

T.C.
PTT Genel M¼d¼rl¼g¼
Sanatoryum ve Hastanesi
G¼g¼s Hastalıkları ve T¼berk¼loz Kliniđi
Őef: Doç. Dr. T¼lin Yılmaz Kuyucu

**AKCİĞERİN OBSTR¼KTİF İNFLAMATUVAR
HASTALIKLARINDA UYARILMIŞ BALGAMDA NİTRİK
OKSİD VE 3- NİTROTİROZİNİN YERİ**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Beng¼ ŞAYLAN

İstanbul - 2002

ÖNSÖZ

Eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım sayın hocam;Klinik Şefi Doç.Dr.Tülin Yılmaz Kuyucu'ya.

Rotasyonlarım sırasında yetişmemde katkıları olan Hastanemiz İç Hastalıkları Klinik Şefi Prof.Dr.Ömer Güven'e, Radyoloji Klinik Şefi Dr.Bülent Saydam'a, Haydarpaşa Numune Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Şefi Doç.Dr.Paşa Göktaş'a, Başhekimimiz Op.Dr.Turgut Alp'e saygılarımı sunar teşekkür ederim.

Asistanlığım süresince yardım ve katkılarından dolayı başasistanımız Dr.Mübeccel Akman'a, Uzm.Dr.Nesrin Çelik'e, tüm uzman ve asistan arkadaşlarıma,

Bu çalışmada emeği geçen Sayın Hocam Doç.Dr. Tülin Yılmaz Kuyucu başta olmak üzere, Dr.Nesrin Çelik, Dr.Şeyma Başlılar, Dr.Nagehan Özdemir Barışık'a, Çerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof.Dr.M. Koray Gümüştaş ve Dr.Pınar Atukeren'e

Tez çalışmalarım sırasında bana uygun ortamı sağlayan ve destek olan eşim Uzm.Dr.Mete Şaylan'a ve oğlum Teo'ya sevgi, şefkat ve anlayışları için teşekkür ederim.

Dr.Bengü Şaylan

İÇİNDEKİLER

| | |
|-------------------------|----|
| GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| GENEL BİLGİLER | 4 |
| MATERYAL VE METOD | 20 |
| BULGULAR | 29 |
| TARTIŞMA | 40 |
| ÖZET | 48 |
| KAYNAKLAR | 51 |

GİRİŞ VE AMAÇ

Ekspiryum havasında ölçülen Nitrik Oksit (NO), havayolu inflamasyonunun değerlendirilmesinde noninvaziv bir gösterge olarak kullanılmaktadır (1,2). NO'nun antibakteriyel ve immunomodülatör antiinflamatuvar etkileri yanında proinflamatuvar etkileri de vardır. Proinflamatuvar etkilerinden birisi de peroksinitrit gibi metabolitlerine bağlı oksidatif hasardır (2,3,4,5,6).

Alt solunum yollarında oluşan NO, kısa sürede stabil ve inaktif nitrat (NO₂) ve nitrit (NO₃)'e dönüşür (2,3,4,7,8). Nitrat ve nitritler sıvı fazda olup BAL, uyarılmış balgam ve yoğunlaştırılmış solunum havasında (Exhaled Breath Condensate) NO yapımının bir göstergesi olarak kullanılabilir (9,10,11,12,13,14,15).

Ortamda oksidanların artması ile gelişen oksidatif stres varlığında ise süperoksit anyon ve/veya peroksidaz bağımlı reaktif nitrojen türevleri (RNS) oluşur (1,2,4,5,13). Ortamdaki RNS'nin bir göstergesi olan 3NT(nitrotirozin), tirozin nitrasyonu sonucu gelişen stabil bir son üründür ve proinflamatuvar gösterge olarak kullanılabilir (2,4,5,6,13).

Son yıllarda çok sayıda araştırmada serbest ya da proteine bağlı 3NT çeşitli doku ve sıvı örneklerinde NO kaynaklı oksidanlar aracılığı ile gerçekleşen oksidasyon reaksiyonlarının bir göstergesi olarak incelenmiştir (2,4,7).

Halen 3NT'nin inflamatuvar oksidanların bir biyomarkır'ı mı olduğu ya da akut ve kronik inflamasyona bağlı gelişen doku harabiyeti ve hücresel disfonksiyonu mu gösterdiği netlik kazanmamıştır (2).

Astma, Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAİ), bronşektazi, kistik fibrozis gibi birçok akciğer hastalığında kronik inflamasyon ve oksidatif stres bulunur. Ancak henüz bu inflamasyonu izlemede pratik bir yöntem yoktur. Çalışmalar ekspirasyon havasında NO(ENO) ölçümünde yoğunlaşmıştır (1,10,11,14,15).

Astmalı hastalarda, hava yolu epiteli ve inflamatuvar hücrelerdeki iNOS(inducible nitrik oksid sentetaz,NOS2) aktivasyonu sonucu ENO seviyesinde artma yaygın olarak gösterilmiştir.Bu test antiinflamatuvar tedavinin izlenmesinde ve subklinik inflamasyonu göstermede kullanılmaktadır (5,8,9,11,17).

Stabil KOAİ'lı ve kronik bronşit'li hastalarda ENO, astmalılardan daha düşük düzeylerde bulunurken normallerden farklı ölçülmemiştir. Ancak KOAİ'lılarda alevlenme dönemlerinde yüksek düzeylerde bulunmuştur (1,10,11,12,14,15,18,19).

Bronşektazili hastalarda ENO düzeyi artışı ile hastalığın yaygınlığı arasında ilişki gösterilmiştir. Ancak stabil bronşektazililerde ENO her zaman yüksek ölçülmemiştir (11).

Astmalı hastalarda yoğunlaştırılmış solunum havasında NT hafif astmalılarda yüksek, orta-ağır astmalılarda ise daha düşük bulunmuştur (13)UB 3NT immun boyama tekniği ile KOAİ'lılarda astmalılardan daha yüksek reaktivitede gösterilmiştir (4).

Endojen NO ve iNOS'un hem astma hem de KOAİ'da arttığı bilinmektedir (3,11,20). ENO ve UB'de NO ürünlerinin her iki hastalıkta da yüksek olması beklenirken yapılan çalışmalarda KOAİ'lılarda bu bilgi desteklenmemiştir. Astmalılarda artmış ENO ve UB NO ürünleri arasında ilişki bulunmuş, ancak KOAİ'lılarda ölçülen ENO düzeyi ile UB NO

ürünleri arasında KOAH-sağlıklı ayırımında tutarlı bilgiler sağlamamıştır (1,4,10,12,14,15).

İnflamatuvar hücreler ve mediyatörlerin farklı olduğu bu hastalıklarda önemli farklılıklardan biri de oksidatif stresin yoğunluğunun derecesidir(15). NO, Oksidatif stres varlığında tüketildiğinden NO metabolizması ürünleri ölçümleri ile oksidatif stres göstergeleri arasında ilişkinin gösterilmesi inflamasyonun yorumlanmasında tamamlayıcı bilgiler verecektir.

Bu çalışmada; invivo NO düzeyini göstermede, UB örneklerinde NO'nun stabil yıkım ürünü olan nitrit/nitrat ölçüldü. Ayrıca yine NO metabolizmasının stabil bir son ürünü ve oksidatif stresin bir göstergesi olan 3NT düzeyi UB'de ölçülerek daha değerli sonuçların elde edilmesi ile tanıdaki değerinin belirlenmesi, ayrıca inflamatuvar obstrüktif hastalıklarda UB'de nitrit/nitrat ve 3NT düzeyleri ile UB hücreleri arasındaki ilişki incelenerek hastalıkların patofizyolojisindeki rollerinin araştırılması amaçlandı.

Hiçbiri sigara içmeyen 16 bronşektazili, 15 KOAH'lı, 18 astmalı, 10 sağlıklı olgu çalışmaya alındı. Bronş hiperreaktivitesinin (BHR) varlığını ve derecesini belirlemek amacı ile olgulara metakolin bronkoprovokasyon testi yapıldı. Bronşektazili hastalarda Toraks HRCT çekildi ve değerlendirildi. Uyarılmış balgam tekniği kullanılarak alınan balgamlarda nitrit/nitrat, 3NT düzeylerine ve hücre profiline bakıldı.

GENEL BİLGİLER

Astma, KOAH ve bronşektazi hava yollarının benzer klinik ve patofizyolojik olaylarını içeren hastalıklardır. Her 3 hastalıkta da akciğerde kronik inflamasyon ve buna bağlı hava yolu obstrüksiyonu sonucu benzer bulgular görülebilir. Bronş Astması, başta eozinofiller, mast hücreleri ve T lenfositler olmak üzere pek çok hücrenin rol aldığı hava yollarının kronik inflamatuvar bir hastalığı olarak tanımlanır (21). Duyarlı kişilerde bu inflamasyon özellikle gece ve sabaha karşı tekrarlayan öksürük, nefes darlığı, hırıltılı solunum ve göğüste sıkışma hissine neden olur (21). Bu semptomlardan sorumlu olan havayolu obstrüksiyonu, bronş aşırı duyarlılığı gibi fonksiyonel bozuklukların nedeni havayollarındaki kronik inflamasyondur. Hastalığın ağırlığı inflamasyonun yoğunluğu ile paralellik gösterir (22,23,24).

KOAH ise tam reverzibilite göstermeyen havayolu kısıtlanması ile karakterize bir hastalıktır. Hava akımı kısıtlanması genellikle ilerleyicidir ve akciğerin zararlı partikül veya gazlara karşı anormal inflamatuvar cevabı ile ilişkilidir. Bu cevap sonucu havayolları, akciğer parankimi ve pulmoner vasküler yapıda kronik inflamasyon oluşur. Akciğerde makrofaj, T lenfosit (CD8) ve nötrofillerde artış meydana gelir. Aktive olan hücrelerden LTB₄, IL8, TNF α gibi mediyatörler salınarak doku harabiyeti oluşur. Çeşitli çalışmalarda KOAH'lılarda BAL, biyopsi ve UB örneklerinde nötrofillerin en belirgin hücreler olduğu IL8 ve TNF α düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (12,21,26,27).

Tablo 1: KOAH ile astma arasındaki farklar (25)

| İnflamasyon | Astma | KOAH |
|--------------------------|---|---|
| İnflamatuvar hücreler | Mast hücreleri Eozinofiller CD4 hücreler(Th2) Makrofajlar + | Nötrofiller CD8 hücreler(Tc) Makrofajlar ++ |
| İnflamatuvar mediatörler | LTB4,histamin IL4,IL5,IL13 Eotaksin,RANTES Oksidatif stres + | LTB4 TNF α IL8,GRO- α Oksidatif stres +++ |
| İnflamatuvar etkiler | Tüm hava yolları BHR +++ Epitelyal dökülme Fibrozis + Parankim tutulumu yok Mukus sekresyonu + | Periferik hava yolları BHR +/- Epitelyal metaplazi Fibrozis ++ Parankimal hasar Mukus sekresyonu +++ |

Bronşektazi bronşiyal ağacın bir kısmında irreverzibl dilatasyon ve buna bağlı kalıcı ya da tekrarlayan havayolu kısıtlılığı ile karakterize, klinikte aşırı balgam üretimi, kronik öksürük, sık infeksiyon ile kendini gösteren bir hastalık olarak tanımlanır (28,29,30,31,32,33). Tekrarlayan

inflamatuvar hücrelerdir. Nötrofil kaynaklı toksik ürünler ise yapısal ve fonksiyonel hasara neden olur (35,36,37).

KOAH hastalarının %10'unda astma varlığı (29), bronşektazili hastaların bir kısmında da astmatik komponent gösterilmiştir (28,29). Bazı bronşektazili olgularda reverzibl havayolu obstrüksiyonu ve bronş aşırı cevaplılığının bulunması inhale $\beta 2$ agonistlerin tedavide kullanılmasına neden olmuştur (28,29,31).

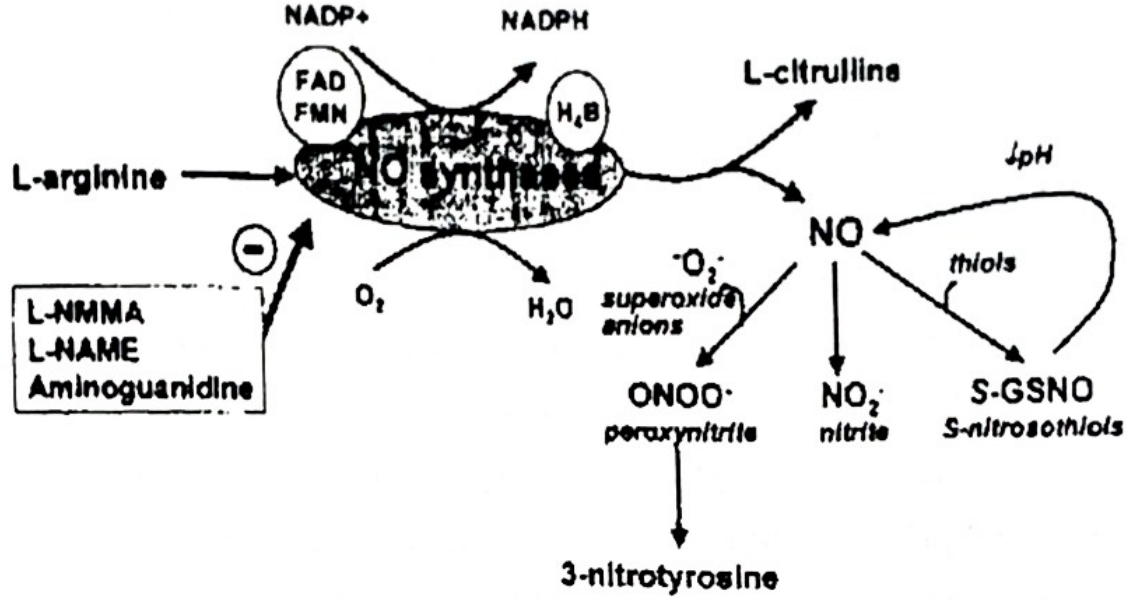
Bu 3 hastalığın patofizyolojisinin ve kliniğinin bu kadar çok birbirine benzemesi 3 hastalık arasında kimi zaman ayırımın ne kadar zor yapılabildiğini göstermektedir.

