



T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖĞÜS CERRAHİSİ ANABİLİM DALI



**PEROKSİNİTRİT'İN OLUŞTURDUĞU AKCİĞER VE  
TRAKEA HASARINDA ETİL PİRUVAT'IN ETKİNLİĞİ**

**Dr. Menderes ERÇİL**  
**UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. M. Oğuz KÖKSEL**

**MERSİN 2007**

**T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖĞÜS CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**PEROKSİNİTRİT'İN OLUŞTURDUĞU AKCİĞER VE  
TRAKEA HASARINDA ETİL PİRUVAT'IN ETKİNLİĞİ**

**Dr. Menderes ERÇİL  
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. M. Oğuz KÖKSEL**

**MERSİN 2007**

## TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasının her aşamasında değerli önerilerini ve eleştirilerini esirgemeyen, sevgi ve hoşgörü ortamı içerisinde tezin hazırlık aşamasından son noktasının konduğu ana kadar sonsuz çaba sarf eden tez danışmanı hocam sayın Doç. Dr. Oğuz Köksel 'e en içten teşekkür, minnet ve şükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince bizleri modern çağın gereklerini izleyen, bilimsel verileri kılavuz alan, mesleğini ve insanları seven, etik kurallara saygılı birer hekim olarak yetiştirmek için tüm güçleri ile çalışan, bilgi ve deneyimlerini titizlikle ve sabırla aktaran, asistanı olmaktan gurur ve mutluluk duyduğum başta değerli anabilim dalı başkanımız sayın Doç. Dr. Ali Özdülger olmak üzere, sevgili hocalarım sayın Doç. Dr. Oğuz Köksel'e, sayın Yrd. Doç. Dr. Erhan Ayan ve Kalp-Damar Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Murat Dikmengil, sayın Doç. Dr. Nehir Sucu, sayın Doç. Dr. Barlas Aytaçoğlu, sayın Doç. Dr. Murat Özeren, sayın Doç. Dr. İlhan Mavioğlu ve eğitimimde emeği geçen Göğüs Hastalıkları AD, Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD, Genel Cerrahi AD ve diğer tüm hocalarıma ayrı ayrı minnet ve şükranlarımı sunarım.

Tezimin hazırlanmasında oldukça emek isteyen, yorucu tetkikleri büyük bir başarı ile gerçekleştiren Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Lülüfer Tamer'e, Arş. Gör. Lokman Ayaz' a ve Arş. Gör. Hatice Yıldırım'a, Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Tuba Karabacak'a, Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Bahar Taşdelen ve Öğr. Gör. Semra Erden'e,

Ayrıca bu tezin hazırlanması sırasında yapıcı eleştiri ve önerileri ile yol gösterici olan Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. İsmail Cinel'e,

Bizlerin eğitimi için çağdaş, özgür ve bilimsel bir çalışma ortamı yaratmak için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan başta rektörümüz sayın Prof. Dr. Süha Aydın olmak üzere, dekanımız sayın Prof. Dr. Güliz İkizoğlu'na,

Son olarak bana hayatın her aşamasında olduğu gibi uzmanlık eğitimim sırasında da desteğini esirgemeyen aileme ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum 'kardeşlerim' Göğüs Cerrahisi, Kalp Damar Cerrahisi ve Kardiyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlilerine teşekkürü bir borç bilirim.

# İÇİNDEKİLER

## SAYFA NO

ÖZET.....	5
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT).....	6
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	7
1.1. Giriş .....	7
1.2. Amaç .....	9
2. GENEL BİLGİLER.....	10
2.1. Serbest Radikaller, Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit .....	10
2.1.1. Radikal Kavramı.....	10
2.1.2. Serbest Radikal Kaynakları.....	11
2.1.2.1. Biyolojik Kaynakları .....	11
2.1.2.2. İntrasellüler Kaynakları .....	11
2.1.3. Serbest Oksijen Radikalleri .....	12
2.1.3.1. Süperoksit Anyon Radikali .....	13
2.1.3.2. Hidrojen Peroksit .....	13
2.1.3.3. Hidroksil Radikali .....	14
2.1.3.4. Singlet Oksijen .....	15
2.1.3.5. Hipoklorik Asit .....	15
2.1.3.6. Karbon Merkezli Radikaller .....	15
2.1.3.7. Nitrik Oksit .....	16
2.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri ve Hücre Hasarı.....	18
2.2.1. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit.....	19
2.3. Peroksinitritin Etkileri ve Akciğer Hastalıklarındaki Rolü.....	21
2.3.1. Peroksinitritin Oluşumu ve Hücre Hasarı.....	21
2.3.2. Nitrotirozinin Akciğer Hastalıklarındaki Rolü.....	23
2.4. Akut Akciğer Hasarı ve Akut Respiratuar Distress Sendromu.....	25
2.4.1. Tanımı ve Tarihçesi.....	25
2.4.2. İnsidans.....	26
2.4.3. Etiyoloji ve Risk Faktörleri.....	26
2.4.4. Patogenez.....	27
2.4.5. Patoloji ve Klinik Seyir.....	29

2.4.6. Komplikasyonlar ve Prognoz.....	30
2.4.7. Tedavi İlkeleri.....	31
2.5. Oksidatif Akut Akciğer Hasarını Önleme Çabaları.....	31
2.5.1. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	31
2.5.1.1. Enzimatik Antioksidanlar .....	32
2.5.1.2. Nonenzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri.....	34
2.6. Nonenzimatik Bir Antioksidan Olarak Etil Piruvat.....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	38
3.1. Deney Protokolü.....	38
3.1.1. Deney Hayvanlarının Temini Ve Deneylere Hazırlanması.....	38
3.1.2. Deneyin Yapılışı ve Deney Gruplarının Oluşturulması.....	38
3.1.3. Materyallerin Biyokimyasal ve Histopatolojik İncelemelere Hazırlanması.....	39
3.2. Çalışmada Yapılan Analizler.....	40
3.2.1.1. Malondialdehid Ölçümü.....	40
3.2.1.2. Myeloperoksidaz Ölçümü.....	41
3.2.1.3. Doku 3-Nitrotirozin/total tirozin Ölçümü.....	41
3.2.2. Histopatolojik İnceleme.....	42
3.2.2.1. Akciğer ve Trakea Dokusunun Histopatolojik İncelemesi.....	42
3.2.3. İstatistiksel Analizler.....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. Biokimyasal Ölçümlerin Değerlendirilmesi.....	44
4.1.1. Doku Malondialdehid Değerlendirilmesi .....	44
4.1.2. Serum Malondialdehid Değerlendirilmesi.....	45
4.1.3. Doku Myeloperoksidaz Değerlendirilmesi.....	45
4.1.4. Serum Myeloperoksidaz Değerlendirilmesi.....	46
4.1.6. Doku 3- Nitrotirozin/ Total tirozin Değerlendirilmesi.....	47
4.2. Işık Mikroskopisi Bulguları.....	48
4.2.1. Akciğer ve Trakeanın Histopatolojik Değerlendirilmesi.....	48
5. TARTIŞMA.....	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	58
6.1. Sonuç.....	58
6.2. Öneriler.....	59
7. KAYNAKLAR.....	60

<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....</b>	<b>68</b>
<b>ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ.....</b>	<b>70</b>
<b>TABLolar DİZİNİ.....</b>	<b>71</b>

## ÖZET

Nitrik oksit ile süperoksit radikallerinin reaksiyonu sonucu oluşan peroksinitrit, hidroksil radikali ve nitrojen diokside dekompoze olur. Peroksinitrit ve bu dekompozisyon ürünleri, lipid peroksidasyonunu başlatarak oksidatif doku hasarına neden olan reaktif moleküllerdir. Ratlarda yaptığımız bu çalışmamızda, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri bilinen Etil Piruvat (EP)'in, peroksinitrit aracılığı ile oluşturulan trakea ve akut akciğer hasarında oluşan lipid peroksidasyonu ve inflamasyon üzerine olan etkisini araştırdık.

Bu çalışmada 18 adet Wistar cinsi erkek rat randomize olarak 3 gruba ayrıldı. Tüm hayvanlara anestezi amacıyla thiopental sodyum ( $25 \text{ mg/kg}^{-1}$  intraperitoneal) uygulandı. Kontrol grubuna ( $n=6$ ) intratrakeal serum fizyolojik diğer gruplara intratrakeal peroksinitrit ( $10 \text{ mM}$   $0,5 \text{ ml}$  içinde) uygulandı. Tedavi grubuna ( $n=6$ ) peroksinitrite ek olarak Etil Piruvat ( $40 \text{ mg/kg}$  intraperitoneal) uygulandı. Peroksinitrit grubuna ( $n=6$ ) ise sadece peroksinitrit uygulandı. Serum ve dokuda lipid peroksidasyonunu takip etmek için Malondialdehit (MDA) düzeyleri, inflamasyondaki polimorfonükleer lökosit (PMNL) invazyonunun bir göstergesi olarak Myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ile yine dokuda peroksinitritin stabil son ürünü ve protein hasarı belirteci olan 3-Nitrotirozin (3-NT/total tirozin) ölçümleri yapıldı. Ayrıca, doku düzeyindeki hasarı araştırmak amacıyla ışık mikroskopisi kullanılarak semikantitatif histopatolojik skorlama yapıldı.

EP'in, peroksinitritle oluşturulan akciğer ve trakeadaki oksidatif hasarı azalttığı; MDA, MPO ve 3-NT/total tirozin konsantrasyonundaki yükselmelerin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldıklarının gösterilmesiyle (sırasıyla p değerleri:  $p=0,001$ ,  $p=0.001$  ve  $p=0,001$ ), ayrıca ışık mikroskopisinde semikantitatif histopatolojik skorlama yapılarak hasarın anlamlı olarak düzeltildiğinin ( $p=0.001$ ) belirlenmesi ile gösterildi.

Bu sonuçlar uyguladığımız rat modelinde EP'in, peroksinitritle oluşturulan trakea ve akut akciğer hasarında iyileşme sağladığını desteklemektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Etil piruvat, peroksinitrit, trakea, akut akciğer hasarı.

## ABSTRACT

### **The Influence of Ethyl Pyruvate on Lung and Tracheal Injury Induced by Peroxynitrite**

Peroxynitrite which is formed by the reaction of the nitric oxide with superoxide radicals, decomposes in hydroxyl radical and nitrogen dioxide. Peroxynitrite and these decomposition products, are reactive molecules causing oxidative tissue damage by making lipid peroxidation. In this study which is conducted on rats, we have searched the influence of Ethyl Pyruvate (EP) which is known with its anti-oxidant and anti-inflammatory properties, on the lipid peroxidation and inflammation on trachea and acute lung injury induced by peroxynitrite.

In this study 18 Wistar male rats are divided randomly into 3 groups. Thiopental Sodium ( $25 \text{ mg/kg}^{-1}$  intraperitoneal) is applied on all animals for anaesthetizing. Intratracheal saline ( $n=6$ ) was applied to the control group and intratracheal peroxynitrite (10 mM in 0,5 ml ) was applied to the other groups. Additionally only the treatment group applied Ethyl Pyruvate (40 mg/kg intraperitoneally). The levels of the Malondialdehyde (MDA) for observing the lipid peroxidation in serum and tissue, Myeloperoxidase (MPO) activity on tissue as an indicator of invasion of the polymorphonuclear leucocyte (PMNL) in the inflammation, and 3-Nitrotyrosine (3-NT/total tyrosine) as the last stabilized product of peroxynitrite and the indicator of the protein damage were measured. Moreover, for searching the damage at the level of the tissue by using light microscopy, semiquantitative histopathologic scoring was done.

That EP reduces the oxidative damage in lungs and trachea induced by peroxynitrite was proven; by showing that the increase in MDA, MPO and 3-NT/total tyrosin concentration statistically at a meaningful level decreases (respective p values:  $p=0,001$ ,  $p=0.001$  and  $p=0,001$ ), and also by the finding that damage was improved in a considerable way ( $p=0.001$ ) by light microscopy semiquantitative histopathologic scoring.

These findings support that EP improves the trachea and acute lung injury induced by peroxynitrite according to the rat model that we applied.

**Key Words:** Ethyl pyruvate, peroxynitrite, trachea, acute lung injury.



# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

## 1.1. Giriş :

Akciğerler, özellikli yapısı ve fonksiyonu nedeniyle, inflamasyon sırasında zarar görebilecek hedef organlardan biridir. Yüksek morbidite ve mortalite hızlarına sahip akut akciğer hasarı (AAH) ve onun çok şiddetli formu olan akut respiratuar distress sendromu (ARDS); travma, aspirasyon, sepsis, pnömoni, endotoksemi gibi pekçok inflamatuar nedenden kaynaklanan ciddi klinik problemlerdir. Fiziopatolojide alveol epitel ve kapiller endotelinde hasar, akut inflamasyon ve kardiyojenik olmayan proteinden zengin akciğer ödemi söz konusudur. Derin hipoksemi ve bozulmuş akciğer kompliyansı görülen bu hastalarda patogeneze ve tedavi stratejileri üzerindeki çalışmalar son 20-30 yıldır sürmektedir. AAH/ARDS tedavisindeki temel amaçlar altta yatan hastalığın tedavisi, akut akciğer hasarını en aza indirebilmek, dokuların oksijen ihtiyacının karşılanması ve iyatrojenik akciğer hasarından kaçınmak olmalıdır. Günümüzde AAH ve ARDS'nin tam olarak iyileştirici bir tedavisi mümkün olmayıp büyük oranda destek tedavisi yapılabilmektedir<sup>1-3</sup>.

Artmış serbest oksijen radikalleri (SOR) ve lipid peroksidasyonunun, doku hasarı ve değişik hastalıkların etiopatogenezeindeki rolü ve bunlardan korunma yollarında etkin olan ve/veya olabilecek yaklaşımlar, son yıllarda giderek artan ilgi alanı oluşturmaktadır. SOR, birincil olarak hastalık nedeni olabildiği gibi bazı hastalıklarda ikincil olarak da ortaya çıkar. Serbest radikaller başlıca, moleküler oksijenin, normal metabolizma basamaklarında indirgenmesi ile açığa çıkan, paylaşılmamış en az bir elektron bulunduran, kararsız ve yüksek reaktiviteye sahip kimyasal yapılardır. Hava kirliliği, bazı kimyasal maddelere maruz kalma, sigara dumanı ve iyonize edici radyasyon gibi çevresel kimyasal etkilerle karşı karşıya kalma sonucunda hücrelerde radikallerin çoğaldığı; hipoksi, inflamasyon, ısı artışı, aşırı fiziksel aktivite, iskemi, travma, intoksikasyon gibi durumların, radikal oluşumunu tetikleyen faktörler olduğu ileri sürülmektedir. Oksijen türevi serbest radikallerin iskemi-reperfüzyon hasarından diyabet, kanser ve hatta yaşlanmaya kadar birçok patolojik süreçte önemli rolü olduğu artık bilinmektedir<sup>4,5</sup>.

Normal şartlarda iç ve dış kaynaklı birçok stres faktörü hücresel dengeyi sürekli etkilemektedir. Bunlara karşı korunmada, hücrenin kendi geliştirdiği,

serbest radikal zincir reaksiyonlarını baskılayan veya radikal temizleyici özellikle antioksidan bileşikler rol oynamaktadır. Oksidan/antioksidan dengesinin oksidan lehine bozulması olarak tanımlanan oksidatif stres, antioksidan savunma sistemlerinin tükenmesine, organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat ve nükleik asit gibi biyomoleküllerin yapısını bozarak doku hasarının ortaya çıkmasına neden olur<sup>6,7</sup>.

Peroksinitrit, akciğer fonksiyonlarında önemli role sahip ve iki farklı serbest radikal olan nitrik oksit (NO) ile süperoksit anyonları arasındaki reaksiyon sonucunda oluşur. Bu işlem normal bireylerde de gerçekleşmektedir. Ancak düşük miktarlarda oluşan peroksinitrite bağlı zararlı etki görülmezken, süperoksit anyonunun aşırı üretildiği patolojik durumlarda, fazla miktarda oluşan peroksinitrite bağlı doku hasarı gelişebilmektedir. Bu hasarın en belirgin şekilde ortaya çıktığı dokulardan biri akciğer epitel hücreleridir. Peroksinitritin akciğerdeki oksidatif hasarda rolü olduğuna ve havayolu aşırı duyarlılığında, pulmoner inflamasyonda, surfaktan proteini hasarında veya epitel hasarında yer aldığına dair bulgular vardır. Peroksinitrit, proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve nükleik asitleri de içeren birçok biyomolekülle reaksiyona girebilir. Nitratlayıcı ajan olarak etki eden peroksinitrit, serbest veya proteine bağlı tirozin rezidülerini modifiye ederek nitrotirozin oluşturur. Birçok akciğer hastalığında nitrotirozin düzeylerinin arttığı bulunmuştur. Astma, endotoksin şoku, ARDS veya AAH, hiperoksi, sigara dumanının indüklediği pulmoner bozukluklar veya iskemi-reperfüzyon hasarını da içeren birçok akciğer bozukluklarının patofizyolojisi peroksinitrit oluşumunun artmasıyla ilişkili olabilir<sup>8-11</sup>.

Piruvik asit güçlü bir antioksidan ve SOR temizleyicisidir<sup>12</sup>. İskemi, hemorajik şok ve SOR'nin neden olduğu akut böbrek yetmezliğini de içeren çalışmalar bu bileşimin oksidatif hasara karşı hücreleri koruyabildiğini göstermiştir<sup>13-15</sup>. Piruvat'ın kararsız moleküler yapısı, tedavi edici ajan olarak kullanım alanını büyük ölçüde kısıtlar. Etil piruvat (EP), piruvik asitten türemiş basit bir alifatik esterdir. Etil piruvat'ın, piruvat'dan daha kararlı moleküler yapıya sahip olduğu bulunmuştur<sup>16</sup>. Son zamanlarda yapılan invivo ve invitro deneysel modellerde etil piruvat'ın etkili anti-inflamatuar özelliği de bildirilmiştir<sup>17-19</sup>.

## 1.2. Amaç :

Literatürde EP'in akciğer ve trakeadaki antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri üzerine selektif olarak yapılmış bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamız ratlarda intratrakeal peroksinitritin akciğer ve trakea hasarı oluşturan etkileri üzerine, antioksidan ve antiinflamatuvar bir ajan olan EP'in etkinliğini değerlendirmek amacı ile planlanmıştır.

Bu çalışmada amaçlanan hedefler sırasıyla aşağıda belirtilmiştir.

1) Deney hayvanlarına (ratlara) intratrakeal peroksinitrit uygulayarak akut akciğer ve trakea hasarı oluşturmak ve bu hasarı histopatolojik olarak göstermek,

2) SOR'ne bağlı olarak oluşan lipid peroksidasyonunun göstergesi doku ve serum malondialdehit (MDA) düzeylerini ölçerek kıyaslamak,

3) İnflamasyondaki rolü çok iyi bilinen ve doku polimorfonükleer lökosit (PMNL) invazyonunun göstergesi olan myeloperoksidaz (MPO) aktivitesini doku ve serum düzeyinde ölçerek, peroksinitrit'in PMNL akümüülasyonunda rolü olup olmadığını ortaya koymak,

4) Dokuda protein hasarı belirteci olan nitrotirozin (3-NT/Total tirozin) seviyelerini ölçerek gruplar arası farklarını karşılaştırmak,

5) Işık mikroskopisinde, dokuda histopatolojik semikantitatif skora yöntemi ile akciğer ve trakeadaki hasarı değerlendirmek,

6) Bir deney grubuna antioksidan ve antiinflamatuvar özelliği bilinen EP vererek, peroksinitritle oluşturulan akciğer ve trakea hasarı gelişimini yavaşlatma veya önlemedeki etkisini, yukarıda belirtilen parametrelerle biyokimyasal ve histopatolojik yöntemlerle araştırmak.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Serbest Radikaller, Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit :

#### 2.1.1. Radikal Kavramı:

Atomlar, nötron ve protondan oluşan bir çekirdekle, çekirdeğin çevresinde bulunan değişik sayıda elektronlardan oluşmaktadır. Enerji düzeylerine göre belirli bir düzende yerleşen elektronlar, orbital adı verilen yörüngelerde hareket etmektedirler. Her orbitalde yerleşik iki elektron, birbirine zıt yönde kendi eksenini etrafında dönmektedir. Her bir orbitale önce birer tane aynı yönde dönen elektron yerleşmekte ve atom numarasına göre sayıları artan elektronlar, tekrar aynı sıra ile ters yönde dönecek şekilde orbitale yerleşmektedir. Orbitallerden birine veya ikisine ters dönüşlü bir veya ters dönüşlü iki elektron yerleştirilmesi ile radikal elde edilmektedir. Serbest radikal, oksidan molekül yada en doğru adlandırma ile SOR; atomik veya moleküler yapılarında bir veya daha fazla sayıda eşlenmemiş tek elektron içeren kararsız moleküllerdir. Bu tek elektron çiftlenme eğiliminde olduğundan, serbest radikaller ileri derecede reaktiftir<sup>5,20-22</sup>.

Bir serbest radikalın dış yörüngesinde çiftlenmemiş bir tek elektronun varlığı konvansiyonel olarak üzerine bir nokta konularak gösterilir (R<sup>•</sup>). En basit serbest radikal hidrojen radikali (H<sup>•</sup>) yani hidrojen atomu olup bir proton ve bir adet çiftlenmemiş elektron içerir. Serbest radikal zincir reaksiyonları lipid peroksidasyonunda da olduğu gibi genellikle diğer moleküllerden bir adet hidrojen atomunun ayrılması ile başlar<sup>20,21</sup>.

Serbest radikaller ve iyonlar 3 şekilde oluşurlar<sup>5</sup>:

Elektron transferi ile radikal oluşumu  $A + e^- \rightarrow A^{\bullet}$

Homolitik ayrılma ile radikal oluşumu  $X : Y \rightarrow X^{\bullet} + Y^{\bullet}$

Heterolitik ayrılma ile iyon oluşumu  $X : Y \rightarrow X^{\bullet} + Y^+$

Aerobik organizmalarda bu radikaller daha çok oksijen radikalleri şeklinde kendini gösterir. Çünkü oksijen ortamda sürekli bulunan ve elektron ilgisi yüksek olan bir elementtir<sup>7,20,21</sup>.

## **2.1.2. Serbest Radikal Kaynakları:**

### **2.1.2.1. Biyolojik Kaynaklar:**

- 1) Aktive olmuş fagositler: Bakterisidal rollerinin gereği olarak süperoksit üretirler.
- 2) Antineoplastik ajanlar: Bleomisin, doksorubisin, adriamisin vb.
- 3) Radyasyon
- 4) Alışkanlık yapan maddeler: Alkol, uyuşturucular, sigara ve diğer yollarla tütün kullanımı,
- 5) Çevresel ajanlar: Toksik kimyasallar (kloroform, bromobenzen, halotan, difenoller, kinonlar), hava kirliliği (azot dioksit, ozon, sülfür dioksit), pestisitler, sitostatikler, metaller (titanyum, kurşun, molibden, nikel, krom, civa, arsenik), antibiyotikler (tetrasiklinler, kinolon antibiyotikleri, aminoglikozitler).
- 6) Stres: Katekolaminlerin düzeyi artar. Okside katekolaminler de serbest radikal kaynağıdır<sup>20,21,23</sup>.

