksidan enzimlerdeki genetik değişiklikler ile yoğunlaştırılmış nefes havasındaki MDA arasındaki etkileşimi gösteren bizim bilgilerimiz dahilinde bildirilmiş çalışma yoktur.

MDA' nın ve dolayısı ile lipid peroksidasyonunun oluşturduğu hasarı engellemeye çalışan en önemli mekanizmalar antioksidan enzimlerdir. Astımlı hastalarda antioksidanları göstermek için en çok kullanılan glutatyonudur.

2.6d. Glutasyon

Oksidatif stres sırasında oluşan reaktif oksijen maddelerinin ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. Birçok hücrede bulunan ve bir tripeptid tiol (L- γ -glutamil-L-sistein-glisin) olan redükte glutasyon, hidrojen peroksidi kimyasal olarak detoksifiye edebilir (89). Glutasyon peroksidaz tarafından katalizlenen bu reaksiyon, artık koruyucu özellikleri olmayan okside glutasyonu (GSSG) oluşturur. Yeni oluşan reaktif oksijen maddelerinin detoksifikasyonunun devam edebilmesi için azalan redükte glutasyon yerine konulmalıdır. Hücre, indirgeyici elektronların kaynağı olarak NADPH'ı kullanarak, glutasyon redüktazın katalizlediği bir reaksiyon ile indirgenmiş glutasyonu tekrar oluşturur. Böylece, NADPH hidrojen peroksidin indirgenmesinde dolaylı olarak elektronları sağlar (şekil3) (89). Redükte glutasyon sentezindeki hız kısıtlayıcı enzim γ -glutamil sistein sentazdır (γ GCS), γ GCS geninin promotor bölgesinde bulunan redox sensitif transkripsiyon faktör aktivatör protein-1 (AP-1) oksidan strese cevap olarak aktive olur ve sonuçta γ GCS sentezi artar (90). Oksidan strese yanıt olarak NF- κ B gibi transkripsiyon faktörleri de aktive olur. Yani oksidan stres bir yandan proinflamatuvar diğer yandan da γ GCS gibi koruyucu gen ekspresyonunu artırır. Pro ve anti inflamatuvar gen ekspresyonundaki denge hücre hasarının büyüklüğünü belirler (91).



Şekil 3. Hidrojen peroksidin NADPH İle glutasyon aracılığıyla indirgenmesi (89)

Glutasyon antioksidan özellik gösterir. Özellikle hava yolu epitelyal hücrelerini serbest radikallere (sigara dumanı, hava kirliliği) bağlı hasardan ve inflamasyondan koruyan antioksidan savunma mekanizmalarından biridir (92,93). Yani glutatyonda görülen azalma oksidan stresin arttığına işaret eder. Glutasyon düzeyi epitelyal sıvıda idiopatik pulmoner fibrozis, akut respiratuvar distres sendromu, kistik fibrozis, akciğer transplantasyonu ve HIV de artmışken, hafif astımlı hastaların bronko alveolar lavaj sıvısında total ve okside formu azalmıştır (94). Tükürükte ve balgamda glutasyonu değerlendirmek için 10 sağlıklı, 10 inhale kortikosteroid kullanan stabil astımlı hastada yapılan çalışmada; tükürükteki glutasyon konsantrasyonunun düşük olduğu [1.2 μ M (0.8-1,5) sağlıklı grupta, 0.9 μ M (0.7-1,2) astımlı grupta], balgamda ise sağlıklı ve astımlı grupta [3.9 μ M (1.0-12.3) , [6.4 μ M (1.3-19.2)] p=0.35 tespit edilmiştir. Stabil astımlı grup ile sağlıklı kontrollerin balgamdaki glutasyon düzeyleri arasında fark bulunmamıştır (95). Astımlı hastalarda yoğunlaştırılmış nefes havasında glutasyon değerlerini gösteren Corradi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma (85) dışında literatürde bizim bilgimiz dahilinde çalışma bulunamamıştır. Yine oksidanlardan 8-isoprostan, malondialdehid ve antioksidanlardan glutasyon arasındaki ve antioksidan enzimlerin genetik polimorfizmleri ile ilişkilendiren bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır.

2.7. Oksidatif Stresin Genetik Yapı ile İlişkisi

Astım gelişiminde oksidatif stres ile anti oksidan savunma arasındaki dengesizliğin fark edilmiş olması bu dengesizliğin neden her bireyde benzer olmadığı sorusunu da beraberinde getirmiştir. Neden aynı çevresel ortamda bulunan her atopik kişide astım gelişmediği, astım şiddeti ve bireylerin aynı ilaçlara verdikleri yanıt farklılıkları bilim adamlarının bu konularda hipotezler üretmesine yol açmıştır. Astımın kronik inflamatuvar bir hastalık olması inflamasyonda rol alan anti-oksidan enzimlerin genetik polimorfizimlerinin

araştırılmasına yol açmıştır. Bunlar arasında glutatyon-S-transferaz ve süperoksit dismutaz süpergen aileleri en çok araştırılanlardır. Glutatyon-S-transferaz ve süperoksit dismutaz enzimleri akciğer alveolar epitelinde eksprese olurlar ve reaktif oksijen maddelerini detoksifiye ederler.

2.7a. Glutatyon-S-Transferaz

Glutatyon-S-transferaz (GST) enzimleri reaktif oksijen maddeleri tarafından oluşturulan okside lipid, DNA ve katekol ürünleri içeren elektrofilik bileşenleri detoksifiye ederler. Glutatyon-S-transferaz sitozolik ve mikrozomal olmak üzere iki ayrı izoenzim süper ailesinden oluşur. Sitozolik enzim dimerik yapıda olup, temel olarak toksik ksénobiyotik ve endobiyotiklerin biyotransformasyonunda görev alır (88,95). Mikrozomal izoenzim ailesi ise trimerik yapıda olup, araşidonik asit metabolizmasında rol alır (95,96).

Sitozolik glutatyon-S-transferaz süper ailesi genleri 16 adet olup, kromozomal lokalizasyona göre α , κ , μ , π , δ , θ , ζ , Ω olmak üzere 8 ayrı sınıfa ayrılır (97). Bu sınıflar yüksek sekans homolojisi gösterir. Ancak her bir sınıfın substrat özgünlüğü farklıdır (98). Örneğin, katekolaminlerin quinon metabolitlerini (dopakrom) μ GST; okside lipid ve DNA yı θ GST, DNA oksidasyonunda açığa çıkan baz profenollerini (timin profenol) π GST sınıfı detoksifiye eder. Yapılan çalışmalarda glutatyon-S-transferazın her sınıfı içinde birbirleriyle yüksek sekans homolojisi gösteren genlerin olduğu gösterildi. Bu genler, μ sınıfında 5 (M1-M5), α sınıfında 4 (A1-A4), κ sınıfında 1 (K1), π sınıfında 1 (P1), δ sınıfında 1 (S1), θ sınıfında 2 (T1,T2), ζ sınıfında 1 (Z1), Ω sınıfında 1 (O1) olmak üzere toplam 16 tanedir.

Çalışmalar glutatyon s-transferaz gen ailesinin polimorfik olduğunu da göstermiştir (98). Glutatyon-S-transferaz gen ailesinde görülen varyasyonlar başlangıçta iyon yükü ve ağırlığına göre nişasta jel elektroforezi ve net yüke göre izoelektrik fokuslama yöntemleri kullanılarak gösterildi (97). Ancak son zamanlarda glutatyon-S-transferaz genlerindeki

polimorfik ekspresyonların çalışılabilmesi için PCR'a dayalı yöntemler kullanılmıştır. İlgilenilen gen allele özgü enzim kesim noktaları oluşturacak şekilde PCR ile çoğaltıldıktan sonra özgül enzimlerle kesilerek polimorfizimler belirlenir (99).

α , μ , π sınıfı glutatyon-S-transferaz; PGJ2 ve PGA2 gibi prostaglandinlerin redükte glutatyonla konjugasyonunu katalizler. Ortamda azalan prostoglandinler NF- κ B ve PPAR γ (peroksizom proliferatör active eden reseptör γ) gibi transkripsiyon faktörlerini aktive edemezler. İnflamasyonda rol alan mediatörlerin sentezi için gerekli olan transkripsiyon faktörleri aktive olamadığı için mediatörler sentezlenemezler (100).

2.7b. GSTM1

μ sınıfındadır. Kromozom 1p13,3 de yer alır. Karaciğer, akciğer, beyin, adrenal, böbrekte eksprese edilir. GSTM1, katalaminlerin quinon metabolitleri (nochrone, dopachrone, noradrenochrome) , aflatoksin B1-8,9-epoksid, oksipoliaromatik hidrokarbon detoksifikasyonunda rol alır (98-102).

GSTM1*1 (yabanıl tip) ve GSTM1*0 (null tip) olmak üzere iki genotipi vardır (98). Null tipinde gen delesyonu olması nedeniyle bu tipe sahip allel protein ürünü vermez (98). Null genotipi çeşitli popülasyonlarda %50-74 sıklıkta görülürken ülkemizde %55-61 oranda rapor edilmiştir (98-103).

Otto-Knapp ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada septum deviasyonu düzeltme ameliyatı yapılan 20 kişiden ameliyat sırasında nazal mukoza örnekleri alınmış. Nazal mukoza hücre kültürleri yapılmıştır. Her hücre kültürü 37 °C, % 95 hava, % 5 CO2 ve 120 ppb ozon bulunan ortamda 24 saat inkübe edilmiştir. Aynı hastadan elde edilen ikinci bir hücre kültürü, içinde ozon olmayan koşullarda inkübe edilmiştir. Kültür süpernatantından histamin düzeyi ölçülmüştür. Glutatyon-S-transferaz, süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. GSTM1 genotipi PCR metodu

ile saptanmıştır. Ozon içeren örneklerde histamin düzeyi ozon içermeyen örneklere göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Ozon ile karşılaştırılan örneklerde glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz aktiviteleri artmış bulunurken, glutatyon-S-transferaz, glutatyon redüktaz ve katalaz aktivitelerininin değişmediği gözlenmiştir. Ozon ile karşılaştırılmayan örneklerde ise glutatyon-S-transferaz, glutatyon redüktaz ve süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri artmışken, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerininin değişmediği bildirilmiştir. Ozon ile karşılaştırılan örneklerde, GSTM1 null genotipine sahip hastaların süperoksit dismutaz aktiviteleri GSTM1 yabancıl genotipine göre artmış olarak ölçülmüştür ($p=0.011$). Ortamdaki ozonu detoksifiye edecek GSTM1 enzimi olmadığı durumda artan ozonu süperoksit dismutaz detoksifiye ettiği için süperoksit dismutaz aktivitesi artmış olarak bulunmuştur. Diğer antioksidan enzimlerin aktiviteleri ile GSTM1 genotip polimorfizmleri arasında anlamlı ilişki gösterilememiştir. Araştırmacılar GSTM1 null genotipinin intrasellüler redoks durumunu değiştirebildiğini ve oksidatif stresi artırabildiğini belirtmişlerdir (104).

GSTM1 allellerinin homozigot kaybı yani null genotipi, reaktif oksijen maddelerinin rol oynadığı çeşitli hastalıklar ve inflamatuvar durumlar için risk taşımaktadır (29,98-102). Örneğin, multiple skleroz aksonal kayıp ile giden progresif bir hastalıktır. Oksidatif stres sonunda oluşan ürünlerin, proinflamatuvar sitokinlerle beraber miyelin ve aksonu zedelemesiyle karakterizedir. Lojistik regresyon analizi (cinsiyet, yaş ve hastalık süresi düzeltildikten sonra) glutatyon-S-transferaz genotipleriyle multiple skleroz derecesi arasında ilişki göstermiştir. 179 vakanın 10 yıllık izleminde GSTM1 null genotipine sahip hastaların hastalık şiddetinin daha fazla olduğu görülmüş ve bu oluşan reaktif oksijen maddelerinin uzaklaştırılmamasına bağlanmıştır (105).

Over kanserinin de tekrarlayan ovarian travmalar sonunda oluşan reaktif oksijen maddeleri ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. 148 ovarian kanserli hastada GSTM1 null

genotipinde olanların hayatta kalım süreleri ve kemoterapiye yanıtları daha düşük bulunmuştur ($p=0.001$, $p=0.004$) (107).

GSTM1 null genotipinde olan akciğer kanserli hastalarda sigara dumanındaki maddelerin detoksifikasyonunda yetersizlik olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç GSTM1 geninde null genotipine sahip olmanın akciğer kanseri oluşumunda rol oynadığını düşündürmüştür (107).

GSTM ailesi astımda da oluşan oksidatif ürünleri substrat olarak kullanıp detoksifiye ederek koruyucu rol oynar (108). Ayrıca reaktif oksijen maddeleri proinflamatuvar eikozanoidlerin araşidonik asitten mobilizasyonu için gereklidir (109). GSTM, reaktif oksijen madde seviyesini azaltarak astım için kritik olan eikozanoidlerin sentezini de düzenler (108).

