

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

**HÜCRE İÇİ cAMP REGÜLASYONUNUN
AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİNDE YANGI VE OKSİDATİF
REAKSİYONLAR ÜZERİNE ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Sinan VICIL

Danışman

Prof. Dr. Suat ERDOĞAN

HATAY-2012

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

**HÜCRE İÇİ cAMP REGÜLASYONUNUN
AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİNDE YANGI VE OKSİDATİF
REAKSİYONLAR ÜZERİNE ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Sinan VICIL

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 23/08/2012 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oy birliğiyle kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri Başkanı : Prof. Dr. Suat ERDOĞAN
Üye : Prof. Dr. Sefa ÇELİK
Üye : Prof. Dr. Deniz YILDIZ
Üye : Yrd. Doç. Dr. Sedat MOTOR
Üye : Yrd. Doç. Dr. Altuğ KÜÇÜKGÜL

Bu tez enstitümüz Biyokimya (VET) Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

.../08/2012

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Enstitü Müdürü

1. GİRİŞ

Akciğer epitel hücreleri solunum yolları ve alveollerin iç yüzeylerini kaplayarak gaz alış verişi ve doğal bağışıklıkta rol oynar. Akciğer epitel hücreleri fizyokimyasal bariyer oluşturmanın yanı sıra mikroorganizmalar ve irritanlarla karşılaştıklarında birçok proenflamatuar sitokin sentezini gerçekleştirir (Schulz ve ark. 2002; Reddi ve ark. 2003; Bals ve ark. 2004; Skerrett ve ark. 2004). Solunum sistemi epitellerinin patojen veya irritan moleküllere karşı geliştirdiği immun yanıtlar astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), kistik fibrozis gibi birçok solunum yollarıyla ilgili hastalıklarının gelişmesinde önemli rol oynar (Diamond ve ark. 2000; Fehrenbach 2001; Pettersen ve ark. 2002; Bals ve ark. 2004). Ayrıca Gram (-) bakterilerin de kronik akciğer hastalıklarının patogenezinde etkin rol oynadığı gösterilmiştir (Sethi ve ark. 2000; White ve ark. 2003). Epitel hücrelerden kemokin salınımının kontrolü ve dolayısıyla yangının kontrol altına alınması, kronik hastalıklarda akciğerlerin zarar görmesini önleme açısından çok önemlidir. Araştırmalar solunum sisteminde yangının kronikleşmeden bertaraf edilmesi için yeni farmakolojik tedavi ajanlarının geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Hastalığın şiddetli tekrarı ve ilaç tedavisinin yetersiz olması sebebiyle çoklu ilaç tedavileri yapılmaktadır.

Enflamasyonda rol oynayan hücrelerden açığa çıkan serbest oksijen radikallerinin neden olduğu oksidatif stres de solunum yolları hastalıklarının patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Gelişen enflamatuar yanıtın kontrolü tedavide önem taşımaktadır. Bu amaçla steroidler ve non steroid antiinflamatuvar (NSAİ) ajanlar kullanılmasına rağmen bu etken maddelerin gastrointestinal, renal, hepatik, hematolojik, nöropsikiyatrik yan etkilerinin yanısıra pulmoner, dermatolojik, oküler toksisite gibi pek çok istenmeyen yan etkilerinin varlığı da bilinmektedir (Sager ve Bennett 1992; Korkut ve ark. 2008). Endoskopik taramalarda, NSAİ ajanların kullanıldığı vakaların %35-60'ında midede erozyonlar ve submukozal kanamalar ile %10-25'inde mide ve duodenumda ülserler olduğu tespit edilmiştir. Özellikle yaşlılarda bu oranlarda ve komplikasyon riskinde daha fazla artış olduğu bildirilmiştir. Gastrointestinal kanalda oluşan ülserlerin en sık gelişen ve korkulan komplikasyonu akut kanamadır. Bu lezyonların sıklığına rağmen ülseratif kanama ancak her 1000 olguda 7.3-13 arasındadır. Kanamalı olgularda ölüm oranı ise % 5-10 olarak bildirilmektedir. Oranlar küçük gibi gelse de, dünyada en fazla kullanılan ilaçlar

olduğu göz önüne alınırsa, NSAİ ajanlara bağlı ülseratif kanama sonucu ölümlerin, ilk sıralarında yer alması doğaldır (Uzunismail, 2003; Korkut ve ark. 2008).

Siklooksijenaz enzim (COX) inhibitörü olarak etki eden bu ilaçlar organizmada hücre ve doku koruyucu olarak yararlı etkileri görülen prostaglandin sentezini baskılayarak etkilerini göstermektedir. Bu nedenle farklı hücre sel sinyal yollarının hedef olarak seçilmesiyle yangının baskılanmasını sağlayacak mekanizma ve tedavi ajanlarının kullanımı yararlılık bakımından daha elverişli seçenekler sunmaktadır.

Yangı inhibisyonunda fosfodiesteraz enzim aktivitelerinin baskılanması siklik adenozin monofosfat (cAMP)'nin hücre içi seviyelerinde artış ve bunun sonucu olarak antienflamatuar etkinliğe neden olmaktadır. Hücre içi cAMP miktarının artışı, kemotaksis, hücre proliferasyonu, agregasyonu ve superoksit anyon sentezini inhibe ettiği gibi, proenflamatuar ajanların sentezinin yanında yangı sel hücre fonksiyonlarını da baskılayarak yangıyı önlemektedir (Piaz and Giovannoni, 2000; Jacob ve ark. 2002).

Kronik akciğer hastalıklarının patogeneğinde etkin rol oynayan Gram (-) bakterilerin hücre duvarı; yüzey lipopolisakaritleri (LPS) ve protein kalıntıları olmak üzere iki yapıdan oluşmaktadır. LPS, Gram (-) bakterilerin yangıdan sorumlu endotoksinidir (Dunn, 1994). LPS etkilediği konak hücrede TNF- α , IL-1, IL-6 gibi proenflamatuar sitokinlerin gen ekspresyonunu uyarır (Souness ve ark. 1996; Houslay ve Kolch, 2000).

Prostasiklinler (PGI₂) ve analogları vazodilatatör, antitrombotik, antiproliferatif ve antienflamatuar etkilere sahiptirler. Prostanoidlerin hedefi bazı hücrelerde eksprese olan prostasiklin reseptörleridir (IP). IP reseptörü, agonistleri olan PGI₂ ve analogları tarafından hızla aktive edilir. IP reseptörü G_s proteinleri ile birleşerek adenilat siklaz aktivasyonu üzerinden cAMP seviyelerinde artışa yol açar. Beraprost sodyum (BPS) bir prostasiklin analogudur. Beraprost, PGI₂'ye göre organizmada daha dayanıklı ve uzun ömürlü bir moleküldür (Chen ve ark. 2009; Wall ve ark. 2009).

Bu tez çalışmasında Gram (-) bakterilerin endotoksini ile oluşturulmuş oksidatif stres ve yangı üzerine prostasiklin analogu olan beraprost sodyumun etkinliği hücre kültürü ortamında araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Solunum Sistemi Enflamasyonu ve Savunma Sistemleri

Solunum sisteminde gelişen astım, kistik fibroz (KF) ile kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) gibi kronik yangısal hastalıklar, kalp hastalıkları, kanser ve serebrovasküler hastalıklardan sonra insanlarda başlıca ölüm sebeplerindedir (Pauwels ve Rabe 2004). Bu hastalıkların lökosit infiltrasyonu ve çeşitli enflamatuar mediyatörlerin salınımı ile karakterize olan kronik mukozal ve havayolu enflamasyonları gibi birçok klinik belirtileri benzerdir. Ancak patofizyolojileri henüz tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Özellikle KOAH'ın patofizyolojisi güncelliği ve insidensinden dolayı günümüzde yoğun olarak araştırılmaktadır. Bilinen bu hastalıklar ile ilgili temel mekanizmaların kaynağını enflamasyon oluşturmaktadır. Akciğer enflamasyonuna karşı gelişen immün yanıtta epitel hücreleri ve monositler, nötrofiller, eosinofil, lenfosit ve makrofajlar rol oynamaktadır (Kelsen ve ark. 2009). Havayolu epitelleri patojen ve iritanlarla ilk karşılaşan hücreler oldukları için solunum yollarında enflamasyonun başlamasında kilit rolü oynamaktadırlar. Bu hastalıkların temelinde, enflamatuar süreçlerin kontrolüne dair olan yeni tedavi yolları patogenezin oluşum mekanizmalarının tam olarak anlaşılması ile mümkün olabilir.

Akciğerler geniş bir yüzey alanına sahip olup, günlük yaklaşık yirmi bin litre havanın ventilasyonunu gerçekleştirmektedir. Oldukça yoğun çalışan bu sistem alerjen etkenlere ve enfeksiyöz ajanlara yoğun olarak maruz kalmaktadır (Chen ve Goldberg, 2009). Solunum sisteminin doğal savunması fiziksel, hücresel ve antimikrobiyal üyelerden oluşur. Bu savunma immün sistemin (makrofaj, T ve B hücreleri) koordinasyonunu gerektirmektedir. Koordinasyonu sağlamada epitel hücreleri önemli rollere sahiptir. Vücudun epitel yüzeyleri enfeksiyona karşı ilk savunma hattını oluşturur. Deri, gastrointestinal mukoza ve solunum yolları mukozası, dış çevreye karşı fiziksel bariyer olarak görev yapmaktadır. Bu üç doku fiziksel niteliğinin yanında zararlı patojenleri tanıması ile de enflamasyon sürecinde önemli görev üstlenirler (Kelsen ve ark. 2009; Gülay, 2007).

Epitel hücreleri, akut faz proteinleri, büyüme faktörleri, lipid mediyatörleri, çeşitli sitokin ve kemokinler gibi havayolu hastalıklarının patogenezinde önemli birçok biyolojik

aktif bileşenle enflamasyona katılır. Bu hücrelerin salgıları, adaptif immun yanıtı şekillendiren enflamatuvar hücrelerin birçok yangısal mediyatörün üretilmesini de düzenler. Alveoler epiteller salgıladıkları kimyasal moleküller aracılığıyla patojen etkenleri öldürmek ya da genetik materyal replikasyonlarını inhibe ederek kimyasal bariyer fonksiyonunu gerçekleştirmektedir (Bismarck ve ark. 2012, Skerrett ve ark. 2007).

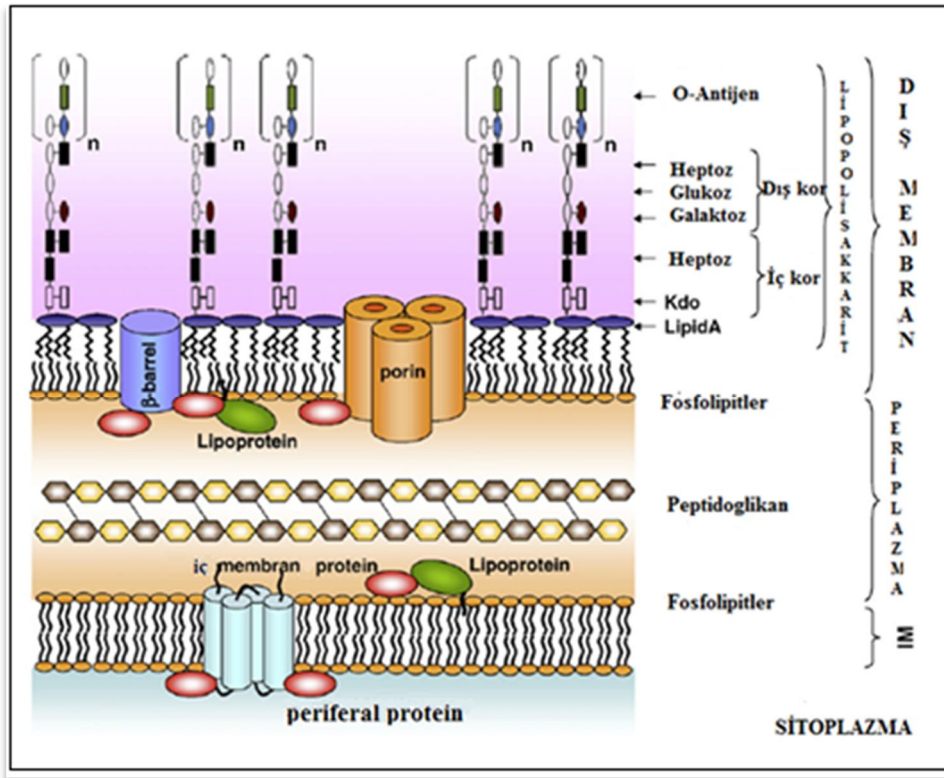
Solunum yolları epitel katmanı sadece fiziksel bariyer değildir. Epitel hücreleri sinirsel uyarılar, sinyal iletim mekanizmaları ve patojenlere karşı etkili efektör moleküller ile dinamik bir konak savunma mekanizması sergilemektedir. Epitel hücresi; mikrobiyal hücre duvarlarına özgü yapıları (patojen ilişkili moleküler paternler-PAMP) tanıyıcı birçok reseptörlere sahiptirler. Epitel hücrelerinin enflamatuvar ve doğal bağışıklık yanıtları, patojenlerin, hücre yüzeyinde ya da sitozollerinde bulunan patern tanıyan reseptörlerle (PRR) temasına bağlıdır (Muir ve ark. 2004; Kunzelmann ve McMorran, 2004). PRR'lerin PAMP'lar ile uyarımı sonucunda kompleman ve koagülasyon kaskadlarının aktivasyonu, fagositoz, proenflamatuvar sinyal yollarının aktivasyonu ve apoptozun uyarılması gerçekleşir (Özenci, 2003).

En karakteristik PRR'ler arasında "Toll Like Receptors-Toll Benzeri Reseptörler" (TLR) bulunur. TLR reseptörleri havayolu epitelleri tarafından ekspresyonu gerçekleşen önemli bir PRR sınıfıdır. Solunum sisteminin immun ve enflamatuvar yanıtlarında TLR reseptörlerinin merkez rollere sahip olduğu bilinmektedir (Wondwossen, 2010, Melkamu, 2010). Gram (-) bakterilerin lipopolisakkariti ve Gram (+) bakterilerin peptidoglikan ve teikoik asit yapıları patojenle ilişkili moleküler paternlerdir. Epitel, TLR yolu ile birçok mikrobiyal yapıyı tanır ve hücrel sinyal yanıtlarını başlatır (Atsushi, 2007).

Epitel hücresi doğal immünitede görevli çeşitli sitokinleri üretilip hücre dışına salarak mikroorganizmalara karşı konak savunmasında önemli fonksiyonlar üstlenirler. Epitel hücrelerinin salgıladığı sitokinler; IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-8, IL-10 (IL; interlökin), TNF- α (tümör nekroz faktör), TGF- α (tümör büyüme faktör), TGF- β ve IFN- γ (interferon)'dır. Mukozal yüzeylerden bakterinin invazyonu ve epitel hücrelerin ürettiği kemotaktik moleküller, enflamasyon bölgesine polimorfonükleer lökositlerin hızlı akışına neden olur (Özenci, 2003; Atsushi, 2007).

2.2. Lipopolisakkarid (LPS)

Lipopolisakkarid (LPS) heterojen moleküler yapıda olup, endotoksin olarak bilinmektedir. Gram (-) mikroorganizmaların hücre duvarı dış yüzeyinde bulunur. Çoğu Gram (-) bakterilerin lipopolisakkariti, lipid A, kor ya da oligosakkarit kısım ve O-polisakkarit zinciri olmak üzere üç ana kısımdan oluşur. Gram (-) bakteriler, deterjanlar, safra tuzları, antibiyotik ya da antimikrobiyal peptitler gibi bir çok toksik maddeden hücre duvarında bulunan LPS ile korunmaktadır (Shnyra ve ark.1999; Sperandeo ve ark, 2009; Yazgan, 2010).



Şekil 2.1. Gram (-) bakterilerde hücre duvarı yapısı ve LPS (Sperandeo ve ark. 2009)

2.3. Lipopolisakkaridin Yapısı

Gram (-) mikroorganizmaların endotoksinlerinin genel yapısı üç ayrı kısımdan oluşmaktadır. Lipid A yüksek derecede hidrofobik ve molekülün endotoksik olarak aktif kısmıdır. Kovalent olarak kendi içinde “iç kor” ve “dış kor” olarak ayrılan bölgelere bağlanmaktadır. İç kor, lipid A’ya bağlıdır ve 3-deoksi-D-manno-oktulosonik asit (Kdo) ile L-glisero-D-Manno heptoz (Hep) gibi yüksek oranda karbonhidratlardan oluşmaktadır. Dış kor, heksoz ve hekzoaminler gibi karbonhidratları yapılarında bulundurulur (Şekil 2.1). Buna O-polisakkarit ya da O-zincir adındaki tekrarlı sakkarit alt üniteleri bağlanmaktadır (Erridge ve ark. 2002).

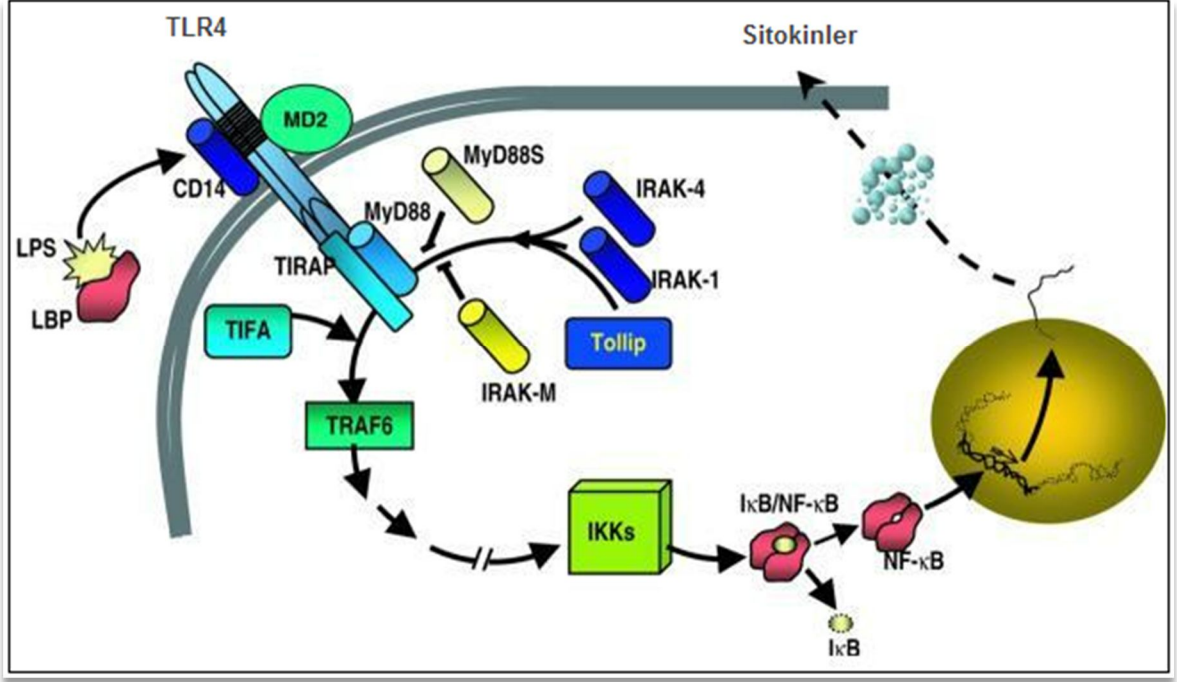
2.4. LPS’in Hücresel Tanınma Mekanizması ve Hücre İçi Sinyal İletimi

Endotoksin, Gram (-) mikroorganizma kaynaklı enfeksiyon, travma ve şokun oluşmasında anahtar rol oynamaktadır. LPS ateş, lökopeni, taşikardi, solunum artışı, hipotansiyon, intravasküler koagülasyon ve çoklu organ yetmezliğini de kapsayan çeşitli patofizyolojik reaksiyonlara sebep olmaktadır (El-Samalouti ve ark. 2000). İnsanlar LPS gibi endotoksinlere oldukça duyarlıdır. LBP’nin (lipopolisakkarit bağlayıcı protein) katalitik etkisiyle ilişkili olarak pikogram miktarındaki LPS bile anafilaktik şoku tetikleyebilir (Hodgson, 2006). Astım ve KOAH hastalarında da hastalık başladıktan sonra endotoksinin hastalığı daha da ilerletebileceği bir çok araştırmada rapor edilmiştir (Koch ve ark. 2007). Septisemi vakalarında da ölüm oranı oldukça yüksektir ve bu artışın sebebi olarak kazanılmış bağışıklık yetersizliği sendromu öne çıkmaktadır. LPS’in etkisi ile ilgili çalışmaların çoğu beslenme, istemli hareket, hafıza kaybı gibi fizyolojik ya da davranışsal yanıtlar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Literatürün büyük bir kısmında belirtildiği gibi LPS uyarısı ile harekete bağımlı aktivite ve davranış azalmaktadır (Lockey ve ark. 2009). Monosit veya makrofajların toksik dozun altında LPS ile muamelesi, hücreleri bir sonraki daha yüksek doza dayanıklı hale getirmektedir. Bu değişim endotoksin toleransı olarak tanımlanmaktadır (Fujihara ve ark. 2003).

Gram (-) bakterilerin LPS’leri, molekülün ampifilik yapısından dolayı misel formdadır. LPS monomerlerinin CD14 yüzey tanınma reseptörüne difüzyonu çok düşük oranda olmaktadır.

LPS plazmik LBP'nin hareketi ile monomerlerine parçalanmaktadır (Heumann ve Roger, 2002). LBP genel olarak 58-60 kDa moleküller ağırlığında ve 452 aminoasit dizilimine sahip bir glikoproteindir. Dördüncül yapıya sahip aktif protein akut faz proteinleri sınıfında yer alır. Başlıca hepatositler olmak üzere, epitel ve kas hücrelerinden de sentezlenebilmektedir (Jerala, 2007). LPS monomerlerini mCD14 (membrana bağlı), sCD14 (çözünebilir CD14) ve fosfolipidlere (özellikle HDL) transfer etmektedir. Bu süreç CD14 ile hücre aktivasyonu ya da HDL ile LPS nötralizasyonu ile sonuçlanmaktadır LPS/LBP kompleksinin LPS/HDL'ye transfer edilmeden önce CD14'e bağlanması LPS'nin nötralize edilmeden immun hücreleri aktive ettiğini göstermektedir (Heumann ve Roger, 2002).

Membrana bağlı CD14 (mCD14), miyelomonositik hücrelerin yüzeyinde bulunan 53 kDa büyüklüğünde bir glikoproteindir. Gliserofosfat inositol (GPI) kısmı ile plazma membranına bağlanmaktadır. mCD14'ün iki farklı fonksiyonu vardır. Birincisi mCD14, LPS'nin fonksiyonel bir reseptörü olmasıdır. İkincisi ise mCD14, LPS ortadan kaldırmasıdır. LPS sinyal transdüksiyonu LBP ve mCD14'ün ikisinden de yararlanır. Çözünebilir CD14/LPS kompleksi, sitokin üretimini uyarmak için endotel hücreler veya bazı epitel hücrelere bağlanabilir. LBP gibi sCD14, HDL'ye LPS'nin transferini de kolaylaştırır. Bu da LPS'nin nötralizasyonu ile sonuçlanmaktadır (Heumann ve Roger, 2002). sCD14, LBP tarafından katalizlenen bir süreçle LPS ile direkt olarak etkileşime girerek bir kompleks oluşturmaktadır. Bu kompleks, sitokin üretimini uyarmak için endotel hücreler veya bazı epitel hücrelere bağlanabilmektedir. LBP gibi sCD14, HDL'ye LPS'nin transferini kolaylaştırabilmektedir (Heumann ve Roger, 2002). İmmun hücrelerdeki örnek tanıma reseptörleri mikrobiyal patojenlerin korunmuş yapılarına bağlanırlar ve onları ayırt ederler. CD14 ve TLR böyle örnek tanıma reseptörlerinin prototipleridir. CD14 ve TLR tanıma reseptörleri ekstrasellüler kısımlarında lösince zengin tekrarlı aminoasit kalıntılarını bulundurlar. TLR'ler transmembran proteinler iken, CD14'lerde transmembran ve intrasellüler kısım bulunmamaktadır (Triantafilou ve Triantafilou, 2002). MyD88 transmembran kısmı bulunmayan bir sitoplazmik Toll benzeri reseptör ailesinin bir üyesidir (Heumann ve Roger, 2002).



Şekil 2.2. LPS ve hücre içi sinyal iletimi mekanizması (Villar ve ark. 2004)

Lipopolissakkarit sinyalinin hücre içine iletiminden sorumlu transmembran proteinin TLR ailesine ait olduğu bilinmektedir. TLR'ler (özellikle TLR4), LPS sinyalini membrana bağlı CD14'ten sitoplazmaya aktardığını göstermektedir (Triantafیلou ve Triantafیلou, 2002) MD-2'nin de LPS sinyalinde önemli bir rol oynadığı görülmektedir. MD-2'nin transmembran kısmı bulunmamaktadır (Heumann ve Roger, 2002). LPS direkt olarak MD-2'ye CD-14 varlığında bağlanarak TLR4 ve MD-2 ile temas kurmaktadır. TLR4 ile sinyal, adaptör molekül MyD88 ve interlökin-1 (IL-1) reseptör ilişkili kinazın (IRAK) ardı ardına etkileşimi ile meydana gelmektedir. LPS sinyali IL-1'inkine çok benzerdir. IL-1 sinyali, IL-1, IL-1 reseptör 1 ve IL-1 reseptör ilişkili yardımcı proteinden (IL-1R-AcP) oluşan bir kompleks ile başlatılır. Sitoplazmik adaptör MyD88 bir Toll benzeri molekül gibi Toll/Toll etkileşimi ile bu moleküle bağlanmaktadır. Bunu, komplekse IRAK'ın eklenmesi izlemektedir. Sonra IRAK reseptörden ayrılır ve TNF reseptör ilişkili faktör 6 (TRAF 6) ile etkileşime girmektedir. Daha sonra nükleer faktör-kappa B (NF-κB) ya da Jun N-terminal kinaz/stresin aktive ettiği protein kinaz (JNK/SAP) aracılığı ile hücre aktivasyonu başlatılmaktadır. İki sistem çok sayıda enflamatuvar genin ekspresyonuna neden olarak proenflamatuvar sitokinlerin üretimini başlatmaktadırlar (Şekil 2.3). Sitokinler özellikle TNF-α, IL-1 ve IL-6, makrofajlar, kupferr hücreleri,

nötrofil, monosit, ve epitel hücreleri gibi çok sayıda hücre tarafından üretilmektedir (Heumann and Roger, 2002; Pier, 2007; Yazgan, 2010).