NİTRİK OKSİT ve 3NT

1987 yılında endotel kaynaklı gevşetici faktörün (EDRF), nitrik oksit (NO) molekülü olabileceği ileri sürüldü (38,39). Kısa bir süre sonra Palmer ve arkadaşları NO'nun endotel hücrelerinden L-arginin kullanılarak endojen olarak oluştuğunu gösterdi (38,39,40). Bu keşif biyoloji ve fizyoloji alanındaki araştırmalarda yeni bir çığır açtı. Çalışmalar ile organizmada birçok fizyolojik ve fizyopatolojik olayda NO'nun rolü olabileceği gösterildi. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, moleküler yapısı küçük, lipofilik ve kısa süreli etkisi ile hücre içi ve hücreler arası iletişimde önemli bir yapı olan NO hakkında birçok bilgi edinilmiştir (8,12,38,39,40,41,42).

Endojen NO, çeşitli dokularda Nitrik Oksid Sentetaz (NOS) enziminin izoformları tarafından yarı esansiyel bir aminoasit olan L-arginin'in L-citrullin'e dönüşmesi sırasında oluşur. Bu reaksiyonda oksijen ve NADPH kosubstrat, α (BH₄) ve flamanlar (FAD,FMN) ise koenzim olarak görev alır (8,12,41,42).

Nitrik Oksid Sentetaz enziminin iki temel izoformu bulunur. Birincisi hücrelerde yapısal olarak bazal bir düzeyde bulunan cNOS (constitutive NOS), ikincisi ise bazı uyarılardan sonra yapıлып aktive olan iNOS (inducible NOS)'dur.



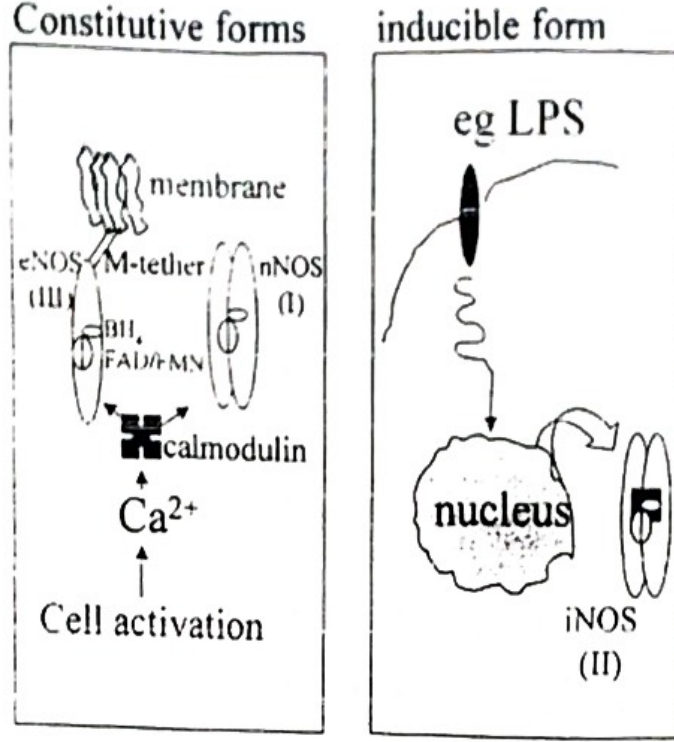
Şekil 2: NOS enzimi ile L-Argininden NO ve 3NT sentezi(11)

Tablo II. NOS izoenzimlerinin Özellikleri

| cNOS (constitutive NOS) | iNOS (inducible NOS) |
|---|---|
| - Yapısal olarak bazal düzeylerde bulunur | - Yapısal olarak bulunmaz. |
| - Ca^{2+} bağımlıdır | - Ca^{2+} bağımlı değildir. |
| - NO sentezi çok kısa sürede olur ve az miktardadır | - NO sentezi için saatler gerekir, çok miktarda NO sentez edilir. |
| - L-Argininin analogları ile inhibe olur | - L-Arginin analogları ile inhibe olur. |
| - Kortikosteroid ile inhibe olmaz. | - Kortikosteroid ile inhibe olur. |
| - Fizyolojik olayların devamında rol oynar. | - Fizyopatolojik değişikliklere neden olur. |

Constitutive Nitrik Oksid Sentetaz Ca^{++} bağımlıdır. Ca^{++} yada kalmodülin aracılığı ile aktive olur. Asetilkolin, bradikinin, kalsiyum ionofor PAF, histamin, lökotrienler gibi medyatörlerin uyarısı ile hücre içi Ca^{++} hızla yükselir ve cNOS aktive olarak saniyeler, dakikalar içerisinde NO üretilir. Epitel hücresi, endotel hücresi, bazı nöronlar, trombosit ve mast hücresinde cNOS aracılığı ile yapılan az miktarda NO, guanil siklazı aktive ederek temel bazı fizyolojik olayların düzenlenmesinde rol oynar (Şekil 2) (11).

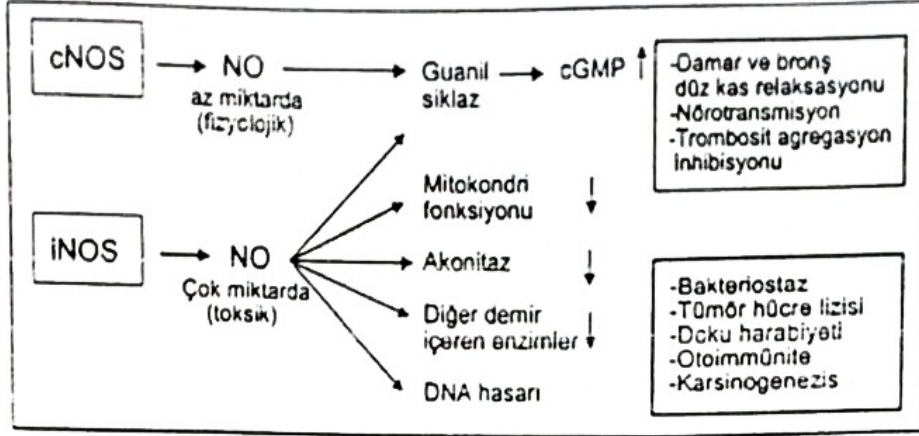
iNOS hücrelerde bazal düzeylerde yapısal olarak bulunmaz. IL-1, TNF α , TNF β , IFN γ gibi sitokinler, endotoksin ve lipopolisakkaritlerin uyarısı ile iNOS sentez edilir. Bunun için gerekli olan gen transkripsiyonu ve mRNA ekspresyonu oluşması için 4-6 saat gibi bir süre geçer. Böylece, cNOS'da olduğu gibi NO saniyeler içinde değil birkaç saat içinde sentezlenmeye başlar. iNOS aracılığı ile sentezlenen NO, cNOS'a göre çok daha fazla miktardadır. iNOS aracılı NO sentezi için Ca^{++} ya da kalmodüline gerek yoktur. iNOS, cNOS gibi epitel ve endotel hücrelerinde bulunabildiği gibi inflamatuvar hücrelerde de sentez edilir (Tablo 2), (40,41,42). L-arginin analogları her iki tip NOS'u baskılarken, iNOS'un üretimi ayrıca kortikosteroidler tarafından da engellenir. Kortikosteroidlerin cNOS'a etkileri yoktur. IL10 gibi sitokinler iNOS'u inhibe ederler (40,41,42).



Sekil 3: eNOS(NOS3), nNOS(NOS1) ve iNOS(NOS2)'un hücresel lokalizasyonları (3)

Nitrik Oksid'in biyolojik fonksiyonları çözünebilir guanilat siklaz/guanozin 3'5' siklik monofosfat (cGMP) sistemi tarafından pek çok dokuda yönetilmektedir. Hücre içinde oluşan veya komşu hücrelerde oluşup diffüze olan cNOS aracılığı ile az miktarda oluşan NO, guanilat siklazı aktive eder. Böylece hücreler arası veya hücre içi mesajcı olarak hareket eder ve cGMP artışına sebep olur. cGMP düzeyindeki artış intraselüler Ca^{++} konsantrasyonunda bir düşüşe neden olur. Bu da vasküler ve nonvasküler dokuda düz kas relaksasyonundan, trombosit adezyon ve agregasyonunun inhibisyonundan, PMNL kemotaksisinin inhibisyonundan, santral ve periferik sinir sistemindeki sinyal iletiminden sorumludur. iNOS aracılığı ile yapılan yüksek miktarda NO ise Krebs siklusunda rolü olan akonitaz NADPH oksidoredüktaz, süksinat oksidoredüktaz gibi demir içeren ve hücre

yaşamı için gerekli olan mitokondri enzimlerini baskılayarak hücre fonksiyonlarını bozar. Otoimmün hastalıklarda oluşan doku harabiyeti, tümör hücrelerinde sitotoksik etki, inflamasyon ve konakçı savunması gibi fizyopatolojik etkilerini bu yol ile gösterir (Şekil 4)(41,43).



Şekil 4 :NOS izoenzimleri ve fonksiyonları(43).

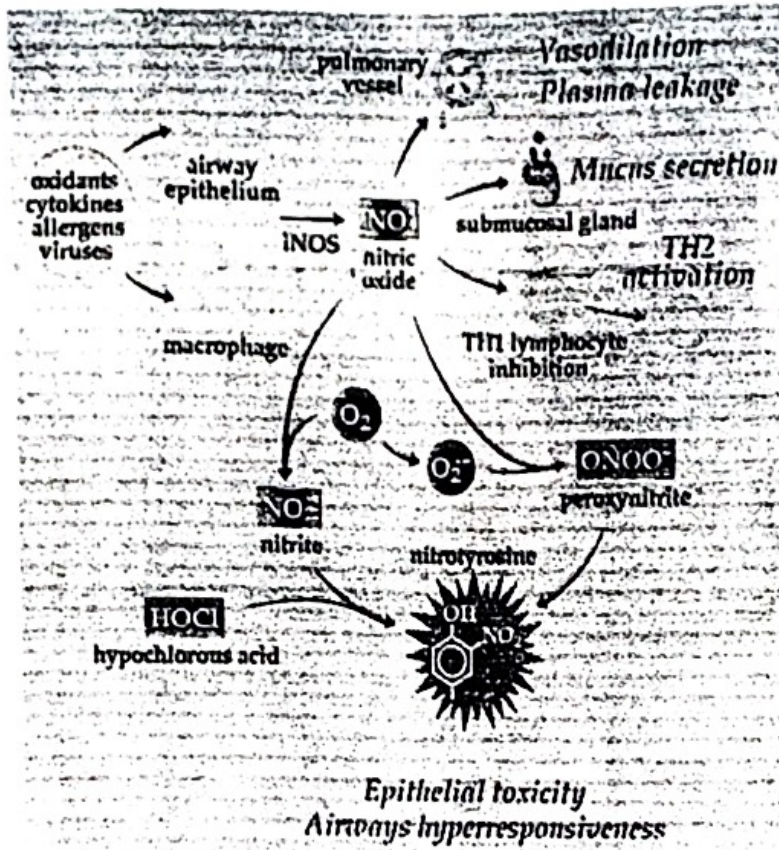
Yakın zaman öncesine kadar NO'nun hücrel kaynakları ve metabolik etkileri tam olarak anlaşılmamıştır. Şimdi akciğerde NO oluşturabilecek potansiyele sahip hücrelerin makrofajlar, nötrofiller, fibroblastlar, düz kas hücreleri, nonadrenerjik nonkolinerjik inhibitör nöronlar, endotel ve epitel hücreleri olduğu bilinmektedir. NO'nun yarılanma ömrü çok kısadır; 0,1-5 sn. (fizyolojik sistemlerde) (38,40,41,42,44,45). Stabil bir molekül olmayan NO, kısa sürede daha stabil olan fakat inaktif yapıdaki nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-)'lara dönüşür. Nitrit ve nitratlar sıvı fazda olup BAL, serum ve uyarılmış balgamda NO yapımının göstergesi olarak kullanılabilirler.

Nitrik Oksid ; güçlü bir vazodilatördür ve astmatik hava yollarındaki hiperemiden sorumlu olabilir. Bu aynı zamanda solunum yollarındaki post

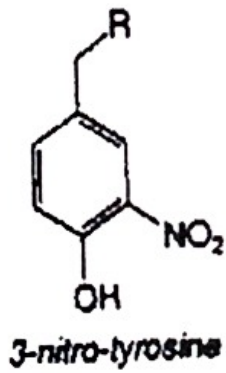
kapiller venüllerden plazma eksüdasyonunu arttırabilmektedir. Yüksek konsantrasyonlardaki NO, solunum yollarında sitotoksik etkilere sahip olabilmekte ve astmatik hastalarda gözlenen epitel dökülmesine eşlik etmektedir (9).

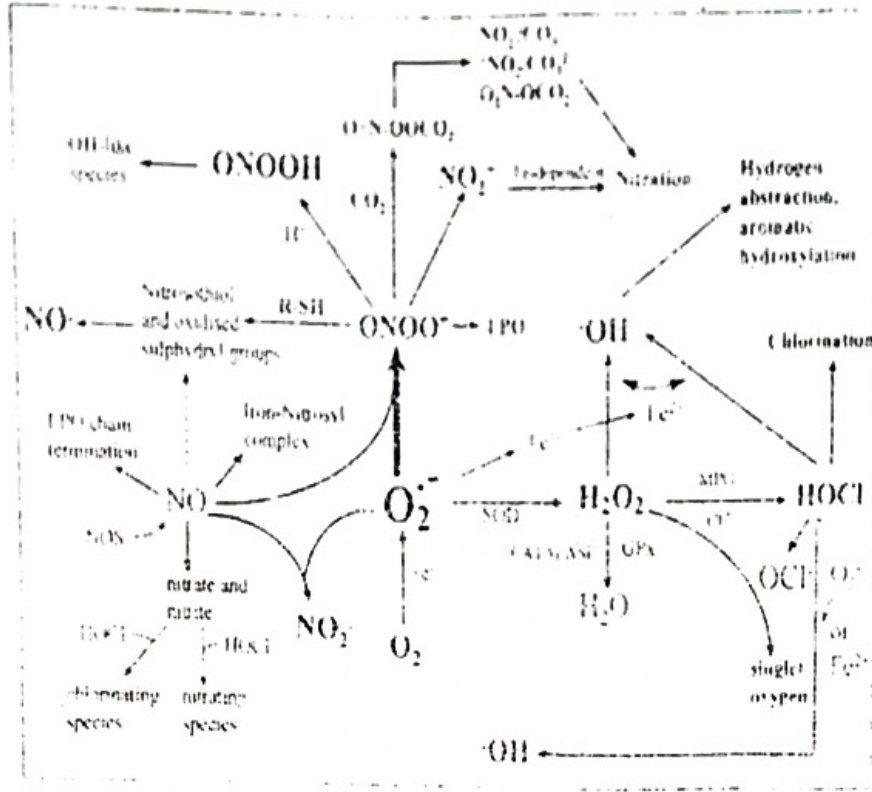
Nitrik Oksid ; sülfür(thiol) ile birleşerek daha stabil ve biyolojik olarak aktif olan s-nitrosothioller (RS-NO) oluşturur. Böylece NO'nun dokular arası taşınması kolaylaşır, etki süresi uzar ve süperoksit ile birleşerek oluşturduğu toksik etkiler önlenmiş olur (8,38,41,44).