GSTM1 genotipinin astım ile ilişkisini araştıran çalışmalar yapılmıştır. Gilliland ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 8-11 yaş arasında 1940 çocuğun 4 yıllık izleminde GSTM1 null olan çocuklarda FEV1 ve FVC de azalmaların anlamlı olduğu gösterilmiştir. (FEV1 için, -0.27% ; 95% CI, -0.50 , -0.04 ve FVC için -0.21% ; 95% CI, -0.40 , -0.03) (110). Aynı çalışmada beyaz, ispanyol, asya ve siyah ırkta enzim aktivitelerinin farklı olduğuna da dikkat çekilmiştir (110). Fryer ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise 202 kişiden oluşan atopik astım, atopik sağlıklı ve nonatopik sağlıklı üç grup oluşturulmuş. GSTM1 genotipi ile atopi, bronş aşırı duyarlılığı ve astım hastalığı arasında bir ilişki gösterilememiştir (101). Gilliland ve arkadaşları ise ragweed allerjisi olan ve sigara içmeyen 19 allerjik rinitli hastaya intranazal ragweed allerjeni ve dizel egsozuyla aynı anda provokasyon testi ve aynı gruba daha sonra sadece intranazal ragweed allerjeni ile provokasyon testi yapmışlardır. Bu çalışmada GSTM1 null genotipine sahip bireylerin dizel egzozuna daha fazla nazal allerjik cevap verdiği öne sürülmüştür. GSTM1 özellikle oksipoliaromatik hidrokarbonları detoksifiye ettiği için bu hidrokarbonlarla karşılaşan allerjik hastalarda GSTM1 null genotipinin olması durumunda detoksifikasyonun yapılamadığı ve

ortamda reaktif oksijen maddelerinin arttığı öne sürülmüştür (102). Tamer ve arkadaşlarının 101 bronşial astımlı, 103 sağlıklı erişkinde yaptığı çalışmada astım hastalarında sağlıklı gruba göre GSTM1 null genotipinin daha sık görüldüğü ancak atopi ile GSTM1 polimorfizimleri arasında bir ilişki olmadığı rapor edilmiştir (111). Glutayon s-transferaz enziminine ait aynı polimorfizimle farklı sonuçların bildirilmiş olmasını etnik farklılıklara bağlı enzim aktivitesinde ki değişiklik ile açıklanabilir (110,111).

2.7c. GSTT1

0 sınıfındadır ve 22q11.23 de lokalizedir. Böbrek, karaciğer, ince barsak, beyin, prostat ve akciğerde eksprese olur. GSTT1 oksidize lipid, DNA ve etilen oksiti substrat olarak kullanır (109).

GSTT1*1 (yabanıl tip) ve GSTT1*0 (null tip) allelleri vardır (95). Null genotip popülasyonda %25-47 (113,116), ülkemizde %20,9-22,7 dir (104). Null tipinde gen delesyonu söz konusu olup protein ürünü yoktur (95), GSTT1*1 allelinin homozigot kaybı (null genotip) kanserler ve inflamatuvar hastalıklar için risk oluşturur, 148 ovarian kanser hastasında GSTT1 null genotipi olanların hayatta kalım süreleri ve GSTM1 null/GSTT1 null birlikteliğinde kemoterapiye yanıtları daha düşük olduğu bulunmuştur (p=0.001, p=0.004) (106).

Duncan ve arkadaşları 245 ülseratif kolit, 112 crohn hastası ve 373 sağlıklı bireyde yaptıkları çalışmada tüm barsağında ülseratif kolit olan hastalarda GSTT1 null genotipinin hem distal kolit hem de sağlıklı bireylere göre daha sık görüldüğünü rapor etmişlerdir (112).

Astım ve allerjik hastalıklarda da GSTT1 geninin etkisi çalışılmıştır. Gilliland ve arkadaşları 8-11 yaş arasındaki 1940 çocuğun 4 yıllık izleminde çocuklarda FEV1 ve FVC değişiklikleri ile GSTT1 null alleli arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır (110). Aynı çalışmada asyalılarda GSTT1 null alleleline daha sık rastlandığına dikkat çekilmiştir (110).

Diğer bir çalışmada Fryer ve arkadaşları 202 vakadan oluşan atopik astımlı, atopik kontrol ve nanatopik kontrol hastalarından oluşan üç grup arasında GSTT1 polimorfizimleri ile atopi, bronş aşırı duyarlılığı ve astım hastalığı arasında ilişki gösterememişlerdir (101). Gilliland ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise ragweed allerjisi olan 19 allerjik rinitli kişide yalnız intranazal ragweed allerjeni ve aynı anda intranazal ragweed allerjeni ile birlikte dizel egzozu ile provokasyon testi yapmışlar. Dizel egzozu ile yapılan provokasyon testine verilen yanıtta GSTT1 genotipleri arasında anlamlı ilişki bulamamışlardır (102). Tamer ve arkadaşlarının 101 bronşial astım hastası ve 103 sağlıklı erişkin kişide yaptıkları çalışmada ise GSTT1 null alleli görülme sıklığında astım hastaları ile sağlıklı kontrol grubu arasında fark bulamadıklarını bildirmişlerdir. Ancak atopik astım hastalarında nanatopik astım hastalarına göre GSTT1 null alleleline daha sık rastlandığını rapor etmişlerdir (111). Glutatyon s-transferaz enziminin değişik aktivitelere sahip olması ve bu güne kadar yayınlanmış mevcut çalışmalarda ki çelişkili sonuçları Gilliland ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmayı (110) kaynak göstererek etnik farklılıklara bağlamışlardır.

2.7d. GSTP1

π sınıfındadır ve kromozom 11q13,3 de lokalizedir (88). GSTP1 beyin, kalp, akciğer, testis ve pankreasta bulunur (88). GSTP1, DNA oksidasyonundan oluşan baz profenolleri (adenin, timin profenol), benzoprin, benzofenantren, lipid ve DNA oksidasyon ürünlerini detoksifiye eder (88).

GSTP1 in dört alleli vardır ve bu alleller 105 ve 114 deki aminoasit farklılıklarına göre adlandırılır (113). 114. aminositte sitozin yerine timin olduğunda ürün alaninin yerine valin olur, ancak bu 114. aminoasit katalitik bölgede olmadığı için detoksifikasyonda önemi yoktur (114). 105. aminoasit ise katalitik bölgede yer alır (103). 105. aminoasiti kodlayan adeninin

guanin olması durumunda ürün izolösün yerine valin olur (115).O halde detoksifikasyonda rol alan GSTP1 geninin 4 alleli şöyle gösterilebilir:

- GSTP1*A (İle105-Ala114)
- GSTP1*B (Val105-Ala114)
- GSTP1*C (Val105-Val114)
- GSTP1*D (İle105-Val114)

Detoksifikasyonda 105, aminoasitte ki allel farklılıkları sonucunda oluşabilecek 3 genotip vardır (27,101). Bunlar:

GSTP1 İle/İle

GSTP1 İle/Val

GSTP1 Val/Val

Bu değişim enzim fonksiyonu üzerinde çeşitli etkilere sahiptir (27,101,102). Pi genleri polisiklik aromatik hidrokarbonlara biyolojik olarak direçli iken pi geni hasara uğratılmış farelerin pi geni olanlara göre bu hidrokarbonları daha az detoksifiye ettikleri ve bu nedenle cilt kanserine duyarlı oldukları bildirilmiştir (116). İn vitro ortamda 105, aminoasiti valin olan enzimin polisiklik aromatik hidrokarbonların diol epoksidlerini 105, aminoasiti izolösün olan enzime göre 7 kat daha fazla detoksifiye ettikleri, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) detoksifikasyonunu ise 3 kat daha az yaptıkları rapor edilmiştir (113,117). Polisiklik hidrokarbonlara katalitik aktivitedeki bu değişikliğin enzimin aktif bölgesindeki yapısal değişiklerden kaynaklandığı düşünölmüştür (117).

İn vivo çalışmalardan elde edilenler ise şöyle özetlenebilir, Multiple skleroz aksonal kayıp ile giden progresif bir hastalıktır. Lojistik regresyon analizi (cinsiyet, yaş ve hastalık süresi düzeltildikten sonra) glutatyon-S-transferaz genotipleriyle hastalığın derecesi arasında ilişki göstermiştir. 179 vakanın 10 yıllık izleminde GSTP1 İle/İle genotipine sahip hastaların

hastalık şiddetinin daha fazla olduğu görülmüş ve bunun nedeni oluşan reaktif oksijen maddelerinin uzaklaştırılmamasına bağlanmıştır (105).

GSTP'nin genomik lokalizasyonu astım ile ilişki gösterilmiş diğer genlerle de yakınlık gösterir. Bronş hiperreaktivitesi ve atopi için en çok ilişki kurulan kromozomlardan biri kromozom 11q dur. Yüksek-afiniteli IgE reseptör (FcεRIβ) ve klara hücre sekresyon protein genleri 11q13 kromozomu üzerindedir (118). GSTP1 in 11q13,3 de yer alması ve astımın kronik inflamatuvar bir hastalık olması nedeniyle astımda ki atopi, bronş hiperreaktivitesi ve astım patogenezinde GSTP1 in de etkisi olabileceğini akla getirebilir. Bu noktadan yola çıkan Fryer ve arkadaşlarının çalışmasında 202 katılımcının allerji, mevsimsel rinit, egzema, allerjik konjoktivit öykü varlığına, cilt testi sonuçlarına, serum IgE seviyesinin 100 IU/ml nin üstünde olmasına, hava yolu obstrüksiyonuna (%FEV1 de %15 den fazla değişiklik) göre hastaları atopik astımlı, atopik kontrol ve nanatopik kontrol olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (101). Katılımcıların GSTP1 İle/İle, GSTP1 İle/Val, GSTP1 Val/Val ile atopi, bronş hiperreaktivitesi ve astım ilişkisi değerlendirilmiştir. GSTP1 Val/Val sıklığının atopik bireylerde (cilt testi pozitif ve IgE>100 IU/ml) nonatopik bireylere göre daha az gözlendiği belirtilmiştir (p=0.010). Buna göre GSTP1 İle/İle genotipinin sıklığı havayolu reaktivitesi/obstrüksiyonu ile paralel olarak artarken GSTP1 Val/Val genotipinin azaldığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada havayolu reaktivitesi/obstrüksiyon şiddetinin artması ile GSTP1 İle/İle ve GSTP1 İle/Val genotipi arasında doğrusal (p=0.017, ki-kare), GSTP1 Val/Val genotipi ile ters ilişki olduğu gösterilmiştir (p=0,043, ki-kare). GSTP1 Val/Val genotipi astım hastalığı ile ilgili bulunmuştur. Buna göre İle/İle genotipine göre astım riskinin Val/Val olan hastalarda 9 kat azaldığı bildirilmiştir (p=0.004, düzeltilmiş OR:0,11; 95% CI:0,02-0,50) (düzeltme yaş, cinsiyet, cilt testi pozitifliği ve IgE>100 IU/ml).

Gillilan ve arkadaşları ise ilk öğretim okuluna giden 1940 çocuğun GSTP1 genotipleri ile akciğer fonksiyonları arasındaki ilişkiyi araştırmıştır (110). GSTP1 Val/Val homozigotluğu

olan çocuklarda akciğer fonksiyon gelişiminin GSTP1 İle/İle veya GSTP1 İle/Val olanlara göre daha yavaş olduğu tespit edilmiştir (FVC -0.35%; 95% CI, -0.62, -0.07; ve FEV1% -0.34%; 95%CI, -0.68, 0.00). Ayrıca FVC, FEV% ve maksimum- orta ekspiryum akımları değerlerindeki azalmanın GSTP1 Val/Val genotipine sahip çocuklarda en fazla olduğu bildirilmiştir. Bu ilişkinin İspanyol ırkından olmayan beyaz çocuklarda daha güçlü olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada astımda oluşan oksidatif stresinin yarattığı zararın Val alleleline sahip çocuklarda daha fazla olduğu yorumu yapılmıştır.

Bir diğer çalışmada ise Tamer ve arkadaşları 101 bronşial astımlı, 103 sağlıklı erişkinde astım hastalarında GSTP1 Val/Val genotipinin sağlıklı bireylere göre daha sık rastlandığını bildirmişlerdir (%22.8 ve %7.8) (111) . GSTP1 İle/Val veya İle/İle genotipine sahip olmanın astım riskini GSTP1 Val/Val göre 3.68 kat artırdığını rapor etmişlerdir (OR: 3.68; 95% CI, 1.44-9.38).Astım hastalarında GSTP1 Val allelinin sıklığının (%45.0) kontrol grubuna (%27.3) göre daha yüksek, GSTP1 İle alleleline sahip astım hastalarına (%55.0) göre daha düşük bulmuşlardır ($p < 0.01$). GSTP1 Val/Val genotipinin atopik astımlılarda nonatopik astımlılardan daha sık görüldüğünü bildirmişlerdir (%28.1 ve %13.5). Çalışmadaki astım hastalarında yapılan analizde GSTP1 Val/Val homozigotluğun atopik astım gelişme riskini 3.55 kat artırdığını öne sürmüşlerdir (OR:3.55; 95% CI, 1.10-12,56).

Bu üç çalışmada elde edilen ve birbiriyle çelişen sonuçların sebebini net olarak açıklamak olanaksızdır. Aradaki farklar çalışılan toplumlardan kaynaklanabileceği gibi, hastalık fenotipini özellikle de sağlıklı hastaların fenotipini belirlemedeki yetersizlikten de kaynaklanabilir.