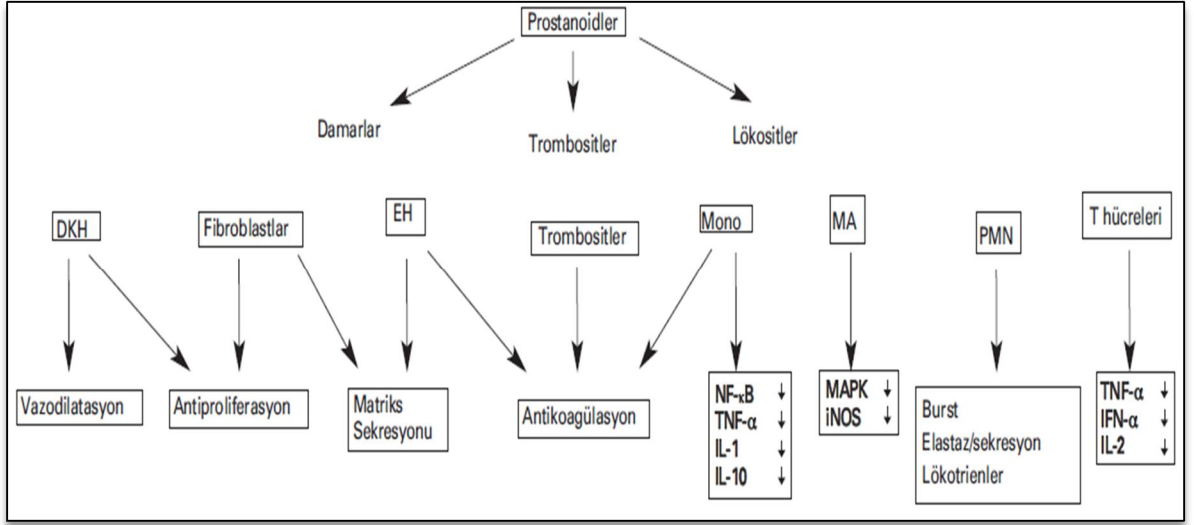
2.5. Prostaglandin ve Analoglarının Biyolojik Etkileri

Prostaglandin ve analogları (prostanoidler) vazodilatör etkileri olan moleküllerdir. Ayrıca antitrombotik, antiproliferatif ve antiinflamatuvar etkilere de sahiptirler. Prostaglandin (PGI_2) ilk olarak, Vane ve ark. tarafından (1976) tavşan ve domuz aortu mikrozomal fraksiyonunda “trombosit agregasyonunu önleyici bir madde” olarak tanımlanmışlardır. PGI_2 , araşidonik asidin bir metaboliti olup, organizmada depolanmayan, uyarılara bağlı olarak sentezlenip-yıkılan doku hormonu özelliğine sahip endojen bir maddedir. PGI_2 damar düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve migrasyonunu engeller ayrıca vazodilatör etkisini özellikle akciğer ve sistemik arterler üzerinde gösterir (Maitland ve Olschewski, 2008).

Siklooksijenaz enzimlerinin her ikisi de (COX-1 ve COX-2), araşidonik asidi prostaglandin prekürsörü olan PGH_2 'ye dönüştürür ve prostaglandin sentaz katalizörlüğünde prostaglandinler sentezlenir. Ancak, özellikle akciğer damarları ve sinovyum gibi dokularda PGI_2 sentezinden COX-2 enzimi sorumludur (McAdam ve ark. 1999).

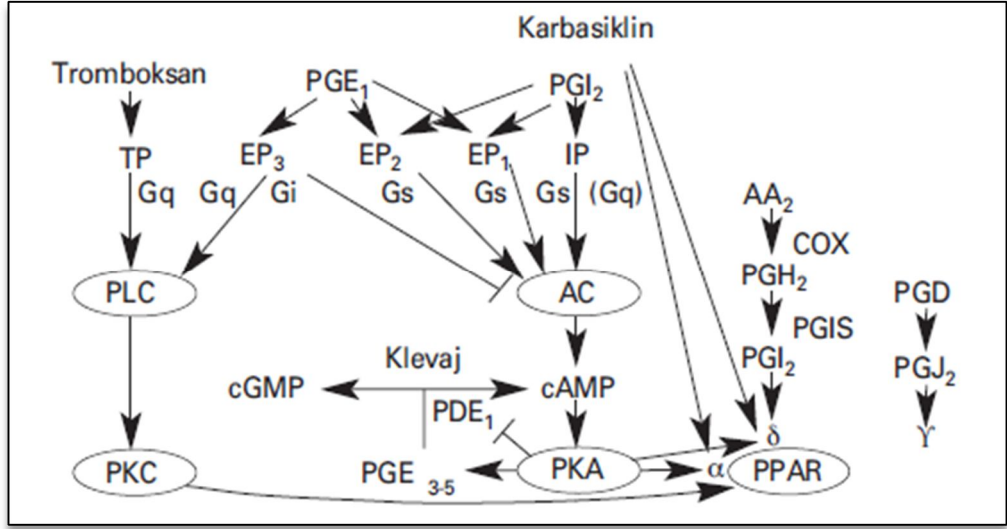
Prostaglandinlerin vasküler düz kas hücreleri vazodilatör ve trombositler üzerine ise kümeleşmeyi önleyici etkileri vardır (Smyth ve ark. 2009). Damar düz kas hücre çoğalmasını ve farklılaşması da inhibe etmektedir. Endotel hücreleri endojen prostaglandinlerin ana kaynağı olduğundan, bu mediatörlerin etkisi hem vasküler duvara hem de endotele yapışan kan hücrelerini etkilemektedir (Fetalvero ve ark. 2006).

Prostaglandinler akciğerlerde kan basıncı ile bronş aşırı duyarlılığını azaltıcı etki gösterir (Idzko ve ark. 2007). PGI_2 'nin en önemli özelliklerinden biri de doku koruyucu etkisidir. Bu etki özellikle gastrik mukoza, beyin, karaciğer, myokard ve trombositler üzerinedir. Prostaglandinler organa ve kullanılan zararlı uyarana özgü olmayan bu geniş spektrumlu etkisinden dolayı organizmada homeostazisin sürdürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Komhoff ve ark. 1998).



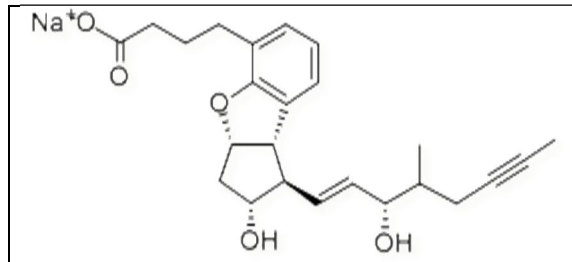
Şekil 2.3. Prostanoidlerin etkileri (Maitland ve Olschewski, 2008)

Prostanoidler hedef hücre membranında bulunan kendilerine spesifik reseptörleri aracılığıyla etkilerini gerçekleştirirler. Prostanoidlere spesifik dokuz tane ligand reseptörü bulunmaktadır. Bunlar DP, EP, FP, IP ve TP reseptörleridir. DP reseptörlerinin 1 ve 2, EP reseptörlerinin ise 1-4 aralığında alt tipleri bulunmaktadır. Bu reseptörler, hücre membranının sitoplazmik kısmında lokalize olmuş, yedi transmembranal segmentli G-proteini ile bağlantılı (G protein-PCR) reseptörlerdir (Narumiya ve ark. 1999; Abramovitz ve ark. 2000). Prostanoid reseptörleri heterotrimetik G proteini aktivasyonu ve hedefteki farklı etkileri baz alınarak kendi içlerinde iki grupta değerlendirilebilirler. İlk grubu relaksan reseptörler oluşturur. IP, EP₂, EP₄ ve DP reseptörleri genel olarak G-protein G_s'yi aktive ederler. G_s proteinin aktivasyonu adenilat siklazı uyarır ve siklik adenosin monofosfat (cAMP) üretimini uyarır (Şekil 2.4). Artan hücre içi cAMP protein kinaz-A (PKA)'yı aktive eder. PKA'nın katalitik alt birimleri çekirdeğe doğru hareket ederek cAMP'ye cevap veren proteini (CREB) fosforiller ve bu şekilde gen transkripsiyonunu uyarılması ile hücreyel yanıt oluşur. İkinci grupta ise kontraktıl tip olarak nitelendirilebilecek olan TP, EP₁ ve FP reseptörleri yer alır. Bu reseptörlerde G-protein G_q'yu aktive ederek fosfatidilinositol aracılığı ile hücre içi Ca⁺² düzeyini etkiler. PGI₂'nin bu etkilerini büyük ölçüde PGE₁ ile ortak reseptörler aracılığı ile oluşturduğu düşünülmektedir (Matsuoka ve Narumiya, 2007). Gray ve ark. (2005), prostanoidlerin kendi reseptörlerinin yanı sıra hücre çekirdeğinde bulunan PPARδ'yı da aktive ederek hücreyel sinyal etkilerini gösterdiklerini bildirmişlerdir.



Şekil 2.4. Prostaglandin ve cAMP etkileşimi (Maitland ve Olschewski, 2008)

Beraprost sodyum (BPS) bir prostaglandin analogüdür. Siklopentan halka yapısının yerine bir dizi konformasyonel değişimler ile sentezlenmiştir (Ohno ve ark. 1985) (Şekil 2.5). Beraprost, endojen PGI₂'ye göre daha dayanıklı ve uzun ömürlü bir moleküldür. BPS, IP ve EP₃ reseptörleri aracılığı ile adenilat siklaz üzerinden hücre içi cAMP seviyesini artırır (Kainoh ve ark. 1993; Mubarak 2010). Yüksek cAMP molekülü ise yangıyı baskılar (Chen ve ark. 2009; Wall ve ark. 2009).

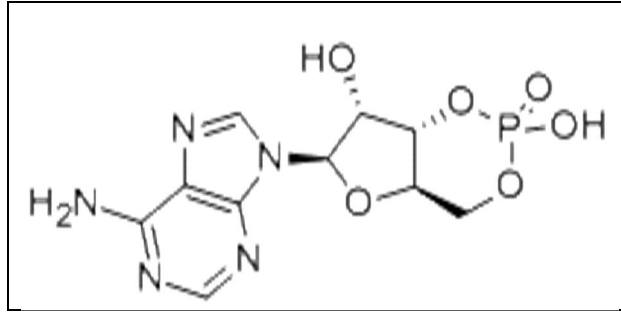


Şekil 2.5. Beraprost Sodyumun moleküler yapısı (Chemvon Biotechnology, 2012)

2.6. Hücre İçi Siklik Adenozin Monofosfatın Biyolojik Etkileri

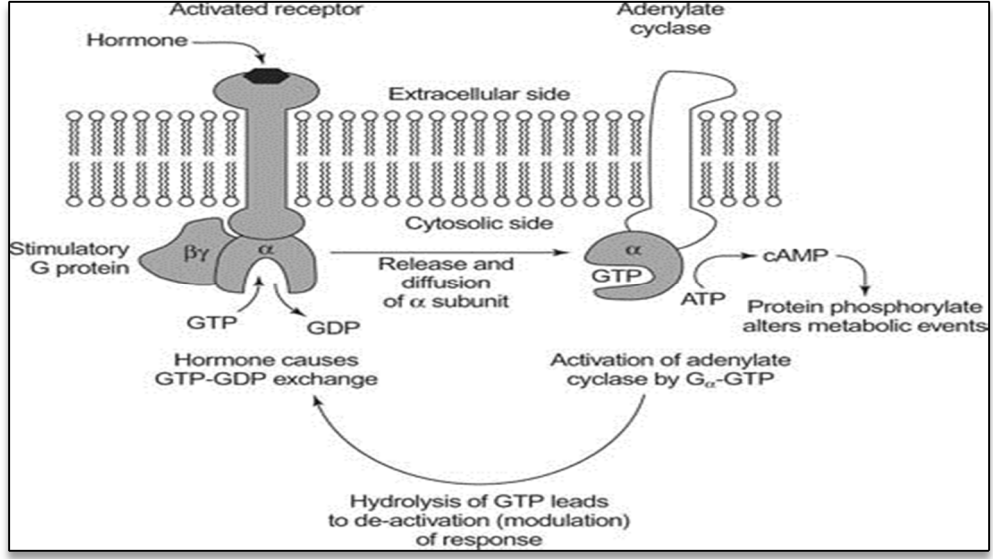
Siklik adenozin monofosfat, hücre membranında gömülü adenilat siklaz enziminin katalizörlüğü ile adenozin trifosfattan (ATP) sentezlenen ve fosfodiesterazlar ile 5'adenozin monofosfata dönüşerek inaktif hale getirilen önemli bir nükleotiddir. 1957 yılında Earl Sutherland ve Tedd Rall tarafından keşfedilen cAMP'nin ekzositoz, immun sistem regülasyonu, hücre bölünmesi ve gen ekspresyonu gibi birçok etkileri vardır. cAMP, hücre zarından geçemeyen amino asit ve protein yapılı bazı hormonların ve ekstraselüler sinyallerin kendilerine spesifik reseptörleriyle birleşmelerinden sonra hücre içine aktarılmasına aracılık eden ikincil haberci moleküldür (Prasad ve ark. 2003).

Hormon etki mekanizması çalışmalarıyla 1971 Nobel Fizyoloji ve Tıp ödülünü kazanan Sutherland, glikojen yıkılmasının hormonal kontrolü konusunda yaptığı araştırmalarda, cAMP'yi keşfetti. Daha sonra cAMP'nin sentezi ile yıkımında rol oynayan enzimlerin bütün memeli hücrelerinde, diğer organizmalarda ve bakterilerde de bulunduğu tespit edildi (Vane ve Botting, 1995).



Şekil 2.6. cAMP'nin moleküler yapısı (Chemvon Biotechnology, 2012)

Siklik adenozin monofosfat yolu ile etki eden hormonlar, nörotransmitter-reseptör etkileşmesinde olduğu gibi hedef hücre membranındaki reseptörlerine bağlandıktan sonra, adenilat siklazı enzimini aktive ederler. Adenilat siklazın aktif hale geçmesi, sitoplazmada ATP'den cAMP üretimini katalize eder (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Hücre içi cAMP üretimi

İkincil haberci bir molekül olan cAMP, hedef hücrenin çekirdeğine bağlanarak değişik enzimleri aktive edebilir. Kas hücrelerinde kasılma ya da gevşeme, membran geçirgenliğinin değişmesi, salgı fonksiyonları, protein sentezi, hücrede diğer enzimlerin aktivasyonu gibi birçok örnek verilebilir. Yine epinefrin veya glukagon, karaciğer hücrelerinin membranda bulunan spesifik reseptörlerine bağlandıktan sonra adenilat siklaz aktivasyonuna neden olur ve ATP'den cAMP üretilir. cAMP hücrede protein kinazı, bu da fosforilaz b kinazı aktive ederek fosforilaz a'ya çevirir ve glikojenolize neden olur. Glikojen, glikoz-1-fosfata dönüşür. Katekolaminler, glukagon, adrenokortikotropik hormon, LH, antidiüretik hormon, vazopressin, TSH, MSH, peptid hormonlar, parathormon, prostaglandinler, histamin, serotonin ve biyojenik aminler cAMP aracılığı ile etki oluşturan hormonlardandır. Yüksek cAMP düzeyleri, kemotaksis, hücre proliferasyonu, agregasyonu ve superoksit anyon sentezini inhibe eder. Ayrıca proenflamatuar ajanların sentezini ve yangısal hücre fonksiyonlarını baskılayarak yangıyı önler (Piaz and Giovannoni, 2000; Jacob ve ark. 2002).

Lipopolisakkaritlerin neden olduğu yangısal olayların baskılanmasında cAMP'nin önemli rolleri vardır (Souness ve ark. 1996; Houslay ve Kolch, 2000). cAMP bu etkilerini protein kinaz A (cAMP tarafından aktive edilen protein kinaz) aracılığı ile gerçekleştirir. PKA'ya bağlanan cAMP, enzimin katalitik ünitesini regüle edici bölgesinden uzaklaştırarak aktive eder. Aktif PKA hücre çekirdeğinde transkripsiyonun başlatılması dahil iyon kanalları, bazı enzim ve hücre içi sinyal iletiminde önemli bazı proteinleri

fosfatlayarak etkisini gösterir. cAMP aracılığı ile başlatılan transkripsiyonda cAMP'ye cevap veren proteinin (CREB) PKA tarafından fosfatlanması ile CRE (cAMP'ye cevap veren element), CREM (CRE-modülatör) ve ATF-1 (aktive olabilen transkripsiyon faktörü-1) fosfatlanarak DNA ile dimer oluştururlar (Houslay ve Kolch, 2000; Gross ve ark. 2003). Sonuç olarak nükleusta hücresel yanıt gelişir.

Yapılan araştırmalarda cAMP'nin fonksiyonel etkisini göstermede PKA dışında diğer bazı sinyal iletim yollarını da kullandığı rapor edilmiştir. Örneğin cAMP'nin, PI3K (fosfatidilinozitol-3-kinaz) üzerinden MEK-ERK aracılığı ve ayrıca Rac1/Cdc42 aracılığı ile p38 kinaz (SAPK: stres uyarımlı aktive edilen kinaz) üzerinden hedef genlerin transkripsiyonu üzerine düzenleyici etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Houslay ve Kolch, 2000; Schulte ve Fredholm, 2003). Hücre içi cAMP düzeyindeki artışın apoptozu önleyici ve yangıyı baskılayıcı etkisinin de olduğu birçok araştırmada rapor edilmiştir (Jimenez de Bagues ve ark. 2005; Mu ve ark. 2005). cAMP'nin sentezi hücre membranı iç yüzeyinde gömülü olan adenilat siklaz (AC) enzimi tarafından yapılırken hidrolizi yalnızca fosfodiesterazlar (PDE) grubu enzimler tarafından düzenlenir. Fosfodiesterazlar farklı genlerden transkribe edilen 11 familyadan ve bunlara ait 50'den fazla izoenzimden oluşan geniş bir enzim ailesidir (Francis ve ark. 2001). Hepsinin ortak özelliği yaklaşık 270 amino asitten oluşan katalitik bölgelerinin %20-40 oranında homoloji göstermesidir. Her bir familyanın substrat spesifitesi, inhibitöre olan duyarlılığı, dokular ve hücre içindeki lokalizasyonu, kalsiyum ve magnezyum gibi iyonlar tarafından regülasyonları farklılıklar gösterir (Bolger ve ark. 1997; Beavo ve Brunton, 2002).

Fosfodiesteraz enzim sınıfında PDE4 enzimlerine spesifik inhibitörlerinin (rolipram, roflumilast gibi) kullanılmasıyla hücre içi cAMP konsantrasyonu artırılabilir. Artan cAMP'nin immun sistemi ve yangı hücre proliferasyonunu baskılayıcı özellikleri yanı sıra sitokin sekresyonunu azaltıcı etkilerinin de olduğu bildirilmiştir (Houslay, 2001).

İmmun hücrelerde hücre içi cAMP artışı yangının baskılanmasına neden olur. Prostaglandin E₂ gibi endojenik veya izobutil metil ksantin (IBMX-PDE inhibitörü), rolipram (PDE4 inhibitörü) gibi ekzojenik ajanlar; hücre içi cAMP seviyelerini arttırlar. Bunun sonucunda da yangı başlatıcı faktörlerden IL-1 ve TNF- α (proinflamatuvar) gibi sitokinlerin salınımında baskılanma ve yangı baskılayıcı sitokin olan IL-10'un sentez ve salınımında artışa neden olur (Kambayashi ve ark. 1995). Ayrıca bu artış ile antioksidan

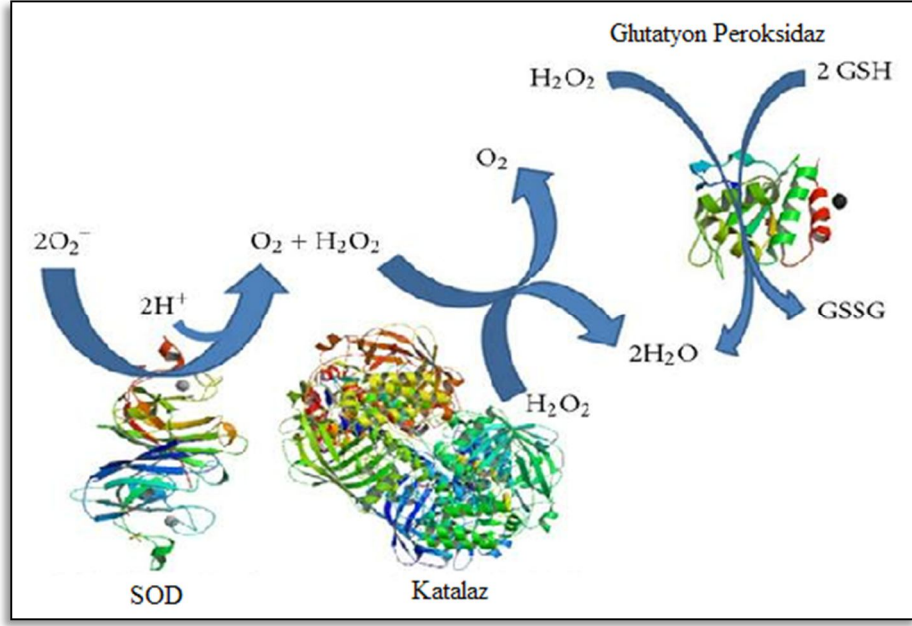
savunma sistemini uyararak lipid peroksidasyonunun önlendiği de belirtilmiştir (Erdogan ve ark. 2008).

Siklik adenzin monofosfat aracılığıyla hücreye ulaşan sinyaller cAMP bağımlı PKA veya cAMP tarafından direk aktive edilebilen değişim proteini (EPAC) ile nükleusa aktarılır (Wong ve Scott, 2004). EPAC, cAMP tarafından doğrudan aktive edilebilen değişim proteinidir. Hücre-hücre etkileşimini, ekzositoz ve çeşitli iyonların hücre içine girişinin düzenlenmesi gibi mekanizmalarda cAMP yanıtlarını düzenleyen moleküldür (Aronoff ve ark. 2005).

2.7. Serbest Radikaller, Antioksidan Sistem ve Prostaglandin ile Etkileşimleri

Organizmada oksidan-antioksidan dengenin, oksidan sistemin lehine değiştiği durumlarda oksidatif stres gelişir (Henricks ve Nijkamp, 2001; Young ve Woodside, 2001; Cherubini ve ark. 2004). Başlıca serbest radikaller; mitokondriyal elektron transport zinciri, ksantin oksidaz, sitokrom P450 redüktaz ve glukoz oksidaz gibi NADPH bağımlı oksidazların ve otooksidasyon reaksiyonlarında, redoks tepkimelerinde ve araşidonik asit metabolizması sonucunda meydana gelir. Enflamasyonda reaktif oksijen türleri (ROS) fagositik hücreler tarafından oksijen moleküllerinin indirgenmesi ile sentezlenir (Seshiah ve ark. 2002).

Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin yaşlanmayla ortaya çıkan nörodejeneratif bozukluklar, artrit, ateroskleroz ve kanser gibi hastalıkların gelişiminde önemli rol oynar (Karan ve Tufan 2010; Saleh ve ark. 2010).



Şekil 2.8. Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyon (Melo ve ark. 2011)

Serbest radikaller ortaklanmamış elektronlara sahiptirler. Elektronlar atom çekirdeğinin etrafındaki orbital olarak adlandırılan katmanlarda bulunurlar. Her orbital normal şartlarda birbirine zıt yönde hareket eden iki elektron bulundurur (Young ve Woodside, 2001; Cherubini ve ark. 2004). Serbest radikaller; kovalent bağ taşıyan bir molekülün yıkımı, bir elektronun eklenmesi, elektron kaybı veya bir molekülün parçalanması sonucu ortaya çıkabilir. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri; UV, X-ray ve gama ışınlarına, metal katalizli reaksiyonlarına, atmosfer kirleticilere maruziyet sonucu, yangı sürecinde nötrofil ve makrofajlar başta olmak üzere birçok hücrede üretilmektedir (Cadenas, 1989).

Oksijen, iki elektronu eşleşmemiş reaktif potansiyeli yüksek elektron dağılımına sahip bir moleküldür. Reaktif bir özelliği olmamasına rağmen diğer radikallerle reaksiyona girerek nükleik asitler, proteinler ve lipidler gibi hücresel makromoleküllerde yapısal bozukluklar yaparak doku hasarı ve hücre ölümüne neden olur. Hücresel makromoleküller için zararlı etkileri olan reaktif oksijen türlerinin oluşmasına zemin hazırlar (Cherubini ve ark. 2004; Poli ve ark. 2004; Vincent ve ark. 2004).

2.7.1. Süperoksit (O_2^-) Anyonu

Süperoksit radikali moleküler oksijenin indirgenmesinde ürün olarak açığa çıkar. Bu radikalin moleküler düzeyde önemli özelliği, sekonder olarak ürettiği radikallerden ileri gelir. Oksijen molekülünün başka bir molekülden elektron almış formu olan O_2^- , mitokondriyal elektron transfer zincirinde redükte nikotinamid adenin dinükleotid (NADH)'ın okside olması ile üretilir. Süperoksit genel olarak anyon olduğu halde, ortamın pH'sına bağlı olarak protonlanarak katyon haline dönüşebilir. Bu durumda perhidroksi radikali (HO_2^-) formunu alır. Süperoksit aslında reaktivitesi düşük bir serbest radikaldir. Ancak H_2O_2 kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olması zararlı reaktivitede önemlidir. Süperoksit anyonu, nötrofillerin bakterisidal aktivitesi, apoptoz, enflamasyon ve vasküler fonksiyonların düzenlenmesi gibi bir çok yararlı etkinliğe sahiptir (Sözmen, 2002; Memişoğulları ve ark. 2003; Vincent ve ark. 2004; Cherubini ve ark. 2005;).