### **2.1.2.2. İntrasellüler Kaynaklar:**

1) Mitokondriyal elektron transportu: Hücrelerdeki en büyük serbest radikal kaynağı elektron transport zincirinden elektron sızıntısıdır. Normal koşullarda mitokondri, sitokrom oksidaz sistemi ile oksijeni suya indirgeyerek detoksifiye etmektedir. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri [nikotinamid adenin dinükleotid (NAD), flavin adenin dinükleotid (FAD), KoenzimQ vb.] büyük oranda indirgendiği zaman mitokondriyal süperoksit radikal üretimi artar. Normal koşullarda bu sızıntı hücrenin savunma sistemleri ile yok edilebilmektedir. Ancak oksidan stres durumunda savunma sistemleri yetersiz kalmakta ve mitokondride hasar oluşmaktadır. Bu hasar sonucunda hücrenin enerji sisteminin etkilenmesiyle adenzin trifosfat (ATP) kullanımındaki artışa ve ATP sentezindeki azalmaya bağlı olarak hücrede ATP düzeyi hızla düşmektedir.

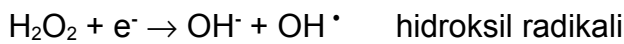
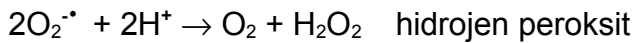
- 2) Enzimler ve proteinler: Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin.
- 3) Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinler, antibiyotikler.
- 4) Plazma membranı: Lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz, fagositlerde nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz,

lipid peroksidasyonu, araşidonik asitten endoperoksit 9,11-endopoksi-15-hidroperoksiprostaglandin [prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>)] oluşumu sırasında bir miktar serbest radikal oluşabilir. Bunlar da lipid peroksidasyon yolu ile MDA oluşturabilirler. Lipid peroksitleri ortamda aşırı miktarda biriktiğinde siklooksijenaz yolunu inhibe edebilirler.

- 5) Oksidatif stres yapıcı durumlar: İskemi, travma, intoksikasyon.
- 6) Peroksizomlar: Oksidazlar, flavoproteinler (peroksizomlar çok önemli hücre içi hidrojen peroksit kaynağıdır. Ancak peroksizomlarda katalaz aktivitesi de çok yüksek olduğu için sitozole geçen hidrojen peroksit miktarı belli değildir)<sup>7,20,21</sup>.

### 2.1.3. Serbest Oksijen Radikalleri:

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijen kökenli olanlardır. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler; oksijenin kendisi, süperoksit , hidrojen peroksit, geçiş metal iyonları ve hidroksil radikalidir<sup>24</sup>. İlk dördünün çeşitli reaksiyonlarıyla hidroksil radikali meydana gelir. Oksijenin mevcut elektronlarından ikisi eşleşmemiştir. Bu yüzden moleküler oksijenin kendisi de bir radikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Oksijen bu özelliği nedeniyle diğer serbest radikallerle kolaylıkla reaksiyona girebilirken, radikal olmayan maddelerle daha yavaş reaksiyona girer ve en son suya indirgenir. Bu arada kısmi redüksiyonla çok sayıda yüksek derecede reaktif ürünler oluşabilir<sup>20,21</sup>:



Açığa çıkan serbest radikaller güçlü oksidan ajanlardır. Etraflarındaki moleküller ile reaksiyona girerek onlardan elektron alıp kararlı hale gelirler<sup>20,21</sup>.

Bunlar dışında oksijenin diğer potansiyel sitotoksik ürünleri ise<sup>20,21</sup>;

Süperoksit anyon radikali  $O_2^{\cdot -}$

Hidroperoksil radikali  $HO_2^{\cdot}$

Hidrojen peroksit  $H_2O_2$

Hidroksil radikali  $OH^{\cdot}$

Peroksit radikali  $ROO^{\cdot}$  (R= lipid)

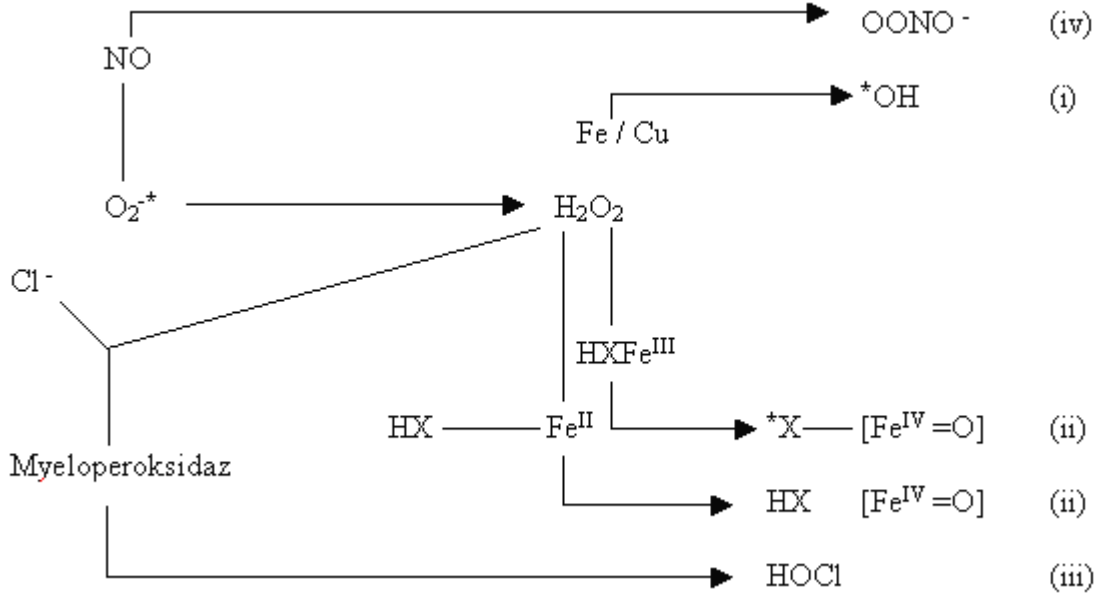
Singlet oksijen  $^1O_2$

Serbest radikaller elektron spin rezonans spektroskopisi ile belirlenirler. Ancak serbest radikal araştırmak için bu yöntemi kullanarak çalışmak ileri teknik donanım gerektirdiğinden araştırmacılar, serbest radikallerin lipidlerle, proteinlerle ve deoksiribo nükleik asit (DNA) ile reaksiyonları sonucu oluşan çeşitli ürünlerin ölçümü gibi dolaylı yöntemleri tercih etmektedir<sup>20,21,23</sup>.

**2.1.3.1. Süperoksit Anyon Radikali:** Süperoksit anyon radikalinin önemli bir kaynağı, bu radikalın mitokondriyal elektron transport sisteminden univalan sızıntısıdır. Süperoksit anyon radikali inflamatuvar hücrelerin yüzeylerinde bulunan redükte NADPH oksidaz sistemi (nötrofil, eozinofil, monosit, makrofaj) ile de oluşturulur. Hem çevresel etkenler, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikali süperoksit radikalidir. Süperoksit radikali, moleküler oksijene bir elektron bağlanması ile oluşur. Yarılanma ömrü çok kısa olup, oksidan etkisi zayıf fakat redüktan etkisi çok güçlüdür. Serbest radikal olmasına rağmen hasar oluşturucu bir tür değildir. Asıl önemi; hidrojen peroksitin kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının redükleyicisi olmasıdır. NO ile reaksiyona girerek peroksinitriti oluşturur (Şekil 1). Süperoksit, düşük pH'da daha reaktif olan perhidroksil radikaline (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>) protonlanır, fakat fizyolojik pH'da bu form çok düşüktür. Süperoksit radikali oksijenin neden olduğu toksisitede önemli bir rol oynar. Süperoksit, oluştuktan sonra tiyol grupları ile reaksiyon verebilir. Bu ise ya glutatyon (GSH) tüketilmesine sebep olarak hücreyi ileri bir oksidatif strese sokar veya enzim ve diğer hücresele proteinler üzerindeki tiyol grupları ile reaksiyon vererek onları inaktive eder. Süperoksit, aynı zamanda oksidatif strese neden olabilen önemli reaksiyonları da başlatabilir. Haber-Weiss reaksiyonu bunlardan biridir<sup>8,21,25</sup>.

**2.1.3.2. Hidrojen Peroksit:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son derece güçlü bir oksitleyici ajandır. Ancak, yavaş reaksiyon verir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'te elektronlar çiftlenmiş olduğu için serbest radikal değildir, ancak reaktif oksijen kategorisine girer ve oksidan etkilidir. Major kaynak olarak süperoksitin dismutasyon reaksiyonu ile ya da oksijenin direkt olarak indirgenmesi sonucu oluşur. Dismutasyon reaksiyonu spontan olarak veya süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığı ile katalize edilir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ya kendisi direkt olarak oksidatif hasar yapabilir ya da OH<sup>•</sup> gibi daha reaktif serbest radikal oluşturarak hasara sebep olabilir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, geçiş metal iyonlarının varlığında hidroksil radikallerini oluşturabilmektedir. Toksik etkisini demir ve

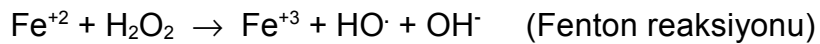
bakır varlığında potansiyel olarak aktif hidroksil radikaline dönüşerek gösterir (Şekil 1). Metal katalizörlerin yokluğunda süperoksit ve hidrojen peroksit kolaylıkla uzaklaştırılır ve zararsız hale getirilir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin oluşturduğu hasar, katalaz (KAT) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri ile önlenir<sup>22,26,27</sup>.



**Şekil 1:** Süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksit'in reaksiyonları<sup>22,26,27</sup>.

Süperoksit ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) radikalinden hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oluşur. i) Hidrojen peroksit demir (Fe) ve bakır (Cu) gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalleri ( $\cdot\text{OH}$ )'ni oluşturur. ii) Hidrojen peroksit myoglobin ve hemoglobin ( $\text{HXFe}^{\text{III}}$ ) gibi spesifik Hem proteinleri ile reaksiyona girerek ferril Hem protein radikallerini ( $\cdot\text{X} - [\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]$ ) oluşturur. iii) Respiratuar yanıt sürecinde nötrofillerden salınan myeloperoxidaz hipoklorid ( $\text{HOCl}$ ) anyonunun sentezlenmesine neden olur. iv) Süperoksit NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit anyonlarını ( $\text{OONO}^-$ ) üretir.

**2.1.3.3. Hidroksil Radikali:** En reaktif oksijen radikali hidroksil radikali'dir. Hidroksil radikali tüm biyolojik substratlarla reaksiyona girebilen, hücre membranlarındaki doymamış yağ asitleri, hücre içinde ve membranındaki proteinler, karbonhidratlar, DNA zincirleri gibi önemli komponentlerin yapı ve fonksiyonlarını bozabilen aktif yapıdadır<sup>26,27</sup>. Hidroksil radikali, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile üretilebilir.

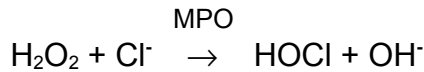




Ayrıca X-ışınları veya  $\gamma$ -ışınları gibi iyonize edici radyasyona maruz kalınması sonucunda hücre ana bileşenlerinden su molekülünün parçalanması ile de hidrojen radikali ( $H\cdot$ ) ve hidroksil radikali ( $HO\cdot$ ) oluşabilir<sup>21,22,26,27</sup>.

**2.1.3.4. Singlet Oksijen:** Oksijen molekülünün enerji alması ile moleküler oksijenin daha reaktif bir türü olan singlet oksijenler oluşur. Delta ve sigma olmak üzere iki tipi vardır. Delta tipinde daha fazla enerji vardır ve daha reaktiftir. Singlet oksijen bir radikal olmayıp, sıklıkla serbest oksijen radikalleri ile birlikte anılan reaktif oksijen türüdür. Serbest radikal reaksiyonlarıyla üretilebilir. Laboratuvar ortamında  $H_2O_2$  ve soğuk alkali çözeltisi üzerinden klor ( $Cl$ ) gazı geçirilmesi ile oluşan hipoklorik asit ( $HOCl$ ) karışımından singlet oksijen üretilebilmektedir. Oluşan  $HOCl$  sayesinde hücre içine alınan bakteri veya diğer mikroorganizmalar parçalanarak öldürülmektedir. Singlet oksijen'in vucutta deri ve retina gibi gün ışığına maruz kalan bölgelerde fotosensitizasyon reaksiyonu ile de sıkça oluştuğu tespit edilmiştir. Bu bölgelerde çok fazla doymamış yağ asitleri bulunduğundan singlet oksijen bu lipitlere hızla geçerek harabiyet oluşturabilir. Singlet oksijenler, organizmadaki proteinler ve bazı aminoasitlerle (triptofan, metiyonin, sistein veya histidin gibi) reaksiyona girerek de önemli biyolojik hasarlar oluşturabilir<sup>21,22,27</sup>.

**2.1.3.5. Hipoklorik Asit:** Hipoklorik asit ( $HOCl$ ) de gerçek radikal olmadığı halde SOR'i arasında değerlendirilmektedir.  $HOCl$ , fagositik hücrelerce bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynar. Aktive olan PMNL, süperoksit üretir. Bu serbest radikal üretimi, fagositer hücrelerin bakterileri öldürmesinde çok önemlidir. Solunum patlaması sırasında oluşan süperoksit moleküllerinden, spontan dismutasyon reaksiyonu sonucu hidrojen peroksit oluşur. Özellikle nötrofiller içerdikleri myeloperoksidaz enzimi aracılığıyla, hidrojen peroksiti, klorür iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyel oksidan olan  $HOCl$ 'e dönüştürür<sup>27,28</sup>.



**2.1.3.6. Karbon Merkezli Radikaller:** Hidroksil radikali yağ asitleri başta olmak üzere, nükleik asitler, karbonhidratlar ve proteinler gibi biyolojik makromoleküllerden bir proton çıkarıp karbon merkezli organik radikallerin oluşmasına neden olur. Karbon merkezli radikaller hızlı bir şekilde  $O_2$  molekülü

ile reaksiyona girerek, ilgili peroksil radikallerini ( $ROO^{\bullet}$ ) oluşturmak üzere birleşirler. Bu peroksil radikali lipid peroksidasyonunu başlatan radikal olup çok uzun ömürlüdür. Peroksil radikalinden bir oksijen atomu çıkması sonucu alkoksil radikali ( $RO^{\bullet}$ ) oluşur<sup>21,27</sup>.

**2.1.3.7. Nitrik Oksit:** Nitrik oksit ve nitrojen dioksit gibi bazı genel inorganik bileşikler de dış yörüngelerinde bir adet çiftlenmemiş elektron ihtiva ederler ve bu tanıma göre onlar da serbest radikaldir. Biyolojik sistemlerde oluşan reaktif nitrojen türevlerinin en önemlisi NO'dir. NO, bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftlenmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir. NO, hemoglobinle hızla etkileşiminden dolayı in vivo olarak kısa yarılanma ömrüne (1-5 saniye) sahip, eşleşmemiş bir elektronu olan bir serbest radikaldir. Nitrik oksit, suda ve yağda çözünebilen, biyolojik membranlardan kolayca difüze olup, nitrit ve nitrate okside olabilen renksiz bir gazdır. Tiyol grupları ile reaksiyona girerek gerektiği zamanlarda kullanılmak üzere depolanır. NO, otokrin ve parakrin bir mesajcı olarak da görev yapmaktadır<sup>9,10,27,29,30</sup>.

NO oksijen, süperoksit radikalleri veya geçiş metalleri (hemoproteinlere bağlı demir gibi) ile hızla reaksiyona girer. NO, kan akımının regülasyonu, trombosit fonksiyonları, non-adrenerjik non-kolinerjik (NANK) nörotransmisyon ve santral sinir sistemi hafızası gibi pek çok fizyolojik olayda düşük konsantrasyonlarda bir sinyal taşıyıcı olarak fonksiyon görürken, tümörler ve patojenlere karşı ise sitotoksik ve sitostatik savunma mekanizmalarında yüksek konsantrasyonlarda çeşitli biyolojik fonksiyonları etkileyen ulak moleküldür<sup>30,31</sup>. Pek çok çalışma NO'nun pulmoner fonksiyonları modüle etmesinde ve çeşitli pulmoner hastalıkların patogeneğinde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir<sup>29-32</sup>.

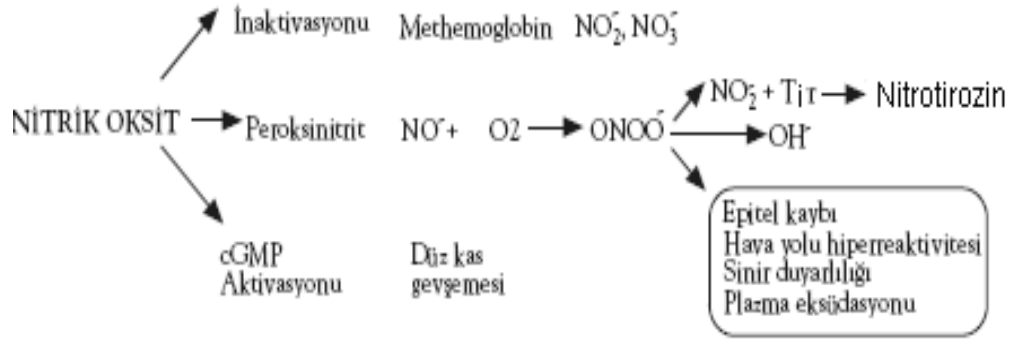
Solunum sisteminde NO, epitel hücresi, solunum yolu sinirleri, inflamatuvar hücreler (makrofajlar, nötrofiller, mast hücreleri), damar endoteli, düz kas hücreleri, Tip 2 alveolar hücreler gibi çeşitli hücre tiplerinde sentezlenmektedir<sup>31,32</sup>. NO, L-arjinin amino asitinin oksidasyonu ile oluşmaktadır. Bu reaksiyon için ortamda oksijen ve bazı diğer ko-faktörlerin [NADPH, FAD, flavin mononükleotid (FMN), tetrahidrobiopterin ve kalmodulin] bulunması gerekir. Bu reaksiyon hem oksijen hem de NADPH bağımlıdır ve NO'in yanı sıra L-sitruilin oluşmasıyla da sonuçlanmaktadır. NO sentezinden sorumlu enzim olan nitrik oksit sentaz (NOS)'ın 3 farklı izoformu vardır. Bunlar;

yapısal nöronal NOS (NOS I veya nNOS), indüklebilir NOS (NOS II veya iNOS), yapısal endotelial NOS (NOS III veya eNOS)'dur. Bu üç NOS izoformu da solunum yollarında eksprese edilmektedir. Fonksiyonel olarak NOS, yapısal NOS (constitutive NOS =cNOS) ve iNOS formları şeklindedir. cNOS nöronlarda bulunan nNOS ve endotel hücrelerinde bulunan eNOS'dır. cNOS humoral, kimyasal ve mekanik olarak uyarılan hücrelerden,  $Ca^{2+}$  ile kalmodüline bağlı olarak saliverilir. iNOS izoformu ise tümör nekroz faktörü (TNF)- $\alpha$ , interferon ( $\text{IFN}$ )- $\gamma$  ve interlökin ( $\text{IL}$ )- $1\beta$  gibi proinflamatuvar sitokinler, endotoksin ve ekzotoksinlerle indüklenir. iNOS, indüklenmesinden birkaç saat sonra nM konsantrasyonlarda (1000 kat daha fazla) proinflamatuvar NO salıverir ve bu uzun süreli (saatler, günler) devam edebilir<sup>23,31-34</sup>.

Nitrik oksit, proinflamatuvar veya antiinflamatuvar etkileriyle, akut ve kronik inflamasyonda önemli bir role sahiptir. Nitrik oksit oldukça reaktif bir moleküldür ve peroksinitrit oluşumu yoluyla oksidan etki gösterir. Bu oksidan özelliği nedeniyle bakterisid ve tümör hücrelerine karşı sitotoksiktir ve savunma sisteminin bir parçası olarak görev yapar. Ancak aynı özellikler astımda görülen inflamasyonun da bir nedeni olabilmektedir<sup>34</sup>. Nitrik oksidin birçok zararlı etkisi süperoksit anyonu ile reaksiyonu sonucu oluşan peroksinitrite bağlı olarak ortaya çıkar (Şekil 2). İnflamatuvar süreçte NO ve süperoksit radikallerinin oluşumu epitel hasarına, medyatör salınımına ve hava yolu duyarlılığının artmasına neden olmaktadır. İnflamatuvar sitokinler, özellikle  $\text{IFN}$ - $\gamma$ , hava yolu epitelinde NOS-II sentezini indüklemektedir. Kortikosteroid ve lökotrien antagonistleri gibi antiinflamatuvar ilaçların uygulanması eNOS seviyelerini ve NOS-II sentezini azaltmakta iken viral üst solunum yolu enfeksiyonu (ÜSYE) ve bronş provokasyon testleri sonucunda artmaktadır<sup>31,33,35</sup>. Artan NO aynı zamanda vazodilasyon özellikleri nedeniyle bronşiyal dolaşımdaki kan akışını artırarak hava yolu ödemeine neden olur. Astımdaki aşırı NO artışı ayrıca ventilasyon-perfüzyon uyumsuzluğuna da neden olabilmektedir. Bazı durumlarda NO, ortamdaki süperoksit ve diğer reaktif oksijen radikallerini bağlayarak antioksidan özellik de göstermektedir. Bu açıdan bakıldığında belki de inflamatuvar süreçlerde NO artışı koruyucu bir antioksidan özellik olarak kabul edilebilir<sup>31,33</sup>.

İnsan vücudunda NO, hemoglobine bağlandığında inaktive olur. Bu bağlanma, oksijene göre 3000 kat daha hızlı olmaktadır<sup>32</sup>. Bu kadar hızlı

inaktive olması belki de nitrik oksidin etkilerini lokalize kılan en önemli faktördür. Nitrik oksit aynı zamanda serbest radikal süperoksit tarafından da inaktive edilmektedir. Böylece süperoksit dismutaz gibi süperoksidi ortadan kaldıran enzimler NO'nun ömrünü uzatabilir. Nitrik oksidin süperoksitle reaksiyonu sonunda peroksinitrit oluşur ki bu, oldukça güçlü doku hasarına yol açan bir maddedir, sitotoksik ve oksidatif özellikleri mevcuttur ve nitrik oksitin inflamatuvar etkilerinden sorumludur (Şekil 2). Peroksinitrit dokularda çok hızlı yıkıldığı için tayin edilemez, bu nedenle tirozin ile oksidasyonu sonucu oluşan 3-nitrotirozin peroksinitrit seviyelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Akciğerin inflamatuvar hastalıklarında (AAH/ARDS, astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı) 3-nitrotirozin seviyelerinde artış bulunmaktadır<sup>33</sup>.



