

**T.C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**OVALBUMİN İLE DUYARLILAŞTIRILMIŞ KOBAY TRAKEA DOKULARINDA  
NO/cGMP YOLAĞININ VE RESEPTÖR ARACILI KASILMA YANITLARININ  
İN VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI**

**Arş. Gör. Dr. Ahmet PARLAK**

**UZMANLIK TEZİ**

**SİVAS**

**2009**

**T.C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**OVALBUMİN İLE DUYARLILAŞTIRILMIŞ KOBAY TRAKEA DOKULARINDA  
NO/cGMP YOLAĞININ VE RESEPTÖR ARACILI KASILMA YANITLARININ  
İN VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI**

**Arş. Gör.Dr. Ahmet PARLAK**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman Öğretim Üyesi**

**Prof. Dr. Şahin YILDIRIM**

**SİVAS**

**2009**

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun 12.03.2002 tarih ve 2002/1 sayılı kararı ve Cumhuriyet Üniversitesi Rektörlüğü'nün 28.03.2002 tarih ve 463 sayılı yazısı ile uygun görülen 'Tez Yazım Klavuzu'na göre hazırlanmıştır.

## TEŞEKKÜR

Tezimi yapmamda katkıda bulunan tez danışmanım Prof. Dr. Şahin YILDIRIM'a ve tez süresince katkılarını esirgemeyen Doç. Dr. İhsan BAĞCIVAN'a, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Tijen KAYA TEMİZ'e, Prof. Dr. A. Serdar SOYDAN'a, Prof. Dr. M. Kemal YILDIRIM'a, Yrd. Doç. Dr. Bülent SARAÇ'a, Anabilim Dalımız Araştırma Görevlileri Dr. Nedim DURMUŞ ve Dr. Ahmet ALTUN'a, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Nevcihan GÜRSOY'a ve Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Hatice ÖZER'e teşekkür ederim.

Bu çalışma T-327 proje numaralı 'Ovalbuminle Duyarlılaştırılmış Kobay Trakea Dokularında NO/cGMP Yolağının ve Reseptör Aracılı Kasılma Yanıtlarının İn Vitro Olarak Araştırılması' proje adı ile Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

## ÖZET

Astım; birçok hücre ve hücre bileşeninin rol oynadığı, hava yollarında daralma ile karakterize, kronik ve enflamatuvar bir hastalıktır. Bu çalışmada ovalbuminle duyarlaştırılarak astım oluşturulan kobaylardan izole edilen trakea preparatlarında in vitro olarak NO/cGMP yolağının nasıl etkilendiği araştırıldı.

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–Henseleit solüsyonu içeren 10 ml’lik organ banyosuna kasıcı ve gevşetici maddeler ile elektriksel alan uyarısına (EAU) maruz bırakılmak için asıldı ve elde edilen yanıtlar karşılaştırıldı.

Deney grubunda, nitrik oksit donörleri (NOC-12 ve NOR-4), guanilat siklaz enzim aktivatörü YC-1, fosfodiesteraz 5 enzim inhibitörü T-0156 maddeleriyle ve elektriksel alan uygulaması (EAU) ile elde edilen gevşeme cevaplarını anlamlı derecede azalmış olarak bulundu. Ayrıca her iki grupta nitrik oksit donörleri ve YC-1 maddesi gevşeme yanıtlarını, guanilat siklaz enzim inhibitörü ODQ varlığında anlamlı derecede azalmış bulundu. Yine her iki grupta EAU’na bağlı gevşeme yanıtlarını, nitrik oksit sentaz inhibitörü L-NAME varlığında anlamlı derecede azalmış bulundu. Ortama L-arginin ilave edilmesiyle L-NAME varlığında elde edilen bu yanıtlar, her iki grupta da geriye döndürüldü.

Her iki grup kobay trakea dokularında, ELISA yöntemi ile cGMP düzeyleri ölçüldü. Deney grubunda; EAU, Karbakol, NO donörleri, YC-1, T-0156 uygulanan ve ilaçsız dokudan elde edilen cGMP miktarları, kontrol grubu düzeylerine göre anlamlı derecede azalmış olarak bulundu. Her iki grupta da NO donörleri ve YC-1 ilaç uygulamaları sonucu ölçülen cGMP düzeyleri, ODQ varlığında anlamlı derecede azalmış olarak bulundu. Yine her iki grupta EAU+L-NAME sonucunda ölçülen cGMP düzeyleri yalnız EAU sonucu ölçülen cGMP düzeylerine göre anlamlı derecede azalmış olarak bulundu.

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.

**Anahtar Kelimeler:** Astım, trakea, ovalbumin, kobay, NO/cGMP, in vitro

## SUMMARY

Asthma is a chronic inflammatory disease characterized with constriction in airways in which many cells and cell components play an important role. In this study, we evaluated how the NO/cGMP cleavage is affected in vitro in trachea preparations isolated from ovalbumin sensitized guinea pigs.

Twenty male guinea pigs were allocated into 2 groups as control and ovalbumin sensitized. Guinea-pigs in experimental group were sensitized by ovalbumin but control group received only saline. The transverse trachea rings from both groups were mounted in 10 ml organ baths containing Krebs–Henseleit solution and exposed to contraction and relaxation drugs and electrical field stimulation, and then the results were compared.

The relaxation responses of nitric oxide donors, NOC-12 and NOR-4, a guanylate cyclase activator, YC-1, a phosphodiesterase-V enzyme inhibitor, T-0156 and EFS were significantly decreased at experiment group compared with control group. The relaxation responses of nitric oxide donors and YC-1 were significantly decreased in the presence of ODQ, a guanylate cyclase inhibitor. L-NAME, a nitric oxide cyclase inhibitor, significantly decreased the EFS relaxation responses in both groups but this effect was reversed by L-arginin addition.

The cyclic guanosine monophosphate levels in trachea tissues from both groups were measured by ELISA. In experimental group, cGMP levels after EFS, carbachol, NOC-12, NOR-4, YC-1 and T-0156 exposure were significantly less than control group. In both groups cGMP levels after NO donors and YC-1 exposure were significantly lower in the presence of ODQ compared with its absence. Separately, in both groups the cGMP level after EFS+L-NAME was lower than EFS alone.

These results may be due to increased formation of NO because of increased iNOS activity leading the inhibition of constitutional NOS which paves a way for decrease of endogen NO and/or decrease of amount and/or activation of guanylyl cyclase. The further studies evaluating the effects of new iNOS enzyme inhibitors and measuring the guanylate cyclase enzyme activity and level may useful for clarifying the pathophysiology of asthma and discovering the clinical benefits of new drugs.

Keywords: Asthma, trachea, ovalbumin, guinea pig, NO/cGMP, in vitro

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
İNGİLİZCE ÖZET.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	viii
TABLolar.....	ix
ŞEKİLLER.....	x
RESİMLER.....	xi
GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
II.1. Astım.....	3
II.1.a. Tarihçe.....	3
II.1.b. Astımın Tanımı.....	3
II.1.c. Epidemiyoloji.....	4
II.1.d. Sınıflandırma.....	4
II.1.e. Astım Etyolojisi.....	7
II.1.f. Astım Patogenezi.....	9
II.1.g. Astım Tedavisi.....	13
II.2. Nitrik Oksit.....	14
II.2.a. Tanım ve Tarihçe.....	14
II.2.b. Salınım ve Metabolizma.....	15
II.2.c. Etki Mekanizması.....	17
II.2.d. Nitrik Oksit Fonksiyonları.....	19
II.2.e. Nitrik Oksit ve Astım.....	21
II.3. Fosfodiesteraz Enzimleri.....	23
II.3.a. Fosfodiesteraz Enzim Sistemi Genel Bilgi.....	23
II.3.b. Fosfodiesteraz Enzim İnhibitörleri.....	24
II.3.c. Fosfodiesteraz Enzim İnhibitörleri ve Astım.....	24
ARAÇ GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	26
III.1. Deney Hayvanlarının Seçimi.....	26
III.2. Kontrol ve Deney Gurubu.....	26
III.3. Allerjik Deri Reaksiyonu (ADR).....	26
III.4. Trakea Preparatlarının Patolojik Değerlendirilmesi.....	26

III.5. Trakea Preparatlarının Alınması ve İn Vitro Deneylere Hazırlanışı.....	27
III.6. Deneylere Kullanılan Besleyici Solüsyonlar ve İlaçlar.....	27
III.7. Kasılma Yanıtları.....	28
III.7.a. KCl Kasılma Yanıtları.....	28
III.7.b. Karbakol Kasılma Yanıtları.....	28
III.8. Gevşeme Yanıtları.....	29
III.8.a. NOC-12 ve NOR-4 Gevşeme Yanıtları.....	29
III.8.b. Fosfodiesteraz V İnhibitörü (T-0156) Gevşeme Yanıtları.....	29
III.8.c. YC-1 Gevşeme Yanıtları.....	29
III.8.d. Sodyum Nitroprussit Gevşeme Yanıtları.....	30
III.8.e. Papaverin Gevşeme Yanıtları.....	30
III.8.f. Elektriksel Alan Uyarısının Oluşturduğu Gevşeme Yanıtları.....	30
III.9. cGMP Düzeylerinin Ölçülmesi .....	31
III.10. Deney Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirmesi.....	31
BULGULAR.....	33
IV.1. Allerjik Deri Reaksiyonu (ADR).....	33
IV.2. Trakea Preparatlarının Patolojik Değerlendirilme Bulguları.....	33
IV.3. Kasılma Yanıtları.....	33
IV.3.a. KCl Kasılma Yanıtları.....	33
IV.3.b. Karbakol Kasılma Yanıtları.....	34
IV.4. Gevşeme Yanıtları.....	34
IV.4.a. NOC-12 Gevşeme Yanıtları.....	34
IV.4.b. NOR-4 Gevşeme Yanıtları.....	34
IV.4.c. Fosfodiesteraz V İnhibitörü (T-0156) Gevşeme Yanıtları.....	35
IV.4.d. YC-1 Gevşeme Yanıtları.....	35
IV.4.e. Sodyum Nitroprussit Gevşeme Yanıtları.....	36
IV.4.f. Papaverin Gevşeme Yanıtları.....	36
IV.4.g. Elektriksel Alan Uyarısının Oluşturduğu Gevşeme Yanıtları.....	37
IV.5. cGMP Düzeylerinin Değerlendirme Bulguları.....	37
TABLolar.....	38
ŞEKİLLER.....	41
RESİMLER.....	54
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	56
KAYNAKLAR.....	65



## **SİMGELER ve KISALTMALAR**

NO:	Nitrik oksit
NOS:	Nitrik oksit sentaz
cNOS:	Yapısal nitrik oksit sentaz
eNOS:	Endotelial 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
ENANK:	Eksitator Nonadrenerjik Nonkolinerjik
İNANK:	İnhibitör Nonadrenerjik Nonkolinerjik
VCAM-1:	Vasküler hücrel adezyon molekülü-1
PDGF:	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
L-NAME:	L-Nitro monometil arjinin
PKG:	Protein kinaz G
GS:	Guanilat siklaz
KCl:	Potasyum klorür
SNP:	Sodyum nitroprussiyat
ODQ:	1H-[1,2,4] Oxadiazole [4,3-a] quinoxalin-1-one
VİP:	Vazoaktif intestinal polipeptid
EAU:	Elektriksel alan uyarısı
K <sub>Ca</sub> :	Kalsiyuma duyarlı potasyum kanalı

## TABLÖLAR

**Tablo 1:** Astım hastalığına yol açan risk faktörleri

**Tablo 2:** Nitrik oksit sentezleyen enzimler

**Tablo 3:** Nitrik oksitin akciğerdeki fonksiyonları

**Tablo 4:** Kontrol ve deney gruplarının alerjik deri testi sonuçları açısından karşılaştırılması (aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata)

**Tablo 5:** İzole kobay trakea dokularında maksimum kasılma ( $E_{maks}$ ) ve  $pD_2$  Değerleri (aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata)

**Tablo 6:** İzole kobay trakea dokularında maksimum gevşeme ( $E_{maks}$ ) ve  $pD_2$  değerleri (aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata)

**Tablo 7:** Kontrol ve deney gruplarının cGMP düzeyleri açısından karşılaştırılması (aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata)

**Tablo 8:** Grupların kendi içinde cGMP düzeyleri açısından karşılaştırılması (aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata)

## ŞEKİLLER

**Şekil 1:** Astım patogenezi

**Şekil 2:** Astımda hava yolu patolojisi.

**Şekil 3:** L-argininden NO sentezi

**Şekil 4:** NO etki mekanizmasının şematik gösterimi

**Şekil 5:** Kontrol ve ovalbumin duyarlı deney grubundaki izole kobay trakea preparatlarında 80 mM KCl kasılma yanıtları

**Şekil 6:** Kontrol ve ovalbumin duyarlı deney grubundaki izole kobay trakea preparatlarında karbakol konsantrasyon-yanıt eğrileri

**Şekil 7:**  $10^{-5}$  M karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında NOC-12 konsantrasyon - yanıt eğrileri

**Şekil 8:**  $10^{-5}$  M karbakol ile kastırılmış kontrol (A) ve ovalbumin duyarlı (B) izole kobay trakea preparatlarında ODQ ( $10^{-5}$  M) varlığında NOC-12 konsantrasyon-yanıt eğrileri

**Şekil 9:**  $10^{-5}$  M karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında NOR-4 konsantrasyon-yanıt eğrileri

**Şekil 10:**  $10^{-5}$  M karbakol ile kastırılmış kontrol (A) ve ovalbumin duyarlı (B) izole kobay trakea preparatlarında ODQ ( $10^{-5}$  M) varlığında NOR-4 konsantrasyon yanıt eğrileri

**Şekil 11:**  $10^{-5}$  M karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında T-0156 konsantrasyon-yanıt eğrileri

**Şekil 12:**  $10^{-5}$  M karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında YC-1 konsantrasyon-yanıt eğrileri

**Şekil 13:**  $10^{-5}$  M karbakol ile kastırılmış kontrol (A) ve ovalbumin duyarlı (B) izole kobay trakea preparatlarında ODQ ( $10^{-5}$  M) varlığında YC-1 konsantrasyon-yanıt eğrileri

**Şekil 14:**  $10^{-5}$  M karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında SNP konsantrasyon-yanıt eğrileri

**Şekil 15:**  $10^{-5}$  M karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında Papaverin konsantrasyon-yanıt eğrileri

**Şekil 16:**  $10^{-5}$  M karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında EUA ile oluşan gevşeme yanıtları

**Şekil 17:**  $10^{-5}$  M karbakol ile kastırılmış kontrol (A) ve ovalbumin duyarlı (B) izole kobay trakea preparatlarında, L-NAME ( $3 \times 10^{-5}$  M) ve L-Arginin ( $3 \times 10^{-5}$  M) varlığında elde edilen gevşeme yanıtları.

## RESİMLER

**Resim 1:** Kontrol gurubunda normal bronşiyol yapısı. (H-E ; x 25)

**Resim 2:** Deney gurubunda bronşiyol duvarında izlenen düz kas hipertrofisi (H- E ; x 50)

**Resim 3:** Deney gurubunda peribronşiyal iltihabi hücre infiltrasyonu ve lümende mukus artışı (H-E ; x 25)

**Resim 4:** Deney gurubunda bronş lümeninde artmış mukus sekresyonu (H-E ; x50)

**Resim 5:** Deney gurubunda bronş duvarında izlenen eozinofil-lökosit infiltrasyonu (H-E ; x 100)

**Resim 6:** Deney gurubunda bronşiyol duvarında izlenen düz kas hipertrofisi ve subepitelyal minimal kollagen artışı (Mason-Trikrom ; x 50)

**Resim 7:** Deney gurubunda bronş duvarında izlenen goblet hücre hiperplazisi ( PAS-Alcien Blue ; x 50)

# 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, hışırtılı/hırıltılı solunum, göğüste sıkışma yakınmalarının bir veya birkaçı ile seyreden, yaygın, değişken, genellikle geri dönüşlü havayolu obstrüksiyonu olarak ifade edilen astım (1), 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 artırılacağı düşünülmektedir (2).

Hava yollarında, kolinerjik,  $\alpha$ -adrenerjik, eksitatör nonadrenerjik nonkolinerjik (eNANK) olmak üzere bronkokonstrüksiyona neden olan üç nöral sistem ve  $\beta$ -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 (3).

Yapılan bazı çalışmalar nitrik oksit (NO), iNANK'in nörotransmitteri 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 (4).

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 $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1, endotoksin gibi) sonra yapıp aktivasyon kazanır. Kortikosteroidlerle iNOS'a bağlı NO yapımının azaltılabileceği belirtilmektedir (5).

Astımlı hastada; inflamatuvar hücrelerden ağığa 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 kaldırabileceği belirtilmektedir (6).

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 inhibisyonun astımda görölen allerjik inflamasyon üzerine etkisinin halen araştırılmakta olduğu belirtilmektedir (7).

Bu çalışmada ovalbuminle duyarılaştırılarak astım oluşturulan kobaylardan izole edilen trakea preparatlarında in vitro olarak NO/cGMP yolağını ve bu yolağa etkileyen ilaçları araştırarak çıkacak sonuçlara göre astım tedavisinde gelecekte kullanılabilecek ilaçlara ışık tutmak amaçlanmaktadır.

## **BÖLÜM II**

### **GENEL BİLGİLER**

#### **II-1.Astım**

##### **II-1.a.Tarihçe**

Astım, dünyada her yaştan bireyi etkileyebilen ciddi bir halk sağlığı sorunu olduğu gibi 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 artırılacağı düşünülmektedir. 300 milyon kişiyi etkilediği tahmin edilen ve dünya çapında bir sorun haline gelen astımın kontrol altına alınmasının maliyeti yüksek görünmesine rağmen, yanlış tedavi maliyetinin daha yüksek olacağı belirtilmektedir (2).

Astım kelimesi Yunanca'da "üfleme, zorlu üfleme," kelimelerinden türetilmiştir. Değişik dönemlerde Fransızca ve İngilizce'nin etkisinde kalan dilimizde her iki terimin ayrı ayrı, ya da karıştırılmış bir şekilde kullanıldığı ve adlandırmada dil birliği olmadığı belirtilmiştir. Astım, astma, bronşiyal astma, astım bronşiyale, bronş astması en sık kullanılan terimlerdir. 1970'li yılların sonlarında fiberoptik bronkoskopinin astımlı hastalarda da uygulanmaya başlaması ile birlikte yapılan biyopsi çalışmalarında, asemptomatik, solunum fonksiyonları normal olan, hafif astımlı hastalarda bile hava yollarında kronik bir inflamasyonun varlığı gösterilebilmiş ve bu bulgulardan sonra astımın tanımı değişmiştir. Buna göre astım; "hava yollarının kronik inflamatuvar bir hastalığı" olarak kabul edilmiştir (6).

##### **II.1.b.Tanım**

Küresel Astım Önleme ve Tedavi Girişimi (The Global Initiative for Asthma ) (GINA) 2006 raporuna göre astım, pek çok hücre ve hücre bileşeninin rol oynadığı kronik ve enflamatuvar bir hava yolu hastalığıdır. Raporda klinik öyküde, sıklıkla öksürüğün eşlik ettiği ve özellikle gece ortaya çıkan ataklarla seyreden nefes darlığı vurgulanırken ekspiryumda hava akımı kısıtlanması ile karakterize, ataklarla seyreden hava yolu obstrüksiyonu başlıca fizyolojik özellik olarak ifade

edilmektedir. Temel patolojik özelliği ise, bazen hava yollarında yapısal değişikliklerle ilişkili hava yolu inflamasyonunun mevcut olması olarak belirtilmektedir (2).

Ülkemizde Toraks Derneği Astım Çalışma Grubu tarafından 1996 ve 2000 yıllarında "Ulusal Astım Tanı ve Tedavi Rehberi" hazırlanmıştır. Bu rehberde ise astım; 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 edilmektedir (1).

Tüm raporlardaki tanımlamalar birbirine benzer olup astımın üç temel özelliği ön plana çıkmaktadır:

1. Kronik havayolu inflamasyonu
2. Bronş aşırı duyarlılığı
3. Yaygın, geri dönüşlü havayolu obstrüksiyonu

### **II.1.c. Epidemiyoloji**

Astım prevalans değerleri tanımlama, coğrafi şartlar, ırk ve yaşa bağlı olarak değişebilmektedir. Ülkemizde ilkokul çağındaki çocuklarda astım prevalansı % 3.8-16.4 arasında değişmekte olup, ortalama % 10 olarak belirtilmiştir. Erişkinlerde astım prevalansı, yapılan araştırmalarda hem dünyanın diğer ülkelerinde hem de ülkemizde çok daha az olarak bulunmuştur. Erişkinlerdeki astım prevalansı % 2.1-7.6 arasında değişmekte olup, ortalama % 3.6 olarak ifade edilmiştir (8).

### **II.1.d. Sınıflandırma**

Etyolojik faktörlere ve hastalığın şiddetine göre olmak üzere sınıflandırmayı iki ana başlık altında yapabiliriz.

#### **A) Etyolojik faktörlere göre sınıflandırma**

**Ekstresek Astım:** Atopik kişilerde gelişen, genellikle erken yaşlarda ortaya çıkan ve çevresel allerjenlerin inhalasyonu ile yakından ilişkili olan astım türüdür. Hastalarda güçlü aile öyküsü, diğer atopik hastalık (allerjik rinit, egzema,



konjunktivit) belirtileri ve özgün IgE'de yükseklik saptanır (9). Ekstresek astımda, atopi ve egzemaya ilave olarak, mevsimsel semptomlar, allerjenlere karşı deri testi ve bronş provakasyon testi pozitifliği, yaşamın ilk 3 dekadında ortaya çıkma ve ilerleyen yıllarda remisyon gibi özellikler mevcuttur (10).