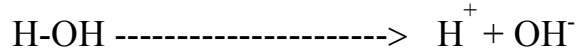
2.7.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Oksijen başka bir molekülden iki elektron alarak peroksiti, peroksit ise H^+ molekülü ile birleşerek hidrojen peroksiti oluşturur Hidrojen peroksit, süperoksidin SOD ile dismutasyonu sonucu veya spontan olarak da üretilmektedir. Hidrojen peroksit gerçekte radikal bir molekül olmayıp, üretildiği bölgede kalan süperoksidin aksine membranları geçen, sitozole diffüze olan ve uzun ömürlü bir bileşiktir. Bu nedenle süperoksidin ulaşamadığı membranla korunan yapılara kolaylıkla ulaşabilir ve zararlı etkisini gösterir. Burada süperoksidle reaksiyona girerek daha reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere yıkılabilir. Hidrojen peroksit başka bir şekilde de Fenton reaksiyonu olarak bilinen yolla serbest Fe^{+2} ile reaksiyona girer ve demir okside olurken hidroksil radikali oluşur (Sözmen 2002; Vincent ve ark. 2004).

2.7.3. Hidroksil Radikali (OH⁻)

Hidroksil molekülü, serbest radikaller arasında en reaktif olanıdır. Amino asitler, nükleik asitler, organik asitler, fosfolipidler ve sakkaritler gibi biyokimyasal maddelerle reaksiyona girerek bu yapılarda deformasyona neden olur.

Hidroksil tek atom halinde ve bir elektronu eksik olan oksijen ile H⁺ 'in birleşmesinden oluşur. Gama radyasyona maruz kalan dokularda da hidroksil radikali oluşabilir. Hidrojen ve oksijen üzerinde dış orbitalde tek elektron kalır ve iki radikal oluşur. Hidroksil radikalının yarılanma ömrü çok kısadır ve pek çok molekülden H atomu çıkarılmasını tetikler (Young ve Woodside, 2001).



2.7.4. Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) adlı sitozolik bir enzimin aktivitesi ile üretilir. Guanilat siklazı aktive eden NO, vasküler basıncın düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Oksijen bağlanan bölgeye kompetitif bağlanarak direkt olarak sitokrom oksidazın inhibisyonu ile hücre selülünü düzenleyen NO, bazı durumlarda bir antioksidan gibi davranır ve hücreleri lipid peroksidasyonuna karşı korur. Bununla birlikte süperoksid düzeylerinin arttığı durumlarda süperoksidle reaksiyona girerek bir prooksidan olan peroksinitrit oluşturur (Pryor ve Squadrito, 1995). Ayrıca nitrik oksit nörotransmitter gibi hareket eden diffüzyon özelliği fazla olan bir moleküldür. Nitrik oksit etkisini, nörotransmitterlerden farklı olarak, postsinaptik membrandaki spesifik reseptörlere bağlanıp, hem pre hem de postsinaptik elementlerin diffüzyonunu artırarak hareketlerini sağlar (Prast ve Philippu, 2001)

2.7.5. Geçiş Metalleri

Demir (Fe) ve Bakır (Cu) gibi okside olabilen metaller farklı formlara dönüşürken oluşan redoks tepkimeleri radikal üreten reaksiyonları hızlandırır. Metal iyonları lipid

peroksidasyonunun oluşmasında önemlidir. Oluşmuş lipid hidroperoksitlerin parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu katalize eder. Böylece zararlı olan radikallerin etkilerini daha da arttırmaları. “Fenton reaksiyonu” olarak bilinen reaksiyonda Fe^{+2} iyonlarının H_2O_2 'i indirgeyip OH^- oluşturabildikleri bilinmektedir. Plazmada bulunan bakırın taşıyıcısı olan seruloplazminin antioksidan aktivitesi; ferrokسيداز aktivitesi, askorbat oksidaz aktivitesi, oksijen radikali temizleyici aktivitesi ve GSH-bağımlı perokسيدaz (GSH-Px) aktivitesi şeklinde dört yolla olur. Transferrin de H_2O_2 'den demir iyonu bağımlı hidroksil oluşumunu inhibe ederek antioksidan etkinliğini gösterir (Daimon ve ark. 1998; Şekeroğlu ve ark. 2000; Memişoğulları ve Bakan, 2004).

2.7.6. Lipid Peroksidasyonu

Hücrel membranda bulunan yağ asitleri ve kolesterolün çift bağlarına serbest radikallerin girmesiyle peroksidasyon şekillenebilmektedir. Bu olayda ilk basamakta yağ asidi hidrojen ve kendi üzerinde birer elektron kalacak şekilde parçalanır ve lipid radikalini oluşturur. Lipid radikali de oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksil radikalini meydana getirir. Bu radikal de diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksidasyonu devam ettirir. Ayrıca lipid peroksiller ortamdaki hidrojen atomları ile de reaksiyona girerek lipid hidroperoksidleri de oluşturabilirler (Şekeroğlu ve ark. 2000; Niki ve ark. 2005). Lipid peroksidler daha sonra malondialdehid (MDA) ve 4-hidroksi nonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşürler. Bu yıkım ürünleri de DNA veya proteinlerle reaksiyona girebilirler ve mutajenik özellikler gösterebilirler. Üç veya daha fazla çift bağa sahip yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu MDA ürünü oluşmaktadır. Bu da tiyobarbutirik asid reaktif maddeler olarak isimlendirilir. Malondialdehid, lipid peroksidasyonunun şiddetiyle orantılı olarak artar, ancak spesifik değildir. Aynı zamanda membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmasına neden olabilir (Masella ve ark. 2005). Mitokondri ve endoplazmik retikulum membranları ve plazmada bulunan lipidler, peroksidasyonun ve ROS saldırılarının ana hedefidir (Cherubini ve ark. 2004).

2.7.7. Antioksidan Enzimler

Organizmada serbest radikallerin vereceği hasarın nötralize edilebilmesi için bazı enzimatik ve non-enzimatik antioksidan savunma sistemleri geliştirmiştir (Memişoğulları ve Bakan, 2004). Antioksidanlar, oksidanları tutarak daha zayıf bir moleküle dönüştürür veya tamamen temizler. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GSH-redüktaz) ve GSH-peroksidaz enzimatik antioksidanlar, bazı vitaminler (Vitamin E, C ve karotenoidler), tiyol antioksidanlar (glutatyon, tiyoredoksin, lipoik asit gibi), doğal flavonoidler, melatonin gibi moleküller non-enzimatik antioksidanları oluştururlar (Mates ve ark. 1999).

Antioksidanlar dört farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirebilirler.

1. Scavenging (temizleme) etkisi: Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki enzimler tarafından yapılır.
2. Quencher (baskılama) etkisi: Oksidanların yapısına bir hidrojen vererek etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından gerçekleştirilir.
3. Onarma etkisi: Yapısal bozukluğa uğramış yapılarda reaktifitenin ortadan kaldırılarak rejenere etme özelliğidir.
4. Zincir koparma etkisi: Oksidanlarla bağ kurarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından gerçekleştirilir (Taysi ve ark. 2002).

İyi bir antioksidan serbest radikalleri belirli bir şekilde ortadan kaldırır, redoks tepkime veren metalleri tutar, diğer antioksidanların aktivitelerini tetikler, gen ekspresyonunu pozitif etki eder, organizmada kolay emilir, membran ve sulu ortamlarda da oldukça fonksiyoneldir (McCall ve Frei 1999).

Enzimatik Antioksidan	Reaksiyonu	Fonksiyonu
Süperoksit dismutaz (SOD)	$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2$	$O_2^{\cdot-}$ 'in H_2O_2 'e dönüşümünü katalizler.
Katalaz (CAT)	$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} O_2 + 2H_2O$	H_2O_2 'i O_2 ve H_2O 'ya metabolize eder.
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GPx} GSSG + 2H_2O$	GSH indirgen eşdeğeri kullanarak hidroperoksitleri inaktive eder.
Glutasyon redüktaz (GR)	$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$	GSSG' den GSH' ı rejenere eder.
Glutasyon-S-transferaz(GST)	$ROOH + 2GSH \xrightarrow{GST} GSSG + ROH + H_2O$	GSH ve alkilleme araçlarını çeker.

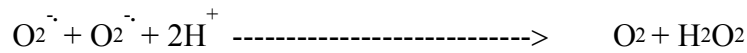
Şekil 2.9. Antioksidan enzimler, reaksiyonları ve fonksiyonları

Oksidatif stres ve reaktif oksijen ile nitrojen türleri kronik yangısal akciğer hastalıklarının patogeneğinde önemlidirler (MacNee, 2001). Serbest radikaller akciğerlerde ilk olarak epitel hücrelere zarar verir ve bu hücrelerin geçirgenliği artırır. Bu hücrelerde redoks tepkimelere neden olarak kısa bir süre içerisinde birçok serbest radikal oluşumunu uyarır (Morrison ve ark. 1999). Solunum yollarındaki en önemli antioksidanlar: katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyondur (Comhair ve Erzurum, 2002).

2.7.7.1. Süperoksit Dismutaz

Bir metalloprotein olan SOD bir süperoksit molekülünü $O_2^{\cdot-}$ molekülüne yükseltgeyip, diğer süperoksit molekülünü H_2O_2 'e indirger. Üç tür SOD enzimi vardır. Birincisi mitokondride lokalize Mn-SOD, ikincisi sitozolde lokalize Cu-Zn SOD ve üçüncüsü de plazmadaki vasküler endotele bağlı Cu-SOD'dir (Taysi ve ark. 2002).

SOD



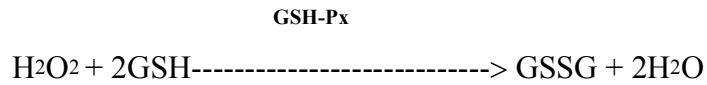
Bu dismutasyon reaksiyonu superoksit radikalinin anyon ve katyon formlarının eşit oranda bulunduğu pH 4,8' de kendiliğinden meydana gelebilir. Ancak fizyolojik şartlarda yani pH'nın 7,35- 7,45 arasında iken bu reaksiyon çok daha yavaş oluşur. SOD enzimi varlığında pH en az 7,4'te bu reaksiyon 4 kat daha hızlı olur (Cherubini ve ark. 2005).

2.7.7.2. Katalaz (CAT)

Katalaz bitki ve hayvan hücreleri ile aerobik bakterilerde bulunan bir enzimdir. Katalaz esas olarak peroksizomlarda, daha az olarak sitozolde bulunur. SOD'ın oluşturduğu H_2O_2 'i katalaz peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalar. Her biri bir prostetik grup olan ve yapısında Fe^{+3} bulunduran dört hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. Peroksizomlarda lokalizedir. Glutasyon peroksidazın H_2O_2 'e karşı Km'si katalaza göre daha düşüktür. Yani düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 'i glutasyon peroksidaz parçalar, yüksek konsantrasyonlarda ise katalaz aktivitesi rol alır (Habif ve ark. 1997; Mates, 1999).

2.7.7.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Peroksidaz)

Glutasyon peroksidaz her birinde selenosistein içeren dört alt birimden oluşur. Redükte glutasyonu yükseltirken H_2O_2 'i suya çevirir. Böylece membran lipidlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korur (Akkuş ve ark. 1996).



Avitaminosis E durumunda glutasyon peroksidaz, hücrel membranları lipid peroksidasyonuna karşı korur. Eritrositlerde bulunan önemli antioksidanlardandır. Glutasyon peroksidaz yetersizliği selenyum eksikliği sonucu olabilir. Çünkü selenyum bu enzimin bir integral parçasıdır (Chao ve ark. 2002).

2.7.7.4. Glutasyon Redüktaz (GSH- Redüktaz)

Yükseltgenmiş glutasyonu indirgenmiş forma dönüştüren bu enzimin hale çeviren iki alt ünitesi vardır. Her bir alt ünite NADPH bağlayan, FAD bağlayan ve ara yüz alan olmak üzere üç tane yapısal alan içerir. Glutasyonun indirgenme reaksiyonu sırasında sıklıkla elektronlar NADPH'dan FAD'ye transfer edilir. Daha sonra alt ünitelerdeki iki sistein arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle okside glutatona aktarılmış olur (Cherubini ve ark. 2005).

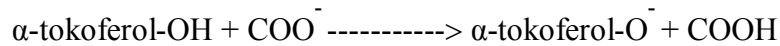
2.7.7.5. Glutasyon S-Transferaz (GST)

Toksik metabolitlerle glutasyonun konjugasyonunu katalizleyen GST enzimi de toksik metabolitlerin detoksifikasyonunda önemli bir antioksidan enzimdir (Van Haaften ve ark. 2001).

2.7.8. Antioksidan Vitaminler

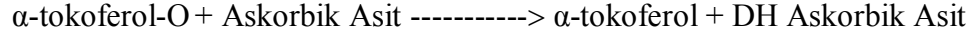
2.7.8.1. E Vitamini

Yağda çözünen vitamin olduğu için hem sellüler hem de subsellüler membranlarda ve lipoproteinlerin yapısına katılan antioksidan bir vitamindir. Membranlarda serbest oksijen radikallerinin ana temizleyicisidir. En aktif formu α -tokoferoldür ve zincir kırıcı antioksidan fonksiyona sahiptir. Hidrofobik kısmına hidrojenini kolaylıkla verebilen -OH grubu bağlıdır. Bu yüzden lipid peroksidasyonu sırasında oluşan peroksil ve alkoksil radikalleri yağ asidi yerine α -tokoferolle birleşerek reaksiyon zinciri kırılmış olur (Van Haaften ve ark. 2001; Singh ve ark. 2004).



Böylece α -tokoferol yeni bir radikal olan α -tokoferol-O $^\cdot$ e dönüştürülmüş olur. Bu radikalın ise başka bir yağ asidiyle birleşebilme aktivitesi düşüktür. Oluşan bu tokoferoksil

radikali membran yüzeyinde askorbik asitle (C vitamini) reaksiyona girerek tekrar tokoferole dönüşmektedir (Singh ve ark. 2004).



2.7.8.2. A Vitamini (Karotenoid)

Karotenoidler görme, üreme, büyüme ve epitel dokusunun rejenerasyonu için gerekli olan bileşiklerdir. Diyetteki retinolün oksidasyonu sonucu oluşan retinoik asit, retinoidlerin görme dışında diğer etkilerinin çoğuna aracılık eder. α -tokoferolle karşılaştırıldığında oldukça zayıf bir antioksidandır (Cherubini ve ark. 2005).

2.7.8.3. C Vitamini (Askorbik asit)

Askorbik asit; moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve c gibi bileşiklerin indirgenmesine neden olan ve sulu ortamlarda serbest radikallerle reaksiyona girebilme kabiliyetinde, suda eriyen bir vitamindir. Plazmada oksidan ajanlara karşı ilk antioksidan defansı oluşturur. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)'nin oksidasyonunu önleyerek ateroskleroza karşı korunmada yardımcı olur. Süperoksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girip onları temizleyen bir antioksidan olmasının yanı sıra tokoferoksil radikalinin tekrar tokoferole dönüşmesini sağlar. Bu esnada kendisi de dehidroaskorbata okside olur. C vitamini yetersizliği durumlarında oluşan tokoferoksil radikalleri tokoferole dönüşmesi için GSH ile reaksiyona girecek ve böylece hücredeki GSH miktarını azaltacaktır (Steinberg ve ark. 1998; Kutlu ve ark. 2005).

2.7.9. Glutasyon (GSH)

Bir tripeptid olan GSH (L- γ -glutamil-L-sisteinglisin); hücrede ROS'nin ve elektrofillerin temizlenmesi, tiyol-disülfid yapılarının onarımı ve sinyal aktarımı gibi hücre için çok önemli fonksiyonlara sahip düşük moleküler ağırlıklı bir antioksidandır (Halliwell ve Gutteridge, 1993). Hücrelerde indirgenmiş formda (GSH) bulunur ve non-enzimatik bir antioksidandır. Glutasyon peroksidazın katalizliğinde GSH, endojen üretilen peroksidleri indirgeyerek, kendisi de okside olarak hücre membranını lipid peroksitlere karşı korur. Glutasyon etkin olarak hücreyi koruyabilmesi için büyük kısmı glutasyon redüktaz katalizörlüğünde redükte halde tutulur (Memişoğulları ve ark. 2005; Vincent ve ark. 2004, Cherubini ve ark. 2005).

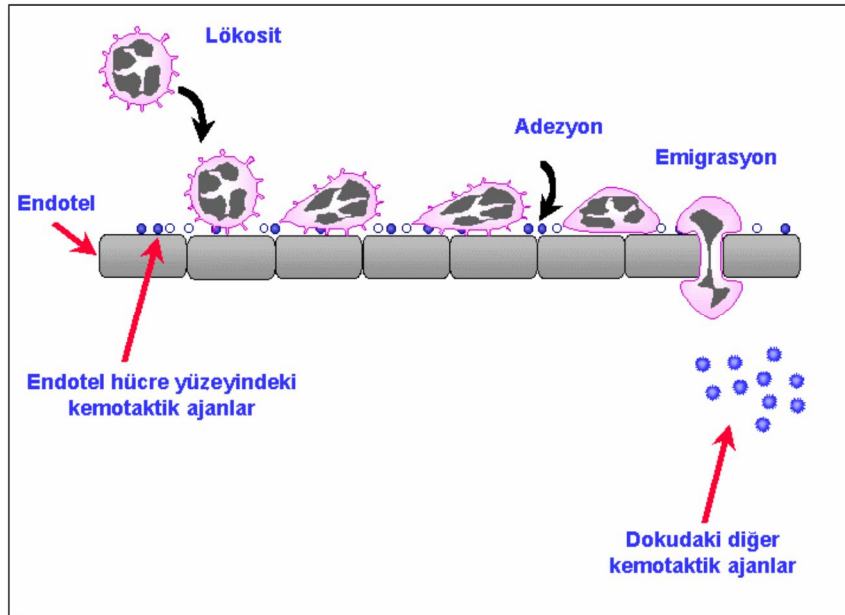
2.7.10. Enflamasyon

Akciğerlerde LPS gibi endotoksinler, iritan moleküller ve artan reaktif oksijen-nitrojen türlerinin etkisiyle oksidan hasarın yanı sıra, transkripsiyon faktörleri (nükleer faktör kappa B, NF- κ B ve aktivatör protein-1, AP1) aracılığıyla enflamasyon da şekillenir. Yangı başlatıcı sitokinler arasında IL-1 β , IL-12 ve TNF- α önemli bir yer tutar (Gazzola ve ark. 2010).

Enflamasyonun vasküler ve hücrel cevabı, plazma hücrelerinden çıkan ve yangıya sebep olan bir uyarana ve kimyasal faktörlerle ortaya çıkmaktadır. Bu gibi kimyasal aracı moleküller bir arada veya sırayla etki ederek yangısal yanıtın gelişmesine neden olurlar (Aghabeigi, 1992). Enflamasyon ve tamir, vücudun önemli savunma mekanizmalarıdır. Bununla birlikte alerjik reaksiyonlar nedeniyle, artmış reaktif yangısal yanıt enflamasyonun bir komplikasyonu olarak organ fonksiyonlarında bozulma veya yetmezliğe, hatta ölüme bile sebep olabilir. Örneğin, perikarditten sonra, kalbin çevresinin yoğun bağ doku ile kaplanması fonksiyonlarının bozulmasına neden olur (Mullington ve ark. 2001). Enflamasyon, vasküler ve hücrel olaylar olmak üzere iki ana olayı içerir. Vasküler olaylar, enflamatuar yanıt süresince vasküler akım ve permeabilite değişkenliğini kapsar. Kılcal arterlerde birkaç saniyelik kısa süreli vazodilatasyon oluşur ve erken dönemde ısı ile kızarıklığın artışına neden olur. Dolaşımdan ekstravasküler sıvıya protein çıkışı nedeniyle eritrosit tutulumu ve kümeleşmesi meydana gelir ve nötrofiller endotel hat boyunca dizilim gösterirler (Şekil 2.10). Daha sonra damar endotel hücreleri arasına

sızarak (emigrasyon) intersitisyel dokuya göç (migrasyon) ederler (Sesle ve ark. 2001). Vasküler permeabilite artışı, vazodilatasyon ve artmış kan akımı intravasküler hidrostatik basıncı, bu da kapillerden sıvı süzülümünü artırır. Bu sıvı başlangıçta transudat niteliğinde olmakla birlikte, kısa sürede damar duvar geçirgenliğinin artması ile değişir ve proteinden zengin sıvı yani eksudat halini alır. Sonuçta intravasküler ozmotik basınç azalır ve intersitisyel ozmotik basınç artarak intersitisyel sıvı birikimine (ödem) neden olur (Kuralay ve Çavdar 2006).

Enflamasyondaki hücresel olaylarda lökositlerin yangı bölgesine göçleri birincil olarak dikkati çeker. Lökositik olaylar, marjınasyon ve yuvarlanma, adezyon, emigrasyon, fagositoz ve intravasküler yıkım, lökosit ürünlerinin hücre dışına salınımıdır.



Şekil 2.10. Enflamasyon sürecinde lökositlerin rolü (Kuralay ve Çavdar 2006).

Enflamatuvar doku yanıtı oluşturulmasında aracılık eden kimyasal mediyatörlerden ilki histamindir. Mediyatörler, hasarlı dokudan, hücrelerden veya plazmadan köken alan çeşitli kimyasal maddelerdir. Biyolojik aktivitelerini kazanmak için bir dizi proteolitik değişiklikler geçirirler. Hücreden köken alan mediyatörler normalde intrasellüler granüllerde bulunur; ihtiyaç olduğunda salgılanır veya bir uyarıya karşı yeniden sentez edilirler. Aktive edilince ve hücreden salınıncı bu mediyatörlerin çoğu kimyasal değişikliğe uğrar veya enzimler tarafından inaktive edilir. Mediyatörlerin tümü hedef hücrelerdeki spesifik reseptörlere bağlanarak aktivite gösterirler. Bir kimyasal mediyatör

hedef hücreyi etkileyerek ikincil mediyatör üretimini uyarabilir. Bu ikincil mediyatörler başlangıçtaki mediyatörlere benzeyebilir veya aynısı olabilir. Bununla birlikte karşıt aktivite gösterebilirler (Bienvenu, 1995; Kuralay ve Çavdar, 2006)

Vazoaktif aminler, histamin ve serotonin, akut enflamasyonun başlangıcında artmış permeabiliteden sorumlu spesifik kimyasal mediyatörlerdir (Bienvenu, 1995). Histaminin kaynağı kan damarları etrafında toplanmış olan konnektif dokudaki mast hücreleridir. Ayrıca kan bazofilleri ve trombositleri de histamin sentezleyebilir. Mast hücrelerinden histamin salınımı mast hücre degranülasyonuna yol açan çeşitli fiziksel uyarılar, mast hücrelerine antikor bağlanmasını içeren otoimmün olaylar, anafilatoksin gibi kimyasal etkenler ve nötrofillerden salınan katyonik lizozomal proteinler etkisiyle salınırlar. Histamin arteriollerin dilatasyonuna ve venüllerin vasküler geçirgenliğinin artmasına neden olur. Histamin, eozinofiller için de kemotaktik etkiye sahiptir ve bu hücrelerde bulunan histaminazla inaktive edilir. Serotonin, trombositlerde ve mast hücrelerinde granüllerde granzim kesecikleri içerisinde bulunur. Trombositlerden serotonin çıkışını takiben, kollajenle temas veya antijen-antikor kompleksleri ile temastan sonra uyarılır. Paraziter ve alerji durumları olan IgE aracılı reaksiyonlarda mast hücrelerinden kaynaklanan trombosit aktivatör faktör (TAF), trombositlerden histamin ve serotonin salınımı ile trombosit kümeleşmesine neden olur. Plazma proteazları ise yangısal yanıtta plazmadan bulunan mediyatör çeşitleridir (Takabayashi ve ark. 1996). Prekallikrein, hageman faktörün (Faktör 12) aktive olması aktif proteolitik formu olan kallikreine dönüşür. Kallikrein, yüksek molekül ağırlıklı kininojeni damar geçirgenliğinde etkili bradikinine dönüştürür. Bradikinin arteriolar dilatasyona, endotelial düz kas hücre kontraksiyonuna neden olur. Kallikrein kemotaktiktir ve *in vitro* koşullarda nötrofil agregasyonuna da neden olur.

Kompleman sistemi, bağışıklık ve enflamasyonda görev alır. C3 aktivasyonu diğer kompleman birimleriyle etkileşimde olduğu için en kritik olaydır. Kompleman sistemin etkileri C3a ve C5a (anafilatoksinler) mast hücrelerinden histamin salınımı ile vasküler permeabilite artışına ve C5a kemotaktik faktör aracılığıyla başta nötrofiller olmak üzere savunma hücrelerinin endotele adezyonuna neden olurlar. Ayrıca C3b bakteriyel hücre duvarına bağlandığında opsonin olarak (lökosit ve makrofaj üzerindeki reseptörleri tanıyan moleküllerdir) hareket eder ve fagositozu sağlar. Kompleks lipid çift tabakaya

tutunarak membran iyon kanalları geçirgenliğini artırır ve lizise neden olur (Takabayashi ve ark. 1996).

Yangıda araşidonik asit metabolitleri (AA), enflamatuar uyarı veya C5a gibi aracı moleküllerle fosfolipaz aktivasyonu sonucu membran fosfolipidlerinden açığa çıkan çoklu doymamış yağ asitleridir (Cheeseman ve Slater, 1993). Siklooksijenaz enzimi katalizliğinde araşidonik asitten önce prostaglandin G₂ oluşur. Sonra peroksidaz ile PGH₂'ye dönüşür. PGH₂'de spesifik enzimlerle daha stabil yapıya sahip olan PGI₂, tromboksan A₂, PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}'ya dönüşür. Bu dönüştürücü enzimlerin çeşitleri farklıdır. Örneğin; trombositlerde tromboksan sentaz fazladır ve ürün çoğunlukla tromboksan (TXA₂)'dır. Kuvvetli vazokonstrüktör ve trombosit agreganıdır. Vasküler endotel ise prostasiklin sentazı yüksek miktarlarda bulundurur. Etkileri TXA₂'nin etkilerinin tersi olarak cereyan eder. PGE₂, PGD₂, PGF_{2α} ise daha çok damar geçirgenliğini ve dokulardaki ödemi artırıcı etki gösterirler. Aspirin ve indometazin gibi nonsteroid antienflamatuarlar siklooksijenaz enzimini inhibe ederek prostaglandin ve tromboksan sentezini inhibe ederler, ancak lipoksijenaz enzimini etkilemezler (Haeggstrom ve ark. 2002).

