

T.C  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇAN AKCİĞERİNDE BLEOMİSİN İLE OLUŞTURULAN  
FİBROZİSTE OKSİDAN/ANTIOKSİDAN SİSTEMİN ROLÜ VE  
ERDOSTEİNİN FİBROZİS ÜZERİNE ETKİSİ

111878

DOKTORA TEZİ

111878

*Dr. Sadık SÖĞÜT*

Biyokimya Anabilim Dalı

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Tez Danışmanı

*Doç. Dr. İsmail TEMEL*

MALATYA

2002

T.C  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇAN AKCİĞERİNDE BLEOMİSİN İLE OLUŞTURULAN  
FİBROZİSTE OKSİDAN/ANTIOKSİDAN SİSTEMİN ROLÜ  
VE ERDOSTEİNİN FİBROZİS ÜZERİNE ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

*Dr. Sadık SÖĞÜT*

Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

*Doç. Dr. İsmail TEMEL*

MALATYA

2002

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

İş bu çalışma, Jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### İMZA

Başkan Prof.Dr. Rıza DURMAZ

Üye/Danışman Doç.Dr. İsmail TEMEL

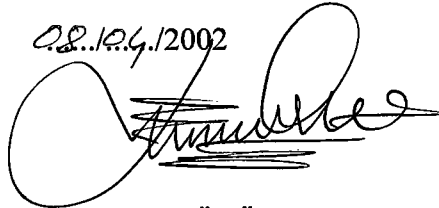
Üye Doç.Dr. Necip İLHAN

Üye Doç.Dr. Zeki YILDIRIM

Üye Doç.Dr. Ömer AKYOL

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

08.12.4.2002



Prof.Dr. Engin M. GÖZÜKARA  
Enstitü Müdürü

<b>1.</b>	<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
2.1.	Akciğerlerin anatomisi ve histolojisi	4
2.2.	İnterstisyel akciğer hastalıkları/pulmoner fibrozis	6
2.2.1.	Pulmoner fibrozis mekanizması	6
2.2.2.	Pulmoner fibrozis nedenleri	9
2.2.3.	Pulmoner fibrozis tedavisi	10
2.3.	Reaktif oksijen türleri (ROS)	11
2.3.1.	Reaktif oksijen türlerinin oluşum mekanizmaları	12
2.3.2.	Reaktif oksijen türlerinin biyolojik sistemlere etkileri ve lipit peroksidasyonu	13
2.3.3.	Oksidatif stresle oluşan hasarı engelleme mekanizmaları	14
2.4.	Erdosteinin yapısı ve özellikleri	15
2.5.	E vitamini (E vit)'nin yapısı ve özellikleri	20
2.6.	Bleomisin (BLM)'in yapısı ve özellikleri	22
<b>3.</b>	<b>MATERYAL VE METOT</b>	<b>25</b>
3.1.	Deney hayvanlarının temini ve deneylere hazırlanması	25
3.2.	Deney gruplarının oluşturulması	25
3.3.	Cerrahi girişimler ve BLM ile fibrozis oluşturulması	26
3.4.	Bikarbonat uygulanması	26
3.5.	E vitamini uygulanması	27
3.6.	Kullanılan aletler	27
3.7.	Akciğer doku homojenizasyonu, süpernatant ve ekstraktların hazırlanması	27
3.8.	Biyokimyasal testler	28
3.8.1.	Homojenat, süpernatant ve ekstrakt nünunelerinde protein miktarlarının tespiti	28
3.8.2.	Akciğer dokusu hidroksiprolin (OH-P) miktarlarının tespiti	29
3.8.3.	Akciğer dokusu süperoksit dismutaz (SOD) aktivite tespiti	31
3.8.4.	Akciğer dokusu glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivite tespiti	32
3.8.5.	Akciğer dokusu malondialdehit (MDA) seviyesi tespiti	33

3.8.6.	Akciğer dokusu myeloperoksidaz (MPO) aktivite tespiti	34
3.9.	İstatistiksel analizler	34
4.	<b>BULGULAR</b>	35
4.1.	Akciğer dokusu OH-P miktarları	36
4.2.	Akciğer dokusu SOD aktiviteleri	37
4.3.	Akciğer dokusu GSH-Px aktiviteleri	38
4.4.	Akciğer dokusu MDA miktarları	39
4.5.	Akciğer dokusu MPO aktiviteleri	40
5.	<b>TARTIŞMA</b>	42
6.	<b>ÖZET</b>	58
7.	<b>SUMMARY</b>	60
8.	<b>KAYNAKLAR</b>	62
9.	<b>TEŞEKKÜR</b>	



## **KISALTMALAR**

BAL:	Bronkoalveoler lavaj
BLM:	Bleomisin
CAT:	Katalaz
C vit:	C vitamini
EC:	Enzim kodu
ER:	Endoplazmik retikulum
E vit:	E vitamini
GRd:	Glutatyon redüktaz
GSH:	Redükte glutatyon
GSH-Px:	Glutatyon peroksidaz
GSSG:	Okside glutatyon
GST:	Glutatyon-S-transferaz
HOCI:	Hipokloröz asit
I/R:	İskemi-reperfüzyon
İL:	İnterlökin
i.p.:	İntraperitoneal
i.t.:	İntratrakeal
İPF:	İdiopatik pulmoner fibrozis
L:	Lipit radikali
LOOH:	Lipit hidroperoksit
MDA:	Malondialdehit
MPO:	Myeloperoksidaz
NADPH:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF-kB:	Nükleer transkripsiyon faktör kappa B
NO:	Nitrik oksit
<sup>1</sup> O <sub>2</sub> :	Singlet oksijen
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> :	Süperoksit radikali
·OH :	Hidroksil radikali
OH-P:	Hidroksiprolin
ONOO <sup>-</sup> :	Peroksi nitrit
PBS:	Phosphate buffered saline
PMA:	Forbol miristat asetat
PUFAs:	Poliansatüre yağ asiti
R <sup>·</sup> :	Karbon merkezli radikaller
RDS:	Respiratuar distres sendrom
RO <sup>·</sup> :	Alkoksil radikali
ROO <sup>·</sup> :	Peroksil radikali
ROS:	Reaktif oksijen türleri
SOD:	Süperoksit dismutaz
TBA:	Tiobarbutirik asit
TBARS:	Tiobarbütirik asit reaktif substans
TGF-β:	Transformasyon oluşturuucu büyüme faktörü beta
TNF:	Tümör nekrozis faktör
XO:	Ksantin oksidaz

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bleomisin (BLM) bazı lenfoma türleri, germ hücre tümörleri, baş ve boyun kanserleri gibi birçok malignenside kemoterapötik ajan olarak kullanılan sitotoksik bir antibiyotiktir. Uzun yıllar boyunca bu tür ilaçların istenmeyen yan etkilerinin hangi moleküler mekanizma ile meydana geldiği araştırılmıştır.

Tedavi amacıyla BLM kullanıldığında en çok deri ve akciğerde konsantre olduğu görülmüştür. Bu nedenle bu antikanserojen antibiyotiğin yan etkisinin en sık olarak görüldüğü yerler de bu organlardır. Transformasyon oluşturucu büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ ), tümör nekrozis faktör (TNF), interlökin 1 (İL-1), İL-5, İL-6, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve kemokinlerin çoğunluğu dahil olmak üzere birçok sitokin BLM'nin oluşturduğu hasarın patogenezinde sorumlu tutulmuştur. Bunların dışında vücudun savunma sistemlerinin harekete geçmesi sebebiyle bir çok hücrenin bu hasara katkıda bulunduğunu ispatlamaya çalışan oldukça fazla sayıda araştırma vardır. Bu hasarın, inflamasyonun ve sitokin miktarındaki değişimlerin etkisi sonucu fibroblastlar ve miyelo-fibroblastlar aktive olurlar, sonuç olarak kollajen yıkımı azalırken yapımı büyük oranda artar ve fibrozis gelişir. Bu son veriler bilim adamlarının deliller sunarak fibrozisin patogenezinin açıklanmaya çalışıldığı en somut verilerdir.

Serbest oksijen radikalleri veya reaktif oksijen türleri (ROS) birçok hastalığın patogenezinde rolü olduğuna inanılan ve endojen olarak vücutta sentez edilen metabolik yan ürünlerdir. Bu ürünler sentez edildikleri yerde hemen detoksifiye edilmezlerse zararlı etki oluşturabilirler. İki şekilde bu oksijen radikallerinin artması söz konusu olabilmektedir: Bu radikallerin aşırı üretilmesi veya normal olarak üretilmiş bulunan radikallerin detoksifikasyonunda yani ortamdan uzaklaştırılmasında bir yetersizliğin bulunması. BLM'nin oluşturduğu inflamatuvar değişimler sonucu ortama göç eden inflamatuvar hücrelerden birçok oksijen metabolitinin salındığı ve deoksiribonükleik asit (DNA) kırıkları dahil olmak üzere birçok yapısal ve fonksiyonel bozuklukların ortaya çıktığı da son zamanlarda BLM toksisitesi hakkında bildirilen gelişmelerdir. Bütün bu çalışmalara rağmen hasarın mekanizması henüz tam açıklanabilmiş değildir.

Bu çalışmada hedeflediğimiz amaçlardan biri bu hasar mekanizmasını aydınlatmaya katkıda bulunacak bazı verileri elde edebilmektir. BLM'nin etkileri gözönüne alındığında, hücre içinde oluşturduğu değişiklikler, örneğin DNA kırıkları, serbest radikallerin etkilerine çok fazla benzemektedir. Dolayısıyla bu etkiden yola çıkarak, BLM'nin serbest radikal üretimini tetiklemiş olabileceği veya antioksidan enzimlerin aktivitelerini değiştirebileceği akla gelmektedir. Yukarıda bahsedildiği gibi her iki durumda da hücresel yapılar ve dokular hasara açık duruma gelmektedir.

Son on yıl içinde bazı akciğer hastalıklarının tedavisi için geliştirilmiş bir preparat olan erdosteine (dithiostein, RV 144, N-carboxymethylthioacetyl-homocystein olarak adlandırılmaktadır) mukolitik ilaçlar arasında sınıflandırılır. Erdosteine, bronşiyal mukus salgısını seyreltici ve ekspektoran özelliği yanında, hem serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek hem de elastaz enziminin aktivitesini inhibe ederek etki gösterir. Bu kimyasal bileşiğin farelerde ve tavşanlarda havayolu salgularını artırdığı, insanlarda da sigara ile meydana gelen  $\alpha$ 1-antitripsin (AAT)'in inaktivasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Bu ajan uygun yollarla vücuda alındığında hemen aktif bir metaboliti olan N-thioglycolylhomocysteine (Met 1) haline çevrilmektedir. Bu metabolitin, ilacın mukokinetik ve mukolitik özelliklerinden sorumlu olduğu iddia edilmektedir. Met 1'in yapısında birçok antioksidan karakterli maddeyle birlikte asıl antioksidan özellikleri taşıyan sülfidril (-SH) grubu bulunmaktadır. Bu bakımdan son birkaç yılda erdosteine'nin antioksidan özellikleriyle ilgili hem insan kaynaklı, hem de deney hayvanları üzerinde birçok araştırma yapılmıştır.

Yaptığımız araştırmalarda erdosteine'nin özellikle BLM kaynaklı olmak üzere akciğer fibrozisi üzerine etkisi hakkında fazla çalışmaya rastlayamadık. Yukarıda da detaylı şekilde bahsedildiği gibi BLM'nin fibrozis yan etkisi muhtemelen serbest oksijen radikallerine bağlı olarak geliştiği için akciğer hastalıklarında rahatlıkla uygulanan ve antioksidan özelliği gösterilmiş bulunan erdosteine'nin bu fibrozisin yavaşlatılması veya önlenmesinde etkili bir rol oynayabileceği düşünüldü. Böylece bu çalışmada amaçlanan hedefler sırasıyla aşağıda belirtilmiştir:

1. Sıçanlarda BLM'nin intratrakeal (i.t.) uygulanması ile fibrozis oluşturmak, bu fibrozisin başarılı bir şekilde oluşturulup oluşturulmadığını kollajen proteinin esas bileşenlerinden biri olan hidroksiprolinin (OH-P) doku seviyeleri ile göstermek.



2. ROS'un fibrozis gelişimindeki rolünü ortaya koyabilmek, serbest oksijen radikallerini süpürücü fonksiyon gösteren süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini ölçmek.

3. Lipid peroksidasyonunun endojen bir metaboliti olan malondialdehit (MDA) miktarını ölçerek oluşan doku hasarını direkt olarak göstermek.

4. Doku seviyesinde polimorfonükleer lökositler (PMNL)'in invazyonunu ortaya koyabilmek amacı ile myeloperoksidaz (MPO) aktivitelerini ölçmek.

5. Bir deney grubuna erdosteine vererek fibrozis gelişimini yavaşlatma veya önlemedeki etkisini makroskopik ve biyokimyasal düzeyde incelemek. Diğer bir gruba E vitamini (E vit) vererek etkisini erdosteine ile karşılaştırmak.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Akciğerlerin anatomisi ve histolojisi

Solunum sistemi akciğerler ile akciğerlere havayı ulaştıran yollardan oluşan bir sistemdir. Solunum sistemi vücut için hayati önemi olan üç önemli görevi yerine getirmektedir. Bunlar:

1. Burun yoluyla alınan havanın akciğerlere kadar taşınması.
2. Bu taşıma işlemi esnasında havanın filtre edilmesi.
3. Akciğerlere ulaşan hava ile kan arasındaki gaz alışverişinin gerçekleştirilmesidir (1,2).

Akciğerler ile akciğerleri dış ortama bağlayan tübüler yapılardan oluşan solunum sistemi ana fonksiyonları göz önüne alınarak iki bölüme ayrılır.

**a) İletici bölüm;** havayı akciğer alveollerine kadar ileten bölümdür. Burun, farinks, larinks, trakea, bronş ve respiratuar bronşiollelere kadar olan bronşiollelerden oluşur. Basit bir hava pasajı olmayıp havanın ısınması, nemlendirilmesi, yabancı maddelerden temizlenmesi (siller, mukus ve lenfositler aracılığıyla) gibi işlemler bu geçiş sırasında yapılır (1,3).

**b) Solunum (respiratuar) bölümü;** kan ile solunan hava arasındaki karbondioksit ve oksijen alışverişinin gerçekleştiği bölümdür. Respiratuar bronşiolleler, duktus alveolaris, sakkus alveolaris ve alveollerden oluşur. Gaz alışverişi alveollerde gerçekleşmektedir (1,3).

**Nazal kavite:** Kemik ve kıkırdaktan oluşan bir septum ile ikiye ayrılan bir çift boşluktur. Bu bölge koku duyusunun alınması ile ilgili reseptörleri içeren hücrelerle kaplıdır (2,3).

**Farinks:** Nazal, oral ve laringeal kısımları vardır. Nazofarinks respiratuar epitelle (yalancı çok katlı kinosilyalı goblet hücreli prizmatik) döşelidir. Orofarinks ve laringofarinks çok katlı yassı nonkeratinize epitelle döşelidir (1,4).

**Larinks:** Farinks ve trakea arasında yer alır. Duvarında hiyalin ve elastik kıkırdaklar, bağ dokusu, çizgili kas ve müköz bezler görülür. Kıkırdaklar hava yolunun açıklığını ve biçimini korur (1,3)

**Trakea ve bronşlar:** Larinks bazalinden primer bronşların başlangıcına kadar uzanan yaklaşık 20 cm uzunluğunda esnek hava iletici bir organdır. Trakea iki primer bronşa ayrılır. Primer bronşların yapısı trakeaya benzer. Ekstrapulmoner ana bronşlar, akciğerlere hilumdan pulmoner arterler ile birlikte girerler ve akciğer loblarına giden lobar bronşlara (sekonder bronşlar) ayrılırlar. Beş lobar bronşun her biri segmental bronşlara (tersiyer bronş), segmenter bronşlar da bronşiolle dallanır. Trakea ve bronş lümeni solunum epiteli ile döşelidir.

**Alveoller:** Alveoller, gaz değişiminin yapıldığı hava keseleridir. Respiratuar bronşiolle, alveol kanalları ve alveol keselerinde bulunan yaklaşık 200 mikrometre çapında kese şeklinde oluşumlardır. Yapısal olarak alveoller arı kovanında bulunan petekler gibi tek tarafı açık küçük ceplere benzer. Bu kadeh biçimindeki yapılarda hava ile kan arasındaki gaz değişimi gerçekleşir. Alveol duvarının yapısı dış ve iç ortam arasında diffüzyonu artıracak şekilde özelleşmiştir. Genelde her duvar iki komşu alveol arasında yer alır ve bu yapı interalveoler septum olarak adlandırılır. Komşu alveoller arasında iletişime izin veren Kohn delikleri bulunur (3,4,5). İnteralveoler septum iki ince tek katlı yassı epitel ve bunların arasında kapillerler, fibroblastlar, mast hücreleri, elastik ve kollajen lifler ile makrofajları içerir. Bu septum içindeki kapillerler ile bağ dokusu matriksi interstisyumu oluşturur. Bu interstisyumda organizmanın en zengin kapiller ağı yer alır. Alveollerdeki hava ile kapiller kan arasında ilişkiyi düzenleyen ve kan hava bariyeri olarak adlandırılan özel bir fonksiyonel yapı mevcuttur. Kan hava bariyerini meydana getiren yapılar 4 kısımda incelenir:

1. Alveol iç yüzeyini döşeyen sürfaktan tabakası.
2. Tip 1 pnömositin sitoplazması.
3. Tip 1 pnömosit ve kapiller endotelinin birleşmiş bazal laminası.
4. Kapiller endotel hücrelerinin sitoplazması (3,4).

Kan hava bariyerinin kalınlığı ortalama 0.2-0.5 mikrometre kadardır. Alveollerin yüzeyinde tip 1, tip 2 pnömositler ve alveoler makrofajlar görülür.

**Tip 1 pnömositler:** Alveol yüzeyinin yaklaşık % 95'ini döşeyen bu hücreler son derece ince ve yassı olup, birbirleriyle sıkı bağlantı kompleksleri ile bağlanırlar. Bu sıkı bağlantı kompleksleri hava ile alveoler septumda yer alan kapillerler arasında sağlam bir bariyer oluşturur. Bölünme yetenekleri yoktur (4,6).

**Tip 2 pnömositler (septal hücreler):** Tip 2 pnömositler tip 1 pnömositler arasına serpilmiş olarak bulunurlar. Yuvarlak veya kübik şekilli olabilen salgı hücreleridir. Sitoplazmaları mitokondri, granüllü ve düz endoplazmik retikulumdan zengindir. Hücrenin apikal sitoplazmasında salgı granülleri izlenir. Fosfolipit, protein ve glikozaminoglikanlardan meydana gelen salgı granülleri multilameller cisimciklere dönüşürler. Daha sonra hücre dışına salgılanarak lameller içerikleri tüm alveol iç yüzeyine yayılır ve sürfaktana dönüşür. Sürfaktan alveol yüzey gerilimini azaltır. Böylece ekspirasyon sırasında alveollerin kollabe olmasına engel olur. Aynı zamanda sürfaktan alveollere kadar ulaşabilen küçük partiküllerin tutulmasına ve alveoler makrofajlar tarafından ortadan kaldırılmasına yardımcı olur (1,3,4). Bölünme yeteneğine sahip olan bu hücrelerin Tip 1 pnömositleri oluşturdukları da bilinmektedir (3).

**Alveoler makrofajlar:** Fagositoz yeteneğine sahip olan kemik iliği kökenli monositlerdir. Çok iyi gelişmiş Golgi kompleksleri ve çok miktarda primer ve sekonder lizozomları olan hücrelerdir. Bu hücreler interalveoler septumlar arasında serbest olarak hareket ederler ve solunan havadaki tozları, karbon içeren maddeleri ve bakterileri fagosite ederler. Bu makrofajlar Toz hücreleri (Dust hücreleri) olarak da adlandırılırlar (1,3).

Bağ dokusunda ayrıca, fibroblastlar, mast hücreleri ve kontraktıl hücreleri bulunur. Fibroblastlar kollajen, elastik fibril ve ara maddeyi sentezler. Kollajen parankimal kitlenin %15-20'sini oluşturur. Akciğerlerde pek çok hastalıkta kollajen miktarı artar (Akciğer fibrozisi ile birlikte 100'den fazla hastalık bilinmektedir) (1).

## **2.2. İnterstisyel akciğer hastalıkları/pulmoner fibrozis**

### **2.2.1. Pulmoner fibrozis mekanizması**

İlk ölümle sonuçlanan ilerleyici pulmoner fibrozis vakası yaklaşık 70 yıl önce Hamman ve Rich tarafından tanımlanmıştır. Sonra değişik derecelerde pulmoner fibrozisli akut ve kronik akciğer bozuklukları tanımlanmış olup, çoğunlukla interstisyel akciğer hastalıkları (İAH) olarak bahsedilmiştir. Daha sonra interstisyum; epitelyal ve endotelyal hücrelerin bazal membranı tarafından sınırlanan mikroskopik anatomik alan olarak tanımlanmış sonra akciğer hastalıklarının bu heterojen grubu için diffüz parankimal akciğer hastalıkları ifadesi çok daha uygun ve tanımlayıcı olarak kullanılmıştır. Bu interstisyel alan içinde, fibroblast benzeri hücreler

(mezenşimal ve bağ dokusu hücreleri) ve ekstrasellüler matriks komponentleri (interstisyel kollajenler, elastin, proteoglikanlar) bulunur. Hastalığın sadece interstisyumla sınırlı olmadığı; epitelyal, endotelyal ve mezenşimal hücreler, makrofajlar ve inflamatuvar hücrelerin toplanması, salgılanan proteinler ve alveoler duvarların içine matriks komponentlerinin sızması gibi nedenlerle açıktır. İlave olarak hastalık süreci alveoler boşluk, asini, bronş lümeni ve bronşiollelerin içine kadar uzar. Bazı hastalarda irreversibl pulmoner fibrozise eşlik eden alveoler duvar, hava boşluğu ve terminal bronşiollelerin inflamasyonu ilk cevaptır. Böylece İAH'de pulmoner parankimin hepsi etkilenir. Bu farklılıklara rağmen bu hastalıklar birbirleri ile çok yakın ilişkili olduğu için İAH terimi kullanılmaya devam edilmiştir (7,8).

Pulmoner fibrozisin temelinde henüz açığa kavuşturulamamış bir çok faktör vardır. Anormal akciğer fizyolojisi ve kollajen, elastin, proteoglikan gibi birçok matriks moleküllerinin aşırı üretimi ile karakterizedir (9). BLM ile oluşturulan akciğer fibrozis modeli hastalığın aşamalarını ve akciğer yapısı ile fonksiyonunu açığa kavuşturmak için kullanılan en önemli modeldir. Kollajen ve elastinin dokudaki artışının gösterilmesinden başka son yıllarda araştırmacılar matriksin temel yapısındaki değişikliklere yönelmişlerdir. Bu temel madde yaygın olarak bir glikozaminoglikan yan zincirine sahip protein çekirdeğini içeren makromoleküller olan proteoglikanlardan oluşmaktadır. Bu proteoglikanlar birçok biyolojik fonksiyonu karşılarlar: Mekanik davranışı etkilemek, kollajen lif formasyonunu ve organizasyonunu etkilemek, hücre göçünü modüle etmek ve birçok sitokinler ve büyüme faktörleri ile etkileşmek (10). Yapılan bazı araştırmaların verilerine göre bu moleküller fibrotik akciğer hastalıklarında değişmektedir. Granüloamatöz ve granüloamatöz olmayan insan pulmoner fibrozisinde akciğer interstisyumunda proteoglikan versikan yapılarının arttığı bulunmuştur (9,11). Diğer bazı çalışmalarda fibrotik süreçlerin erken safhalarında hem bir mesaj hem de bir protein ekspresyonu görevi gören fibromodülin dekorin ve biglikan gibi küçük proteoglikanların değiştiği bulunmuştur (12).

Pulmoner fibrozis daha çok akciğerlerin inflamasyon durumlarında ortaya çıkan ilerleyici kollajen depolarının bozukluğu ile karakterize bir hastalıktır. Kollajen dışında diğer ekstrasellüler matriks proteinlerinin de akciğer parankiminde depo edildiği bilinmektedir. İnflamatuvar süreç ve ardından gelişen artmış kollajen

depolanması akciğer veriminin şiddetle düşmesine, pulmoner fonksiyonların bozulmasına, gaz değişiminin azalmasına ve sonuç olarak respiratuar yetmezliğe neden olur. İdiyopatik pulmoner fibrozisin (İPF) sebebi tam olarak bilinmezken BLM gibi bazı ajanların hayvan ve insan akciğerinde benzer mekanizmalarla pulmoner fibrozis oluşturduğu gösterilmiştir.