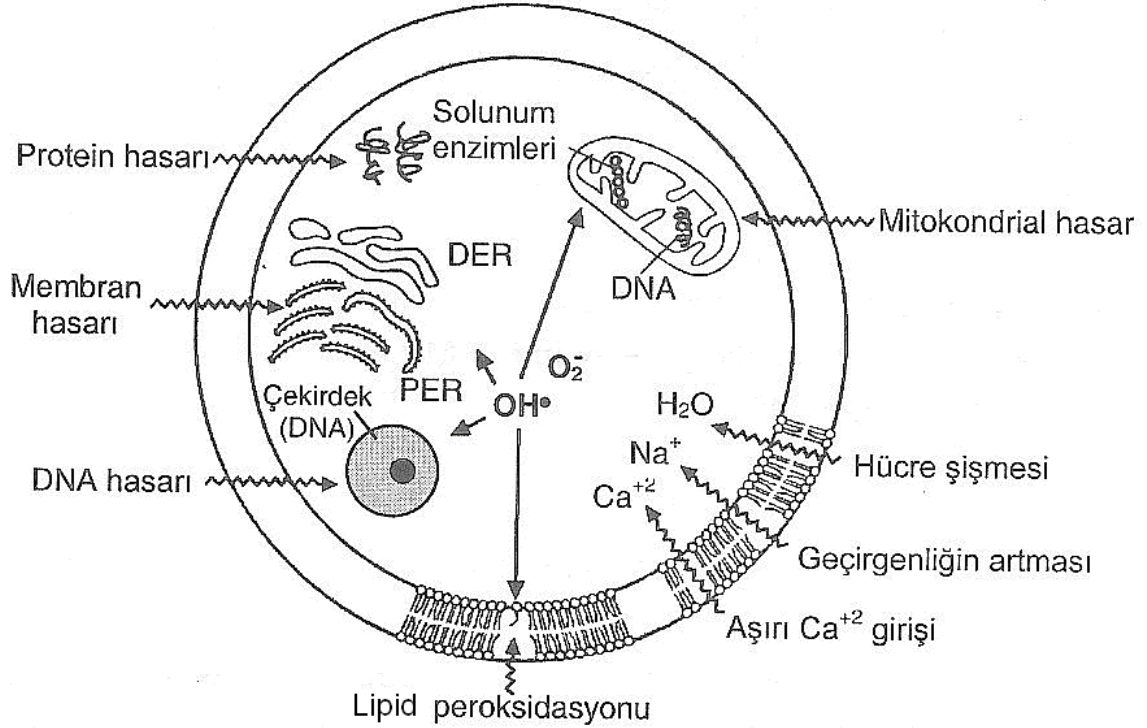
**Şekil 2:** Nitrik oksitin etkileri, peroksinitrit ve nitrotirozin oluşumu<sup>33</sup>:

1) Methemoglobin, nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) ve nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) dönüşerek inaktive olur; 2) süperoksit anyonları (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ile birleşerek peroksinitrite (ONOO<sup>-</sup>) dönüşür. Peroksinitrit, hidroksil radikalleri (OH<sup>-</sup>) ve tirozinle (Tir) birleşerek nitrotirozini oluştururlar. OH<sup>-</sup> ve ONOO<sup>-</sup> astım patogenezinde rol alan moleküllerdir; 3) Bu etkinin aksine guanil siklaz aktivasyonu ile cGMP'yi artırarak düz kas gevşemesine de neden olabilmektedir.

## 2.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri ve Hücre Hasarı:

Organizma, tüm anabolik ve katabolik reaksiyonlar esnasında ve sonrasında, sürekli bir oluşum halindeki serbest radikal reaksiyonları ile oksidanlara maruz kalırken, bir yandan da endojen antioksidanlar adı verilen moleküller tarafından etkisizleştirme süreci içindedir. Daha önce de belirtildiği gibi; serbest radikaller, belirli düzeylerde kaldıkları sürece, organizmanın yabancı maddelere ve infeksiyöz ajanlara karşı savunmasında önemli moleküllerdir. Ancak belirli düzeyin üzerinde oluşurlar ve/veya antioksidanlar

yetersiz kalırsa serbest radikaller hücresel yapıları etkileyerek hücre hasarına yol açarlar (Şekil 3)<sup>20,26,36</sup>.



**Şekil 3:** Serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarı<sup>36</sup>.

DER: Degranüle endoplazmik retikulum,

PER: Peroksizom,

DNA: Deoksiribo nükleik asit

### 2.2.1. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit:

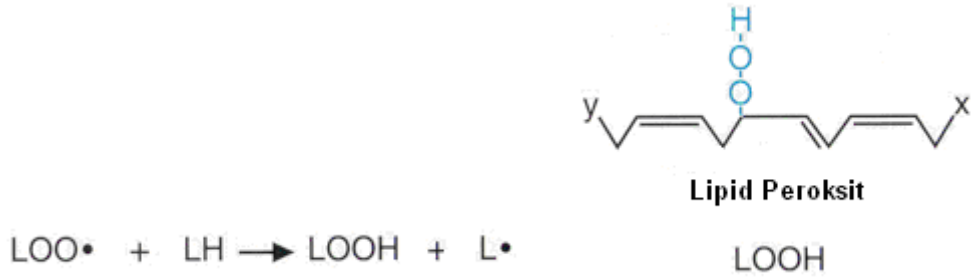
Serbest radikallerin en belirgin hasar verici etkisi hücre membranlarında oluşan lipid peroksidasyonudur. Serbest radikaller, lipid peroksidasyonunu indükleyerek fonksiyonel ve yapısal hücre hasarına neden olurlar. Memeli hücre membranları peroksidatif hasara karşı çok duyarlı olan büyük miktarda çoklu doymamış yağ asitleri (Polyunsaturated fatty acids=PUFA) içermektedir. PUFA'nın oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve hücresel hasarın en önemli nedenlerinden biridir. Kendi kendini devam ettiren zincir tepkimeler şeklinde ilerler ve oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür<sup>20-22,26</sup>.

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan serbest radikallerin etkisi sonucu membran yapısında bulunan PUFA zincirinin alfa –metilen gruplarından bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Uzaklaşan hidrojen atomu

sebebiyle karbon atomu üzerinde ortaklaşmamış bir adet elektron kalır ki bu da yağ asidi zincirinin radikal (karbon merkezli lipid radikali) olmasına neden olur.



Oluşan bu lipid radikali (L•) kararsız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle konjuge dienler ve daha sonra lipid radikalının moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali (LOO•) oluşur. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer PUFA'ları etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder<sup>21,22,26</sup>.



Plazma membranı ve subsellüler organel lipid peroksidasyonu, serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallerinin varlığında artar. Bu metaller redoks katalisti olarak görev yaparak, süperoksit ve hidrojen peroksitin daha güçlü oksidanlara dönüşümünü katalizlerler<sup>22</sup>.

Lipidlerden, araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine “enzimatik lipid peroksidasyonu”, diğer radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna ise “non-enzimatik lipid peroksidasyonu” adı verilir<sup>5</sup>.

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerinin yıkımı, geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında, çoğu biyolojik olarak aktif ve toksik olan aldehitler ile diğer karbonil bileşiklerine dönüşürler. Bu aldehitlerden en iyi bilineni MDA ve 4-hidroksinonenal'dir. Bu bileşikler, ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Malondialdehit, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif indikatörü değildir fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin göstergesi olarak kullanılır<sup>21,36</sup>.

Belirttiğimiz gibi zararlı bir zincir reaksiyonu olan lipid peroksidasyonu hem direk olarak membran yapısına hem de indirek olarak reaktif aldehitler üretmek suretiyle diğer hücre bileşenlerine zarar vermektedir. Böylece hücre hasarına ve birçok hastalığa neden olur. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması yüzünden reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerle oluşur. Böylece membranlarda, reseptörleri ve mebrana bağlı enzimleri inaktive ederek, membran geçirgenliği ve viskozitesini ciddi şekilde etkilerler. Ayrıca peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Bu da membranda deformasyon, iyon transportunun bozulması, enzim aktivitesinin değişimi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir<sup>21,24,26,27,36</sup>.

## **2.3. Peroksinitritin Etkileri ve Akciğer Hastalıklarındaki Rolü:**

### **2.3.1. Peroksinitritin Oluşumu ve Hücre Hasarı:**

Peroksinitrit, nitrik oksit ile süperoksit radikallerinin reaksiyonu ile oluşan önemli bir biyolojik oksidandır. Bu reaksiyonun hızı, süperoksitin SOD ile olan reaksiyon hızından yaklaşık 4 kat daha fazladır. Normal koşullarda çok az peroksinitrit oluşabilir. NO ve süperoksitin konsantrasyonunun arttığı ve/veya SOD aktivitesinin düşük olduğu patolojik olaylarda peroksinitrit oluşumu belirgin

olarak artar. İnflamasyon gibi birçok patolojik durumda hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artarak, NO ve süperoksitin salıverilmesine yol açar. Makrofajlar ve nötrofiller stimüle edildiklerinde NO ve süperoksiti salıvererek peroksinitrit oluşumuna neden olabildikleri gibi, NO ve süperoksit farklı hücrelerden de salıverilip peroksinitrit oluşturabilirler<sup>37-41</sup>.

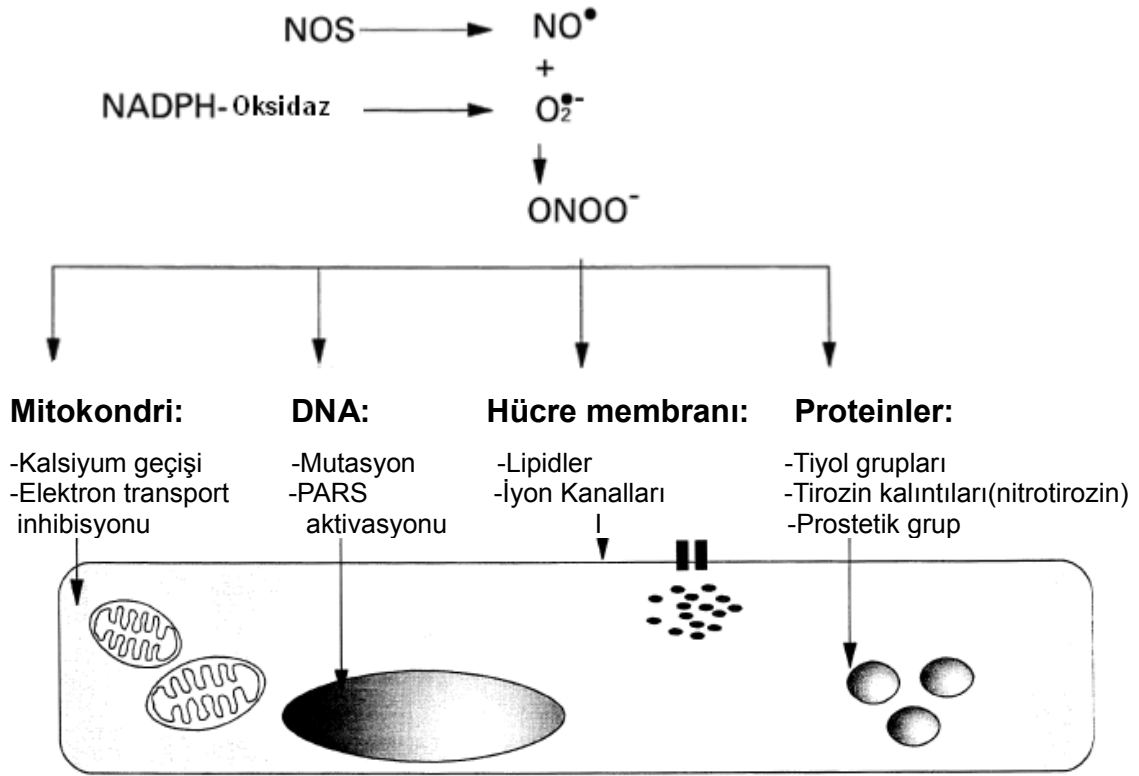
Organizmada peroksinitrit, hidroksil radikali gibi davranan hidroksinitrite (HOONO) dönüşür. Peroksinitritin parçalanmasıyla yüksek konsantrasyonlarda nitrojen dioksit (NO<sub>2</sub>) oluşur. Oluşan bu ürünler güçlü oksidan özelliğe sahiptir. Bu reaktif nitrojen bileşikleri lipidler, DNA, tiyoller, amino asitler ve metallerle reaksiyona girerek enzim fonksiyonlarını bozar, membran bütünlüğüne zarar verir ve DNA mutasyonuna neden olabilir. Bunların sonucunda lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu başlar.

Peroksinitrit proteinlerdeki veya serbest haldeki tirozinin fenolik halkasına nitro grubu ekleyerek 3-nitrotirozini oluşturur. Bu reaksiyon spontan olarak oluşabileceği gibi, geçiş metalleri, SOD, CO<sub>2</sub> ve miyeloperoksidaz tarafından da katalize edilir. Nitrit ve hipoklorik asit reaksiyon ürünleri gibi ajanların, peroksinitritten bağımsız olarak nitrotirozin oluşturabildiklerinin bildirilmesine karşın, biyolojik sistemlerde oluşan nitrotirozinin yaygın olarak peroksinitrit oluşumunu yansıması daha olasıdır<sup>38</sup>.

Peroksinitrit ve hidroksil radikalleri hücre membran lipidlerinin peroksidasyonuna, DNA ve çok sayıda enzim proteininin oksidasyonuna neden olur (Şekil 4). Membran lipidlerinin peroksidasyonu, hücre mebranınin akışkanlığını, elastikiyetini ve geçirgenliğini azaltarak membran bütünlüğünün bozulmasına yol açarlar. Bu radikaller, hücre içi iyonize kalsiyum düzeylerini sürekli artırarak mitokondrial solunum ve elektron transport zincirinin inhibisyonuna, ATP üretiminin azalmasına ve radikal üreten enzimlerin aktivasyonuna bağlı olarak hücreler üzerinde sitotoksik etki meydana getirirler. Ayrıca peroksinitrit, DNA'da tek zincir kırılmasına neden olurken, nükleer bir enzim olan "poli- ADP-riboz sentaz" (PARS)'da aktive olur. PARS, substratı NAD<sup>+</sup>'yi tüketip, mitokondrial solunum ve elektron transportunu inhibe ederek hücresel enerji üretimini baskılar. Sonuçta glikoliz hızı, elektron transportu ve ATP oluşumu azalır, bu da akut hücre hasarı ve hücre ölümüne neden olur<sup>10,41-</sup>

44.





**Şekil 4:** Hücrede peroksinitritin etkileri<sup>10,41</sup>:

NOS: Nitrik Oksit Sentaz, NO: Nitrik Oksit ONOO<sup>-</sup>: Peroksinitrit, PARS: poli (ADP-riboz) sentaz

### 2.3.2. Nitrotirozinin Akciğer Hastalıklarındaki Rolü:

Astmalıların ekspirasyon havasında nitrotirozin düzeylerinin belirgin olarak arttığı saptanmıştır<sup>45</sup>. Solunum yolu epiteli ve inflamatuvar hücrelerde kuvvetli nitrotirozin immunoreaktivitesinin saptanması, astmada peroksinitritin oluştuğunu ve solunum yolunun aşırı cevaplılığı, epitel hasarı ve bronkokonstrüksiyonda rolünün olduğunu göstermektedir<sup>46</sup>.

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH) patogenezinde rolü olan oksidanların kaynağı sigara dumanı ve aktive olmuş fagositik hücrelerdir. KOAH'da inflamatuvar hücrelerde belirgin nitrotirozin immünoreaktivitesi saptanmıştır<sup>47</sup>.

Kistik fibrozisli hastaların ekspirasyon havası kondensatında nitrotirozin düzeylerinin belirgin olarak arttığı saptanmıştır<sup>48</sup>.

Sigara dumanının yüksek konsantrasyonda NO içermesi ve katranda süperoksit oluşturucu kinon/hidrokinon redoks sisteminin bulunmasından dolayı, sigara içenlerin akciğerlerinde peroksinitrit oluşabilir ve akciğer kanseri gibi sigara ile ilgili hastalıklarda peroksinitrit önemli rol oynayabilir<sup>49</sup>.

Kısmen hiperoksidedeki oksidatif stresden kaynaklanan infantların bronkopulmoner displazisinde, plazma nitrotirozin konsantrasyonunun arttığı saptanması, premature infantlardaki bu hastalığın gelişmesinde peroksinitrit aracılı oksidan stresin rolü olduğunu göstermektedir<sup>50</sup>.

Akut akciğer hasarı olan insanlarda ve peroksinitritle inkübe edilen ratlarda yaygın nitrotirozin düzeylerinin saptanması, bu hasarlarda peroksinitritin rolü olduğunu göstermektedir<sup>10,51</sup>. Son zamanlarda yapılan bir araştırmada<sup>52</sup> peroksinitritin oluşturduğu akut akciğer hasarında endotelin-1'in de rolünün olabileceğini göstermiştir.

AAH ve ARDS'de diffüz ve yoğun inflamasyonla oluşan alveoler kapiller membran hasarı pulmoner ödeme yol açar. ARDS'li hastaların akciğerlerinde immunohistokimyasal olarak yaygın nitrotirozin rezidülerinin bulunduğu saptanması, peroksinitritin oluştuğunu ve akciğer dokusuyla reaksiyona girdiğini göstermektedir<sup>51</sup>.

Solunum yolu inflamasyonu, epitel hasarı ve solunum yolu aşırı cevaplılığı astma gibi inflamatuvar akciğer hastalıklarında görülmektedir. Kobay izole trakeasına peroksinitrit uygulaması epitel hasarı oluşturarak histamin ve metakolinin oluşturduğu kontraksiyonları anlamlı olarak artırmıştır. İntratrakeal peroksinitrit uygulanması da koblarda agonistlere karşı kontraksiyonda nonspesifik olarak trakeal aşırı cevaplılık oluşturur<sup>53</sup>. Sıçanlarda kronik akciğer infeksiyonunda iNOS ekspresyonunun artmasına karşın, iNOS aktivitesinin ve dolayısıyla nitrotirozin düzeylerinin artmadığı gösterilmiştir<sup>54</sup>. Adenovirus infeksiyonunda ise peroksinitrit oluşumu ve nitrotirozin düzeyi belirgin olarak artmaktadır<sup>55</sup>. İdiyopatik pulmoner fibrozisli hastaların balgamında glutatyon düzeyi sağlıklı insanlarla karşılaştırıldığında 4 kattan daha fazla azalma göstermiştir<sup>56</sup>.

Asbestos inhalasyonu akciğerlerde önemli inflamatuvar ve toksik cevaplar oluşturmaktadır. Sıçanlarda asbestos inhalasyonu peroksinitrit aracılığıyla nitrotirozin oluşumuna yol açmaktadır<sup>57</sup>. Bu araştırma, asbestosla indüklenen akciğer hasarında peroksinitritin önemli rol oynayabileceğini göstermektedir.

## 2.4. Akut Akciğer Hasarı ve Akut Respiratuar Distres Sendromu :

### 2.4.1. Tanımı ve Tarihçesi :

AAH ve ARDS; akut solunum yetmezliğine yol açan akciğerlerin alveolar epiteliyal ve kapiller endoteliyal bariyerlerinin yaygın hasarı, akut inflamasyon ve proteinden zengin pulmoner ödem ile karakterize sık görülen klinik bozukluklardır. ARDS'nin, ilk kez Ashbaugh ve arkadaşları tarafından 1967 yılında takipne, oksijen tedavisine dirençli hipoksemi, diffüz alveolar infiltratlar ve pulmoner kompliansda düşmeye yol açan, akut başlangıçlı bir sendrom olarak tanımlandığı bildirilmiştir<sup>2</sup>.

İlk yıllarda ARDS tanımı adult (erişkin) respiratuar distres sendromu olarak kullanılmaya başlanmışken, güncel tanımlama 1994'de NAECC (North American European Consensus Conference)'ında yapılmış, adult tanımı akut tanımı ile değiştirilerek ARDS ve AAH için tanı kriterleri kabul edilmiştir (Tablo 1)<sup>1</sup>.

**Tablo 1:** AAH ve ARDS için önerilen spesifik kriterler<sup>1</sup>:

Kriter	Zamanlama	Oksijenasyon	Akciğer Grafisi	Pulmoner Kapiller Wedge Basıncı
<b>AAH</b>	Akut başlangıç	$PaO_2/FiO_2 \leq 300$ mmHg (PEEP düzeyine bakılmaksızın)	Bilateral infiltratlar	$\leq 18$ mmHg veya sol atrial hipertansiyonun klinik bulgularının olmaması
<b>ARDS</b>	Akut başlangıç	$PaO_2/FiO_2 \leq 200$ mmHg (PEEP düzeyine bakılmaksızın)	Bilateral infiltratlar	$\leq 18$ mmHg veya sol atrial hipertansiyonun klinik bulgularının olmaması

AAH: Akut Akciğer Hasarı,

ARDS: Akut Respiratuar Distres Sendromu,

$PaO_2$ : Arteriyel kandaki parsiyel oksijen basıncı,

$FiO_2$ : İnspire edilen havadaki oksijen konsantrasyonu,

PEEP: Positive End Expiratory Pressure (ekspirasyon sonrası pozitif havayolu basıncı)

Bu tanımlamaya göre ARDS, akciğer hasarının en ağır formudur. AAH, sol atrial veya pulmoner kapiller hipertansiyon ile açıklanamayan fakat bunlarla birlikte olabilen klinik, radyolojik ve fizyolojik bozukluklar ile seyreden akciğerlerin yaygın inflamasyonu ve permeabilite artışı olarak tanımlanır. AAH, ARDS'nin daha hafif bir formu olup ARDS'de olduğu gibi akut başlangıçlıdır ve akciğer grafisinde kardiyak bir nedenden kaynaklanmayan diffüz bilateral infiltratlar mevcuttur. Ancak

AAH'da akciğerlerdeki gaz değişimi bozukluğu ARDS'den daha hafiftir ve bu nedenle de  $PaO_2/FiO_2$  oranı 300 mmHg'nın (normali=500 mmHg) altındadır. ARDS 'da ise gaz değişimindeki bozukluk AAH 'dan daha şiddetli olduğundan  $PaO_2/FiO_2$  oranı 200 mmHg'dan küçüktür<sup>1,2</sup>.

AAH/ARDS tanısı genellikle klinik olarak konulmaktadır. ARDS'na neden olduğu bilinen risk faktörlerinin varlığında, akut başlayan ve kardiyak disfonksiyondan kaynaklanmayan akciğer ödemi, pulmoner kapiller wedge basıncı (PCWP: Pulmonary Capillary Wedge Pressure) <18 mmHg ve inatçı hipoksemi (uygulanan PEEP düzeyine bakılmaksızın  $PaO_2/FiO_2$ <200 mmHg olması) gelişmesi ile tanı konmaktadır<sup>1,2</sup>.