**İntrensek Astım:** Atopik olmayan kişilerde, genellikle yetişkin yaşta ortaya çıkan, belirgin bir alerjik nedenin saptanamadığı astım türüdür. Kişisel ve ailevi alerji öyküsü yoktur, genellikle şiddetli bir solunum sistemi hastalığı sonrasında ortaya çıkar (9).

İntrensek astım hastaları;

- 1) Ekstresek hastalara göre daha yaşlı olma
- 2) Ailede astım ve atopi öyküsünün olmaması veya çok daha az olması
- 3) IgE yüksekliği, pozitif deri ve provakasyon testinin olmaması
- 4) Kan ve balgam eozinofillerinde artış
- 5) Otoimmün hastalık insidansında ve düz kas otoantikorlarında artış
- 6) Tedaviye yanıtın az olması
- 7) Daha yüksek oranda aspirin duyarlılığı

ve sonuçta persistan, progresif bir obstürüksiyon özellikleri ile karakterizedir (10).

**İlaçlara Bağlı Astım:** Aspirin, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, beta blokerler, ACE (angiotensin konverting enzim) inhibitörleri, parasempatomimetik ilaçlar başta olmak üzere daha bir çok ilaç astım nedeni olabilmektedir (11).

**Egzersize Bağlı Astım:** Egzersize bağlı bronkokonstriksiyon tipik olarak egzersiz bittikten 5-10 dakika sonra başlar. Hastalarda 30-45 dakika içinde kendiliğinden geriler. Kuru ve soğuk havada daha sık, sıcak ve nemli iklimlerde ise daha nadir görüldüğü belirtilmektedir (2).

**Mesleksel Astım:** Daha önce bilinen astım hastalığı olmayan ve iş yerinde duyarlılaştırıcı ajana belli bir süre maruziyetten sonra ortaya çıkan astım tipi olarak tanımlanan bu hastalıkta, mesleki antijenle karşılaşmadan sonra duyarlılaşma gelişmesi için yıllar süren bir latent dönem gerekebilir (11).

En sık olarak; gıda sanayi, kümes hayvancılığı, çiftçiler, ipek işçileri, fırıncılar, nakliye işçileri, pamuk tekstil işçileri, rafine işçileri, kaplamacılık, elmas işlemeciliği, kuaförler, hastane çalışanları, anestezi uzmanları, plastik sanayi oto boyama gibi mesleklerde görülmektedir (12).

**Gece Oluşan Astım (Nokturnal Astım):** Geceleri veya sabah erken saatlerde uykudan uyandıran astım çeşididir. Astımın geceleri kötüleşmesine yol açan faktörler bütünüyle anlaşılammakla birlikte (2) geceleri parasempatik tonusta ve hava yolu inflamasyonunda artma olması, nonadrenerjik hava yolu genişletici mekanizmada azalma olması, dolaşımdaki adrenalin, kortizol düzeyindeki azalma ve fonksiyonel rezidüel kapasitedeki artış, nokturnal astımın temel nedenleri olarak ifade edilmektedir (9).

**Psikojenik astım:** Birçok astımlı hastada şok, üzüntü, korku ve aşırı heyecanlanma gibi durumlar nöbetlerin başlamasını tetikleyebilmektedirler. Astım ile hastanın emosyonel durumu arasında ilişki olduğu kabul edilmiş bir gerçektir. Ancak ayrı bir tip astım olarak ele alınmasının gerekmediği ifade edilmektedir (12).

## **B) Hastalığın şiddetine göre sınıflandırma**

Hastalığın şiddetine göre astım hastaları, aralıklı (intermitant) astım ve sürekli (persistant) astım olarak iki başlık altında değerlendirilmekte, sürekli astıma sahip hastalar da kendi aralarında hafif, orta, şiddetli olarak sınıflandırılmaktadır (9). Astımın şiddetine göre yapılan sınıflamanın, hastanın tedavisiyle ilgili kararların alındığı başlangıçtaki değerlendirmede yararlı olabileceği, astımın şiddetinin ise hem altta yatan hastalığa hem de tedaviye verilen yanıtla bağlı olduğu vurgulanmaktadır (13). O nedenle başlangıçta ağır persistan olarak sınıflandırılan astım, tedaviye yanıt vermesiyle daha sonra orta persistan olarak sınıflanabilmektedir. Ayrıca hastalığın şiddetinin astımın değişmez bir özelliği olmadığı ve zaman içinde değişebileceği belirtilmektedir (2).

## II.1.e. Etyoloji

Astım hastalığına yol açan risk faktörleri, a) hastalığın gelişmesine yol açan ve b) semptomları tetikleyenler olarak ikiye ayrılmakla birlikte, bazıları her ikisine de sebep olabilir. Konak faktörleri birinci grupta yer alırken, ikinci gurubu daha çok çevresel faktörlerin oluşturduğu ifade edilmiştir (Tablo 1) (14). 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 (15). Ayrıca bağışıklık sisteminin olgunlaşmasının ve yaşamın ilk yıllarında enfeksiyon ile karşılaşma zamanının, genetik yatkınlığı olan bireylerde astım riski açısından önemli olduğu belirtilmiştir (2).

**Tablo-1:** Astım Hastalığına Yol Açan Risk Faktörleri

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

## A) 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 (16).

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 (17).

Genetik faktörlerin astım gelişiminde risk faktörü olmasının yanısıra, bazı genlerdeki polimorfizimlerin astımın şiddetini ve  $\beta$ -adrenerjik agonist ve antilökotrien gibi ilaçların tedavideki başarı derecelerini etkileyebildikleri belirtilmektedir (10).

**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 (18).

## B) Çevresel Faktörler

**Allerjenler:** Ev içi ve ev dışı allerjenlerin astım alevlenmelerine neden olabildiği iyi bilinmekle birlikte, bunların astım gelişimindeki rolleri hâlâ tam olarak anlaşılammıştır. 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 (2).

**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 (19).

**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 (20).

**Beslenme:** İşlenmiş 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 (21).

### **II.1.f. Astım Patogenezi**

Kişide varolan bir genetik yatkınlığa, çevresel faktörlerin de katkısıyla ortaya çıkan bozulmuş immünoregülasyon ile dengesiz nöral kontrol ve/veya uyarılmış non immünolojik non nöral yol ile oluşan **kronik inflamasyonun**, bronş astımı patogenezinin temelini oluşturduğu ifade edilmektedir. Sonuç olarak enflamasyon etrafında gelişen ve birbiri içine girmiş durumdaki bir dizi olaylar sonucunda, astımın temel özellikleri olan bronşiyal hiperreaktivite ve obstrüksiyon oluşmaktadır.

**Hava Yolu İnflamasyonu:** Astımda, alerjik hastalıklarda görülen tipte bir inflamasyon vardır. Bu inflamasyonda aktive olmuş mast hücreleri, eozinofil hücreleri, T hücreleri önemli rol almaktadırlar. Nötrofiller, makrofajlar ve dendritik hücreler bu süreçte rol alan diğer inflamatuvar hücrelerdendir. Bununla birlikte hava yollarının diğer yapısal hücreleri olan epitel hücrelerinin, düz kas hücrelerinin, fibroblast ve endotel hücrelerinin de inflamasyonun sürmesine çeşitli yollarla katkı sağladıkları bilinmektedir (2). Akut olaylardaki tetikleyici hücreler mast hücreler iken, astımda kronikleşmeye ve doku hasarına en çok neden olan hücreler ise eozinofillerdir (22).

İnhalasyon yoluyla alınan ve bronşiyal mukozaya ulaşan antijenler, antijen sunan hücreler tarafından peptidlere parçalanarak T lenfositlerine sunulur. T hücreler

sunulan antijeni algılayıp aktivite kazanırlar ve Th1, Th2 olmak üzere iki ayrı gruba diferansiye olurlar. Diferansiye Th1 hücreler interferon- $\gamma$  sekrete ederek fagosite edilmiş mikroorganizmaların intraselüler destrüksiyonunda önemli rol oynarken, Th2'ler çeşitli sitokin ve IgE senteziyle bu inflamasyona katkıda bulunurlar (22, 23).

Alerjen, sensitize olmuş organizmaya ikinci kez girdiğinde, bronşiyol duvarında ve alveol boşluğunda mast hücre yüzeyinde bulunan IgE'nin Fab bölümü ile birleşerek immün kompleks oluşturur. Bu kompleks oluşumu sonucunda hücre yüzeyinde bulunan reseptöre bağımlı olan kanaldan kalsiyum içeri girer, kalmodulin ile birleşerek daha önceden hücre içinde hazır bulunan, histamin, bradikinin, serotonin mediyatörlerinin salınımına neden olur. Salınan bu mediyatörlerin, epiteli daha da geçirgen hale getirdiği, bronş düz kasında kasılma, clara ve goblet hücresinden mukus artışı, damarda geçirgenlik artışı ve ödeme neden olabileceği belirtilmektedir (24).

Bronş mukozasında sayıları ve aktiviteleri artmış olan eozinofillerin uyarılması ile daha önce sentez edilip sitoplazmik granüllerde depolanan major bazik protein (MBP), eozinofilik peroksidaz (EPO), eozinofil katyonik protein (ECP) gibi enzimler açığa çıkarak, bronş epitelinin zedelenmesine, bütünlüğünün bozulmasına ve deskuamasyonuna neden olurlar (24). Eozinofillerin ayrıca büyüme faktörlerinin salınmasında ve hava yolunun yeniden şekillendirmesinde de (remodeling) rolleri olabileceği belirtilmektedir (2).

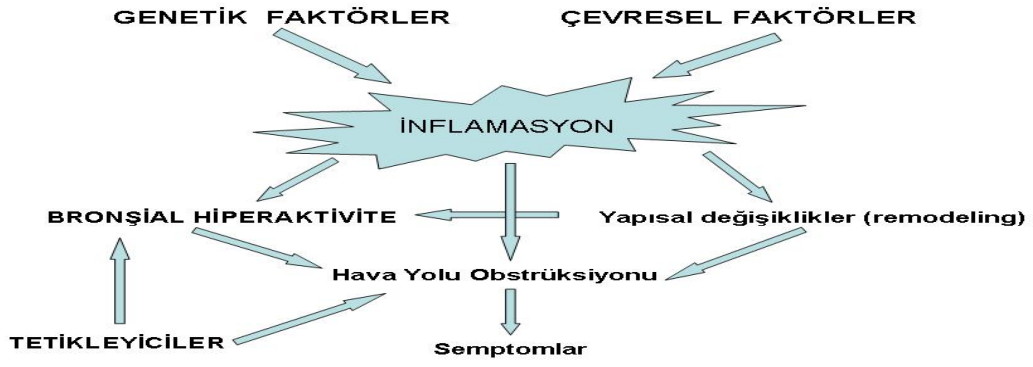
Özetle eozinofiller, mast hücreleri ve Th lenfositlerin başrolü oynadığı bu inflamasyonda akut ve kronik değişiklikler meydana gelir. Akut değişiklikler; bronkospazm, mukus artışı, vazodilatasyon ve ödem ile birlikte oluşan bronş hiperreaktivitesi olarak sıralanabilir. Kronik veya doğal süreçteki kalıcı değişiklikler ise subepitelyal fibrozis, bronş düz kaslarının ve mukus glandlarının hipertrofisi ve hiperplazisi, angiogenezis olup bronş duvarının yapısını değiştirebilmektedir (12).

**Bronş hiperreaktivitesi:** Astım hastalarının hava yollarının normal bir birey için zararsız olan bir uyarana daralmayla yanıt vermesi olarak adlandırılan bu aşırı duyarlılık, enflamasyon ve hava yollarındaki yapısal değişiklikler ile bağlantılı olup, tedavi ile kısmen geri dönebilmektedir (2).

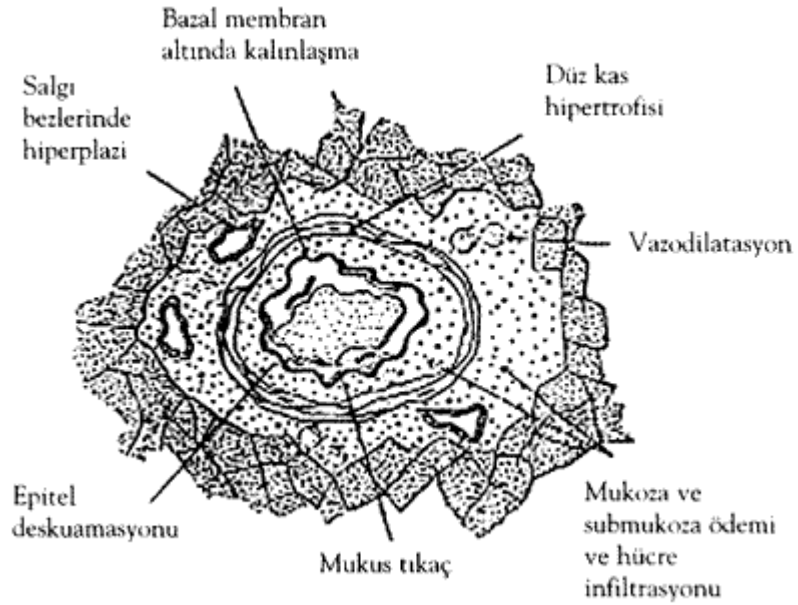
Kolinerjik, adrenerjik ve nonadrenerjik-nonkolinerjik (NANK) nöral mekanizmaların dengeli çalışmasının bozulmasının da bronş hiperreaktif cevabını arttırdığı belirtilirken, astımda artmış bir eksitatör nöral geçişin ve azalmış bir inhibitör nöral transmisyonun söz konusu olduğu ifade edilmektedir. Ancak aynı sinirde inhibitör ve eksitatör nörotransmitterlerle birlikte yer almalarına rağmen, çeşitli uyarılarla ve dengesiz bir nöral kontrolde farklı salınımlar artmaktadır. Özellikle eksitatör uçların hakimiyeti ile bronkomotor tonus üzerinden kasılma olduğu, hava yolu sekresyonunda artış, bronşiyal dolaşımında vazodilatasyon, inflamatuvar hücrelerde tetikleyici etkiler meydana geldiği belirtilmiştir (12).

**Hava yolu obstrüksiyonu:** Hava yolu daralması, astımda şikayetlere ve fizyolojik değişikliklere neden olan son ortak yoldur (2). Astım hastalarındaki bu durumun; tetikleyici ajanlarla karşılaşma sonrası gelişen akut bronkokonstrüksiyon, mukoza ödemi, mukus tıkaçları ve hava yollarındaki yapısal değişikliklere bağlı olarak gelişebileceği ifade edilmektedir (25).

Sonuç olarak genetik ve çevresel faktörlerden dolayı duyarlı hale gelen astım hastalarında bu mekanizmalar sonucunda havayollarında bazı değişimler oluşmaktadır. İlk başlarda hafif derecede başlayan bu değişimler, hastalık kronikleştikçe kalıcı hale gelebilmekte ve bronş yapısı bozulabilmektedir. Özellikle mast hücreleri, eozinofiller, yardımcı T hücreleri ve makrofajlar tarafından oluşturulan bu değişiklikler; inflamatuvar hücre infiltrasyonu, solunum epitelinde hasar ve dökülme, vazodilatasyon, ödem, bazal membran kalınlaşması, salgı bezlerinde hiperplazi, düz kas hipertrofisi ve lümeninde mukus tıkaçı gibi klasik histopatolojik özelliklerdir. Bunların astımın doğal sürecinde gelişen patolojiler olduğu ve en şiddetli olarak küçük çaplı bronşlarda izlenebileceği belirtilmektedir (22, 26). Astım patogenezi şekil-1’de astımda patolojik bulgular şekil-2’de özetlenmiş olarak gösterilmektedir.



Şekil 1. Astım Patogenezi (6)



Şekil 2: Astımda hava yolu patolojisi (27).



## II.1.g. Astım Tedavisi

Astım tedavisinde kullanılan ilaçlar 6 gruba ayrılır. Bu ilaçların bir kısmı kriz döneminde akut olarak kullanılırken, bir kısmı da profilaktik olarak kullanılmaktadır.

**1. Beta-adrenerjik reseptör agonistleri (beta-mimetikler):** Bu ilaçlar  $\beta_2$ -adrenerjik reseptörler üzerinden bronş düz kaslarında cAMP artışıyla bronkodilatasyon meydana getirirler. Kriz döneminde kullanılan adrenalin ve profilaktik olarak kullanılan salbutamol bu gruptaki ilaçlardan bazılarıdır.

**2. Fosfodiesteraz enzim inhibitörleri:** Bronş düz kaslarında PDE-4 diğerlerine göre daha fazla bulunmaktadır. Bu grupta en çok kullanılan ilaç, non-selektif PDE inhibitörü olan teofilindir. cAMP yıkımını engellemek suretiyle yaptığı bronkodilatasyonda hala tam olarak anlaşılabilen noktalar vardır. PDE-4'ün güçlü selektif blokörü olan rolipram güçlü bir bronkodilatatördür ve astım tedavisinde denenmektedir.

**3. Antimuskarinik İlaçlar:** Bu grup ilaçlar solunum yollarında parasempatik tonusu kaldırarak bronş çeperindeki parasempatik postgangliyonik sinir uçlarından salınan asetilkolinin bu uçların yanı başında bulunan mast hücrelerinin muskarinik reseptörlerini aktive etmesini engeller. Böylece, histamin, lökotrienler, kemotaktik faktörler v.b gibi bronkokonstriktör etkili ve mukus salgısını artıran maddelerin açığa çıkmasını önlerler. Ayrıca bronkospazm oluşmasında rol oynayan vagovagal refleksleri inhibe ederler. Bu grup ilaçlardan ipratropium bromür aerosol şeklinde ve profilaktik olarak halen kullanılmaktadır.

**4. Mast hücresi stabilizatörleri:** Solunum yollarında yerleşmiş mukozal türdeki mast hücrelerinde cAMP düzeylerini yükseltmek ve  $Ca^{+2}$  girişini inhibe etmek suretiyle, sitoplazma mebranlarını stabilize ederler ve böylece proinflamatuvar ve bronkokonstriktör otakoidlerin salınmasını engellerler. Bu grup ilaçlar arasında kromolin, ketotifen ve nedokromil bulunur.

**5. Glukokortikoidler:** Astımda hava yollarının bronkokonstriktör etkenlere hiperrreaktif oluşunun altında yatan hava yolu mukozası iltihabını azaltmak suretiyle hava yolu rezistansını düşürürler. Direkt bronkodilatatör etkileri olmamalarına rağmen güçlü anti astmatikdirler.

## **6. Lökotrien Antagonistleri (Lipoksijenaz inhibitörleri ve sisteinil-lökotrien reseptör blokörleri)**

Lökotrienler inflamasyonda ve aşırı duyarlılıkta rol oynayan mediatörlerdir. Bu nedenle astım tedavisinde kullanılmak üzere lökotrien reseptör antagonistleri olan zafirlukast, montelukast, pranlukast ve 5-lipoksijenazın direkt inhibitörü olan zilotan geliştirilmiştir. Montelukast ve zafirlukast, hafif ve orta derecedeki olgularda glukokortikoidler ve beta-agonistler yeterli olmamışsa onlara ek olarak kullanılır. Tedaviye lökotrien reseptör antagonistlerinin eklenmesi glukokortikoid dozunun azaltılmasına olanak vermeyebilir ancak beta-agonisti gereksinimini azaltır (28).

## **II-2. NİTRİK OKSİT**

### **II-2.a. Tanım ve Tarihçe**

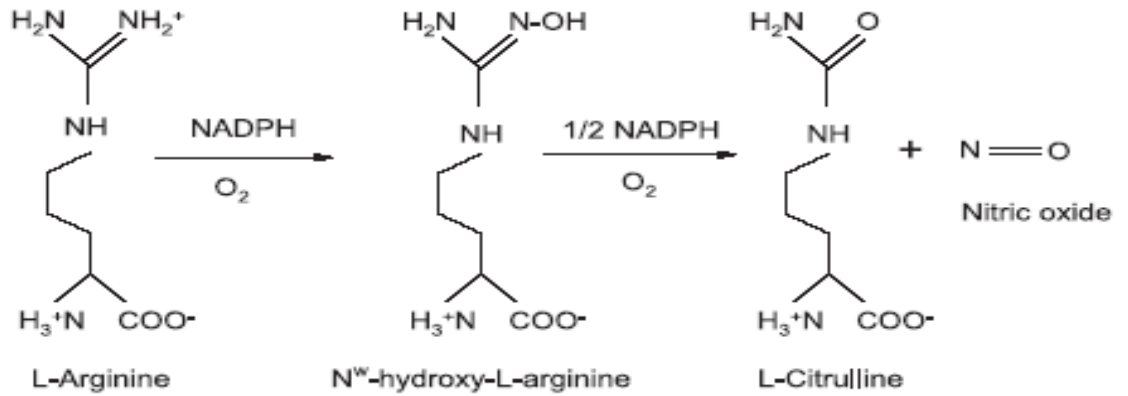
Nitrik oksit, vücutta çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik durumlarda rol alan, yüksek oranda reaktif ve kısa yarılanma ömrüne sahip renksiz bir gazdır. 1980 yılında Furchgott ve Zawadski yaptıkları çalışmalar sonucunda asetil kolin uyarısıyla endotel hücrelerince yapılan, damar düz kasını gevşetici bir madde bildirmişlerdir. Bu maddeye endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF: Endotel Derived Relaxing Factor) adı verilmiştir (29). Daha sonra yapılan çalışmalar sonucunda Palmer ve arkadaşları EDRF'nin kimyasal yapısının NO olduğunu bildirmişlerdir (30).