Hayvan çalışmalarında fibrotik değişim olduktan sonra erken ve geç safhalarda normale göre kollajen tipinde bir değişme meydana gelmektedir. Sıçanlara i.t. BLM verildikten sonra tip I kollajenin yapımı geçici olarak artar. Normal şartlarda tip III kollajen yapılması gerekirken bu uyumla tip I kollajen sentezlenir (13). Total akciğer kollajen içeriği uygulamanın yapılmasından 14 gün sonra belirgin olarak artar ve tüm akciğerin kollajen içeriği 8 hafta yüksek seviyede kalır. Akciğer kollajen içeriğinde 14 günde oluşan kollajen artışı büyük oranda tip I kollajen birikmesine bağlıdır. Bunun yanında BLM uygulanması tip III kollajen sentezinde de artış meydana getirir (14). Hayvan çalışmalarında tip I/tip II oranı incelendiğinde tipik olarak BLM ile oluşturulan fibroziste bu oranın arttığı görülmüştür. Yetişkin respiratuar distress sendromlu (RDS), İPF'li, sarkoidozlu ve infant RDS'li hastalarda yapılan çalışmalarda akciğer parankiminde tip III kollajen miktarı başlangıçta rölatif olarak artmıştır (15). Diğer bazı çalışmalarda bu hastaların bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvısı ve serumlarında N-terminal tip III prokollajen peptit miktarında artış tespit edilmiştir. Bu da göstermiştir ki fibrotik akciğer hastalıklarında tip III kollajen sentezi de artmaktadır (16,17).

Fibrozis sürecinde akciğer hasarından sonra bağ dokusu sentezinde artma olurken aynı zamanda bu olayların hemen öncesinde alveollerle beraber interstisyumda yoğun bir şekilde inflamatuvar hücre infiltrasyonu görülmektedir (18). İnflamatuvar hücrelerin ortama göç etmeleri ile birlikte açığa çıkan uyarılarla alveoler makrofajlar aktive olur ve İL-1, İL-5 ve TNF- $\alpha$ , İnsülin büyüme faktörü 1, Trombosit kaynaklı büyüme faktörü, TGF- $\beta$  gibi birçok fibrojenik ve proinflamatuvar sitokinler açığa çıkar (19,20). Bu sitokinlerden TGF- $\beta$ 1 inflamasyon ve bağ doku sentezinin patogenezinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu bileşik aynı zamanda diğer fibrojenik sitokinleri regüle etmektedir (21). İPF ve asbestoziste alveoler makrofajlar ve/veya monositlerde İL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$ 'nın gen ekspresyonlarının aşırı derecede arttığı ve bu iki sitokinin fibrozis patogenezinde anahtar bir rol oynadığı

savunulmuştur (22). Bunların yanında insan ve eksperimental çalışmalarda alveol makrofajlarında İL-6 salınımının arttığı ve bununla pulmoner fibrozisi hızlandırdığı gösterilmiştir (23). Fibrozisi önlemeye yönelik çalışmalarda TNF- $\alpha$  antikörlerinin (24) ve rekombinant insan soluble TNF- $\alpha$  reseptörlerinin (25) BLM kaynaklı pulmoner toksisite ve fibrozisi önlediği gösterilmiştir. Bu önleyici maddelerin bulunmadığı fare çalışmalarında TNF- $\alpha$  mRNA düzeyinin aşırı şekilde arttığı bulunmuştur.

Epidemiyoloji: Gerçekte İAH'nin popülasyondaki epidemiyolojisi çok az bilinir. Son çalışmalar İAH'nin insidansının daha önceye göre daha sık olduğunu göstermiştir. Özellikle yılda 100.000'de 3-26 insidanda görülür. Bunların içinde İPF en çok görülenidir, %30'unu içerir. Preklinik ve teşhis edilmemiş İAH'lerin oranının klinik tanı konmuş hastalardan on kat daha fazla olduğu tahmin ediliyor (26).

### **2.2.2. İnterstisyel akciğer hastalıkları/ pulmoner fibrozis nedenleri**

İnterstisyel akciğer hastalıklarının akut ve kronik heterojen grupları 6 ana grupta kategorize edilebilir (27).

I. Kollajen Vasküler/bağ dokusu hastalıkları ve pulmoner-renal sendromlar

II. İnhalasyon nedenleri

1. Mesleki (inorganik ve organik tozlar)
2. Çevresel (ev içi dahil)
3. Gazlar, dumanlar, buharlar, aerosoller
4. Hobiler, kuşlar, ev hayvanları

III. Bazı spesifik antiteler

1. Bronşiolitis obliterans (organize pnömonili veya pnömonisiz)
2. Eosinofilik pnomoni
3. İyatrojenik I. a) ilaçlar; b) kemoterapötik ajanlar (BLM, Mitomisin-C, Aktinomisin-D) c) amiyodarone, nitrofurantoin II. Radyasyon
4. Lenfanjiyoleiomyomatozis
5. Respiratuar bronşiyolit
6. Alveoler proteinozis
7. Veno-okluzif hastalıklar
8. Lenfanşitik karsinomatozis
9. İdiyopatik pulmoner hemosiderozis

#### IV. Granülomatoz hastalıklar

1. Bilinmeyen nedenler (örneğin sarkoidoz, histiositozis X gibi)
2. Bilinen nedenler (örneğin hipersensitivite pnömonitis, bazı inhalasyon nedenleri ve ilaçlar)

#### V. Kalıtsal nedenler

1. Familyal (İPF, sarkoidoz)
2. Tuberoz sklerozis
3. Hermansky-Pudlak sendromu
4. Nörofibromatozis
5. Hipokalsiürik hiperkalsemi

#### VI. İdiyopatik pulmoner fibrozis (İPF)

##### 2.2.3. Pulmoner fibrozis tedavisi

Oksidanlar fibroproliferatif cevaba yol açan akciğer hasarında önemli bir rol oynar. İPF’de makrofajlar ve nötrofillerin artması ile inflamatuvar süreç oldukça hızlanır. Bu hücreler hem BAL sıvısında hem de alveol yapısında ROS salgılayarak fibrozis oluşturur. Bu açıdan lipozoma hapsedilmiş katalaz ve N-asetilsistein gibi antioksidanların kullanılması tedavide kural olarak kabul edilmektedir.

Antioksidan tedavi aynı zamanda hücreleri koruyucu enzimlerin aktif merkezinde bulunan sülfidril grupları ve diğer aktif grupların inaktive edilmesini engelleyerek de etki gösterir. Fibrozis oluşumunu engellemede en etkili antioksidanlar SOD, katalaz (CAT) ve glutatyondur. Oksidanlar akut faz reaktan proteinlerinden bir kısmının gen ekspresyonunu 10-40 kat artırır (28). Bunun en önemli örneklerinden biri ısı şok proteinleridir. Bu tip *in vivo* olarak sentez edilen proteinlerin de fibrozis sürecinde koruyucu fonksiyon görebileceği düşünülebilir.

Bazı çalışmalarda CAT, Mn-SOD ve GSH-Px kombine halde veya ayrı ayrı verilerek, ayrıca glutatyon-S transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GRd) genleri upregüle edilerek NAD(P)H tedavi protokolleri geliştirilmiştir.

Akciğerdeki sürfaktan seviyesinin uygun düzeye çekilmesi de normal akciğer homeostazisinin sağlanması için gerekli tedavi protokollerinden biridir (29). Antiproteinazların tedaviye eklenmesi özellikle BLM kaynaklı fibrozisin durdurulması için başvuru tedavi yöntemlerinden biridir (30). Bu antiproteinazlar proteinaz aktivitesini fizyolojik koşullarda olması gereken seviyede tuttukları için



aşırı matriks yıkılımını engelleyerek hücre ve organ disfonksiyonunun önüne geçerler.

Kortikosteroidler son 30 yıldır İPF'nin tedavisinde kullanılmaktadır. Hastaların ancak %10-30'u tedaviye cevap vermekte ve tam remisyon nadiren sağlanabilmektedir (31). Diğer taraftan steroide cevap vermeyen hastalarda veya kortikosteroid komplikasyonları açısından yüksek risk taşıyan (70 yaş üzeri, kontrol edilmemiş diabetes mellitus veya hipertansiyon, şiddetli osteoporoz veya peptik ülser hastalığı) hastalarda immüno supresif veya sitotoksik ajanlar (azatiyopirin veya siklofosfamid) mutlaka göz önüne alınmalıdır. %15-50 vakada bu iki ajanın etkinliği görülmüştür (32).

Son olarak antifibrotik ajanlar (kolşisin) (33) ve penisilamin (34) kollajen sentez veya fibröz inhibitörü olarak kullanılmaktadır.

### **2.3. Reaktif oksijen türleri (ROS)**

Serbest radikaller terimi bir çiftlenmemiş elektron içeren molekül ve iyonlar için kullanılır. ROS'lar taşıdıkları bir veya daha fazla çiftlenmemiş elektron ile kazandıkları özellikler sayesinde biyolojik sistemlerde önemli rol oynamaktadırlar.

En önemli ROS kaynağı mitokondri ve endoplazmik retikulum (ER)'dur. Mitokondride NADPH ve FADH<sub>2</sub>'nin indirgenmesi sırasında radikal üretimi gerçekleşebilir (35). ER'de sitokrom p450 reaksiyonu esnasında NADPH kullanılır. Bu sistem moleküllere bir elektron ilave ederek veya çıkartarak ROS oluşturur (36). Bazı kimyasal ajanlar redoks döngüsünü kullanarak p450 gerektirmeden radikal oluşturabilirler. BLM böyle bir reaksiyon ile bir çiftlenmemiş elektron kazanma eğilimindedir (37). Oluşan radikal kolayca oksijenle oksitlenir ve süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) oluşur. Serbest radikaller bu aşamadan sonra redoks döngüsüyle hidroksil radikali (OH) üretme eğilimindedir. Böylece ilave bir ROS üretimi ileri bir hücre hasarına yol açabilir (35,38).

Hücrel mekanizmaların yanında özellikle birçok patolojik olayların da serbest radikallere kaynaklık yaptığını görmekteyiz. Böbrek (39), karaciğer (40), kalp (41) gibi birçok organın iskemi reperfüzyon (I/R) hasarında değişik mekanizmalar ile ROS oluştuğu gösterilmiştir. İçerisinde yer alan ksenobiyotikler, aromatik hidrokarbonlar ve yüksek konsantrasyonda okside nitrojen ile sigara ROS

oluşmasında önemli bir kaynaktır (42). BLM gibi antineoplastik ajanlar ROS üretimi ile DNA hasarına yol açmaktadır (37).

### 2.3.1. Reaktif oksijen türlerinin oluşum mekanizmaları

Normal fizyolojik koşullarda  $O_2^{\cdot-}$ , hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ) ve  $H_2O_2$  aerobik metabolizmanın ürünleri olarak sürekli üretilir. Solunum zincirine giren oksijenin %1-5 kadarı ROS üretimine yönelir (35,36). Yarılanma ömrü kısa olan  $O_2^{\cdot-}$  moleküler oksijene ekstra bir elektron bağlanması ile meydana gelir.  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$  dismutasyon reaksiyonu ile ya da direkt olarak oksijenin indirgenmesiyle meydana gelir. Fenton reaksiyonu (43,44) ile  $H_2O_2$ ,  $Fe^{+2}$  ( $OCl^-$ ) ya da  $Cu^+$  ile reaksiyona girerek  $\cdot OH$ 'ı oluşturabilir. Demir varlığında Haber-Weiss reaksiyonu ile  $H_2O_2$  ve  $O_2^{\cdot-}$  etkileşerek son derece toksik olan  $\cdot OH$ 'a dönüşür (36,44). Oluşan radikaller içinde en güçlüsü  $\cdot OH$  dır.

Ortamdaki oksijen miktarının artmasıyla  $O_2^{\cdot-}$  ile NO reaksiyona girerek peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) oluşumuna yol açacaktır.  $ONOO^-$  oluşumu ile  $O_2^{\cdot-}$  süpürülür, ancak kendisinde bir radikal olduğundan DNA gibi hücre yapılarına etki edebilir (38).

DNA hasarlarında  $H_2O_2$ 'nin önemli rolü birçok çalışmada gösterilmiş ve ortamdan  $H_2O_2$ 'nin uzaklaştırılmasının hasarı azalttığı bulunmuştur (45).  $H_2O_2$  hücre membranını  $O_2^{\cdot-}$ 'nin aksine kolaylıkla geçer. Fenton reaksiyonu ile  $\cdot OH$ 'ın oluşmasına yol açar veya Haber-Weiss reaksiyonu ile  $\cdot OH$  oluşturur.  $H_2O_2$ 'nin toksik etkilerine kaynaklık eden en önemli mekanizmalar bu iki reaksiyondur. Ortamdaki  $H_2O_2$  fizyolojik koşullarda CAT ve GSH-Px enzimlerinin yardımıyla suya dönüşür. Bu enzimlerin etkinliği hem  $H_2O_2$ 'nin hem de Fenton ya da Haber Weiss reaksiyonları ile oluşabilecek  $\cdot OH$  radikallerinin ortamdan uzaklaştırılmasını ve dokunun korunmasını sağlar (36,38,45).

Hipoklorat ( $HOCl$ ) nötrofil içindeki granüllerde üretilir. Reaksiyon MPO tarafından katalizlenir.  $H_2O_2$  ile  $Cl^-$ 'un reaksiyona girmesiyle  $HOCl$  oluşur. Bu radikal özellikle bakterilere ve funguslara etki ederek savunmada görev alır. Güçlü bir oksidan olan  $HOCl$  inflamatuvar olaylarda görev alarak vücut savunması yanında hasar yapıcı olarak da çalışabilir (46-48).

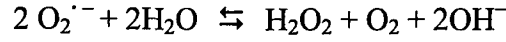
### 2.3.2. Reaktif oksijen türlerinin biyolojik sistemlere etkileri ve lipid peroksidasyonu

Oksijen radikallerinin en önemli hedefleri arasında yer alan çoklu doymamış yağ asitleri (PUFAs) hücrelerin en önemli yapıtaşlarından biridir. Mitokondriden, ER'ye ve hücre membranına kadar birçok hücrenel yapıda yer alırlar. Oksidatif stresin hasar verdiği hedefler arasında PUFAs önemli bir yer tutar. Oksidatif stresin bu etkisinin karşımıza çıkan şekli lipid peroksidasyonudur. Serbest oksijen radikallerinin PUFAs'ın reaktif metilen grubundan bir hidrojen (H) atomu koparmasıyla lipid peroksidasyonu tetiklenir. Bu tetiklemede  $\cdot\text{OH}$ , alkoksil radikali ( $\text{RO}\cdot$ ), peroksil radikali ( $\text{ROO}\cdot$ ) rol oynayabilir. Daha sonraki aşamada oluşan karbon radikalleri kendilerini stabilize etmek için konjuge dienleri oluştururlar. Oksijen konjuge dienlerle girdiği reaksiyon sonucu peroksil radikalinin oluşmasına yol açar (38,49). Peroksil radikali kendisiyle birleşebilir ya da membran proteinlerine atak yapabilir. Ancak peroksil radikalleri ayrıca membranda komşu yağ asidinden hidrojen kopararak zincirleme bir reaksiyon başlatır. Böylece tek bir başlangıç reaksiyonu yüzlerce yağ asidi zincirinin lipid monohidroperoksitlere dönüşümü ile sonuçlanır. Bu olay defalarca tekrarlanır. Bu yayılcı reaksiyonun uzunluğu membrandaki lipid/protein oranına bağlıdır (49).

Lipid hidroperoksidazlar (LOOH) fizyolojik koşullarda stabil moleküllerdir. LOOH'lar geçiş metalleri ve kompleksleriyle reaksiyona girerler. Sonuçta alkoksil radikallerini ( $\text{LO}\cdot$ ) ya da peroksil radikallerini ( $\text{LOO}\cdot$ ) oluştururlar. Lipid peroksidasyon sırasında karbon bağlarının kırılması sonucunda MDA, 4-hidroksinonenal, pentan ve etan gibi bileşiklerin oluşumuna yol açar. MDA protein tiyolleri ile etkileşerek, lipid ve proteinler arasında çapraz köprüler oluşturarak hücre hasarına yol açmaktadır. 4-hidroksinonenal biyolojik olarak çok aktiftir ve trombosit agregasyonunu ve aktive olmuş adenilat siklazı inhibe eder. Ayrıca glutatyon transferaza substrat olur. Pentan ise linoleik ve araşidonik asidin oksidasyonu ile bu mekanizma içerisinde son ürün olarak açığa çıkar. Etan ise linolenik asidin oksidasyonunun son ürünü olarak peroksidasyon sonunda açığa çıkar (49).

### 2.3.3. Oksidatif stresle oluşan hasarı engelleme mekanizmaları

SOD; superoksit anyonunun ortamdaki zararlı etkisini önlemede görev alan önemli bir antioksidan enzimdir. Ancak bu işlemi yaparken daha güçlü bir oksidan olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin üretimini sağlar. SOD enzimi reaksiyonu şu şekilde katalizler (49).



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin zararlı etkilerinden kurtulmak için organizmada yer alan en önemli enzimlerden biri CAT'dır. CAT antioksidan etkisini 2 tane H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekülünü 2 H<sub>2</sub>O ve 1 O<sub>2</sub>'ye dönüştürerek gösterir (38).

GSH-Px, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekülünü ortamdaki uzaklaştıran diğer bir enzimdir. En önemli özelliklerinden birisi selenyum (Se) bağımlı olmasıdır. Aşırı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında redükte glutatyonu (GSH) okside glutatyona (GSSG) dönüştürerek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin suya dönüşmesini sağlar. Böylece H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin doku hasarı yapıcı etkisini engeller (35,38). Normalde dokuda GSH/GSSG oranı yüksektir. Böylece gerek duyulduğunda GSH yoluyla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suya dönüştürülerek GSSG oluşur. Bu yüzden GSH/GSSG oranı oksidatif stresin önemli bir indikatörü olarak kabul edilir (45). Bu oranın korunmasında glutatyon redüktaz (GRd) enziminin önemli yeri vardır. GSH-Px ortamdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi uzaklaştırmak için GSH/GSSG oranını GSSG tarafına kaydırır (38,43). Tekrar dengenin sağlanması için GSSG'nin GSH'a dönüşmesi gerekir. NADPH yardımı ile GRd enzimi bu indirgenme olayında görev alır. NADPH ise glukozun pentoz fosfat metabolik yolunda oksidasyonu sonucu elde edilir (43). Glutatyon S-transferaz (GST) lipid peroksitlere karşı Se bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek etki eder (36).

Pineal bezde üretilen melatonin hormonu güçlü bir antioksidandır. Melatonin 'OH radikalinin etkili bir süpürücüsüdür. Ayrıca melatonin direk süpürme de ikincil olarak O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikalinde tutarak ortamdaki uzaklaştırır. Melatonin hormonu antioksidan enzimler olan SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerini artırarak antioksidan sisteme katkıda bulunur (38).

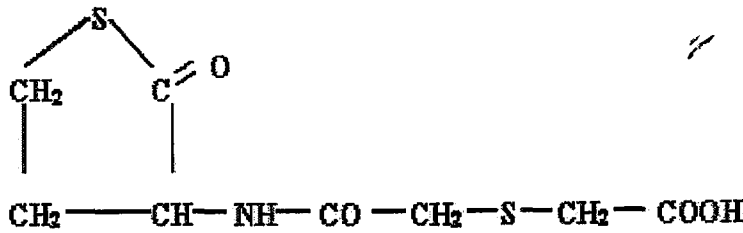
Transferrin, seruloplazmin, albümin, ürik asit, haptoglobülin, bilirubin ve deferoksamin gibi moleküller serbest radikalleri süpürme ya da geçiş metalleri ortamdan uzaklaştırma yoluyla antioksidan özellik gösterirler (48).

Suda eriyen vitaminlerden olan C vitamini (C vit) aynı zamanda önemli bir antioksidan kaynaktır. Radikalleri süpürerek antioksidan etki gösteren C vit redükten olarak görev yapar. Askorbik asit singlet oksijen ( $^1O_2$ ),  $O_2^{\cdot-}$  ve  $\cdot OH$  süpürme yeteneğine sahiptir. Prostetik metal iyonlarını indirgenmiş halde tutar. Aynı zamanda E vit radikali olan tokoferoksil radikalini redüklenmesini sağlar (41).  $\beta$ -karoten de güçlü bir radikal süpürücüdür ve böylelikle lipit peroksidasyonunu engellediği gibi lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını da önleyebilir (41,50). E vit lipitte çözünebilir en etkili antioksidandır.  $\alpha$ -tokoferol E vitamininin en aktif olanlarındandır.  $\alpha$ -tokoferol lipit peroksidasyonunu inhibe ederek doku hasarını engeller. Radikaller ile reaksiyona girerek daha az aktif olan tokoferoksil radikalini oluşturur. Oluşan bu radikal de C vit tarafından süpürülür (41).

#### 2.4. Erdosteinin yapısı ve özellikleri

Klinikte mukolitik ve ekspektoran özelliği dolayısıyla oral olarak yaygın bir şekilde kullanılan erdosteinin bazı özellikleri aşağıda sıralanmıştır (51).

**Fizikokimyasal özellikleri:** Erdostein doğal bir amino asit olan homosisteinin bir formu olup bu amino asitin N-tiolaktonik şeklidir. Kimyasal adı N-(karboksimetil tioasetil) homosistein tiolaktondur. Kimyasal kapalı formülü  $C_8H_{11}O_4N_1S_2$ 'dir. Kimyasal yapısı aşağıda görüldüğü gibidir.



Beyaz mikro kristalli acı ve renksiz toz görünümündedir. Değişik maddeler içindeki çözünürlükleri aşağıda verilmiştir:

Su: 3.55 mg/ml; metanol: 10.71 mg/ml; etanol: 3.79 mg/ml; aseton: 5.34 mg/ml; kloroform: 0.52 mg/ml; eter: 0.09 mg/ml; metilenklorür: 0.19 mg/ml'dir. Erime sıcaklığı 154-155 °C' dir.

**Farmakolojik özellikleri:** Erdosteine mukolitik tipte mukus modifiye edici orijinal maddelerden biridir. Bronşiyal mukozaların sekresyonları üzerine sulandırıcı aktivitesi esas olarak absorpsiyondan sonra transformasyona uğrayarak aktif metabolitlerine dönüşmesine bağlıdır. En son aktif metabolitler serbest -SH radikalleri taşımaktadır. Bu radikaller glikoproteinlerin birbirine bağlandıkları disülfid köprülerine bağlanarak kırılmasını sağlarlar. Böylece mukus elastikliğinde ve vizkozitesinde azalma oluşturarak ekspektoran etki gösterir. Metabolize edilmeden önce erdosteine kapalı (inaktif formda) iki adet tiol grubu taşır. Bronşiyal sekresyonlarda bulunan mukopolisakkaritlerin disülfid köprülerinin açılması ancak erdosteine molekülünün metabolize olarak sülfidril radikallerin serbest hale gelmesi ile ve tiolaktin halkasının açılması ile mümkün olur. Bu ilacın gastrointestinal düzeyde iyi tolere edilmesi ve organlara dağılımı serbest -SH gruplarının yokluğuna bağlıdır. İnsanlarda ve hayvanlarda erdosteine etkileri ve metabolizması aşağıda gösterildiği gibi bulunmuştur.

1. Hayvanlarda: Bir çok deneysel modelde mukolitik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Mukoproteinlerin disülfid köprülerinin parçalanmasına sebep olur. Bazı bronkopnömatilerde artan siyalomüsinlerin parçalanmasına sebep olur. Mukosilyer temizlenmeyi artırarak ekspektorasyonu daha rahat hale getirir. Serbest radikal süpürücü aktivitesi nedeniyle antioksidan özelliklere sahiptir. Sigara içimiyle inaktive olan pulmoner AAT'yi korur.

2. İnsanlarda: Metabolize edildikten sonra bronşiyal sekresyonlarda bulunan farklı glikoprotein bileşiklerinin molekül içi ve moleküller arası disülfid köprülerini parçalar. Bronşiyal sekresyonların mukus vizkozitesinin azalması açısından çok kuvvetli bir aktiviteye sahiptir. Ayrıca mukosilyer transportu artırır. Sekresyonların normal vizkozitesini sağlayarak hızla balgam hacmini azaltır. Böylece hem öksürükteki hem de ekspektorasyondaki zorlukları yener. Kronik bronşitli hastalarda ekspektorasyonun sekretuar IgA konsantrasyonunu artırır. Bu özelliği molekülün antiinflamatuvar aktivitesinin bir sonucu olabilir. Böylece bronşiyal inflamasyonun önemli öğelerinin azalmasına yol açar. Hem sağlıklı bireylerde hem de kronik bronşitli hastalarda sigara içimiyle inaktive olan AAT'nin fonksiyonunu koruyucu

etki gösterir. Erdosteine bronşiyal sekresyonlarda amoksisilinin penetrasyonunu artırır. Yine erdosteine ve metabolitleri PMN nötrofillerin tütün ile indüklenen kemotaktik aktivitelerindeki azalmaya karşı koruyucu etki gösterir.