Bölümümüzde Kalaycı ve ekibi tarafından yapılan bir çalışmada; 196 hafif astım, 116 orta-ağır astım ve 2 sağlıklı kontrol grubunda (187/ 68) çocuk GSTT1 ve GSTM1 null tip, GSTP1 İle/Val genotipi açısından genotiplendirilmiş. GSTP1 val/val genotipindeki astımlı çocuklarda malondialdehid düzeylerinin daha yüksek ve glutatyon düzeylerinin daha düşük

olduğu ($P = .023$ ve $P = .014$), GSTP1 val/val genotipinin astım ciddiyeti ile ilişkili olmadığı (odds ratio, 4.210; 95% CI, 1.581-11.214; $P = .004$) ve GSTP1 val/val genotipinde ile105val lokusunun oksidatif hasarın derecesini belirlemede etkili bir factor olabileceği gösterilmiştir (119).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Çalışma Grubu

Yoğunlaştırılmış nefes havası toplanan hastalar:

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Allerji ve Astım Ünitesi kliniğine Ekim 2005-Eylül 2006 tarihleri arasında başvuran 140 astımlı hasta ve 191 sağlıklı çocuk bu grubu oluşturdu.

Astımlı grupta çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- 6-18 yaş arasında olmak
- Son 2 yıl içinde bronkodilatör sonrası FEV1'de en az %12 artışın gösterilmiş olması veya metakolin (Mch) ile yapılan provakasyon testinde Mch PD20 <8mg/dL olması

Çalışma dışı bırakılma kriterleri:

- Son 4 hafta içinde astım alevlenmesi
- Son 4 haftada üst/alt solunum yolu enfeksiyonu geçirmek
- Herhangi bir sistemik hastalığı olması

Hastaların son 72 saat içinde uzun etkili beta agonist almamış olmasına dikkat edildi.

Astım ciddiyeti GINA kriterlerine göre (2) hafif intermitan, hafif persistan ve orta-ağır astım olarak belirlendi.

Kontrol grubunda çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- Doktor tanılı bronşit, astım bronşit, allerjik bronşit, astım tanısı olmayan
- 6-18 yaş arası
- Herhangi bir sistemik hastalığı ve sürekli kullandığı bir ilaç olmayan
- Son 4 hafta içinde üst/alt solunum yolu enfeksiyonu geçirmemiş sağlıklı çocuklardan oluşturuldu.

Yoğunlaştırılmış nefes havası toplanan grupta yapılan ölçümler:

- Solunum fonksiyon testleri yapıldı (2130 Spirometer, Sensor Medics Co., CA, ABD).
- Total IgE düzeyleri Uni-Cap sistemi ile ölçüldü (Pharmacia, Kalamazoo, MI).
- Eozinofil sayısı Coulter Counter İle belirlendi.
- Sağlıklı çocuklara ise 8 allerjenle (Dp,Df, kedi, alternaria, süt, polen, çayır miks, ağaç miks) deri testi yapıldı. Pozitif kontrol olarak histamin, negatif kontrol olarak serum fizyolojik kullanıldı. Negatif kontrole göre 3 mm'den daha büyük endurasyonlar pozitif olarak değerlendirildi. Deri testlerinin en az bir tanesi pozitif olan çocuklar atopik kabul edildi.
- Tüm çocukların antekubital bölgesinden EDTA'lı vasat içine venöz kan örnekleri alındı (10 cc). Alınan kandan plazma ayrıldı ve DNA periferik kandan standart fenol/kloroform prosedürüne uygun olarak izole edildi. Plazma ve DNA örnekleri analiz edilene kadar -80° C'de saklandı.
- 140 astımlı hastadan ve 191 sağlıklı kontrolden yoğunlaştırılmış nefes havası, 10 dakika süreyle yoğunlaştırılmış nefes kondensatı (EcoScreen, Hoechberg, Almanya) ile toplandı. Toplanan havanın biriken sıvı kısmı 130µL'lik tüplere konularak kuru buz içerisinde laboratuvara ulaştırıldı. Örnekler analiz edilene kadar -80° C'de saklandı.

Sistemik çalışma yapılan astımlı grup:

- EBC toplanan hastalar ve daha önce sistemik çalışma yapılmış hastalardan oluşturuldu. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Allerji ve Astım Ünitesi kliniğine Ekim 2002-Nisan 2004 tarihleri arasında başvuran GINA (Global Initiative for Asthma) kriterlerine (2) göre bir çocuk allerji uzmanı tarafından hafif astım tanısı almış 6-18 yaşında 663 hastanın içinden son 6 hafta

içinde üst/alt solunum yolu enfeksiyonu ve akut astım atağı geçirmemiş, başka bir sistemik hastalığı olmayan, ilaç kullanmayan hastalar arasından gelişigüzel yöntemle seçilen 200 tanesi çalışmaya dahil edildi.

- Çalışmaya aynı dönemde GINA kriterlerine göre 6-18 yaşındaki 118 orta-ağır persistan astım hastasından genotiplenme sonuçları ve sistemik malondialdehid / glutasyon düzeyleri elde olunan 112 sı dahil edildi.
- Tekrarlayan hışıltı öyküsü olan, spirometrede bronkodilatör sonrası birinci saniye zorlu ekspiratuvar hacimde (FEV1) %12 ve üzerinde artma veya 8 mg ve daha düşük metakolin inhalasyonu ile % 20 ve üzerinde FEV1 de azalma belirlenen, anti-astım tedaviye yanıt veren hastalar astım olarak kabul edildi.
- Her hasta GINA kriterlerine göre tedavi başlanmadan önceki astım klinik öyküleri temel alınarak astım şiddeti hafif, orta ve ağır olarak sınıflandırıldı. Çalışmaya alınırken tedavi alanlar ise çalışmaya alındıkları zamanki mevcut klinik özellikleri ve kullanmakta oldukları günlük tedavi rejimlerine göre astım şiddetleri belirlendi.

Sistemik çalışma yapılan astımlı grupta ölçümler:

- Astımlı hastaların spirometrik ölçümleri yapıldı (2130 Spirometer, Sensor Medics Co., CA, ABD).
- Total IgE düzeyleri Uni-Cap sistemi ile ölçüldü (Pharmacia, Kalamazoo, MI).
- Eozinofil sayısı Coulter Counter İle belirlendi.
- Tüm çocuklara 30 aero-allergen ve 8 besin allergeninden oluşan 38 allergenle cilt testi yapıldı. Pozitif kontrol olarak histamin, negatif kontrol olarak serum fizyolojik kullanıldı. Negatif kontrole göre 3 mm'den daha büyük endurasyonlar pozitif olarak değerlendirildi. Cilt testlerinin en az bir tanesi pozitif olan çocuklar

atopik kabul edildi. Kontrol grubunun FEV1 değeri , cilt testleri daha önce yapılan ISAAC alışması sırasında belirlenmişti (12).

- Tüm ocukların antekubital bölgesinden EDTA'lı vasat içine venöz kan örneklere alındı (10 cc). Alınan kandan plazma ayrıldı ve DNA periferik kandan standart fenol/kloroform prosedürüne uygun olarak izole edildi. Plazma ve DNA örneklere analiz edilene kadar -80° C'de saklandı.

Tablo 3. GİNA kriterlerine göre çalışmaya alınan hastaların astım şiddetinin belirlenmesi

	Hafif intermitant	Hafif persistant	Orta persistant	Ağır persistant
FEV1	≥80	≥80	%60-80	≤60
İlaç	Yok	İKS (100-400µg) LA	İKS(400-800 µg) veya İKS+UEBA veya İKS+LA	İKS(>800 µ g) + UEBA veya + LA veya+ OKS

Çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Krulu tarafından onaylandı. Tüm aileler çalışma ile ilgili bilgilendirildi ve bilgilendirilmiş onam formu alındı.

3.2. Yoğunlaştırılmış Nefes Havaşının Toplanması

Çalışmaya dahil edilen son iki yıl içerisinde gösterilmiş reverzibilitesi olan astımlı 140 hastadan ve 191 sağlıklı kontrolden ECoScreen (Hoechberg, Almanya) ile 10 dakika, burun maşası kullanılmadan yoğunlaştırılmış nefes hava kondensatına normal nefes alıp verme şeklinde üflemleri ile nefesin sıvı volümü toplandı.

3.3. Redükte Glutatyon lm

Nefeste antioksidan savunma sisteminin göstergesi olarak redükte glutatyon lld. Nefeste redükte glutatyonun sülfidril grupları 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoik asit (DTNB,

Ellman's reagenti) ile reaksiyona girerek 5-thio-2-nitrobenzoik asit (TNB) oluşturur ve renk sarıya dönüşür. TNB konsantrasyonunun 405 nm (bazı durumlarda 415nm) de ölçülmesi glutayon miktarını verir. Bunun için 100µL nefes volümü kullanıldı (85,86).

3.4. Malondialdehid Ölçümü

Nefeste oksidatif stresin dolaylı göstergesi olarak peroksidasyon ürünlerinden malondialdehid ölçüldü. Nefeste malondialdehid ve tiyobarbitürik asit kombinasyonunun analizi HPLC yardımıyla yapıldı. Bunun için 200 µl nefes volümü kullanıldı (83,84,85).

3.5. 8-İsoprostan Ölçümü

Yoğunlaştırılmış nefes havasında oksidatif stresin göstergesi olarak lipid peroksidasyon ürünlerinden nonenzimatik yolla üretilen, stabil kalabilen 8- isoprostan ölçüldü. Nefeste 8-isoprostan ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) (Cayman Chemical, Milan, Italy) ile 50µL nefes volümü kullanılarak ölçüldü.

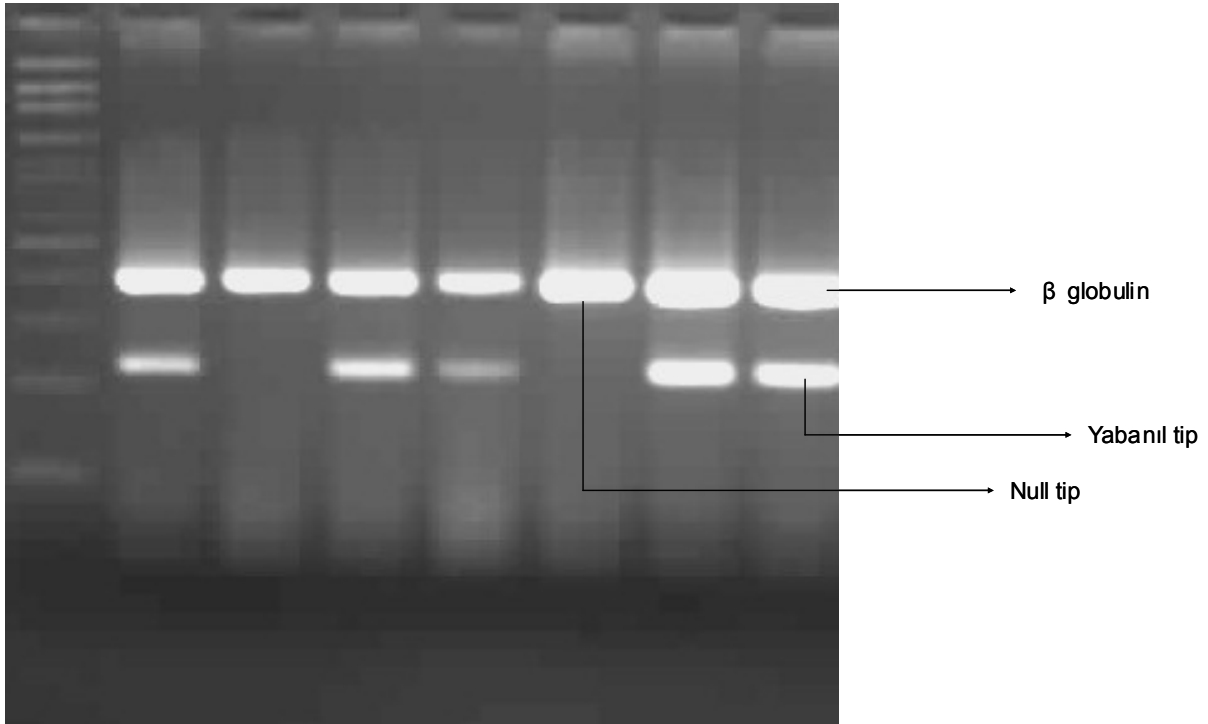
3.6. Genotiplendirme

Tüm çocuklar GSTM1 ve GSTT1 enzimlerinde yabanıl ve null ; GSTP1'de İle105Val polimorfizmleri varlığı açısından genotiplendirildi.