Sitokinler yangıda önemli rollere sahip protein yapılı aracı moleküllerdir. Sitokin sekresyonu, bakteriyel ürünler, immün kompleksler, toksinler ve fiziksel etmenlerce uyarılabilirler. Sitokinler polipeptid yapıda olup enflamasyonda en önemli üyeleri interlökinler (IL) ve tümör nekroz faktör-alfadır (TNF-α). Özellikle IL-1 ve TNF-α birçok ortak biyolojik özellikleri paylaşan proenflamatuar (yangı başlatıcı) sitokinlerdir. Her ikisi de aktive makrofajlar, lenfosit ve diğer hücre tipleri tarafından oluşturulurlar. Sitokinler başlıca üç etkiye sahiptirler (Drenth ve ark, 1995; Armstrong ve ark; 1996). Birincisi sistemik akut faz reaksiyonlarını tetikleyici etkileridir. Aktive olmuş makrofajlardan salınan IL-1 ve TNF-α akut faz proteinlerinin kan değerlerindeki artışı, ateş oluşumu ve iştah kaybından sorumludurlar. İkincisi; endotelial etkilerdir. Lökositlerin adezyonuna, prokoagülan aktivitesine ve TAF aktivasyonuna etki ederler. Üçüncüsü; fibroblastik etkileridir. Kollagen sentezi ve fibroblast proliferasyonunu arttırlar. TNF-α birçok hücre tipinde büyüme ve farklılaşmayı düzenler. Özellikle interferon-gama (IFN-γ) ile birlikte sitotoksik etki gösterir. Yapılan bazı çalışmalar, TNF-α'nın akut enflamasyonda ve antitümöral immünitede en önemli sitokin olduğunu göstermektedir. Nötrofil ve endotel hücrelerini uyarak adezyon ve kemotaksisi yönetir. TNF-α, aktive monositler,

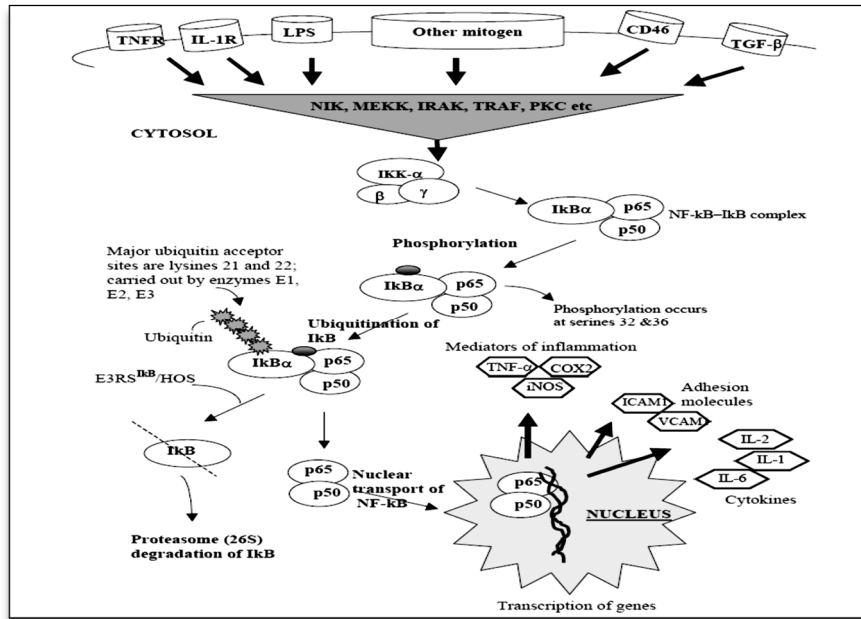
makrofajlar ve daha az çoğunlukta aktive T hücreler, B hücreler, mast hücreler, fibroblast, keratinosit, kupffer hücreleri, düz kas, sinovial örtü hücreleri, alveolar hücreler ve bazofiller gibi birçok hücre tipinden salgılanmaktadır. Fibroblastların ve endotel hücrelerinin TNF- α aracılı proliferasyonu yara iyileşmesinde önemlidir. Ayrıca TNF- α , endotelial vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM)'nün sentezinde önemli bir uyarıcı etkiye sahiptir (Kuralay ve Çavdar 2006).

Proinflamatuvar olan TNF- α 'nın üretimi, IL-10, TGF- β , PGE, siklosporin A, deksametazon, ibuprofen, metilprednizolon ve pentoksifilin tarafından inhibe edilir. IL-1 ise başlıca antijen sunan hücreler (monosit ve makrofajlar, langerhans hücreleri, dendritik hücreler, endotelial hücreler, T lenfositleri, doğal öldürücü hücreler, astrositler ve keratinositler) olmak üzere tüm çekirdekli hücrelerden sentezlenebilir (Dinarello ve ark. 2002; Gardner ve ark. 2003) IL-1; romatoid artrit, septik şok, periodontit, malignite, asbestoz, tüberküloz ve AIDS'de hastalığın gelişimi ile ilişkili olmakla birlikte akut pankreatitte çoklu organ yetmezliğinin fizyopatolojisinden sorumlu tutulmaktadır. IL-1'in tüberkülozda ve enflamatuvar barsak hastalıklarında epitel hücrelerden akut faz proteinlerinin ve sitokinlerin üretimini artırdığı gösterilmiştir (Dinarello ve ark. 2002). Çözünabilir IL-1 reseptörü hematopoezin stimülasyonunda, radyasyonun öldürücü dozlarına karşı korunmada ve kanser hücrelerinin büyümesinin durdurulmasında antienflamatuvar ve immunosupresif tedavi için geliştirilmiştir (Gardner ve ark. 2003).

Yangının uyarılmasında diğer etkili ara molekül olan nitrik oksit, arjininin guanido grubunda yer alan nitrojen atomu ile moleküler oksijenin reaksiyona girmesi sonucu oluşan kısa ömürlü bir serbest radikaldir. Nitrik oksit oluşumunu katalize eden enzim ise nitrik oksit sentaz (NOS) olarak bilinmektedir. Bu enzimin endotel hücrelerinde e-NOS, nöronlarda nNOS ve uyarılabilir form olan iNOS olmak üzere, üç alt tipi bulunmaktadır (Çelik ve Erdoğan, 2008). Akciğerlerde yüksek seviyede NO üretiminden sorumlu hücreler epitel hücreleri makrofajlar, monositler ve eosinofillerdir (Coleman, 2002). Epitel kültürlerinde TNF, IL-1 β , interferon γ gibi sitokinlerin iNOS ekspresyonunu indüklediği, buna karşın glukokortikoid, IL-13 ve IL-14'ü ise inhibe ettiği gösterilmiştir (Berkman ve ark. 1996). Mast hücreleri diğer hücre tiplerine göre enflamasyon ve IgE aracılı alerjik reaksiyonlarda özelleşmiş hücreler olarak bilinmektedir. Nitrik oksidin mast hücre aktivasyonunu inhibe edici etkileri ile ilgili çalışmalarda, sıçanlara kimyasal NO uygulanması sonucunda mast hücre degranülasyonu ve mast hücre bağımlı vasküler

endotele lökosit adezyonunda inhibisyon meydana geldiği gösterilmiştir (Metcalf ve ark. 1997). Nitrik oksidin mast hücre aktivasyonunu inhibe edici fonksiyonu yanında superoksit radikali ile reaksiyona girerek reaktif radikal türlerinin oluşması ve doku hasarına yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca NO'nin nöroblastoma hücrelerinde p53 aracılığı ile apoptozu indükleyici etkisinin gösterilmesine rağmen, apoptoz gerçekleşmesinde rol oynayan kaspazların aktivasyonlarını engelleyerek apoptozu engellediği de bildirilmiştir (Wang ve ark. 2003). NO'nin çok yüksek konsantrasyonlarda endotel hücreleri, düz kas hücreleri, hepatositler ve fibroblastlar gibi çok farklı hücre tiplerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu ve poliaminlerin sentezinde görevli ornitin dekarboksilaz enzimini inhibe ederek hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Stadler ve ark. 1991). Nitrik oksit aynı zamanda nörotransmitter gibi hareket eden diffüzyon özelliği olan moleküldür. Etkisini, nörotransmitterlerden farklı olarak, postsinaptik membrandaki spesifik reseptörlere bağlanıp, hem pre hem de postsinaptik elementlerin diffüzyonunu artırarak hareketlerini sağlayarak gerçekleştirir.

Akciğerlerde Gram (-) bakterilerin hücre duvarı dış yüzeyinde bulunan ve endotoksenden sorumlu komponenti LPS, proenflamatuar sitokinlerden TNF- α ve IFN- γ ekspresyonlarında uyarıma neden olarak yangı oluşturur (Pechkovsky ve ark. 2000). Beraprost gibi prostasiklin analogları NF- κ B uyarımını baskılayarak proenflamatuar sitokinlerin gen ekspresyonunu baskılamaktadır (Şekil 2.11) (Ohta ve ark. 2005).



Şekil 2.11. LPS'in proenflamatuar sitokin sentezindeki hücre sinyal iletim yolu

2.8. Prostatiklinlerin Apoptoz Üzerine etkileri

Apoptoz (programlı hücre ölümü), istenmeyen, hasarlı ve hastalıklı hücrelerin ortadan kaldırılmasını düzenleyen bir savunma mekanizmasıdır. Bu nedenle fizyolojik ve patolojik süreçlerde oldukça önemlidir (Mohan ve ark. 2009). Kaspazlar apoptozun başlatıcısı ve sonlandırıcısı olarak bu mekanizmada merkezi bir rol üstlenmektedir. Kaspazların aktive olabilmesi için üç mekanizma vardır. Bunlardan ilki ekstrinsik yolak ikincisi intrinsik (mitokondriyal) yolaklardır (Schneider ve Tschopp, 2000). İntrinsik yolağın tetikleyicileri ise oksidatif stres, serbest radikaller gibi uyarıcılardır. Bu yolak sitokrom-c gibi proapoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınımı ve mitokondriyal membran potansiyelinin (MMP) azalması ve yetersiz ATP üretimi ile ilişkilidir (Daniel ve Korsmayer, 2004; Hwang ve Yen 2008). Sitokrom-c nin salınımı apoptoz proteaz aktive edici faktör (APAF-1) ve kaspaz 9'un aktif haliyle bir araya gelerek kaspaz 3'ü aktive eder ve apoptoz şekillenir (Kroemer ve ark. 2007).

Lipopolisakkarid, intrinsik apoptotik yolağı kaspaz-3 ile uyarır, ancak prostatiklin ve analogları kaspaz-3 ekspresyonlarını baskılayarak antiapoptotik etkinlik gösterirler (Chen ve ark. 2009).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Araştırmada insan alveoler bazal epitelyal hücre hattı (A549) kullanıldı. Skuamoz tip görünüşe sahip akciğer alveollerini kaplayan bu hücreler; su ve elektrolitler gibi maddelerin difüzyonundan sorumlu olmakla birlikte sürfektan madde salınımıyla akciğer alveollerini ekstrinsik etkenlerden korumaktadır. Çalışmada kullanılan akciğer epitel hücreleri Dr. Mazella C. tarafından Paris, Fransa'dan temin edildi.

3.2. Hücre Pasajı

Alveoler hücreler, %10 oranında ısı ile inaktif edilmiş fetal sığır serumu (FCS-Sigma) ve 100 IU/ml penisilin/streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besi medyumunda (tam besi yeri) 37 °C, %5 CO₂ ve %95 hava bulunduran steril etüvde inkübe edildi. Hücrelerin çoğaltılması için yaklaşık 1x10⁶/ml sayıda hücre 20 ml medyum bulunan 75cm² steril flaslara eklenerek üç günde bir medyum değiştirilmek koşuluyla inkübasyona bırakıldı. 3-4 gün süreyle hücre üremesi yeterli yoğunluğa ulaştığında 1/3 oranında pasajlandı. Çalışma grupları oluşturulurken flask tabanına yapışan hücreler 1-2 ml/75 cm² flask % 0,025 tripsin/EDTA kullanılarak kaldırıldı, toplanarak 400 g ve oda ısısında 5 d süreyle santrifüj edildi. Süpernatant kısım atılarak dipte kalan hücre peleti 1 ml taze komple medyum ile kaldırılarak homojen olması sağlandı. Hücre sayımı hemositometrede tripan mavisini ile belirlenerek deneme grupları için ihtiyaç duyulan hücre sayısı flaslara eklendi.

3.3. Denemede kullanılan kimyasallar

3.3.1. Lipopolisakkarid (LPS)

Araştırmada A549 hücrelerinde oksidatif stres ve yangı oluşturmak amacıyla LPS 0,1-1-5 µg/ml konsantrasyon aralığında uygulandı. 24 s'lik inkübasyon sonrası, 1 µg/ml konsantrasyonunun çalışma için uygun olduğu yapılan viabilite kontrolleri sonucu tespit edildi. Yapılan birçok çalışmada LPS'in bu konsantrasyonunun patolojik düzeyde sitokin

salınımını uyardığı rapor edilmiştir. LPS uyarımı ile oluşan TNF- α , IL-1 β ve IL-6 sitokinlerinin salınımı enflamasyonda önemlidir (Yeh ve ark. 2011).

3.3.2. Beraprost Sodyum (BPS)

Araştırmada kullanılacak uygun BPS düzeyi yapılan denemeler sonucu 24 s inkübasyon uygulamalarında 10 μ M olarak belirlendi. Stok çözelti DMSO'da 10 μ M konsantrasyonla çözdürülerek hazırlandı. Çalışma süresince 10 μ M konsantrasyonu hücre medyumuna uygulanılarak inkübasyon süreleri başlatıldı.

3.4. MTT Viabilite Testi

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) kullanılarak bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlıklı hücrelerde mitokondrial redüktazlar tarafından MTT'nin tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon mitokondrial bir enzim olan süksinat dehidrogenaz aktivitesine bağlıdır (McGahon ve ark. 1995). Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Çalışmada A549 hücrelerine 24 s farklı konsantrasyonlarla LPS ve BPS eklenerek hücre canlılık oranları araştırıldı.

3.5. Homojenat hazırlama

İnkübasyon sonrası hücreleri yapışmış oldukları 25 cm²'lik flask tabanından kaldırmak için 300 μ l tripsin/EDTA (% 0,25) (Sigma) eklenerek 1-2 d beklendi. Daha sonra flasklar üzerinde hafif çırpma hareketleriyle hücrelerin kalkmaları sağlandı. Bu hücreler pipet ile toplanarak ependorf tüplere aktarıldı. Daha sonra oda ısısında 5 d süreyle 400 g devirde santrifüj edilerek hücre peletleri elde edildi. Homojenatlar PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra tekrar santrifüj edildi ve üzerlerine içerisinde %1 triton X-100 (Merck), 50 mM HEPES pH 7.2, 10 mM EDTA, 100 mM NaH₂PO₄-2H₂O ve % 8 oranında proteaz inhibitor kokteyli (aprotinin, fenilmetansülfonilflorid (PMSF), leupeptin, sodyum florid

(Merck) bulunan lizis bafır eklendi. Deterjanla çözünmeyen hücresel proteinler 12 000 g, 4°C'de 10 d süreyle santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Süpernatantların protein düzeyleri Bradford metodu ile ölçüldü.

3.6. Nitrik Oksit (NO) Düzeylerinin Belirlenmesi

Akciğer hücrelerinin bulunduğu flasklardan farklı deneme gruplarının 24 s inkubasyon sonucu elde edilen medyumlardaki NO seviyelerinin ölçümünde, bileşiğin yarılanma ömrünün çok kısa olması nedeni ile nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) düzeylerinin saptanmasıyla hesaplanmaktadır. Bu amaçla Kostas ve Wakid (1990) tarafından geliştirilen Griess metodu uygulama için seçildi. Bu metod takip edilerek; kadmiyum granülleri (2-25 g), süzgeç kağıdından süzdürülerek üç kez deiyonize su ile yıkandı. Daha sonra granüller glisin-NaOH tampon II (15 g/L, pH=9,7) içinde 5 mmol/L CuSO_4 solüsyonunda 5 d karıştırılarak aktive edildi. Her deneme grubundan 300 µl örnek alınarak, üzerlerine 250 µl (75 mmol/L) ZnSO_4 ve 350 µl 55 mmol/L NaOH eklendi. Bu karışım 10000xg rotor hızında 4 °C'de 3 d santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlardan 750 µl pipetlenerek farklı ependorf tüplere alındı ve üzerlerine 250 µl glisin tampon I (45 g/L pH: 9,7) ilave edildi. Bu tüplere daha önce anlatıldığı gibi aktifleştirilen kadmiyum granüllerinden bir pens yardımıyla her tüpe bir granül olacak şekilde eklendi. Bu şekilde 10 d karıştırıldıktan sonra hazır hale gelen örneklerden 300 µl alınıp üzerlerine 1125 µl ayraç 1 (N-naftil etilen diamin) ve 1200 µl ayraç 2 (Sülfanilik asit, 3 mmol/L HCL) eklenerek; köre karşı 546 nm ışık dalga boyunda absorbans ölçümleri yapıldı. Elde edilen veriler µmol/L cinsinden hesaplanıp kaydedildi.

3.7. Glutatyon (GSH) Analizi

İndirgenmiş glutatyon (GSH) düzeylerinin ölçümü, Sedlak ve Lindsay (1968) tarafından geliştirilen metod takip edilerek yapıldı. Bu yöntemin prensibi, reaksiyon ortamına ilave edilen 5,5-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB)'in ortamda bulunan sülfidril grupları tarafından indirgenmesi sonucu, 1 mol sülfidriyle karşılık 1 mol 2-nitro-5-

merkaptobenzoik asit oluşumuna dayanmaktadır. Özetle metodta şu aşamalar takip edildi. Elde edilen süpernatantlardan 250 µl alınıp aynı miktarda % 10'luk triklor asetik asit (TCAA) ile karıştırılarak 8600 rpm rotor hızında 15 d santrifüj edildi. Deproteinize edilen örnekler 250 µl alınıp temiz tüplere aktarılarak üzerlerine 2 ml 0.3 M'lık Na₂HPO₄ ilave edildi. Bu karışımlara 250 µl DTNB eklenerek vorteks yardımıyla tam olarak karışımları sağlandıktan sonra 5 d oda ısısında bekletildi. Sonrasında ise 410 nm ışık dalga boyunda spektrofotometrede distile suya karşı değerler okunarak kaydedildi.

3.8. Katalaz (CAT) Aktivitesi Analizi

Farklı test gruplarından 24 s inkübasyon sonucu elde edilen hücre homojenatlarında katalaz aktivite tayini Luck (1965) tarafından geliştirilen metod kullanılarak yapıldı. Bu yöntemin prensibi H₂O₂'in ışık spektrumunun ultraviyole dalga boyunun azalmasıyla artan bir absorbans vermesine dayanır. Uygun bir tampon içinde (PBS) bulunan H₂O₂'nin örnekte bulunan katalaz etkisiyle yıkılması sonucu 240 nm absorbansta azalma görülür. Bu azalış hızı katalaz aktivitesi ile doğru orantılı olarak kabul edilir.

Fosfat tamponu (1/15 mmol/L; pH=7) için 3.522 g KH₂PO₄ ve 14.61 g Na₂HPO₄ distile suda çözdürüldü ve 1 L'ye tamamlanarak pH 7'ye ayarlandı. Fosfat tamponunda H₂O₂ çözeltisi (10 mM), % 30'luk H₂O₂ çözeltisinden 0.16 ml alınarak daha önce hazırlanmış olan fosfat tamponunun 100 ml'sinde seyreltilti. Her örneğin analizinden önce örnekte bulunabilecek maddelerin neden olabileceği absorbans yükselmesi saptamak ve sadece örnekten kaynaklı farkın elde edilmesi amacıyla her örneğin kör deney tüpleri hazırlandı. Bunun için quartz küvete 2.95 ml fosfat tamponu üzerine 50 µl numune eklendi. Spektrofotometre her örneğin kendisine ait kör deney olarak kabul edilen bu küvete göre sıfırlandı. Test işaretli quartz küvetlere ise 2.95 ml fosfat tampon içinde hazırlanmış H₂O₂ çözeltisi kondu ve üzerlerine 50 µl örnek eklenerek homojen olması için küvetler alt-üst edilerek spektrofotometreye yerleştirildi. 240 nm ışık dalga boyunda 30 s içinde absorbanslarda meydana gelen azalmalar takip edilerek "k" hız sabiti elde edildi. Okunan değerler µmol/mg protein cinsinden hesaplanarak kaydedildi.

3.9. Malondialdehit (MDA) Analizi

Aerobik şartlarda pH 3,4'te tiobarbutürikasit (TBA) ile örneklerin 95 °C'de inkübasyonu sonucu, eğer lipid peroperoksidasyonu varsa sekonder bir ürün olarak oluşan MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturur. Bu kompleks spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçülür (Ohkawa ve ark. 1979). Elde edilen hücre homejenatından 10 ml'lik cam tüplere 0,5 ml ilave edildi. Üzerine 2,5 ml TCAA ve 1 ml TBA eklendi (kör tüpe hücre homejenatı yerine 0,5 ml TCAA eklendi). Kaynayan su banyosunda 30 d inkübe edildikten sonra hızlı bir şekilde buz ile soğutuldu ve üzerlerine 4'er ml n-bütenol eklendi. Daha sonra tüpler 3000 rpm'de 10 d santrifüj edildi. n-bütenol tabakası spektrofotometrenin 535 nm ışık dalga boyunda okundu.

3.10. Total Antioksidan Seviye (TAS) Analizi

Ferro-dianisidine kompleksi, hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH⁻ radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü düşük pH'da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidil radikallerini meydana getirirler. Bu radikaller ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumunu arttırmaktadır (Benzie ve Strain 1996). TAS düzeyleri yukarıda belirtilen prensiplere dayanan ticari kitler (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak analiz edildi.

3.11. RNA İzolasyonu

İnkübasyon sonucu RNA izolasyonunda deney gruplarının bulunduğu 75 cm²'lik flasklardaki medyumların atıldı ve hücreler bir kazıyıcı yardımı ile kazındıktan sonra ependorf tüplere alındı. Üzerlerine 1 ml RNA izolasyon reaktifi (Trizol Reagent-SİGMA) eklendi ve vorteksle karıştırıldı. Tüpler oda ısısında 5 d bekletildikten sonra 12000xg, 4° C'de 10 d santrifüj edildi. Süpernatantlar temiz tüplere aktararak oda ısısında 5 d bekletildi ve üzerlerine 0,2 ml kloroform ilave edilip, 15 s süreyle vortekste karıştırıldı. Oda ısısında 15 d bekletildikten sonra örnekler 12000xg, 4 °C'de 15 d santrifüj edildi. Santrifüj sonrası meydana gelen üç fazdan üstteki renksiz faz (RNA içerir) yeni ependorf tüplere alınıp, üzerlerine 0,5 ml izopropanol ilave edildi. Tüpler oda ısısında 5-10 d süreyle

tutulduktan sonra 12000xg 10 d süreyle santrifüj edilerek peletlerin oluşması sağlandı. Peletler üzerindeki süpernatantlar alınıp pelet halindeki RNA'lar % 75'lik etil alkol ile yıkandı. Vorteks edilip, 7500xg'de 5 d süreyle santrifüj edilip, süpernatantlar atıldıktan sonra RNA'lar 10-15 d süreyle hava akımında kurutuldu. Her tüpteki RNA peletleri üzerine 25-30 µl DEPC su (diethylpirokarbonatlı) ilave edilip, birkaç kez al-ver muamelesiyle pipetlenerek çözünmeleri sağlandı. Total RNA miktarları ve saflıkları spektrofotometrede (OD₂₆₀ ve OD₂₈₀ nm'de) belirlendi. RNA/DNA oranları 1.7-2.0 aralığındaki olan örneklerin saflığı yüksek kabul edilip cDNA (tamamlayıcı DNA) sentezinde kullanıldı.

3.12. cDNA Sentezi ve Reverz Transkripsiyon (RT-PCR)

Elde edilen total RNA'lardan cDNA sentezi (Fermentas) eldesinde; otoklavlanmış 0.2 ml ependorf tüplere her bir örnek tüpünden 1-2 µg total RNA'yı sağlayacak miktarı alınıp eklendikten sonra üzerlerine 1 µl oligo (dT 18) primer eklendi. Daha sonra bu tüplerdeki hacim DEPC su ile 12 µl'ye tamamlandı. Karışım 3-5 s 13000 g'de santrifüj edilip termal saykırda (Toshiba) 70° C'de 5 d reaksiyona tabi tutuldu. Süre sonunda karışım buz içinde soğutulup, santrifüj edilerek tüpün dibinde toplanması sağlandı. Tüpün üzerine 5x reaksiyon tamponu, ribolock ribonülease inhibitör (20 U/µl), 10 µl dNTP karışımı konulup karıştırıldı ve kısa süreli santrifüj edildi ve termal saykırda 37° C'de 5 d tutuldu. Daha sonra tüpler buz içerisine alınarak üzerlerine 1 µl revertAid m-multi-v reverz transkriptaz ilave edildi. Termal saykırda 42° C'de 60 d süre ile RNA'lar cDNA' lara dönüştürüldü. cDNA sentezinin tamamlanması için tüpler 70°C'de 10 d inkübe edildikten sonra PCR kullanımına hazır hale getirildi ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.13. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi, genetik materyaller (DNA ve RNA) üzerinde seçilmiş bir bölgenin *in vitro* şartlarda ilgili gen bölgelerine spesifik oligonükleotid primerler ve *Taq* polimeraz enzimi kullanılarak bir otomatik termal saykırda çoğaltılması esasına dayanan metottur. PCR reaksiyonunda temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır. Birincisi denatürasyon (DNA çift zincirinin açılması), ikincisi primerlerin spesifik oldukları gen bölgesine yapışması (annealing) ve üçüncüsü ise zincir uzaması (extention)'dır. Spesifik olmayan yapışmaların olmaması için döngü sayısı genellikle 30-40 olacak şekilde sınırlandırılır. Kısaca PCR reaksiyonu için test tüpler şu şekilde hazırlandı. Örneklerden elde edilen cDNA'lardan 1 µl alınarak, üzerlerine 0.5 U DNA *Taq* polimeraz içeren Syber Green PCR mastermiks (Fermentas) ve mRNA üzerinde çoğaltılmak istenen genlere spesifik bir çift primer (oligonükleotid) ilave edildi.