Ortamda süperoksit (O_2^-) varlığında NO hızla potent bir oksidan olan peroksinitrit (NOO^*)'e dönüşür. NO'nun olumsuz etkileri (BHR oluşumu) bu ve bundan sonraki olaylar zinciri ile açıklanabilir. Peroksinitrit aracılı protein nitrasyonu protein fonksiyonlarını bozar, lipid ve DNA hasarına neden olur. Sürfaktanı inaktive eder ve tirozinkinazlarla olan protein fosforilasyonunu baskılar. Böylece sinyal iletim mekanizmalarını etkiler. Peroksinitrit, tirozinin hidroksil grubuna komşu pozisyonundaki 3.C'a bir nitrojen grubu ekleyerek stabil ürün olan 3NT oluşumuna yol açar. Tirozinin nitrasyonu genellikle peroksinitrite bağlanmasına rağmen peroksidaz bağımlı nitrit oksidasyon yolları da olaya eşlik etmektedir. Nötrofil kaynaklı myeloperoksidaz (MPO) veya diğer peroksidazlar ile (laktoperoksidaz(LPO), eozinofil peroksidaz (EPO)) oksidasyon sonucunda (RNS; Reaktif nitrojen türevleri): nitriklorid (NO_2Cl) ve nitrojendioksit (NO_2^*) oluşur. MPO ile katalizlenen hidrojenperoksidin (H_2O_2) Cl oksidasyonu sonucu hipoklorusasit ($HOCl$) ve hidroksil radikalleri gibi ara bileşikler üzerinden de 3NT oluşabilir. Bu nedenle 3NT, belirli olaylarda peroksinitrit, nitrojendioksit ve diğer nitrojen türleri (RNS)'nin yer aldığı bir göstergesi olarak kullanılabilir (Şekil5, Şekil 6) (2,4,3,5,9,13,16,43).



Şekil 5: NO ve NO metabolitleri sonucu gelişen inflamasyon ve NT oluşumu (3).





Şekil6: ROS ve RNS oluşum mekanizması(3).

Oksidatif stres oksidanlara artmış maruziyet ve/veya antioksidan kapasitesinde azalma olarak tanımlanır ve havayollarının inflamatuvar hastalıklarında görülür (4,46,47,48). İnflamatuvar hücreler özellikle eozinofiller daha fazla miktarda süperoksit anyonları üretirler. Böylece oksidatif stresin sonucu olarak reaktif oksijen ve nitrojen kökenli türlerin oluşmasına neden olurlar. Bazı hastalıklarda ekspiryum havasında artmış NO düzeyi havayolu ödemi ve inflamasyonla ilişkili bulunmuştur. Çeşitli çalışmalar yoğunlaştırılmış solunum havasında ve UB'de 3NT ölçümünün de hava yollarındaki oksidatif stresin bir göstergesi olabileceğini ortaya koymuştur (2,4,5,13).

Pek çok çalışmada protein nitrasyonunun inflamasyonla ilişkili akciğer hasarını yansıttığı gösterilmiştir (2,4,12,13,16,45,49,50). Gelecekte 3NT tayini çeşitli hastalıklarda NO kaynaklı oksidanların yer aldığını göstermede bir tanı aracı olacaktır.

3-nitrotirozin oluşumu artmış peroksinitrit oluşumunu ya da granülosit peroksidazlar aracılı direkt nitrasyonu yansıtır. Artmış düzeylerde nitratlanmış proteinler hava yolu lümeninde bulunur ve steroid tedavisi almamış hafif astmalılarda yoğunlaştırılmış solunum havasında gösterilebilir (13).

Astmada yoğunlaştırılmış solunum havasında NO ve 3NT düzeyi tayininde hiç steroid tedavisi almamış hafif astmalılarda ve sağlıklılarda NO ve 3NT düzeyleri yüksek; orta ve ağır dereceli astmalılarda ise NO artmış, 3NT düşük bulunmuş ve 3NT oluşumunun astmada havayollarındaki oksidatif stresin bir göstergesi olabileceği ileri sürülmüştür (13).

Uyarılmış balgam çalışmalarında, astmalılarda NO ürünleri olan nitrit ve nitrat düzeyleri, UB eozinofil sayısı ve ECP düzeyi ile ilişkili bulunmuş ve astmatik havayollarındaki allerjik inflamasyonun değerlendirilmesinde UB'de NO ürünleri tayininin yararlı bir gösterge olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır (9).

Ekspiryum havasında NO düzeylerinin belirlendiği çalışmalarda astmalılarda KOAH'lılardan daha yüksek düzeylerde ekspiratuar NO tespit edilirken UB örneklerinde her iki hastalık grubunda da normallerden yüksek düzeylerde NO ürünleri gösterilmiştir. Sadece astmalılarda UB NO ürünleri, eksale NO konsantrasyonu ile ilişkili bulunmuştur. Bu ilişki KOAH'lılarda gösterilememiştir. KOAH'da ise nötrofiller ile NO deriveleri ilişkili bulunmuştur.

Sonuç olarak endojen NO üretiminin hem astma hem de KOAH'lılarda arttığı ancak KOAH'lılarda havayolu inflamasyonunu değerlendirmede UB NO ürünlerinin ekspiratuar NO'dan daha değerli olduğu gösterilmiştir. KOAH'da ekspiryum havasındaki NO düzeylerinin düşüklüğü çeşitli şekillerde açıklanmaya çalışılmıştır. Astmada bronş mukozasındaki inflamatuvar yanıt eozinofil infiltrasyonu ile karakterize iken KOAH'da nötrofil ve makrofaj hakimiyeti söz konusudur. KOAH'lı hastalarda yapılan akciğer biyopsi ve UB çalışmalarında gösterilen artmış düzeyde süperoksit neticede NO ile etkileşime girerek peroksinitriti oluşturur. Aktive nötrofillerin varlığı böylece ekspiryum havasındaki NO düzeylerini etkileyebilir. KOAH'da hava yollarındaki inflamatuvar değişiklikler sırasında oluşan sitokinler (IL8) ve bakteriyel endotoksinler artmış NO üretimine, mukus hipersekresyonu ise NO'nun difüzyon kapasitesinin azalmasına ve ekspiryum havasında düşük NO konsantrasyonuna, şiddetli küçük havayolu akımı kısıtlılığı ve kademeli ekspiryum ölçülen ekspiratuar NO'nun normalden daha düşük düzeylerde yorumlanmasına neden olabilir(12).

Stabil KOAH'lılarla normalleri karşılaştıran UB ve ekspiryum havasında NO ve nitrit/nitrat düzeylerinin araştırıldığı çalışmalarda fark bulunamamıştır. Sadece UB eozinofil %'si ile eksale NO arasında ilişki gösterilmiştir (15).

KOAH'daki havayolu inflamasyonunda balgam eozinofilisinin önemini ve eksale NO ile ilişkisini netleştirmek amacıyla alevlenme dönemlerinde de çalışmalar yapılması gereklidir (18).

KOAH'lı ve astmalı olgularda UB'de NT immun boyama tekniği kullanılarak RNS miktarı ve inflamatuvar hücrelerdeki iNOS belirlenmiştir. Sağlıklılarla karşılaştırıldığında KOAH ve astmalılarda benzer şekilde

havayolu inflamatuvar hücrelerindeki iNOS immunoreaktivitesi artmış bulunmuş, ancak eksale NO düzeylerine bakıldığında sadece astmalılarda yüksek saptanmıştır. Bu sonuçlar KOAH'da havayollarındaki inflamatuvar ve obstrüktif olayların patobiyolojisinde reaktif nitrojen türevlerinin ilişkisi olabileceğini, havayollarında oluşan NO'nun iNOS aracılı olduğunu ve süperoksit anyonu ve/veya peroksidaz bağımlı mekanizmalarla bu reaksiyonların gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Immunoreaktiviteye bakılarak elde edilen iNOS ekspresyonu gösteren total hücre sayılarının KOAH ve astmalılarda benzer bulunması aşırı NO üretiminin KOAH'da da astmatik hava yollarındaki kadar olduğunu göstermiştir. RNS üretiminin bir göstergesi olarak kullanılan NT immunoreaktivitesi astmalı olguların eozinofillerinde, KOAH'lıların makrofaj ve nötrofillerinde anlamlı derecede artmıştır. iNOS immunoreaktivite sonuçlarının tersine NT(+) hücre sayıları KOAH'lılarda astmalılardan anlamlı derecede yüksek bulunmuş ve bu sonuç RNS üretiminin KOAH'lıların hava yollarında astmalılardankinden daha fazla olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca NO metabolizması sırasında oluşan güçlü bir oksidan olan Peroksinitrit tirozin nitrasyonuna ,oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu aracılığıyla proinflamatuvar etkilere neden olarak parankimin ekstraselüler matriksinin tüm komponentlerinin yıkımına ve neticede KOAH'daki amfizematöz değişikliklere neden olabilir. Bu sonuçlar birleştirildiğinde KOAH'da havayollarında NO'nun süperoksit anyonu ile reaksiyonu ve/veya peroksidaz bağımlı nitrit oksidasyon mekanizmaları sonucu oluşan peroksinitritin NO'yu tükettiği düşünülebilir. Bu da en azından kısmen KOAH'lılarda, astmalılardan daha düşük olan ekspiratuar NO düzeylerini açıklayabilir (4).

Uyarılmış Balgam :

Birkaç yıl önce hipertonic salin solusyonu inhalasyonu ile uyarılmış balgam metodu açıklandığından bu yana (51), astma gibi pek çok solunum yolu hastalığında bu yöntem yaygın olarak kullanılmaktadır (49). Yapılan çalışmalarda uygulanan bu yöntem ile farklı inflamatuvar hücrelerin belirlendiği; albümin ve fibrinojen gibi kapiller geçirgenlik markırlarının, IL-5 ve IL-8 gibi sitokinlerin, ECP gibi eozinofillerin toksik degranülasyon ürünlerinin ölçülebildiği gösterilmiştir (52,53). Ayrıca noninvaziv olan bu teknik güvenli, ucuz, iyi tolere edilebilir ve tekrarlanabilir bir yöntemdir (51,54). Bu tekniğin astmalı ve KOAH'lıların havayolu inflamasyonunun araştırılmasında geçerli ve klinik pratik değere sahip olduğu bildirilmiştir (55,56). Spontan olarak balgam verebilen olgularda indüksiyon gereksiz gibi görülebildiği halde çalışmalarda, spontan elde edilen balgamın sitospin kalitesi daha kötü, skuamöz hücre kontaminasyonu daha fazla ve en önemlisi canlı hücre sayısı daha az bulunmuştur. Hücre formülünün ise uyarılmış balgamla iyi ilişkili olduğu, ECP ve fibrinojen gibi mediyatörlerin biraz daha yüksek bulunduğu belirtilmiştir (57,58).

Astmalılarda UB ve bronkoskopi örneklerinin (biyopsi, BL; bronş lavajı, BAL; bronkoalveolar lavaj) karşılaştırıldığı çalışmalar, balgamdaki inflamatuvar göstergelerin havayolu inflamasyonunu yansıtabileceğini göstermektedir (53).

Uyarılmış balgam, daha çok büyük havayolları hakkında bilgi verir. KOAH'da uyarılmış balgam ile yapılan çalışmalarda havayollarının nötrofilik ve eozinofilik inflamasyonun değerlendirilebileceği gösterilmiştir. Nitekim Peleman ve ark.ları KOAH'lılarda UB'da nötrofillerin sağlıklı

olgulardan daha yüksek olduğunu ve havayolu obstrüksiyonu ile ilişkisini saptamışlardır (57).

Yapılan çalışmalarda UB ve BAL'da hücrelerin farklı olduğu ancak sıvı fazda bulunan markırlar hakkında BAL ile UB'de aynı sonuçlar elde edilmiştir(56).UB ile ekspiryum havası ve serum örneklerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda UB'nin daha değerli sonuçlar verdiği bildirilmiştir.

MATERYAL VE METOD

1/9/2001 ve 1/12/2001 tarihleri arasında Posta İşletmeleri Genel Müdürlüğü Eğitim Araştırma Hastanesi ve Sanatoryumu Göğüs Hastalıkları polikliniğinde izlenen 18 astmalı, 15 KOAH'lı, 16 bronşektazili hasta çalışmaya alındı. Kontrol grubunu 10 sigara içmeyen, sağlıklı çoğu hastane çalışanı gönüllüler oluşturdu.

Astma Hastaları:

1997 GINA (Global initiative for Asthma) Uzlaş Raporu kriterlerine uygun olarak seçildi (21).

- Öykülerinde tekrarlayan öksürük, nefes darlığı, göğüste tıkanıklık hissi, hırıltı, hışıltı şikayetlerinden biri veya daha fazlası olan;
- Şikayetleri gece veya sabaha karşı daha fazla;
- Egzersiz, viral infeksiyon, hayvanlarla temas, toz, parfüm kokusu, hava veya ısı değişimleri, mevsimsel değişimlerde şikayetleri artış gösteren;
- Reverzibilitesi predikte ve başlangıç değerine göre %12 veya daha fazla;
- Sabah ve akşam PEF takiplerinde %20 veya üzerinde PEF değişkenliği olan hastalar çalışmaya alındı.

Hastaların 13'ü kadın, 5'si erkekti. Olguların hiçbirisi sigara içmiyordu; 9'u ise pasif sigara içici idi. Diğer hastaların hiçbirinde sigara öyküsü yoktu.

Hastalar 2002 GINA Uzlaşı Raporuna göre 3'ü hafif, 15'i orta astma olarak değerlendirildi (59).

17 olguda öykü ve fizik muayene ile Allerjik Rinit ve Konka Hipertrofisi saptandı. KBB muayenesi normal olan iki hastadan biri mevsimsel rinit ve hapşırık nöbetleri tanımlıyordu, diğerinin hiçbir şikayeti yoktu.

24 bilinen antijene karşı prick yöntemi ile uygulanan deri testi 18 hastada en az bir allerjene karşı pozitif bulundu.

Hastaların 15'i çalışmadan 2 ay öncesine kadar inhale kortikosteroid kullanmaktaydı; hiçbirinde son üç ay içerisinde oral kortikosteroid kullanımı ve atak tanımlanmıyordu, 15 orta astmalı hastanın tedavisi kontrollü olarak kesildi. Diğer hastaların 4'ü ihtiyaç halinde kısa etkili inhale β 2 mimetik kullanan ve diğer şikayetleri nedeni ile göğüs hastalıkları polikliniğine yeni başvuran hastalardı.