ARDS'de solunum yetmezliği, akciğerlerin gaz değişiminde rol oynayan komponentlerinin yaygın olarak hasarlanması sonucu gelişir. Kardiyak pulmoner ödem ve masif kan aspirasyonu da akciğerlerde hasar olmaksızın aynı klinik tabloya neden olabilir. Özellikle diastolik fonksiyon bozukluğu olanlarda, akciğer grafisinde kalp gölgesinin normal olması halinde, sol kalp yetmezliğini ARDS'den ayırmak güç olabilir. Sol kalp yetmezliği genellikle pulmoner arter kateteri ile PCWP ölçülerek ARDS'dan ayırt edilebilir. Bununla beraber kardiyak pulmoner ödem ve ARDS'nun bir arada bulunması da mümkündür. PCWP'ı yükselmiş bir hastada (>18-20 mmHg) ARDS'den şüphe ediliyorsa, bu şüphe sadece PCWP normale döndükten 24-48 saat sonra akciğer grafisinde pulmoner infiltratların devam etmesi ile doğrulanabilir. ARDS'de akciğer hasarı akut başlangıçlıdır ve tipik olarak hasarın başlamasını izleyen 6-48 saat içinde solunum yetmezliği gelişir<sup>2</sup>.

#### **2.4.2. İnsidans :**

ARDS'nin gerçek insidansı bilinmemektedir. Erişkin yaş grubunda yılda 1.5-13.5:100000 arasında değişen oranlardan söz edilmektedir<sup>58</sup>. Pediatrik yaş grubu için insidans verileri olmamakla beraber pediatrik yoğun bakım ünitelerinde izlenen hastaların %0.6-7.2'sini ARDS'li hastalar oluşturmaktadır<sup>58</sup>.

#### **2.4.3. Etiyoloji ve Risk Faktörleri :**

AAH/ARDS'ye predispozisyon oluşturan çeşitli durumlar Tablo 2'de gösterilmiştir. En sık rastlanan neden sepsis ve farkedilmeyen pulmoner aspirasyondur. ARDS'de akciğer hasarı ya toksik bir maddenin akciğer epitelini hasarlaması sonucu doğrudan veya sepsiste olduğu gibi dolaşıma karışan

inflamatuvar mediatörlere bağlı ve dolaylı olarak ortaya çıkar. Bunlar içerisinde daha çok görülen ise direk akciğer hasarına bağlı olarak ARDS'nin gelişmesidir<sup>2</sup>.

**Tablo 2:** AAH/ARDS'de başlıca risk faktörleri<sup>2</sup>:

**Direkt akciğer hasarı;**

- Aspirasyon pnömonisi
- Diffüz pulmoner infeksiyon (bakteriel, viral)
- Suda boğulma
- Toksik buhar ve duman inhalasyonu (inhalasyon hasarı)
- Akciğer kontüzyonu
- Yağ embolisi
- Reperfüzyon hasarı

**İndirekt akciğer hasarı :**

- Ağır sepsis
- Ağır nontorasik travma (uzamış hipotansiyon, kemik kırıkları, kafa travması, yanık)
- Hipovolemik şok
- Acil resüstasyon için masif transfüzyon
- Toksemi
- Akut pankreatit
- Kardiyopulmoner bypass
- Yaygın damar içi pıhtılaşma sendromu
- Amniyotik sıvı embolisi

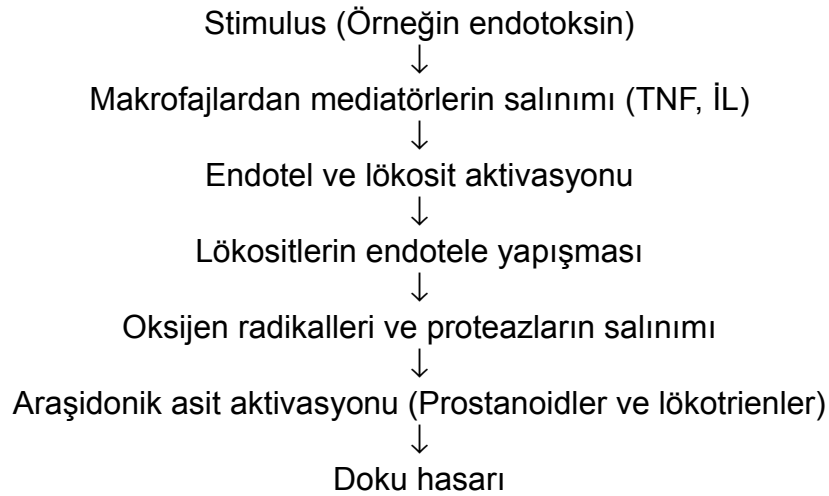
**2.4.4. AAH/ARDS Patogenezi :**

ARDS'nin akut fazında direkt veya indirekt akciğer hasarının sebep olduğu artmış alveolo-kapiller membran geçirgenliğine sekonder olarak alveol boşluklarına ve interstisyuma proteinden zengin sıvı kaçıışı görülür<sup>59</sup>. Bronşiyal ve alveoler epitel hücreleri dökülür ve makrofajlar aktive olur. Aktive makrofajlar, sitokinler, İL-1-6-8-10 ve TNF- $\alpha$  salgılar. Tüm bunlar nötrofil aktivasyonuna ve nötrofillerin olay yerine göç etmesine sebep olur. Olay yerine gelen nötrofiller, oksidan molekülleri, proteinleri, lökotrienleri ve diğer proinflamatuvar molekülleri salgılayarak sürekli ilerleyen ve inflamasyona neden olan esas sebep ortadan kaldırılmadıkça kendi kendini tekrarlayan bir döngü yaratır. ARDS'nin aynı zamanda nötropenik hastalarda da görülüyor olması, başka alternatif yolların da olduğunu göstermektedir<sup>60-62</sup>.

AAH/ARDS'de akciğerlerin mikrovasküler endoteli ve alveoler epitel hücrelerinin uygun olmayan veya aşırı inflamatuvar yanıtla bağlı aşırı hasarı, interstisyel ve alveolar ödem, kanamalar, proteinden zengin sıvının alveolar hava boşluklarına sızması, epitel ve endotel harabiyeti ile devam eder. İnflamasyonun başlaması ile lökosit yapımı aşırı derecede artar ve lökositler

inflamasyon gelişen bölgelerde toplanır. Proinflamatuvar sitokinler, kemokinler, akut faz proteinleri, SOR, kompleman, koagülasyon yolunun bileşenleri, adezyon moleküllerinin etkilenmesi ve mediyatör kaskadının yaygın aktivasyonuna bağlı olarak gelişen inflamatuvar yanıt, patogeneizde önemli rol oynar. Bununla beraber proinflamatuvar yanıtı dengelemek üzere antiinflamatuvar yanıt da aktifleşir. Glukokortikoidlerin ve antiinflamatuvar sitokinlerin (İL-4, İL-10 ve İL-1 reseptör antagonisti) yapımında artma ve adezyon moleküllerinin aktivitelerinin azaltılması gerçekleşir<sup>2</sup>.

Deneysel çalışmalar ve postmortem patoloji çalışmaları, nötrofiller, monosit ve makrofajların, inflamatuvar mediatörlerin etkisi ile, adezyon kapasitesi aşırı derecede artmış kapiller endotel hücreleri ile etkileşime girerek pulmoner mikrosirkülasyona fazla miktarda sekestre olduğunu göstermiştir<sup>2</sup>. Aktif hale gelen PMNL'den salınan proteaz, elastaz, kollejenaz, SOR ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinler alveoler-kapiller sınırdaki hücrelerde hasar oluşturarak AAH/ARDS'nin klasik patolojik bulgularından sorumlu bir kısır döngüye yol açar<sup>2</sup>:



İnflamasyon → Hasar → Sıvı sızıntısı ve mediatör salınımı → Daha fazla inflamasyon → Daha fazla sıvı sızıntısı ve mediatör salınımı

Nötrofillerden salınan SOR, TNF- $\alpha$  ve İL-1 $\beta$  gibi sitokinlerin yapımını artırır. Proinflamatuvar sitokinlerin yapımı ve salınımı endotoksin dahil birçok mediatörle stimüle edilir. Nükleer faktör kapa B (NF-kB) sitokinlerin esas düzenleyicisidir. TNF- $\alpha$ , İL-1, İL-6, İL-8 ve ARDS gelişimindeki diğer

proteinler için düzenleyici faktördür. TNF- $\alpha$  ve İL-1 de NF-kB'yi aktive etmektedir<sup>62,63</sup>.

AAH/ARDS'de uygulanan tedavi de akciğer zedelenmesine katkıda bulunabilir. Yüksek konsantrasyonda oksijen; akciğer zedelenmesi, alveolit ve pulmoner ödeme neden olurken pozitif basınçlı mekanik ventilasyon, surfaktan yapımında yetersizliğe, alveolar tip 1 hücreler arası sıkı bağlantılarda bozulmaya ve eksüdatif pulmoner ödemde artışa neden olur. Ayrıca agresif sıvı tedavisi, akciğerlerde sıvı birikimi ile zedelenmeye katkıda bulunmaktadır<sup>64</sup>.

#### **2.4.5. Patoloji ve Klinik Seyir :**

AAH/ARDS diffüz alveolar hasar (DAH) ile karakterizedir. DAH birbirleriyle değişik derecede bir arada olabilen üç fazdan oluşmaktadır<sup>2,58</sup>.

**I. Eksüdatif faz:** İlk 24 saat içinde başlayan bu akut dönem hiyalen membran oluşumunun da eşlik ettiği, proteinden zengin ve çoğu kez hemorojik, intertisyel ve eksüdatif nötrofilik alveoler ödem ile karakterizedir. Mikrovasküler ve alveoler bariyerlerde lokal hasar bölgeleri mevcuttur. Alveollerin duvarları ödemli olup epitelde nekroz alanlarına rastlanır. Tip 1 alveolar epitel hücrelerin hızlı nekroz ve hasarı epiteliyal bariyerde bozulmaya ve sıvı eksüdasyonuna yol açar. Bazal lamina başlangıçta sağlamdır. Bununla beraber proteaz veya oksidanlar daha sonra bazal membranda hasarlanmaya yol açarlar. Alveol boşluklarındaki nötrofil ve eritrosit sayısı hızla artar. Çoğu kez alveolar septaların tepesinde hiyalen membranlar oluşmaya başlar ve bunlar daha sonra duktuslardan uzayarak potansiyel olarak alveol açıklığını kapatır. Bu fazda erken endotelial lezyonlar pek belirgin değildir ve endotel nekroz alanları içerir. Soyulmuş boşlukların içi genellikle fibrin pıhtısı ile doludur. Başlangıç fazı sırasında kapillerler, intertisyel aralık ve progresif olarak hava boşlukları içinde nötrofillerin gittikçe arttığı saptanır. Bu fazda epiteliyal/endotelial hasar nedeni ile artan geçirgenlik akciğer ödemine ve akut inflamatuvar değişikliklere yol açar. Ödem oluşumunun başlangıcında daha çok epitel hücrelerinde olmak üzere epitel ve endotel hücrelerinde hasar mevcuttur. Hasarı oluşturan bileşenlerden SOR ve proteazların kaynağı nötrofillerdir. Nötrofiller önce TNF- $\alpha$  ve trombosit aktivan faktör (Platelet Activated Factor= PAF) gibi bazı maddeler tarafından aktive edilir. Aktive olan nötrofiller daha sonra vasküler boşluktan intertisyum ve/veya alveoler boşluğa geçerek toksik SOR ve proteazlar aracılığı ile hasar oluştururlar. Nötrofiller ve diğer hücrelerin aktivasyonu araşidonik asit

metabolitlerinin salınmasına da yol açar ki bu maddeler de akciğer hasarı gelişmesinde önemli rol oynarlar. Hasar ilerledikçe alveolar kapiller membranın epiteliyal yüzeyi çoğu kez önemli derecede bozulur. Endotel ve epitel hücrelerinin hasarı plazma proteinlerinin akciğerlerde ekstrasvasküler alanlara sızmasına, ödem gelişmesine ve surfaktan fonksiyonunda bozulmaya yol açar. ARDS'de; sitokinler, proteazlar, fosfolipazlar, araşidonik asit mediatörleri gibi inflamatuvar mediatörlerin ve PMNL'in, surfaktan fonksiyonunu inhibe ettikleri; surfaktan yapımının azalmasının da akciğer mekanikleri ve gaz değişimindeki bozulma ve ödem oluşmasında rol oynadığını gösteren çeşitli çalışmaların olduğu bildirilmiştir<sup>2,58,62</sup>.

**II. Proliferatif faz:** Başlangıçtaki hasardan 3-4 gün sonra başlayan, 7 gün veya daha uzun sürebilen proliferatif faz, tip 2 hücre hiperplazisi ve eksudanın organizasyonu ile karakterizedir. Kapiller ağ hasarlanmıştır ve doku kesitlerinde kapillerlerde progresif azalma saptanır. Bu değişiklikler damar lümeninin daralmasına yol açarak intralüminar trombozise predispozisyon yaratır. İntertisyel alan genişler, tip 1 pnömositlerin nekrozu epitelyal bazal membranı açığa çıkarır ve alveollerin içi de lökosit, eritrosit, fibrin ve hücre debrislerinden oluşan materyal ile doldurulur. Soyulmuş epiteliyal yüzeyi kapatma çabası ile alveolar tip 2 hücrelerde proliferasyon gelişir. Önce intertisyel boşluklarda daha sonra ise alveol lümenlerinde fibroblastlar belirgin hale gelir. Bu olaylar hava boşluklarının aşırı derece daralmasına ve hatta obliterasyonuna neden olur<sup>2,58</sup>.

**III. Fibrozis fazı:** Hasardan genellikle 7-10 gün sonra başlayan fibrozis fazı aşırı kollajen ve ekstrasellüler matriks materyali birikmesi ile karakterizedir. Makroskopik olarak akciğerler skar dokusu nedeniyle kaldırım taşı karakterindedir. Damarlar mural fibrozis ve myointimal kalınlaşmaya bağlı olarak iyice daralır ve önemli derecede hasarlanır. İlk iki hafta içinde total akciğer kollajeni iki katına çıkabilir<sup>2,58</sup>.

#### **2.4.6. Komplikasyonlar ve Prognoz :**

AAH/ARDS yoğun bakım ünitelerinde hala önemli mortalite ve morbidite nedenidir. Sendromun seyri hastadan hastaya değişmekle birlikte, birkaç günden birkaç aya kadar devam edebilir. Prognozu belirleyen en önemli faktörler; hastanın yaşı, komplikasyon ve multipl organ yetmezliği (MOY) gelişip gelişmediği, eğer gelişmişse bunun şiddetidir. Ölümünün üçte biri AAH oluşturan esas nedenden kaynaklanır. Üçte ikisi ise aynı anda veya sonradan başlayan sepsis, septik şok ve



eşlik eden MOY gibi komplikasyonlara bağlıdır. Komplikasyonlar nedeni ile kaybedilen hastaların dörtte üçünde sepsisin klinik bulgularına rastlanır. Sepsis ve sepsise eşlik eden MOY 'nin en önemli nedenini ise hastane kökenli pnömoniler oluşturur. Yaygın enfeksiyonlar ve pnömoniye bağlı olarak gelişen AAH/ARDS'nin mortalitesi oldukça yüksektir<sup>2</sup>.

AAH/ARDS'nin komplikasyonlarına ek olarak, ventilatör tedavisi sırasında oluşan barotravma da akciğer hasarına katkıda bulunur. Hava kaçağı ile ilgili komplikasyonlar pnömotoraks, pnömomediastinum ve interstisyel amfizemdir<sup>2,64</sup>.

#### **2.4.7. Tedavi İlkeleri :**

AAH/ARDS'de tedavi, spesifik ve nonspesifik tedavi olmak üzere iki başlık altında toplanabilir. Spesifik tedavi, sendroma yol açan ekzojen ajanlar veya endojen mediatörlere yönelik farmakolojik tedavi iken, spesifik olmayan tedavide ise çeşitli nonfarmakolojik destekleyici tedavi ilkelerinden oluşur<sup>2</sup>.

Destekleyici tedavinin en önemli bileşenleri; ventilatuar ve hemodinamik desteğin sağlanması, doku oksijenasyonunun devam ettirilmesi, akciğer ödeminin azaltılması, enfeksiyonun önlenmesi, barotravma, yüksek volümle ventilasyona bağlı travma, atelektazi sorunları ve oksijen toksisitesi gibi iyatrojenik olarak ventilatöre bağlı akciğer hasarlarından kaçınılması, entübasyon ve vasküler kateterizasyon komplikasyonları gibi komplikasyonların önlenmesi, ayrıca sıvı elektrolit dengesizliği, kardiyak aritmiler, pulmoner embolizm, gastrointestinal sistem komplikasyonları ve malnütrüsyonun önlenmesidir<sup>2,62</sup>.

AAH/ARDS'de inflamatuvar akciğer hasarını ortadan kaldırmaya yarayan spesifik bir tedavi protokolü henüz oluşturulamamıştır. Teorik olarak ARDS tedavisindeki ideal farmakolojik ajan, seçici olarak akciğerlerin ventile bölümlerini dilate etmeli, oksijenizasyonu arttırmalı, ventilasyon perfüzyon uyumsuzluğunu azaltmalı, en az yan etkilere sahip olmalı ve yaşam süresini arttırmalıdır<sup>1,2</sup>.

#### **2.5. Oksidatif Akut Akciğer Hasarını Önleme Çabaları:**

Hücrelerde oksidatif hasarı önleyen, yok eden veya kısmen azaltan bazı mekanizmalar bulunmaktadır.

### 2.5.1. Antioksidan Savunma Sistemleri:

Doğrudan etki ile oksidanları inaktif hale getiren maddelere antioksidan adı verilmektedir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya SOR'ni temizleyerek lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan antioksidanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidir. Ancak GSH hücre içi güçlü antioksidandır<sup>20,21</sup>.

Antioksidanlar etkilerini başlıca dört farklı şekilde gerçekleştirir<sup>20,21</sup>:

- 1) Toplatıcı etki: Enzimler, oksidanları tutarak daha zayıf bir moleküle dönüştürmektedirler.
- 2) Bastırıcı etki: Vitaminler ve flavonoidler gibi bileşikler, oksidanlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltabilmekte veya etkisiz hale getirebilmektedirler.
- 3) Onarıcı etki: Oksidanların oluşturduğu hasarı onaran antioksidanlar.
- 4) Zincir kırıcı etki: Ağır metaller, hemoglobin, seruloplazmin, E vitamini oksidanları kendilerine bağlayarak fonksiyonlarını engellemektedirler.

Antioksidan moleküller endojen antioksidanlar ve ekzojen antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır<sup>20,21</sup>:

A) Endojen antioksidanlar:

1) Enzimatik antioksidan savunma sistemleri

2) Nonenzimatik antioksidan savunma sistemleri:

Metal iyonlarının etkisizleştirilmesini sağlayan antioksidanlar

İnvivo sentezlenebilen düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar

Diyetle alınan düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar

Karotenoidler ve fenolik yapıdaki antioksidanlar

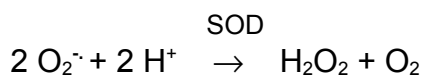
B) Ekzojen antioksidanlar:

Bazı ilaçlar

Gıda antioksidanları

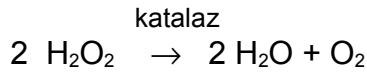
#### 2.5.1.1. Enzimatik Antioksidanlar:

**I. Süperoksit Dismutaz:** Süperoksit radikallerinin hidrojen dismutasyonunu katalizleyen enzim grubudur. Katalizlediği reaksiyon şu şekildedir:



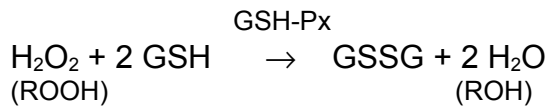
Bu reaksiyon “oksidatif strese karşı ilk savunma” olarak da adlandırılır. Çünkü, süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde hücrel kompartmanlardaki  $O_2^{\cdot-}$  düzeyleri kontrol altında tutulur. İnsanda SOD'un iki tipi bulunmaktadır; sitozolde bulunan, dimerik, bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik manganez (Mn) içeren izomerdir (Mn-SOD)<sup>7,8,25,27</sup>.

**II. Katalaz:** Tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan dört tane hem grubu içeren bir hemoproteindir. Daha çok peroksizomlarda lokalizedir. Kan, kemik iliği, müköz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır. SOD aracılığıyla oluşan hidrojen peroksit bir radikal olmamasına karşın en reaktif SOR olan  $HO^{\cdot}$  radikalinin öncüsüdür. Bu nedenle birçok SOR'inden daha fazla oksidatif hasara neden olur. Katalaz hidrojen peroksiti, su ve moleküler oksijene parçalar:

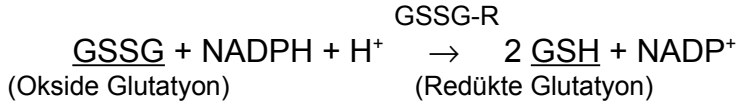


Görüldüğü gibi katalaz hücreyi kendi respiratuvar patlamasına karşı koruyucu yönde hizmet eder. Katalazın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksitin yanı sıra metil, etil hidroperoksitler gibi küçük molekülü lipid hidroperoksitleri de içine alır<sup>7,25</sup>.

**III. Glutasyon Peroksidaz:** Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), intrasellüler mesafede lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Hücrelerde oluşan hidrojen peroksit ve büyük molekülü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinden sorumlu, sitozolde yerleşmiş, birbirinin aynı dört alt birimden oluşan tetramerik bir enzimdir. Her alt birim bir selenyum atomu içerir. Bu nedenle hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir selenoenzim olduğu düşünülür. Karaciğerde en yüksek, kalp, akciğer ve beyinde orta, kasta düşük aktivitede bulunur. GSH-Px, aşırı hidrojen peroksit varlığında, glutasyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG, glutasyon disülfid) oksidasyonunu katalize eder; bu arada  $H_2O_2$  de suya dönüştürülerek detoksifiye edilmiş olur<sup>7,21,25</sup>:

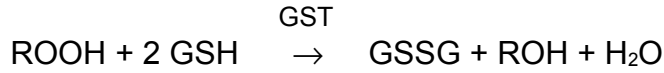


**IV. Glutasyon Redüktaz:** Glutasyon Redüktaz (GSSG-R). GSH-Px tarafından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve diğer lipid peroksitlerin redüksiyonu sırasında glutasyon, okside glutatyonu dönüşmektedir. Bu okside formun ileride kullanılmak üzere tekrar redükte GSH'a dönüştürülmesi gereklidir. Çünkü organizmanın glutasyon deposu sınırlıdır. GSSG-R, NADPH varlığında okside glutatyonu tekrar redükte glutatyonu çevirerek indirek antioksidan etki gösterirler.



Burada gerekli olan NADPH + H<sup>+</sup> pentoz fosfat yolundan elde edilmektedir<sup>7,21,27</sup>.