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 adezyonunu inhibe eden, vasküler hücre büyümesi ve yeniden yapılanmayı sağlayan, endotel hücre apoptozisini, migrasyonunu ve hücre permeabilitesini regüle eden bir mediyatör olduğu belirtilmektedir. Nitrik oksitin, sinir sisteminde nörotransmitter fonksiyonu gördüğü, immün sistemin bir parçası olarak da yüksek konsantrasyonlarında sitotoksik etkisi ile organizmayı koruduğu ifade edilmektedir (31). 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 (32,33)

## II-2.b. Salınım ve Metabolizma

NO, NOS ile katalizlenen reaksiyon sonucu yarı esansiyel bir aminoasit olan L-argininden sentez edilen endojen bir vazodilatördür (33). NO, L-arginin ve moleküler oksijenden, elektron vericisi olarak nükleotid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), kofaktör olarak hem, tetrahidrobiopterin, kalmodulin ve flavin adenin mono (FMN) ve dinükleotidin (FAD) kullanılmasıyla oluşmaktadır (34). L-argininden NO oluşması şekil 3'te gösterilmiştir.



**Şekil 3:** L-argininden NO sentezi. NO, L-argininin L-sitrüline dönüşümü sırasında sentezlenmektedir. Bu reaksiyon esnasında 1,5 molekül NADPH, elektron vericisi olarak kullanılmaktadır. Hidroksi-arginin ara ürün olarak oluşmaktadır (35).

NOS enziminin 2 izoformu bulunmaktadır. Bunlardan ilki cNOS'dur. Hücrelerde yapısal olarak bazal düzeyde bulunmaktadır. Oluşturduğu NO ile guanil siklazı aktive ederek fizyolojik olayları regüle eder (bronş ve damar düz kas gevşemesi gibi). Kortikosteroidden etkilenmediği ifade edilmektedir. Endotelde bulunan eNOS ve nöronlarda bulunan nNOS

alt tipleri vardır. İkinci NOS izoformu ise iNOS'dur. Bazı uyaranlardan (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1, endotoksin gibi) sonra yapılıp aktivasyon kazanır. Kortikosteroidlerle iNOS'a bağlı NO yapımının azaltılabileceği belirtilmektedir (5).

nNOS ve eNOS fizyolojik şartlarda ilgili reseptörlerin uyarılmasına cevap olarak aktif hale geçerler ve bunun için Ca<sup>+2</sup>'a ihtiyaç duyarlar. Hücreler içinde sürekli olarak eksprese edilen yapısal NOS alt tiplerinin, Ca<sup>+2</sup> düzeyindeki bir artış sonucu kalsiyum iyonunun kalmoduline bağlanmasıyla aktifleştiği ve birkaç dakika içinde NO salınımına yol açtığı ifade edilmektedir. Yapısal NOS'un sentez süresi kısa ve üretilen NO miktarı çok düşüktür. Bu durum hücre içi iyonize kalsiyum konsantrasyonunun azalmaya başladığı anda enzimin inaktif hale geçmesinden dolayı oluşmaktadır. Hücre içinde bulunmayan iNOS'un ise, endotoksin ve/veya değişik sitokinlere cevap olarak makrofajlar ve diğer hücre tiplerinin uyarılmasıyla kalsiyumdan bağımsız olarak salgılandığı, sürekli ve çok miktarda NO yapabildiği ifade edilmektedir. Özellikle bakteri lipopolisakkaritleri ve interferon- $\gamma$  ile uyarılan makrofajların bol miktarda NO üretebildiği bildirilmektedir (34). NOS türlerinin buldukları hücre tipleri ve ürettikleri NO'nun miktarları Tablo 2 de özetlenmiştir.

**Tablo-2:** Nitrik oksit sentezleyen enzimler (33).

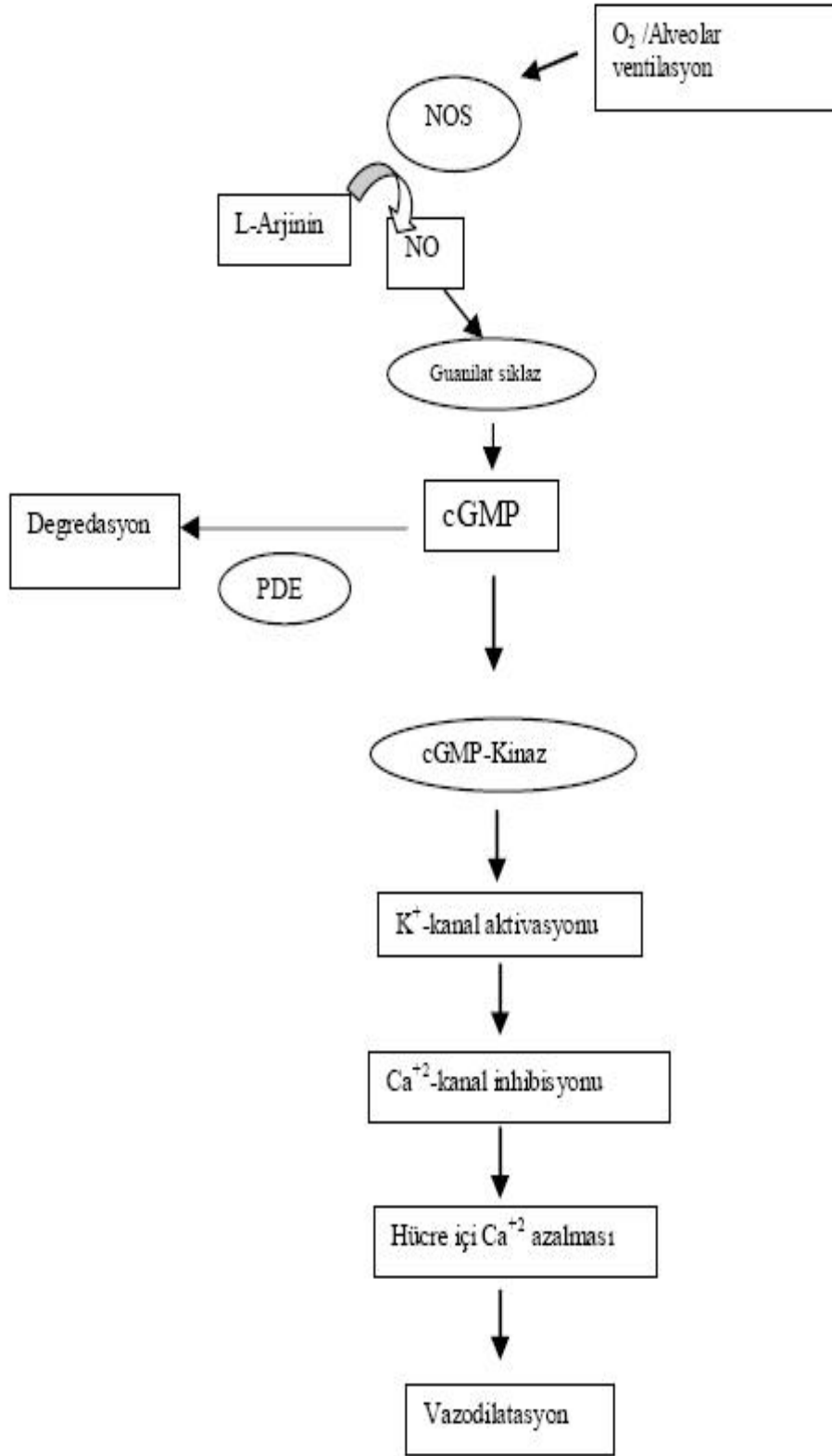
NOS izoformu	Salınım	Kaynak	Regülasyon	NO miktarı
nNOS	Devamlı	Sinir hücreleri	Ca <sup>+2</sup> bağımlı	Düşük (pikomol)
iNOS	İndüklen- diğinde	Makrofaj, damar düz kası ve endoteli, miyokard, endokard, hepatosit, immün hücreler, hava yolu epiteli	Sitokinler, endotoksin, oksidanlar tarafından indüklenme	Yüksek (nanomol)
eNOS	Devamlı	Endotel, trombosit, miyokard, endokard, nötrofil ve mast hücreleri	Ca <sup>+2</sup> bağımlı	Düşük (pikomol)

NO'nun yarılanma ömrü çok kısa olmakla birlikte solüsyonlarda hızla okside olarak nitrit (NO<sub>2</sub>) ve nitrata (NO<sub>3</sub>) dönüşmektedir. İnsan vücudunda NO, hemoglobine bağlandığında inaktive olur. Bu bağlanmanın, oksijene göre 3000 kat daha hızlı olduğu belirtilmektedir. NO'nun bu kadar hızlı inaktive olmasının belki de etkilerini lokalize kılan en önemli faktör olabileceği ifade edilmektedir (36). NO aynı zamanda serbest radikal süperoksit tarafından da inaktive edilmektedir. NO'nun süperoksitle reaksiyonu sonunda peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) oluşur ve bu da oldukça güçlü doku hasarına yol açan bir maddedir. NO sentezleyen enzimin inhibitörlerinin bulunmuş olmasının, NO'nun fizyolojik ve patofizyolojik özelliklerini saptamada önemli rol oynadığı belirtilmektedir. L-arginin analoglarının [Ng-monometil- L-arginin (L-NMMA), NG-nitro-L-arginin (L-NOARG), NG-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME), NGiminoetil-L-ornitin (L-NIO)] endojen NO sentezini inhibe ettiği belirtilmiştir (37).

## II-2.c. Etki Mekanizması

NO'nun biyolojik aktivitesinde en iyi tanımlananı, hedef bölgesinin, çözünür guanilat siklazın hem komponenti içerisindeki Fe<sup>+2</sup>,ye bağlanması ve enzimi aktive ederek GTP'nin cGMP'ye dönüşümü sağlamasıdır. Bunun ardından cGMP'nin , tip I çözünür cGMP-bağımlı protein kinaz'a (PKG) bağlanarak hücre içi etkilerini oluşturduğu belirtilmektedir (38).

Genel olarak cGMP'nin düz kas gevşemesini iki moleküler mekanizmayı aktive ederek başlattığı kabul edilmektedir: 1) Hücre içi Ca<sup>+2</sup> konstrasyonunu azaltarak; 2) Kontraktıl sistemin Ca<sup>+2</sup>'a duyarlılığını azaltarak. İlk mekanizmaya göre aktive olmuş PKG'nin, çeşitli hedef proteinleri fosforilleyerek hücre içi Ca<sup>+2</sup> konsantrasyonunun azalmasına neden olduğu belirtilmektedir. PKG, Ca<sup>+2</sup> ile aktive edilen K<sup>+</sup> kanallarını stimule ederek, membran Ca<sup>+2</sup> kanal aktivitesini inhibe ederek, plazma membranındaki ve sarkoplazmik retikulumdaki Ca<sup>+2</sup>-ATPaz pompasını aktive ederek ve inositol 1,4,5-trifosfat duyarlı Ca<sup>+2</sup> salıveren kanalı bloke ederek sarkoplazmik retikulümdan Ca<sup>+2</sup> saliverilmesini azaltarak etki gösterdiği ifade edilmektedir (39). (Şekil-4).



Şekil 4: NO etki mekanizmasının şematik gösterimi (40).

cGMP ile indüklenen  $Ca^{+2}$  desentizasyonun ise RhoA-bağımlı yolağın inhibisyonu üzerinden miyozin-hafif zincirin fosfataz aktivitesini stimule ederek oluşturduğu belirtilmektedir (41).

Bunlara ilave olarak NO'nun, guanilat siklaz ve cGMP'den bağımsız olarak da bazı etkilere aracılık ettiği ifade edilmiştir. iNOS ile salıverilen yüksek konsantrasyondaki NO'nun tümör hücreleri üzerinde immün efektör molekül olarak etki gösterdiği belirtilmektedir. Aynı zamanda viral replikasyonu önlemede ve çeşitli patojenlerin eliminasyonunda da benzer etkiye sahiptir. Hatta NO'nun fungus, parazitler, Mycobacterium tuberculosis'i içeren bakteriler üzerinde öldürücü veya gelişimini inhibe edici etkiye sahip olduğu da bildirilmiştir. Bu etkisini ribonükleotid redüktaz'ın inaktivasyonu ile DNA sentez inhibisyonu ve DNA deaminasyonu üzerinden gerçekleştirdiği belirtilmektedir (42).

## **II-2.d. Nitrik Oksit Fonksiyonları**

Nitrik oksit; kardiyovasküler sistem, santral sinir sistemi, gastrointestinal sistem, ürogenital sistem, immün sistem ve solunum sisteminde bir çok olayda rol almaktadır.

### **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 (31).

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 (3). 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 (4).

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 (43). Gruetter ve arkadaşları nitrovazodilatörlerin sığır izole solunum yolu düz kasında guanilat siklazı aktive ederek ve cGMP düzeylerini artırarak gevşeme oluşturduğunu göstermişlerdir (44). Anestezi altındaki kobaylarda metakolin ile sağlanan bronkokonstriksiyonun inhale edilen NO ile konsantrasyona-bağımlı (5-300 ppm) bir şekilde azaldığı belirtilmektedir (45). 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 yanıtını önlediğini düşündürdüğü ifade edilmiştir (46).

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



**Tablo-3:** Nitrik oksitin akciğerdeki fonksiyonları (33)

<b>Yararlı Etkiler</b>	<b>Zararlı Etkiler</b>
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

### **II-2.e.Nitrik Oksit ve Astım**

Astımda exhale edilen NO seviyesi arttığı ve NO ölçümünün inflamatuvar süreci tespit için non-invasif bir yöntem olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (7). Astımlı hastalarda hava yollarında iNOS enzim salınımının ve buna bağlı NO miktarının arttığı ve steroid tedavisiyle bunun normale döndüğü birçok çalışmada gösterilmiştir (47). Miktarı artan NO'nun, cNOS'un inhibisyonuna ve guanil siklazın desensitizasyonuna neden olup, bronkodilatör yanıtı ortadan kaldırdığı belirtilmektedir (12).

NO ölçümünün astım hastalarında sağladığı faydalardan biri subklinik formların saptanıp steroidle tedavi edilmesi ve klinik olarak hastalık tablosunun ortaya

çıkmasının önlenmesiyle, bir diğer faydası da tedaviye yanıtın değerlendirilip gereksiz yere yüksek doz ilaç alımının önüne geçmiş olmasıdır (47).

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 (31). 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 (35).

NO'nun solunum sistemindeki ve astım gibi bazı solunum sistemi rahatsızlıklarındaki etkisini araştırmaya yönelik in vivo/in vitro çeşitli deneyler yapılmıştır. İnsanda santral ve periferik solunum yollarında iNANK yanıtlarına tamamen NO'nun aracılık ettiği gösterilirken, kobay trakeasında ise bu yanıtlara NO'nun yanı sıra VIP'inde aracılık ettiği belirtilmiştir (48). 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 (49). 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 (50). 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 (51).

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 (7).

### **II.3. Fosfodiesteraz Enzimleri**

#### **II.3.a. Fosfodiesteraz Enzim Sistemi Genel Bilgi**

1957'de Sutherland ve arkadaşları hücre içi ikinci ulak görevi yapan siklik adozin monofosfatı (cAMP) ilk kez tanımlamışlardır. Daha sonra diğer bir siklik nükleotid olan siklik guanozin monofosfat (cGMP) ve bunları katabolize eden spesifik fosfodiesteraz enzimleri (PDE ) ile substratları ve aktiviteleri farklı 10 kadar non-spesifik fosfodiesteraz enzimleri (PDE1-10) tanımlanmıştır (52)

Fosfodiesteraz enzimleri siklik nükleotidleri hidrolize eden (cAMP ve cGMP) ve böylece ikinci ulak sinyal yollarının modülasyonunda önemli rol alan enzimlerdir. Değişik PDE'ler farklı substratlara karşı değişen enzimatik afiniteye sahiptirler. Bu enzimler farklı yerleşim ve kalsiyuma duyarlılık göstermektedirler. Korpus kavernozumda PDE-2 / 3 / 4 / 5'in, kalp kasında PDE-1 / 2 / 3 / 4 / 7 / 8 / 9'un, damar düz kasında PDE-1 / 2 / 3 / 4 / 5'in varlığı gösterilmiştir. PDE-1 ve PDE-5'in cGMP'ye afinitesinin daha yüksek olduğu, PDE-2, PDE-3 ve PDE-4'ün ise cAMP'ye daha yüksek afinite gösterdiği belirtilmektedir. PDE-5 enziminin, damar ve korpus kavernozum düz kasları dışında barsak düz kaslarında, trombositlerde ve kondrositlerde de bulunduğu belirtilmiştir (53).

### **II.3.b. Fosfodiesteraz Enzim İnhibitörleri**

PDE-5, cGMP yıkımını sağlayan bir enzimdir ve inhibisyonu dokuda cGMP artışına neden olmaktadır. Guanilat siklaz enzimi ile oluşan cGMP, proteinkinaz-G'yi (PKG) aktive ederek birçok hücresel işlevi tetiklemektedir. Düz kaslar dışında da (vücuttaki hemen hemen tüm hücrelerde) cGMP'nin ikinci haberci olarak rol oynadığı ve birçok hücre işlevinin tetiklenmesinin sitozolik cGMP düzeylerine bağlı olduğu belirtilmektedir. Hücre içi cGMP düzeylerini ise sentezde guanilat siklaz, ve yıkımda PDE enzimleri belirlemektedir (53).

PDE'nin selektif inhibitörleri son yıllarda kullanılmaktadır. Milrinon ve enoksimon gibi PDE 3'ün selektif inhibitörlerinin pozitif inotrop ve vazodilatör etkileri nedeniyle konjestif kalp yetmezliği tedavisinde kullanıldığı belirtilmektedir. Ayrıca son yıllarda metilksantinlerin PDE'ye non selektif yüksek afiniteli çok sayıda türevi sentezlenmiştir. Bunlardan pentoksifilin vazodilatatör tedavide kullanıldığı, izobutilmetilksantin (IBMX)'in ise henüz tedaviye girmediği, üzerinde laboratuvar çalışmalarının yapıldığı belirtilmektedir (52). Gene yakın zamanda selektif PDE-5 inhibitörleri geliştirilmiş ve erektil disfonksiyon tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca inhale NO ve PDE-5 inhibitörlerinin yetişkin ve neonatal pulmoner arteriel hipertansiyon tedavisinde kullanıldığı belirtilmektedir (53).

### **II.3.c.Fosfodiesteraz Enzim İnhibitörleri ve Astım**

Birinci kuşak inhibitörler diye bilinen ksantin alkaloidleri teofilin ve kafeinin 60 yılı aşkın süredir bronkodilatör, antiastmatik ve analeptik olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Kafeinin analeptik olarak değerini kaybettiği, teofilin ucuz tedavi seçeneği olarak ve daha önemlisi kendisinden sonra tedaviye giren ve çok daha etkili ve daha az yan etkili birçok seçeneğe rağmen astım ve kronik obstruktif akciğer hastalıklarının tedavisinde ilk seçenek olmamakla birlikte tedavi değerini koruduğu ifade edilmektedir. En eski ve en çok araştırılmış bir solunum sistemi ilacı olmasına rağmen halen etki mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte, kesin olan yönü nonspesifik PDE enzim inhibisyonu yapmasıdır (54).

PDE izoenzimlerinin dokulardaki dağılımları farklı olduğundan dolayı, spesifik hücrelerdeki PDE izoenzimlerine yönelmenin, selektif izoenzim inhibitörleri ile

tedavi başarısını artırırken, yan etkileri de en aza indireceği belirtilmektedir. Yeni ilaç geliştirme amaçlı yapılan in vitro deneylerde, PDE-4 inhibitörleri ile bildirilen çok sayıda çalışma olmasına karşın insanlardaki aktivitesi üzerinde çalışmalar sınırlıdır. İlk geliştirilen inhibitör olan zaprinastın erişkin astımlılarda egzersize bağlı bronkokonstriksiyonu azalttığı, ancak çocuklarda bu etkisinin görülmediği, ayrıca histaminin indüklediği bronkokonstriksiyonda etkili olmadığı gösterildiği belirtilmektedir. Tibenelastın etkisinin de istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı ifade edilmektedir. Dual PDE-3/4 inhibitörü benafentrin ve zardaverinin etkisi konusunda ise sonuçların çelişkili olduğu, sistemik olarak alınan bu ilaçlarda hedeflenmeyen dokularda da etkileri olduğundan yan etki profillerinin hâlâ geniş olduğu vurgulanmaktadır. Bu nedenle de doku dağılımının daha ayrıntılı bilinmesinin, doku veya hücreye daha spesifik PDE inhibitörlerinin geliştirilmesinin önemi üzerinde durulmaktadır (55)

Yapılan bir in vitro çalışmada kobay trakealarında NO'ya bağlı gevşeme cevaplarına selektif PDE-5 inhibitörü zaprinastın etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada cGMP-spesifik tip 5 PDE inhibitörü zaprinastın, elektriksel alan uyarısı (EAU) ile sağlanan NANK gevşeme cevaplarını ve NO donörleri SIN-1 ve SNP gevşeme cevaplarını artırdığı belirtilmektedir. Bu bilgiler ışığında en azından düz kas gevşemesinin bir bölümünün, NO gibi transmitterlerin guanilat siklazı uyararak cGMP seviyelerini artırması sonucunda olabileceğini bir hipotez olarak iddia etmişlerdir. Elde ettikleri bulgulara göre NO'nun, NANK'a bağlı gevşeme cevaplarında bir mediatör olabileceğini ve PDE-5 inhibisyonunun NO aracılı gevşeme cevaplarını artırdığını belirtmişlerdir (51).