**Farmakokinetik özellikleri:** Erdosteine oral olarak alındıktan sonra hızla absorbe olur. Oral tek bir dozdan sonraki T<sub>max</sub>: 1.2 saattir. Alındıktan sonra hızla en az üç adet aktif metabolite dönüştürülür: N-tioglikolil homosisteine (Met I), N-asetilhomosisteine (Met II) ve homosisteine (Met III). Bunların herbirinin ortak özelliği serbest tiyol gruplarını içermesidir.

Erdosteinein yarılanma ömrü 1.4 saattir. Ancak metabolitlerin tek tek yarılanma ömürleri birbirinden farklıdır. Örneğin Met I ve Met II nin yarılanma ömrü 1.2 ve 2.7 saattir. Bu üç metabolitten hiçbirisi idrarda ve feçeste bulunmaz. Kullanıldığında idrardaki inorganik sülfatların miktarı artar. Besinlerle birlikte alınması erdosteinein ve metabolitlerinin pikini hafifçe geciktirir. Fakat bu hiçbir zaman maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşmasını engellemez. Birden çok ilacın alındığı tedavilerde erdosteinein farmokokinetiği fazla değişmez. Özellikle enzimatik indüksiyon ve akümülyasyon gözlenmemiştir. İnsan yaşı ile erdosteinein ve metabolitlerinin farmokinetiğinin değişmediği gösterilmiştir. Sağlıklı bireylerde ve kronik bronşitli hastalarda ilacın farmokokinetiği açısından bir fark gözlenmemiştir. Kreatin klerensi 25-40 ml/dakika olan böbrek yetmezlikli yaşlı hastalarda erdosteine ve metabolitlerinin farmakokinetik özellikleri sağlıklı yaşlı bireylerden farklı bulunmamıştır. Teofilin veya eritromisin ile herhangi bir farmakokinetik etkileşim gözlenmemiştir.

Klinik olarak erdosteinein kullanım endikasyonları:

1. Mukus ve mukopürülan içeriğinin sulandırılması veya ekspektorasyonun artırılarak ventilasyonun sağlanması:

a) Akut ve kronik bronkopulmoner hastalıklar (akut ve kronik bronşitin alevli veya stabil fazları, bronşektaziler, hipersekretuar bronşiyal astma)

b) Üst respiratuar yolun akut ve kronik hastalıkları (rinit, sinüzit, farenjit, larenjit, trakeit).

2. Bronşiyal hastalıkların gelişimin önlemek amacıyla:

a) Amfizemin eklendiği hipersekretuar bronkopulmoner rahatsızlıklar

b) Sigara içenlerdeki kronik bronşitler.

3. Profilaktik olarak ve cerrahiden sonra solunum başarısının sağlanması amacıyla:

- a) Bronkopnömoni
- b) Pulmoner atalektaziler.

Şiddetli karaciğer ve böbrek yetmezliklerinde günlük doz yarı yarıya düşürülmektedir. Preklinik çalışmalarda her ne kadar embriyofetal oluşumlar üzerine toksik, teratojenik ve mutajenik etkileri gösterilmemiş ise de yeni bir ajan olarak erdosteine, hamilelik esnasında ve doğumdan hemen sonra ve ayrıca süt emzirme döneminde ve iki yaşın altındaki çocuklarda kullanılmamaktadır.

Erdosteinin yan etkilerinin çok az olduğu gösterilmiştir. Ayrıca birden çok tedavi protokollerinden sonra vücutta birikim ve metabolik aktivasyon gibi etkilere rastlanmamıştır (52).

#### **Erdosteinin antioksidan özellikleri:**

1. *İn vitro* çalışmalar: *İn vitro* olarak erdosteine sigaranın gaz fazına maruziyetten sonra meydana gelen AAT'nin hasarına karşı koruyucu etki gösterir (53). Alkali hidrozisini takiben erdosteine glutatyon ve askorbik asit gibi indirgeyici ajanlara benzer aktivite sergilemiştir.

2. Hayvan çalışmaları: Sıçanlarda oral olarak uygulanan erdosteine kısmi fakat önemli bir düzeyde sigaranın indüklediği AAT elastaz inhibitör kapasitesinin (EİK) azalmasına karşı koruyucu etki gösterir. 500-1000 mg/kg Erdosteine uygulanan sıçanların bronkoalveoler sıvılarında EİK sırasıyla %27 ve %16.5 azalmış olarak bulunmuştur. Bunun kontrolü olan plasebo grubunda bu değer %44 olarak ölçülmüştür. Beş gün süresince günde bir defa oral yolla alınan erdosteinin farelerde paraquat toksisitesini önlediği tespit edilmiştir. Normalde bu madde ROS üretimine bağlı olarak ilerleyici ve geri dönüşümsüz solunum yetmezliği ile ölüme sebep olmaktadır. Erdosteine hem yaşam süresini uzatmakta hem de mortalite hızını azaltmaktadır (54). Başka bir çalışmada 200 ve 400 mg/kg dozunda oral olarak uygulanan erdosteinin S enantiomerinin doza bağımlı olarak fareleri paraquatın toksik etkilerinden koruduğu gösterilmiştir (55). Buna karşılık R-erdsosteine, asetil sisteine, glutatyon ve askorbik asit paraquatın bu etkilerine karşı herhangi bir koruyucu özellik göstermemektedir.

3. İnsan çalışmaları: Dört hafta süreyle günde üç defa 300 mg erdosteine verilen 24 sağlıklı sigara içen bireyde fonksiyonel AAT düzeyi (alveoler dokuda



elastine karşı elastazın hidrolitik özelliklerini inhibe edici aktif kısım) 1-1.2 mmol/l olan plasebo değerleri ile karşılaştırıldığında 1.1-2.2 mmol/l'ye yükselmiştir (56). Erdosteine alanlarda AAT'nin EİK yüzdesi %25 'ten %85' e çıkmıştır.

Periferik PMN hücrelerin kimyasal stimuluslara doğru hareket etmeleri sigara içenlerde azalmıştır. Onaltı sigara içen ve kronik bronşiti olan birey günde 3 defa 300 mg erdosteine ile iki hafta tedavi edildiğinde PMN hücrelerinin kemotaktik ajanlar olan kazein ve formil-metiyonil-lösin-fenilalanine olan cevap verme kapasitesinde sigaranın neden olduğu azalma ortadan kalkmıştır (57).

Hipersekresyonlu enfeksiyöz bronşitte ko-trimaksozol ile yapılan tedavi protokolüne erdosteine eklendiğinde balgam çözücü ve antibiyotik difüzyonunu artırıcı etkisi ile tedaviyi kolaylaştırdığı görülmüştür (58).

Bronşiyal sekresyonlar akut ve kronik solunum yolu enfeksiyonlarında hem hastalığın seyrinde hem de tedavinin etkinliğinde çok önemlidir. Bazı araştırmacılar bu sekresyonların miktar ve kıvamını etkileyebilecek ajanların tedaviye eklenmesiyle tedavi süresi ve etkinliğinin değiştirilebileceğini öne sürerek birtakım preparatları denemişler ve erdosteine oral olarak alınımından sonra etkin olduğunu bulmuşlardır (59).

Plasebo kontrollü olarak yapılan bir çalışmada diğer bazı ajanlarla birlikte erdosteine uygulanarak klinik, fizyolojik ve farmakolojik parametreler değerlendirilmiştir. Bu amaçla global etkinlik skoru adı verilen bazı kriterler göz önüne alınarak şu 5 semptom skorlanmıştır: Ekspektorasyon zorluğu, dispnenin şiddeti, öksürüğün niteliği ve sıklığı, balgamın niteliği ve balgamın vizkozite görünümü. Sonuçta erdosteine yukarıda sayılan bütün kriterler üzerine biyolojik tolere edilebilirliği göz önünde bulundurularak mükemmel bir etki oluşturduğu gözlenmiştir (60).

Ekspektorasyonun birbirine çok sıkı olarak bağlı birkaç mekanizması mevcuttur. Bu bağlamda, ekspektoran ajanlar bir kaç şekilde etki mekanizması gösterirler: Balgamın vizkozitesini azaltarak, solunum yolu sıvılarının ve sürfaktanın sekresyonunu artırarak ve trakeal mukusu normalize ederek (61,62). Erdosteine ekspektoran etkisi araştırıldığında, balgamın vizkozitesini azalttığı, mukosilyer transportu hızlandırdığı, solunum yolu sekresyonunu arttırdığı ayrıca kimyasal yolla stimüle edilen öksürük refleksi ve hava yoluna plazma sızıntısını baskıladığı

gözlemlenmiş, sonuç olarak birden fazla etki mekanizmasına sahip mükemmel bir ekspektoran olduğu gösterilmiştir (63).

Bir araştırmada (64) sağlıklı bireylere tek veya multiple oral dozlar halinde erdosteine verildikten sonra erdosteine direkt olarak veya metabolitleri yoluyla idrar ve fekal yolla atılımı ve plazma düzeyleri araştırılmış ve aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

1. Multiple uygulamalar erdosteine metabolizasyonunu ve plazma dağılımını etkilemektedir.

2. Tek bir oral doz alındığında açlıktaki biyoyararlanım tokluğa göre daha iyi bulunmuştur.

3. Erdosteine plazma proteinlerine bağlanmasını araştırmak için normal plazma örnekleri *in vitro* olarak erdosteine ile inkübe edilmiş ardından equilibrium diyalizine tabi tutulmuş ve sonuçta %64,5'unun proteinlere bağlı olduğu tespit edilmiştir.

4. İdrarda hiçbir şekilde erdosteine kalıntısına rastlanmamış ve plazmada üç adet metaboliti tespit edilmiştir.

5. Erdosteine uygulanmasından sonra idrarda inorganik sülfatlar artmış ancak multiple dozlardan sonra ileri artışlar tespit edilmemiştir.

6. Çok az feçes örneklerinde erdosteine rastlanmamış ancak metabolitine rastlanmamıştır.

7. Besinler erdosteine absorpsiyon zamanını geciktirmiş ve uzatmıştır.

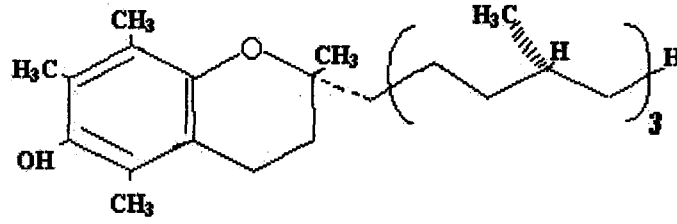
8. Ardışık dozlardan sonra bile erdosteine herhangi bir yan etkisine rastlanmamış ve tolere edilebilirliği çok iyi bulunmuştur.

Akut ve alevli kronik bronkopnömatili hastalarda ambroksol ve erdosteine etkinliği araştırılmış, ölçülen parametrelerdeki klinik ve istatistiksel değişimler göz önüne alınarak her iki ajanın da tolerabilitesinde doyurucu olduğu sonucuna varılmış ve erdosteine belirgin bir terapötik aktivitesine rastlanmıştır (65).

## **2.5. E Vitamini (E vit)'nin yapısı ve özellikleri**

Bitkisel yağlardan elde edilen tokoferoller ve tokotrienollerin hepsine isim olarak E vit denmektedir. Yağda eriyen vitaminler arasında yer alan E vit doğada 8 tokoferolden oluşur.  $\alpha$ -tokoferol içlerinde en aktif olanı ve doğada en çok

bulunanıdır. Yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka molekülün aktif kısmıdır (41). E vit'in yapısı ve şekli aşağıdaki gibidir:



Primer olarak özellikle enzimatik olmayan oksidasyonu engelleyen bir antioksidandır. Dokuda özellikle membrandan zengin kısımlarda yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Bulunduğu membran bölgelerinde lipit peroksidasyonu zincirini kırarak hücre hasarını önlerken diğer taraftan hücre içi sinyal yollarının normal fonksiyonunu devam ettirmesi bu vitaminin varlığına bağlıdır (41,66,67). Ayçiçek yağı gibi bitkisel yağlar zengin E vit kaynaklarıdır (68). Karaciğer ve yumurtada orta derecede yer alır. Yağda çözülmüş olarak alınır ve yağlarla beraber emilir. Yağda eridiği için hücre membranına lokalizedir. PUFAs'ların oksidasyonunda engelleyici bir görev alan E vit'e olan ihtiyaç çoklu doymamış yağ asidi alımının artmasıyla doğru orantılıdır (48). Etkinliği çoğunlukla lipit emilim ve taşınmasının bozuk olduğu kişilerde görülür ve anormal hücre zar yapıları ile kendini gösterir. Klinikte özellikle antioksidan özelliğinden faydalanılarak kullanılmıştır. E vit alımının artışıyla koroner kalp hastalıklarındaki azalma yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Buna ek olarak E vit'in, C vit ve  $\beta$ -karoten ile beraber katarakt oluşumunu geciktirdiği bilinmektedir. Günlük alım çok yüksek dozlara ulaşmadığı sürece diğer yağda eriyen vitaminlerin tersine E vit toksisitesi daha azdır. Günlük 300 mg'a kadar olan dozlarda herhangi bir yan etki görülmemiştir (48).

E vit hücre membranında yer alan PUFAs'ları radikallerin ataklarından korumaya çalışır.  $O^-$ ,  $\cdot OH$ ,  $^1O_2$  ve diğer radikalleri süpürür (66). GSH-Px ile tamamlayıcı bir antioksidan etki gösterir. Se metabolizmasında önemli bir rol oynar. Se eksikliğinde, E vit emilimi bozulur. Ayrıca E vit de Se'un vücuttan kaybını önler. Lipit peroksil ( $LOO^-$ ) radikallerini yıkarak lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu kırar ve antioksidan özelliğini burada gösterir. Reaksiyon sonunda oluşan tokoferoksil radikali stabildir ve böylece peroksidasyon durmuş olur. Ancak oluşan bu radikalın ortamdaki uzaklaştırılması yine de gereklidir. Burada devreye C

vit girer. C vit ya da GSH yardımıyla tokoferoksil radikali indirgenir. Bundan dolayı E vit'in yanında C vit'de önemli bir görev görmüş olur (36,41,68).

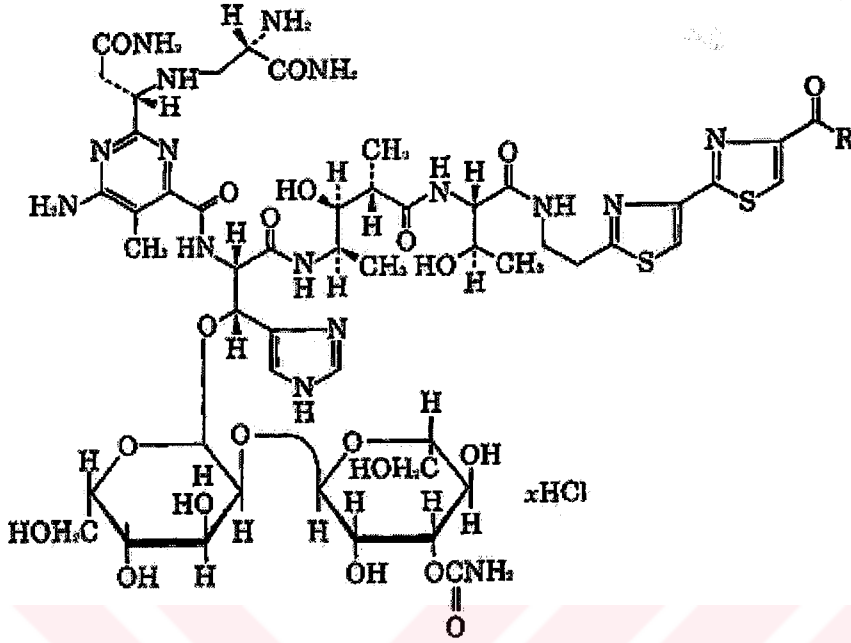
Ayrıca  $\alpha$ -tokoferol iskemik dokuda nötrofil kaynaklı inflamatuvar cevabı antiinflamatuvar ve antikoagülan etkileriyle engeller. Araşidonik asit metabolizmasını fosfolipaz A2 ve 5-lipooksigenaz aktivitelerine etki ederek regüle eder. Oral E vit uygulanmasının pro-inflamatuvar olan 5-lipooksigenaz sentezini engellediği gösterilmiştir. Diğer taraftan E vit prostasiklin sentezini arttırır. İskemik koşullarda vasodilatör olan prostasiklin salgısı bu yolla arttırılmış olur. E vit trombosit agregasyonunu inhibe ederek dolaşımın devamı için yardımcı olur (41). Birçok I/R hasarında E vit'in lipit peroksidasyonu önleyici etkisi başarı ile gösterilmiştir (69).

$\alpha$ -tokoferol sepsisli hayvanlarda tedavi olarak uygulandığı zaman karaciğer lipit peroksidasyonunu azaltır. Yaygın intravasküler koagülasyon yavaşlatılmış ve plazma laktat seviyeleri azalmıştır (70-72). Sıçanlarda Zimosan ile oluşturulan peritoniti takiben gelişen pulmoner inflamasyon modelinde yararlı etkileri görülmüştür (73,74). Akciğer hasarını engellemede gösterdiği aktivite büyük oranda alveollerdeki makrofaj pro-inflamatuvar cevabın inhibisyonu şeklinde kendini göstermektedir (75). İnsanlara oral E vit takviyesinin yapılması monositlerin respiratuvar patlama sırasında ki ROS üretimini azaltmıştır (66).

## **2.6. Bleomisin (BLM)'in yapısı ve özellikleri**

Bazı kanser türlerinde DNA sentezinin inhibisyonu ve DNA ipliğinin kırılması üzerine etki eden  $C_{55}H_{84}C_1N_{17}O_{21}S_3$  formülü ile gösterilen ve molekül ağırlığı 1487,5 olan BLM'nin yapısı ve şekli aşağıdaki gibidir:

✓



Antitümör aktivitesi 2 açıdan ele alınabilir.

*In vitro*; HeLaS3 hücreleri Ehrlich kanser hücreleri ve Yoshida kanser hücreleri gibi hücrelerde hücre büyümesini ve DNA/protein sentezini inhibe eder.

*In vivo*; Köpeklerde spontan lenfosarkomun kaybolmasını sağlar.

Deri kanseri, baş-boyun kanseri (maksiller, dil, dudak, farinks, larinks, ağız boşluğu kanserleri), akciğer kanseri (özellikle primer veya metastatik skuamöz hücre karsinomu), özefagus kanseri, malign lenfoma (retikulum hücre sarkomu, lenfosarkom, hodgkin hastalığı), uterus serviks kanseri, nörogloma ve tiroid kanseri gibi kanserlerde kullanma endikasyonları vardır.

Açık sarı-beyaz liyofilize ürün halinde enjeksiyona hazır preparatlar olarak piyasada satılmaktadır. İntravenöz, intramusküler, subkutan ve intraarteriyel şeklinde verilebilmektedir. Suda tam olarak, etanolde az ve eterde ise pratikte çözünmez.

BLM aslında sitotoksik bir antibiyotiktir. Pulmoner toksisitesi çok yüksek olduğundan ve bir çok organ ve dokuya birikme eğilimi bulunduğundan kullanımı sınırlanmaktadır. Bilinen antikanser ilaçlar içerisinde farklı bir mekanizma ile, süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi ROS üreterek antikanser etki gösterir. Fakat bu arada biriktiği dokularda antikanser etkisinin yanında lipid peroksidasyonuna neden olarak, akciğer prostaglandin sentezini değiştirerek ve kollajen sentezini

arttırarak fibrozise neden olur. Bazı durumlarda verilmesinden hemen sonra dispne, öksürük ve döküntüyle seyreden akut bir sendrom oluşturur (76). Böyle hastalarda akciğer biyopsisi yapıldığında eozinofilik infiltrasyon ve hipersensitivite cevabına ait bulgular tespit edilmiştir. BLM alan hastalarda ilaç toksisitesine bağlı gelişen mortalite oranı %1-2'dir. Pulmoner toksisite gelişen hastalarda ise mortalite %10-83 arasında değişir (77). Bu tür durumlarda kortikosteroidlerin kullanılması önerilmektedir. Her durumda bazı hastalarda radyografik veya fizyolojik anormallikler kalabilmektedir.



7

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Deney hayvanlarının temini ve deneylere hazırlanması

Çalışmada kullanılmak üzere Sprague Dawley tipi erkek sıçanlar Farmakoloji Anabilim Dalı deney hayvanları yetiştirme biriminden temin edildi. Sıçanlar deney gününe kadar havalandırma şartları sağlanmış, güneş ışığı alan odalarda özel kafeslerde tutuldu. Düzenli olarak standart pellet yemle beslendi ve çeşme suyu verildi. Suları her gün değiştirildi ve kafes temizliği gūnaşırı yapıldı. Kontrol grubu için 8, sadece BLM ve BLM ile birlikte E vit uygulanacak 2 grup için 9'ar ve BLM ile birlikte erdostein uygulanacak grup için 10 sıçan ayrı ayrı kafeslere ve bir kafeste en çok 4 sıçan olacak şekilde ayrıldı.

#### 3.2. Deney gruplarının oluşturulması

**1. Grup, Kontrol grubu (n=8):** Bu gruptaki sıçanlara i.t. uygulamadan 2 gün önce sodyum bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) 10 mg/kg/gün dozunda oral olarak 1x1 (günde bir kez) uygulanmaya başlandı ve sıçanların kesildiği 14. güne kadar toplam 17 gün sürdürüldü. BLM uygulamasının yapıldığı gün 0.(sıfırncı) gün olarak kabul edildi. Kontrol grubuna 0. gün i.t. olarak tek doz fosfatla tamponlanmış steril salin (PBS, phosphate buffered saline) verildi.

**2. Grup, BLM grubu (n=9):** Bu gruptaki sıçanlara sadece 0. gün i.t. olarak BLM (Bleocin; bleomycin hydrochloride; Nippon Kayaku Co.,Ltd., Tokyo, japonya) uygulandı. 7.5 ü/kg dozunda BLM 250 µl PBS içinde çözümlenerek tek doz şeklinde verildi (78).

**3. Grup, BLM + E vitamini (E vit) grubu (n=9):** Bu gruptaki sıçanlara BLM uygulamasından 2 gün önce intaperitoneal (i.p.) olarak E vit (Epnal-ROCHE) 10 mg/kg dozunda 1x1 olarak uygulanmaya başlandı ve sıçanların kesildiği 14. güne kadar (79) toplam 17 gün boyunca tedaviye devam edildi. Sıfırncı gün ise i.t. BLM uygulandı (7.5 ü/kg, 250µl PBS içinde tek doz).

**4. Grup, BLM + Erdostein (n=10):** Bu gruptaki sıçanlara BLM uygulamasından 2 gün önce  $\text{NaHCO}_3$  içinde çözülmüş erdostein (Edmond Pharma, İtalya) 10 mg/kg 1x1 (59,80,81) dozunda oral olarak vermeye başlandı. Erdostein tedavisine, hayvanların kesildiği 14. gün sonuna kadar toplam 17 gün boyunca

devam edildi. BLM ise sadece bir kez i.t. olarak 0. gün 7.5 ü/ kg dozunda verildi (250 µl PBS içinde).

### **3.3. Cerrahi girişimler ve BLM ile fibrozis oluşturulması**

Bütün ilaç uygulamaları her sabah saat 08:00'de yapıldı. i.t. BLM uygulamasından 12 saat önce aç bırakılan sıçanlar tartıldı ve 250 g'ı geçenler rasgele grupları oluşturmak için ayrıldı. Genel anestezi amacıyla 1 mg/kg dozunda xyalzine ile 0.5 ml/kg dozunda ketamin aynı enjektöre çekildi ve i.p. olarak uygulandı. Anestezik maddeler uygulandıktan sonra sıçanların refleksleri kontrol edilerek derin anesteziye girmeleri için beklendi. Bu işlemlere paralel olarak BLM'nin 15 ünitelik flakon formu PBS içinde çözüldü.

Daha sonra sıçanların boyun ön bölgesinin cilt dokuları orta hat kesisi ile açıldı. Uygun bir klemp yardımı ile cilt altı yağ dokusu, bağ dokusu ve vasküler yapılar dikkatli bir şekilde zarar verilmeden ekarte edilerek trakea'ya ulaşıldı. Trakea içine insülin enjektöründe hazır bekletilen BLM enjekte edildi. Kontrol grubuna ise 250µl PBS uygulandı. BLM'nin i.t. olarak uygulanışını takiben ilacın tamamının akciğerlere doğru akmasını sağlamak amacıyla sıçanlar kafası yukarıda olacak şekilde 30 saniye kadar bekletildi. Bu işlem bittikten sonra kesi bölgesi 4/0'lık keskin gövdeli atravmatik cerrahi ipek iplikle dikildi. Daha sonra sıçanlar ayılmaya bırakıldı. Vücut ısıları 37 °C'de tutulmaya çalışıldı. Aylma esnasında bütün sıçanların vücut ısıları, solunumları ve refleksleri takip edildi. Deneylerin son gününe kadar sıçanların tedavisi yapılırken kesi bölgesini enfeksiyona karşı korumak amacıyla günlük yara bakımı (antiseptik Batticon solüsyonu ile) yapıldı. Deney işlemleri süresince sıçanların kesi bölgelerinde enfeksiyon gözlenmedi.