GSTM1 ve GSTT1 multipleks PCR metodu ile amplifiye edildi (120). Pozitif kontrol olarak β-globin geni kullanıldı. GSTM1 primerlerinin sekansları:

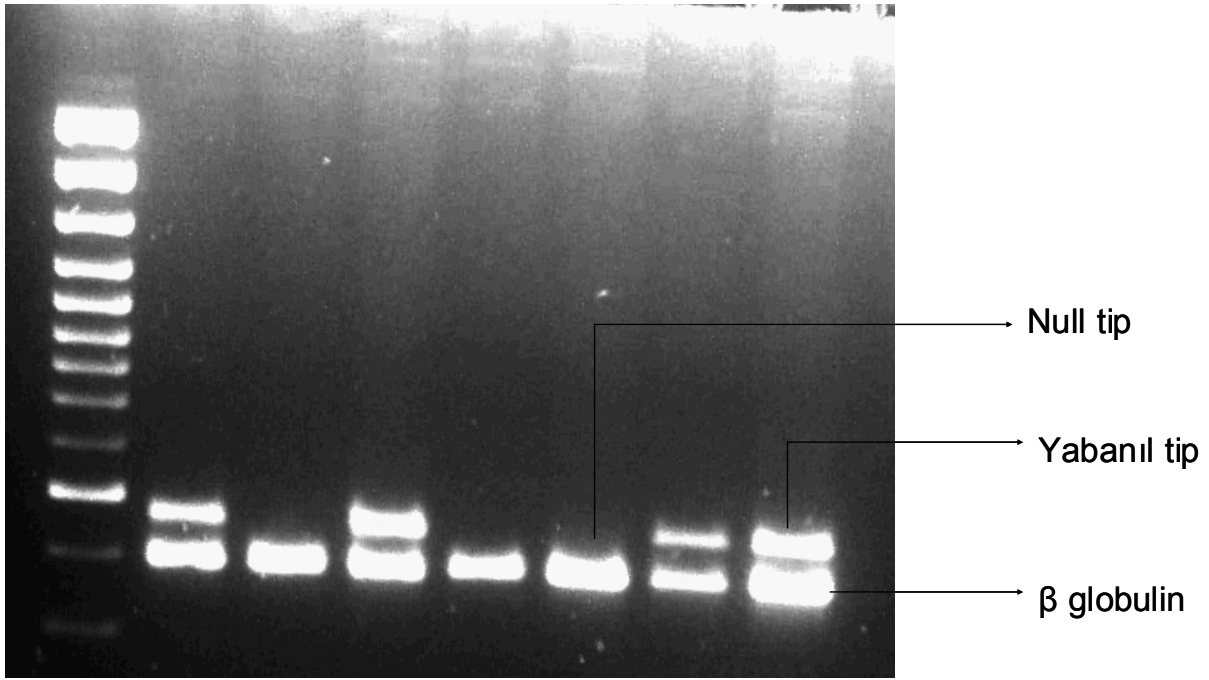
5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3 ve 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3' idi, 2 mM MgCl₂, 200 µl dNTP, 3 IU Taq polimeraz (Promega), her bir GSTP1 primerinden 10, β-globilin primerinden 5 pmol içeren 25 µl içine 100 ng genomik DNA konularak karışım hazırlandı. Denatürasyon 94°C de 30 saniye, primer eşleşmesi 60°C de 30 saniye, zincir uzaması 72°C de 45 saniye olmak üzere üç basamaklı PCR programı 35 kez tekrarlandı. Elde

edilen ürünün 20 µl si %2 lik agoroz jelde ultraviyole ışığında incelendi. Pozitif kontrol olarak kullanılan β-globine ait 389 baz çiftlik ürün tüm örneklerde gözükürken GSTM1 genine ait 215 baz çiftlik lik amplifikasyon ürününün olması durumunda yabancı, olmaması durumunda null tip olarak adlandırıldı (121) (şekil 4).



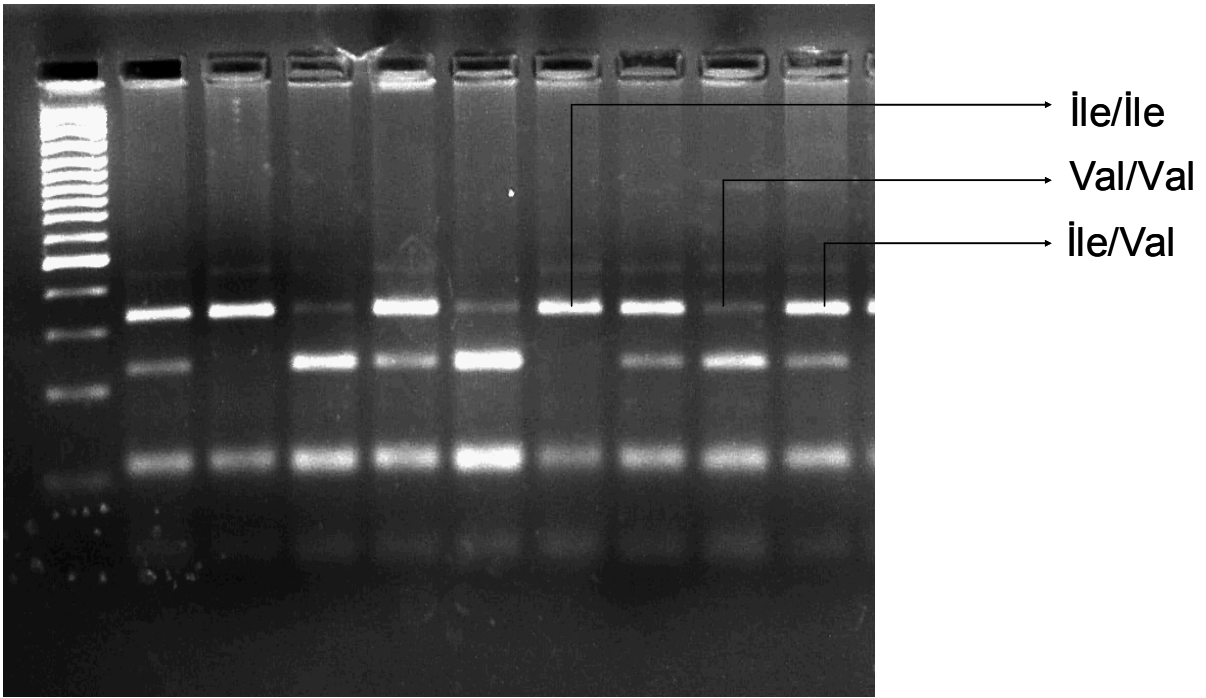
Şekil 4: GSTM1 genotipleme

GSTT1 polimorfizimini belirlemek için 5'TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' ve 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3' primer sekansları kullanıldı. PCR karışımı ve programı GSTM1 PCR karışımında bahsedildiği gibiydi. Farklı olarak her bir GSTT1 primerinden 5 pmol konuldu. GSTT1 genine ait 480 baz çiftlik amplifikasyon ürününün olması durumunda yabancı, olmaması durumunda null tip olarak adlandırıldı (şekil 5).



Şekil 5: GSTT1 genotiplenmesi

GSTP1 İle105Val polimorfizmi PCR-RFLP metoduyla önceden belirtildiği koşullara göre tanımlandı (112). Bu reaksiyonda +313 pozisyonunda adeninin guanine dönüşmesi PCR ürünüde Alw I enzimi için ikinci bir tanıma dizisi oluşturur. GSTP1 İle105Val polimorfizmini belirlemek için 100 ng genomik DNA, 2 mM MgCl₂, 200 µl dNTP, 3 IU Taq polimeraz (promega), 5'-GTAGTTTGCCCAAGGTCAAG-3' ve 5'-AGCCACCTGAGGGGTAAG-3' primerlerinin her birinden 5 pmol konularak 25 µl PCR karışımı hazırlandı. Denatürasyon 94°C de 30 saniye, primer eşleşmesi 57°C de 30 saniye, zincir uzaması 72°C de 42 saniye olmak üzere üç basamaklı PCR programı 35 kez tekrarlandı. Elde edilen 442 baz çiftlik ürünün 15 µl si Alw261 enzimi ile kesildi. Kesim sonunda homozigot isolösin alleli taşıyanlarda 329, 113 bp; homozigot valin alleli taşıyanlarda 216, 113, 107 baz çiftlik; heterozigot isolösin/valin olanlarda 329, 216, 113, 107 baz çiftlik kesim bantları görüldü (şekil 6).



Şekil 6: GSTP1 genotiplemeesi

3.7. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmalar sonunda oksidan stres ve antioksidan dengeye ait belirteçler astımlı hastalar ve normal kontrollerde karşılaştırıldı; oksidan ve antioksidan belirteçlerin düzeyine etki eden biyolojik ve demografik özellikler ile genetik varyantlar lojistik regresyon ile araştırıldı.

İstatistiksel analizler SPSS 11.5 programı kullanılarak yapıldı, Hardy-Weinberg equilibrium ki-kare istatistiği ile test edildi. Yaş, boy, vücut ağırlığı, astım başlanğıç yaşı, eozinofil sayısı, total IgE, nefes volümü, 8-isoprostan, redükte glutatyon, malonaldehid düzeyleri, FEV1 normal dağılmıyordu. Logaritmik çevirimleri de normal dağılım göstermiyordu. Bu nedenle sonuçlarda median ve çeyrekler arası değerler kullanıldı ve tüm istatistikler nonparametrik Mann-Whitney U-test ve Kruskal-Wallis test kullanılarak gerçekleştirildi, 0.05'den küçük p değerleri anlamlı kabul edildi.

Astım ağırlık derecesine, yoğunlaştırılmış nefes havasındaki redükte glutasyon, 8-isoprostan ve malondialdehid düzeylerine etki eden faktörler lojistik regresyon analizi ile araştırıldı. Lojistik regresyon analizine dahil edilen faktörler şunlardı: yaş, cinsiyet, astım başlangıç yaşı, deri testi pozitifliği, eozinofil sayısı, IgE seviyesi, anne-babanın sigara kullanımı, hayvan besleme, anne, baba ve kardeşlerde allerjik hastalık varlığı, GSTM1, GSTT1, GSTP1 polimorfizmleri, univaryat lojistik regresyon analizinde 0.05'den küçük p değerlerine sahip faktörler arasında multivaryat lojistik regresyon analizi yapıldı. Bu analiz sonunda 0.05'den küçük p değerleri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1.Olguların Demografik Verileri ve Özellikleri

300 hafif astımlı, 142 orta-ağır astımlı hastanın ve 191 sağlıklı çocuğun PCR-RFLP yöntemiyle GSTP1 bölgesi başarı ile genotiplendirildi. Analizler; genotiplendirilmesi yapılan bu populasyonda yapıldı.

Çalışmaya alınan çocukların demografik özellikleri Tablo 4' te görölmektedir.

Tablo 4. Çalışmaya alınan çocukların özellikleri

Değişken	Kontrol N=191		Hafif astım N=300		Orta-ağır astım N=142		P	P
	Ortanca	Çeyrek Aralık	Ortanca	Çeyrek Aralık	Ortanca	Çeyrek Aralık		
Yaş	10.7	8.1-13.1	9.6	8.1-11.7	11.1	8.6-13.0	0.001*	<0.001‡
Cinsiyet								
Kız	99 (%51.8)		126 (% 42.1)		75 (% 53.6)		0.031†	0.023§
Erkek	92 (%48.2)		173 (% 57.9)		65 (% 46.4)			
Atopi								
Pozitif	31 (%16.2)		175 (% 58.5)		87 (% 62.1)		<0.001†	0.508§
Negatif	160 (%83.8)		124 (% 41.5)		53 (% 37.9)			
Aile hikayesi								
Pozitif	21 (%11)		108 (% 36.2)		60 (% 42.9)		<0.001†	0.225§
Negatif	170 (%89)		190 (% 63.8)		80 (% 57.1)			
Sigara								
Pozitif	110 (%57.6)		106 (% 35.5)		62 (% 44.3)		<0.001†	0.097§
Negatif	81 (%42.4)		193 (% 64.5)		78 (% 55.7)			
Hayvan								
Pozitif	24 (%12.6)		25 (% 8.4)		13 (% 9.3)		>0.05†	0.605§
Negatif	167 (%87.4)		274 (% 91.6)		127 (% 90.7)			
FEV1 %	101	91-108.2	97	89.7-104	77	72-92	<0.001*	<0.001‡
Eozinofil (mm³)	146.3	98.9-274.2	260	150-458	288	170-588	<0.001*	0.01‡
IgE (kU/L)	35	17-73.2	139.5	50-399	149	47.2-566.7	<0.001*	0.536‡

P * =Kruskal-wallis (kontrol,hafif astım ve orta astım)

p † =Ki-kare (kontrol,hafif astım ve orta astım)

p ‡ = Bonferroni denetimi ile hafif astım ve orta –ağır astım karşılaştırması

p § = Hafif astım ve orta-ağır astım arasında ki-kare

4.2. Astım Tanısı ile İlişkilendirme Çalışması

Tüm çocuklar GSTM1 ve GSTT1 genlerinde yabancı ve null ; GSTP1’de İle105Val polimorfizmleri varlığı açısından genotiplendirildi. İstatistiksel analizler yaşa ve cinse göre kontrol edilerek yapıldı. Her bir genetik varyantın dağılımı ‘‘Hardy-Weinberg equilibrium’’ koşullarına uygunluk gösterdi.

Tablo 5. Çalışma gruplarında GST genotiplerinin dağılımı

	Kontrol N=191	Hafif astım N=300	Orta-ağır astım N=142	P*	P†
GSTM1					
Null	102 (0.534)	137 (0.474)	57 (0.41)	>0.05	>0.05
Yabancı	89 (0.466)	152 (0.526)	82 (0.59)		
GSTT1					
Null	20 (0.114)	53 (0.182)	28 (0.203)	>0.05	>0.05
Yabancı	156 (0.886)	238 (0.818)	110 (0.797)		
GSTP1					
İle/İle	77 (0.416)	152 (0.512)	82 (0.586)	0.00038	0.006
İle/Val	95 (0.514)	124 (0.418)	39 (0.279)		
Val/Val	13 (0.070)	21 (0.071)	19 (0.136)		

p* = Kontrol, hafif ve orta-ağır astım arasında (Ki-kare test)

p† = Hafif ve orta-ağır astım arasında (Ki-kare test)

GSTP1 Val105Val genotipi kodominant modelde orta-ağır astımlılarda hafif astımlılar ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0.00038). Kontroller (0.070) ve hafif astımlılarda (0.071) genotip dağılımı birbirine benzerdi.

4.2a. Astım ağırlık derecesini etkileyebilecek değişkenlerin lojistik regresyon analizleri

Astım ağırlık derecesini etkileyen faktörlerin lojistik regresyon analizi tablo 6'da gösterilmiştir. Univaryat analizde anlamlı bulunan sonuçlara multivaryat analiz uygulanmıştır.