Hastaların hiçbirinde akciğer malignitesi, kalp yetmezliği, inaktif akciğer tüberkülozu, kor pulmonale, diabetes mellitus gibi kronik hastalık yoktu.

KOAH Hastaları:

KOAH hastaları 2001 GOLD(Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) kriterlerine göre belirlendi(60).

- Öykülerinde sigara içiciliği ve/veya çevresel risk faktörleri, kronik öksürük ve balgam çıkarma şikayetleri (özellikle sabahları), hırıltı/ hışıltı

şikayetleri, akut ekzezbasyonlar ile öksürük balgam hırıltı/hışıltı ve nefes darlığında artış ve ilerleyici nefes darlığının bulunduğu;

- Fizik muayenelerinde oskültasyonda ekspiryum /zorlu ekspiryumda ronküs, ekspiryum uzaması gibi hava akımı obstrüksiyonu veya solunum sesleri ve kalp seslerinde hafifleme gibi amfizemi düşündüren bulguları olan;

- Akciğer radyografisinde malignite, aktif akciğer tüberkülozu vs gibi diğer hastalıklara ait bulguları olmayan hastalar çalışmaya alındı.

Hastaların 9'u erkek, 6'sı kadındı. 3'ü hiç sigara kullanmamış, 12'si ise sigarayı bırakmıştı (>3yıl).

Olgular 2001 GOLD kriterleri hastalık ağırlık derecesine göre sınıflandırıldığında tümü hafif grupta olarak değerlendirildi (FEV1/FVC<70% , FEV1≥80% ,kronik semptom (öksürük, balgam) var veya yok) (60).

2 hastada allerjik rinit ve 1 hastada deri prick testi (+)'liği ile atopi mevcuttu.

Hastaların 5'i düzenli inhaler bronkodilatör tedavi kullanmakta; 10'u sadece ekzezbasyonlarda öksürük şurubu ve inhaler tedavi kullanmaktaydı. 2 hastada iskemik kalp hastalığı öyküsü mevcut olup; hiçbirinde akciğer malignitesi, kalp yetmezliği, inaktif akciğer tüberkülozu, kor pulmonale, diabetes mellitus gibi kronik hastalık yoktu.

Bronşektazili Hastalar:

Öykülerinde bol balgam çıkarma ve öksürük şikayeti olan hastalara Siemens Somatom HiQ (Germany) aleti ile Toraks HRCT çekildi. HRCT scan kriterlerine göre bronşektazik değişiklikler belirlendi.

Fizik muayenede, bütün hastalarda oskültasyonda inspiratuar orta-kaba ve iki zamanlı raller duyuldu. Akciğer grafisinde ve Toraks HRCT'de malignite ,aktif akciğer tüberkülozu v.s. gibi hastalıklara ait bulguları olmayan olgular çalışmaya alındı.

Hastaların 7'si erkek ,9'u kadındı. 5'i sigara hiç içmemiş, 11'i sigarayı bırakmıştı (>3yıl). Hastaların hiçbirinde allerjik rinit yoktu. Prick testleri negatifti. Hastalar sadece alevlenme dönemlerinde antibiyotik ve öksürük şurubu kullandıklarını ifade ettiler.

Hastaların hiçbirinde akciğer malignitesi, kalp yetmezliği, inaktif akciğer tüberkülozu, kor pulmonale, diabetes mellitus gibi kronik hastalık yoktu.

Kontrol grubu hastane çalışanları ve gönüllülerden seçildi.Hiçbiri sigara içmiyordu. 6'sı erkek , 4'ü kadındı. Hastaların hiçbirinde prick test pozitifliği yoktu. Astma veya KOAH'ı düşündürecek semptom ve ek hastalık yoktu.

Olguların öyküleri alındıktan sonra solunum fonksiyon testleri (SFT) yapılarak akciğer volüm ve kapasiteleri, akım hızları, bronkodilatör yanıt, metakolin'e hava yolu duyarlılığı ölçüldü. Deri prick test sonuçları kaydedildi. Uyarılmış balgamları alınarak hazırlandı.

Deri testleri 24 bilinen antijene karşı, prick yöntemi ile uygulandı. Allerjenlerin göstermiş olduğu reaksiyonlar histamin ile kıyaslanarak değerlendirildi.Pozitif test reaksiyonu için çevresinde eritem olan ödemli alan değerlendirildi .Histamin reaksiyonunun iki katı (++++), Histamin reaksiyonu kadar (+++), Histamin reaksiyonunun yarısı (++) ,Histamin reaksiyonundan küçük fakat negatif reaksiyondan büyük (+) olarak değerlendirildi.

Tüm olgulara "JAEGER Computerized Pulmonary Function" aletinde ATS kriterlerine göre düzenlenmiş "Master LAB" komputer sisteminde FVC (Forced Vital Capacity; Zorlu Vital Kapasite), FEV₁ (Forced Expiratory Volume in one second; 1. saniyedeki zorlu ekspiriyum hacmi), FEV₁/FVC, PEF (Peak Ekspiratoy Flow; Zirve akım hızı), FEF₅₀ (Forced Expiratory Flow 50%; Zorlu Ekspiriyum akım hızı 50%) parametreleri değerlendirildi. Ölçümlerden 12 saat öncesinde olguların tüm ilaçları kesildi. Astmalıların inhale kortikosteroidleri (İKS) çalışmadan 3 hafta öncesinde kesilmişti. Testler aynı günde, aynı kişi tarafından sabah 8⁰⁰-9⁰⁰ arası hasta oturur pozisyonda iken yapıldı.

Bazal şartlarda 3 kez solunum fonksiyon testleri uygulanıp her 3 test arasında %5'ten az fark olduğu görülerek 200µgr (mikrogram) salbutamol volümatik ile uygulandı. Hastalar 15 dakika istirahat durumunda bekletildikten sonra üçer kez daha solunum fonksiyon testleri tekrarlandı. FEV₁'de beklenen değeri üzerinden %12'lik artış saptanan hastaların erken bronkodilatör yanıtı pozitif kabul edildi (Erken Reversibilite).

Metakolin Bronkoprovokasyon Testi

Metakolin ile provokasyon testi ATS'nin 1999 metakolin ve egzersiz provokasyon testleri rehberi esas alınarak yapıldı(61).

Bronkoprovokasyon testi aynı günde, aynı kişi tarafından sabah 8⁰⁰-9⁰⁰ arasında hasta oturur pozisyonda iken yapıldı. Bazal şartlarda 3 kez solunum fonksiyon testleri uygulanıp her 3 test arasında %5'ten az fark olduğu görülerek tidal volümde iki dakika serum fizyolojik inhale ettirildi; bulunan FEV₁ değeri bazal FEV₁ değerine göre %20'lik düşüş göstermediği takdirde teste devam edildi ve bu FEV₁ değeri başlangıç olarak alınarak

0,0625-0,125-0,25-0,50-1-2-4-8-16-32-64 mg/mL konsantrasyonlarda metakolin nebülizatör ile inhale ettirildi. Başlangıç FEV₁ değerine göre %20 ve daha fazla düşüş görülen konsantrasyonda test sonlandırıldı; bu konsantrasyon C₂; bu konsantrasyondaki % FEV₁ düşüşü R₂; bir önceki konsantrasyon C₁ ve bu konsantrasyondaki % FEV₁ düşüşü R₁ olarak alındıktan sonra;

$$PC_{20} = \text{antilog} \left(\log C_1 + \frac{(\log C_2 - \log C_1) \times (20 - R_1)}{R_2 - R_1} \right)$$

formülünden PC₂₀ değeri hesaplandı.

Toraks HRCT:

Klinik olarak bronşektazi düşünülen olgulara PTT Hastanesi radyodiagnostik bölümünde Siemens Somatom HiQ (Germany) aleti ile 1mm kesit kalınlığı, 15/20 mm interval, 20 cm. FOV, 225mAs ve 133kV, 1300-1500 HU pencere genişliği, -300 – -450 HU pencere seviyesi standartları kullanılarak, derin inspiryum sonunda, HRCT çekilerek HRCT kriterlerine göre bronşektazi varlığı ve yaygınlığı belirlendi.

Bronşektazide BT bulguları:

- 1) İnternal bronş çapının eşlik eden pulmoner arter çapından büyük olması
- 2) Bronşiyal incelmede bozulma
- 3) Bronşun kostal plevraya 1 cm.'den daha yakın olması
- 4) Bronşial duvarda kalınlaşma
- 5) Bronşun mediastinal plevraya yaklaşması(28,29).

Uyarılmış Balgamın Alınması ve Hazırlanması:

Hastalar bronş provakasyon testinden en az 48 saat sonra balgam tetkiki için tekrar kliniğe çağrıldılar. Uyarılmış balgam tekniği küçük değişiklikler ile Pavord ve ekibinin metoduyla uygulandı (52). PEF ölçümünü takiben hastalara 200 µg salbutamol inhale ettirildi ve ardından ultrasonik nebulizatör (Devlbiss Ultra-Neb 2000) ile % 5 NaCl (Hipertonik tuzlu su) inhalasyonu yaptırıldı. Başlangıçta 10 dk sürekli inhalasyon yaptırıldı. Bu dönemde hasta öksürük hissederse, ağzını ve boğazını suyla temizleyip suyu yutması ve gelen balgamı steril bir tüpe toplaması istendi. Eğer öksürük hissi gelmemişse 5'er dakikalık sürelerle inhalasyona devam edildi(yeterli balgam alınana kadar veya maksimum 30 dk). Arada sırtlarına yapılan masajla kendilerine yardımcı olunup öksürtülmeye çalışıldı. Test sırasında, 5'er dakikalık periyodların arasında ve hasta rahatsızlık hissettiğinde PEF ölçümleri yapıldı. Değerlerdeki düşme %10'un altındaysa işleme devam edildi. %10-20 arasında düşme olursa salbutamol inhalasyonu, %20'den fazla düşme olduğunda işleme son verilmesi planlandı. Hastalarımızın hiçbirinin PEF takibinde %20'den fazla düşme olmadı. Hastalardan yaklaşık 2-7,5 ml arası balgam elde edildi. Steril plastik kaptaki toplanan balgamın tahta çubuk yardımı ile tükürük kısmı ayıklanarak 4 katı kadar %0,1'lik Dithiothreitol (DTT) ilave edildi. Balgamdaki mukusu, disülfid bağlarını çözerek eriten, hücrelerin daha iyi değerlendirilmesini sağlayan bu çözeltinin, hücre formülü ile ECP, sitokinler ve fibrinojen gibi markerları etkilemediği gösterilmiştir (64). Balgam ile DTT karışımı 15 sn süre ile Vorteks mikserde karıştırıldı. Karışım daha sonra 37° C'lik Ben-Mari'de, 5 dk'da bir vorteks mikserde karıştırılarak 15 dk bekletildi. Karışıma daha önce eklenen DTT kadar D-PBS (Dulbeko's phosphate buffered saline) eklendi. Vorteks mikser'de tekrar karıştırıldı. Yaklaşık

1mm'lik delikleri olan naylon bezden süzüldü. Santrifüjde 590g'da 4°C'de 5 dakika çevrildi. Üstte kalan balgamın süpernatant kısmı ayrıldı ve ependorf tüplerde -20°C'de saklandı. I.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim dalına Nitrit, nitrat, 3NT ölçümü için gönderildi. Burada nitrit /nitrat düzeyleri Griess reaksiyonu, 3NT düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü.

Hücre pelleti ise 50 mikrolitre BSA ile karıştırıldı, üzerine 2ml.D-PBS eklendi. Bu sıvının 75 mikrolitresi sitosantrifüj için kullanıldı. 500 rpm'de düşük deselerasyonda 5 dakika santrifüj edildikten sonra havada kurutuldu. May Grünwald-Giemsa ile boyanıp ışık mikroskopunda hücre farklılığı değerlendirildi. Her hastada 200 adet skuamöz olmayan hücre sayıldı. Skuamöz hücre oranı %80'nin üzerinde olan preparatlar geçersiz sayıldı.

Daha önceden -20° C'de saklanmış UB örneklerinde Griess yöntemine dayanan Roche kiti ile nitrit ve nitrat tayinleri yapıldı. Total nitrit ve nitrat (NO) tayininde numune nitratı tamponlu ortamda NADPH varlığında, nitrat redüktaz ile, nitrite indirgenip, sülfanilamid ve N-(1-naftil) etilendiamin renk reaktifleri ilavesi ile renkli diazo bileşiği oluşturularak, yalnız distile su ve reaktifleri içeren körüne karşı 520nm.'de absorbansı spektrofotometrik olarak ölçüldü (65,66).

NT Yöntemi

Nitrotirozin ELISA ile nitrozillenmiş proteinlerin kantitatif ölçümü yapılır. Kitin minimum tayin düzeyi 2nM ve ölçülebilen konsantrasyon aralığı da 2-1.500nM'dir.

Yöntem; sandwich ELISA prensibine dayanmaktadır. Numuneler ve standartlar antikor kaplı kuyucuklarda inkübe edilir. Bu inkübasyon sırasında nitrotirozin solid bağlı antikor tarafından tutulur. Bağlanmış

materyal, yıkama ile uzaklaştırılır ve ardından biotinlenmiş ikinci antikor (tracer) kuyucuğa eklenir. Eğer numunemizde nitrotirozin varsa tracer antikorlar bağlanacaktır. Ardından tracer yıkanarak uzaklaştırılır. Kuyucuklara streptavidin-peroksidaz konjugatı eklenir ve bu konjugat nitrotirozinlere bağlanmış biotinlenmiş tracerler ile reaksiyona girer ve yine fazla streptavidin-peroksidazlar yıkanarak uzaklaştırılır. Kuyucuklara tetrametilbenzid (TMG) eklenir. Numunede bulunan nitrotirozin miktarı ile orantılı olarak renk oluşturmaya başlar. Enzim reaksiyonu ortalama sitrik asit ile durdurulur, ve 450 nm de absorbar ölçülür. Standartlar ve konsantrasyonlar kullanılarak standart eğri çizilir ve numunelerin nitrotirozin miktarları eğri üzerinden hesaplanır.

