



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**AKCİĞER KONTÜZYONU OLUŞTURULAN RATLARDA
DEKSAMETAZON VE L-NAME'İN AKUT AKCİĞER
HASARI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

Doktora Tezi

Dr. Ahmet KOZAN

**Samsun
Haziran-2015**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**AKCİĞER KONTÜZYONU OLUŞTURULAN RATLARDA,
DEKSAMETAZON VE L-NAME'İN AKUT AKCİĞER
HASARI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

Doktora Tezi

Dr. Ahmet KOZAN

Danışman

Prof. Dr. Nermin KILIÇ

**Samsun
Haziran-2015**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

..... tarafından Yrd. Doç. Dr. /Doç. Dr. /Prof. Dr.
..... Danışmanlığında hazırlanan
..... başlıklı bu
çalışma jürimiz tarafından /.... /.... tarihinde yapılan sınav ile
..... Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS / DOKTORA Tezi
olarak kabul edilmiştir.

Başkan :
(Ünvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /.....

Ünvanı Adı SOYADI
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, kıymetli bilgi ve deneyimlerinden faydalanarak bugünlere gelmemi sağlayan değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Nermin KILIÇ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Ramazan AMANVERMEZ, Sayın Prof. Dr. Abdülkerim BEDİR, Sayın Doç. Dr. Bahattin AVCI, Sayın Doç. Dr. Birşen BİLGİCİ, Sayın Yrd. Doç. Dr. Özgür KORHAN, Sayın Yrd. Doç. Dr. Ali OKUYUCU'ya içtenlikle teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım da emeği geçen Sayın Prof. Dr. Tolga GÜVENÇ, Sayın Doç. Dr. Ahmet GÜZEL, Sayın Doç. Dr. Hasan ALAÇAM ve Sayın Uzman Dr. Mehmet AÇIKGÖZ'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında her türlü desteklerini hep hissettiğim değerli arkadaşlarım Uzman Dr. Uğur DÜZ, Uzman Dr. Mesut KILIÇOĞLU, Uzman Dr. Sedat GÜLTEN, Dr. Yasemin KÜÇÜK ve Mustafa Kulbay, Ufuk Gör, Canan Külcü ve Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Her zaman bana destek olan eşim Betül KOZAN ve ailemin neşe kaynakları Asım ve Nihal'e sonsuz sevgilerle.

Çalışmanın etik kurul izni; Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 24.09.2013 tarih ve 2013/45 numara ile alındı.

Projenin desteklenmesi; TÜBİTAK tarafından 12.02.2014 tarih ve 114S008 proje numarası ile desteklendi.

ÖZET

AKCİĞER KONTÜZYONU OLUŞTURULAN RATLARDA DEKSAMETAZON VE L-NAME'İN AKUT AKCİĞER HASARI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ

Amaç: Akciğer kontüzyonlu hastalarda yapılmakta olan tedavilere katkıda bulunmak amacıyla pulmoner kontüzyon sonrası oluşan akciğer doku hasarını azaltmak için potansiyel anti-enflamatuvar ajan olan dexametazon ile bir NOS inhibitörü olan L-NAME'nin tedavide etki düzeyi araştırılacak. Aynı zamanda CC-16 ve YKL-40'ın akciğer kontüzyonunda diagnostik ve prognostik bir parametre olarak yeri değerlendirilecektir.

Materyal ve Metot: Araştırma kapsamında 8 farklı deneysel rat grubu oluşturuldu. Her biri 10 adet 250-300 gr olan Sprague-Dawley cinsi ratlara Raghavendran'ın tanımladığı akciğer kontüzyon modeli uygulandı. Kontüzyon sonrası verilen tedaviye bağlı serumda; YKL-40, TNF- α ve IL-10 düzeylerinin tayini ELISA yöntemi ile akciğer dokusunda; iNOS ve CC16 analizi ise immünohistokimyasal olarak gerçekleştirildi.

Bulgular: Deksametazon ve L-NAME uygulaması, kontüzyon gruplarında iNOS seviyesini azaltmaktadır. DXM, sham gruplarında YKL-40 ve IL-10 sentezini artırırken, kontüzyon oluşturulan gruplarda daha çok artırdığı tespit edildi. L-NAME, akciğer kontüzyonunda IL-10 artışı yapmaktadır.

Sonuç: Steroidlerin akciğer dokusunda, YKL-40 ve IL-10 ve CC-16 sentezini artırmasının akciğer kontüzyonunda pnömöni, ALI/ARDS ve sepsis oluşmasının önlenmesi bakımından değerlidir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kontüzyon; CC-16; Deksametazon; iNOS; L-NAME; YKL-40

Ahmet KOZAN, Doktora Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Haziran-2015

ABSTRACT

THE EFFECTS OF DEXAMETHASONE and L-NAME ON ACUTE LUNG INJURY IN RATS WITH LUNG CONTUSION

Aim: Potential anti-inflammatory agent dexamethasone with the NOS inhibitor L-NAME treatment effect level was investigated because contribute to the treatment which is performed in patients with pulmonary contusion. CC-16 ve YKL-40 were evaluated as diagnostic ve prognostic parameters in the lung contusions.

Material and Method: 8 different experimental rat groups each 10 number were formed for research. Contusion model that Raghavendran the defined was created to sprague-dawley rats that each 250-300 gr weight. YKL-40, TNF- α ve IL-10 levels by ELISA assay in serum; NOS and CC16 analysis was performed by immunohistochemistry in tissue.

Results: The level of iNOS is reduced by dexamethasone and L-NAME in contusion groups. Synthesis of YKL-40 and IL-10 are increased by Dexamethasone in lung contusion groups more than sham groups. IL-10 is increased by L-NAME in lung contusion.

Conclusion: YKL-40 and IL-10 and CC-16 synthesis are increased by steroids in the lung tissue. Thus it can prevent development of pnomoni, ALI/ARDS and sepsis after lung contusion.

Keywords: CC-16; Dexamethasone; iNOS; L-NAME; Lung Contusion; YKL-40

Ahmet KOZAN, Ph. D. Thesis
Ondokuz Mayıs University - Samsun, June-2015

SİMGELELER VE KISALTMALAR

ALI	Acute Lung Injury (Akut Akciğer Hasarı)
AP-1	Activator Protein-1
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BAL	Bronkoalveolar Lavaj
BASC	Bronchioalveolar Stemcell
BH4	Tetrahidrobiopterin
BOOP	Bronchiolitis Obliterans Organizing Pneumonia
CaM	Kalmodulin
CC-16	Clara Cell Protein-16
CHI3L1	Chitinase-3-Like-1
CINC-1	Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1
CSF	Colony Stimulating Factor
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 10
DASC	Distal Airway Stem Cell
ECM	Ekstraselüler Matriks
ERK1/2	Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases 1/2
ES	Embryonic stem
GC	Glukokortikoid
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
GR	Glukokortikoid Reseptör

GRE	Glucocorticoid Response Element
DXM	Dexamethasone
ECM	Ekstraselüler Matriks
ExMacs	Exudative Macrophage
GFR	Glomerüler Filtrasyon Hızı
GSH	Glutatyon
HA	HyaluraN
HE	Hematoksilen-Eozin
HMGB1	High Mobility Group Box
HSP	Heat-Shock Protein
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule-1
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
IP	İntraperitoneal
IPF	İdyopatik Pulmoner Fibrozis
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LC	Akciğer Kontüzyonu (Lung Contusion)
L-NAME	N-Nitro, L-Arginin-Metil Ester
LPS	Lipopolisakkarit
MAP	Mitogen-Activated Protein Kinases
MIP-2	Macrophage Inflammatory Protein
MPO	Myeloperoksidaz

MSC	Mesenchymal Stem cell
M1	İnhibitör Tip Makrofaj
M2	İyileşme Tip Makrofaj
NLR	NOD-Like Receptor
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NR	Nükleer reseptör
PRR	Pattern-Recognition Receptor
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PGE2, PGI2	Prostaglandin E2/I2
RANKL	Receptor Activator of NF-kB Ligand
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
SP-D	Surfaktan Protein D
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TLR	Toll-Like Receptor
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör
TNFR	TNF- α Reseptörleri
vWf	von Willebrand factor

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akciğer	3
2.1.1. Akciğer Hücre Yapısı	3
2.1.2. Gaz Değişim Fonksiyonu	4
2.1.3. Bariyer Fonksiyonu	4
2.1.4. İmmünmodülatör Fonksiyon	5
2.2. Künt Göğüs Travması	6
2.3. Akciğer Kontüzyonu	7
2.3.1. Epidemiyoloji	7
2.3.2. Kontüzyon Hasarı Oluşturan Etki	7
2.3.3. Patofizyoloji	8
2.3.4. Histopatoloji	8
2.3.5. Oksidatif Stres	9
2.3.6. Akut İnflamasyon	9
2.3.7. Apoptozis	10
2.3.8. Akciğer Kontüzyonunda Toll-Like Reseptör	10
2.3.9. Tip II hücre ve surfaktan	11
2.3.10. Akciğer Kontüzyon Modelleri	11
2.4. ALI/ARDS	12

2.4.1.	Epidemiyoloji ve Tanım.....	12
2.4.2.	Histopatoloji.....	13
2.4.3.	Patofizyoloji.....	13
2.4.4.	İnflamasyon.....	14
2.4.5.	Tamir ve Remodelling.....	14
2.5.	İmmün Sistem	15
2.5.1.	Sınıflandırma.....	16
2.5.2.	Travma-İndüklü Sinyal Molekülleri.....	16
2.5.3.	Kompleman Sistem	17
2.5.4.	Nötrofiller.....	17
2.5.5.	Monositler	17
2.5.6.	Makrofajlar.....	17
2.6.	Steroid.....	18
2.6.1.	Tanım	18
2.6.2.	Etki Mekanizması.....	18
2.6.3.	Deksametazon	20
2.6.4.	Steroidler ve Akciğer Hasar Tedavisi	21
2.7.	CC16	21
2.7.1.	Clara Cell	21
2.7.2.	CC16 Yapı ve Fonksiyonu	22
2.7.3.	CC16 ve Sirkülasyon.....	22
2.7.4.	Biyomarkır olarak CC16.....	22
2.8.	YKL-40	23
2.8.1.	Memeli Kitinazları ve Kitinaz-Like Proteinler	23
2.8.2.	Tanım ve Yapı.....	24
2.8.3.	Biyolojik Aktivitesi.....	24

2.8.4.	YKL-40 Sinyal Yolağı.....	25
2.8.5.	YKL-40 ve Hastalıklar ile İlişkisi.....	26
2.9.	IL-10.....	27
2.9.1.	Tanım ve Yapı.....	27
2.9.2.	IL-10 gen ve proteini.....	27
2.9.3.	Biyolojik etki.....	28
2.9.4.	IL-10 aktivasyon yolağı.....	28
2.10.	TNF- α	28
2.10.1.	Tanım.....	28
2.10.2.	TNF- α gen ve protein yapısı.....	29
2.10.3.	TNF- α 'nın rolü.....	29
2.11.	Nitrik Oksit Sentaz (NOS).....	30
2.11.1.	Nitrik Oksit (NO).....	30
2.11.2.	Nitrik Oksit Sentaz Tanım.....	33
2.11.3.	NOS Yapısı.....	33
2.11.4.	eNOS.....	35
2.11.5.	nNOS.....	35
2.11.6.	iNOS.....	35
2.11.7.	NOS yerleşimi.....	35
2.11.8.	NOS İnhibisyonu.....	36
2.11.9.	L-NAME.....	37
3.	MATERYAL METOD.....	38
3.1.	Kontüzyon Modeli.....	38
3.2.	Yöntem.....	39
3.3.	Kullanılan Malzemeler ve Hazırlanması.....	40
3.3.1.	İlaçlar.....	40

3.3.2.	Kitler	40
3.4.	Çalışma.....	41
3.4.1.	IL-10.....	41
3.4.2.	TNF- α	43
3.4.3.	YKL-40	45
3.4.4.	Hematoksilen-eozin.....	47
3.4.5.	İmmunohistokimya (iNOS ve CC16).....	47
3.5.	İstatiksel Analiz.....	48
4.	SONUÇLAR	49
5.	TARTIŞMA	57
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
KAYNAKLAR		63
ÖZGEÇMİŞ.....		92

1. GİRİŞ

Künt göğüs travması sonrası akciğer kontüzyonunda aşırı inflamatuvar reaksiyon gelişmesi ALI/ARDS, pnömöni, multiple organ yetersizliği ve ölümlerle sonuçlanabilmektedir (Dewar ve ark., 2009). ALI/ARDS gelişimine bağlı yüksek morbidite ve mortaliteyi azaltmak için hayvan ve klinik çalışmalar, akciğer kontüzyonu patogenezinde katkıda bulunan inflamatuvar mekanizmayı anlama üzerinedir (Raghavendran ve ark., 2009).

ALI hasar sonrası, ilk 7 günü takiben eksüdatif fazdan proliferatif faza geçiş olmakta, bunu fibrotik faz takip etmekle birlikte bu fazlar iç içe geçmiş durumdadır (MacCallum ve Evans, 2005; Bhargava ve Wendt, 2012). Proliferatif faz; travma, akciğer kontüzyon hasarı, kronik akciğer hastalıkları ve ALI/ARDS'de önem arz etmektedir. Post-kontüzyon 7. günde; bronşiyoller çevresinde fibrozis varlığı, insan ARDS erken fibroproliferatif fazdaki patolojiyle kavramsal olarak ilişkilidir (Raghavendran ve ark., 2005; Matute-Bello ve ark., 2008).

Akciğer kontüzyonunda; kemokinler (CINC-1 ve MIP-2) ve sitokinler (IL-6, IL-1 β) genel olarak 24 ve 48 saatte yüksek seviyede iken bütün inflamatuvar mediyatör konsantrasyonları, 7. günde temel düzeyine dönmektedir (Raghavendran ve ark., 2005; Matute-Bello ve ark., 2008). ALI, inflamasyon 7. gün nötrofil-dominant iken bu günden sonra lenfosit ve makrofaj-dominant inflamasyon oluşmaya başlamaktadır. 7. gün kollajen miktarı ve nitrik oksidatif stres pik yaparak sabit düzeye geçmektedir (Lee ve ark., 2010). Akciğer kontüzyonu, farklı kompartımandaki monosit ve makrofajların immüdisfonksiyonuna sebep olabilmektedir. Makrofajlardaki bu gecikmiş bozukluk ARDS ve pnömöni gelişmesine sebep olmaktadır (Perl ve ark., 2005). Non-infeksiyöz akciğer hasar sonrası, ExMacs 7. gün pik yapmaktadır. Hyalüran (HA) fragmantları ile stimülasyon sonrası anti-fibrotik kemokin (CXCL10) üretmektedirler (Tighe ve ark., 2011).

Akciğer kontüzyonu, akciğer parankiminde hasar sonucu alveol duvarlarının bozulması ile karakterizedir. Bu hasar sonucu alveoler boşlukta ödem ve kan toplanması ile akciğer yapı ve fonksiyon kaybı meydana gelir. Sonuçta artmış pulmoner vasküler rezistans, azalmış akciğer kompliyansı ve azalmış gaz değişimi olmaktadır.

Akut akciğer hasarı; pulmoner parankimde inflamatuvar cevap artışı ile karakterizedir. Enflamatuvar cevapta; kan lökositlerinin birikimi, doku makrofajlarının aktivasyonu, sitokin, kemokin, oksijen radikalleri, araşidonik asit metabolitlerinin seri üretimi sözkonusudur.

Akciğer kontüzyonu; pnömöni, akut akciğer hasarı ve akut solunum sıkıntısı sendromu (ALI/ARDS) gelişimi için önemli risk faktörü olup %10-25 arası yüksek mortaliteye sahiptir.

Yoğun bakım ünitelerinde travma hastalarının önemli bir yüzdesini oluşturan akciğer kontüzyonu, ALI/ARDS gelişiminde önemli bir yüzdeye sahip olup bu hastalıkların tedavi maliyeti çok yüksektir. Gerek mortalitenin gerekse tedavi maliyetinin azaltılması ülke ekonomisine ve insan gücüne katkı sağlayacaktır.

Akciğer hasarını azaltmaya yönelik çalışmalar; (i) artmış inflamatuvar sitokin/kemokin üretiminin sinyal iletim yollarının yeniden düzenlenmesi (özellikle proinflamatuvar sitokinlerin azaltılması, nötrofil infiltrasyonunun bloke edilmesi) ve (ii) oksidatif hücre hasarını sınırlamaya yönelik oksidan/antioksidan dengenin onarımı olarak iki yönde odaklanmıştır.

Bu iki perspektif üzerinde temellendirdiğimiz çalışmamız da deneysel model olarak akciğer kontüzyonlu ratlarda, intraperitoneal yolla uygulanan bir anti-enflamatuvar ajan dexametazon ile bir anti-oksidan olan L-NAME'nin akut akciğer hasarı üzerine olan etkileri araştırıldı ve tedavi edici etkinliği değerlendirildi.

2. GENEL BİLGİLER

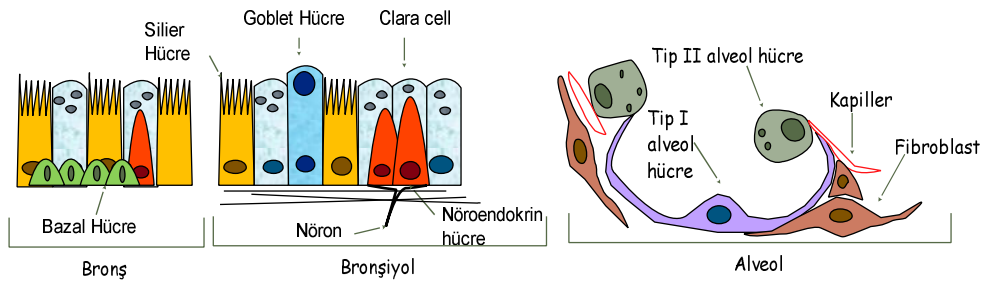
2.1. Akciğer

2.1.1. Akciğer Hücre Yapısı

Fonksiyonel respiratuvar sistem; proksimal bölgede trakea ve havayolları, distalde bronşiyoller ve alveollerden oluşmuştur (Rock ve Hogan, 2011). Akciğer; vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, epitelyal hücreler, pnömosit, club cell, nöron, bronşiyal düz kas hücresi ve makrofajlar dahil pek çok hücre tipini içermektedir.

Bronş epiteli; silier, goblet, bazal, nöroendokrin ve clara cell hücrelerini içermektedir (Fahy ve Dickey, 2010), (şekil 1). Silier hücreler; epitel yüzey çevresinin korunmasını sağlayan perisilier sıvı tabakanın düzenlenmesini, temizlenmesini sağlayarak çevresel zararlılara karşı doğal immünitide ilk adımı oluşturur. Goblet hücreler; epitelin apikal yüzeyine mukus sekrete eden granüler yapıda hücrelerdir. Distal havayollarında club cell olarak değişmiştir (Fahy ve Dickey, 2010). Clara cell hücreler; non-silier sekretuar hücreler olup çevresel zararlardan havayollarının korunmasını sağlar (Reynolds ve Malkinson, 2010).

Akciğer rejenerasyonuna katkı sağlayan hücreler; BASCs (bronchioalveolar stemcells), DASCs (distal airway stem cells), ES (embryonic stem) ve MSC (Mesenchymal stem cells) hücreleridir. Akciğer rejenerasyonunda akciğer “stem cell” hücrelerin katkısı, bu hücrelerin alveolar bölgeye göçmesi ve genişleme mekanizması ile olmaktadır (Weiss ve ark., 2011; Garcia ve ark., 2012; Xian ve McKeon, 2012).



Şekil 1: Respiratuvar sistem hücre tipleri

(Rock ve Hogan, 2011)'dan uyarlanmıştır)

Alveolar epitel; Tip I ve Tip II alveolar epitelyal hücrelerden (Tip I ve Tip II pnömosit olarak da adlandırılır) olup sırasıyla alveol yüzeyinin % 96 ve % 4'ünü işgal eder. Tip II hücreler, apikal mikrovili ve lameller cisimcik morfolojisi ile karakterize alveolar köşede lokalize kübik hücrelerdir (Mason, 2006).

2.1.2. Gaz Değişim Fonksiyonu

Alveolar bölge; insanın oksijen gereksinimi olan günlük 10-12 L hava değişimini karşılamak için kan ve hava arasında ilişki kurmak üzere yapılanmıştır. Balon benzeri alveolar komponentler, olgun akciğerde 500 milyon civarında olup inspirasyon süresince 150 m² yüzey alanı oluşturmaktadır.

Lokal anatomik organizasyonda; kapillerler alveolleri ayıran septaların içine akmakta, her kan damarı iki alveol ile kontak sağlayarak her taraftan bir beslenme sağlamaktadır. Nefes gazının difüze olduğu hava-kan bariyer kalınlığı 1-µm kalınlığındadır. Bu durum alveolar epitelyal hücrelerin morfolojik özelliklerinden kaynaklanmaktadır.

