

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ASTIMLI YETİŞKİN HASTALARDA SERUM LEPTİN, IFN-gama,
IL-4, IL-10, NİTRİK OKSİT KONSANTRASYONLARI VE
SOLUNUM FONKSİYONLARI ARASINDAKİ İLİŞKİLER**

Dr. Mustafa YILMAZ

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**AYDIN
2007**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ASTIMLI YETİŞKİN HASTALARDA SERUM LEPTİN, IFN-gama,
IL-4, IL-10, NİTRİK OKSİT KONSANTRASYONLARI VE
SOLUNUM FONKSİYONLARI ARASINDAKİ İLİŞKİLER**

Dr. Mustafa YILMAZ

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç.Dr. Mustafa ALTINIŞIK**

**AYDIN
2007**

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim sırasında ilgi ve desteklerini gördüğüm, bilimsel konularda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, başta tez danışmanım hocam Sayın Doç.Dr. Mustafa ALTINIŞIK olmak üzere Anabilim Dalımız Başkanı Sayın Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY'e, Öğretim Üyeleri Sayın Doç.Dr. Aslıhan KARUL, Sayın Doç.Dr. Leyla Didem KOZACI ve Sayın Yrd.Doç.Dr. Mukadder SERTER'e teşekkür ederim.

Tezimin proje aşamasında olguların klinik muayeneleri ile seçimi ve solunum fonksiyon testlerinin yapılması sırasında ve sonrasında her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç.Dr. Mehmet POLATLI ve Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı asistanlarına teşekkür ederim.

HPLC ile analizlerin yapılması için Üniversitemiz Merkez Araştırma laboratuvarının imkanlarını sunan Sayın Doç.Dr. Serhan SAKARYA ve analizlerin yapılması sırasında her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç.Dr. Cengiz GÖKBULUT'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim sırasında iyi ilişkiler içinde bulunduğum ve kendilerinden çok şey öğrendiğim tüm asistan arkadaşlarıma ve laboratuvar çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca tezimin proje aşamasında maddi desteği sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkür ederim.

Son olarak; her zaman destek ve teşviklerini esirgemeyen Sevgili Eşim Gülayşe YILMAZ'a anlayışı ve sabrı için teşekkür ederim.

Dr. Mustafa YILMAZ

2007 AYDIN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Önsöz	I
İçindekiler	II-III
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	IV
Şekiller ve Grafikler Dizini	V-VI
Tablolar Dizini	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR BİLGİSİ	3
2.1. Astım	3
2.2. Solunum Fonksiyon Testleri (SFT)	9
2.3. Obezite ve Astım	12
2.4. Leptin	15
2.5. Nitrik Oksit (NO)	20
2.6. Sitokinler	27
2.6.1. İnterlökin-4 (IL-4)	29
2.6.2. İnterlökin-10 (IL-10)	31
2.6.3. İnterferon- γ (IFN- γ)	32
3. GEREÇ ve YÖNTEM	34
3.1. Çalışma Grupları	34
3.2. Ön İşlemler	34
3.3. Kan Örneklerinin Alınması, İşlenmesi ve Saklanması	35
3.4. Gereçler	35
3.5. Solunum Fonksiyon Testleri ve Vücut Kitle İndeksi Ölçülmesi	36
3.6. Rutin Biyokimya Testleri	38
3.7. Plazma Nitrik Oksit Düzeyi Tayini	39
3.8. Serum Leptin Düzeyi Tayini	45
3.9. Serum İnterlökin-4 (IL-4) Düzeyi Tayini	47
3.10. Serum İnterlökin-10 (IL-10) Düzeyi Tayini	50
3.11. Serum İnterferon- γ (IFN- γ) Düzeyi Tayini	52
3.12. İstatistiksel Değerlendirme	54
4. BULGULAR	56
5. TARTIŞMA	68

	Sayfa
6.	
SONUÇLAR	74
TÜRKÇE ÖZET	75
İNGİLİZCE ÖZET	76
KAYNAKLAR	77

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simge veya Kısaltma</u>	<u>Açılım</u>
BCSF-1	B Hücre Büyüme Faktörü-1
FEFR	Zorlu Ekspirasyon Akım Hızı
FEV1	Zorlu Ekspiryum Volüm 1. saniye
FVC	Zorlu Vital Kapasite
GER	Gastro Özafageal Reflü
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
IFN- γ	İnterferon- γ
IL-2	İnterlökin-2
IL-4	İnterlökin-4
IL-5	İnterlökin-5
IL-10	İnterlökin-10
IL-13	İnterlökin-13
LEPR	Leptin Reseptörleri
LTC4	Lökotrien C4
α -MSH	α -Melanosit Sitümulan Hormon
NO $\cdot$	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
PGD2	Prostaglandin D2
POMC	Proopiomelanakortin
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SFT	Solunum Fonksiyon Testi
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör- α
TV	Tidal Volüm
UCP	Eşleşmemiş Proteinler
VCAM-1	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1

ŞEKİLLER ve GRAFİKLER DİZİNİ

<u>Şekiller-Grafikler</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil-1. Astımda bronş duvarından bir kesit	3
Şekil-2. Astım fizyopatolojisinde sitokinlerin rolü	7
Şekil-3. FEV1 ve FVC değerlerinin yaşla değişimi	12
Şekil-4. L-argininden nitrik oksit (NO) sentezi	21
Şekil-5. Nitrik oksit (NO) kaynakları ve oluşumu	24
Şekil-6. Nitrik oksit metabolizması	25
Şekil-7. Astımda Th1 ve Th2'nin rolü	28
Şekil-8. IL-4'ün kristal yapısı	29
Şekil-9. IL-4'ün biyolojik etkileri	30
Şekil-10. Solunum fonksiyon testlerinin yapılması	37
Şekil-11. Bilgisayarlı spirometre cihazında ölçülen değişkenler	38
Şekil-12. HPLC sistem	42
Şekil-13. HPLC sistemde standartlar ve numuneler	44
Şekil-14. HPLC sistemde standartlara ait pikler	44
Şekil-15. Leptin konsantrasyonu kalibrasyon grafiği	47
Şekil-16. IL-4 konsantrasyonu kalibrasyon grafiği	49
Şekil-17. IL-10 konsantrasyonu kalibrasyon grafiği	52
Şekil-18. IFN-γ konsantrasyonu kalibrasyon grafiği	54
Grafik-1. Hasta ve kontrol grubuna ait FEV1 (%) değerleri grafiği	59
Grafik-2. Hasta ve kontrol grubuna ait FVC (%) değerleri grafiği	59
Grafik-3. Hasta ve kontrol grubuna ait FEV1/FVC (%) değerleri grafiği	60
Grafik-4. Hasta ve kontrol grubuna ait plazma nitrit+nitrat düzeyi grafiği	60
Grafik-5. Hasta ve kontrol grubuna ait leptin değerleri grafiği	61
Grafik-6. Erkek ve kadınlara ait serum leptin değerleri grafiği	62
Grafik-7. Gruba ve cinsiyete bağlı FEV1 (%) değerleri	63
Grafik-8. Gruba ve cinsiyete bağlı FVC (%) değerleri	63
Grafik-9. Gruba ve cinsiyete bağlı FEV1/FVC (%) değerleri	64
Grafik-10. Gruba ve cinsiyete bağlı leptin düzeyi (ng/ml) değerleri	64
Grafik-11. Kontrol ve hasta grubunda serum leptin düzeyi (ng/ml) ile FEV1 (%) ve FVC (%) arasındaki korelasyon	65

Sekiller-Grafikler**Sayfa**

Grafik-12. Kontrol grubunda serum leptin düzeyi (ng/ml) ile VKİ (kg/m ²) arasındaki korelasyon	66
Grafik-13. Erkek hasta, erkek kontrol, kadın kontrol gruplarında serum leptin düzeyi (ng/ml) ile vücut kitle indeksi (kg/m ²) arasındaki korelasyon	67

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo-1. Nitrik oksit sentezleyen enzimler	22
Tablo-2. Nitrik oksitin akciğerlerdeki fonksiyonları	26
Tablo-3. Nitrik oksitin bazı sistemlerdeki etkileri	26
Tablo-4. Çalışma grupları ve yaş karakteristikleri	34
Tablo-5. Tüm çalışma grubu bireylerine ait ölçülen parametre verileri	56
Tablo-6. Çalışmaya alınan erkekler ve kadınlara ait incelenen parametre verileri	57
Tablo-7. Hasta ve kontrol grubuna ait incelenen parametre verileri	57
Tablo-8. Hasta grubunda erkekler ve kadınlara ait incelenen parametre verileri	58
Tablo-9. Kontrol grubunda erkekler ve kadınlara ait incelenen parametre verileri	58

1. GİRİŞ

Astım, hava yollarının kronik inflamatuvar hastalığı olarak kabul edilmektedir (1).

Leptin, 1994 yılında Zhang ve arkadaşları tarafından keşfedilen, sitokinlere benzeyen, 167 amino asit kalıntısı içeren, 16 kDa molekül ağırlığında, protein yapısında bir hormondur. Leptin, adipoz dokuda sentezlenir, özellikle hipotalamus üzerine reseptörleri (LEPR) aracılığıyla gıda alımını ve enerji metabolizmasını düzenleyerek obezite gelişmesini engeller (2). Leptin yetmezliği obeziteye yol açmakla birlikte obez insanlarda leptin rezistansı ile ilgili olarak yüksek leptin düzeyleri gözlenebilmektedir (3). Leptinin üreme, hematopoez, angiogenez, immünite, kan basıncını kontrol ve kemik oluşumu gibi pek çok çeşitli fonksiyonları olduğu gösterilmiştir. Önceleri leptinin bütün etkilerinin merkezinde beyin olduğu ve leptinin etkilerini beyin üzerinden gösterdiği düşünülürdü. Son yıllarda leptinin merkezde yer aldığı ve farklı organların leptinin hedefi olduğu görüşü ağırlık kazanmıştır (4). Leptin, lenfosit aracılı inflamasyona izin verirken monosit/makrofaj aracılı inflamasyon üzerine inhibitör etki göstererek inflamasyonu düzenler. Leptin, T hücrelerden salıverilen sitokinlerin dengesini Th1 yanıt tarafına değiştirir (5). Leptin, güçlü bir proinflamatuvar sitokin olan interferon- γ (IFN- γ) sekresyonu ile Th1 immün yanıtını iletir, Th2 sitokinlerin sekresyonunu ise inhibe eder (6, 7).

Th1 hücreler IFN- γ , interlökin-2 (IL-2), lenfotoksin üretirler; Th2 hücreler ise interlökin-4 (IL-4), interlökin-5 (IL-5), interlökin-10 (IL-10) üretirler (7). IFN- γ , Th1 aktivitesinin; IL-4, Th2 aktivitesinin belirleyicisi olarak kullanılabilir (8).

Leptin ve IL-10 seviyeleri, sepsisli hastalarda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (9).

Leptin, endotelial nitrik oksit (NO[•]) üretimini stimüle eder (10). Nitrik oksit, hava yolu fonksiyonlarının düzenlenmesinde ve inflamatuvar hava yolu hastalıklarının patofizyolojisinde önemli rol oynar (11). NO[•] üretiminin ölçüsü olarak sıklıkla plazmada nitrit ve nitrat tayini kullanılır (12).

Akciğer fonksiyonlarında bozulma olan hastalarda dolaşımdaki leptin seviyeleri yüksek saptanmıştır (13). Leptinin, obez kişilerdeki astımda patolojik rol oynadığı düşünülür, fakat bu konudaki çalışmalar azdır (14).

Bu çalışma, astımlı yetişkin hastalarda serum leptin, IFN- γ , IL-4, IL-10, Nitrik Oksit konsantrasyonları ve solunum fonksiyonları arasındaki ilişkileri araştırmak ve böylece leptinin periferik etkileri hakkında tüm dünyada yaygın olarak sürdürülen çalışmalara ülkemizden de katkıda bulunmak amacıyla tıpta uzmanlık tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmada, Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları Polikliniğine gelen hastalardan klinik olarak bronşial astım tanısı alan fakat başka bir akut veya kronik hastalığı olmayan 16 erkek ve 16 kadın olmak üzere 32 kişi “hasta grubu”nu, bronşial astım ve başka bir akut veya kronik hastalığı olmayan, nonspesifik yakınmalarla polikliniğe başvuran 16 erkek ve 16 kadın olmak üzere 32 sağlıklı kişi “kontrol grubu”nu oluşturmuştur. Çalışmaya katılanlardan “Bilgilendirilmiş onam formu” alınmıştır.

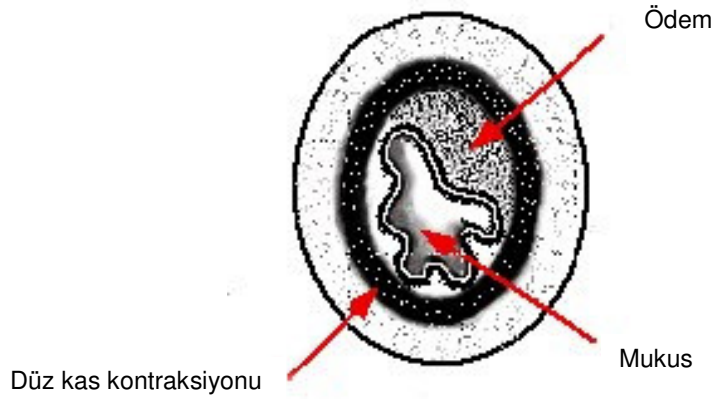
Çalışmaya katılanların vücut ağırlığı ile boyu ölçülüp, solunum fonksiyon testleri [1. saniyedeki zorlu ekspiratuvar volüm (FEV1) ve zorlu vital kapasite (FVC) ölçümü], serum örneklerinde leptin, IFN- γ , IL-4, IL-10 analizleri, plazmada nitrit ve nitrat düzeyi ölçümü yapılmıştır. Vücut ağırlığı ve boy değerlerinden vücut kitle indeksi (VKİ) hesaplanmıştır.

Hesaplanan VKİ ve diğer ölçülen değerler SPSS bilgisayar programında bilgisayara girilip T-test, Mann-Whitney U testi ve Pearson korelasyon testi kullanılarak ve $P < 0,05$ değerleri anlamlı kabul edilerek istatistiksel analizi yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1. Astım

Tanım: Astım Yunanca “soluksuzluk” veya “ağız açık solumak” sözlük anlamlarını taşır. Astım, kısmi geri dönüşümlü havayolu obstrüksiyonu ve bronş aşırı duyarlılığı ile karakterize, çoğu durumda inflamasyonun da eşlik ettiği, tekrarlayıcı karakterde bir havayolu hastalığıdır (15). Hava yolu inflamasyonu aynı zamanda hava yolu hiperreaktivitesine de neden olmaktadır. Astım patogenezinde bronkospazm, havayolu mukozasında yaygın ödem, mukus sekresyonunda artış, hücrel infiltrasyon ve havayolu epitel hasarı rol oynamaktadır (16). Astımda bronş duvarından bir kesit şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1: Astımda bronş duvarından bir kesit

Prevalans: Astım, prevalans farklılıkları göstermekle birlikte genel olarak batı toplumlarında daha yüksek, doğu toplumlarında daha düşük oranda görülür. Dünyada astımın en sık görüldüğü ülkeler Avustralya, Yeni Zelanda, Kanada, İngiltere’dir; düşük oranda rastlandığı toplumlar arasında Kuzey Amerika Kızılderilileri, Eskimolar ve Afrikalılar sayılmaktadır. Ülkemizde prevalansın erişkinlerde yaklaşık %3-5, çocukluk çağına ise %5-10 olduğu düşünülmektedir. Ülkemizde yaklaşık 2,5–4 milyon astımlı olduğu tahmin edilmektedir. Son yıllarda dünyanın birçok bölgesinde astım ve allerjik hastalıkların prevalansında artış olduğu rapor edilmektedir. Astım için bilinen en büyük risk faktörü ailede astım varlığıdır. Yapılan çalışmalar bunun birçok genin

kontrolünde olduğunu telkin etmektedir. Astımın genetik bir hastalık olduğuna dair yeterince veri bulunmamaktadır. Ailesel birikim göstermesi, tek yumurta ikizlerinde ikisinde birden astım görülme oranının (konkordans) çift yumurta ikizlerinden daha fazla olması astımın genetik geçişli bir hastalık olduğunu destekleyen bulgulardır. Bugüne kadar astım ve atopi ile ilişkili birçok kromozom ve genetik mutasyon tanımlanmıştır. Ancak tanımlanan bu genlerin hiçbirisi kesin olarak astım ve atopinin patogenezi ile ilişkilendirilememiştir. Halen astım poligenik kompleks bir hastalık olarak ele alınmaktadır. Son yıllardaki artıştan genetik faktörlerin rolü olamayacağı ve bunda bazı çevresel faktörlerin de rolü olabileceği sanılmaktadır. Bunlardan da hava kirliliği ve aşırı hijyenik yaşamın rolü en olası nedenler olarak gözükmemektedir. Astım hastalığının prevalansındaki artışı açıklayan hipotezler içinde en dikkat çeken hijyen hipotezi olmuştur. Bu hipoteze göre endüstrileşmiş ülkelerde iyileşen hijyenik koşullar, aşılar ve antibiyotiklerin yaygın kullanımı, normalde immün sistemi uyaran ve aynı zamanda astım hastalığını da hafifleten infeksiyon hastalıklarının görülme sıklığının azalmasına yol açmaktadır (17).

Etiyoloji: Astım ile ilgili risk faktörleri, kişiyi astıma yatkın kılan kişisel faktörler ve genetik olarak astıma yatkın olanlarda astım gelişimine yol açabilen çevresel faktörler olmak üzere 2 grupta toplanmaktadır.

Kişisel Faktörler:

- Genetik yatkınlık
- Atopi
- Hava yolu aşırı duyarlılığı
- Cinsiyet
- İrk/etnik özellikler

Çevresel Faktörler:

- Allerjenler
- Mesleksen ajanlar
- Hava kirliliği
- Solunum sistemi infeksiyonları
- Paraziter enfestasyonlar
- Sosyoekonomik düzey
- Aile büyüklüğü

Diyet ve ilaçlar (aspirin)
Obezite
Sigara dumanı maruziyeti
Gastroözofageal reflü

Patofizyoloji: Astımın temelini oluşturan allerjik sensitizasyon (duyarlılaşma) güçlü bir genetik özellik taşır. IgE/mast hücresi/Th2 lenfosit üçgeninin oluşturduğu immün cevabı geliştirme yatkınlığı atopik kişiler tarafından genetik olarak aktarılır. Ev tozu akarlarının dışkılarındaki proteinlere, hamamböceği allerjenlerine, kedi, köpek ve diğer hayvan tüylerine, polenlere ve diğer allerjenlere belirli bir yoğunlukta ve sürede maruz kalınması, allerjenlerin antijen sunan hücreler tarafından CD4+ T lenfositlere sunulmasına ve takiben IL-3, IL-4, IL-5 ve diğer Th2 sitokinlerin salınmasına neden olur. Bu sitokinler mukozal infiltrasyon yoluyla giren bu allerjenlere karşı IgE yapımı gibi proinflamatuvar süreci başlatırlar ve plazma hücreleri, mast hücreleri ve eozinofillerin aktivasyonuna neden olurlar. Kişi bir kez duyarlılaştıktan sonra allerjenler ile sonraki her karşılaşmada, astım belirtileri ile sonuçlanan allerjik olaylar zinciri tetiklenmiş olur. Yapılan biyopsi çalışmaları asemptomatik olgularda bile kronik inflamatuvar değişikliklerin olduğunu ve inflamasyonun yoğunluğu ile hastalık şiddetinin korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur.

Astımda allerjik cevap ani (erken) faz ve geç faz olarak iki bölümde incelenir.

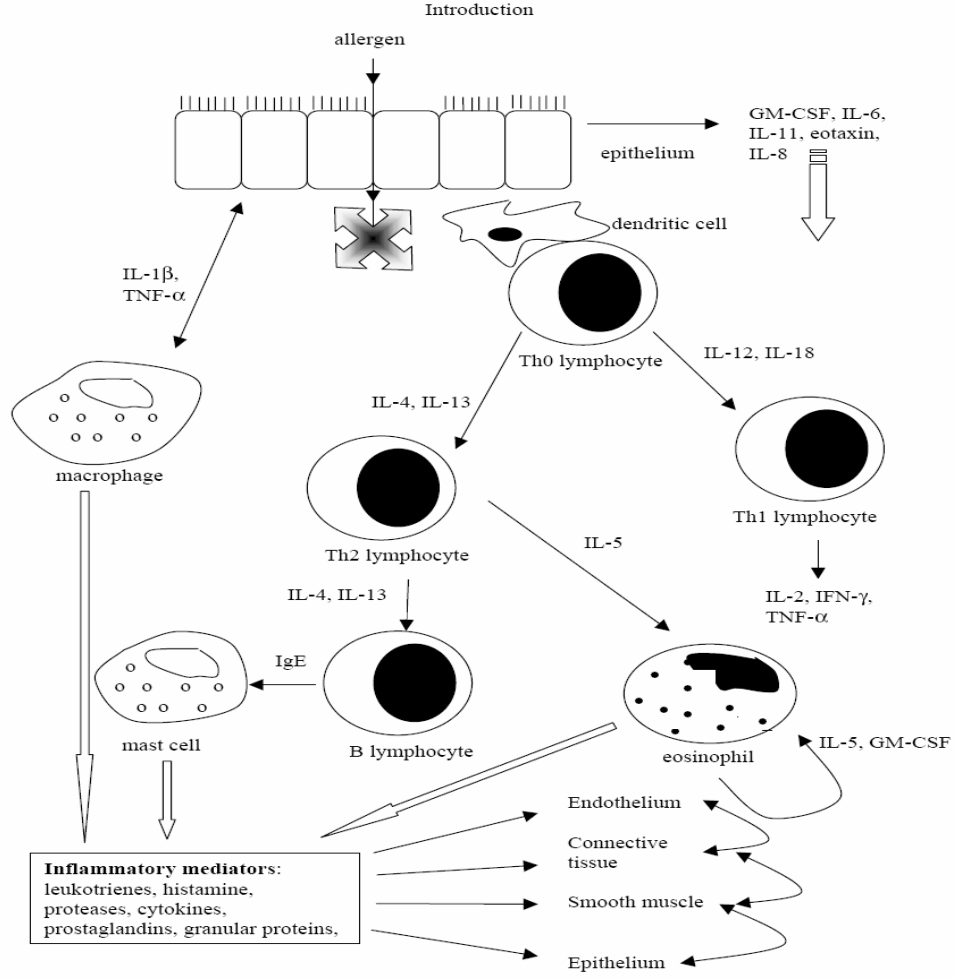
Erken Faz: Allerjen ile karşılaşma sonucunda B lenfositleri tarafından salgılanan allerjen-spesifik IgE antikoru mast hücreleri ve bazofillerde bulunan yüksek affiniteli IgE reseptörlerine bağlanırlar. Bu olay allerjik sensitizasyon olarak bilinir. Aynı allerjen ile daha sonraki karşılaşmalarda, dakikalar içinde bir allerjen-antikor reaksiyonu oluşur. Eğer allerjen iki veya daha fazla IgE molekülü arasında köprü yapacak şekilde IgE moleküllerine bağlanırsa IgE reseptörleri hücre yüzeyinde agrege olur, membran bağımlı proteolitik enzimler de aktive olarak hücre içinde bir dizi enzimatik olaylar başlar. Böylece enerji bağımlı, nonsitolitik bir sürecin sonunda hücre içi granüller hücre membranı ile birleşir ve içeriklerini hücre dışına boşaltır (degranülasyon). Degranülasyon materyali histamin, triptaz, kimaz, kininojenaz, heparin gibi önceden sentez edilmiş mediatörleri içerir. Ayrıca mast hücreleri prostaglandin D2 (PGD2) ve sulfidopeptidil lökotrienleri de (LTC4, E4, D4) bu sırada sentezleyerek salgılar.

Bu mediatörler bronkospazm, mukozal ödem ve sekresyona; ayrıca, duyu sinirlerini de uyarak öksürük gibi reflekslerin uyarılmasına yol açarlar. Allerjik cevabın erken fazında oluşan karakteristik belirtiler, bronkospazm ve mukozal ödeme bağlı dispne, vizing; mukus sekresyonunda artışa bağlı öksürük ve balgamdır.

Geç Faz: Erken faz sırasında salgılanan mast hücre kökenli mediatörler (histamin, triptaz, kimaz, kininojenaz, heparin, PGD2 ve sulfidopeptidil lökotrienler, vb) postkapiller endotel hücreler üzerine etki ederek, dolaşan lökositlerin endotel hücrelerine adezyonunu kolaylaştıran damar hücresi adezyon molekülü (vascular cell adhesion molecule-VCAM) ve E-selektin ekspresyonunu artırır. IL-5 gibi kemoatraktan sitokinler de eozinofiller, nötrofiller, bazofiller, T lenfositleri ve makrofajların mukozayı infiltre etmesini kolaylaştırır. Allerjen ile karşılaşmadan 4-8 saat sonra bu hücreler aktive olur ve erken fazın bir çok proinflamatuvar reaksiyonlarını reaktif eden inflamatuvar mediatörler (histamin, kinin, TAME-esteraz, major basic protein [MBP], eozinofil kökenli nörotoksin, vb) salgılar. Bu hücre aracılıklı geç inflamatuvar reaksiyona geç faz cevabı denir.

T-helper lenfositlerin alt grupları allerjenlere karşı kronik inflamatuvar cevabın olası düzenleyicileridir. Th2 lenfositleri IL-3, IL-4, IL-5 ve IgE yapımını, eozinofil kemoatraksiyonunu ve yaşamını, mast hücrelerinin toplanmasını arttıran diğer sitokinleri salgılayarak allerjik cevabı güçlendirir. Geç faz sırasında üretilen sitokinler glukokortikoidler tarafından azaltılır.

Şekil 2, astım patofizyolojisinde sitokinlerin rolünü göstermektedir.



Şekil 2: Astım patofizyolojisinde sitokinlerin rolü (18).

Astımda inflamasyona paralel seyreden ve hastalık semptomlarında önemli rol oynayan bir diğer özel durum "remodelling"dir. "Ekstrasellüler matriksin yeniden yapılanması" olarak da adlandırılan bu durum patolojik olarak bazal membranda kalınlaşma, düz kas hipertrofisi, yeni vasküler yapılar ve sinir yapılarının oluşması, goblet hücre hiperplazisi ile karakterizedir. Remodelling, aslında inflamasyonun gelişmesi için uygun bir mikro ortam oluşturmaktadır. Bu patolojinin gelişiminde rol alan başlıca hücreler epitel hücresi, fibroblast ve hava yolu düz kası iken, mast hücreleri, eozinofil ve makrofajların da önemli katkıları vardır.

Hastaların allerjen ile tekrarlayan karşılaşmaları sonucunda, her karşılaşmada semptom oluşması için gereken allerjen miktarı azalır. Buna

priming denir ve geç faz allerjik cevap sırasında oluşan hücre akınının bir sonucu olduğu düşünülmektedir.

Tanı: Astım tanısında anamnez önemli bir yer tutmaktadır. Bir kişide tekrarlayan vizing ve nefes darlığı ataklarının varlığı ve özellikle sabaha karşı ortaya çıkması, aile hikayesinin olması her zaman astımı düşündürmelidir. Uluslararası alışma grupları son yıllarda öyküde “tekrarlayan öksürük ve/veya vizing atakları” olması gerektiğini belirterek, öksürüğü de bu kapsam alanı içine almışlardır. Büyük ocuklarda ve erişkinlerde öykü yanında solunum fonksiyon testleri tanı için en değerli tetkiktir.

Sınıflama: Ekstresek (allerjik) astım, intrinsek (allerjik olmayan) astım, egzersize bağlı astım, mesleksen astım, aspirine bağlı astım, noktrnel astım gibi çeşitli astım formları tanımlanmıştır.

