



T.C.
Cumhuriyet Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**OVALBÜMİN İLE DUYARLANDIRILMIŞ KOBAY ASTIM MODELİNDE
NİTRİK OKSİT DONÖRLERİ NOC-18 VE SIN-1'İN TRAKEA DÜZ KASI
ÜZERİNDEKİ GEVŞETİCİ ETKİLERİNİN İN-VİTRO OLARAK
İNCELENMESİ**

ECZ. İRFAN YILMAZER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMOKOLOJİ ANA BİLİM DALI

SİVAS

2011

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENTİTÜSÜ

**OVALBÜMİN İLE DUYARLANDIRILMIŞ KOBAY ASTIM MODELİNDE
NİTRİK OKSİT DONÖRLERİ NOC-18 VE SIN-1'İN TRAKEA DÜZ
KASI ÜZERİNDEKİ GEVŞETİCİ ETKİLERİNİN İN-VİTRO OLARAK
İNCELENMESİ**

Ecz. İrfan YILMAZER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı

Prof. Dr. İhsan BAĞCIVAN

Sivas

2011

Bu alışma Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Farmakoloji Anabilim Dalı yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

ye (Danışman) : Prof. Dr. İhsan BAğCİVAN

ye : Prof. Dr. Tijen KAYA TEMİZ

ye : Doç. Dr. Sinan GÜRSOY

ONAY

Bu tez çalışması 15/11/ 2011 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ali Altuğ BIÇAKÇI
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Fen/Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

ÖZET

Astım patogeneğinde birçok faktörün rol oynadığı, hava yollarındaki daralmanın ataklar şeklinde meydana gelen, kronik ve inflamatuvar bir hastalıktır. Bu çalışmada ovalbuminle duyarlaştırılan kobaylardan izole edilen trakea preparatlarında in vitro olarak nitrik oksit donörlerinin düz kas gevşemesi üzerine olan etkileri ve bu etkilerde guanilat siklaz enziminin rolünün araştırılması amaçlandı.

Çalışmamızda kullanılan 20 adet erkek kobay kontrol ve ovalbumin duyarlı olarak iki gruba ayrıldı. Deney grubuna ovalbumin, kontrol grubuna salin enjeksiyonu yapıldı. Her iki gruptan elde edilen dokular Krebs-Henselit solüsyonu içeren 10 ml'lik organ banyosuna kasıcı ve gevşetici maddeler ile maruz bırakılmak için asıldı ve elde edilen yanıtlar kontrol ve Ovalbümin ile duyarlaştırılmış gruplar arasında karşılaştırıldı.

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, submaksimal konsantrasyonda karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra, SIN-1, NOC-18 ve Protoporfirin-9 gevşeme yanıtları kümülatif olarak alındı. Gevşemeler, Emaks ve pD₂ değerleri üzerinden değerlendirildi. Kontrol ve deney grupları karşılaştırıldığında, deney gruplarında SIN-1, NOC-18 ve Protoporfirin-9 gevşeme yanıtları tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Deney gruplarından alınan gevşeme yanıtlarında pD₂ değerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı, Emaks değerlerindeyse anlamlı bir azalma olduğu saptandı.

Elde ettiğimiz sonuçlar, astımda aktivitesi artan inflamatuvar NOS'a (iNOS) bağlı olarak fazla miktarda oluşan NO'nun, yapısal NOS'u (cNOS) inhibe etmesine ve bunun sonucunda endojen NO'nun azalmasına ve/veya guanil siklaz enzim miktar ve /veya aktivasyonundaki azalmaya bağlı olabilir. iNOS inhibitörlerinin kullanıldığı ve guanil siklaz enzim aktivite ve miktarının ölçüldüğü daha ileri çalışmalar gerek hastalığın patofizyolojisine ışık tutmak gerekse de yeni ilaçların klinikte kullanılabilirliğinin araştırılması açısından faydalı olacaktır.

ABSTRACT

Asthma pathogenesis is a chronic and inflammatory disease occurring with the shape of attacks of the air channels' narrowing. In this research, it have studied the effects on the planned muscle loosening of the nitric oxide donors as "in vitro" in trachea preparations isolated from cavies sensitized with ovalbumin and the role of guanylate cyclase enzyme on these effects.

In our research, twenty ones male cavies, control and as sensitized with ovalbumin were separated two groups. Ovalbumin was injected to the experiment group and saline to the control group. The tissues acquired from both of two groups were hanged up to with 10 milliliter the visceral bath including Krebs-Henselit solution in order to be exposed with the straining and loosening materials and the acquired results were compared between control and sensitised with ovalbumin.

SIN-1, NOC-18 and Protoporfirin-9 loosening results were acquired as cumulative after isolation trachea preparations acquired from the cavies in both of two groups were strained with carbachol in submaximal concentration and the tissues reached to the balance. Loosening were evaluated over Emaks and pD2 values. When the control and experiment groups were compared, in the experiment groups SIN-1, NOC-18 and Proporfirin-9 loosening results reduced mentionably in all concentration groups relatively in the control groups. In the loosening results acquired from experiment groups, it was determined not to be any mentionable change in pD2 values, but Emaks values recorded a mentionable decrease.

The results we acquired, NO occurring much quantities as related inflammatory NOS (iNOS) rising activity in asthma can inhibit structural NOS(cNOS) and in result of this, it can depend on decrease of endogenous NO and/or guanylate cyclase enzyme quantity and/or its activation. Next research used iNOS inhibitors and measured guanylate cyclase enzyme activity and quantity will be beneficial to both lightening up pathophysiology of the disease and searching usability of new medicines in the clinic.

TEŞEKKÜR

Bu alışmada bana yardımcı olan başta tez danışmanım Prof. Dr. İhsan BAĞCİVAN'a, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Tijen KAYA TEMİZ'e, tez çalışmam sırasında emeğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Ahmet ALTUN'a ve eğitimim sırasında emeği geçen Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve Öğretim elemanlarına teşekkür ederim

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
BÖLÜM I	1
GİRİŞ VE AMAÇ	1
BÖLÜM 2	3
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Astım	3
2.1.1. Tanım.....	3
2.1.2. Epidemiyoloji.....	3
2.1.3. Etyoloji	4
2.1.3.1. Konak Faktörleri	5
2.1.3.2. Çevresel Faktörler	6
2.1.4. Astım Patogenezi	7
2.1.4.1. Hava Yolu İnflamasyonu.....	7
2.1.4.2. Brons Asırı Duyarlılığı	9
2.1.4.3. Hava Yolu Obstrüksiyonu	10
2.2- NİTRİK OKSİT	11
2.2.1. Tanım ve Tarihçe	11
2.2.2. Biyosentezi	12
2.2.3. Nitrik oksit sentaz enziminin izoformları.....	13
2.2.4. Nitrik oksit etki mekanizması	15
2.2.5. Nitrik Oksit Fonksiyonları.....	16
2.2.6. Solunum Sistemi Üzerine Etkileri.....	16
2.2.7. Nitrik Oksit ve Astım	18

BÖLÜM III	21
ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER	21
3.1. Deney Hayvanlarının Seçimi.....	21
3.2. Kontrol ve Deney Gurubu	21
3.3. Alerjik Deri Reaksiyonu (ADR)	21
3.4. Trakea Preparatlarının Alınması ve İn Vitro Deneylere Hazırlanışı.....	22
3.5. Deneylerde Kullanılan Besleyici Solusyonlar ve İlaçlar.....	22
3.6 Kasılma Yanıtları.....	23
3.6.1. KCl Kasılma Yanıtları.....	23
3.6.2. Karbakol Kasılma Yanıtları.....	23
3.7. Gevşeme Yanıtları.....	23
3.7.1. NOC-18 Gevşeme Yanıtları.....	23
3.7.2. SIN-1 Gevşeme Yanıtları.....	24
3.7.3. Protoporfirin IX Gevşeme Yanıtları.....	24
3.8. Deney Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirmesi.....	24
BÖLÜM 4	26
BULGULAR	26
4.1. KCl Kasılma Yanıtları.....	26
4.2. Karbakol Kasılma Yanıtları.....	27
4. 3. Gevşeme Yanıtları.....	28
4.3.1. Papaverin Gevşeme Yanıtları	28
4.3.2. NOC-18 Gevşeme Yanıtları	29
4.3.3. SIN-1 Gevşeme Yanıtları	30
4.3.4. Protoporfirin IX Gevşeme Yanıtları.....	31
BÖLÜM 5	33
TARTIŞMA VE SONUÇ	33
KAYNAKÇA	40

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1: Astım Hastalığına Yol Açan Risk Faktörleri.....	5
Tablo 2: Nitrik oksit sentezleyen enzimler ve temel özellikleri.....	15
Tablo 3: Nitrik oksitin akciğerdeki fonksiyonları	18
Tablo 4: Kontrol ve deney guruplarının alerjik deri testi sonuçları açısından karşılaştırılmazı (aritmetik ortalama \pm standart hata.....	26

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Astım Patogenezi	10
Şekil 2: Astımda hava yolu patolojisi	10
Şekil 3: NO biyosentezi NOS: nitrik oksit sentaz; FMN: flavin mononükleotid; FAD: flavin adenin dinükleotid; BH4: tetrahidrobiopterin; CAM: kalmodulin.	13
Şekil 4: Nitrik oksit etki mekanizması	16
Şekil 5: İzole kobay trakea preparatlarında 80 mM KCl kasılma yanıtları (n=10)	27
Şekil 6: Kontrol ve ovalbumin duyarlı deney grubundaki izole kobay trakea preparatlarında karbakol konsantrasyon yanıt eğrileri (n=10).....	28
Şekil 7: 10^{-5} M Karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında papaverin gevşeme eğrileri (n=10).....	29
Şekil 8: 10^{-5} M Karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında NOC- 18 konsantrasyon yanıt eğrileri (n=10).....	30
Şekil 9: 10^{-5} M Karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında SIN-1 konsantrasyon yanıt eğrileri (n=10).	31
Şekil 10: 10^{-5} M Karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında protoporfirin IX konsantrasyon yanıt eğrileri (n=10).....	32

SİMGELER ve KISALTMALAR

NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
cNOS	: Yapısal nitrik oksit sentaz
eNOS	: Endoteliyal nitrik oksit sentaz
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
iNOS	: İnflamatuvar (indüklenebilir) nitrik oksit sentaz
PDE	: Fosfodiesteraz enzimi
PDE-5	: Fosfodiesteraz-5 enzimi
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
NANK	: Nonadrenerjik Nonkolinerjik
iNANK	: İnhibitör Nonadrenerjik Nonkolinerjik
VCAM-1	: Vasküler hücresel adezyon molekülü-1
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
L-NAME	: L-Nitro monometil arjinin
PKG	: Protein kinaz G
GS	: Guanilat siklaz
KCl	: Potasyum klorür
VIP	: Vazoaktif intestinal polipeptid
EAU	: Elektriksel alan uyarısı
Kca	: Kalsiyuma duyarlı potasyum kanalı

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

Ülkemizdeki Toraks Derneği Astım Çalışma Grubu tarafından 1996 ve 2000 yıllarında hazırlanan "Ulusal Astım Tanı ve Tedavi Rehberi"ne göre; kronik hava yolu inflamasyonu ile oluşan bronş hiperreaktivitesi ve nöbetler şeklinde öksürük, dispne, hışıltılı/hırıltılı solunum, göğüste sıkışma yakınmalarının bir veya birkaçı ile seyreden, yaygın, değişken, genellikle geri dönüşlü havayolu obstrüksiyonu olarak ifade edilen astım (69), dünyada her yaştan bireyi etkileyebilen ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Ayrıca kontrol altına alınmadığında günlük yaşamı ciddi şekilde sınırlandırabilen ve bazen ölümcül olabilen bir hastalıktır. Erken tanı konulması ve uygun tedavinin başlatılması durumunda, hastalığın getireceği sosyoekonomik yükte anlamlı bir azalma sağlanabileceği, hastaların yaşam kalitesinin artırılabilceği düşünülmektedir (25).

Hava yollarında, kolinerjik, α -adrenerjik, eksitatör nonadrenerjik nonkolinerjik (eNANK) olmak üzere bronkokonstrüksiyona neden olan üç nöral sistem ve β -adrenerjik ve inhibitör nonadrenerjik nonkolinerjik (iNANK) bronkodilatasyona yol açan mekanizmalar olduğu belirtilmektedir. Proksimal hava yollarında ağırlıklı olarak iNANK nöral sisteminin aktif olarak mevcut olduğu ve bu sistemin insan hava yollarındaki tek endojen bronkodilatör sistem olduğu ifade edilmektedir (7).

Yapılan bazı çalışmalar nitrik oksit (NO), iNANK'in nörotransmiteri olarak davrandığını ve bu şekilde de hava yollarındaki gevşemeye katkıda bulunduğunu bildirmektedir. İmmunohistokimyasal çalışmalar ile nöronal nitrik oksit sentazın (nNOS), kobay ve insan solunum yolları sinirlerinde lokalize olduğu gösterilmiştir. NOS immunoreaktivitesi gösteren sinirlerin solunum yollarının damarlarında, düz kas hücrelerinde ve lamina propria da bulunduğu belirtilmektedir (21).