Alveolar yapı epitelyum tarafta kan-hava ara yüzey tarafından uygulanan yüzey gerilimi kollaps basınç üretir. Alveolar yüzey gerginliği, pulmoner sürfaktan tarafından düşürülmektedir (Guillot ve ark., 2013). Sürfaktan %90 lipid, %10 protein kompleks karışımı havayoluna sekrete olana kadar Tip II hücreleri laminar cisimciklerde ön-paketleme olmaktadır. Lipid sürfaktanın major yapısı %75 fosfatidil kolindir. Dört sürfaktan protein tanımlanmıştır; SP-A, SP-B, SP-C, SP-D (Agassandian ve Mallampalli, 2013). SP-A ve SP-D; hidrofilik kalsiyum-bağımlı lektinler olup doğal immün sistemde major rol oynar (Chronos ve ark., 2010). SP-B ve SP-C ise hidrofobik proteinler olup sürfaktanın fiziksel yapısı için esastır (Perez-Gil, 2008).

2.1.3. Bariyer Fonksiyonu

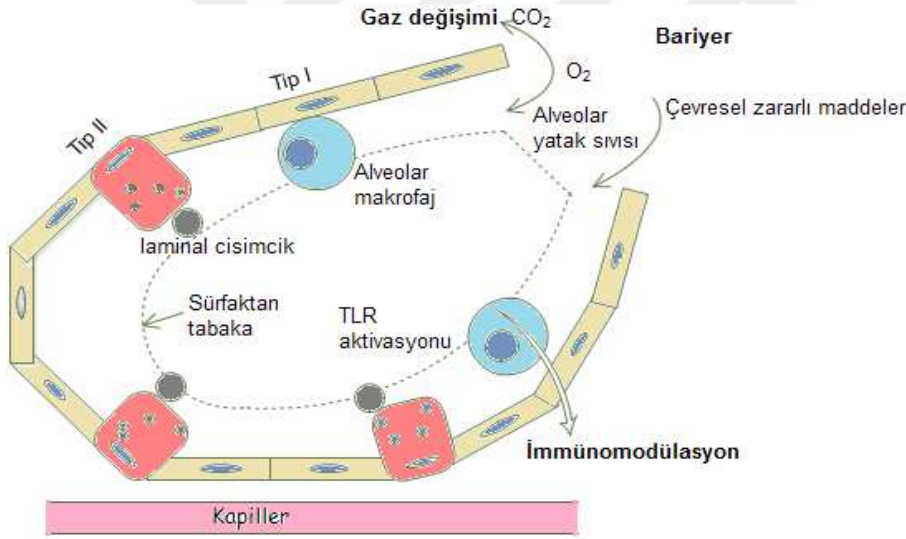
Akciğer epitelinin major rollerinden biri virüs, alerjen, bakteri gibi çevresel toksinler ve mikroorganizmalara karşı dokuyu savunmak için submukoza ve lümen arasında fiziksel bariyer görevi yapmaktır. Bu bariyerin korunması; alveolar boşluğa kan komponentlerinin infiltrasyonu ile oluşan ve bir basınç gradiyenti ile regüle edilen çok ince bir tabaka olan alveolar yatak sıvısı (ALF) tarafından sağlanmaktadır (şekil 2).

İntersitium komponent ve alveolar boşluk arasında moleküllerin transepitelyal paraselüler geçişi bariyer içindeki “tight junction” lar ile sağlanmaktadır.

Pulmoner mikrosirkülasyon ve akciğer intersitium içine alveolar boşluktan sıvı geçişi, çeşitli kanallar ve pompalar tarafından olmaktadır. Tip I ve Tip II alveolar epitelyum hücreleri; transepitelyal sodyum (Na^+), potasyum (K^+) ve klorür'e (Cl^-) geçiş izni veren transport proteinleri ile donanımlıdır. Aynı zamanda AQP (aquaporin) proteinleri de lokalize olup su geçişini sağlar (Toczyłowska-Maminska ve Dolowy, 2012).

2.1.4. İmmünmodülör Fonksiyon

Çeşitli inhale çevresel materyaller ve patojenlere karşı mekanik bariyer fonksiyonuna ek olarak alveolar epitelyal hücreler, akciğerin inflamatuvar cevabını aktive etmektedir. Alveolar epitel çeşitli zararlı durumlar altında sayısız moleköl sentezlemektedir (Thorley ve ark., 2011).



Şekil 2: Alveolar yapı

(Guillot ve ark., 2013)'dan uyarlanmıştır)

Akciğerler; süfaktan proteinlerin üretimi, IL-10 ve TGF- β sekresyonu ve apoptotik hücrelerin fagositozunu içeren bir dizi lokal işlevler ile inflamasyonun rezülasyonuna katılmaktadır (Takeda ve ark., 2003; Aono ve ark., 2012).

Havayolu epitel, hücre migrasyon ve proliferasyonunu da içeren tamir sürecini başlatmaktadır (Zahm ve ark., 1991).

2.2. Künt Göğüs Travması

Acil travma hatalarının %10'u künt toraks hasar olup, travmatik ölümlerin %25'ine de sebep olmaktadır (Locicero, 1989; Ziegler ve Agarwal, 1994).

Künt hasarlar; düşmeler, motorlu araç ya da motosiklet kazaları, yaya/araç çarpışmaları, patlamalar ve diğer künt kuvvet mekanizmaları sonucunda oluşmakta (Wanek ve Mayberry, 2004; Miller ve Mansour, 2007; Bernardin ve Troquet, 2012), toraks boşluğuna kuvvet transferi ile kaburgalar, sternum, plevral boşluk, intratorasik havayolları ve akciğer parankimi hasara uğrayabilmektedir. Bu hasarlar altta yatan mekanizmaya bağlı olarak kombine de olabilmektedir (Kiraly ve Schreiber, 2010; Bernardin ve Troquet, 2012). Örneğin plevral boşluktaki hasar sonucu; pnömotoraks, hemotoraks gelişebilmektedir.

Künt toraks hasar; intra-kraniyal, intra-abdominal, spinal, ekstremiteler, pelvik gibi çeşitli hasarlar ile kombine olabilen genel major travmadır.

Künt göğüs travması, uzamış mekanik ventilasyon ve organ yetersizliğini içeren %80 den fazla hastada respiratuvar komplikasyonlar (en önemlisi ALI) gelişmesi görülen bir durumdur (Miller ve ark., 2001). Hasar sonrası pnömöni gelişmesi mortalite için önemli risk faktörüdür (Battle ve ark., 2012). Kazayı takiben 2-3 gün içinde veya sonraki günlerde komplikasyon gelişmesi sıktır (Ahmad ve ark., 2010).

Künt göğüs hasarının nispeten yaygın olması, morbidite ve mortalite oranının yüksek olmasından dolayı komplikasyonlara katkı sağlayan faktörlere odaklanılmaktadır.

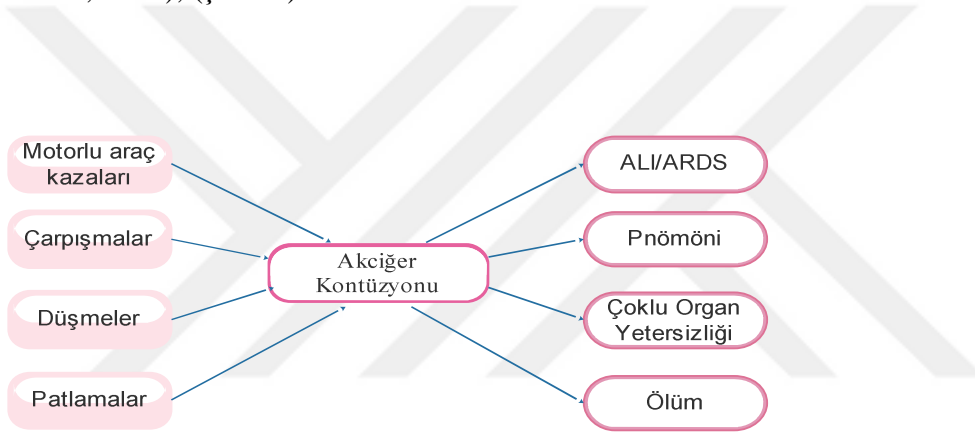
Klinik belirtilerin doğru tahmin edilememesi künt göğüs hasarında yaşam kurtarılamaması ile sonuçlanmaktadır (Dubinsky, 1997; Söderlund ve ark., 2014). Pulmoner sistem hasarının ilk değerlendirmelerde tanımlanması acil yaşam kurtarıcı olmaktadır (Bernardin ve Troquet, 2012; Brasel ve ark., 2013).

Akciğer kontüzyonu; künt göğüs hasarında sık gözükmektedir. Bu hasarlar; akciğer parankimi ve göğüs duvarına kompresyon veya hızlı yavaşlama kuvvetlerinden kaynaklanmaktadır. Sıklıkla da araç kazalarında olmaktadır (Bastos ve ark., 2008; Cohn ve DuBose, 2010; Hamrick ve ark., 2010; Plurad, 2011).

2.3. Akciğer Kontüzyonu

2.3.1. Epidemiyoloji

Akciğer kontüzyonu (LC) ilk olarak 1761 de Morgagni'nin rapor etmesiyle medikal literatüre girmiştir. Hastaneye kabul edilen akut travmaların 1/3'ü künt göğüs travması oluşturmaktadır. Akciğer kontüzyonu ALI/ARDS ve pnömöni gelişmesinde önemli bir riski faktörüdür (Cohn, 1997; Miller ve ark., 2001). Yapılan bir çalışmada akciğer kontüzyonlu hastalarda ARDS insidansı %35, pnömöni insidansı % 43 bulunmuştur (Miller ve ark., 2001). Diğer bir çalışmada; akciğer kontüzyonlu hastalarda pnömöni gelişme riski yüksek olup bu pupülasyondaki insidansı %20-40'dır (Hudson ve ark., 1995), (şekil 3).



Şekil 3: Akciğer kontüzyonu sebep-sonuç ilişkisi

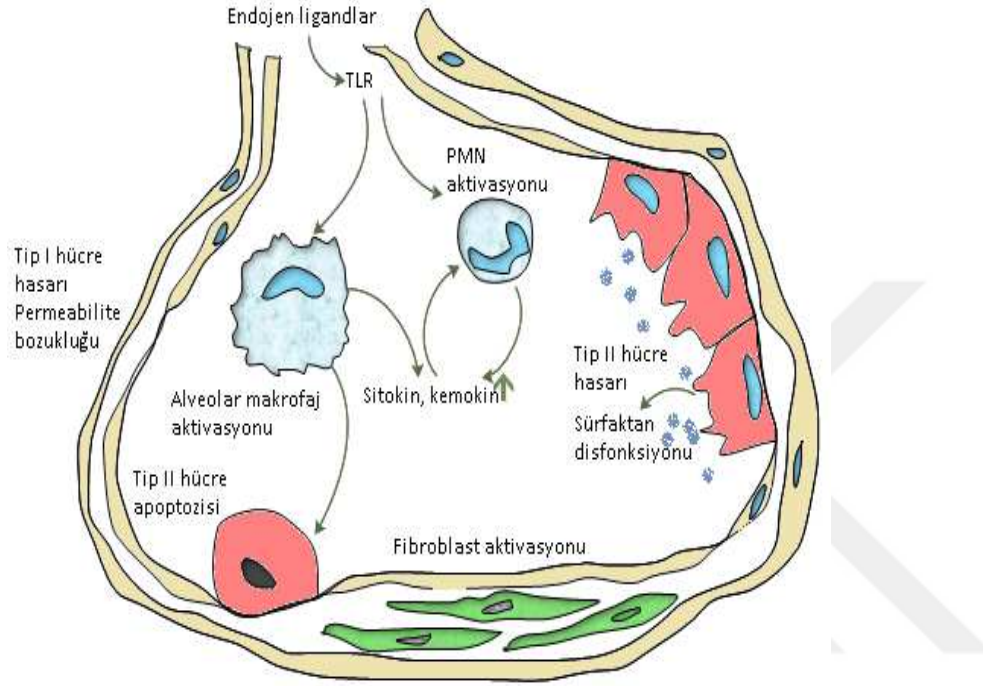
Akciğer parankimal hasar %20 (göğüs tomografisine göre) üzerinde ise ARDS gelişme riski %82'ye çıkmaktadır. Akciğer kontüzyonlu hastalarda sitokin serbestleşmesi ARDS insidansı ile orantılıdır. Akciğer kontüzyonunda sitokinlerin bu rolü terapötik uygulamalarda önemli olmaktadır (Miller ve ark., 2001).

2.3.2. Kontüzyon Hasarı Oluşturan Etki

Kavlama etkisi (spalling effect); shearing kuvvetler tarafından alveol ve havayollarının bozulmasıdır. Bu etki ile alveolar doku, ağır hiler yapılardan soyulmaktadır. İçten patlama etki (implosion effect); darbe sonrası basınç dalgasından alveol ve havayollarında gazın aşırı genişlemesine dokuların tepkisi olarak ifade edilmektedir (CLEMEDSON ve PETTERSSON, 1953).

2.3.3. Patofizyoloji

Akciğer kontüzyon patofizyolojisi; inflamasyon, artmış alveolo-kapiler permeabilite, pulmoner ödem, ventilasyon/perfüzyon dengesizliği, artmış intrapulmoner şant ve kompliyans kaybını içermektedir (Cohn ve Zieg, 1996), (şekil 4).



Şekil 4: Kontüzyon sonrası alveoldeki değişiklikler

(Raghavendran ve ark., 2009)'dan uyarlanmıştır

2.3.4. Histopatoloji

Akciğer kontüzyonunda; intraalveolar hemoraji, alveol bozulması, hemoraji gözlenmektedir. Postkontüzyondan 7 gün sonra intralüminal fibroplastik plaklar ve konjesyon odakları organize edilmekte ve respiratuvar bronşiyoller etrafında interstisyel fibrozis gözlenmektedir ki bu durum BOOP (bronchiolitis obliterans organizing pneumonia) ile mikroskopik özellikleri bakımından tutarlıdır. BOOP; havayolu ve alveolar kanal içine granülasyon dokusunun proliferasyonu ile karakterize bir durumdur (Epler, 2001).

2.3.5. Oksidatif Stres

Akciğer kontüzyonunda hipoksemi ve vazokonstriksiyon patogenezinde reaktif oksijen ve nitrojen türleri (ROS/RNS) önemli rol oynamaktadır. Akciğer kontüzyonundan sonra süperoksit ve peroksinitrit gibi ROS/RNS artışının antioksidan enzimler ile azaltılması kontraktiletiyi düşürmekte ve vazorelaksasyonu geliştirmektedir.

2.3.6. Akut İnflamasyon

Akut akciğer hasarı; pulmoner parankimde yoğun inflamatuvar cevap ile karakterizedir. Direkt veya indirekt tetiklenmeye karşılık olarak doğal inflamatuvar cevap sonucu, sitokin, kemokin, oksijen radikalleri, araşidonik asit metabolitleri, komplement ve koagülasyon kaskadı komponentlerini içeren bir dizi farklı mediyatörler üretilmektedir (Ward, 2003; Piantadosi ve Schwartz, 2004). LC-indüklü travmatik doku hasarında pulmoner inflamasyon sonucu alveolokapiller membran permeabilitesi artmakta ve endotelial ve epitelyal hücreler bozulmaktadır. Bu anormallikler alveolar ödem, sürfaktan disfonksiyonu, ventilasyon-perfüzyon bozukluğu, azalmış akciğer kompliyansı, volümü ve hipoksiye yol açmaktadır (Raghavendran ve ark., 2009).

Nötrofiller;

Nötrofil ilişkili LC hasar artışı mekanizması tamamen aydınlatılmamış olmakla birlikte alveolar epitelde nekrozis/apoptozis artışı üzerinden olmaktadır (Ward, 2003). Nötrofil-indüklü akciğer hasarı, sıklıkla oksidant aracılıdır ve bozulmuş alveolar sıvı transportu oluşturmaktadır (McAuley ve ark., 2004).

Makrofajlar;

Alveolar ve interstisyel içine nötrofil toplanması ve alveolar makrofajların aktivasyonu; proteinaz ve oksidantların serbestleşmesi ile alveolar epitelyum yıkımı ve pulmoner vasküler sızıntıya sebep olur (Liener ve ark., 2011; Seitz ve ark., 2011; Visser ve ark., 2011). Alveolar makrofaj aktivasyonu; inflamatuvar kaskad genlerini etkileyen NF-kB ve AP-1 (activator protein-1) nükleer translokasyonunu artırır (Guo ve ark., 2002). Bu yola zıt olarak STAT3 transkripsiyon faktör, inflamatuvar cevabın negatif düzenleyicisi olarak ortaya çıkar. IL-10; anti-enflamatuvar etkisini STAT3 yolağı ile yapmaktadır (Guo ve Ward, 2005; Tang ve ark., 2011).

2.3.7. Apoptozis

Özellikle Tip II pnömositlerdeki apoptozisin LC hasarın çözülmesi veya ilerlemesinde mekanik öneme sahiptir. Künt göğüs travmasından sonra alveolar Tip II hücreleri apoptozise uğramaktadır. Apoptotik hücreler travmatize alveollerde birikmektedir (Seitz ve ark., 2008). Apoptotik hücrelerin çıkarılması makrofaj ve dendritik hücreler gibi fagositlerce olmaktadır (Kurosaka ve ark., 2003). Makrofajlar apoptotik hücrelerle karşılaşınca IL-10 ve TGF-1 (transforming growth factor1) gibi anti-enflamatuvar sitokinler serbestleşmek de iken TNF- α veya IL-1 β gibi proinflamatuvar mediyatörler downregüle olmaktadır (Voll ve ark., 1997).

2.3.8. Akciğer Kontüzyonunda Toll-Like Reseptör

Alveolar epiteldeki TLR'ler çeşitli sitokinler ve akut faz proteinlerin aktivasyonunu sağlar (Jiang ve ark., 2005). Pulmoner kontüzyonda öncelikle TLR2 ve TLR4 aktive olmakta ve hasara inflamatuvar cevabta aracı olmaktadır. Noninfeksiyöz doku hasarına inflamatuvar cevapta TLR-aracılı sinyal yolağı rol alır. Endojen ligandlar, TLR2 aracılığı ile akciğer dokusuna nötrofil geçişini indüklenmektedir. TLR2 aktivasyonu ile kemokinlerin (CXCL1) ifadesi up-regüle edilmektedir (Hoth ve ark., 2007; Hoth ve ark., 2009). Non-infeksiyöz akciğer patogeneğinde TLR'nin biyolojik rolü; konak savunmada (Inoue ve ark., 2000), alerjik hastalıklarda (Hayashi ve ark., 2004) ve doku hasarı ve tamiri (Pons ve ark., 2006) alanlarında araştırılmaktadır.

TLR ligandları;

İnfeksiyöz ve noninfeksiyöz olarak iki gruba ayrıldığı gibi ekzojen ve endojen olarak da sınıflandırılmaktadır. İnfeksiyöz ligandlar; LPS, bakteri hücre duvarı komponentleri içermektedir. Noninfeksiyöz ligandlar; fiziksel akciğer hasarı ile açığa çıkmakta olup ekstraselüler matriks komponentleri, nekrotik hücrelerdir (Kaisho ve Akira, 2006; Noble ve Jiang, 2006).

Endojen TLR ligandları; çeşitli inflamatuvar proteinler ve peptidler (Hsp60) (Vabulas ve ark., 2001), High mobility group box 1 (HMGB1) (Park ve ark., 2001), bazı kolektin molekülleri (SP-A) (Guillot ve ark., 2002), memeli orjinli nükleik asitler (Barrat ve ark., 2005), glikozaminoglikanların yıkım ürünleridir (hyalüran, HA) (Termeer ve ark., 2002).

Doku hasarı süresince ekstraselüler matriks (ECM) turnover artmaktadır (Laurent, 1998). Çözünbilir (soluble) HA makrofajları aktive ederek sitokin ve kemokinlerin üretimini stimüle eder ve hasar bölgesine inflamatuvar hücrelerin birikmesini sağlar (Jiang ve ark., 2006).

IL-6, IL-1 β ve kemokinler (MCP-1/CCL2, MIP-2, CINC-1/GRO/CXCL1) 24 saatte pik yaparken post kontüzyon 7. gün baseline düşmektedir (Raghavendran ve ark., 2005). 7. gün MCP-1 deki artış mortalite ile direkt ilişkilidir (Rosseau ve ark., 2000). Bu durum akut akciğer hasarı başlamasında mekanik önemdedir.

7. gün oksijenasyon (PaO₂/FiO₂), P-V mekanizması, albümin ve hücre sayısı normalize olmaktadır. Akciğer volüm azalması ve kompliyans 24. saatte maksimum düzeyde olmaktadır. Bu mekaniksel bozukluk, surfaktan disfonksiyonu varlığını gösterip havayollarına albümin geçişi ve alveolar ödem oluşması birliktelik göstermektedir (Raghavendran ve ark., 2005). LC volümü ve hipoksi arasında korelasyon derecesine dair çelişkili raporlar vardır (Miller ve ark., 2001; Christin ve ark., 2003).