PDE enziminin değişik izoenzimlerinin varlığının saptanması ve PDE-4'ün solunum yolu inflamasyonlarındaki rolünün ve öneminin anlaşılması ile teofilinden daha güçlü etkili ve özellikle daha az yan etkili selektif PDE inhibitörlerinin sentezine odaklanıldığı belirtilmektedir. Hemen tedaviye girmeye hazır cilomilast ve faz çalışmaları süren roflumilast ve piclamilast gibi ikinci kuşak olarak nitelenen yeni selektif inhibitörlerin ilgiyi tekrar PDE'ler ve inhibitörleri üzerine çektiği, göğüs hastalıkları tedavi rehberlerinde seçenek önceliklerinde değişikliklere neden olacak gibi görüldüğü ifade edilmektedir (54)

## **BÖLÜM III**

### **ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER**

#### **III.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.

#### **III.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 intramuskuler olarak uygulandı. Her iki gruptaki hayvanlar 25. günün sonunda öldürüldü (56).

#### **III.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 (57).

#### **III.4. Trakea Preparatlarının Patolojik Değerlendirilmesi**

Kontrol grubundaki ve ovalbumin duyarlı deney grubundaki kobaylardan alınan doku örnekleri 12-24 saat %10'luk formaldehid ile tespit edildikten sonra, dehidratasyon ve şeffaflandırma yapılarak parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan 3 mikronluk kesitlere Hemotoksilen-Eozin, Masson Trikrom, PAS-Alcien Blue boyaları uygulandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda değerlendirildi. Tüm deneklerden alınan doku kesitleri C.Ü. Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda ışık mikroskopu ile aynı patolog tarafından değerlendirildi.

### III.5. Trakea Preparatlarının Alınması ve İn Vitro Deneylere Hazırlanışı

Pentobarbital (100 mg i.p.) anesteziisini 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 mmlik şeritler halinde, 37°C'da ısıtılan, %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> 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 ve antagonist maddelerin uygulanması ve EAU için 30 dakika dinlenmeye bırakıldı.

EAU için, trakea preparatları 2 paralel elektrot arasına vertikal bir şekilde, bir ucu organ askısına diğer ucu Grass-FT 03 Force Displacement transdüsörüne bağlanarak yerleştirildi. EAU supramaksimal voltajda (60 V), 0.5 msn, 64 Hz 'lik frekanslarda toplam 10 sn'lik süre ile uygulandı.

### III.6. Deneylerde Kullanılan Besleyici Solusyonlar ve İlaçlar

Deneylerde kullanılan Krebs Bikarbonat solüsyonunun içeriği mM/L olarak şu şekildedir: NaCl: 120 mM/L, KCl: 4.6 mM/L, NaHCO<sub>3</sub>: 22 mM/L, MgSO<sub>4</sub>: 1,2 mM/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1,2 mM/L, glukoz: 11.5 mM/L, CaCl<sub>2</sub> 2.5'dir.

#### Deneylerde Kullanılan İlaçlar:

**NOC-12:** NO donörü (Sigma)

NOC-12'nin açık ismi (3-Ethyl-3-(ethylaminoethyl)-1-hydroxy-2-oxo-1-triazene) olup stabil kompleks halindeyken fizyolojik şartlar altında kofaktör olmaksızın NO salıverebilmektedir. Yarılanma ömrünün ise 327 dakika olduğu ifade edilmektedir.

**NOR-4:** NO donörü (Sigma)

NOR'ün açık ismi ((±)-(E)-4-Ethyl-2-[(Z)-hydroxyimino]-5-nitro-3-hexen-1-yl-nicotinamide) olup kontrollü şartlar altında spontan olarak NO saldığı ve yarılanma ömrünün 60 dakika olduğu belirtilmektedir.

**T-0156:** Fosfodiesteraz 5 inhibitörü (Sigma)

T-0156 maddesinin açık ismi ((2-(2-Methylpyridin-4-yl)methyl-4-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-8-(pyrimidin-2-yl)methoxy-1,2-dihydro-1-oxo-2,7-naphthyridine-3-carboxylic acid methyl ester hydrochloride)) olup dokuda cGMP artışına neden olmaktadır

**L-NAME:** Nitrik oksit sentaz inhibitörü (Sigma)

**YC-1:** Guanilat siklaz aktivatörü (sigma)

**ODQ:** Guanilat siklaz inhibitörü (Sigma)

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

**Karbakol:** Kolinerjik agonist (Sigma)

**Papaverin:** Direkt düz kas gevşeticisi (Sigma)

**Sodyum nitroprussiyat (SNP):** NO salıvericisi (Fluka)

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

### **III.7 Kasılma Yanıtları**

#### **III.7.a. 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.

#### **III.7.b. Karbakol Kasılma Yanıtları**

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, dokular dengeye ulaştıktan sonra, karbakol ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) kasılma yanıtları kümülatif olarak alındı ve kasılma yanıtları aynı preparatta 80 mM KCl'nin oluşturduğu kasılmalarının %'si olarak grafiklendi.



### **III.8. Gevşeme Yanıtları**

#### **III.8.a. NOC-12 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-12 (NO donörü) ( $10^{-8}$ - $3.10^{-4}$  M) gevşeme yanıtları kümülatif olarak alındı. Her bir konsantrasyondaki gevşeme yanıtı dengeye eriştikten sonra bir üst konsantrasyona geçildi. Ayrıca NOC-12 gevşeme yanıtları her grup için ODQ ( $10^{-5}$  M) varlığında tekrar alındı. Her iki gruptaki gevşeme yanıtları da karbakolun ( $10^{-5}$  M) oluşturduğu kasılma yanıtı üzerinde % gevşeme olarak grafiklendi.

#### **III.8.b. NOR-4 Gevşeme Yanıtları**

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, submaksimal konsantrasyonda  $10^{-5}$  M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra, NOR-4 (NO donörü) ( $10^{-8}$  - $3.10^{-4}$  M ) gevşeme yanıtları kümülatif olarak alındı. Her bir konsantrasyondaki gevşeme yanıtı dengeye eriştikten sonra bir üst konsantrasyona geçildi. Ayrıca NOR-4 gevşeme yanıtları her grup için ODQ ( $10^{-5}$  M) varlığında tekrar alındı. Her iki gruptaki gevşeme yanıtları da karbakolun ( $10^{-5}$  M) oluşturduğu kasılma yanıtı üzerinden % gevşeme olarak grafiklendi.

#### **III.8.c. T- 0156 Gevşeme Yanıtı**

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, submaksimal konsantrasyonda  $10^{-5}$  M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra, PDE-5 inhibitörü T-0156 ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) gevşeme yanıtları kümülatif olarak alındı. Her bir konsantrasyondaki gevşeme yanıtı dengeye eriştikten sonra bir üst konsantrasyona geçildi. Her iki gruptaki gevşeme yanıtları da karbakolun ( $10^{-5}$  M) oluşturduğu kasılma yanıtı üzerinden % gevşeme olarak grafiklendi.

#### **III.8.d. YC-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, YC-1 ( $10^{-9}$ -  $3.10^{-5}$  M) gevşeme yanıtları kümülatif olarak alındı. Her bir

konsantrasyondaki gevşeme yanıtı dengeye eriştikten sonra bir üst konsantrasyona geçildi. Ayrıca YC-1 gevşeme yanıtları her grupta için ODQ ( $10^{-5}$  M) varlığında tekrar alındı. Her iki gruptaki gevşeme yanıtları da karbakolün ( $10^{-5}$  M) oluşturduğu kasılma yanıtı üzerinden % gevşeme olarak grafiklendi.

### **III.8.e. Sodyum Nitropurussit Gevşeme Yanıtları**

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, submaksimal konsantrasyonda  $10^{-5}$  M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra, SNP ( $10^{-8}$ - $3.10^{-4}$  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.

### **III.8.f. Papaverin Gevşeme Yanıtları**

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, submaksimal konsantrasyonda  $10^{-5}$  M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra, papaverin ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  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.

### **III.8.g. Elektriksel Alan Uyarısının Oluşturduğu Gevşeme Yanıtları**

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, submaksimal konsantrasyonda  $10^{-5}$  M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra, 60 V 0.5 msn, 64 Hz 'lik frekanslarda toplam 10 sn'lik süre ile uyarılar verildi. Ayrıca ortama L-NAME ( $3 \times 10^{-5}$  M) ilave edilerek elektiriksel alan uyarıları tekrarlandı. Elde edilen gevşemeler karbakolün ( $10^{-5}$  M) oluşturduğu kasılma yanıtı üzerinden % gevşeme olarak grafiklendi.

### III.9. cGMP Düzeylerinin Ölçülmesi

Kontrol ve deney gurubundan alınan trakea preparatı doku örneklerinde cGMP düzeyleri Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi Laboratuvarında ELISA yöntemi kullanılarak analiz edildi. Her iki guruptan alınan trakea preparatı doku örnekleri 37°C'de (pH 7,4), %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> ile sürekli gazlandırılan Krebs bikarbonat tampon çözeltisinde 60 dakika dengelenmeye bırakıldı. İlaçlarla 10 dakika, antagonistlerle 30 dakika, [Karbakol (10<sup>-5</sup> M), NOC-12 (10<sup>-4</sup> M), NOC-12 + ODQ (10<sup>-4</sup> M), NOR-4 (10<sup>-5</sup> M), NOR-4 + ODQ (10<sup>-5</sup> M), YC-1 (10<sup>-5</sup> M), YC-1 + ODQ (10<sup>-5</sup> M), PDE-5 (3. 10<sup>-5</sup> M),] olmak üzere inkübe edildi ve elektriksel alan uygulandı. İnkübasyondan sonra hızlı bir şekilde alınan şeritler sıvı nitrojende donduruldu. Dondurulan şeritler 1 ml % 80 etanole transfer edildi. Örnekler etanolle homojenize edildi ve 30 dakika 4°C'de inkübe edildi. Daha sonra homojenat hücre debris ve proteinleri çöktürmek için 4°C'de 15 dakika 12.000xg'de santrifüj edildi. Etanolü uzaklaştırmak için, süpernatantlar temiz deney tüpüne alındı ve 50°C'de uçuruldu. Bunun sonucunda kalan materyal, cGMP kitinde belirtilen talimatlara göre işlemlenerek ELISA yöntemiyle (Parameter™, Cyclic GMP Assay, Catalog Number KGE003) cGMP düzeyi ölçmek için kullanıldı. Her bir trakea dokusundaki cGMP düzeyi pmol cGMP mg<sup>-1</sup> proteine standardize edildi.

### III.10. 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 ± 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<sub>50</sub>) her bir deneyin log-konsantrasyon yanıt eğrilerinden elde edildi ve aritmetik ortalama ± standart hata olarak gösterildi.

pD<sub>2</sub> 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 denklemine uygulanması ile çizilen grafiklerden saptandı.

## **BÖLÜM IV**

### **BULGULAR**

#### **IV.1. Alerjik Deri Reaksiyonu Bulguları**

Kobayların ovalbumin ile duyarlanıp duyarlanmadığını tespit etmek amacıyla alerjik deri reaksiyonu testi 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. Deney gurubundaki ovalbumin enjeksiyonuna bağlı oluşan kızarıklık yanıtı, bütün dozlarda kontrol grubunda oluşan kızarıklık yanıtına göre istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0.05$ ). Her iki grupta da salin injeksiyonuna yanıt oluşmadı ( Tablo 4).

#### **IV.2. Trakea Preparatlarının Patolojik Değerlendirilme Bulguları**

Her iki deney gurubundan alınan bronşiyal doku örneklerinde yapılan patolojik inceleme sonucunda ovalbumin duyarlı gurupta astımla uyumlu olarak; peribronşiyal/perivasküler iltihabi hücre infiltrasyonun, düz kas hipertrofisinin, eozinofil lökosit infiltrasyonun, subepitelyal kollagen artışının, mukus sekresyonun ve goblet hücre hiperplazisinin daha fazla miktarda olduğu gözlemlendi (Resim 1-7).

#### **IV.3. Kasılma Yanıtları**

##### **IV.3.a. 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. KCl kasılma yanıtları açısından iki grup karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ( $p>0.05$ ), (Şekil 5), (Tablo 5).

### **IV.3.b. Karbakol Kasılma Yanıtları**

Her iki grupta da izole kobay trakea preparatlarında karbakolün ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M), konsantrasyona bağlı olarak kasılma meydana getirdiği görüldü. Kasılmalar  $E_{maks}$  ve  $pD_2$  değerleri üzerinden değerlendirildi. Karbakol kasılma yanıtları açısından iki grup karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ( $p>0.05$ ), (Şekil 6), (Tablo 5).

### **IV.4.Gevşeme Yanıtları**

#### **IV.4.a. NOC-12 Gevşeme Yanıtları**

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, submaksimal konsantrasyonda  $10^{-5}$  M karbakol ile kasıldıktan ve dengeye ulaşıldıktan sonra, NOC-12 ( $10^{-8}$ - $3.10^{-4}$  M) gevşeme yanıtları kümülatif olarak alındı. Gevşemeler,  $E_{maks}$  ve  $pD_2$  değerleri üzerinden değerlendirildi. Kontrol ve deney grupları karşılaştırıldığında, deney gruplarında NOC-12 gevşeme yanıtları  $10^{-6}$  M konsantrasyondan başlamak üzere tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı ( $p<0.05$ ). Deney gruplarından alınan gevşeme yanıtlarında  $pD_2$  değerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı,  $E_{maks}$  değerlerindeyse anlamlı bir azalma olduğu saptandı ( $p<0.05$ ), (Şekil 7), (Tablo 6).

Ayrıca her iki gruptaki dokular, submaksimal konsantrasyonda  $10^{-5}$  M karbakol ile kasıldıktan ve dengeye ulaşıldıktan sonra, NOC-12 ( $10^{-8}$ - $3.10^{-4}$  M) gevşeme yanıtları, antagonist (ODQ) ( $10^{-5}$  M) varlığında tekrar alındı. Gevşemeler,  $E_{maks}$  ve  $pD_2$  değerleri üzerinden değerlendirildi. Her iki grupta ODQ varlığında elde edilen gevşeme yanıtları, tek başına NOC-12 uygulandığında elde edilen gevşeme yanıtlarına göre  $10^{-6}$  M konsantrasyondan başlamak üzere anlamlı olarak azaldı ( $p<0.05$ ). Antagonist varlığında alınan gevşeme yanıtlarında  $pD_2$  değerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı,  $E_{maks}$  değerlerindeyse anlamlı bir azalma olduğu saptandı ( $p<0.05$ ), (Şekil 8), (Tablo 6).

#### **IV.4.b. NOR-4 Gevşeme Yanıtları**

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, submaksimal konsantrasyonda  $10^{-5}$  M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaşıldıktan

sonra, NOR-4 ( $10^{-8}$ - $3.10^{-4}$  M) gevşeme yanıtları kümülatif olarak alındı. Gevşemeler,  $E_{maks}$  ve  $pD_2$  değerleri üzerinden değerlendirildi. Kontrol ve deney grupları karşılaştırıldığında, deney gruplarında NOR-4 gevşeme yanıtları  $10^{-6}$  M konsantrasyondan başlamak üzere tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı ( $p<0.05$ ). Deney gruplarından alınan gevşeme yanıtlarında  $pD_2$  değerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı,  $E_{maks}$  değerlerindeyse anlamlı bir azalma olduğu saptandı ( $p<0.05$ ), (Şekil 9), (Tablo 6).

Ayrıca her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları,  $10^{-5}$  M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra, NOR-4 ( $10^{-8}$ - $3.10^{-4}$  M) gevşeme yanıtları, ODQ ( $10^{-5}$  M) varlığında tekrar alındı. Gevşemeler,  $E_{maks}$  ve  $pD_2$  değerleri üzerinden değerlendirildi. Her iki grupta antagonist varlığında elde edilen gevşeme yanıtları, tek başına NOR-4 uygulandığında elde edilen yanıtlara göre, kontrol gurubunda  $10^{-6}$  M'dan deney gurubunda ise  $10^{-5}$  M konsantrasyondan başlamak üzere anlamlı olarak azaldı ( $p<0.05$ ). Antagonist varlığında alınan gevşeme yanıtlarında  $pD_2$  değerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı,  $E_{maks}$  değerindeyse anlamlı bir azalma olduğu saptandı ( $p<0.05$ ), (Şekil 10), (Tablo 6).

#### **IV.4.c. T-O156 Gevşeme Yanıtları**

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları,  $10^{-5}$  M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra, PDE-5 inhibitörü T-0156 ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) gevşeme yanıtları kümülatif olarak alındı. Gevşemeler,  $E_{maks}$  ve  $pD_2$  değerleri üzerinden değerlendirildi. Kontrol ve deney grupları karşılaştırıldığında, deney gruplarında T-0156 gevşeme yanıtları  $10^{-8}$  M konsantrasyondan başlamak üzere tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı ( $p<0.05$ ). Deney gruplarından alınan gevşeme yanıtlarında  $pD_2$  değerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı,  $E_{maks}$  değerlerindeyse anlamlı bir azalma olduğu saptandı ( $p<0.05$ ), (Şekil 11), (Tablo 6).

#### **IV.4.d. YC-1 Gevşeme Yanıtları**

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları,  $10^{-5}$  M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra, guanilat siklaz enzimi aktivatörü YC-1 ( $10^{-9}$ - $3.10^{-5}$  M) gevşeme yanıtları kümülatif olarak alındı. Gevşemeler,  $E_{maks}$  ve

pD<sub>2</sub> değerleri üzerinden değerlendirildi. Kontrol ve deney grupları karşılaştırıldığında, deney gruplarında YC-1 gevşeme yanıtları 10<sup>-7</sup> M konsantrasyondan başlamak üzere tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı (p<0.05). Deney gruplarından alınan gevşeme yanıtlarında pD<sub>2</sub> değerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı, E<sub>maks</sub> değerlerindeyse anlamlı bir azalma olduğu saptandı (p<0.05), (Şekil 12), (Tablo 6).

Ayrıca her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, 10<sup>-5</sup> M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra, YC-1 (10<sup>-9</sup>-3.10<sup>-5</sup> M) gevşeme yanıtları, ODQ (10<sup>-5</sup> M) varlığında tekrar alındı. Gevşemeler, E<sub>maks</sub> ve pD<sub>2</sub> değerleri üzerinden değerlendirildi. Her iki grupta, antagonist (ODQ) varlığında elde edilen gevşeme yanıtlarını, tek başına YC-1 yanıtlarına göre kontrol grubunda 10<sup>-8</sup> M, deney grubunda 10<sup>-7</sup> M konsantrasyondan başlamak üzere anlamlı olarak azaldığı bulundu (p<0.05). Antagonist varlığında alınan gevşeme yanıtlarında pD<sub>2</sub> değerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı, E<sub>maks</sub> değerindeyse anlamlı bir azalma olduğu saptandı (p<0.05) (Şekil 13) (Tablo 6).

#### **IV.4.e. Sodyum Nitropurussit Gevşeme Yanıtları**

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, 10<sup>-5</sup> M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra, SNP (10<sup>-8</sup>-3.10<sup>-4</sup> M) gevşeme yanıtları kümülatif olarak alındı. Gevşemeler, E<sub>maks</sub> ve pD<sub>2</sub> değerleri üzerinden değerlendirildi. Gevşeme yanıtları her iki grupta da 10<sup>-8</sup> M konsantrasyonda başladı. SNP gevşeme yanıtları açısından iki grup karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (p>0.05), (Şekil 14), (Tablo 6).

#### **IV.4.f. Papaverin Gevşeme Yanıtları**

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, 10<sup>-5</sup> M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra, Papaverin (10<sup>-8</sup>-10<sup>-4</sup> M) gevşeme yanıtları kümülatif olarak alındı. Gevşemeler, E<sub>maks</sub> ve pD<sub>2</sub> değerleri üzerinden değerlendirildi. Papaverin gevşeme yanıtları açısından iki grup karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (p>0.05), (Şekil 15), (Tablo 6).



#### **IV.4.g. Elektriksel Alan Uyarısının Oluşturduğu Gevşeme Yanıtları**

Her iki grupta kobaylardan elde edilen izole trakea preparatları, submaksimal konsantrasyonda  $10^{-5}$  M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra, 60 V 0.5 msn, 64 Hz 'lik frekanslarda toplam 10 sn'lik süre ile uyarılar verilerek gevşeme yanıtları alındı. EAU her iki grupta da gevşeme yanıtı oluşturdu. Deney grubu EAU gevşeme yanıtlarında, kontrol grubu yanıtlarına göre anlamlı olarak azalma meydana geldiği,  $E_{maks}$  değerlerinin de kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı saptandı ( $p<0.05$ ), (Şekil 16), (Tablo 6).