### **3.4. Bikarbonat uygulanması**

Deney gruplarında kullanılacak olan erdostein NaHCO<sub>3</sub> içinde çözülmüş olduğu için kontrol grubuna da erdosteinle aynı ekimolarda olan bidistile suda çözülmüş NaHCO<sub>3</sub> çözeltisi verildi. Tam bir kontrol sağlamak amacıyla kontrol grubuna 0. gün i.t. PBS uygulandı. Bunun sebebi ise diğer gruplara verdiğimiz BLM'nin PBS içinde çözülmüş olmasıdır.



### **3.5. E Vitamini uygulanması**

E vitamini enjeksiyonları 100 ünitelik (1 mililitrelik) insülin enjektörü ile uygulandı. Hayvanlar arka bacaklarından kaldırılarak barsakların baş tarafına doğru kayması sağlandı. Enjeksiyon karın alt kısmından cilt, ciltaltı ve karın kasları geçilerek peritonun içine girildiğine emin olunduktan sonra yapıldı. Enfeksiyona karşı korumak amacı ile (peritonit ve cilt enfeksiyonu gibi) her enjeksiyon işlemi öncesi sıçanların karın altı kısımları antiseptik Batticon solüsyonu ile usulüne uygun silindi.

### **3.6. Kullanılan aletler**

Tez çalışmamızda laboratuvar deneyleri esnasında kimyasal analizler için aşağıda belirtilen aletler kullanıldı:

Hanna Instruments HI 8521 marka pH-metre (Singapur), Labinco BV L 46 marka vorteks (Hollanda), Kötterman Labortechnik marka Ben Mary (Almanya), Sartorius AG BP 310 S marka hassas terazi (Göttingen-Almanya), Ultra Turrax T25 Basic maksimum 25000 devir/dakika homojenizatör (Almanya), Rotina 46R marka soğutmalı maksimum 5000 x g kapasiteli santrifüj (Almanya), LKB Biochrom Ultraspec Plus 4054 uv/visible marka Spektrofotometre (Cambridge-İngiltere) ve Hitachi F-4010 marka Floresans Spektrofotometre (Tokyo-Japonya) kullanıldı.

### **3.7. Akciğer doku homojenizasyonu, süpernatant ve ekstraktların hazırlanması**

Deney işlemleri toplam 17 gün sürdü. Kontrol ve tedavi uygulamalarına BLM uygulamasından 2 gün önce başlandı. BLM uygulanmasından 14 gün sonra sıçanların dokuları çıkartıldı. Sıçanlar deneyin başlangıcında, 7. günde ve 14. günde olmak üzere tartılarak ağırlıkları kaydedildi. Deneyin 14. gününün sonunda genel anestezi amacıyla sıçanlara, 1 mg/kg xyalzine ile 0.5 ml/kg ketamin aynı enjektöre çekilerek i.p. olarak uygulandı. Kalp atışı devam eden sıçanların toraks ( göğüs ) boşlukları makas ile orta hat boyunca kesilerek akciğer dokuları doku bütünlüğü korunarak çıkartıldı. Akciğerlerin makroskopik görüntüleri not edildi.

Biyokimyasal analizlerde kullanılacak olan akciğer dokuları grup numaraları belirtilerek hemen alüminyum folyoya sarılarak plastik kaplara konuldu. Sonra sıvı azot tankına konularak sıvı azot içinde donduruldu ve -85 °C'ye ayarlı derin

dondurucuda (Nuair -85 °C Ultralow Freezer - Japonya) biyokimyasal testlerin yapılacağı güne kadar muhafaza edildi.

Deneylere başlandığı gün derin dondurucudan çıkarılan akciğer dokuları temizlendi. Distile su ile yıkandı ve kurutma kağıdı ile kurutuldu. Daha sonra buz aküleri yardımıyla soğukluğu muhafaza edilerek bir bistüri yardımıyla küçük parçalara bölündükten sonra yaklaşık yarısı hidrokspirolin çalışması için saklanmak üzere kapaklı cam tüplere konuldu. Geri kalan dokuların yaş ağırlıkları hassas terazi ile tartılarak not edildi ve cam tüplere aktarıldı. Dokuların üzerine pH'sı 7.4 olan 2 ml 0.2 mM soğuk Tris-HCl tamponu eklendi (0.2 mM olarak hazırlanan Tris solüsyonu ve HCl solüsyonu 50/39.9 (v/v) oranında karıştırılarak hazırlandı, homojenizasyon işlemlerinin tamamında bu tampon kullanıldı). Daha sonra cam tüplerdeki dokular içi kar ile dolu bir beher içinde soğukluğu muhafaza edilerek homojenizatörde 16.000 devir/dakika hızda 2 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenat üzerine 4 ml daha tampon ilave edildi ve 1 dakika süreyle tekrar homojenize edilerek toplam süre 3 dakikaya tamamlandı. Elde edilen homojenat vortekslendikten sonra 2 ml'lik kısmı eppendorf tüplere aktarıldı ve bu homojenatlarda MDA ve protein tayinleri yapıldı. Homojenatların bir bölümü, 45 dakika süreyle 3500 x g'de +6 °C de soğutmalı santrifüjde santrifüje edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlardan GSH-Px ve protein tayinleri yapıldı. Süpernatanttan bir hacim alınarak 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) karışımı ilave edilerek vortekslendikten sonra 45 dakika süreyle 3500 x g'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından protein ve SOD enzim aktivite tayini yapıldı. MPO enzim tayininde kullanılacak süpernatanın elde edilmesi için ise % 0.5'lik hexadecyltrimethyl ammonium bromid (HDTMAB), doku ağırlığının 5 katı olacak şekilde ilave edilerek homojenizatörde 16000 devir/dakika hızda 2 dakika süreyle homojenize edildi.

### **3.8. Biyokimyasal Testler**

#### **3.8.1. Homojenat, süpernatant ve ekstrakt numunelerinde protein miktarlarının tespiti**

Protein seviyelerinin tespit işlemleri Lowry metoduna göre yapıldı (82). Hazırlanan alkali çözeltide (C reaktifi) bakır-protein kompleksi oluşur ve fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Fenol Reaktifi) redükleyerek

koyu mavi bir renk oluşturur. Ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılı bir şekilde renk koyulaşır. Folin reaktifi sadece asit ortamda dayanıklıdır. Redükleme ise pH 10'da oluşmaktadır. Bu yüzden folin reaktifi acele olarak alkali bakır-protein çözeltilisine ilave edildi ve vortekslendi. Böylece fosfomolibdat-fosfotungstat (folin) reaktifi parçalanmadan önce redüklenme olayı gerçekleşir. Standart ve numuneler köre karşı 700 nm'de okundu.

Deneylerde;  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{Sitrat}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaOH}$ , Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifleri kullanıldı.

Standart deneylerinde konsantrasyonunu bildiğimiz sığır serum albümininden hazırlanmış çözeltiler kullanıldı. Optik dansite (OD) – mg/ml protein konsantrasyonu ile standart grafiği çizilerek protein değerleri bu grafikten okundu.

Protein (mg/ml) = grafikten okunan değer x faktör

F (faktör) = standart hacmi (0.5 ml)/numune hacmi (0.010ml) = 50

Standart çalışmalarında 0.5 ml, numune çalışmalarında 0.010 ml kullanıldığı için faktör hesabı bu şekilde yapılarak işleme dahil edilir.

### **3.8.2. Akciğer dokusu hidroksprolin (OH-P) miktarlarının tespiti**

Homojenizasyon işlemleri sırasında küçük parçalara ayrılan akciğer dokularının, BLM diffüz fibrozis yaptığı için, yaklaşık yarısı randomize bir şekilde OH-P düzeyi tespit deneyleri için ayrıldı.  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de dondurularak deney gününe kadar saklandı. Çalışma esnasında dondurulmuş dokular çözülerek izotonik NaCl ile yıkandı ve kurutma kağıdına serilerek kendi halinde kurumaya bırakılarak tartıldı. Cam tüplere konularak  $100\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanmış etüvde 72 saat kurutuldu. Kontaminasyon engellenerek kurutulan dokular küçük bir havan içinde toz haline getirildi. Toz haline gelmiş kuru dokuların herbirinin kuru ağırlıkları hassas terazide ölçülerek kaydedildi. Toz halindeki dokular 15 ml'lik vidalı kapaklı cam tüpler içerisine konularak üzerine 2 ml 12 N HCl ilave edildi. Daha sonra etüvde  $130\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 3 saat kaynatılarak hidrolize edildi. Buharlaştırma nedeniyle miktarı 1 ml'nin altına düşenler ölçülerek 12 N HCl ile tekrar 1ml'ye tamamlandıktan sonra 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Üstteki süpernatant kısmından 0.5 ml alınıp üzerine 0.5 ml isopropanol eklenerek  $2500 \times g$ 'de 10 dk daha santrifüj edildi. Sonra üst fazdan 0.3

ml alınarak çalışıldı. Hidroksiprolin tespiti Woessner'in tarif ettiği yöntemle kısmen modifiye edilerek yapıldı (83).

Deney işlemleri esnasında; OH-P standardı, kloramin-T, P-dimetil amino benzaldehit, perklorik asit, isopropanol, Na-asetat-3 H<sub>2</sub>O, Na-sitrat-5.5 H<sub>2</sub>O, 12 N HCl, 1mM HCl kimyasalları kullanıldı (Merck&Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA).

Hidroksiprolin standardı; 1,231 mg OH-P 5 ml 0,001 M HCl'de çözülerek günlük stok standart çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu stok standart çözeltisi 1/2, 1/4, 1/6, 1/8 oranlarında dilüe edilerek daha düşük konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı. Sonra OH-P deney işlemleri bu örneklere de uygulanarak 558 nm'de standart körüne karşı okundu. Çıkan absorbans değerleri ile standart grafiği oluşturuldu. Bu grafikten eğim bulunarak hesap işlemlerinde kullanıldı.

Kloramin-T çözeltisi; 70 mg kloramin-T 1 ml bidistile suda çözülerek üzerine 4 ml asetat/sitrat tamponu ilave edilerek günlük hazırlandı.

Ehrlich reaktifi; 4 gr P-dimetil amino benzaldehit 6 ml (%60'lık) perklorik asitte çözülerek üzerine 26 ml isopropanol ilave edilerek günlük hazırlandı.

Asetat/sitrat tamponu; 57 gr Na-asetat-3H<sub>2</sub>O ve 44,47 gr Na-sitrat-5.5 H<sub>2</sub>O 400 ml bidistile suda çözüldü. Üzerine 385 ml isopropanol ilave edillerek HCl ile pH 6'ya ayarlandıktan sonra hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra deney işlemleri aşağıdaki tabloya göre yapıldı.

	Kör	Numune
Bidistile su	0,3 ml	-
Numune	-	0,3 ml
İsopropanol	0,2 ml	0,2 ml
Kloramin-T	0,1 ml	0,1 ml
Ehrlich reaktifi	2,6 ml	2,6 ml

Numune ve kör tüpleri üzerine reaktifler yukarıdaki sıraya göre eklendikten sonra vorteksle karıştırıldı ve 60 °C'de su banyosunda 25 dk inkübe edildikten sonra 558 nm'de köre karşı okundu. Sonuçlar mg/g kuru doku olarak verildi.

### 3.8.3. Akciğer dokusu total süperoksit dismutaz (SOD) aktivite tespiti

SOD (Superoxide dismutase, EC 1.15.1.1) enziminin aktivite tespit deneyleri ksantin/ksantin oksidaz reaksiyonları ile üretilen  $O_2^{\cdot -}$  radikalinin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi prensibine göre yapılır. SOD enziminin olmadığı ortamda oluşan süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek mavi-mor renk oluşturmaktadır. Eğer ortamda SOD varsa NBT indirgenmesi meydana gelmez ve mavi-mor renk görülmez, enzimin miktarına ve aktivitesine bağlı olarak rengin koyuluğunun da değiştiği görülür. Bu reaksiyon spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans gösterir. Süperoksit dismutaz enziminin aktivite tespit deneyleri Sun ve arkadaşlarının belirttiği metoda (84) ve Durak ve arkadaşlarının tarif ettiği modifikasyona (85) göre yapıldı. Bir ünite SOD enzimi; NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim miktarıdır. Hesap işlemlerinden sonra SOD enzimi aktivite sonuçları U/mg protein olarak gösterildi.

$$\% \text{ Enzim inhibisyonu} = (\text{Abs}_{\text{kör}} - \text{Abs}_{\text{num}}) / \text{Abs}_{\text{kör}} \times 100$$

Deneylerde; assay reaktifi, 167 U/l ksantin oksidaz (XO), 2M  $(NH_4)_2SO_4$  ve 0.8 mmol/l  $CuCl_2$  kullanıldı. Assay reaktifi 0.3 mmol/l ksantin, 0.6 mmol/l  $Na_2EDTA$ , 150  $\mu\text{mol/l}$  NBT, 400 mmol/l  $Na_2CO_3$ , 1g/l sığır serum albümini (BSA) kullanılarak elde edildi. Deneyin aşamaları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

	Kör	Numune
Reaktif	2.85 ml	2.85 ml
Ekstrakt	-	0.100 ml
Bidistile su	0.100 ml	-
XO (167 U/l)	0.050 ml	0.050 ml

Tüpler 3-5 defa alt üst edilerek 25 °C'de 20 dk inkübe edildi.

$CuCl_2$	1 ml	1 ml
----------	------	------

Distile suya karşı körden başlanarak numuneler 560 nm'de okundu.

Hesaplama işlemleri;

$$\% \text{ İnhibisyon} = ([\text{Absorbans kör (K)} - \text{Absorbans numune (N)}]) / K \times 100$$

% 50'lik inhibisyona 1 U denildiği için;

$$\text{Aktivite: (U/ml)} = [(\% \text{ inhibisyon}/50) \times (1 / 0.1)] \text{ ml}$$

$$U/ml = [(K-N) / K ] \times 20 \times 5 \text{ (sulandırma faktörü)}$$

Spesifik aktivite (U/mg protein) = [U/ml/mg/ml protein]. Sonuçlar, U/mg protein olarak ifade edildi.

#### 3.8.4. Akciğer dokusu glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivite tespiti

GSH-Px (Glutathione peroxidase, EC 1.11.1.9) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG)'a yükseltgenmesini katalizleyen bir enzimdir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, GRd ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. NADPH'ın NADP<sup>+</sup>'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de tespit edilmesiyle GSH-Px aktivitesi hesaplanır. Birim zamanda okside olan NADPH'ın mikromol olarak miktarı enzim ünitesini verir.

Deneylerde; 150 mM redükte GSH, 8 mM NADPH, 1 M NaN<sub>3</sub>, GRd, 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fosfat tamponu (pH = 7, 50 mM), 3.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanıldı. Deneyin aşamaları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Fosfat tamponu (5 mM, EDTA'lı)	2.650 ml
Redükte GSH	0.100 ml
NADPH	0.100 ml
GRd	0.010 ml
NaN <sub>3</sub>	0.010 ml
Numune	0.020 ml

Vortekslenerek 30 dk inkübe edildi.

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.100 ml
-------------------------------	----------

Spektrofotometrede 340 nm'de numunelerin absorbans değerleri 5 dk boyunca 15 saniyede bir kaydedildi. Düzenli olarak absorbans azalması görülen aralığının 1 dk'lık süresi esas alınarak hesap yapıldı.

$$\text{Aktivite hesabı; IU/l} = [(\Delta A/t) / 6.22 \times 10^{-6}] \times (1 / 0.02)$$

Spesifik aktivite IU/gr protein = (IU/l) / (1000xW). Sonuçlar U/g protein olarak hesaplandı. GSH-Px aktivitesi Paglia ve ark. tarif etmiş oldukları metoda göre çalışıldı (86).

### 3.8.5. Akciğer dokusu malondialdehit (MDA) seviyesi ölçümü

TBA ile 95 °C'de reaksiyona giren MDA, pembe renkli bir görünüm oluşturur. Oluşan rengin şiddeti ortamdaki MDA miktarı ile orantılı olarak artmaktadır. Ortamdaki n-butanola geçecek şekilde ekstrakt oluşturulan MDA floresans spektrofotometrede eksitasyon 525 nm, emisyon 547 nm dalga boylarında ölçüldü. MDA standart grafiği kullanılarak, numunelerin MDA miktarları tespit edildi.

Deneylede; 29 mmol/l TBA çözeltisi (pH= 2.8), 6 M HCl ve n-Butanol kullanıldı. Deneğin aşamaları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

	Numune	Numune Körü	Standart	Standart Körü
Deiyonize su	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Plazma	50 µl	50 µl	-	-
Standart	-	-	50 µl	50 µl
TBA solüsyonu	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

karıştırıldı.

1 saat inkübasyon	96 °C	25 °C	96 °C	25 °C
-------------------	-------	-------	-------	-------

İnkübasyon bitince buz banyosuna sokuldu ve aşağıdaki kimyasallar eklendi.

HCl	25µl	25µl	25µl	25µl
n-Butanol	3.5ml	3.5ml	3.5ml	3.5ml

Karıştırılıp 1500 x g'de 10 dk santrifüj yapıldı. Üstteki butanol fazı alınarak floresanspektrofotometre ile okundu (Eksitasyon: 525 nm, emisyon: 547 nm). Deneğin standart grafiği, 2 adet MDA molekülünün birleşmesinden oluşan 1,1,3,3-tetrametoksipropan ile çalışılarak yapıldı. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar, numunelerle aynı şartlarda çalışıldı ve floresanspektrofotometrede okunmalarından elde edilen değerler ile standart grafiği çizildi. Bu grafik kullanılarak oluşturulan eğim sabiti elde edilen numune değerlerine tatbik edilerek

MDA miktarı, yaş gram doku başına nanomol olarak hesaplandı. Bu deneyler Wasowicz ve arkadaşlarının tarif ettiği metoda göre çalışıldı (87).

### 3.8.6. Akciğer dokusu myeloperoksidaz (MPO) aktivite tespiti

Myeloperoksidaz (Myeloperoxidase, MPO; EC 1.11.1.7) enziminin aktivite tespit deneyleri MPO aracılı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile yapılan oksidasyon için substrat olarak 4-aminoantipyrine (4-AAP)/phenol solusyonu kullanılarak yapıldı.

Deney işlemlerinde; 25mM 4-AAP, %2 phenol, %0.5'lik hexadecyltrimethyl ammonium bromid (HDTMAB), 1.7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanıldı.

%0.5'lik HDTMAB ile homojenize edilen dokular 3220 rpm/45 dakika +4°C'de santrifüje edildi. Üstte kalan ekstrakt süpernatantı alınarak kullanıldı. Deneyin aşamaları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

	Numune
4-AAP-%2 phenol	1.3 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.5 ml
Ekstrakt süpernatantı	0.2 ml

510 nm'de 5 dakika boyunca absorban artışını tespit edildi ve lineer aktivite artışının gözlemlendiği absorban değerleri alınarak hesap işlemleri yapıldı (88).

Hesap işlemleri;  $U/l = [\Delta OD / \Delta t \text{ (dakika)}] \times (3/0.2) \times F$  formülüyle yapıldı.

1 enzim Unitesi; 25 °C'de 1 dakikada 1µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi harcayan enzim olarak gösterildi. Sonuçlar mU/g protein olarak verildi.

### 3.9. İstatistiksel analizler

İstatistikler Windows 95-98 uyumlu SPSS® 7.5 ile yapıldı. Grupların dağılımına Non-parametrik testlerden one-sample Kolmogorov-Smirnov Test ile bakıldı. Dört Grupta da yer alan tüm sonuçlar normal dağılım gösterdiğinden parametrik testlerden one-way ANOVA testi uygulandı, Post Hoc testlerden LSD (Least significant difference) ile gruplar arası anlamlılık incelendi. Gruplar normal dağılım gösterdiğinden korelasyon analizi için Bivariate korelasyon testlerinden Pearson Korelasyon testi kullanıldı ve two-tailed significanta bakıldı. İstatistiksel anlamlılık için p<0.05 olan değerler anlamlı olarak kabul edildi. Değerler ortalama ± standart hata olarak verildi.



#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda sıçan akciğerinde fibrozis oluşturmak üzere i.t. BLM uygulandı. BLM'nin i.t. 7.5 ü/kg tek doz uygulandığında akciğerde yaygın fibrozis oluşturduğu bilinmektedir. Bunun göstergesinde akciğer dokusu hidroksiprolin seviyeleridir. Akciğerin oksidan/antioksidan durumunun göstergesi olarak da süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz aktiviteleri, lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak malondialdehit seviyeleri ve nötrofil göçünün göstergesi olarak da myeloperoksidaz aktiviteleri ölçüldü. Bulgular tablo 1 de verilmiştir.

**Tablo 1:** Gruplarda akciğer dokusunda hidroksiprolin, enzim ve malondialdehit sonuçları

	Gruplar	OH-P mg/g kuru doku ± SEM	SOD U/mg protein ± SEM	GSH-Px U/g protein ± SEM	MDA nmol/g yaş doku ± SEM	MPO mU/g protein ± SEM
I	Kontrol	13.274 ± 0.464	0.237 ± 0,014	6.161 ± 0.309	456.0 ± 19.3	54.82 ± 5.19
II	BLM	22.688 ± 0.525	0.179 ± 0.007	2.711 ± 0.202	766.3 ± 29.6	96.22 ± 6.23
III	BLM+E vit	17.776 ± 0.473	0.185 ± 0.010	3.567 ± 0.284	585.3 ± 34.8	92.27 ± 9.94
IV	BLM+Erd	10.160 ± 0.420	0.191 ± 0.009	4.501 ± 0.184	466.2 ± 19.8	55.15 ± 3.49

#### P değeri

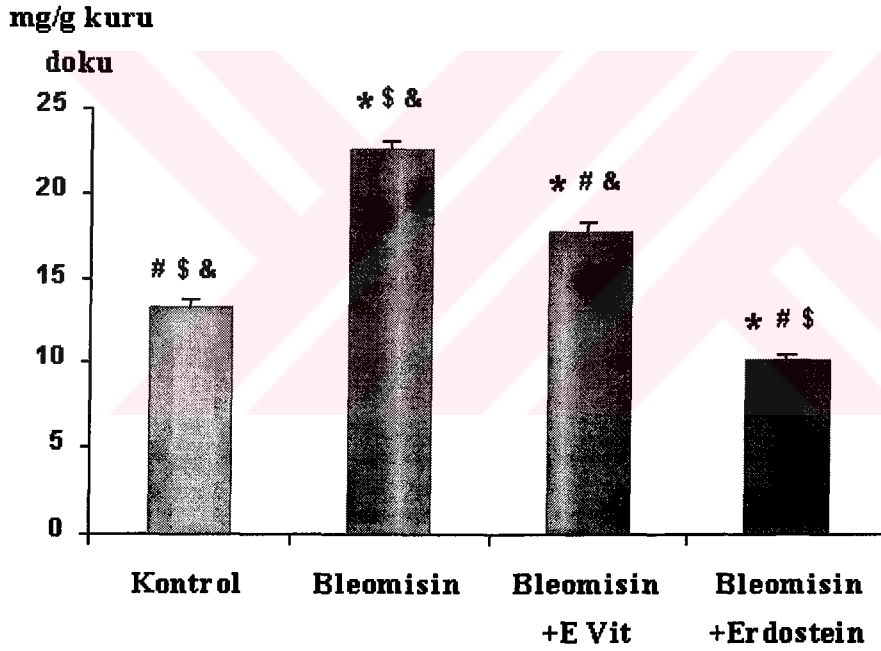
I-II	0.0001	0.0001	0.001	0.0001	0.0001
I-III	0.0001	0.001	0.001	0.002	0.0001
I-IV	0.0001	0.003	0.001	AD	AD
II-III	0.0001	AD	0.019	0,0001	AD
II-IV	0.0001	AD	0.0001	0.0001	0.0001
III-IV	0.0001	AD	0.009	0.003	0.0001

(AD: anlamlı değil, BLM: bleomisin, E vit: E vitamini, Erd: erdostein, OH-P: hidroksiprolin, SOD: süperoksit dismutaz, GSH-Px: glutatyon peroksidaz, MDA: malondialdehit, MPO: myeloperoksidaz, SEM: standart hata)

Tabloda verilen bulgular anlama ve değerlendirmeyi kolaylaştırmak amacıyla çalışılan her bir parametre için ayrı bir grafik hazırlanıp aşağıda gösterilmiştir.