NO, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile L-Arginin'den sentezlenir. NOS enziminin yapısal (constitutive) ve indüklenebilir (inflamatuvar) NOS olmak üzere

2 izoformu bulunduğu belirtilmektedir. cNOS hücrelerde bazal düzeyde bulunmaktadır ve oluşturduğu NO ile guanil siklazı aktive ederek fizyolojik olayları regüle eder. Kortikosteroidden etkilenmediği ifade edilmektedir. Endotelde bulunan endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve nöronlarda bulunan nNOS alt tipleri vardır. iNOS ise bazı uyarılardan (TNF α , IFN γ , IL-1, endotoksin gibi) sonra yapılıp aktivasyon kazanır. Kortikosteroidlerle iNOS'a bağlı NO yapımının azaltılabileceği belirtilmektedir (38).

Astımlı hastada; inflamatuvar hücrelerden açığa çıkan sitokinler ile iNOS transkripsiyonun olduğu ve buna bağlı NO'nun yüksek konsantrasyonda sentezlendiği, sonuç olarak cNOS'un inhibisyonuna ve guanil siklazın duyarısızlaşmasına neden olup, bronkodilatör yanıtı ortadan kaldıırabileceği belirtilmektedir (76).

NO'nun solunum sistemindeki ve astım gibi bazı solunum sistemi rahatsızlıklarındaki etkisini araştırmaya yönelik çeşitli in vivo/in vitro deneyler yapılmıştır. Bununla birlikte NO'nun hastalığın patofizyolojisi ile bağlantısının şüpheli olduğu ve yarar/ zarar dengesinin kesinlik kazanmadığı ifade edilmiştir. cNOS'a bağlı olarak bazal seviyede üretilen NO bronkokonstriktör stimulusa karşı koruyucu bir etki gösterirken, iNOS'a bağlı olarak aşırı miktarda üretilen NO'nun tam tersi etki gösterdiği ve iNOS inhibisyonunun astımda görölen allerjik inflamasyon üzerine etkisinin halen araştırılmakta olduğu belirtilmektedir (56).

Bu çalışmada ovalbuminle duyarılaştırılan kobaylardan izole edilen trakea preparatlarında in vitro olarak nitrik oksit donörlerinin düz kas gevşemesi üzerine olan etkileri ve bu etkilerde guanilat siklaz enziminin rolünün araştırılması amaçlandı.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Astım

2.1.1. Tanım

Astım birçok hücre ve hücre bileşeninin rol oynadığı kronik ve inflamatuvar bir hava yolu hastalığıdır (26, 16, 43). Hava yollarındaki inflamasyon, duyarlı bireylerde nöbetler halinde gelen öksürük, nefes darlığı, hışıltılı solunum ve göğüste sıkışma gibi semptomlara yol açar. Bu ataklar genellikle kendiliğinden veya tedaviyle geri dönüşlü olabilen değişken hava yolu obstrüksiyonu ile karakterizedir (75, 19).

Kronik inflamasyon bronş mukozasında yapısal değişikliklere yol açarak hava yollarının nonspesifik uyarılara olan duyarlılığının artmasına neden olur. Sağlıklı bireyleri etkilemeyen küçük uyarılar bu bireylerde belirgin bronkokonstrüksiyona neden olur. Bu durum bronş aşırı duyarlılığı olarak tanımlanır (75, 19, 13).

2.1.2. Epidemiyoloji

Astım tüm dünyada bütün ırklarda görülebilen bir hastalıktır. Yetişkinlerde prevalans verileri çok farklıdır ve genel olarak artma eğilimindedir. Astımdaki artışın genetik değil çevresel faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir. Astım prevalansı dünya üzerinde ülkeden ülkeye ve hatta aynı ülkenin bir bölgesinden, diğer bir bölgesine göre farklılıklar gösterir. Görülme sıklığı Eskimolar, Güney Doğu Asya'da %1'den düşükken, Yeni Zelanda ve Avustralya'nın bazı bölgelerinde %20'nin üzerine çıkabilmektedir. Değişen yaşam koşulları, çevre ve hava kirliliği, çocukluk döneminde geçirilen enfeksiyonlar, giderek daha çok kapalı ortamlarda yaşanması, günlük yaşamda azalan egzersiz, sigara, diyet alışkanlıklarındaki değişiklikler veya belki henüz tam olarak açıklanamamış genetik faktörler bu farklılıktan sorumlu tutulmaktadır. Dünyada yaklaşık olarak 150 milyon astım hastası olduğu tahmin edilmektedir (39). Ülkemizde ilkokul çağındaki çocuklarda astım prevalansı %3,8-%16,4 arasında değişmekte olup

ortalama %10'dur. Eriskinlerde astım prevalans araştırmaları dünyada ve ülkemizde çok daha azdır. Eriskinlerdeki prevalans %2,1-%7,6 arasında değismekte olup ortalama %3,6 civarındadır. Bu, ocukların astım prevalansının üçte biridir (46). Astım prevalansı, morbiditesi ve siddeti yas dönemleri ile değisen bir cinsiyet farklılığı göstermektedir. Bebeklik döneminde erkeklerde kızlara göre iki kat daha sık iken, pubertede bu oran esitlenir. 20 yasin üzerindeki kadınlarda astım prevalans ve morbiditesi erkeklere göre daha fazladır (46). Astımda mortalite seyrek tir. Ancak mortalite son birkaç dekadda artmıştır. WHO (World Health Organization) verilerine göre dünyada her yıl astıma bağlı 250 000 ölüm vakası görülmektedir. Astım morbiditesi yaşam kalitesi, sağlık hizmeti, astım siddeti, ilaç kullanımı, tedavi maliyeti, prevalans ve insidans gibi esitli faktörlerden etkilenmektedir (80).

2.1.3. Etyoloji

Astım hastalığına yol açan risk faktörleri, a) hastalığının gelişmesine yol açan ve b) semptomları tetikleyenler olarak ikiye ayrılmakla birlikte, bazıları her ikisine de sebep olabilir. Konak faktörleri birinci gurupta yer alırken, ikinci gurubu daha çok çevresel faktörlerin oluşturduğu ifade edilmiştir (Tablo 1) (8). Risk faktörlerinin astım gelişmesini ve ortaya çıkmasını sağlayan mekanizmaları karmaşık ve birbirleriyle etkileşim içindedir. Örneğin astıma yatkınlığın, genlerin hem diğer genlerle, hem de çevresel faktörlerle olası etkileşimi sonucunda belirlendiği ifade edilmektedir (58). Ayrıca bağışıklık sisteminin olgunlaşmasının ve yaşamın ilk yıllarında enfeksiyon ile karşılaşma zamanının, genetik yatkınlığı olan bireylerde astım riski açısından önemli olduğu belirtilmiştir (25).

Tablo 1: Astım Hastalığına Yol Açan Risk Faktörleri

KONAK FAKTÖRLERİ	ÇEVRESEL FAKTÖRLER
<ul style="list-style-type: none"> •Genetik faktörler (Atopi gelişmesine yatkınlık yaratan genler, hava yolu aşırı duyarlılığının gelişmesine yatkınlık yaratan genler) •Obezite •Cinsiyet 	<ul style="list-style-type: none"> • Alerjenler <ul style="list-style-type: none"> — Ev içi: ev içi akarları, kürklü hayvanlar (köpek, kedi, fare), hamamböceği alerjeni, mantarlar, küf, mayalar — Ev dışı: polen, mantar, küf, maya • Enfeksiyonlar (öncelikle viral) • Mesleksel duyarlılaştırıcılar • Sigara dumanı <ul style="list-style-type: none"> — Pasif içicilik — Aktif içicilik • Ev dışı/ev içi hava kirliliği • Beslenme

2.1.3.1. Konak Faktörleri

Genetik faktörler: Astımın kalıtsal bir bileşeni vardır ama basit değildir. Güncel veriler, astım patogeneğinde birden çok genin yer alabildiğini ve farklı etnik gruplarda farklı genlerin sorumlu olabileceğini göstermektedir (34).

Atopi astımda bilinen en önemli risk faktörüdür. Atopik kişilerde astım riski non-atopiklere göre 10–20 kat daha fazladır. Atopik dermatitli ve alerjik rinitli hastalarda astımın % 40–70 gibi yüksek oranlarda görülmesi, atopinin önemli bir risk faktörü olduğunu göstermektedir (78).

Genetik faktörlerin astım gelişiminde risk faktörü olmasının yanısıra, bazı genlerdeki polimorfizimlerin astımın şiddetini ve β -adrenerjik agonist ve antilökotrien gibi ilaçların tedavideki başarı derecelerini etkileyebildikleri belirtilmektedir (77).

Cinsiyet: Erkek cinsiyet, çocuklarda astım için bir risk faktörüdür. Çocuklar büyüdükçe bu fark azalır ve erişkinlik çağında astım prevalansı kadınlarda erkeklerden daha yüksektir. Cinsiyete bağlı bu farklılıkların nedeni açık değildir. Ancak akciğer boyutlarının doğumda erkek çocuklarda kız çocuklardakinden daha küçük olduğu, erişkinlik çağında bu durumun tersine döndüğü belirtilmektedir (53).

2.1.3.2. Çevresel Faktörler

Allerjenler: Ev içi ve ev dışı allerjenlerin astım alevlenmelerine neden olabildiği iyi bilinmekle birlikte, bunların astım gelişimindeki rolleri hâlâ tam olarak anlaşılamamıştır. Alerjen maruziyeti ile çocukların duyarlılaşması arasında dolaylı bir bağlantı olduğu ve bunun allerjenin dozuna, maruziyet süresine, çocuğun yaşına ve olasılıkla genetik faktörlere bağlı olduğu ifade edilmektedir (25).

Enfeksiyonlar: Hastaneye yatırılan ve RSV olduğu belgelenen çocuklarda yapılan uzun süreli ileriye yönelik birkaç çalışmada, bu hastaların yaklaşık % 40'nda hışıltılı solunumun devam ettiği veya geç çocukluk çağı astımının ortaya çıktığı bildirilmektedir (67).

Sigara: Sigara kullanımının astımlı hastalarda akciğer fonksiyonunun azalmasını hızlandırdığı, astımın şiddetini artırdığı, hastaları inhale ve sistemik glukokortikosteroid tedavilerine daha az yanıt verir duruma getirdiği ve astımın kontrol altına alınma olasılığını azalttığı belirtilmektedir (4).

Beslenme: İşlenmemiş gıda alımının artmasının, antioksidan (meyve ve sebze şeklinde) alımının azalmasının, n-6 çoklu doymamış yağ asidi alımının (margarinlerde ve bitkisel yağlarda bulunur) artmasının, n-3 çoklu doymamış yağ asidi alımının (balıkyağında bulunur) azalması gibi beslenme tarzının, astım ve atopik hastalık sıklığında meydana gelen artışa katkı sağlayabileceği belirtilmektedir (14).

2.1.4.Astım Patogenezi

Astım hastalığının temelinde yatan olay, hava yollarının kronik inflamasyonudur.

Astım etiyojisi ve patogenezi Tablo-1'de ana başlıklar halinde özetlenmiştir (73).

Astım kalıtsal bir hastalıktır. Genetik özellikler tek başına ele alındığında genel olarak astım %5–10 oranında görülürken, anne veya babadan birinin astımlı olması durumunda bu oran %20-30'a yükselmekte, anne ve babanın her ikisinin astımlı olması durumunda ise %60- 70 gibi oldukça yüksek rakamlara ulaşmaktadır (39,46).

Ailesinde astım ve atopi öyküsü olan bebeklerde, intrauterin dönemde ve yaşamın ilk yıllarında karşılaştıkları çevresel faktörler bebeğin astım fenotipine programlanmasına neden olmaktadır (73). Son yıllarda atopinin maternal kalıtım modeli izlediği öne sürülmüştür. Atopik annelerin bebeklerinde kord kanı total IgE düzeyinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (57). Çocukluk döneminde enfeksiyöz ajanlara yetersiz maruz kalma, astım ve alerjik hastalık geliştirme riskini artırmaktadır. Hijyen hipotezine göre viral veya bakteriyel enfeksiyonlar, enfeksiyonlara karşı gecikmiş tipte aşırı duyarlılık şeklinde yanıt oluşturan Th1 bağışıklık yanıtını uyararak, atopik reaksiyonlardan sorumlu olan Th2 bağışıklık yanıtını baskılayabilmektedir (68).

Bronşial astımın tanımda belirtildiği gibi 3 özelliği vardır:

1. Kronik hava yolu inflamasyonu
2. Bronşial hiperreaktivite
3. Hava yolu inflamasyonu

2.1.4.1. Hava Yolu İnflamasyonu

İnhalasyon yolu ile alınan ve bronşial mukozaya ulaşan antijenler, antijen sunan hücreler (Antijen Presenting Cell) (APC) tarafından alınır ve peptidlere parçalanır. MHC class II (Major Histocompatibility Complex) doku uyum antijeni

ile CD4 (+) T lenfositlerine sunulur. CD4 (+) T lenfositler, T hücre reseptörleri (TCR) ile sunulan antijeni algılayıp aktivite kazanırlar, Th1 ve Th2 olmak üzere iki ayrı gruba diferansiye olurlar (23). Astımda kronik iltihabi reaksiyonun sürdürülmesinde ve kontrolünde aktive T helper lenfositlerin önemi büyüktür. Th1'ler hücrel sitotoksiste, Th2'ler IgE sentezinin yönetiminden sorumludur. Th2'ler IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 ile IgE sentezini artırır (23). IL-3, GM-CSF, TNF- α her iki Th alt grubunda da yapılır. IL-4 ve IL-9 mast hücre maturasyonunda rol alırken, GM-CSF, IL-3, IL-5 eozinofillerin diferansiyasyon ve maturasyonunda, IL-6 eozinofil ve mast hücrelerin aktivasyonunda önemlidir. IL-4 ve IL-13, B lenfositlerden IgE oluşumunu aktive eder. Astımlı hastaların mukoza biyopsi ve lavaj incelemelerinde bronş mukozasında Th2 lenfositlerin arttığı farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Th2 inflamasyonun modülasyonundan sorumlu hücrelerdir. Th2 kaynaklı sitokinlerden IL-4 ve IL-13, normal koşullarda IgG ve IgM üreten B lenfositleri uyararak bu hücreleri IgE sentezine yönlendirir. IL-4 ve IL-13 atopinin ortaya çıkışında rol alan sitokinlerdir. Th2 kaynaklı diğer sitokinler olan IL-5, IL-3 ve GM-CSF ise eozinofil maturasyonu, inflamasyon bölgesinde birikmesi, aktivasyonu ve yaşam sürelerinin uzamasını sağlayarak astımda hava yollarında oluşan eozinofilik inflamasyonda önemli rol oynarlar (Şekil-1) (73).