**V. Glutasyon-S-Transferaz:** Glutasyon-S-Transferaz (GST)'lar iki protein alt biriminden oluşan bir enzim ailesidir. Genel olarak 3 sitozolik ve bir de mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılırlar. Organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere (ROOH) karşı GST'lar, Selenyum-bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi göstererek bir savunma mekanizması oluşturup, antioksidan etkinlik gösterir<sup>21,27</sup>.



Antioksidan aktivitelerine ek olarak çok önemli başka biyokimyasal fonksiyonlara da sahip olup hem, bilirubin ve bazı kortikosteroidler gibi endojen maddeleri reversibl olarak bağlayarak bunların hücre içi transportunda görev alırlar. Bazı güçlü alkileyici ajanlara doğrudan kovalent bağlanarak hücre proteinler ve makromolekülleri bu ajanların etkisinden korurlar. GST'lar LTB<sub>4</sub> ve prostaglandin sentezinde rol oynarlar<sup>21</sup>.

#### **2.5.1.2. Nonenzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri:**

**I. Glutasyon:** Glutasyon, önemli bir intrasellüler antioksidandır ve ekstrasellüler mesafede çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. Glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden meydana gelmiş bir tripeptittir. GSH'a antioksidan özelliğini sisteinin tiyol grubu kazandırır. Glutasyon, HO· ve singlet O<sub>2</sub> gibi SOR'lerinin temizleyicisidir. Serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona

girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Bunun dışında proteinlerdeki –SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı muhafaza eder. Demirin Fe<sup>+2</sup> (ferröz) halde tutulmasını sağlar. Böylece, protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller, hatta rejenere olmalarını sağlar<sup>27</sup>.

**II. Vitamin E:** Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubuna ait aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır. Vitamin E ( $\alpha$ -Tokoferol) dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. En yüksek vitamin E konsantrasyonları, mitokondri ve mikrozoimler gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur. E vitamini dokularda en önemli zincir kırıcı antioksidandır ve lipid peroksidasyonuna karşı ilk sıradaki korunma mekanizmasıdır E vitamini, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksi radikallerini ve diğer radikal örneklerini indirger<sup>27</sup>.

**III. Vitamin C:** Askorbik asit bir ketolaktondur. L-askorbik asit ve L-dehidroaskorbik asit gibi iki aktif formu olan askorbik asit güçlü bir redüktan (indirgeyici) maddedir. Redükleyici bir ajan ve radikal temizleyici olarak SOR'ne karşı koruyucu etki gösterir. Süperoksit ve hidroksil radikalinin doğrudan temizleyicisidir<sup>27</sup>.

**IV. Karotenler:** Doğada yaygın olarak bulunan ve hücreleri korumada önemli görevleri olan pigmentlerdir. A vitamininin metabolik ön maddesi olan  $\beta$ -karotenin, singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksi radikalleri ile direkt olarak etkileşerek antioksidan vazife gördüğü tespit edilmiştir<sup>27</sup>.

**V. Flavonoidler:** Lipidlerde çözünen antioksidanlar sınıfından olan flavonoidler bitkilerdeki kırmızı, mavi ve sarı renk pigmentlerini oluşturan polifenollerdir. Fenolik antioksidan, lipid radikallere hızla H<sup>+</sup> verecek şekilde lipid oksidasyonu ile etkileşir. Görevi ROO<sup>\*</sup> ve RO<sup>\*</sup> radikalini parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır. Ayrıca bakır iyonlarıyla kompleks oluşturabilirler; bu durum antioksidan etkilerine bağlanabilir<sup>21,27</sup>.

**VI. Melatonin:** En zararlı radikal olan hidroksil radikalini ortadan kaldıran, günümüze kadar bilinen en güçlü antioksidanlardan biridir. Lipofilik özelliğe sahiptir. Böylece hücrenin bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan-beyin bariyerini de kolayca geçer. DNA hasarını da çok

etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Yaş artımı ile birlikte melatonin üretimi de azalmaktadır. Bu durumun yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogeneğinde önemli olabileceği düşünülmüştür<sup>21,25</sup>.

**VII. Sistein:** Süperoksit ve hidroksil radikallerinin toplayıcısıdır<sup>21</sup>.

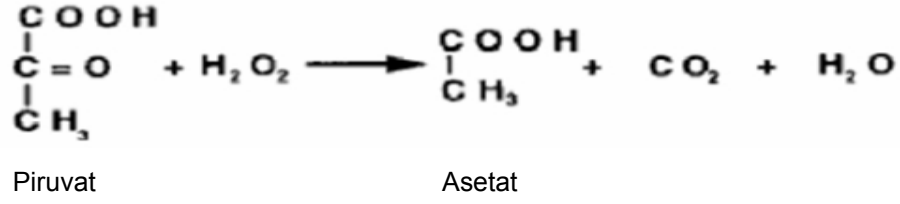
**VIII. Diğer nonenzimatik antioksidanlar;** transferrin, seruloplazmin, albümin, ürik asit, haptoglobülin, bilirubin ve deferoksamin gibi moleküller serbest radikalleri temizleyerek ya da geçiş metalleri ortamdan uzaklaştırarak antioksidan özellik gösterirler<sup>21,25</sup>.

### **2.6. Nonenzimatik Bir Antioksidan Olarak Etil Piruvat:**

Etil piruvat, kimyasal adı; Ethyl 2-oxopropionate= Pyruvic acid ethyl ester olan moleküler ağırlığı; 116.12, formülü; C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>, renksiz, suda çözünen (20 °C 10 g/l), dansitesi: 1.060 - 1.062, viskozitesi: 1.186 cp olan bir maddedir.

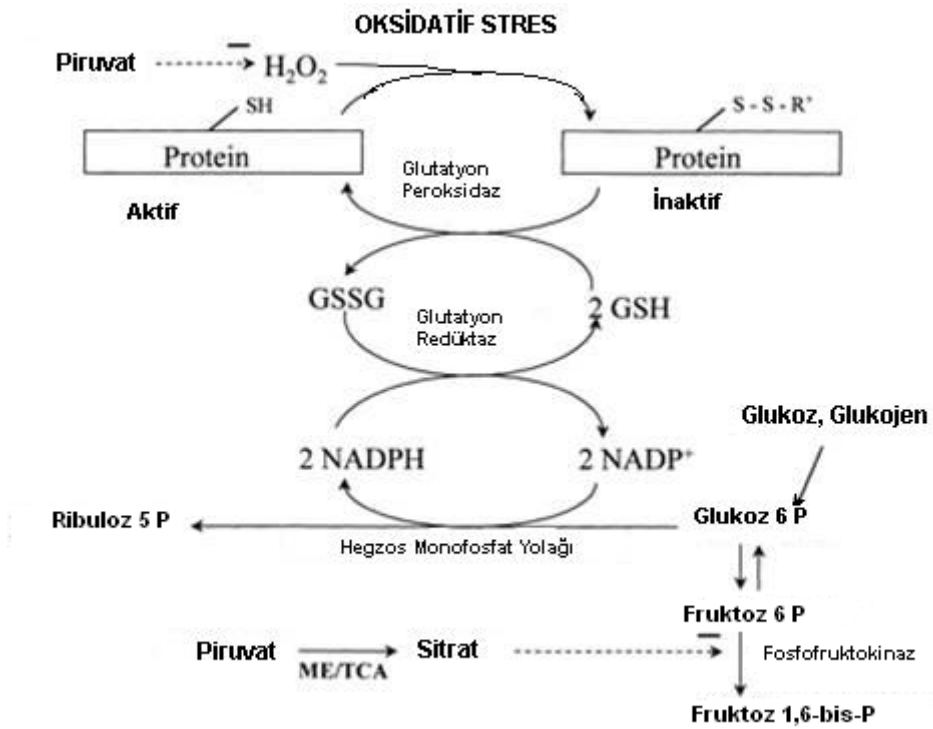
Organizmalar yaşamları için gereken enerjiyi, yükseltgenme ve indirgenme (oksidasyon-redüksiyon) reaksiyonları ile oluştururlar. Bunun iki majör yolu glikoliz ve tricarboksilik asit (TCA) siklusudur. Glikoliz sonucu 3 karbonlu bir molekül olan piruvik asit oluşur. Daha sonra piruvat, TCA döngüsüne katılarak, hücre yaşamı için esas olan NADH ve ATP üretir. Piruvat sadece doğal bir enerji sağlayıcı değil aynı zamanda serbest radikallere karşı vücudu koruyan antioksidan maddelerden biridir. Piruvatın antioksidan etkileri direk olarak hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerini non-enzimatik bir reaksiyonla nötralize ederek veya indirekt antioksidan mekanizmalar ile NADH/NAD<sup>+</sup> ve GSH/GSSG oranlarını artırarak gerçekleştirebilir<sup>65-67</sup>.

Piruvik asit (CH<sub>3</sub>COCOOH) basit bir 3 karbonlu α-keto-mono karboksilik asittir. Fizyolojik şartlarda piruvik asit, çoğunlukla birleşik anyon olan piruvat gibi hücre içi ve hücreler arası sıvıda yer alır. Glikolizin son ürünü ve TCA siklusunun başlangıç substratı olan piruvat, ara metabolizmada merkezi bir rol alır. Piruvat ayrıca *invivo* olarak endojen bir antioksidan kadar fonksiyon gösterir. Piruvat CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O üretmek için nonenzimatik olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'le reaksiyona girer (Şekil 5). böylece H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ortamdan temizlendiğinden yüksek reaktif madde olan hidroksil radikalinin oluşumu da engellenmiş olur<sup>67,68</sup>.



**Şekil 5:** Piruvatın nonenzimatik antioksidan reaksiyonu<sup>65,68</sup>.

Piruvatın her iki antioksidan mekanizması aşağıdaki (Şekil 6) da özetlenmektedir.



**Şekil 6:** Piruvatın antioksidan mekanizmaları<sup>65</sup>:

Oksidatif stres, sülfidril bağlarının oksidasyonu ile proteinleri inaktive eder. Piruvat, hidrojen peroksiti nötralize ederek bu oksidasyonu önler. Piruvat ayrıca, hegzos mono fosfat yoluyla NADPH üretimini artırarak indirek olarak sülfidril oksidasyonunu geri döndürebilir. Piruvat karboksilasyonu ile oluşan sitrat yeniden şekillendiği zaman hegzos mono fosfat yolağının işleyişi artar. NADPH varlığında glutasyon disülfid (GSSG), redükte glutatyon (GSH) çevrilir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Deney Protokolü :

Bu deney T.C. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı'nın 23.12.2005 tarihli 18. toplantısında 9 karar sayısı ile etik kurul onayı alındıktan sonra yapılmıştır.

#### 3.1.1. Deney Hayvanlarının Temini Ve Deneylere Hazırlanması :

Çalışmamızda, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Yetiştirme Laboratuvarından temin edilen Wistar Albino tipi yetişkin erkek ratlar kullanıldı. Deney gününe kadar havalandırması olan ve gün ışığı alan odalarda, özel kafeslerde tutulan ratlara standart pellet yem ve çeşme suyu verildi. Suları her gün değiştirildi ve kafes temizliği gūnaşırı yapıldı. Deneyden bir gün önce, yemleri kesilen ratların ağırlıkları tartıldı ve ağırlıkları 250-260 g gelen ratlar rastgele alınarak, kontrol grubunda 6, deney gruplarında da 6' şar olacak şekilde toplam 18 adet rat 3 gruba ayrıldı. Ayrı ayrı kafeslere ve bir kafeste en çok 3 rat olacak şekilde yerleştirildi.

#### 3.1.2. Deneyin Yapılışı ve Deney Gruplarının Oluşturulması :

**İntraperitoneal (İP) uygulama;** İlaçlar, insülin enjektörü ile karın alt kısmından cilt, cilt-altı ve karın kasları geçilerek periton boşluğuna uygulandı. Arka bacaklarından kaldırılarak barsakların baş tarafına doğru kayması sağlandı. Enfeksiyona karşı korumak amacı ile (peritonit ve cilt enfeksiyonu gibi) her enjeksiyon işlemi öncesi sıçanların karın altı kısımları % 10 polivinilpirolidon (Polyod, Drogsan ilaçları San. ve Tic. A.Ş, Türkiye) ile silinerek temizlendi.

**İntratrakeal (İT) uygulama;** Thiopental sodyum (25 mg/kg<sup>-1</sup>, İ.P.) ile genel anestezi uygulanan ratların refleksleri kontrol edilerek derin anesteziye girmeleri için beklendi. Ratlar dik tutularak, boyunları ekstansiyona getirilip, trakeaları palpe edildikten sonra cilde antiseptik solüsyon uygulandı. Trakea tekrar palpe edilip, insülin enjektörü ile girilerek, kontrol amaçlı trakeal hava aspire edildikten sonra trakea içine insülin enjektöründe hazır bekletilen peroksinitrit (10 mM 0,5 ml içinde) tek doz enjekte edildi. Kontrol grubuna ise 0.5 ml serum fizyolojik uygulandı. 30 saniye kadar aynı pozisyonda bekletildi. Böylece verilen ilacın tamamının akciğerlere doğru akması sağlandı. Sonra ratlar uyanamaya bırakıldı. Vücut ısıları 37 °C de tutulmaya çalışıldı. Uyanama esnasında bütün ratların vücut ısıları, solunumları ve refleksleri takip edildi.



### **Deney gruplarının oluşturulması :**

**1. Grup, Kontrol grubu (n=6):** Thiopental sodyum (25 mg/kg<sup>-1</sup>, İ.P.) ile anestezi uygulanmış bu gruptaki ratlara tek doz peroksinitrit yerine serum fizyolojik (0.5 ml İ.T ), tedavi olarak etil piruvat yerine başlangıçta ve 24 saat sonra İ.P olarak Serum fizyolojik uygulandı. Peroksinitrit ve etil piruvat serum fizyolojik içinde çözüldüğünden kontrol grubunda serum fizyolojik kullanılmıştır.

**2. Grup, Peroksinitrit grubu (n=6):** Thiopental sodyum (25 mg/kg<sup>-1</sup>, İ.P.) ile anestezi uygulanmış bu gruptaki ratlara 0. saat tek doz İ.T. peroksinitrit (10 mM 0,5 ml içinde) ve 0 ile 24. saat İ.P. salin uygulandı.

**3. Grup, Tedavi grubu (n=6):** Thiopental sodyum (25 mg/kg<sup>-1</sup>, İ.P.) ile anestezi uygulanmış bu gruptaki ratlara tek doz peroksinitrit verilmesini takiben, 40 mg/kg dozunda etil piruvat İ.P. olarak sıfırıncı saat ve 24. saatte aynı tedavi dozu tekrarlandı. Doz aralığı etil piruvatın etkinliği göz önüne alınarak planlandı.

### **3.1.3. Materyallerin Biyokimyasal ve Histopatolojik İncelemelere Hazırlanması :**

Deney süresi toplam 48 saat sürdü. Deney süresi bitiminde ratlara, yüksek doz İ.P. thiopental sodyum enjeksiyonu uygulanarak genel anestezi yapıldı. Kalp atışı devam eden ratların toraksı median sternotomi ile açılarak önce 10 ml' lik enjektör ile intra kardiak girilerek 5-6 ml kan alındı. Sonra her iki akciğer ve trakea doku bütünlüğü korunarak total olarak çıkarıldı.

Histopatolojik inceleme için hazırlanan ve grup numaraları yazılı %10 formol içeren kaplara, sağ akciğer ve trakea kesilerek konuldu. Daha önce grup numaraları yazılı biyokimya tüplerine alınan kan örnekleri, 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen serum -20 °C'de biyokimyasal testlerin yapılacağı zamana kadar saklandı.

Biyokimyasal analizlerde kullanılacak olan sol akciğer lobları hemen grup numaraları yazılı düz biyokimya tüplerine konuldu. Sonra -85°C derin dondurucuda (Jouan, Danimarka) biyokimyasal testlerin yapılacağı zamana kadar saklandı. Derin dondurucudan çıkarılan akciğer dokuları soğukluğu muhafaza edilerek bir bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılarak cam tüplere aktarıldı.

**Peroksinitrit Sentezi:** 0,6 M NaNO<sub>2</sub> ve 0,6 M HCL solusyonları, 0,7 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile birlikte T-junction tüpüne konuldu ve cam karıştırıcı ile karıştırıldı. Nitröz asidin asid-kataliz reaksiyonu 1,5 M NaOH'in hızlıca pompalanması ile peroksinitrit sentezlendi. Solusyon cam tüpe alınarak -20 C<sup>0</sup> de 1 hafta süre ile donduruldu. Sürenin sonunda tüpün en üst kısmında tabaka halinde birikmiş olan peroksinitritin oluşturduğu sarı tabaka analiz ve uygulama amacı ile toplandı.

### **3.2. Çalışmada Yapılan Analizler:**

#### **3.2.1. Biyokimyasal Ölçümler:**

Ratlardan alınan akciğer dokusundan Malondialdehit, Myeloperoksidaz ve 3-Nitrotirozin/total tirozin, serumlarından da ayrı ayrı olmak üzere MDA ve MPO ölçümleri yapıldı.

##### **3.2.1.1. Malondialdehit Ölçümü:**

Serum ve doku örneklerindeki MDA düzeyleri Yagi ve ark.<sup>69</sup> nın geliştirdikleri yöntemle göre saptandı. Yöntem, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'in tiyobarbitürik asit ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe rengin 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.

**Doku Homojenizasyonu:** Tüm dokular tartıldı. Doku ağırlıkları 50 mg. dokuya 500 µL 0.15 M KCl eklenerek homojenize edildi.

**Metod:** Lipid peroksidasyonu varsa, aerobik şartlarda homojenat/serum'un pH:3.4'de tiyobarbitürik asit ile 95°C'de inkübasyonu sonucu sekonder ürünü olan malondialdehit oluşur. Oluşan MDA tiyobarbitürik asit ile pembe renkli bir kompleks oluşturur. Bu renk şiddetinin 532 nm.'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile lipid peroksidasyonu saptanır.

	Kör (Kontrol)	Çalışma
SDS (%8.1)	200µl	200 µl
Asetik asit (%20, pH:3.5)	1.5 ml.	1.5 ml.
TBA (%0.8, pH:3.5)	1.5 ml.	1.5 ml.
Distile su	0.8 ml.	0.7 ml.
Örnek (Homojenat veya serum)	-	100 µl

(SDS: Sodyum dodesil sülfat, TBA: Tiyobarbitürik asit)

Hazırlanan solüsyonlar (serum veya homojenat) 95°C'de 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra musluk suyunda soğutuldu. 1 ml distile su eklendi. 5 ml. n-bütanol: piridin (14:1 oranında hazırlandı) solüsyonu eklendi. Vorteksde karıştırıldı. 4000 rpm.'de 15 dakika santrifüje edildi. Üstteki kısmı (yaklaşık 500 µL) alınarak spektrofotometrede 532 nm.'de absorpsiyonu okundu.

Sonuçlar: Konsantrasyon (nmol/ml olarak) aynı yöntemle çalışılarak değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standart eğri yardımı ile hesaplandı.

### 3.2.1.2. Myeloperoksidaz Ölçümü:

Serum ve doku örneklerindeki MPO düzeyleri Golowich ve ark.<sup>70</sup> nın geliştirdikleri yöntemle göre saptandı. Yöntem hidrojen peroksidin örnek (serum veya homojenat) tarafından oksitlenerek o-dianozidini redüklemesi ve redükte o-dianozidinin 410 nm'de ölçülmesi prensibine dayanmaktadır

**Doku Homojenizasyonu:** 300 mg akciğer dokusu tartıldı ve 5 ml. 0.02 M EDTA (pH:7.4) konularak 60 saniye homojenize edildi. Homojenatın 1.5 ml'si 20.000 devirde (15 dakika +4°C'de) santrifüje edildi, süpernatant atıldı. 0.05 M KPO<sub>4</sub> (pH:6) tamponu içinde %0.5 HETAAB (Hekza Adezil Trimetil Amonyum Bromid) hazırlandı. Pellet (çökelti) 1,5 ml HETAAB ile yeniden homojenize edildi. Homojenat 20.000 devirde tekrar (15 dakika +4°C'de) santrifüje edildi, süpernatant çalışma için alındı.

	Kontrol	Çalışma
Tampon	0.2 ml.	0.2 ml.
% 30 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	09 ml.	0.09 ml.
O-dionisidin (%1, metanol)	0.1 ml.	0.1 ml.
Distile su	1.6 ml.	1.3 ml
Örnek (Homojenat veya serum)	-	0.3 ml.

Hazırlanan kör ve çalışma örnekleri 37°C'de 30 dakika bekletildi. 0.2 ml 3 M HCl eklendikten sonra 410 nm.'de kontrol (kör)'e karşı okutuldu.

Sonuçlar: Spesifik aktivite = Ünite / gr. doku olarak hesaplandı.

### 3.2.1.3. Doku 3-Nitrotirozin/Total tirozin Ölçümü:

0,5 gr akciğer doku örnekleri 1.5 ml 50 mM sodyum-potasyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile homojenize edildi. Daha sonra homojenatın 0,3 ml' sine 0,3 ml %10 luk trikarboksilik asit eklenerek karıştırıldı ve 300 rpm de sanrifuj edilerek

süpernatant atıldı. Pellet 6 N HCl asitle homojen bir dağılım sağlanıncaya kadar homojenize edildi, daha sonra homojenat hidroliz tüplerine alınarak 100°C'de 24 saat inkübasyon ile hidrolize edildi. İnkübasyondaki tüpler soğutulularak üzerine 6 N NaOH eklenip, karıştırılarak 3000 rpm 10 santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant filtre edilerek HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) sistemi (Agilent 1100 series , Almanya) kullanılarak analiz edildi. Analitik kolon, 4.6 x 250 mm, Allsphere ODS-2, C<sub>18</sub> 5 µm reverse-phase kolon (HICHROM, Waters Spherisorb, İngiltere) idi. 50 mmol/L sodyum asetat /50 mmol/l sitrat/ 8% metanol, pH 3.1 olan mobil faz kullanıldı. HPLC analizi izokratik şartlar altında akış 1 ml /min. ve 274 nm de UV detector ile ölçüldü. 3-NT pikleri alıkonma zamanlarına göre belirlendi ve pikler ekzojen 3-NT (10 mol/l) eklenmesi ile pik uçlarının yükselmesi ile doğrulandı. Sonuçlar 3-NT/total tirozin olarak belirlendi<sup>71</sup>.

### **3.2.2. Histopatolojik İnceleme:**

Tüm örnekler deney gruplarından habersiz aynı patolog tarafından ışık mikroskopisi altında değerlendirildi. Her örnekte en az iki farklı kesit incelendi. Mikroskopik değerlendirme için Olympus B X 50 ışık mikroskobu kullanıldı ve fotoğraflar Olympus PM10SP sistem ile çekildi.