Ekstresek (allerjik) astım: Genellikle erken yaşlarda başlar. Hastalarda astımın yanısıra egzama, allerjik rinit (saman nezlesi), ürtiker gibi hastalıklar da vardır. Deri testleri pozitif, serum IgE düzeyleri yüksektir. Bu hastalarda ailesel atopi de mevcuttur. Allerjenlerle aralıklı karşılaşma paroksizmal vizing ve soluk darlığı nöbetlerine yol açar. Atopik kişilerde semptomlara neden olan çoğunlukla solunan allerjenlerdir.

Intrinsek (allerjik olmayan) astım: Allerjik bir çevresel etkenin neden olmadığı, ailesel ve kişisel atopi öyküsü ve bulgusu olmayan genellikle 30 yaş üstü hastalarda görülen bir klinik biçimdir. İnfeksiyonlar, psikososyal stres, paroksizmal vizing ve soluk darlığı nöbetlerini başlatan nedenlerdir. Genellikle deri testler negatiftir, serum IgE düzeyleri normal veya düşük olabilir, periferik kanda ve balgamda bazen eozinofili saptanabilir, nonspesifik bronş provokasyon testleri pozitifdir.

Egzersize bağlı astım: Orta veya ağır egzersizi takiben 8-30 dakika arasında maksimal ekspiratuvar akım hızlarında azalma ve aşırı hava yolu daralması ile karakterizedir. Egzersizin vantilasyonu artırarak hava yollarında soğuma ve kurumaya yol açtığı varsayılmaktadır. Bu ozmotik değişim, mast hücrelerinden hava yollarında bronkospazma neden olacak mediatörlerin salgılanmasını başlatır. Egzersiz sırasında sempatik aktivite arttığından hasta kısa bir süre korunmuş olur, ancak daha sonra bronkospazm bulguları belirir.

Sadece bu durumda astım bulguları ortaya çıkıyorsa egzersiz astımından söz edilir. Ancak astımlıların pek çoğunda diğer nedenlere ilave olarak egzersiz sırasında yakınmalarda artış vardır (19).

Mesleksenel astım: İşyeri ortamındaki bir allerjenin neden olduğu astım olarak tanımlanır. Daha önceden varlığı bilinen astımın başlaması şeklinde olabilir. Allerjenle karşılaşma ile duyarlılık arasında aylar ve yıllarla ölçülen bir latent dönem vardır. İş ortamında solunan toz, gaz ve kokular hastada paroksizmal ve periyodik astım semptomlarının başlamasına neden olurken iş ortamından uzak olduğu günlerde hasta daha iyi hisseder. Mesleksenel astım tanısını kesinleştirmek için iş ve ev ortamında PEF ölçümleri yapılmalıdır. En sık görüldüğü meslekler ve kişiler; gıda sanayii, kümes hayvancılığı, çiftçilik, ipek işçiliğı, fırın işçiliğı, nakliye işçiliğı, pamuk tekstil işçiliğı, rafine işçiliğı, kaplamacılık, elmas işlemeciliğı, kuaförlük, hastane çalışanları, anesteziistler, plastik sanayi, oto boyama işçileridir (19).

Aspirine bağı astım: Aspirinin tetiklediğı klinik formdur. Erişkin astımlıların %2-10'unda aspirinle bronş obstrüksiyonu bildirilmiştir. Duyarlılığı kişiden kişiye değişir. Ufak dozlar, ciddi nöbetlere neden olabilir. Hastaların çoğunda Samter triadı denen, rinit, polip ve sinüzit de vardır. Aspirinin siklooksijenaz yolunu bloke ederek prostaglandin yapımını önlediğı ve bu nedenle bronkospazm oluşturduğı bilinmektedir (19).

Noktürnal astım: Noktürnal astım konusundaki bilgiler geliştikçe, gece hastaların kötüleşmesinden sadece bronkokonstrüksiyonun sorumlu olmadığı anlaşıldı. Sağlıklı bireylerde bile solunum fonksiyonları gece %8 oranında bozulur. Astımlılar da bu sirkadien ritme uyarlar ancak artmış olan bronş hiperreaktivitesi nedeniyle onlarda gece kötüleşmeleri çok belirgindir ve progresif olup uykunun fazları ile ilişkili değildir.

2.2. Solunum Fonksiyon Testleri (SFT)

Solunum sisteminin normal konumunu değerlendirmede ve hastalıklardaki sapmalarda, solunum mekaniğinin göstergeleri olan akciğer fonksiyon testleri yardımcı olur. Akciğer fonksiyonlarını etkileyen belli başlı faktörler olan yaş, ırk, cinsiyet, boy, kilo gibi değişkenlerin doğru belirlenmesi gerekir. Akım oranları ve akciğer volümleri yaşla birlikte değişmekle birlikte boy

çoğu kez yaştan daha önemli bir parametredir. Akciğerlere giren, çıkan hava volüm ve kapasiteleri ile hava akım hızlarının ölçülmesi işlemine spirometri, ölçüm yapan aletlere spirometre, elde edilen traseye spirogram denir. Çıkan hava “volüm/akım” ve “zaman/volüm” değişkenlerine göre grafik şeklinde kaydedilebilir. Tekrarlanan ölçümlerde daha kullanışlı görüntü vermesi sebebi ile akım-volüm eğrileri tercih edilmektedir. Spirometre ile pek çok parametre ölçülebilmesine rağmen, pratikte en sık kullanılan ve testlerin duyarlılığını arttıran parametreler FVC (zorlu bir eksprium ile akciğerlerden çıkarılan toplam hava miktarı-zorlu vital kapasite), FEV1 (zorlu bir ekspriumun birinci saniyesinde çıkarılan hava miktarı), FEV1/FVC'dir. Bu parametrelerde tespit edilen patolojik bir düşüklük ilgili hava yollarında obstrüksiyon olduğunu göstermektedir. Astımdaki obstrüksiyonun en önemli özelliklerinden biri reverzibilite göstermesidir. Hastaların 200 mikrogram salbutamol veya 500 mikrogram terbutalin inhalasyonundan sonra ölçülen FEV1 veya FVC değerlerinde başlangıçta elde edilenlere göre %12 veya üzerinde bir artış tespit edilmesi solunum yollarında reverzibil bir obstrüksiyon olduğunu gösterir ki bu astım tanısı için son derece önemli bir testtir. Bu test “erken reverzibilite testi” olarak isimlendirilmektedir.

Solunum fonksiyon testleri statik ve dinamik olmak üzere iki gruba ayrılır. Statik testlerde zaman faktörü göz önüne alınmadan yalnızca hacim değerlendirilir. Dinamik testlerde ise belli bir süre içerisinde çıkarılan hava hacmi ya da akım hızı ölçülür.

Statik Solunum Fonksiyon Testleri

Soluk Hacmi (Tidal Volume, TV): Normal solunum sırasında akciğerlere giren ve çıkan hava hacmidir. Yaklaşık 500 ml'dir.

İnspirasyon Yedek Hacmi (İnspiratory Reserve Volume, IRV): Normal bir inspirasyondan sonra alınabilecek maksimum hava miktarıdır. İstirahat sırasındaki maksimum inspirasyon ile alınan hava hacminden tidal volümün çıkarılması ile elde edilir.

Ekspirasyon Yedek Hacmi (Expiratory Reserve Volume, ERV): Normal bir ekspirasyondan sonra çıkarılabilecek maksimum hava miktarıdır.

Reziduel Hacim (Residuel Volume, RV): Hiçbir zaman akciğerlerden çıkarılamayan hava miktarıdır. Toplam akciğer kapasitesinin %25–30'unu

oluşturur. Bu miktarın artması soluk alıp verme sırasında alveol havasının yenilenme oranını düşürür. Direkt olarak ölçülemez; indirekt olarak akciğerlerde kolayca dağılan ancak kan dolaşımına karışmayan helyum, azot gibi gazların yardımıyla hesaplanabilir.

Inspirasyon Kapasitesi (Inspiratory Capacity, IC): Normal bir ekspirasyondan sonra çıkarılabilecek maksimum hava miktarıdır. Soluk hacmi ile inspirasyon yedek hacminin toplamıdır.

Fonksiyonel Reziduel Kapasite (Fonksiyonel Residuel Capacity, FRC): Normal bir ekspirasyonu takiben akciğerlerde kalan hava miktarıdır. Akciğerin esnek gerilim gücüne karşı akciğer ile göğüs kafesinin gerilim gücü arasındaki dengeyi yansıtır.

Vital Kapasite (Vital Capacity, VC): Derin bir inspirasyonun ardından verilebilecek toplam hava miktarıdır. Inspirasyon yedek hacmi, normal solunum hacmi ve ekspirasyon yedek hacminin toplamıyla oluşur. Vital kapasiteye etki eden başlıca faktörler boy, kilo, yaş, cinsiyet, ırk ve düzenli spordur. Boyun uzamasıyla vital kapasite artar. 20–22 yaşlarında VC en yüksek değerdedir; 40 yaşından sonra azalır. Erkeklerde kadınlardan %25–30 daha fazladır. Özellikle yüzme, vital kapasiteyi artırır. Solunum kaslarının kuvveti ve akciğer ve göğüs kaslarının genişleyebilme kapasitesi de etkiler.

Total Akciğer Kapasitesi (Total Lung Capacity, TLC): Maksimum inspirasyondan sonra akciğerlerde bulunan hava miktarıdır.

Dinamik Solunum Fonksiyon Testleri

Zorlu Vital Kapasite (Forced Vital Capacity, FVC): Maksimum inspirasyonu takiben zorlu ve hızlı bir ekspirasyonla akciğerlerden çıkarılan hava miktarıdır. Normal bir solunum frekansında inspirasyon 2 saniye, ekspirasyon 3 saniye sürer.

Zorlu ekspirasyon hacmi (Forced Expiratory Volume, FEV): 1., 2., 3. saniyedeki zorlu ve hızlı bir ekspirasyonla akciğerlerden çıkarılan hava hacmi (FEV1, FEV2, FEV3) belirlenebilir. FVC'ye oranları hesaplanır. FEV1/FVC'nin %70'in altında olması patolojiktir. Özellikle solunum yolu obstrüksiyonlarında bu oran düşer.

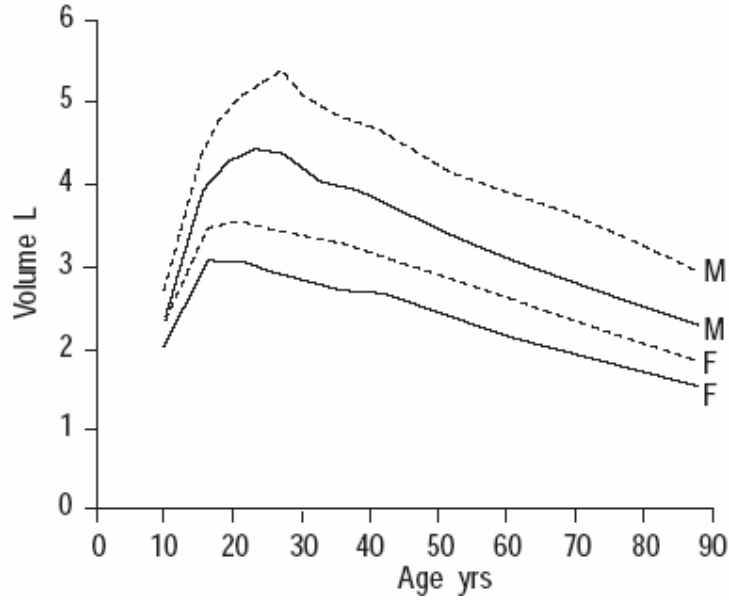
Ekspirasyon Akım Hızı: Zorlu ekspirasyon sırasında çıkarılan havanın akım hızıdır. Akım hızının maksimum olduğu değer Maksimum Ekspirasyon

Akım Hızı (Peak Expiratory Flow Rate, PEFR); zorlu vital kapasitenin %25, %50, %75'inin çıkarıldığı andaki akım hızları Zorlu Ekspirasyon Akım Hızı (Forced Expiratory Flow Rate, FEFR) olarak değerlendirilir.

Maksimum Solunum Kapasitesi (Maximum Voluntary Ventilasyon, MVV):

Bir dakika içerisinde istemli olarak yapılan maksimum ventilasyondur. Pulmoner ventilasyon normal koşullarda 6 lt/dak'dır .

FEV1/FVC oranı 60 yaşından sonra önemli oranda düşer (20). FEV1 ve FVC kadınlarda 20, erkeklerde 27 yaşına kadar artış gösterir, daha sonraki yaşlarda azalmaya başlar (20). FEV1 değeri 25-39 yaşları arasında yılda 20 ml, 65 yaşından sonra 38 ml azalma gösterir (20). FEV1 ve FVC değerlerinin yaşla değişimi şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3: FEV1 ve FVC değerlerinin yaşla değişimi: Düz çizgi FEV1, Kesik çizgi FVC değerleridir (20).

2.3 Obezite ve Astım

Günümüzde çevre şartları ve yaşam biçimi hızla değişmekte, bunun sonucu olarak da bazı hastalıkların prevalansı değişmektedir. Hem astım hem de obezite bütün dünyada milyonlarca insanı etkilemektedir. Son yıllarda her ikisinin de prevalansında büyük artışlar gözlenmektedir. Bu iki durum, genetik ve çevresel etkilerin kompleks etkileşimi sonucu oluşmaktadır (21). Çevresel

faktörlerin obezite prevalansındaki artışta rolü açık olmakla birlikte, astım sıklığında artıştaki rolü tam belirgin değildir. Bu iki durumun birlikte artışı, astım patogenezinde obezitenin rolü olduğu kanısını doğurmuştur. Ancak astımın obezite ile ilişkili olmayıp her ikisinin de hareketsiz bir yaşam biçimi, değişen diyet özellikleri gibi çeşitli olumsuz faktörlerden etkilendikleri de öne sürülmektedir.

Dünyada 1995 yılında 200 milyon obez kişi bulunmakta iken, 2000 yılında 300 milyona yükselmiştir. Bu artış, en çok kadınlarda olmaktadır. ABD'de 16 yaşındaki gençlerin 1/3'ü aşırı kilolu, %16'sı obezite sınırındadır (22). 11 yaşından sonra obez kadınlarda astım görülme sıklığı, 5-7 kez daha fazladır ve leptin düzeylerinde artış vardır (22). Obezlerin büyük bir kısmının modernleşmiş toplumlarda yaşadığı düşünülmese rağmen, gelişmekte olan ülkelerde de 115 milyon obez kişinin bulunduğu tahmin edilmektedir. Obezite, vücut kitle indeksi (body mass index, VKİ, BMI) ile ifade edilmektedir ve vücut ağırlığı (kg)/boy (m)² şeklinde hesaplanmaktadır.

Yaşa ve cinse göre oluşturulmuş olan VKİ persentil eğrileri ile değerlendirildiğinde, 5. persentilin (20) altı zayıf, 5-95. persentiller arası (20-27) normal ve 95. persentil (27) üzerinde obez olarak kabul edilmektedir. Vücut kitle indeksi yükseldikçe astım prevalansında artış görülür. Kadınlarda, beden kitle indeksindeki (VKİ) artışın astım gelişim riskini arttırdığı belirlenmiştir (23). Bir çalışmada da kadınlarda astım ile VKİ arasında doğru, FEV1/FVC oranı ile ters ilişki olduğu saptanmıştır (24). Ayrıca obezite ile astım semptomları, bronş aşırı duyarlılığı ve atopi arasında bağlantı saptanmıştır. Sıklığı giderek artan astım ve obezite ile ilgili epidemiyolojik veriler obez erişkin ve çocuklarda astım insidansının arttığını göstermektedir (25). Obezite özellikle şiddetli astımı olan olgularda önemlidir; astım tanısı ile acil servise başvuran olguların %75'inin obez olduğu bildirilmiştir (26). Ayrıca morbid obezitesi olan astımlı olguların kilo vermekle semptomlarının ve astım şiddetinin azaldığı bilinmektedir (27). Obezite astımda olduğu kadar havayolu hiperreaktivitesinin oluşmasında da rol oynar (28). Obezite ile ilişkili astımın patogenezinde, adipoz dokudan salınan leptinin rolü olabileceği düşünülmektedir (29). Obezite ile astımın sebep-sonuç ilişkisini açıklayabilecek çalışmalar az sayıda olmasına rağmen bazı spesifik mekanizmalar açığa çıkmıştır. Obezite, astım fenotipini direkt mekanik etkilerle, immün cevapları arttırarak, genetik mekanizmalarla ve hormonlar aracılığı ile

etkilemektedir. Obez kişilerde akciğerde tidal solunum hareketleri azalmıştır, fonksiyonel rezidüel kapasite karın içi yağlarının diyafram kasını yukarı kaldırması nedeni ile düşüktür. Obez kişilerin spirometrik incelemelerinde en belirgin özellik zorlu vital kapasitenin (FVC) orta kısmında zorlu akımın (FEF25-75) düşmesidir. (FEF25-75)/FVC oranı kilo vermekle düzeltilmektedir.

Gastroözofageal reflü (GER), astımlı erişkinlerin %60-80'inde saptanmaktadır. Obezite, GER için en önemli risk faktörlerinden biridir. Obezlerde artmış olan karın içi basınç, mekanik olarak gastroözofageal basınç gradiyentini artırır. Zayıflama ile GER bulgularının hafiflemesi de obezite ile astım arasındaki ilişkide GER'in rol oynadığını düşündürmektedir.

Obezitenin inflamatuvar bir durum olduğunu gösteren çalışmalar gitgide artmaktadır. Obez kişilerde leptin yüksektir. Leptin, lipopolisakkarid ile stimule edilmiş makrofajlardan TNF α , IL-6 ve IL-12 yapımını arttırmaktadır. Astım da inflamasyon ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Obezitede yüksek bulunan bu protein ve sitokinlerin astım patogenezinde de rol oynadığı gösterilmiştir.

Obezite, astım fenotipini birkaç yoldan etkileyebilir. Öncelikle, her ikisini de araştıran çalışmalarda bazı ortak genler saptanmaktadır. β 2 adrenerjik reseptör ve TNF α genleri her iki durumda da önemli rol oynamaktadır. Obezite aday genlerinin bazıları astım ile ilgili kromozom bölgelerinde yer almaktadır. Astımda genom çalışmaları, 5q, 6p, 11q ve 12q kromozom bölgelerinin kalıtımda rol oynadığını göstermektedir. Obezite genleri de yaklaşık aynı bölgelerde yer almaktadır. Glukokortikoid reseptör geni 5q31-32 bölgesinde yer almakta ve hem obezite hem de astımda rol oynamaktadır. İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 de 12q23 bölgesinde yer almakta ve hem obezite ile hem astımdaki kronik değişiklikler sonucunda ortaya çıkan hava yolu yeniden yapılanması ile ilişkili bulunmaktadır. Ayrıca obezlerde öyle bazı proteinler kodlanabilir ki, bunların astım üzerine direkt etkileri olabilir. Endüstrileşmiş toplumlarda gıda üretimi toplumun ihtiyaçlarını fazlası ile karşılar ve aşırı yeme en önemli sorunlardan biri haline gelmektedir. Şehirleşme, kişilerin yemek yeme alışkanlıklarını değiştirmektedir. Fizik aktivite eksikliği genetik üzerine etkili olarak astım gelişmesine neden olabileceği gibi, fizik aktivite eksikliği ve genetik birlikte etki ile hem obeziteye hem de astıma neden olabilir. Günümüzde fast-food yeme alışkanlığından dolayı obezite gelişme sıklığı çok artmıştır.

2.4 Leptin

1994 yılında Zhang ve arkadaşları tarafından keşfedilen leptin, adını Yunanca leptos (ince) kelimesinden alan, sitokinlere benzeyen ve 167 amino asit içeren protein yapısında bir hormondur. Molekül ağırlığı 16 kDa'dur ve vücutta birçok alanda fonksiyon gördüğü tespit edilmiştir (30). İnsanlarda 7. kromozomun uzun kolunda bulunan (7q31) ob/ob geni'nde kodlanmıştır. İlk defa ob/ob mutant farelerde bir mutajenik gen ürünü olarak belirlenmiştir (31). Ob, obez farenin kısaltmasıdır. Vücutta başlıca adipoz dokuda sentezlenen leptinin, bir miktar plasenta, gastrik epitel, iskelet kası, hipofiz ve meme bezi tarafından da salgılandığı gösterilmiştir (32). Kanda serbest ve proteine bağlı olmak üzere iki formda bulunur. Leptinin aktivitesinden serbest formun sorumlu olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda obez bireylerde serumdaki leptinin büyük kısmının serbest formda olduğu tespit edilmiştir (33).

Obez kişilerde serbest leptin formunun artışının tespit edilmesi, obezite gelişiminde asıl sorunun leptin eksikliği değil, leptin rezistansı olduğu hipotezini destekleyen kanıtlardan biri olarak görülmektedir. Leptinin dolaşımdaki yarı ömrü yaklaşık 30 dakikadır ve pulsatif olarak yemeklerden 2-3 saat sonra salgılanır. Diurnal bir ritmi vardır ve sabah erken saatlerde pik yaparken, öğleden sonra en düşük düzeylere iner (34). Serum leptin düzeyleri kadınlarda erkeklere oranla daha yüksektir. Bu durum kadınlarda yağ dokusu fazlalığı ve ciltaltı/visseral yağ oranının daha fazla olması ile açıklanmaktadır.

Leptin Sekresyonunun Regülasyonu

Leptin merkezi sinir sisteminde etkilidir. Özellikle hipotalamik yiyecek alınımlarını baskılar, enerji harcanımını stimüle eder (35). Kilo kaybı durumunda, kan leptin düzeyinde azalma ile yiyecek alınımlarında artış, enerji harcanımında azalış saptanmıştır. Kilo artışı durumunda, kan leptin düzeyindeki artış ile yiyecek alınımlarında azalış, enerji harcanımında artış rapor edilmiştir. Enerji harcanımındaki bu artış, oksijen tüketiminde, vücut sıcaklığında artış ve yağ dokusu kitlesinde azalma ile kendisini gösterir (36).

Vücut ağırlığının düzenlenmesinde anahtar rol oynayan leptin, hipotalamustaki spesifik reseptörler üzerinden etki ederek iştahı azaltır ve enerji

harcanmasını artırır (37). Serum leptin seviyeleri ile vücut kitle indeksi (VKİ) arasında pozitif korelasyon olduğu ve leptinin vücut yağ kitlesini yansıttığı gösterilmiştir (38). Leptin düzeyinin ana belirleyicisi vücut yağ kitlesi ve vücut kitle indeksi (VKİ) olsa da, bir çok faktör leptinin regülasyonunda rol almaktadır. İnsülin, glukokortikoidler ve prolaktin leptin sentezini stimüle ederken; tiroid hormonları, büyüme hormonu, somatostatin, serbest yağ asitleri, uzun süre soğuğa maruz kalma ve katekolaminler leptin üzerinde inhibitör etki gösterirler.

Leptinin Fonksiyonları

Leptinin vücuttaki başlıca rolü, beyin (özellikle hipotalamus) üzerine negatif feedback etki ile gıda alımını ve enerji metabolizmasını düzenlemek ve obezite gelişmesini engellemektir. Ayrıca, metabolizmanın düzenlenmesi, cinsel gelişim, üreme, hematopoez, immünite, gastrointestinal fonksiyonların düzenlenmesi, sempatik sinir sistemi aktivasyonu, anjiyogenez ve osteogenezis'de de çok önemli rolleri olduğunu saptanmıştır.

Leptin Reseptörleri

Leptin, sitokin ailesine olan aşırı benzerliği nedeniyle klas 1 sitokin reseptör ailesinden sayılmaktadır. Leptin IL-6 ve IL-11 ile yüksek oranda benzerlik gösterirken; leptin reseptörleri de IL-6 reseptörü ile homoloji göstermektedir (39). Leptin reseptörleri, OB-Rb (uzun reseptörler) ve OB-Ra (kısa reseptörler) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. OB-Rb reseptörleri sinyal transdüksiyonu kapasitesine sahiptirler ve en çok hipotalamusta (nükleus arkuatus) bulunurlar. Kısa form reseptörler (OB-Ra) ise intrasellüler sinyal için gerekli olan segmentlerin tümünü taşımazlar ve bu nedenle sinyal iletiminde rolleri çok az veya yoktur. OB-Ra reseptörlerinin bulunduğu başlıca dokular ise böbrek, akciğer, plevus koroideus ve beyin kapillerleridir. Farelerde matür reseptörler 1142 amino asit'den oluşan 81 kDa ağırlığında Tip I (ekstrasellüler N-terminal) transmembran proteinidirler. 817 amino asit içeren ekstrasellüler segment, 21 amino asit içeren transmembranik bölge ve 302 aminoasit içeren sitoplazmik kuyruk olmak üzere 3 bölgeden oluşurlar. İnsan, fare ve sıçan reseptörleri uzunluk bakımından birbirleri ile benzerdirler.

Leptinin Etki Mekanizması

Leptin, vücut yağ kitlesi ile orantılı olarak dolaşımda bulunur ve santral sinir sistemine de plazma seviyeleri ile orantılı olarak geçer. Leptinin ana etki mekanizması birçok hipofizer hormonun regülasyonunda görev alan ve asıl etkisi iştahı artırmak olan nöropeptid-Y'nin arkuat nükleus'dan salınımı ve ekspresyonunu inhibe etmektir (40). Bununla birlikte yapılan çalışmalar leptinin diğer birtakım mediatörler ile de etkileşim içinde olduğunu ve kompleks bir iletişim ağı olduğunu göstermiştir. Bu mediatörler başlıca anabolik ve katabolik olarak ikiye ayrılabilirler. Anabolik olanlar (nöropeptid-Y gibi) günlük gıda alımını artırdığı gibi enerji harcanmasını da azaltarak pozitif enerji dengesine neden olurlar. Katabolik olanlar ise gıda alımını azaltırlar ve enerji harcanmasını arttırlar. Katabolik mediatörlerden ilk tanımlanan ve en önemli olanı bir melanokortin ailesi üyesi olan α -melanosit stimülan hormon (α -MSH)'dur. α -MSH, proopiomelanokortin (POMC) prekürsöründen oluşan bir moleküldür ve melanokortin reseptör ailesinin birçok üyesi için ligandır. Bu üyelerden en önemlileri primer olarak beyinde sentezlenen melanokortin 3 reseptörü (MC3R) ve melanokortin 4 reseptörü (MC4R)'dür. Genetik olarak MC4R defektli farelerin obez olduğu ve bu reseptörün sentetik agonistinin verilmesi ile gıda alımının baskılandığının gösterilmesi, MC4R üzerinden sinyallerin gıda alımını ve yağ dokusundaki artışı sınırlandırdığını göstermiştir.

MC3R'deki genetik eksiklik vücutta fazla yağ depolanmasına neden olsa da bu etki ılımlı bir etkidir ve artmış gıda alımı söz konusu değildir. POMC nöronları nükleus arkuatus'da nöropeptid-Y'ye oldukça yakın bulunurlar ve leptin tarafından regüle edilirler (41). Sonuçta leptin, beyinde kilo alımına neden olan anabolik sinyal iletimini inhibe, enerji harcanmasını arttıran katabolik sinyal iletimini aktive ederek fazla kilo alımına engel olur.

Leptin ve İmmün Sistem

Gerek leptin defekti (ob/ob), gerekse leptin reseptör defekti (db/db) olan farelerde immün fonksiyonların bozulduğu tespit edilmiştir. Bu bozukluklar başlıca hücre aracılı immün yanıtta olmaktadır ve özellikle viral ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı yanıtta azalma ve azalmış makrofaj fonksiyonları olarak kendini göstermektedir. Leptin, lökosit sentezini uyarır ve eritropoietin

hormonunun eritrositlere olan etkisini arttırır (42). Tıpkı bakteriler gibi leptin de makrofajları aktive ederek fagositozu güçlendirir ve onlardan pro- ve anti-inflamatuvar sitokin salınımını uyarır (43). Aynı zamanda yara iyileşmesini kısalttığı ve neovaskülarizasyonu arttırdığı da tespit edilmiştir (44).