Th2 lenfositlerin uyarısı ile B lenfositlerden aşırı miktarda IgE sentezlenmeye başlaması artık kişinin sensitize olduğunu gösterir. Serum total ve spesifik IgE düzeyleri çok yükselmistir. Duyarlanmış bu kişilerin alerjen ile yeniden teması mast hücrelerin degranülasyonuna neden olur. Mast hücrelerinden sentezlenip sitoplazmik granüllerde depolanan histamin, triptaz gibi mediatörler hücre dışına çıkarken, IgE uyarısı ile lökotrien ve prostaglandinler gibi yeni mediatörler de sentez edilir. Mast hücre kaynaklı bu mediatörler bronş mukozasında vazodilatasyon, ödem, mukus sekresyonu ve bronkospazm oluşturarak astımlı hastalarda akut ataklara neden olurlar. Bronş mukozasında sayıları ve aktiviteleri artmış olan mast hücreleri ve Th2 lenfositlerden açığa çıkan sitokinler mukozaya eozinofillerin göçüne neden olurlar (37). Sitokinlerin (IL-5) uyarısı ile kemik iliğinde diferansiye olup matürasyonunu tamamlayan

eozinofiller dolasına geçerler. Eozinofiller yüzeylerinde yapısal olarak bulunan L-selektin ve Sialyl-Lex aracılığı ile endotelde beliren E-selektine bağlanırlar. Selektinler eozinofillerin kapiller endotele zayıf ve geri dönüşümlü bağlar ile bağlanmasına neden olur. Endotele sıkıca bağlanıp, inflamasyon bölgesine tutulan eozinofiller adezyon molekülleri aracılığı ile endoteli geçerek interstisyel dokuya gelirler (Şekil 2) (73).

Kronik inflamasyon ve akut inflamatuvar ataklar sonucunda brons mukozası zedelenir. Olusan bu zedelenmeyi onarmak amacıyla; subepitelyal fibrozis, brons düz kas hipertrofisi ve hiperplazisi, yeni damar olusumları ve goblet hücre hipertrofisi gibi kalıcı yapısal değişiklikler (remodelling) ortaya çıkar (şekil 3) (74). Th2 yönünde farklılaşma ve atopi gelişiminde çevresel faktörlerin yanı sıra genetik etkenler de önemli rol oynamaktadır. Benzer hava yolu inflamasyonuna karşın diğer hastalıklarda brons hiperreaktivitesi oluşmazken astımda brons aşırı duyarlılığının ortaya çıkması sadece atopinin değil astımlı hastalarda hava yolu duyarlılığı, brons mukozası yapısı ve fonksiyonlarının da genetik kontrol altında olduğunu göstermektedir.

2.1.4.2. Brons Aşırı Duyarlılığı

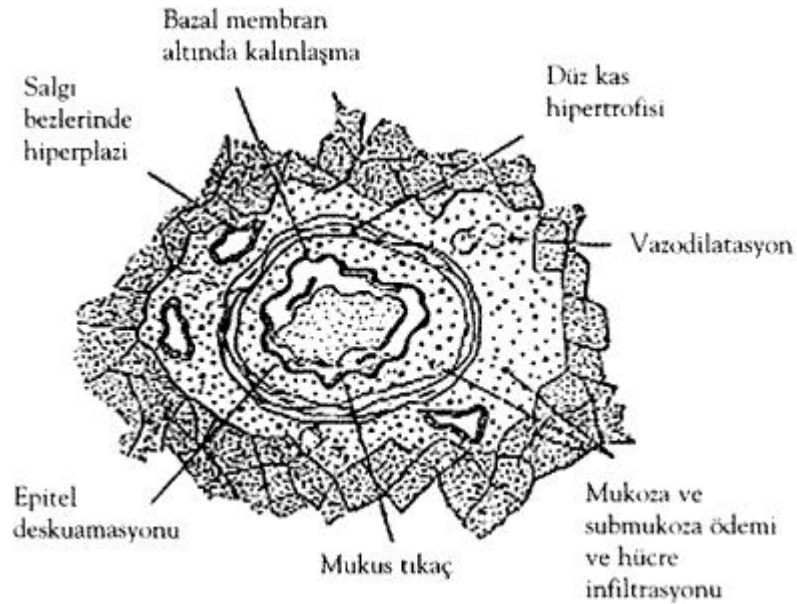
Bronşial hiperreaktivite, duyarlılığı artan hava yollarının sağlıklı kişileri etkilemeyecek kadar küçük uyarılar karşısında bile aşırı bronkokonstrüktör yanıt vermesidir. Brons aşırı duyarlılığını ölçmek için histamin ve metakolin gibi direkt uyarımlarla yapılan teste ise bronkoprovokasyon testi denir. Kronik hava yolu inflamasyonu, brons çapında daralma ile birlikte, brons epitel yıkımına da neden olarak bronşial aşırı duyarlılığın oluşmasında rol oynar. Epitel bütünlüğünün bozulması sonucu myelinsiz duyu sinirlerinin uçları açığa çıkar. Toz, duman, sülfürdioksit gibi nonspesifik uyarımlar bu duyu sinirlerine çok daha kolay ulaşır ve kolinerjik afferent uyarıyı oluşturlar. Vagal sinir ile gelen efferentlerle oluşan akson refleksi brons düz kasının kasılmasına yol açar. Epitel harabiyeti ile brons düz kas tonusu artar. Kronik inflamasyon ve yapısal değişiklikler sonucu bronşlar aşırı duyarlı hale gelir ve hava yolları küçük uyarımlarla bile daralabilme özelliği kazanır (74).

2.1.4.3. Hava Yolu Obstrüksiyonu

Astımlı hastalarda hava yolu obstrüksiyonu; tetikleyici ajanlarla karşılaşma sonrası gelişen akut bronkokonstrüksiyon, mukoza ödemi, mukus tıkaçları ve hava yollarındaki yapısal değişikliklere bağlı olarak gelişmektedir



Şekil 1. Astım Patogenezi (76)



Şekil 2: Astımda hava yolu patolojisi (17)

2.2- NİTRİK OKSİT

2.2.1. Tanım ve Tarihçe

Nitrik Oksit

Atmosferde, bakteriler, asid yağmurları, egzoz gazları ve sigara dumanı, çevre kirlenmesine neden olan, reaktif nitrojen oksitleri üretirler. Bu reaktif nitrojen oksitler, aynı zamanda karsinojenik etki de oluşturabilirler. Atmosferde kirlenici bir gaz olarak bilinen nitrik oksitin, memeli hücrelerinde sentezinin gösterilmesi, birçok biyolojik araştırmalarda önemli bir süreci başlatmıştır (5, 54).

Bir azot ve bir oksijen atomu içeren esterleşmemiş bir elektrona sahip olan NO, renksiz gaz yapısında, küçük, yüksüz ve lipofil bir moleküldür. Bilinen en düşük moleküler ağırlıklı, memeli hücreleri sekresyon ürünüdür. Dayanaksız bir moleküldür. 3-5 saniye gibi çok kısa bir yarı ömre sahiptir. Biyolojik membranlardan çok kolay difüze olabilir (5, 2). Lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir ve suda erir (55, 61). Düşük konsantrasyonlarda iken toksik değildir ve birçok önemli fizyolojik işlevin gerçekleşmesinde rol alır.

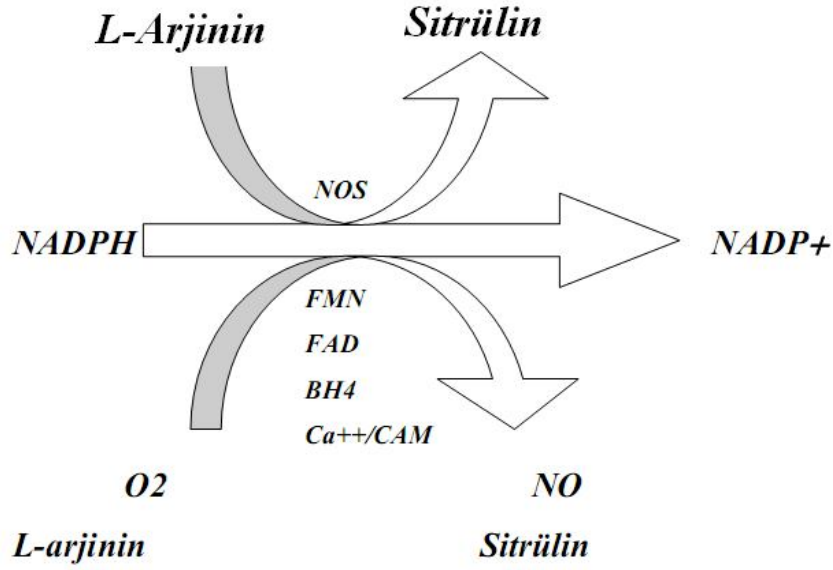
Tarihsel gelişimi

Amerika Birleşik Devletleri New York Downstate Üniversitesi Farmakoloji bölümünden Furchgott ve Zawadski (22) ilk olarak 1980 yılında tavşan aortik damar şeritlerinde noradrenalin, fenilefrin veya başka bir kasıcı agonistle submaksimal (maksimal kasılmanın % 60-70'i) bir kasılma sağladıktan sonra ortama asetilkolin (Ach) ilavesi ile gevşemelerin oluştuğunu gösterdiler. Bu gevşemenin endotelyuma bağımlı olduğunu ve bu etkiden endotelyumdan düz kasa geçebilen non prostanooid labil bir maddenin sorumlu olduğunu ileri sürdüler. Bu hazırlanan gevşeme izole aort halkalarında endotel mevcutsa olmakta, ancak endoteli alındıktan sonra gevşeme kaybolmakta veya kasılmaya dönüşmekteydi. Bu nedenle bu faktör ‘Endotelium Derived Relaxing Factor’(EDRF) olarak adlandırılmış ve EDRF ile olan araştırmalar hız kazanmıştır. Başlangıçta EDRF, araşidonik asitin lipooksijenaz yolundaki ara ürün olarak değerlendirilmiştir. 1987 yılında ise, Ignarro ve arkadaşları (36) ile Palmer ve arkadaşları (51) ayrı ayrı

yaptıkları çalışmalarda, EDRF' yi damar endotelinden izole etmişler ve bu yapının dominant kısmının NO olduğunu tespit etmişlerdir. Palmer ve arkadaşları, EDRF ile ilgili yaptıkları araştırmada, bu molekülün yarı ömrünün çok kısa olduğu, aktivitesinin saniyeler içinde oluşup, bir başka forma dönüşerek sona erdiği görülmüş ve bu yapının NO olduğu düşünülmüştür. 1988' de Moncada ve arkadaşları, EDRF ile NO'nun aynı bileşik olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmalarda NO'nun L-Argininden sentezlendiği görülmüş ve reaksiyonu gerçekleştiren enzime nitrik oksit sentaz (NOS) adı verilmiştir. NO, 1992 yılının Aralık ayında, Amerika' da "Science" dergisi tarafından yılın molekülü seçilmiştir. Furchgott, Ignarro ve Murad 1998'de NO ile ilgili çalışmalarıyla Nobel ödülü almıştır.

2.2.2. Biyosentezi

NO, L-arjininden; sitokrom p-450 redüktaz homologu olan, NOS olarak bilinen enzim ailesi tarafından, birbirinden bağımsız iki monooksijenizasyon reaksiyonu ile sentezlenir. Yan ürün olarak L-sitrüllin oluşur. Normalde L-Arjinin seviyesi sürekli salınan NO sentezi için yeterlidir. Bu reaksiyonun yan ürünü olan L-sitrüllin, bir azotla birleşerek tekrar L-Arjinine dönüşür ve bu suretle de L-Arjinin temin edilmiş olur (44, 50). L-Arjinin'den NO sentezinde, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP), kalmodulin, oksijen ve dört kofaktöre (hem, FMN=flavin mononükleotid, FAD=flavin adenin dinükleotid ve BH4=tetrahidrobiyopterin) gereksinim duyulduğu anlaşılmıştır (54, 41, 40, 45) (Şekil 2.10).



Şekil 3. NO biosentezi NOS: nitrik oksit sentaz; FMN: flavin mononükleotid; FAD: flavin adenin dinükleotid; BH4: tetrahidrobiopterin; CAM: kalmodulin.