2.3.9. Tip II hücre ve surfaktan

Tip II hücreler surfaktan üretimi ve metabolizmasından sorumlu olup pulmoner inflamasyon düzenlenmesinde çok önemdedir (Wright, 2004). Surfaktan kompozisyon, yapı ve aktivitesindeki anormallikler ARDS/ALI hastalarında iyi tanımlanmakla birlikte bu hastalarda ekzojen surfaktan verilmesi tedavide yarar sağlamaktadır.

2.3.10. Akciğer Kontüzyon Modelleri

İlk tanımlanan modellerden ultrasonik blast dalga ile hasar yapılarak oluşturulan model (Knofel ve ark., 2003), silindirik ağırlık düşürülerek sağlanan Raghavendran modeli (Raghavendran ve ark., 2005; Raghavendran ve ark., 2008), Hoth ve arkadaşlarının (2007) yayınladığı elektriksel kortikal darbe ile yapılan modeli (Hoth ve ark., 2007) içermektedir.

2.4. ALI/ARDS

2.4.1. Epidemiyoloji ve Tanım

1967 yılında Asbaugh ve arkadaşlarının tanımlanan ARDS (Ashbaugh ve ark., 1967), “American-European Consensus Conference Committee” tavsiyesi ile ALI/ARDS üzerinde isim birliği sağlandı.

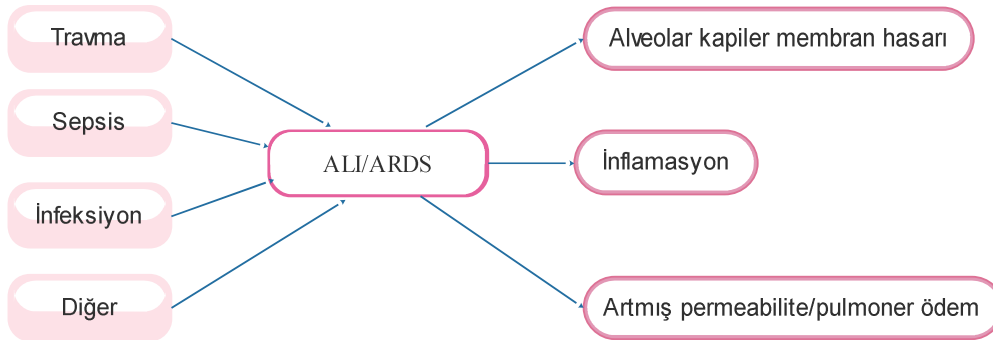
Göğüs radyografisinde difüz bilateral pulmoner infiltratlar, akut başlangıç, ALI için $PaO_2/FiO_2 \leq 300$, ARDS için $PaO_2/FiO_2 \leq 200$ ve pulmoner arter wedge basıncı (PAWP) ≤ 18 olması teşhis için gereklidir (Bernard ve ark., 1994).

ARDS mortalite oranı 1980’li yıllarda % 64-70 iken son çalışmalar bu oranın %19-42’ye düştüğünü göstermekle birlikte strateji mortaliteyi düşürme üzerine kurulmuştur (Villar ve Slutsky, 1989; Zambon ve Vincent, 2008; Erickson ve ark., 2009).

Akut akciğer hasarlı hastaların çoğu 7-10 gün içinde belirlenmektedir. Bu zamana kadar hastaların yarısı ölmekte veya tedavi kesilmektedir (Brower ve ark., 2000).

Uluslararası konsensus tarafından yapılan sınıflamada, ARDS saptamada 7. günden önce akut başlangıç bulunmaktadır (Bernard ve ark., 1994).

Hastalığın oluşmasını sağlayan klinik faktörler; sepsis, pnömöni, travma, pankreatitis, kan transfüzyonu, toksik gaz inhalasyonudur (Ware ve Matthay, 2000), (şekil 5).



Şekil 5: ALI/ARDS sebep-sonuç ilişkisi

2.4.2. Histopatoloji

Erken akut akciğer hasarı nötrofilik alveolar infiltrasyon, hemoraji, protein-zengin pulmoner ödemin oluşturduğu histopatoloji ile karakterizedir. Oksidan stres ve proteaz aktivitenin artmasıyla, surfaktan üretiminin düşmesinden dolayı atelaktazi çok yaygındır. Elastaz, akciğer yapısında alveolar-kapiler ve epitelyal-hücre hasarı oluşturur.

2.4.3. Patofizyoloji

ALI; endotel ve epitelyal bariyerin dağılmasına sebep olan akut enflamasyon bozukluğudur. Akut akciğer hasarı erken fazında inflamatuvar selüler infiltrasyon ve akciğer içine ödem sıvısı birikimi, ventilasyon-perfüzyon uyumsuzluğuna yol açmakta, sonuçta hipoksemi tablosu oluşmaktadır. Akut akciğer doku hasarı; alveolar-kapiler membran bütünlüğünün kaybı, transepitelyal nötrofil migrasyonunun artması gibi selüler özellikler ve pro-inflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , TGF- β), araşidonik asit metabolitlerinin serbestleşmesi ile açığa çıkan soluble komponentler ile karakterizedir (Matthay ve Zimmerman, 2005).

Mikrovasküler endotel hasar artmış kapiler permeabiliteye yol açar. Permeabilite değişikliği protein-zengin sıvınının peribronşiyovasküler intersitisyum içine efüzyonuna yol açar. Endotelial hasar tespiti için vWf (von Willebrand factor) ve ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) üzerine çalışmalar mevcut (Flori ve ark., 2007; Calfee ve ark., 2009). Transepitelyal nötrofil migrasyonu, inflamasyonun primer faili olarak ALI'nın önemli bir özelliğidir. Nötrofiller hasar oluşturan pro-apoptotik ve pro-inflamatuvar mediyatörleri serbestleştirmektedir (Zemans ve ark., 2009). Nötrofil infiltrasyonu, akut inflamasyonun önemli belirteçidir. Nötrofil ürünleri; elastaz, kollojenaz, ROS ve sitokinler ARDS'li hastalarda artış yapmaktadır. Elastazlar ise ekstraselüler matriks yıkımını gerçekleştirmektedir (Dos Santos, 2008).

ALI ilerlemesinde önemli rol oynayan makrofajlar çeşitli mediyatörlerin salınımını sağlayarak dramatik proliferatif cevap oluşturmaktadır. Proinflamatuvar mediyatörler (IL-1 β , IL-4, IL-13) ve growth faktörler (TGF- α , TGF- β , epidermal growth faktörler) sekrete etmektedir (Reynolds, 2005). IL-6, IL-8 ve TNF- α 'nın plazma düzeyinin dirençli yüksekliği, güçlü mortalite tahmini oluşturmaktadır (Meduri ve ark., 1995; Parsons ve ark., 2005).

Biri diğere tigt junction ile bağı Tip I ve Tip II hücreler epitelyal bariyeri oluşturur. Akciğer hasarının akut fazı boyunca membran permeabilitesindeki artış protein-zengin sıvının alveolar boşluğa geçmesine yol açar. Aynı zamanda bu hücrelerdeki hasar Na⁺ kanalları ve Na⁺/K⁺ ATPaz pompasında bozukluğa yol açar (Ware ve Matthay, 2000). Epitelyal tamir sürecinde Tip II hücrelerin fonksiyon kaybı, disorganizeye ve fibrozise yol açar (Bitterman, 1992).

Endotoksin, ozon maruziyeti, akut hipoksik asit aspirasyonu, bleomisin verilmesi ve diğere değışikliklerin sebep olduğı ALI/ARDS deki endotelyal hasar ve oksidatif streten NO/iNOS sorumlu olduğına dair pek çok çalışma bulunmaktadır (Kristof ve ark., 1998; Evgenov ve ark., 2000; Inoue ve ark., 2000; Wang ve ark., 2002; Agorreta ve ark., 2003; Razavi ve ark., 2004; Genovese ve ark., 2005).

2.4.4. İnflamasyon

ARDS'de tanımlanan üç faz; inflamatuvar veya eksudatif, proliferatif ve fibrozisdir. Eksudatif faz; difüz alveolar hasar ile karakterize, epitelyal ve endotelyal hücrelerden serbestleşen faktörler hücre ölümü ve hasarı oluşturmaktadır. Alveollerin proteinöz eksuda ile dolması sonucu gaz değışimi bozulmaktadır. Proliferatif faz; alveolar Tip II ve fibroblastlardaki fenotipik değışiklikler ve proliferasyon ile karakterizedir. Fibrotik faz; normal akciğer yapısının kaybolması ve difüz fibrozis ile karakterizedir.

Fibroproliferatif fazı eksudatif fazdan ayıracak spesifik bir özellik bulunmamaktadır. Akut akciğer hasar tedavisinde fibroproliferatif faz üzerinde odaklanılmıştır (Meduri ve ark., 1991; Meduri ve ark., 1994).

2.4.5. Tamir ve Remodelling

Son çalışmalar ALI/ARDS'da fibroproliferasyon gelişimi üzerine odaklanmaktadır. Bu yüzden fibroproliferasyon gelişimine katkıda bulunan hücresel ve soluble faktörler, matriks depozitleri, hücre ölümünü içeren remodelling ve tamir mekanizmasının anlaşılması önemlidir (Dos Santos, 2008). ARDS başlangıcında alveolit fibrozis süreci önem arz etmektedir (Marshall ve ark., 2000). İnflamasyon ve tamire katılan ALI genlerindeki transkripsiyonel cevap, hasar oluşumunda çok erken ve farklı ifade olmaktadır (Wesselkamper ve ark., 2005).

Pek çok mediyatör her iki süreçte de bulunur ki bu durum hasar ve tamir durumundaki çelişkileri iyi ortaya koymamızı gerektirmektedir. Alveolar membran soyulmanın olduğu difüz alveolar hasar, ARDS için karakteristiktir.

Tamir; doğal parankimal hücrelerin yenilenmesi ve defektlerin fibroblast doku ile doldurulması sürecidir. Verimli alveolar epitelyal tamir, fibrozis gelişimini düşürebilmelidir. Bozulmuş veya gecikmiş reepitelizasyon proliferatif kapasitenin kaybı, değişmiş apoptozis ya da inefektif alveolar hücre diferansiyasyon ve migrasyonu ile sonuçlanır.

Epitelyal tamir; alveolar Tip II hücreleri ile mezenkimal hücreleri de içeren çeşitli hücreler arasındaki etkileşim ve koordinasyonu sağlar. Endotelyal hücreler ve ekstraselüler matriks reepitelizasyon sürecinde alveolar boşluğa çeşitli soluble mediyatörlerin bırakılması ile koordinasyon sağlanmaktadır.

İnefektif tamir ve patojenik fibrozis; ciddi alveolar membran soyulmasından sonra apoptotik veya nekrotik ölümden kaynaklanan fonksiyon kaybı ile oluşmaktadır. ARDS çözümlenmesinde ve tamirinde mezenkimal hücrelerin apoptozisi temel işlev görür.

2.5. İmmün Sistem

İnflamasyon; yabancı antijen veya patojen algılanmasına fizyolojik cevaptır. İnflamatuvar stimulusa cevap olarak lökosit infiltrasyonu ve vasküler değişikliklerde sitokin, kemokin, adhezyon molekülleri, reseptörler ve enzimlerin artışı kritik adımlardır (Newton ve Dixit, 2012).

Memelilerde immün sistem, doğal ve kazanılmış immün sistem olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır. Doğal immün sistem doku hasarı veya enfeksiyona cevapta kritik önemdedir. PRRs (pattern-recognition receptors) aracılığı ile doğal immün sistem; PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) veya DAMPs (damage-associated molecular patterns) gibi korunmuş yapıların algılanması ile derhal aktive olmaktadır (Akira ve ark., 2006).

Kazanılmış immün sistem, immünolojik hafızanın yardımıyla antijen spesifik B ve T hücrelerince spesifik patojenlerin nötralize edilmesini ifade eden ikincil savunma hattı olarak hizmet görür (Pancer ve Cooper, 2006).

2.5.1. Sınıflandırma

1) Kazanılmış immün sistem; nispeten yavaştır ve antijen spesifiktir.
2) Doğal immün sistem; hızlıdır, reseptörler ve moleküller immün cevapta önemlidir. Doğal immün sistem mekanizması; major travmadan sonra saatler içinde inflamasyonun erken fazını başlatır (Keel ve Trentz, 2005). İnfeksiyöz patojenlere karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır.

a. Humoral doğal immün cevap

i. Komplement ve

ii. Koagülasyon kaskad sistemi

b. Selüler doğal immün cevap

i. Non-myeloid hücreler; çevresel etkiler ile indüklenen epitelyal hücreler ve fibroblastlar

ii. Myeloid hat hücreleri; nötrofil, eozinofil, bazofil, dendritik hücre, platelet, monosit, makrofaj gibi farklı fonksiyonu olan hücreleri içermektedir (Koenderman ve ark., 2014).

2.5.2. Travma-İndüklü Sinyal Molekülleri

Travmatik hasarda akut inflamatuvar cevabı indükleyebilir (Lippross ve ark., 2012). Travma-indüklü immün cevap, lokale sınırlı olabildiği gibi multiple hasarlı hastalarda massive sistemik immün aktivasyon ile de sonuçlanabilir (Stahel ve ark., 2009). Son yıllarda tanımlanan ve travmatik etki ile indüklenen “ilk vuruş (first hit)” olarak adlandırılan DAMPs bir cephane gibi immün hücrelerin reseptörleri tarafından tanınan tehlikeli sinyaller süper ailesidir (Kohl, 2006; Bianchi ve Manfredi, 2009). DAMP’lar; PAMPs ve “alarmins”leri indüklemektedir (Bianchi, 2007). “Alarmin”ler doku hasarından orjin alan non-patojen kaynaklı tehlikeli sinyallerdir. Alarminlerin klasik markırları; HSPs (heat-shock proteins), annexins, defensins, S100 protein ve HMGB1 (high mobility group box) proteindir. İmmünolojik komponentler; alarmin ve DAMP ları kendi yüzeylerindeki reseptörler (TLR gibi) ile tanır (Zedler ve Faist, 2006; McGhan ve Jaroszewski, 2012).

Doku travmasından sonra erken safha; nötrofil aktivasyonu, toplanması ve kompleman aktivasyonunu içeren immün sistemin selüler ve moleküler efektörlerinin aktivasyonu ile karakterizedir (Keel ve Trentz, 2005; Stahel ve ark., 2007).

2.5.3. Kompleman Sistem

Major enflamasyondan sonra erken fazda doğal immün sistemin önemli efektör temsilcisi olarak kompleman sistem gözükmektedir. Kompleman sistem; fagositoz ile patojenlerin kaldırılmasında kritik rol oynar (Stahel ve Barnum, 2006; Griffiths ve ark., 2010). Travma-indüklü akciğer inflamasyonunun patofizyolojisinde kompleman aktivasyon ürünleri (C5a gibi) önemli rol alır (Flierl ve ark., 2008).

2.5.4. Nötrofiller

Nötrofiller; erken posttravmatik immün cevabın “anahtar efektör” hücresi olarak kompleman aktivasyonu ile oluşturulan humoral immün cevaba hücrel karşılık olarak işlev görmektedir (Neher ve ark., 2011). Nötrofiller hasardan sonra dakikalar içinde ve birkaç gün, hasarlı dokunun temizlenmesinde ve immünolojik savunmada önemli rol alır. Sitokin, kemokin, ROS ve MPO gibi doku-toksik enzimlerin serbestleşmesini sağlar (Osterloh ve ark., 2009; Wink ve ark., 2011).

2.5.5. Monositler

İmmün cevapta büyük miktarda sitokin üretmektedirler. Karaciğerde kuppfer, akciğerde alveolar makrofajlar gibi çeşitli dokularda spesifik makrofajlara diferansiye olmaktadır (Terry ve Miller, 2014). Akut ve kronik inflamasyon süresince monosit popülasyonunda büyük değişiklikler olmaktadır. Bu değişiklikler, travma hastalarında inflamatuvar komplikasyonlarından dolayı akut inflamasyonda tanı aracı olarak kullanılmaktadır (Hietbrink ve ark., 2011; Hietbrink ve ark., 2013).

2.5.6. Makrofajlar

Monosit orjinli ve kandan farklı dokulara göç eden hücrelerdir. Belirli doku bölgelerinde spesifik monositler, lokal sinyallere cevap olarak doku makrofajlarını oluşturmaktadır. Sirkülasyonda iki benzersiz monosit topluluğu bulunmaktadır.

Temel monositler, akciğerdeki denge durumu (steady-state) şartlarında dokuya girer ve alveolar makrofajlara dönüşür. Buna karşılık inflamatuvar monositler, akciğer inflamasyonu sürecinde CCR2-bağımlı mekanizma ile aktif makrofajları (ExMac) oluşturmaktadır (Geissmann ve ark., 2003).

Makrofaj iyileşme-tip M2 ve inhibitör-tip M1 olarak da adlandırılır (Wynn ve ark., 2013; Mills ve Ley, 2014). M2 iyileşmeye cevapta ornitin ve büyümeyi uyarıcı moleküller aracılık ederken (Munder, 2009), M1/inhibitörde ise NO ve hücrel öldürme aktivitelerinin teşvik edilmesi aracılık eder (Nathan, 1992). Eğer yara steril ise makrofajlar NO üretimini durdurur, nötrofil migrasyonu sonlanır. M2/ornitin veya M1/NO yara iyileşmesinde ve konak savunmada önemli rol üstlenen efektör moleküllerdir (Mills ve ark., 2014).

2.6. Steroid

2.6.1. Tanım

Kortikosteroidler, glukokortikosteroidler (GC) ya da basitçe steroidler olarak da adlandırılmaktadır. Hava yolu hastalıklarının enflamasyon tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Barnes ve ark., 2006). Glukokortikoidlerin anti-enflamatuvar etkisi 1940 yılında tanımlanıp doğal veya sentetik anti-enflamatuvar olarak dünya genelinde reçete sınıfına girdi (Clark ve Belvisi, 2012).

GC'ler lipofilik yapısı dolayısıyla plazma membranından serbestçe difüze olmakta, ligand-bağımlı transkripsiyon faktörlerinin nükleer reseptör (NR) süper ailesi üyesi glukokortikoid reseptörün (GR) aktivasyonu ile etkilerini göstermektedir (Evans, 1988).

2.6.2. Etki Mekanizması

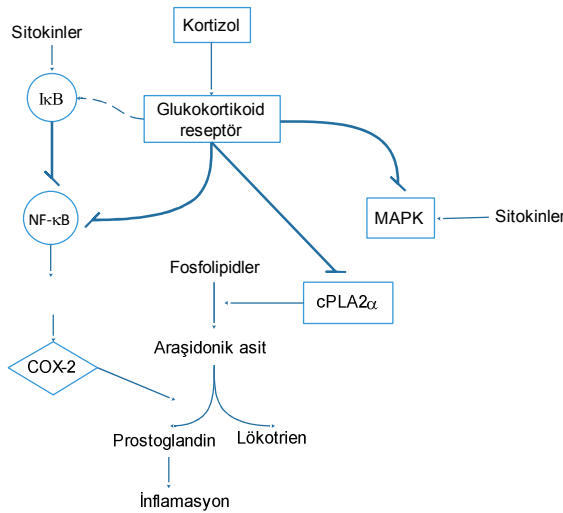
Kortikosteroidler; antienflamatuvar ve immünsupresif etki mekanizmaları içermektedir. Plazma ve mitokondriyal membran ile etkileşerek membran-bağlı proteinlerin aktivitelerini değiştirir. Sitozolik cGR bağlanarak inflamatuvar mediyatörler tarafından oluşturulan membran-bağlı fosfolipidlerin serbestleşmesi inhibe edilir. GC'ler, hemen hemen bütün immün sistem hücrelerinin aktivasyon durumu veya diferansiyasyonu etkileyebilmektedir. GC'ler spesifik hücrelerde immün sistem veya sistemik infeksiyonun hiperaktivasyonu ile selüler ve transkripsiyonel düzeyde etki eder.

Uzamış GC maruziyeti, makrofajlarda fagositik aktvitenin değişmesi ile anti-enflamatuvar cevabın uyarılması, doku tamiri ve apoptotik hücrelerin çıkarılması ile inflamasyonun çözülmesine katkıda bulunur (Busillo ve Cidlowski, 2013).

İnflamasyon fazı çeşitli kimyasal yolları içeren aktif bir süreçtir. İnflamatuvar bölgedeki nötrofil toplanmasının baskılanması, biyoaktif lipidlerin sekresyonu rezüstasyonda bazı anahtar işaretlerdir. GC'ler selüler ve moleküler düzeydeki bu süreçleri etkilemektedir (Serhan ve ark., 2007). GC'in aşırı konsantrasyonlarının çoğu sisteme zararlı olmasına rağmen fizyolojik düzeyi dokunun normal gelişimi için önemlidir (Henneicke ve ark., 2014).