#### 4.1. Akciğer dokusu hidroksiprolin miktarları

OH-P seviyeleri şekil 1'de gösterilmiştir. OH-P seviyesi BLM grubunda kontrol grubuna göre artmış ve bu artış istatistiki olarak anlamlı bulundu ( $p<0.0001$ ). E vit grubunda BLM grubundaki kadar yüksek artış söz konusu değilse de diğer üç gruba göre anlamlı şekilde farklı bulundu ( $p<0.0001$ ). Erdosteine grubunda ise BLM grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde azalmış ( $p<0.0001$ ), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrol seviyesininde altında olduğu için anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p<0.0001$ ). E vit grubu ile erdosteine grubu karşılaştırıldığında ise erdosteine grubu anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p<0.0001$ ).

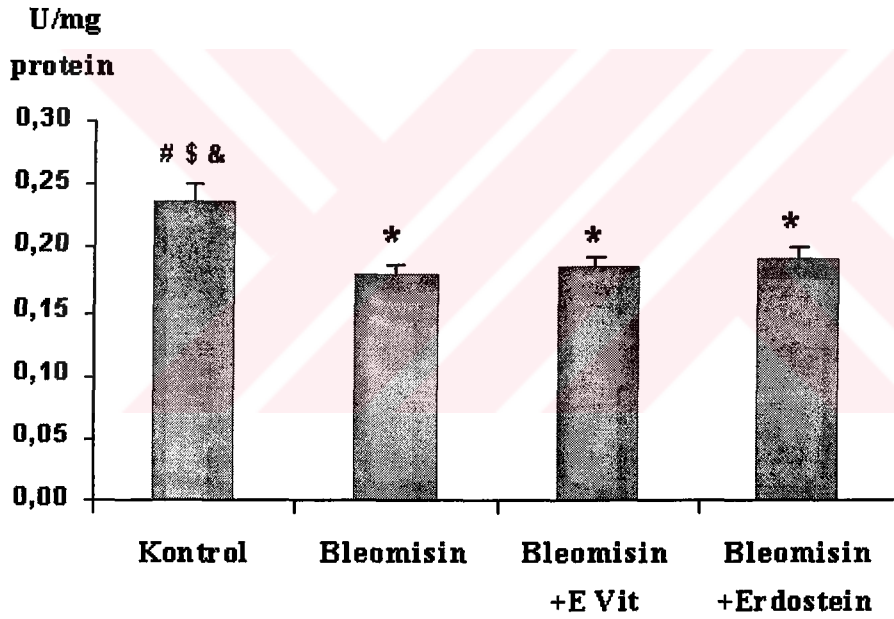


**Şekil 1:** Kontrol, BLM, E vit ve erdosteine gruplarında OH-P seviyeleri.  
(Not: Hata çubukları SEM değerlerini yansıtmaktadır.)

- \*  $p<0.05$  Kontrol grubuna göre
- #  $p<0.05$  BLM grubuna göre
- \$  $p<0.05$  BLM + E Vit grubuna göre
- &  $p<0.05$  BLM + Erdosteine grubuna göre

#### 4.2. Akciğer dokusu SOD aktiviteleri

SOD aktiviteleri şekil 2’de gösterilmiştir. SOD aktivitesi BLM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde ( $p<0.0001$ ) azalmıştır. E vit ve erdostein ise azalan bu aktiviteyi bir miktar arttırmıştır ancak bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bulunmamıştır. BLM, E vit ve erdostein gruplarının üçündeki aktiviteler de kontrole göre anlamlı şekilde azalmış olarak bulundu (sırası ile  $p<0.0001$ ,  $p<0.001$  ve  $p<0.003$ ). BLM, E vit ve erdostein gruplarındaki sıçanlarda SOD aktivitesi kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunmadı.

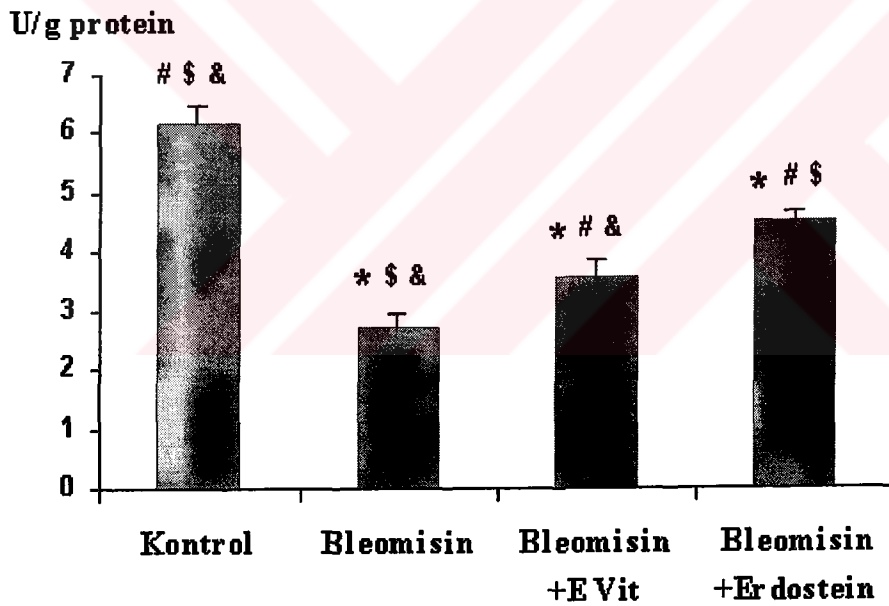


Şekil 2: Kontrol, BLM, E vit ve erdostein gruplarında SOD aktiviteleri.

- \*  $p<0.05$  Kontrol grubuna göre
- #  $p<0.05$  BLM grubuna göre
- \$  $p<0.05$  BLM + E Vit grubuna göre
- &  $p<0.05$  BLM + Erdostein grubuna göre

### 4.3. Akciğer dokusu GSH-Px aktiviteleri

GSH-Px aktiviteleri şekil 3’de gösterilmiştir. Bütün gruplarda GSH-Px aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde azalmış olarak bulundu (her 3 grup için  $p<0.001$ ). Enzim seviyesinde azalma en fazla BLM grubunda görülmüştür. Diğer gruplar karşılaştırıldığında E vit BLM grubundaki bu azalmayı anlamlı olacak şekilde yükseltmiş ( $p<0.019$ ) ancak kontrol seviyesinden uzak kalmıştır. Erdosteine ise bu azalmayı kontrol grubu seviyesine çıkarmasa da E vit’den daha fazla olarak oldukça etkili bir şekilde yükseltmiştir ( $p<0.0001$ ). E vit ile erdosteine karşılaştırıldığında aralarında anlamlı olacak şekilde ( $p<0.009$ ) fark bulundu.

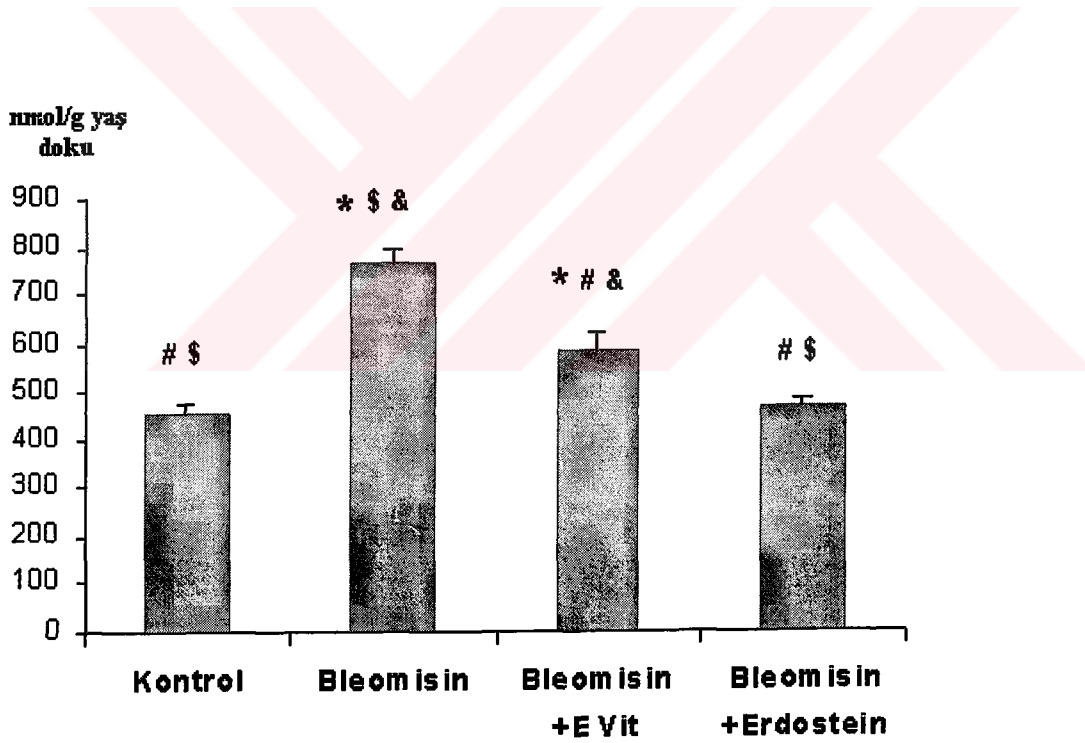


Şekil 3: Kontrol, BLM, E vit ve erdosteine gruplarında GSH-Px aktiviteleri.

- \*  $p<0.05$  Kontrol grubuna göre
- #  $p<0.05$  BLM grubuna göre
- \$  $p<0.05$  BLM + E Vit grubuna göre
- &  $p<0.05$  BLM + Erdosteine grubuna göre

#### 4.4. Akciğer dokusu MDA miktarları

MDA seviyeleri şekil 4’de gösterilmiştir. BLM grubu MDA miktarları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ve oldukça yüksek bulunmuştur ( $p<0.0001$ ). BLM ile E vit grubu karşılaştırıldığında BLM grubundaki artışı E vit’in istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalttığı ( $p<0.0001$ ) bulundu. MDA değerleri kontrol grubuna yaklaşmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde hala yüksek olduğu bulundu ( $p<0.002$ ). Erdosteine ile BLM grupları karşılaştırıldığında ise MDA seviyeleri anlamlı şekilde azalmış olarak bulundu ( $p<0.0001$ ). Erdosteine ile kontrol grubu karşılaştırıldığında ise aralarında anlamlı bir fark bulunmadı. E vit ile erdosteine grubu karşılaştırıldığında, E vit grubu MDA seviyeleri erdosteine grubundan anlamlı olacak şekilde yüksek bulundu ( $p<0.003$ ).

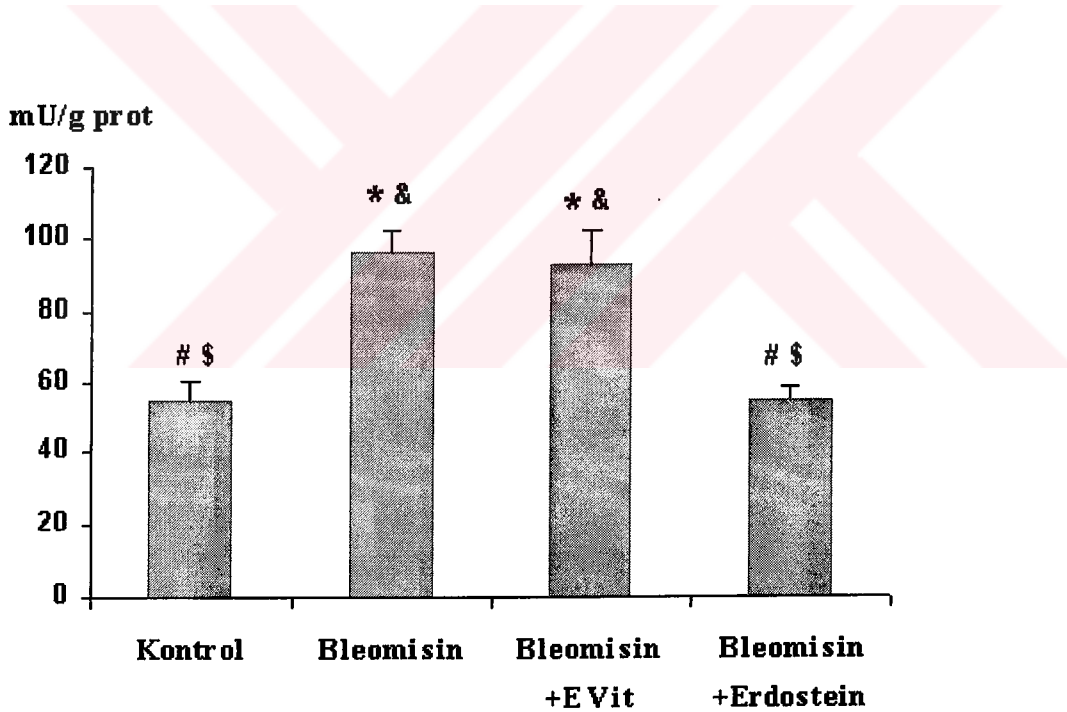


Şekil 4: Kontrol, BLM, E vit ve erdosteine gruplarında MDA miktarları.

- \*  $p<0.05$  Kontrol grubuna göre
- #  $p<0.05$  BLM grubuna göre
- \$  $p<0.05$  BLM + E Vit grubuna göre
- &  $p<0.05$  BLM + Erdosteine grubuna göre

#### 4.5. Akciğer dokusu MPO aktiviteleri

MPO aktivite sonuçları Şekil 5’de gösterilmiştir. BLM grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde MPO seviyelerinin yaklaşık 2 kat arttığı bulundu ( $p<0.0001$ ). BLM ile E vit grubu karşılaştırıldığında MPO miktarları arasında anlamlı bir fark yoktu ve iki grup hemen hemen aynı değerlere sahipti. E vit ile kontrol grubu karşılaştırıldığında oldukça yüksekti ve anlamlı bir şekilde fark vardı ( $p<0.0001$ ). Erdosteine grubu BLM ile karşılaştırıldığında MPO seviyelerinde anlamlı bir azalma ( $p<0.0001$ ) bulunup, bu seviyeler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hemen hemen aynı olup aralarında anlamlı bir fark yoktu. E vit ile erdosteine grubu karşılaştırıldığında erdosteine grubu anlamlı şekilde düşük seviyelerde MPO değerlerine sahipti ( $p<0.0001$ ).



Şekil 5: Kontrol, BLM, E vit ve erdosteine gruplarında MPO aktiviteleri.

\*  $p<0.05$  Kontrol grubuna göre

#  $p<0.05$  Bleomisin grubuna göre

\$  $p<0.05$  Bleomisin + E Vit grubuna göre

&  $p<0.05$  Bleomisin + Erdosteine grubuna göre

Yapılan korelasyon analizleri sonucunda, Grup 2'de MDA ile OH-P arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur ( $r = -0.705$ ,  $p = 0.034$ ). Grup 3'de, MPO ile SOD ve MPO ile OH-P arasında negatif bir korelasyon gözlenmiştir (sırasıyla  $r = -0.728$ ,  $p = 0.026$ ;  $r = -0.700$ ,  $p = 0.036$ ). SOD ile GSH-Px ve MDA ile OH-P arasında ise pozitif bir korelasyon bulunmuştur (sırasıyla  $r = 0.766$ ,  $p = 0.016$ ;  $r = 0.682$ ,  $p=0.043$ ). Grup 4'de MDA ile GSH-Px arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir ( $r = 0.722$ ,  $p = 0.028$ ).



## 5. TARTIŞMA

Bu deneysel çalışmada BLM ile başarılı bir şekilde akciğer fibrozisi oluşturuldu. BLM'nin dozu, fibrozis oluşturma süresi ve şekli deney öncesinde ön çalışmalar yapılarak optimize edildi. BLM uygulanan sıçanlar 14. günün sonunda anestezi altında açıldığında makroskopik olarak fibrozisin olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu ve BLM uygulanan gruplardaki doku hidrokspirolin değerleri fibrozisi tam olarak destekledi. E vit doku OH-P düzeyini BLM grubu değerlerine göre düşürmüştü ancak bu düşürme erdosteine grubu kadar bariz bulunmamıştır. Erdosteine ise doku OH-P düzeyini anlamlı olarak düşürmüştü, hemen hemen kontrol grubu ile aynı düzeylerde tespit edilmiştir.

Antioksidan enzimler olan SOD ve GSH-Px birbirinden farklı şekilde etkilenmiştir. SOD aktivitesi hiçbir deney grubunda diğerlerinden anlamlı olacak şekilde farklı bulunmamıştır. GSH-Px aktivitesi BLM grubunda kontrole göre anlamlı derecede azalmış, E vit ve erdosteine gruplarında ise kontrol grubu değerlerine ulaşmasa da BLM grubuna göre artmıştır.

Doku düzeyinde yapılan analizlerde OH-P seviyesinden sonra en göze çarpıcı bulgular MDA düzeylerinde elde edilmiştir. BLM uygulanması ile doku MDA düzeyi yaklaşık olarak 1.7 kat artmıştır. Bu anlamlı artış BLM'nin oksidatif stresi önemli ölçüde artırdığının bir göstergesi olabilir. E vit ve erdosteine BLM ile birlikte uygulandığında MDA düzeyleri kontrol düzeyine yaklaşacak şekilde gerilemiştir. Ancak bunlardan erdosteine etkisi daha dikkat çekici olarak bulundu.

Akciğer dokusuna PMNL göçünün önemli bir göstergesi olan MPO aktivitesi yaklaşık iki kat artmıştır. BLM ile birlikte E vit uygulanması MPO düzeyinde herhangi bir değişikliğe sebep olmamıştır. Halbuki erdosteine uygulanması MPO düzeyini kontrol değerlerine kadar geriletmiştir. Bu sonuçlardan hareketle E vit'in kısmen, erdosteine ise baskın derecede BLM ile oluşturulan fibrozisi yavaşlatabileceği veya en azından fibrozisin alt yapısını oluşturan birbirinden farklı mekanizmaları dokunun lehine olacak şekilde değiştirebileceği söylenebilir.

Akciğer fibrozisi akciğer parankiminde kollajen proteinin aşırı bir şekilde artması ve akciğerin normal fonksiyonlarının kısıtlanması olarak tarif edilmektedir. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda inflamasyon bu patolojik gidişin önemli bir sebebi olarak gösterilmiştir (89). Sonuçta total akciğer kapasitesi, maksimum hava alıp genişleme kapasitesi ve oksijenlenme başarısı azalır. Bu tip hastalarda görülen



ilk belirtiler hipoksi nedeniyle ortaya çıkan aşırı solunum yapma isteğidir (hiperkapni).

Hastalarda ve deney hayvanlarında oluşturulan fibrozis modellerinde yapılan histolojik ve morfolojik çalışmalar, fibrozisin alveol membranlarının kalınlaşmasıyla başladığını ve ardından koagülasyon kaskadının devreye girerek olayı ilerlettiğini göstermiştir (90). Ardından meydana gelen alveol içi anormal bir sıvının birikmesini takiben PMNL'lerin olay yerine göçü söz konusu olur. Bu son durum inflamasyonun başlaması anlamına gelir ki, interstisyumun etkilenmesi ile fibrozis gelişmeye başlar. Burada aktive olan önemli başka bir mekanizma ise myofibroblastların epitel bazal membranındaki aralıklardan geçerek luminal yüzeye ulaşması ve burada proliferasyon olmasıdır. Bütün bu ardışık olarak gelişen patolojik süreçler; yani hasar, koagülasyon, inflamasyon ve fibrozis, temel olarak akut akciğer yaralanmalarında gözlenen değişimlerdir. Ancak burada gelişen olaylar akciğeri tamir yönünde geliştiği için sonuçta herhangi bir solunum kaybı ve akciğer patolojisi gelişmemektedir. Silikoz ve asbestozda olduğu gibi subakut ve kronik akciğer hastalıklarında ise olay tamir olarak algılanmaz. Akciğer her ne kadar savunma amacıyla içerdiği sistemleri harekete geçirirse de sonuçta geriye dönülmez sekellerin olduğu fibrozis meydana gelir (91).

Doku ve organ seviyesinde gelişen bu fibrozisin en ince detayları bile çalışılmış olup sürecin bütün safhaları hemen hemen aydınlatılmıştır. Ancak hücresel seviyede fibrozisi tetikleyen ve ilerlemesine katkıda bulunan mekanizmalar tam anlamıyla ve kesin olarak ortaya konulmamıştır. En çok üzerinde durulan kimyasal mekanizmalar, ROS ve aktive olmuş proteazlardır. Mitokondrilerde gerçekleşen elektron transport zincirinin iki noktasında elektron akışı sırasında elektronların bir sonraki transport elemanına değil de kaçak olarak moleküler oksijene aktarılması sonucu süperoksit radikalleri oluşur. Normal koşullarda bunun bir önemi yoktur. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler stresi uzaklaştırarak ortamı denge halinde tutmaktadırlar.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda BLM'nin esas olarak hangi ana ve/veya yan yolları kullanarak fibrozis oluşturduğu üzerinde durulmuştur. Koslowski ve ark. (78) sıçan akciğerinde oluşturdukları deneysel BLM kaynaklı fibroziste kronik inflamasyon gözlemlemişler. Akciğer dokusunda ve alveol makrofajlarında katepsin L, B, H ve S düzeylerinin şiddetle yükseldiğini bulmuşlardır. Akut inflamasyon

periyodunda akciğer dokusu metalloelastaz aktivitesinde on kat bir artış tespit etmişlerdir. Yapılan bazı araştırmalarda silikon tozu (92) ve radyasyon (93) maruziyetinde BLM benzeri yollarla fibrozis olduğu tespit edilmiştir. Fibroblastlar ve düz kas hücreleri oldukça yüksek oranda jelatinaz aktivitesi içermekte olup (94) fibrozisin önemli bir bulgu olduğu sarkoidoz vakalarında alveol makrofajlarında bu enzim tespit edilmiştir (95). Nötrofil elastazı pulmoner fibrozisli hastalarda önemli rol oynamaktadır (96). Elastaz aktivitesinin *in vivo* olarak inhibe edilmesi ise büyük ölçüde hastalığın gelişimini geciktirmektedir (97). Gen delesyonu ile nötrofil elastaz aktivitesinden yoksun hale getirilmiş farelerde yapılan bir araştırmada BLM kaynaklı bir fibrozisin gelişmediği ve deney hayvanlarının bu yolla oluşan fibrozise dirençli olduğu gözlemlenmiştir (98,99).

Protein C metabolik yolu koagülasyon sisteminde önemli regülatör olarak görev yapmaktadır. Bu zimojen antikoagülan molekül endotel hücreleri, monositler ve trombositlerin fosfolipit yüzeyinde bulunan trombomodulin-trombin kompleksi ile aktive protein C'ye çevrilir (100). Aktive protein C koagülasyon faktörlerinden faktör V(a) ve VIII(a)'nın proteolitik inaktivasyonunu katalizleyerek antikoagülan aktivite gösterir. Bazı araştırmalarda aktive protein C'nin TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerin ekspresyonunu modüle ederek ve nötrofil aktivasyonunu bloke ederek inflamatuvar cevapta rol oynadığı gösterilmiştir (101). Son olarak yapılan bir çalışmada aktive protein C'nin i.t. olarak uygulanmasının BLM kaynaklı akciğer fibrozisini inhibe ettiği gösterilmiştir (102).

ROS'un akciğer hasarı ve fibrozisinde rol oynadığı en iyi silikon tozları ile yapılmış çalışmalarda ortaya konmuştur. Bu tozlar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sup>-</sup>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, <sup>•</sup>OH gibi ROS ürünleri oluşturarak akciğer hasarına sebep olmaktadır (103). Yine bununla bağlantılı olarak silikon partiküllerinin lipid peroksidasyonu oluşturduğu hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak gösterilmiştir (104). Diğer taraftan silikon partiküllerinin serbest radikal reaksiyonları yoluyla olduğu tahmin edilen bir mekanizma ile DNA çift zincir kırılmaları, deoksiguanozin hidroksilasyonu ve timin glikol formasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (105). Silikonun bu etkileri büyük oranda serbest radikal üretimi ile çok yakın ilişkisi bulunan NF-kB (nükleer transkripsiyon faktör B) üzerinde gerçekleşmektedir. Silikonun fare makrofaj hücre kültürü olan RAW 264.7 hücrelerinde NF-kB'yi aktive ettiği gösterilmiştir (106). NF-kB indüksiyonundan sonra bir seri reaksiyonla inflamasyonda önemli rol oynayan bazı interlökinler aktive

olmaktadır. Ayrıca prostaglandin E<sub>2</sub> sentezinde görev alan siklooksijenaz II enzimi aktive olarak membran seviyesinde daha fazla serbest radikal üretilmektedir (107).