#### **3.2.2.1. Akciğer ve Trakea Dokusunun Histopatolojik İncelemesi:**

Detaylı doku incelemesi trakea ve akciğerin çıkarılmasını takiben yapıldı. Ratların sol akciğeri ve trakeası histopatolojik inceleme için ayrıldı. Tüm dokular %10'luk formalin içinde 24 saat fikse edilerek, etanolde dehidrate edildikten sonra standart parafin balmumu içerisine yerleştirildi. Parçalardan mikrotom ile 4-5 mm'lik kesitler alınarak lam üzerinde rutin hematoksilin-eozin ile boyandı. Hazırlanan preparatlardaki akciğer ve trakea örnekleri, inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu, doku ödem formasyonu ve pulmoner yapının incelenmesi amacı ile ışık mikroskopisi altında incelendi.

Sonuçlar hasarın derecesine göre değerlendirilerek semikantitatif bir histomorfolojik skala kullanılarak skorlandı<sup>72</sup>:

Skor 1 ; normal histopatoloji,

Skor 2 ; sadece birkaç lökosit infiltrasyonu,

Skor 3; orta derecede nötrofil infiltrasyonu, perivasküler ödem gelişimi ve pulmoner yapıda kısmi destrüksiyon,

Skor 4; yoğun lökosit infiltrasyonu, abse formasyonu ve pulmoner dokunun tamamıyla destruksiyonu olarak kabul edildi.

Trakealar ise ödem, konjesyon ve lökosit infiltrasyonu açısından değerlendirildi.

### **3.2.3. İstatistiksel Analizler:**

Bütün değişkenler için gruplar arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığını test edebilmek için One-Way ANOVA test istatistiği, serum MDA ile doku MDA değişkenleri, aynı şekilde serum MPO ve doku MPO değişkenleri karşılaştırılmak için Paired-Samples t testi kullanılmıştır. Farklılık gözlenen gruplarda hangi grupların farklılık gösterdiğini belirleyebilmek için ise çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey HSD testi kullanılmıştır. Bu istatistikler SPSS 11.5 paket programı kullanılarak hesaplanmıştır.

## 4. BULGULAR

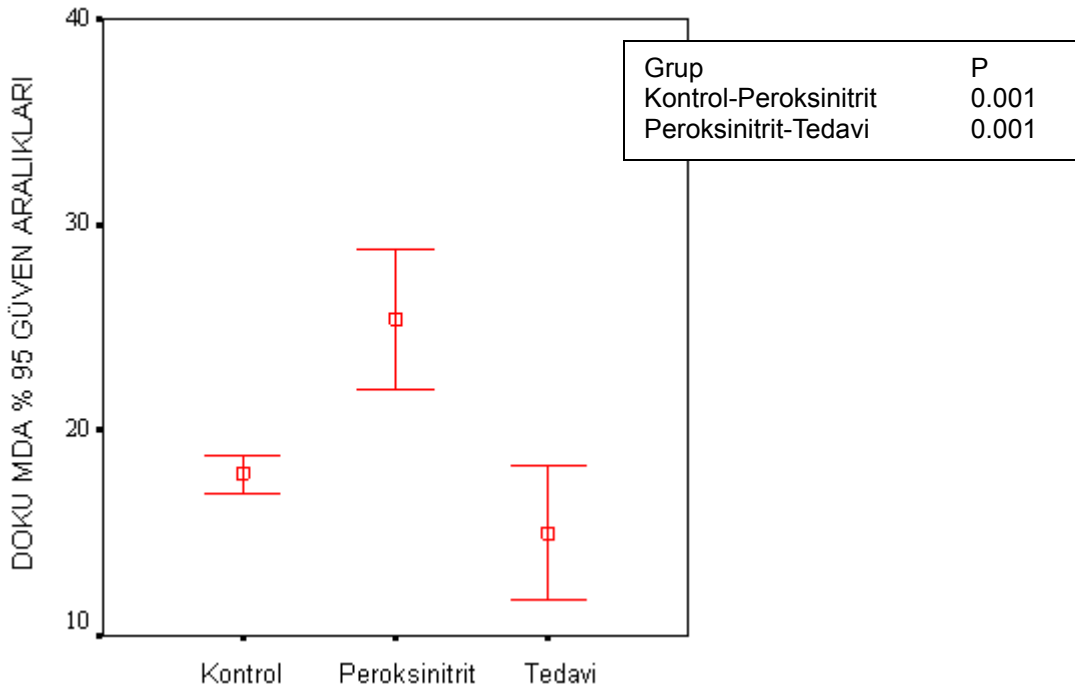
### 4.1. Biyokimyasal Ölçümlerin Değerlendirilmesi:

#### 4.1.1. Doku Malondialdehit Değerlendirilmesi:

Doku MDA değişkeni için gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmektedir ( $p=0,0001$ ). Farklılıklar incelendiğinde kontrol ile P grubu arasında, tedavi ile P grubu arasında anlamlı farklılık olduğu gözlenmektedir. Aşağıda Doku MDA değişkenindeki gruplara ait ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 3'de, gruplar arası farklılıklara ait p değerleri ise Şekil 7'de verilmektedir.

**Tablo 3:** Doku MDA değerlerine ait tanıtıcı istatistikler:

Grup	Ortalama $\pm$ St. Sapma
Kontrol	17.84 $\pm$ 0.859
Peroksinitrit	25.38 $\pm$ 3.25
Tedavi	15.01 $\pm$ 3.08



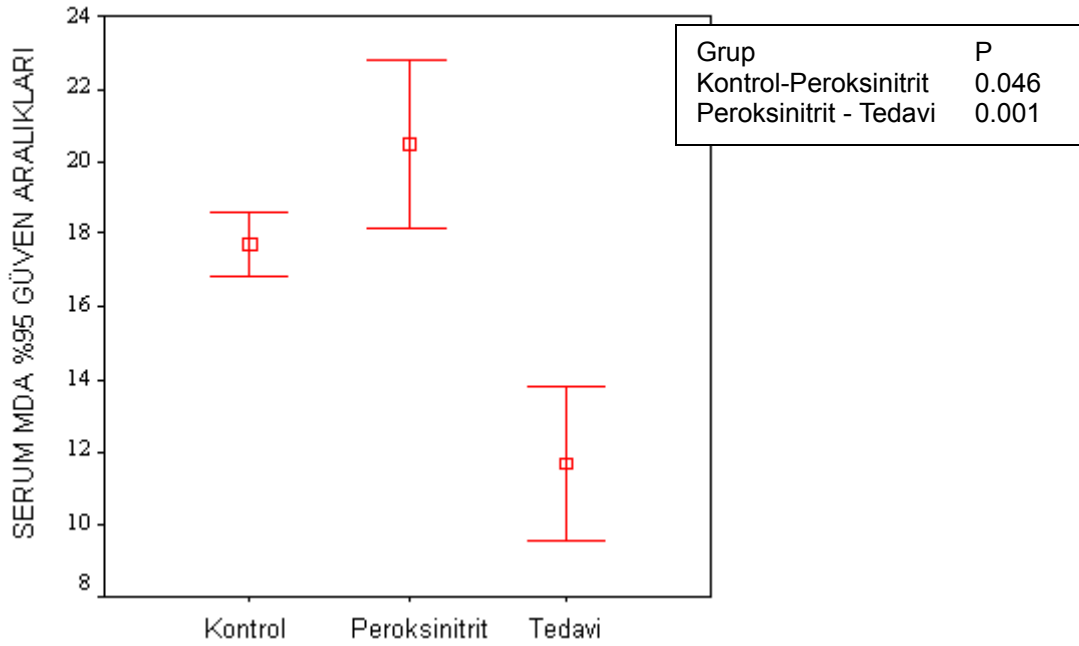
**Şekil 7:** Doku MDA değerlerine ait gruplar arasındaki farklılıklar ve p değerleri.

#### 4.1.2. Serum Malondialdehit Değerlendirilmesi :

Serum MDA değişkeni için gruplar arasında anlamlı farklılık görülmektedir ( $p=0,0001$ ). Farklılıklar incelendiğinde kontrol ile patoloji arasında, kontrol ile tedavi arasında, tedavi ile patoloji grubu arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir. Serum MDA değişkenindeki gruplara ait tanıtıcı istatistikler Tablo 4’de, gruplar arası farklılıklara ait p değerleri ise Şekil 8’de verilmektedir.

**Tablo 4:** Serum MDA değerlerine ait tanıtıcı istatistikler:

Grup	Ortalama $\pm$ St. Sapma
Kontrol	17,73 $\pm$ 0,83
Peroksinitrit	20,47 $\pm$ 2,21
Tedavi	11,69 $\pm$ 2,02



**Şekil 8:** Serum MDA değerlerine ait gruplar arasındaki farklılıklar ve p değerleri.

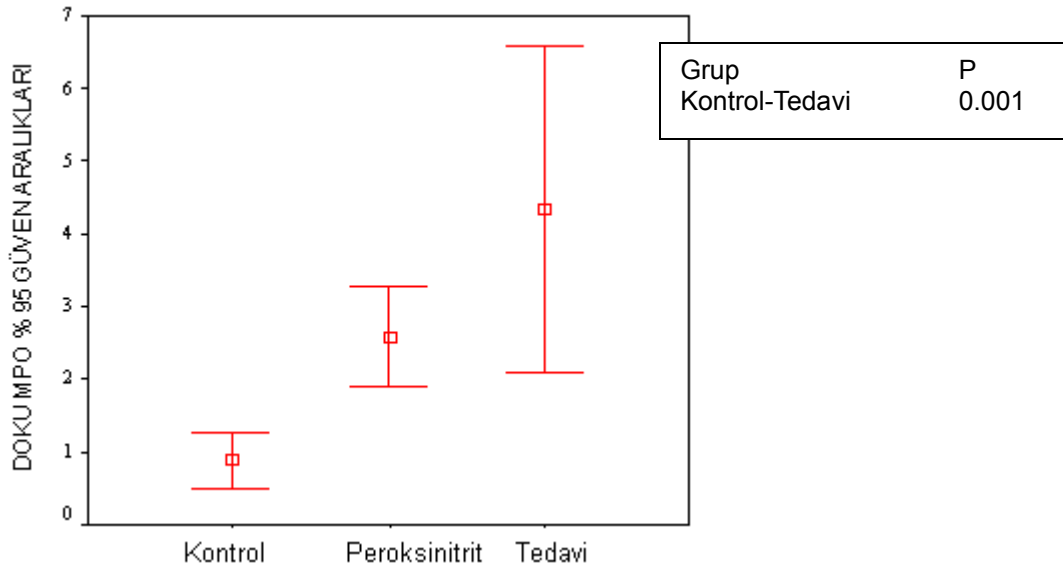
#### 4.1.3. Doku Myeloperoksidaz Değerlendirilmesi :

Doku MPO değişkeni için gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir ( $p=0,0001$ ). Farklılıklar incelendiğinde kontrol ile tedavi grubu arasında anlamlı farklılık vardır ( $p=0,001$ ). Aşağıda doku MPO değişkenindeki gruplara ait tanıtıcı

istatistikler Tablo 5’de, gruplar arası farklılıklara ait p değerleri ise Şekil 9’da verilmektedir.

**Tablo 5:** Doku MPO değerlerine ait tanıtıcı istatistikler:

Grup	Ortalama $\pm$ St. Sapma
Kontrol	0.88 $\pm$ ,37
Peroksinitrit	2.58 $\pm$ 0.66
Tedavi	4.33 $\pm$ 2.14



**Şekil 9:** Doku MPO değerlerine ait gruplar arasındaki farklılıklar ve p değerleri.

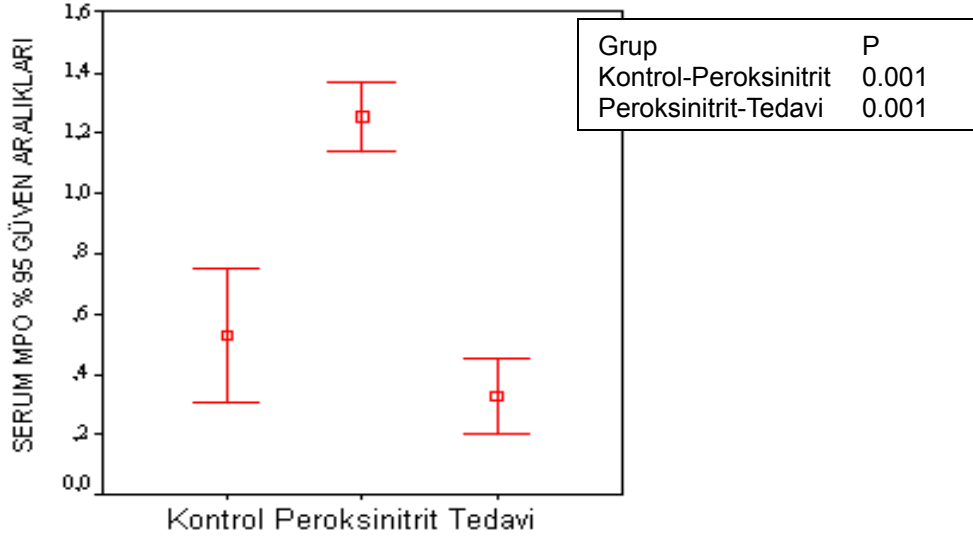
#### 4.1.4. Serum Myeloperoksidaz Değerlendirilmesi :

Serum MPO değişkeni için gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir ( $p=0,0001$ ). Farklılıklar incelendiğinde kontrol ile P grubu arasında ( $p=0,001$ ), P grubu ile tedavi grubu arasında anlamlı bir farklılık vardır ( $p= 0,001$ ). Aşağıda serum MPO değişkenindeki gruplara ait ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 5’de, gruplar arası farklılıklara ait p değerleri ise Şekil 10’da verilmektedir.



**Tablo 6:** Serum MPO değerlerine ait tanıtıcı istatistikler:

Grup	Ortalama $\pm$ St. Sapma
Kontrol	0.53 $\pm$ ,21
Peroksinitrit	1.25 $\pm$ 0.11
Tedavi	0.33 $\pm$ .12



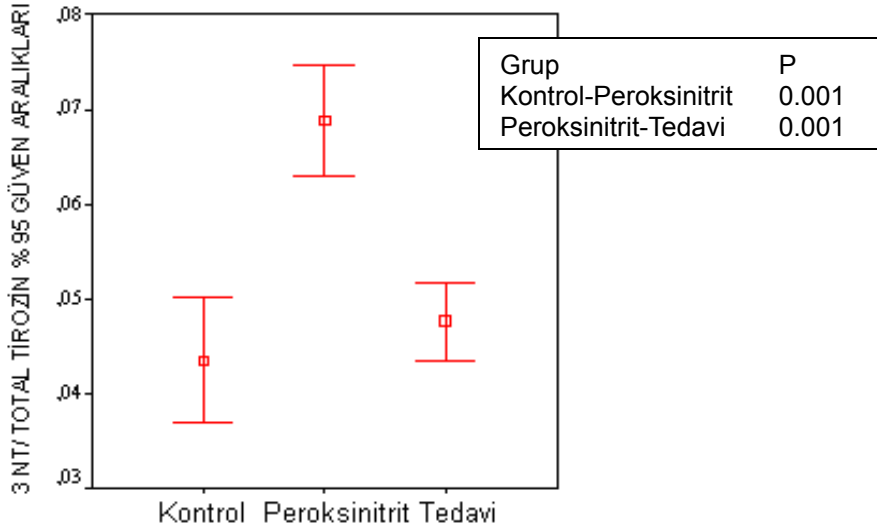
**Şekil 10:** Serum MPO değerlerine ait gruplar arasındaki farklılıklar ve p değerleri.

#### 4.1.6. Doku 3- Nitrotirozin/ Total tirozin Değerlendirilmesi :

3-NT/ Total Tirozin bakımından gruplar karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,001). Farklılıklar incelendiğinde kontrol ile peroksinitrit grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlenmiştir (p=0,001). Peroksinitrit grubu ile tedavi grubu arasında anlamlı bir farklılık vardır (p=0,001). Doku 3-NT/ Total Tirozin değişkenindeki gruplara ait ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 7’de, gruplar arası farklılıklara ait p değerleri ise Şekil 11’de verilmektedir.

**Tablo 7:** 3-NT/ Total tirozin değerlerine ait tanıtıcı istatistikler:

Grup	Ortalama $\pm$ St. Sapma
Kontrol	1.17 $\pm$ 0.41
Peroksinitrit	3.17 $\pm$ 0.43
Tedavi	1.17 $\pm$ 0.41



**Şekil 11:** 3-NT/ Total tirozin değerleri ait gruplar arasındaki farklılıklar ve p değerleri.

## 4.2. Işık Mikroskopisi Bulguları:

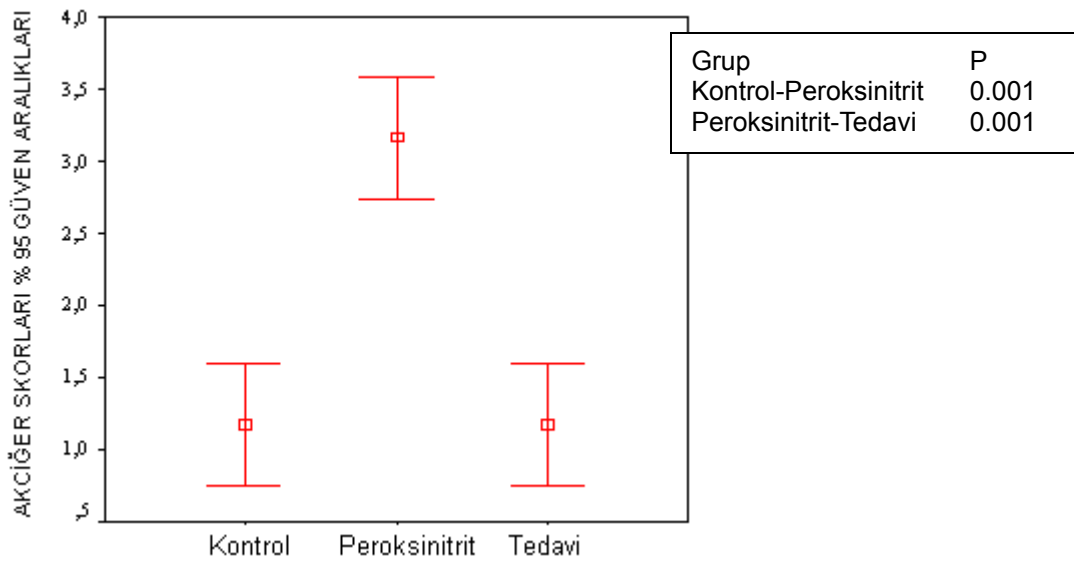
### 4.2.1. Akciğer ve Trakeanın Histopatolojik Değerlendirilmesi :

Akciğer dokularının ışık mikroskopu ile değerlendirilmesi sonucunda gruplar arasında peribronşiyal ve perivasküler lökosit infiltrasyonu, ödem ve destrüksiyon bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ( $p=0,001$ ). Farklılıklar incelendiğinde Peroksinitrit grubu ile tedavi grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmektedir ( $p=0,001$ ). Peroksinitrit grubunda nötrofil lökosit infiltrasyonu, perivasküler ödem, akciğer yapısında kısmi yıkımın daha belirgin hale gelmiş olduğu görülmektedir (Resim 3). Tedavi grubu histopatolojik görünümü, az sayıda nötrofil lökosit infiltrasyonu (Resim 2) ile normal akciğer histopatolojisi görünümünde idi (Resim 1).

Grupların akciğer skorlarına ait tanıtıcı istatistikler Tablo 8’de, gruplar arası farklılıklara ait p değerleri ise Şekil 12 ’de verilmektedir.

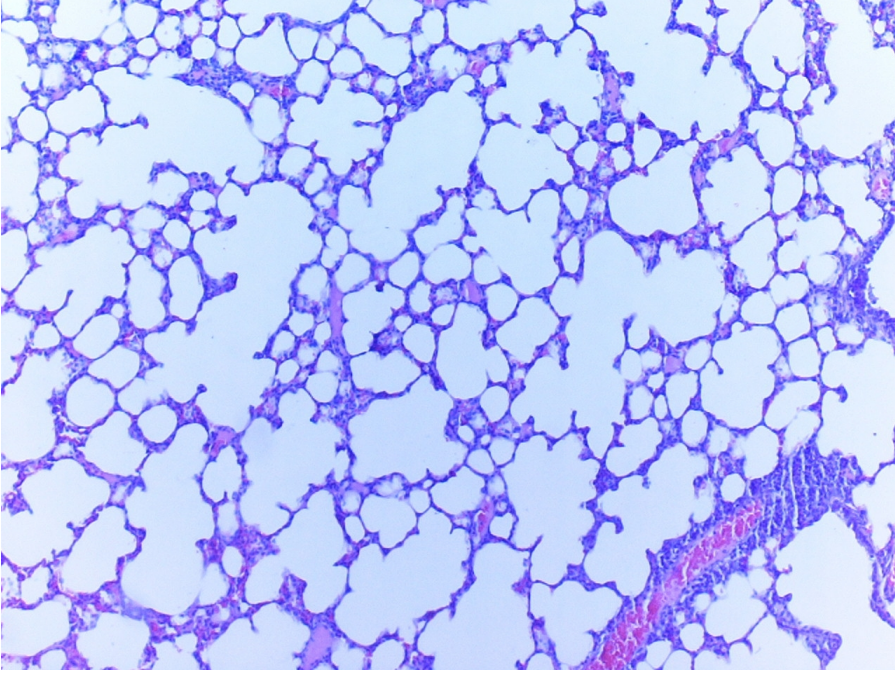
**Tablo 8:** Akciğer skorlarına ait tanıtıcı istatistikler:

Grup	Ortalama $\pm$ St. Sapma
Kontrol	1.17 $\pm$ 0.41
Peroksinitrit	3.17 $\pm$ 0.43
Tedavi	1.17 $\pm$ 0.41

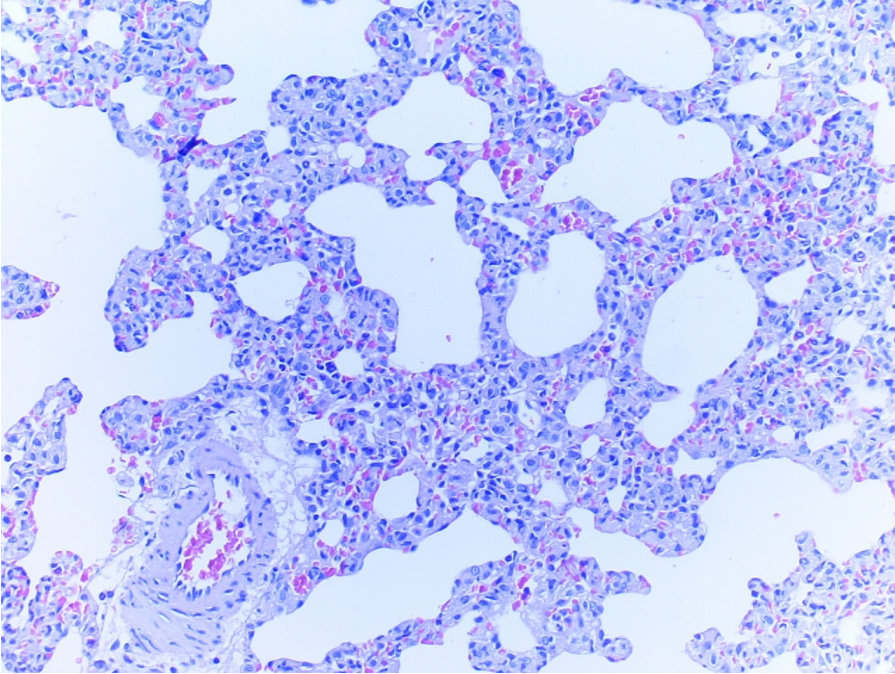


**Şekil 12:** Akciğer skorlarına ait gruplar arasındaki farklılıklar ve p değerleri.

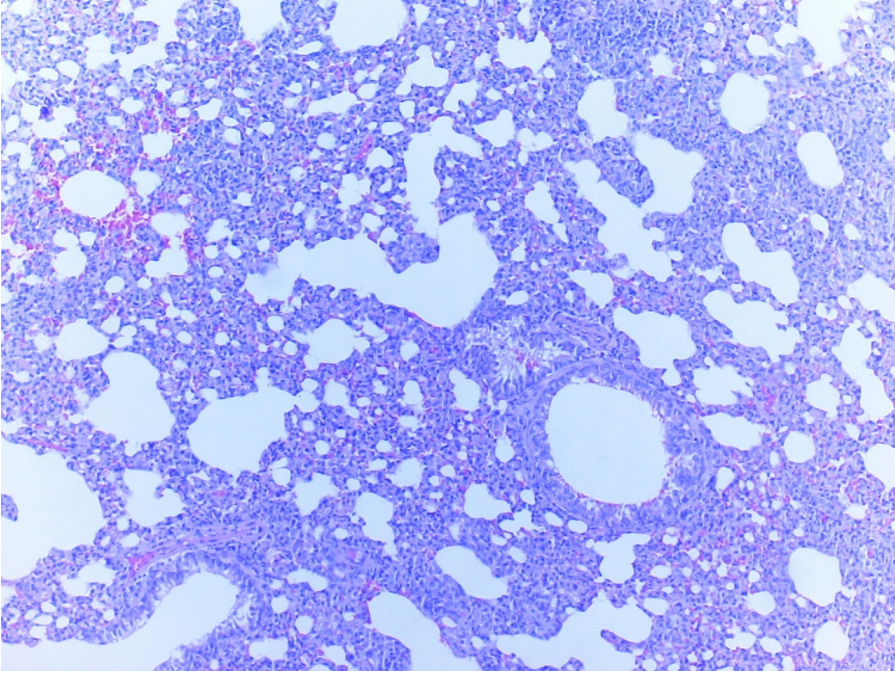
Trakeanın histopatolojik değerlendirilmesinde peroksinitrit grubunda 48. saatte belirgin hale gelen epitelyumda deskuamasyon, submukozada taze kanama alanları ve konjesyon saptandı (Resim 4). Tedavi grubunda trakeada patolojik bir değişikliğe rastlanmadı.