GC, bazı dokularda reseptörlere bağlanmadan önce iki enzim ile etkileşim geçirir. Bunlar, 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaz tip 1 (11- β HSD1) ve tip 2 (11- β HSD2)'dir. İnaktive eden enzim (11- β HSD2), böbrekte GR reseptörlerinin aktivasyonunu önlerken aktive eden enzim diğer çoğu dokuda bulunmaz.

TLR1-10 (Toll-like receptors); PAMP etkileşim ve algılanmasında kritik rol oynar. TLR; AP-1, NF- κ B ve IRF, transkripsiyon faktörlerin aktivasyonunu sağlayarak sinyal kaskadını indükler. GC'ler, endojen inhibitörlerin (MKP-1) indüksiyonu veya AP-1, NF- κ B ve IRF inhibisyonu aracılığı ile TLR aracılı sinyali süprese eder (Chinenov ve Rogatsky, 2007). Proinflamatuvar moleküllerinin serbestleşmesi, inflamasyon süresince sinyal kaskadının başlaması ve AP-1 ve NF- κ B transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile olmaktadır. GC'lerin anti-enflamatuvar etkisiyle ilgili araştırmaların çoğu bu yolak üzerine kurulmaktadır (şekil 6).



Şekil 6: İnflamatuvar yollara glukokortikoidlerin etki mekanizması

(Bush, 2012)'den uyarlanmıştır.

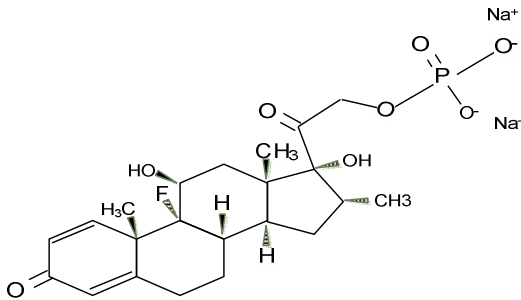
Kromatinde GC-bağlı reseptör kompleksini tanıyan bölge, GRE ve AP-1 (glucocorticoid response elements) ile etkileşerek transkripsiyonel fonksiyonunu gösterir. TNF- α ilişkili genler down regüle edilmektedir.

NLR (NOD-like receptors), PAMP ve DAMP'lerin her ikisine cevap oluşturan intraselüler PRR ailesinin bir üyesidir. GC'ler, özellikle makrofajlarda NLRP3 ekspresyonunu düzenler (Busillo ve ark., 2012). GC yüksek düzeyi RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) proteinlerinin üretimini stimüle etmektedir (Sivagurunathan ve ark., 2005).

Hızlı olan, non-genomik GC etkileri, son zamanlarda tanımlanmakla birlikte yolları az bilinmektedir. GC'lerin gen transkripsiyonunun düzenlenmesindeki pozitif veya negatif etkileri GC'e maruziyet ve konsantrasyona bağlı olarak gen transkripsiyonu dışında farklı durumları indüklemektedir (Strehl ve ark., 2011).

2.6.3. Deksametazon

Deksametazon glukokortikoid reseptörlere kortizolden daha etkin bağlanır. Geniş bir yan etki spektrumuna sahip olmasına rağmen hala en güvenilir ilaçlardan biridir. 9- α -flor, 16- α -metil, 21 fosfat grupları ile "A" halkasında 1 ve 2 karbon atomları arasında ekstra çift bağ içermektedir. Deksametazon sodyum tuzu hidrofilik özellik sağlar (Urbanska J ve ark., 2014) (şekil 7).



Şekil 7: Deksametazon 21-fosfat molekül yapısı

2.6.4. Steroidler ve Akciğer Hasar Tedavisi

Akut akciğer hasarının kortikosteroidler ile tedavisinde sağkalım yararı nadir olmasına rağmen, gaz değişimi ve hemodinamik stabilite açısından bazı yararlar sağlayabilmektedir (Wheeler ve Bernard, 2007).

Septik şokun eşlik ettiği erken ARDS hastalarında 7 gün düşük doz kortikosteroid kullanımının mortaliteyi düşürdüğü rapor edilmiştir (Annane ve ark., 2006). ARDS'li hastaların kortikosteroidler ile tedavisinde inflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , TNF- α , IL-6, ve IL-8) düzeyi düşmektedir (Headley ve ark., 1997).

Akut akciğer hasarı riskli hastaların tedavisinde glukokortikoid kullanımının hastalık frekansını azaltmaması (Luce ve ark., 1988) ve erken tedavinin başarısız olmasına rağmen dirençli akut akciğer hasarlı hastaların kurtarılmasında kortikosteroid kullanımı büyük ilgi çekmektedir.

2.7. CC16

2.7.1. Clara Cell

Akciğer, organlara hava iletiminin ve gaz değişim sisteminin olduğu bir organdır. Hava iletimini sağlayan havayolları kolumnar epitel ile döşeli olup siliar hücreler ve non-silier sekretuar Clara cell hücrelerini içerir (Boers ve ark., 1998). Daha çok distalde, terminal bronşiyoller de epitelin yaklaşık %22'si Clara cell tarafından döşenmiştir (Boers ve ark., 1999).

Clara cell hücreler, Clara cell sekretuar proteinler üretmektedir. Genel bir adlandırma olarak CCSP kullanılmakla birlikte, CC16, CC10, sekretogloblin, uteroglobin de kullanılmaktadır. Bu proteinler hücre yüzey sıvısı olarak çevresel stimuluslara cevap olarak görev yapar (Stripp ve ark., 2002).

Clara cell hücreleri zararlı inhale substantların detoksifiye edilmesini sağlayan stokrom P-450 enzim sisteminin kaynağıdır (Stripp ve ark., 1996). Pulmoner epitelyal bariyer, yaşamın her günü geniş bir pulmoner irritana maruz kalması dolayısıyla sürekli tamir ve rejenerasyon geçirmektedir. Hücre hasar oranının tamir kapasitesini aşması, akciğer hasarı ile sonuçlanır.

2.7.2. CC16 Yapı ve Fonksiyonu

CC16; Clara cell'den sekrete edilen disülfid köprülü homodimerik protein olup hücre yüzey markırı olarak ifade edilmektedir. Gen, kromozom 11q12.3–13.1'de lokalizedir (Wang ve ark., 2003; Celli ve Owen, 2013). CC16; 16 kDa küçük bir protein, aşırı ısı ve pH'a karşı stabil, proteazlara karşı rezistans gösterir. İçerdiği hidrofobik cep lipofilik ligandlara hizmet eder (Stripp ve ark., 1996).

CC16; normal durumlarda havayolu bakımında, hasar sonrası ise tamir ve yenilenme de önemli rol alır (Wong ve ark., 2009). İlk olarak renal yetersizliği olan hastaların idrarında tanımlanan CC16, daha sonra akciğer lavaj sıvısında pürfiye edildi. Prostat, böbrek endometriyum gibi ekstra pulmoner dokularda da üretilmesine rağmen akciğerden 20 kat düşük düzeyde ifade edilmektedir.

2.7.3. CC16 ve Sirkülasyon

Serum CC16 artışı; pulmonar epitel permeabilededeki artış, BAL sıvısından seruma artmış CC16 transportu, CC16 üretim artışı, renal klirens azalması ile oluşmaktadır (Lakind ve ark., 2007). Akciğer epiteli hasara uğradığında epitelyal bariyerin geçirgenliğinin artmasıyla CC16 serum düzeyi artmaktadır. Diğer yandan Clara cell hücreleri içeren alveolar hasarda CC16 düzeyi azalmaktadır (Reynolds ve ark., 2004). Düşük moleküler ağırlıklı proteinlerin plazma klirensinden major sorumlu organ böbreklerdir. CC-16 vasküler kompartıman konsantrasyonunun GFR'dan etkilendiği görülmektedir (Hermans ve ark., 2003). CC16, pulmoner epitel kaplayan sıvıda 100 mg/L, ekstrapulmoner sıvıda 15 µg/L'dir (Broeckaert ve ark., 2000).

2.7.4. Biyomarkır olarak CC16

Akciğer hasarının klinik monitorizasyonunda akciğer epiteline spesifik küçük proteinler, biyomarkır olarak kullanılmaktadır. Bu sınıftaki proteinler; Tip II epitel spesifik proteinleri (KL6, SPA ve SPD), Tip I epitel membran proteinleri (HI56) ve Clara cell spesifik proteinleridir (CC16). Alveolar-kapiller bariyerin fizyolojik kısıtlanması, 10-20 kDa makromolekülleri geçirir (Hermans ve Bernard, 1999). CC16, yüksek derecede soluble olması ve sirkülasyona kolaylıkla difüze olması ölçümünü kolaylaştırmaktadır. CC-16, zaman-bağımlı diürenal varyasyon gösterdiğinden bu durum, bir biyomarkır olarak kullanılırken göz önünde bulundurulmalıdır. Epitelyal hasarın derecesine göre akciğer spesifik proteinlerin geçişi olmaktadır.

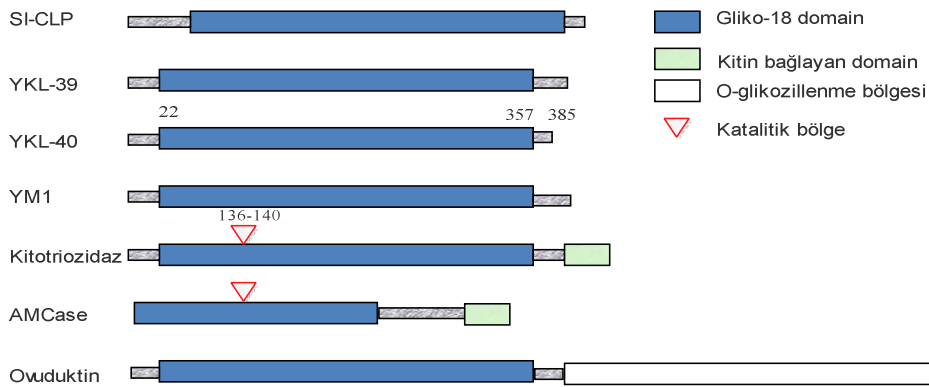
ARDS de akciğer hasarı alveolar kapiller bariyerin boyut selektif kaybını indükler. ARDS başlangıcında serum CC16 yüksekliği, böbrek yetersizliği olmayan hastalarda kötü klinik sonuç göstergesidir (Lesur ve ark., 2006).

2.8. YKL-40

2.8.1. Memeli Kitinazları ve Kitinaz-Like Proteinler

Bu proteinler, Glyco-18 domain içermektedirler (şekil 8). Glikozil hidrolaz ailesi 18 grubuna dahildir ve kitin hidrolizini katalizler. Bir polisakkarit olan kitin, mantarlardan bakterilere kadar doğada çok bulunmasına rağmen memelilerde endojen kitin bulunmaz.

İnsanda glyco-18 domain içeren 6 çeşit protein bulunmaktadır. YM1/YM2'de araştırılmaktadır. Memelilerde bu proteinlerden yalnızca asidik memeli kitinaz (AMCase) ve kitotriozidaz enzimatik aktivite gösterir. YKL-39, YKL-40, SI-CLP ve YM1/YM2; tamamen Glyco-18 domain içerirken Oviductin/MUC9; Glyco-18 domain ve O-glikozilasyon bölgesi içerir. YKL-39, YKL-40, SI-CLP, YM1/YM2 ve oviductinin katalitik bölgedeki kritik aminoasitleri, enzimatik aktiviteyi kısıtlamaktadır. Kitotriozidazların katalitik merkezindeki glutamik asit, lösin ile yer değiştirmiştir. Böylece kitin bağlanması zorlaşmaktadır. Memelilerde kitinaz ve kitinaz benzeri proteinler makrofajlar, nötrofil, epitel hücresi, kondrosit, sinovyal hücrelerde üretilmektedir. Ekspresyonunu çeşitli sitokinler ve hormonlar yapmaktadır.



Şekil 8: Gliko-18 domaini içeren insan kitinaz ve kitinaz-like proteinler sınıfı

(Kzhyshkowska ve ark., 2007)'dan uyarlanmıştır.

2.8.2. Tanım ve Yapı

YKL-40; human cartilage glycoprotein-39 (HC gp-39), chitinase-3-like-1 (CHI3L1) olarak da adlandırılmaktadır. YKL-40; ilk osteosarkom hücrelerinden sekrete edilen 40 kDa protein olarak keşfedildi (Johansen ve ark., 1992). YKL-40; sinoviyal hücreleri, artiküler kondrositler, alveolar makrofajlar, nötrofiller bronşiyal ve kolonik epitelyum tarafından sekrete edilmektedir (Kawada ve ark., 2007).

İnsan YKL geni CHI3L1 kromozom 1q31-q32'da lokalizedir (Rehli ve ark., 2003). YKL-40'daki harfler; üç N-terminal aminoasit isminden türemiştir (Y(tirozin), K(Lizin), L(Lösin)).

Kitinazların yapısında bulunan $\alpha+\beta$ folding domain korunmuştur. YKL-40 katalitik rezidüleri Asp117 ve Glu119 yerine Ala117 ve Leu119 değişmesiyle katalitik aktivitenin kaybolmasına yol açmıştır. Bununla birlikte YKL-40, aromatik rezidüer korunmakla birlikte 9 şeker bağlayan altbirim ile kitin bağlayabilmektedir (Fusetti ve ark., 2003). Kitin bağlayan domainin yüksek koruma altında olması, kitinaz aktivitesini kısıtlamaktadır (Johansen ve ark., 2006).

2.8.3. Biyolojik Aktivitesi

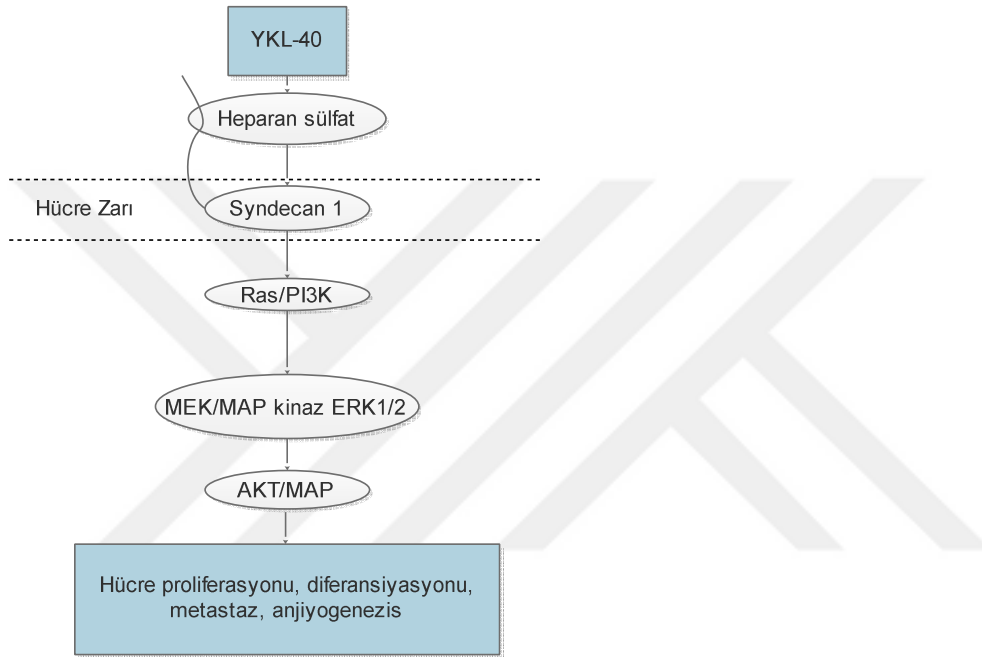
Hücre proliferasyonu, adhezyonu, migrasyonu ve aktivasyonunun düzenlenmesini içerir, böylelikle ekstraselüler matriksin düzenlenmesine katkı sağlar. YKL-40 bağ dokusu hücreleri (fibroblast, kondrosit, sinoviyal hücre) için bir growth faktördür. Bağ dokuda sinyal kaskadını başlatarak hücre proliferasyonunu başlatır (Recklies ve ark., 2002). YKL-40, hücre tipine spesifik hücre migrasyonuna yardım eder (vasküler düz kas hücrelerinin migrasyonunu indüklerken fibroblastları etkilemez)

YKL-40 aşırı ifadesi; fibrozis ilerleme sürecinde akut ve kronik enflamasyonlarda gözlenmektedir. Makrofaj aktivasyon durumunu yansıtmakla birlikte nötrofillerde sirkülasyondaki konsantrasyonuna katkı sağlar (Kzhyshkowska ve ark., 2007).

YKL-40'ın doğal kristal yapısında oligosakkarid bağladığı gösterilmiştir. Savunma sisteminde ligandın bağlanması YKL-40'da büyük konformasyonel değişikliği indüklemesi enzimatik olarak inaktif chitinase-like proteinlerin yeni sitokin sınıfına konulmasına katkıda bulunmuştur (Houston ve ark., 2003). YKL-40; Tip I kollojene ve heparine bağlanarak fibril oluşumunu stimüle eder (Bigg ve ark., 2006).

2.8.4. YKL-40 Sinyal Yolağı

CHI3L1'in heparin-bağlayan rezidü içermesi, ERK1/2 fosforilasyon mekanizmasını aktive ederek proliferasyon ve diferansiyasyona yol açar. Hyalüran bağlayan motif içermesi, ECM'de substrat olarak hyalüran tanınmasını sağlar ve membran reseptörleri aracılığı ile hücre içine sinyal geçişini sağlar (şekil 9).



Şekil 9: YKL-40 sinyal yolağı

(Prakash ve ark., 2013)'dan uyarlanmıştır.

YKL-40; syndecan gibi hücre yüzeyi spesifik reseptörlerine bağlanmaktadır. Syndecan reseptörlerinin düzenlenmesindeki başarısızlık iyileşme ve enflamasyonda patolojilerle birlikte dir. Reseptörler, ektodomain HS zincirine sahipse YKL-40 yüksek affinite gösterir.

CHI3L1 inhibisyonu, makrofajlardan kemokin (CXCL2) üretimini baskılar (Libreros ve ark., 2012). Pro-inflamatuvar TNF- α 'nın; kondrosit, kolonik epitel hücreler, alveolar makrofajlar ve çeşitli kanser hücrelerinde CHI3L1'i indüklediği gösterilmiştir (Letuve ve ark., 2008).

Mekanik stres altında hücre kültür sistemindeki bronşiyal epitel hücreler EGFR/MEK1/2-bağımlı yolak üzerinden CH13L1 gen ekspresyonunu ve YKL-40 sekresyonu artmaktadır. Bu sekresyon mekanik stres ile karşılaştırıldığında TNF- α 'ya cevapta daha yavaş ve daha zayıf olmaktadır (Park ve ark., 2010).

2.8.5. YKL-40 ve Hastalıklar ile İlişkisi

YKL-40; kanser (Johansen ve ark., 2009), osteoartrit (Huang ve Wu, 2009), kardiyovasküler hastalıklar (Mathiasen ve ark., 2010), doku remodelling ve fibrozis içeren inflamatuvar hastalıklarda (Mygind ve ark., 2013) bir biyomarkır olarak araştırmalarda yorumlanmıştır (Coffman, 2008). YKL-40 yüksekliğinin romatoid artritli hastalarda eklem yıkımıyla (Johansen ve ark., 1999), fibrotik karaciğer hastalıklarında fibrozis şiddeti ile (Nojgaard ve ark., 2003), kistik fibrozisli hastaların erken döneminde inflamasyonu yansımasıyla (Fantino ve ark., 2014) ve sarkoidizde pulmoner fibrozisin gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kruit ve ark., 2007).

YKL-40'ın enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz hastalıklarda bulunması, bir enflamasyon markırı olarak kullanılmasını sağlar (Huang ve Wu, 2009; Mathiasen ve ark., 2010). YKL-40'ın akciğerlerde üretilip kana geçtiği ya da sistemik enfeksiyonun yansıması olarak kanda bulunduğu belirtilmiştir (Hector ve ark., 2011; Kornblit ve ark., 2013).

Astım hastalarında ve idiyopatik pulmoner fibrozis hastalarında (IPF) YKL-40 yüksekliğini, YKL-40'ın akciğerde doku remodelling ve kronik inflamasyonu gösteren patolojik şartlarda arttığının göstergesi kabul edilmiştir (Chupp ve ark., 2007; Hartl ve ark., 2009; Furuhashi ve ark., 2010). Çeşitli kronik enflamatuvar hastalıkların başlangıç ve ilerlemesinde YKL-40 yüksekliği görülmektedir.

Proteinler ve karbohidratlar ile potansiyel etkileşimi sayesinde hücre yüzeyi ve ekstraselüler matriks protein, polisakkarit ve proteoglikanların YKL-40 ile temasını sağlar (Prakash ve ark., 2013).