Sıçanlarda oluşturduğumuz bu fibrozis modelinde, erdosteinin akciğerleri, hem makroskopik hem de biyokimyasal parametreler göz önüne alındığında koruduğu göze çarpmaktadır. Erdosteinin hangi mekanizma üzerinden böyle bir etki oluşturduğu henüz açık değildir. Çalışmamız fibrozis modeline erdosteinin etkinliğini araştıran sınırlı sayıda araştırmalardan birisi olduğundan temel mekanizmayı izah edici bulgular çok büyük önem kazanmaktadır. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda erdosteinin ekspektoran ve mukolitik aktivitelerinden başka en önemli etkilerinden birinin de nötrofil fonksiyonları üzerine yaptığı etkiler olduğu bildirilmiştir. Solunum sistemi bir bütün olarak değerlendirildiğinde akciğerler internal bir organ olarak görev yapmakta, hem üst solunum yollarıyla çevresel etkilere hem de yoğun damarsal yapısından dolayı organizma içi endojen etkilere maruz kalmaktadır (108).

Solunum havası bakteri, virüs ve polenler gibi birçok biyolojik organizmayı, fiziksel (iyonize edici ajanlar, lifler, silika/asbestoz ve tozlar) ve kimyasal çevre kirleticileri (gazlar, NO, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> vs.) içermektedir. Bunların hepsi ROS üretimini direkt veya indirekt olarak artırabilen ajanlardır. Akciğerler hem humoral hem de hücresele birçok koruma sistemine sahiptir. Örneğin akciğerlerin alveoler makrofajları ve damar yapılarından dokuya difüze olabilen PMNL dokuyu koruma amaçlı olarak fagositoz ile birlikte inflamatuvar bir cevap başlatabilmektedir. Bu yolla spesifik bir stimulusla aktive olan PMNL'ler ve makrofajlar oksitativ patlama veya solunum patlaması adı verilen bir reaksiyonlar zincirini oluşturmaktadır. Dolayısı ile ajan patojen veya kimyasal indükleyiciden koruma sağlanırken bir yandan da akciğer dokusu zarar görmektedir. Akciğer fibrozisi incelendiğinde BLM'nin kimyasal bir indükleyici gibi davranarak akciğer parankimine ve alveolere PMNL göçünü artırdığı gösterilmiştir. Bu açıdan PMNL göçünü önleyen her tedavi edici ajan fibrozis gelişimini de etkin bir şekilde yavaşlatacaktır.

Yapılan bir çalışmada her ne kadar klinik bulgular açık olmasa da erdosteinin met I formunun antiinflamatuvar özellikler gösterdiği ve bu yönüyle birçok pulmoner hastalıkta kullanımının faydalı olacağı sonucuna varılmıştır (109). Uzun süreli sigara içme alışkanlığının periferale nötrofillerin özellikle kemotaktik fagositik ve bakterisidal kapasitesi üzerine olumsuz etki oluşturduğu gösterilmiştir. Erdosteinin

taşıdığı -SH grubu nedeniyle antioksidan özellik gösterdiği için periferel nötrofillerin bu fonksiyonları üzerine regüle edici ve koruyucu etkilerinin olabileceği düşünülmüş ve yapılan bir araştırmada (110) sigara içen sağlıklı bireylerin PMNL'si üzerine erdosteinin kemotaksisi düzenleyici yönde etki ettiği gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada sigaranın direkt etkisiyle serbest oksijen radikallerinin bazı biyolojik yapılar üzerine olan toksik etkilerinin erdosteinin -SH gruplarından kaynaklanan antioksidan etki ile azaldığı bulunmuştur. Sigaranın bu yan etkileri üzerine antioksidan karakterli maddelerin koruyucu etkisi yapılan birçok araştırma ile gösterilmiştir. Bunlar daha çok reaktif serbest -SH grupları taşıyan antioksidan karakterli maddelerdir (111,112). Erdostein ile bu maddelerin en büyük benzerliği -SH grupları içermesidir. Bu çalışmayı daha önceden yapılmış birçok çalışma desteklemektedir (113,114).

Aktive olmuş akciğer nötrofillerinden salgılanan ve sigaranın direkt etkisi ile oluşan ROS'un AAT'yi inaktive ettiği bilinmektedir (115). Bunun yanında AAT'nin EİK'daki azalma üzerine metionin bakiyelerinin oksidasyonunun sebep olduğu (116), geri dönüşüm içinde (EİK de artma) koruyucu veya tamir edici enzim ve kimyasal ajanların gerekli olduğu bilinmektedir (117). Bu verilerden hareketle akciğerleri serbest radikal kaynaklı hasardan korumak için doku antioksidan seviyesinin önemli olduğu sonucuna varılabilir. Bu amaçla yapılan bir *in vitro* çalışmada insan AAT'si üzerine erdosteinin koruyucu etkisi araştırılmış ve sonuç olarak sigaradan kaynaklanan oksidatif akciğer hasarının önlenmesinde kullanımının faydalı olacağı bulunmuştur (53). Araştırmacılar bunu erdosteinin bir elektron donörü gibi davranarak indirgeyici özellik göstermesine veya direkt olarak peroksinitritlerle reaksiyona girerek gösterdiği antioksidan etkisine bağlamışlardır. Oluşturulan peroksinitritlerin insan  $\alpha$ 1-proteinaz inhibitörlerinin antielastaz aktivitesini inaktive ettiği ileri sürülen iddialar arasındadır (118).

Erdosteinin PMNL kaynaklı ROS üzerine inhibe edici veya süpürücü etkisinin ortaya konabileceği en güzel çalışma modeli *in vitro* koşullarda bu hücrelerin indüklenerek erdosteinin etkisini araştırmaktır. Nitekim bazı araştırmacılar erdostein ve bunun aktif metaboliti olan Met I'in forbol miristat asetat (PMA) ile indüklenmiş insan nötrofilleri, sıçan nötrofilleri ve Guinea pig eozinofillerinin ürettiği lüminal bağımlı kemilüminesan (LDCL) üzerine etkisini göstermek için *in vitro* bir çalışma planlamışlardır (80). Buna göre PMA indüksiyonu başarı ile

oluşturulmuş ve sıçan nötrofilleri esas alındığında erdosteinin deney sistemine indüksiyondan 10 dakika önce ilave edilmesi ile LDCL'nin önemli şekilde inhibe olduğu, aynı etkinin Met I için de geçerli olduğu görülmüştür. Guinea pig periton eozinofillerinde de benzer şekilde çok anlamlı LDCL inhibisyonu gözlenirken, insan nötrofillerinde hafif ve önemli olmayan bir azalma tespit edilmiştir. Bununla beraber insan nötrofillerinde Met I'in LDCL üzerine önemli inhibe edici etkisi olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar Met I'in direkt süpürücü bir etkisinin olup olmadığını ortaya koymak için deney ortamına PMA'dan 10 dakika önce değil de PMA ilavesinden sonra eklemişler, LDCL'de istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit etmişlerdir. Bu azalma GSH'ın oluşturduğu azalmayla hemen hemen aynıdır.

Akciğerler ile ilgili problemlerin bir çoğundan esas sorumlu olarak nötrofiller tutulmaktadır. Sigara içiminden sonra akciğerin hem alveollerinde hemde parankiminde gelişen akut inflamatuvar reaksiyon, arkadan gelen patolojilerin öncüsü olarak kabul edilmektedir (119). Yapılan çalışmalar sigara içicilerin lokositozise sahip olduğunu ortaya koymuştur (120). Diğer taraftan sigarayla bağlantılı olarak gelişen amfizemin altında yatan asıl sebebin PMNL'lerin akciğer dokusuna ve alveollere göçü olduğu iddia edilmiştir. Akciğerlerdeki proteaz-antiproteaz dengesinin bozulması ve proteolitik atağın başlaması ile amfizem gelişmektedir (121).

Sigaranın proteaz-antiproteaz dengesine PMNL yolu ile etki ederek amfizem oluşturması, ameliyat olarak akciğerinin bir lobu veya bir kısmı çıkarılan sigara içicilerde detayıyla açığa kavuşturulmuştur (122). Bu akciğer dokusu örneklerinde PMNL sayısı sigara içmeyenler veya bırakanlara göre oldukça yüksek bulunmuştur.

Akciğerlerin mukosilyer aktivitesi sigara içimi, sülfürdioksit, sülfürik asit, formaldehit ve metallere etkilenebilmektedir (123). Bunların dışında HCl ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'e direkt maruziyetin mukosilyer transportu inhibe ettiği gösterilmiştir (124). Son olarak Hosoe ve ark. yaptıkları çalışmada erdosteinin sıçanlarda mukosilyer aktiviteyi ve temizlenmeyi artırdığı, bronkoalveoler lavaj sıvısında nötrofillerin sayısını azalttığı ve bu yolla inflamasyonun azalmasına katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca erdostein; lipopolisakkarit verilerek nötrofil aktivasyonu sağlanmış sıçanlarda bronkoalveoler sıvısının volümünü kontrol seviyesine getirmiştir. Bu sonuç erdosteinin bronkokonstrüksiyonu baskıladığı anlamına gelmektedir. Erdostein bir bronkodilatör olmadığı için bu etkisinin indirekt bazı diğer faktörlere bağlı

olabileceği düşünülmüştür (81). Sonuçta bu etkinin yukarıda bahsi geçen konularda da açıklandığı gibi erdosteinin antiinflamatuvar ve antioksidan etkilerine bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Alveoler makrofajlardan, alveollere ve parankime invaze olan inflamatuvar hücrelerden sentezlenen oksijen radikalleri düz kas konstrüksiyonunu artırmakta ve vasküler permeabilityi yükseltmektedir (125). Diğer taraftan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> araşidonik asidin salınımını ve bronkokonstrüksiyonu indüklemektedir (126). Erdosteinin antioksidan (127) ve radikal süpürücü etkileri göz önüne alındığında bronkokonstrüksiyonu nasıl engellediği ve hangi sebeple olursa olsun meydana gelebilecek obstrüksiyonu ortadan nasıl kaldırdığı daha iyi anlaşılmaktadır. BLM kaynaklı fibrozisin gelişiminde önemli mekanizmalardan birinin de üretilen aşırı serbest radikaller olduğu daha önceki bölümlerde bahsedilmiştir. Fibrozis gelişmeden hemen önceki olaylar zincirinde de zaten bronkokonstrüksiyon ve alveol içi sıvı viskozitesinin artması mevcuttur. Çalışmamızda erdosteinin fibrozis oluşumunu geciktirmesi veya engellemesinde, indirekt yoldan oluşturduğu bronkodilatasyon ve kan akımını normalize etmesinin etkili olabileceği akla gelmektedir. Diğer taraftan aynı çalışmada araştırmacılar lipopolisakkarit verilen sıçanlarda albümin sızıntısı, mukopolisakkarit hipersekresyonu ve inflamatuvar hücrelerin denaturasyonu etkilerini gözlemlediler. Erdostein muhtemelen mukopolisakkarit hipersekresyonu ve albümin sızıntısı üzerine etki etmeyip direkt olarak antiinflamatuvar etki ile patolojiyi düzeltici yönde etki göstermiştir.

ROS'un birçok akciğer hastalığı patofizyolojisinde önemli fonksiyonlar üstlendiği konusunda sürekli yeni deliller bulunmaktadır (42). Çevresel toksinlere maruz kalma sonucunda gelişen karakteristik akciğer hastalıkları olan RDS, astım, hava yolu hiperaktivitesi ve akciğer fibrozisi antioksidan tedavi ile bir dereceye kadar önüne geçilebilen hastalıklardır (128,129). İdiyopatik pulmoner fibrozis gibi fibrotik akciğer bozukluklarında hastalığın gelişim aşamalarında ROS'un önemli derecede fonksiyonu olduğu iddia edilmektedir (130). Bu hastalıkta karakteristik olarak alveoler makrofajlarda ve nötrofillerde artma, parankim hücre hasarı ve alveol duvarının fibrozisi gözlenmiştir. BLM toksisitesi aynı yolla kendisini göstermekte, oksijen radikali oluşumu artarak akciğer fibrozisi oluşmaktadır. Artan oksijen konsantrasyonlarında toksisitenin daha da arttığı gözlenmiştir. Bunun dışında BLM'nin demir gibi bazı elementlerle kompleksler oluşturduğu görülmüştür (131). Akciğerde tip II ve daha az olasılıkla tip I epitel hücreleri düşük BLM hidrolaz

aktivitesi göstermekte veya bu enzim hiç bulunmamaktadır (132). Akciğerlerin neden BLM'ye bu kadar hassas olduğunu izah eden bir bulgu da hidrolaz aktivitesinin düşük olmasıdır. Akciğerlerle ilgili yapılan I/R çalışmalarında reperfüzyon aşamasında ödem, vazokonstriksiyon ve lökosit infiltrasyonu gözlemlenmiştir. Bu olaylar kısmen araziidonik asit metabolitleri ile oluşturulmaktadır. Bunun delili ise siklooksijenaz inhibitörlerinin reperfüzyon hasarını minimuma indirmesidir (133). SOD, CAT, dimetil tiyüüre, N-asetil sistein ve allopürinölün koruyucu etkisi gösterilmiştir. Fakat hiçbir mükemmel koruma göstermemektedir (134). Yapılan bazı *in vivo* ve izole perfüze akciğer çalışmalarda I/R hasarı için nötrofillerin mutlaka gerekli olmadığı ortaya konulmuştur (135). Buradan anlaşılmaktadır ki nötrofiller hasarı oluşturan değil hasarın oluşumuna katkıda bulunan hücrelerdir. BLM kaynaklı fibrozisin oluşum mekanizması bazı yönlerden I/R hasarına benzemektedir. Bu açıdan gerek I/R patofizyolojisinin açıklanması gerekse tedavi yaklaşımları aynı zamanda kısmen BLM toksisitesi için de geçerlidir. SOD, CAT gibi antioksidan enzimlerin infüzyon şeklinde sistemik olarak veya direkt olarak akciğer damarlarına BLM ile birlikte verilmesi hem yeni bir tedavi anlayışının oluşturulmasında hemde bu enzimlerin endojen fonksiyonlarının açığa kavuşturulmasında önemli katkıda bulunacağından ileride bu tip çalışmaların yapılması yol gösterici olacaktır.

Kollajenin yapısında yaklaşık %30 oranında OH-P bulunmaktadır. Yapısındaki amino asitleri formülize etmek gerekirse OH-P-X-Y şeklinde gösterilebilir. Ekstrasellüler matrikste kollajen yapımının artması ile OH-P seviyesi artar. Kollajen açısından amino asitler ayrı bir özellik göstermektedir. Alveoller arası septumda lokalize olan kollajen, elastin ile oldukça esnek bir yapı kazanan alveollerin fazlaca gerilmesini önleyerek sağlam kalmasını sağlar. BLM ile oluşturulan fibrozis modelimizde özellikle doku makrofajlarının ve invaze olan PMNL'lerin etkisi ile interalveoler septum bağ dokusunda normalde bulunan fibroblastlar kollajen sentezini artırır. Böylece başlangıçta sadece alveollerin hareketini sınırlayan sertleşme zamanla tamamen dokunun yapısını bozar. Normal alveoler yapı tamamen ortadan kalkar.

Vücutta E vit düzeyinin düşük olması immün hücre membranlarının stabilizasyonunun bozulması ve prostaglandinler gibi immün supresör ajanların üretimini artırır (136). Bir çalışmada farelerin diyetine 500 mg/kg oral E vit

eklenmesi immün cevabı birkaç yönden geliştirmiştir. Fareler uzun süre (6 ay) antioksidan tedaviye alındıktan sonra İnfluenza virüsü ile nazal olarak infekte edildiğinde yalnızca E vit ile beslenen farelerde vücut ağırlığı azalmamış ve akciğer virüs titresinde önemli azalma görülmüştür. E vit'in bu pozitif etkileri virüsün temizlenmesinin artması ile gerçekleşmekte ancak inflamatuvar aracılardan modülasyonunda herhangi bir aracı rolü üstlenmemektedir. E vit glutatyon ile kombine edilerek kullanıldığında farelerde tek başına verildiğinde elde edilen immün sistemdeki düzelme ortadan kalkmış, buna karşılık karaciğerin MDA ve 4 hidroksinonenal düzeyleri azalmıştır. Yaşlı insanlarda diyetle uzun süreli E vit suplementasyonu yapıldığında immün cevap gelişmiştir (137). Laughton ve ark. BLM kaynaklı fibrozis modeli ile yaptıkları çalışmalarda E vit'in BLM kaynaklı DNA hasarına karşı koruyucu olduğunu (138) göstermişler ve benzer olarak hamster da E vit eksikliğinin BLM ile oluşturulan akciğer hasarını hızlandırdığını göstermişlerdir. Kılınç ve ark. mekanizmasını tam olarak açıklayamamakla birlikte E vit verilmesinin subkutan olarak uygulanan BLM'nin fibrotik etkilerini önemli derecede azalttığını bulmuşlardır. Bundan hareketle de yüksek dozda E vit verilmesini BLM tedavisi alan hastalara fibrozisi geciktirme veya engelleme yönüyle katkısının olabileceğini ileri sürmüşlerdir (139). E vit'in günde tek doz 10 mg/kg uygulanması OH-P düzeyini kontrol düzeyine çekemese de BLM ile oluşturulan fibrozisi yavaşlatacak derecede bir etkinlik göstermiştir. Erdosteinin ise OH-P düzeyini çok etkin bir şekilde azaltması nedeniyle BLM'ye bağlı fibrozisi engellemede oldukça etkin fonksiyon gördüğü açıktır.

Süperoksit dismutaz bütün organ ve dokularda olduğu gibi akciğerde de önemli derecede eksprese edilmekte ve hücrel savunmada önemli fonksiyonlar üstlenmektedir. Akciğer ve eritrositlerde SOD'un çok önemli anahtar bir fonksiyonu vardır. Çünkü bu iki sistemin hücreleri oksijene diğer organ ve dokularda olduğundan çok daha fazla maruz kalırlar. Moleküler oksijene bir elektron ilavesi ile rahatça sentezlenebilen  $O_2^-$  diğer radikallerin oluşmasına da öncülük edeceğinden bu ilk aşamada detoksifiye edilmesi önem kazanmaktadır. BLM uygulanan sıçanlarda akciğer doku SOD aktivitesinin azalması birkaç anlam taşıyabilir:

1. Antikanser bir ilaç olarak bazı kanser türlerinde oldukça yaygın kullanılan BLM nükleer DNA'da tek ve çift zincir kırılmalarına sebep olur. Kırılma yaptığı noktaların belli bir baz dizisine spesifik olup olmadığı bilinmemektedir. Dolayısıyla



6. ve 21. kromozomlara lokalize olan sırasıyla Cu, Zn ve Mn-SOD genleri tesadüfi olarak bütünlüğünü kaybetmiş ve SOD ekspresyonu azalmış olabilir. Ancak bunun ortaya konabilmesi için ilgili genin *in vitro* koşullarda amplifiye edilerek kırılma noktalarının gösterilmesi gerekir. Bu sadece SOD proteini için geçerli bir olay olmayıp diğer bütün proteinlerin genleri aynı şekilde bir etkiye maruz kalabilirler. GSH-Px aktivitesinde de BLM grubunda benzer azalmanın bulunması aynı olasılığı akla getirmektedir.

2. Enzimlerin aktif merkezi genel olarak endojen ve eksojen bazı maddelerin etkilerine açık olup bazı maddeler bazı enzimleri geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak inhibe edebilmektedir. Oluşan inhibisyonun kompetitif, nonkompetitif veya unkompetitif olduğunu anlayabilmek için *in vitro* koşullarda bir seri deneyin yapılması gerekir (140). BLM bu şekilde direkt olarak enzim proteinine etki ederek aktiviteyi azaltmış olabilir.

3. BLM hücre içinde bazı sistemleri harekete geçirerek üçüncü moleküllerle inhibisyonu sağlamış olabilir. Yukarıda bahsedildiği gibi bunun tam olarak açığa kavuşturulabilmesi, ilgili enzimin ticari preparatının alınarak *in vitro* koşullarda BLM ile inkübe edilmesi ve aktivitesinin bundan nasıl etkilendiğinin kaydedilmesi gerekir.

E vit ve erdostein BLM ile azalmış olan SOD aktivitesine herhangi bir değiştirici etki yapmamıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki grupta da halen SOD aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Belki de bu ajanların antioksidan karakteri BLM'nin oluşturabileceği bütün patolojik etkileri en baştan kontrol altına alarak SOD aktivitesinin cevap olarak artmasını engellemiş olabilir. Ayrıca, süperoksit radikali SOD enziminin substratıdır. Ortamdaki süperoksit radikal artışı erdostein tarafından engellenmiş olabileceğinden buna bağlı olarak da SOD aktivitesi artmamış olabilir. Bu durum GSH-Px aktiviteleri ile ters gözüktüğü de bu enzimin substratı  $H_2O_2$ 'dir.  $H_2O_2$  ise farklı ve çok çeşitli kaynaklardan köken alabilir.

Bowler ve ark. hemorajinin oluşturduğu akciğer hasarını engellemek için akciğer dokusuna mahsus olmak üzere ekstrasellüler SOD ekspresyonunu artırmışlar ve hemorajiden sonra gelişen akciğer hasarını önlediğini bulmuşlardır (141). Genel olarak ekstrasellüler SOD'un akciğer hasarını önlemesi şu mekanizmalar üzerinden gerçekleşmiştir: NF-kB aktivasyonunun azaltılması ve lipit peroksidasyonunun

azaltılması. Bizim modelimizde de BLM'nin SOD üzerine yaptığı aktiviteyi inhibe edici etki dışardan uygun yollarla SOD verilerek engellenebilir gibi gözükmektedir. Bu açıdan ileriki çalışmalarda aynı modellerde SOD'un sıçanlara verilmesi bu konuyu aydınlatacak ve yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

SOD'un sentezlediği  $H_2O_2$ 'yi suya çevirmekle görevli olan GSH-Px aktivitesi BLM uygulandığında SOD'a benzer şekilde azalmıştır. SOD için geçerli olan yorumların bu enzim içinde geçerli olabileceğini düşünüyoruz. SOD'dan farklı olarak E vit ve erdostein GSH-Px aktivitesini BLM grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artırmıştır. Ancak kontrol düzeyine getirememiştir. Bu açıdan bakıldığında erdostein daha etkin gibi gözükmektedir. Çünkü E vit ve erdostein grupları arasında da GSH-Px aktivitesi bakımından anlamlı farklılık mevcuttur ( $p < 0.011$ ).

Glutasyon bağımlı antioksidan enzim sistemi serbest oksijen radikallerine karşı hücrel korumanın sağlanmasında hem patolojik hem de toksikolojik durumlarda önemli bir yer tutmaktadır. Mitokondriler birçok hücre tipinde hücrel GSH miktarının %10'unu içermektedir. Hiperoksi ve oksidan sistemin arttığı durumlarda mitokondriyal ROS'un artması sonucunda bu organellerin etkili bir GSH redoks siklusuna ihtiyacı vardır. Mitokondriler CAT yönünden fakir olduğundan (142) hidroperoksitleri detoksifiye etmek için GSH-Px'e bağımlı durumdadırlar. Bunun dışında mitokondriler GSH sentez edemediklerinden en önemli GSH kaynakları okside GSH'ın indirgenmesi ve dışarıdan GSH'ın transfer edilmesidir (143). Mitokondriyal GSH'ın baskılanması ise hücrelerin oksidan hasara yatkınlığının artması ile korele bulunmuştur (144). Shan ve ark. hücre korunmasında mitokondriyal GSH'ın kritik bir role sahip olduğunu ve seçici olarak bazı maddelerle mitokondriyal GSH konsantrasyonunun azaltılması sonucunda sıçan hepatositlerinde t-BuOOH (tert butil hidroperoksit) aracılı hücre hasarının arttığını bulmuşlardır (145). Bütün bunların ışığında mitokondriyal GSH/GSSG oranının hücre korunmasında çok önemli olduğu savunulmuştur (146).

BLM ile oluşturulan akciğer fibrozisinde ilk aşamada GSH-Px aktivitesinin azalması bu anti kanser ajanın direkt olarak enzim aktivitesini azaltabileceğini veya indirekt olarak mitokondriyal GSH deplesyonu oluşturarak kofaktör eksikliği üzerinden enzim aktivitesini azaltabileceğini akla getirmektedir. Erdostein ve E vit'in

enzim aktivitelerini olumlu yönde etkilemesi belki de antioksidan etkileri ile mitokondri membranını lipit peroksidasyonu ve ardından gelişecek hasardan koruma mekanizması üzerinden gerçekleşmektedir. Çalışmamızda E vit grubunda SOD ile GSH-Px enzimleri arasında pozitif korelasyon ( $r = 0.766$ ,  $p = 0.016$ ) bulunması bu iki antioksidan enzimin oksidatif stresten birlikte etkilendiğini ve tedavilerimizden olumlu yanıt alındığını göstermektedir.