İstatistiksel İncelemeler

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 10.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında Oneway Anova, Tukey HSD testi, Kruskal Wallis Varyans Analizi, Mann Whitney U test ve Student t testi kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi kullanıldı. İlişki katsayılarını değerlendirmede Sperman Korelasyon Analizi uygulandı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

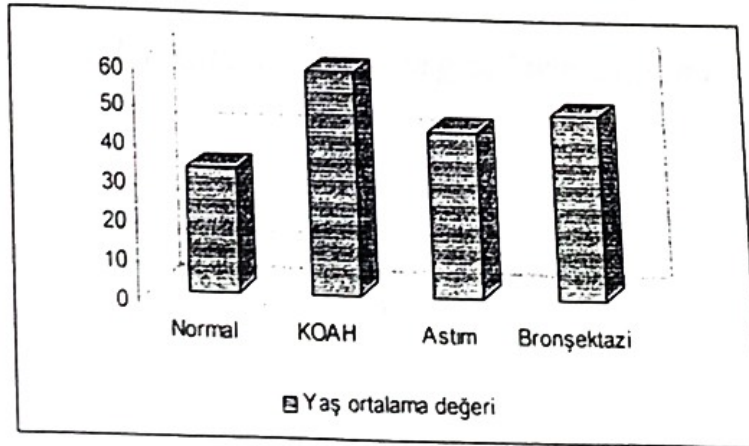
BULGULAR

Çalışma 1/9/2001 ve 1/12/2001 tarihleri arasında Ulaştırma Bakanlığı PTT Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göğüs Hastalıkları Kliniğinde izlenen 15 KOAH'lı (6K,9E), 18 astmalı (13K,5E), 16 bronşektazili (11K,5E) ve 10 sigara içmeyen sağlıklı (5K,5E) olmak üzere toplam 59 olgu çalışmaya alındı.

Tablo III: Grupların yaş ortalamalarına göre dağılımı

| | n | Yaş(yıl) | p |
|-------------|----|---------------|-----------------|
| Normal | 10 | 32,30 ± 7,72 | 0,001 p<0,01 |
| KOAH | 15 | 58,20 ± 10,67 | |
| Astma | 18 | 43,11 ± 8,19 | |
| Bronşektazi | 16 | 47,82 ± 14,52 | |

Sağlıklı olgular en küçük, KOAH'lılar en yüksek yaş ortalamasına sahipti. Astmalı ve sağlıklı olguların yaş ortalaması arasında anlamlı farklılık mevcuttu(p<0.01).

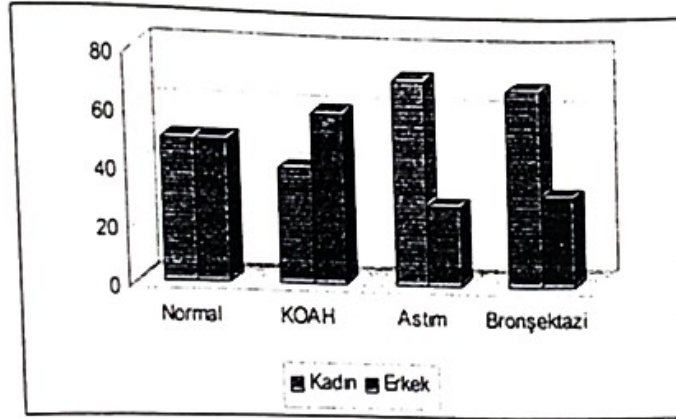


Şekil 7: Yaş ortalamalarına göre grupların dağılımı

Tablo IV: Cinsiyetlere göre grupların dağılımı

| | Kadın | Erkek | p |
|-------------|------------|-----------|-----------------|
| Normal | 5 (%50,0) | 5 (%50,0) | 0,211 p>0,05 |
| KOAH | 6 (%40,0) | 9 (%60,0) | |
| Astma | 13 (%72,2) | 5 (%27,8) | |
| Bronşektazi | 11 (%68,8) | 5 (%31,3) | |

Cinsiyet dağılımlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Yaş ve cinsiyet dağılımları hastalıkların demografik özellikleri ile uyumluydu.



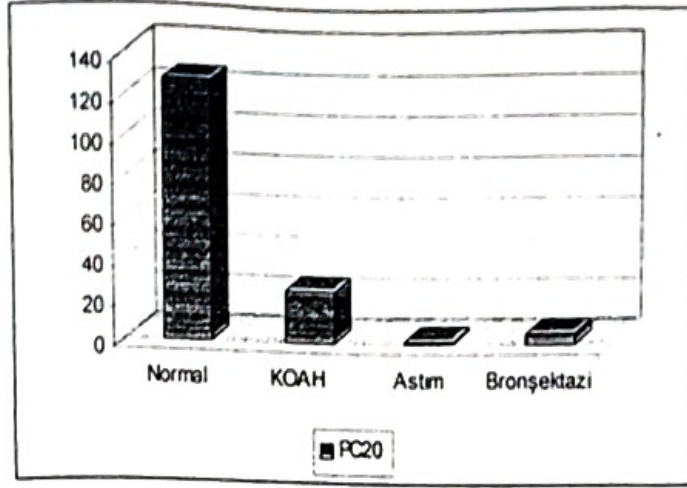
Şekil 8: Cinsiyetlere göre grupların dağılımı

Tablo V : Grupların UB makrofaj ,lenfosit,eozinofil ,nitrat,NT düzeyleri ve PC20 metakolin ortalamaları.

| | Normal | KOAH | Astma | Bronşektazi | p |
|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------|
| PC20(mg/ml) | 128,0 ± 0,00 | 25,0 ± 24,14 | 1,16 ± 1,42 | 5,63 ± 4,16 | 0,001** |
| Nitrat (nM/L) | 65,39 ± 8,52 | 40,90 ± 6,85 | 39,96 ± 10,76 | 51,15 ± 10,07 | 0,001** |
| 3NT(nM/L) | 7,19±5,05 | 19,02 ± 12,51 | 6,81 ± 5,62 | 22,04 ± 15,67 | 0,001** |
| UB makrofaj(%) | 67,00 ± 14,81 | 61,53 ± 13,46 | 60,39 ± 9,56 | 47,37 ± 21,22 | 0,041* |
| UB nötrofil(%) | 27,00 ± 15,32 | 35,93± 6,66 | 24,44± 7,32 | 41,81 ± 22,78 | 0,005** |
| UB Lenfosit(%) | 3,10 ± 1,28 | 4,93 ± 4,23 | 4,83 ± 6,29 | 5,87 ± 14,53 | 0,570 |
| UB Eozinofil(%) | 2,90 ± 0,99 | 4,00± 2,47 | 10,83± 6,37 | 4,87 ± 2,60 | 0,001** |

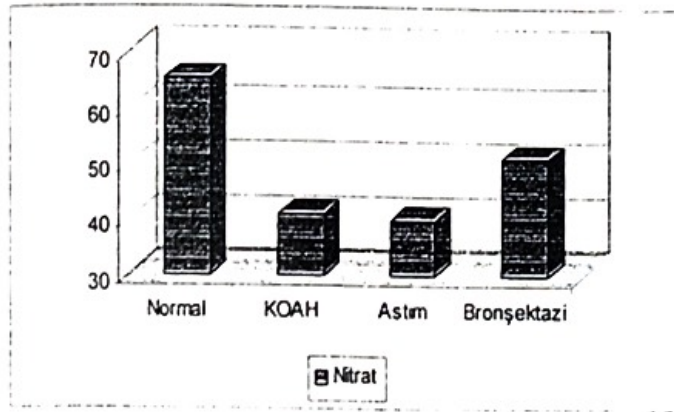
* p<0,05 anlamlı; **p<0,01 ileri düzeyde anlamlı

KOAH, bronşektazi ve astma grupları karşılaştırıldığında ise; PC20 (met) düzeyi KOAH'lılarda en yüksek ,astmalılarda en düşük olmak üzere anlamlı olarak farklı bulundu (p<0,01). PC20 (met) değeri; sağlıklılarda tüm gruplardan anlamlı derecede yüksekti (128 ± 0.00 mg/ml) (p<0,01). Astmalı hastaların hepsinin PC20 metakolin değeri 2 mg/ml'nin altındaydı.



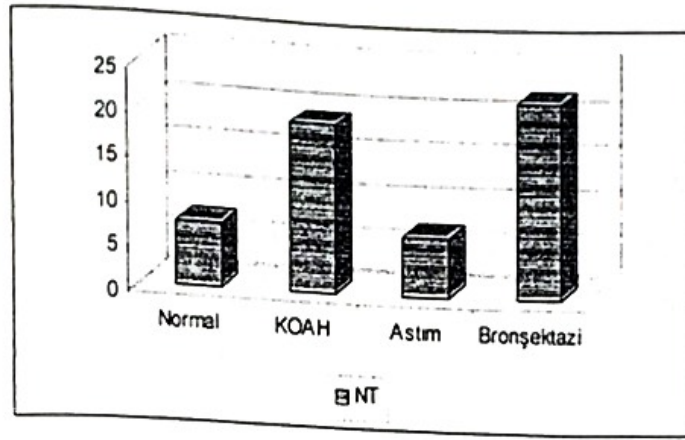
Şekil 9: Grupların PC20(met) düzeyine göre dağılımı

Nitrat düzeyleri gruplar arasında ileri düzeyde anlamlı farklılık gösterdi ($p < 0,001$). KOAH, astma ve bronşektazi gruplarının nitrat düzeyleri normal gruba göre anlamlı derecede düşüktü (sırasıyla, KOAH $40,90 \pm 6,85$, astma $39,96 \pm 10,76$, bronşektazi $51,15 \pm 10,07$, sağlıklı $65,39 \pm 8,52$ nM/L) ($p < 0,01$). Astma grubunun nitrat düzeyi ortalaması bronşektazili grupla karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük bulundu ($p < 0,01$). KOAH ile astma gruplarının nitrat düzeyleri arasında ise anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,059$).



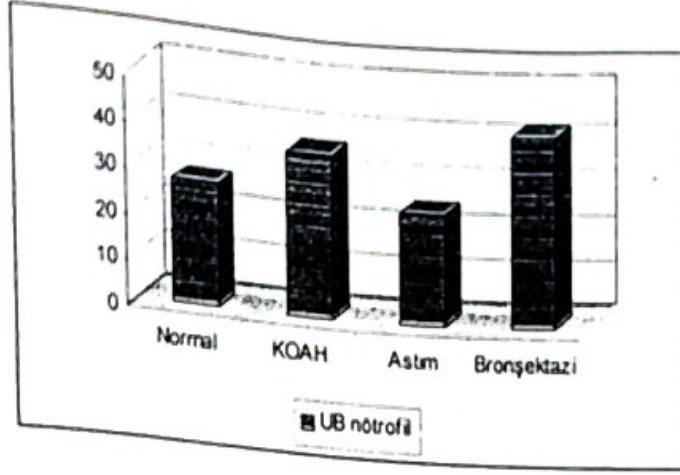
Şekil 10: UB Nitrat düzeylerine göre dağılım grafiği

Nitrotirozin düzeyleri gruplar arasında ileri derecede anlamlı farklılık gösterdi ($p<0,01$). KOAH($19,02\pm12,51$ nM/L) ve bronşektazili ($22,04\pm15,67$ nM/L), hastaların nitrotirozin düzeyi normal gruba göre anlamlı derecede yüksekti ($p<0,01$). Normal grup ($7,19\pm 5,05$ nM/L) ile astmalı hastaların ($6,81\pm5,62$ nM/L) nitrotirozin düzeyleri arasında ise anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Astma grubunun nitrotirozin düzeyi ortalaması bronşektazi grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,01$).



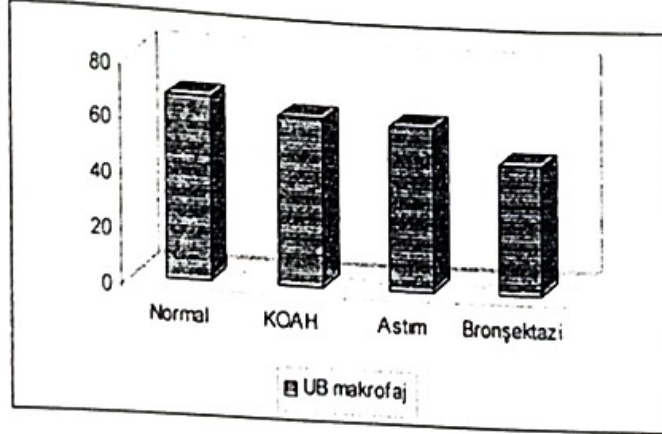
Şekil 11:UB Nitrotirozin düzeylerine göre grupların dağılımı

Nötrofil düzeyleri gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdi ($p<0,01$). KOAH ve Bronşektazi olgularının nötrofil düzeyleri diğer gruplardan anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,01$) (Sırasıyla KOAH $\%35,93\pm6,66$, bronşektazi ($\%41,81\pm22,78$). Astmalı olgular ile sağlıklıların, KOAH'lılarla ve bronşektazi olgularının nötrofil düzeyleri arasında ise anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). Sırasıyla astma $\%24,44\pm7,32$, sağlıklı $\%27,00\pm15,32$).



Şekil 12: UB nötrofil ortalamasına göre grupların dağılımı

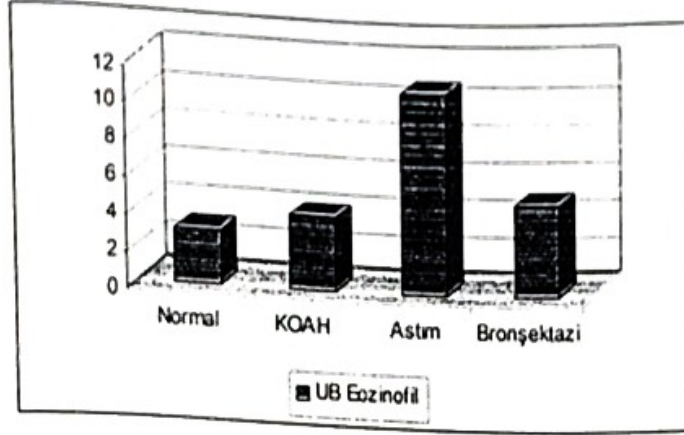
Makrofaj düzeyleri gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdi ($p < 0,05$). Bronşektazi grubunun makrofaj düzeyi normal gruba göre anlamlı derecede düşüktü ($p < 0,05$). Normal, KOAH ve astma grubunun makrofaj düzeyleri arasında ise anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$).



Şekil 13: Grupların UB makrofaj düzeyi ortalamalarına göre dağılımı

Lenfosit düzeyleri gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi ($p > 0,05$). En yüksek lenfosit düzeyi bronşektazi olgularında görülmesine rağmen diğer gruplarla anlamlı farklılık bulunamadı ($p > 0,05$).

Eozinofil düzeyleri gruplar arasında ileri düzeyde anlamlı farklılık gösterdi ($p<0,01$). Astmalı hastaların eozinofil düzeyi ($\%10,83\pm6,37$) en yüksek olup diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösterdi ($p<0,01$).