Astım ve KOAH hastalarında YKL-40, hastalık şiddeti ile orantılı yükselmekle birlikte bu iki hastalıkta farklı hücre tiplerinin (nötrofil, eozinofil gibi) havayolu infiltrasyonu gözükmemektedir. KOAH hastalarında, alveolar kompartmanda ve akciğer dokusunda makrofaj sayısı yüksektir (Retamales ve ark., 2001).

2.9. IL-10

2.9.1. Tanım ve Yapı

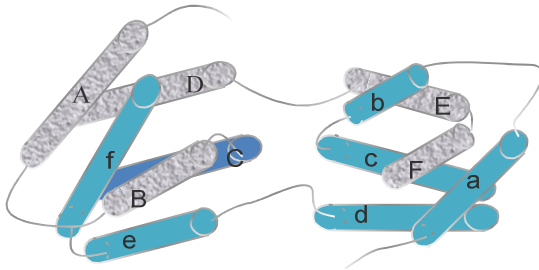
1989 da Mosmann ve arkadaşlarınca keşfedildi (Fiorentino ve ark., 1989). Orijinal ismi CSIF (cytokine synthesis inhibitory factor).

IL-10 kaynakları; yardımcı T hücreler, monosit, makrofaj olmakla birlikte; dendritik hücreler, B hücreler, sitotoksik T hücreleri, NK hücreler, mast hücrelerinde sentez kabiliyeti bulunmaktadır (Siewe ve ark., 2006; Blanco ve ark., 2008; Grant ve ark., 2008). Bu hücrelerin hangisinin esas kaynak olduğu; stimulus tipine, etkilenen doku tipine ve bağışıklık sürecindeki zamana bağlıdır (Couper ve ark., 2008).

Monosit ve makrofajlar çeşitli endojenlerin yanı sıra LPS gibi eksojen mediyatörler tarafından TLR reseptörler aracılığıyla NF-kB, TRAF3, p65/p50, ve ERK kinase aktivasyon sonrası IL-10 sekrete edilir (Banerjee ve ark., 2006; Hacker ve ark., 2006). IL-10; T hücre reseptörlerinin aktivasyonu sonrası ERK1 ve ERK2 MAP kinaz aktivasyonu sonrası sekrete edilir (Saraiva ve ark., 2009).

2.9.2. IL-10 gen ve proteini

IL-10 geni; kromozom 1'de lokalizedir (Kim ve ark., 1992). 178 aa uzunluğunda bir protein, 18 aa sinyal peptididir. İnsan IL-10, 35 kDa homodimer (iki monomer non-kovalent bağlar ile bağlı), homodimerler; bir domainin 4 heliksi ve diğer domainin 2 heliksinden oluşan 2 V-orient domain içermektedir. Monomerler içindeki iki disülfid köprü sitokin biyolojik aktivitesi için esastır (Windsor ve ark., 1993), (şekil 10).



Şekil 10: IL-10 kristal yapısı. Heliksler silindirik olarak resmedildi.

(Ouyang ve ark., 2011)'dan uyarlanmıştır.

2.9.3. Biyolojik etki

IL-10; çeşitli lökositleri hedefleyerek inflamasyon nedeniyle oluşan epitelyal hasara karşı korur, aşırı immün cevabı azaltır (Ouyang ve ark., 2011).

IL-10, monosit ve makrofajların önemli fonksiyonu olan; immün mediyatörlerin serbestleşmesi, anjen sunumu ve fagositozu baskılamaktadır. IL-10; LPS- ve IFN- γ -indüklü TNF- α , IL-1b, IL-6, IL-8, G-CSF ve GM-CSF gibi pro-inflamatuvarların makrofaj/monositlerden sekresyonunu inhibe eder (Fiorentino ve ark., 1991).

Nötrofilik granüositlere etki ederek çeşitli kemokinlerin sekresyonunu inhibe eder (Kasama ve ark., 1994). Non-inhibitör fonksiyonlar; NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesini stimüle eder. B hücre apoptozisini önler (Burdin ve ark., 1997))

2.9.4. IL-10 aktivasyon yolağı

Monositik hücreler (makrofaj, dendritik hücreler) TLR ailesi üyelerinin patojenleri tanınmasıyla NF-kB ve çeşitli MAP kinazların (p38, ERK, JNK) aktivasyon yolağı üzerinden proinflamatuvar mediyatörleri üretirler (Basak ve Hoffmann, 2008). Aynı zamanda makrofaj ve dendritik hücreler, PRR ligandaların TLR aktivasyonu ile IL-10 üretir (Boonstra ve ark., 2006).

IL-10; TLR-tetikli proinflamatuvar mediyatörlerin üretimini inhibe eder (Grutz, 2005). Myeloid kökenli hücrelerde IL-10 anti-enflamatuvar etki, esasında IL-10 reseptörleri tarafından STAT3 aktivasyonu üzerinden olmaktadır (El Kasmi ve ark., 2006). IL-10; proinflamatuvar sitokinler üzerindeki supresif etki, STAT3 eksik makrofaj ve lökositlerde tamamen kaldırılmaktadır (Takeda ve ark., 1999).

IL-10'un kolleteral hasarın sınırlandırılmasında ve aşırı immün cevabın önlenmesinde fizyolojik önemi vardır. Antijen ile karşılaştıktan sonra bağışıklık sisteminin “süpürücü” fonksiyonunu güçlendirir (Sabat ve ark., 2010).

2.10. TNF- α

2.10.1. Tanım

“Cachectin” olarak da bilinen TNF- α ilk 1975 yılında Carwell ve arkadaşlarınca tanımlandı. TNF- α ligand süperfamily (TNFSF) olarak bilinen sitokin grubuna dahildir (Wajant ve ark., 2003).

2.10.2. TNF- α gen ve protein yapısı

İnsan TNF- α geni; MHC (major histocompatibility) gen kümesinin bir kısmı olarak kromozom 6p21.32'de lokalizedir (Ruuls ve Sedgwick, 1999).

TNF- α ; 17 kDa soluble form (sTNF- α) ve 26 kDa membran-bağlı form (tm TNF- α) olarak üretilir (Kriegler ve ark., 1988; Luettig ve ark., 1989). Her bir monomeri β antiparalel β -iplik tarafından β -jellyroll topolojisinde oluşturulan 2 β tabaka (plate sheet) içeren homotrimer formdadır (Eck ve Sprang, 1989).

tmTNF- α ; hücrenin ekstraselüler yüzeyinde eksternal sinyalleri tanıyan bir reseptör olan ligand bağlanan TNFR olarak hizmet görür (Eissner ve ark., 2004). TNF- α reseptörleri (TNFR); ekstraselüler domaininde 2-6 kez tekrarlanmış sistein zengin motif ile karakterize Tip I transmembran glikoproteinidir (Naismith ve ark., 1995). TNF- α ; TNFR, sinyal transdüksiyon ile hücre ölümü, apoptozis ve pro-enflamatuvar genlerin ekspresyonu olmak üzere iki ayrı sinyal yolağını aktive eder.

2.10.3. TNF- α 'nın rolü

İnflamasyon süresince hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu, apoptozisinde önemli bir rol oynayan güçlü bir proenflamatuvardır (Baud ve Karin, 2001).

TNF- α , COX-2 stümlasyonu ile prostanooidlerin (PGE2, PGF2 α , ve PGI2) üretimin artırmaktadır. PGI2, en yüksek vazodilatasyon aktivite sağlar (Mark ve ark., 2001). TNF- α , damar duvarını döşeyen endotel yapısını bozarak ödem oluşmasına katkıda bulunur (Zelova ve Hosek, 2013). TNF- α ; P-selektin, E-selektin (endotel) ekspresyonunu stimüle ederek nötrofil, monosit adhezyonunu kolaylaştırır (Chandrasekharan ve ark., 2007).

TNF- α ve diğer sitokinler; endotel ve monositlerde TF (tissue factor) ifadesini indükleyerek koagülasyon kaskadının aktivasyonunu sağlar (Sherwood ve Toliver-Kinsky, 2004; Sherwood ve Toliver-Kinsky, 2004). TNF- α , stümlasyonundan sonra endotel hücrelerince ROS üretimini MAPK aktivasyonu ile yapmaktadır (Li ve ark., 2005).

TNF- α ve pro-inflamatuvar sitokinler; makrofajlarda ve diğer bazı lökositlerde iNOS ekspresyonunu stimüle eder (Sanders ve ark., 2001). TNF- α , eNOS ekspresyonunu ise suprese etmektedir (Neumann ve ark., 2004).

2.11. Nitrik Oksit Sentaz (NOS)

2.11.1. Nitrik Oksit (NO)

Akciğerde NO; endotelyum vazodilatasyonu, inhibitör noradrenerjik sinir terminallerinde bronkodilatasyon, makrofajlarda fagositoz, bronşiyal epitelyum hücrelerinde müsin üretimine katkı sağlar (Ermert ve ark., 2002; Coggins ve Bloch, 2007). NO'nun fizyolojik hedefi, soluble guanilil siklazdır. Guanil siklazın Hem kısmındaki demire NO bağlanması enzimi aktif hale getirir. NO'nun görevi çok farklıdır; soluble guanilil siklazı stimüle edip cGMP üreterek iyon kanalları, protein fosfatazlar ya da siklik nükleotid fosfodiesterazları modifiye eder. NO, reaktif nitrojen türleri (RNS) sinyal yolları üzerinden çeşitli proteinlerin aktivitesini nitrozilasyon reaksiyonu ile değiştirir.

NO, eşleşmemiş elektron içermesinden dolayı serbest radikal olup çeşitli oksidasyonlar ile nitroksil iyonu (NO⁻), NO serbest radikali (NO•), nitrozonyum katyonu (NO⁺), nitrit iyonu (NO₂⁻) ve nitrat iyonu (NO₃⁻) oluşmaktadır. Hücrelerdeki reaksiyonlarda NO'nun ana hedefleri; metaller, redükte tiyoller, moleküler oksijen ve reaktif oksijen türleridir (Gow ve Ischiropoulos, 2001). En hızlı reaksiyonu süperoksit iyonları (O₂⁻) ile peroksinitrit (ONOO⁻) oluşmasıdır. Peroksinitrit, protein ve lipidleri nitrasyon ile modifiye eden güçlü bir oksidandır ve yarı ömrü 15 ms'dir.

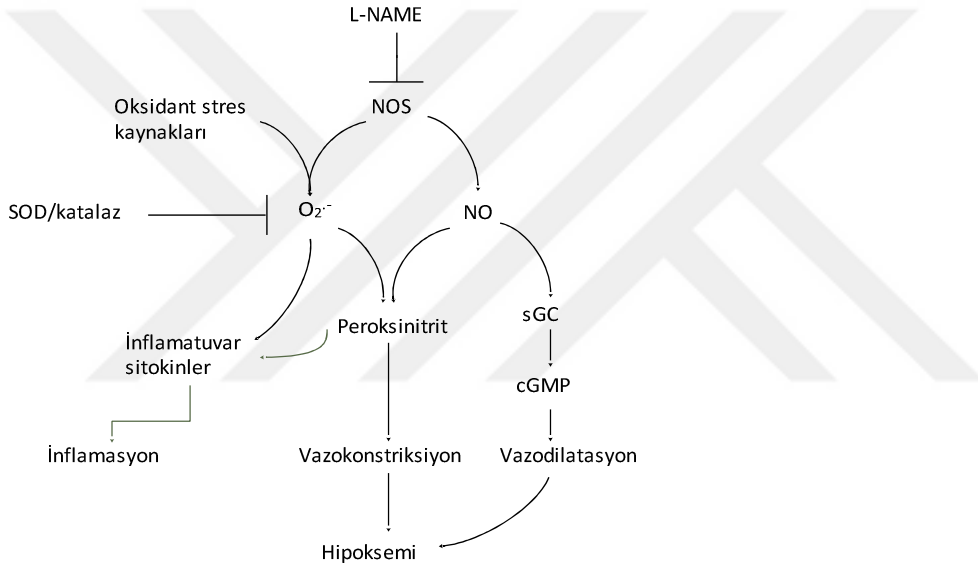
Spesifik sistein rezidülerinin S-nitrozasyonu ile proteinlerin fonksiyonunu reversibil etkiler. İyon kanalları, enzimler, transkripsiyon faktörleri, G proteinleri, S-nitrozasyona uğramaktadır (Stamler ve ark., 2001). NO, hedef proteinler ile direkt etki göstermeyip onları RNS üzerinden etkilemektedir. RNS'ler nitrozilasyon reaksiyonlarında görev almaktadır (Berridge, 2008). NO, elektron alıcısı olarak; geçiş metal iyonları (Mⁿ⁺ (geçiş metali), Fe³⁺, Cu²⁺), glutatyon (GSH), sistein (Cys), süperoksit radikali (O₂⁻) ile etkileşir.

1. NO + O₂⁻ → ONOO⁻ (peroksinitrit)
2. NO + Mⁿ⁺ → Mnⁿ⁺ + NO
3. NO + GSH → GS-NO
4. NO + Cys → Cys-NO

S-nitrozilasyon reaksiyonu hedef proteinlerin peptidil sistein tiol grubuna (R-SH) RNS'lerden NO'nun transfer reaksiyonudur.

1. $R-SH + ONOO^- \rightarrow R-SNO$
2. $R-SH + M^n + NO \rightarrow R-SNO$
3. $R-SH + GS-NO \rightarrow R-SNO$
4. $R-SH + Cys-NO \rightarrow R-SNO$

Dokularda NO biyoyararlanımı; süperoksit anyon konsantrasyonu ile SOD ve katalaz gibi antioksidan enzim aktivitesi tarafından belirlenir. Bu enzimler, süperoksit temizleyici ve peroksinitrit oluşumunu önleyici olarak işlev görmektedir. NO'nun süperoksit anyonları ile bağlanması ve peroksinitrit oluşturması hipoksemi ve pulmoner vazokonstriksiyona katkıda bulunmaktadır (şekil 11).



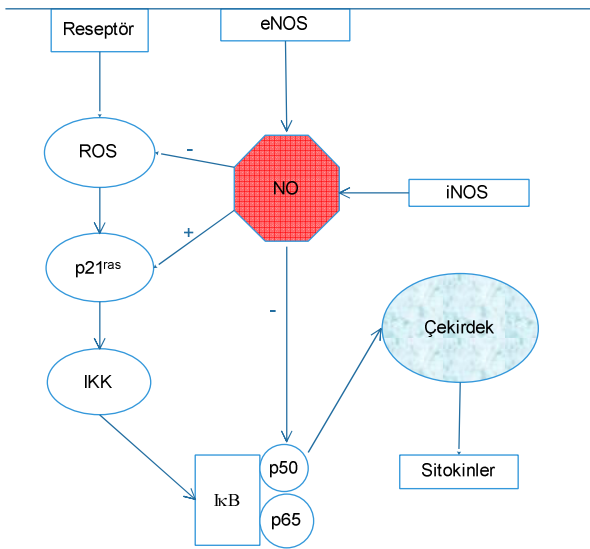
Şekil 11: Akciğer kontüzyonunda pulmoner vazokonstriksiyon ve oksidantlar

(Lakshminrusimha ve ark., 2013)'dan uyarlanmıştır.

NO, hücre membranını hızlıca geçen bir haberci moleküldür. Komşu hücrenin membranını difüzyonla geçerek parakrin etki gösterir. NO sinyali; hücrenin redoks durumuna bağlı olarak pek çok sinyal yolağını etkiler. NO faaliyetleri, tiyol konsantrasyonu ve redoks durumuna bağlı olarak NO'nun protektif ve zararlı etkilerini açıklamaktadır.

NO'nun dual etkileri (koruyucu veya zararlı), farklı süreçlerde düzenlenen farklı nitrik oksit sentaz enzim izoformlarının miktarlarına ya da hücrenin redoks durumuna bağlıdır (Vallance ve Leiper, 2002). Erken safhada inflamatuvar yanıtı önlemek için büyük miktarda NO üretimi olurken, geç aşamada düşük miktarda NO, inflamatuvar yanıtı değiştirerek ölü hücrelerin temizlenmesini sağlamaktadır (Shibata ve ark., 2006). NO; (i) erken zamanda adhezyon molekülleri ve proinflamatuvar sitokinlerin ifadesini destekleyerek infeksiyon/hasar bölgesine selüler toplanmayı kolaylaştırmak ve patojenik zararı eradike etmek için bu hücrelerin aktivasyonunu sağlarken, (ii) geç zamanlarda aktivasyonun hızlı sonlanmasını sağlayarak hücreler üzerinde inhibitör etki göstermektedir. NO, bu etkileri, NF-kB aktivitesinin modülasyonu ile sağlamaktadır (Connelly ve ark., 2001).

NO tarafından NF-kB inhibisyonu; (i) Ik-B'yi indükleyerek NF-kB nükleer lokalizasyonunun önlenmesi ile (Peng ve ark., 1995), (ii) NF-kB subüniti olan p50 sistein rezidüsünü nitrosatlayarak DNA bağlanma kapasitesinin düşürülmesi ile (Matthews ve ark., 1996) ve (iii) NF-kB aktivasyonunda önemli rol oynayan reaktif oksijen türleri hızlı etkileşime girerek NF-kB aktivasyonunun azalmasını sağlayarak (Lander ve ark., 1997) gerçekleşmektedir (şekil 12).



Şekil 12: NF-kB aktivitesine Nitrik oksit etkisi (Connelly ve ark., 2001)'dan uyarlanmıştır.

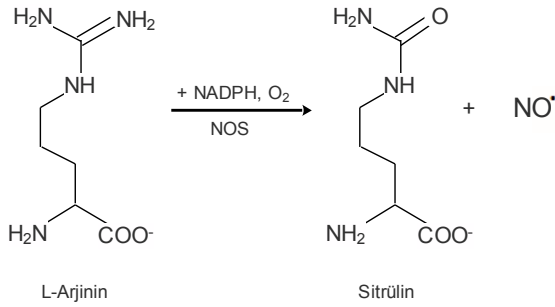
NO tarafından NF-kB aktivasyonu; p21^{ras} nitrozasyonu ile olmaktadır. p21^{ras}, oksidatif strese cevap olarak Ras aktivasyonu için zorunlu olan redoks aktif sistein rezidüsü içeren intraselüler sinyal proteindir (Lander ve ark., 1997).

ROS'ların düşük konsantrasyonunda NO daha yüksek biyoyararlanım sağlamaktadır. Aşırı NO, peroksinitrit üzerinden anormal vasküler reaktivite, pulmoner vazokonstriksiyon ve hipoksiye yol açmaktadır. (Lakshminrusimha ve ark., 2013; Suresh ve ark., 2013).

NO ve reaktif oksijen türleri, inflamatuvar pulmoner hastalıklarda önemli rol üstlenir (Bove ve van der Vliet, 2006). KOAH ve astım hastalarının nefeslerinde NO düzeyi yükselmiştir (Shaw ve ark., 2007).

2.11.2. Nitrik Oksit Sentaz Tanım

NO, nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin katalizlediği reaksiyonla L-arjininden sentezlenir (şekil 13). NOS'un hücrenin farklı kısımlarında lokalize olan ve birbirine kısmi bağlı olan üç farklı izoenzimi bulunur. Bunlar endotelial NOS (eNOS, NOS3), nöronal NOS (nNOS, NOS1), indüklenen veya inflamatuvar NOS (iNOS, NOS2)'dir. Nitrik oksit sentaz, NADPH ve O₂ bağımlı mekanizma ile L-arjininin NO ve sitriline oksidasyonunu katalizler.



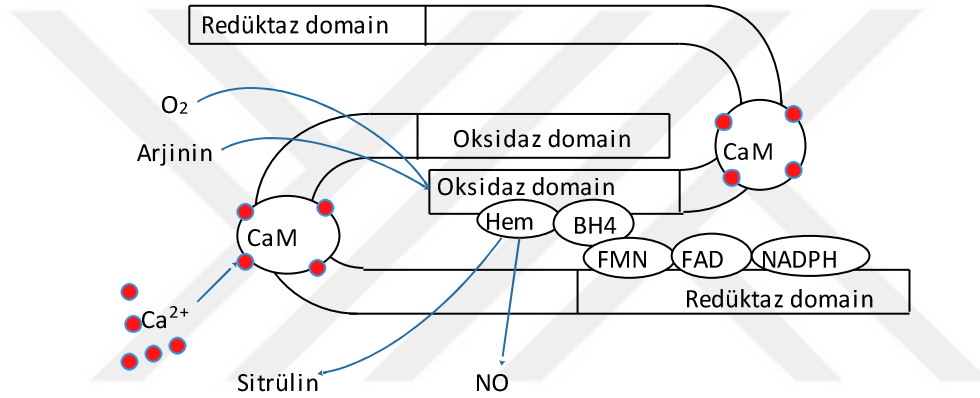
Şekil 13: NO sentez reaksiyonu

(Vallance ve Leiper, 2002)'dan uyarlanmıştır.

2.11.3. NOS Yapısı

NOS, flavoenzim olup dimer yapıdadır. Her bir monomer karboksi terminal diflavin-redüktaz domain ve amino terminal oksijenaz domain içerir. Dimerizasyon, enzimi aktive etmektedir, burada demir önemli rol alır.