Rahman ve ark. akciğerin antioksidan defansında GSH'ın kritik bir öneme sahip olduğunu ve özellikle hava yolları epitelinin oksidan hasardan ve inflamasyondan korunmasında esansiyel olduğunu vurgulamışlardır (147). Glutasyonun redoks durumundaki dengesizlikler inflamatuvar akciğer hastalıklarında proinflamatuvar genlerin transkripsiyonuna yol açmaktadır (148). Bu açıdan N-asetil sistein gibi sistein taşıyan bileşiklerin GSH prekürsörü gibi davranması, dolayısıyla tedavi edici olarak kullanılması önerilmiştir. Bu bileşik disülfit bağlarını indirgerken aynı zamanda direkt antioksidan olarak da etki göstermektedir (149). Dolayısıyla erdosteinin GSH-Px aktivitesini indirekt yoldan düzeltmek için verilmesi mantıklı bir tedavi protokolü olabilir. Çünkü bu bileşik GSH'ın sentezine veya redüklenmesine katkıda bulunarak GSH-Px aktivitesini artırabilir.

Bazı çalışmalarda GSH'ın aerosol şeklinde preparatları hazırlanarak inflamatuvar akciğer hastalıklarının tedavisine çalışılmıştır (150,151). Bu faydalı etkisinin yanında özellikle astım hastalarının okside glutasyon oluşumuna bağlı olarak bronkokonstrüksiyon ihtimali bu tedavi şeklinin uygulanma alanını kısıtlamaktadır (152). Sonuç olarak GSH preparatları veya GSH oluşumunu artıracak her türlü preparat BLM kaynaklı akciğer fibrozisi gibi inflamasyonun önemli rol oynadığı akciğer hastalıklarının tedavisine katkıda bulunabilir.

Malondialdehit doymamış yağ asitlerinin oksidatif olarak parçalanması, yani peroksidasyonu sonucu açığa çıkan bir lipit ürünüdür. Bir ortamda yükseldiğinin tespit edilmesi lipit peroksidasyonu olduğunu gösterir. Hücre membranı ve organel membranlarında akışkanlığı sağlayan oldukça fazla miktarda fosfolipit, dolayısıyla bunun yapısında yer alan doymamış yağ asitleri mevcuttur. Oksidan/antioksidan dengenin bozulması ile detoksifiye edilemeyen ROS ilk hedef olarak membran lipitlerini okside etmekte ve başta hücrenin bütünlüğü olmak üzere bütün hücresel fonksiyonları direkt veya indirekt olarak etkilemektedir. Mitokondrilerde üretilen enerjinin (çekirdekli hücreler için geçerli olmak üzere) yaklaşık %70'i membran

bütünlüğünün korunması ve transport işlemlerinin gerçekleştirilmesi için kullanılır. Bu gerçek membranın önemini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda kontrol grubunda ortalama 456 nanomol/gr yaş doku olan MDA doku düzeyinin BLM uygulaması ile 766 nanomol/gr yaş doku düzeyine yükseldiği tespit edilmiş olup BLM'nin lipit peroksidasyon sürecini hızlandırmış olduğu açıkça görülmektedir. Tek başına SOD ve GSH-Px aktivitelerinde gözlenen BLM'ye bağımlı azalma MDA'daki yükselmenin sebebi olabilir. Çünkü süperoksit radikalleri ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, akciğer dokusunda bu enzimlerin aktivitesi düşük olduğundan tam olarak uzaklaştırılmamakta ve ardından lipit peroksidasyonu reaksiyonları zinciri başlamaktadır. E vit ve erdosteine etkin bir şekilde BLM ile oluşturulan MDA artışını tekrar kontrol seviyesine doğru azaltmıştır. Kendi aralarında karşılaştırıldığında erdosteine lipit peroksidasyonunu daha etkin bir şekilde engellemiştir. Kontrol grubu ve erdosteine grubu arasında MDA değerleri açısından istatistiksel farklılık mevcut değildir.

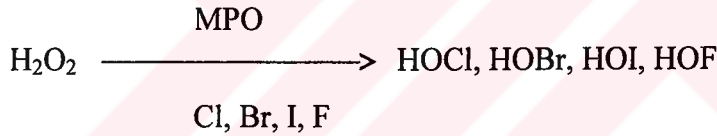
SOD ve GSH-Px aktivitelerini azaltarak indirekt yoldan lipit peroksidasyonunu artırmanın dışında BLM'nin diğer bazı yollar ile de MDA oluşumunu tetiklemesi olasıdır. Birçok araştırmada BLM'nin tedavi edici etkisinin; oluşturduğu serbest radikallere bağlı olarak geliştiği ileri sürülmüştür (37). Dolayısıyla böyle bir ortamda lipit peroksidasyonunun meydana gelmesi doğaldır. Özellikle akciğerler gibi BLM'nin yoğun konsantrasyon olabildiği organlar lipit peroksidasyonu etkisine açık hale gelmektedir. Fibrozis sürecinde MDA'nın sebep veya sonuç olarak fonksiyon görebileceği de olasılık dahilindedir. Çünkü MDA patolojik bir sürecin ürünü olduğu gibi kendisi de toksik özellik taşımaktadır. Sentez edildiğinde hücre membranının iç veya dış kısmında bulunmasına bağlı olarak hücreler arası boşluğa ve dolayısıyla plazmaya geçebileceği gibi hücre içine doğru da yönelebilir. Her iki durumda da bulunduğu ortamdaki kimyasal yapıları bozucu etki gösterebilir. Bu etkiler aktivitesi karaciğerde tespit edilen spesifik aldehit dehidrogenazlarla MDA'nın yok edilmesi zamanına kadar devam eder.

Bu çalışmada MDA düzeyleri aslında lipit peroksidasyonunun bir indeksi olarak alınmıştır. Çünkü tiyobarbitürik asit nonspesifik bir şekilde MDA ile etkileşerek karakteristik pembe rengini oluşturmaktadır. MDA dışında lipit peroksidasyonunun ara ürünleri olan konjuge dienler de TBA ile reaksiyon verebilmektedir. Bu açıdan spektrofotometrik olarak yapılan bazı çalışmalarda lipit

peroksidasyonu göstergesi, tiyobarbitürük asit reaktif ürünleri (TBARS) olarak ifade edilmiştir (152,153). Biz bu çalışmada daha alışılmış ve tanınan bir ifade olduğu için MDA'yı tercih ettik.

Kaynağı ne olursa olsun oksidan hasarın derecesi değişik kaynaklardan ilgili ortama salınan oksidanlarla savunma sistemi olan antioksidan aktivitenin arasındaki dengeye bağlıdır (154). Lipit peroksidasyonu bu dengesizliğin doğal bir sonucu olarak meydana gelmektedir. Akciğer dokusu oksijen ile sıkı bir temas içinde olduğu için serbest oksijen radikali üretim ihtimali uygun koşullar yerine geldiğinde diğer dokulardan daha fazladır. Erdosteine ve E vit kullanılan sıçanların akciğer dokusunda MDA düzeylerinin düşük bulunması her iki kimyasalın da lipit peroksidasyonunu kısmen veya tamamen engellediği ve böylece fibrotik değişiklikte ara basamaklardan biri olan hücresel bütünlüğün bozulmasının önüne geçtiği söylenebilir.

Myeloperoksidaz PMN nötrofillerin sitoplazmasında azurofilik granüller olarak bulunur. Fonksiyonu ajan patojenlerle ve kimyasal indükleyicilerle karşılaşarak aktive olan nötrofillerin yabancı partikülleri sindirebilmesi için kuvvetli oksidan maddeler olan hipoklorat, hipobromat ve hipoyodat gibi Halid ürünleri oluşturmaktadır.



Organ ve dokularda MPO aktivitesi bu bölgelere nötrofillerin invazyonunu göstermek için sıklıkla kullanılan bir parametredir. Aktivitesinin artması kesinlikle nötrofillerin dokuya geçtiğini gösterir. İnflamasyon durumlarında bu hücrelerin dokularda sentezlediği oksijen radikallerinin ve Halid ürünlerinin önemli bir fonksiyonu vardır. Membranöz yapılarda fosfolipaz A2, siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimatik yolları devreye girerler, böylece prostaglandin ve lökotrien sentezi yoluyla inflamasyon süreci daha karmaşık hale gelir. Bütün bu olaylar zincirinde dokuya invaze olan nötrofillerin yeri oldukça önemlidir.

Akciğerde bulunan BLM'nin oluşturduğu patolojik sürecin bir veya birkaç aşamasında nötrofiller dokuya invaze olmaktadır. Çalışmamızda BLM grubundaki yüksek MPO aktivitesi bunu göstermektedir. Zaten BLM'nin nasıl olup da ilgili dokularda serbest oksijen radikalleri oluşturduğu şüphelidir. Dokuya lökosit invazyonunu artırması ROS artışının başlıca sebebi olabilir. Diğer taraftan farklı bir

yolla, örneğin mitokondriyal elektron transport zincirinin bir noktada kesintiye uğraması veya ksantin oksidaz aktivasyonu sonucu dokuda serbest radikal üretilmesi, nötrofillerin dokuya invazyonunda tetikleyici fonksiyon görebilir. Hangi yolla olursa olsun net sonuç dokuya nötrofil göçünün artması ve doku makrofajlarının aktivasyonudur. BLM muhtemelen fibrozisi bu süreçlerle hızlandırmakta iki hafta süre zarfında önemli değişiklikler oluşturmaktadır. Dokuya nötrofil invazyonunu önlemek için antiinflamatuvar ajanlar başta olmak üzere birçok kimyasal madde denenmiştir. Bunların bir kısmı başarılı bulunmuştur. Son yapılan bazı çalışmalarda kafeik asit fenetil ester gibi yeni kimyasalların etkinliği gösterilmiştir (155,156). Erdosteine bu açıdan henüz tam anlamıyla araştırılmış değildir. Şimdiye kadar etkinliği ispatlanmış kullanım alanı; her türlü akciğer inflamasyonu ve patolojisinde mukolitik, ekspektoran, mukosilyer düzenleyici, salgı artırıcı amaçlıdır. Fibrozisin önlenmesi amacıyla kullanımı yenidir. Sonuçlarımızdan açıkça görüleceği gibi erdosteine grubu MPO aktivitesi hemen hemen kontrol grubuna eşittir. BLM ile birlikte uygulandığında nötrofil göçünü tamamen bloke etmiş gibi görülmektedir. E vit için aynı şeyi söylemek güçtür. Zaten E vit'in nötrofil göçünü engelleyici yönünün araştırıldığı fazla araştırma yoktur. Bir çalışmada E vit'in BLM kaynaklı akciğer fibrozisini azalttığı bulunmuş ancak mekanizması konusunda nötrofiller ile ilgili yorum yapılmamıştır (145). Bizim çalışmamızda E vit grubunda grup içi korelasyon analizlerinde MPO ile SOD enzimleri arasında negatif korelasyon ( $r = -0.728$ ,  $p = 0.026$ ) bulunması da bu durumu desteklemektedir.

Sonuç olarak;

1. BLM ile sıçanlarda akciğer fibrozisi başarı ile oluşturulmuş, bunun göstergesi olan kollajenin yapısındaki temel amino asit olan OH-P seviyeleri BLM uygulamasını takiben kontrole göre bir hayli yükselmiştir.

2. Erdosteine ve E vit akciğer dokusunda BLM'nin neden olduğu kollajen birikimini kısmen engellemiştir. Erdosteine'nin etkinliği E vit'e göre daha üstün bulunmuştur. Bu da bize BLM kaynaklı fibrozisin oluşum aşamasının başlangıcında baskılanabileceğini göstermiştir.

3. BLM uygulaması ile her iki antioksidan enzim de etkilenmiş ve anlamlı azalmalar meydana gelmiştir. Bu da bize fibrozisin oluşturduğu hasarın, serbest radikallerin aşırı üretilmesi ve bunun karşılığında antioksidan sistemin yeterince çalışmaması üzerinden meydana gelebileceğini göstermektedir. Azalan GSH-Px

aktivitesi E vit ve erdostein tarafından anlamlı şekilde yükseltilmiştir. Erdostein grubundaki yükselme kontrol grubuna daha yakın gerçekleşmiştir. Diğer antioksidan enzim olan SOD BLM ile anlamlı olarak azalmış ancak E vit ve erdostein bu azalmayı anlamlı şekilde yükseltmemiştir. Bu duruma bizim yorumumuz deney düzeneğimizde kullandığımız bu ajanların antioksidan karakteri BLM'nin oluşturabileceği bütün patolojik etkileri (özellikle serbest radikal kaynaklı olarak gelişenleri) olayın başlangıcında kontrol altına alarak SOD aktivitesinin cevap olarak artmasını engellemiş olabileceğidir. Çünkü süperoksit radikali SOD enziminin substratıdır. Ortamdaki süperoksit radikal artışı erdostein tarafından engellenmiş olabileceğinden buna bağlı olarak da SOD aktivitesi artmamış olabilir. Bu durum GSH-Px aktiviteleri ile ters gözüktüğü de bu enzimin substratı  $H_2O_2$ 'dir.  $H_2O_2$  ise farklı ve çok çeşitli kaynaklardan köken alabilir.

4. MPO aktivitesinin BLM grubunda oldukça yüksek olması fibrozis sahasına nötrofil infiltrasyonunun olduğunu gösterir. Doku hasarında en önemli rolün nötrofillere ait olduğu söylenebilir. E vit ve erdostein anlamlı bir şekilde MPO düzeylerini azaltmış ve nötrofil göçüne bağlı serbest radikal salınımını önlemiştir.

5. Doku MDA düzeyleri BLM grubunda artmıştır. Bu artış fibrozis sürecinde özellikle de membran yapılarında lipid peroksidasyonunun arttığını göstermektedir. E vit ve erdostein anlamlı bir şekilde MDA düzeylerini azaltmıştır.

Pulmoner fibrozis hastalık grubunda başlangıç aşamasında tanı konulan vakalarda fibrozis sürecini yavaşlatmak amacıyla E vit ve erdostein kullanılması, çalışmamızın verilerinde görülen faydalı etkileri nedeni ile önerilebilir. Ayrıca kanser tedavi protokolünde BLM uygulanacak hastalara tedavi öncesinde profilaktik amaçlı olarak erdostein verilmesi, fibrozis oluşmasını kısmen önleyici fonksiyon gösterdiğinden, faydalı olabileceği kanaatindeyiz. Bu durumlarda E vit ve erdostein birlikte kullanımının faydalı olup olmayacağını söyleyebilmek için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 6. ÖZET

Bu çalışmada sıçan akciğerinde deneysel olarak bleomisin (BLM) ile fibrozis oluşturup antioksidan enzimlerin seviyeleri ve lipit peroksidasyonunun göstergesi olan parametreler çalışılıp, E vitamini (E vit) ve erdosteinin akciğer fibrozisi üzerine olumlu etkilerinin olup olmadığı araştırıldı. Bunun için kontrol (n=8), BLM (n=9), E vit (n=9) ve erdostein (n=10) olarak 4 grup oluşturuldu. BLM grubuna intratrakeal (i.t.) BLM, E vit grubuna i.t. BLM + intraperitoneal (i.p.) E vit ve erdostein grubuna ise i.t. BLM + oral erdostein verildi.

Akciğerde fibrozisin göstergesi olarak doku hidrokspirolin (OH-P) seviyeleri kullanıldı. BLM grubunda OH-P seviyeleri kontrol grubuna göre fibrozis oluştuğuna delil olacak şekilde yüksek bulundu ( $p<0.0001$ ). E vit grubundaki değerler BLM grubuna göre düşük ( $p<0.0001$ ), kontrol grubuna göre ise yüksek bulundu ( $p<0.0001$ ). Erdostein grubu BLM grubuna göre düşük ( $p<0.0001$ ) ve hatta kontrol grubu seviyelerinin de altında olduğu gözlemlendi. BLM'nin akciğerde fibrozis oluşturduğu, E vit ve erdosteinin bu fibrozisi azalttığı ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında erdosteinin bunu daha iyi yaptığı söylenebilir.

BLM grubu süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri kontrol grubuna göre düşük ( $p<0.0001$ ), lipit peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit (MDA) seviyeleri ve nötrofil göçünü gösteren myeloperoksidaz (MPO) aktiviteleri ise yüksek bulundu ( $p<0.0001$ ).

E vit grubu SOD aktiviteleri BLM grubundan farksız, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde ( $p<0.001$ ) düşük bulundu. Erdostein grubu ile farksızdı. GSH-Px aktiviteleri BLM grubuna göre yüksek ( $p<0.019$ ), kontrol grubuna göre ise düşüktü. MDA düzeyleri BLM grubuna göre düşük ( $p<0.0001$ ), kontrol grubundan anlamlı olarak yüksekti ( $p<0.002$ ). MPO aktiviteleri BLM grubundan farksız, kontrol grubundan ise yüksekti ( $p<0.0001$ ).

Erdostein grubu SOD aktiviteleri BLM grubundan farksız, kontrol grubuna göre ise düşük bulundu ( $p<0.003$ ), E vit grubundan da farksızdı. GSH-PX aktiviteleri BLM grubundan yüksek ( $p<0.0001$ ) bulundu, kontrol grubuna göre ise düşüktü ( $p<0.0001$ ). E vit grubundan ise anlamlı yüksekti ( $p<0.009$ ). MDA seviyeleri ve MPO aktiviteleri BLM grubundan düşüktü ( $p<0.0001$ ), kontrol ile karşılaştırıldığında ise hemen hemen aynı idi ve fark yoktu. E vit grubuna göre ise anlamlı düşüktü ( $p<0.0001$ ).



Sonuç olarak erdosteinin fibrozis sürecinde antioksidan savunma sistemlerini desteklediği, n6trofil g6çünü engelleyerek serbest radikal salınımını ve hasarını azalttığı, bunları E vit'e g6re daha iyi bir şekilde gerçekleştirdiği s6ylenebilir. Tedavi protokolünde BLM bulunan kanserli hastalara profilaktik amaçlı ve pulmoner fibrozis tanısı konulan hastalarda süreci yavaşlatmak ve tedavi etmek amacıyla erdosteinin verilmesi 6nerilebilir.



## 7. SUMMARY

In this experimental study, bleomycine (BLM)-induced lung fibrosis was developed by single intratracheal injection of BLM. The levels of lipid peroxidation end products and antioxidative enzyme activities were studied. The effects of vitamin E (vit E) and erdosteine on the parameters studied and lung fibrosis were also examined. For these purposes, rats were divided into four unequal groups: sham operation group (control, n=8), BLM group (n=9), vit E + BLM group (n=9) and erdosteine + BLM group (n=10). Rats were received BLM by intratracheally in the BLM-applied groups, vit E by intraperitoneal injection in vit E + BLM group, erdosteine by orally in erdosteine + BLM group.

Hidroxyproline (OH-P) levels were taken as the indicator of lung fibrosis as stated by previous studies. OH-P levels were found to be elevated in BLM group suggesting clearly the fibrosis in lung tissue ( $p < 0.0001$ ). Tissue OH-P levels were decreased in vit E group compared to BLM group ( $p < 0.0001$ ), but it was still high compared to control group ( $p < 0.0001$ ). On the other hand, tissue OH-P levels were decreased in erdosteine group compared to both BLM group ( $p < 0.0001$ ) and control group, but the last one was not statistically significant. According to the findings about OH-P, vit E and erdosteine are both effective inhibitor agents in coping with BLM-induced lung fibrosis. Erdosteine is more effective than vit E.

Superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities were found to be decreased ( $p < 0.0001$ ); malondialdehyde (MDA) levels as an index of endogenous lipid peroxidation increased ( $p < 0.0001$ ); myeloperoxidase (MPO) activities as an index of neutrophil invasion to the lung tissue increased ( $p < 0.0001$ ) in BLM group compared to control group.

SOD activities in vit E group were unchanged compared to both BLM and erdosteine groups and decreased compared to control group ( $p < 0.001$ ). GSH-Px activity in vit E group were increased compared to BLM group ( $p < 0.019$ ) and decreased compared to control group. Tissue MDA levels in vit E group were decreased compared with BLM group ( $p < 0.0001$ ) and increased in control group ( $p < 0.002$ ). MPO activities were unchanged compared to BLM and increased compared to control group ( $p < 0.0001$ ).

In erdosteine group; SOD activities were found to be unchanged compared to BLM and vit E groups, decreased compared to control group ( $p < 0.003$ ); GSH-Px

activities were found to be increased compared to BLM ( $p < 0.0001$ ) and vit E ( $p < 0.009$ ) groups, decreased compared to control group ( $p < 0.0001$ ); tissue MDA levels and MPO activities were found to be decreased compared to both BLM ( $p < 0.0001$ ) and vit E ( $p < 0.0001$ ) groups, statistically unchanged compared to control group.

In conclusion, erdosteine may attenuate the BLM-induced lung fibrosis via its antioxidant properties and the inhibitory effects on the neutrophil sequestration into lung tissue, so scavenge the free oxygen radicals and it is more effective agent in comparison with vit E. In the light of these results, we may suggest that erdosteine may be used for two purposes; 1) to attenuate the fibrotic process in the patients with fibrotic lung diseases, 2) as a prophylactic agent in the human neoplasms in which BLM is the main anticancer drug used.



## 8. KAYNAKLAR

1. Paker Ş. Histoloji. Uludağ Üniversitesi Basımevi. Bursa, 1993;414-435.
2. Burkitt HG, Young B, Heath JW. Wheather's functional Histology a text and colour atlas. 3. ed. Churchill Livingstone. Hong Kong 1993;220-234.
3. Leeson CR, Leeson TS, Paparo AA. Text book of Histology. 5. Ed. WB Saunders Company. 1985;382-408.
4. Gartner LP, Hiatt JI, Strum JM. Board review series Histology. Williams and Wilkins. Baltimore 1988;173-180.
5. Krstic RV. Human microscopic Anatomy. Springer-Verlag. Berlin 1991;124-159.
6. Junpeira LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic Histology, 8. Ed. Barış Kitabevi/Appleton&Lange; 1998;325-345. Çeviri editörü Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışalı B.
7. Cherniack RM, Colby TV, Flint A, Thurlbeck WM, Waldron SA Jr., Ackerson L, Schwarz MI, King TE Jr. Correlation of structure and function in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1995;151:1180-1188.
8. Colby TV, Swenson SJ. Anatomic distribution and histopathologic patterns in diffuse lung disease correlation with HRCT. J Thorac Imagining 1996;11:1-26.
9. Bensadoun ES, Burke AK, Hogg JC, Roberts CR. Proteoglycan deposition in pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1996;154:1819-1828.
10. Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. Annu Rev Biochem 1998;67:609-652.
11. Bensadoun ES, Burke AK, Hogg JC, Roberts CR. Proteoglycans in granulomatous lung diseases. Eur Respir J 1997;10:2731-2737.
12. Westergren-Thorsson G, Hernnas J, Sarnstrand B. Altered expression of small proteoglycans, collagen, and transforming growth factor- $\beta$ 1 in developing bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. J Clin Invest 1993;92:632-637.
13. Herterberg TW, Gerriets JE, Reiser KM, Jackson AC, Cross CE, Last JA. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis: correlation of biochemical, physiological, and histological changes. Toxicol Appl Pharmacol 1981;60:360-367.
14. Shahzeidi S, Mulier B, de Crombrughe B, Jeffery PK, McAnulty RJ, Laurent GJ. Enhanced type III collagen gene expression during bleomycin induced lung fibrosis. Thorax 1993;48:622-628.
15. Nerlich AG, Nerlich ML, Müller P. Pattern of collagen types and molecular structure of collagen in acute post-traumatic pulmonary fibrosis. Thorax 1987;42:863-869.
16. Lammi L, Kinnula V, Lahde S, Risteli J, Paakko P, Lakari E, Ryhanen L. Propeptide levels of type III and type I procollagen in the serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with pulmonary sarcoidosis. Eur Respir J 1997;10:2725-2730.
17. Chesnutt AN, Matthay MA, Tibayan FA, Clark JG. Early detection of type III procollagen peptide in acute lung injury. Pathogenetic and prognostic significance. Am J Respir Crit Care Med 1997;156:840-845.
18. Khalil N. TGF- $\beta$ : from latent to active. Microb Infect 1999;1:1255-1263.
19. Kovacs EJ, Kelly J. Secretion of macrophage-derived growth factors during acute lung injury induced by bleomycin. J Leukoc Biol 1985;37:1-14.