NO salınımına birçok etken neden olmaktadır bu nedenlerden bazıları şunlardır: Asetilkolin, histamin, adrenalin, serotonin, vazopressin, bradikinin, prostasiklin, VIP, P maddesi, kalsitonin geni ile ilişkili peptid, insulin, alfa - adrenerjik reseptörler, kalsiyum iyonoforları, akıma bağlı sürtünme stresi, pıhtılaşma sırasında oluşan trombin, trombosit agregasyonu sırasında aktive edilen trombositlerin salıverdikleri ATP ve ADP, oksitosin ve PAF.

2.2.3. Nitrik oksit sentaz enziminin izoformları

Nitrik oksit sentezini katalizleyen NOS enzimlerinin iki temel izoformu bulunur:

- a) konstitütif (cNOS)
- b) indüklenebilir (iNOS)

İki çeşit konstitütif enzim bulunmaktadır. Bunlardan birisi endotelial NOS (eNOS), diğeri nöronal NOS (nNOS)'dur. eNOS ağırlıklı olarak zarsal bir

enzimdir ve endotel kaynaklı gevşeme faktörünün (EDRF) sentezinden sorumludur. eNOS, iki globuler protein molekülünden oluşmaktadır (redüktaz ve oksijenaz segmentleri). Bu iki segment esnek protein yapısı ile birbirine bağlanmıştır. Oksijenaz segmenti, NO üretimi için gerekli olan katalitik merkezden oluşur. L-arjinin, tetrahidrobiopterini (BH4) bağlar. Redüktaz segmenti, NO sentezi için NADPH'a bağlanarak dehidrojenasyonu katalize etmek için gerekli olan elektronları üretir. Elektronlar esnek protein yapıdan oksijenaz segmentine transfer edilir. Bu elektron transferi kalmodulinin (CAM), esnek protein parçasındaki spesifik bağlanma bölgesine kalsiyum aracılığıyla bağlanmasıyla aktive edilir (42).

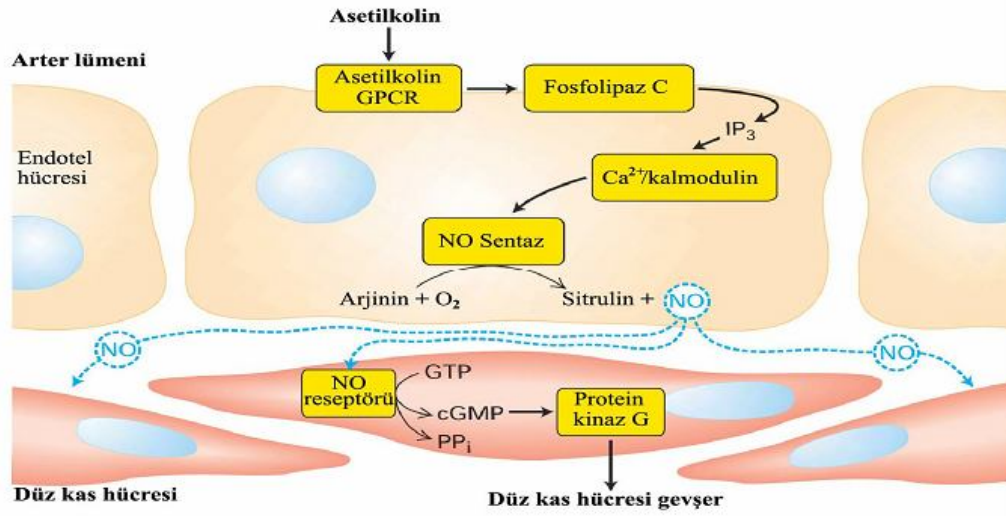
nNOS, MSS ve nöronlarda haberci molekül olarak kullanılan NO sentezinden sorumludur. Konstitütif enzimlerin aktiviteleri mutlak olarak Ca^{++} /kalmodulin bağımlıdır. NOS enzimlerinin indüklenebilir olan izoformu (iNOS, NOSIII) alt birim olarak kalmoduline ihtiyaç duyar. Aktivitesi için Ca^{++} 'a ihtiyaç yoktur. iNOS enziminin sentezini lipopolisakkaritler gibi çeşitli bakteriyel ürünler ile inflamatuvar sitokinler indüklerler (INF- γ , IL-1, IL-2, TNF- α gibi). iNOS sadece fagositik lökositlere özgü olmayıp uygun indüksiyonla tüm çekirdekli hücreler tarafından sentezlenebilir. NOS enzimlerinin aktiviteleri tamamıyla koenzimlere bağımlıdır ve NO sentezini katalizlemeleri için dimer yapı oluşturmaları gerekir. Bu enzimler alt birim başına FAD, FMN ve THB'e gereksinim duyarlar (51) (Tablo 2.6).

Tablo 2. Nitrik oksit sentezleyen enzimler ve temel özellikleri

NOS izoenzimi	Salınım	Kaynak	Regülasyon	NO miktarı
nNOS	Devamlı	Sinir hücreleri	Kalsiyuma bağımlı	Düşük (pmol)
iNOS	Uyarıldığında	Makrofaj, damar düz kası, damar endoteli, miyokard, endokard, hepatosit, immün hücreler, hava yolu epiteli	Sitokinler, endotoksin ve oksidanlar tarafından indüklenme	Yüksek (nmol)
eNOS	Devamlı	Vasküler, endotel hücreleri, trombositler, miyokard ve endokard, mast hücreleri, nötrofiller	Kalsiyuma bağımlı	Düşük (pmol)

2.2.4. Nitrik oksit etki mekanizması

NO endotel hücresi tarafından sentezlendikten sonra difüzyonla düz kas hücrelerine geçerek guanilat siklazı aktive edip cGMP seviyesini artırır. cGMP düz kas hücresi içindeki cGMP bağımlı protein kinazı aktive eder. Bunun sonucunda potasyum kanalları fosforile, Ca^{+2} kanalları hiperpolarize olur. Hücre içi Ca^{+2} miktarı azalır ve bu da düz kas hücresinde gevşemeye yol açar. NO, cGMP yolundan başka sodyum ve potasyum kanallarını doğrudan aktive ederek de vazodilatasyona katkıda bulunur (51, 42, 6) (Şekil 2.11).



Şekil 4. Nitrik oksit etki mekanizması

2.2.5. Nitrik Oksit Fonksiyonları

Nitrik oksit; kardiyovasküler sistem, santral sinir sistemi, gastrointestinal sistem, ürogenital sistem, immun sistem ve solunum sisteminde birçok olayda rol almaktadır.

2.2.6. Solunum Sistemi Üzerine Etkileri

NO, solunum sisteminde epitel hücresinde, solunum yolu sinirlerinde, inflamatuvar hücrelerde (makrofajlar, nötrofiller, mast hücreleri), damar endotelinde, düz kas hücrelerinde, Tip II alveolar hücreler gibi çeşitli hücrelerde sentezlenmektedir. Aynı zamanda son çalışmalarda insan akciğer epitel hücrelerinde iNOS'un yapısal ekspresyonunun mRNA ve protein düzeyinde gösterildiği belirtilmektedir. NO, solunum sisteminde solunum yolları tonusunu, bronşiyal sirkülasyonu, mukus ve elektrolit sirkülasyonunu ve hava yolları nöronal aktivitesini regüle etmektedir (1).

Hava yollarında, kolinerjik, alfa-adrenerjik, eNANK olmak üzere bronkokonstrüksiyona neden olan üç nöral sistem ve beta-adrenerjik ve iNANK'ın ise bronkodilatasyona yol açan nöral sistemler olduğu belirtilmektedir.

Proksimal hava yollarında ağırlıklı olarak iNANK nöral sisteminin aktif olarak mevcut olduğu ve bu sistemin insan hava yollarındaki tek endojen bronkodilatör sistem olduğu ifade edilmektedir. NO, tıpkı vazodilatör etkisi gibi bronkodilatör etkiye de sahiptir. Bu etkisini, doğrudan bronş düz kas hücresi içindeki cGMP oranını artırarak ve dolaylı olarak da iNANK nöronların bir nörotransmitteri olarak göstermektedir (7). Son yıllarda NO'nun iNANK'in nörotransmitteri olarak gevşeme olayına katkıda bulunduğunu destekleyen bazı çalışmalar yapılmıştır. İmmunohistokimyasal çalışmalar ile nNOS'un kobay ve insan solunum yolları sinirlerinde lokalize olduğu gösterilmiştir. NOS immunoreaktivitesi gösteren sinirlerin solunum yollarının damarlarında, düz kas hücrelerinde ve lamina propria tabakasında bulunduğu belirtilmektedir (21).

Solunum havasında NO'nun (sağlıklı bireylerde 5–10 ppb) ve bronkoskopik lavaj ve indüklenmiş balgam örneklerinde NO metabolitlerinin saptanmış olması, NO'nun hava yollarında sentezlendiğini gösteren bulgulardır (65). Gruetter ve arkadaşları nitrovazodilatörlerin sığır izole solunum yolu düz kasında guanilat siklazı aktive ederek ve cGMP düzeylerini artırarak gevşeme oluşturduğunu göstermişlerdir (29). Anestezi altındaki kobaylarda metakolin ile sağlanan bronkokonstriksiyonun inhale edilen NO ile konsantrasyona-bağımlı (5–300 ppm) bir şekilde azaldığı belirtilmektedir (18). Bununla birlikte NO'nun yüksek konsantrasyonlarının ise (300 ppm) bazal tonusda ufak bir bronkodilatasyon oluşturduğu gösterilmiştir. Anestezi altında ve mekanik olarak ventile edilen tavşanlarda solunum havasına eklenen 80 ppm NO'nun nebulizasyonla uygulanan metakolin'in oluşturduğu rezistans artışını önlediği fakat pulmoner kompliyansda bir değişiklik oluşturmadığı gösterilmiştir. Bu sonuçların NO'nun küçük solunum yollarına göre, daha büyük solunum yollarında kasılma yanıtlarını önlediğini düşündürdüğü ifade edilmiştir (33).

NO'in akciğerde yaptığı yararlı ve zararlı etkiler Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo-3: Nitrik oksitin akciğerdeki fonksiyonları (20)

Yararlı Etkiler	Zararlı Etkiler
1. Bronkodilatasyon 2. Arteriyel vazodilatasyon 3. Mukosilyer klirensin düzenlenmesi 4. Savunma sistemleri: Bakteri, virüs ve parazitlere toksik etki	1. Semptomlarda ve hava yolu obstrüksiyonunda artışa neden olan inflamatuvar yanıt 2. Bronşiyal vazodilatasyon, astımlı hastalarda görülen hava yolu hiperemisi 3. Postkapiller venüllerdeki kan akımını arttırarak hava yollarında ödem 4. Pulmoner damarlardaki vazodilatasyona bağlı ventilasyon/perfüzyon dengesizliği 5. Doğrudan veya submukozal bezlerdeki kan akışını artırarak mukus sekresyonunda artış 6. T-helper 2 (Th2) aktivasyonunda dolaylı artışa bağlı olarak astmatik inflamasyonda artış 7. Hava yollarında inflamatuvar hücrelerce oluşturulan süperoksit anyonları ile birleşerek peroksinitrit iyonları oluşturması

2.2.7. Nitrik Oksit ve Astım

Astımda exhale edilen NO seviyesi arttığı ve NO ölçümünün inflamatuvar süreci tespit için non-invasif bir yöntem olarak kullanılabilceği belirtilmektedir (56). Astımlı hastalarda hava yollarında iNOS enzim salınımının ve buna bağlı NO miktarının arttığı ve steroid tedavisiyle bunun normale döndüğü birçok çalışmada gösterilmiştir (3). Miktarı artan NO'nun, cNOS'un inhibisyonuna ve guanil siklazın desensitizasyonuna neden olup, bronkodilatatör yanıtı ortadan kaldırdığı belirtilmektedir (24).

NO ölçümünün astım hastalarında sağladığı faydalardan biri subklinik formların saptanıp steroidle tedavi edilmesi ve klinik olarak hastalık tablosunun ortaya çıkmasının önlenmesiyken, bir diğer faydası da tedaviye yanıtın değerlendirilip gereksiz yere yüksek doz ilaç alımının önüne geçmiş olmasıdır (3).

NO, süperoksit radikali (O_2^-) ile hızlı bir şekilde etkileşir ve süperoksitten daha güçlü bir oksidan olan peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşumuna neden olur. O_2^- 'den peroksinitrit oluşumu ile, SOD aracılığı ile H_2O_2 oluşumu arasında bir yarışma söz konusudur. Fizyolojik koşullarda peroksinitrit oluşumunun ihmal edilebilir düzeyde olduğu belirtilmektedir. Dolayısıyla eNOS'tan fizyolojik koşullarda üretilen NO'nun, SOD'un fizyolojik konsantrasyonlarının varlığında antioksidan, bronş ve damar düz kas gevşetici etki gösterdiği, iNOS aracılığı ile üretilen çok yüksek konsantrasyonlardaki NO'nun ise peroksinitrit oluşumuna neden olabileceği belirtilmektedir (1). Akciğerlerdeki inflamatuvar süreçte NO ve aktive nötrofiller tarafından ortaya çıkarılan süperoksit anyonu arasındaki reaksiyon sonucu oluşan peroksinitritin; epitel hasarına, medyatör salınımına ve hava yolu duyarlılığının artmasına neden olduğu belirtilmektedir (59).