Temel kofaktör tetrahidrobiopterin (BH4), arjinine bağlanmak için yüksek afinite gösterir. Hem, oksijenaz domainden flavin redüktaz domaine elektron transferine izin verir. Aktivite, kalmazulin bağlanmasına bağlıdır. iNOS, kalmazuline sıkıca bağlanırken eNOS ve nNOS'un kalmazulin bağlanması kalsiyum bağımlıdır. Kalmazulin bağlanması, oksijenaz domainden redüktaz domaine elektron akışına aracılık eder. NOS dimerinin koordinasyonunu Zn atomu sağlar (Alderton ve ark., 2001), (şekil 14). H4B, dimer ara yüzeylerinin bağlanmasını sağlayarak aktif enzimin kuaterner yapısını stabilize eder, aynı zamanda oksijen aktivasyonunda elektron donorü olarak NO serbestleşmesi için elektron yakalayıcısı olarak görev yapar (Daff, 2010).



Şekil 14: Nitrik oksit sentaz yapı ve reaksiyon mekanizması

(Berridge, 2008)'den uyarlanmıştır.

Redüktaz domainin katalitik siklüsü 3 adımda gerçekleşmektedir. (1) NOS; elektronları önce ko-substrat NADPH'dan C-terminal redüktaz domaindeki (2) FAD ve (3) FMN'e, sonra N-terminal oksijenaz domaindeki Hem'e transfer eder. Oksijenaz domain, kofaktör olarak BH4; moleküler oksijen ve substrat olarak L-arjinin bağlar. Hem varlığında NOS fonksiyonel dimer formdur, karşı monomerin Hem'ine flavinlerden elektron transferini sağlar. Her bir adımda CaM bağımlı mekanizma ile enzim konformasyonu açık kapalı menteşe modeli değişikliği ile olmaktadır.

iNOS, bütün fizyolojik Ca^{+2} konsantrasyonlarında CaM bağlar, diğer iki izoform ise Ca^{+2} -bağımlı düzenlenmektedir. eNOS, FMN domain içinde C-terminal redüktaza uzanan, otoinhibitör loop (AI) içerir, nNOS ise hücre proteinlerine lokalizasyonu sağlayan PDZ domain içerir. eNOS ve nNOS, intraselüler Ca^{+2} artmış konsantrasyonda (200-400 nM) iken CaM bağlar (Foerstermann ve Sessa, 2012).

2.11.4. eNOS

İlk olarak endotelial hücrelerde tanımlanmakla birlikte akciğer epitelyal hücreleri, kardiyak myositler gibi çok farklı hücrelerde de ifade edildiği ispatlanmıştır. Kan akımına bağlı shear stress ya da asetilkolin ve bradikinin gibi agonistlerce Ca^{2+} yükselmesine bağlı olarak NO üretir. Endotelial hücrelerden bırakılan NO komşu diğer hücelere difüze olarak kan basıncını kontrol etmekte, lökosit adhezyonu, platelet agregasyonunu regüle etmektedir.

2.11.5. nNOS

İlk olarak nöronlarda tanımlanmakla birlikte iskelet kas hücresi gibi diğer hücre tiplerinde de bulunmaktadır. Nöron ve kas nNOS'ları plazma membranına PDZ domain ile bağlıdır.

2.11.6. iNOS

İndüklenebilir veya immünoisit olarak da bilinen iNOS, ilk olarak makrofajlarda tanımlandı. Esas kaynağı makrofajlar olmakla birlikte vasküler düz kas hücreleri, kardiyak hücreler gibi diğer hücre tiplerinde de ifade edilir. Aktivasyonu için Ca^{+2} gerekmez, kalmodulin bağlanması (CaM) aktivasyonu için esastır. Primer regülasyonu inflamatuvar reseptörlerinin interferon- γ (IFN- γ) veya LPS'ye cevap olarak indüklenmesi ile olmaktadır. İnflamasyon bölgesinde NO'nun büyük miktarda üretimi, komşu hücreleri etkileyerek yayılmaktadır.

2.11.7. NOS yerleşimi

Her hücre içinde her bir NOS izoformu, özel subselüler kompartmanlarda bulunmaktadır. Bu durum NO spesifik hedeflerinde etkileşimini kolaylaştırmaktadır (Fernandez ve ark., 2006; Giulivi ve ark., 2006). NOS3, β -adrenerjik reseptör ve L-Tip I kalsiyum kanal yakınına lokalize iken NOS1, sarkoplazmik retikulum yakınında lokalizedir (Barouch ve ark., 2002).

Aynı zamanda NOS translokale olmaktadır. Eğer NO suda difüze olsaydı translokale olmasına gerek kalmazdı. Patofizyolojik durumlarda her üç NOS izoformu hücre çekirdeğinde gözlenmiştir (Giordano ve ark., 2002; Gilchrist ve ark., 2004). NOS3, öncelikle endotel hücre caveol ve golgi apparatusda ifade edilmektedir. Bu translokalezyon, vazodilatasyon ile ilişkilidir (GarciaCardena ve ark., 1996). NOS izoform translokasyonu, çeşitli stimuluslara cevap olarak çeşitli yollar ile hücreleri etkileyebilmektedir. Bu yollar, sinyal yolağının aktivasyon/inhibisyonu, gen transkripsiyon düzenlenmesinin değişmesi ve protein-protein etkileşimi ile enzimatik aktivitenin düzenlenmesini içermektedir (Zimmermann ve ark., 2002; Schilling ve ark., 2006).

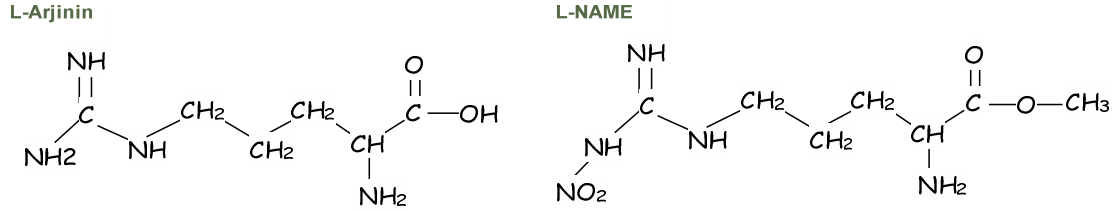
Hastalık tipine göre (astım veya KOAH gibi) farklı hücre-spesifik NOS izoform ifadesi olmaktadır (Grasemann ve ark., 2000). NOS izoformların klinik sürecin farklı safhalarındaki etkisi de açıklanmalıdır. Örneğın endotoksik şokta erken safhada pulmoner kan alışı artırılarak hayati organlara oksijenli kan akışı yükseltilmektedir. Geç safhada dilatasyonun artması ile sistemik kan volümünün büyük kısmının pulmoner damarlarda olması durumunda diğer organların oksijen ihtiyacından ödün verilmektedir (Ayuse ve ark., 1995).

2.11.8. NOS İnhibisyonu

Potansiyel terapötik ajan olarak kullanılan NOS inhibitörleri, pulmoner damarlar ve bronşiyal düz kas hücrelerinde eNOS ve nNOS ekspresyon azalması ile pulmoner hipertansiyon ve bronkokonstriksiyona yol açmaktadır. NOS aktivitesini azaltırken bu dokularda eNOS ve nNOS düşürülmesi, vasküler düz kas kontraktilesinde artış yapabilmektedir (Abe ve ark., 2006). İnsan ve hayvan çalışmalarında inflamasyondaki NOS inhibisyon sonuçları belirsizdir. Örn; NOS inhibisyonunun sepsiste myokardiyal fonksiyonu düzelttiği gösterilmekle birlikte hipertansiyona sebep olduğu ve IF- γ ve IL-2 ifadesini artırdığı gösterilmiştir (Kelly ve ark., 1995); (Gabbai ve ark., 1997). Akciğer kontüzyonunda, nitrit kaynaklı oksidatif stresi azaltıcı çeşitli tedavi seçenekleri araştırılmaktadır. SOD mimetikler (mnTBAP) NO ile reaksiyona girmeden önce süperoksit anyonlarını elimine ederek peroksinitrit oluşumunu azaltarak akciğer kontüzyonundan sonra akut enflamasyon ve akciğer hasarına karşı koruyucu olmaktadır (Suresh ve ark., 2013).

2.11.9. L-NAME

Arjinin metil ester analogları, L-NAME (N-Nitro, L-Arginin-Metil Ester), NOS inhibisyonunu substrat benzerliği üzerinden yapmaktadır (şekil 15).



Şekil 15: L-Arjinin ve L-NAME yapısal formülü

LPS (endotoksin) verilmesi ile oluşan endotelial hasar, plazma nitrit/nitrat, iNOS, TNF- α , IL- β artışı gibi değişiklikler; L-NAME, aminoguanidin, DXM gibi iNOS inhibitörleri tarafından kaldırılmıştır (Wang ve ark., 1999). L-NAME'nin non-vazoaktif inhibisyon ile oksidatif hasarı baskılamada yararlı etkileri varken, güçlü vazoaktif inhibisyon ile rat kalbindeki iskemi-reperfüzyon hasarı artırmakta olduğu (Kobara ve ark., 2003) ve zaman içinde perfüzyon akışında azalma yaptığı rapor edilmiştir (Nosratabadi ve ark., 2003).

Orta düzey pankreatitte tedavi için verilen L-NAME'nin etkinliği DXM ile karşılaştırıldığında daha güçlü iken, ciddi pankreatitlerde daha az etkin olması L-NAME ve DXM etkilerinin hastalık şiddetine bağlı olarak farklı yollardan farklı patojenik faktörler ile sağlandığını göstermektedir. L-NAME'nin non selektif NOS inhibitörü, DXM'nin selektif iNOS inhibitörü olması, yapısal ve indüklenebilir NOS'lar üzerine dikkati çekmektedir (Sugiyama ve ark., 2005). L-NAME uygulamasının P-selektin ekspresyonunda, lökosit migrasyonu ve toplanmasında artış yaptığı tespit edilmiştir (Davenpeck ve ark., 1994).

NOS inhibitörlerinin terapötik etkisi; doz, zaman ve hastalığın kategori ve şiddetine bağlıdır. L-NAME'nin dual etkileri, konsantrasyon bağlı olarak oluşmaktadır. L-NAME, inflamatuvar cevabı düzeltmedeki optimal dozu bilinmemektedir (Hsiao ve ark., 2012). NO'nun kompleks fonksiyonunu anlamak, uygun tedavi stratejisi geliştirilmesini sağlayabilir (Villanueva ve Giulivi, 2010).

3. MATERYAL METOD

3.1. Kontüzyon Modeli

Çalışmamızda kontüzyon modeli olarak silindirik ağırlık düşürülerek sağlanan Raghavendran modeli kullanıldı (Raghavendran ve ark., 2005; Raghavendran ve ark., 2008). Mekanizma; ağırlığın düşürüldüğü dikey paslanmaz “çelik tüp”, göğsü sabitleyen “lexon platform”, platformda masa ayakları gibi işlev gören ve enerji transferini kontrol ve minimize eden “teflon çubuklar”, platform altında platformun göğüs ile temasını azaltan, aynı zamanda kontüzyondan kalbi koruyan “plastik kalkan”dan ibarettir (şekil 16).

Düşürülen ağırlığın impakt enerjisi E(joule, J) aşağıdaki formülden hesaplandı;

$E=mgh$, m; alüminyum ağırlık(gram, g), g; yerçekimi ivmesi ($9.8m/s^2$), h; ağırlığın bırakıldığı yerden platforma yüksekliği (metre, m). Ağırlığın potansiyel enerjisi hayvana transfer edildi.

IACUC (Institutional Animal Care ve Use Committee)’nin belirlediği subletal göğüs impakt enerji mortalite oranı %15 olup impakt enerji 2.7J de mortalite oranı bu limiti aşmaktadır. 1.8-2.45j hasarda hayvanların gross muayenesinde her iki akciğerinde kontüzyondan etkilendiği, göğüs grafisinde kaburga kırığı olmadığı, kalp kas doku harabiyetinin fazla olmadığı gözlenmektedir.



Şekil 16: Kontüzyon model çalışması

Bu modele göre; ratlar çelik yüzey platform ile sabitleyici platform arasına yerleştirilmektedir. Bu pozisyondaki kontrol grubu hariç 40 rata 50 cm yukarıdan olacak şekilde vertikal çelik silindirik bir tüp içerisinde 0.4 kg'lık bir metal ağırlık serbest düşme ile sabit bir hızda sağ hemitoraks üzerine bırakılmaktadır. Raghavendran modeline göre maksimal subletal enerji 2.45J ve eksternal künt göğüs travması oluşturan subletal enerji 1.8-2,45J olarak tespit edildi. Modelimizde 1.8J enerji oluşturuldu. Aynı zamanda Raghavendran modelinde kardiyak travma minimize edilmektedir.

3.2. Yöntem

Araştırma kapsamında 8 farklı deneysel rat grubu oluşturuldu planlandı. Her biri 10 adet 250-300gr olan Sprague-Dawley cinsi ratlara standart sedasyon ve analjezi uygulandıktan sonra, Krishnan Raghavendran'ın tanımladığı kontüzyon modeli oluşturuldu.

Grup 1 (İlaçsız sham grup)(n=10): Kontüzyon modeli oluşturulmadı ve herhangi bir tedavi verilmedi.

Grup 2 (İlaçsız kontüzyon grup)(n=10): Kontüzyon modeli oluşturulduktan sonra herhangi bir tedavi verilmedi.

Grup 3 (DXM sham grup)(n=10): Kontüzyon modeli oluşturulmayan kontrol grubuna intraperitoneal (IP)15 mg/kg deksametazon verildi.

Grup 4 (DXM kontüzyon grup)(n=10): Kontüzyon modeli oluşturulduktan sonra intraperitoneal 15 mg/kg deksametazon verildi

Grup 5 (L-NAME sham grup)(n=10): Kontüzyon modeli oluşturulmayan kontrol grubuna 60mg/kg dozunda L-NAME intraperitoneal olarak uygulandı.

Grup 6 (L-NAME kontüzyon grup)(n=10): Kontüzyon modeli oluşturulduktan sonra intraperitoneal 60mg/kg L-NAME verildi.

Grup 7 (DXM ve L-NAME kombine, sham grup)(n=10): Kontüzyon modeli oluşturulmayan kontrol grubuna 15mg/kg deksametazon ve 60 mg/kg L-NAME her gün IP olarak uygulandı.

Grup 8 (DXM ve L-NAME kombine, kontüzyon grup)(n=10): Kontüzyon modeli oluşturulduktan sonra 15 mg/kg deksametazon ve 60 mg/kg L-NAME her gün IP olarak uygulandı.

Çalışma süresince hayvanların vücut ağırlığı, vücut ısısı ve lokomotor aktiviteleri değerlendirildi. 7. günün sonunda hayvanlara 100 mg/kg ketamine ve 0,75 mg/kg klorpromazin intraperitoneal verilerek anestezi uygulandı.

İntrakardiyak ponksiyon ile kan örnekleri alınarak ve santrifüj edildikten sonra serum ayrılarak analiz gününe kadar -40 °C saklandı. Daha sonra her bir rat serum fizyolojik (%0.9 NaCl) ile reperfüzyon uygulamasının ardından dekapite edilerek akciğer dokuları alındı.

İntraperitoneal ilaç uygulamasına bağlı olarak serumda; YKL-40, TNF- α ve IL-10 düzeylerinin tayini OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD laboratuvarında, histopatolojisi ve immünohistokimya (iNOS) incelemesi OMÜ Veteriner Fakültesi Patoloji AD laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.3. Kullanılan Malzemeler ve Hazırlanması

3.3.1. İlaçlar

L-NAME; ticari kit ismi, N-Omega-Nitro-L-Arginine Methyl Ester 5g (Sigma, CA, USA, Kat No: N5751). 600 mg/40ml olacak şekilde günlük hazırlandı ve ilaç uygulaması bitene kadar soğuk zincirde tutuldu.

DXM; ticari kit ismi, Dexamethazone 21-P, 500 mg (Santa Cruz, CA, USA). Birinci gün 50 mg/40mL, diğer günler ise 1 mg/40mL olarak hazırlandı.

3.3.2. Kitler

CC-16; ticari kit ismi; CC-16 antibody, (Antibodies Online Inc., GA, USA, Kat. No: ABIN687262), immunpeoxidase kit (İnvitrogen)

iNOS; ticari kit ismi, iNOS antibody (Santa Cruz, Sc-8310, CA, USA), immunpeoxidase kit (İnvitrogen)

IL-10; ticari kit ismi, Rat IL-10 Platinum ELISA (eBioscience Inc., CA, USA, BMS629)

TNF- α ; ticari kit ismi, Rat TNF- α Platinum ELISA (eBioscience Inc., CA, USA, BMS622)

YKL-40; ticari kit ismi, Rat chitinase-3-like protein 1(CHI3L1) ELISA (MyBioSource Inc., CA, USA, MBS914441)

3.4. Çalışma

3.4.1. IL-10

Numune hazırlama;

Kan numuneleri alındıktan sonra pıhtılaşma sonrası santrifüj edildi. Numuneler alikotlandıktan sonra -80°C de saklandı.

Reaktif hazırlama;

- Wash Buffer (1x); 1000 mL dereceli silindire 50 mL eklendikten sonra distile su ile 1000 mL'ye tamamlanarak 20 kat dilüe edildi.
- Assay Buffer (1x); 100 mL dereceli silindire 5 mL eklendikten sonra distile su ile 100 mL ye tamamlanarak 20 kat dilüe edildi.
- Biotin-Conjugate; dilüsyondan sonra 30 dk içinde kullanılmak üzere hazırlandı. Temiz plastik tüpe 0,06 mL eklendikten sonra 5,94 mL assay buffer (1x) eklenerek 6 mL ye tamamlanarak 100 kat dilüe edildi.
- Streptavidin-HRP; dilüsyondan sonra 30 dk içinde kullanılmak üzere hazırlandı. Temiz plastik tüpe 0,12 mL eklendikten sonra 11,88 mL assay buffer (1x) eklenerek 12 mL ye tamamlanarak 100 kat dilüe edildi.
- Rat IL-10 Standard; distile su eklenerek çözüldü, 10-30 dk arası beklendi. 2000 pg/mL stok solüsyonu elde edildi.
- İşaretli 7 tüp (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7) hazırlandı. Her bir tüpe 225 µl sample diluent eklendi. Stok solüsyondan 225 µl alınarak 1. tüpe, dilüsyonlu 2. tüpten 225 µl alınarak 3. tüpe eklendi. Böylece bir öncekinden bir sonrakine ekleme yapılarak standartlar hazırlandı. "Kör" sadece sample dilüent içerdi.

Tüp	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	BLANK
pg/ml	1000	500	250	125	62,5	31,3	15,6	0

Test Protokolü;

1. Microwell stripler 400µl Wash Buffer ile 2 kez yıkandı, kuyucuklar kurutulmadı.
2. Standartlardan 100 µl standart kuyucuklarına eklendi.

3. 100 µl sample dilüent blank kuyucuğuna eklendi.
4. 50 µl sample dilüent numune kuyucuklarına eklendi.
5. Numunelerden 50 µl numune kuyucuklarına eklendi.
6. Biotin-Conjugate hazırlandı.
7. 50 µl Biotin-Conjugate bütün kuyucuklara eklendi.
8. Plate üzeri adheziv film ile kapatılarak oda sıcaklığında (18-25°C) shaker üzerinde 400 rpm de 2 saat inkübe edildi.
9. Streptavidin-HRP hazırlandı.
10. Wash Buffer ile 4 kez yıkama yapıldı.
11. Dilüe Streptavidin-HRP den bütün kuyucuklara 100 µl eklendi.
12. Plate üzeri adheziv film ile kapatılarak oda sıcaklığında (18-25°C) shaker üzerinde 400 rpm'de 1 saat inkübe edildi.
13. Wash Buffer ile 4 kez yıkama yapıldı.
14. Bütün kuyucuklara 100 µl TMB Substrate Solution pipetlendi.
15. Mikrowell stripler oda sıcaklığında (18-25°C) 10dk inkübe edildi. Işıktan korundu.
16. Her bir kuyucuğa çabucak 100µl Stop Solution eklendi ve derhal okumaya geçildi.
17. Her bir microwell absorbansı 450nm'de spektro-fotometrik olarak okuyucuda okundu.
18. Excel programında her bir standardın absorbans ve konsantrasyonu ordinatlara yerleştirilerek grafik çizimi yapıldı (5-parameter curve). Elde edilen grafik formülünden numune konsantrasyonları hesaplandı.

19. Protokole göre 2 kat dilüsyon yapıldığından çıkan numune sonuçları 2 ile çarpıldı.

3.4.2. TNF- α

Numune hazırlama;

Kan numuneleri alındıktan sonra pıhtılaşma sonrası santrifüj edildi. Numuneler aliatlandıktan sonra -80C'de saklandı.