Tablo 6. Astım ağırlık derecesini etkileyen faktörlerin lojistik regresyon analizi

	OR	%95 CI	P	OR	%95 CI	P
Yaş	1.152	1.068-1.242	<0.001	1.123	1.038-1.216	0.004
Cinsiyet	0.631	0.422-0.945	0.026	0.646	0.423-0.988	0.044
IgE (kU/L)	1.000	1.000-1.001	>0.05			
Eozinofil (mm ³)	1.001	1.000-1.002	0.016	1.001	1.000-1.002	0.011
Atopi	1.163	0.771-1.756	>0.05			
Aile hikayesi	1.319	0.876-1.988	>0.05			
Sigara	1.447	0.961-2.179	>0.05			
Hayvan besleme	1.122	0.556-2.265	>0.05			
Astım başlangıç yaşı	1.114	1.040-1.194	0.002	1.082	1.006-1.164	0.034
GSTM1	1.297	0.861-1.952	>0.05			
GSTT1	0.875	0.525-1.458	>0.05			
GSTP1 Val/Val	2.064	1.071-3.978	0.03	1.958	0.977-3.927	0.058

4.2b. Yoğunlaştırılmış Nefes Havaında Oksidatif Stres Belirteçleri (Tablo 7, Şekil 7-9)

Redükte glutatyon ve malondialdehid düzeyleri bakımından gruplar arasında son derece anlamlı bir fark gözlemlendi. Bu, temel olarak sağlıklı kontrollerle astımlılar arasındaki farktan kaynaklanıyordu. İkili karşılaştırmalarda hafif ve orta-ağır astım grupları arasında MDA ve GSH düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık saptanmadı (MDA için p=0.024, GSH için

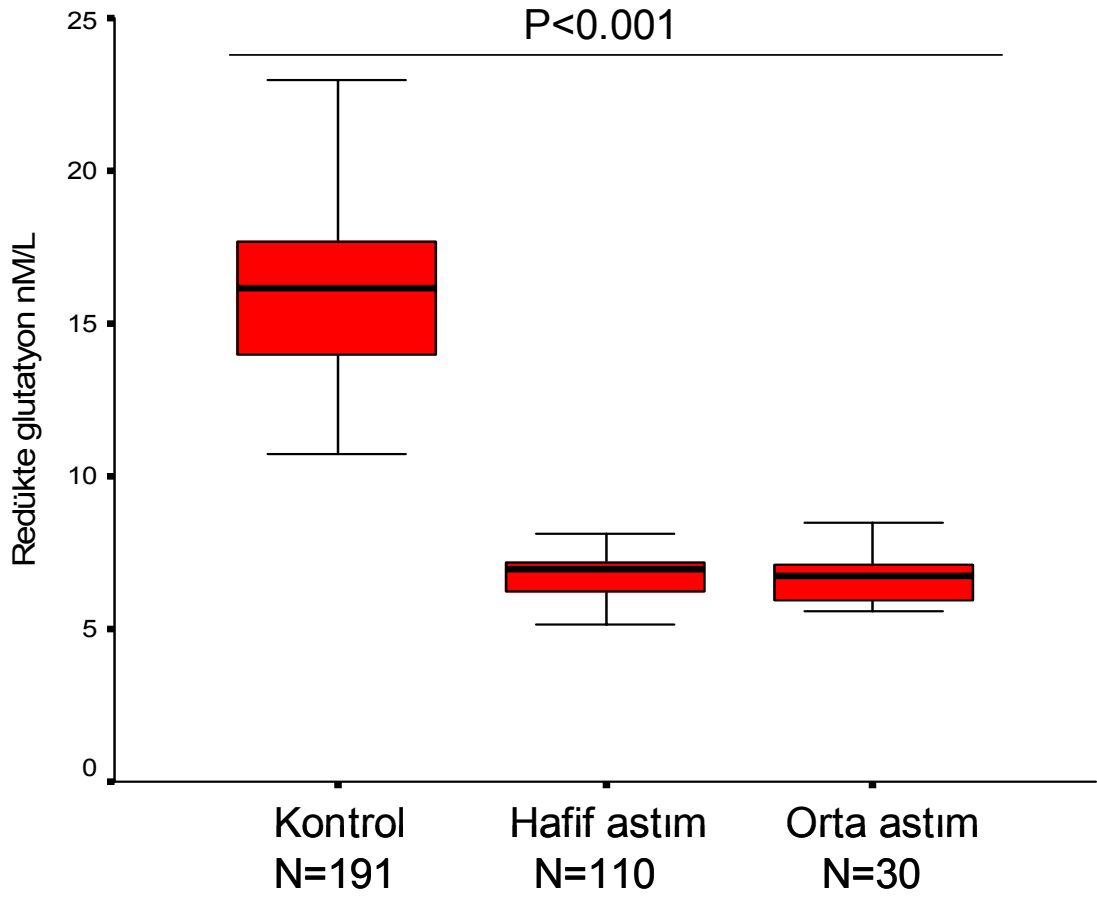
$p > 0.05$, Mann-Whitney U test-Bonferroni düzeltmesi). Öte yandan gruplar arasında 8-isoprostan düzeyleri farklılık göstermedi.

Tablo 7. Çalışma gruplarında yoğunlaştırılmış nefes havasında oksidatif stres belirteçleri

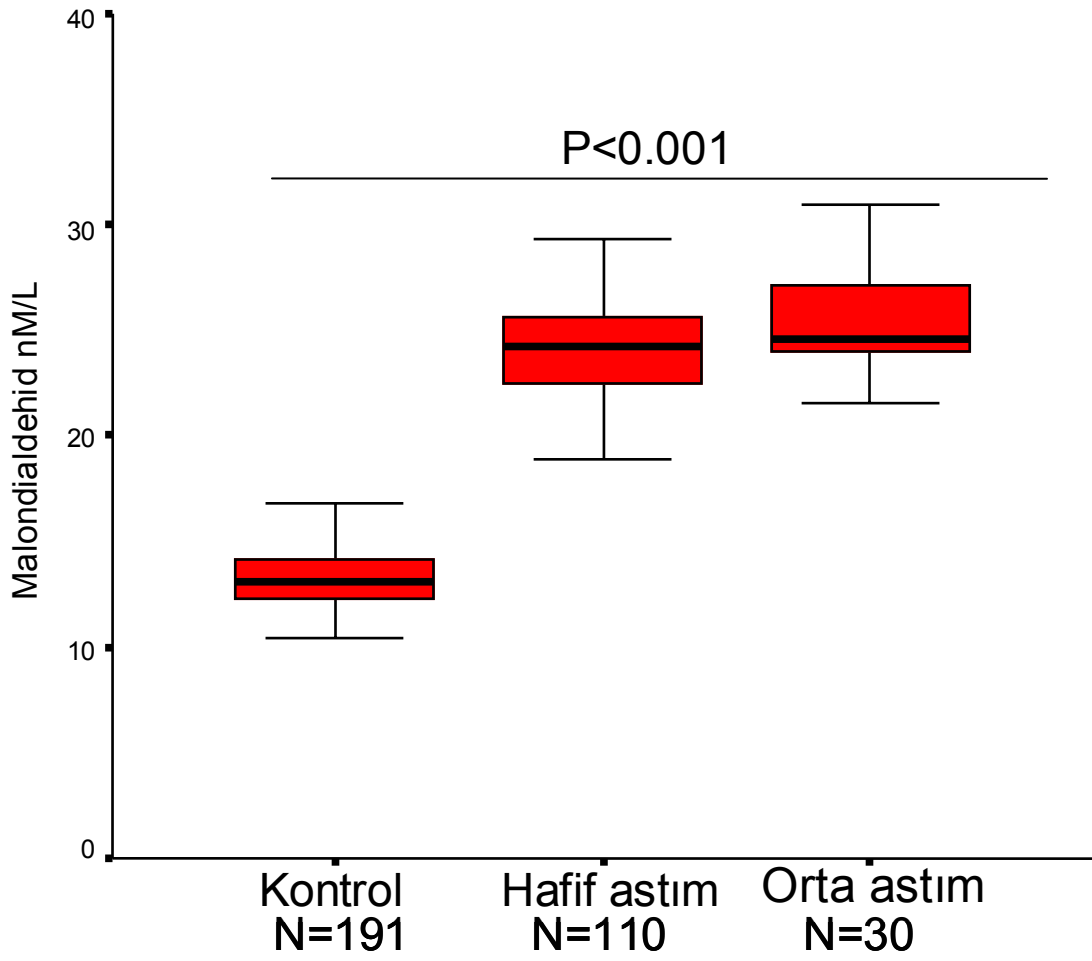
	Kontrol (N=191)		Hafif Astım (N=110)		Orta-ağır Astım (N=30)		p*	p†
	Ortanca	Çeyrek aralık	Ortanca	Çeyrek aralık	Ortanca	Çeyrek aralık		
MDA (nM/L)	13.09	12.1-14.1	24.2	22.4-25.6	24.5	23.9-27.1	<0.001	0.024
GSH (nM/L)	16.1	13.9-17.7	6.9	6.2-7.1	6.7	5.9-7.1	<0.001	>0.05
İsoprostan (pg/mL)	13.1	7.0-21.0	12.3	7.4-21.3	13.9	9.0-22.7	>0.05	>0.05
GSH/MDA (nM/L)	1.2	1.03-1.37	0.2	0.24-0.30	0.2	0.23-0.28	<0.001	0.04

p* = Kruskal-wallis (kontrol,hafif ve orta-ağır astım arasında)

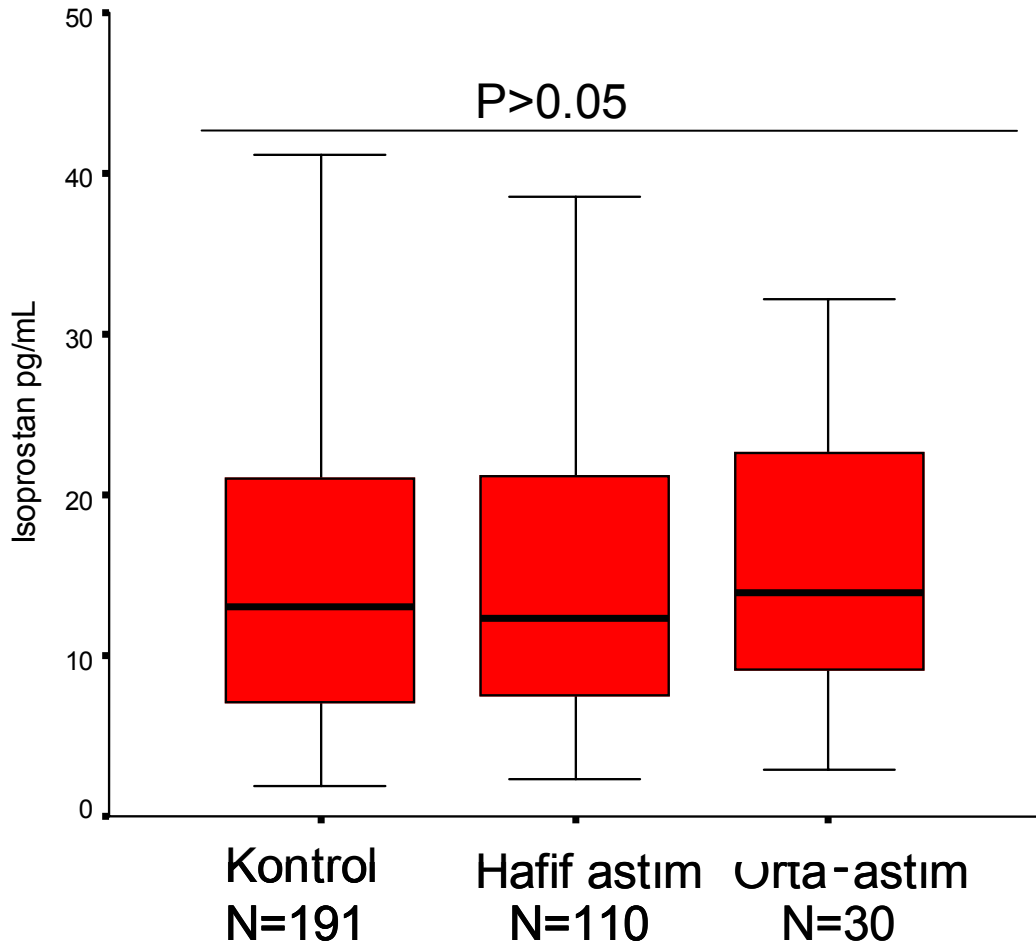
p† = Hafif ve orta-ağır astım arasında bonferino denetimi