Leptin ve Hematopoez

Hematopoetik dokularda ve embriyojenik gelişim dönemlerindeki kök hücrelerinde leptin reseptörlerinin gösterilmesi leptinin hematopoezde rolü olabileceğini düşündürmüştür (45). Kemik iliği adipositlerinden leptin sekresyonunun, hematopoetik hücre prekürsörleri için bir diğer lokal leptin kaynağı olduğunu düşündürmektedir (46). Bu hücrelerin leptine doza bağımlı olarak yanıt verdikleri gösterilmiştir. Son çalışmalar leptinin hematopoezin çok erken safhalarında sitokinlerle beraber özellikle T hücreleri ve makrofajlar başta olmak üzere bir çok hematopoetik hücrenin gelişmesini etkilediği gösterilmiştir. Leptinin ayrıca makrofajlar üzerine de direkt etkili olduğu saptanmıştır (43).

Leptin ve Kemik Metabolizması

İnsanlarda leptin seviyelerinin obezite, artmış kemik kitlesi ve kemik oluşum hızı ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (47). Kısaca leptin kemik oluşumunu stimüle edip, rezorbsiyonunu inhibe eden bir “kemik dostu” olarak çalışmaktadır.

Leptin ve Anjiyogenez

İnsan endotelial hücrelerinde leptin reseptörlerinin olduğu ve leptinin anjiyogenezisi hem *in vitro* hem de *in vivo* indüklediği saptanmıştır (48).

Leptin ve Üreme

Leptinin üreme fonksiyonundaki rolünü belki de en iyi gösteren bulgular obez C57BL/6J ob/ob farelerinin genetik olarak hipogonadotropik hipogonadizm göstermeleri ve steril olmalarıdır. Ayrıca steriliteleri kilo verme (diyet kısıtlaması) ile de düzelmemektedir. Bu farelere leptin verilmesi ile puberte başlamış ve infertilite düzelmiştir. Ayrıca, normal sıçanlara leptin verilmesi ile de pubertenin başlamasının hızlandığı görülmüştür. Hipotalamustan GnRH, hipofizden FSH, LH ve prolaktin salınımını stimüle ettiği gösterilen leptinin, bu etkisini

nöropeptid-Y üzerinden gösterdiği sanılmaktadır. Nöropeptid-Y, yüksek konsantrasyonlarda gonadotropin aksı üzerine inhibitör etkilidir. Böylece direkt olarak düşük gıda alımı ve/veya aşırı enerji harcanması gibi koşullarda seviyesi artarak seksüel matürasyonu ve üremeyi inhibe eder. Ayrıca leptinin gonadotropin ve seks steroid sentezini ve sekresyonunu arttırdığı da saptanmıştır.

Leptin ve Termogenez

Leptinin enerji harcanmasında yaptığı en önemli etki termogenezisde artış sağlamasıdır. Bilindiği üzere alınan gıdalardaki enerjinin büyük bir kısmı metabolizma sırasında ısı olarak açığa çıkar ve bu fenomen termogenezis olarak adlandırılır. Tiroid hormonlarının termogenezisi artırarak enerji metabolizmasında düzenleyici rol oynadıkları bilinmektedir. Termogenezisde en önemli faktörler “uncoupling” proteinler (UCP)'dir. UCP'ler mitokondrinin iç membranında bulunurlar ve protonların eşleşmesine engel olarak ATP sentezi yerine ısıнын açığa çıkmasını sağlarlar. Tiroid hormonları UCP2 ve UCP3 ekspresyonunu güçlü bir şekilde uyarırlar ve böylece daha fazla ısıнын oluşmasını (daha fazla enerji harcanması) sağlarlar. Leptin, tiroid hormonlarının seviyesini ve sempatik sinir sisteminin aktivasyonunu arttırarak daha fazla UCP seviyelerinin oluşmasını sağlar ve termogenezisi arttırır ve böylece obezite gelişiminin önlenmesi için iştahın azaltılması (enerji alımının azaltılması) yanında çok önemli bir adım daha atılarak enerji harcanması da arttırılmış olur (49).

Leptin ve Obezite

Leptin eksikliğinin obezite ile sonuçlandığı, günümüzde artık oldukça iyi bilinen ve kabul edilmiş bir gerçektir. Ob/ob farelerdeki “nonsense” bir mutasyon, obezite, artmış gıda alımı (iştah) ve diyabet gelişmesi ile sonuçlanmaktadır; aynı farelerde adipositlerden leptin sentez ve sekresyonunun bozuk ve yetersiz olduğu da saptanmıştır. Benzer şekilde leptine direnç gösteren db/db fareler de obezdirlar ve tıpkı ob/ob fareleri gibi bunlarda da leptin yeterli fonksiyon gösterememektedir.

Obez insanlarda leptin geninde henüz farelerdeki gibi bir mutasyon saptanamasa da, serum leptin konsantrasyonları obezite göstergeleri olan vücut

kitle indeksi (VKİ) ve vücut yağ kitlesi oranı ile pozitif bir korelasyon göstermektedir. Obez insanların büyük çoğunluğunda serum leptin konsantrasyonları yüksektir ve kilo verimi ile tekrar azalır (50). Ayrıca, serum leptin seviyelerinde obezler arasında cinse bağlı fark da vardır. Buna göre leptin ile vücut yağ kitlesi ve VKİ arasındaki pozitif korelasyon kadınlarda erkeklere oranla daha belirgindir ve yapılan ölçümler sonucunda kadınlarda leptin seviyelerinin erkeklere oranla daha fazla olduğu saptanmıştır (50). Ayrıca obez insanlardaki plazma leptin konsantrasyonları her ne kadar obez olmayanlara göre 5 kat kadar yüksek olsa da, serebral sıvıdaki leptin konsantrasyonlarının sadece çok az yüksek olması leptin rezistansını kolaylaştıran hız sınırlayıcı faktörün santral sinir sistemine leptin transportundaki defekt olduğunu göstermektedir (51). Leptin, antiobezite etkisini başlıca enerji alımını azaltarak (iştahın azaltılarak daha az gıda alınması) ve enerji harcanımını artırarak (sempatik sinir sistemi aktivasyonu, termogenezis, artmış oksijen tüketimi) göstermektedir (31).

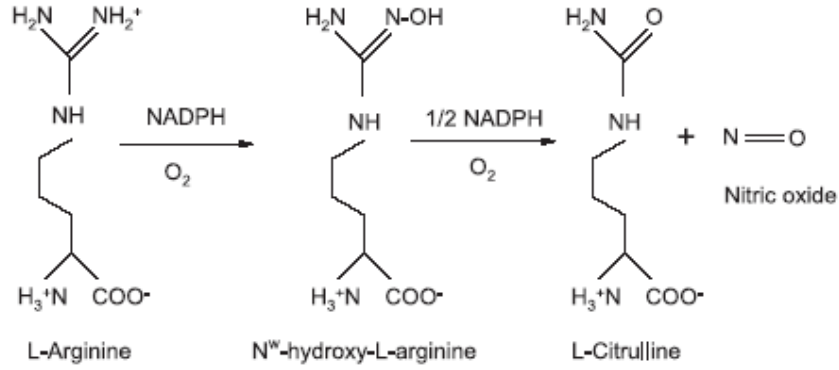
Özetle leptin sadece vücut yağ depoları ile santral sinir sistemi arasında bir koordinatör gibi davranarak obezite gelişimini önleyen bir sigorta değil, yara iyileşmesi, hematopoez, üreme, termogenez, immün sistem, gastrointestinal fonksiyonların ve glukoz metabolizmasının düzenlenmesi, kemik gelişimi gibi pek çok alanda da rolü olan multifonksiyonel bir hormondur.

2.5. Nitrik Oksit (NO)

Endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) 1980'de keşfedildi ve 1987'de bunun NO olduğu anlaşıldı (52, 53). NO, organizmada çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik durumları düzenleyen yüksek oranda reaktif, kısa yarılanma ömrüne sahip, renksiz bir gazdır (54). NO, bir çok hücre tipinde oluşur; dört saniye kadar kısa bir yarılanma ömrüne sahip olmasına rağmen, çevre dokulara çok hızlı geçiş gösterir ve bir çok hücre sinyal iletim yollarını aktive eder. Nitrik oksit, hem yağda hem de suda çözünür.

Nitrik Oksit Sentezi: Nitrik oksit, L-argininden oluşmuştur (28). Bu reaksiyonu katalizleyen enzim, yapıcı sitokrom P-450 redüktaza benzeyen bir enzim kompleksi olan nitrik oksit sentazdır (NOS) (56, 57). NO, L-arginin ve

moleküler oksijenden, elektron vericisi olarak nükleotid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), kofaktör olarak hem, tetrahidrobiopterin, kalmodulin ve flavin adenin mono ve dinükleotidin kullanılmasıyla oluşur. L-argininden NO[•] oluşması reaksiyonu şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4: L-argininden nitrik oksit (NO[•]) sentezi. Nitrik oksit, L-argininin L-sitrüline dönüşümü sırasında sentezleniyor. Bu reaksiyon esnasında 1,5 molekül NADPH, elektron vericisi olarak kullanılıyor. Hidroksi-arginin ara ürün olarak oluşmuştur (58).

Nitrik oksit sentezinin gerçekleştiği reaksiyon, L-argininin, N-hidroksil-L-arginin ara ürünü üzerinden L-sitrülin ve NO[•] oluşturmasıyla sonuçlanan iki basamaklı bir oksidasyon reaksiyonudur. Her bir basamakta karma fonksiyonlu oksidasyon oluşur ve buralarda monooksijenaz 1 ve 2 enzimleri rol oynar (54). Nöronal NOS (nNOS, tip-I NOS), indüklenebilir NOS (iNOS, tip-II NOS) ve endotelial NOS (eNOS, tip-III NOS) olmak üzere üç nitrik oksit sentaz enzimi tanımlanmıştır (59, 60). Bu enzimlerin sentezleri sırasıyla 12., 17. ve 7. kromozoma lokalize genler tarafından düzenlenir (61). Farklı NOS izoformları arasında amino asit benzerliği yaklaşık %55'dir (62). nNOS ve eNOS aktiviteleri için kalsiyum/kalmoduline bağımlı iken, iNOS bağımlı değildir ve bakteriyel lipopolisakkarit ve sitokinler aracılığı ile ekspresyonu artar (63). Nitrik oksit sentaz enzimlerinin izoformlarına ait özellikler tablo 1'de gösterilmiştir. Solunum yolu epitelinde ve çeşitli diğer hücrelerde iNOS bulunur.

iNOS, özgül sitokinlerin indüklemesi sonrasında fazla miktarda salgılanır. İnterferon- γ , IL-1 β , TNF- α , endotoksin veya egzotoksinlerce indüklenmesi sonucunda NOS-I ve NOS-III'ten 1000 kat daha fazla NO[•]

sentezleyebilmektedir. Glukokortikosteroidler bu indüksiyonu ve NO⁻ sentezini inhibe eder (64).

Tablo-1: Nitrik oksit sentezleyen enzimler (58)

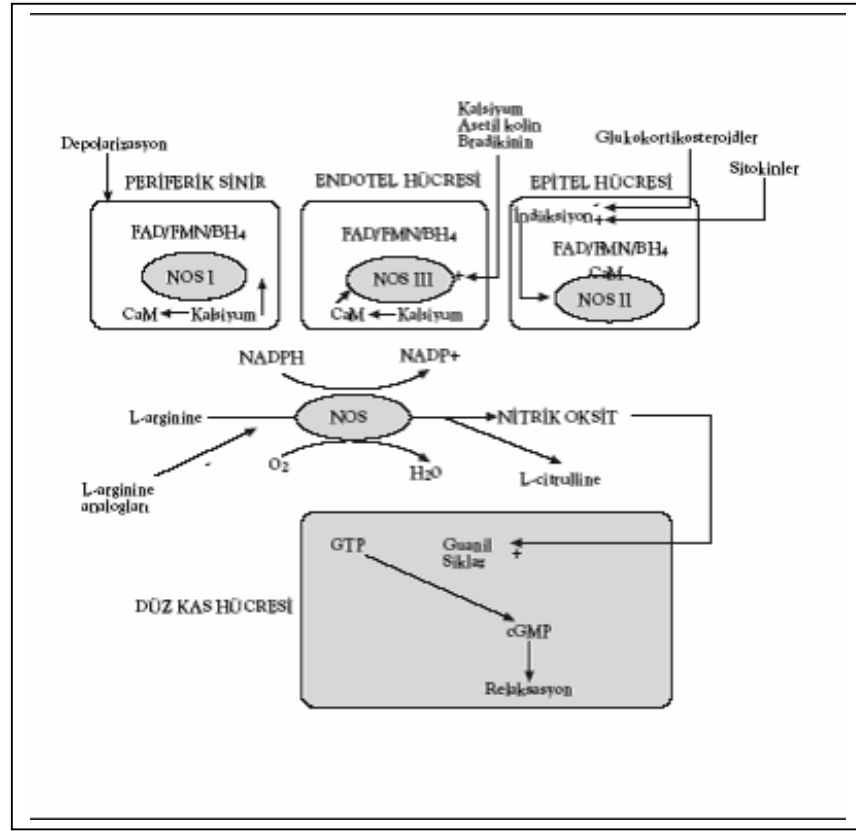
NOS İzoform	Diğer Adı	Salınımı	Kaynak	Regülasyon	NO Miktarı	Kromozom
Tip I	nNOS	Devamlı	Sinir Hücreleri	Kalsiyuma bağımlı	Düşük (pikomol)	12
Tip II	iNOS	İndüklendiğinde	Makrofaj, damar düz kası ve endoteli, miyokard, endokard, hepatosit, immün hücreler, hava yolu epiteli	Sitokinler, endotoksin ve oksidanlar tarafından indüklenme	Yüksek (nanomol)	17
Tip III	eNOS	Devamlı	Vasküler endotel hücreleri, plateletler, miyokard ve endokard, mast hücreleri, nötrofiller	Kalsiyuma bağımlı	Düşük (pikomol)	7

NO⁻, Nitrik oksit; NOS, Nitrik oksit sentezleyen enzim; nNOS, nöral NOS; iNOS, indüklenebilen NOS; eNOS, endotel kökenli NOS

Nitrik oksidin akciğerlerdeki hücresel kaynakları epitelyum hücreleri, pulmoner arter ve venlerin endotel hücreleri, inhibitör nonadrenerjik nonkolinerjik nöronlar, düz kas hücreleri, mast hücreleri, mezotel hücreleri, fibroblastlar, nötrofiller, lenfositler ve makrofajlardır (65).

Nitrik Oksitin Genel Etkileri: Nitrik oksit bir kez sentezlendikten sonra hızla hedef dokulara yayılır ve hücre içinde guanilat siklaz enzimini aktive ederek düz kas kasılmasını sağlayan “cyclic guanosine monophosphate” (cGMP) miktarını artırır (65, 66). Oluşan bu biyokimyasal olaylar düz kas kasılması, vasküler tonüs ve kan akımlarının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Nitrik oksit aynı zamanda trombositler içindeki çözülebilir guanilat siklaz aktivitesini de artırarak trombosit adhezyon ve agregasyonunu azaltır. Ayrıca mikroorganizmaların mitokondrial proteine bağlı demir bileşikleriyle reaksiyona girip DNA sentezini bozarak ölmelerine yol açar ve savunma sisteminde rol oynar. Nitrik oksit, kardiyovasküler sistem, sinir sistemi ve immünolojik sistemde bir çok fizyolojik ve patolojik mekanizmaların düzenlenmesinde çok önemli intra ve intersellüler sinyal taşıyan bir moleküldür (54).

NO[•], damar düz kasları gevşetir, trombosit agregasyonunu inhibe eder, kan basıncını düşürür, anjiyogenezi stimüle eder, nöronal sinyal iletimini sağlar. iNOS vasıtasıyla mikroorganizma tahrip edici NO[•] sentezlemek için makrofajları aktive eder (54). Nitrik oksit diğer bir yandan da, inflamatuvar bozukluklarda sitotoksik bir ajan olarak hareket edebilir (54). Astım patogenezinde de bir çok rol oynayabilir. Astmatik semptomlar gösteren fakat, normal solunum fonksiyon testlerine (SFT) sahip hastaların alveol ve bronşlarında artmış NO[•] konsantrasyonlarına rastlanılmıştır. Özet olarak, NO[•] insan fizyolojisinde önemli bir yere sahiptir. Nitrik oksit düzeyleri, kadınlarda follikül gelişimi esnasında arttığı, ovulasyondan hemen sonra da azaldığı saptanmıştır (67). Nitrik oksit eksikliğinin tubal disfonksiyona sebep olduğu, sperm transportunu geciktirdiği ve bundan dolayı infertiliteye neden olduğu belirlenmiştir. Şekil 5'te nitrik oksitin kaynakları, oluşumu ve düz kas üzerine etki mekanizması gösterilmiştir.



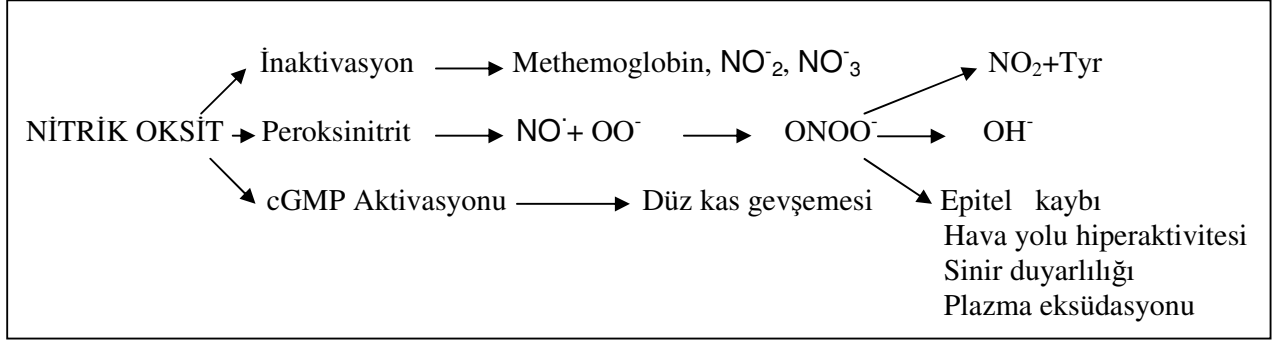
Şekil-5: Nitrik oksit (NO) kaynakları ve oluşumu: Nitrik oksit sentezleyen enzim (NOS) NADPH, oksijen, flavoproteinler (FAD, FMN), kalmodulin (CaM) ve tetrahidrobiopterinin (BH4) varlığında L-arginini, sitrullin ve NO'ya dönüştürür. NOS-I ve III nöronal ve endotelial hücrelerde yer alır ve enzim aktivasyonu için intraselüler kalsiyum artışına gereksinim duyar. NOS II kalsiyuma bağlı değildir. Bütün NOS enzimleri arginin analoglarınınca inhibe edilir. Nitrik oksit, guanil siklazı aktive eder ve hücre içinde cGMP düzeyini artırır ve bu, düz kaslarda gevşemeyle sonuçlanır (58).

Nitrik Oksitin İnaktivasyonu: Nitrik oksitin yarılanma ömrü çok kısadır ve solüsyonlarda hızla okside olarak nitrit (NO_2^-) ve nitrata (NO_3^-) dönüşür. İnsan vücudunda NO, hemoglobine bağlandığında inaktif olur ki bu bağlanma, oksijene göre 3000 kat daha hızlı olmaktadır (9). Bu kadar hızlı inaktif olması belki de nitrik oksidin etkilerini lokalize kılan en önemli faktördür.

Nitrik oksit aynı zamanda serbest radikal süperoksit tarafından da inaktif edilmektedir. Böylece süperoksit dismutaz gibi süperoksidi ortadan kaldıran enzimler NO'nın ömrünü uzatabilir. Nitrik oksidin süperoksitle reaksiyonu sonunda peroksinitrit (ONOO^-) oluşur ki bu, oldukça güçlü doku hasarına yol açan bir maddedir. Nitrik oksit sentezleyen enzimin inhibitörlerinin bulunması, NO'nın fizyolojik ve patofizyolojik özelliklerini saptamada önemli rol

oynamaktadır. L-arginin analogları [Ng-monometil- L-arginin (L-NMMA), NG-nitro-L-arginin (L-NOARG), NG-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME), NG-iminoetil- L-ornitin (L-NIO)] endojen NO⁻ sentezini inhibe ederler (43).

NO⁻'in oluşumundan sonra akıbeti şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil-6: Nitrik oksit (NO⁻) oluşuktan sonra: 1) Methemoglobin, nitrite (NO₂⁻) ve nitrata (NO₃⁻) dönüşerek inaktive olur; 2) süperoksit anyonlar (OO⁻) ile birleşerek peroksinitrite (ONOO⁻) dönüşür. Peroksinitrit, hidroksil radikalleri (OH⁻) ve tirozinle (Tyr) birleşerek nitrotirozini oluştururlar. OH⁻ ve ONOO⁻ astım patogenezinde rol alan moleküllerdir; 3) guanilat siklaz aktivasyonu ile cGMP'yi artırarak düz kas gevşemesine neden olmaktadır.

Solunum Sisteminde Nitrik Oksit: Ekspirasyon havasında nitrik oksit (NO⁻) varlığının 1991'de Lars Gustafsson tarafından insanlarda ve hayvanlarda gösterilmesinden sonra, NO⁻ ölçümüne ilgi ve bu konuda çalışmalar giderek artmıştır (69). Bundan birkaç yıl sonra astımlı hastaların ekspirasyon havasında NO⁻'in arttığı gösterilmiş ve bu basit ve invaziv olmayan yöntemin astımın değerlendirilmesinde kullanılabileceği gündeme gelmiştir (70). Solunum havasında NO⁻ (sağlıklı bireylerde 5-10 ppb) ve bronkoskopik lavaj ve indüklenmiş balgam örneklerinde NO⁻ metabolitlerinin saptanması, NO⁻'in hava yollarında sentezlendiğini gösteren bulgulardır (71, 72). Nitrik oksidin akciğerlerdeki ve başka bazı sistemlerdeki etkileri tablo 2 ve 3'te gösterilmiştir.

Tablo-2: Nitrik oksitin akciğerlerdeki etkileri (58)

Yararlı Etkiler	Zararlı Etkiler
1. Bronkodilatasyon 2. Arteriyel vazodilatasyon 3. Mukosiliyer 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

Tablo-3: Nitrik oksitin bazı sistemlerdeki etkileri (58)

Hedef Sistemler	Biyolojik Fonksiyon	Mekanizma
Akciğerler	Bronkodilatasyon Hava yolu obstrüksiyonu Vazodilatasyon	Bronkodilatör yanıtla sonuçlanan iNANC sinir sisteminde nörotransmitter olarak rol alır Hava yolu damarlarında vazodilatasyon ve ödem cGMP oluşumu
İnflamatuvar Sistem	Antiinflamatuvar etki Proinflamatuvar etki	Th1 lenfosit aktivasyonunda azalma Lökosit göçünde artış, eozinofillerde ve Th2 lenfositlerde dolaylı artış
Savunma Mekanizmaları	Konak savunmasına katılır	NO ⁻ ve/veya oksitleri bakterisid ve sitotoksik etkiye sahiptir.

Nitrik oksidin akciğerdeki hücresel kaynakları, epitel hücreleri, pulmoner arter ve venlerin endotel hücreleri, inhibitör nonadrenerjik nonkolinerjik sinirler, düz kas hücreleri, mast hücreleri, mezotel hücreleri, nötrofil, makrofaj ve lenfositler olduğundan üç NOS izoformu da akciğerde mevcuttur. Özgül olarak

NOS-I, inhibitör nonadrenerjik nonkolinerjik nöronlardan salınır, NOS-III ise endotel hücrelerinde yer alır. NOS-II normal hava yolu epitelinde yer alır ve sitokinler, endotoksin ve reaktif oksijen radikalleri tarafından indüklenir. Ekshale edilen nitrik oksidin potansiyel kaynakları, pulmoner dolaşım, alt ve üst hava yolları ve paranazal sinüslerdir. Özellikle üst solunum yollarında ve paranazal sinüslerde yüksek konsantrasyonlarda NO[•] sentezlenmektedir. Nitrik oksidin yüksek oranda yayılabilme kapasitesi, hemoglobine bağlanabilme kapasitesinin oksijene göre 3000 kat daha fazla olması ve akciğerdeki zengin damar yapısı, pulmoner dolaşımı NO[•] için biyolojik bir atık deposu haline getirmekte ve ekshale edilen NO[•]'da pulmoner dolaşımın rolü bulunmamaktadır. Endotelyal NOS temel olarak endotel hücrelerinden ve trombositlerden salgılanır (59, 72). Nöronal NOS ise daha çok serebellum ve iskelet kaslarında eksprese edilir (73). İndüklenebilir NOS ilk olarak aktive olmuş fare makrofajlarından daha sonraları insan makrofajları dahil bir çok hücreden elde edilmiştir (54, 60, 74).

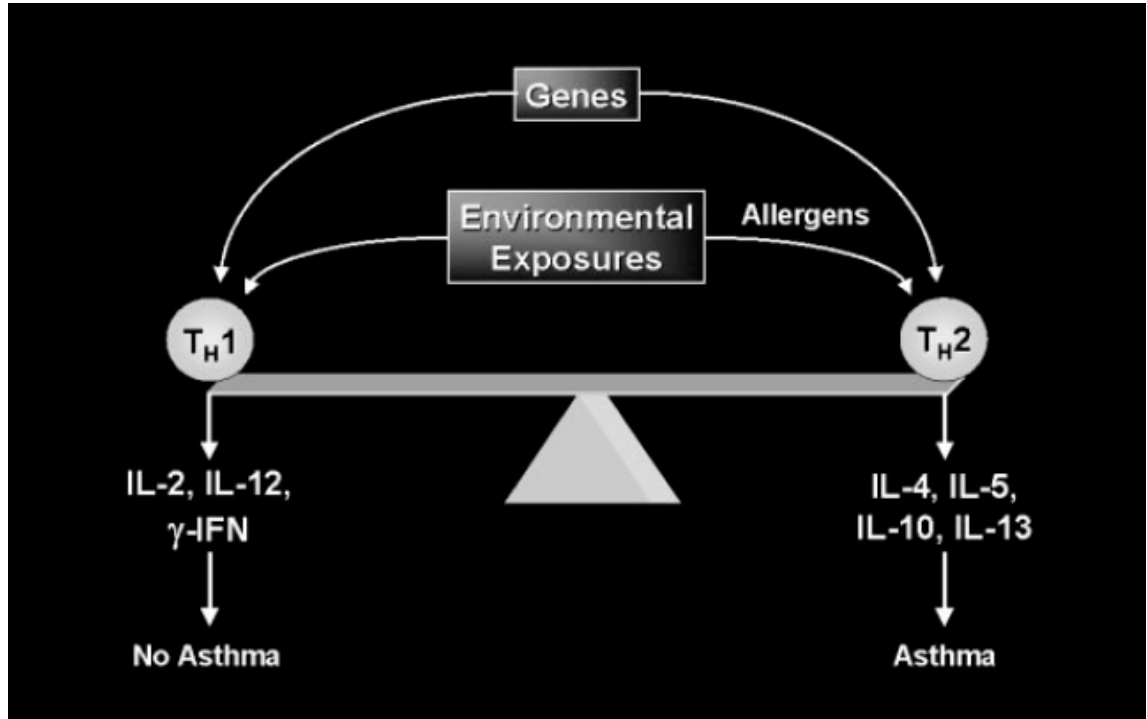
Mediatör Olarak Nitrik Oksit: Nitrik oksit, hücreleri direkt ve indirekt olarak uyaran, çok iyi diffüzyona uğrayabilen birincil haberci gibi görev alır. Direkt etki, NO[•] molekülünün kendisinin direkt olarak yaptığı etki iken, indirekt etki ise, NO[•]'in oksijen veya süperoksit radikalleri ile etkileşimi sonrasında oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) aracılığı ile oluşur. eNOS ve nNOS'un oluşturduğu NO[•] miktar olarak azdır ve direkt etkilidir. iNOS'un oluşturduğu NO[•] yüksek konsantrasyonlardadır ve daha çok indirekt etki gösterir (75, 76). cGMP oluşumu, NO[•]'in bir çok direkt fizyolojik etkisini açıklar (76). Nitrik oksit demir veya çinko içeren nonhem proteinlerle etkileşebilir (75, 77). NO[•]'in indirekt etkileri arasında oksidasyon, nitrozasyon ve nitrasyon reaksiyonları yer alır (75). Sitokinlerce indüklenen NO[•], makrofajlarda sitotoksik etki gösterir (77). NO[•], oksijenle spontan olarak reaksiyona girdiğinde, DNA deaminasyonu ve nitrozilasyonu oluşturabilen dinitrojen trioksit (N₂O₃) oluşur.