Ayrıca her iki grupta submaksimal konsantrasyonda  $10^{-5}$  M karbakol ile kasıldıktan ve dokular dengeye ulaştıktan sonra EAU verilerek elde edilen gevşeme yanıtları , ortama ilk başta L-NAME ( $3 \times 10^{-5}$  M) , daha sonra da L-Arginin ( $3 \times 10^{-5}$  M) ilave edilerek tekrar alındı. Her iki gruptaki gevşeme yanıtları ortama L-NAME ilave edilmesi ile anlamlı olarak azalırken ( $p<0.05$ ), ortama L-Arginin ilave edilmesi sonucu kontrol ve deney gruplarındaki gevşeme cevapları başlangıç seviyelerine geri döndü (Şekil 17), (Tablo 6).

#### **IV.5. cGMP Düzeylerinin Değerlendirilme Bulguları**

Her iki gruptan alınan trakea preparatı doku örneklerinde cGMP düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. EAU, EAU+L-NAME+L-ARG, Karbakol ( $10^{-5}$  M), NOC-12 ( $10^{-4}$  M), NOR-4 ( $10^{-5}$  M), YC-1 ( $10^{-5}$  M), T-0156 ( $3 \cdot 10^{-5}$  M) uygulanan ve boş (ilaç uygulanmayan doku) trakea preparatlarında cGMP düzeyleri, (pmol/mg) deney gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldı ( $p<0.05$ ), (Tablo 7).

Ayrıca her iki gruptaki doku örneklerinde cGMP düzeyleri, NOC-12, NOR-4 ve YC-1 ilaçları için ODQ, EAU için ise L-NAME varlığında tekrar ölçüldü. Her iki grupta antagonistler (ODQ,L-NAME) varlığında ölçülen cGMP düzeyleri, antagonist yokluğunda ölçülen cGMP düzeylerine göre anlamlı derecede azaldı ( $p<0.05$ ), (Tablo 8).

## TABLolar

**Tablo 4:** Kontrol ve DeneY Guruplarının Alerjik Deri Testi Sonuçları Açısından Karşılaştırılması (aritmetik ortalama ± standart hata)

(Alerjik Deri Testi Sonuçları mm cinsinden hesaplanmıştır)

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

\*' Kontrol gurubundan istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05)

**Tablo 5:** İzole Kobay Trakea Dokularında Maksimum Kasılma (E<sub>maks</sub>) ve pD<sub>2</sub> Değerleri (aritmetik ortalama ± standart hata)

İlaç		Kontrol Grubu (n=10)	DeneY Grubu (n=10)
KCl	Emaks (mg)	1220 ± 126.0	1360 ± 187.0
Karbakol	Emaks (%)	113.8 ± 8,0	120.8 ± 9,0
	pD <sub>2</sub>	6.73 ± 0.07	6.66 ± 0.09

**Tablo 6:** İzole Kobay Trakea Preparatlarında Maksimum Gevşeme ( $E_{maks}$ ) ve  $pD_2$  Değerleri (aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata)

İlaç		Kontrol Grubu (n=10)	Deney Grubu (n=10)
NOC-12	Emaks (%)	68.9 $\pm$ 6.4	30.6 $\pm$ 2.8 *
	$pD_2$	5.54 $\pm$ 0.06	5.20 $\pm$ 0.08
ODQ+NOC-12	Emaks (%)	34.6 $\pm$ 3.6 <sup>▲</sup>	14.6 $\pm$ 2.7 <sup>▲</sup>
	$pD_2$	5.44 $\pm$ 0.04	4.95 $\pm$ 0.03
NOR-4	Emaks (%)	62.8 $\pm$ 5.8	24.6 $\pm$ 3.9 *
	$pD_2$	5.50 $\pm$ 0.06	5.10 $\pm$ 0.08
ODQ+NOR-4	Emaks (%)	31.6 $\pm$ 4.1 <sup>▲</sup>	15.6 $\pm$ 2.8 <sup>▲</sup>
	$pD_2$	5.52 $\pm$ 0.09	5.12 $\pm$ 0.07
T-0156	Emaks (%)	65.2 $\pm$ 3.9	35.3 $\pm$ 4.7 *
	$pD_2$	6.14 $\pm$ 0.08	6.20 $\pm$ 0.06
YC-1	Emaks (%)	73.5 $\pm$ 5.2	35.2 $\pm$ 4.9 *
	$pD_2$	6.53 $\pm$ 0.05	6.15 $\pm$ 0.11
ODQ+YC-1	Emaks (%)	36.6 $\pm$ 4.3 <sup>▲</sup>	15.3 $\pm$ 2.1 <sup>▲</sup>
	$pD_2$	6.37 $\pm$ 0.10	6.12 $\pm$ 0.07
EAU	Emaks (%)	42.8 $\pm$ 4.5	26.2 $\pm$ 4.2 *
L-NAME +EAU	Emaks (%)	26.6 $\pm$ 3.9 <sup>•</sup>	12.2 $\pm$ 2.1 <sup>•</sup>
L-NAME+EAU+L-ARG	Emaks (%)	38.4 $\pm$ 3.4	24 $\pm$ 2.6
SNP	Emaks (%)	79.4 $\pm$ 6.7	71.2 $\pm$ 5.9
	$pD_2$	5.27 $\pm$ 0.09	5.10 $\pm$ 0.08
PAPAVERİN	Emaks (%)	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
	$pD_2$	5.33 $\pm$ 0.07	5.03 $\pm$ 0.06

\* , Kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05)

▲ , Her iki grupta antagonistin (ODQ) kullanılmadığı duruma göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05)

• , Her iki grupta antagonistin (L-NAME) kullanılmadığı duruma göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05)

**Tablo 7:** Kontrol ve Deney Guruplarının cGMP Düzeyleri Açısından Karşılaştırılması (aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata)

İL AÇ	Kontrol Grubu (n=10) pmol/mg protein	Deney Grubu (n=10) pmol/mg protein
BOŞ	103.36 $\pm$ 29.26	73.09 $\pm$ 7.33*
KARBAKOL	109.53 $\pm$ 25.50	86.97 $\pm$ 23.12*
NOC-12	217.11 $\pm$ 30.41	154.04 $\pm$ 21.08*
NOR-4	208.28 $\pm$ 34.90	121.17 $\pm$ 8.01*
YC-1	197.62 $\pm$ 21.83	92.25 $\pm$ 10.11*
T-0156	160.20 $\pm$ 44.33	84.69 $\pm$ 22.53*
EAU	132.75 $\pm$ 24.73	82.96 $\pm$ 6.22*
L-NAME+EAU+ L-ARG	126.11 $\pm$ 12.43	75.67 $\pm$ 8.34*

\*, Kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05)

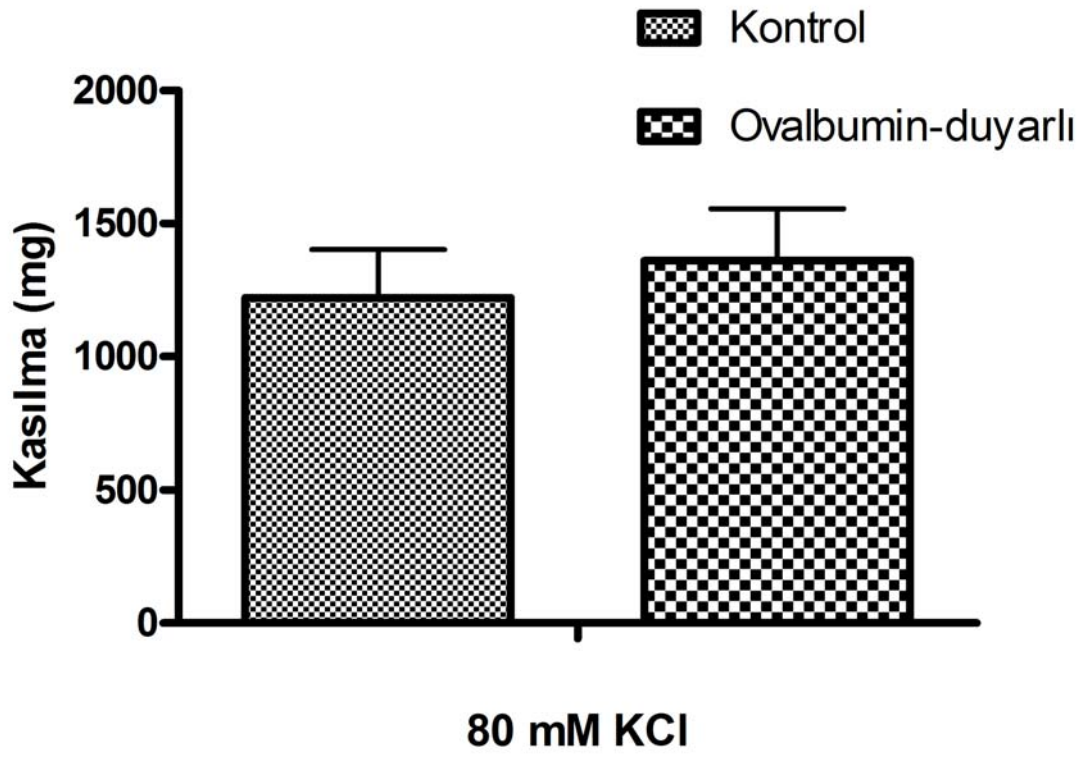
**Tablo 8:** Gurupların Kendi İçinde cGMP Düzeyleri Açısından Karşılaştırılması (aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata)

İL AÇ	Kontrol Grubu (n=10) pmol/mg protein	Deney Grubu (n=10) pmol/mg protein
NOC-12	217.11 $\pm$ 50.41	154.04 $\pm$ 101.58
ODQ+NOC-12	121.43 $\pm$ 7.39 *	73.08 $\pm$ 13.89 *
NOR-4	208.28 $\pm$ 34.90	121.17 $\pm$ 8.01
ODQ+NOR-4	123.38 $\pm$ 10.03*	63.30 $\pm$ 15.95 *
YC-1	197.62 $\pm$ 21.83	92.25 $\pm$ 10.11
ODQ+YC-1	108.17 $\pm$ 9.51 *	43.98 $\pm$ 7.36 *
EAU	132.75 $\pm$ 24.73	82.96 $\pm$ 6.22
L-NAME +EAU	97.37 $\pm$ 17.28 **	41.26 $\pm$ 3.58 **

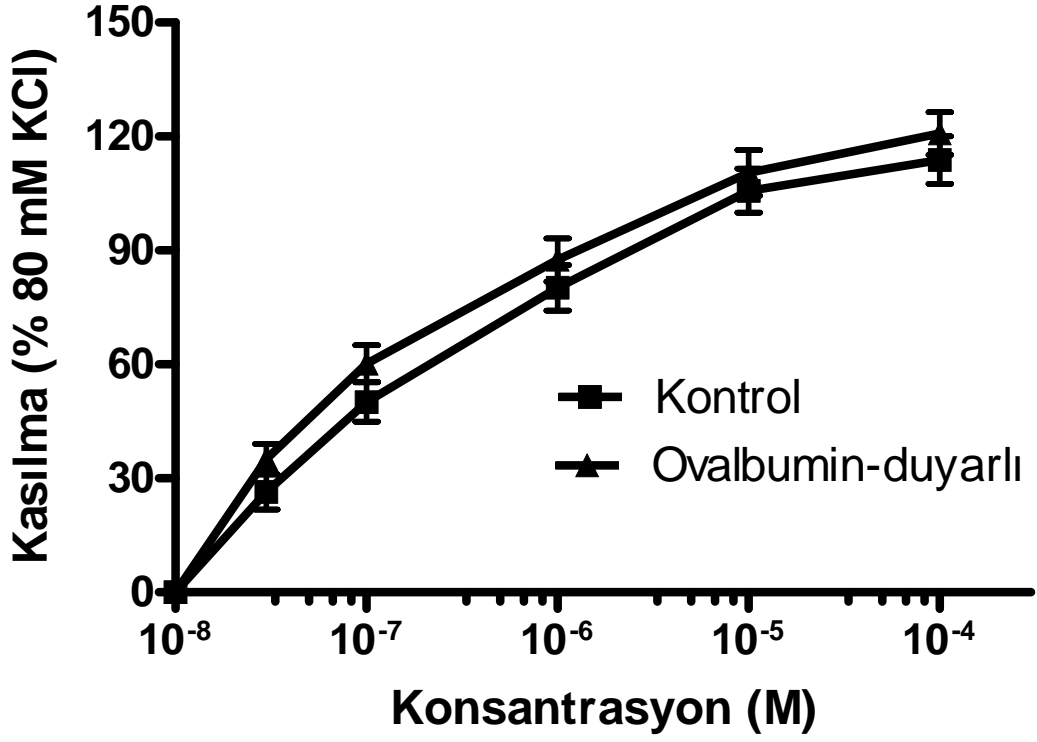
\*, Her iki grupta ODQ'nun kullanılmadığı duruma göre anlamlıdır (p<0.05)

\*\* , Her iki grupta L-NAME'in kullanılmadığı duruma göre anlamlıdır (p<0.05)

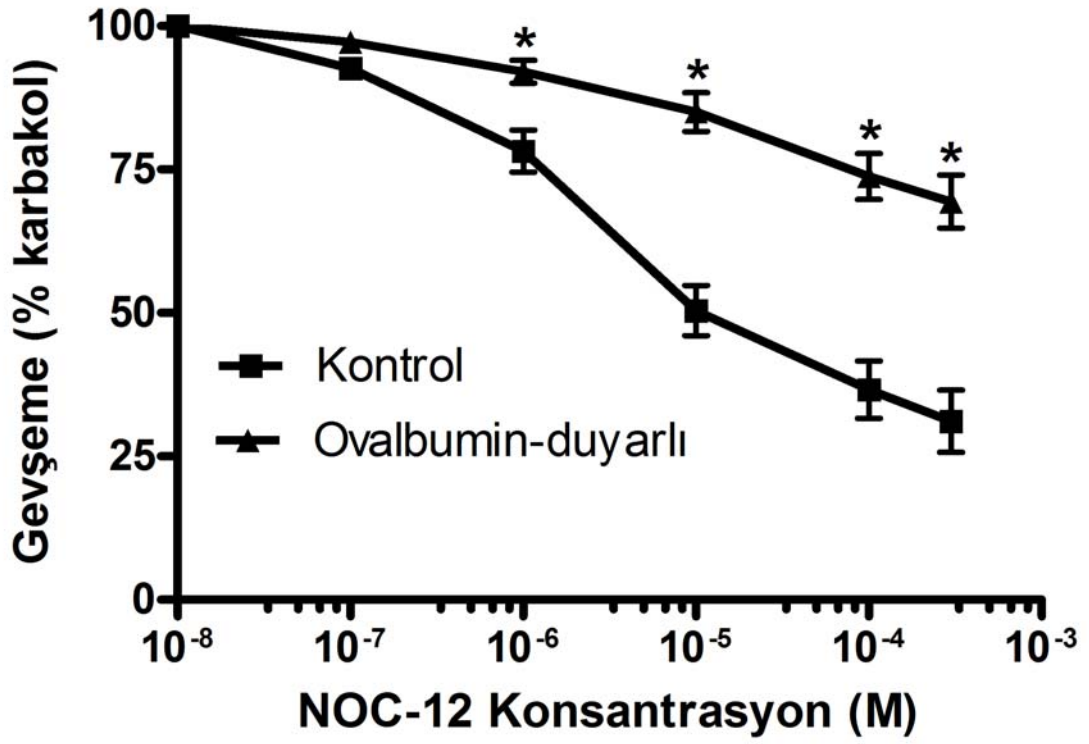
## ŞEKİLLER



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

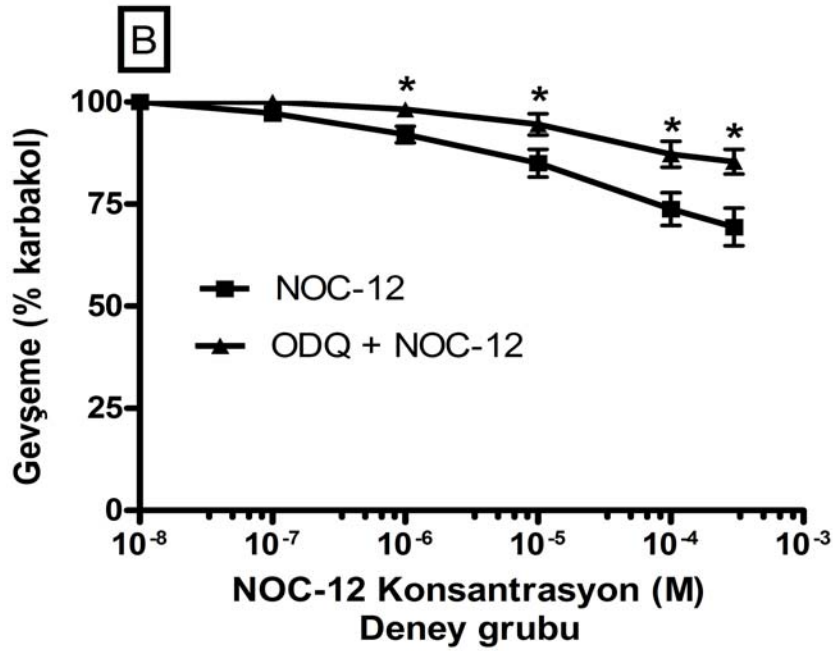
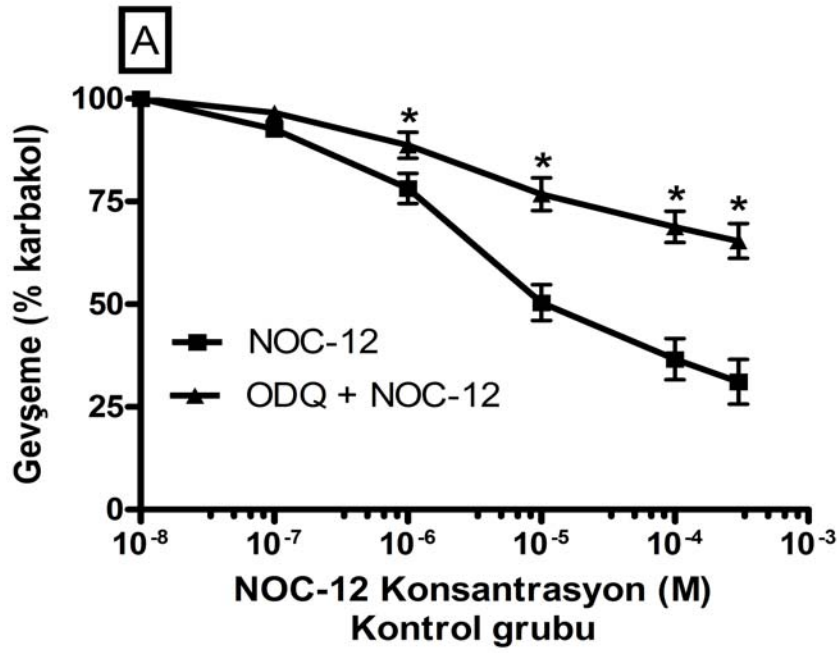


Şekil 6: Kontrol ve ovalbumin duyarlı deney grubundaki izole kobay trakea preparatlarında karbakol konsantrasyon yanıt eğrileri (n=10)



Şekil 7: 10<sup>-5</sup> M Karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında NOC-12 konsantrasyon yanıt eğrileri (n=10).

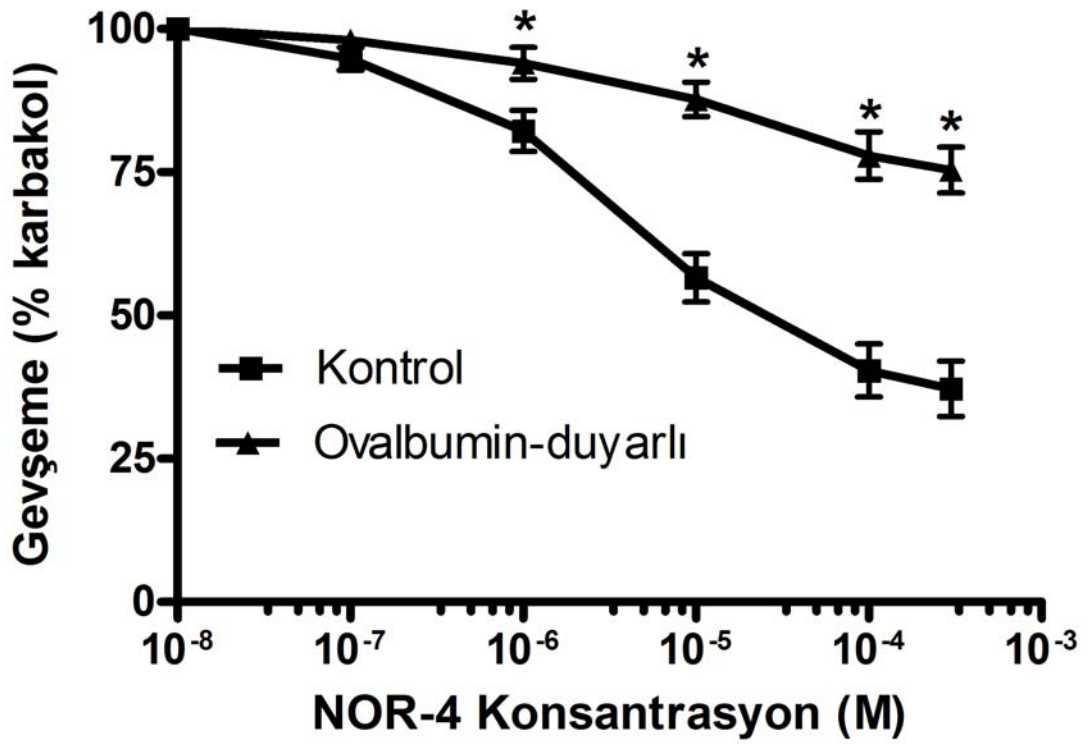
\*, Kontrol grubuna göre p<0.05



**Şekil 8:** 10<sup>-5</sup> M Karbakol ile kastırılmış kontrol (A) ve ovalbumin duyarlı (B) izole kobay trakea preparatlarında ODQ (10<sup>-5</sup> M) varlığında NOC-12 konsantrasyon yanıt eğrileri (n=10).