Reaktif hazırlama;

- Wash Buffer (1x); 1000mL dereceli silindire 50mL eklendikten sonra distile su ile 1000 mL ye tamamlanarak 20 kat dilüe edildi.
- Assay Buffer (1x); 100 mL dereceli silindire 5mL eklendikten sonra distile su ile 100mL ye tamamlanarak 20 kat dilüe edildi.
- Biotin-Conjugate; dilüsyondan sonra 30 dk içinde kullanılmak üzere hazırlandı. Temiz plastik tüpe 0,06 mL eklendikten sonra 5,94 mL assay buffer (1x) eklenerek 6mL ye tamamlanarak 100 kat dilüe edildi.
- Streptavidin-HRP; dilüsyondan sonra 30dk içinde kullanılmak üzere hazırlandı. Temiz plastik tüpe 0,12 mL eklendikten sonra 11,88mL assay buffer (1x) eklenerek 12 mL ye tamamlanarak 100 kat dilüe edildi.
- Rat TNF- α Standard; distile su eklenerek çözüldü, 10-30 dk arası beklendi. 5ng/mL stok solüsyonu elde edildi.
- İşaretli 7 tüp (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7) hazırlandı. Her bir tüpe 225 μ l sample diluent eklendi. Stok solüsyondan 225 μ l alınarak 1. tüpe, dilüsyonlu 2. tüpten 225 μ l alınarak 3. tüpe eklendi. Böylece bir öncekinden bir sonrakine ekleme yapılarak standartlar hazırlandı. Kör sadece sample dilüent içerdi.

Tüp	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	BLANK
pg/ml	5000	2500	625	312	156	78,1	39,1	0

Test Protokolü;

1. Microwell stripler 400 µl Wash Buffer ile 2 kez yıkandı, kuyucuklar kurutulmadı.
2. Standartlardan 100 µl standart kuyucuklarına eklendi.
3. 100 µl sample dilüent blank kuyucuğuna eklendi.
4. 50 µl sample dilüent numune kuyucuklarına eklendi.
5. Numunelerden 50 µl numune kuyucuklarına eklendi.
6. Biotin-Conjugate hazırlandı.
7. 50 µl Biotin-Conjugate bütün kuyucuklara eklendi.
8. Plate üzeri adheziv film ile kapatılarak oda sıcaklığında (18-25°C) shaker üzerinde 400 rpm'de 2 saat inkübe edildi
9. Streptavidin-HRP hazırlandı.
10. Wash Buffer ile 4 kez yıkama yapıldı.
11. Dilüe Streptavidin-HRP den bütün kuyucuklara 100 µl eklendi.
12. Plate üzeri adheziv film ile kapatılarak oda sıcaklığında (18-25°C) shaker üzerinde 400 rpm'de 1 saat inkübe edildi.
13. Wash Buffer ile 4 kez yıkama yapıldı.
14. Bütün kuyucuklara 100 µl TMB Substrate Solution pipetlendi.
15. Mikrowell stripler oda sıcaklığında (18-25°C) 10 dk inkübe edildi. Işıktan korundu.
16. Her bir kuyucuğa çabucak 100µl Stop Solution eklendi ve derhal okumaya geçildi.
17. Her bir microwell absorbansı 450 nm'de spektro-fotometrik olarak okuyucuda okundu.

18. Excel programında her bir standardın absorbans ve konsantrasyonu ordinatlara yerleştirilerek grafik çizimi yapıldı (5-parameter curve). Elde edilen grafik formülünden numune konsantrasyonları hesaplandı.

19. Protokole göre 2 kat dilüsyon yapıldığından çıkan numune sonuçları 2 ile çarpıldı.

3.4.3. YKL-40

Serum hazırlama;

Serum ayırma tüplerindeki kan numunesi pıhtılaştıktan sonra 100Xg'de 15 dk santrifüj edildi. Serum ayrıldıktan sonra -80°C'de saklandı. Çalışma günü çözülerek oda sıcaklığına getirilen numuneler sample dilüent ile 1/5 dilüe edildi.

Reaktif hazırlama;

- Reaktifler kullanmadan 30dk önce oda sıcaklığına (18-25°C) getirildi.
- Biotin-antibody (1X) ; açılmadan önce santrifüj edildi. 10 µl Biotin-antibody ile 990 µl Biotin-antibody Diluent karıştırılarak 100 kat dilüe edildi.
- HRP-avidin (1X); açılmadan önce santrifüj edildi. 10 µl HRP-avidin ile 990 µl HRP-avidin Diluent karıştırılarak 100 kat dilüe edildi.
- Wash Buffer (1X); 20 mL Wash Buffer distile su ile 500 mL ye tamamlanarak 25 kat dilüe edildi
- Standart; 6000 rpm de 30s santrifüj edildi. 1 mL sample dilüent eklenerek 15 dk çözülmesi için beklendi. Elde edilen stok solüsyon 25ng/mL. Sample dilüent'ten her bir tüpe (S0-S6) 250 µl eklendi. Stok solüsyondandan itibaren 250 µl alınıp bir sonraki tüpe eklenerek standartlar 2 kat dilüe edildi. Zero standart sadece sample dilüent içerdi.

Tüp	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1	S0
ng/mL	25	12,5	6,25	3,12	1,56	1,78	0,39	0

Ölçüm prosedürü;

1. Standart ve numunelerden 100µl kuyucuklara eklendi. Üzerleri adheziv strip ile kapatılarak 37C'de 2 saat inkübe edildi.

2. Bütün kuyucuklardaki sıvı boşaltıldı, yıkama yapılmadı.
3. Her bir kuyucuğa 100µl Biotin-antibody (1X) eklendi. Üzerleri yeni bir adheziv strip ile kapatılarak 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
4. Her kuyucuk Wash Buffer (200 µl) ile otomatik yıkama ile 3 kez yıkandı. Yıkama aralarında 2 dk beklendi.
5. Her bir kuyucuğa 100 µl HRP-avidin (1X) eklendi. Üzerleri adheziv strip ile kapatılarak 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
6. Her kuyucuk Wash Buffer (200 µl) ile autowasher 5 kez yıkandı. Yıkama aralarında 2 dk beklendi.
7. Her bir kuyucuğa 90 µl TMB Substrate eklendi. 37°C'de 15-30 dk inkübe edildi. Işıktan korundu.
8. Her bir kuyucuğa 50µl Stop Solution eklendi.
9. 450nm' de mikroplate readerda 5 dk içinde okuma yapıldı.

3.4.4. Hematoksilen-eozin

Doku örnekleri %10'luk tamponlu formalin solusyonunda 24 saat tespit edildikten sonra alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek, parafinde bloklanmıştır. Mikrotom ile 5 mikron kalınlığında APES kaplı lamlara alınan kesitler, rutin histopatolojik değerlendirmeler için hematoksilen-eozin ile boyanmıştır. Histopatolojik değerlendirme skorlamasında aşağıdaki tabloya göre değerlendirildi (Takıl A ve ark., 2003) (tablo 2) .

Tablo 1: Histopatolojik skorlama tablosu

	0	1	2	3
Peribronşiyal inflamatuvar hücre infiltrasyonu	Yok	Germinal merkezleri belirgin lenfoid folliküller	Lenfoid folliküller arasında infiltrasyon	Sınırları belirsiz band şeklinde
Alveolar septal infiltrasyon	Yok	Minimal	Orta	Ağır, lümeneye doğru uzanım gösteren
Alveoler ödem	Yok	Fokal	Birden fazla alveoli içerisinde	Yaygın, lobüller oluşturan
Alveoler eksuda	Yok	Fokal	Birden fazla alveoli içerisinde	Belirgin, yaygın
Alveolar histiyosit		az alveolde dağılmış	alveolar boşlukta kümeleşme	alveolar boşluğu doldurma
İnterstisyel fibrozis	Yok	Fokal, minimal	Fokal, belirgin fibröz kalınlaşma	Yaygın, belirgin fibröz kalınlaşma
Nekroz	Yok	Fokal, birkaç nekrotik hücre	Multifokal, küçük alanlar	Geniş alanlar

3.4.5. İmmunohistokimya (iNOS ve CC16)

İmmunohistokimya boyamalar için streptavidin-peroksidaz immunohistokimya tekniği uygulandı. Deparafinize kesitler testin her aşaması sonrası 2 kez, 10 dakika tris-buffer (pH 7.4) ile yıkandı. Kesitler öncelikle formaldehitin dokudaki antijenik yapıyı maskeleyici etkisini gidermek için sitrat tamponlu antijen retrieval solusyonunda 20 dakika kaynatıldı. Yıkama işleminden sonra, metanolde hazırlanmış %3'lük H₂O₂ ile 5 dakika inkübe edilerek, dokudaki endojen peroksidaz aktivitesi giderildi. Spesifik olmayan antijenik bağlanmaları engellemek için %5'lik normal keçi serumunda tutulan kesitler daha sonra tavşan poliklonal iNOS (1/250 Santa Cruz Biotechnology) ve cc16 (1/100 Bioss) primer antikoları ile oda ısısında 1 saat süre ile inkübe edildi.

Daha sonra sırasıyla biotinle işaretli sekonder antiserum ve streptavidin peroksidase enzimi ile 10'ar dakika oda ısısında bekletilen kesitler, son olarak 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC) ile mikroskop altında kontrollü olarak 15 dakika süreyle tutuldu. Gill's hematoxylin ile karşıt boyamaları yapılarak, su bazlı immün yapıştırıcı ile kapatıldı. Kesitlerinden en az 10 farklı alandan alınan dijital görüntüler görüntü analiz programı ile değerlendirildi (BAB software, BsPro200 yazılımı, Ankara, Türkiye). Hücrelerin boyanma yoğunluğu dikkate alınmaksızın boyanan her hücre pozitif kabul edilerek toplam 1000 hücre sayılarak pozitif hücreler yüzde olarak değerlendirildi.

3.5. İstatiksel Analiz

İstatiksel analizde; OMÜ'ye ait lisanslı SPSS 21.0 istatiksel analiz paket programı kullanıldı.

YKL, TNF- α ve IL-10 biyokimyasal parametreler, iNOS ve CC16 immünohistokimyasal parametreler ve histopatolojik değerlendirmenin istatiksel analizinde; Levene testi ile homojenlik sağlanamadığı gösterildiğinden Kruskal Wallis testi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Gruplar arası korelasyon incelenmesinde ise Spearman korelasyon testinden yararlanıldı.

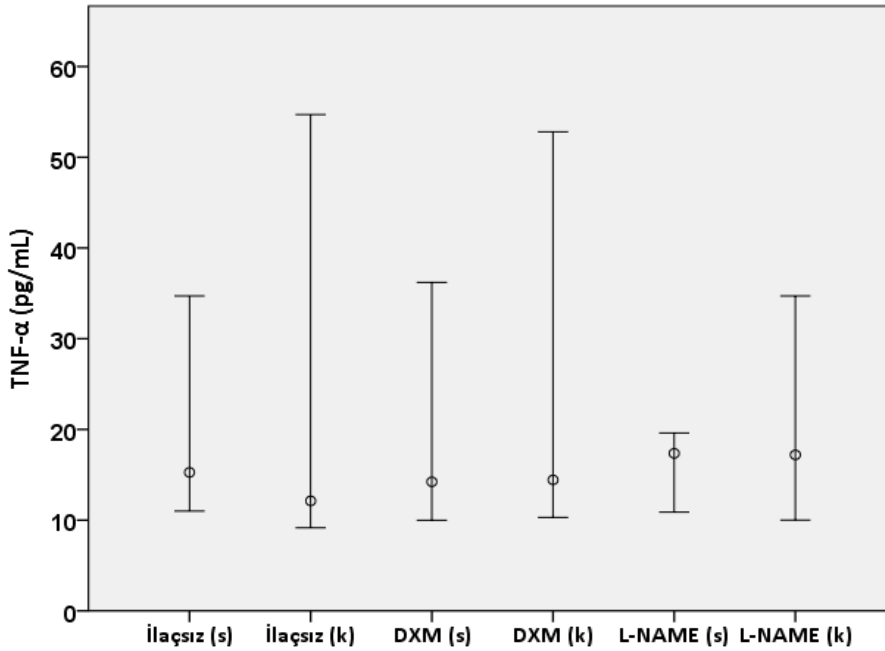
4. SONUÇLAR

Çalışmamızda DXM ve L-NAME'in kombine verildiği hem kontrol hem de kontüzyon gruplarında ratların ölmesi dolayısıyla bu iki grup değerlendirme dışı bırakıldı.

Grupların TNF- α düzeyleri (medyan, min-max) olarak ifade edildi. Grupların TNF- α düzeyleri, bazal seviye olarak referans aldığımız ilaçsız (sham) grup ile istatistiksel olarak benzerlik göstermektedir ($p>0,05$), (tablo 2), (şekil 17).

Tablo 2: Grupların TNF- α düzeyi

	TNF- α (pg/mL) medyan (min-max)		
	Sham	Kontüzyon	P
İlaçsız	15,3 (11,0-34,7)	12,1 (9,20-54,7)	0,944
DXM	14,2 (10,0-36,2)	14,4 (10,3-52,8)	
L-NAME	17,4 (10,9-19,6)	17,2 (10,0-34,7)	



Şekil 17: Grupların TNF- α düzeylerinin “Error Bar” grafiği

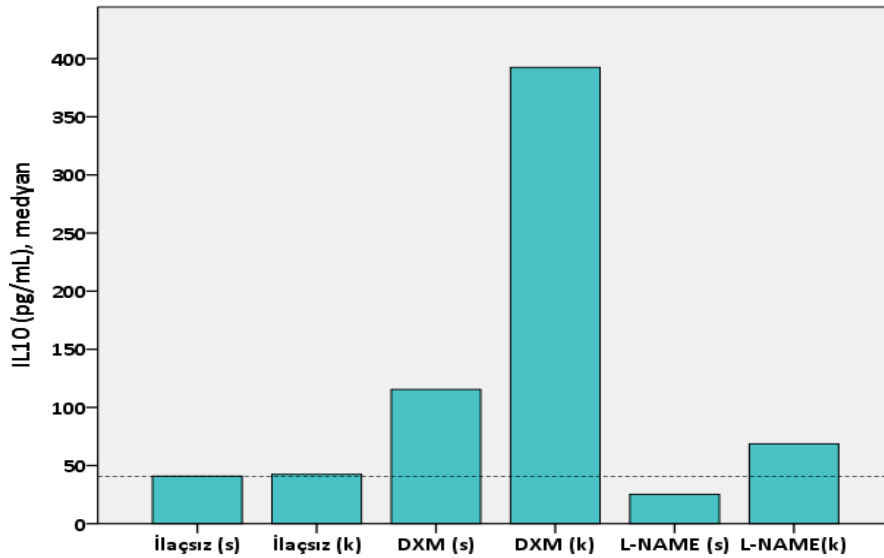
Medyan ve % 95 güven aralığı ile ifade edildi. **s:** sham, **k:** kontüzyon

Gruplarının IL-10 düzeyleri (medyan, min-max) olarak ifade edildi. DXM (sham) grubu IL-10 düzeyinin, L-NAME (sham) grubuna göre yüksek seyrettiği görülmektedir ($p<0,05$). L-NAME (kontüzyon) grubu IL-10 düzeyi, L-NAME (sham) grubuna göre yüksek düzeyde seyretmiştir ($p<0,05$). DXM (kontüzyon) grubu IL-10; ilaçsız (kontüzyon) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p<0,05$), (tablo 3), (şekil 18).

Tablo 3: Grupların IL-10 düzeyleri

	IL-10 (pg/ml), medyan (min-max)	
	Sham	Kontüzyon
İlaçsız	40.8 (14.6-74.4)	42.5 (14-204)
DXM	115 (33.4-560) ^(a)	392 (58.9-1578) ^(b)
L-NAME	25.2 (3.93-58.0)	68.7 (12.9-362) ^(c)

$p<0.05$ istatistiksel anlamlılık, **a:** İlaçsız (sham) ve L-NAME (sham) grubuna göre, **b:** ilaçsız (kontüzyon), DXM (sham) ve L-NAME (kontüzyon) grubuna göre, **c:** L-NAME (sham) grubuna göre



Şekil 18: Grupların IL-10 düzeylerinin sütun grafiği

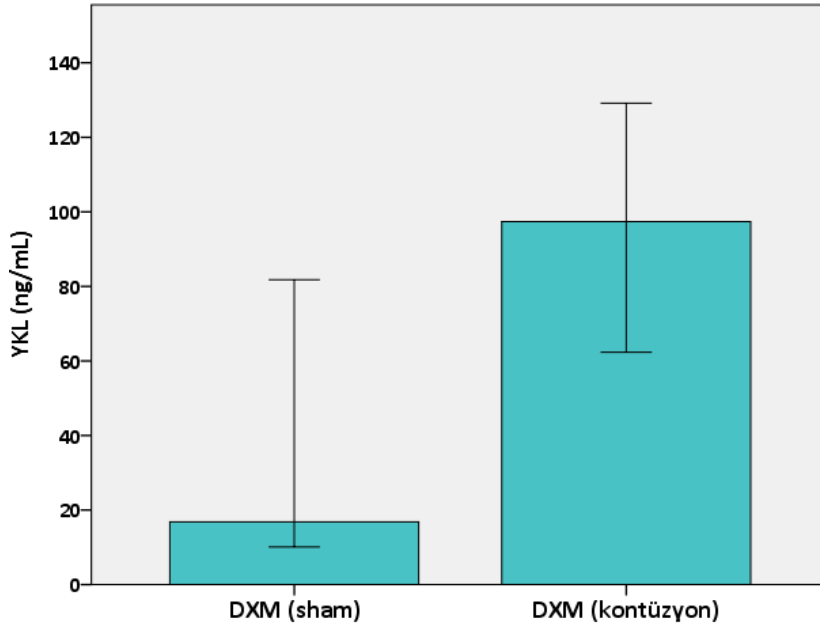
s: sham, k: kontüzyon

YKL-40; DXM (sham) ve DXM (kontüzyon) gruplarında tespit edildi (Tablo 4). Diğer gruplarda deteksiyon limitinin altında olması dolayısıyla bu gruplar istatistiksel değerlendirmeye alınmadı. DXM (kontüzyon) grubunun YKL-40 düzeyi DXM (sham) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek seyretmektedir ($p<0,05$), (şekil 19), (Tablo 4).

Tablo 4: Grupların YKL-40 düzeyleri

	YKL-40 (ng/mL) medyan (min-max)		P
	Sham	Kontüzyon	
İlaçsız	ND	ND	
DXM	16,8 (10,1-81,8)	97,4 (62,3-129)	0,003
L-NAME	ND	ND	

ND: Tespit edilemedi



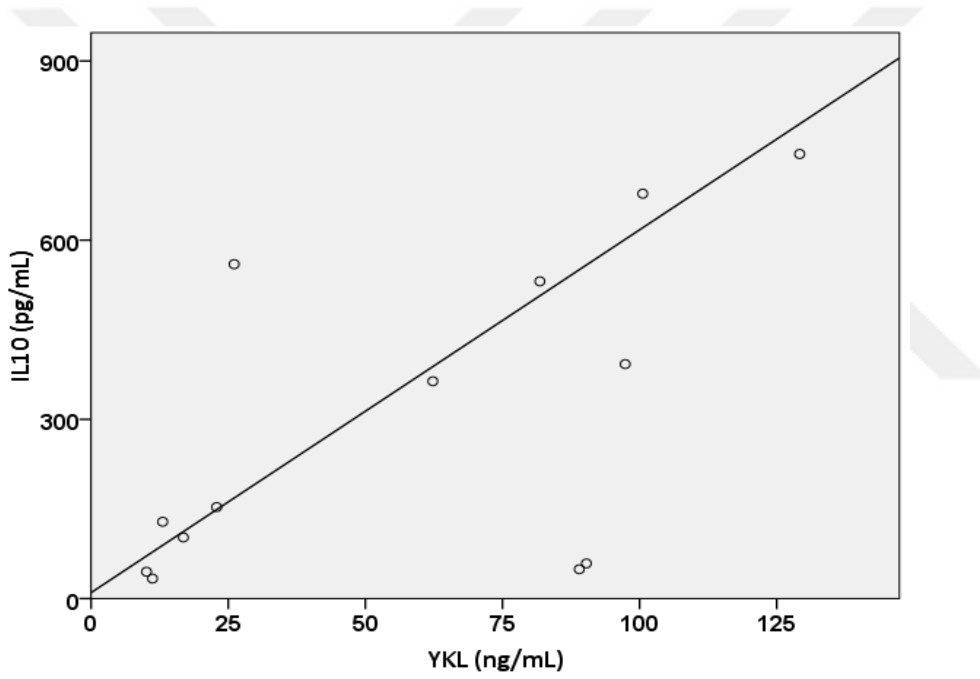
Şekil 19: Grupların YKL-40 düzeylerinin sütun grafiği

Medyan ve % 95 güven aralığı ile ifade edildi

DXM (sham) ve DXM (kontüzyon) gruplarında YKL düzeyleri ile aynı grupların IL-10 düzeyleri arasında orta derecede pozitif korelasyon saptandı ($p<0,05$), (tablo 5), (şekil 20).