2.6. Sitokinler

Sitokinler, hücrelerel düzenleyici proteinlerdir. Çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanır ve hedeflenen hücrelerin davranışını etkilerler. Belli bir sitokin, çeşitli hücreler tarafından farklı dokularda salgılanır

fakat aynı biyolojik etkiyi gösterir. Sitokinlerin etkileri sistemik veya lokaldir. Bazıları klasik hormon gibi davranırlar. Şöyle ki; belli hücreler tarafından kana veya çeşitli hücrelerel sıvılara salgılanıp vücudun diğer bölgelerindeki hücrelerel reseptörlerine bağlanırlar. Diğer sitokinler daha lokalize olmuş etkiler gösterirler. Bunlar otokrin (bir hücre tarafından salgılanan sitokinin aynı hücre üzerine etkisi) ve parakrin (belli bir hücre tarafından salgılanan sitokinin yakındaki komşu hücreye etkisi) etkilerdir (55). Sitokinler, hücre bölünmesi ve farklılaşmasının kontrolü, hematopoez ve bağışıklık sisteminin regülasyonu, yaraların iyileşmesi, kemik formasyonu ve hücrelerel metabolizmanın değiştirilmesi gibi biyolojik olaylarda rol oynamaktadır.

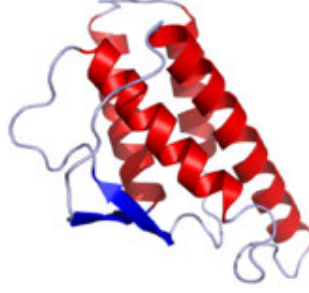
Astımda CD4 T lenfositleri Th2 lenfositlerini artırır. Th1/Th2 lenfositleri arasında bir denge vardır (79). Th1 CD4 lenfositleri, antiviral olan ve sitotoksik T hücrelerini aktive eden IFN- γ ve IL-2'yi sekrete ederken; Th2 CD4 helper lenfositleri, alerjik olayları başlatan ve IgE üreten B hücrelerini uyaran IL-4, IL-12, IL-13'ü salgırlar. Th2 tipi sitokinler alerjik inflamasyonu başlatırken, IFN- γ ise bu etkiyi güçlü bir şekilde antagonize eder. Astım oluşmasında Th1 ve Th2 dengesinin rolü Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil-7: Astımda Th1 ve Th2'nin rolü (80)

2.6.1 İnterlökin-4 (IL-4)

İnterlökin-4 (IL-4), CD4+ T lenfositlerinin alt grubu olan Th2 hücreleri, mast hücresi öncülleri tarafından sentezlenen 15-19 kDa molekül ağırlığında glikoprotein yapısında bir sitokindir.

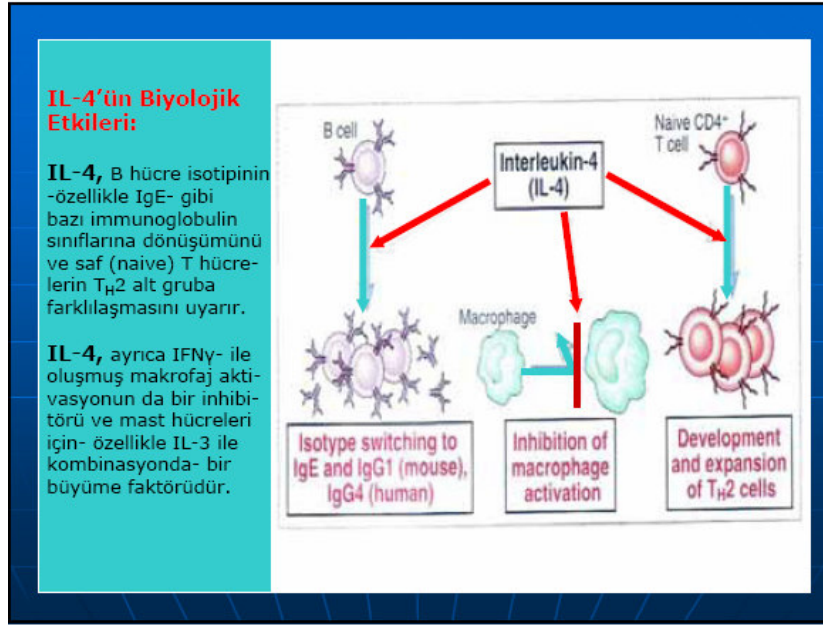


Şekil-8: IL-4'ün kristal yapısı (81)

IL-4, ilk olarak 1982'de M. Howard ve Ellen Vitetta tarafından keşfedilmiştir. Bundan 4 yıl sonra, nükleotid dizileri izole edilerek farelerde B hücre stimülatör faktör-1 (BCSF-1) olarak bilinen protein ile benzerliği ortaya konuldu (81).

IL-4'ün Fonksiyonları: IL-4'ün bir çok biyolojik fonksiyonu vardır: B ve T hücre proliferasyonunu stimüle eder, CD4+T hücrelerinin Th2 hücrelerine farklılaşmasını sağlar, humoral ve kazanılmış immünitede, alerjik inflamasyonun gelişiminde anahtar rol oynar. Th1 CD4+ T lenfositlerinin IFN- α sentezini düzenler, IL-2'nin indüklediği T hücre proliferasyonunu engeller. IL-4, solubl CD23 üretimiyle B hücreleri üzerine büyüme faktörü etkisine sahiptir ve proliferasyonunu sağlar. Aynı zamanda B hücre diferansiyasyonuna sebep olarak IgE, IgM ve IgG1 sentezini sağlar. IL-4, IgE aracılı immün cevabı hücre yüzeylerinde bulunan IgE reseptörlerinin upregülasyonunu sağlayarak güçlendirir. B lenfositleri ve mononükleer fagositik hücrelerde düşük afiniteli, mast hücreleri ve bazofillerde yüksek afiniteli IgE reseptörleri vardır (82). Monositler üzerine olan etkisi, class II antijenleri ve CD23 reseptörlerinin sayısını arttırması ve IgG reseptör oluşumunu engellemesidir. IL-1, IL-6, TNF- α , PGE2 oluşumunu engeller. Mast hücrelerinin büyüme faktörüdür ve mast hücre

aktivasyonunu sağlayarak hızlı alerjik reaksiyon gelişiminde önemli rol oynar. Şekil 9'da IL-4'ün biyolojik etkileri gösterilmiştir.



Şekil-9: IL-4'ün biyolojik etkileri (18)

Astımda IL-4, müsin gen ekspresyonunu ve mukus salgısını artırarak havayolu obstrüksiyonuna katkıda bulunur (83). IL-4, kronik astımda akciğer inflamasyonuna katkıda bulunan fibroblastlardan salgılanan diğer inflamatuvar sitokinleri artırır. IL-4'ün astmatik akciğerlerde inflamasyonun ilerlemesine sebep olan en önemli fonksiyonlarından biri, vasküler endotelden vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM)-1 salgılatmasıdır (84). IL-4 ve VCAM-1 arasındaki etkileşme, T lenfositleri, monositler, bazofiller ve eozinofillerin inflamasyon odağına direkt olarak göçüne sebep olur. Alerjik akciğer inflamasyonunun gelişiminde bir başka önemli nokta, IL-4'ün Th2 lenfositlerinin oluşumunu arttırılabilmesidir. Th2 lenfositleri IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13 salgılatırken, IFN- γ salgısı yetersizdir. Alerjik hastaların bronkoalveolar sıvısında ve serumunda IL-4 düzeyinde artış olduğu saptanmıştır (85). Kronik astımı olan hastalara nebulizör ile IL-4 verildiğinde, balgam eozinofil sayısında artışla birlikte bronş hiperaktivitesi geliştiği görülmüştür (86). Bu bulgular, atopik kişilerin IL-4 salgılamalarını düzenleyen değişik özelliklere sahip olduklarını düşündürmektedir. Atopik kişiler, atopik olmayan kişilere göre daha fazla IL-4 üreten T lenfositlerine sahiptir.

Astım 5q31-33 kromozomu ile ilişkilidir ve bu bölgede IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13 genleri vardır. IL-4'ün aşırı üretimi ve kalıtsal defektlerden dolayı bu sitokine aşırı cevap, astım patofizyolojisine katkıda bulunur. Farelerde yapılan bir çalışmada, anti IL-4 ile IL-4 nötralizasyonu suretiyle alerjen spesifik IgE oluşumunun, eozinofilik inflamasyonun ve havayolu reaktivitesinin azaldığı görülmüştür (87). Günümüzde, astım tedavisinde önemli noktalardan bir tanesi IgE düzeylerinin düşürülmesidir (88). IL-4 üretiminin inhibisyonu serumda IgE düzeylerinin azalmasına ve astım semptomlarının düzelmesine yol açabilir.

2.6.2 İnterlökin-10 (IL-10)

IL-10, 19 kDa molekül ağırlığında, sitokin sentez inhibitör faktör (CSIF) olarak da bilinen antiinflamatuvar bir sitokindir. Doğal immün reaksiyonların ve hücrel immünitinin kontrolünde rol oynar. IL-10 immünoregülatuar sitokinler arasındaki dengede çok önemli bir göreve sahiptir. Th1 ve makrofajlar gibi hücreler tarafından üretilen IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin sentezini inhibe eder, negatif feedback için mükemmel bir örnek sunar. Bununla birlikte, bazı T lenfositleri, mast hücreleri ve B hücrelerini sitümüle eder, IgG sekresyonunu sağlar. IL-10'un diğer proinflamatuvar etkileri, IL-2 ve IL-3 bağımlı T lenfosit proliferasyonunu arttırmak ve lokal birikimini sağlamaktır.

IL-10, Th2 lenfositlerince üretilen sitokinleri inhibe etmesinden dolayı, alerjik inflamasyonların şiddetinin azalmasına neden olabilir. T lenfositleri, monositler, makrofajlar ve B lenfositlerince üretilen IL-10, antijen sunan hücrelerin antijen sunma yeteneğini baskılar.

Normal solunum sisteminde IL-10 düzeyleri yüksektir (89). Astımlı olmayan kişilerde, bu yüksek IL-10 düzeyleri, Th2 hücrelerinin rol oynadığı patolojik olayların sınırlandırılmasında önemli rol oynar (90). Astmatik kişilerin havayollarında IL-10 düzeyleri azalmıştır. Bu da, potansiyel olarak astım semptomlarının daha şiddetli geçmesine neden olur. Astımlı hastalarda serum IL-10 düzeyi ile ilgili çalışmalar azdır. IL-10 hem proinflamatuvar hem anti-inflamatuvar özelliğe sahip olduğundan bu konuda çalışma yapılırken daha dikkatli olunmalıdır. Bir çok çalışmada kortikosteroid tedavinin IL-10 düzeylerini

arttırarak alerjik inflamasyonu baskıladığı saptanmıştır. *İn-vitro* olarak IL-4 ve IL-10 varlığında IgE düzeyinin azaldığı saptanmıştır (91). IL-10 düzeyindeki değişkenliklerin %74'ünün kalıtsal olduğu gösterilmiştir (92). Th2 lenfositlerinin IL-10 sentezlemesi yönünde programlanmasıyla astımda gelişen inflamasyonun azaltıldığı saptanmıştır. Astımlı hastaların balgamında yapılan bir çalışmada IL-10 düzeylerinin anlamlı olarak düşük saptanması, havayolu inflamasyonunun gelişmesinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (93). Alerjik ve atopik astımlı hastalarda plazma IL-10 düzeylerinin ve IL-10 mRNA ekspresyonunun arttığının gösterilmesine karşın bazı çalışmalarda uyarılmış makrofajların IL-10 üretiminde bir defisit olduğu rapor edilmiştir (89, 94). Böylece, T hücrelerinden salgılanan IL-10 astımdaki inflamasyonu regüle edemediği, alerjenle karşılaşmadan sonra salgılanan IL-10'un otoregülasyon yaptığı, fakat uyarılmış makrofajların IL-10 salgısının azaldığı anlaşılmaktadır.

2.6.3 İnterferon- γ (IFN- γ)

İnterferonlar, virus, bakteri, parazit ve tümör hücreleri gibi yabancı ajanlara karşı organizmanın immün sisteminin ürettiği glikoprotein yapısında doğal proteinlerdir, sitokinler olarak bilinirler. IFN- γ , aktive T lenfositlerinin bir ürünüdür, fibroblastlarda viral replikasyonu inhibe eder. IFN'un bilinen tek kaynağı CD4+, CD8+ T lenfositleri ve NK hücreleridir.

İnterferon- γ aktive T-lenfositler ve NK hücreler tarafından üretilen sekretuar bir proteindir. İnterlökin-2 gibi başlıca hücre aracılı immünitede T helper hücre tip 1 cevabından sorumludur. İnterferon- γ reseptör 2'de glutamin yerine arginin amino asiti değişimine (Gln64Arg) neden olan A839G genetik polimorfizmi tanımlanmıştır. İnterferon- γ reseptör 1'de de Val14Met değişimine neden olan genetik polimorfizm bildirilmiştir.

IFN- γ reseptörü tek bir transmembranal proteindir. Bu reseptör yüksek afiniteyle IFN'u bağlamasına rağmen, ekstrasellüler alanda yardımcı bir proteine ihtiyaç duyar. Böylece, interferon- γ , interferon- γ reseptör ligand-bağlama zinciri ve bir interferon- γ reseptör sinyal-iletici zincir içeren spesifik bir hücre reseptör kompleksine bağlanır. Bu reseptör T ve B hücrelerinde, monosit/makrofajlarda,

dendritik hücrelerde, granülositlerde ve trombositlerde exprese edilmiştir. Ayrıca endotel ve epitelyal hücrelerde de bu reseptör saptanmıştır.

İnterferonların reseptörlerine göre tanımlanmış üç tipi vardır: İnterferon Tip I, hücre yüzeylerinde bulunan spesifik IFN- α reseptörlerine bağlanırlar. İnterferon Tip II, hücre yüzeylerinde bulunan spesifik IFN- γ reseptörlerine bağlanırlar. İnterferon Tip III, IL-10R2 reseptörlerine bağlanırlar.

IFN- γ bir çok hücre üzerinde değişik derecelerde immünoregülatuvar etkiye sahiptir. Th1 hücrelerince salgılanıp Th2 hücrelerine inhibitör etki gösterir (95, 96). IFN- γ proinflamatuvar bir etkiye sahiptir; sitokin ve adezyon moleküllerini açığa çıkarmak için havayolu epitelyum hücrelerini aktive eder (97). IFN- γ , endotoksin veya açığa çıkan IgE ile uyarılan aktive alveolar makrofajlardan TNF- α serbestleşmesini, makrofaj ve epitelyum hücrelerinde MHC class I ve II exprese edilmesini sağlar (98). IFN- γ güçlü ve göreceli olarak spesifik IL-4 ve IgG₄ inhibitörüdür, IL-1, PAF, H₂O₂ sekresyonunu artırır. Monositlerden IL-10 üretimini azaltır. IFN- γ , hücreSEL immün yanıtta alerjik inflamasyon ve IgE sentezi inhibe olurken anahtar rol oynar. Monosit/makrofajlar, dendritik hücreler, epitelyal, endotelial hücreler üzerinde bulunan class II moleküllerinin upregülasyonunu sağlar. Böylece onların antijen sunabilme özelliklerine katkıda bulunmuş olur.

Astmatik kişilerde hastalığın şiddeti ile orantılı olarak T hücreleri tarafından sentezlenen IFN- γ miktarı azalmıştır (99). IFN- γ gen polimorfizminin astımla bir ilişkisi yoktur (100). Alerjene maruz bırakılan farelere ekzojen IFN- γ verilmesi havayolu hiperaktivitesini ve eozinofiliyi önler (101). Sekonder antijen maruziyetinden önce pulmoner epitelyuma IFN- γ gen transferi, pulmoner alerjik cevabı baskılamıştır (102). Alerjene cevap olarak oluşan havayolu eozinofilinin uzaması sonucu IFN- γ reseptörleri inaktive olmuştur (103). IFN- γ alerjik eozinofiliyi ve havayolu hiperaktivitesini muhtemelen IL-10 oluşumunun artırılmasıyla inhibe eder (101). Bu bulgular IFN- γ 'nın alerjik olaylarda potansiyel olarak düzenleyici rolü olduğunu düşündürür. Astmatik kişilere yapılan immünoterapi serumda ve burun biyopsi örneklerinde T hücreleri tarafından sentezlenen IFN- γ düzeyini artırır (104). Kortikosteroid tedavisi astmatik havayollarında IFN- γ ekspresyonunu artırırken kortikosteroide dirençli hastalarda IFN- γ düzeyini azaltır (105, 106).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Grupları

Çalışma kapsamına, Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları polikliniğine müracaat eden hastalar alındı. Bu hastalardan klinik olarak bronşial astım tanısı alan fakat akut atak döneminde olmayan ve başka bir kronik hastalığı bulunmayan 16 erkek, 16 kadın olmak üzere toplam 32 kişi “hasta grubu”nu oluşturdu; bronşial astım ve başka akut veya kronik hastalığı bulunmayan ancak nonspesifik yakınmaları olan 16 erkek, 16 kadın olmak üzere toplam 32 kişi “kontrol grubu”nu oluşturdu. Gruplara ait yaş karakteristikleri tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo-4. Çalışma grupları ve yaş karakteristikleri

Grup	Cinsiyet	N	Yaş			
			Ortalama (yıl)	Standart Sapma	Minimum	Maksimum
Hasta	Erkek	16	49,19	11,54	30	65
	Kadın	16	54,25	10,95	40	70
	Tüm Hastalar	32	51,72	11,36	30	76
Kontrol	Erkek	16	43,88	8,16	29	56
	Kadın	16	46,75	11,64	20	67
	Tüm Kontroller	32	45,31	9,99	20	67
Tüm Olgular	Erkek	32	46,53	10,19	29	65
	Kadın	32	50,50	11,75	20	76
	Toplam	64	48,52	11,09	20	76

3.2. Ön İşlemler

Proje hazırlandı. Etik kurul ön onayı alındı. Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu’ndan maddi destek sağlandı.

Çalışma kapsamına alınacak her bireye, “Gönüllüler İçin Bilgilendirilmiş Onam Metni” okunarak bilgilendirildi ve kendisinin “Bilgilendirilmiş Onam Formu”nu imzalaması sağlandı. Bilgilendirilmiş onam formunu imzalayan ve

böylece araştırma kapsamına alınmayı kabul eden bireyin, demografik bilgileri “Veri Kayıt Formu”na işlenip vücut ağırlığı ile boyu ölçüldü ve ölçümler “Veri Kayıt Formu”na kaydedildi. Daha sonra bireye spirometre (Minato AutoPal Spirometry, Japan) ile solunum fonksiyon testleri [1 saniyedeki zorlu ekspiratuvar volüm (FEV) ve zorlu vital kapasite (FVC) ölçümü] yapıldı ve bu ölçümler de “Veri Kayıt Formu”na kaydedildi.

3.3. Kan Örneklerinin Alınması, İşlenmesi ve Saklanması

Çalışma kapsamına alınan her bireyden, 10-12 saatlik açlığı takiben sabah saat 08.00-11.00 arasında rutin hemogram ve biyokimya analizleri için alınan venöz kanla birlikte leptin, IFN- γ , IL-4, IL-10, nitrik oksit (nitrit/nitrat) analizleri için de venöz kan alındı. Nitrit/nitrat ölçümü için heparinli tüpe; leptin, IFN- γ , IL-4, IL-10 analizleri için antikoagülansız tüpe kan alındı. Örnekler alındıktan 30 dakika sonra 4000 g’de 7 dakika santrifüj edildi. Serum ve plazmalar hemen ayrıldı. Kan alınması sırasında hastaların akut atak döneminde olmamasına, aşırı aç veya aşırı tok olmamasına, kadın hastaların menstrüel siklusun ilk yarısında olmasına dikkat edildi.

Bireyin rutin analizlerinin sonuçları takip edildi ve bunlar, “Veri Kayıt Formu”na işlendi.

Alınan venöz kan örneklerinden leptin, IFN- γ , IL-4, IL-10 analizleri için ayrılan serum ve nitrit ile nitrat analizi için ayrılan plazma, her bir parametre için yaklaşık 1 mL örnek, ayrı ayrı etiketlenmiş kapaklı plastik eppendorf tüplere kondu ve analiz gününe kadar Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı’nda -80°C ’deki derin dondurucuda saklandı. Toplanan örnekler ayrıca ayrı ayrı listelere de yazıldı.

Öngörülen yeterli sayıda materyal toplandıktan sonra uygun zamanlarda ve şartlarda analizler yapıldı.

3.4. Gereçler

1. Spirometre (Minato AutoPal Spirometry, Japan): Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları Kliniğinde.
2. Tartı ve boy ölçüm cihazı (NAN Tartı A.Ş. İstanbul): Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları Kliniğinde.

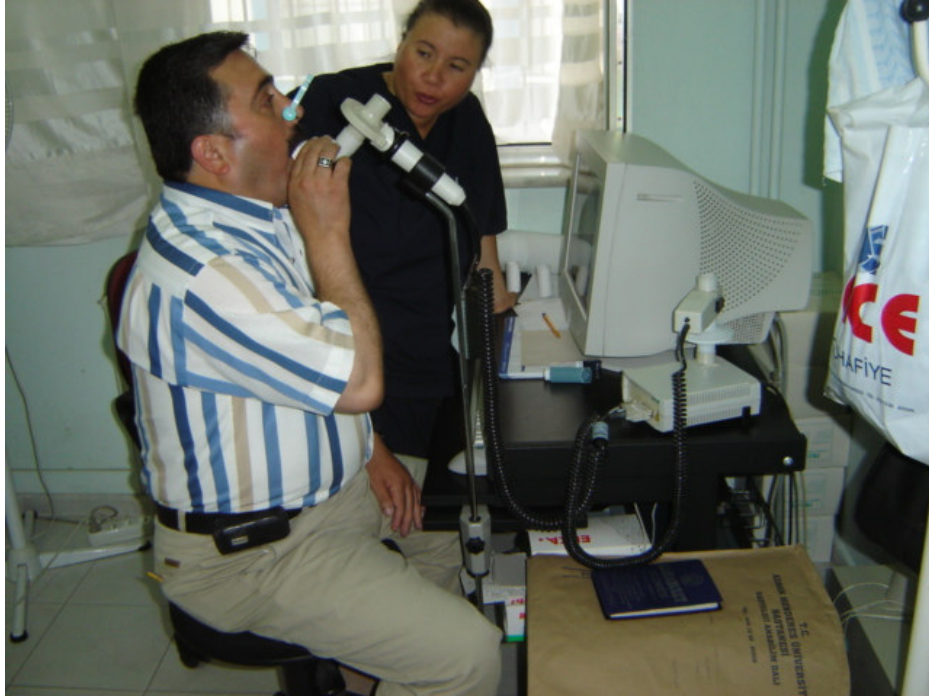
3. Mikroplate Reader (Bio-TEK Instruments EL 800): Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda.
4. Santrifüj cihazı (Hettich, Rotina 38R, Almanya): Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı'nda.
5. Vorteks (IKA® MS2 Minishaker): Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı'nda.
6. Çalkalayıcı (Microtec, İsviçre): Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı'nda.
7. Derin dondurucu (Nuaire; -85 °C Ultralow Freezer): Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı'nda.
8. Ultra saf su cihazı (Millipore simplicity 185): Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı'nda.
9. Santrifüj cihazı (Hettich micro 20, Almanya): Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı'nda.
10. Hassas terazi: Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı'nda.
11. HPLC sistemi (Agilent 1100 Serisi, Waldron, Almanya): Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı'nda.
12. Cam ve otomatik pipet (eppendorf): Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı'nda.
13. Balon joje ve mezür: Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı'nda.
14. Vacumlu kan alma tüpleri (heparinli ve düz tüp): Sarf malzemesi
15. Eppendorf tüpleri (kapaklı): Sarf malzemesi
16. Pipet uçları (mavi ve sarı renkli): Sarf malzemesi

3.5. Solunum Fonksiyon Testleri ve Vücut Kitle İndeksi Ölçülmesi

“Hasta grubu” ve “kontrol grubu”nu oluşturan her bireyde Solunum Fonksiyon Testleri yapılmadan önce vücut ağırlığı (kg) ve boy (m) ölçümleri yapıldı. Vücut Kitle İndeksi (VKİ), vücut ağırlığı (kg)/boy (m²) formülünden hesaplandı.

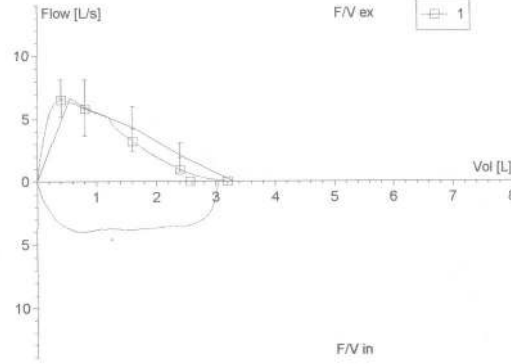
Solunum Fonksiyon Testleri öncesi bireylere testin nasıl yapılacağı ve manevralar hakkında bilgi verildi. Bireyin uyumunu gözlemek için deneme testleri yapıldıktan sonra asıl test yapıldı.

Tüm hastalarda Solunum Fonksiyon Testleri, Minato Autospiropal spirometri cihazı ile American Thoracic Society (ATS) kriterlerine göre yapıldı (107). Solunum Fonksiyon Testleri yapılacak kişi rahat bir sandalyeye oturtulduktan sonra burnu basit bir mandal ile kapatıldı, spirometrenin içine doğru normal nefes alıp vermesi söylendi. Daha sonra güçlü ve hızlı nefes alıp verme sırasında volüm–zaman ve akım–volüm eğrileri elde edildi (şekil 10).



Şekil-10: Solunum fonksiyon testlerinin yapılması

Kabul edilebilir özellikte en az 3 testten sonra elde edilen volüm–zaman ve akım–volüm eğrileri incelendi. Bilgisayarlı spirometre cihazından yirmiden fazla spirometrik değişken ölçülebilmekle birlikte (şekil 11) test sonucunu değerlendirmede temel değişkenler olarak kabul edilen fonksiyonel vital kapasite (FVC), birinci saniyedeki zorlu vital kapasite (FEV1) ve FEV1/FVC oranı değerleri kaydedildi.