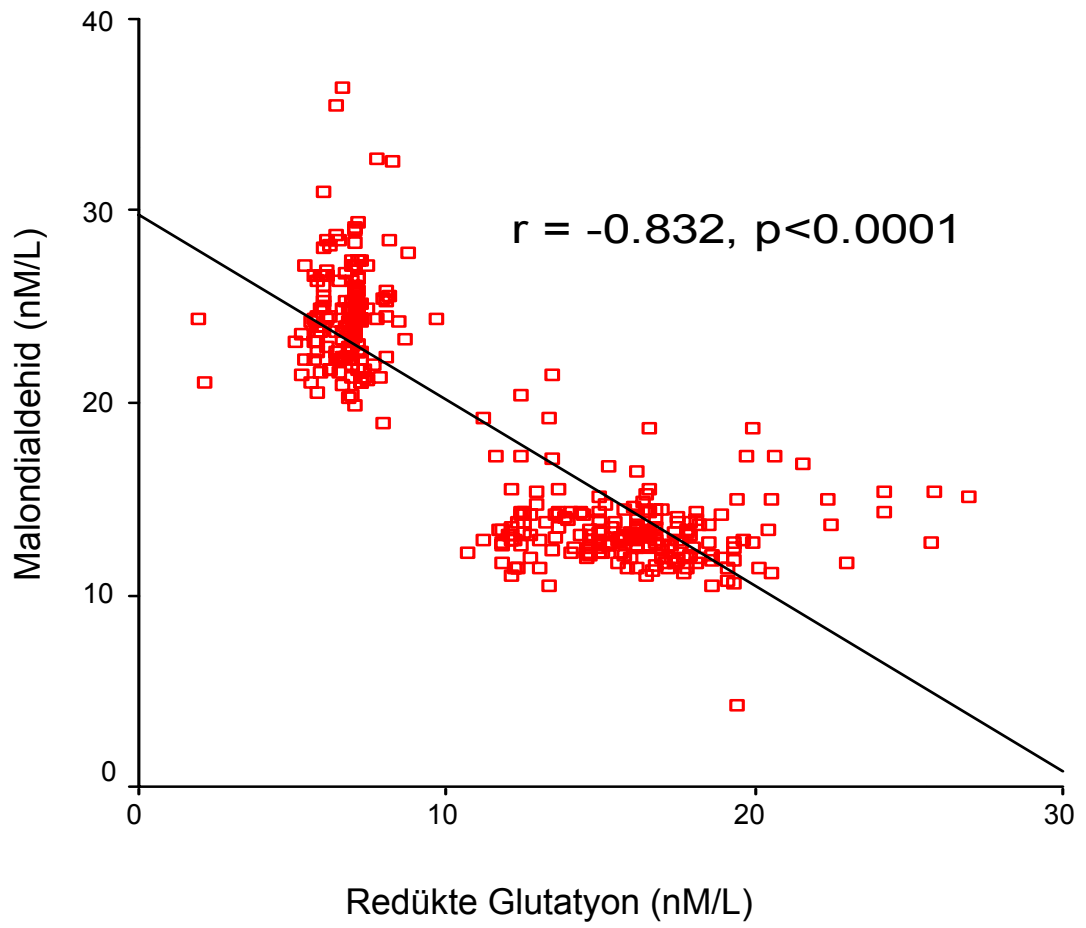
Şekil 7. Çalışma gruplarında redükte glutatyon düzeyleri



Şekil 8. Çalışma gruplarında malondialdehid düzeyleri



Şekil 9. Çalışma gruplarında 8-isoprostan düzeyleri



Şekil 10. Yoğunlaştırılmış nefes havasında malondialdehid ve redükte glutatyon arasındaki korelasyon

4.3. Yoğunlaştırılmış Nefes Havasında Antioksidan Enzim Genotipleri ile Oksidatif Belirteçler Arası İlişki

Antioksidan enzimlerin değişik genetik varyantları arasında 8-isoprostan, redükte glutasyon ve malondialdehid düzeyleri kıyaslandı. Bu kıyaslama tüm kohort, yalnızca astımlılar ve yalnızca kontrol grubunda ayrı ayrı gerçekleştirildi. Bu analizlerin sonucunda astım hastalarında GSTT1, GSTP1 genotiplerinde 8-isoprostan, glutasyon ve malondialdehid düzeyi arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0.05$), fakat GSTM1 genotipinde redükte glutasyonun yabancı grupta null tipe göre daha düşük olduğu saptandı ($p=0.032$). Kontrol grubunda yoğunlaştırılmış nefes havasındaki oksidatif stres belirteçleri ile genotipler arasında ilişki saptanmadı ($p>0.05$).

Tablo 8. Astımlı grup içerisinde genotiplere göre yoğunlaştırılmış nefes havasında oksidatif stres belirteçleri

	GSTM1					GSTT1					GSTP1						
	Null (N=75)		Yabanıl (N=63)		<i>P</i> *	Null (N=17)		Yabanıl (N=115)		<i>P</i> *	Yabanıl (N=67)		Heterozigot (N=53)		Mutant (N=18)		<i>P</i> †
	Ortanca	Çeyrek	Ortanca	Çeyrek		Ortanca	Çeyrek	Ortanca	Çeyrek		Ortanca	Çeyrek	Ortanca	Çeyrek	Ortanca	Çeyrek	
	aralık		aralık			aralık		aralık			aralık		aralık		aralık		
GSH (nM/L)	7.0	6.2-7.2	6.8	6.0-7.0	0.032	7.0	6.6-7.0	6.8	6.0-7.1	>0.05	6.8	6.0-7.2	6.9	6.4-7.1	6.6	6.0-7.0	>0.05
MDA (nM/L)	24.3	22.6-26.0	24.3	22.6-26.0	>0.05	24.3	23.5-27.9	24.2	22.3-26.0	>0.05	24.2	22.4-26.0	24.3	22.8-26.6	24.1	22.6-26.1	>0.05
İsoprostan (pg/mL)	13.6	7.8-21.0	12.3	7.5-22.3	>0.05	14.6	7.0-26.8	13.1	7.9-20.3	>0.05	13.2	7.5-22.9	13.8	7.7-20.2	12.8	8.0-23.8	>0.05

*P** = Mann Whitney U*P*† = Kruskal Wallis

Tablo 9. Kontrol grubu içinde genotiplere göre yoğunlaştırılmış nefes havasında oksidatif stres belirteçleri

	GSTM1					GSTT1					GSTP1						
	Null		Yabani		<i>P</i> *	Null		Yabani		<i>P</i> *	İle/İle		İle/Val		Val/Val		<i>P</i> †
	(N=102)		(N=89)			(N=20)		(N=156)			(N=77)		(N=95)		(N=13)		
Ortanca	Çeyrek	Ortanca	Çeyrek	Ortanca	Çeyrek	Ortanca	Çeyrek	Ortanca	Çeyrek	Ortanca	Çeyrek	Ortanca	Çeyrek	Ortanca	Çeyrek		
	aralık	aralık	aralık	aralık	aralık	aralık	aralık	aralık	aralık	aralık	aralık	aralık	aralık	aralık	aralık		
GSH (nM/L)	16.1	13.8-17.7	16.0	14.0-17.6	>0.05	17.5	15.4-18.5	16.1	14.0-17.6	>0.05	15.8	14.1-17.2	16.2	13.5-18.1	14.6	11.8-16.6	>0.05
MDA (nM/L)	13.0	12.4-14.1	13.0	12.0-14.1	>0.05	13.2	12.6-13.9	13.0	12.1-14.2	>0.05	12.8	12.1-13.3	13.3	12.3-14.2	12.8	12.3-14.9	>0.05
İsoprostan (pg/mL)	12.0	6.5-21.0	14.4	7.2-21.2	>0.05	10.4	5.8-17.4	13.1	7.0-21.0	>0.05	13.2	6.9-20.9	13.4	7.0-21.1	9.4	5.3-24.9	>0.05

*P** = Mann Whitney U*P*† = Kruskal Wallis

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, astımda sistemik dolaşıma ilave olarak havayollarında da güçlü bir oksidatif stresin varlığını göstermektedir. Oksidatif stresteki keskin artış, yoğunlaştırılmış nefes havasında ölçülen oksidatif mediatörlerin astımlı hastalar ve sağlıklı kontroller arasında neredeyse hiç örtüşme olmamasıyla desteklenmektedir. Artmış oksidan yük hem bir oksidatif belirteç olan malondialdehiddeki artıştan; hem de güçlü bir antioksidan savunma olan redükte glutatyondaki azalmadan kaynaklanmaktadır. Malondialdehid ile redükte glutasyon arasındaki son derece güçlü ve anlamlı korelasyon oksidan/antioksidan sistemdeki değişikliklere ortak bir mekanizmanın yol açtığını düşündürmektedir. Daha önce de benzer çalışmalar yapılmış olmakla beraber bu çalışma yoğunlaştırılmış nefes havasıyla gerçekleştirilen en geniş grubu oluşturmaktadır. Bu parçasıyla çalışmamız daha önce sistemik dolaşımda gerçekleştirdiğimiz çalışmanın sonuçlarını desteklemektedir (119).

Oksidatif stres inflamasyon ve inflamatuvar hastalıkların temel belirleyicilerindedir. Konakçının antioksidan sistemleri, oksidan saldırı karşısında aktive olurlar fakat bireyler arası farklı yanıt oksidan stresin nihai etkisini belirler. Bu çalışmamızın temel amaçları önceki çalışmamızda saptadığımız oksidatif strese etki eden faktörleri daha geniş bir grupta çalışarak doğrulamak ve sistemik dolaşıma ilave olarak yoğunlaştırılmış nefes havasındaki oksidatif yüke etki eden faktörleri saptamaktır.

Bu çalışma, sağlıklı kontroller, hafif astımlılar ve orta-ağır şiddette astımlılardan oluşan kohortta yapılan analizlerde GSTP1 ve GSTT1 genlerine ait değişik gneotiplerin astım ve astım şiddeti ile ilgili olmadığını; GSTP1 genindeki val105val genotipinin sıklığının hafif astımlılarla sağlıklı kontrollerde benzer olduğunu ($=0.070$ ve 0.071); ancak buna karşılık ağır astımlılarda bu genotip frekansının diğer grupların yaklaşık iki katına ulaştığını göstermektedir (0.139). Bu farkın en önemli özelliklerinden biri de farklılığın istatistiksel

olarak çok anlamlı olmasıdır ($p=0.00038$). Bu sonuç GSTP1 geninin 105 pozisyonunda izolösün yerine valin aminoasitini taşıyor olmanın astım için bir risk oluşturmadığını; ancak genetik ve çevresel etkenlerle astım fenotipine sahip bireylerde val105val genotipinin ağır astım riskini anlamlı olarak artırdığını düşündürmektedir.

GSTP1, DNA'nın oksidasyonu sırasında oluşan reaktif oksijen maddelerini detoksifiye eder. Reaktif oksijen maddeleri araşidonik asitten eikosanoid sentezi için gereklidirler. GSTP1, reaktif oksijen maddelerini ortamdaki uzaklaştırarak astım patogenezinde önemli rol oynayan eikosanoidlerin sentezinin azalmasına neden olur. Hem Gillilan ve arkadaşlarının hem de Tamer ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada GSTP1 Val/Val genotipinin astım hastalarında daha sık görülmesi, bu genotipe sahip astım hastalarının FEV1, FVC gibi akciğer fonksiyonlarını gösteren belirteçlerinin zamanla düşmesi bu genotipe sahip kişilerin ortamdaki reaktif oksijen maddelerini yeterince detoksifiye edemediklerini düşündürmektedir (110,111). *In vitro* ortamda 105. aminoasiti valin olan enzimin polisiklik aromatik hidrokarbonların diol epoksidlerini 105. aminoasiti izolösün olan enzime göre 7 kat daha fazla detoksifiye ettiği, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) detoksifikasyonunu ise 3 kat daha az yaptığı rapor edilmiştir (113,117). Polisiklik hidrokarbonlara katalitik aktivitedeki bu değişikliğin enzimin aktif bölgesindeki yapısal değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmüştür (117).

Çalışılan genotiplerin sıklığı ülkeler arasında olduğu gibi aynı ülke içindeki değişik gruplarda da farklılık gösterebilir. Avrupada populasyonun % 50-70 inde GSTM1 null tipi varken ülkemizde erişkin astım hastalarında % 63.4, sağlıklı kontrol grubunda % 40.8 bulunmuştur (111). Bizim çalışmamızda GSTM1 null sıklığını hafif astım hastalarında % 47.4, orta-ağır asımlılarda % 41.0 kontrol grubunda % 53.4 olarak bulduk (Tablo 5). Literatürde yapılan yapılan birçok çalışmada GSTM1 null genotipi ile antioksidan kapasitenin

azalması arasında ilişki gösterilmiş olmasına rağmen biz bu birlikteliği gösteremedik (106,112). GSTT1 null tipi sıklığı avrupada % 25, asyada % 40'dır. Biz ise hafif astım hastalarında % 18.2, orta-ağır astımlılarda % 20.3, kontrolde % 11.4 olarak bulduk (Tablo 5). Tamer ve arkadaşları da benzer sıklıkları erişkin popülasyonda saptamışlardır (111). Bizim çalışmamızda GSTT1 genotipinde astım hastaları ile sağlıklı kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulamadık. Cilt testi pozitifliği ile de GSTT1 genotip polimorfizmleri arasında bir ilişki gösteremedik. Tamer ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada atopik astımlı erişkin hastalarda non atopik astımlı hastalara göre GSTT1 null genotipinin daha sık olduğu gösterilmiştir (111). Litaratürde de GSTT1 null tipinin astımda artığına ait verilerin yanında ilişki gösterilmediğine ait de sonuçlar bulunmaktadır (110). Litaratürde GSTP1 genotipleri ile de birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiş çalışmalar bulunmaktadır. Tamer ve arkadaşları GSTP1 Val/Val homozigot genotipli kişilerde 3.6 kat daha yüksek astım gelişme riskinin olduğunu bildirmişlerdir (111). Spiteri ve arkadaşların yaptığı bir çalışmada ise GSTP1 Val/Val genotipine sahip olmanın havayolu obstrüksiyonu ve bronşial aşırı cevabını azalttığı gösterilmiştir (27). Bunun yanında Freidin ve arkadaşları glutayon-S-transferaz ve bronşial astım şiddeti arasında bir ilişki gösterememişlerdir (122). Gillilan ve arkadaşları ise benzer şekilde GSTP1 Val/Val homozigotluğu olan astım hastalarının astım olmayanlara göre FEV1, FVC ve maksimal orta-ekspratuvar akımında dört yıllık izlemde daha çok düşme gösterdiğini rapor etmişlerdir (110). Bu farklı sonuçlar sitozolik glutatyon-S-transferaz gen polimorfizminin etnik ve çevresel faktörlere göre değişiklik göstermesiyle açıklanabilir (110). Bu farklılığı açıklayabilecek diğer bir faktör ise çalışma popülasyonunun seçilme kriterleri olabilir. Bizim çalışma popülasyonumuz astım hastası çocuklardan oluşan geniş bir grupken diğer çalışmalarda vaka sayısı çok daha azdır.