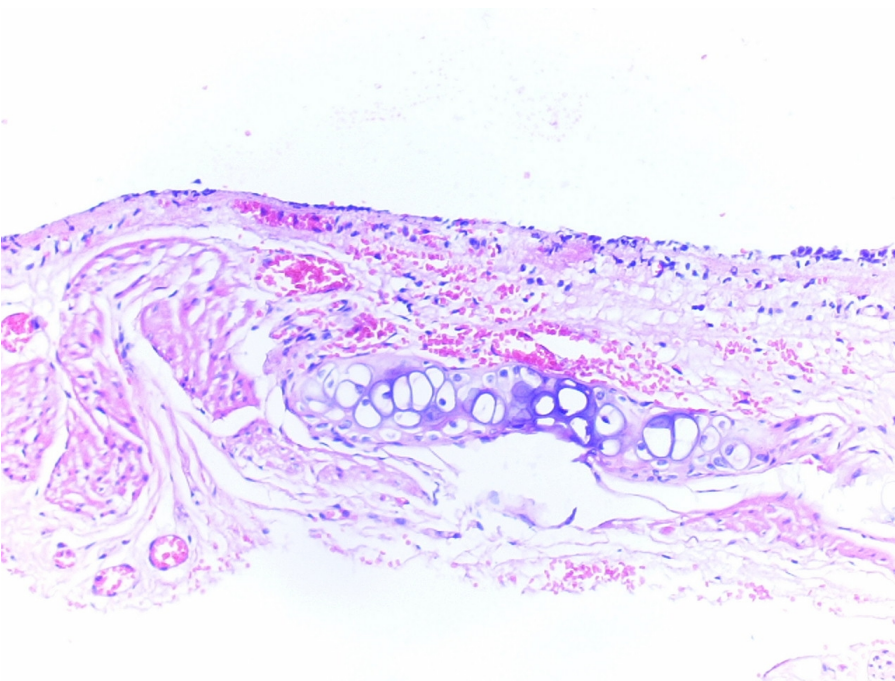
**Resim 1:** Kontrol grubu; normal akciğer dokusu (HE, x100).



**Resim 2:** Tedavi grubu; alveol duvarında az sayıda nötrofil lökosit infiltrasyonu (HE, x100).



**Resim 3:** Peroksinitrit grubu; alveol duvarında orta derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu (HE, x100).



**Resim 4:** Peroksinitrit grubu; trakeada yüzey epitelinde kısmi deskuamasyon ve konjesyon (HE, x200).

## 5. TARTIŞMA

Akciğerler normal hücre metabolizması sürecinde de oluşan, başlıcaları süperoksit ile hidrojen peroksit olan SOR'ne bağlı oksidan madde yüküne sürekli olarak maruz kalmaktadır. İnflamasyon, sepsis, hemorajik şok, travma, iskemi-reperfüzyon hasarı, çoklu kan transfüzyonu, pankreatit, hiperoksi gibi birçok patolojik süreçte ayrıca çevreden alınan ozon, nitrojendioksit veya sigara dumanında yüksek oranlarda bulunan oksidan maddelerin inhalasyonu gibi durumlarda, söz konusu oksidan yük daha da artmaktadır. Bu oksidan yükün akut yada kronik akciğer hasarına yol açabileceği bilinmektedir<sup>1,3-5,73</sup>.

İnflamasyon sonucu oluşan hücre hasarına ait mekanizmalar ile ilgili görüşlerin çoğunun temeli nötrofil ve lökosit aktivasyonuna dayanır. Nötrofil aktivasyonu sonucunda SOR'nin, intraselüler proteazların ve araşidonik asit metabolitlerinin salınımı yanında, makrofaj ve trombositlerden açığa çıkan medyatörler de doku hasarına katkıda bulunur. Hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonları gibi oksidanlar aktive nötrofillerden toksik miktarda salınır. SOR hücre lipid membranlarında yapısal bozukluk yaparak hücre hasarına neden olur. Membran lipidlerinin peroksidasyonu, hücre membranının akışkanlığını; elastikiyetini ve geçirgenliğini azaltarak membran bütünlüğünün bozulmasına yol açar. Ayrıca bu radikaller, hücre içi iyonize kalsiyum düzeylerini sürekli artırarak mitokondri fonksiyonlarının inhibisyonuna, ATP üretiminin azalmasına ve radikal üreten enzimlerin aktivasyonuna bağlı olarak hücreler üzerinde sitotoksik etki meydana getirerek, doku hasarına ve birçok hastalığa neden olurlar<sup>21,24,26,27,36</sup>.

Akut akciğer hasarı ve ARDS'ye yol açan çok çeşitli faktörler mevcut olup ortak özellikleri inflamasyondur. AAH'ında histopatolojik değişiklikler akciğer hücrelerinde SOR'nin oluşması ile başlar. Daha sonra bölgede nötrofillerin artması, aktive olmaları ve bu hücrelerden büyük miktarlarda serbest radikallerin salınması ile hasar ilerler. Oluşan reaktif oksijen ve nitrojen türleri, hem doğrudan hem de dolaylı etkileri ile inflamatuvar hasara katkıda bulunur. SOR'nin hücre ve dokularda yol açtığı hasarların başında lipid peroksidasyonu gelmektedir. Bunun sonucunda hücre zarının yapı ve fonksiyonu değişir. Lipid peroksidasyonu, lipid peroksitlerin aktif aldehid ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sona erer. Malondialdehid, alkoller, etan ve pentan oluşan son

ürünlerden bazılarıdır. MDA, stabil yapısı ve ölçülebilirliği sayesinde lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kullanılmakta ve doku hasarında lipid peroksidasyonu şiddetini yansıtmaktadır<sup>1,4,73,74,36,60-63</sup>.

Bir serbest radikal olan nitrik oksit, nitrik oksit sentazın L-arjinin ile etkileşimi sonucu oluşur. NO solunum sisteminde, solunum yolları fonksiyonunun endojen modülasyonundan, pulmoner vasküler tonusun regülasyonuna, patofizyolojik durumlarda ise proinflamatuvar ve immunomodülatör mediyatör olarak çok çeşitli rollere sahiptir. cNOS ile üretilen NO normal fizyolojik olayların sürdürülebilmesi için gerekli iken, iNOS ile üretilen yüksek konsantrasyonlardaki NO ise oksidatif hasarı artırır. Sepsis ve inflamasyonda iNOS enziminin tetiklenmesi sonucunda NO üretimi artar<sup>9,23,31-35</sup>. NO'in çeşitli inflamatuvar durumlarda aşırı salınmasının, AAH/ARDS gibi akciğerlerdeki patofizyolojik süreçler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir<sup>75</sup>. Fazla miktarlarda üretilen NO'in, süperoksit radikalleri ile reaksiyona girerek oldukça güçlü şekilde oksidatif doku hasarına yol açan sitotoksik peroksinitrit oluşturduğu ve NO'in inflamatuvar etkilerinden bu peroksinitritin sorumlu olduğu gösterilmiştir<sup>76</sup>. Peroksinitrit dokularda çok hızlı yıkıldığından dolayı ölçülemez, bu nedenle tirozin ile oksidasyonu sonucu oluşan 3-nitrotirozin, peroksinitrit seviyelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Akciğerin inflamatuvar hastalıklarında 3-nitrotirozin seviyelerinde artış olduğu bildirilmiştir. Lökositlerin infiltrasyonu ve aktivasyonu ile karakterize inflamatuvar ve infektif hastalıklarda peroksinitrit oluşumunun bir göstergesi olarak 3-nitrotirozin saptanmaktadır<sup>33</sup>.

Domuz ve tavşanlarla yapılan çalışmalarda, peroksinitrit uygulamasının *invivo* ve *invitro* olarak hava yollarında epitelial bariyer ve bronşial düz kas hücrelerinde hasar oluşturduğu bildirilmiştir<sup>10,77,78</sup>. Farshid ve ark.<sup>78</sup> yaptıkları çalışmada, intratrakeal peroksinitrit uygulamasından 2 saat sonra trakeada ödem, konjesyon ve lökosit infiltrasyonu, akciğerde ise fokal konjesyon ve eksüdasyon, bronşial epitelde dejeneratif değişiklikler saptamışlardır. İnokulasyondan 24 ve 48 saat sonra inflamatuvar sürecin daha da ilerlediğini ve alveoler boşluğu dolduran eksüda ile yaygın lökosit infiltrasyonu geliştiğini, alveoler septada incelmeye konjesyon ve ödem oluştuğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da ratlara peroksinitritin intratrakeal uygulanması ile benzer sonuçlar elde edilmiş olup, solunum yollarında inflamatuvar ve dejeneratif

değişikliklere neden olduğu histopatolojik skorlama ile istatistiksel olarak gösterilmiştir.

Akciğer transplant olgularında antioksidan durum ve oksidatif stresin incelendiği bir çalışmada, plazma ve BAL sıvısında lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın yükseldiğini ve postoperatif bir yıla kadar yüksek kaldığı bildirilmiştir<sup>79</sup>. Meyancı ve ark.<sup>79</sup> tavşanlarda intratrakeal hidroklorik asitle oluşturdukları AAH modelinde, plazma ve BAL'daki MDA düzeylerine bakarak lipid peroksidasyonu üzerine olan etkileri araştırmış ve sonuç olarak MDA düzeylerinin ileri derecede arttığını saptamıştır. Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar alınmış olup, akciğer hasarının gösterilmesi açısından hem doku hemde serum MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre ileri derecede artmış olduğu gözlenmiştir.

MPO; PMNL'lerin sitoplazmasında azurofilik granüller halinde bulunur. Asıl fonksiyonu nötrofilin membran iç yüzünde lokalize NADPH-oksidad ile birlikte moleküler oksijenden oksidan bazı maddeler üretmektir. Başlangıçta NADPH-oksidad moleküler oksijenden süperoksit radikali üretir. Ardından SOD ile üretilen hidrojen peroksit, klor (Cl), brom (Br), iyot (I) gibi halojenlerle birleştirip güçlü oksidan ajanlar olan hipoklorik asit, hipobromik asit ve hipoyodik asidi oluşturmaktadır. Bunlar yüzey aktif ajanlar olup bakteri, mantar, virüs gibi bütün biyolojik materyalleri parçalayabilirler. Dokularda hiçbir şekilde bulunmaması nedeniyle dokuda inflamasyonun şiddetini ve invaze olan nötrofillerin miktarını tayin etmede, doku MPO aktivitelerinin ölçülmesi büyük önem taşımaktadır. Özellikle histolojik preparasyonun yapılamadığı durumlarda veya daha detaylı sonuç almak gerektiğinde doku MPO aktivitesinin ölçümü daha da önem kazanmaktadır<sup>80</sup>.

Yapılan çalışmalar, akciğer hasarı ya da inflamatuvar olaylarda, artmış olan peroksinitrit aktivitesi ile birlikte, MPO aktivitesi, MDA değerleri ve PMNL infiltrasyonlarında artış olduğunu göstermiştir<sup>81-83</sup>. Muijsers ve ark.<sup>84</sup> çalışmasında peroksinitrit'in hava lümenine direkt olarak uygulanmasını takiben bronkoalveoler lavajda PMNL sayılarında anlamlı bir artış saptamıştır. Bizim çalışmamızda da literatürdeki çalışmalarla uyumlu biçimde doku ve serum MPO aktiviteleri ile MDA değerlerinin peroksinitrit grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış olduğu gözlemlendi. Histopatolojik incelemede de yüksek MPO konsantrasyonu olan grupta yoğun PMNL infiltrasyonunun olduğu görüldü.



Ratlarda intestinal iskemi reperfüzyon oluşturularak yapılan bir çalışmada artmış nitrik oksit ve peroksinitrit düzeylerinin uzak organ olarak akciğer hasarı oluşturduğu histopatolojik olarak gösterilmiş ve akciğerlerde MDA ve 3NT/total tirozin düzeylerinde belirgin derecede artış belirlenmiştir<sup>85</sup>. Yine ratlarla yapılan başka bir çalışmada, alt ekstremitte iskemi reperfüzyonu sonrası, uzak organ olarak akciğerlerde, doku MDA ve 3NT düzeyleri, MPO aktivitesi, bronkoalveoler lavaj analizi ve doku histopatolojik incelemesi ile peroksinitrit aracılığı ile akciğer hasarının geliştiği gösterilmiştir<sup>86</sup>. Bir diğer çalışmada, akciğer hasarında 3-NT değerlerinde anlamlı derecede artış olduğu gösterilmiş ve bununda peroksinitritin etkisine bağlı olduğu bildirilmiştir<sup>81</sup>. Farelerin hava yoluna direkt peroksinitrit uygulaması ile yapılan bir çalışmada, özellikle epiteliyal tabaka ile submukozada yaygın biçimde 3-NT toplandığı gösterilmiştir<sup>84</sup>.

Nonenzimatik hücre içi önemli bir antioksidan olan GSH, tüm doku ve vücut sıvılarında bulunmasına rağmen özellikle akciğer dokusu ve BAL sıvısında yüksek seviyelerde bulunur. GSH, oksidatif strese  $H_2O_2$  ile reaksiyona girerek GSGG formuna dönüşür. Böylece GSH seviyesi ya da GSH/GSGG oranının tespiti oksidatif stres belirleyicisi olarak kullanılır. AAH/ARDS'de BAL sıvısında GSH aktivitesi ve konsantrasyonu azalmıştır. Yapılan çalışmalarda, intravenöz olarak GSH verilmesi, GSH düzeylerinde yükselme oluşturamamakta, ancak GSH sentezi N-asetil sistein ve prosistein tarafından stimüle edilebilmektedir. Bu prekürsörlerin verilmesi ile plazma eritrosit, nötrofil ve BAL sıvısındaki GSH konsantrasyonu artmaktadır<sup>1,2,81-83,87</sup>.

AAH/ARDS'de, SOR'nin önemi belirlendikten sonra pekçok antioksidan ajan tedavi yada hasarın azaltılması amacıyla denenmeye başlamıştır. Askorbik asit, tokoferol, flavonoidler gibi diyet antioksidanları SOR'nin oksidatif hasarından koruyabilmektedir. N-asetil sistein ile yapılan AAH/ARDS tedavi çalışmalarının erken sonuçları ümit vericidir. Ancak çalışmalarda mortalite, ventilatör tedavi süresi ve oksijenizasyonda farklılık saptanmamıştır<sup>1,2,81-83,87</sup>. Domuzlarda endotoksinle oluşturulan akut akciğer hasarında antioksidan ve steroidlerin etkilerini araştıran bir çalışmada, endotoksinin provoke ettiği lökosit aracılı akciğer vasküler hasarının steroid ve antioksidanlar ile minimale indirildiği bildirilmiştir<sup>79</sup>.

Etil piruvat, güçlü bir antioksidan ve SOR temizleyicisi olan piruvik asitten türemiş basit bir alifatik esterdir. Piruvat'dan daha kararlı moleküler yapıya sahip bu bileşimin oksidatif hasara karşı hücreleri koruyabildiği ve ayrıca etkili anti-inflamatuar özelliği de bulunduğu bir çok *invivo* ve *invitro* çalışma ile gösterilmiştir<sup>17-19</sup>. İskemi, hemorajik şok ve SOR'nin neden olduğu akut böbrek yetmezliğini de içeren bir çok çalışma, bu bileşimin oksidatif hasara karşı hücreleri koruyabildiğini göstermiştir<sup>13-15</sup>. Piruvatın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve OH<sup>-</sup> gibi SOR'nin etkili temizleyicisi olması, redoks bağımlı bu bileşimi, çeşitli patolojik durumlarda, tedavi edici bir ajan olarak kullanılması yönünde araştırmacıları teşvik etmiştir. Örneğin; Salahudeen ve ark.<sup>13</sup> sodyum piruvatın bir çözeltisini uygulamanın, SOR-aracılı akut böbrek yetmezlikli rat modelinde, böbrek fonksiyonunu koruduğunu göstermiştir. Diğer araştırmacılar, piruvat ile tedavinin myokardial, intestinal veya hepatik iskemi/reperfüzyonla oluşan hasarı düzelttiği bildirilmiştir<sup>16,67</sup>. Sodyum piruvat içeren çözeltinin, galaktoz<sup>67</sup> yada diabetle indüklenen katarak formasyonunu<sup>88</sup>, stroke<sup>15</sup> ve hemorajik şoku<sup>14</sup> ayrıca galaktoz<sup>67</sup>, fruktoz<sup>89</sup> veya oksidanlara<sup>67</sup> maruz kalınmasıyla oluşan gözün lensine ait hasara karşı yararlı etkisinin olduğu, *invitro* hayvan modellerinde gösterilmiştir. Etil piruvatın lipopolisakkarit ile uyarılmış, İL-6 ve nitrik oksit sekresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir<sup>19</sup>. Ratslarla yapılan intestinal ve hepatik iskemi reperfüzyonda, lipid peroksidasyonun göstergesi olarak MDA düzeyleri çalışılmış ve artmış MDA düzeylerinin, EP ile tedavi uygulanan grupta belirgin olarak azaldığı gösterilmiş, bunun da EP'nin SOR temizleyici olduğunu desteklediği bildirilmiştir<sup>67</sup>. Woo ve ark.<sup>16</sup> bu bulguları destekler yönde, koroner arter oklüzyonu ile oluşturdukları iskemik hasar rat modelinde, EP tedavisi ile hasar boyutunun önemli ölçüde gerilediğini ve kardiyak lipid peroksidasyonunu iyileştirdiğini göstermişlerdir. Yang ve ark.<sup>90</sup> farelerde etanol ile oluşturulan ve akut alkolik hepatitle seyreden akut karaciğer hasarı modelinde, EP uygulamasından sonra bu sendroma özgü histopatolojik ve biyokimyasal anormalliklerin düzeldiğini, lipid peroksidasyonunu geriletmediğini göstermiştir. Yu ve ark.<sup>91</sup> nın ratlarda serebral arter oklüzyonu ile oluşturdukları serebral iskemik hasar modelinde, EP'nin sinir hücrelerini bu hasardan koruduğu gösterilmiştir.

Biz yapmış olduğumuz bu çalışmada akciğer ve trakea'da peroksinitrit ile oluşturduğumuz hasarın düzeltilmesi amacıyla EP kullandık. Bizim

çalışmamızda da yukarıda belirttiğimiz örneklerdekilere benzer sonuçlar alınmış olup, havayoluna direkt olarak peroksinitrit uyguladığımız grupta, doku 3-NT/total tirozin değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış olduğu, EP grubundaki değerlerin ise düşük olduğu görüldü. EP ile tedavi uyguladığımız grupta serum ve doku MDA konsantrasyonunun, kontrol grubu ile hemen hemen aynı olduğu dikkat çekmiştir. Tedavi grubu ile peroksinitrit grubu arasında serum ve doku MDA konsantrasyonları bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir. Bu gözlem, oluşan akut akciğer hasarının peroksinitrite bağlı oluştuğunu ve tedavi amacıyla verilen EP'nin de bu hasarı engellemiş olduğu tezini destekler niteliktedir.

Literatür taramasında EP'nin akciğerdeki antioksidan özellikleri üzerine yapılmış özgün bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızda, EP ile tedavi uyguladığımız grubun tüm biyokimyasal ve histopatolojik verileri peroksinitrit grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı derecede düzeldiği ve kontrol grubuna çok yakın değerlerde olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmamızda, EP'nin antioksidan etkisine yönelik farklı organlarda yapılmış diğer çalışmaları destekler bulgular elde edilmiştir. EP bu etkiyi nonenzimatik reaksiyonla doğrudan peroksinitrit ve  $H_2O_2$ 'i etkin biçimde temizleyerek  $OH\cdot$  radikali oluşumunu engellediği, dolaylı olarak da metabolik etkisi ile NADPH oluşumu ve GSH/GSSG oranını artırarak antioksidan etki gösterdiği kanaatindeyiz.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

### 6.1. Sonuç :

1) Deney hayvanlarına (ratlara) intratrakeal peroksinitrit uygulayarak akut akciğer ve trakea hasarı başarılı bir şekilde oluşturulmuş ve bu hasar ışık mikroskopisinde, histopatolojik semikantitatif skorlama yöntemi ile gösterilmiştir.