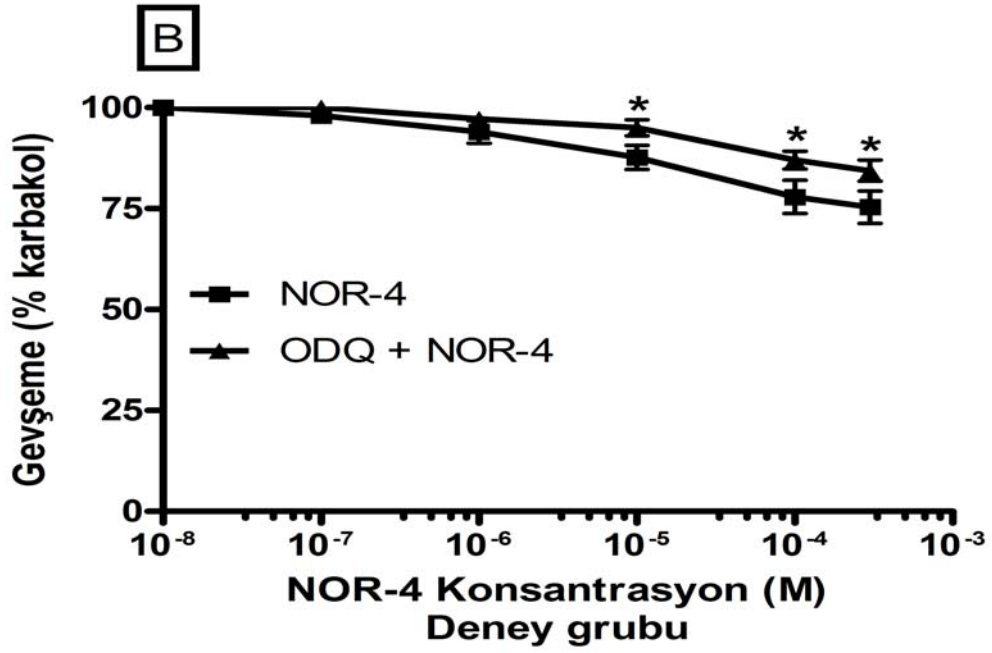
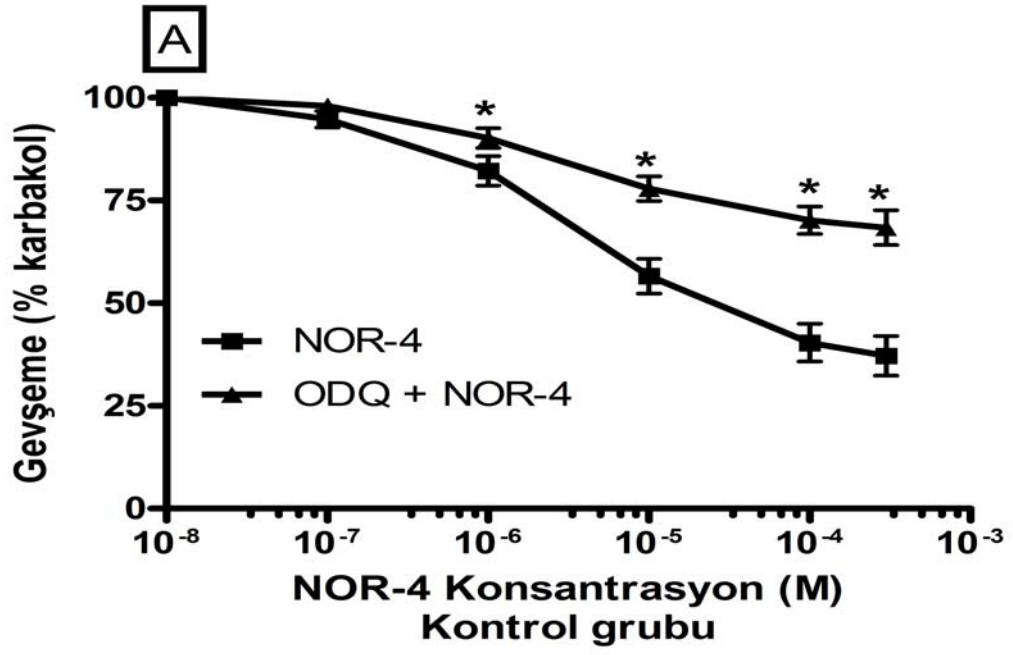
\*, ODQ ilave edilmemiş duruma göre p<0.05





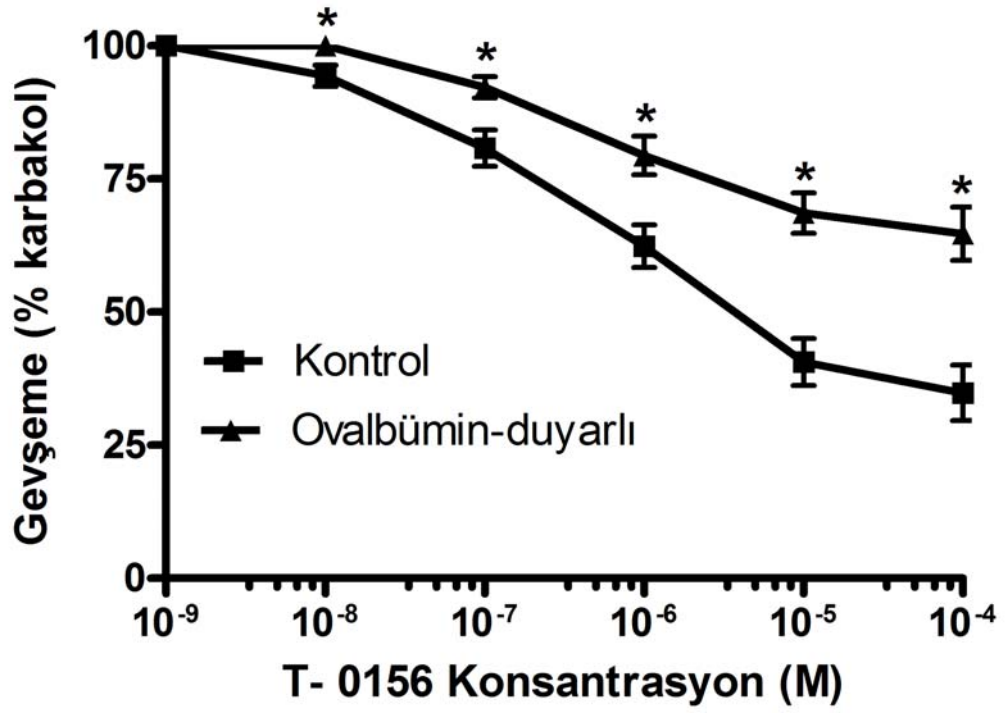
**Şekil 9:** 10<sup>-5</sup> M Karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında NOR-4 konsantrasyon yanıt eğrileri (n=10).

\*, Kontrol grubuna göre p<0.05



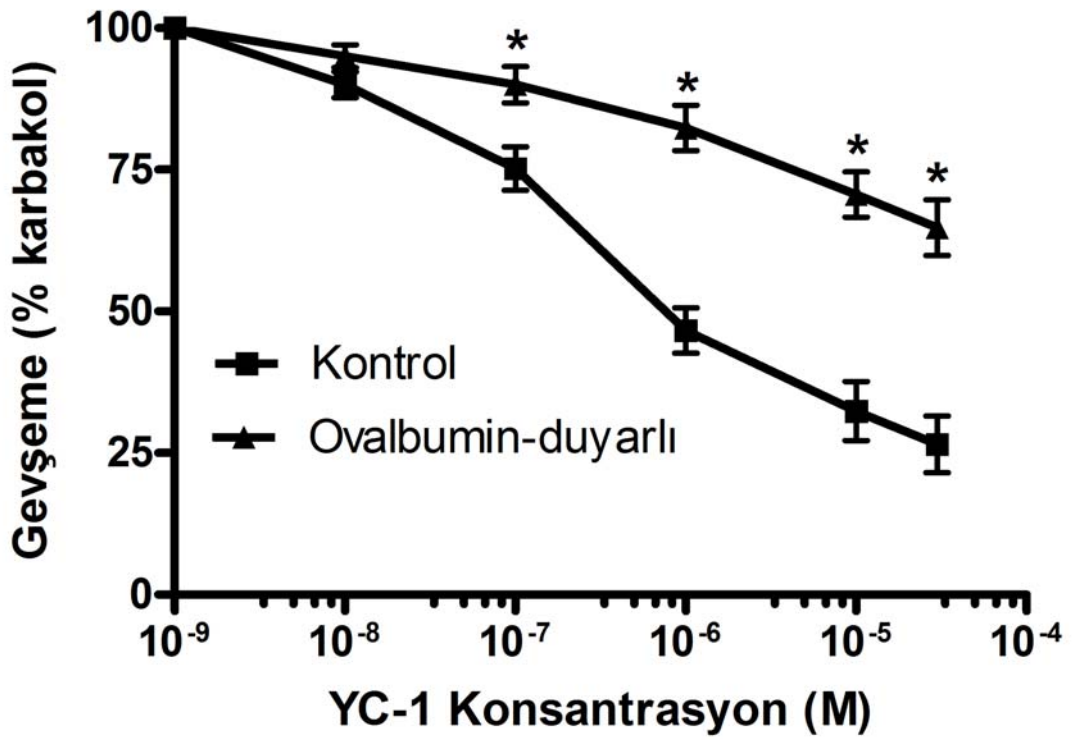
**Şekil 10:**  $10^{-5}$  M Karbakol ile kastırılmış kontrol (A) ve ovalbumin duyarlı (B) izole kobay trakea preparatlarında ODQ ( $10^{-5}$  M) varlığında NOR-4 konsantrasyon yanıt eğrileri (n=10).

\*, ODQ ilave edilmemiş duruma göre  $p < 0.05$ .



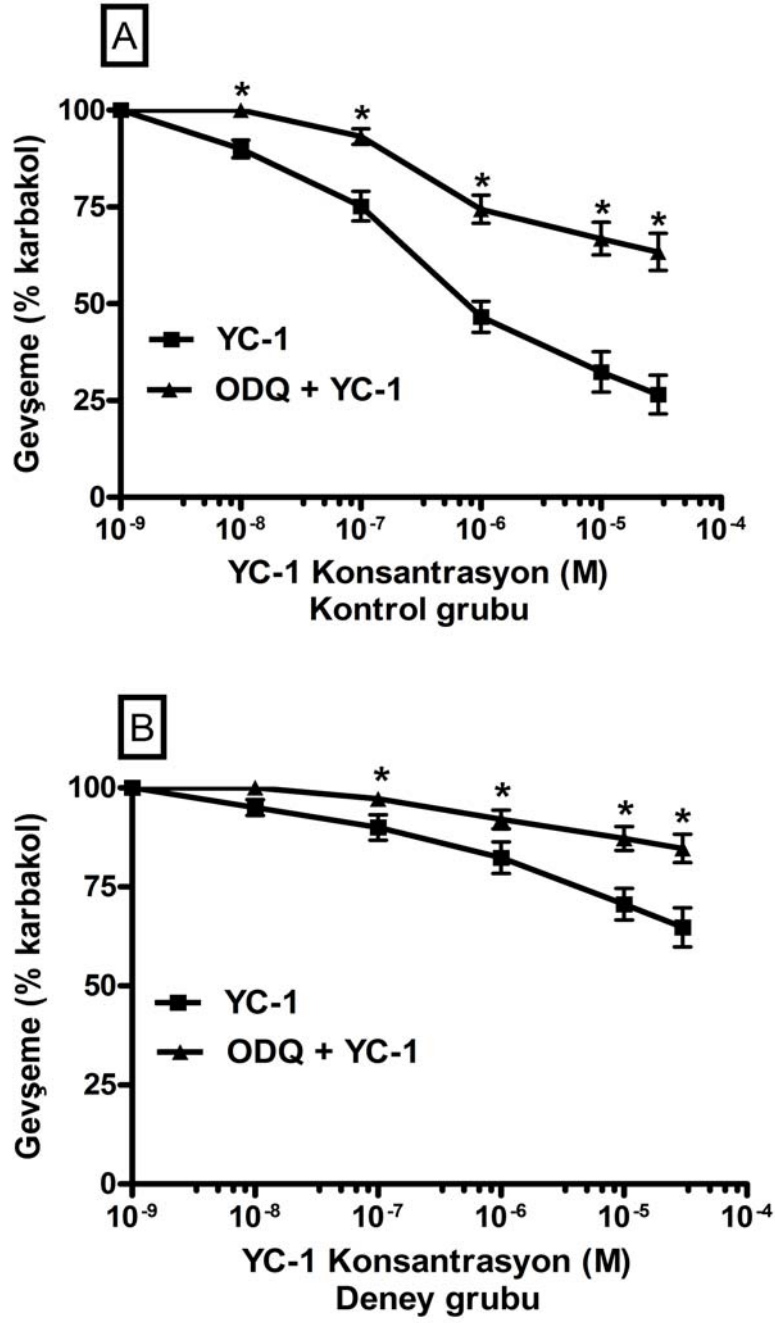
**Şekil 11:**  $10^{-5}$  M Karbakol ile kastrılmış izole kobay trakea preparatlarında T-0156 konsantrasyon yanıt eğrileri (n=10).

\*, Kontrol grubuna göre  $p < 0.05$



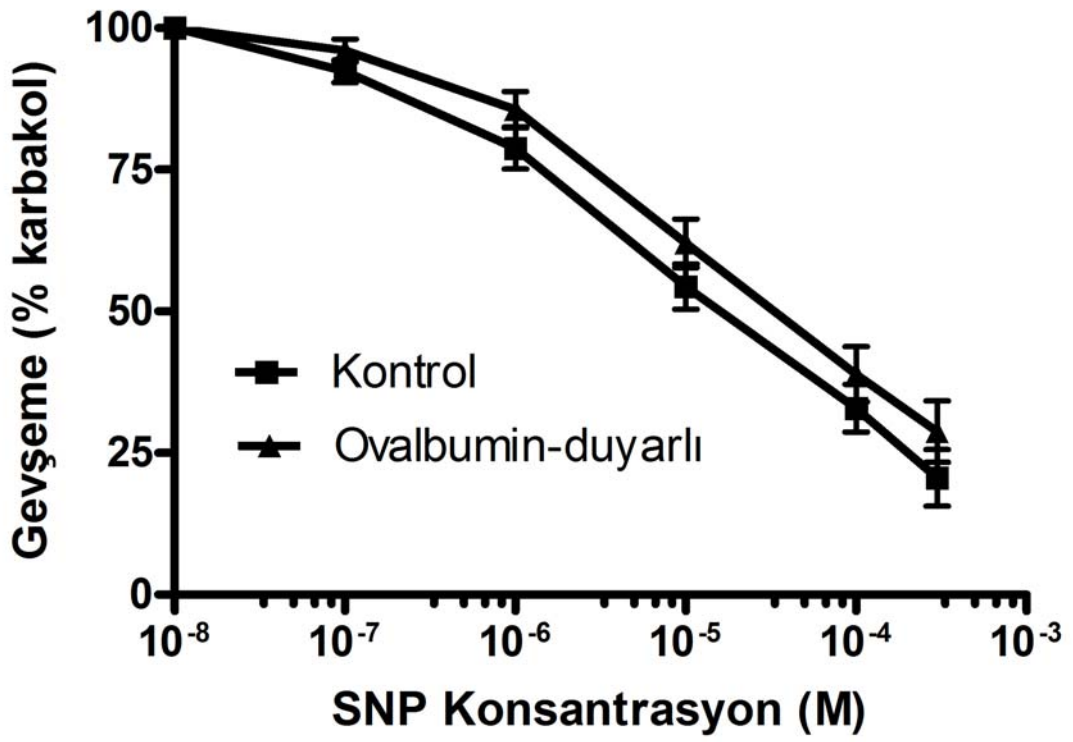
Şekil 12:  $10^{-5}$  M Karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında YC-1 konsantrasyon yanıt eğrileri (n=10).

\*, Kontrol grubuna göre  $p < 0.05$

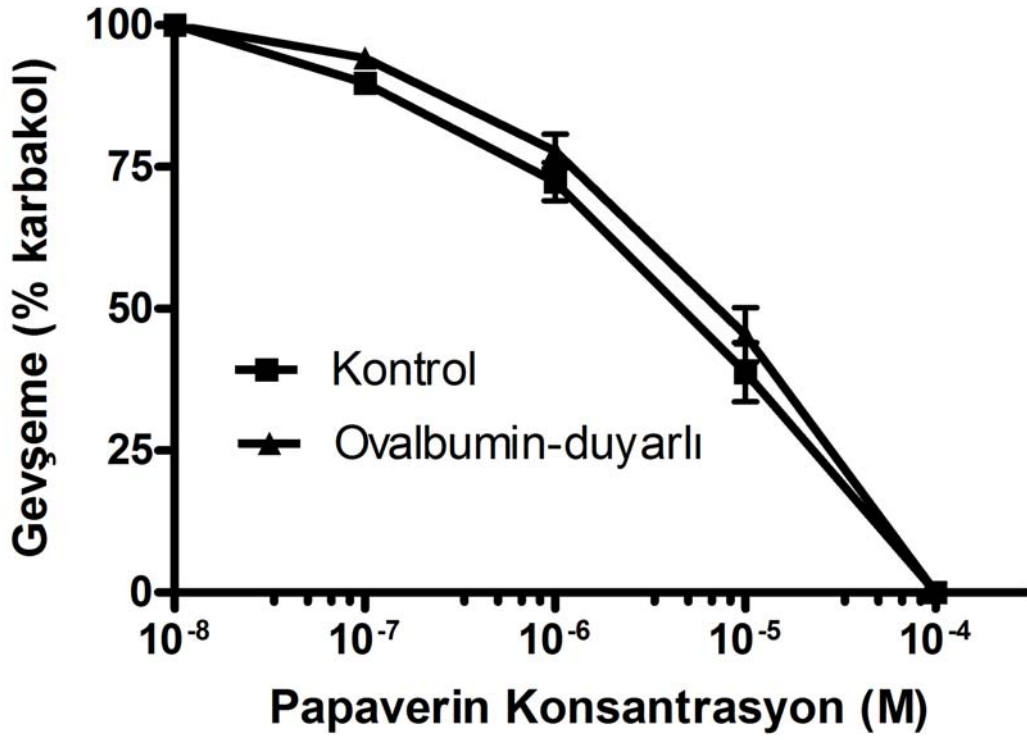


**Şekil 13:**  $10^{-5}$  M Karbakol ile kastrılmış kontrol (A) ve ovalbumin duyarlı (B) izole kobay trakea preparatlarında ODQ ( $10^{-5}$  M) varlığında YC-1 konsantrasyon yanıt eğrileri (n=10).

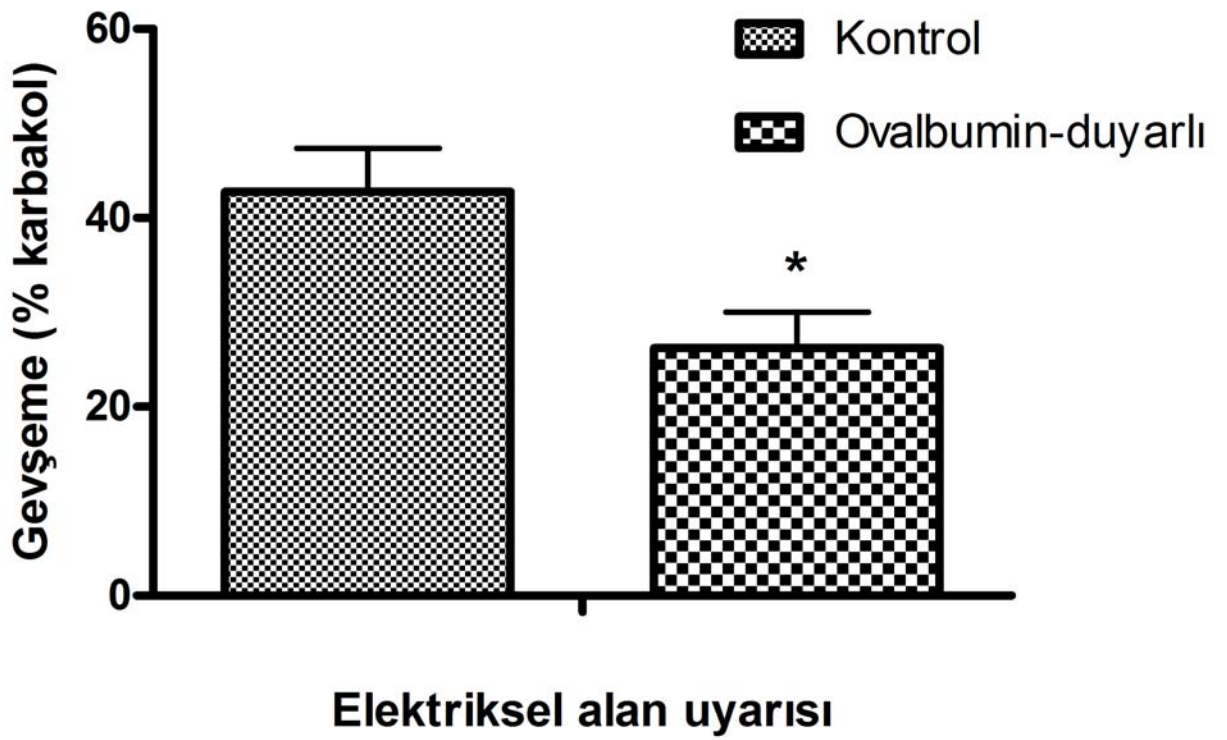
\*, ODQ ilave edilmemiş duruma göre  $p < 0.05$



Şekil 14:  $10^{-5}$  M Karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında SNP konsantrasyon yanıt eğrileri (n=10).