		Pred	Pre	% Beklenen	Post	Değişim
FVC	[L]	3.29	3.19	97.1	3.29	2.98
FEV 1	[L]	2.85	2.56	90.0	2.69	5.23
FEV 1 % FVC	[%]		80.20		81.96	2.19
PEF	[L/s]	6.64	6.51	98.0	6.34	-2.53
FEF 25	[L/s]	5.88	5.81	98.8	5.78	-0.46
FEF 50	[L/s]	4.20	3.19	75.9	3.61	13.01
FEF 75	[L/s]	1.91	0.92	48.1	1.05	13.67
IC	[L]	2.17				
FEV 0.5	[L]		2.05		2.18	6.23
FEF50 % FIF50	[%]		82.28		87.50	6.34
FEV6	[L]				3.27	
FEV1 % FEV6	[%]				82.36	
FIV 0.5	[L]		2.07		2.10	1.89
FEV0.5 / FIV0.5			0.99		1.04	4.26
FIF 50	[L/s]		3.88		4.12	6.27
FIV1	[L]				3.15	
FIV1 % FVC	[%]				100.96	
FEF 200-1200	[L/s]		5.91		6.04	2.30
FET	[s]		5.91		6.32	6.98
MVV	[L/min]	106.04				
FEV 1 % VC MAX	[%]	82.45	80.20	97.3	81.96	2.19
ERV	[L]	1.16				
IRV	[L]					
Date			230806		230806	
Time			15:41		16:08	

Şekil-11: Bilgisayarlı spirometre cihazında ölçülen değişkenler

Normalin alt sınırının oldukça altında ya da üstünde olan değerler güvenle yorumlanabilir. Sınırdaki değerlerde klinik bilgi önemlidir. Hava akım obstrüksiyonunu en iyi FEV1/FVC oranı gösterir. Obstrüksiyonun şiddetini belirlemede FEV1 % değeri kullanılır ki bronkodilatöre yanıtın değerlendirilmesinde önemlidir. Restriktif bozuklukta VC, FVC, TLC azalırken FEV1/FVC normaldir.

3.6. Rutin Biyokimya Testleri

Çalışma kapsamına alınan her bireyden 10-12 saatlik açlığı takiben sabah saat 08.00-11.00 arasında uygun tüplere alınan kan örneklerinden rutin hemogram, eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) ve biyokimya analizleri, Adnan

Menderes Üniversitesi Hastanesi Hematoloji ve Klinik Biyokimya Laboratuvarlarında, aynı gün içinde yapıldı. Hemogram ölçümünde Beckman Coulter Gen-S system 2, Almanya otomatik kan sayım cihazı ve hazır ticari solüsyonları kullanıldı. Eritrosit sedimentasyon hızı (ERS) ölçümünde Sedimatic 100 Analys Instrument AB sedimentasyon tayin cihazı kullanıldı. Rutin biyokimya testleri Clinical Chemistry Architect C8000, USA otoanalizör cihazında hazır ticari kitlerle yapıldı. Yapılan rutin testler aşağıdadır:

Serum Açlık Kan Glukozu (mg/dl)

Serum AST aktivitesi (U/L)

Serum ALT aktivitesi (U/L)

Serum ALP aktivitesi (U/L)

Serum LDH aktivitesi (U/L)

Serum total protein düzeyi (g/dl)

Serum albumin düzeyi (g/dl)

Serum BUN düzeyi (mg/dl)

Serum kreatinin düzeyi (mg/dl)

Serum total kolesterol düzeyi (mg/dl)

Serum trigliseridleri düzeyi (mg/dl)

Kan eritrosit sayısı ($10^6/\mu\text{l}$)

Kan lökosit sayısı ($10^3/\mu\text{l}$)

Hemoglobin değeri (g/dl)

Hematokrit değeri (%)

MCV değeri (fl)

Trombosit sayısı ($10^3/\mu\text{l}$)

Eritrosit Sedimentasyon Hızı (mm/saat)

3.7. Plazma Nitrik Oksit (NO) Düzeyi Tayini

Çok kısa yarılanma ömrüne sahip NO'nın biyolojik sıvılarda direkt olarak saptanabilmesi çok zordur. Nitrik oksit ilk olarak, ozon ile etkileşime girerek ışık oluşturması prensibine (kemilüminesans yöntemi) dayanarak saptanmıştır (108). *In vitro* nitrik oksite spesifik *mikroelektrotların* kullanımı ile nitrik oksit düzeyleri saptanmıştır (109). Daha sonra nitrik oksit düzeylerini saptamak için

kısa sürede sonuç alınabilen kemilüminesans analizörü kullanılmıştır (110). Nitrik oksitin ikincil habercisi cGMP ölçümlerinin yanı sıra, radyo izotopla işaretli argininin sitrülline dönüşümü de ölçülmüştür (111). Nitrik oksit oluşumu, pozitif NADPH diaforaz aktivitesi sayesinde de saptanmıştır (112, 113).

Nitrik oksitin *in vivo* ölçümünde halâ zorluklar vardır. Nitrik oksitin *in vivo* salınımının bir ölçüsü olarak endotelial vazomotor fonksiyon, ön kol venöz pletismografisi veya nabız atım analizi ile ölçülebilir. Nitrik oksit üretimini arttıran asetilkolin gibi bir droğun intraarteriyal olarak verilmesiyle oluşan kan akım hızındaki artış, endotelial vazodilatasyonun göstergesi olarak pletismografide ölçülmüştür (114). Arter esnekliği de nabız analizi ile ölçülmüştür (115). Nitrik oksit sentezinden sorumlu NOS'ların ekspresyonu, çeşitli dokularda Western blot ve immünohistokimyasal çalışmalarla saptanmış ve NO' üretimi ile ilgili olduğu belirlenmiştir (54).

Nitrik oksit, hızlı bir şekilde, stabil olan ve plazma, idrar, peritoneal sıvılar gibi çeşitli biyolojik sıvılarda Griess reaksiyonu ile *in vitro* ve *in vivo* ölçümleri yapılabilen nitrit ve nitrat metabolitlerine dönüşür (116, 117). Griess reaktifi, nitrit ile spektrofotometrik olarak absorbansı ölçülebilen azo boyası oluşturur. Numunelerdeki nitrat deneyden önce nitrite indirgenmelidir ve plazma örneklerinin deproteinizasyonuna ihtiyaç vardır (12). Plazma ve serumda nitrit/nitrat ölçümü klasik Griess metodu dışında, ultraviyole spektrofotometrik metod, iyon kromatografisi, gaz kromatografisi, kütle spektrometresi, kapiller elektroforez ve HPLC ile de yapılabilir. HPLC ile serum ve plazmada nitrit/nitrat tayini ile, kolay, doğru ve nispeten hızlı sonuç alınır.

Nitrattan zengin yiyecekler (kırmızı et, sebzeler, tahıldan hazırlanan içkiler) plazma nitrat düzeyini artırır. Bundan dolayı, kan alımından 48 saat öncesine kadar diyetle bir kısıtlama yapılmalıdır (118).

Plazma Nitrik Oksit (NO') Düzeyi Tayininde Kullanılan Kimyasallar

Sodyum nitrat $\geq 99\%$: Kimyasal Formülü, NaNO_3 ; Molekül Ağırlığı, 85,01; Fluka'dan sağlandı, Lot Numarası, 1143516; Katalog Numarası, 71758.

Sodyum nitrit $\geq 99\%$: Kimyasal Formülü, NaNO_2 ; Molekül Ağırlığı, 69,00; Fluka'dan sağlandı, Lot Numarası, 1189478; Katalog Numarası, 71759.

Acetonitrile E chromasol V HPLC: Kimyasal Formülü, $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$; Molekül Ağırlığı, 41,05; Riedel-de Haen'den sağlandı, Lot Numarası, 3257A.

Sodyum bikarbonat %99,7: Kimyasal Formülü, NaHCO_3 ; Molekül Ağırlığı, 84; Sigma-Aldrich'den alındı, Lot Numarası, 42290; Katalog Numarası, 31437.

Sodyum karbonat %99,8: Kimyasal Formülü, Na_2CO_3 ; Molekül Ağırlığı, 106; Sigma-Aldrich'den alındı, Lot Numarası, 5114A; Katalog Numarası, 31432.

Plazma Nitrik Oksit (NO) Düzeyi Tayininde Kullanılan Reaktifler

1,8 mM Sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi: 0,191 gr Na_2CO_3 1 L ultra saf su içinde çözöldü.

1,7 mM Sodyum bikarbonat (NaHCO_3) çözeltisi: 0,143 gr NaHCO_3 1 L ultra saf su içinde çözöldü.

Mobil faz: Eşit miktarlarda 1.8mM Na_2CO_3 ile 1.7mM NaHCO_3 çözeltileri karışımı.

Nitrit/nitrat stok solüsyonu: 100 ml'lik balon jojeye bir miktar ultra saf su kondu, daha sonra 0,0150 gr sodyum nitrit ve 0,0107 gr sodyum nitrat hassas terazide tartılarak ultra saf suda çözöndüröldü ve volüm 100 ml'ye tamamlandı. Böylece 100 µg/ml'lik nitrit/nitrat stok solüsyonu hazırlanmış oldu. Hazırlanan stok solüsyondan, ultra saf su ile seri dilüsyonlar yapılarak 10; 1; 0,5; 0,1; 0,05 µg/ml'lik çalışma standart çözeltileri ayrı ayrı hazırladı:

1. Çalışma standardı (10 µg/ml nitrit/nitrat) için, 5 ml stok solüsyon ile 45 ml ultra saf su karıştırdı.
2. Çalışma standardı (1 µg/ml nitrit/nitrat) için, 5 ml 1.çalışma standardı ile 45 ml ultra saf su karıştırdı.
3. Çalışma standardı (0,5 µg/ml nitrit/nitrat) için, 25 ml 2.çalışma standardı ile 25 ml ultra saf su karıştırdı.
4. Çalışma standardı (0,1 µg/ml nitrit/nitrat) için, 10 ml 3.çalışma standardı ile 40 ml ultra saf su karıştırdı.
5. Çalışma standardı (0,05 µg/ml nitrit/nitrat) için, 25 ml 4.çalışma standardı ile 25 ml ultra saf su karıştırdı.

HPLC sistem

HPLC (Agilent 1100 Serisi, Waldron, Almanya)

Otomatik örnekleiyici: (G1313)

Hareketli faz: 1.8mM Na₂CO₃ + 1.7mM NaHCO₃

Akış hızı: 1 ml/dakika

Pompa: Quaternary pump (G1354A)

Kolon: Sdex IC SI-904E (250x4mm) (Phenomenex, kolon no. 3606805, Cheshire, İngiltere)

Kolon koruyucu: Nükleosil C18 Kartuş (Phenomenex, Cheshire, İngiltere)

Kolon fırını: (G1316A)

Kolon ısısı: 30°C

Dedektör: Fotodiode-array dedektör (PDA) (G1315B)

Dalga boyu: 212 nm

Analiz süresi: 14 dakika

Örnek miktarı: 20µl



Şekil-12: HPLC sistem

Plazmaları çalışmadan önce cihazın ve kolonun doğru çalışıp çalışmadığını anlamak için 0,05; 0,1; 0,5; 1 ve 10 µg/ml olarak hazırlanan çalışma standartları çalışıldı. Sdex IC SI-904E (250x4mm Phenomenex, Cheshire, İngiltere) marka kolonun prospektüsünde gösterildiği şekilde ve

zamanda nitrit ve nitrat pikleri görüldüğünde cihazın ve kolonun doğru bir şekilde çalıştığı kabul edildi ve örneklerin çalışılmasına karar verildi.

Materyallerin HPLC Sistem ile NO⁻ Düzeyi Tayini İçin Hazırlanması

-85°C'de dondurulmuş halde bulunan, 32 hasta grubuna 32 kontrol grubuna ait toplam 64 plazma, çözünmeleri için yaklaşık olarak 2 saat oda ısısında bekletildi. Çözünen plazmaları homojen hale getirmek için her biri vorteks ile karıştırıldı. Plazmaların oda ısısına gelmesi için yaklaşık 30 dakika daha beklendi. Plazmalar, üzerlerine 0,25 ml plazma için 0,25 ml asetonitril eklenme suretiyle deproteinize edildi ve 5 dakikalık bir bekleme süresinden sonra bu karışım, vorteks ile karıştırıldı. Karışım üzerine daha sonra 0,5 ml mobil faz (eşit miktarlarda 1,8 mM sodyum karbonat ile 1,7 mM sodyum bikarbonat çözeltileri karışımı) eklendi. Bu şekilde plazma 1/4 oranında (0.25 ml plazma+0.25 ml asetonitril+0.5 ml mobil faz) sulandırılmış oldu.

1/4 oranında dilüe edilmiş olan plazma örnekleri 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.

HPLC Sistem ile Çalışma

1/4 oranında dilüe edilmiş olan plazma örneklerini 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj etmek suretiyle elde edilen her süpernatanttan ve çalışma standartlarından 200 µl alınarak HPLC sistemde çalışılmak üzere örnek tepsisindeki yerlerine konuldu. Öyle ki örnek tepsisinin ilk 5 numune bölgesine sırasıyla 0,05; 0,1; 0,5; 1 ve 10 µg/ml'lik çalışma standartları, sonra dört örnek ve bir 1µg/ml'lik çalışma standardı konuldu ve böylece her dört örnekte bir 1 µg/ml standart çalışılması sağlanmış oldu (şekil 13).

Takip eden örnekler, bir önceki standart pikinin alanı referans alınarak değerlendirildi (şekil 14). Plazmadaki nitrit/nitrat değerini saptamak için, örneğin yaptığı pikin alanının hesaplanmasından sonra, kendisine en yakın olarak çalışılmış 1 µg/ml standart pikinin alanı hesaplanmış ve alanlar arasında kurulan doğru orantıyla örneğin konsantrasyonu, sulandırma faktörü olan 4 (tüm örnekler 1/4 dilüe çalışıldığı için) dikkate alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlar µg/ml olarak hesaplandıktan sonra µmol/L (Nitrit için çevirme faktörü 23,26 ve nitrat için çevirme faktörü 16,13) olarak ifade edilmiştir.

Plazma nitrik oksit düzeyi, metabolitleri olan nitrit ve nitrat konsantrasyonlarının toplamı ile değerlendirildi.



Şekil-13: HPLC sistemde standartlar ve numuneler



Şekil-14: HPLC sistemde standartlara ait pikler

3.8. Serum Leptin Düzeyi Tayini

Derin dondurucudan çıkarılan serumların çözünmesi ve oda ısısına gelmesi için yaklaşık 3 saat beklendi. Tüm serumlar vorteksten geçirilerek homojen hale gelmesi sağlandı. ELİSA yöntemini kullanan ticari kit (dbc-Diagnostics Biochem Canada Inc, kat. No. CAN-L-4260) ve bioelisa reader (EL800, biokit) ile ölçüm yapıldı. Serum leptin düzeyi ölçümü için kullanılan ELİSA yöntemi, üretici firmanın önerdiği protokol çerçevesinde, hiçbir modifikasyon yapılmadan uygulandı.

Testin Prensibi

Serum leptin düzeyinin ölçümünde sandviç tip ELİSA yöntemi kullanıldı. Bu deneyde spesifitesi çok yüksek iki tane monoklonal antikor kullanılmaktadır: Birincisi, leptine spesifik monoklonal antikor, plaktaki küçük kuyucuklara sabitlenmiş idi. İkinci monoklonal antikor (Leptinin farklı bir epitopuna spesifik) biyotinle konjuge idi. İlk basamakta, örnekteki ve standartlardaki leptin, kuyucukda sabit halde bulunan monoklonal antikora ve biyotinlenmiş halde bulunan diğer epitopa spesifik monoklonal antikora bağlanarak bir sandviç kompleks oluşturur. Bağlanamayan biyotinli monoklonal antikor, yıkama basamağından sonra ortamdan uzaklaştırılır. İkinci basamakta, bağlı halde bulunan biyotinli monoklonal antikora spesifik olarak bağlanabilen streptavidin-HRP eklenir. Bağlanamayan streptavidin-HRP tekrar bir yıkama basamağından sonra ortamdan uzaklaştırılır. Daha sonra enzim eklenir ve ortamdaki leptin konsantrasyonu ile doğru orantılı mavi renk oluşur. Stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durdurulur ve sarı renk oluşur. Plak okuyucuda 450 nm'de absorbans okunur ve standart eğri kullanılarak miktar tayini yapılır.

Kalibratörlerin Hazırlanması

Kit içinde bulunan hazır kalibratörler, üretici firmanın önerdiği şekilde, kit içinde bulunan deney tamponu ile 1:10 dilüe edilerek 0-5 ng/ml arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlandı.

Kalibratör	Konsantrasyon (ng/ml)	Çalışma Konsantrasyonu
A	0	0,0
B	1	0,1
C	5	0,5
D	10	1,0
E	20	2,0
F	50	5,0

Prosedür

1. Kit içerisindeki kontroller ve serum örnekleri kalibratörler gibi deney tamponu ile 1:10 dilüe edildi.
2. 20µl dilüe kalibratör, kontrol ve serum örnekleri sırayla kuyucuklara konuldu.
3. 80µl monoklonal antileptin biyotin konjugatı sırayla her kuyucuğa eklendi.
4. 1 saat çalkalayıcıda (yaklaşık 200 rpm) oda ısısında inkübe edildi.
5. Kuyucuklar, 1:10 dilüe edilmiş 300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez manuel olarak yıkandı.
6. 100 µl Streptavidin HRP konjugatı (1:50 dilüe) her kuyucuğa eklendi.
7. 30 dakika çalkalayıcıda (yaklaşık 200 rpm) oda ısısında inkübe edildi.
8. Yıkama basamağı aynen tekrar edildi
9. 100 µl TMB substratı her kuyucuğa eklendi.
10. 15 dakika oda ısısında inkübe edildi.
11. 50 µl stop solüsyonu her kuyucuğa eklendi.
12. 20 dakika içinde 450 nm'de plak okuyucuda okuma yapıldı.
13. Tüm sonuçlar plate reader'da 4 parametre standart eğrisi (şekil 15) kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar ng/ml olarak ifade edildi.

Testin Performans Özellikleri

Analitik sensitivite: 0,17 ng/ml

Linearite: 50 ng/ml

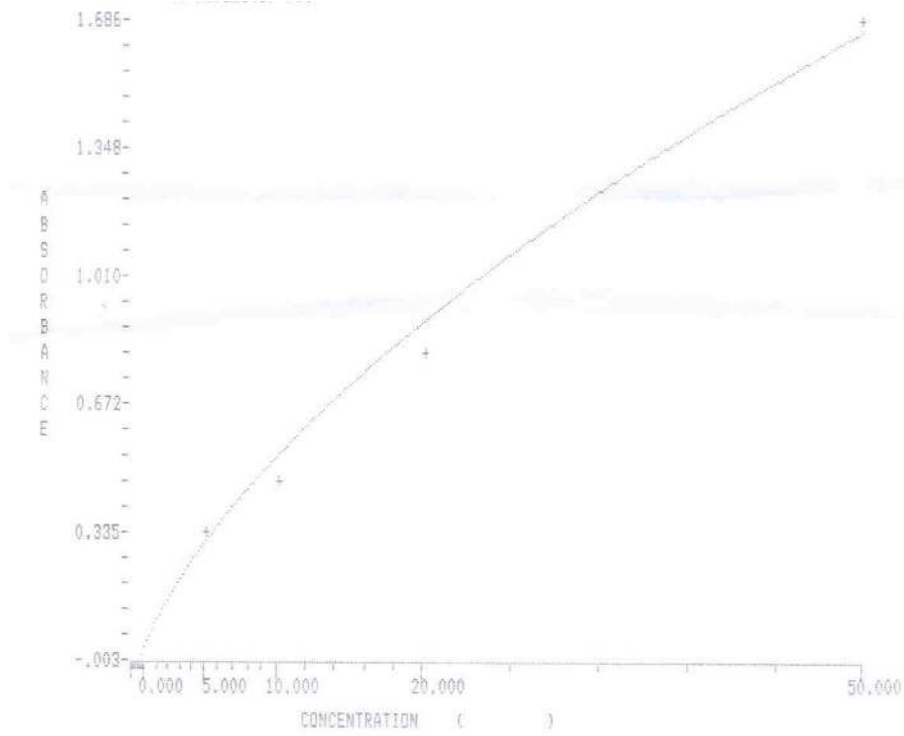
Spesifite: Bilinen diğer sitokinlerle 1000 ng/ml'ye kadar etkileşim göstermez.

Tekrarlanabilirlik: Deney içi tekrarlanabilirlik; serumun ard arda 20 kere çalışılması sonucunda CV % 3,7-5,5 bulunmuştur. Deneyler arası

tekrarlanabilirlik; aynı serumun 10 gün boyunca ayrı ayrı çalışılması sonucunda CV %5,9-6,8 olarak bulunmuştur.

Normal değerler: Zayıf kadınlarda 3,7-11,1 ng /ml

Zayıf erkeklerde 2,0-5,6 ng/ml



Şekil-15: Leptin konsantrasyonu kalibrasyon grafiği

3.9. Serum İnterlökin-4 (IL-4) Düzeyi Tayini

Derin dondurucudan çıkarılan serumların çözünmesi ve oda ısısına gelmesi için yaklaşık 3 saat beklendi. Tüm serumlar vorteksten geçirilerek homojen hale gelmesi sağlandı. IL-4 düzeyini saptamak için ELİSA yöntemini kullanan ticari IL-4 kiti (İmmunotech, Bekman Coulter, katalog No. IM1981 Marsilya, Fransa) kullanıldı. IL-4 tayini için uygulanan prosedür, üretici firmanın önerdiği şekilde hiçbir değişiklik yapılmadan uygulandı.

Testin Prensibi

Serum IL-4 düzeyi tayini için sandwich tip ELİSA yöntemi kullanıldı. Birinci basamakta, plak kuyucukları IL-4'e spesifik monoklonal antikorlarla kaplanmış idi. İkinci basamakta, biyotinli monoklonal antikorlar ve streptavidin peroksidaz konjugatı eklendi. Biyotinli antikorlar, antijen antikor kompleksine ve konjugata bağlanır. İnkübasyondan ve bağlı olmayan antikorları uzaklaştırmak için yapılan yıkama basamağından sonra, bağlı halde bulunan antijen-antikor komplekslerini saptamak için kromojen substratı eklendi. Örnekte bulunan IL-4 konsantrasyonu ile oluşan renk yoğunluğu doğru orantılıdır.

Kalibratörlerin Hazırlanması

Kit içinde bulunan hazır 10 ng/ml stok kalibratörden üretici firmanın önerdiği şekilde seri dilüsyon yapılarak 1000; 250; 62,5; 15,6; 0 pg/ml'lik çalışma kalibratör solüsyonları hazırlandı.

1. Çalışma kalibratör solüsyonu (1000 pg/ml IL-4) için, 50 µl stok kalibratör ile 450 µl dilüent karıştırıldı.
2. Çalışma kalibratör solüsyonu (250 pg/ml IL-4) için, 100 µl 1. çalışma kalibratör solüsyonu ile 300 µl dilüent karıştırıldı.
3. Çalışma kalibratör solüsyonu (62,5 pg/ml IL-4) için, 100 µl 2. çalışma kalibratör solüsyonu ile 300 µl dilüent karıştırıldı.
4. Çalışma kalibratör solüsyonu (15,6 pg/ml IL-4) için, 100 µl 3. çalışma kalibratör solüsyonu ile 300 µl dilüent karıştırıldı.
5. Çalışma kalibratör solüsyonu (0 pg/ml IL-4) için, 300 µl dilüent kullanıldı.

Prosedür

1. 100 µl kalibratör ve örnekler sırasıyla her kuyucuğa eklendi
2. 18-25°C'de 2 saat çalkalayıcıda inkübe edildi.
3. Tüm kuyucuklar kit içinde bulunan yıkama solüsyonu ile 3 kez manuel olarak yıkandı.
4. 50 µl biyotinli antikor ve 100 µl streptavidin HRP konjugatı her kuyucuğa eklendi
5. 18-25°C'de 30 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi.

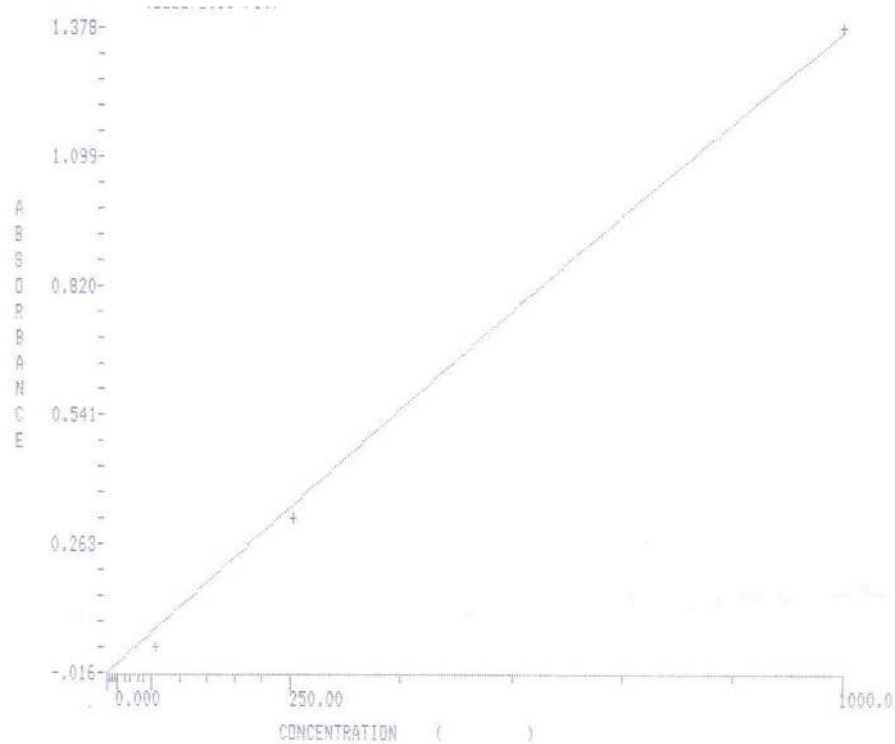
6. Tekrar aynı şekilde 3 kez yıkama yapıldı.
7. 100 µl substrat eklendi.
8. 18-25°C'de 20 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi.
9. 50 µl stop solüsyonu her kuyucuğa eklenerek reaksiyon durduruldu.
10. 450 nm'de plate reader'da okuma yapıldı
11. Tüm sonuçlar plate reader'da quadratik mod ($y=A+BX+C^2$) standart eğrisi (şekil 16) kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar pg/ml olarak ifade edildi.

Testin Performans Özellikleri

Analitik sensitivite: 5 pg/ml

Spesifite: Bilinen diğer sitokin ve sitokin reseptörleri ile etkileşim göstermez.

Tekrarlanabilirlik: Deney içi tekrarlanabilirlik; serumun ard arda 10 kere çalışılması sonucunda CV % 2,1-5,6 bulunmuştur. Deneyler arası tekrarlanabilirlik; aynı serumun 10 gün boyunca ayrı ayrı çalışılması sonucunda CV %4,8-14,7 olarak bulunmuştur.



Şekil-16: IL-4 konsantrasyonu kalibrasyon grafiği

3.10. Serum İnterlökin-10 (IL-10) Düzeyi Tayini

Serum IL-10 düzeyini saptamak için sandviç tip ELİSA yöntemini kullanan ticari IL-10 kiti (İmmunotech, Bekman Coulter, katalog No. IM1987, Marsilya,Fransa) kullanıldı. IL-10 tayini için uygulanan prosedür, üretici firmanın önerdiği şekilde hiçbir değişiklik yapılmadan uygulandı.

Testin Prensibi

Serum IL-10 düzeyi tayini için sandviç tip ELİSA yöntemi kullanıldı. Birinci basamakta, plak kuyucukları IL-10'e spesifik monoklonal antikorlarla kaplanmış idi. İkinci basamakta, biyotinli monoklonal antikorlar ve streptavidin peroksidaz konjugatı her kuyucuğa eklenir. Biyotinli antikorlar, antijen antikor kompleksine ve konjugata bağlanır. İnkübasyondan ve bağlı olmayan antikorları uzaklaştırmak için yapılan yıkama basamağından sonra, bağlı halde bulunan antijen-antikor komplekslerini saptamak için kromojen substratı eklenir. Örnekte bulunan IL-10 konsantrasyonu ile oluşan renk yoğunluğu doğru orantılıdır.

Kalibratörlerin Hazırlanması

Kit içinde bulunan hazır 20 ng/ml stok kalibratörden üretici firmanın önerdiği şekilde seri dilüsyon yapılarak 2000; 400; 80; 16; 0 pg/ml'lik çalışma kalibratör solüsyonları hazırlandı.