2) SOR'ne bağlı olarak oluşan oksidatif hasar, lipid peroksidasyonu göstergesi olan artmış doku ve serum MDA düzeyleri ile gösterilmiştir.

4) İnflamasyondaki rolü çok iyi bilinen ve doku PMNL invazyonunun göstergesi olan MPO aktivitesinin doku ve serum düzeyinde arttığı görülmüş ve peroksinitrit'in PMNL akümüülasyonunda rolü olduğu ortaya konmuştur.

5) Peroksinitritle oluşturduğumuz akut akciğer hasarı ve trakea hasarında, peroksinitritin stabil bir son ürünü ve aynı zamanda dokuda protein hasarı belirteci olan 3-NT/Total tirozin değerlerinde anlamlı derecede artış olduğu görülmüştür. Bu artış oksidatif akut akciğer hasarının peroksinitritin oksidan etkisine bağlı olarak geliştiğinin bir göstergesidir.

6) Tedavi grubunda, antioksidan ve antiinflamatuvar özelliği nedeniyle verilen EP'in, peroksinitritle oluşturulan akut akciğer ve trakea hasarı gelişimini, çalışılan tüm biyokimyasal parametreler ve histopatolojik inceleme ile belirgin olarak önlediği gözlenmiştir.

Çalışmamızda planladığımız hedeflere ulaşılmış, ratlara peroksinitritin intratrakeal uygulamasının, solunum yollarında inflamatuvar hasara ve dejeneratif değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. EP'in, histopatolojik skoru düşürmesi, MDA, MPO ve 3-NT/total tirozin konsantrasyonunu azaltması oluşan hasarın engellendiği tezini desteklemiştir.

Sonuç olarak, intratrakeal peroksinitrit ile akut akciğer ve trakea hasarı oluşturduğumuz rat modelinde, EP uygulanmasının serum ve doku MDA ile MPO düzeylerini düşürdüğü dolayısıyla lipid peroksidasyonunu engellediğini gözlemledik. Bu veriden yola çıkılarak EP 'in lipid peroksidasyonu ve oksidatif hasarı önlemede etkili olduğu sonucuna vardık. Bu etkinliğin, EP'nin literatürlerde de belirtildiği gibi, oluşan hidrojen peroksit ve hidroksil radikalini etkin bir biçimde temizleyerek gerçekleştirdiği kanaatindeyiz.

## 6.2. Öneriler:

Akciğer hastalıklarının önemli kısmında serbest radikaller rol oynamaktadır. Bu hastalıkların içinde mortalitesi yüksek olan AAH/ARDS de vardır. Yüksek konsantrasyonlarda peroksinitrit proteinler, lipidler, karbonhidratlar, nükleik asitler ve diğer biyomoleküllerle reaksiyona girerek onların oksidasyonuna yol açar. Peroksinitritin hücresel hasardaki moleküler mekanizması ve hücresel sinyal ileti yolağı ile ilgili çalışmalar çok sınırlı sayıdadır. Peroksinitritin patolojik olaylardaki rolünün ve mekanizmasının araştırılması akciğer hastalıklarının aydınlatılması açısından önem taşıyacaktır.

Çok merkezli olarak sürdürülmekte olan akciğer hastalıkları patogenezi ve serbest radikal temizleyicileri ile ilgili çalışmalar içerisinde, ilk araştırma sonuçları ümit verici olan bir serbest radikal temizleyicisi EP'ın, farklı akciğer hastalıklarının tedavisinde yeni bir tedavi yaklaşımı olarak daha fazla araştırılmasına ihtiyaç olduğu kanısındayız.

## 7. KAYNAKLAR

1. Chow CW, Abreu MTH, Suzuki T, Downey GP. Oxidative Stress and Acute Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:427-431.
2. Tulunay M, Akut Akciğer Hasarı ve ARDS. Prof.Dr.İlker Ökten ve Prof.Dr.Adem Güngör. Göğüs Cerrahisi kitabı 18. Bölüm 1. Baskı Ankara: Sim Matbaacılık, 2003:427-460.
3. Hoidal JR, Xu P, Huecksteadt T, Sanders KA, Pfeffer K, Sturrock AB. Lung Injury and Oxidoreductases. *Environmental Health Perspectives* 1998; 106:1235-1239.
4. Gani H, Seyfikli Z, Çelik VK, Akkurt İ, Abadoğlu Ö. Kırsal Alandaki Kadınlarda Biomass Maruziyetinin Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Enzim Aktivitelerine Etkisi. *Toraks Dergisi* 2000;1:13-18.
5. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006;31(2);51–56.
6. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Hastalıkların Patogenez ve Tedavisinde Reaktif Oksijen Partikülleri Ve Antioksidanlar. *Türk Nefroloji Dializ ve Transplantasyon Dergisi* 1997;3-4:96-101.
7. Akyol Ö. Şizofrenide Oksidatif Stres. *Kocatepe Tıp Dergisi Cilt 5* 2004; Ek Sayı 1;15-25.
8. Demiryurek AT, Wadsworth RM. Superoxide in the pulmonary circulation. *Pharmacol Ther* 1999;84:355-65.
9. Clini E, Ambrosino N. Nitric oxide and pulmonary circulation. *Med Sci Monit* 2002;8(8):RA178-82.
10. Mujisers RB, Folkerts G, Henricks PA, Sadeghi-Hashjin G, Nijkamp FP. Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. *Life Sci* 1997;60(21):1833-45.
11. Nossaman BD, Dabisch PA, Liles JT, et.al. Peroxynitrite does not impair pulmonary and systemic vascular responses. *J Appl Physiol* 2004;96:455–462.

12. Mallet R T, Sun J, Knott Em, Sharma Ab, Olivencia-Yurvati AH. Metabolic Cardioprotection by Pyruvate: Recent Progress. *Exp BiolMed*2005;230:435- 443.
13. Salahudeen AK, Clark EC, Nath KA. Hydrogen peroxide induced renal injury: a protective role for pyruvate in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1991;88:1886–1893.
14. Slovin PN, Huang CJ, Cade JR, et.al. Sodium pyruvate is better than sodium chloride as a resuscitation solution in a rodent model of profound hemorrhagic shock. *Resuscitation* 2001;50:109–115.
15. Lee JY, Kim YH, Koh JY. Protection by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats. *J Neurosci* 2001;21RC171:1-6.
16. Woo YJ, Taylor MD, Cohen JE, et.al. Ethyl pyruvate preserves cardiac function and attenuates oxidative injury after prolonged myocardial ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127:1262-9.
17. Ulloa L, Ochani M, Yang H, et.al. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12351–12356.
18. Wang LZ, Sun WC, Zhu XZ. Ethyl pyruvate protects PC12 cells from dopamine-induced apoptosis. *European Journal of Pharmacology* 2005;508:57-68.
19. Song M, Kellum JA, Kaldas H, Fink MP. Evidence that glutathione depletion is a mechanism responsible for the anti-inflammatory effects of ethyl pyruvate in cultured LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:307-16.
20. Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan biyokimyası. 1. Baskı, Ankara 2002: Palme Yayıncılık.
21. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı, Konya 1995: Mimoza Basım Yayım ve Dağıtım AŞ.
22. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984;219:1-14.
23. Bowler RP, Crapo JD. Oxidative stress in allergic respiratory Diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:349-356.

24. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *YYU Vet Fak Derg* 2004;15(1-2):91-96.
25. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, et.al. Reiter Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004;36:1-9.
26. Tamer L, Polat G, Eskandari G., Ercan B, Atik U. Serbest radikaller. *MEÜ Tıp Fak Derg* 2000;1(1):52-58.
27. Lee J, Koo N, Min DB. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety* 2004;3:21-33.
28. Babior BM. The Respiratory Burst of Phagocytes. *J Clin Invest* 1984; 73:599-601.
29. Ricciardolo FLM. Multiple roles of nitric oxide in the airways *Thorax* 2003;58:175-182.
30. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England Journal of Medicine* 1993;30:2002-2012.
31. Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric Oxide in Health and Disease of the Respiratory System 2004;84:731-765.
32. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP et. al. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1994;269:6765-72.
33. van der Vliet A, Eiserich JP, Cross CE. Nitric oxide: a pro-inflammatory mediator in lung disease? *Respir Res* 2000;1:67-72.
34. Dweik RA, Laskowski D, Abu-Soud HM, et al. Nitric oxide synthesis in the lung. Regulation by oxygen through a kinetic mechanism. *J Clin Invest* 1998;101:660-6.
35. Khatri SB, Ozkan M, McCarthy K, et.al. Alterations in Exhaled Gas Profile during Allergen-induced Asthmatic Response. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1844-8.
36. Machlin JL, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEBJ* 1987;1:441-445.
37. Gow AJ, Thom SR, Ischiropoulos H. Nitric oxide and peroxynitrite-mediated pulmonary cell death. *Am J Physiol* 1998;274:112-8.
38. Eiserich JP, Cross CE, Jones AD, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous



- acid: A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J Biol Chem* 1996;271:19199-208.
39. Abdalla M. Peroxynitrite. *Free Radicals in Biology and Medicine* Spring 2001;77:222.
  40. Cinel İ, Oral U. Peroksinitrit ve Myokardium. *Mersin Üniversitesi Tıp Fak Dergisi* 2000;2:163-168.
  41. Sadeghi-Hashjin G, Folkerts G, J. Henricks PA, Muijsers RBR, Nijkamp FP. Peroxynitrite in airway diseases. *Clinical and Experimental Allergy* 1998;28:1464-1473.
  42. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite Oxidation of Sulfhydryls. *The Journal of Biological Chemistry* 1991;266(7):4244-4250.
  43. Szabo C, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL. DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1753-1758.
  44. Virag L, Scott GS, Antal-Szalmas P, O'connor M, Ohshima H, Szabo C. Requirement of Intracellular Calcium Mobilization for Peroxynitrite-Induced Poly(ADP-Ribose) Synthetase Activation and Cytotoxicity. *Molecular Pharmacology* 1999;56:824-833.
  45. Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate of patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1273-6.
  46. Saleh D, Ernst P, Lim S, Barnes PJ, Giaid A. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J* 1998;12:929-37.
  47. Ichinose M, Sugiura H, Yamagata S, Koarai A, Shirato K. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:701-6.
  48. Balint B, Kharitonov SA, Hanazawa T, et al. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2001;17:1201-7.
  49. Szabo C, Ohshima H. DNA damage induced by peroxynitrite: Subsequent biological effects. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 1997;1:373-85.

50. Banks BA, Ischiropoulos H, McClelland M, Ballard PL, Ballard RA. Plasma 3-nitrotyrosine is elevated in premature infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 1998;101:870-4.
51. Haddad IY, Pataki G, Hu P, Galliani C, Beckman JS, Matalon S. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest* 1994;94:2407-13.
52. Eichert K, Hamacher J, Wunder MA, Wendel A. Intravasal peroxynitrite generation causes dysfunction in the isolated perfused rat lung via endothelin. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:128-32.
53. Kanazawa H, Shiraishi S, Okamoto T, Hirata K, Yoshikawa J. Inhibition of bronchoprotective effects of 2-adrenoceptor agonists by peroxynitrite in guinea pig airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1272-6.
54. Hopkins N, Cadogan E, Giles S, Bannigan J, McLoughlin P. Type 2 nitric oxide synthase and protein nitration in chronic lung infection. *J Pathol* 2003;199:122-9.
55. Zsengeller ZK, Ross GF, Trapnell BC, Szabo C, Whitsett JA. Adenovirus infection increases iNOS and peroxynitrite production in the lung. *Am J Physiol* 2001;280:503-11.
56. Beeh KM, Beier J, Haas IC, Kornmann O, Micke P, Buhl R. Glutathione deficiency of the lower respiratory tract in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2002;19:1119-23.
57. Tanaka S, Choe N, Hemenway DR, Zhu S, Matalon S, Kagan E. Asbestos inhalation induces reactive nitrogen species and nitrotyrosine formation in the lungs and pleura of the rat. *J Clin Invest* 1998;102:445-54.
58. Atabai K, Matthay MA. The pulmonary physician in critical care 5: Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: definition and epidemiology. *Thorax* 2002;57:452-458.
59. Matthay MA, Zimmerman GA, Esmon C, et.al. Future Research Directions in Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1027-35.
60. Matthay MA. Conference summary: Acute lung injury. *Chest* 1999;116:19-26.
61. Bernard GR. Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:798-806.

62. Ware LB, Matthay MA. The Acute Respiratory Distress Syndrome. *The New England Journal of Medicine* 2000;342(18):1334-49.
63. Fan J, Ye RD, Malik AB. Transcriptional Mechanisms of Acute Lung Injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;281:1037-50.
64. Whitehead T, Slutsky AS. The pulmonary physician in critical care 7: Ventilator induced lung injury. *Thorax* 2002;57:635-42.
65. Mallet RT. Pyruvate: Metabolic protector of cardiac performance. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;223:136-52.
66. Li H. Pyruvate, A Sacrificial Antioxidant. *Free Radicals In Biology And Medicine* 2003;77(222):1-10.
67. Fink MP. Ethyl Pyruvate: A Novel Treatment For Sepsis And Shock. *Minerva Anesthesiol* 2004;70:365-71.
68. Wang XF, Cynader MS. Pyruvate released by astrocytes protects neurons from copper-catalyzed cysteine neurotoxicity. *J Neurosci* 2001;21:3322-31.
69. Yagi K. Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. Edited by D.Armstrong. *Free Radicals in Diagnostic Medicine*. Plenum Press, New York 1994:1-15.
70. Golowich SP, Kaplan SD. *Methods in enzymology*, Aca. Press Inc, vol II, New York 1955;769.
71. Kamisaki Y, Wada K, Nakamoto K, et. al. Sensitive determination of nitrotyrosine in human plasma by isocratic high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996;685:343-7.
72. Sucu N, Ünlü A, Tamer L, et.al. 3-Nitrotyrosine in Atherosclerotic Blood Vessels. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:23-25.
73. Bowler RP, Crapo JD. Oxidative Stress In Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:38-43.
74. Comhair SAA, Erzurum SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:246-255.
75. Lang JD, McArdle PJ, O'Reilly PJ, Matalon S. Oxidants-antioxidants balance in acute lung injury. *Chest* 2002;122:314-320.
76. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall BA, Freeman BA. Apparent OH radical production from peroxynitrite. Implications for endothelial injury by nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1620-24.

77. Sadeghi-Hashjin G, Folkerts G, Henricks PA, et al. Peroxynitrite induces airway hyperresponsiveness in guinea pigs in vitro and in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1697-701.
78. Farshid AA, Sadeghi-Hashjin G, Ferdowsi HR. Histopathological studies on the effects of peroxynitrite on the lungs and trachea of rabbits. *Eur Respir J* 2002;20:1014-6.
79. Meyancı G, Arıcıoğlu F, Öz H, Aydemir A. Akut Akciğer Hasarında İntratrakeal Deksametazonun Lipid Peroksidasyonuna Etkileri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2001;32:20-24.
80. Schlaifer D, Cooper MR, Attal M, Sartor OA, Trepel JB, Myers CE. Myeloperoxidase: an enzyme involved in intrinsic vincristine resistance in human myeloblastic leukemia. *Blood* 1993; 81:482-9.
81. Koksel O, Cinel İ, Tamer L, et.al. N-acetylcysteine inhibits peroxynitrite-mediated damage in oleic acid-induced lung injury. *Pulmonary Pharmacology Therapeutics* 2004;17:263-70.
82. Yang C, Moriuchi H, Takase J, Ishitsuka Y, Irikura M, Irei T. Oxidative stress in early stage of acute lung injury induced with oleic in guinea pigs. *Biol Pharm Bull* 2003;26(4):424-8.
83. Hammerschmidt S, Buchler N, Wahn H. Tissue lipid peroxidation and reduced glutathione depletion in hypochlorite-induced lung injury. *Chest* 2002;121:573-81.
84. Muijsers RB, van der Veeken A, Habernickel J, Folkerts G, Postma DS, Nijkamp FP. Intra-luminal exposure of murine airways to peroxynitrite causes inflammation but not hyperresponsiveness. *Inflamm Res* 2002;51:33-7.
85. Zhou JL, Jin GH, Yi YL, Zhang JL, Huang XL. Role of nitric oxide and peroxynitrite anion in lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *World J Gastroenterol* 2003;9(6):1318-22.
86. Koksel O, Yildirim C, Cinel L, et.al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates lung tissue damage after hind limb ischemia-reperfusion in rats. *Pharmacol Res* 2005; 51(5): 453-62.
87. Bernard GR, Wheeler AP, Arons MM. A trial of antioxidants N-acetylcysteine and procysteine in ARDS Study Group. *Chest* 1997;112:164-72.

88. Zhao W, Devamanoharan PS, Henein M, Ali AH, Varma SD. Diabetes-induced biochemical changes in rat lens: attenuation of cataractogenesis by pyruvate. *Diabetes Obes Metab* 2000;2:165-74.
89. Zhao W, Devamanoharan PS, Varma SD. Fructose induced deactivation of antioxidant enzymes: preventive effect of pyruvate. *Free Radical Res* 2000;33:23-30.
90. Yang R, Han X, Delude RL, Fink MP. Ethyl Pyruvate Ameliorates Acute Alcohol-Induced Liver Injury and Inflammation In Mice. *J Lab Clin Med* 2003;142:322-31.
91. Yu YM, Kim JB, Lee KW, Kim SY, Han PL, Lee JK. Inhibition of the Cerebral Ischemic Injury by Ethyl Pyruvate With a Wide Therapeutic Window. *Stroke*. 2005;36:2238-2243.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AAH</b>	Akut akciğer hasarı
<b>ARDS</b>	Akut respiratuar distress sendromu
<b>ATP</b>	Adenozin trifosfat
<b>BAL</b>	Bronkoalveolar lavaj
<b>DAH</b>	Diffüz alveolar hasar
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>e<sup>-</sup></b>	Elektron
<b>EP</b>	Etil piruvat
<b>FAD</b>	Flavin adenin dinükleotid
<b>FiO<sub>2</sub></b>	İnspire edilen havadaki oksijen konsantrasyonu
<b>FMN</b>	Flavin mononükleotid
<b>GSH</b>	Glutatyon (redükte glutatyon)
<b>GSH-Px</b>	Glutatyon peroksidaz
<b>GSSG</b>	Glutatyon disülfid (okside glutatyon)
<b>GSSG-R</b>	Glutatyon Redüktaz
<b>GST</b>	Glutatyon-S-Transferaz
<b>H<sup>•</sup></b>	Hidrojen radikali
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen Peroksit
<b>HOCl</b>	Hipoklorit iyonu
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>KAT</b>	Katalaz
<b>KOAH</b>	Kronik ostrüktif akciğer hastalığı
<b>LOO<sup>•</sup></b>	Lipid peroksil radikali
<b>LOOH</b>	Lipid hidroperoksit
<b>LTB<sub>4</sub></b>	Lökotrien B <sub>4</sub>
<b>MDA</b>	Malondialdehit
<b>MOY</b>	Multi organ yetmezliği
<b>MPO</b>	Myeloperoksidaz
<b>NADPH</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NF-κB</b>	Nükleer faktör-kappa B

<b>NO</b>	Nitrik oksit
<b>NOS</b>	Nitrik oksit sentaz
<b>R<sup>•</sup></b>	Radikal
<b>O<sub>2</sub><sup>-•</sup></b>	Süperoksit anyon radikali
<b>OH<sup>•</sup></b>	Hidroksil radikali
<b>PAF</b>	Platelet activating factor (platelet aktive edici faktör)
<b>PARS</b>	Poli (ADP-Riboz) sentaz
<b>PaO<sub>2</sub></b>	Arteriyel kandaki parsiyel oksijen basıncı
<b>PCWP</b>	Pulmonary capillary wedge pressure (pulmoner kapiller wedge basıncı)
<b>PEEP</b>	Positive end expiratory pressure (ekspirasyon sonrası pozitif havayolu basıncı)
<b>PMNL</b>	Polimorfonükleer lökosit
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>SOR</b>	Serbest oksijen radikalleri
<b>TNF</b>	Tümör nekroz faktörü

## ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

### Şekiller

	Sayfa No
Şekil 1 (Süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksit'in reaksiyonları).....	14
Şekil 2 (Nitrik oksitin etkileri, peroksinitrit ve nitrotrozin oluşumu).....	18
Şekil 3 (Serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarı).....	19
Şekil 4 (Hücrede peroksinitritin etkileri).....	23
Şekil 5 (Piruvatın nonenzimatik antioksidan reaksiyonu).....	37
Şekil 6 (Piruvatın antioksidan mekanizmaları).....	37
Şekil 7 (Doku MDA değerlerine ait gruplar arasındaki farklılıklar ve p değerleri).....	44
Şekil 8 (Serum MDA değerlerine ait gruplar arasındaki farklılıklar ve p değerleri).....	45
Şekil 9 (Doku MPO değerlerine ait gruplar arasındaki farklılıklar ve p değerleri).....	46
Şekil 10 (Serum MPO değerlerine ait gruplar arasındaki farklılıklar ve p değerleri).....	47
Şekil 11 (3-NT/ Total Tirozin değerleri ait gruplar arasındaki farklılıklar ve p değerleri).....	48
Şekil 12 (Akciğer skorlarına ait gruplar arasındaki farklılıklar ve p değerleri).....	49

### Resimler

Resim 1 (Kontrol grubu; normal akciğer histopatolojisi) .....	50
Resim 2 (Tedavi grubu; alveol duvarında az sayıda nötrofil lökosit infiltrasyonu).....	50
Resim 3 (Peroksinitrit grubu; alveol duvarında orta derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu).....	51
Resim 4 (Peroksinitrit grubu; trakeada yüzey epitelinde kısmi deskuamasyon ve konjesyon).....	51



## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablolar</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1 (AAH ve ARDS için önerilen spesifik kriterler).....</b>	<b>25</b>
<b>Tablo 2 (AAH/ARDS'de risk faktörleri).....</b>	<b>27</b>
<b>Tablo 3 (Doku MDA değerlerine ait tanıtıcı istatistikler).....</b>	<b>29</b>
<b>Tablo 4 (Serum MDA değerlerine ait tanıtıcı istatistikler).....</b>	<b>45</b>
<b>Tablo 5 (Doku MPO değerlerine ait tanıtıcı istatistikler).....</b>	<b>46</b>
<b>Tablo 6 (Serum MPO değerlerine ait tanıtıcı istatistikler).....</b>	<b>47</b>
<b>Tablo 7 (3-NT/ Total tirozin değerlerine ait tanıtıcı istatistikler).....</b>	<b>48</b>
<b>Tablo 8 (Akciğer skorlarına ait tanıtıcı istatistikler).....</b>	<b>49</b>