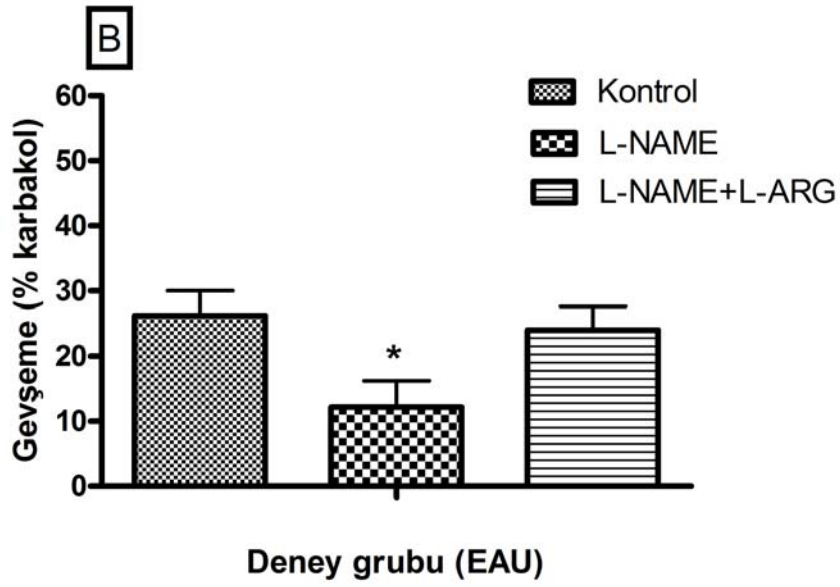
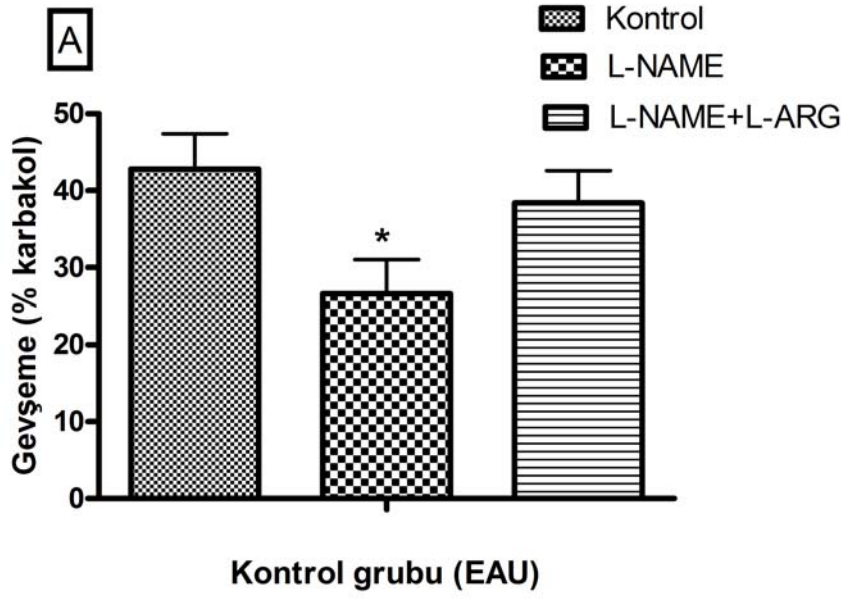
Şekil 15:  $10^{-5}$  M Karbakol ile kastrılmış izole kobay trakea preparatlarında Papaverin konsantrasyon yanıt eğrileri (n=10).



Şekil 16:  $10^{-5}$  M Karbakol ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında EAU ile oluşan gevşeme yanıtları (n=10).

\*, Kontrol gurubuna göre  $p < 0.05$

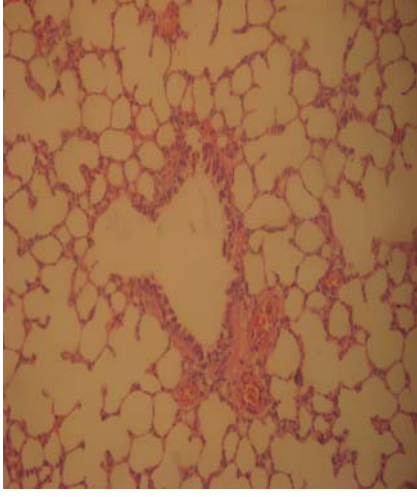




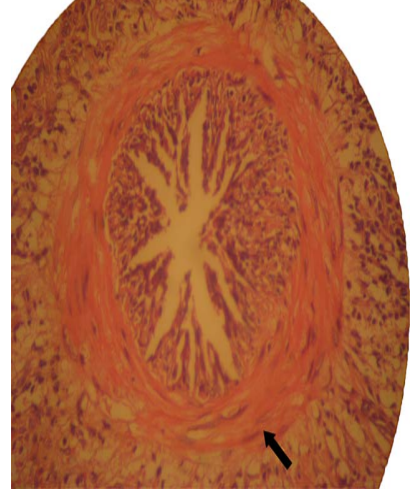
**Şekil 17:**  $10^{-5}$  M Karbakol ile kastrılmış kontrol (A) ve ovalbumin duyarlı (B) izole kobay trakea preparatlarında, L-NAME ( $3 \times 10^{-5}$  M) ve L-Arginin ( $3 \times 10^{-5}$  M) varlığında elde edilen gevşeme yanıtları.

\*, Kontrol gurubuna göre  $p < 0.05$

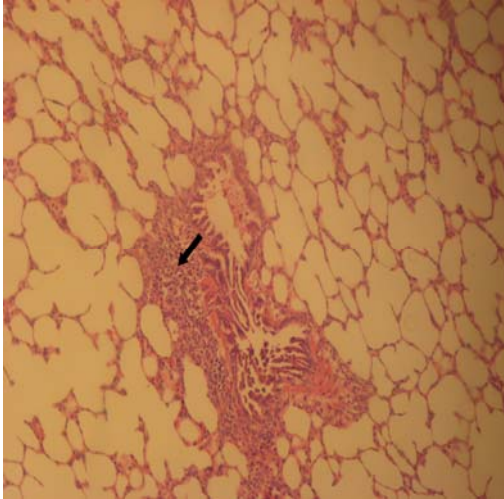
## RESİMLER



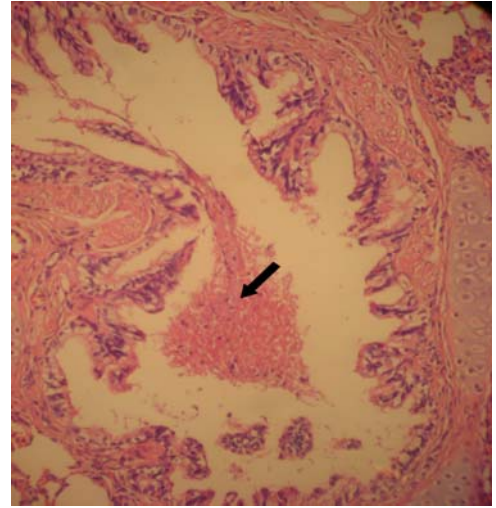
**Resim 1:** Kontrol gurubunda normal - bronşiyol yapısı (H-E;x25)



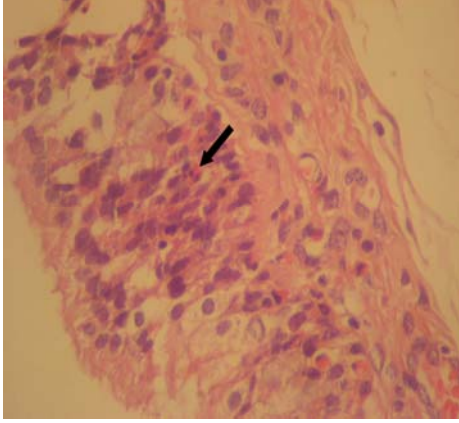
**Resim 2:** Deney gurubunda bronş duvarında düzkas hipertrofisi (H-E;x50)



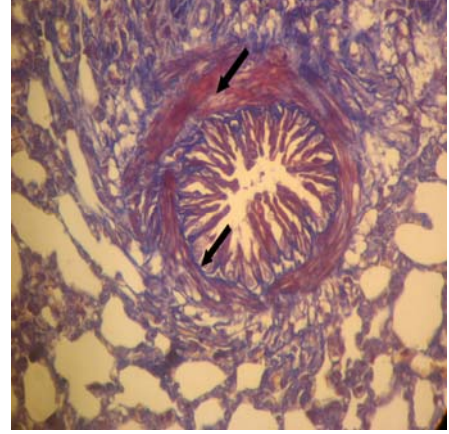
**Resim3:** Deney gurubunda peribronşiyal-iltihabi hücre infiltrasyonu ve mukus (H-E;x25)



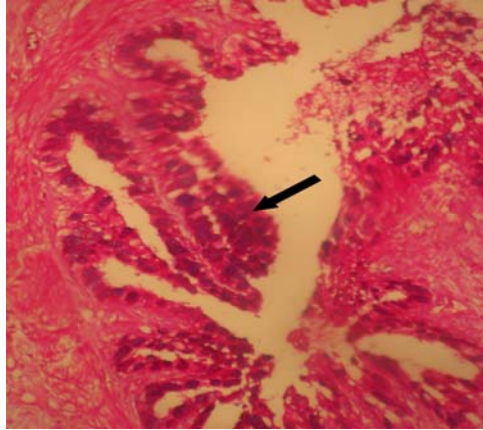
**Resim4:** Deney gurubunda bronş lümenin de mukus artışı (H-E;x50)



**Resim 5:** Deney gurubunda bronş duvarında eozinofil-lökosit infiltrasyonu  
(H-E;x100)



**Resim 6:** Deney gurubunda bronşiyol duvarında düz kas hipertrofisi ve subepitelyal minimal kollagen artışı  
(Mason-Trikrom ; x 50)



**Resim 7:** Deney gurubunda bronş duvarında izlenen goblet hücre hiperplazisi  
( PAS-Alcien Blue ; x 50)

## BÖLÜM V

### TARTIŞMA VE SONUÇ

Astım; kronik hava yolu inflamasyonu ile oluşan bronş hiperreaktivitesi ve nöbetler şeklinde öksürük, dispne, hışıltılı/hırıltılı solunum, göğüste sıkışma yakınmaları ile seyreden, yaygın, değişken, genellikle geri dönüşlü havayolu obstrüksiyonu olarak tanımlanır (1).

Kişide varolan bir genetik yatkınlığa, çevresel faktörlerin de katkısıyla ortaya çıkan bozulmuş immünoregülasyon ile dengesiz nöral kontrol ve/veya uyarılmış non-immünolojik non-nöral yol ile oluşan kronik inflamasyon, astımın patogenezinin temelini oluşturmaktadır (12). Sonuç olarak astımda, kronik inflamasyon, bronş aşırı duyarlılığı ve yaygın, geri dönüşlü hava yolu obstrüksiyonu görülmektedir.

NO solunum sisteminde; epitel hücresi, solunum yolu sinirleri, inflamatuvar hücreler (makrofajlar, nötrofiller, mast hücreleri), damar endoteli, düz kas hücreleri, Tip II alveolar hücrelerde NOS enzimiyle sentezlenmektedir. NO'nun, solunum sisteminde solunum yolları tonusunu, bronşiyal sirkülasyonu, mukus ve elektrolit sirkülasyonunu ve hava yolları nöronal aktivitesini düzenlediği belirtilmektedir (31).

Solunum havasında, bronkoskopik lavaj ve indüklenmiş balgam örneklerinde NO ve metabolitlerinin saptanmış olması, NO'nun hava yollarında sentezlendiğini gösteren bulgulardır (43). NOS immunoreaktivitesi gösteren sinirlerin solunum yollarının damarlarında, düz kas hücrelerinde ve lamina propriada bulunduğu belirtilmektedir (4). Astımlılarda solunum havasında NO seviyesinin arttığı ve NO ölçümünün inflamatuvar süreci tespit için non-invasif bir yöntem olarak kullanılabilmesi belirtilmektedir (7). 300 milyon kişiyi etkilediği tahmin edilen ve dünya çapında bir sorun haline gelen astımın, kontrol altına alınmasının maliyeti yüksek görünmesine rağmen, hastalığın doğru tedavi edilmemesinin bunu daha da artıracığı ifade edilmektedir (2).

NO, nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi aracılığı ile L-Argininden sentezlenir. NOS enziminin 2 izoformu bulunduğu belirtilmektedir. Bunlardan ilki cNOS [constitutive (yapısal) NOS]'dur. Hücrelerde yapısal olarak bazal düzeyde bulunmaktadır. cNOS ile oluşan NO guanil siklazı aktive ederek fizyolojik olayları regüle eder. cNOS'un, endotelde bulunan eNOS ve nöronlarda bulunan nNOS (nöronal NOS) alt tipleri vardır ve kortikosteroidlerden etkilenmediği ifade edilmektedir. Yapısal NOS'un sentez süresi

kısa, üretilen NO miktarı düşük, fakat süreklidir. İkinci NOS izoformu ise iNOS [inducible (indüklenebilir) NOS]'dur. iNOS bazı uyarılardan ( $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ , IL-1, endotoksin gibi) sonra aktivasyon kazanır ve bol miktarda üretilirler. Kortikosteroidlerle iNOS'a bağılı NO yapımının azaltılabileceğı belirtilmektedir (5).

Hava yollarında, kolinerjik,  $\alpha$ -adrenerjik, eksitatör nonadrenerjik nonkolinerjik (eNANK) olmak üzere bronkokonstrüksiyona neden olan üç nöral sistem bulunmaktadır. Bronkodilatasyona yol açan mekanizmaların ise  $\beta$ -adrenerjik ve inhibitör nonadrenerjik nonkolinerjik (iNANK) sistemler olduğı belirtilmektedir. Proksimal hava yollarında ağırlıklı olarak iNANK nöral sisteminin aktif olarak mevcut olduğı ve bu sistemin insan hava yollarındaki tek endojen bronkodilatör sistem olduğı ileri sürülmektedir (3). Bazı çalışmalar NO'nun iNANK'in nörotransmiteri olarak davrandığını ve bu şekilde de gevşeme olayına katkıda bulunduğunu bildirmektedir (4).

Asetilkolin kolinerjik, noradrenalin  $\alpha$ -adrenerjik, nörokinin ise eNANK nöral sistemleri üzerinden hava yollarında bronkokonstrüksiyon meydana getirirler. Astımda özellikle eksitatör sistemin hakimiyeti ile bronkomotor tonus üzerinden kasılma olduğı, hava yolu sekresyonunda artış, bronşiyal dolaşımda vazodilatasyon, inflamatuvar hücrelerde tetikleyici etkiler meydana geldiğı belirtilmiştir (12).

NO'nun solunum sistemindeki ve astım gibi bazı solunum sistemi rahatsızlıklarındaki etkisini araştırmaya yönelik in vivo/in vitro çeşitli deneyler yapılmıştır. Bu çalışmalardan birinde anestezi altındaki kobaylarda metakolin ile sağlanan bronkokonstrüksiyonun inhale edilen NO ile konsantrasyona-bağımlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (45). Başka bir çalışmada Akira Koarai ve arkadaşları (2000), farelerde iNOS'a yüksek derecede spesifik bir inhibitör olan 1400W kod isimli maddeyle tedavi sonrasında solunum yollarındaki aşırı duyarlılığın tamamen ortadan kalktığını ve eozinofil infiltrasyonun da daha az olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgular ışığında iNOS'a bağılı olarak oluşan NO'nun solunum yollarındaki aşırı duyarlılıktan ve eozinofil infiltrasyonundan sorumlu olduğunu ve selektif iNOS inhibitörleriyle tedavinin astımda faydalı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (58).

Biz bu çalışmada ovalbuminle duyarlaştırılarak astım oluşturulan kobaylardan izole edilen trakea preparatlarında in vitro olarak NO/cGMP yolağını ve bu yolağa etkileyen ilaçları araştırdık.

Astım için geliştirilen hayvan modelleri hastalığın etiyojisi ve patolojisinin açıklanması açısından önemli bir değer taşımaktadır. Hayvanlarda ovalbumin uygulanmasıyla duyarlı hale getirerek oluşturulan astım, son yıllarda kullanılan modellerin başında gelir (56). Bu modelde kobaylara artan dozlarda ovalbumin intradermal olarak verildikten 60 dakika sonra oluşan kızarıklığın çapı ölçülerek hayvanların duyarlı hale gelip gelmediği saptanır.

Bu çalışmada kontrol grubunda ovalbumine kızarıklık yanıtı oluşmazken, deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde cevap oluştu. Her iki grupta da salin injeksiyonuna yanıt oluşmadı. Bu sonuçlar, çalışmamızda kullandığımız deney grubundaki kobayların ovalbuminle duyarlı hale getirildiğini ve deneysel astım oluşturulduğunu göstermektedir.

Ovalbuminle duyarlı hale getirdiğimiz kobay bronşiyal dokularında gözlenen patolojik bulgular da bu hayvanlarda astım oluştuğunu desteklemektedir.

Çalışmamızda KCl hem kontrol hem de deney grubundaki trakea düz kas preparatlarında kasılmalar oluşturmuş ve bu kasılmalar arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır. KCl reseptör aracısız kasılma yapar ve düz kasların kasılma fonksiyonlarını değerlendirmek için kullanılır. Yüksek konsantrasyonda KCl, 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.

Araştırmamızda karbakol, hem kontrol hem de deney grubunda kasılmalar oluşturdu. Karbakolun oluşturduğu kasılma yanıtlarında ovalbümin duyarlı grupta, kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Karbakol, hem muskarinik hem de nikotinik özellik gösteren asetilkolinesteraz enzimine dayanıklı bir ilaçtır. Karbakol trakea düz kasında bulunan muskarinik reseptörleri uyararak inozitol trifosfat ve diaçilgliserol üzerinden hücre içi kalsiyum düzeyini artırmak suretiyle düz kasta kasılma oluşturur. Cevit ve arkadaşlarının (2007), ovalbumin duyarlı ve kontrol grubu kobay trakealarındaki karbakol kasılma yanıtları arasında anlamlı bir fark bulamamış olmaları da bizim bulgularımızı destekler nitelikteydi (56).

Çalışmamızda karbakol kasılma yanıtlarının deney grubunda, kontrol grubuna göre değişiklik göstermemesi, ovalbuminle duyarlı hale getirilmiş kobaylarda muskarinik reseptör aracılığı ile oluşan yanıtların bozulmadığını düşündürmektedir.

Karbakol ile kasılmış izole kobay trakea preparatlarında sodyum nitroprussiyat (SNP) ile olan gevşeme yanıtlarında her iki grupta da anlamlı bir fark bulunamamıştır. SNP, vücutta NO ve CN (siyanür iyonu) salınımına yol açmaktadır. Hipertansif krizlerde kullanılan güçlü bir parenteral gevşetici olan SNP'nin hem arterleri hem de venülleri dilate ettiği, aynı zamanda damar dışı düz kasları da gevşettiği ifade edilmektedir. Gevşetici etkisinde potasyum kanallarını açmak, membranda elektrojenik  $Na^+$  pompasını aktive etmek suretiyle hiperpolarizasyon yapmak ve reseptör bağımlı  $Ca^{+2}$  kanallarından  $Ca^{+2}$  girişini inhibe etmek gibi birçok mekanizma rol oynamaktadır. Ayrıca hücre içine geçtikten sonra NO salınımı yaparak guanilat siklaz-cGMP sistemini aktive etmektedir (59). Çalışmamızda SNP gevşeme yanıtlarının değişmemiş olması SNP'nin izole kobay trakea düz kasında yaptığı gevşemelerde birden fazla mekanizma kullanıyor olmasına bağlı olabilir.

Çalışmamızda papaverin, hem kontrol hem de deney grubunda gevşemeler oluşturdu. Ovalbümin duyarlı grupta papaverinin oluşturduğu gevşeme yanıtlarında, kontrol grubundaki yanıtlara göre 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. Ayrıca papaverin endojen adenozinin uptake'ini bloke ederek onun vazodilatör etkinliğini artırır. Papaverinin oluşturduğu gevşemeler reseptörden bağımsız gevşemelerdir ve düz kasların gevşeme fonksiyonunu test etmek için sıklıkla kullanılır (60). Papaverin gevşeme yanıtlarının deney grubunda, kontrol grubuna göre değişiklik göstermemesi, ovalbuminle duyarlı hale getirilmiş kobaylarda düz kasın reseptöre bağlı olmayan gevşeme özelliğinin bozulmadığını göstermektedir.