1. Çalışma kalibratör solüsyonu (2000 pg/ml IL-10) için, 50 µl stok kalibratör ile 450 µl dilüent karıştırıldı.
2. Çalışma kalibratör solüsyonu (400 pg/ml IL-10) için, 100 µl 1. çalışma kalibratör solüsyonu ile 400 µl dilüent karıştırıldı.
3. Çalışma kalibratör solüsyonu (80 pg/ml IL10) için, 100 µl 2. çalışma kalibratör solüsyonu ile 400 µl dilüent karıştırıldı.
4. Çalışma kalibratör solüsyonu (16 pg/ml IL-10) için, 100 µl 3. çalışma kalibratör solüsyonu ile 400 µl dilüent karıştırıldı.
5. Çalışma kalibratör solüsyonu (0 pg/ml IL-10) için, 400 µl dilüent kullanıldı.

Prosedür

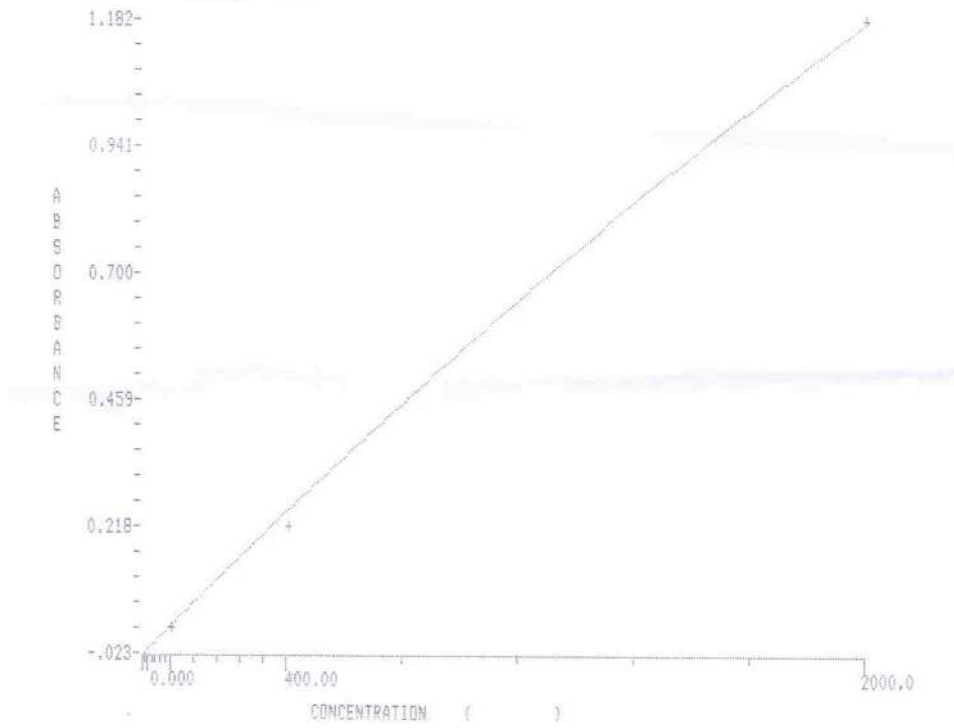
1. 50 µl kalibratör ve örnekler her kuyucuğa konuldu.
2. 18-25°C'de 2 saat çalkalayıcıda inkübe edildi.
3. Tüm kuyucuklar kit içinde bulunan yıkama solüsyonu ile 3 kez manuel olarak yıkandı.
4. 50 µl biyotinli antikor ve 100 µl streptavidin HRP konjugatı tüm kuyucuklara eklendi.
5. 18-25°C'de 30 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi.
6. Tekrar aynı şekilde 3 kez yıkama yapıldı.
7. 100 µl substrat eklendi.
8. 18-25°C'de 15 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi.
9. 50 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.
10. 450 nm'de plak okuyucuda okuma yapıldı
11. Sonuçlar plak okuyucuda quadratik mod ($y=A+BX+C^2$) standart eğrisi (şekil 17) kullanılarak hesaplandı ve pg/ml olarak ifade edildi.

Testin Performans Özellikleri

Analitik sensitivite: 5 pg/ml

Spesifite: Bilinen diğer sitokin ve sitokin reseptörleri ile etkileşim göstermez.

Tekrarlanabilirlik: Deney içi tekrarlanabilirlik; serumun ard arda 10 kere çalışılması sonucunda CV % 3,3-4 bulunmuştur. Deneyler arası tekrarlanabilirlik; aynı serumun 10 gün boyunca ayrı ayrı çalışılması sonucunda CV %5,6-8,6 olarak bulunmuştur.



Şekil-17: IL-10 konsantrasyonu kalibrasyon grafiği

3.11. Serum İnterferon- γ (IFN- γ) Düzeyi Tayini

Serum IFN- γ düzeyini saptamak için ELİSA yöntemini kullanan ticari IFN- γ kiti (İmmunotech, Bekman Coulter, katalog No. IM1743-IM1862, Marsilya, Fransa) kullanıldı. IFN- γ tayini için uygulanan prosedür, üretici firmanın önerdiği şekilde hiçbir değişiklik yapılmadan uygulandı.

Testin Prensipleri

Serum IFN- γ düzeyi tayini için sandviç tip ELİSA yöntemi kullanıldı. Birinci basamakta, plak kuyucukları IFN- γ 'a spesifik monoklonal antikorlarla kaplanmıştı. İkinci basamakta, biyotinli monoklonal antikorlar ve streptavidin peroksidaz konjugatı eklenir. Biyotinli antikorlar, antijen antikor kompleksine ve konjugata bağlanmaları sağlanır. İnkübasyondan ve bağlı olmayan antikorları uzaklaştırmak için yapılan yıkama basamağından sonra, bağlı halde bulunan antijen-antikor komplekslerini saptamak için kromojen substratı eklenir. Örnekte bulunan IFN- γ konsantrasyonu ile oluşan renk yoğunluğu doğru orantılıdır.

Kalibratörlerin Hazırlanması

Kit içinde bulunan hazır 250 IU/ml stok kalibratörden üretici firmanın önerdiği şekilde seri dilüsyon yapılarak 25; 6,25; 1,56; 0,39; 0 IU/ml'lik çalışma kalibratör solüsyonları hazırlandı.

1. Çalışma kalibratör solüsyonu (25 IU/ml IFN- γ) için, 50 μ l stok kalibratör ile 450 μ l dilüent karıştırıldı.

2. Çalışma kalibratör solüsyonu (6,25 IU/ml IFN- γ) için, 100 μ l 1. çalışma kalibratör solüsyonu ile 300 μ l dilüent karıştırıldı.

3. Çalışma kalibratör solüsyonu (1,56 IU/ml IFN- γ) için, 100 μ l 2. çalışma kalibratör solüsyonu ile 300 μ l dilüent karıştırıldı.

4. Çalışma kalibratör solüsyonu (0,39 IU/ml IFN- γ) için, 100 μ l 3. çalışma kalibratör solüsyonu ile 300 μ l dilüent karıştırıldı.

5. Çalışma kalibratör solüsyonu (0 IU/ml IFN- γ) için, 300 μ l dilüent kullanıldı.

Prosedür

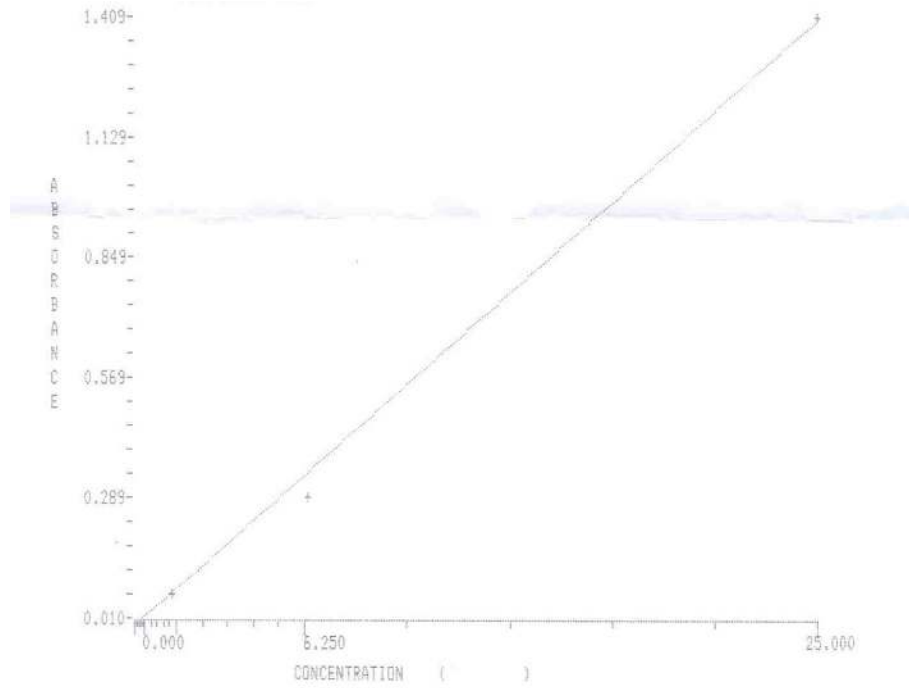
1. 50 μ l kalibratör ve örnekler her kuyucuğa eklendi.
2. 18-25°C'de 2 saat çalkalayıcıda inkübe edildi.
3. Tüm kuyucuklar kit içinde bulunan yıkama solüsyonu ile 3 kez manuel olarak yıkandı.
4. 50 μ l biyotinli antikör ve 100 μ l streptavidin HRP konjugatı tüm kuyucuklara eklendi.
5. 18-25°C'de 30 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi.
6. Tekrar aynı şekilde 3 kez yıkama yapıldı.
- 7 100 μ l substrat eklendi.
8. 18-25°C'de 20 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi.
9. 50 μ l stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.
10. 450 nm'de plate reader'da okuma yapıldı
11. Sonuçlar plate reader'da quadratik mod ($y=A+BX+C^2$) standart eğrisi (şekil 18) kullanılarak hesaplandı ve IU/ml olarak ifade edildi.

Testin Performans Özellikleri

Analitik sensitivite: 0,08 IU/ml

Spesifite: Bilinen diğer sitokin ve sitokin reseptörleri ile etkileşim göstermez.

Tekrarlanabilirlik: Deney içi tekrarlanabilirlik; serumun ard arda 17 kere çalışılması sonucunda CV % 2,2-12,6 bulunmuştur. Deneyler arası tekrarlanabilirlik; aynı serumun 8 gün boyunca ayrı ayrı çalışılması sonucunda CV % 6,2-12,2 olarak bulunmuştur.



Şekil-18: IFN-γ konsantrasyonu kalibrasyon grafiği

3.12. İstatistiksel Değerlendirme

Her olgu için ayrı “Veri Kayıt Formu”na kaydedilmiş olan veriler, SPSS 13.0 programında bilgisayara girildi.

Bilgisayarda SPSS 13.0 programı yardımıyla, sayısal verilere ait ortalama değerler, tüm olgular, erkekler ve kadınlar, “hasta grubu” ve “kontrol grubu”, hasta grubundaki erkekler ve kadınlar, kontrol grubundaki erkekler ve kadınlar için ayrı ayrı olmak üzere hesaplandı. İncelenen parametrelere [Vücut ağırlığı (kg), Boy (cm), Vücut Kitle İndeksi (kg/m^2), FEV1 (%), FVC (%),

FEV1/FVC (%), Serum leptin düzeyi (ng/ml), Serum IFN- γ düzeyi (IU/ml), Serum IL-4 düzeyi (pg/ml), Serum IL-10 düzeyi (pg/ml), Plazma nitrit+nitrat düzeyi (μ mol/l)] ait hesaplanan ortalamalar t-test ve Mann-Whitney U testi ile $p<0,05$ değerleri anlamlı kabul edilerek karşılaşıtırıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar boksör torbası grafikleriyle görsel halde sunuldu.

İncelenen parametreler arasında korelasyon olup olmadığı Pearson korelasyon testi ile $p<0,05$ değerleri anlamlı kabul edilerek test edildi. Saptanan korelasyonlar grafiklerle görsel halde sunuldu.

4. BULGULAR

Grup ve cinsiyet ayrımı yapmadan tüm olgular (n=64) bir arada düşünüldüğünde ölçülen parametrelere ait veriler tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo-5. Tüm çalışma grubu bireylerine ait ölçülen parametre verileri

Ölçülen Parametre	Tüm Olgular (n=64) İçin Veriler		
	Ortalama Değer	Standart Sapma	Standart Hata
Serum Açlık Kan Glukozu (mg/dl)	96,23	13,39	1,71
Serum AST aktivitesi (IU/L)	20,71	6,52	0,83
Serum ALT aktivitesi (IU/L)	22,81	10,20	1,30
Serum ALP aktivitesi (IU/L)	85,02	30,59	4,09
Serum LDH aktivitesi (IU/L)	166,42	56,26	7,59
Serum total protein düzeyi (g/dl)	7,31	0,33	0,04
Serum albumin düzeyi (g/dl)	4,70	0,34	0,04
Serum BUN düzeyi (mg/dl)	24,66	7,30	0,98
Serum kreatinin düzeyi (mg/dl)	0,89	0,21	0,02
Serum total kolesterol düzeyi (mg/dl)	200,25	40,71	5,30
Serum trigliseridleri düzeyi (mg/dl)	158,37	100,39	13,07
Kan eritrosit sayısı ($10^6/\mu\text{l}$)	4,89	0,49	0,06
Kan lökosit sayısı ($10^3/\mu\text{l}$)	7949,00	1871,86	239,60
Hemoglobin değeri (g/dl)	14,03	1,36	0,17
Hematokrit değeri (%)	42,42	6,77	0,87
MCV değeri (fl)	85,71	7,08	0,91
Trombosit sayısı ($10^3/\mu\text{l}$)	255,22	53,79	7,00
Eritrosit Sedimentasyon Hızı (mm/saat)	19,48	13,19	1,73
Vücut ağırlığı (kg)	48,52	11,09	1,39
Boy (cm)	74,73	13,65	1,71
Vücut kitle indeksi (kg/m^2)	27,36	4,79	0,61
FEV1 (%)	93,54	23,88	2,98
FVC (%)	103,19	20,14	2,52
FEV1/FVC (%)	73,70	9,87	1,23
Serum leptin düzeyi (ng/ml)	16,46	15,50	1,93
Serum IFN- γ düzeyi (IU/ml)	<0,08	-	-
Serum IL-4 düzeyi (pg/ml)	<5,00	-	-
Serum IL-10 düzeyi (pg/ml)	10,47	5,82	0,76
Plazma nitrit+nitrat düzeyi ($\mu\text{mol}/\text{l}$)	46,95	26,84	3,35

Grup ayrımı yapmadan erkekler (n=32) ve kadınlar (n=32) ayrı ayrı düşünüldüğünde incelenen parametrelere ait veriler Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo-6. Çalışmaya alınan erkekler ve kadınlara ait incelenen parametre verileri

Ölçülen Parametre	Erkeklerle (n=32) ait veriler			Kadınlara (n=32) ait veriler		
	Ortalama Değer	Standart Sapma	Standart Hata	Ortalama Değer	Standart Sapma	Standart Hata
Vücut ağırlığı (kg)	78,75	12,24	2,16	70,72	13,98	2,47
Boy (cm)	169,81	7,17	1,26	160,59	6,35	1,12
Vücut kitle indeksi (kg/m ²)	27,23	4,50	0,82	27,49	5,12	0,92
FEV1 (%)	96,32	17,30	3,06	90,75	29,04	5,13
FVC (%)	105,47	14,76	2,61	100,91	24,41	4,32
FEV1/FVC (%)	74,34	9,42	1,67	73,06	10,41	1,84
Serum leptin düzeyi (ng/ml)	6,47	6,28	1,11	26,45	15,58	2,75
Serum IFN γ düzeyi (IU/ml)	<0,08			<0,08		
Serum IL-4 düzeyi (pg/ml)	<5,00			<5,00		
Serum IL-10 düzeyi (pg/ml)	11,29	6,69	1,22	9,62	4,72	0,88
Plazma nitrit+nitrat düzeyi (μ mol/l)	48,57	33,91	5,99	45,33	17,56	3,11

Cinsiyet ayrımı yapmadan gruplar (hasta grubu 32 kişi, kontrol grubu 32 kişi) ayrı ayrı düşünüldüğünde incelenen parametrelere ait veriler tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo-7. Hasta ve kontrol grubuna ait incelenen parametre verileri

Ölçülen Parametre	Hasta grubuna (n=32) ait veriler			Kontrol grubuna (n=32) ait veriler		
	Ortalama Değer	Standart Sapma	Standart Hata	Ortalama Değer	Standart Sapma	Standart Hata
Vücut ağırlığı (kg)	77,84	14,50	2,56	71,63	12,18	2,15
Boy (cm)	164,06	7,78	1,38	166,34	8,46	1,50
Vücut kitle indeksi (kg/m ²)	29,00	5,15	0,95	25,87	3,97	0,70
FEV1 (%)	76,67	21,38	3,78	110,41	10,67	1,89
FVC (%)	92,72	20,63	3,65	113,66	13,13	2,32
FEV1/FVC (%)	67,66	9,41	1,66	79,75	5,84	1,03
Serum leptin düzeyi (ng/ml)	20,55	18,28	3,23	12,37	10,93	1,96
Serum IFN γ düzeyi (IU/ml)	<0,08			<0,08		
Serum IL-4 düzeyi (pg/ml)	<5,00			<5,00		
Serum IL-10 düzeyi (pg/ml)	9,27	5,60	1,00	11,80	5,86	1,10
Plazma nitrit+nitrat düzeyi (μ mol/l)	40,35	24,62	4,35	53,55	27,70	4,90

Hasta ve kontrol gruplarında erkekler (n=16) ve kadınlar (n=16) için incelenen parametrelere ait veriler Tablo 8 ve Tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo-8. Hasta grubunda erkekler ve kadınlara ait incelenen parametre verileri

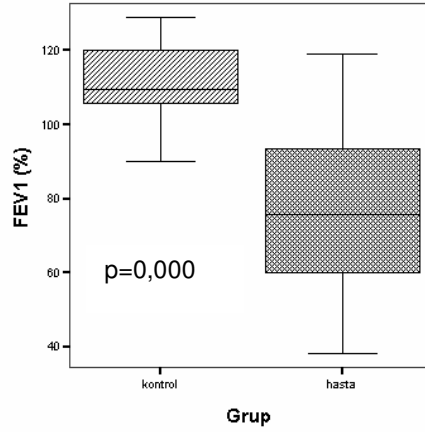
Ölçülen Parametre	Erkeklerle (n=16) ait veriler			Kadınlara (n=16) ait veriler		
	Ortalama Değer	Standart Sapma	Standart Hata	Ortalama Değer	Standart Sapma	Standart Hata
Vücut ağırlığı (kg)	81,81	14,46	3,62	73,88	13,86	3,46
Boy (cm)	168,81	7,08	1,77	159,31	5,19	1,30
Vücut kitle indeksi (kg/m ²)	28,62	5,26	1,41	29,35	5,19	1,34
FEV1 (%)	86,77	18,25	4,56	66,56	19,85	4,96
FVC (%)	101,50	18,57	4,64	83,94	19,25	4,81
FEV1/FVC (%)	68,25	8,41	2,10	67,06	10,56	2,64
Serum leptin düzeyi (ng/ml)	7,55	8,14	2,04	33,56	16,23	4,05
Serum IFN γ düzeyi (IU/ml)	<0,08			<0,08		
Serum IL-4 düzeyi (pg/ml)	<5,00			<5,00		
Serum IL-10 düzeyi (pg/ml)	10,35	6,79	1,70	8,12	3,88	1,00
Plazma nitrit+nitrat düzeyi (μ mol/l)	41,07	30,58	7,65	39,63	17,80	4,44

Tablo-9. Kontrol grubunda erkekler ve kadınlara ait incelenen parametre verileri

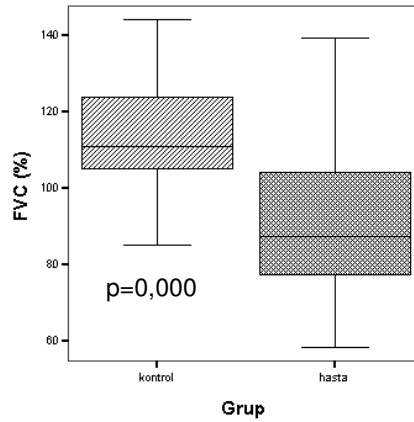
Ölçülen Parametre	Erkeklerle (n=16) ait veriler			Kadınlara (n=16) ait veriler		
	Ortalama Değer	Standart Sapma	Standart Hata	Ortalama Değer	Standart Sapma	Standart Hata
Vücut ağırlığı (kg)	75,69	8,96	2,24	67,56	13,82	3,45
Boy (cm)	170,81	7,24	1,81	161,87	7,28	1,82
Vücut kitle indeksi (kg/m ²)	26,01	3,44	0,86	25,73	4,54	1,13
FEV1 (%)	105,88	9,54	2,38	114,94	10,04	2,51
FVC (%)	109,44	8,49	2,12	117,88	15,70	3,93
FEV1/FVC (%)	80,43	5,80	1,45	79,06	5,98	1,50
Serum leptin düzeyi (ng/ml)	5,41	3,59	0,90	19,33	11,43	2,86
Serum IFN γ düzeyi (IU/ml)	<0,08			<0,08		
Serum IL-4 düzeyi (pg/ml)	<5,00			<5,00		
Serum IL-10 düzeyi (pg/ml)	12,37	6,65	1,78	11,22	5,13	1,37
Plazma nitrit+nitrat düzeyi (μ mol/l)	56,07	36,35	9,08	51,03	15,86	3,97

Cinsiyet ayrımı yapmadan gruplar (hasta grubu n=32, kontrol grubu n=32) ayrı ayrı düşünölüp incelenen parametrelere ait verilerde ortalama değerler t-test ve Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. $p<0,05$ değerleri anlamlı kabul edildiğinde FEV1, FVC, FEV1/FVC ve NO' (nitrit+nitrat) ortalama değerleri, beklendiği gibi hasta grubunda anlamlı olarak dūřuk (sırasıyla $p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,048$), leptin değerleri ise hasta grubunda anlamlı olarak yūkksek ($p=0,034$) bulunmuştur. Farklar, Grafik 1-5'de gōsterilmiřtir.

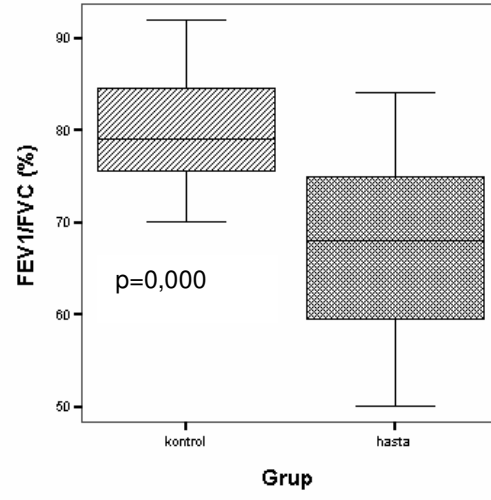
Grafik-1. Hasta ve kontrol grubuna ait FEV1 (%) değerleri grafiği



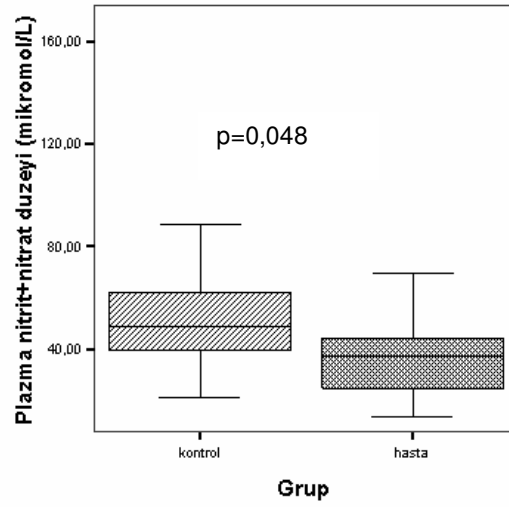
Grafik-2. Hasta ve kontrol grubuna ait FVC (%) değerleri grafiği



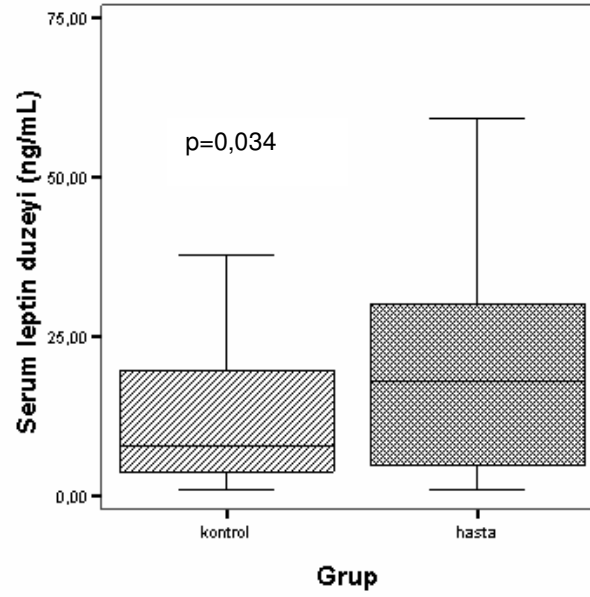
Grafik-3. Hasta ve kontrol grubuna ait FEV1/FVC (%) değerleri grafiği



Grafik-4: Hasta ve kontrol grubuna ait plazma nitrit+nitrat düzeyi grafiği



Grafik-5: Hasta ve kontrol grubuna ait leptin değerleri grafiği

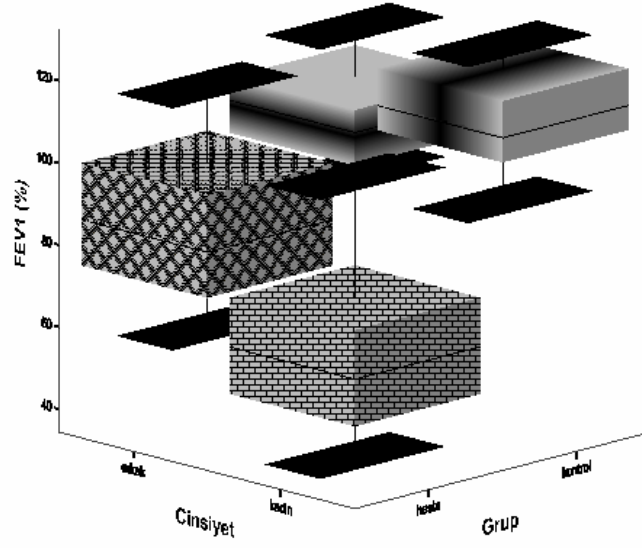


Grup ayrımı yapmadan erkekler (n=32) ve kadınlar (n=32) ayrı ayrı düşünölüp incelenen parametrelere ait verilerde ortalama değerler t test ve Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. $p < 0,05$ değerleri anlamlı kabul edildiğinde vücut ağırlığı ve boy ortalama değerleri, kadınlarda anlamlı olarak düşük (sırasıyla $p=0,017$; ve $p=0,000$); serum leptin düzeyi ise kadınlarda anlamlı olarak yüksek ($p=0,000$) bulunmuştur. Erkek ve kadınlara ait serum leptin değerleri arasındaki fark, Grafik 6'da gösterilmiştir. Diğer parametre ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

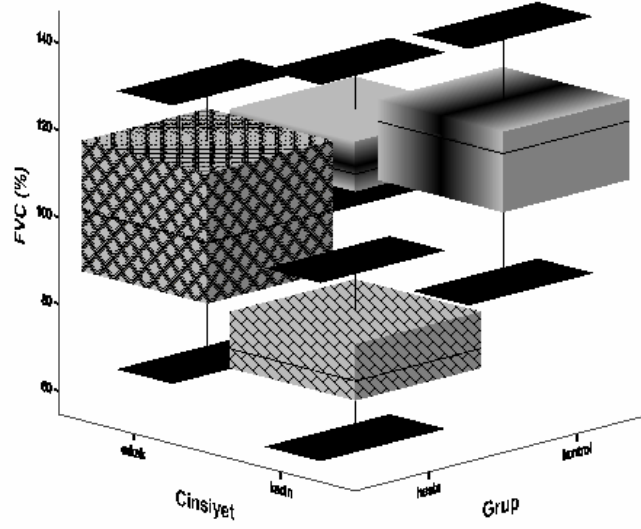
Box plot showing Serum leptin levels (ng/mL) by Gender (Cinsiyet). The Y-axis ranges from 0.00 to 75.00 ng/mL. The X-axis shows 'erkek' (male) and 'kadın' (female). The male group has a median around 5 ng/mL, while the female group has a median around 25 ng/mL. The p-value is 0.000.