NO'nun solunum sistemindeki ve astım gibi bazı solunum sistemi rahatsızlıklarındaki etkisini araştırmaya yönelik in vivo/in vitro çeşitli deneyler yapılmıştır. İnsanda santral ve periferel solunum yollarında iNANK yanıtlarına tamamen NO'nun aracılık ettiği gösterilirken, kobay trakeasında ise bu yanıtlara NO'nun yanı sıra VIP'inde aracılık ettiği belirtilmiştir (47). Harm Maarsingh ve arkadaşları kobaylardaki alerjik astım modelinde; erken astmatik reaksiyondan sonra nNOS kaynaklı NO'nun eksikliğine bağlı olarak iNANK gevşemelerinin belirgin şekilde azaldığını gösterirlerken, artmış arjinaz aktivitesinin, NO eksikliğinin ve bozulmuş iNANK gevşemelerinin ana nedeni olduğunu iddia etmişlerdir (52). NO donörleriyle yapılan bir başka çalışmada Kırsı Vaalı ve arkadaşları NO salan ilaçların kobay trakeasındaki in vitro gevşetici etkilerinin, yapısal özelliklerinden bağımsız olarak, bir ölçüde Ca^{+2} duyarlı K kanalları aracılığı ile olduğunu ve bu etkinin ODQ gibi soluble guanilat siklaz inhibitörleri ile antagonize edilebildiğini belirtmişlerdir. Uyguladıkları modelde ATP duyarlı

K kanal inhibitörü glibenklamidin, çalışılan NO donörlerinin gevşetici etkilerini modifiye edemediğini ve 4-Aminopiridin'in etkilediği K kanallarının da bu etkilerde rol oynamadığını ifade etmişlerdir (79). Duyarlı hale getirilmemiş kobay trakeasında yapılan bir başka in vitro çalışmada; NANK aracılı gevşeme yanıtlarında NO'nun mediatör olarak rol aldığı ve PDE-5 inhibisyonunun NO aracılı gevşemeyi artırdığı ifade edilmiştir (70).

Eksojen olarak verilen NO nun hem bronkodilatör hem de bronkoprotektif etkileri olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte NO'nun hastalığın patofizyolojisi ile bağlantısının şüpheli olduğu ve yarar/ zarar dengesinin kesinlik kazanmadığı ifade edilmiştir. cNOS'a bağlı olarak oluşan NO'nun bronkokonstriktör stimulusa karşı koruyucu bir etki gösterdiği, iNOS'a bağlı olarak aşırı miktarda üretilen NO'nun tam tersi etki gösterdiği ve iNOS inhibisyonunun astımda görülen allerjik inflamasyon üzerine etkisinin halen araştırılmakta olduğu belirtilmektedir (56).

BÖLÜM III

ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Hayvanlarının Seçimi

Bu çalışmada Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarından temin edilen, 280–330 g ağırlığında 20 adet erkek erişkin kobay kullanıldı. Deneklere yapılacak işlemler konusunda Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulundan onay alındı. Kobaylar kontrol ve ovalbumin duyarlı (deney grubu) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Deneyler Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında ve Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.2. Kontrol ve Deney Gurubu

20 adet yetişkin kobay eşit iki gruba ayrıldı. Hayvanlar oda sıcaklığında metal kafeslere konarak yiyecek ve suya ulaşmalarına izin verildi. Deney grubundaki kobaylar 1. ve 4. günlerde 0.30 ml, %5'lik (a/h) ovalbumin/salin solüsyonu ile duyarlı hale getirildi. Kontrol grubundaki hayvanlara ise 1. ve 4. günlerde 0.30 ml salin solüsyonu uygulandı. Her iki gruptaki hayvanlar 25. günün sonunda öldürüldü (12).

3.3. Alerjik Deri Reaksiyonu (ADR)

Kobayların ovalbumin ile duyarlanıp duyarlanmadığını tespit etmek amacıyla alerjik deri reaksiyonu uygulandı. Her bir kobayın üst dermis bölgesine intradermal olarak izotonik saline, ovalbumin (0,5, 1,0, and 5µg) verildi. 60 dakika sonra oluşan kızarıklığın çapı ölçülerek ovalbumin duyarlılığı tespit edildi (81).

3.4. Trakea Preparatlarının Alınması ve İn Vitro Deneylere Hazırlanışı

Pentobarbital (100 mg i.p.) anesteziğini takiben servikal dislokasyonla öldürülen kobayların trakea dokuları çıkarılarak besleyici solüsyon içerisinde ve hızlı bir şekilde Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirildi. Kobaylardan alınan izole trakea preparatları uygun şekilde çevre dokularından temizlendi. Preparatlar, eşit boyda olmak üzere (3,4 mm) 37°C'da ısıtılan, %95 O₂ ve %5 CO₂ ile gazlandırılan pH'sı 7,4 olan 10 ml'lik organ banyolarında, Krebs-Henseleit solüsyonu içinde bir ucu cam organ askısına, diğer ucu ise 4/0 ipek ile Grass-FT 03 Force Displacement güç çevirgecine bağlandı. Dokular kasılma ve gevşeme yanıtları alınmadan önce 0,5 gramlık ön gerilim altında her 15 dakikada bir yeni solüsyon ile yıkanarak, 1 saatlik dengelenmeye bırakıldı. Bu dengelenme süresinin sonunda trakea preparatları, deney sırasında oluşması muhtemel olan spontan kasılmaları önlemek ve hem de karbakol kasılma yanıtlarının değerlendirilmesinde ölçüt olması amacı ile 80 mM KCl solüsyonu ile kasıldılar. Daha sonra yıkanan dokular agonist maddelerin uygulanması için 30 dakika dinlenmeye bırakıldı.

3.5. Deneylerde Kullanılan Besleyici Solüsyonlar ve İlaçlar

Deneylerde kullanılan Krebs Bikarbonat solüsyonunun içeriği mM/L olarak şu şekildedir: NaCl: 120 mM/L, KCl: 4,6 mM/L, NaHCO₃: 22 mM/L, MgSO₄: 1,2 mM/L, NaH₂PO₄: 1,2 mM/L, glukoz: 11,5 mM/L, CaCl₂ 2,5'dir.

Deneylerde Kullanılan İlaçlar:

NOC-18: NO donörü (Sigma)

NOC-18'nin açık ismi (2,2'-(Hydroxynitrosohydrazino)bis-ethanamine) olup kontrollü bir tarzda spontan şekilde NO salıvermektedir. Solüsyon içerisindeki yarı ömrü ise yaklaşık olarak 3400 dakikadır.

SIN-1: NO donörü (Sigma)

SIN-1'in açık ismi (3-(4-Morpholinyl)sydnone imine hydrochloride) olup solüsyon içerisinde spontan olarak NO salıvermektedir. Ayrıca guanilat siklaz enzimini aktive ederek cGMP seviyelerinin yükselmesine neden olmaktadır.

Protoporfirin-9:Guanilat siklaz aktivatörü

Protoporfirin-9'un açık ismi 3,7,12,17-Tetramethyl-8,13-divinyl-2,18-porphinedipropionic acid

Ovalbumin: Hayvanlarda astım modeli oluşturmak için kullanılır (Sigma)**Karbakol** (Sigma)**Papaverin** (Sigma)

Tüm ilaçlar distile suda çözüldü ve her deney için günlük hazırlandı.

3.6 Kasılma Yanıtları**3.6.1. KCl Kasılma Yanıtları**

Kontrol ve deney grubundaki kobaylardan elde edilen trakea preparatları agonist ilaçlar verilmeden önce, 80 mM KCl ile organ banyosunda muamele edildi. KCl kasılma yanıtları mg olarak sunuldu.

3.6.2. Karbakol Kasılma Yanıtları

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, dokular dengeye ulaştıktan sonra, Karbakol (10^{-5} M) kasılma yanıtları alındı ve kasılma yanıtları 80 mM KCl kasılmalarının %'si olarak grafiklendi.

3.7. Gevşeme Yanıtları**3.7.1. NOC-18 Gevşeme Yanıtları**

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, submaksimal konsantrasyonda 10^{-5} M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra, NOC-18 (NO donörü) (10^{-8} - 10^{-4} M) gevşeme yanıtları

kümülatif olarak alındı. Her bir konsantrasyondaki gevşeme yanıtı dengeye eriştikten sonra bir üst konsantrasyona geçildi.

3.7.2. SIN-1 Gevşeme Yanıtları

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, submaksimal konsantrasyonda 10^{-5} M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra, SIN-1 (NO donörü) (10^{-8} - 10^{-4} M) gevşeme yanıtları kümülatif olarak alındı. Her bir konsantrasyondaki gevşeme yanıtı dengeye eriştikten sonra bir üst konsantrasyona geçildi.

3.7.3. Protoporfirin IX Gevşeme Yanıtları

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, submaksimal konsantrasyonda 10^{-5} M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra, Protoporfirin IX (10^{-9} - 10^{-4} M) gevşeme yanıtları kümülatif olarak alındı. Her bir konsantrasyondaki gevşeme yanıtı dengeye eriştikten sonra bir üst konsantrasyona geçildi. Her iki gruptaki gevşeme yanıtları da karbakolün (10^{-5} M) oluşturduğu kasılma yanıtı üzerinden % gevşeme olarak grafiklendi.

3.8. Deney Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirmesi

Çalışmamızın verileri SPSS (ver:14,0) programına yüklenerek gruplar arasında fark olup olmadığı, iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi (student t testi), Man Whitney U testi ve her bir grubun kendi içinde ölçülen değişkenler yönünden karşılaştırılması (bağımlı gruplarda) Wilxcon testi ile araştırılmıştır. Deney sonuçları metin içinde aritmetik ortalama \pm standart hata olarak sunulup, p değerinin 0.05'den küçük olması halinde fark anlamlı kabul edilmiştir. Agonist ilaçların oluşturduğu maksimum yanıtın %50'sini oluşturmak için gereken konsantrasyon (EC_{50}) her bir deneyin log-konsantrasyon yanıt eğrilerinden elde edildi ve aritmetik ortalama \pm standart hata olarak gösterildi.

pD_2 değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$pD_2 = \log A - \log(E_{max}/E_A - 1)$$

A =Agonist ilacın molar konsantrasyonu

E_{max} =Agonist ilacın oluşturduğu maksimum etki

E_A =Agonist ilacın belirli bir konsantrasyonda oluşturduğu etki

Ayrıca ilaçların oluşturdukları maksimum etkileri herbir deneyden elde edilen verilerin Scatchard denkleminde uygulanması ile çizilen grafiklerden saptandı.

BÖLÜM 4

BULGULAR

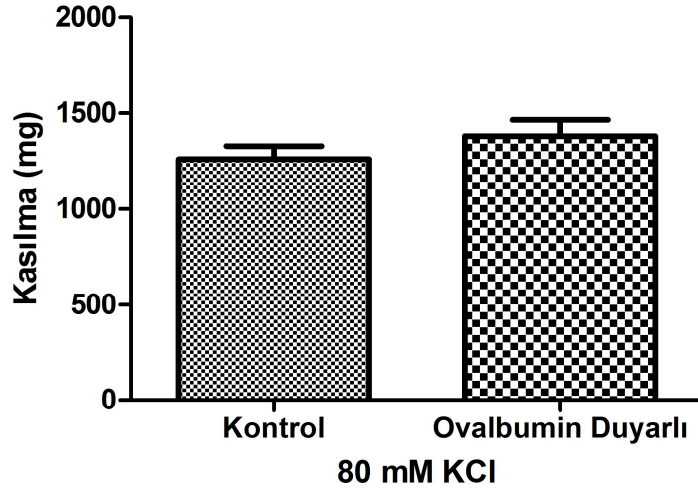
Kobayların ovalbumin ile duyarlanıp duyarlanmadığını tespit etmek amacıyla alerjik deri reaksiyonu uygulandı. Her bir kobayın üst dermis bölgesine intradermal olarak izotonik saline/ovalbumin (0.5, 1.0, ve 5µg) verildi. 60 dakika sonra oluşan kızarıklığın çapı ölçülerek ovalbumin duyarlılığı tespit edildi. Kontrol grubunda ovalbumine kızarıklık yanıtı oluşmazken, deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde cevap oluştu ($p<0.05$). Her iki grupta da salin injeksiyonuna yanıt oluşmadı

Tablo 4: Kontrol ve deney guruplarının alerjik deri testi sonuçları açısından karşılaştırılmazı (aritmetik ortalama \pm standart hata

İLAÇLAR	KONTROL (n=10)	DENEY (n=10)
Salin	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
OVA (0.5 µg)	0.5 \pm 0.13	7.00 \pm 1.30*
OVA (1.0 µg)	1.01 \pm 0.21	9.78 \pm 2.03*
OVA (5.0 µg)	1.47 \pm 0.26	13.87 \pm 1.62*

4.1. KCl Kasılma Yanıtları

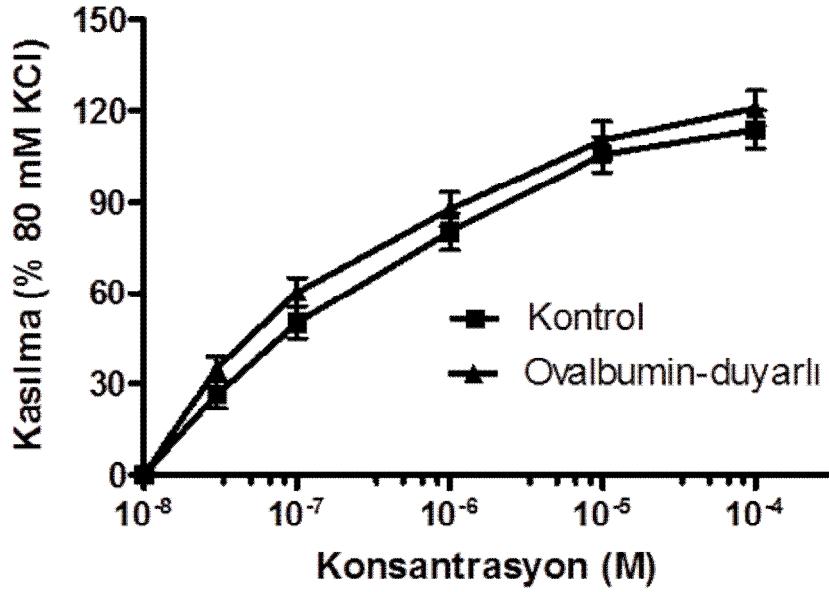
İzole kobay trakea preparatları, ilaçlar verilmeden önce ve deneylerin sonunda, 80 mM KCl ile organ banyosunda muamele edildi. KCl, hem kontrol hem de deney grubunda kasılmalar oluşturdu. Ovalbümin duyarlı grupta 80 mM KCl'nin oluşturduğu kasılma yanıtları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$) (Şekil 4.1).