NO, guanilat siklaz enzim aktivasyonu ile cGMP artışı yaparak ve dolaylı yoldan da hava yollarında bronkodilatasyondan sorumlu olan iNANK sisteminin nöromediatörü olarak görev yapmaktadır (3). Gruetter ve arkadaşları (1989) nitrovazodilatörlerin sığır izole solunum yolu düz kasında guanilat siklazı aktive ederek ve cGMP düzeylerini artırarak gevşeme oluşturduğunu göstermişlerdir (61).

Astımlı hastalarda hava yollarında iNOS enzim salınımının ve buna bağlı NO miktarının arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir (47). Miktarı artan NO'nun, cNOS'un inhibisyonuna ve guanil siklazın desensitizasyonuna neden olup, bronkodilatör yanıtı ortadan kaldırdığı belirtilmektedir (12). 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 (49). 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 (50). Hwang T-L ve arkadaşları (1999), bir guanilat siklaz enzim aktivatörü olan YC-1'in eksojen ve endojen NO'nun kobay trakeasındaki gevşetici etkisini cGMP düzeylerini artırarak potansiyalize ettiğini iddia etmişlerdir. Aynı çalışmada YC-1 ile SNP gevşeme cevaplarını solubl guanilat siklaz inhibitörü olan ODQ'nun geriye döndürdüğünü belirtmişlerdir (62).

Fosfodiesteraz-5, cGMP yıkımını sağlayan bir enzimdir ve inhibisyonu dokuda cGMP artışına neden olmaktadır. Hücre içi cGMP düzeylerini sentezde guanilat siklaz, yıkımda ise fosfodiesteraz enzimleri belirlemektedir (53). PDE'nin selektif inhibitörleri son yıllarda klinikte bir çok alanda kullanılmaktadır. Fosfodiesteraz enziminin değişik izoenzimlerinin varlığının saptanması ve PDE<sub>4</sub>'ün solunum yolu inflamasyonlarındaki rolünün ve öneminin anlaşılması ile teofilinden daha güçlü, daha az yan etkili selektif fosfodiesteraz inhibitörlerinin sentezine odaklanılmıştır. (54). Tuncel ve arkadaşları (2004), in vitro araştırmalarında kobay trakealarında cGMP-spesifik tip 5-fosfodiesteraz inhibitörü zaprinastın, EAU ile sağlanan NANK gevşeme cevaplarını ve NO donörleri SIN-1, SNP gevşeme cevaplarını artırdığını göstermişlerdir. Elde ettikleri bulgulara göre NO'nun, non adrenerjik-non kolinerjik (NANK) cevaba bağlı gevşeme cevaplarında bir mediatör olabileceğini ve fosfodiesteraz-5 inhibisyonunun NO aracılı gevşeme cevaplarını artırabileceğini iddia etmişlerdir (51).

Biz bu çalışmada NO/cGMP yolağını etkileyen nitrik oksit donörleri NOC-12 ve NOR-4, guanilat siklaz enzim aktivatörü YC-1, fosfodiesteraz 5 (PDE<sub>5</sub>) enzim inhibitörü T-0156 maddeleriyle karbakol ile önceden kastırılmış olan kobay trakea



dokularında konsantrasyona baēlı gevşeme cevapları aldık. Bu maddeler ile oluşan gevşeme yanıtlarının tümünü ovalbumin duyarlı deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmış olarak bulduk. Ayrıca her iki grupta nitrik oksit donörleri ve YC-1 maddesi gevşeme yanıtlarını, bir guanilat siklaz enzim inhibitörü olan ODQ varlığında tekrar aldık. Her iki grupta da antagonist varlığında elde edilen gevşeme yanıtlarını, maddelerin yalnız kullanıldığı duruma göre anlamlı derecede azalmış olarak bulduk.

Her iki grupta ODQ'nun nitrik oksit donörleri (NOC-12 ve NOR-4) ve YC-1 ile oluşan gevşemeleri azaltmış olması, bu maddelerin guanilat siklaz aktivasyonu üzerinden cGMP artışıyla gevşeme yaptıkları bilgisini desteklemektedir. Nitrik oksit donörleri ve YC-1 maddesi ile elde ettiğimiz gevşeme yanıtlarının deney grubunda azalmış olması, astımda enflamasyona baēlı olarak artmış iNOS aktivasyonu sonucunda oluşan fazla miktardaki NO'nun, guanilat siklaz enzimi miktar ve/veya aktivitesinde meydana getirdiēi azalmaya ve sonuçta yeterli miktarda cGMP oluşmamasına baēlı olabilir.

Çalışmamızda fosfodiesteraz 5 (PDE<sub>5</sub>) enzim inhibitörü olan T-0156 ile iki grupta da gevşeme elde edilmesi izole kobay trakea düz kasındaki gevşeme yanıtında cGMP'nin rol aldığını göstermektedir. Deney grubunda T-0156 ile oluşan gevşeme yanıtlarındaki azalma, artmış iNOS aktivasyonu sonucunda oluşan fazla miktardaki NO ile cNOS'da baskılanmaya ve buna baēlı olarak endojen NO miktarındaki azalmaya baēlı olabileceēi gibi, guanilat siklaz enzimi miktar ve/veya aktivasyonundaki azalmaya ve sonuç olarak yeterli miktarda cGMP üretilmemiş olmasına baēlı olabilir.

Jacob de Boer ve arkadaşları (1999), kobaylarda yaptıkları bir in vitro çalışmada, erken astmatik reaksiyondan sonra metakolinle saēlanan solunum yollarındaki aşırı duyarlılığa, endojen NO'daki eksikliēin katkıda bulunduğunu ve bu durumun eksojen olarak verilen L-arginin ile geriye dönebileceēini belirtmişlerdir. Bu bulgular ışığında cNOS substrallarındaki kısıtlamanın, bu enzimin aktivitesindeki azalmanın ve erken astmatik reaksiyondan sonraki solunum yolları aşırı duyarlılığının sebebi olduğunu iddia etmişlerdir (63). Nitrik oksit sentezleyen enzimin inhibitörlerinin bulunmuş olmasının, NO'nun fizyolojik ve patofizyolojik özelliklerini saptamada önemli rol oynadığı belirtilmektedir. [Ng-monometil- L-arginin (L-NMMA), NG-

nitro-L-arginin (L-NOARG), NG-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME), NGiminoetil-L-ornitin (L-NIO)] gibi L-arginin analoglarının endojen NO sentezini inhibe ettiği belirtilmiştir (37).

Bir başka invitro çalışmada izole kobay trakea dokularında, indometazin, atropin, gunetidin,  $\alpha$ -kimotripsin, ve histamin varlığında elde edilen EAU gevşeme cevaplarının YC-1 varlığında büyük ölçüde arttığını, L-NAME veya ODQ varlığında alınan EAU gevşemelerinin ise azaldığını ve devamında ortama ilave edilen YC-1'in ise EAU gevşeme yanıtlarını daha fazla arttırmadığını belirtmişlerdir (62).

Çalışmamızda önceden karbakol ( $10^{-5}$  M) ile kastırılmış izole kobay trakea preparatlarında EAU, kontrol ve deney gruplarında gevşeme yanıtları oluşturdu. EAU uygulamaları sonucunda elde edilen gevşeme yanıtları, ovalbumin duyarlı grupta, kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmış olarak bulundu. Her iki grupta da EAU sonucu oluşan gevşeme cevapları, ortama L-NAME eklenmesiyle anlamlı derecede azalırken, ortama ilave edilen L-Arginin ile bu gevşeme yanıtları geriye döndü. Bu sonuçlar reversibl bir NOS inhibitörü olan L-NAME'in NO sentezini engellediğini, ortama L-Argininin ilave edilmesinden belli bir süre sonra ise NO salınımını artırarak tekrar gevşemeleri artırdığını ve neticede EAU sonucu ortaya çıkan gevşemelerin nöronal NO salınımı ile olduğunu göstermektedir. Deney grubunda gevşemelerdeki bu azalma, kronik enflamasyon sonucu artmış iNOS aktivasyonuna bağlı olarak oluşan fazla miktardaki NO'nun cNOS'da baskılanma yapmasına ve sonuçta verdiğimiz EAU'nın yeterli miktarda nöronal nitrik oksit salınımına yol açmamasına bağlı olabileceği gibi, gunilat siklaz enzimi miktar ve/veya aktivisindeki azalma da bu sunuca yol açabilecektir.

NO'nun biyolojik aktivitesinde en iyi tanımlananı, hedef bölgesinin, çözünür guanilat siklazın hem komponenti içerisindeki  $Fe^{+2}$ ,ye bağlanması ve enzimi aktive ederek GTP'nin cGMP'ye dönüşümü sağlamasıdır. Bunun ardından cGMP'nin , tip I çözünür cGMP-bağımlı protein kinaz'a (PKG) bağlanarak hücre içi etkilerini oluşturduğu belirtilmektedir (38). Genel olarak cGMP'nin düz kas gevşemesini iki moleküler mekanizmayı aktive ederek başlattığı kabul edilmektedir: 1) Hücre içi  $Ca^{+2}$  konstrasyonunu azaltarak; 2) Kontraktil sistemin  $Ca^{+2}$ 'a duyarlılığını azaltarak. İlk mekanizmaya göre aktive olmuş PKG'nin, çeşitli hedef proteinleri fosforilleyerek hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun azalmasına neden olduğu belirtilmektedir (39).

cGMP ile indüklenen  $Ca^{+2}$  desentizasyonunun ise RhoA- bağımlı yolağın inhibisyonu üzerinden miyozin-hafif zincirin fosfataz aktivitesini stimule ederek oluşturduğu belirtilmektedir (41).

Çalışmamızda, ovalbumin duyarlı grup ve kontrol grubunda ELISA yöntemini kullanarak siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeylerini ölçtük. Ovalbumin duyarlı grup izole kobay trakea dokularında; EAU, Karbakol, NOC-12, NOR-4, YC-1, T-0156 uygulamaları sonucunda ve hiç ilaç uygulanmayan dokudan ölçülen cGMP miktarlarını, kontrol grubu düzeylerine göre anlamlı derecede azalmış olarak bulundu. cGMP sonuçlarını deney grubunda azalmış olarak bulunması, astımda miktarı artan NO'nun, cNOS'un inhibisyonuna ve guanil siklaz enziminin miktar veya aktivitesinde azalma yapmış olmasına bağlı olabilir.

ODQ varlığında her iki grupta NO donörleri ve YC-1 ilaç uygulamaları sonucu ölçülen cGMP düzeyleri, ODQ yokluğunda aynı ilaçların yalnız uygulanması sonucu ölçülen cGMP miktarlarına göre anlamlı derecede azalmıştı. ODQ varlığında cGMP sonuçlarındaki bu azalma NO donörleri ve YC-1'in guanilat siklaz üzerinden cGMP aracılığı ile gevşeme yaptıkları bilgisini doğrularken, ODQ'nun guanilat siklaz enzimini baskıladığını ve sonuç olarak da cGMP oluşumunu azalttığını göstermektedir.

Ayrıca her iki grupta EAU+L-NAME sonucunda ölçülen cGMP düzeylerini yalnız EAU sonucu ölçülen cGMP düzeylerine göre anlamlı derecede azalmış olarak bulduk. Bu bulgular nonselektif NOS inhibitörü olan L-NAME'in NO salınımını azalttığını ve sonuç olarak da cGMP oluşumunu azalttığını göstermektedir.

Kontrol ve deney grubunda KCl ve papaverin yanıtlarının değişmemiş olması, her iki grup kobay trakea düz kasında kasılma-gevşeme fonksiyonunun normal olduğunu göstermektedir. Ayrıca her iki grupta karbakol kasılma yanıtları açısından anlamlı bir fark bulunamamış olması, NO donörleri, YC-1, T-0156, EAU ile deney grubunda elde edilen gevşeme yanıtlarındaki bu anlamlı azalmanın kasılma yanıtlarından bağımsız olduğunu düşündürmektedir.

İzole kobay trakealarında yaptığımız bu in vitro çalışmada ovalbumin duyarlı deney grubunda, NO/cGMP yolağına etki eden NOC-12, NOR-4, T-0156, YC-1 ve EAU'na bağılı olan gevşeme cevaplarını kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmış bulduk. cGMP seviyelerinin de deney grubunda anlamlı derecede azalmış olması, astım grubunda NO/cGMP yolağının çalışmasında bir sorun olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak bu bulgular astımda, aktivitesi artan iNOS'a bağılı olarak fazla miktarda oluşan NO'nun, yapısal NOS enzimini inhibe etmesine ve bunun sonucunda endojen NO'nun azalmasına ve/veya guanil siklaz enzim miktar veya aktivasyonundaki azalmaya bağılı olabilir. Bu anlamda NO donörlerinin veya NO/cGMP yolağını etkileyen yeni ilaçların astım hastalarında rutin olarak tedavide kullanılabilmesi için yarar/zarar dengesinin netlik kazanması gerekmektedir. Yeni iNOS enzim inhibitörlerinin denendiğı ve guanilat siklaz enzim aktivite ve miktarının ölçüldüğü daha ileri çalışmalar, gerek hastalığın patofizyolojisine ışık tutmak gerekse de yeni ilaçların klinikte kullanılabilirliğinin araştırılması açısından faydalı olacaktır.

## KAYNAKLAR

- 1) Toraks Derneği Bronş Astımı Çalışma Grubu: Ulusal Astım Tanı ve Tedavi Rehberi. Toraks Dergisi. Cilt 1, Ek 1, Nisan 2000.
- 2) Global Initiative For Astma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. National Institutes of Health. National Heart, Lung and Blood Institute. Revised. 2006.
- 3) Brett SJ, Quinlan GJ, Mitchell J et al. Production of nitric oxide during surgery involving cardiopulmonary bypass. Crit Care Med; 26: 272– 278, 1998.
- 4) Fischer A, Mundel P, Mayer B, et al. Nitric oxide synthase in guinea pig lower airway innervation. Neurosci Lett 149:157–60, 1993.
- 5) Kalkan Ş, Astım Tedavisinde Kullanılan Montelukastın Alerjik Pirik Testleri Üzerine Etkisi, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Malatya, 2005.
- 6) Türkteş H, Türkteş İ (ed.). Astma. 1.Baskı. Bozkır Matbaacılık, Ankara; (27-48), (1-4), (13-26), 1998.
- 7) Mulrennan SA, Redington AE. Nitric Oxide Synthase İnhibition: Therapeutic potential in asthma. Treat Respir Med; 3(2): 79-88, 2004.
- 8) Küçükusta AR. Epidemiyoloji. Gemicioğlu B.ed. Tanımdan Tedaviye Astım. Turgut Yayıncılık ve Ticaret A.Ş. İstanbul. S: 5–26, 2005.
- 9) Kocabas A. Bronşial Astım, Temel İç Hastalıkları. Ankara, Günes Kitabevi 1: 476 -496, 1996.
- 10) Türkteş H. ed. Synopsis of DISEASES of the CHEST. (3): 644, 2006.
- 11) Sakin FY. Astımlı Hastalarda sinonazal patolojilerin değerlendirilmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Uzmanlık Tezi, Van, 2006.
- 12) Gemicioğlu B. Bronş astımı.In: Erk M.ed. Göğüs Hastalıkları. 1st.ed. İstanbul. İ.Ü. Yayınları No 4297; 621-658, 2001.
- 13) Tarlo SM, Liss GM. Occupational asthma: an approach to diagnosis and management. CMAJ; 168(7): 867-71. 2003.
- 14) Busse WW, Lemanske RF, Jr. Asthma. N Engl J Med; 344(5):350-62. 2001.
- 15) Ober C. Perspectives on the past decade of asthma genetics. J Allergy Clin Immunol; 116(2):274-8, 2005.

- 16) Holloway JW, Beghe B, Holgate ST. The genetic basis of atopic asthma. *Clin Exp Allerg* ; 29(8):1023-32, 1999.
- 17) Türктаş H. Etyoloji ve Patogenez. Ulusal Verilerle Astma. Kalyoncu AF, Türктаş H. ed. Kent Matbaa, Ankara; s: 39–89, 1999.
- 18) 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
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) Devereux G, Seaton A. Diet as a risk factor for atopy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*; 115(6): 1109-17, 2005.
- 22) Drazen B, Thomson R. Asthma and COPD First Edition, 2002.
- 23) Ngoc LP, Gold DR, Tzianabos AO, et al. Cytokines, allergy, and asthma. *Current Opinion in Allergy Immunology*; 5: 161–166, 2005.
- 24) Bayram A. Astımda Atopi ve Alerjik Rinit Sıklığı. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Uzmanlık Tezi, Kayseri, 2007.
- 25) Çelik EG. Astım Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri. Demirel SY. ed. Güncel Akciğer Hastalıkları Serisi:10. Astım Tanı ve Tedavi. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara; s: 9–37, 2004.
- 26) Travis WD, Colby TV, Koss MN, et al. Obstructive pulmonary diseases. In: Atlas of non tumor pathology, Nonneoplastic disorders of lower respiratory tract, 1st eds. Washington DC AFIP boks; 10: 457-471, 2002.
- 27) Dunnill MS. The pathology of asthma with special reference to changes in the bronchial mucoza. *J Clin. Pathol*; 13: 27-33, 1960.
- 28) Kayaalp SO. Tıbbi Farmakoloji Gözden Geçirme Kitabı. Bronkodilatatör İlaçlar ve Diğer Anti-astmatik İlaçlar. 2. Baskı, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti. 225-226, 2005.

- 29) Güray A, Samancı N, Ovalı F, Dağoğlu T. Nitrik Oksit, Fizyolojisi ve Klinik Önemi. *T. Klin Tıp Bilimleri*; 17: 115-119, 1997.
- 30) Palmer RMJ, Ashton DS, Moncado S. Vascular Endothelial Cells Synthesized Nitric Oxide from L- arginine. *Nature*; 333: 664-66, 1988.
- 31) Alp Fİ, Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Açilasyonunun Nitrik Oksit Sentez ve Vasküler Reaktivite Üzerine Etkisi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, İstanbul, 2007.
- 32) Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med*; 120: 227–237, 1994.
- 33) 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.
- 34) Aladağ MA, Türköz Y, Özerol İ.H. Nitrik Oksit ve Nörofizyopatolojik Etkileri. *T. Klin Tıp Bilimleri*; 20: 107-111, 2000.
- 35) Özkan Metin, Yüksekol İsmail. Nitrik Oksit ve Akcigerler, *Toraks Dergisi*; 4(1): 88-94, 2003.
- 36) Arnalich F, Lopez J, Codeceo R, Jimenez M, Madero R, Montiel C. Relationship of plasma leptin to plasma cytokines and human survival in sepsis and septic shock. *JID*; 180: 908-911, 1999.
- 37) Lee FYJ, Li Y, Yang EK. Phenotypic abnormalities in macrophages from leptin-deficient obese mice. *Am J Physiol*; 276: 386- 94, 1999.
- 38) Ignarro LJ and Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25: 171–191, 1985.
- 39) Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, and Weiner CP. Molecular mechanism of cGMPmediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol* 184: 409–420, 2000.
- 40) *J. Am. Coll. Cardiol.* 43: 68-72, 2004.
- 41) Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P, and Loirand G. Cyclic GMP- dependent protein

kinase signaling pathway inhibits Rho-induced  $\text{Ca}^{+2}$  sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 275: 21722-21729, 2000.

42) Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, and Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophages effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 87-94, 1988.

43) 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.

44) 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.

45) 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.

46) 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.

47) Barnes PJ. Nitric Oxide and Airway Disease. *Ann Med*; 27:389-93, 1995.

48) 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.

49) 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.

50) Vaali 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.



- 51) 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.
- 52) Dökmeci İ, Farmakoloji İlaçlar ve Etkileri. Alfa Basım Yayım Dağıtım Ltd.Şti, (183-184), 208, (497-498), (280), Mart 2007.
- 53) Turgut H N, Suraminle Oluşturulan Sıçan Preeklampsi Modelinde Damar Düz Kas Cevaplarında Oluşan Değişiklikler Üzerine Fosfodiesteraz-5 İnhibisyonunun Etkisi, T.C Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, SİVAS, 2007.
- 54) Banoğlu NZ. Fosfodiesteraz İnhibitörleri. *Türkiye Klinikleri Farmakoloji Özel Dergisi*; 1(3); 1-3, 2003.
- 55) Yorgancıoğlu A. Astım Tedavisinde Yenilikler ve Lökotrien Antagonistleri. *Toraks Dergisi*, 2:58-68, 2000.
- 56) Cevit O, Bağcivan 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.
- 57) 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.
- 58) Koarai A, Ichinose M, Sugiura H, Yamagata S, Hattori T, Shirato K. Allergic Airway Hyperresponsiveness and Eosinophil Infiltration is Reduced by a Selective iNOS Inhibitor, 1400W, in Mice. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 13, 267-275, 2000.
- 59) Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Antihipertansif İlaçlar. 9. Baskı, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti. 2000, 449.
- 60) 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.
- 61) 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.

62) Tsong-Long Hwang , Chin-Chung Wu & ,Che-Ming Teng. YC-1 potentiates nitric oxide-induced relaxation in guinea-pig trachea. *British Journal of Pharmacology*. 128, 577 - 584, 1999.

63) Boer de J, Duyvendak M, Fineke E, Schuurman F, May H, Zaagsma PJ, Meurs H, Role of L-arginine in the deficiency of nitric oxide and airway hyperreactivity after the allergen-induced early asthmatic reaction in guinea pig. *British Journal of Pharmacology* 128, 1114–1120, 1999.