62

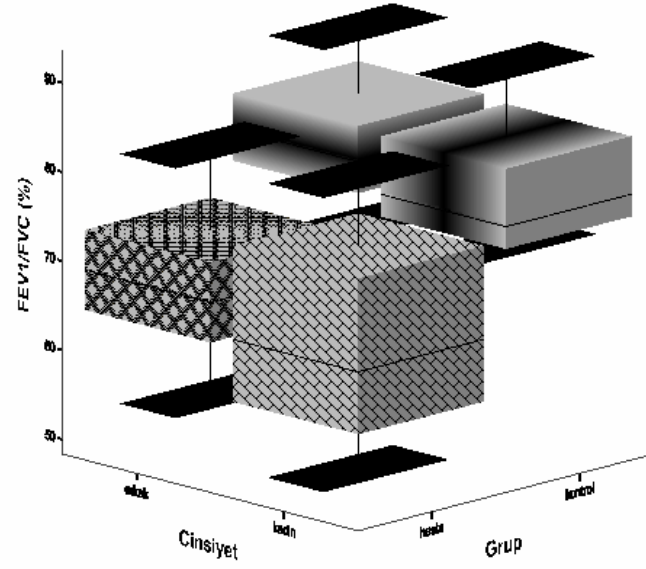
Grafik-7: Gruba ve cinsiyete bağılı FEV1 (%) değerleri



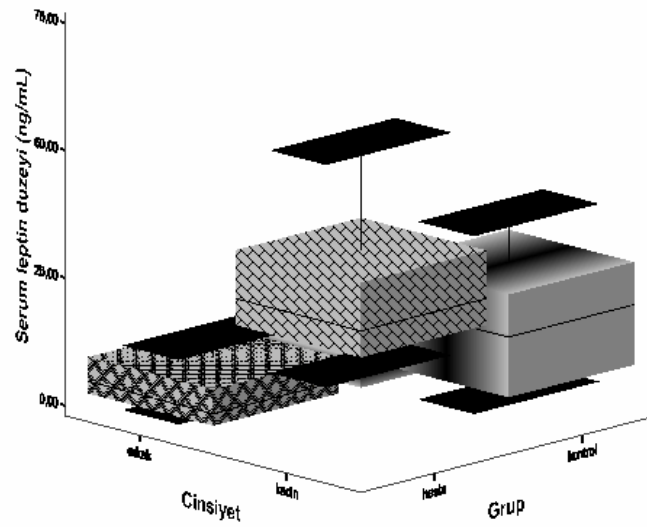
Grafik-8: Gruba ve cinsiyete bağılı FVC (%) değerleri



Grafik-9: Gruba ve cinsiyete bağı FEV₁/FVC (%) değerleri

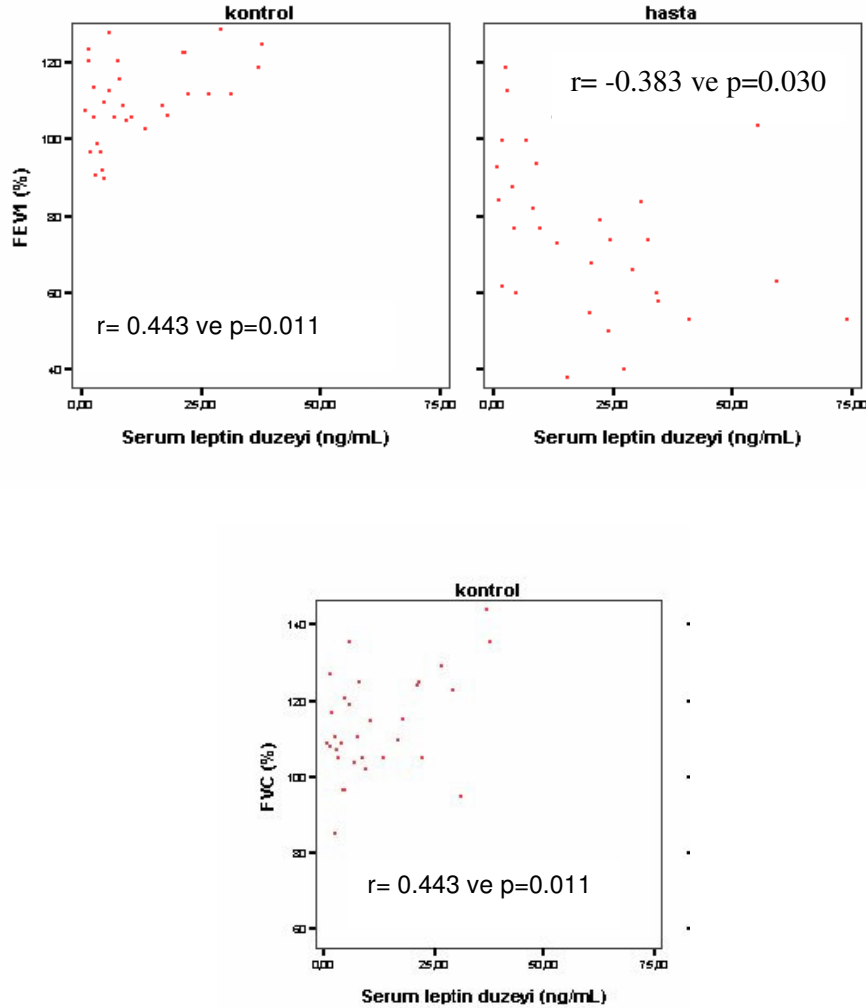


Grafik-10: Gruba ve cinsiyete bağı leptin düzeyi (ng/ml) değerleri

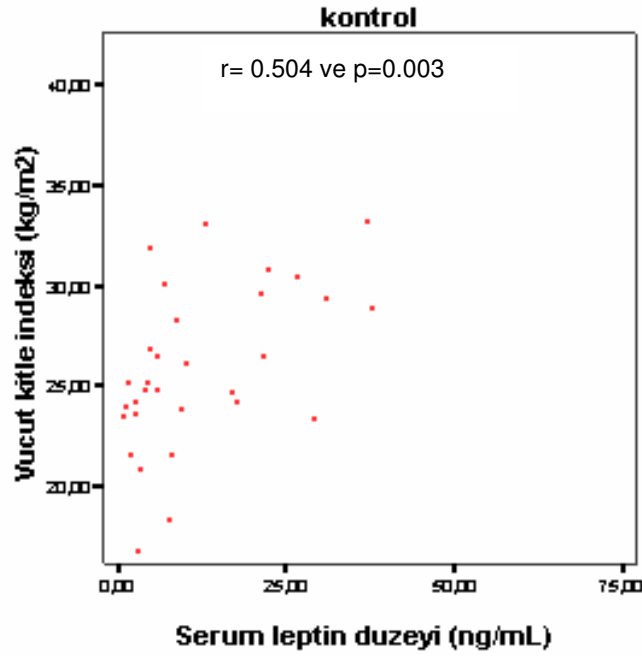


Cinsiyet ayrımı yapmadan kontrol grubu (n=32) ile hasta grubunda (n=32) incelenen parametreler arasında $p<0,05$ değerleri anlamlı kabul edilerek Pearson korelasyon testi yapılmıştır. Kontrol grubunda serum leptin düzeyi vücut kitle indeksi (VKİ), FEV1 ve FVC ile pozitif korelasyon gösterirken (sırasıyla $r=0,504$ ve $p=0,003$; $r=0,443$ ve $p=0,011$; $r=0,443$ ve $p=0,011$), hasta grubunda böyle bir ilişki saptanmamıştır. Hasta grubunda serum leptin düzeyinin FEV1 ile zayıf olarak negatif korelasyon gösterdiği ($r=-0,383$ ve $p=0,030$) bulunmuştur. Saptanan korelasyonlar grafik 11-12'de gösterilmiştir.

Grafik-11: Kontrol ve hasta grubunda serum leptin düzeyi (ng/ml) ile FEV1 (%) ve FVC (%) arasındaki korelasyon

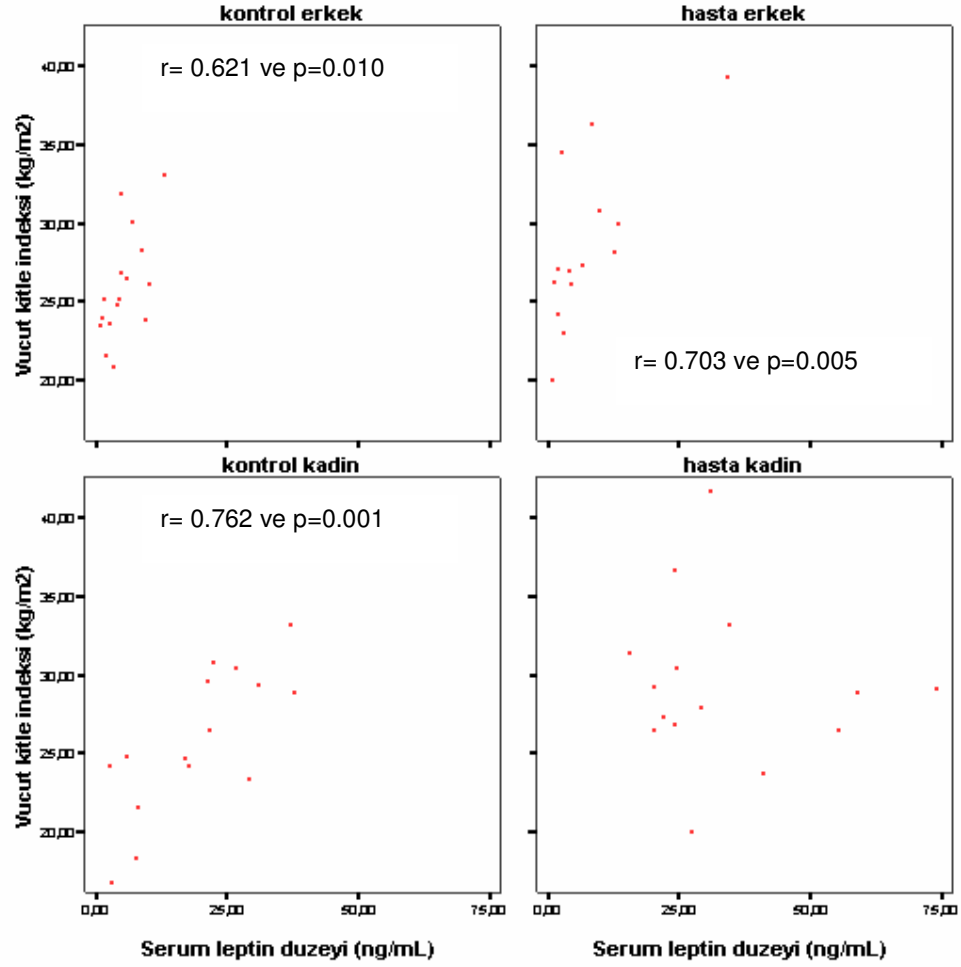


Grafik-12: Kontrol grubunda serum leptin düzeyi (ng/ml) ile VKİ (kg/m²) arasındaki korelasyon



Erkek hasta (n=16), Erkek kontrol (n=16), kadın hasta (n=16), kadın kontrol (n=16) şeklinde gruplar düşünülüp incelenen parametreler arasında $p < 0,05$ değerleri anlamlı kabul edilerek Pearson korelasyon testi yapıldığında, erkek hasta, erkek kontrol, kadın kontrol gruplarında serum leptin düzeyi ile vücut kitle indeksi (VKİ) arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon (sırasıyla $r=0,703$ ve $p=0,005$; $r=0,621$ ve $p=0,010$; $r=0,762$ ve $p=0,001$) gözlenmiştir. Gözlenen korelasyonlar grafik 13’de gösterilmiştir.

Grafik-13: Erkek hasta, erkek kontrol, kadın kontrol gruplarında serum leptin düzeyi (ng/ml) ile vücut kitle indeksi (kg/m^2) arasındaki korelasyon



5. TARTIŞMA

Okul devamsızlığında ve iş gücü kaybında kronik hastalıklar arasında ön sıralarda yer alan astım, tedavi giderleri açısından da, yılda yaklaşık 12,6 milyar dolarlık bir maliyet ile önemli derecede ekonomik yük oluşturan bir hastalıktır. Dolayısıyla son yıllarda astım patogenezi ile ilgili bir çok çalışma yapılmış ve bu konuyla ilgili ortaya atılanlar, adeta bilgi bankası oluşmasına neden olmuştur. Özellikle üzerinde durulan konu, Th1 ve Th2 lenfositleri arasındaki dengenin Th2 yönünde bozulmasıdır (79).

Bronşial astımda reversibl havayolu obstrüksiyonun altında yatan esas neden inflamasyondur. Bir çok çalışmada, inflamasyon derecesi ile astım şiddetinin dolayısıyla akciğer fonksiyon bozukluğunun paralel seyrettiği gösterilmiştir (119).

Akciğer fonksiyonunun pratik bir göstergesi, solunum fonksiyon testleri ki özellikle FEV1/FVC oranıdır. Solunum fonksiyon testleri, uygulaması kolay, referans yöntem gerektirmeyen, noninvaziv bir testtir. Robert ve ark. yaptığı bir çalışmada VKİ'nin, atopi, prik testi, serum IgE düzeyi ile pozitif, FEV1/FVC oranı ile negatif bir ilişkiye sahip olduğu gösterilmiştir (24). Aynı çalışmada, kadınlarda VKİ ile astım semptomları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif ilişki tespit edildiği halde erkeklerde saptanmamıştır. Başka bir çalışmada cinsiyet ayrımı olmadan erişkin astımlı hastalarda VKİ ile astım semptomları arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır (120). Aaron ve ark. obez astımlı kadınların kilo vermesiyle akciğer fonksiyonlarında iyileşme görüldüğünü saptamışlardır (27). Jarvis ve ark. ise erişkin atopili hastalarda atopi ile VKİ arasında her hangi bir ilişki bulamamışlardır (121). Kadınlarda astım gelişimi ile VKİ arasında pozitif bir ilişki olduğu yönünde bir çok çalışma olmasına rağmen, erkeklerde böyle bir ilginin olmadığı yönündeki yayınlar fazlalıktadır. Obezite, mekanik etkiyle, astımda dispne, vizing gibi semptomların ortaya çıkışını kolaylaştırabilir. Son yıllarda yapılan bir çalışmada, VKİ artışının akciğer volümlerinde azalmaya yol açtığı saptanmıştır (122).

Çalışmamızda rutin biyokimya analizlerine ait değerlerin referans aralıkları içinde olması, çalışmaya alınanlarda hasta grubundaki kişilerde bilinen bronşial astım dışında akut veya kronik hastalık olmadığının doğrulanması biçiminde değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda FVC, FEV1/FVC değerleri kontrol grubunda hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ki bu, astımda hava yolları obstrüksiyonu ile uyumludur. Ancak çalışmamızda VKİ ile havayolu obstrüksiyonunun göstergesi kabul edilen solunum fonksiyon testleri arasında istatistiksel olarak anlamlı her hangi bir ilişki tespit edilmemiştir. Bu Jarvis ve ark. bulgularını desteklemekle birlikte doğru bir karar için çalışmaların sürdürülmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Obezlerde astımın daha sık görülmesi, hem obezite ve hem astım etyolojisinde fiziksel aktivite azlığının rol oynaması ile açıklanabilir (120). Diğer taraftan astım, çocukluk çağında erkeklerde, erişkin çağında kadınlarda sık görülmektedir. Erişkin çağında kadınlarda vücut yağ oranı yüksek olduğundan, astımın ortaya çıkmasında VKİ'nin vücut yağ oranı ve bazı hormonal özelliklerle etkili olabileceği düşünülür. Günümüzde yağ dokudan bazı mediatörlerin kana verildiği bilinmektedir. Vücuttaki yağ oranı, yağ dokudan kana verilen mediatörlerin immün cevabı arttırmasıyla da astım ve allerjik hastalık gelişiminde rol oynar (29).

Yağ dokusundan sentezlendiği bilinen leptin, kadınlarda daha çok olmak üzere tüm obez kişilerde artmıştır. Hava yolu inflamasyonu ile karakterize olan astımın ortaya çıkmasıyla obezite arasında pozitif ilişki olduğu bilinmesine rağmen leptinin astımdaki rolü hakkında az sayıda bilgi mevcuttur.

Obezite, astım, leptin üçgeni üzerinde yapılan bir çok çalışmada saptandığı gibi, bizim çalışmamızda da, kontrol grubunda FEV1 ve FVC ile leptin arasında pozitif korelasyon bulunurken hasta grubunda FEV1 ile leptin arasında negatif korelasyon, leptin ile VKİ arasında pozitif korelasyon bulundu. Fakat, FEV1 ve FVC ile obezitenin göstergesi olan VKİ arasında her hangi bir ilişki tespit edemedik.

Astım patogenezinde Th1/Th2 dengesinin Th2 yönünde bozulması anahtar rol oynar (79). Obez kişilerde leptin rezistansı söz konusudur ve bu Th2 lenfositlerine zıt etki gösterir. Leptin düzeyindeki artışlar, astımlı hastalarda Th1 sitokin üretimi üzerinde uyarıcı etki gösterir (6). Leptin, Th1 üzerine uyarıcı etkisiyle astımda inflamasyonun sınırlandırılmasında önemli rol oynayabilir. İnflamasyonun düzenlenmesinde yaptığı bu olumlu fonksiyonların yanı sıra, leptinin aynı zamanda makrofajlardan salınan TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin (ki bunlar, antijene maruz kalma esnasında IL-4 ve IL-5 oluşumunu

arttırarak inflamasyonun yayılmasına yardımcı olurlar) artışına neden olarak allerjik hava yolu inflamasyonunun oluşmasında bazı etkileri olabileceği düşünülmektedir (123, 124). Tıpkı bakteriler gibi leptin de makrofajları aktive ederek fagositozu güçlendirir ve onlardan pro- ve antiinflamatuvar sitokin salınımını uyarır (43). Farelerde allerjik reaksiyonlar esnasında leptin düzeyinin havayollarındaki miktarının arttığı saptanmıştır (125). Yüksek serum leptin düzeylerinin, havayolları hiperaktivitesi ve yüksek serum IgE seviyeleri ile paralellik gösterdiği belirtilmiştir (125).

Çalışmamızda, leptinin inflamasyonun düzenlenmesindeki rolünü destekler anlamında olmak üzere, astım hastalarında serum leptin düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda, grup ayırımı yapmadan incelendiğinde, serum leptin düzeyleri erkeklerle kıyaslandığında kadınlarda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu durum kadınlarda yağ dokusu fazlalığı ve ciltaltı/visseral yağ oranının daha fazla olması ile açıklanmaktadır.

Çalışmamızda serum leptin düzeyinin kontrol grubuna göre hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunması ve leptinin lenfosit aracılı inflamasyonda etkili olduğunun bilinmesi, astımda lenfosit aracılı inflamasyonu desteklemektedir.

Allerjik astımda Th1/Th2 oranının anlamlı olarak düşük olması Th2 hücrelerinin baskın olduğu anlamına gelir. Th2 hücrelerince üretilen IL-10, Th1 ve makrofajlar gibi hücreler tarafından üretilen IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin sentezini inhibe eder, “negatif feedback” için mükemmel bir örnek sunar; böylece antiinflamatuvar özellik gösterir. IL-10, Th2 lenfositlerince üretilen sitokinleri inhibe etmesinden dolayı, allerjik inflamasyonların şiddetinin azalmasına neden olabilir.

IL-10 hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar özelliğe sahip olduğundan bu konuda çalışma yapılırken dikkatli olunmalıdır. Proinflamatuvarlar ve Th2 sitokinleri arasındaki denge allerjik astmanın inflamasyon karakterinin belirlenmesinde anahtar rol oynamaktadır. Normal solunum sisteminde IL-10 düzeyleri yüksektir (89). Astımlı olmayan kişilerde yüksek IL-10 düzeyleri, Th2 hücrelerinin rol oynadığı patolojik olayların sınırlandırılmasında önemli rol oynar (90). Astmatik kişilerin havayollarında IL-10 düzeyleri azalmıştır. Bu da, potansiyel olarak astım semptomlarının şiddetlenmesine neden olur.

Astımda Th2 sitokinlerindeki artış pek çok araştırmacı tarafından kabul edilmekle birlikte, astmatik hava yollarında T hücreleri tarafından aşırı bir sitokin üretimi gösterilememiştir. Astımda Th2 sitokinlerindeki artışın astım şiddeti ile bağlantısı tam olarak kurulamamıştır. Allerjik hastaların bronkoalveolar sıvısında ve serumunda IL-4 düzeyinde artış saptanması, kronik astımı olan hastalara nebulizör ile IL-4 verildiğinde balgam eozinofil sayısında artışla birlikte bronş hiperaktivitesi geliştiğinin görülmesi, atopik kişilerin IL-4 salgılamalarını düzenleyen değişik özelliklere sahip olduklarını düşündürmektedir (85, 86).

Atopik kişiler, atopik olmayan kişilere göre daha fazla IL-4 üreten T lenfositlerine sahiptir. Akut astımlı hastalarda serum IL-4 ve IFN- γ düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna ve asemptomatik astımlı gruba göre anlamlı olarak yüksek saptanmış ve FEV1 ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur (126). Farelerde, anti IL-4 ile allerjen spesifik IgE oluşumunun, eozinofilik inflamasyonun ve havayolu reaktivitesinin azaldığının gösterilmesi, IL-4 inhibisyonunun, serumda IgE düzeylerinin azalmasına ve astım semptomlarının düzelmesine yol açabileceğini düşündürmektedir (87). IgE aracılı inflamasyonlarda Th1/Th2 oranındaki dengesizliğin rol oynadığı açık olarak bilinmektedir. Matsumoto ve ark. yaptıkları bir çalışmada, serum IL-4 düzeyinin IgE ile korele olmadığı saptanmıştır (127, 128). Bizim çalışmamızda, tüm olgularda serumda ölçülebilir düzeyde IL-4 tespit edilmedi. Serum düzeylerinin solunum yollarını doğrudan yansıtmayabileceği muhtemel bir neden olsa da, olgularımızın tedavi altında stabil durumda olmaları ile de açıklanabilir.

Th2 hücrelerinin aracılık ettiği inflamasyona karşın Th1 hücrelerinden interferon- γ salınmaktadır. IFN- γ 'nın akut ve kronik astımdaki rolü tartışmalıdır. Ying ve ark. yaptıkları bir çalışmada astımlı hastalardan alınan bronşiyal biyopsi örneklerinde IFN- γ için kopyalanan mRNA CD3 ve CD68 pozitif hücrelerin sayısında önemli bir azalma olduğunu göstermişlerdir (129). Bir başka çalışmada ise, astımlı hastalardan gece alınan serum örneklerinden çalışılan IFN- γ düzeylerinin, sağlıklı kişilere göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (130).

Bizim çalışmamızda, tüm olgularda IFN- γ ölçülebilir düzeyde bulunmadı. Serum IFN- γ düzeyleri, hem astmatik hastalarda hem de normal sağlıklı grupta ölçülemeyecek kadar düşüktü. Astımlı kişilerde serum IFN- γ düzeyinin

yükseldiğini gösteren çalışmaların yanı sıra, artışın olmadığını gösteren çalışmalar da vardır (127, 131, 132, 133).

Üst ve alt solunum yollarında, özellikle üst solunum yollarında çok fazla miktarda nitrik oksit (NO) bulunur ve paranazal sinüslerin sterilitesinin devamını sağlamada önemli rol oynar (134). Nitrik oksitin (NO) bir çok inflamatuvar hastalıkla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar olmasına rağmen, allerjik astımda kesin rolünün ne olduğu konusunda çok fazla açıklayıcı bilgi bulunmamaktadır (134).

Astımda havayolu inflamasyonu nedeniyle, özellikle alevlenmeler ve kontrol altında olmayan hastalarda ekshalasyon havasında NO düzeyi yüksektir (135). Ekshalasyon havasında NO metabolitlerinin yüksek olarak saptanmasının nedeni, astmatik hava yollarından sentezlenen sitokinler ve diğer inflamatuvar mediyatörler tarafından indüklenen iNOS düzeylerindeki artış olabilir. Ekshalasyon havasındaki NO yüksekliği ile VKİ arasında güçlü bir ilişki olduğunu gösteren çalışmalar vardır (136). Subklinik düşük dereceli inflamasyonu olan obezlerdeki kilo alımı, düşük üretim ile ilgili olarak, solunumdaki NO düzeyinde düşüklüğe sebep olabilir (137). Yapılan bir çalışmada, serum nitrat düzeyi astımlı hastalarda sağlıklı normal kontrollere göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır (138).

Çalışmamızda plazma NO (nitrit+nitrat) düzeyi astımlı olgularda kontrol grubuna kıyasla düşük bulunmuştur. Serumda bir takım inflamatuvar belirteçlerin bakılması kolay ve tekrarlanabilir olması nedeniyle tercih edilen bir yol olmakla birlikte, her zaman akciğerde lokalize patolojileri yansıtmada yeterli olmayabilir. Ekshalasyon havasında NO düzeyinin akciğerden kaynaklanan bir inflamatuvar olayda artması nedeniyle, plazma düzeyinde de bir artış beklenebilir. Ancak plazma NO düzeyinin yalnız akciğerlerden etkilenmediği, dolaşımdaki vasküler endotelial yapıdan kaynaklandığına ilişkin yayınlar da vardır (134). Vasküler endotelial yapılardan iki önemli madde dolaşıma salınır ki bunlar endotelin ve NO'dur. Çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda NO düzeyinin düşük bulunmasının muhtemel nedeni, zaman zaman astım ataklarına bağlı gelişen hipoksemi ve bu hipokseminin endotelde yaptığı etki sonucu NO düzeyinin azalmış olması olabilir. İnhal kortikosteroidlerin kullanımı, epitelium hücrelerinde bulunan sitokinlerce indüklenen iNOS üretimini baskılayarak plazmada nitrik oksit derivelerinin düşük seviyelerde kalmasına neden olabilir

(139). Nitrik oksit düzeylerinde kısa süren artışlar, iNOS aktivitesi üzerinde down-regülasyon etkisine sahip olarak plazma NO⁻ düzeyinin düşük seviyelerde seyretmesine neden olabilir (140).