Şekil 14: UB Eozinofil düzeyi ortalamalarına göre dağılım grafiği

Tablo VI: Grupların UB Nitrat ve nitrotirozin düzeyleri ile PC20 (met) arasındaki ilişki

| | Nitrat | Nitrotirozin |
|------------------------------|----------------------|-----------------------|
| KOAH PC20(met)(mg/ml) | $r= 0,494; p=0,061$ | $r= -0,009; p=0,971$ |
| Astma PC20(met) (mg/ml) | $r= -0,096; p=0,704$ | $r = 0,392; p= 0,148$ |
| Bronşektazi PC20(met)(mg/ml) | $r= 0,160; p=0,554$ | $r= -0,081; p=0,766$ |

KOAH grubunda; PC20(met) ile nitrat arasında pozitif yönde orta düzeyde fakat istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir ilişki mevcut iken ($p>0,05$), PC20 (met) ile nitrotirozin grubu arasında ilişki bulunamadı.

Astma grubunda; PC20(met) düzeyi ile nitrat düzeyi arasında anlamlı bir ilişki bulunmazken ($p>0,05$), Nitrotirozin ile pozitif yönde orta düzeyde fakat istatistiksel olarak anlamlı olmayan ilişki mevcuttur ($p>0,05$).

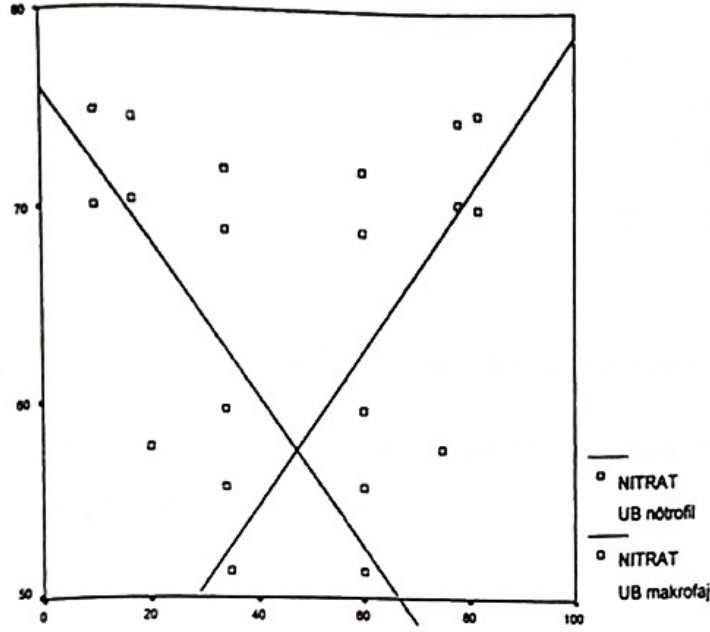
Bronşektazi grubunda; PC20(met) düzeyi ile nitrat ve nitrotirozin düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p>0,05$).

Tablo VII: Grupların UB hücre (makrofaj, nötrofil, eozinofil) ile NT, nitrat ilişkisi

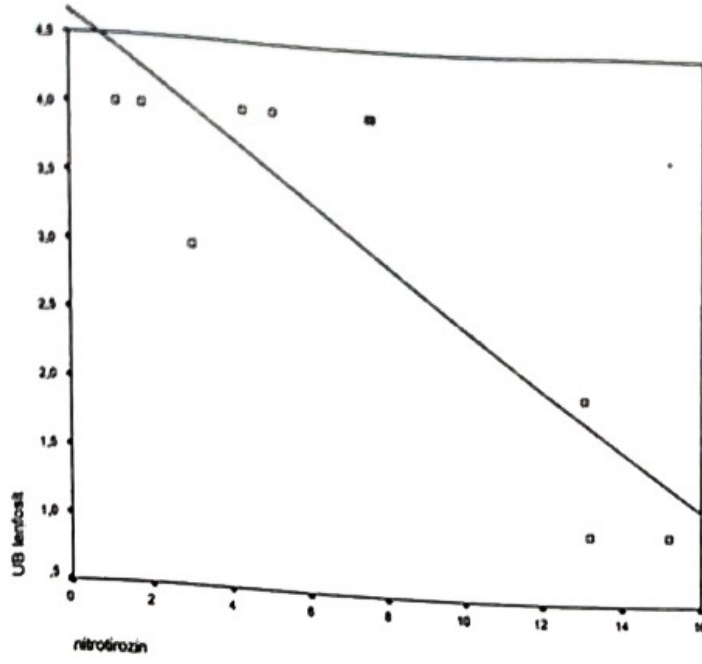
| | | UB makrofaj | UB nötrofil | UB lenfosit | Eozinofil |
|-------------|------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Normal | Nitrat (nM/L) | $r=0,697$ $p=0,025^*$ | $r=-0,704$ $p=0,023^*$ | $r=-0,056$ $p=0,878$ | $r=0,542$ $p=0,106$ |
| | 3NT (nM/L) | $r=-0,204$ $p=0,572$ | $r=0,244$ $p=0,497$ | $r=-0,847$ $p=0,002^{**}$ | $r=0,383$ $p=0,275$ |
| KOAHA | Nitrat (nM/L) | $r=0,089$ $p=0,753$ | $r=-0,243$ $p=0,382$ | $r=0,018$ $p=0,949$ | $r=0,027$ $p=0,923$ |
| | 3NT (nM/L) | $r=-0,242$ $p=0,385$ | $r=0,082$ $p=0,771$ | $r=-0,229$ $p=0,411$ | $r=-0,537$ $p=0,039^*$ |
| ASTMA | Nitrat (nM/L) | $r=0,253$ $p=0,312$ | $r=0,012$ $p=0,962$ | $r=-0,123$ $p=0,626$ | $r=-0,227$ $p=0,365$ |
| | 3NT (nM/L) | $r=0,131$ $p=0,642$ | $r=-0,005$ $p=0,987$ | $r=-0,183$ $p=0,513$ | $r=-0,428$ $p=0,112$ |
| Bronşektazi | Nitrat (nM/L) | $r=0,386$ $p=0,140$ | $r=-0,313$ $p=0,238$ | $r=-0,341$ $p=0,196$ | $r=-0,061$ $p=0,822$ |
| | 3NT (nM/L) | $r=0,075$ $p=0,781$ | $r=-0,133$ $p=0,623$ | $r=-0,005$ $p=0,987$ | $r=-0,702$ $p=-0,002^{**}$ |

* $p<0,05$ anlamlı; ** $p<0,01$ ileri düzeyde anlamlı

Normal grupta nitrat ile UB makrofaj arasında pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı bulunan bir ilişki mevcuttu ($p<0,05$). UB nötrofil ile ise; negatif yönde anlamlı ilişki bulundu ($p<0,05$). Nitrotirozin ile UB lenfosit arasında negatif yönde ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı ($p<0,01$).

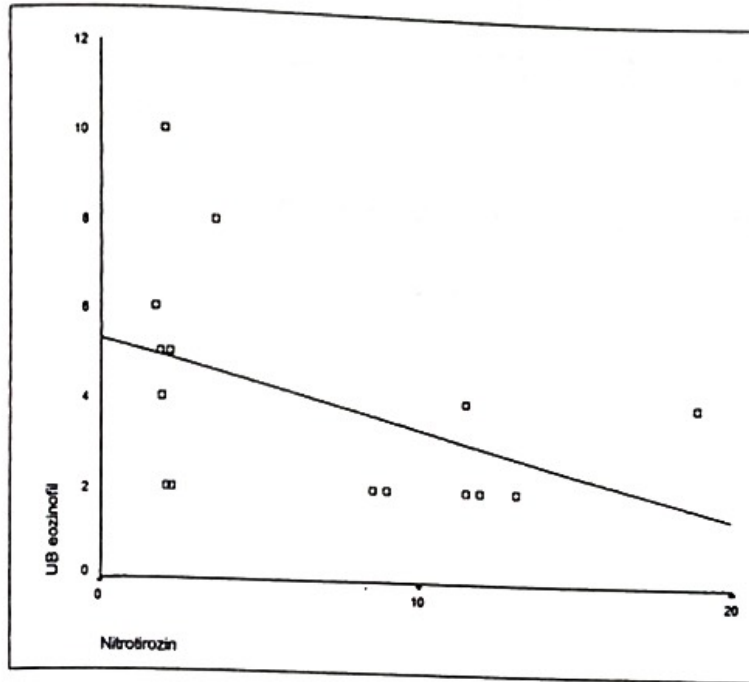


Şekil 15: Normal grupta UB Nitrat ile makrofaj ve nötrofil arasındaki ilişki durumu



Şekil 16: Normal gruptaUB'de Nitrotirozin ile lenfosit arasındaki ilişki

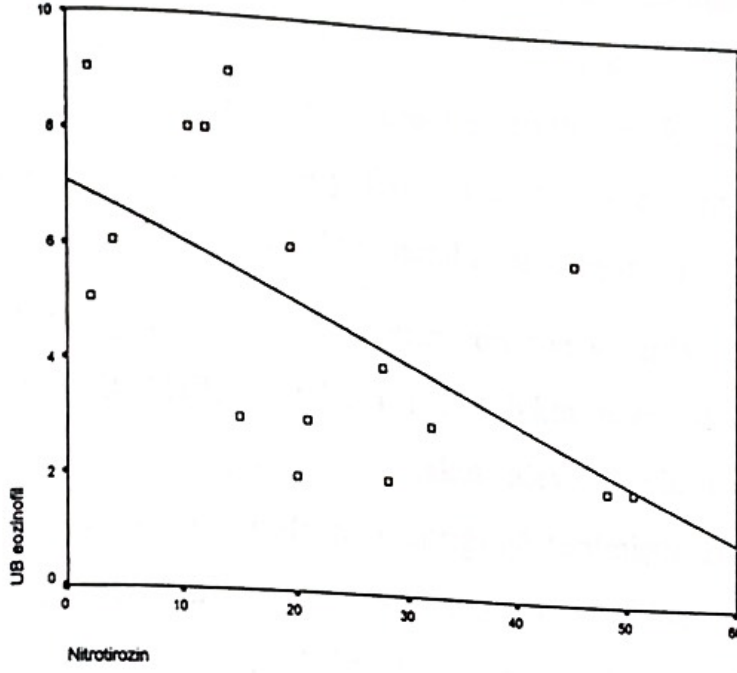
KOAH grubunda nitrotozin ile eozinofil arasında negatif yönde istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı ($p < 0,05$).



Şekil 17 : KOAH'lı hastalardaUB'de nitrotozin ile eozinofil arasında ilişki durumu

Astma grubunda ; nitrat ve nitrotozin ile UB makrofaj, nötrofil, lenfosit ve eozinofil arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmedi ($p>0,01$).

Bronşektazi grubunda ise; Nitrotozin ile UB eozinofil arasında negatif yönde istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundu($p<0,01$).



Şekil 18: Bronşektazi hastalarında UB'de nitrotozin ile eozinofil arasında ilişki grafiği

TARTIŞMA

Astma, KOAH, Bronşektazi, Kistik Fibrozis, İnterstisyel akciğer hastalığı gibi pek çok hava yolu hastalığının ortak patofizyolojik özelliği oksidatif stres ve kronik inflamasyondur (11). Oksidatif stres oksidanlara artmış maruziyet ve/veya antioksidan kapasitesinde azalma olarak tanımlanır (46,47). Buna bağlı olarak inflamasyonla ilişkili akciğer hasarı gelişir. Çeşitli inflamatuvar hücrelerden üretilen ROS ve RNS ile oluşan reaksiyonlar sonucunda solunum yollarında sitotoksik etkiler, DNA hasarı, enzim inhibisyonları ve neticede doku harabiyeti oluşur (2).

KOAH patogeneğinde oksidanların yeri son yıllarda gittikçe artarak tartışılmaktadır. KOAH'lı hastaların her solukta normalden daha fazla hidrojen peroksit(H_2O_2) çıkarttıkları ,akut alevlenmede reaktif oksijen radikali olan H_2O_2 miktarının daha da arttığı gösterilmiştir. Bu sonuca göre KOAH'lı hastalarda akciğerdeki inflamasyonla birlikte reaktif oksijen radikallerinin artışına bağlı oksidatif stresin arttığı söylenebilmektedir. Oksidan stresin kaynağının lökositler olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (11,67,68). Bu sonuç KOAH, bronşektazi gibi hastalıkların alevlenmesinde bakteriyel infeksiyonlarda oksidatif stresin artışının işaretidir.

Son yıllarda akciğer hastalıklarının seyrinde inflamasyon ve oksidatif stresin izlenmesinde ekspirasyon havasında çeşitli gazların ölçümü gündemdedir(11). Nitrik oksit (NO), ekspirasyon havasında en sık çalışılan madde olmasına karşın, ekspirasyon havasında ölçülebilen tek inflamasyon göstergesi değildir. Diğer bazı uçucu gazların (karbon monoksit, etan, pentan) ve mediyatörlerin de (hidrojen peroksit, nitrit/nitrat, isoprostanlar) inflamasyonun göstergesi olarak kullanılabileceği, inflamasyonun

yorumlanmasında NO ile beraber değerlendirildiklerinde tamamlayıcı olduklarına dair yayınlar vardır.

Ekspiryum havasında NO ölçümü Astma, KOAH, Bronşektazi gibi hastalıkların izlenmesinde ve ayırıcı tanısında sıklıkla kullanılır ve hava yollarındaki inflamasyon hakkında bilgi verir, ancak akciğer dokusundaki inflamatuvar olaylar hakkında yeterli bilgi sağlamaz (11). NO yolağında peroksinitrit üzerinden oluşan 3NT ise hem dokuda hem de yoğunlaştırılmış solunum havasında ölçülebilir, NO ve NO metabolitleri sonucu gelişen inflamasyonu ve epitel hasarını yansıtır(2,4,7). Bu nedenle belirli olaylarda peroksinitrit, nitrojendioksit ve diğer nitrojen türlerinin yer aldığı bir göstergesi ve oksidatif stresin bir marker'ı olarak 3NT kullanılabilir (7).

Bu çalışmada orta persistan ağırlık derecesinde astmalı, hafif KOAH'lı ve stabil bronşektazili olgularda UB örneklerinde NO(nitrit/nitrat), 3NT ölçümleri yapılarak UB hücreleri ile ilişkileri ve ayırıcı tanıdaki yerleri araştırıldı.

Olguların 18'i atopik astmalı, 15'i KOAH'lı, 16'sı bronşektazili idi.Hiçbiri sigara içmiyordu. Daha önce steroid tedavisi alan olguların ilaçları kontrollü olarak 3 hafta öncesinde kesilmişti. Öykü, fizik muayene ve laboratuvar bulguları gözden geçirilerek stabil durumdaki hastalara Metakolin Bronkoprovakasyon testleri uygulandı.Bronşektazili hastalarda Toraks HRCT ile tanıları doğrulandı.