Val105Val genotipinin astım ağırlık dercesine olan etkisini lojistik regresyon yöntemi ile de araştırdık. Univariante analizde anlamlı bir ilişki ortaya çıkmasına (OR: 2.064, P=0.03)

rağmen multivaryat analizde istatistiksel anlam sınırında (OR:1.958,P=0.058) bir ilişki gösterebildik. Bu, temel olarak orta ağır astımlı hasta sayısının diğer iki gruptaki sayıların toplamından daha düşük olmasına bağlanabilir.

Çalışmamızın ikinci bölümünde yoğunlaştırılmış nefes havasındaki oksidan ve antioksidan belirteçleri gruplar arasında kıyasladık. Bu çalışmada oksidatif stres belirteci olan malondialdehid ve antioksidan savunmanın göstergesi olan redükte glutatyon astımlı hastalarda kontrollere göre nerdeyse değerler arasında hiç örtüşme göstermeyecek şekilde bir farklılık gösterdi. Bu, sistemik dolaşma ilave olarak yoğunlaştırılmış nefes havasında da çok güçlü bir oksidan yük saptanabildiğini göstermektedir. Ancak sistemik dolaşımdan farklı olarak hafif ve orta şiddette astımlılar arasında bu bakımdan bir fark gösteremedik. Sistemik dolaşımdaki çalışmaya dikkat edilirse hafif ve orta ağır şiddetteki astımlılar arasındaki farkın astımlılar ile kontroller arasındaki farktan çok daha küçük olduğu dikkati çekmektedir. Yoğunlaştırılmış nefes havasındaki ölçümlere ait sorunlardan bir tanesi de burada mediatörlerin su nedeniyle ileri dercede dilüsyona uğramasıdır. Bu durumda orta şiddetle astım ile hafif şiddette astım arasındaki farkları ortaya koyabilmek için kıyaslamaların hafif şiddetle astım ile çok ağır astım arasında yapılması gerekebilir. Oysa çocukluk çağında bilindiği gibi ağır astımlı hasta sayısı son derece azdır. Örneğin bu geniş kohortumuzdaki ağır astımlı hasta sayısı sadece 13'tür. Bu nedenle ağır astımdaki oksidatif yük ile hafif astımdaki oksidatif yük arasındaki kıyaslamaları yapmak için erişkin hastalarda bir çalışma tasarlanması uygun olabilir.

Çalışmadaki ilginç sonuçlarımızdan bir tanesi de oksidatif stresin anlamlı bir göstergesi olan 8-isoprostan düzeylerinin gruplar arasında fark göstermemesidir. Çalışmamız bunun esas nedenini saptamaya yönelik olarak tasarlanmamıştır. Ancak gerek malondialdehid gerekse redükte glutatyon birçok ortak yolağın sonlanarak meydana getirdiği oksidatif harabiyete bağlı ürünleri ölçerken, 8-isoprostan hemen yalnız araşidonik asit üzerinden non-

enzimatik yollardan meydana gelmektedir (Şekil 2). Yukarıda sözü edilen yoğunlaştırılmış nefes havasına ait dilüsyonel faktörler de göze alındığında tek bir yolağın ürünü olarak ölçülen bir mediatörde fark görülmemiş olabilir. Ancak, çalışmamız bu gözlemin gerçek sebebini ortaya koymaz.

Çalışmamızın hedeflerinden bir tanesi de yoğunlaştırılmış nefes havasındaki oksidatif yüke ait epidemiyolojik ve genetik faktörleri ortaya koymaktır. Çalışmamızın sonuçları çalışılan anti-oksidan anezimlere ait genotiplerden hiç bir tanesinin var olan oksidatif stres üzerine önemli bir etkide bulunmadığını göstermektedir. Bu sonuç, sistemik dolaşımında gerçekleştirdiğimiz ve GSTP1 genindeki val105val genotipinin oksidatif stresi belirleyen önemli bir faktör olduğunu öne sürdüğümüz çalışmanın (119) sonuçlarından farklıdır. Bu fark yukarıda sözü edildiği gibi dilüsyonel farklılıklardan kaynaklanabileceği gibi gerçek sebebi üzerinde yorum yapmamıza olanak tanıyacak verilerimiz yoktur.

Astımlı hastalarda reaktif oksijen maddelerinin kaynağı havayollarında ve intravasküler alandaki inflamatuvar hücrelerdir (30-36). Makrofaj, eozinofil, lenfosit, nötrofil, monosit oksidatif stresin kaynağıdır. Bizim çalışmamızda oksidatif stresi belirleyen faktörler ile yalnızca eozinofillerle bir ilişki gösterilmeye çalışıldı ancak astımlı hastaların glutatyon, 8-isoprostan ve malondialdehid düzeylerini etkileyen faktörler arasında eozinofil sayısı ile bir ilişki gösterilemedi. Yoğunlaştırılmış nefes havasında oksidatif stresin ve antioksidanların hücrel kaynağı belli değildir. Lokal oksidatif stresin hücrel ve dokusal kaynağının ne olduğunu ortaya koymak için başka bir çalışma planlanabilir.

Bahsedilecek bir diğer konu da bu sonuçların astım tedavisine etkisinin ne olabileceğidir. Yakın zamanda Decramer ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada antioksidan olarak 600 mg oral N-asetil sistein ve plesebo alan 523 kronik obstruktif akciğer hastası 3 yıl boyunca izlenmiştir. Sonuç olarak N-asetil sisteinin FEV1 in azalması ve hastalığın alevlenmesi üzerine etkisi olmadığı görülmüştür (123). Oksidatif stres bizim

çalışmamızda da gösterdiğimiz gibi son derece güçlüdür ve çok fazla hücrenel kaynağı bulunmaktadır. Elimizde bütün bu oksidatif etkiyi nötralize edecek kadar güçlü bir antioksidan olmadığı için böyle bir sonuç elde edilmiş olabilir.

Sonuç olarak, bu çalışma sağlıklı çocuklarda ve astımlılarda yoğunlaştırılmış nefes havasının ölçülebileceğini; astımda sağlıklı bireylere göre çok güçlü bir oksidatif stresin varlığını göstermektedir. Sonuçlarımız, antioksidan enzimlerden GSTP1'e ait genetik varyantların da astım şiddetini etkileyebileceğini düşündürmektedir

Bu çalışma, yoğunlaştırılmış nefes hava kondansatı kullanarak yapılacak olan çalışmalara kaynak olmakla birlikte antiinflamatuvar tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesinde yararlı olacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Astımlı çocuklarda sistemik dolaşıma ilave olarak lokal doku düzeyinde de oksidatif stresin artmış olduğunu göstermektedir.
2. Redükte glutatyon ve MDA arasındaki çok yüksek korelasyon oksidan ve antioksidan göstergelerin benzer faktörler tarafından ayarlandığını göstermektedir.
3. Yoğunlaştırılmış nefes havasında lokal oksidatif stresi göstermek için MDA ve redükte glutatyon ölçümleri 8-isoprostana göre daha iyi göstergeler olabilir.
4. GSTP1 Val105Val genotipi astım için son derece önemli bir prognostik faktördür. Genetik predispozisyon ve çevresel faktörlerin etkisi ile astım hastalığı olan bireylerde GSTP1 Val105Val genotipi astım ağırlık derecesinin riskini artırır.
5. GSTP1 Val105Val genotipi sistemik dolaşımdaki oksidatif stresin önemli belirleyicilerinden biri olmakla beraber yoğunlaştırılmış nefes havasında bu genotipin malondialdehid ve redükte glutatyon üzerine önemli bir etkisi saptanmadı.

7. KAYNAKLAR

1. National Heart, lung and blood institute. Global strategy for asthma management and prevention. 2002.s.2
2. National Heart, lung and blood institute. Global strategy for asthma management and prevention. 2002.s. 28
3. Hollaway JW. Beghe B. Holgate ST. The genetic basis of atopic asthma. Clin Exp Allergy 1999; 29: 1023-32
4. Induction of asthma and the Environment: What We Know and Need to Know Environmental Health Perspectives vol 114.number 4. april 2006
5. A Brief Targeted Review of Susceptibility Factors. Environmental Exposures. Asthma Incidence. and Recommendations for Future Asthma Incidence Research . Environmental Health Perspectives vol 114.number 4. april 2006
6. Distinguishing severe asthma phenotypes: Role of age at onset and eosinophilic inflammation. J Alergy Clin Immunol January 2004.
7. Genetics of allergen-induced asthma. j Allergy Clin Immunol. August 2001.
8. Clinical phenotypes of asthma. Current Opinion in Pulmonary Medicine 2004. 10:44-50
9. Polymorphisms in Candidate Asthma Genes Am J Med Sci . Volume 321(1).January 2001.11-16
10. Current concepts on the genetics of asthma. Current Opinion in Pediatrics 2001. 13:267-277.
11. Variations in genetic influences on the development of asthma throughout childhood. adolescence and early adult life. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology 2006. 6:317-322.

12. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinocconjunctivitis, and atopic eczema. International study of asthma and allergies in childhood (ISAAC) Steering committee. *Lancet* 1998; 351 : 1225
13. Del Prete G. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy* 1992; 47:450-55
14. Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Eng J Med.* 2001 jan 11; 344: 30-37
15. Kay AB. Allergy and allergic diseases. Second of two parts. *N Eng J Med.* 2001 jan 11; 344: 109-13
16. Buse WW, Lemanske RF. Asthma. *N Eng J Med* 2001; 344: 350-62
17. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema. International study of asthma and allergies in childhood (ISAAC) steering committee. *Lancet* 1998; 351:1225
18. Saraçlar Y, Kuyucu S, Tuncer A, ve ark. Prevalance of asthmatic phenotypes and bronchial hyperresponsiveness in Turkish schoolchildren: International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) phase 2 study. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2003 ; 91: 477-84
19. Chanez P, Dent G, Yukuwa T, ve ark. Generation of oxygen free radicals from blood eosinophils from asthma patients after stimulation with PAF or phorbol ester. *Eur Respir J* 1990;3:1002-7
20. Cluzel M, Damon M, Chanaz P, ve ark. Enhanced alveolar cell luminol-dependent chemiluminescence in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1987;80:195-201
21. Calhoun WJ, Salisbury SM, Bush RK, ve ark. Increased superoxide release from alveolar macrophages in symptomatic asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:A224

22. Vachier I. Damon M. Le Doucen C. ve ark. Increased oxygen species generation in blood monocytes of asthma patients. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:1161-6
23. Barnes BJ. Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radic Biol Med* 1990;9:235-43
24. Van Asbeck BS. Hoidal J. Vercelloti GM. ve ark. Protection against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocytes: role of red cell glutathione. *Science* 1985; 227: 756-59
25. Agar NS. Sadradeh SNH. Hallway PE. ve ark. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense. *J Clin Invest* 1986; 77: 319-21
26. Toth KM. Clifford DP. Berger EM. ve ark. Intact human erythrocyte prevent hydrogen peroxide mediated damage to isolated perfused rat lungs and cultured bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Clin Invest* 1984; 74: 292-95
27. Spiter MA. Bianco A. Strange RC. ve ark. Polymorphisms at the glutathione S-transferase. GSTP1 locus: a novel mechanism for susceptibility and development of atopic airway inflammation. *Allergy* 2000; suppl 61: 15-20
28. Barnes PJ. Air pollution and asthma: molecular mechanisms. *Mol Med Today* 1995; 1: 149-55
29. Ichinose M. Sugiura H. Yamagata S. ve ark. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 701-706
30. Ganas K. Loukides S. Papatheodorou G. ve ark. Total nitrite/nitrate in expired breath condensate of patients with asthma. *Respir Med* 2001; 95: 649-54
31. Calhoun WJ. Reed HE. Moest DR. ve ark. Enhanced superoxide production by alveolar macrophages and air-space cells. airway inflammation and alveolar macrophage density

- changes after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 317-25
32. Sanders SP. Zweier JL. Harrison SJ. ve ark. Spontaneous oxygen radical production at sites of antigen challenge in allergic subjects. *AM J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1725-33
33. Demoly P. Damon M. Michel FB. ve ark. IFN-gamma activates superoxide anion production in blood monocytes from allergic asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995; 75: 162-6
34. Demoly P. Vachier I. Pene J. ve ark. Ig E produces monocyte superoxide anion release: correlation with CD23 expression. Comparison of patients with asthma, patients with rhinitis, and normal subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 108-16
35. Evans DJ. Lindsay MA. O'Connor BJ. ve ark. Priming of circulating human eosinophils following late response to allergen challenge. *Eur Respir J* 1996; 9: 703-8
36. Vachier I. Chanez P. Le Doucen C. ve ark. Enhancement of reactive oxygen species formation in stable and unstable asthmatic patients. *Eur Respir J* 1994; 7: 1585-92
37. Abe MK. Chao TS. Solway J. ve ark. Hydrogen peroxide stimulates mitogen-activated protein kinase in bovine tracheal myocytes: implications for human airway disease. *Am J Respir Mol Biol* 1994; 11: 577-85
38. Montuschi P. Corradi M. Ciabattini G. ve ark. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 216-20
39. Paredi P. Kharitonov SA. Barnes PJ. Elevation of exhaled ethane concentration in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1450-4