Şekil 5. İzole kobay trakea preparatlarında 80 mM KCl kasılma yanıtları (n=10)

4.2. Karbakol Kasılma Yanıtları

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, dokular dengeye ulaşıttan sonra, karbakol (10^{-5} M) ile kasıldı ve kasılma yanıtları 80 mM KCl kasılmalarının %'si olarak verildi. Karbakol (10^{-5} M), hem kontrol hem de deney grubunda kasılmalar oluşturdu. Ovalbümin duyarlı grupta karbakolun (10^{-5} M) oluşturduğu kasılma yanıtları kontrol grubuna göre daha yüksek olmasına rağmen fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$) (Şekil 4.2.)

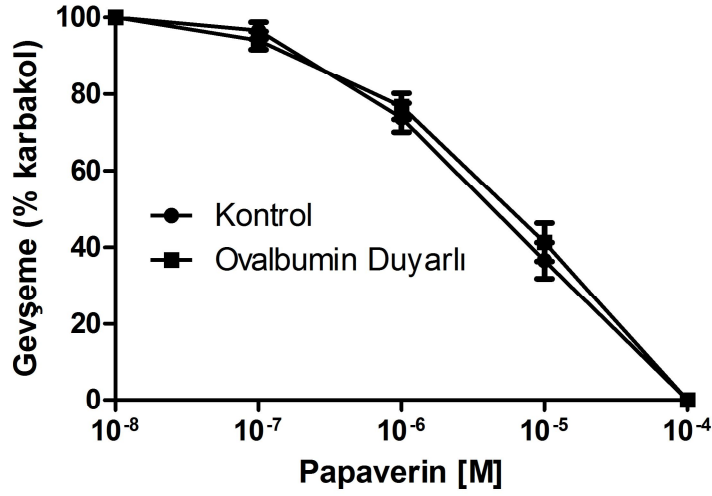


Şekil 6. Kontrol ve ovalbumin duyarlı deney grubundaki izole kobay trakea preparatlarında karbakol konsantrasyon yanıt eğrileri (n=10)

4. 3. Gevşeme Yanıtları

4.3.1. Papaverin Gevşeme Yanıtları

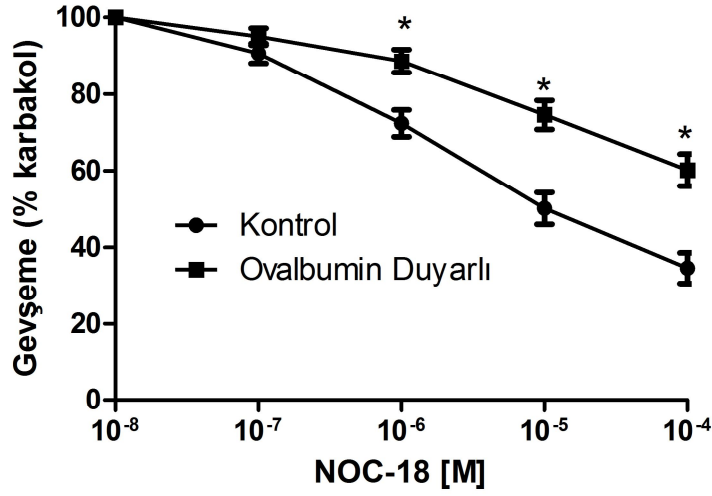
Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, karbakol (10^{-5} M) ile submaksimal olarak kasıldıktan sonra artan konsantrasyonlarda papaverin (10^{-8} – 10^{-4} M) gevşeme yanıtları alındı. Papaverin hem kontrol hem de deney grubunda konsantrasyona bağımlı gevşeme oluşturdu. Gevşeme yanıtları her iki grupta da 10^{-7} M konsantrasyonda başladı. Ovalbümin duyarlı grupta papaverinin (10^{-8} – 10^{-4} M) oluşturduğu gevşeme yanıtları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$) (Şekil 4.3).



Şekil 7. 10^{-5} M Karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında papaverin gevşeme eğrileri (n=10).

4.3.2. NOC-18 Gevşeme Yanıtları

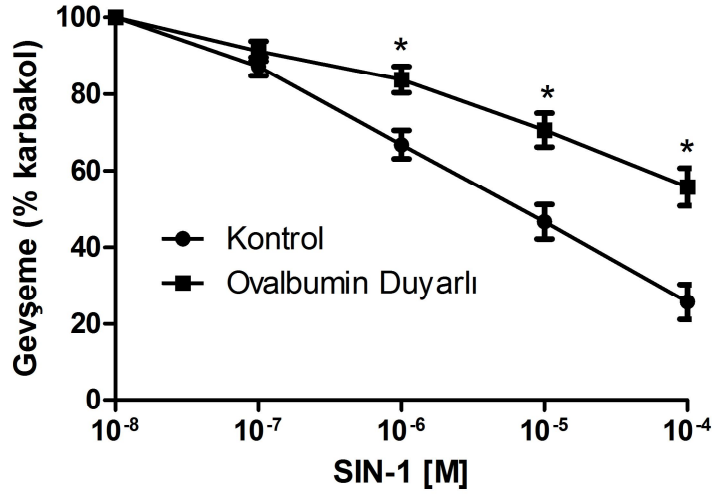
Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, submaksimal konsantrasyonda 10^{-5} M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra, NOC-18 (10^{-8} - 10^{-4} M) gevşeme yanıtları kümülatif olarak alındı. Gevşemeler, Emaks ve pD2 değerleri üzerinden değerlendirildi. Kontrol ve deney grupları karşılaştırıldığında, deney gruplarında NOC-18 gevşeme yanıtları 10^{-6} M konsantrasyondan başlamak üzere tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı ($p<0.05$). Deney gruplarından alınan gevşeme yanıtlarında pD2 değerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı, Emaks değerlerindeyse anlamlı bir azalma olduğu saptandı ($p<0.05$) (Şekil 4.4).



Şekil 8. 10^{-5} M Karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında NOC-18 konsantrasyon yanıt eğrileri (n=10).

4.3.3. SIN-1 Gevşeme Yanıtları

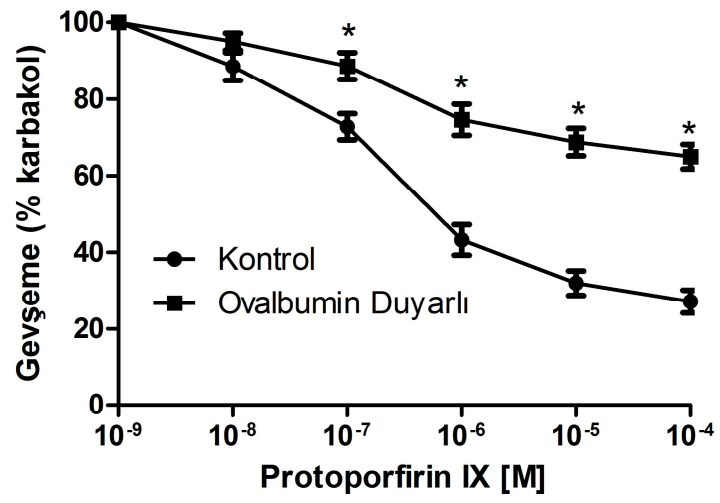
Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, submaksimal konsantrasyonda 10^{-5} M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra, SIN-1 (10^{-8} - 3×10^{-4} M) gevşeme yanıtları kümülatif olarak alındı. Gevşemeler, Emaks ve pD2 değerleri üzerinden değerlendirildi. Kontrol ve deney grupları karşılaştırıldığında, deney gruplarında SIN-1 gevşeme yanıtları 10^{-6} M konsantrasyondan başlamak üzere tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı ($p < 0.05$). Deney gruplarından alınan gevşeme yanıtlarında pD2 değerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı, Emaks değerlerindeyse anlamlı bir azalma olduğu saptandı ($p < 0.05$) (Şekil 4.5).



Şekil 9. 10⁻⁵ M Karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında SIN-1 konsantrasyon yanıt eğrileri (n=10).

4.3.4. Protoporfirin IX Gevşeme Yanıtları

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, submaksimal konsantrasyonda 10⁻⁵ M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra, Protoporfirin IX (10⁻⁹-10⁻⁴ M) gevşeme yanıtları kümülatif olarak alındı. Gevşemeler, Emaks ve pD2 değerleri üzerinden değerlendirildi. Kontrol ve deney grupları karşılaştırıldığında, deney gruplarında Protoporfirin IX gevşeme yanıtları 10⁻⁶ M konsantrasyondan başlamak üzere tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı (p<0.05). Deney gruplarından alınan gevşeme yanıtlarında pD2 değerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı, Emaks değerlerindeyse anlamlı bir azalma olduğu saptandı (p<0.05) (Şekil 4.6).



Şekil 10. 10^{-5} M Karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında protoporphirin IX konsantrasyon yanıt eğrileri (n=10).

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

Astım kendiliğinden veya tedavi ile geri dönüşümlü bir çok hücre ve hücresel elemanın rol aldığı kronik inflamatuvar bir hava yolu hastalığıdır. Kronik inflamasyon hava yolunun artmış cevabına yol açarak tekrar eden öksürük, nefes darlığı, göğüste sıkışma hissi, hışıltılı solunum gibi klinik bulgular oluşturmaktadır (27, 9). Allerjenler dışında infeksiyonlar, egzersiz, metakolin gibi kimyasal ajanlar, soğuk ve kirli hava, emosyonel durum ve hava değişiklikleri gibi etkenler hava yolu hiperreaktivitesine neden olabilmektedir (63). Dünya genelinde tahmini olarak yaklaşık 300 milyon astım hastası olduğu düşünülmektedir (27). Hastaların büyük bölümünü hafif ve orta astım hastaları oluşturmaktadır, geriye kalan küçük bir grup da ciddi astım tanısına sahiptir (11). Toplumlar arasında astım prevalansın %1-18 arasında değiştiği saptanmıştır (35). Ülkemizde yapılan çalışmalarda çocuklarda belirtilen astım prevalansı %2.8-9.8 arasında değişmektedir. Erişkinlerde ise prevalans çalışmalarına bakıldığında erkeklerde %2.1-6.9 kadınlarda %2.8-7.5 bulunmuştur (71).

Kişide var olan bir genetik yatkınlığa, çevresel faktörlerin de katkısıyla ortaya çıkan bozulmuş immünoregülasyon ve/veya dengesiz nöral kontrol ve/veya uyarılmış nonimmünolojik nonnöral yol ile oluşan kronik inflamasyon, bronş astımı patogenezi oluşturmaktadır.

Atopi astım için en önemli predispozan etkidir. Ebeveynlerden birisinde astım veya atopi bulunması halinde doğacak çocukta astım riski %30-50 arasındadır. Her iki ebeveynde varsa risk %50-70 kadardır. Genetik yatkınlıkta multifaktöryel poligenik kontrol söz konusudur. Bu nedenle pek çok farklı genetik kod olabilmektedir. Atopik özellikli bronş astımında konu daha çok incelenmiştir. Ailesel olarak atopik hastalıklara yatkınlığı söz konusudur.

Kolinerjik, adrenerjik ve nonadrenerjik, nonkolinerjik (NANC); nöral mekanizmaların dengeli çalışmasının bozulması da bronş hiperreaktif cevabını

arttırır. Astımda artmış bir eksitatör nöral geçiş ve azalmış bir inhibitör nöral transmisyon, söz konusudur.