PC20(metakolin) değeri hava yolu inflamasyonunun eşlik ettiği üç hastalık grubunda da astmalılarda en belirgin olmak üzere normaller ile karşılaştırıldığında ileri derecede anlamlı düşüktü (KOAH $25,0 \pm 24,14$, astma $1,16 \pm 1,42$, bronşektazi $5,63 \pm 4,16$.normal $128 \pm 0,00$ mg/ml)

($p < 0.001$). Bu sonuç tüm hastalık gruplarında BHR'nin varlığını yansıtmaktaydı.

Uyarılmış balgam NO(nitrit/nitrat) düzeyi bronşektazi, KOAH ve astmalılarda normallerden anlamlı düşük bulunurken ($p < 0.01$), hastalık grupları karşılaştırıldığında KOAH ve astmalılarda benzerdi (KOAH $40,90 \pm 6,85$, astma $39,96 \pm 10,76$, bronşektazi $51,15 \pm 10,07$, sağlıklı $65,39 \pm 8,52$ nM/L). Bu sonuç, UB NO ürünlerinin hastaları sağlıklılardan ayırabildiğini, ancak KOAH – astma ayırımı yapamadığını düşündürdü.

Uyarılmış balgam'da 3NT düzeyleri değerlendirildiğinde ise astmalılarda düşük, KOAH ve bronşektazililerde yüksek bulundu, gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttu (KOAH $19,02 \pm 12,51$, astma $6,81 \pm 5,62$, bronşektazi $22,04 \pm 15,67$, sağlıklı $7,19 \pm 5,05$ nM/L) ($p < 0.001$). KOAH ve bronşektazililerde, normaller ile karşılaştırıldığında anlamlı yüksek 3NT değerleri saptandı ($p < 0.01$). Bu sonuçlar UB NO'nun KOAH - astma ayırımını yapamazken UB NT'nin hem astmalıları KOAH'lılardan hem de bronşektazi ve KOAH'lıları normallerden ayırt edebileceğini gösterdi.

Ichinose ve arkadaşlarının KOAH ve astmalılarda UB'de inflamatuvar hücrelerdeki iNOS immunoreaktivitesine baktıkları ve immun boyama tekniği kullanılarak 3NT tayini yaptıkları çalışmalarında her iki hastalıkta da iNOS reaktivitesini benzer bulurken, NT immunopozitif hücreler KOAH'lılarda astmalılardan anlamlı yüksek bulunmuştur(4).

Klinik pratikte hava yolu inflamasyonunun eşlik ettiği akciğer hastalıklarının takibinde ve tedaviye yanıtı değerlendirmede ENO ölçümü, pratik, hasta uyumunun iyi olduğu ve hastalığın ağır formlarında da kullanılabilecek noninvaziv ancak pahalı bir yöntemdir. ENO başta astma

olmak üzere pek çok akciğer hastalığında üzerinde en sık çalışılan inflamatuvar bir göstergedir. ENO'yu nefes tutma, egzersiz, hiperventilasyon, üst ve alt solunum yolu enfeksiyonları, astma, bronşektazi, kistik fibrozis, allerjen provokasyonuna geç yanıt artırırken; pulmoner hipertansiyon, Kartagener sendromu gibi hastalıklar ve sigara içimi glukokortikoidler, antilökotrienler ve NOS inhibitörleri azaltmaktadır (11). Astmanın tersine stabil KOAH'da ENO artmadığından ayırıcı tanıda faydalı olabileceği düşünülmüştür (71). İn hale steroid tedavisi sonrasında ENO'nun normal düzeylere düştüğü bu düşüşün giderek devam ettiği ve inhale steroidlerle tedavi edilen astmalılarda biyopsi çalışmalarında havayolu epitel hücrelerinde iNOS ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir(17). Kharitanov ve ark.'nın çalışmasında steroid dozu azaltıldığında astmalı hastalarda NO'da spirometri ya da PEF değişkenliğinde anlamlı değişiklik olmaksızın artış, doz artırıldığında ise düşüş gözlenmiştir (70). Subklinik astmanın bir göstergesi olarak semptomlar gelişmeden önce deri testlerinin pozitifleşmesi ile eş zamanlı ve atağın bir habercisi olarak ENO artmış olarak tespit edilebilmektedir(11).

Stabil KOAH'lı hastalarda ve kronik bronşitlilerde ölçülen ENO sigara içen ya da içmeyen astmalılardan düşük, normallerle ise benzer düzeyde bulunur (11). Sigaranın etkileri yanında KOAH'lılarda ENO'nun düşük oluşu inflamasyonun astmaya göre daha periferik yerleşimli olduğunu ve artmış oksidatif stresin NO'yu peroksinitrit oluşumuna neden olarak tükettiğini gösterebilir (11,14,15). Ayrıca KOAH'lılarda küçük havayollarındaki şiddetli hava akımı kısıtlılığı ve ekspiryumun kademeli oluşu ölçülen ENO'nun aslından daha düşük düzeylerde yorumlanmasına neden olur(11,15). KOAH'da artmış düzeyde bulunan IL8 de nötrofillerden süperoksit anyonu salınımını artırır, böylece NO ve ürünleri peroksinitrit

döngüsüne kaydırılır (4,15). Stabil olmayan KOAH'lılarda ise ENO düzeyleri stabil sigara içen KOAH'lılardan ya da sigarayı bırakmış KOAH'lılardan yüksektir. Bunun nedeni artmış nötrofilik inflamasyon ve oksidan/antioksidan dengesizliğidir(11). KOAH alevlenmeleri sırasında iNOS ekspresyonu gösteren eozinofiller tespit edilmiştir ve NO üretiminden sorumludur ,ayrıca alevlenmeler sırasında oluşan asidoz da NO salınımını artırır.Aksine kor pulmonalesi olan KOAH'lılarda bozulmuş endotelial NO salınımına bağlı ENO düzeyleri düşüktür. Kortikosteroid yanıtı olan küçük bir KOAH grubunda UB'de eozinofil oranı artmıştır, bu hastalarda aynı zamanda ENO da yüksektir.Bu çalışma sonucunda uzun dönem inhale kortikosteroid(İKS) tedavisine hangi KOAH'lıların yanıt verebileceğini belirlemede ENO faydalı olabilir yorumu yapılmıştır (11).

Bronşektazili olgularda da ENO artmıştır, bu artış BT skoru ile ölçülen hastalığın yaygınlığı ile ilişkili bulunmuştur. Bronşektazide görülen bronşiyal sepsis varlığında bakteriyel endotoksinler ve sitokinler de iNOS ekspresyonunu indükleyerek NO üretimini arttırabilir. Astmalılarla benzer şekilde İKS alan hastalarda ENO artışı görülmez ve bu da ENO'nun bronşektazide alt solunım yollarındaki aktif inflamasyonu yansıtabileceğini düşündürmektedir. Bronşektazili hastalarda akciğerlerde artmış iNOS ekspresyonu gösterilmiştir. Stabil bronşektazili olgularda normaller ile karşılaştırıldığında ENO'nun artmadığı ENO'nun visköz havayolu sekresyonlarına bağlı hapsedildiği ya da ROS'lar ile reaksiyonuna bağlı ortamdan uzaklaştırıldığı sonucuna varılmıştır (11). Kanazava ve ark.'nın astmalı olgularda UB'de NO ürünleri olan nitrit/nitrat düzeylerini normaller ile karşılaştırdıklarında anlamlı yüksek ve UB eozinofil sayısı ve ECP düzeyi ile ilişkili bulmuşlardır. Bu bulgunun klinik önemi astmada havayollarındaki allerjik inflamasyonun değerlendirilmesinde UB'de NO tayininin yararlı bir

gösterge olarak kullanılabilirliği(9). Aynı ekibin astma'lı ve KOAH'lı olgularda NO üretimini inceledikleri çalışmalarında ,KOAH'lılar ile karşılaştırıldığında astmalılarda anlamlı derecede yüksek ENO düzeyleri saptanmıştır. Ancak UB'de normaller ile karşılaştırıldığında hem astmada hem de KOAH'da daha yüksek düzeylerde NO ürünleri elde edilmiştir. Sadece astmalılarda UB NO ile ENO düzeyi ilişkili bulunmuştur ve bu ilişki KOAH'lılarda gösterilememiştir. KOAH'lılarda UB nötrofiller ile NO arasında ilişki bulunmuştur. Sonuç olarak endojen NO üretiminin hem astma hem KOAH'lılarda arttığı ancak KOAH'lılarda havayolu inflamasyonunun değerlendirilmesinde UB NO'nun ENO'dan daha değerli olduğu gösterilmiştir (12). Ichinose ve ark.'nın KOAH ve astmalı hastalarda UB çalışmasında 3NT düzeyi KOAH'lılarda astmalılardan anlamlı derecede yüksek, iNOS aktivitesi her iki grupta benzer, ENO ise astmalılarda yüksek KOAH'lılarda normaller ile benzer bulunmuştur (12).

Bizim çalışmamızda da UB NO ürünlerinin düzeyleri astma ve KOAH'lılarda benzer bulunurken hücresel düzeyde reaktivite değerlendirilmemesine rağmen UB 3NT düzeyleri KOAH'lılarda astmalılardan daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada UB hücre formülü değerlendirildiğinde nötrofiller KOAH ve bronşektazililerde, astmalı ve sağlıklılardan anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0.01$). KOAH ve bronşektazili olgularda UB nötrofil sayıları benzerdi ($p > 0.05$) Eozinofiller ise astmalılarda tüm gruplardan belirgin yüksekti ($p < 0.01$) ve gruplar arasında ileri derecede anlamlı farklılık mevcuttu ($p < 0.001$). Lenfosit sayısında gruplar arasında anlamlı farklılık gösterilemedi ($p > 0.05$), ancak bronşektazililerde en yüksekti. UB makrofaj sayısında KOAH, astma, normaller arasında fark bulunmazken bronşektazililerde normallerden anlamlı düşüktü ($p < 0.05$). Bronşektazililerde nötrofil ve lenfosit sayısının

fazla oluşu UB makrofaj sayısının göreceli olarak azalmış bulunmasını açıklayabilir.

Uyarılmış balgam hücre formülünde KOAH ve bronşektazililerde nötrofillerin, astmalılarda ise eozinofillerin hakim oluşu hastalıkların patofizyolojisi ile uyumlu idi(21,36,37,71).

Uyarılmış balgam hücreleri (makrofaj, nötrofil, eozinofil, lenfosit) ile UB NO ürünü ve UB 3NT arasında Bronşektazili olgularda UB eozinofil ve UB 3NT arasındaki negatif yönde ilişki dışında anlamlı ilişkiler gösterilemedi ($p < 0.05$). Bu çalışmada hücre düzeyinde immunreaktivite ve immun boyama teknikleri kullanılmadı. Hücreler ile nitrat ve 3NT düzeyleri arasında birebir ilişkilerin gösterilememesi bu hücrelerin aktif olup olmamasının belirlenememesine bağlandı. Buna rağmen astma, KOAH ve bronşektazi olgularında hastalıkların patofizyolojisi ile uyumlu hücrelerin artmış bulunması, aktivite tayini yapılabildiği takdirde ilişkili sonuçların çıkabileceğini düşündürdü.

KOAH, astma ve bronşektazili olgularda normallerle karşılaştırıldığında anlamlı düşük bulunan PC20 metakolin değerleri ile UB NO ürünleri ve 3NT düzeyleri arasında da ilişki gösterilemedi. Çeşitli çalışmalarda PC20 metakolin ile ENO arasındaki ilişki konusunda tartışmalı sonuçlar mevcuttur (3,5,15).

Sonuç olarak, bu çalışmada UB NO ürünlerinin normaller ile hastalık gruplarını (astma, KOAH, bronşektazi) ayırabildiği ancak KOAH – astma ayırımı yapamadığı düşünüldü. UB 3NT düzeyi ise KOAH'lıları astmalılardan, KOAH ve bronşektazilileri de sağlıklılarından ayırabilmekteydi.

UB hücreleri ve PC20 metakolin ile UB NO ürünleri ve 3NT düzeyleri arasında

ilişki gösterilemedi. Hücresel düzeyde aktivite değerlendirmesi yapılmadığından bire bir ilişkilerin saptanamaması şaşırtıcı değildi.

Literatürde çok sayıda çalışmada ENO ve UB NO ürünlerinin ölçülmesinin hava yolu inflamasyonunu değerlendirmede yararlı olduğu gösterilmiştir. Ancak KOAH ve bronşektazi gibi oksidatif stresin, mukus hipersekresyonunun ve parankim harabiyetinin daha yoğun olduğu hastalıklarda 3NT ölçümü hem havayolu hem de parankim inflamasyonunu belirlemede daha değerli gözükmektedir. Bu çalışmada da NO metabolizmasının son ürünleri değerlendirildiğinde UB 3NT, UB NO ürünlerinden daha değerli bilgiler vermiştir.

Bu sonuç KOAH ve bronşektazili hastalarda astmalılardan daha fazla olması beklenen oksidan yükü bilgisi ile de uyumlu bulundu. Böylece nitrit/nitrata indirgenen NO oksidasyonunun son ürünü NT'nin tanıda daha değerli bilgiler verebileceği sonucuna varıldı.NO metabolizması ürünlerinden özellikle 3NT ile oksidatif stres göstergeleri arasındaki ilişkiyi gösterecek çalışmaların planlanması ile inflamasyonun yorumlanmasında ilave- tamamlayıcı bilgiler elde edilebilecektir.

ÖZET

Astma, KOAH ve Bronşektazi pekçok ortak klinik patofizyolojik özelliğe sahip, havayollarının kronik inflamatuvar, obstrüktif hastalıklarıdır. Bu hastalıkların seyrinde inflamasyonun şiddetini ve derecesini, tedaviye yanıtı belirlemede, diğer hastalıklarla ayırıcı tanıda çeşitli göstergeler kullanılır. İdeal test noninvaziv, ucuz, pratik ve hastalığın farklı ağırlık derecelerinde de uygulanabilir olmalıdır. Bu nedenle 'altın standart' ancak invaziv olan bronkoskopik yöntemlere alternatif olarak kan, ekspirasyon havası, yoğunlaştırılmış solunum havası ve UB örneklerinde ölçülebilen testler geliştirilmiştir.

Uyarılmış balgam çalışmaları, hava yollarındaki inflamasyonu belirlemede son yıllarda yaygınlaşmaktadır. Hava yolu inflamasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilen NO; kronik inflamasyonun eşlik ettiği hastalıklarda ekspiryum havasında ölçülebilmektedir. Ancak pahalı oluşu ve standardizasyonunun güç olması nedeni ile ulaşılabilirliği pek çok klinik için mümkün değildir.