Reaksiyonda 100 ng düzeyinde TNF- α , IFN- γ , COX-2, IL-1 β ve Kas-3 spesifik primerleri literatürde belirtilen baz dizgeleri sentezi yaptırılarak kullanıldı (Çizelge 3.1). DNA amplifikasyonu PCR yöntemi ile gerçek zamanlı PCR sistemi (Real-Time PCR, Bioer) kullanılarak yapıldı. Amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait kopya eşiği (Ct) değerleri karşılaştırılarak, hedef genlerin mRNA transkripsiyon düzeylerinin nisbi değişimleri 2^{-DDCt} metodu ile hesaplandı (Paffl, 2001). Bu hesaplamada; “ $DDCt = (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\beta\text{-actin}})_{\text{denek grubu}} - (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\beta\text{-actin}})_{\text{kontrol grubu}}$ ” formülü uygulandı; hesaplanan değer her bir gen için 2^{-DDCt} formülüne uygulanarak mRNA transkripsiyon düzeyi misli olarak artış, ya da azalış şeklinde belirlendi. Her örnek için kontrol olarak kabul edilen β -actin geni (housekeeping gen) düzeltme için kullanılarak transkripsiyon seviyesi istenilen genlerdeki transkripsiyon seviyeleri hesaplanarak kaydedildi. Real Time PCR sisteminde Syber Green (Fermentas) boyası çift iplikli DNA parçasına bağlanarak elektriksel uyarı sinyali ile birlikte floresan ışımaya yapar ve bu ışımaya sistemin lazer dedektörü tarafından algılanarak bilgisayar ortamında grafik formatına çevrilir. Ölçülen floresans şiddeti PCR ürününün miktarı ile doğru orantılıdır. Daha sonra gruplar arasındaki farklar misli (katı) cinsinden tablolarda verildi.

3.14. İstatistiksel Metod

Araştırmada elde edilen veriler, SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Sciences) programında, One-way ANOVA varyans analizi yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar Duncan testi ile tespit edildi. $p < 0.001$ değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Değerler ortalama \pm standart hata (S.E) şeklinde kaydedildi.

Hedef Gen	Primer sekansları		PCR programları
TNF-α	Geri primer İleri primer	5' CCT TGG TCT GGT AGG AGA CG 3' 5' CAG AGG GAA CAG TTC CCC AG 3'	Başlangıç 95 ⁰ C 10d 95 ⁰ C 45sn-60 ⁰ C 1d 72 ⁰ C 45sn (35 siklus)
IFN-γ	Geri primer İleri primer	5' GGG TTG GGG GTG TGG TGA TGT 3' 5' TCC GAG GCA AAC AGC ACA TTC A 3'	Başlangıç 95 ⁰ C 10d 95 ⁰ C 15sn-58 ⁰ C 1d 72 ⁰ C 30sn (35 siklus)
Kaspaz-3	Geri primer İleri primer	5' CAC AAA AGA ACT GGA TGA AC 3' 5' ACA TGG CGT GTC ATA AAA TAC 3'	Başlangıç 95 ⁰ C 10d 95 ⁰ C 45sn-60 ⁰ C 1d 72 ⁰ C 45sn (40 siklus)
IL- 1β	Geri primer İleri primer	5' GGT CAT TCT CCT GGA AGG TCT GTG GGC 3' 5' GCA AGC GCT TCA GGC AGG CGG CG 3'	Başlangıç 95 ⁰ C 10d 95 ⁰ C 45sn-55 ⁰ C 1d 72 ⁰ C 45sn (35 siklus)
COX-2	Geri primer İleri primer	5' TCA TCA GGC ACA GGA GGA AG 3' 5' TGA AAC CCA CTC CAA ACA CAC AG 3'	Başlangıç 95 ⁰ C 10d 95 ⁰ C 45sn-54 ⁰ C 1d 72 ⁰ C 45sn (35 siklus)
β-actin	Geri primer İleri primer	5' CGT GGC CAT CTC TTG CTC GAA G 3' 5' CAT CGT CAC CAA CTG GGA CGA C 3'	Başlangıç 95 ⁰ C 10d 95 ⁰ C 45sn-55 ⁰ C 1d 72 ⁰ C 45sn (35 siklus)

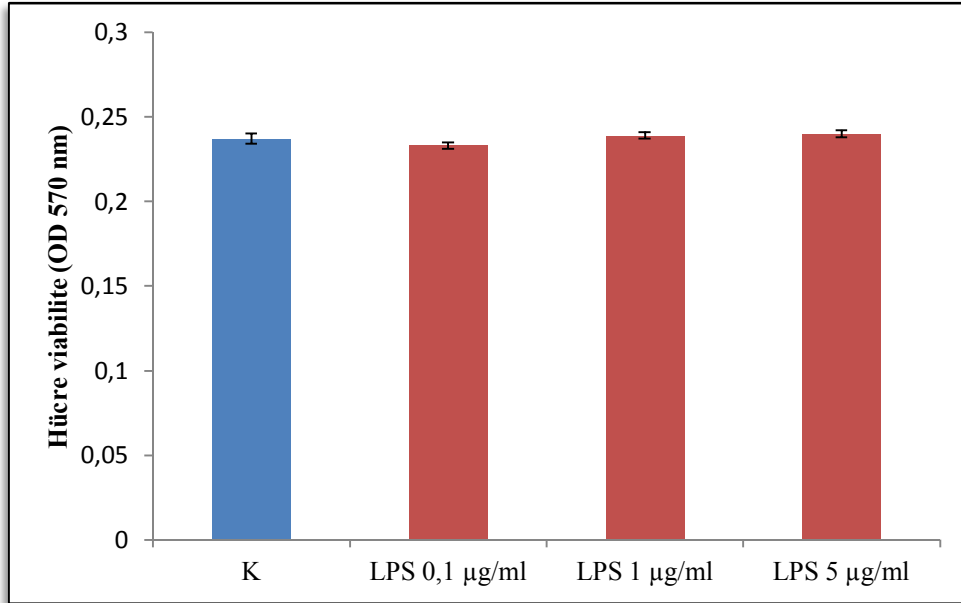
Çizelge 3.1. Gerçek zamanlı PCR analizlerinde kullanılan primer baz dizgeleri ve PCR koşulları

4. BULGULAR

4.1. Spektrofotometrik Analizler

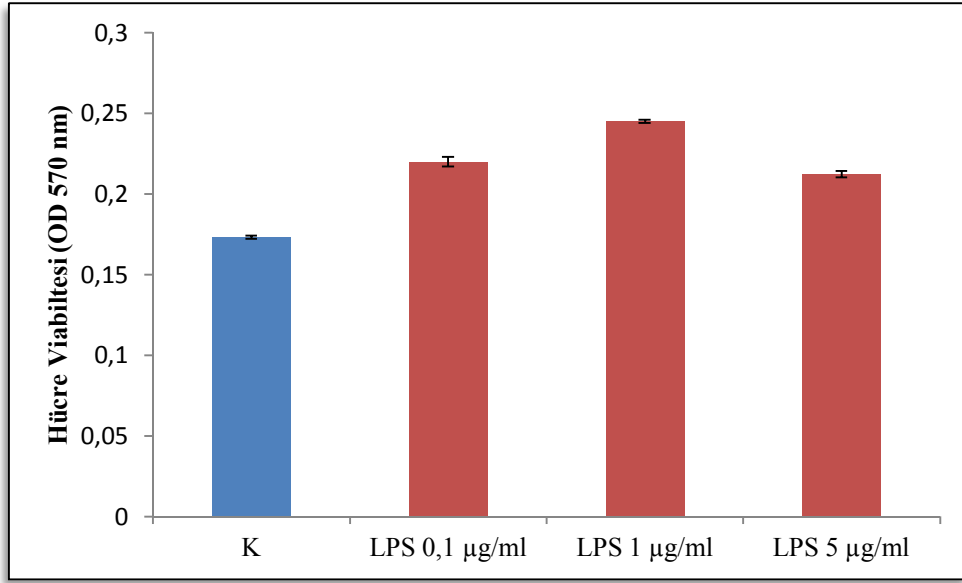
4.1.2. Farklı Konsantrasyonlar ve Sürelerdeki LPS'in Hücre Viabilitesi Üzerine Etkisi

Bir gün önceden 24 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen akciğer epitel hücreleri (50×10^3) lipopolisakkaridin 0.1-1 ve 5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonları 3, 24 ve 48 s süresince inkübasyona tabi tutuldu. Süre sonunda hücre viabiliteyi MTT yöntemiyle analiz edildi.



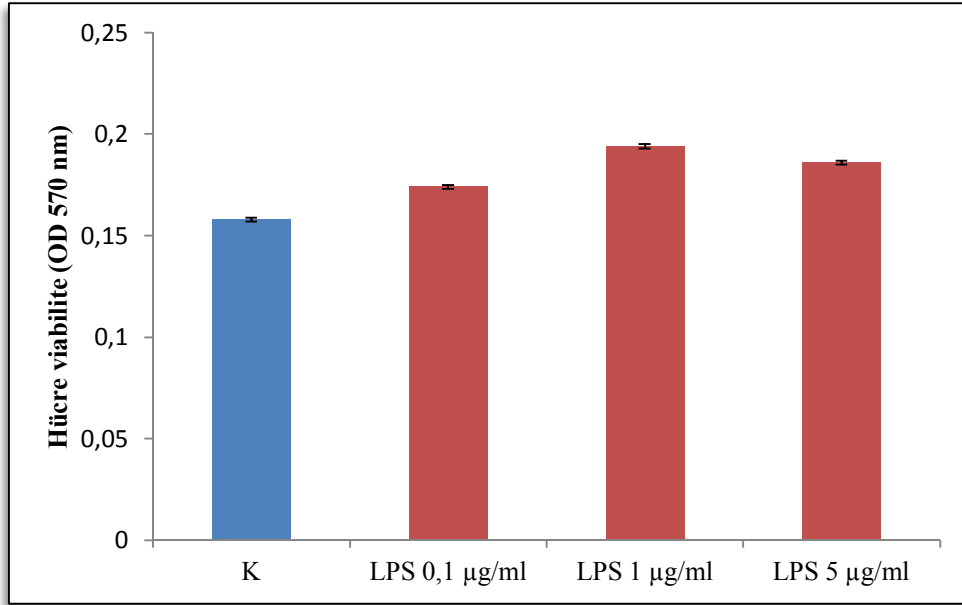
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda LPS uygulamasının hücre viabilitesi üzerine etkileri (3 s)

Üç saatlik inkübasyondan sonra yapılan MTT analizinde, kontrol grubuna ($0,23 \pm 0,003$) göre LPS'in 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ($0,23 \pm 0,002$), 1 $\mu\text{g/ml}$ ($0,24 \pm 0,002$) ve 5 $\mu\text{g/ml}$ ($0,24 \pm 0,002$) konsantrasyonları uygulanan gruplardaki canlılık oranlarında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edildi ($p > 0,05$ -Şekil4.1).



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda LPS uygulamasının hücre viabilitesi üzerine etkileri (24 s)

Yirmidört saatlik MTT testinde, kontrol grubuna ($0,17 \pm 0,001$) göre LPS'in $0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($0,22 \pm 0,003$), $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($0,25 \pm 0,001$) ve $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($0,21 \pm 0,002$) konsantrasyonları uygulanan gruplardaki canlılık oranlarında artış olduğu saptandı ($p < 0,001$). Gruplar arasında LPS'in $0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($0,22 \pm 0,003$) ve $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ dozunun kullanıldığı grupta ($0,21 \pm 0,002$) farkların olduğu, ancak önem düzeyinin düşük olduğu belirlendi ($p < 0,05$ - Şekil 4.2).

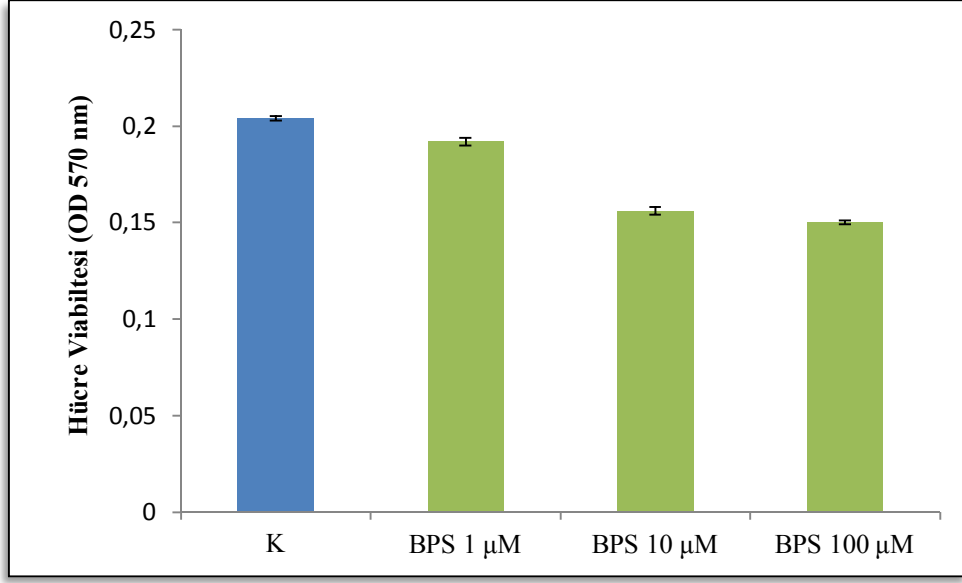


Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda LPS uygulamasının hücre viabilitesi üzerine etkileri (48 s)

Lipopolissakkaritin farklı konsantrasyonlarının 48 s uygulanması sonunda yapılan MTT testinde, kontrol grubuna ($0,16 \pm 0,001$) göre LPS'in 1 $\mu\text{g/ml}$ ($0,20 \pm 0,001$) ve 5 $\mu\text{g/ml}$ ($0,19 \pm 0,002$) konsantrasyonlarının eklendiği gruplarda önemli düzeyde artış olduğu saptandı ($p < 0,001$ - Şekil 4.3). Gruplar arasında LPS'in 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ($0,17 \pm 0,003$) grubu ve kontrol grubu arasında ($0,19 \pm 0,002$) daha az anlamlı bir farkın olduğu tespit edildi ($p < 0,05$ - Şekil 4.3) .

4.1.3. Farklı Konsantrasyonlardaki BPS'in Hücre Viabilitesi Üzerine Etkisi

Bir gün önceden 24 kuyucuklu kültür kaplarında bulunan akciğer epitel hücreleri (50×10^3) beraprostun 1-10 ve 100 μM konsantrasyonları eklendi ve 24 s inkübasyona tabi tutuldu. Süre sonunda hücre canlılık oranları MTT yöntemiyle tespit edildi.

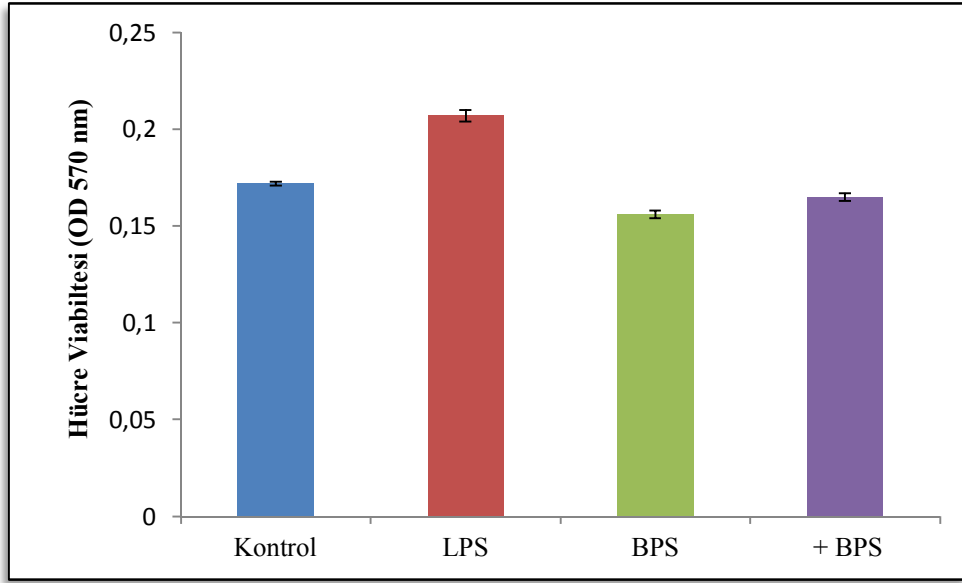


Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda BPS uygulamasının hücre viabilitesi üzerine etkileri (24 s)

Beraprostun farklı konsantrasyonlarının hücre viabilitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada, kontrol grubuna ($0,20 \pm 0,002$) göre BPS'in 10 μM ($0,16 \pm 0,006$) ve 100 μM ($0,15 \pm 0,005$) eklenen gruplarda anlamlı derecede azalırken ($p < 0,001$), 1 μM ($0,19 \pm 0,006$) dozun kullanıldığı grupta daha düşük düzeyde azalma olduğu saptandı ($p = 0,001$ - Şekil 4.4).

4.1.4. BPS ve LPS'in Hücre Viabilitesi Üzerine Etkileri

Akciğer hücrelerine BPS (10 μ M) verilerek 30 d süresince ön uygulamaya tabi tutulması sonrasında LPS (1 μ g/ml) uygulanarak 24 s inkübasyona tabi tutuldu. Süre sonunda MTT yöntemi ile hücre viabiliteleeri kontroller yapıldı.

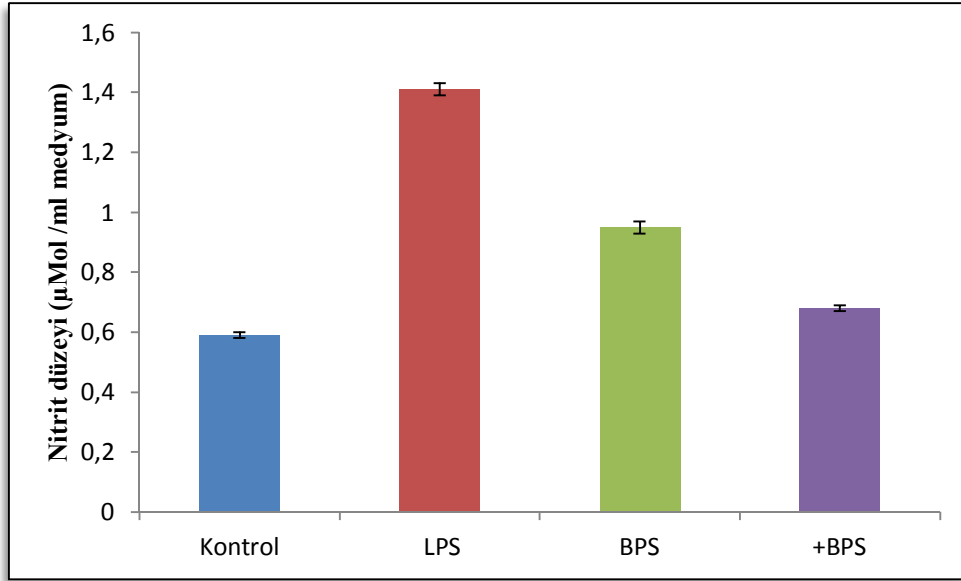


Şekil 4.5. LPS ve BPS uygulamasının hücre viabilitesi üzerine etkileri (24 h)

İnkübasyon süresi sonunda hücre viabilitesinin LPS uygulanan grupta ($0,21 \pm 0,003$) kontrol grubuna ($0,17 \pm 0,003$) göre anlamlı derecede arttığı ($p < 0,001$), sadece BPS eklenen grupta ($0,16 \pm 0,005$) ise kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azaldığı tespit edildi ($p < 0,05$). BPS sonrası LPS eklenen grupta ise ($0,16 \pm 0,002$) bu farkın anlamlı derecede azaldığı saptandı ($p < 0,05$ -Şekil 4.5). Kontrol, LPS: 1 μ g/ml Lipopolisakkarid, BPS: Beraprost Sodyum 10 μ M, +BPS: 1 μ g/ml LPS+10 μ M BPS.

4.1.5. LPS ve BPS Uygulamasının Nitrit Düzeyi Üzerine Etkileri

Akciğer epitel hücrelerine LPS uygulamasından 30 önce BPS ilave edildi ve kültür kaplarında 24 s süreyle inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda hücreleri besleyen medyumlar toplanarak nitrit düzeyi Griess yöntemiyle araştırıldı.

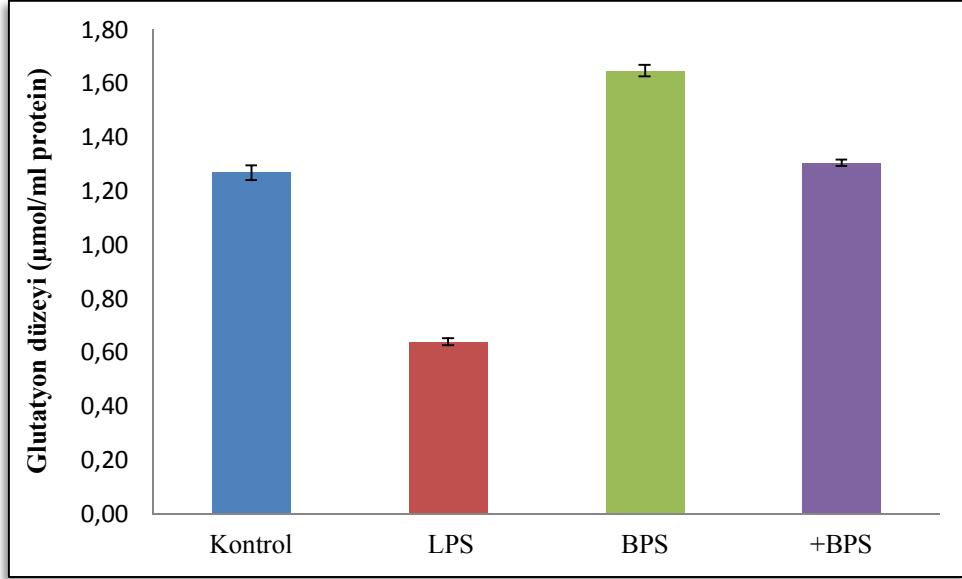


Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda LPS uygulamasının nitrik oksit üzerine etkileri

İnkübasyon süresi sonrasında nitrit düzeyi kontrol grubunda ($0,59 \pm 0,01$), LPS grubunda ($1,42 \pm 0,02$), BPS grubunda ($0,94 \pm 0,02$) ve +BPS grubunda ($0,67 \pm 0,01$) olarak tespit edildi. Elde edilen değerlere göre nitrit düzeyi kontrol grubuna göre LPS ve BPS gruplarında anlamlı derecede ($p < 0.001$ - Şekil 4.6) artarken, BPS sonrası LPS eklenen grupta ise bu artışın anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p < 0.05$ - Şekil 4.6). Kontrol, LPS: 1 µg/ml Lipopolisakkarid, +BPS: 1 µg/ml LPS+10µM BPS

4.1.6. LPS ve BPS Uygulamasının GSH Üretimi Üzerine Etkileri

Akciğer hücreleri bir gece önceden 25 cm²'lik flasklara (7x10⁶ hücre) ekildi. Sonraki günde hücreler kontrol, BSP, LPS ve BPS sonrası LPS eklenen gruplar olarak ayrılarak 24 s inkübasyona tabi tutuldu. Süre sonunda hücreler homojenize edildi ve GSH analizi yapıldı.

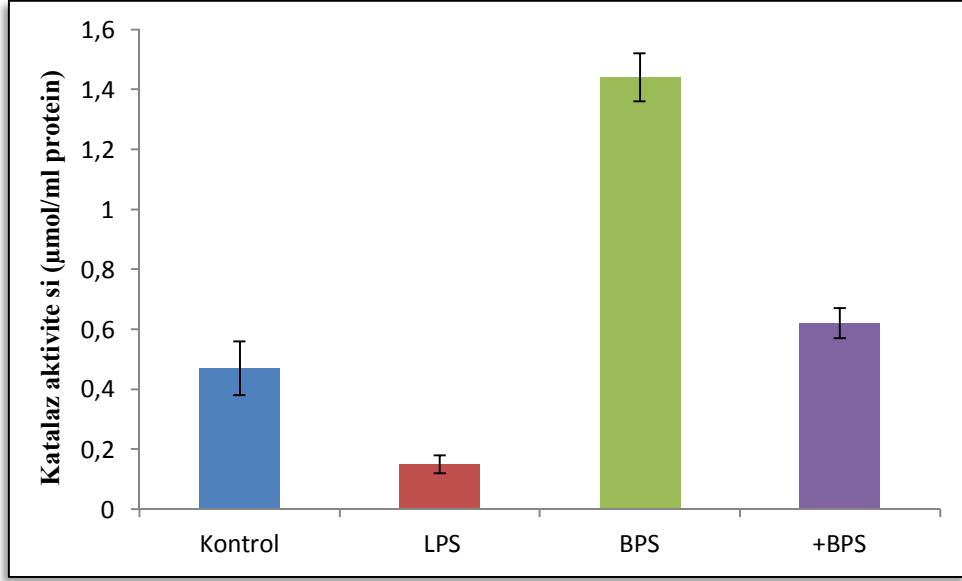


Şekil 4.7. Akciğer epitel hücrelerinde LPS ve BPS uygulamasının GSH üretimi üzerine etkisi (24 s)

Glutasyon seviyesi kontrol grubuna (1,27 ± 0,02) göre LPS (0,64 ± 0,01) grubunda anlamlı derecede azalırken (p<0.001- Şekil 4.7), BPS ön muamelesinden sonra LPS eklenen grupta (1,30 ± 0,03) bu olumsuz düzeyin anlamlı derecede iyileştirildiği tespit edildi (p<0.001- Şekil 4.7). Kontrol, LPS: 1 µg/ml Lipopolisakkarid, BPS: Beraprost Sodyum 10 µM, +BPS: 1 µg/ml LPS+10µM BPS

4.1.7. LPS ve BPS Uygulamasının Katalaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Alveoler hücrelerine BPS (10 μ M) 30 d süreyle ön uygulamasını takiben LPS eklenerek 24 s inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örneklerden elde edilen hücre homojenatlarında katalaz aktivitesi araştırıldı.