NO⁻ güçlü bir vazodilatördür, pulmoner arter basıncının düşük düzeyde devam etmesinden sorumludur (134). Pulmoner arterlerde anormal kalınlaşma ve pulmoner vasküler dirençte artma pulmoner hipertansiyon ile sonuçlanır. Primer pulmoner hipertansiyonlu hastalardan elde edilen verilere göre bu hastalarda endotel kaynaklı vazodilatör faktörler (prostasiklin, NO⁻) ile vazokonstriktör mediatörler [endotelin-1 (ET-1), tromboksan A2 (TXA2)] arasında dengesizlik vardır (141). Bunu destekleyen bir bulgu, NOS inhibitörleri uygulanmasının pulmoner ve sistemik hipertansiyonla sonuçlanmasıdır. NO⁻ inhale formda verildiğinde, selektif olarak pulmoner vasküler yatağı dilate eder, endotel kaynaklı NO⁻ üretimindeki bir aksaklık pulmoner hipertansiyonun bazı şekillerinin oluşmasına neden olur (134). Primer pulmoner hipertansiyonlu hastalarda nitrik oksitin düşük saptanması, bunun hastalık patogenezinde önemli bir rolü olabileceğini düşündürmektedir (142). Nitrik Oksitin selektif pulmoner vazodilatatif etkisinin de bilinmesinden dolayı, bu tür durumlarda tedavide kullanımı faydalı olabilir. Hipoksemiye bağlı obstriktif ve/veya restriktif tipteki akciğer patolojilerinde gözlenen pulmoner hipertansiyon gelişimi muhtemelen bu mekanizma ile ilişkili olabilir ve bu konuda ileri ek çalışmaların yapılması uygun olacaktır.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda, solunum fonksiyon testlerinin düşük olduğu astım hastalarında serum leptin değerlerinin, kadınlarda daha belirgin olmak üzere arttığı saptanmıştır. Ancak astım hastalarında, Th1 lenfositlerince sentezlenen IFN- γ , Th2 lenfositleri tarafından sentezlenen IL-4 ve IL-10'un serum değerlerinde kontrol grubuna göre farklılık saptanmamıştır. Buna göre leptinin, astım patogeneğinde önemli olan Th1 ve Th2 arasındaki denge üzerine etki yapmadığı, başka mekanizmalarla astım hastalığında regülatuar rol oynayabileceği düşünülebilir.

Çalışmamızda, astımlı hastalarda plazma NO⁻ düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Buna göre NO⁻'nun, astım hastalığının gelişiminde bir rolü olduğu yerine hastalığın bir sonucu olarak plazma düzeyinin düştüğü düşünülmelidir.

Astımda hava yollarında oluşan inflamasyonun akciğerlerde sınırlı kalmayıp sistemik etkisinin olabileceğini, hastalığa bağlı diğer sistemik etkilenmelerin öngörüsünde serum leptin ve plazma nitrik oksit düzeylerinin yararlı belirteçler olarak kullanılabileceğini düşünebiliriz.

ÖZET

ASTIMLI YETİŞKİN HASTALARDA SERUM LEPTİN, IFN-gama, IL-4, IL-10, NİTRİK OKSİT KONSANTRASYONLARI VE SOLUNUM FONKSİYONLARI ARASINDAKİ İLİŞKİLER

Dr.Mustafa YILMAZ

Astım, hava yollarının kronik inflamatuvar hastalığı olarak kabul edilmektedir. Astımda Th1/Th2 lenfositleri arasındaki denge Th2 lenfositleri lehine değişmiştir. Çalışmamızda, astımlı yetişkin hastalarda solunum fonksiyon testleri ile serum leptin, IL-4, IL-10, IFN-gama düzeyleri ve plazma nitrik oksit konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçladık.

Çalışma kapsamına, klinik olarak astım tanısı alan 32 hasta, hasta grubu olarak; astım ve başka bir akut veya kronik hastalığı olmayan 32 sağlıklı kişi de kontrol grubu olarak alındı. Tüm olgularda solunum fonksiyon testleri spirometre ile ölçüldükten sonra rutin biyokimya testleri ve leptin, IL-4, IL-10, IFN-gama düzeylerini saptamak için antikoagülsiz tüpe, nitrik oksit düzeyini saptamak için heparinli tüpe kan alındı. Rutin biyokimya analizleri hemen yapıldı; diğer analizler için ayrılan serum/plazma analiz gününe kadar -85 santigrad derecede saklandı. Serum leptin, IL-4, IL-10, IFN-gama düzeyleri ELISA yöntemini kullanan ticari kit ile, plazma nitrik oksit konsantrasyonunun göstergesi olarak nitrit+nitrat konsantrasyonları HPLC ile ölçüldü. SPSS 13.0 programında bilgisayara girilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi, t-test ve Pearson korelasyon testi ile yapıldı.

Kontrol grubunda FEV1 ve FVC ile leptin arasında pozitif korelasyon (sırasıyla $r=0,443$ $p=0,005$ ve $r=0,440$ $p=0,013$) bulunurken hasta grubunda FEV1 ile leptin arasında negatif korelasyon ($r=-0,366$ $p=0,043$) bulundu. Serum leptin düzeyi kadınlarda erkeklere göre anlamlı olarak yüksek ($p=0,000$) saptandı. Plazma nitrit+nitrat düzeyi hasta grubunda kontrol grubunda göre anlamlı olarak düşük ($p=0,012$) bulundu.

Bulgularımız, astımda hava yollarında oluşan inflamasyonun sistemik etkilerinin olabileceğini, bu etkilerin öngörüsünde leptin ve nitrik oksit düzeylerinin yararlı belirteçler olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

ABSTRACT

THE RELATIONSHIP BETWEEN RESPIRATORY FUNCTION TESTS AND SERUM LEPTIN, IL-4, IL-10, IFN-gamma LEVELS AND PLASMA NITRIC OXIDE CONCENTRATIONS IN ASTHMATIC ADULTS

Dr.Mustafa YILMAZ

Asthma is accepted as a chronic inflammatory disease of the airway epithelium. In asthma, balance between Th1/Th2 lymphocytes is changed in favour of the Th2 lymphocytes. In this study, it was aimed to investigate the relationship between respiratory function tests and serum leptin, IL-4, IL-10, IFN-gamma levels and plasma nitric oxide concentrations.

In this study, 32 clinically asthma diagnosed patients were taken as a patient group and 32 healthy individuals as a control group. For the measurement of leptin, IL-4, IL-10, IFN-gamma and nitrite+nitrate, serum/plasma of blood samples were separated and kept in -85 centigrade degree until the day of measurement. Respiratory function tests for each case were carried out with spirometer, serum leptin, IL-4, IL-10, and IFN-gamma levels were measured with a commercial kit that uses ELISA, plasma nitrite and nitrate levels detected with HPLC. Data were analysed with SPSS 13.0 software, t-test and Pearson correlation applied where appropriate.

In control group, there was a positive correlation between leptin levels and FEV1 and FVC with the value of $r=0,443$ $p=0,005$ and $r=0,440$ $p=0,013$ respectively, where as in patient group, there was a negative correlation between leptin levels and FEV1 with the value of $r=-0,366$ $p=0,043$. Serum leptin levels were significantly higher in women compared to men, $p=0,000$. In patient group, plasma nitric oxide levels were significantly lower compared to the control group, $p=0,012$.

These findings suggest that, airway inflammation may have systemic effects in asthma so that leptin and nitric oxide levels might be useful parameters to detect these systemic effects.

KAYNAKLAR

1. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 2000 May; 161 (5): 1720-45
2. Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: A review of current evidence. *Ann Intern Med* 1999; 130: 671-680
3. Wallace AM. Measurement of leptin and leptin binding in the human circulation. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 244-252
4. Fruhbeck G. Peripheral actions of leptin and its involvement in disease. *Nutr Rev* 2002 Oct; 60 (10): S47-55(5) Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 437-446
5. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 437-446
6. Matarese G, La Cava A, Sanna V, ve ark. Balancing susceptibility to infection autoimmunity: a role for leptin? *Trends Immunol* 2002;23:182-7
7. Solak ZA. Astım ve atopi gelişiminde hijten hipotezi. *Toraks dergisi* 2003; 4 (3): 269-278
8. Lord G. Role of leptin in immunology. *Nutr Rev* 2002 Oct; 60 (10): S35-38
9. 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* 1999; 180: 908-911
10. Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A. Stimulatory effect of leptin on nitric oxide production is impaired in dietary-induced obesity. *Obesity research* 2003; 11 (12): 1571-1580
11. Barnes PJ. Nitric oxide and airway disease. *Ann Med.* 1995 Jun; 27 (3): 389-93
12. Moshage H, Kok B, Huizenga JR ve Jansen PL (1995) Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem*, 41, 892-896
13. Sin DD, Man SF. Impaired lung function and serum leptin in men and women with normal body weight: a population based study. *Thorax* 2003; 58: 695-698
14. Mai XM, Böttcher MF, Leijon I. Leptin and asthma in overweight children at 12 years of age. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; 15: 523-530
15. McDowell, KM 2000. Pathophysiology of asthma. *Respiratory Care Clinics of North America*, 6(1): 15-26
16. Beers MH & Berkow R (eds). 1999. *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, 17 ed. Whitehouse Station, N.J.: Merck Research Laboratories.2146-2152
17. Strachan DP. Hay fever, hygiene and household size. *Br Med J* 1989;259:1259-60
18. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology, 5. th. Ed. Saunders, 243, 2003
19. Gemicioğlu B. Bronş astımı: Erk M.ed. Göğüs Hastalıkları. 1st.ed. İstanbul. İ.Ü. Yayınları No 4297, 2001; 621-658
20. Janssens JP, Pache JC, Nicod LP. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J* 1999;13(1):197-205

21. Tantisira KG, ve ST Weiss. Complex interactions in complex traits: obesity and asthma. 2001Thorax 56 Suppl 2:ii64-73
22. Weiss&Shore AJRCCM 2004; 169; 963-8
23. Beckett WS, DR Jacobs Jr, X Yu, Iribarren C, ve Williams OD. 2001. Asthma is associated with weight gain in females but not males, independent of physical activity. *Am J Respir Crit Care Med* 164:2045-50
24. Robert J Hancox, Barry J Milne ve ark. AJRCCM 2004, Sex differences in the relation between body mass index and asthma and atopy in a birth cohort 10.1164/rccm.200405-623OC
25. Huang SL, Shiao G, Chou P. Association between body mass index and allergy in teenage girls in Taiwan. *Clin Exp Allergy* 1999;29:323-329
26. Thomson CC, Clark S, Camargo CA Jr. Body mass index and asthma severity among adults presenting to the emergency department. *Chest* 2003;124:795-802
27. Aaron SD, FergussonD, DentR, ve ark. Effect ofweight reduction on respiratory function and airway reactivity in obese women. *Chest* 2004;125:2046-2052
28. Litonjua AA, Sparrow D, Celedon JC, ve ark. Association of body mass index with the development of methacholine airway hyperresponsiveness in men: theNormativeAging Study. *Thorax* 2002;57:581-585
29. Tantisira KG,Weiss ST. Complex interactions in complex traits: obesity and asthma. *Thorax* 2001;56 (Suppl. 2):ii64-73
30. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L,Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372:425-32
31. Friedman JM. Role of leptin and its receptors in the control of body weight. In: (Blum WF, Kiess W & Rascher W eds.) *Leptin-the voice of adipose tissue*. Johann Ambrosius BarthVerlag, Germany; 1997:3-22
32. Barata M. Leptin from a signal of adiposity to a hormone mediator in peripheral tissues. *Med Sci Monit* 8:RA282-92, 2002
33. Brabant G, Horn R, Mayr M, Wurster U, Schnabel D, Heidenreich F. Free and protein bound leptin are distinct and independently controlled factors in energy regulation. *Diabetologia* 2000; 43; 438-42
34. Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endorinol Metab* 1996; 81: 3419- 23
35. Webber J Energy balance in obesity. *Proc Nutr Soc* 62:539-43, 2003
36. Freieedman JM, Halas JK, Leptin and the regulation body weigth in mammalias.*Nature* 395:763 1998
37. WabitschM, Jensen PB, BlumWF, ve ark. Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes* 1996;45:1435-1438
38. ConsidineRV, SinhaMK, HeimanML, ve ark. Serumimmunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *NEngl J Med* 1996;334:292-295
39. Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem*. 1997;272:6093 – 6

40. Spitzweg C, Heufelder AE. More clues from fat mice: leptin acts as an opponent of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Eur J Endocrinol* 1997;136:590–1
41. Daniel P, Denis G, Baskin D, Michael WS. Leptin and Insulin Action in the Central Nervous System. *Nutr Rev* 2002; 60: 20–9
42. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998; 394: 897-901
43. Lee FYJ, Li Y, Yang EK. Phenotypic abnormalities in macrophages from leptin-deficient obese mice. *Am J Physiol* 1999; 276: 386- 94
44. Bouloumie A, Dresler HCA, Lafontan M. Leptin, the product of the Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res.* 1998;83:1059- 66
45. Bennet BD, Solar GP, Yuan JO, Thomas GR. A role for leptin and its cognate receptor in haematopoiesis. *Curr Biol* 1996; 6:1170- 80
46. Laharrague P, Larrouy D. High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture. *FASEB J* 1998; 12: 747- 53
47. Klein KO, Larmore KA. Effect of obesity on estradiol level, and its relationship to leptin, bone maturation, and bone mineral density in children. *J Clin Endoc Metab* 1998; 83: 3469- 75
48. Iwaniec UT, Heaney RP, Cullen DM, Yee JA. Leptin increases the number of mineralized bone nodules in vitro. *J Bone Miner Res* 1998;13: 2-12
49. Marcin K. Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. *Eur J Phar* 2002;440: 85– 98
50. McConway MG, Johnson D, Kelly A, Griffin D, Smith J, Wallace AM. Differences in circulating concentrations of total, free and bound leptin relate to gender and body composition in adult humans. *Ann Clin Biochem* 2000;37: 717-23. 59
51. Lonnquist F, Arner P. Over expression of the obese gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med* 1995;1: 950- 3
52. Furchgott RF, Zawadzki JV, *Nature* 288 (1980) 373
53. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. *Nature* 327 (1987) 524
54. Aktan F. (2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*, 75, 639-653
55. Kuby, J., *Immunology*, 1992 W.H. Freeman and Company, 245
56. Marletta, M. (1994) Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, 78, 927-930
57. Palmer, R.M. and Moncada, S. (1989) A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 158, 348-352
58. Özkan Metin, Yüksek İsmail. Nitrik Oksit ve Akciğerler, *Toraks Dergisi*, 2003;4(1):88-94
59. Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M ve Murad F. (1991) Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor

- synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 10480-10484
60. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA., Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T ve Nathan C. (1992) Cloning and characterization of inducible NOS from Mouse macrophages. *Science*, 256, 225-228
 61. Mayer B ve Hemmens B. (1997) Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci*, **22**, 477-481
 62. Michel T ve Feron O. (1997) Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest*, 100
 63. Knowles RG ve Moncada S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 298 (Pt 2), 249-258
 64. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP ve ark. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1994; 269: 6765-72
 65. Dweik R. The promise and reality of nitric oxide in the diagnosis and treatment of lung disease. *Clev Clin J Med*. 2001;68:486-493
 66. Ozkan M, Dweik R. Nitric Oxide and Airway Reactivity. *Clin Pulm Med* 2001;8:199-206
 67. Ashok Agarwal, Sajal Gupta ve Rakesh K Sharma, Role of oxidative stress in female reproduction *Reproductive Biology and Endocrinology* 2005, 3:28
 68. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS ve Tannenbaum SR. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 126, 131-138
 69. Gustafsson LE, Leone AM, Persson M-G, Wiklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 852-7
 70. Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Eur Respir J* 1993; 6: 1268-70
 71. Jang AS, Choi IS, Lee S, et al. Nitric oxide metabolites in induced sputum; a marker of airway inflammation in asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 1999;29:1136-1142
 72. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 1987;92:639-46
 73. Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Förstermann U ve Murad F. (1993) Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett*, 316, 175-180
 74. Moilanen E, Moilanen T, Knowles R, Charles I, Kadoya Y, al-Saffar N, Revell PA ve Moncada S. (1997) Nitric oxide synthase is expressed in human macrophages during foreign body inflammation. *Am J Pathol*, **150**, 881-887
 75. Davis KL, Martin E, Turko IV ve Murad F. (2001) Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 203-236
 76. Murad F. (1999) Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep*, 19, 133-154

77. Hogg N. (2002) The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42, 585- 600
78. Farrell AJ ve Blake, DR. (1996) Nitric oxide. *Ann Rheum Dis*, 55, 7-20
79. Buse W, Lemanske R. Immunology of asthma, *NEJM* 2001;344:350
80. Lee Maddox ve David A. Schwartz, The Pathophysiology of asthma, *Annu. Rev. Med.* 2002. 53:477–98 Copyright c° 2002 by Annual Reviews
81. Yokota T ve ark. (1986). "Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83 (16): 5894-8
82. Pawankar R, Okuda M, Yssel H, Okumura K, Ra C: Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J Clin Invest* 1997, 99:1492–1499
83. Dabbagh K, Takeyama K, Lee HM, Ueki IF, Lausier JA, Nadel JA:IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunol* 1999, 162:6233–6237
84. Moser R, Fehr J, Bruijnzeel PL: IL-4 controls the selective endothelium-driven transmigration of eosinophils from allergic individuals. *J Immunol* 1992, 149:1432–1438
85. Daher S, Santos LM, Sole D, De Lima MG, Naspitz CK, Musatti CC: Interleukin-4 and soluble CD23 serum levels in asthmatic atopic children. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1995, 5:251–254
86. Shi HZ, Deng JM, Xu H, Nong ZX, Xiao CQ, Liu ZM, Qin SM, Jiang HX, Liu GN, Chen YQ: Effect of inhaled interleukin-4 on airway hyperreactivity in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 157:1818–1821
87. Coyle AJ, Le Gros G, Bertrand C, Tsuyuki S, Heusser CH, Kopf M, Anderson GP: Interleukin-4 is required for the induction of lung Th2 mucosal immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995, 13:54–59
88. Hamelmann E, Rolinck-Werninghaus C, Wahn U. Is there a role for anti-IgE in combination with specific allergen immunotherapy? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3:501–10
89. Borish L, Aarons A, Rumblyrt J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97:1288±96
90. Moore KW, Malefyt RW, Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor *Annu Rev Immunol* 2001
91. Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol* 1998; 160:3555–61
92. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Verweij CL, Sturk A. Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet* 1997; 349:1912–3
93. Takanashi S, Hasegawa Y, Kanehira Y, Yamamoto K, Fujimoto K, Satoh K, Okamura K. Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers *European Respiratory Journal*, 14,2,309. 1999

94. Robinson DS, Tsicopoulos A, Meng Q, Durham S, Kay AB, Hamid Q. Increased interleukin-10 messenger RNA expression in atopic allergy and asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14:113±7
95. Dong M, Shi Y, Cheng Q ve Hao M. (2001) Increased nitric oxide in peritoneal fluid from women expression by peritoneal macrophages in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril*, 77, 46-51
96. Romagniani S. Regulation and deregulation of human IgE synthesis. *Immunol Today* 1990;11:316–21
97. Look DC, Rapp SR, Keller BT, et al. Selective induction of intracellular adhesion molecule-1 by interferon-gamma in human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 1992;263:L79–87
98. Gifford GE, Lohmann-Matthess ML. Gamma interferon priming of mouse and human macrophages for induction of tumor necrosis factor production by bacterial lipopolysaccharide. *J Natl Cancer Inst* 1987;78:121–4
99. Koning H, Neijens HJ, Baert MR ve ark. T cell subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. I. Analysis of IL-4, IFN-gamma and IL-13 mRNA expression and protein production. *Cytokine* 1997;9:416–26
100. Hayden C, Pereira E, Rye P ve ark. Mutation screening of interferon-gamma (IFN γ) as a candidate gene for asthma. *Clin Exp Allergy* 1997;27:1412–6
101. Lack G, Bradley KL, Hamelmann E ve ark. Nebulized IFN γ inhibits the development of secondary allergic responses in mice. *J Immunol* 1996;157:1432–9
102. Li XM, Chopra RK, Chou TY ve ark. Mucosal IFN gene transfer inhibits allergic responses in mice. *J Immunol* 1996;157:3216–9
103. Coyle AJ, Tsuyuki S, Bertrand C ve ark. Mice lacking the IFN-gamma receptor have impaired ability to resolve a lung eosinophilic inflammatory response associated with a prolonged capacity of T cells to exhibit a Th2 cytokine profile. *J Immunol* 1996;156:2680–5
104. Durham SR, Till SJ. Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102: 157–64
105. Bentley AM, Hamid Q, Robinson DS ve ark. Prednisolone treatment in asthma. Reduction in the numbers of eosinophils, T cells, tryptase-only positive mast cells, and modulation of IL-4, IL-5, and interferon-gamma cytokine gene expression within the bronchial mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:551–6
106. Leung DY, Martin RJ, Szeffler SJ ve ark. Dysregulation of interleukin 4, interleukin 5, and interferon gamma gene expression in steroid-resistant asthma. *J Exp Med* 1995; 181:33–40
107. American Thoracic Society: Standardization of spirometry. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1107-36
108. Palmer RM, Ferrige AG ve Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524-526

109. Tsukahara H, Gordienko DV ve Goligorsky MS. (1993) Continuous monitoring of nitric oxide release from human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 193, 722-729
110. Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH ve Kim WW. (2000) Relationships between concentrations of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in follicular fluid and oocyte quality. *J Asist Reprod Genet*, 17, 222-228
111. Ogden JE ve Moore PK. (1995) Inhibition of nitric oxide synthase – potential for a novel class of therapeutic agent? *Trends Biotechnol.*, 13, 70-78
112. Ekerhövde E, Brännström M, Alexandersson M ve Norström A. (1997) Evidence for nitric oxide mediation of contractile activity in isolated strips of the human Fallopian tube. *Hum Reprod*, 12, 301-305
113. Rosselli M, Dubey RK, Rosselli MA, Macas E, Fink D, Lauper U, Keller PJ ve Imthurn B. (1996) Identification of nitric oxide synthase in human and bovine oviduct. *Mol Hum Reprod*, 2, 607-612
114. Benjamin N, Calver A, Collier J, Robinson B, Vallance P ve Webb D. (1995) Measuring forearm blood flow and interpreting the responses to drugs and mediators. *Hypertension*, 25, 918-923
115. Wilkinson IB, Hall IR, MacCallum H, Mackenzie IS, McEniery CM, van der Arend BJ, Shu YE.(2002), *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,22,147-152
116. Orpana AK, Avela K, Ranta V, Viinikka L ve Ylikorkala O. (1996) The calcium-dependent nitric oxide production of human vascular endothelial cells in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 174, 1056-1060
117. Osborn BH, Haney AF, Misukonis MA ve Weinberg JB. (2002) Inducible nitric oxide synthase
118. Jungersten L, Edlund A, Petersson AS ve Wennmalm A. (1996) Plasma nitrate as an index of nitric oxide formation in man: analyses of kinetics and confounding factors. *Clin Physiol*, 16, 369-379
119. Synek M, Beasley R, Frew AJ et al. Cellular infiltration of the airways in asthma of varying severity. *Am JRespirCritCareMed*1996;154:224±30
120. Luder E, Erlich RI, Lou WYW, Melnik TA, Kattan M. Body mass index and the risk of asthma in adults. *Respir Med* 2004;98:29–37
121. Jarvis D, Chinn S, Potts J, ve Burney P. 2002. Association of body mass index with respiratory symptoms and atopy: results from the European Community Respiratory Health Survey. *Clin Exp Allergy* 32:831-7
122. Chinn S, Jarvis D, Burney P. The relation of bronchial responsiveness to body mass index in the ECRHS. *Thorax* 2002;57:1028–33
123. Güler N, Kırerler E, Ones Ü, ve ark. Leptin: Does it have any role in childhood asthma? *J Allergy Clin Immunol* 2004;114: 254-259
124. Faggioni R, Jones-Carson J, Reed DA, ve ark. Leptin-deficient (ob/ob)mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumour necrosis factor alpha and IL-18. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2367-2372

125. Shore SA, Igor N, Schwartzman BSc ve ark. Effect of leptin on allergic airway responses in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:103–9
126. Yong Chul Lee , Kyung Hun Lee, Heung Bum Lee , Yang Keun Rhee Serum Levels of Interleukins (IL)-4, IL-5, IL-13, and Interferon- γ in Acute Asthma Department of Internal Medicine, Chonbuk National University Hospital, , Keumamdong Chonju, , South Korea
127. Tang ML, Coleman J, Kemp AS. Interleukin-4 and interferon- gamma production in atopic and non-atopic children with asthma. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 515–521
128. Matsumoto T, Miike T, Yamaguchi K, Murakami M. Kawabe T, Yodoi J. Serum levels of soluble IL-2 receptor, IL-4 and IgE-binding factors in childhood allergic diseases. *Clin Exp Immunol* 1991; 85: 288–292
129. Ying S, Durham SR, Corrigan CJB, Hamid Q, Kay AB. Phenotype of cells expressing mRNA for TH2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and TH1-type (interleukin 2 and interferon γ) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatic and normal subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12: 477–487
130. Hacken Y, Oosterhoff HF, Kauffman L, Guevarra T, Satoh DJ, Tollerud DS. Postma Elevated serum interferon- γ in atopic asthma correlates with increased airways responsiveness and circadian peak expiratory flow variation *Eur Respir J* 1998; 11: 312–316
131. Corrigan CJ, Kay AB. CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 970–977
132. Saito H, Hayakawa T, Mita H, Yui YS, Shida T. Augmentation of leukotriene C4 production by gamma interferon in leukocytes challenged with an allergen. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988; 87: 286–293
133. Hashimoto S, Amemiya E, Tomita Y ve ark. Elevation of soluble IL-2 receptor and IL-4, and nonelevation of IFN-gamma in sera from patients with allergic asthma. *Ann Allergy* 1993; 71: 455–458
134. Sanders S P. Nitric oxide in asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21:147– 149; 1999
135. de Jongste JC. 2000. Surrogate markers of airway inflammation: inflammometry in paediatric respiratory medicine. *Paediatr. Respir. Rev.* 1, 354–360
136. Kazaks A, Uriu-Adams JY, Stern JS, Albertson TE. 2005. No significant relationship between exhaled nitric oxide and body mass index in people with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 929–930, author reply 930
137. Giugliano F, Esposito K, Di Palo C, Ciotola M, Giugliano G, Marfella R, D'Armiento M, Giugliano D. 2004. Erectile dysfunction associates with endothelial dysfunction and raised proinflammatory cytokine levels in obese men. *J. Endocrinol. Invest.* 27, 665–669
138. Garmendia JV, Moreno Jr D, Larocca NE, Ta'lamo C, De Sanctis JB. 2007. Nitric Oxide Metabolites In Asthma And Copd. *J Allergy Clin Immunol*, volume 119, number 1, 89-89
139. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled nitric oxide: a marker of airway inflammation? *Curr Opin Anaesthesiol* 1996; 9: 542-548

140. Kharitonov SA, Alving K, Barnes PJ. Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations. *Eur Respir J* 1997; 10: 1683-1693
141. Giaid A. Nitric oxide and endothelin-1 in pulmonary hypertension, *Chest* 1998; 114:208-12
142. Ozkan M, Laskowski D, Dweik RA, Erzurum SC. High levels of nitric oxide in individuals with pulmonary hypertension receiving epoprostenol therapy. *Lung* 2002;179;233-43

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Tıpta Uzmanlık Eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan, “Astımlı yetişkin hastalarda serum Leptin, IFN-gama, IL-4, IL-10, Nitrik Oksit konsantrasyonları ve solunum fonksiyonları arasındaki ilişkiler” başlıklı, Dr.Mustafa YILMAZ’a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/07/2007

Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı
Jüri Başkanı

Doç.Dr. Mustafa ALTINIŞIK
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp
Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı

Doç.Dr. Aslıhan KARUL
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp
Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Üye

Doç.Dr. Leyla Didem KOZACI
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp
Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Üye

Yrd.Doç.Dr. Mukadder SERTER
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp
Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Üye

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Tıpta Uzmanlık Eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan, “Astımlı yetişkin hastalarda serum Leptin, IFN-gama, IL-4, IL-10, Nitrik Oksit konsantrasyonları ve solunum fonksiyonları arasındaki ilişkiler” başlıklı, Dr.Mustafa YILMAZ’a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/07/2007

Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı
Jüri Başkanı

Doç.Dr. Mustafa ALTINIŞIK
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp
Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı

Doç.Dr. Aslıhan KARUL
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp
Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Üye

Doç.Dr. Leyla Didem KOZACI
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp
Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Üye

Yrd.Doç.Dr. Mukadder SERTER
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp
Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Üye