40. Dworski R. Roberts LJ 2nd. Murray JJ. ve ark. Assessment of oxidant stress in allergic asthma by measurement of the major urinary metabolite of F₂-isoprostane. 15-F₂t-IsoP (8-iso-PGF₂α). *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 387-90
41. Hanazawa T. Kharitonov SA. Barnes PJ. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate of patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1273-6
42. Wu W. Samoszuk MK. Comhair SA. ve ark. Eosinophils generate brominating oxidants in allergen-induced asthma. *J Clin Invest* 2000; 105: 1455-63
43. Nijkamp FP. Henricks PA. Receptors in airway disease. Beta-adrenoceptors in lung inflammation. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141(suppl): S145-50
44. Katsumata U. Miura M. Ichinose M. ve ark. Oxygen radicals produce airway constriction and hyperresponsiveness in anesthetized cats. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 1158-61
45. Rhoden KJ. Barnes PJ. Effect of hydrogen peroxide on guinea-pig tracheal smooth muscle in vitro: role of cyclo-oxygenase and airway epithelium. *Br J Pharmacol* 1989; 98: 325-30
46. Wright DT. Fischer BM. Li C. ve ark. Oxidant stress stimulates mucin secretion and PLC in airway epithelium via a nitric oxide-dependent mechanism. *Am J Physiol* 1996; 271: L854-61
47. Hesselmark OL. Malmgren R. Unge G. ve ark. Lowered platelet GSH-Px activity in patients with intrinsic asthma. *Allergy* 1990; 45: 523-7
48. Picado C. Deulofen R. Lieonart R. ve ark. Dietary micronutrients/antioxidants and their relationship with bronchial asthma severity. *Allergy* 2001; 56: 43-9
49. Smith LJ. Shamsuddin M. Sporn PHS. ve ark. Reduced superoxide dismutase in lung cells of patients with asthma. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 1301-7

50. Kelly FJ. Mudway L. Blomberg A. ve ark. Altered lung antioxidant status in patients with mild asthma. *Lancet* 1999; 354: 482-3
51. Nadeen A. Chhabra SK. Masood A. ve ark. Increased oxidative stres and altered levels of antioxidants in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 72-8
52. Jarjour NN. Calhoun WJ. Enhanced production of oxygen radicals in asthma. *J Lab Clin Med* 1994; 123: 131-6
53. Clinical and Biological Heterogeneity in Children with Moderate Asthma. *American J of Respiratory and Critical Care Medicine*. Vol 167. pp. 1490-1495. 2003
54. Small airways function and molecular markers in exhaled air in mild asthma. *Thorax* 2005; 60;639-644
55. Clinical and Technical Factors Affecting Ph and Other Biomarkers in Exhaled Breath Condensate. *Pediatric Pulmonology* 41: 87-94 (2006)
56. Reynolds. H.Y. (2000) Use of bronchoalveolar lavage in humans-past necessity and future imperative. *Lung* 178. 271-293
57. Jeffery. P.K. et al. (2000) Biopsy markers of airway inflammation and remodelling. *Respii. Med.*94(suppl.F). S9-S15
58. Holz. O. Et al.(2000) Update on sputum methodology. *Eur. Respir. J.* 16.355-359
59. Yates. D.H. (2001) Role of exhaled nitric oxide in asthma. *Immuno. Cell Biol.*79.178-190
60. Mutlu.G.M. et.al.(2001) Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am. J. Respir.Crit. Care Med.*164.731-737
61. Fairchild C. Stampfer J. Particle concentration in exhaled breath. *Am Ind Hyg Assoc j* 1987;48:948-949
62. Obstructive Pulmonary Disease *American Journal Of Respiratory and Critical Care Medicine* vol167 pp. 1380-1386. 2003

63. John Hunt. MD Charlottesville. Va Exhaled breath condensate: An evolving tool for non-invasive of lung disease. *J Allergy Clin Immunol* Vol 110. number 1.
64. Soyer OU, Dizdar EA, Keskin O, Lilly C, Kalaycı O, Comparison of two methods for exhaled breath condensate collection. *Allergy*. 2006 Aug;61(8):1016-8.
65. M. Corradi and friends Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation. *Eur Respir J* 2004; 24: 1011-1017.
66. Kharitonov S. Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am.J. Resp. Crit.Care Med*. 2001; 163:1693-1722
67. Analysis of Oxidative stres in exhaled breath condensate from patients with severe pulmonary infections. *Arch Bronconeumol* 2006;42:113-119
68. Cracowski JL. Durand T. Bessard G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology. pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23:360-366
69. Pratico D. Lawson JA. Rokach J. et al. The isoprostane in biology and medicine. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12:243-247
70. Kawikova I. Barnes PJ. Takahashi T. et al. 8-Epi-PGF 2α . a novel noncyclooxygenase-derived prostaglandin. constricts airways in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153-590-596
71. Increased 8-isoprostane a marker of oxidative stres in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999. 160:216-220
72. Morrow JD. Roberts LJ: The isoprostane: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res* 1997. 36:1-21
73. Exhaled 8-isoprostan in childhood asthma. *Respiratory Research* 2005, 6:79
74. Increased Exhaled 8-isoprosatan in Childhood Asthma. *Chest* 2003; 124:25-31.

75. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1175-1177
76. Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* 2000;55: 205-209
77. Induced sputum 8-isoprostane concentrations in inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 426-430
78. Mylonis C. Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In vivo* 1999; 13: 295-309
79. Esterbauer H. Schaur RJ. Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 81-128
80. Kalaycı Ö. Saraçlar Y. Kılınç K. ve ark. Serum levels of eosinophilic cationic protein (ECP), myeloperoxidase (MPO), lipid peroxidation products, interleukin (IL)-5 and interferon (IFN)- γ in children with bronchial asthma at acute asthma attack and remission. *Turkish J Pediatrics* 2000; 42: 9-16
81. Kalaycı Ö. Besler T. Kılınç K. ve ark. Serum levels of antioxidant vitamins (alpha-tocopherol, beta-carotene, and ascorbic acid) in children with bronchial asthma. *Turkish J Pediatrics* 2000; 42: 17-21
82. Ozaras R. Changes in malondialdehyde levels in bronchoalveolar fluid and serum by the treatment of asthma with inhaled steroid and beta2-agonist. *Respiratory* 2000; 5: 289-92
83. Rajiv Agarwal, Shawn D. Chase Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples *Journal of Chromatography B*. 775 (2002) 121-126.
84. Jürgen Jürgen Pilz, Ingolf Meineke, Christoph H. Gleiter Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2.

- 4–dinitrophenylhydrazine derivative *Journal of Chromatography B*. 742 (2000) 315-325.
85. M. Corradi and friends Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation *Eur Respir J* 2004; 24: 1011-1017.
86. N Daultbaev, J Rickmann, K Viel, R Buhl, T-O-F Wagner and J Bargon Glutathione in induced sputum of healthy individuals and patients with asthma *Thorax* 2001;56;13-18.
87. Aldehydes in Exhaled Breath Condensate of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease *Am J Respir Crit Care Med* Vol 167. pp 1380-1386. 2003.
88. Hayes JD, Strange RC. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to response to oxidative stress. *Free Radic Res* 1995; 22: 193-207
89. Champe PC, Harvey RA. Lippincott's Illustrated Reviews, Biochemistry, bölüm 10
90. Galloway DC, Blake DG, Shephard AG, ve ark. Regulation of human γ -glutamylcysteine synthetase: coordinate induction of the catalytic and regulatory subunits in HepG2 cells. *Biochem J* 1997; 328: 99-104
91. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *European J Pharmacology* 2001; 429: 195-207
92. Li XY, Donaldson K, Rahman I, ve ark. An investigation of the role of glutathione in the increased permeability induced by cigarette smoke in vivo and in vitro. *Am Rev Respir Crit Care Med* 1994; 149:1518-25
93. Van Klaveren RJ, Demendts M, Nemery B. Cellular glutathione turnover in vitro, with emphasis on type 2 pneumocytes. *Eur Respir J* 1997; 10: 1392-1400
94. Smith LJ, Houston M, Anderson J. Increased level of glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:1461-64
95. Hayes JD. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 2000;61:154-66

96. Whalen R. Boyer TD. Human glutathione S-transferases. *Semin Liver Dis* 1998; 18: 345-58
97. Mannervick B. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Rel Areas Mol Biol* 1985; 57: 357-417
98. Hayes JD. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 2000;61:154-66
99. Fosberg L. Genetic variation and regulation of oxidative stress related genes. Doktora tezi. 2000: Karolinska Institutet. University of Stockholm. Sweden.
100. Bogaards JJP. Venekamp JC. van Bladeren PJ. Stereoselective conjugation of prostaglandin A2 and prostaglandin J2 with glutathione. catalysed by the human glutathione s-transferases A 1-1. A 2-2. M 1a-1a and P 1-1. *Chem Res Toxicol* 1997; 19: 310-37
101. Fryer AA. Bianco A. Heple M. ve ark. Polymorphism at the glutathione S-transferase GSTP1 locus. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161: 1437-42
102. Gilliland FD, Li YF, Saxon A ve ark. Effect of glutathione S-transferase M1 and P1 genotypes on xenobiotic enhancement of allergic responses: randomised placebo-controlled crossover study. *Lancet*. 2004; 363: 119-125
103. Balta G, Yuksek N, Ozyurek E, ve ark. Characterization of MTHFR, GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 genotypes in childhood acute leukemia. *Am J Hematology* 2003; 73: 154-60
104. Otto-Knapp R. Jurgovsky K. Schierhorn K. ve ark. Antioxidative enzymes in human nasal mucosa after exposure to ozone. Possible role of GSTM1 deficiency. *Inflamm res*. 2003; 52: 51-55
105. Mann CLA. Davies MB, Boggild MD, ve ark. Glutathione S-transferase polymorphisms in multiple sclerosis; Their relationship to disability. *Neurology* 2000; 54: 552-57

106. Howells REJ, Redman CWE, Dhar KK. ve ark. Association of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 null genotypes with clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2439-45
107. D'Errico A, Malats N, Vieneis P. ve ark. Review of studies of selected metabolic polymorphisms and cancer. (chapter 23). *IARC Sci Publ* 1999; 148: 323-93
108. Hayes JD, Strange RC. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radic Res* 1995; 22: 193-207
109. Strange RC, Fryer AA. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci Publ* 1999; 148: 231-49
110. Gilliland FD, Gauderman WJ, Vora H. ve ark. Effects of Glutathione-S-Transferase M1, T1, and P1 on childhood lung function growth. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 710-16
111. Tamer L, Çalikoğlu M, Ateş NA. ve ark. Glutathione-S-Transferase gene polymorphisms (GSTT1, GSTM1, GSTP1) as increased risk factors for asthma. *Respirology* 2004; 9: 493-98
112. Duncan H, Swan C, Green J. ve ark. Susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease: interactions between glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 genotypes. *Clin Chim Acta*. 1995 Aug 31; 240(1) :53-61.
113. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G. ve ark. Molecular cloning, characterisation and expression in *Escherichia coli* of fulllength cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. *J Biol Chem* 1997; 272: 100004-12
114. Ji X, Blaszczyk J, Xiao B. ve ark. Structure and function of residue 104 and water molecules in the xenobiotic substrate-binding site in human glutathione S-transferase P1-1. *Biochemistry* 1999; 38: 10231-38

115. Hemmingsen A, Fryer AA, Heple M. ve ark. Simultaneous identification of GSTP1 İle 105→Val 105 and Ala 114→Val 114 substitutions using an amplification refractory mutation system polymerase chain reaction assay: studies in patients with asthma. *Respir Res* 2001; 2: 255-260
116. Henderson CJ, Smith AG, Ure J. ve ark. Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5275-5280
117. Hu X, Xia H, Srivastava SK. ve ark. Activity of four allelic forms of glutathione S-transferase hGSTP1-1 for diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238: 397-402
118. Weiss ST. (1996). Issues in phenotype assessment. In S B Liggett and DA Meyers, editors. *The Genetics of Asthma*. Marcel Dekker, New York. 401-13
119. Hulya Ercan, Esra Birben, Evrim A. Dizdar, Ozlem Keskin, Çağatay Karaaslan, Ozge U. Soyer, Raziye Dut, Cansin Sackesen, Tanju Besler, Omer Kalayci Oxidative stress and genetic and epidemiologic determinants of oxidant injury in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:1097-104
120. Chen CL, Lio Q, Relling MV, Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 ve T1 polymorphisms by polimerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmacogenetics*. 1996; 6: 187-91
121. Matthey DL, Hassell AB, Plant M, ve ark. Association of polimorphism in the glutathione S-transferase, GSTM1, GSTM3, GSTP1 and GSTT1 loci with susceptibility and outcome in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1999; 58: 164-68
122. Freidin MB, Bragina E, Iu Ogorodova LM, ve ark. Polymorphism of the theta 1 and mu 1 glutathione s-transferase genes (GSTT1, GSTM1) in patients with atopic bronchial asthma from the West Siberian region. *Mol Biol. (Mosk)* 2002; 36: 630-34

123. Decramer M, Mólken MR, Dekhuijzen PNR, et al. Effects of N-acetylcysteine on outcomes in chronic obstructive pulmonary disease (bronchitis randomized on NAC cost-utility study, BRONCUS): a randomised placebo controlled trial. *Lancet* 2005; 365: 1552-60