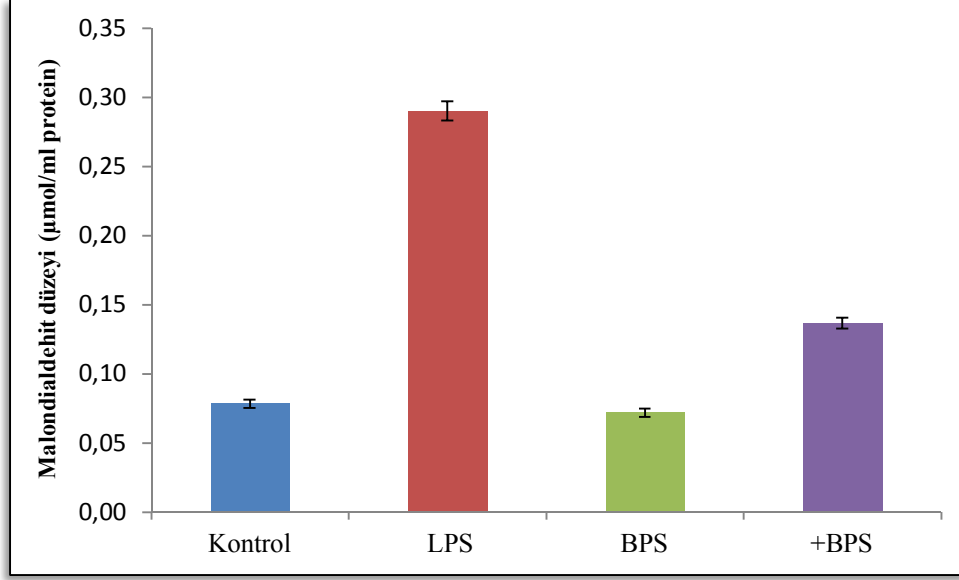


Şekil 4.8. LPS ile BPS uygulamasının katalaz enzim aktivitesi üzerine etkisi (24 h)

İnkübasyon süresi sonunda BPS eklenmiş grupta ($1,44 \pm 0,003$) kontrol grubuna ($0,48 \pm 0,009$) göre katalaz aktivitesinin anlamlı derecede arttığı, LPS eklenen hücrelerde ($0,15 \pm 0,007$) ise katalaz aktivitesi kontrol grubuna ($0,48 \pm 0,009$) göre önemli düzeyde azaldığı saptandı. Ayrıca BPS sonrası LPS grupta ise ($0,62 \pm 0,005$), LPS grubuna ($0,15 \pm 0,007$) göre katalaz aktivitesinin önemli düzeyde arttığı tespit edildi ($p < 0,001$ - Şekil 4.8). Kontrol, LPS: 1 μ g/ml Lipopolisakkarid, BPS: Beraprost Sodyum 10 μ M, +BPS: 1 μ g/ml LPS+10 μ M BPS

4.1.8. LPS ve BPS Uygulamasının MDA Düzeyi Üzerine Etkileri

Besi kaplarında (25 cm²'lik) bulunan A549 hücreleri, BPS (10 µM)'un 30 d süreyle uygulamasını takiben LPS eklenerek 24 s inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örneklerden elde edilen homojenatlarda MDA düzeyi araştırıldı.

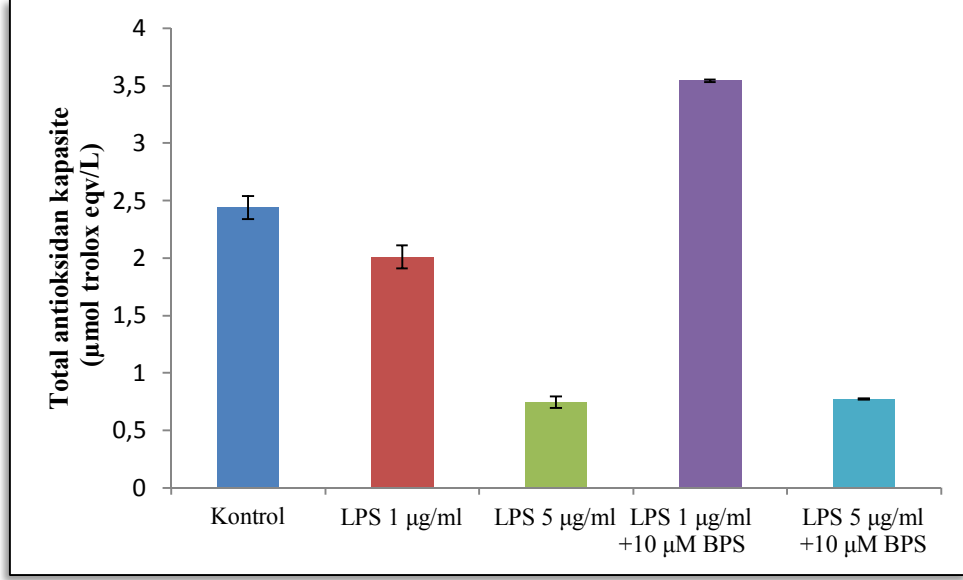


Şekil 4.9. LPS ve BPS uygulanmasının MDA üretimi üzerine etkisi (24 s)

Malondialdehid düzeyi LPS'li grupta ($0,29 \pm 0,007$) kontrol grubuna ($0,08 \pm 0,003$) göre anlamlı düzeyde artış gösterirken BPS sonrası LPS eklenen grupta ($0,14 \pm 0,004$) ise bu artışın anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p < 0,001$ - Şekil 4.9). Kontrol grubu ($0,08 \pm 0,003$) ile BPS grubu ($0,07 \pm 0,006$) arasında MDA düzeyi bakımından istatistiksel olarak farklılık olmadığı saptandı (Şekil 4.9). Kontrol, LPS: 1 µg/ml Lipopolisakkarid, BPS: Beraprost Sodyum 10 µM, +BPS: 1 µg/ml LPS+10µM BPS.

4.1.9. Total Antioksidan Kapasite (TAS) Üzerine LPS ve BPS Uygulamasının Etkileri

Alveoler hücrelerine BPS (10 μ M) 30 d süreyle ön uygulamasını takiben LPS eklenerek 24 s inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örneklerden elde edilen hücre homojenatlarında total antioksidan kapasite araştırıldı.

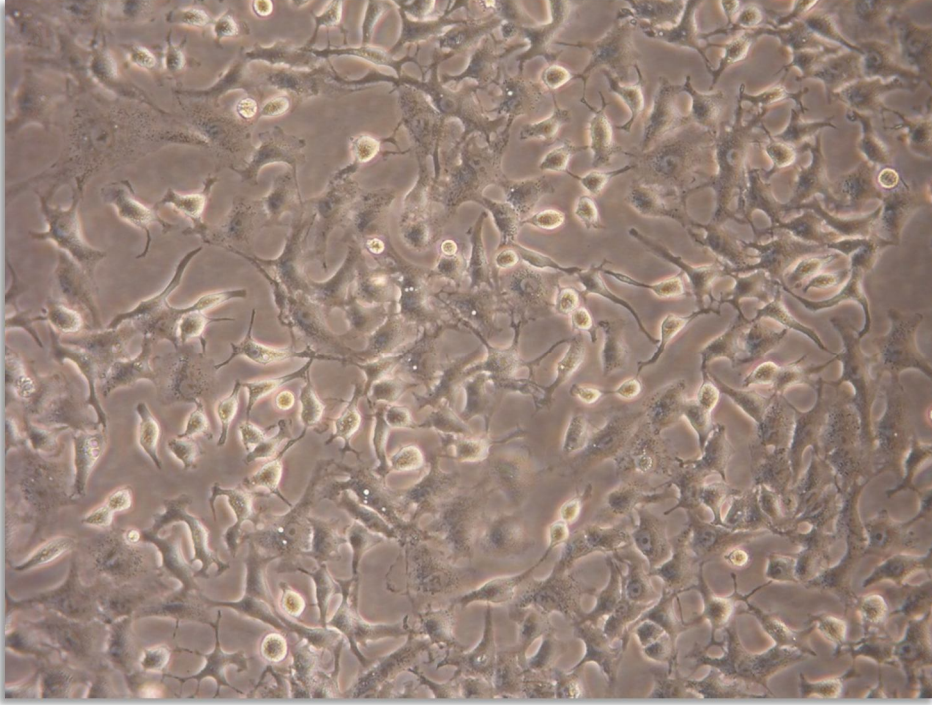


Şekil 4.10. LPS ve BPS uygulanmasının TAS üzerine etkisi (24 s)

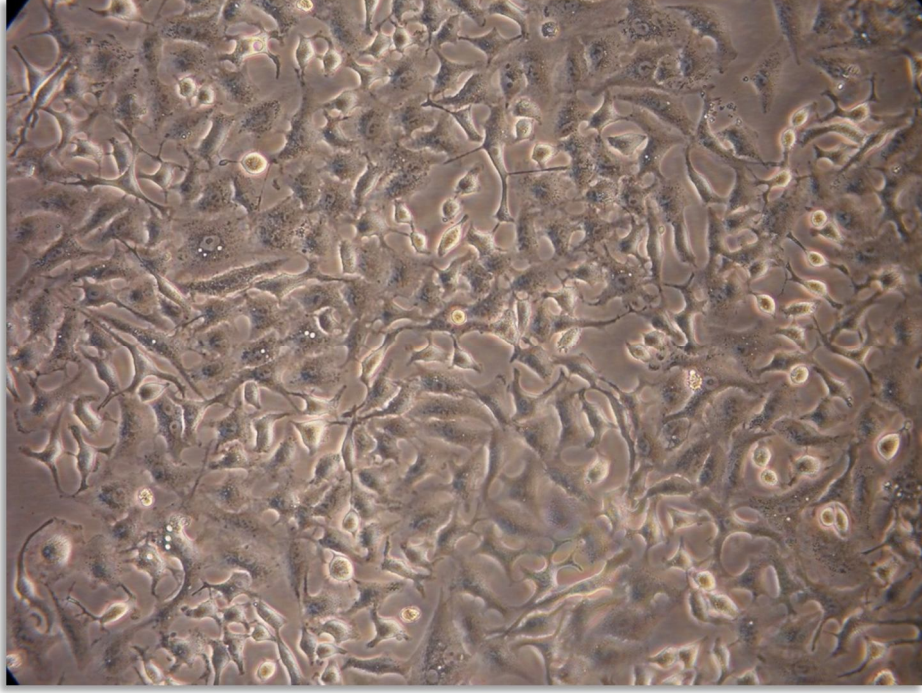
Total antioksidan kapasite düzeyi, LPS'in 1 μ g/ml ($2,01 \pm 0,01$) ve 5 μ g/ml ($0,74 \pm 0,05$) konsantrasyonlarının uygulandığı gruplarda kontrol grubuna ($2,44 \pm 0,01$) göre anlamlı derecede azaldığı ($p < 0,001$ - Şekil 4.10.), ancak BPS sonrası LPS eklenen grupta ise ($3,54 \pm 0,01$) önemli düzeyde arttığı tespit edildi ($p < 0,001$ - Şekil 4.10). Kontrol, LPS: 1 μ g/ml Lipopolisakkarid, BPS: Beraprost Sodyum 10 μ M, +BPS: 1 μ g/ml LPS+10 μ M BPS

4.2. LPS ve BPS'un Akciğer Epitel Hücrelerinin Morfolojisi Üzerine Etkileri

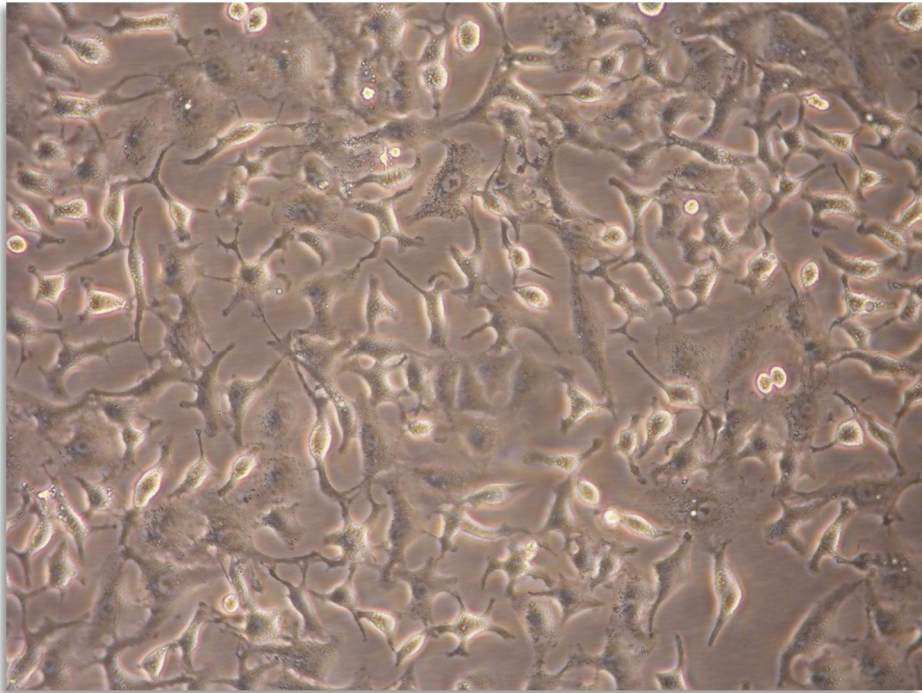
Bir gün önceden 25 cm²'lik flaslara ekilen A549 hücrelerine BPS'un (10 µM) 30 d uygulanmasını takiben LPS (1 µg/ml) eklenerek 24 s inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda elde edilen hücre örneklerinden invert mikroskobun 40X büyütme objektifi ile çekilen fotoğraflarda, hücre proliferasyonunun LPS grubunda kontrol grubuna göre artmış olduğu, BPS grubunda ise azaldığı tespit edildi. LPS ve BPS'un birlikte uygulandığı grupta ise kontrol grubuna yakın görünümde olduğu saptandı.



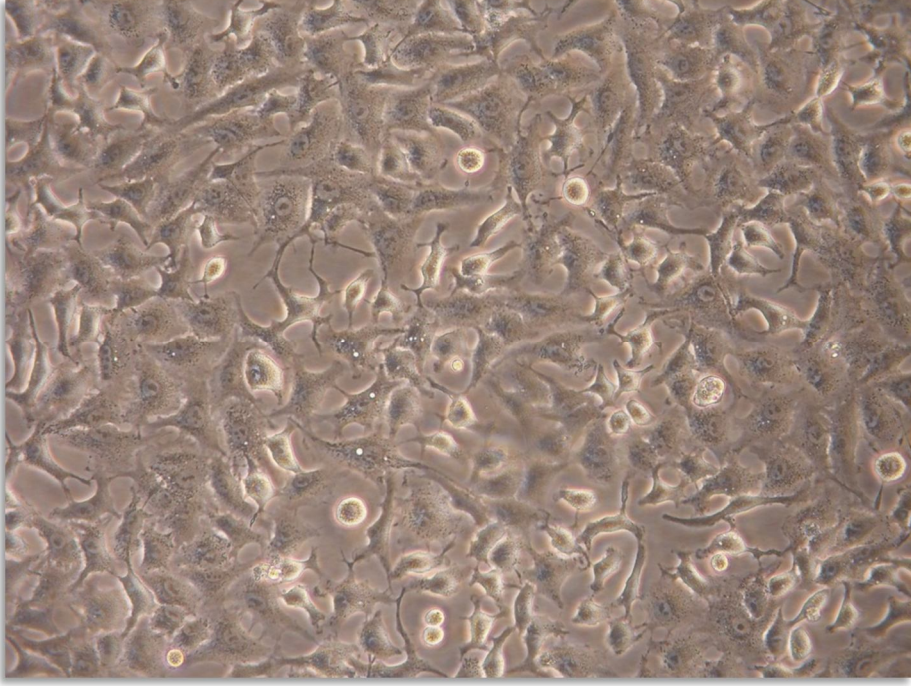
Şekil 4.11. Kontrol grubu akciğer epitel hücreleri (40x büyütme-24 s).



Şekil 4.12. LPS grubu akciğer epitel hücreleri (40x büyütme-24 s).



Şekil 4.13. BPS grubu akciğer epitel hücreleri (40x büyütme-24 s).



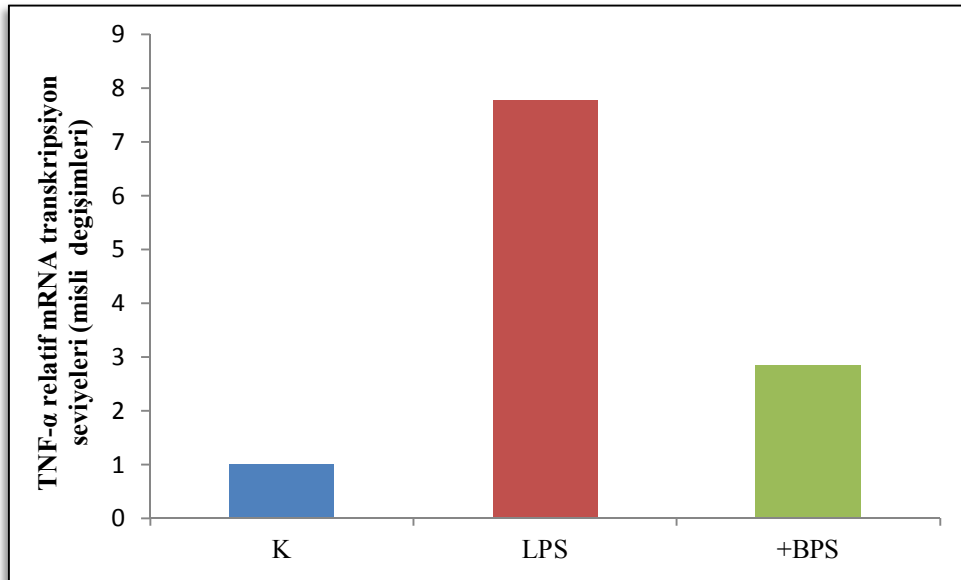
Şekil 4.14. LPS+BPS grubu akciğer epitel hücreleri (40x büyütme-24 s).

4.3. RT-PCR Sonuçları

Akciğer epitel hücreleri (75 cm² flasklarda) 30 d BPS uygulamasını takiben LPS eklendi ve 24 s inkübasyona tabi tutuldu. Süre sonunda elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezleri yapılarak belirli genlerin (TNF- α , IL-1 β , kaspaz-3, COX-2 ve IFN- γ) spesifik primerler kullanılarak mRNA transkripsiyon seviyeleri gerçek zamanlı PCR yöntemiyle araştırıldı.

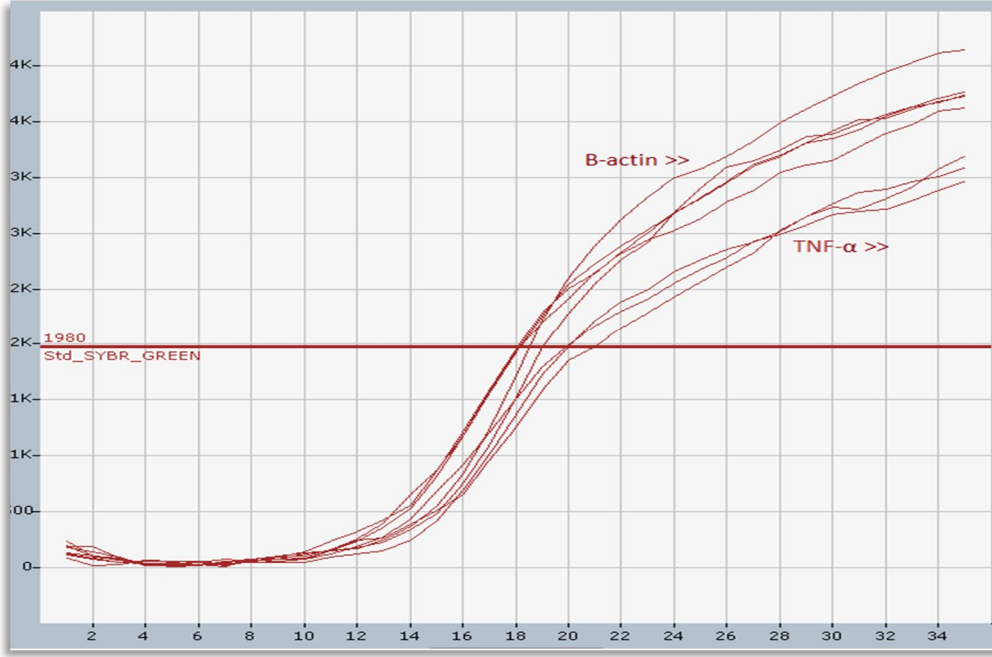
4.3.1. TNF- α mRNA Transkripsiyonu

Flasklara ekilen A549 hücre medyumlarına 10 μ M beraprost eklenerek, 30 d inkübasyona bırakıldı. Lipopolisakkaridin de eklenmesinin ardından 24 s inkübasyona tabi tutuldu. Süre sonunda elde edilen RNA örneklerinden yangı öncülü sitokinlerden TNF- α 'nın mRNA transkripsiyon düzeyi real time PCR yöntemiyle araştırıldı.



Şekil 4.15. TNF- α mRNA transkripsiyon düzeyleri (24 s).

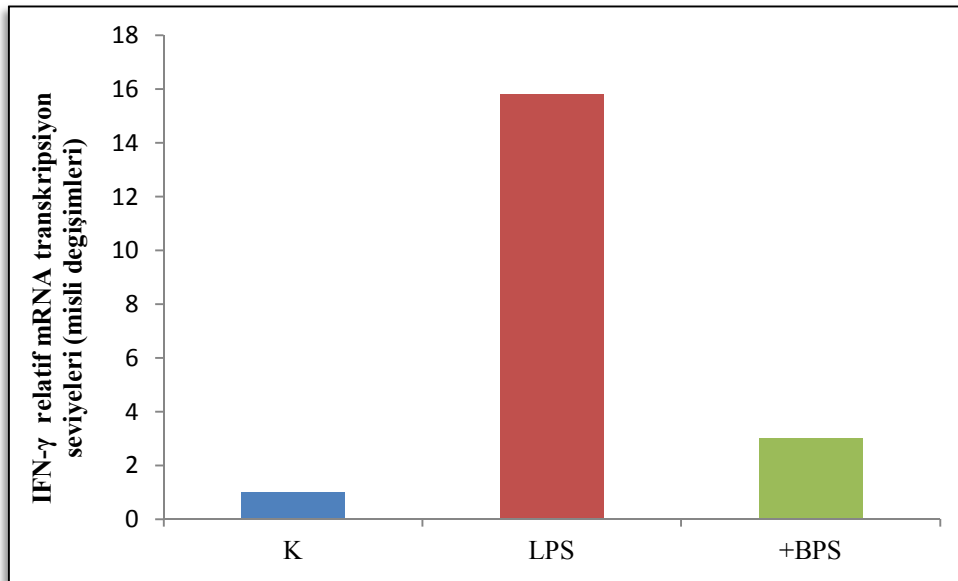
İnkübasyon sonrası TNF- α mRNA transkripsiyon düzeyinin LPS eklenen hücrelerde kontrol grubuna göre uyarıldığı (yaklaşık 7,78 misli), ancak BPS tedavisinin bu uyarılmayı % 64 oranında azalttığı saptandı (Şekil 4.15). K: Kontrol, LPS: 1 μ g/ml lipopolisakkarid, +BPS: 1 μ g/ml lipopolisakkarid+10 μ M beraprost sodyum



Şekil 4.16. Gerçek zamanlı PCR’da TNF- α mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrisi

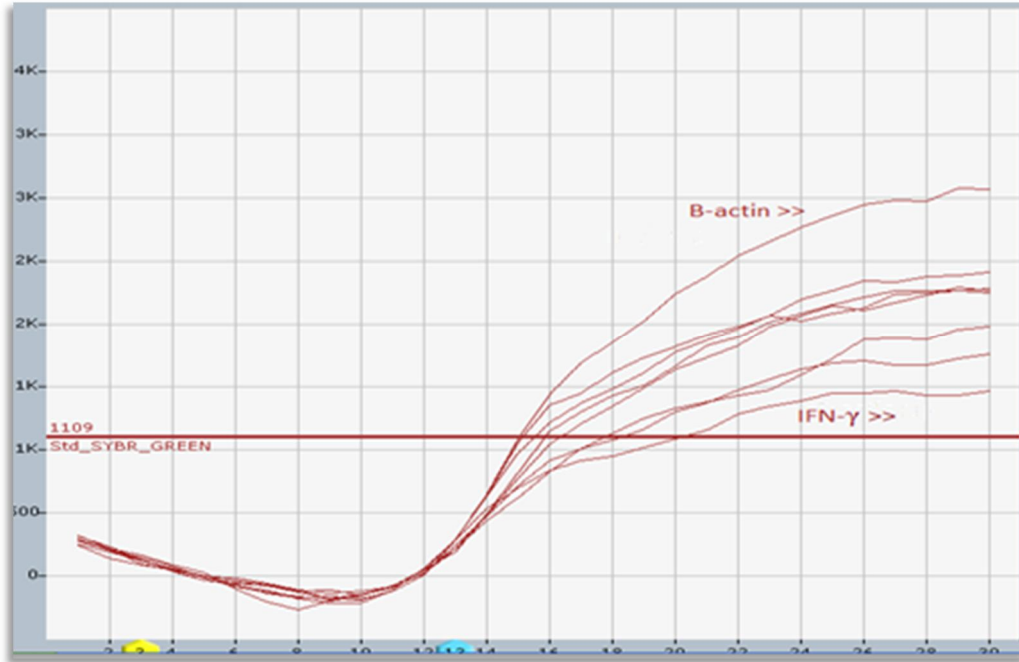
4.3.2. IFN- γ mRNA Transkripsiyonu

Akciğer epitel hücreleri 30 d beraprost uygulanmasını takiben lipopolisakkarid eklenerek 24 s inkübasyona tabi tutuldu. Periyot sonunda elde edilen örneklerden IFN- γ mRNA transkripsiyon seviyeleri real time PCR metodu ile araştırıldı.



Şekil 4.17. IFN- γ mRNA transkripsiyon seviyeleri (24 s).