Mast hücrelerinin çeşitli etkenlerle (güneş, çeşitli gazlar, egzersiz) direkt olarak hazır mediatörleri deşarjı söz konusudur. Bu medyatörler immünolojik olaylarda olduğu gibi düz kas, sekretuvar hücreler, damar yatağını etkileyerek ve afferent lifleri uyararak, bronş hiperreaktivitesine sebep olurlar. Bu mekanizmaya terapötik olarak mast hücresi stabilizatörlerinin ve selektif H1 reseptör antagonistlerinin olumlu etkileri söz konusudur

Özetlenecek olursa genetik ve çevresel etkenlerle duyarlı hale gelmiş astımlı kişilerde bronşiolarda inflamasyon, hiperreaktivite, bronş düz kasında kontraksiyon, hipertrofi, hiperplazi, mukus salgısı artışı oluşur. Bundan immünolojik mekanizmalar kadar nöral ve non nöral, non immünolojik yolda sorumlu olabilmektedir. Tetik hangi mekanizmayla çekilirse çekilsin hepsi birbirini tamamlayarak katkılarıyla bir bütünü oluşturmaktadır. Hafif dönemde kalıcı olmayan bu değişimler, hastalık kronikleştikçe kalıcı hale gelir ve bronş yapısı bozulur ('remodelling': yeniden şekillenme). Özellikle mast hücreleri, eozinofiller, makrofaj tarafından oluşturulan bu değişiklikler; epitel hasarı ve dökülmesi, vazodilatasyon, ödem, bronkokonstriksiyon, mukus hipersekresyonu, submukozal salgı bezi hipertrofisi, revaskularizasyon, subepitelyal fibrozis, düz kas hipertrofisi olarak sıralanabilir

Nitrik oksit, vücutta çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik durumlarda rol alan, yüksek oranda reaktif ve kısa yarılanma ömrüne sahip renksiz bir gazdır. 1980 yılında Furchgott ve Zawadski yaptıkları çalışmalar sonucunda asetil kolin uyarısıyla endotel hücrelerince yapılan, damar düz kasını gevşetici bir madde bildirmişlerdir. Bu maddeye endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF: Endotel Derived Relaxing factor) adı verilmiştir (30). Daha sonra yapılan çalışmalar sonucunda Palmer ve arkadaşları EDRF'nin kimyasal yapısının NO olduğunu bildirmişlerdir (60).

NO ilk olarak endotelde varlığının gösterilmesinin ardından, vücutta pek çok hücre tarafından sentezlenip salıverildiği bulunmuştur. Bu yaygın dağılımı

nedeniyle NO'nun; organizmada vasküler düz kas tonusunu düzenleyen, trombosit agregasyonunu ve lökosit adhezyonunu inhibe eden, vasküler hücre büyümesi ve yeniden yapılanmayı sağlayan, endotel hücre apoptozisini, migrasyonunu ve hücre permeabilitesini regüle eden bir mediyatör olduğu belirtilmektedir. Nitrik oksit, sinir sisteminde nörotransmitter fonksiyonu gördüğü, immün sistemin bir parçası olarak da yüksek konsantrasyonlarında sitotoksik etkisi ile organizmayı koruduğu ifade edilmektedir (1). NO, membranları kolayca geçebilme özelliği olan oldukça lipofilik bir moleküldür. NO'nun düşük konsantrasyonları çok önemli fizyolojik işlevlerde rol alırken, aşırı ve kontrolsüz salınımı hücreler için zararlı olabilmektedir. NO'nun , bu özellikleri ile çok ideal bir fizyolojik molekül olduğu belirtilmektedir. Klinik olarak hava yollarındaki NO miktarındaki değişikliklerin, inflamasyonun göstergesi olarak, hastalığın ilerleyişi ve tedavinin etkinliğinin gösterilmesinde bir parametre olarak kullanılabileceği ifade edilmektedir (48, 20)

Astım etiyojisi ve potogenezi ile oldukça karmaşık bir hastalıktır. Hastalığın karmaşıklığı patolojinin taklit edilmesini ve modellenmesini zorlaştırmaktadır. Ovalbumin uygulanmasıyla hayvanların trakea düz kas dokularını duyarlı hale getirerek oluşturulan astım, son yıllarda kullanılan modellerin başında gelmektedir (12). Bu modelde kobaylara artan dozlarda ovalbumin intradermal olarak verildikten 60 dakika sonra oluşan kızarıklığın çapı ölçülerek hayvanların duyarlı hale gelip gelmediği saptanmaktadır.

Bizim çalışmamızda kontrol grubunda ovalbumine uygulamasıyla kızarıklık oluşmazken, deney grubunda ovalbümün enjeksiyonundan sonra istatistiksel olarak anlamlı düzeyde kızarıklık yanıtı oluştu. Negatif kontrol olarak % 0.9'luk sodyumklorür kullanıldı ve her iki grupta da % 0.9'luk NaCl injeksiyonuna yanıt oluşmadı. Bu sonuçlar, çalışmamızda kullandığımız deney grubundaki kobayların ovalbuminle duyarlı hale getirildiğini ve deneysel astım oluşturulduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda hem kontrol hem de deney grubundaki trakea düz kas preparatları KCl ile kasılmıştır ve KCl'nin oluşturmuş olduğu bu kasılmalar

arasında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. KCl reseptör aracısız kasılma yapan bir moleküldür. Hücre dışında artan K konsantrasyonu hücreleri depolarize eder. Sonuç olarak voltaj duyarlı kalsiyum kanalları açılarak hücre dışından hücre içine kalsiyum girişi olur ve düz kas kasılır. Meydana gelen kasılma tamamen hücresel mekanizmalarla oluşmaktadır. Bu çalışmada KCL kasılma yanıtlarının değişmemesi kontrol ve deney grubunda hücresel düzeyde bir bozukluğun olmadığını ve düz kasın kasılma fonksiyonunun bozulmadığını göstermektedir.

Çalışmamızda trakea düz kasındaki en önemli kasılma mekanizmalarından biri olan muskarinik sistemin işleyişini değerlendirmek amacıyla, hem kontrol hem de deney grubunda muskarinik agonist karbakol ile kasılmalar oluşturuldu. Karbakol, hem muskarinik hem de nikotinik özellik gösteren asetilkolinesteraz enzimine dayanıklı bir ilaçtır. Trakea düz kasında bulunan muskarinik reseptörleri uyararak inozitol trifosfat ve diaçilgliserol üzerinden hücre içi kalsiyum düzeyini artırmak suretiyle düz kasta kasılma oluşturur. Karbakolun oluşturduğu kasılma yanıtlarında ovalbümin duyarlı grupla, kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Daha önce yapılmış çalışmalarda, ovalbumin duyarlı ve kontrol grubu kobay trakealarındaki karbakol kasılma yanıtları arasında anlamlı bir fark bulunmamış olması bizim bulgularımızı destekler niteliktedir (12).

Çalışmamızda karbakol kasılma yanıtlarının deney grubunda, kontrol grubuna göre değişiklik göstermemiş olması, ovalbuminle duyarlı hale getirilmiş kobaylarda muskarinik sistem yada reseptörlerde bir bozukluk olmadığını göstermektedir.

Trakea dokularının kasılma fonksiyonlarında bir bozukluk olup olmadığı KCl ile test edildikten sonra, gevşeme fonksiyonlarını değerlendirmek için dokular öncelikle karbakol ile kasıldı ve papaverin gevşeme yanıtları değerlendirildi. Çalışmamızda papaverin, hem kontrol hem de deney grubunda gevşemeler oluşturdu. Papaverinin ovalbümin duyarlı grupta oluşturmuş olduğu gevşeme yanıtlarıyla kontrol grubunda oluşturduğu gevşeme yanıtları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Papaverin, selektif olmayan bir

şekilde siklik nükleotid fosfodiesteraz enzimini inhibe etmek suretiyle hücre içi cAMP düzeyini artırarak ve hücre içine kalsiyum girişini azaltarak düz kaslarda gevşeme oluşturur. Papaverinin oluşturduğu gevşemeler reseptörden bağımsız gevşemelerdir ve düz kasların gevşeme fonksiyonunu test etmek için sıklıkla kullanılır (15). Papaverin gevşeme yanıtlarının deney grubunda, kontrol grubuna göre değişiklik göstermemesi, ovalbuminle duyarlı hale getirilmiş kobaylarda düz kasın reseptöre bağlı olmayan gevşeme özelliğinin bozulmadığını, yani yapısal bir fonksiyon bozukluğu olmadığını göstermektedir.

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve astımda ana patolojinin bronkokonstrüksiyon olduğu bilinmektedir. Bu yüzden çalışmalar bronş düz kaslarında dilatasyon yaptığı bilinen nitrik oksit üzerinde yoğunlaşmaktadır. Yavaş salımlı bir nitrik oksit donörü olan GEA 3145'in kobay trakeasında güçlü bir şekilde gevşeme yanıtları oluşturduğu gösterilmiştir. Bu gevşemelerin cGMP, fosfataz ve iberotoksin duyarlı potasyum kanalları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Sadece kobay trakeasında değil sığır trakeasında da nitrovazodilatatörlerin guanilat siklazı aktive ederek cGMP düzeyini artırdıkları ve gevşeme oluşturdukları gözlenmiştir (28). Astımlı hastalarda hava yollarında iNOS enzim salınımının ve buna bağlı NO miktarının arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir (3). Miktarı artan NO'nun, cNOS'un inhibisyonuna ve guanil siklazın desensitizasyonuna neden olup, bronkodilatatör yanıtı ortadan kaldırdığı belirtilmektedir (24). Harm Maarsingh ve arkadaşları (2006) kobaylardaki alerjik astım modelinde, erken astmatik reaksiyondan sonra nNOS kaynaklı NO'nun eksikliğine bağlı olarak iNANK gevşemelerinin belirgin şekilde azaldığını göstermişlerdir (52). NO donörleriyle yapılan bir başka çalışmada Kırsı Vaalı ve arkadaşları (1998), NO salan ilaçların kobay trakeasındaki in vitro gevşetici etkilerinin, ODQ gibi soluble guanilat siklaz inhibitörleri ile antagonize edilebildiğini belirtmişlerdir (79).

Biz bu çalışmada NO/cGMP yolağını etkileyen nitrik oksit donörleri NOC-18 ve SIN-1, guanilat siklaz enzim aktivatörü protoporfirin IX maddeleriyle karbakol ile önceden kastırılmış olan kobay trakea dokularında konsantrasyona

bağlı gevşeme cevapları aldık. Bizim çalışmamızda da yukarıda belirtilen çalışmalara paralel olarak nitrik oksit donörlerinin hem kontrol hem de ovalbümin duyarlandırılmış grupta istatistiksel olarak anlamlı şekilde güçlü bir gevşeme yaptığını, bu maddeler ile oluşan gevşeme yanıtlarının tümünün ovalbümin duyarlı deney grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmış olduğu görüldü. Ovalbümin ile duyarlandırılmış grupta gevşeme yanıtlarının azalması duyarlanma sürecinde nitrerjik sistemde bir bozulma meydana geldiğini düşündürmektedir. Ayrıca bir guanilat siklaz aktivatörü protoporfirin IX'un trakea düz kaslarında yapmış olduğu gevşemenin ovalbümin ile duyarlandırılmış grupta anlamlı şekilde daha az olması ve protoporfirin IX'un yapmış olduğu gevşemenin SIN-1 ve NOC-18 ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde daha az olması astım patogenezinde bozulan nitrerjik mekanizma komponentinin guanilat siklaz olabileceğini düşündürmektedir.

cAMP'den daha düşük konsantrasyonlarda salınsa da düz kas kasılmasında cGMP'nin büyük önemi bulunmaktadır (31, 49). cGMP iki izoformu olan guanilat siklaz enziminin aktive olması ile oluşmaktadır (49). Bunlardan ilki ve belki de en önemlisi soluble guanilat siklazdır. Bu izoform nitrik oksitin heme prostetik grubuna bağlanması ile aktive olur (32). Diğer guanilat siklaz izoformu ise natriüretik peptitlerin bağlanması için reseptör görevi görür (64).

Astımlı hasta ve deney hayvanlarının akciğerlerinde indüklenebilir nitrik oksit sentaz ekspresyonunun tetiklendiği gözlenmiştir (66). iNOS'un aktive olması ve NO seviyelerinin artmasına rağmen, bu nitrik oksitin guanilat siklazı aktive etmesi ve bronş düz kaslarında gevşeme yapması beklenirken astımda hava yolu tonusunun arttığı görülmektedir. Guanilat siklazın astım patogenezindeki bu önemli rolünden yola çıkarak biz de çalışmamızda bir guanilat siklaz aktivatörü protoporfirin IX'un bronş düz kas gevşemeleri üzerindeki etkisini değerlendirdik. Ovalbümin ile duyarlandırılmış grupta, protoporfirin IX'un, nitrik oksit donörleri ile kıyaslandığında anlamlı şekilde daha az bir gevşeme yaptığını tespit ettik. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bu sonuç astımda guanilat siklaz aktivitesinde bir bozukluk olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızın bu sonucunu destekler

şekilde Papapetropoulos A. ve arkadaşlarının (62) yapmış olduğu bir çalışmada ovalbümin ile duyarlandırılmış hayvanlarda guanilat siklaz enziminin α_1 , α_2 ve β_1 alt ünitelerinin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca Canning BJ ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada protoporfirin IX'un guanilat siklazın heme aktif bölgesine bağlandığı gösterilmiştir (10). Protoporfirin IX'un astım durumunda yeterli düz kas gevşemesi meydana getirememesi azalmış guanilat siklaz ekspresyonu yanında guanilat siklazın heme aktif bölümünde de bir defekt olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak astımda indüklenen iNOS enzimi tarafından üretilen nitrik oksit, guanilat siklaz aktivitesini baskılamakta, dışardan verilen nitrik oksit donörlerinin astımlı olmayanlarda meydana getirebileceği gevşeme yanıtlarından daha az bir gevşeme meydana getirmesine neden olmaktadır. Buna rağmen çalışmamızda kullanılan nitrik oksit donörleri trakea düz kaslarında anlamlı bir gevşeme meydana getirmiştir. Bu özellikleriyle astım tedavisinde kullanılmaya aday moleküller olabilirler. Ayrıca çalışmamız astımdaki önemli patolojilerden birinin guanilat siklaz enzimidaki bir defekten kaynaklanıyor olabileceğine işaret etmektedir. Nitrik oksit donörlerinin dışardan verilmesinin yanında guanilat siklaz enzimidaki bu defekti gidermeye yönelik tedavi yaklaşımları nitrik oksit donörlerinin etkinliklerini ciddi şekilde artıracaktır. Hem nitrik oksit donörlerinin hem de guanilat siklaz üzerinden etki gösterecek bu tedavi yaklaşımlarının etkilerinin daha ayrıntılı şekilde aydınlatılabilmesi için ileri araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