Bu çalışmada 18 atopik astmalı, 15 KOAH'lı, 16 Bronşektazili, hiçbiri sigara içmeyen olguda UB'de NO metabolizmasının ürünleri olan nitrit, nitrat ve 3NT değerlendirildi. 3NT tirozin nitrasyonu sonucu gelişen ve ortamdaki RNS'nin göstergesi olarak kullanılan bir göstergedir. Akut, kronik inflamasyona bağlı gelişen doku harabiyetini yansıttığı düşünülmektedir. Literatürde astma, KOAH ve bronşektazili olgularda UB NO ürünleri ve ENO düzeyleri konusunda tartışmalı sonuçlar verilmiştir.

Bu çalışmada UB NO (nitrit/nitrat) düzeyi bronşektazi, KOAH ve astmalılarda normallerden anlamlı düşük bulunurken ($p < 0.01$), hastalık

grupları karşılaştırıldığında KOAH ve astmalılarda benzerdi. Bu sonuç, UB NO ürünlerinin hastaları sağlıklılarından ayırabildiğini, ancak KOAH-astma ayırımı yapamadığını düşündürdü. UB'de inflamasyona bağlı gelişen oksidasyonun bir göstergesi olan 3NT düzeyleri değerlendirildiğinde ise astmalılarda düşük, KOAH ve bronşektazililerde yüksek bulundu. KOAH ve bronşektazililer normaller ile karşılaştırıldığında anlamlı yüksek 3NT değerleri saptandı. ($p < 0.01$) Bu sonuçlar, UB NO ürünlerinin KOAH ve astma ayırımını yapamazken UB NT'nin hem astmalıları KOAH'lılardan hem de bronşektazi ve KOAH'lıları normallerden ayırt edebileceğini düşündürdü. Bu sonuç KOAH ve bronşektazili hastalarda astmalılardan daha fazla olması beklenen oksidan yükü bilgisi ile de uyumlu bulundu. Böylece nitrit/nitrata indirgenen NO oksidasyonunun son ürünü NT'nin tanıda daha değerli bilgiler verebileceği sonucuna varıldı. NO metabolizması ürünlerinden özellikle 3NT ile oksidatif stres göstergeleri arasındaki ilişkiyi gösterecek çalışmaların planlanması inflamasyonun yorumlanmasında ilave-tamamlayıcı bilgiler elde edilebilecektir.

Uyarılmış balgam hücre formülü değerlendirildiğinde ise nötrofiller KOAH ve bronşektazililerde, astmalı ve sağlıklılarından anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0.01$). KOAH ve bronşektazili olgularda UB nötrofil sayıları benzerdi ($p > 0.05$). Eozinofiller ise astmalılarda tüm gruplardan belirgin yüksekti ($p < 0.01$). UB hücre formülünde KOAH ve bronşektazililerde nötrofillerin, astmalılarda ise eozinofillerin hakim oluşu hastalıkların patofizyolojisi ile uyumlu idi.

Uyarılmış balgam hücreleri ile UB NO ürünleri ve UB 3NT arasında anlamlı ilişkiler gösterilemedi. Hastalıkların patolojileri ile uyumlu hücrelerin UB'de artmış bulunmasına rağmen bu ilişkilerin

gösterilememesinin nedeni hücresele düzeyde aktivite tayininin yapılamaması nedeni ile açıklanamadı.

Uyarılmış balgam 3NT ölçümünün, akciğerlerde inflamasyonu belirlemede alternatif bir yöntem olarak UB NO ürünlerinin ölçümlerinden daha doğru sonuçlar verebileceği düşünöldü. Sonuç olarak; gelecekte UB'de 3NT ölçümünün obstrüktif, inflamatuvar havayolu hastalıklarında ön plana çıkacağı görüşündeyiz.

KAYNAKLAR

1- Ferreira I. M., Hazari M. S., Gutierrez C. Exhaled Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164: 1012-1015.

2-Vliet A., Eiserich J. P., Shigenaga M.K., Cross E. C. Reactive Nitrogen species and Tyrosine Nitration in the Respiratory Tract. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160: 1-9.

3-Belvisi M.G., Mitchell J.A. Nitric Oxide in Pulmonary Processes: Role in Physiology and Pathophysiology of Lung Disease. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag, 2000.

4-Ichinose M., Sugiura H., Yamagata S. Increase in Reactive Nitrogen Species Production in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162: 701-706.

5- Kaminsky D.A., Mitchell J., Carroll N. Nitrotyrosine formation in the airways and lung parenchyma of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 747-754.

6- Duguet A., Iijima H, Eum S.Y. Eosinophil Peroxidase Mediates Protein Nitration in Allergic Airway Inflammation in Mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164:1119-1126

7- Ischiropoulos H. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1998; 356: 1-11.

8-Peter J. Barnes, Maria G. Belvisi. Nitric oxide and lung disease. *Thorax* 1993; 48: 1034-1043

9- Kanazawa H, Shoji S, Yamada M. Increased levels of nitric oxide derivatives in induced sputum in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1997; 99: 624-629.

10- Sterk P. J, H W F M de Gouw, F L M Ricciardolo F. L. M. Exhaled nitric oxide in COPD: glancing through a smoke screen. *Thorax.* 1999; 54: 565-567.

11- Kharitonov S.A., Barnes P. J. Exhaled Markers of Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163: 1693-1722.

12- Kanazawa H., Shoji S., Yoshikawa T. Increased production of endogenous nitric oxide in patients with bronchial asthma and COPD. *Clinical and Experimental Allergy.* 1998; 28:1244-1250.

13- Hanazawa T., Kharitonov S.A., Barnes P. J. Increased Nitrotyrosine in Exhaled Breath Condensate of Patients with Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162:1273-1276.

14- Montuschi P, Kharitonov S.A., Barnes P.J. Exhaled Carbon Monoxide and Nitric Oxide in COPD. *Chest* 2001; 120: 496-501.

15- Rutgers S.R., Th W von der Mark, Coers W. Markers of nitric oxide metabolism in sputum and exhaled air are not increased in COPD. *Thorax* 1999; 54: 576-580.

16- Eiserich J.P., Hritova M, Cross C. E. Formation of nitric oxide derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998; 391: 393-397.

17- Barnes P.J., Kharitonov S.A. Exhaled nitric oxide: a new lung function test. *Thorax* 1996; 51: 233-237.

18-Corradi M., Majori M., Cacciani G.C. Increased exhaled nitric oxide in patients with stable COPD. *Thorax* 1999; 54: 572-575.

19-Kostikas K., Papatheodorou G., Ganas K. pH in Expired Condensate of Patients with Inflammatory Airway Diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165: 1364-1370.

20-Hart C.M. Nitric oxide in Adult Lung Disease. *Chest* 1999; 115: 1407-1417.

21-Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention NHLBI/WHO workshop report. National Institute of Health Publication Number. 97-4053, October 1997.

22-Sant J.K., Krieken J.H. Relationship between the inflammatory infiltrate in bronchial biopsy specimens and clinical severity asthma in patients treated with inhaled steroids. *Thorax.* 1996; 51: 496-502.

23-Foresi A., Bertorelli G. Inflammatory Markers in Bronchoalveolar lavage and in bronchial biopsy in asthma during remission. *Chest* 1990; 98: 528-535.

24-Walker C., Martin K. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991; 935-942.

25-Barnes P.J. Mechanism in COPD Differences from asthma. *Chest* 2000; 117: 10S-14S.

26-Saetta M., Turato G., Maestrelli P. Cellular and Structural Bases of COPD. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163: 1304-1309.

27-O'byrne P.M., Postma D.S. The many faces of inflammation: Asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159: S41-S66.

28-Fraser R.S., Colman N., Müller N.L., Paré P.D. Bronchiectasis and Other Bronchial Abnormalities. Fraser's and Paré's Diagnosis of Disease of the Chest. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1999; 2265-2298.

29- O'Riordan T., Wanner A. Bronchiectasis. In: Baum G.L., Crappo J.D., Celli B.R., Karlinsky J.B. Textbook of pulmonary Diseases. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1998; 807-822.

30-Nicotra M.B. Bronchiectasis. Seminars in Respiratory Infections. 1994;9:31-40.

31-Mysliwiec V, Pina J.S. Bronchiectasis: The 'other' obstructive lung disease. Postgraduate Medicine. 1999; 106:123-132.

32-Silva J.R.L., Guerreiro D. Noble B. Immunopathology of Experimental Bronchiectasis. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1989; 1: 297-304.

33-P. W. Bishop. Aspiration Pneumonia, Lung Abscess, Bronchiectasis and Atelectasis. In: Wonsiewicz M.J., Melvin S. Spencer's Pathology of the Lung. 5th ed. :Mc.Graw-Hill. 1996; 357-375.

34-Cole P.J. Inflammation: a two-edged sword- the model of bronchiectasis. Eur. J Respir. Dis. 1986; 69:6-15.

35-Warwick H.M.C., Salkovskis P.M. Chronic bronchial sepsis and progressive lung damage. British Medical Journal. 1985; 290:1026-1028.

36-Angrill J., Agusti C., Celis R. Bronchial Inflammation and Colonization in Patients with Clinically Stable Bronchiectasis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001; 164:1628-1632.

37-Silva J. R. L., Jones J. A. H., Cole P. J. The immunological component of the cellular inflammatory infiltrate in bronchiectasis. *Thorax* 1989; 44: 668-673.

38-Sair M., Evans W.T. NO news is good news. *Thorax*.1995;50:323-324.

39-Türktaş H.Etyoloji ve patogenez. Astma patogenezi.Bozkır Matbaacılık, Ankara 1996; 1-28.

40-Barnes P.J. Nitric oxide and airways. *Eur.Respir. J.* 1993; 6:163-165.

41-Gaston B., Drazen M.J., The Biology of Nitrogen Oxides in the Airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*1994;149:538-551.

42-Moncada S.,Palmer R.M.J.,Higgs E.A.Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and pharmacology.*Pharmacological Reviews.*1991;43:109-142.

43-Türktaş H.Nitrik oksid.Astma patogenezi.Bozkır Matbaacılık, Ankara 1996; 61-75

44- Mizutani T., Layon J.A. Clinical Applications of Nitric Oxide. *Chest.* 1996; 110: 506-524.

45-Kılıçturgay K.Enflamasyonda Endotel, İmmunoloji. Hünkar ofset, Bursa 1997;247-253.

46-Morcillo E.J.,Estrela J.,Cortijo J.Oxidative stress and Pulmonary Inflammation: Pharmacological Intervention with Antioxidants. *Pharmacological Research.* 1999;40:393-404.

47-MacNee W., Rahman I.Oxidants and Antioxidant as Therapeutic Targets in COPD . *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*1999;160:S58-S65.

48-Repine J.E., Bast A., Lankhorst I. Oxidative Stress in COPD. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 156: 341-357.

49-Wu W., Chen Y., Hazen S.L. Eosinophil Peroxidase Nitrates Protein Tyrosyl Residues. *Journal of Biological Chemistry.* 1999;274:25933-25944.

50- Pazo V., Arruda-Chaves E., Andres B. Eosinophils Transcribe and Translate Messenger RNA for Inducible Nitric Oxide Synthase. *The Journal of Immunology.* 1997; 158: 859-864.

51-Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax.* 1992;47:25-29.

52-Pavord ID, Pizzichini MMM, Pizzichini E. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax.* 1997; 52: 498-450.

53-Erger RA, Casale TB. Interleukin-8 is potent mediator of eosinophil chemotaxis through endothelium and epithelium. *Am. J. Physiol.* 1995; 268: L117-L122.

54-Veen JCCM, De Gouw HWFM, Smits HH. Repeatability of cellular and soluble markers of inflammation in induced sputum from patients with asthma. *Eur. Respir. J.* 1996;9:2441-2447.

55-Fuente PT, Romagnoli M, Godard P. Safety of inducing sputum in patients with asthma of varying severity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 157; 1127-1130.

56-Kips JC, Fahy JV, Hargreave FE. Methods for sputum induction and analysis of induced sputum. A Method for Assessing Airway Inflammation in Asthma. *Eur. Respir. J.* 1998; 11: Suppl.26.9 s-12s.

- 57-Peleman RA ,Rytala PH, Kips JC. The cellular composition of induced sputum in COPD. *Eur. Respir. J.* 1999; 13: 839-843.
- 58-Pizzichini MMM,Popov TA, Efthimiadis A. Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*1996;154; 866-869.
- 59- Global Initiative for Asthma.Global strategy for asthma management and prevention NHLBI/WHO workshop report. National Institute of Health Publication Number. 02-3659, April 2002.
- 60- Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). National Institute of Health Publication Number. 2701, April 2001.
- 61-American Thoracic Society. Guidelines for Methacholine and Exercise Challenge Testing-1999 *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 161: 309-329.
- 62-Reiff DB, Wells AU, Carr DH.CT Findings in Bronchiectasis. *AJR*1995; 165:261-267.
- 63-McGuinness G.,Naidich PD, Leitman PS., Bronchiectasis: CT Evaluation. *AJR* 1993; 160: 253-259.
- 64-Efthimiadis A, Pizzichini MMM, Pizzichini E. Induced sputum cell and fluid phase indices of inflammation: comparison of treatment with dithiothreitol vs. phosphate buffered saline. *Eur. Respir J.*1997; 10: 1336-40.
- 65-Green LC ,Wagner DA ,Glogowski J. Analysis of nitrate, nitrit and ¹⁵N nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 1982; 126: 131-138.
- 66-Beutler HO, Wurst B,Fischer S.Eine neue methode zur enzymatischen bestmmung von nitrat in lebensmittein. *Deutsche Lebensmittel Rundschau.* 1986; 147: 697-704.

67-Repine J:E ,Bast A,Lankhorst I.Oxidative stress in COPD. Am. J. Respir. Crit. Care Med.1997;156:341-357.

68-Rahman I,Morrison D,Donaldson K,MacNee N.Systemic oxidative stress in asthma, COPD and smokers. Am. J. Respir. Crit. Care Med.1996;154:1055-1063.

69-Kharitanov S,Alving K,Barnes JP.Exhaled and nasal NO measurements:recommendations. Eur. Respir. J. 1997; 10: 1683-1693.

70-Kharitanov S.A., Yates D:H., Chung K.F. Changes in the dose of inhaled steroid affect exhaled nitric oxide levels in asthmatic patients. Eur.Respir. J. 1996; 9:196-201.

71- Marina Saetta. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir. Crit Care Med.1999;160(5) part 2: S17-20