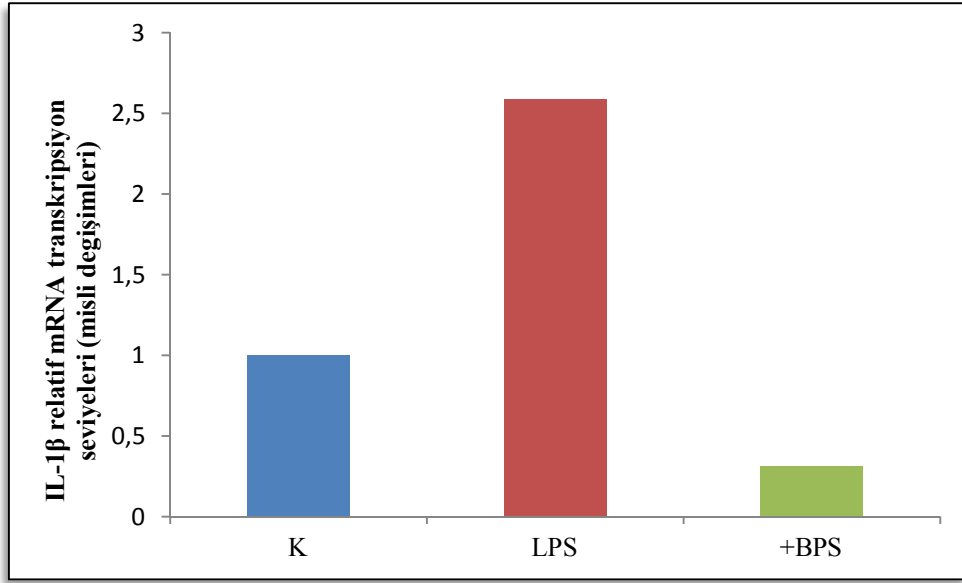
Elde edilen sonuçlarda IFN- γ geni mRNA transkripsiyon seviyesi LPS eklenen grupta kontrol grubuna göre uyarıldığı (15,78 misli), BPS uygulaması sonrası LPS eklenen grupta ise bu artışın % 80 oranında baskılandığı tespit edildi (Şekil 4.17). K: Kontrol, LPS: 1 μ g/ml lipopolisakkarid, +BPS: 1 μ g/ml lipopolisakkarid+10 μ M beraprost sodyum



Şekil 4.18. Gerçek zamanlı PCR'da IFN- γ mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrisi

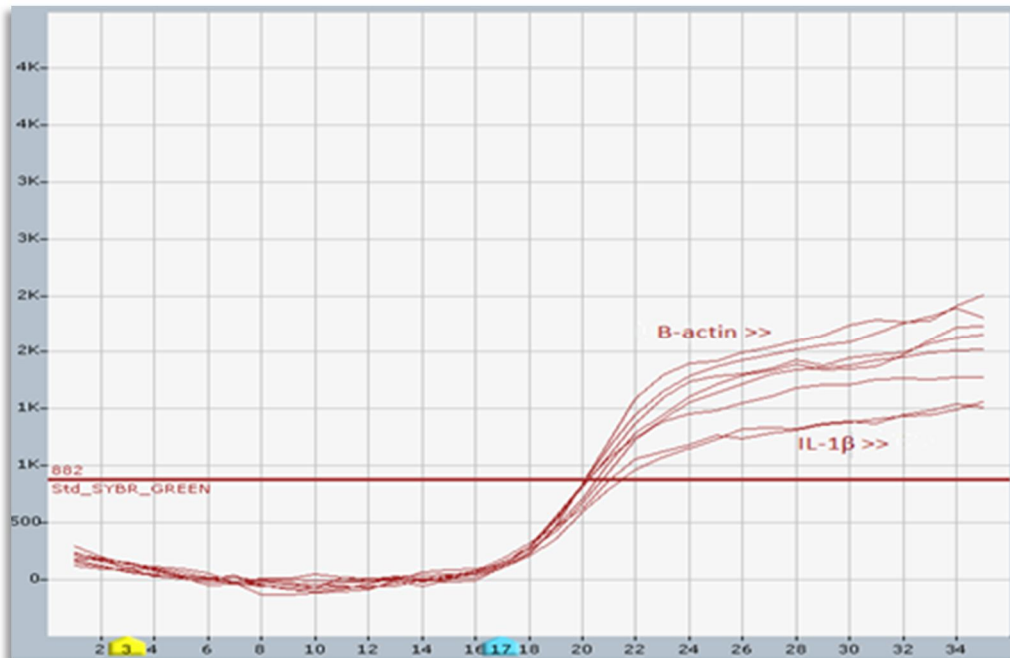
4.3.3. IL-1 β mRNA Transkripsiyonu

Flasklarda bulunan A549 hücre medyumlarına 30 d önceden BPS, daha sonra ise LPS eklenerek 24 s inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda elde edilen RNA örneklerinden IL-1 β mRNA transkripsiyon düzeyi gerçek zamanlı PCR yöntemiyle araştırıldı



Şekil 4.19. IL-1 β mRNA transkripsiyon düzeyleri (24 s)

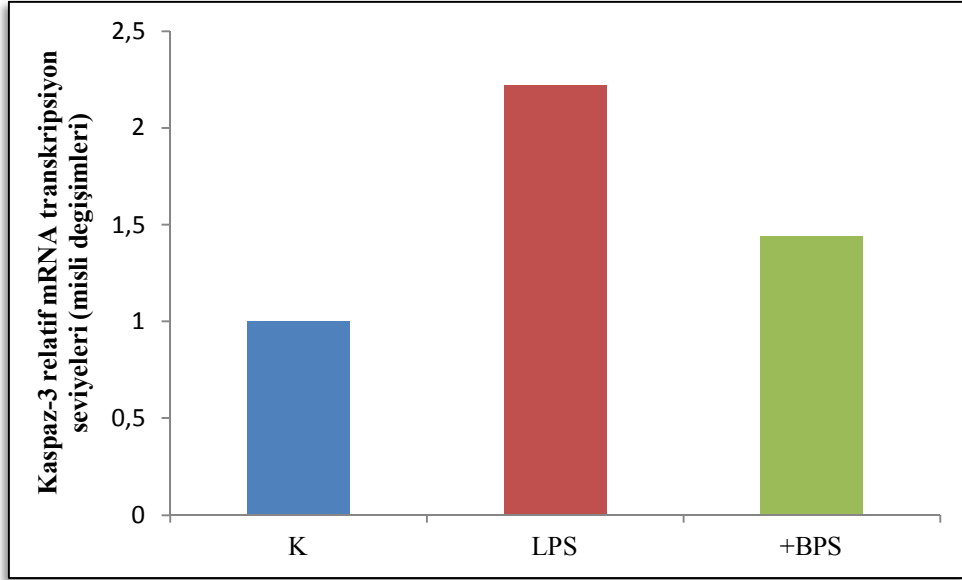
Alınan sonuçlarda beraprost uygulamasının kontrol grubuna göre indüksiyonu (2,59 misli) gösteren LPS'in bu etkilerini % 88 oranında inhibe ettiği baskıladığı belirlendi (Şekil 4.19). K: Kontrol, LPS: 1 μ g/ml lipopolisakkarid, +BPS: 1 μ g/ml lipopolisakkarid + 10 μ M beraprost sodyum



Şekil 4.20. Gerçek zamanlı PCR'da IL-1 β mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrisi

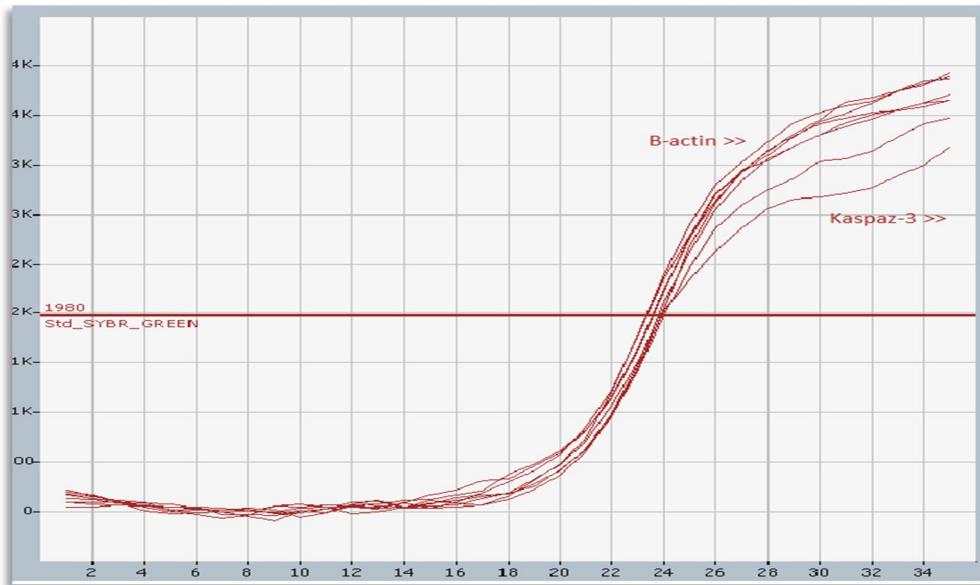
4.3.4. Kaspaz-3 mRNA Transkripsiyonu

Akciğer epitel hücrelerine 30 d BPS süreyle uygulanmasını takiben LPS eklenerek 24 s inkübasyona bırakıldı. Periyot sonunda elde edilen RNA örneklerden kaspaz-3 mRNA transkripsiyon seviyeleri gerçek zamanlı PCR metodu ile araştırıldı.



Şekil 4.21. Kaspaz-3 mRNA transkripsiyon seviyeleri (24 s).

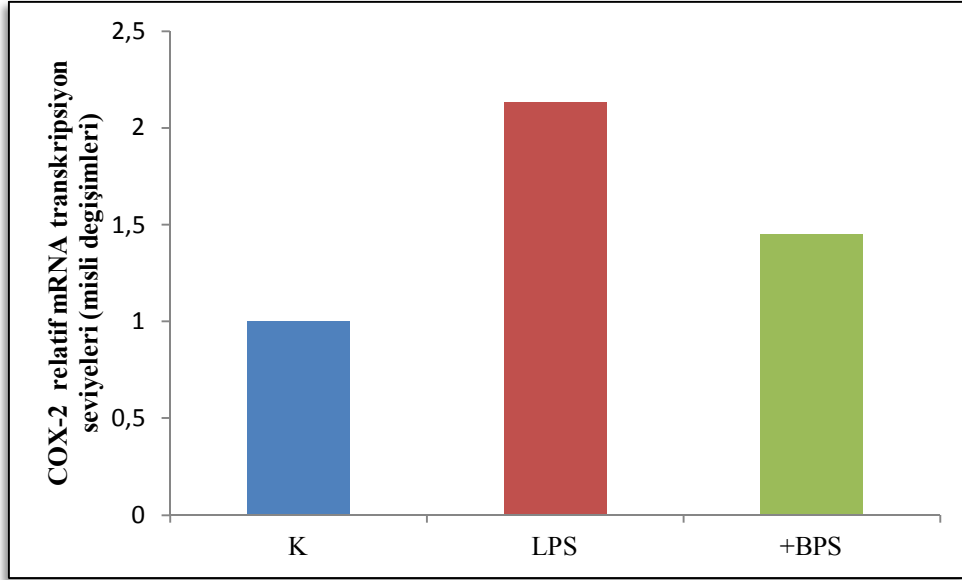
Yapılan çalışma sonucunda kontrol grubuna göre artış (2,22 misli) gösteren LPS grubunun, beraprost uygulamasıyla % 35 oranında azaldığı tespit edildi (Şekil 4.21). K: Kontrol, LPS: 1 µg/ml lipopolisakkarid, +BPS: 1µg/ml lipopolisakkarid+10 µM beraprost sodyum



Şekil 4.22. Gerçek zamanlı PCR'da Kaspaz-3 mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrisi

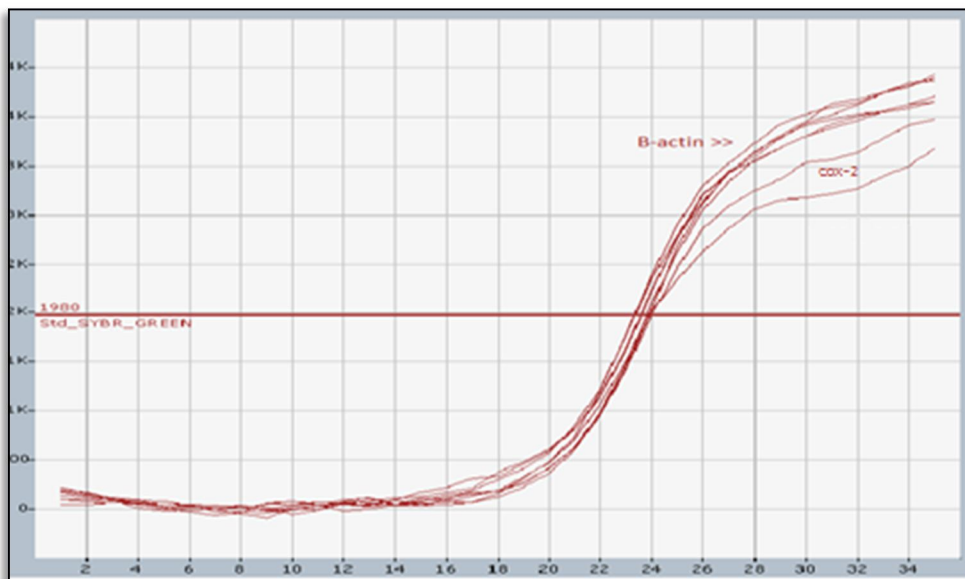
4.3.5. COX-2 mRNA Transkripsiyonu

Alveol epitel hücreleri LPS'e uygulanmadan 30 d süreyle 10 µM BPS eklendi, daha sonra hücrelere LPS ilave edilerek 24 s inkübasyona bırakıldı. Elde edilen RNA örneklerinden COX-2 mRNA transkripsiyon seviyeleri gerçek zamanlı-PCR yöntemiyle araştırıldı.



Şekil 4.23. COX-2 mRNA transkripsiyon seviyeleri (24 s).

Süre sonunda elde edilen örneklerden tespit edilen mRNA transkripsiyon seviyeleri LPS grubunda kontrol grubuna göre arttığı (2,13 misli), +BPS grubunda ise bu artışın % 32 oranında baskılandığı belirlendi (Şekil 4.23). K: Kontrol, LPS: 1 µg/ml lipopolisakkarid, +BPS: 1µg/ml lipopolisakkarid+10 µM beraprost sodyum



Şekil 4.24. Gerçek zamanlı PCR'da COX-2 mRNA transkripsiyon amplifikasyon eğrisi

5. TARTIŞMA

Akciğerler sürekli zararlı partiküller ve mikroorganizmalar ile temas halindedir. Akciğer epitel hücreleri, fiziko-kimyasal bariyer fonksiyonunun yanı sıra mikroorganizmalar ve iritanlarla karşılaştığında birçok enflamatuar mediyatörün sentezini ve salınımını gerçekleştirirler (Diamond ve ark. 2000; Schulz ve ark. 2002; Skerrett ve ark. 2004). Kronik akciğer hastalıklarının patogeneğinde önemli rol oynayan faktörlerden birisi de patojenik Gram (-) bakterilerdir (Sethi ve ark. 2000; White ve ark. 2003). Gram (-) bakteri LPS'i enfekte edecekleri konak hücrelerde bulunan CD14/TLR4/MD2 reseptör kompleksine bağlanarak NF-κB uyarımıyla yangı başlatıcı sitokinleri (IL-1β, IL-6 ve TNF-α gibi) kodlayan genlerin ekspresyonlarında artışlara neden olurlar (Lehnardt ve ark. 2002; Zhang ve ark. 2009).

Yapılan çalışmada LPS'(1 µg/ml) le maruziyetin hücrelerde proliferatif etkisinin olduğu yapılan MTT viabilite testiyle saptandı. Ancak yine aynı metodla LPS'in artan konsantrasyonlarının (0,1-5 µg/ml) ise dereceli olarak hücrelerde toksik etki ile kayıplara neden olduğu tespit edildi. Duan ve Zhang (2006) aldığımız sonuçlara benzer olarak LPS'in A549 hücrelerinde proliferatif etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Yine Chuang ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, A549 hücrelerinde LPS'in artan dozlarının dereceli olarak kayıplara neden olduğunu, bunun sebebinin ise üretimi artan oksidatif ürünlerin artışına bağlı olarak gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. Yürütülen bu tez çalışmasında da LPS'in 1 µg/ml düzeyindeki dozların akciğer epitelyum hücrelerinde reaktif oksijen ve azot türlerinin üretimine neden olarak hücre proliferasyonuna sebep olduğu saptandı.

Bu çalışmada bir PGI₂ analogu olan BPS'nin A549 hücrelerinde 24 saat inkübasyonu sonucu LPS'in sebep olduğu hücre çoğalmasına karşın antiproliferatif etkinliği MTT hücre viabilite testiyle saptandı. Elde ettiğimiz sonuçlara paralel olarak Olschewski ve ark. (2004) prostanoidler tarafından insan pulmoner arterlerinde cAMP seviyesindeki artışa bağlı olarak hücre proliferasyonunun azaltıldığını bildirmişlerdir. Ancak bu etki konusunda cAMP'nin etkinliğinin açık olmadığını, farklı bir yolağın da bu etkide fonksiyonel olabileceği belirtilmiştir. Yine sonuçlarımıza benzer olarak Lin ve ark. (2008) bir PPARδ aktivasyonu ile olan beraprostun antiproliferatif etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Sue ve ark. (2009) fare

damar düz kas hücreleri ile oluşturdukları çalışmada beraprost sodyumun, PPAR δ ve CREB proteinleri hücre içi konsantrasyonlarını arttırarak antiproliferatif etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Çok sayıda araştırmacı prostanoidlerin kendi reseptörlerinin yanı sıra hücre çekirdeğinde bulunan PPAR δ 'yı da aktive ettiklerini, bu aktivasyonun da apoptozu uyurabileceğini bildirmişlerdir (Gray ve ark. 2005, Hatae ve ar 2001, Lazennec ve ark 2000). Trifilieff ve ark. (2003) PPAR δ reseptörlerinin, A549 hücrelerinde varlığını göstermişlerdir. Bu sonuçlar beraprostun farklı yollar ile antiproliferatif etkilerinin olduğunu göstermektedir

Siklooksijenazlar hücre içerisinde araşidonik asitten prosaglandinler ve eikozonoidlerin sentezinden sorumlu enzimlerdir (Gökşen ve Kelekçi 2010). Yapılan bu çalışmada bir prostasiklin analogu olan beraprostun akciğer epitelyum hücrelerinin 24 saatlik LPS uyarımlı yangısında COX-2 gen transkripsiyonu üzerine etkileri de araştırıldı. LPS'e maruz bırakılan hücrelerde COX-2 gen transkripsiyonunda bir artış olduğu; ancak, bu artışı baskıladığı tespit edildi. Elde edilen sonuçlara benzer olarak Duan ve ark. (2005) yürüttükleri akciğer kanser modelinde LPS uyarımıyla COX-2 gen transkripsiyonunda anlamlı derecede artışlar olduğunu ve hücrelerde önemli düzeyde proliferasyon geliştiğini rapor etmişlerdir. Yine Rafi ve ark. (2007) yaptıkları *in vitro* çalışmada, LPS uyarımlı yangıda COX-2 gen transkripsiyonunun önemli derecede arttığını göstermişlerdir. Bununla birlikte prostasiklin analoglarının COX-2 gen transkripsiyonları üzerine etkileri hücre çeşitlerine göre farklılık göstermektedir. Inoue ve ark. (2000) monositik hücrelerde yaptıkları çalışmada LPS uyarımlı COX-2 artışının, prostasiklin analoglarına benzer etkili PPAR δ agonisti kullanarak baskıladıklarını rapor etmişlerdir. Debey ve ark. (2003) damar endoteli hücrelerinde prostasiklin analoglarının maruziyetinde COX-2 enzim gen ekspresyonunda önemli artışlar olduğunu rapor etmişlerdir. Elde edilen bu zıt etki, prostasiklinlerin hücre türlerinde farklı etki oluşturabileceğini göstermektedir.

Apoptoz istenmeyen, hasarlı ve hastalıklı hücrelerin ortadan kaldırılmasını düzenleyen fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli bir savunma mekanizmasıdır (Mohan 2009). Kaspazlar apoptozun başlatıcısı ve sonlandırıcısı olarak bu mekanizmada merkezi bir rol üstlenen proteazlardır. Kaspazların aktive olabilmesi için 3 mekanizma bulunmaktadır. Bunlardan ilki ekstrinsik yolak, ikincisi intrinsik (mitokondriyal) yolak, üçüncüsü ise endoplazmik retikulum stresine bağlı gelişen apoptotik yolaktır (Marsden ve ark. 2002). Yapılan bu çalışmada A549 hücrelerinin LPS maruziyeti sonucu kaspaz-3 gen transkripsiyon seviyesinde anlamlı düzeyde artışın olduğu saptandı. Munshi ve ark. (2002) yaptıkları çalışma da Gram (-) bakterilerin endotoksinden sorumlu komponenti olan LPS'in kaspaz-3 gen

transkripsiyonunda uyarıya neden olduğunu rapor etmişlerdir. Chen ve ark.' da (2009) sigara dumanı uyarımlı akciğer anfizem modelinde beraprost sodyumun artan kaspaz-3 gen ekspresyonunu anlamlı derecede baskıladığını rapor etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada da benzer şekilde LPS ile uyarılmış kaspaz-3 gen transkripsiyonlarının beraprost kullanılarak baskılandığı tespit edildi. Bu sonuç sigara dumanı zararlıları etkisi ile gelişen hücre ölümlerinin beraprostun kaspaz inhibisyonu ile engellenebileceğini göstermektedir.

Akciğerler oksidanlardan kaynaklanan saldırılardan korunmak ve normal redoks şartlarını sürdürmek için solunum yollarında önemli antioksidanlar bulundurulur. Bunlar arasında katalaz, glutatyon, glutatyon redüktaz ve süperoksit dismutaz da yer alır. Glutatyon sistemi reaktif oksijen ve nitrojen türlerini inaktive eden koruyucu bir role sahip olup solunum yolundaki en büyük antioksidan savunma sistemini oluşturur (Dekhuijzen, 2004). GSH hava boşluğu epitel bariyerinin yoğunluğunun devam ettirilebilmesinde önemli rollere sahiptir. Epitel hücrelerindeki GSH seviyelerindeki bir azalma, geçirgenliği artırır ve bariyer fonksiyonunu bozar (Gao ve ark. 1999). Glutatyon ve glutatyon peroksidaz solunum yollarında zararlı partikül ve Gram (-) bakteriler gibi iritanların uyarımıyla oluşan ROS'lara karşı savunmada önemli rollere sahiptirler. Yapılan bu çalışmada, A549 hücreleri üzerinde Gram (-) bakterilerin endotoksini olan LPS uyarımıyla oluşan oksidatif stres ve yangıda beraprostun, azalan GSH üretimi üzerine anlamlı derecede koruyucu etki sağladığı tespit edildi. Yine hücre içi antioksidan enzimlerden katalaz aktivitesi LPS tarafından belirgin düzeyde inhibe edildiği, ancak beraprost uygulamasının katalaz aktivitesini önemli düzeyde geri kazandırdığı saptandı. Zhang ve ark (2011), yüksek glikoz stresine bağlı rat mezengial hücreleri üzerine yaptıkları *in vitro* çalışmada, BPS'un gelişen oksidatif stresi önemli düzeyde azalttığını, total antioksidan kapasiteyi arttırdığını, katalaz aktivitesini önemli seviyede arttırdığını ve proliferasyonu önlediğini rapor etmişlerdir. Yürütülen bu çalışmada, LPS'in A549 hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak total antioksidan kapasiteyi önemli düzeyde azalttığı, ancak beraprost uygulamasının bu kayıpları önemli düzeyde geri kazandırdığı tespit edildi.

Lipopolissakkaritler üç veya daha fazla çift bağa sahip yağ asidlerinde lipid peroksidasyonuna neden olur. Buna bağlı olarak hücre içi malondialdehit (MDA) artarken katalaz aktivitesi düşerek, olumsuz bir tablo ortaya çıkar (Sebai ve ark. 2010) Balbir-Gurman ve ark (2007) ile Gedik ve ark. (2009)'nın oksidatif stres ve yangı ortamında yaptıkları çalışmada, prostasiklin analoglarının MDA, GSH ve CAT düzey ve aktivitelerinde iyileştirici etkisini göstermişlerdir.