KAYNAKÇA

1. Alp Fİ, Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Açılasyonunun Nitrik Oksit Sentez ve Vasküler Reaktivite Üzerine Etkisi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, İstanbul, 2007.
2. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994; 343: 1199-1206.
3. Barnes PJ. Nitric Oxide and Airway Disease. *Ann Med*; 27:389-93, 1995.
4. Bateman ED, Boushey HA, Bousquet J, Busse WW, Clark TJ, Pauwels RA, et al. Can guideline-defined asthma control be achieved? The Gaining Optimal Asthma Control study. *Am J Respir Crit Care Med*; 170(8): 836-44, 2004.
5. Bayındır O. Nitrik oksid'in reaktivitesi, sentezi ve analiz metodları. Koşay S (ed). Nitrik Oksid'in Patolojik Olaylardaki Rolü. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 1996; 7-25.
6. Behrendt D, Ganz P. Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol* 2002; 90(suppl): 40-48.
7. Brett SJ, Quinlan GJ, Mitchell J et al. Production of nitric oxide during surgery involving cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med*; 26: 272– 278, 1998.
8. Busse WW, Lemanske RF, Jr. Asthma. *N Engl J Med*; 344(5):350-62. 2001.
9. Busse, W.W., et al., Mechanisms of persistent airway inflammation in asthma. A role for T cells and T-cell products. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995. 152(1): p. 388-93.
10. Canning BJ, Fisher A., Localization of heme oxygenase-2 immunoreactivity to parasympathetic ganglia of human and guinea-pig airways. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998 Feb; 18(2): 279- 85
11. Carlo, T. and B.D. Levy, Chemical mediators and the resolution of airway inflammation. *Allergol Int*, 2008. 57(4): p. 299-305.
12. Cevit O, Bagcivan I, Sarac B, Parlak A, Durmus N, Kaya T. Mechanism of relaxation induced by nicotine in normal and ovalbumin-sensitized guinea-pig trachea. *EJP-64312*; No of Pages 6, 2007.

13. Currie GP, Fardon TC, Lee DKC. The role of measuring airway hyperresponsiveness and inflammatory biomarkers in asthma. *Ther Clin Risk Manag* 2005; 1(2): 83-92.
14. Devereux G, Seaton A. Diet as a risk factor for atopy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*; 115(6): 1109-17, 2005.
15. Dominique Tallet, Piero Del Soldato, Nicole Oudart, and Jean-Luc Burgaud, NO-steroids: Potent Anti-inflammatory Drugs with Bronchodilating Activity in Vitro. *Bioch. and Biophys. Res. Comm*; 290, 125-130, 2001.
16. Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax* 2002; 57: 643-648.
17. Dunnill MS. The pathology of asthma with special reference to changes in the bronchial mucosa. *J Clin. Pathol*; 13: 27-33, 1960.
18. Dupuy PM, Shore SA, Drazen JM, Frostell C, Hill WA, and Zapol WM. Bronchodilator action of inhaled nitric oxide in guinea pigs. *J Clin Invest* 90: 421-428, 1992.
19. Elias JA, Lee CG, Zheng T, Ma B, Homer RJ, Zhu Z. New insights into the pathogenesis of asthma. *J Clin Invest* 2003; 111: 291-297
20. Elmas İ, Duman İnhalasyon Hasarında Selektif Olan Ve Olmayan Nitrik Oksit Sentaz inhibitörlerinin Akciğer Parankimi Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi: Deneysel Çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2007.
21. Fischer A, Mundel P, Mayer B, et al. Nitric oxide synthase in guinea pig lower airway innervation. *Neurosci Lett* 149:157-60, 1993.
22. Furchott RF, Zawadski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (Lond)*. 1980; 288: 373-376.
23. Gemicioğlu B. Bronş Astımı. Erk M. ed. Göğüs hastalıkları II. Cilt Santay Matbaacılık, İstanbul 2001;s: 619-661.
24. Gemicioğlu B. Bronş astımı.In: Erk M.ed. Göğüs Hastalıkları. 1st.ed. İstanbul. İ.Ü. Yayınları No 4297; 621-658, 2001.

25. Global Initiative For Astma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. National Institutes of Health. National Heart, Lung and Blood Institute. Revised. 2006.
26. Global Initiative For Asthma. Küresel Astım Önleme ve Tedavi Girişimi. Gözden geçirilmiş baskı 2006. Bölüm 1; sf: 2-13
27. Global Strategy For Asthma Management and Prevention 2009. 2.
28. Gruetter CA, Childers CE, Bosserman MK, Lemke SM, Ball JG, and Valentovic MA. Comparison of relaxation induced by glyceryl trinitrate, isosorbide dinitrate, and sodium nitroprusside in bovine airways. *Am Rev Respir Dis* 139: 1192–1197, 1989.
29. Gruetter CA, Childers CE, Bosserman MK, Lemke SM, Ball JG, and Valentovic MA. Comparison of relaxation induced by glyceryl trinitrate, isosorbide dinitrate, and sodium nitroprusside in bovine airways. *Am Rev Respir Dis* 139: 1192–1197, 1989.
30. Güray A, Samancı N, Ovalı F, Dağoğlu T. Nitrik Oksit, Fizyolojisi ve Klinik Önemi. *T. Klin Tıp Bilimleri*; 17: 115-119, 1997.
31. Hamad AM, Clayton A, Islam B, and Knox AJ. Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriuretic peptides, and airway smooth muscle function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L973–L983, 2003.
32. Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci* 18: 484–491, 1997.
33. Hogman M, Frostell C, Arnberg H, and Hedenstierna G. Inhalation of nitric oxide modulates methacholine-induced bronchoconstriction in the rabbit. *Eur Respir J* 6: 177–180, 1993.
34. Holloway JW, Beghe B, Holgate ST. The genetic basis of atopic asthma. *Clin Exp Allerg* ; 29(8):1023-32, 1999.
35. Ignacio-Garcia, J.M. and P. Gonzalez-Santos, Asthma self-management education program by home monitoring of peak expiratory flow. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995. 151(2 Pt 1): p. 353-9.
36. Ignarro JJ, Bryns RE, Wood KS. Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric

- oxide radicals in vasodilatation. Vasculer smooth muscle, peptides, autonom nerves and endothelium (Ed: Vanhoutte PM). New York, Raven Pres, 1998; 342: 427-436.
37. Jeffery PK, Turato G, Saetta M. Pathology of asthma. *Eur Respir Mon.*2003;23:114-125
 38. Kalkan Ş, Astım Tedavisinde Kullanılan Montelukastın Alerjik Pirik Testleri Üzerine Etkisi, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Malatya, 2005.
 39. Kalyoncu AF. Ülkemizde Brons Astması Epidemiyolojisi. Kalyoncu AF. ed. Brons Astması. Atlas Kitapçılık Tic.Ltd.Sti., Ankara 2001;s:1-15
 40. Kayaalp S.O. Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe-TAŞ. Ankara. 2002.
 41. Kılıçturgay K. İmmünoloji. Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi 2000; 310-313.
 42. Kılınç A, Kılınç K. Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. Palme yayıncılık 2003.
 43. King TE. A new look at the pathophysiology of asthma. *J Natl Med Assoc* 1999; 91(suppl 8): 9-15
 44. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-258.
 45. Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci.* 1989; 86: 5159-5162.
 46. Küçükusta AR. Epidemiyoloji. Gemicioğlu B. ed. Tanımdan Tedaviye Astım. Turgut Yayıncılık ve Ticaret A.S. istanbul 2005;s:5-26
 47. Li CG, Rand MJ. Evidence that part of the NANC relaxant response of guinea-pig trachea to electrical field stimulation is mediated by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 102:91-4, 1991.
 48. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med*; 120: 227-237, 1994.

49. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, and Waldman SA. cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 52: 375–414, 2000. Guanylyl cyclases and signaling by
50. Lucas L, Soriano FG and Szabó C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Car Med.* 2000; 28(4 Suppl): 37-52.
51. Lüscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 1997;20 (suppl II): II-3-II-10.
52. Maarsingh H, Leusink J, T Bos I S, Zaagsma J and Meurs H. Arginase strongly impairs neuronal nitric oxide-mediated airway smooth muscle relaxation in allergic asthma. *Respiratory Research* , 7:6 doi:10.1186/1465-9921-7-6, 2006.
53. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Me* ; 332(3):133-8, 1995.
54. Moncada S, Higgs EA. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 30: 2002-2012.
55. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol.* 1989; 38: 1709-1715.
56. Mulrennan SA, Redington AE. Nitric Oxide Synthase Inhibition: Therapeutic potential in asthma. *Treat Respir Med*; 3(2): 79-88, 2004.
57. Mungan D. Astma ve Atopinin Genetiği. *T Klin Tıp Bilimleri* 1997;17:222-227
58. Ober C. Perspectives on the past decade of asthma genetics. *J Allergy Clin Immunol*; 116(2):274-8, 2005.
59. Özkan Metin, Yüksekol İsmail. Nitrik Oksit ve Akcigerler, *Toraks Dergisi*; 4(1): 88-94, 2003.
60. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular Endothelial Cells Synthesized Nitric Oxide from L- arginine. *Nature*; 333: 664-66, 1988.

61. Palmer RMJ, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 158: 348-352.
62. Papapetropoulos A, Simoes DCM, Xanthou G, Roussos C. And Gratziou C. Soluble Guanylyl Cyclase Expression is Reduced in Allergic Asthma. *AJP-Lung Cell Mol Physiol.* Vol: 290, January 2006.
63. Peat, J.K., C.M. Salome, and A.J. Woolcock, Factors associated with bronchial hyperresponsiveness in Australian adults and children. *Eur Respir J*, 1992. 5(8): p. 921-9.
64. Potter LR and Hunter T. Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *J Biol Chem* 276: 6057–6060, 2001.
65. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol*,92:639-46, 1987.
66. Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, and Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 84: 731–765, 2004.
67. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med*; 161(5):1501-7, 2000.
68. Solak Aytemir Z. Astım ve Atopi Gelisiminde Hijyen Hipotezi. *Toraks Dergisi* 2003;4:269-278
69. Toraks Derneği Bronş Astımı Çalışma Grubu: Ulusal Astım Tanı ve Tedavi Rehberi. *Toraks Dergisi.* Cilt 1, Ek 1, Nisan 2000.
70. Tuncel İ B, Şadan G. Effects of Phosphodiesterase V Inhibition on Nitric Oxide-Mediated Relaxation Responses in Guinea Pig Trachea. *International Journal of Experimental and Clinical Pharmacology.* 71(2) 57-112, June 2004.
71. Turktas, I., Z.T. Selcuk, and A.F. Kalyoncu, Prevalence of asthma-associated symptoms in Turkish children. *Turk J Pediatr*, 2001. 43(1): p. 1-11.

72. Türktas H. Astmada Hava Yolu İnflamasyonu. Kalyoncu F.ed. Brons Astması ve Alerji Hastalıkları. Modern Tıp Seminerleri:4.Günes Kitabevi Ltd. Sti. Ankara 1999;s:9-37
73. Türktas H. Etiyoloji ve Patogenez. Ulusal Verilerle Astma. Kalyoncu AF, Türktas H. ed. Kent Matbaa, Ankara 1999;s: 39-89
74. Türktas H. Türktas Đ. Astım. Bozkır Matbacılık, Ankara 1998; s:56-72
75. Türktaş H, Türktaş I. Astma. 1. Baskı, Ankara: Bozkır Matbaacılık, 1998:1-4
76. Türktaş H, Türktaş İ (ed.). Astma. 1.Baskı. Bozkır Matbaacılık, Ankara; (27-48), (1-4), (13-26), 1998.
77. Türktaş H. ed. Synopsis of DISEASES of the CHEST. (3): 644, 2006.
78. Türktaş H. Etiyoloji ve Patogenez. Ulusal Verilerle Astma. Kalyoncu AF, Türktaş H. ed. Kent Matbaa, Ankara; s: 39–89, 1999.
79. Vaalı K, LI L, Paakkari I and Vapaatalo H. Relaxing Effects of NO Donors on Guinea Pig Trachea In Vitro are Mediated by Calcium-Sensitive Potassium Channels. The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics Copyright © 1998 By The American Society For Pharmacology And Experimental Therapeutics Jpet 286:110–114, 1998.
80. Viegi G, Annesi I, Matteelli G. Epidemiology of Astma. Eur Respir Mon. 2003;23:1-25
81. Zhong-Xin,W.,Daohong,Z.,Gang,C. Airway hyperresponsiveness to cigarette smoke in Ovalbumin-sensitized guinea pigs. Am. J. Respir. Crit.Care Med.,161:73-80, 2000.