20. Gharau-Kermani M, McGarry B, Lukacs N, Huffnagle G, Egan RW, Phan SH. The role of IL-5 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Leukoc Biol* 1998;64:657-666.
21. McCartney-Francis N, Mizel D, Wong H, Wahl L, Wahl S. TGF- $\beta$  by human peripheral blood monocytes. *Growth Factor* 1990;4:27-35.
22. Zhang Y, Lee TC, Guillemin B, Yu MC, Rom WN. Enhanced IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure. *J Immunol* 1993;150:4188-4196.
23. Vanhee D, Gosset P, Marquette CH, Wallaerd B, Lafitte JJ, Gosselin B, Voisin C, Tonnel AB. Secretion and mRNA expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the lungs of pneumoconiosis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:298-306.
24. Piguet PF, Collard MA, Grau GE, Kapanci Y, Vassalli P. Tumor necrosis factor/cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis. *J Exp Med* 1989;170:655-663.
25. Zhang K, Gharaee-Kermani M, McGarry B, Remick D, Phan SH. TNF- $\alpha$ -mediated lung cytokine networking and eosinophil recruitment in pulmonary fibrosis. *J Immunol* 1997;158:954-959.
26. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:967-972.
27. Raghu G. Interstitial lung disease: a clinical overview and general approach. Volume 1, chapter 68;1037-1053. In: Fishman AP, Elias JA, Fishman JA, Grippi MA, Kaiser LR, Senior RM. *Fishman's pulmonary Diseases and disorders*. 3. ed.; McGraw-Hill, New York, USA 1998.
28. Fanburg BL, Massaro DJ, Cerutti PA, Gail DB, Berberich MA. Regulation of gene expression by O<sub>2</sub> tension. *Am J Physiol* 1992;262:235-241.
29. Minoo P, King RJ, Coalson JJ. Surfactant proteins and lipids are regulated independently during hyperoxia. *Am J Physiol* 1992;263:291-298.
30. Nagai A, Aoshiba K, Ishihara Y, Inano h, Sakamoto K, Yamaguchi E, Kagawa S, Takizawa T. Administration of  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *Am Rev respir Dis* 1992;145:651-656.
31. Rudd RM, Haslam PL, Turner-Warwick M. Cryptogenic fibrosing alveolitis: relationships of pulmonary physiology and bronchoalveolar lavage to response to treatment and prognosis. *Am Rev Respir Dis* 1981;24:1-8.
32. Raghu G, Depaso WJ, Cain K, Hammar SP, Wetzel CE, Dreis DF, Hutchinson S, Pardee NE, Winterbauer RH. Azathioprine combined with prednisone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:291-296.
33. Peters SG, McDougall JC, Douglas WW, coles DT, DeRemee RA. Colchicine in the treatment of pulmonary fibrosis. *Chest*. 1993;103:101-104.
34. Meier -Sydow J, Weiss SM, Buhl R, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: current concepts and challenges in management. *Semin Respir Crit Care Med* 1994;15:77-96.
35. Wei YH, Lu CY, Ma YS, Lee HC. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chinese Journal of Physiology* 2001;44:1-11.
36. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*, second edition, Clarendon Press, Oxford, New York, USA, 1995:1-81.

37. Hagivari SI, Ishii Y, Kitamura S. Aerosolized administration of N-acetylcystein attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:221-225.
38. Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burghardt S. Free radical-mediated molecular damage: mechanism for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 2001;939:200-215.
39. Özyurt H, Irmak MK, Akyol O, Sogut S. Caffeic acid phenethyl ester changes the indices of oxidative stress in serum of rats with renal ischemia-reperfusion injury. *Cell Biochem Funct* 2001;19:259-263.
40. Uz E. Deneysel karaciğer iskemi-reperfüzyonu oluşturulan sıçanlarda doku oksidan-antioksidanlarının durumu: doku hasarına E vitamini ve kafeik asit fenetil ester'in (CAPE) etkileri. Uzmanlık tezi. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Biyokimya A.D. 2001.
41. Nagel E, zu Vilsendorf AM, Bartels M, Pichlmayr R. Antioxidative vitamins in prevention of ischemia/reperfusion injury. *Internat J Vit Nutr Res* 1997;67:298-306.
42. Ryrfeldt A, Bannenberg G, Moldeus P. Free radicals lung disease. *British Medical Bulletin* 1993;49:588-603.
43. O'Donovan DJ, Fernandes CJ. Mitochondrial glutathione and oxidative stress: implications for pulmonary oxygen toxicity in premature infants. *Molecular Genetics and Metabolism* 2000;71:352-358.
44. Fishman AP. Pulmonary-systemic interactions. Volume 1, chapter 30, 417-427. In: Fishman AP, Elias JA, Fishman JA; Grippi MA, Kaiser LR, Senior RM. *Fishman's pulmonary Diseases and disorders*. 3. ed., McGraw-Hill, New York, USA 1998.
45. Wei YH, Ma YS, Lee HS, Lee CF, Lu CY. Mitochondrial theory of aging matures-roles of mtDNA mutation and oxidative stress in human aging. *Chinese Medical Journal* 2001;64:259-270.
46. Suzuki K. Neutrophil functions of patients with vasculitis related to myeloperoxidase-specific anti-neutrophil antibody. *Int J Hematol* 2001;74:134-143.
47. Dallegri F, Ottonello L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm Res* 1997;46:382-391.
48. Champe PC, Harvey RA. Lippincott's Illustrated reviews serisinden: Biyokimya. 2. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul 1997:171-190.
49. Rice-Evans CA, Diplock AT, Symons MCR. Techniques in free radical research. In *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology volume 22* edited by Burdon RH, van Knippenberg PH. Elsevier, New York, 1991:1-50.
50. Hughes DA. Effects of carotenoids on human immune function. *Proceedings of the Nutrition Society* 1999;58:713-718.
51. Vagliasindi M. Clinical Expert Report 1996.
52. De Bernardi di VM, Pharmacokinetics of erdosteine in fasting and unfasting healthy volunteers after single and multiple oral treatments. *Medical Praxis* 1992;13:77-98.
53. Gazzani G, Fregnan GB, Vandoni G. In vitro protection by erdosteine against oxidative in activation of alfa1-antitrypsin by cigarette smoke. *Respiration* 1989;55:113-118.
54. Kaise T, Hosoe H, Sano J et al. Effects of KW-9144 on paraguat toxicity in mice and bleomycin-induced pulmonary injury in rats. *Jpn J Pharmacol* 1993;61:81.

55. Inglesi M, Nicola M, Fregnan GB, Bradamante S, Pagani G. Synthesis and free radical scavenging properties of the enantiomers of erdosteine. *Farmaco* 1994;40:703-708.
56. Vagliasindi M, Fregnan GB. Erdosteine protection against cigarette smoking-induced functional antiprotease deficiency in human bronchiolo-alveolar structures. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1989;27:238-241.
57. Ciaccia A, Papi A, Tschirky B, Fregnan B. Protection of erdosteine on smoke-induced periheral neutrophil dysfunction both in healthy and in bronchitic smokers. *Fundam Clin Pharmacol* 1992;6:375-382.
58. Hötzing H. Erdosteine or placebo combined with co-trimoxazole in the treatment of hypersecretive infectious bronchitis: a double blind clinica trial. *Med Praxis* 1991;12:171-181.
59. Scuri R, Giannetti P, Paesano A. Effect of erdosteine and its metabolites on tracheobronchial mucus production and transport. *Drugs Ext Clin Res* 1988;14:693-698.
60. Ghiringhelli G, Mancini C. Cross-over clinical study of efficacy and tolerability of erdosteine in the treatment of chronic obstructive bronchial disease in stable hypersecretive phase controlled double-blind study vs placebo. *Archivio di Medicina Interna* 1995;42:113-120.
61. Post M, Batenburg JJ, Schuurmans EA, Oldenburg V, Van der Molen AJ, Van der Golde LMG. The perfused rat lung as a model for studies on the formation of surfactant and the effect of ambroxol on this process. *Lung* 1983;161:349-359.
62. Carina RL, Mary AA, Susan MJ, Christopher M. Model systems for the evaluation of mucolytic drugs acetylcysteine and S-carboxymethylcysteine. *J Pharm Pharmacol* 1990;42:73-78.
63. Hosoe H, Kaise T, Ohmori K, Isohama Y, Kai H, Takahama K, Miyata T. Mucolytic and antitussive effects of erdostein. *J Pharm Pharmacol* 1999;51:959-966.
64. Di Valserra, MDB. Pharmacokinetics of erdosteine in fasting and unfasting healthy volunteers after single and multiple oral treatments. *Medical Praxis* 1992;1:77-98.
65. Fumagalli G, Balzarotti C, Banfi P, Ferrante Decò L, Zennaro M. Erdosteine :A new molecule with mucolytic activity. Clinical and instrumental evaluation in patients with acute and exacerbated chronic bronchopneumopathies. *Italian J Chest Dis* 1988;42:299-308.
66. Bulger EM, Maier RV. Antioxidants in critical illness. *Arch Surg* 2001;136:1201-1207.
67. Packer L. Interactions among antioxidants in health and disease: vitamin E and its redox cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;20:271-276.
68. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's Biochemistry*. 24<sup>th</sup> edition. Appleton & Lange. London 1996:343-357.
69. Meydani M. Dietary antioxidants modulation of aging and immune-endothelial cell interaction. *Mec Ageing Dev* 1999;111:123-132.
70. Sugino K, Dohi K, Yamada K, Kawaski T. The role lipid peroxidation in endotoxin-induced hepatic damage and the protective effect of antioxidants. *Surgery* 1987;101:746-752.
71. Yoshikawa T, Murakami M, Kondo M. Endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in vitamin E deficient rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984;74:173-178.
72. Pekkanen T, Lindberg P, Sankari S. The effect of pretreatmen with vitamin E on the effects of endotoxin on rat. *Acta Pharmacol Toxicol* 1983;53:64-69.

73. Demling R, Lalonde C, Ikegami K, Picard L, Nayak U. Alpha-tocopherol attenuates lung edema and lipid peroxidation caused by acute zymosan-induced peritonitis. *Surgery* 1995;117:226-231.
74. Marubayashi S, Dohi K, Ochi K, Kawasaki T. Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: prevention of damage by alpha-tocopherol administration. *Surgery* 1986;99:184-192.
75. Novotny MJ, Laughline MH, Adams HR. Evidence for lack of importance of oxygenfree radicals in Escherichia coli endotoxemia in dogs. *Am J Physiol* 1988;254:954-962.
76. Yousem SA, Lifson JD, Colby TV. Chemotherapy-induced eosinophilic pneumonia: relation to bleomycin. *Chest* 1985;88:103-106.
77. Zitnik RJ. Drug-induced lung disease: cancer chemotherapy agents. *J Respir Dis* 1995;16:855-865.
78. Koslowski R, Knoch KP, Wenzel KW. Proteinases and proteinase inhibitors during the development of pulmonary fibrosis in rat. *Clinica Chimica Acta* 1998;271:45-56.
79. Van Hoozen BE, Grimmer KL, Marelich GP, Amstrong LC, Last JA. Early phase collagen synthesis in lungs of rats exposed to bleomycin. *Toxicology* 2000;147:1-13.
80. Miyake K, Kaise T, Hosoe H, Akuta K, Manabe H, Ohmori K. The effect of erdosteine and its active metabolite on reactive oxygen species production by inflammatory cells. *Inflamm res* 1999;48:205-209.
81. Hosoe H, Kaise T, Ohmori k. Erdosteine enhances mucociliary clearance in rats with and without airway inflammation. *J P M* 1998;40:165-171.
82. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
83. Woessner JB. The determination of hydroxiprolin in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1961;93:440-447.
84. Sun Y, Oberley LW, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500.
85. Durak I, Yurtarlan Z, Canbolat O, Akyol O. A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chim Acta* 1993;214:103-104.
86. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab & Clin Med* 1967;70:158-169.
87. Wasowicz W, Neve S, Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: Importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* 1993;39:2522-2526.
88. Wei H, Frenkel K. In vivo formation of oxidized DNA bases in tumor promoter-treated mouse skin. *Cancer Res* 1991;51:4443-4449.
89. Schelegle ED, Walby WF, Mansoor JK, Chen AT. Lung vagal afferent activity in rats with bleomycin-induced lung fibrosis. *Respiration Physiology* 2001;126:9-27.
90. Fukada y, Ferrans VJ, Shoenberg CI. Patterns of pulmonary structural remodeling after experimental paraquat toxicity. *Am J Pathol* 1985;118:452-475.
91. Craighead JE, Abraham JL, Churg A, Green FH, Kleinerman J, Pratt PC, Seemayer TA, Vallyathan V, Weill H. The pathology of asbestos-associated diseases of the lungs and



- pleural cavities: diagnostic criteria and proposed grading schema. *Arch Pathol Lab Med* 1982;106:543-559.
92. Begin R, Cantin A, Boileau R, Bisson G. Spectrum of alveolitis in quartz-exposed human subjects. *Chest* 1987;92:1061-1067.
  93. Graham MM, Evans ML, Dahlen DD, Mahler PA, Rasey JS. Pharmacological alteration of the lung vascular response to radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990;19:329-339.
  94. Okada Y, Katsuda S, Okada Y, Nakanishi I. An elastinolytic enzyme detected in the culture medium of human arterial smooth muscle cells. *Cell Biol Int* 1993;17:863-869.
  95. Garbisa S, Ballin M, Daga-Gordini D, Fastelli G, Naturale M, Negro A, Semenzato G, Liotta La. Transient expression of type IV collagenolytic metalloproteinase by human mononuclear phagocytes. *J Biol Chem* 1986;261:2369-2375.
  96. Yamonouchi H; Fujita J, Hojo S, Yoshinouchi T, Kamei T, Yamadani I, Ohtsuki Y, Ueda N, Takahara J. Neutrophil elastase:  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor complex in serum and bronchoalveolar lavage fluid in patients with pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 1998;11:120-125.
  97. Taooka Y, Maeda A, Hiyama K, Ishioka S, Yamakido M. Effects of neutrophil elastase inhibitor on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:260-265.
  98. Tkalcevic J, Novelli M, Pylactides M, Iredale SP, Segal AW, Roes J. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity* 2000;12:201-210.
  99. Dunsmore SE, Roes J, Chua FJ, Segal AW, Mutsaers SE, Laurent GJ. Evidence that neutrophil elastase-deficient mice are resistant to bleomycin-induced fibrosis. *Chest* 2001;120:35-36.
  100. Suzuki K. Protein C in high KA. In: High KA, Robert HR, editors. *Molecular basis of thrombosis and hemostasis*. Marcel Dekker, New York, 1995.
  101. Grey ST, Tsuchida A, Hau H, Orthner CL, Salem HH. Selective inhibitory effects of the anticoagulant protein C on the responses of human mononuclear phagocytes to LPS, IFN-gamma, or phorbol ester. *J Immunol* 1994;153:3664-3672.
  102. Yasui H, Gabazza EC, Tamaki S, Kobayashi T, Hataji O, Yuda H, Shimizu S, Suzuki K, Adachi Y, Taguchi O. Intratracheal administration of activated protein C inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1660-1668.
  103. Shi X, Dalal NS, Hu XN, Vallyathan V. The chemical properties of silica particle surface in relation to silica-cell interaction. *J Toxicol Environ Health* 1989;27:435-454.
  104. Kamal AM, Goma A, Khafif ME, Hammad AS. Plasma lipid peroxides among workers exposed to silica or asbestos dusts. *Environ Res* 1989;49:173-180.
  105. Shi X, Castranova V, Halliwell B, Vallyathan V. Reactive oxygen species and silica-induced carcinogenesis. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 1998;1:181-197.
  106. Chen F, Lu Y, Rojanasakul Y, Shi X, Vallyathan V, Castranova V. Role of hydroxyl in silica-induced NF-kB activation in macrophages. *Ann Clin Lab Sci* 1998;28:1-13.
  107. DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxidase synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim Biophys Acta* 1991;60:121-134.
  108. Braga PC. Vitamin C in respiratory disease. In: *Vitamin C*. Paoletti R, Sies H, Bug J. et al. Springer Verlag, Milan 1998;87-106.

109. Braga PC, Sasso MD, Zuccotti T. Assessment of the antioxidant activity of the SH metabolite I of erdosteine on human neutrophil oxidative bursts. *Arzneim-Forsch/ Drug Res* 2000;50:739-746.
110. Ciaccia A, Papi A, Tschirky B, Fregnan B. Protection of erdosteine on smoke-induced peripheral neutrophil dysfunction both in healthy and in bronchitic smokers. *Fundam Clin Pharmacol* 1992;6:375-382.
111. Simon L, Suttorp M. Lung cell oxidant injury: a decrease in oxidant mediated cytotoxicity by N-acetyl-cysteine. *Eur J Respir Dis* 1985;66:132.
112. Censen T, Kharazmi A, Schiøtz PO. Effect of oral N-acetylcysteine administration on human blood neutrophil and monocyte function. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1988;96:62.
113. GL, Fregnan GB, Gazzani G, Vandoni G. Erdosteine protection from cigarette smoke-induced loss of  $\alpha$ 1-antitrypsin activity in rat lungs. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1989;27:235-237.
114. Gazzani G, Fregnan GB, Vandoni G. *In vitro* protection by erdosteine against oxidative inactivation of  $\alpha$ 1-antitrypsin by cigarette smoke. *Respiration* 1989;55:113-118.
115. Carp H, Janoff A. *In vitro* suppression of serum elastase-inhibitory capacity by reactive oxygen species generated by phagocytosing polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 1979;63:793-797.
116. Carp H, Miller F, Hoidal JR, Janoff A. Potential mechanism of emphysema:  $\alpha$ <sub>1</sub>-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase-inhibitory capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:2041-2045.
117. Gazzani G, Fregnan GB, Vandoni G. *In vitro* protection by erdosteine against oxidative inactivation of  $\alpha$ 1-antitrypsin by cigarette smoke. *Respiration* 1989;55:113-118.
118. Pryor WA, Dooley MM, Church DF. Mechanisms of cigarette smoke toxicity: the inactivation of human  $\alpha$ <sub>1</sub>-proteinase inhibitor by nitric oxide/isoprene mixtures in air. *Chem Biol Interact* 1985;54:171-183.
119. Reynolds HV. Bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:250-263.
120. Sparrows D, Glynn RJ, Cohen M, Weiss ST. The relationship of the peripheral leukocyte count and cigarette smoking to pulmonary function among adult men. *Chest* 1984;86:383-386.
121. Janoff A. Elastases and emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:417-433.
122. Wright JL, Hobson JE, Wiggs B, Pare PD, Hogg JC. Airway inflammation and peribronchiolar attachments in the lungs of nonsmokers, Current and ex-smokers. *Lung* 1988;166:277-286.
123. Morgan KT, Patterson KT, Patterson DL. Distribution, progression and recovery of acute formaldehyde induced inhibition of nasal mucociliary function in F-344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986;86:448-456.
124. Kai H, Saito M, Furusawa K, Oda Y, Okano Y, Takahama K, Miyata T. Protective effects of surface-active phospholipids against the acid-inducing inhibition of the tracheal mucociliary transport. *Jpn J Pharmacol* 1989;49:375-380.
125. Barnes PJ, Rhoden KJ. The effect of oxygen-derived free radicals on airway smooth muscle responses. *Br J Pharmacol* 1987;90.

126. Sporn PHS, Petets-Golden M, Simon RH. Hydrogen-peroxide-induced arachidonic acid metabolism in the rat alveolar macrophage. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:49-56.
127. Inglesi M, Nicola M, Fregnan GB. Synthesis and free radical scavenging properties of the enantiomers of erdosteine. *Farmaco* 1994;49:703-708.
128. Goodglic LA, Kane AB. Role of reactive oxygen metabolites in crocidolite asbestos toxicity to mouse macrophages. *Cancer Res* 1986;55:558-5566.
129. Sibille Y, Reynolds HY. State of the art: macrophage and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:471-501.
130. Crystal RG. Oxidants and respiratory tract epithelial injury: pathogenesis and strategies for therapeutic intervention. *Am J Med* 1991;91:39-44.
131. Gutteridge JMC, Xiao-Chang F. Protection of iron-catalyzed free radical damage to DNA and lipids by copper(II)-bleomycins. *Biochem Biophys Res Commun* 1981;99:1354-1360.
132. Lazo JS, Merrill WW, Pham ET, Lynch TJ, McCallister JD, Ingbar DH. Bleomycin hydrolase activity in pulmonary cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1984;231:583-588.
133. Kennedy TP, Rao NV, Hopkins C, Pennington L, Tolley E, Hoidal JR. Role of reactive oxygen species in reperfusion injury of the rabbit lung. *J Clin Invest* 1989;83:1326-1335.
134. Jackson RM, Veal CF, Alexander CB, Branner AL, Fulmer JD. Re-expansion pulmonary edema. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:1165-1171.
135. Steimle CN, Guynn TP, Morganroth ML, Bolling SF, Carr K, Deeb GM. Neutrophils are not necessary for ischemia-reperfusion lung injury. *Ann Thorac Surg* 1992;53:64-73.
136. Meydani SN, Wu D, Santos MS, Hayek MG. Antioxidants and the immune response in aged persons: overview of the present evidence. *Am J Clin Nutr* 1995;62:1462-1476.
137. Meydani SN, Meydani M, Blumberg JB, Leka LS, Siber G, Loszewski R, Thompson C, Pedrosa MC, Diamond RD, Stollar BD. Vitamin E supplementation enhances *in vivo* immune response in healthy elderly: a dose-response study. *J Am Med Assoc* 1997;277:1380-1386.
138. Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Houlst JR, Halliwell B. Inhibition of mammalian S-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol* 1991;42:1673-1681.
139. Kılınç C, Özcan O, Karaöz E, Sunguroğlu K, Kutluay T, Karaca L. Vitamin E reduces bleomycin-induced lung fibrosis in mice: biochemical and morphological studies. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1993;4:249-269.
140. Gözükkara EM. *Biyokimya*. 4. baskı Nobel tıp kitabevleri, İzmir, 2001:624-630.
141. Bowler RP, Arcaroli J, Crapo JD, Ross A, Slot JW, Abraham E. Extracellular superoxide dismutase attenuates lung injury after hemorrhage. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:290-294.
142. Lehninger AL, Beck DP. The catalase requirement in the reversal of mitochondrial swelling caused by reduced glutathione and by trace metals. *J Biol Chem* 1976;242:2098-2101.
143. Griffith OW, Meister A. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4668-4672.

144. Loos H, Roos WD, Meredith MJ, Reed DJ. Depletion in vitro of mitochondrial glutathione rat hepatocytes and enhancement of lipid peroxidation by adriamycin and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochem Pharmacol* 1983;32:1383-1388.
145. Shan X, Jones DP, Hashmi M, Anders MW. Selective depletion of mitochondrial glutathione concentrations by (R,S)-3-hydroxy-4-pentenoate potentiates oxidative cell death. *Chem Res Toxicol* 1993;6:75-81.
146. Palmeira CM, Wallace KB. Benzoquinone inhibits the voltage-dependent induction of the mitochondrial permeability transition caused by redox-cycling naphthoquinones. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;143:338-347.
147. Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airways disease. *Am J Physiol* 1999;277:1067-1088.
148. Rahman I, MacNee W. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radical & Biology* 2000;28:1405-1420.
149. Olsson B, Johansson M, Gabrielsson J, Bolme P. Pharmacokinetics of reduced and oxidized N-acetylcysteine. *Eur J Clin Pharmacol* 1988;34:77-82.
150. Borok Z, Bhul R, Grimes GJ, Bokser AD, Hubbard RC, Holroyd KJ, Roum JH, Czerski DB, Cantin AM, Crystal RG. Effect of glutathione aerosol on oxidant-antioxidant imbalance in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 1991;338:215-216.
151. Marrades RM, Roca J, Barbera JA, Dejour L, MacNee W, Rodriguez-Roisin R. Nebulized glutathione induces bronchoconstriction in patients with mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:425-430.
152. Herken H, Uz E, Özyurt H, Söğüt S, Virit O, Akyol Ö. Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2001;6:66-73.
153. Jeon SM, Bok SH, Jang MK, Kim YH, Nam KT, Jeong TS, Park YB, Choi MS. Comparison of antioxidant effects of naringin and probucol in cholesterol-fed rabbits. *Clin Chim Acta* 2002;317:181-190.
154. Halliwell B. Oxidants and human disease, some new concepts. *FASEB J* 1987;1:358-364.
155. Dobrowolski JW, Vohoraq SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SAH, Dandiya PC. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory, and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol* 1991;35:77-82.
156. Natarajan K, Singh S, Burke TR Jr, Grunberger D, Aggrawal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:9090-9095.

## 9. TEŞEKKÜR

Bu deneysel tez çalışmamda yardımını esirgemeyen Doç. Dr. İsmail TEMEL'e, çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde katkıları bulunan Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Ömer AKYOL ile Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Zeki YILDIRIM'a ve Biyokimya Anabilim Dalı'nda görev yapan diğer öğretim üyelerine, sıçanların bakımı ve cerrahi işlemlerinde yardımcı olan Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Dr. Hüseyin ÖZYURT'a, Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Mustafa IRAZ'a ve Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Murat YAĞMURCA'ya, teşekkür eder en derin saygılarımı sunarım.

Ayrıca doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bana her türlü manevi desteği sağlayan, sıkıntılara katlanan ve büyük özveride bulunan eşime, çalışmalarım sırasında kendilerine fazla vakit ayıramadığım biricik kızım ve oğluma sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