6. SONUÇ

Bu araştırmada; çeşitli sebeplerle akciğerlerde gelişen yangısal olayların tedavisinde, günümüzde yaygın olarak kullanılan, ancak direnç ve diğer yan etkiler gelişebilen glukokortikoidlere alternatif olarak prostasiklin analoglarının etkileri akciğer epitel hücreleri üzerinde analiz edildi. Hücre içi ikincil haberci moleküllerden cAMP düzeyinin artışı yangının baskılanmasında önemli olduğu literatürde yer alması gerekçesiyle, bakteriyel endotoksinlerden LPS ile *in vitro* şartlarda akciğer epitel hücrelerinde enflamasyon ve oksidatif stres oluşturuldu ve gelişen reaksiyonların tedavisinde prostasiklin analogu BPS'in etkileri araştırıldı. Beraprost aracılı hücre içi cAMP artışı TNF- α , IL-1 β , IFN- γ and COX-2 gibi yangısal sitokinlerin mRNA ekspresyonlarını baskıladığı, antioksidan enzim aktivitesini ve hücre içi antioksidan GSH düzeyini artırdığı saptandı. Elde edilen sonuçlar akciğer epitel hücrelerinde BPS uygulamasının yangı ve oksidan olayları baskılama potansiyelinin bulunduğunu gösterdi. Bu alanda yapılacak ileri araştırmalar ile hücre içi cAMP regülasyonunun akciğerlerde gelişen yangısal ve oksidatif strese bağlı reaksiyonların giderilmesinde kullanım alanı bulunup bulunamayacağı ortaya konulabilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Abramovitz M, Adam M, Boie Y.** The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochim Biophys Acta*, **2000**, 1483, 285-293
2. **Aghabeigi B.** The pathophysiology of the pain. *Br Dent J*. **1992**, 173, 91-97
3. **Akkuş I, Kalak S, Vural H, Çağlayan O, Menekşe E, Can G, Durmuş B.** Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin C levels of patients with type-II diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*. **1996**, 244, 221-227
4. **Armstrong L, Jordan N, Millar A.** Interleukin 10 regulation of TNF- α from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax* **1996**, 51, 143-149,
5. **Aronoff D, Canetti MC, Peters-Golden M.** Prostaglandin E₂ inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J Immunol*. **2004**, 173, 559-565
6. **Atsushi K, Schleimer RP.** Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology* **2007**, 19, 711-720
7. **Balbir-Gurman A, Braun-Moscovici Y, Livshitz V, Schapira D, Markovits D, Rozin A, Boikaner T, Nahir AM.** Antioxidant status after iloprost treatment in patients with Raynaud's phenomenon secondary to systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*. **2007**, 26, 1517-1521
8. **Bals R, Hiemstra PS.** Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur. Respir. J*. **2004**, 23, 327-333
9. **Berkman N, Robichaud A, Robbins RA, Roesems G, Haddad EB, Barnes PJ.** Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by interleukin-4 and interleukin-13 in human epithelial cells. *Immunology*. **1996**, 89, 363-367.
10. **Beavo JA, Brunton LL.** Cyclic nucleotide research still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2002**, 3, 710-718
11. **Benzie IF, Strain JJ.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, **1996**, 239, 70-76
12. **Biennu J.** Exploration of cytokines in biological fluids. *CR Seances Soc Biol Fil*. **1995**, 545-555, 189
13. **Bismarck PV, Mohrbach SV, Herzberg M, Uhlig U, Schütze S, Lucius R, Martin F, Krause IK** NBD peptide inhibits LPS induced pulmonary inflammation and alters sphingolipid metabolism in a murine model. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **2012**, 1-8
14. **Bolger GB, Erdogan S, Jones RE, Loughney K, Scotland G, Hoffmann R, Wilkinson I, Farrell C, Houslay MD.** Characterization of five different proteins produced by alternatively spliced mRNAs from the human cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D gene. *Biochem J*. **1997**, 539-548, 328
15. **Cadenas E.** Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* **1989**, 58, 79-110
16. **Celik S, Erdogan S.** Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects brain against oxidative stress and inflammation induced by diabetes in rats. *Mol. Cell. Biochem.* **2008**, 312, 39-46.
17. **Chao JC, Huang CH, Wu SJ, Yang SC, Chang NC, Shieh MJ, Lo PN.** Effects of beta-carotene, vitamin C and E on antioxidant status in hyper lipidemic smokers. *J Nutr Biochem*. **2002**, 13, 427-434,
18. **Cheeseman KH, Slater TF.** An introduction to free radical biochemistry. *British Med Bulletin* **1993**, 59, 481-493
19. **Chemvon Biotechnology Co. Ltd.** Cyclic AMP Property
http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8747868.htm, **2012**, Erişim tarihi: 15.04.2012
20. **Chemvon Biotechnology Co. Ltd.** Beraprost Sodium Basic Information,
http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB8761736_EN.htm, **2012**, Erişim tarihi: 15.04.2012
21. **Chen H, Goldberg MS.** The effects of outdoor air pollution on chronic illnesses. *McGill Journal of Medicine*. **2009** 12, 58-64
22. **Chen Y, Hanaoka M, Chen P, Droma Y, Voelkel NF, Kubo K.** Protective effect of beraprost sodium, a stable prostacyclin analog, in the development of cigarette smoke extract-induced emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2009**, 296, 648-656
23. **Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci C.** Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine*. **2005**, 39, 841-852

24. **Chuang CY, Chen TL, Cherng YG, Tai YT, Chen TG, Chen RM.** Lipopolysaccharide induces apoptotic insults to human alveolar epithelial A549 cells through reactive oxygen species-mediated activation of an intrinsic mitochondrion-dependent pathway. *Arch Toxicol.* **2011**, 209-218,
25. **Coleman JW.** Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clin Exp Immunol.* **2002**, 129, 4-10.
26. **Comhair SA, Erzurum SC.** Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2002**, 283, 246-255
27. **Costas NK, Wakid NW.** Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem.* **1990**, 36, 1440-1443.
28. **Daniel NN, Korsmeyer SJ.** Cell death: Critical control points. *Cell*, **2004**, 116, 205-219
29. **Daimon M, Hama K, Susa S, Kimura M, Yamatani K, Ohnuma H, Manaka H, Kato T.** Hyperglycemia is a factor for an increase in serum ceruloplasmin in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* **1998**, 21, 1525-1528
30. **Debey S, Meyer-Kirchrath J, Schror K.** Regulation of cyclooxygenase-2 expression by iloprost in human vascular smooth muscle cells. Role of transcription factors CREB and ICER. *Biochem Pharmacol* **2003**, 65, 979-988
31. **Dekhuijzen PNR.** Antioxidant properties of *N*-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, **2004**, 23, 629-636
32. **Diamond G, Legarda D, Ryan LK,** The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev;* **2000**, 173, 27-38
33. **Dinarello CA.** The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol.* **2002**, 20, 1-13
34. **Drenth JP, Van Uum SH, Van Deuren M.** Endurance run increased circulating IL-6 and IL-1 ra but down-regulates ex vivo TNF- α and IL-1 β production. *J Appl Physiol.* **1995**, 79, 1497-1503
35. **Duan W, Zhang L.** Cyclooxygenase inhibitors not inhibit resting lung cancer A549 cell proliferation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* **2006**, 74, 317-321
36. **El-Samalouti VT, Lutz H, Dieter FH, Ulmer AJ.** The Biology of Endotoxin Bacterial Toxins: Methods and Protocols. **2004**, 145, 287-309
37. **Erdogan S, Aslantas O, Celik S, Atik E.** The effects of increased cAMP content on inflammation, oxidative stress and PDE4 transcripts during *Brucella melitensis* infection. *Res Vet Sci.* **2008**, 84, 18-25
38. **Erridge C, Nieto LM, Morgan R, Young M, Poxton IR.** *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling. *Journal of Medical Microbiology* **2006**, 56, 165-171
39. **Fetalvero K, Martin M, Hwa J.** Cardioprotective prostacyclin signaling in vascular smooth muscle. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2007**, 82, 109-118
40. **Fehrenbach H.** Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir. Res.* **2001**, 2, 33-46
41. **Francis SH, Turko IV, Corbin JD.** Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **2001**, 65, 1-52
42. **Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Syzuki T, Azuma H, Ikeda H.** Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex, *Pharmacology and Therapeutics* **2003**, 100, 171-194
43. **Gao L, Kim KJ, Yankaskas JR, Forman HJ.** Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia. *AJP - Lung Physiol.* **1999**, 277, 113-118
44. **Gardner RV, McKinnon E, Poretta C, Leiva L.** Hemopoietic function after use of IL-1 with chemotherapy or irradiation. *J Immunol.* **2003**, 1202-1206.
45. **Gedik E, Girgin S, Obay BD, Ozturk H, Ozturk H, Buyukbayram B.** Iloprost, a prostacyclin (PGI₂) analogue, reduces liver injury in hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, **2009**, 24, 226-232
46. **Gökşen US, Kelekçi NG.** Antiinflamatuvar Tedavide Yeni Bir Yaklaşım: Siklooksijenaz ve 5-Lipooksijenazın Dual İnhibitörleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **2010**, 30, 81-118
47. **Gray JP, Burns KA, Leas TL, Perdew GH, Vanden Heuvel JP.** Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by protein kinase C. *Biochemistry*, **2005**, 44, 10313-10321
48. **Gross A, Bouaboula, M, Casellas P, Liautard JP, Dornand J.** Subversion and utilization of the host cell cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A pathway by *Brucella* during macrophage infection. *J Immunol.* **2003**, 170, 5607-5614
49. **Gülay Z.** Pnömoni Patogenezi, *İç Hastalıkları Dergisi* **2007**, 14, 179-190
50. **Habif S, Turgan N, Mutaf I.** Plasma catalase, glutathione peroxidase and selenium levels in adult diabetic patients. *Tr J Med Sci.* **1997**, 27, 139-141

51. Haeggstrom JZ, Kull F, Rudberg PC, Tholander F, Thunnissen MM. Leukotriene A4 hydrolase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2002**, 68, 495-510
52. Hatae T, Wada M, Yokoyama C, Shimonishi M, Tanabe T. Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR delta. *Biol Chem*, **2001**, 276, 46260-46267
53. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance, *Am J Clin Nutr*, **1993**, 57, 715-725
54. Henricks PA, Nijkamp FP. Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* **2001**, 14, 409-420
55. Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria, *Clinica Chimica Acta*, **2002**, 323, 59-72
56. Hodgson J.C. Endotoxin and Mammalian Host Responses During Experimental Disease, *J. Comp. Path.* **2006**, 135, 157-175
57. Houslay MD. PDE4 cAMP-specific phosphodiesterases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2001**, 69, 249-315
58. Houslay MD, Kolch W. Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol*, **2000**, 58, 659-668
59. Hwang SL, Yen GC. Neuroprotective effects of the citrus flavanones against H₂O₂-induced cytotoxicity in PC12 cells. *J. Agric. Food. Chem.* **2008**, 56, 859-864
60. Idzko M, Hammad H, Van Nimwegen M, Kool M, Vos N, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Inhaled iloprost suppresses the cardinal features of asthma via inhibition of airway dendritic cell function. *J. Clin. Invest.* **2007**, 117, 464-472
61. Inoue H, Tanabe T, Umesono K. Feedback Control of Cyclooxygenase-2 Expression through PPAR δ . *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.* **2000**, 275, 28028-28032
62. Jacob C, Chouly CM, Lagente V. Type 4 phosphodiesterase-dependent pathways: role in inflammatory processes. *Therapie.* **2002**, 57, 163-168
63. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition, *International Journal of Medical Microbiology* **2007**, 297, 353-363
64. Jimenez de Bagues MP, Dudal S, Dornand J, Gross A. Cellular bioterrorism: how Brucella corrupt macrophage physiology to promote invasion and proliferation. *Clin Immun.* **2005**, 114, 227-238
65. Kainoh M, Ueno S, Endoh T, Nakadate T. Inhibitory effect of beraprost sodium on formation of lipid peroxides in ischemia and recirculation induced cerebral injury. *Pharmacol. Res.* **1993**, 28, 249-258
66. Kambayashi T, Jacob CO, Zhou, D, Mazurek N, Fong M, Strassmann G. Cyclic nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL-10 and in the subsequent inhibition of TNF-alpha and IL-6 release by endotoxin-stimulated macrophages. *J Immunol.* **1995**, 155, 4909- 4916
67. Karan MA, Tufan F. Yaşlanma Mekanizmaları. *Ege Tıp Dergisi*, **2010**, 49, 11-17
68. Kelsen SG, Aksoy MO, Georgy M. Lymphoid follicle cells in chronic obstructive pulmonary disease overexpress the chemokine receptor CXCR3. *Am J Respir Crit Care Med.* **2009**, 179, 799-805
69. Koch A, Knobloch J, Bammhayn C, Raidl M, Ruppert A, Hag H, Rottlaender D, Müller K, Erdmann E. Effect of bacterial endotoxin LPS on expression of INF- γ and IL-5 in T-lymphocytes from Asthmatics, *Clinical Immunology* **2007**, 125, 194-204
70. Komhoff M, Lesener B, Nakao K, Seyberth HW, Nusing RM. Localization of the prostacyclin receptor in human kidney. *Kidney Int.* **1998**, 54, 1899-1908
71. Korkut E, Aytuğ N, Özden A. Nonsteroid Anti-inflamatuvar ilaçlar ve gastro-intestinal sistem. *Güncel Gastroenteroloji.* **2008**, 12/1, 10
72. Kreja L, Seidel HJ. On the cytotoxicity of some microbial volatile organic compounds as studied in the human lung cell line A549, *Chemosphere*, **2002**, 49, 105-110
73. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* **2007**, 57, 99-163
74. Kuralay F, Çavdar Z. İnflamatuvar medyatörlere toplu bir bakış. *Genel Tıp Derg.* **2006**, 16, 143-152
75. Kutlu M, Naziroglu M, Simsek H, Yılmaz T, Sahap Kukner A. Moderate exercise combined with dietary vitamins C and E counteracts oxidative stress in the kidney and lens of streptozotocin-induced diabetic-rat. *Int J Vitam Nutr Res.* **2005**, 75, 71-80
76. Kunzelmann K, McMorran B. First Encounter: How Pathogens Comprise Epithelial Transport. *Physiology.* **2004**, 19.
77. Lazennec G, Canaple L, Saugy D, Wahli W. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Mol Endocrinol.* **2000**, 14, 1962-1975
78. Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett P.L, Jensen F.E, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *The Journal of Neuroscience*, **2002**, 22, 2478-2486

79. Lin H, Lee JL, Hou HH, Chung CP, Hsu SP, Juan SH. Molecular mechanisms of the antiproliferative effect of beraprost, a prostacyclin agonist, in murine vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* **2008**, 214, 434-441
80. Lockey AJ, Kavaliers M, Ossenkopp KP. Lipopolysaccharide reduces tactile startle response magnitude but not Prepulse inhibition in rats: A dose-response examination, *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour* **2009**, 93, 47-53
81. Luck H, Bergmeyer, HU. Catalase. In: *Methods in Enzyme Analysis.* Verlag-Chemic. **1965**
82. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol.* **2001**, 429, 195-207
83. Maitland MG, Olschewski H. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon Tedavisinde Prostatiklin Terapileri. *European Respiratory Journal*, **2008**, 3
84. Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly LA. Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independent of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature*, **2002**, 419, 634-637
85. Masella R, Benedetto RD, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry.* **2005**, 16, 577-586
86. Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases, *Clin. Biochem.* **1999**, 32, 595-603
87. Matsuoka T, Narumiya S. Prostaglandin Receptor Signaling in Disease Eicosanoid Receptors and Inflammation *The Scientific World Journal*, **2007**, 7, 1329-1347
88. McAdam BF, Lawson FC, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci*, **1999**, 96, 272-277
89. McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, 26, 1034-1105
90. McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahbaubi A, Shi Y. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods Cell Biol.* **1995**, 46, 153-185
91. Melkamu T. Toll-like receptor interactions and their contribution to airway inflammation. *A dissertation submitted to the faculty of the Graduate School of the University of Minnesota.* **2010**
92. Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* **2005**, 3, 30-39
93. Melo A, Monteiro L, Lima RMF, Oliveira DM, Cerqueira MD, El-Bachá RS. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Therapeutic Perspectives, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2011**, 467180, 14
94. Memişoğulları R, Bakan E. Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with type-2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications.* **2004**, 193-197, 18
95. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev.* **1997**, 77, 1033-1079
96. Mu MM, Koide N, Hassan F, Islam S, Sugiyama T, Ito H, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. A role of mitogen and stress-activated protein kinase 1/2 in survival of lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **2005**, 43, 277-286
97. Mubarak KK. A review of prostaglandin analogs in the management of patients with pulmonary arterial hypertension. *Respiratory Medicine.* **2010**, 104, 9-21
98. Mullington JM, Hinze-Selch D, Pollmavher T. Mediators of inflammation. *Ann NY Acad Sci* **2001**, 933, 201-210
99. Muir A, Soong G, Sokol S, Reddy B, Gomez MI, Van Heeckeren A, Prince A. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **2004**, 30, 777-783
100. Munshi N, Fernandis AZ, Cherla RP, Park IW, Ganju RK. Lipopolysaccharide-induced apoptosis of endothelial cells and its inhibition by vascular endothelial growth factor. *J Immunol.* **2002**, 168, 5860-5866
101. Mohan C, Kim YG, Min Lee G. Apoptosis and Autophagy. *Cell Engineering*, **2009**, 6, 195-216
102. Morrison D, Rahman I, Lannan S, MacNee W. Epithelial permeability, inflammation and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* **1999**, 159, 473-479
103. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions, *Physiological Reviews*, **1999**, 79
100. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **2005**, 338, 668-676
101. Ohno K, Nagase H, Matsumoto K, Nishiyama H, Nishio JS. Stereoselective synthesis of 5,6,7-trinor-4,8-inter-m-phenylene-PGI derivatives and their inhibitory activities to human platelet aggregation. *Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* **1985**, 15, 279-281

102. Ohta S, Nakamuta M, Fukushima M, Kohjima M, Kotoh K, Enjoji M, Navata H. Beraprost sodium, a prostacyclin (PGI₂) analogue, ameliorates concanavalin A-induced liver injury in mice. *Liver International*. 2005, 25, 1061-1068
103. Olschewski H, Rose F, Schermuly R, Ghofrani HA, Enke B, Olschewski A, Seeger W. Prostacyclin and its analogues in the treatment of pulmonary hypertension. *Pharmacology & Therapeutics*. 2004, 102, 139-153
104. Özenci H. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) veya bronşektazi tanılı olgularda bronş epitel hücrelerinin antibakteriyel etkinliğinin araştırılması, *Proje Raporu*, <http://acikarsiv.ankara.edu.tr/browse/2129>, Erişim Tarihi: 18.01.2012
105. Pauwels RA, Rabe KF. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Lancet*. 2004, 364, 14-20
106. Pechkovsky DV, Zissel G, Ziegenhagen MW, Einhaus M, Taube C, Rabe KF, Magnussen H, Papadopoulos T, Schlaak M, Müller-Quernheim J. Effect of proinflammatory cytokines on interleukin-8 mRNA expression and protein production by isolated human alveolar epithelial cells type II in primary culture. *Eur. Cytokine Netw*. 2000, 10 618-625
107. Pettersen CA, Adler KB. Airways inflammation and COPD: epithelial-neutrophil interactions. *Chest* 2002, 121, 142-150
108. Piaz VD, Giovannoni MP. Phosphodiesterase 4 inhibitors, structurally unrelated to rolipram, as promising agents for the treatments of asthma and other pathologies. *Eur. J. Med. Chem*. 2000, 35, 463-480
109. Pier GB. Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide: A major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *International Journal of Medical Microbiology* 2007, 297, 277-295
110. Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E. Oxidative stress and cell signalling. *Curr. Med. Chem*. 2004, 11, 1163-1182
111. Prasad KN, Cole WC, Yan XD, Nahreini P, Kumar B, Hanson A, Prasad JE. Defects in cAMP-pathway may initiate carcinogenesis in dividing nerve cells: a review. *Apoptosis* 2003, 8, 579-586
112. Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol*. 2001, 51-68, 64
113. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *AJ-Lung Physiol*. 1995, 268, 699-722
114. Rafi MM, Yadav PN, Rossi AO. Glucosamine inhibits LPS-induced COX-2 and iNOS expression in mouse macrophage cells (RAW 264.7) by inhibition of p38-MAP kinase and transcription factor NF-kappaB. *Mol Nutr Food Res*. 2007, 51, 587-593
115. Reddi K, Phagoo SB, Anderson KD, Warburton D. Burkholderia cepacia-induced IL-8 gene expression in an alveolar epithelial cell line: signalling through CD14 and mitogen-activated protein kinase. *Pediatr. Res*. 2003, 54, 297-305
116. Sager DS, Bennett R. Individualizing the risk/benefit ratio of NSAID's in older patients. *Geriatrics* 1992, 57, 24-31
117. Saleh MA, Clark S, Woodard B, Deolu-Sobogun SA. Antioxidant and free radical scavenging activities of essential oils. *Ethn. Dis*. 2010, 20, 78-82
118. Schneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharmaceutica acta Helvetiae*. 2000, 24
119. Schulte G, Fredholm BB. Signalling from adenosine receptor to mitogen activated-protein kinases. *Cellular Signalling*, 2003, 15, 813-827
120. Schulz C, Farkas L, Wolf K, Kratzel K, Eissner G, Pfeifer M. Differences in LPS-induced activation of bronchial epithelial cells (BEAS-2B) and type II-like pneumocytes (A549). *Scand. J. Immunol*. 2002, 56, 294-302
121. Sebai H, Sani M, Boughanmi NG, Aouani E. Prevention of lipopolysaccharide-induced mouse lethality by resveratrol. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48, 1543-1549
122. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, 1968, 25, 192-205
123. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotension II stimulation of NADPH oxidase activity: upstream mediators. *Circulation research*, 2002, 406-413, 91
124. Sessle BJ. New insights into peripheral chemical mediators of pain and inflammation. *J Orofac Pain*, 2001, 15, 1-5
125. Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in a state-of-the-art review. *Clin. Microbiol. Rev*. 2000, 14, 336-363
126. Shnyra A, Luchi M, Morrison DC. Preparation of endotoxin from pathogenic gram negative bacteria from: methods in molecular medicine, *Septic Shock*, 1999, 36, 13-25

127. Singh U, Jialal I. Anti-inflammatory effects of alpha-tocopherol. *Ann NY Acad Sci.* **2004**, 1031, 195-203
128. Steinberg FM, Chait A. Antioxidant vitamin supplementation and lipid peroxidation in smokers. *Am J Clin Nutr.* **1998**, 68, 319-327
129. Skerrett SJ, Liggitt HD, Hajjar AM, Ernst RK, Miller SI, Wilson CB. Respiratory epithelial cells regulate lung inflammation in response to inhaled endotoxin. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2004**, 287, 143-152
130. Smyth EM, Grosser T, Wang M, Yu Y, Fitzgerald GA. Prostanoids in health and disease. *J. Lipid Res.* **2009**, 50, 423-428
131. Souness JE, Griffin M, Maslen C, Ebsworth K, Scott LC, Pollock K, Palfreyman MN, Karlsson JA. Evidence that cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors suppress TNF alpha generation from human monocytes by interacting with a 'low-affinity' phosphodiesterase 4 conformer. *Br J Pharmacol.* **1996**, 118, 649-658
132. Sözmen EY, Onat T, Emerk K. Yaşlanma Biyokimyası. İnsan Biyokimyası, *Palme Yayıncılık, Ankara.* **2002**, 665-674.
133. Sperandio P, Gianni D, Polissi A. The lipopolysaccharide transport system of Gram-negative bacteria, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2009**, 1791, 594-602
134. SPSS Inc. SPSS for windows. Version 13.0, SPSS Inc., Chicago, **2004**.
135. Stadler J, Billiar TR, Curran RD. Effect of exogenous and endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes. *Am J Physiol.* **1991**, 260, 910-916
136. Sue YM, Chung CP, Lin H, Chou Y, Jen CY, Li HF, Chang CC, Juan SH. PPAR γ -mediated p21/p27 induction via increased CREBbinding protein nuclear translocation in beraprost-induced antiproliferation of murine aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2009**, 297, 321-329
137. Şekeröglü MR, Şahin H, Dülger H, Algün E. The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type-2 diabetes mellitus. *Clin Biochem.* **2000**, 33, 669-674
138. Takabayashi T, Vannier E, Clark BD. A new biologic role for C3a and C3a des Arg: Regulation of TNF- α and IL-1 β synthesis. *J Immunol* **1996**, 156, 570-583
139. Taysi S, Polat F, Gul M, Sari RA, Bakan E. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International.* **2002**, 21, 200-204
140. Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14,TLRs and the LPS-activation cluster, *Trends in Immunology* **2002**, 23
141. Trifilieff A, Bench A, Hanley M, Bayley D, Campbell E, Whittaker P. PPAR- α and - γ but not - δ agonists inhibit airway inflammation in a murine model of asthma: in vitro evidence for an NF- κ B independent effect. *British Journal of Pharmacology*, **2003**, 139, 163-171
142. Uzunismail H. Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar ve gastrik toksisite. *Endoskopi.* **2003**, 14, 7-9
143. Van Haften RI, Evelo CT, Penders J, Eijnwachter MP, Haenen GR, Bast A. Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by tocopherols and alpha-tocopherol derivatives. *Biochim Biophys Acta.* **2001**, 1548, 23-28
144. Vane JR, Botting RM. New sights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res*, **1995**, 44, 1-10
145. Villar J, Maca-Meyer N, Pérez-Méndez L, Flores C. Bench-to-bedside review: Understanding genetic predisposition to sepsis *Critical Care* **2004**, 8, 180-189
146. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine reviews*, **2004**, 25, 612-628
147. Wall EA, Zavzavadjian JR, Chang MS, Randhawa B, Zhu X, Hsueh RC, Liu J, Driver A, Bao XR, Sternweis PC, Simon MI, Fraser ID. Suppression of LPS-induced TNF-alpha production in macrophages by cAMP is mediated by PKA-AKAP 95-p105. *Sci Signal.* **2009**, 16, 28.
148. Wang X, Zalcenstein A, Oren M. Nitric oxide promotes p53 nuclear retention and sensitizes neuroblastoma cells to apoptosis by ionizing radiation. *Cell Death Differ.* **2003**, 10, 468-476
149. White AJ, Gompertz S, Stockley RA. Chronic obstructive pulmonary disease. 6: The aetiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* **2003** 58, 73-80
150. Wondwossen A, Abdulaziz A, Alghaithy A, Kenneth PJ, Simon KJ. Surfactant lipids regulate LPS-induced interleukin-8 production in A549 lung epithelial cells by inhibiting translocation of TLR4 into lipid raft domains. *Journal of Lipid Research* **2010**, 51
151. Wong W, Scott JD. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2004**, 5, 959-970
152. Wu S, Duan S, Zhao S, Cai Y, Chen P, Fang X. Atorvastatin reduces lipopolysaccharide-induced expression of cyclooxygenase-2 in human pulmonary epithelial cells. *Respir. Res.* **2005**, 27, 6-10

153. **Yazgan AS**, *Enterobacter Cloacae* ve *Enterobacter Aerogenes* türlerinden elde edilen lipopolisakkarit yapısındaki endotoksinlerin bazı hastane enfeksiyonları üzerine etkileri. *Yük.Lis.Tezi*. Gebze Yük.Tek.Enst. Mühendislik ve Fen Bil. Enst. Gebze, **2010**
154. **Yeh CH, Cho W, So EC, Chu C, Lin MC, Wang JJ, Hsing CH**. Propofol inhibits lipopolysaccharide-induced lung epithelial cell injury by reducing hypoxia-inducible factor-1 α expression. *British Journal of Anaesthesia* **2011**, 106, 590-599
155. **Young IS, Woodside JV**, Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, **2001**, 54, 176-186
156. **Zhang L, Wu C, Zhao S, Yuan D, Lian G, Wang X, Wang L, Yang J**. Demethoxycurcumin, a natural derivative of curcumin attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of intracellular ROS-related MAPK/NF- β signaling pathways in N9 microglia induced by lipopolysaccharide. *Int. Immunopharmacology*, **2010**, 10, 331-338
157. **Zhang LY, Zou JJ, Liu ZM**. Effects of beraprost sodium, a prostaglandin I(2) analog, on high glucose-induced proliferation and oxidative stress in a rat glomerular mesangial cell line. *Pharmacology*. **2011**, 87, 350-358

8. ÖZGEÇMİŞ

Sinan VICIL, 1977 yılında Giresun'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Urfa ve Eskişehir'de, lise öğrenimini ise 1994 yılında Isparta Şarkıkaraağaç Veteriner Sağlık Meslek Lisesinde tamamlayarak Tarım Bakanlığı bünyesinde çalışmaya başladı. 2002 yılında Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesini, 2005 yılında ise Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2006 yılında aynı kürsüde doktora eğitimine başladı.