Tablo 5: IL-10 ile YKL-40 arasındaki korelasyon değerleri

IL10&YKL-40	
Spearmon rho katsayısı	0,727
p	0,003



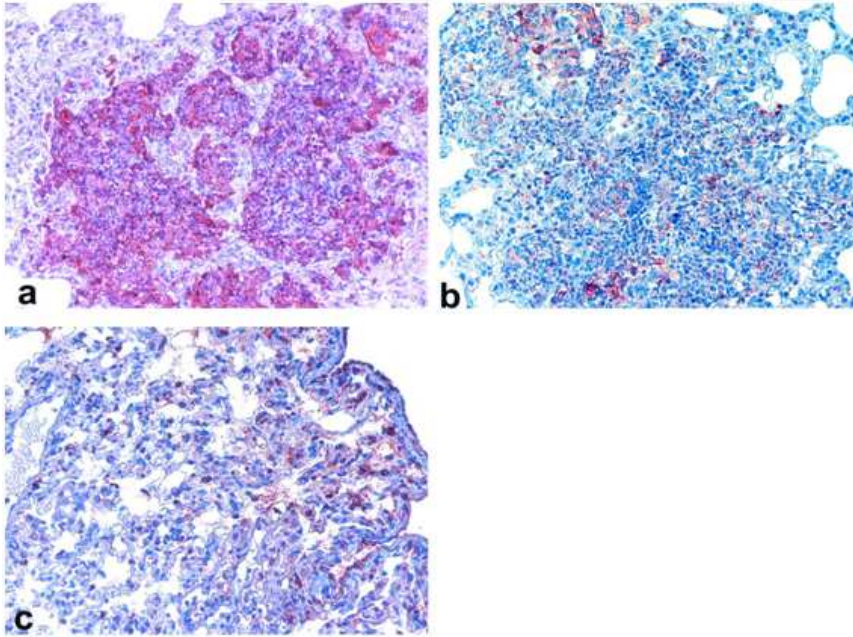
Şekil 20: DXM (sham) ve DXM (kontüzyon) gruplarında YKL ile IL-10 düzeyleri arasındaki saçılım grafiği

Grupların immünohistokimyasal olarak iNOS % pozitif alanı ve semi-kantitatif değerlendirilmesi yapıldı (tablo 6), (şekil 21). DXM ve L-NAME, sham gruplarında iNOS artışı yapmaktadır ($p<0,05$). Kontüzyon oluşturulan gruplarda iNOS düzeyi, sham gruplarına göre yüksek düzeyde iken kontüzyon gruplarına DXM veya L-NAME uygulanması doku iNOS seviyesini azaltmaktadır ($p<0,01$).

Tablo 6: Grupların iNOS immünohistokimyasal dağılımı

iNOS	Görüntü analiz % pozitif alan (semi-kantitatif)	
	Sham	Kontüzyon
İlaçsız	0 (0)	8,7 (3) ^(a)
DXM	1,19 (1) ^(c)	4,81 (2) ^(a, b)
L-NAME	0,71 (1) ^(c)	3,41 (2) ^(a, b)

$p<0,01$, **a:** sham gruplarına göre, **b:** ilaçsız kontüzyon grubuna göre, **c:** ilaçsız (sham) grubuna göre



Şekil 21: Grupların iNOS immünohistokimyasal gösterimi

a: Yoğun immunopozitif reaksiyon ilaç uygulanmış (kontüzyon) grub **b:** DXM (kontüzyon) grubunda iNOS immunopozitif hücreler **c:** L-NAME (kontüzyon) grubu daha az yoğunlukta iNOS pozitif immünohistokimyasal reaksiyon. İmmunoperoksidaz tekniği AEC kromojen, 20x objektif.

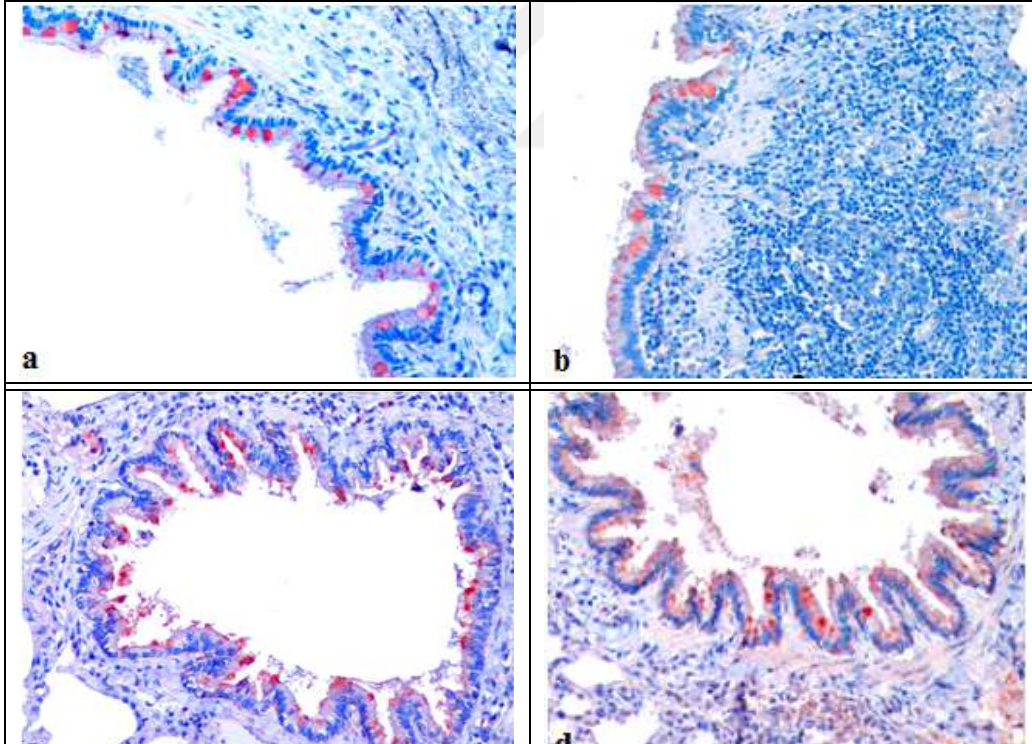
Grupların immünohistokimyasal olarak CC-16 % pozitif alanı ve semi-kantitatif değerlendirilmesi yapıldı (tablo 7, şekil 22). DXM uygulanan gruplarda CC-16 yüksek düzeyde tespit edildi. Ayrıca L-NAME (sham) grubunda CC-16 düzeyinin, L-NAME (kontüzyon) grubuna göre yüksek düzeyde olduğu saptandı.

Tablo 7: Grupların CC-16 immünohistokimyasal dağılımı

CC-16	Görüntü analiz % pozitif alan (Semi-kantitatif)	
	Sham	Kontüzyon
İlaçsız	1,49 (1)	1,96 (1)
DXM	5,41 (3) ^(a)	5,51 (3) ^(b, c)
L-NAME	1,80 (1)	1,41 (1)

P<0.01 anlamlılık, **a:** ilaçsız (sham) grubu ile karşılaştırıldığında

b: ilaçsız (kontüzyon) grubuna göre, **c:** L-NAME (kontüzyon) grubu ile karşılaştırıldığında,



Şekil 22: Grupların CC-16 immünohistokimyasal gösterimi

a: İlaçsız (sham) grubu, **b:** İlaçsız (kontüzyon) grubu, **c:** Dekametazon (sham) grubu, **d:** Dekametazon (kontüzyon) grubu. İmmunoperoksidaz tekniği AEC kromojen, 20x objektif.

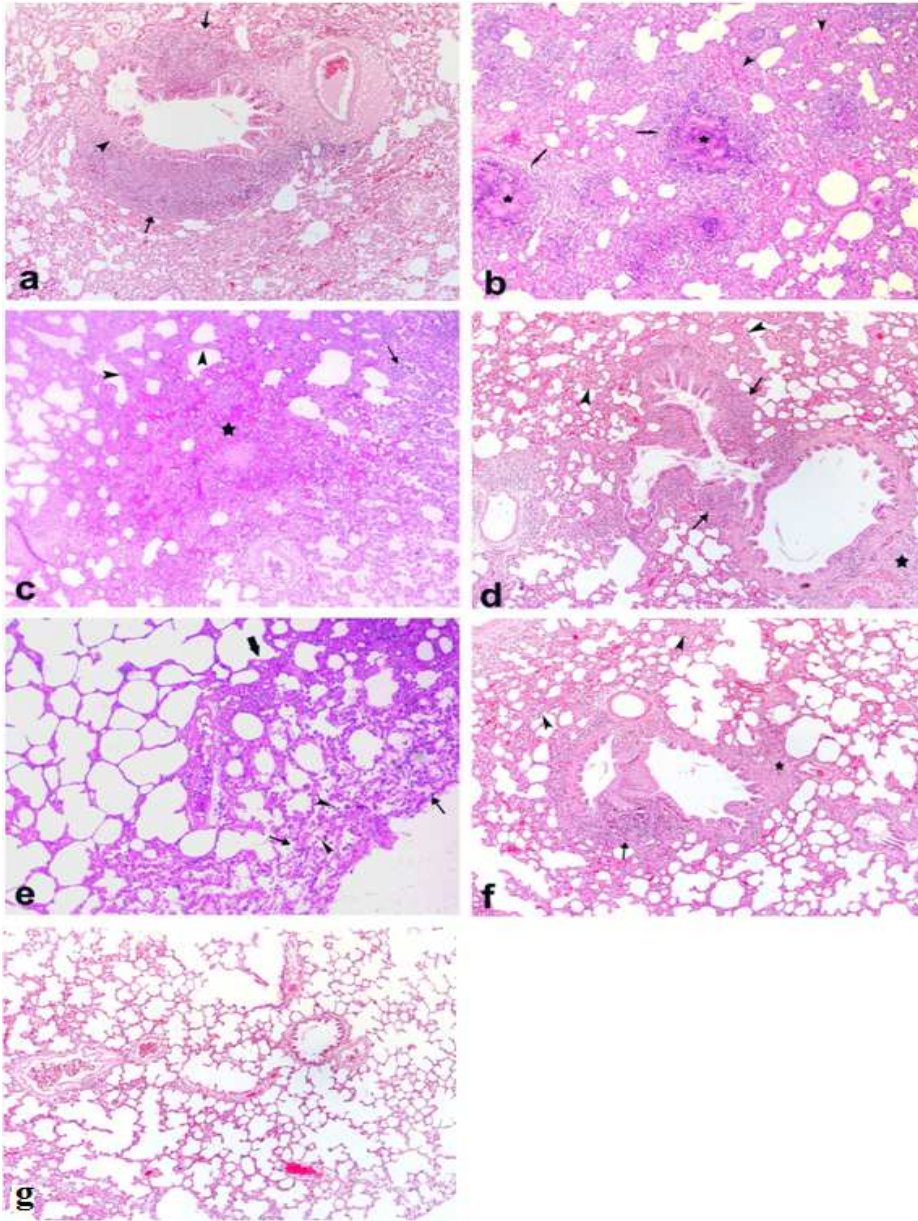
Kontüzyon uygulanan grupların akciğer doku histopatolojik incelemesinde; alveolar ödem, alveolar eksudat, alveolar makrofaj, interstisyel fibrozis, granuloma ve nekrozis tespit edildi. Akciğer kontüzyonu sonrası yüksek doz DXM veya L-NAME ilaç uygulaması; alveolar eksudat, granuloma ve nekrozis de tamamen düzelme sağlarken, peribronşiyal hücre infiltrasyonu, alveolar septal infiltrasyon, alveolar histiyosit ve interstisyel fibrozis fokal minimal seviyeye düşmektedir. DXM, alveolar ödemi ortadan kaldırırken, L-NAME tedavisi ödemi az sayıda alveol düzeyine indirmektedir (tablo 1, 8), (şekil 23).

Tablo 8: Grupların histopatolojik değerlendirilmesi

	Sham Gruplar	İlaçsız (k)	DXM (k)	L-NAME (k)
Peribronşiyal yangısal hücre infiltrasyonu	0	3	2 ^(a)	2 ^(a)
Alveolar septal infiltrasyon	0	3	1 ^(a)	1 ^(a)
Alveolar ödem	0	3	0 ^(a)	2 ^(a)
Alveolar eksudat	0	3	0 ^(a)	0 ^(a)
Alveolar histiyosit	0	3	1 ^(a)	1 ^(a)
İnterstisyel fibrozis	0	3	1 ^(a)	1 ^(a)
Granuloma	0	3	0 ^(a)	0 ^(a)
Nekrozis	0	3	0 ^(a)	0 ^(a)

P<0,01 anlamlılık, **a:** ilaçsız (kontüzyon) grubu ile kıyaslandığında

k: kontüzyon



Şekil 23: Grupların Hematoksilen&Eozin gösterimi

a: Peribronşial hücre infiltrasyonu (oklar) ve fibrozis (ok başı) ilaçsız (kontüzyon) grubu, **b:** ilaçsız (kontüzyon) grubunda nekroz (yıldız) ve garnulasyon dokusu (oklar), **c:** Alveol lümanlerinde ödem (yıldız) ve makrofaj infiltrasyonu (oklar) ilaçsız (kontüzyon) grubu, **d:** Peribronşial ve inter-alveoler septal dokuda hücre infiltrasyonu Dekametazon (kontüzyon) grubu, **e:** İnter-alveoler septal dokuda hücre infiltrasyonu ve hafif kalınlaşma (kalın ok), alveoler makrofajlar (ok başları), alveol lümenlerinde fibrin ve ödem (oklar) L-NAME (kontüzyon) grubu, **f:** L-NAME (kontüzyon) grubunda İnter-alveoler septal dokuda hücre infiltrasyonu ve hafif kalınlaşma (ok başları), peribronşial hücre infiltrasyonu (oklar) ve fibrozis (yıldız), **g:** İlaçsız (sham) grubunda akciğerin normal histolojik görünümü. Hematoksilen Eozin boyama, 4x objektif.

5. TARTIŞMA

Akciğer kontüzyonu; düşmeler, motorlu araç veya motosiklet kazaları, yaya/araç çarpışmaları, patlamalar gibi künt kuvvet mekanizmaları sonucu oluşmakta olup ALI/ARDS, pnömöni, sepsis, çoklu organ yetmezliği gibi komplikasyonlara yol açabilmektedir (Miller ve Mansour, 2007; Bernardin ve Troquet, 2012).

Akciğer kontüzyonu patofizyolojisinde; inflamasyon, artmış alveolo-kapiler permeabilite, pulmoner ödem tablosu gözükmetedir (Cohn ve DuBose, 2010). Aynı zamanda akciğer kontüzyonunda hipoksemi ve vazokonstriksiyon patogenezinde, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşumunda NOS önemli rol almaktadır (Lakshminrusimha ve ark., 2013). Çalışmamızda, akciğer kontüzyonunda doku hasarının azaltılması için güçlü bir antienflamatuvar olan Deksametazon ve NOS inhibitörü olan L-NAME kullanıldı.

Gerek akciğer kontüzyonu başlangıcında ilk 7-10 gün, pnömöni, ALI/ARDS ve sepsis gelişiminde önemli olması gerekse akciğer kontüzyonundan bir hafta sonra nitrik oksit kaynaklı metabolitlerin yüksek düzeyde olması üzerine çalışmamızda tedavi protokolü ilk 7 gün olarak belirlendi. Akciğer kontüzyonunda, eksudatif fazdan proliferatif faza geçiş veya ödem rezolüsyonunda TNF- α , IL-10, iNOS, CC-16 ve YKL-40 biyomarkırlarının düzeyi tayin edilerek ve histopatolojik inceleme yapılarak patogeneze katkı sağlandı. Bu parametrelerin analizi ile akciğer kontüzyon tedavisinde DXM ve L-NAME kullanılmasının tedavideki etkinliğine dair bilgiler edinildi.

Yapılan çalışmalara paralel olarak çalışmamızda hasara uğramış akciğer doku histopatolojik incelemesinde; alveolar ödem, alveolar eksudat, alveolar makrofaj, interstisyel fibrozis, granuloma ve nekrozis tespit edildi (Raghavendran ve ark., 2005; Raghavendran ve ark., 2009). Verimli alveolar epitelyal tamir, fibrozis gelişimini düşürebilmelidir. İnefektif tamir ve patojenik fibrozis; ciddi alveolar membran soyulmasından sonra nekrotik ölümle sonuçlanan fonksiyon kaybı ile oluşmaktadır (Dos Santos, 2008). Akur akciğer hasarı oluşumunda, interstisyel inflamasyon ve interstisyel fibrozis ortalama 3. gün artmaya başlamakta ve 7. gün pik yapmaktadır (Bhargava ve Wendt, 2012).

Akciğer kontüzyonu sonrası DXM veya L-NAME ilaç uygulaması; alveolar eksudat, granuloma ve nekrozis de tamamen düzelmeye sağlarken, peribronşiyal hücre infiltrasyonu, alveolar septal infiltrasyon, alveolar histiyosit ve interstisyel fibrozis fokal minimal seviyeye düşmektedir. DXM tedavisi alveolar ödemi ortadan kaldırırken, L-NAME tedavisi ödemi az sayıda alveol düzeyine indirmektedir. Akciğer kontüzyonu uygulanan hayvan modellerinde kortikosteroid veya antioksidan kullanımının düzelmeyi desteklediği birkaç çalışma bulunması bu verileri önemli kılmaktadır (Turut ve ark., 2009).

Akciğer kontüzyonunda; kemokinler (CINC-1 ve MIP-2) ve sitokinler (TNF- α , IL-6, IL-1 β) genel olarak 24 ve 48 saatte yüksek seviyede iken 7. günde temel düzeyine dönmektedir (Raghavendran ve ark., 2005; Matute-Bello ve ark., 2008). Çalışmamızda ilaç uygulanmayan kontüzyon grubunda 7. gün, TNF- α , IL-10 ve CC-16 bazal seviyede, iNOS yüksek düzeyde tespit edilirken YKL-40 ise tespit edilemedi.

CC16; hayvan ve insan çalışmalarında pulmoner epitelyal fonksiyonun sensitif bir biyomarkırı olduğu için (Helleday ve ark., 2006) çalışmamızda akciğer doku hasar ve tedavisini değerlendirmek için biyomarkır olarak CC-16 kullanıldı. CC-16'nın en önemli görevi, respiratuvar sistemi inflamasyon ve oksidatif stresten korumaktadır (Broeckart ve ark., 2000). CC16 azalması, alveolar hasar, ödem ve düşük akciğer tamirinden oluşmaktadır (Reynolds ve ark., 2004). Çalışmamızda kontüzyon sonrası 7.gün inflamasyonun rezolüsyonu ile doku CC-16 düzeyi bazal seviyede tespit edildi. DXM verilen kontrol ve kontüzyon gruplarında CC-16 sentezinin artması, steroidlerin fizyolojik ve patolojik şartlarda da CC-16 sentezini uyardığının göstergesidir. CC-16 sentez artışı, respiratuvar sistem distal kısmında kontüzyona bağlı hasarın onarımına katkı sağlamaktadır. ARDS'de CC-16 düşüklüğü göz önünde bulundurulursa, CC-16 daki bu artış, ARDS tablosu oluşmasının önlenmesinde önem arz etmektedir. Pnömoni gelişiminde seruma CC-16 sızıntısı dolayısıyla akciğer kontüzyonunda doku CC-16 artışının sağlanması olası pnömöni tablosuna karşı koruyucu olabilir (Alaçam H ve ark., 2013). Yapılan bir çalışmada da GC'lerin akciğerde CC16 sentezini regüle ettiği bildirilmiştir (Hagen ve ark., 1990). Diğer yandan L-NAME'nin kontrol ve kontüzyon gruplarında CC-16 düzeyine etki etmediği tespit edildi.

YKL-40; inflamasyon, remodeling ve hücre ölümünün kontrol edilmesi, anti-patojen rolü ile kritik önemdedir (Chuan Hua He ve ark., 2013). YKL-40; TNF-a ve IL-1 tarafından indüklenen MMP'ı baskılayarak bağ dokusunu inflamatuvar süreçte katabolik ve degradatif etkiden korumaktadır (Ling ve Recklies, 2004). Yeni inflamatuvar markır olan YKL-40'ın fonksiyonu tam bilinmemekle birlikte, oksidan-indüklü akut akciğer hasarını inhibe ettiği ve alveolar tip II hücreleri ile immün hücrelerde apoptozisi önlediği gösterilmiştir (Sohn MH ve ark., 2010). Künt göğüs travmasından sonra alveolar tip II hücreler apoptozise uğramaktadır ve apoptotik hücreler travmatize alveollerde birikmektedir (Seitz ve ark., 2008). Yüksek doz inhale veya oral kortikosteroid kullanan hastalarda YKL-40 artışı olmaktadır (Chupp ve ark., 2007; Hartl ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda serum YKL-40; DXM verilen gruplarda tespit edilirken, DXM verilmeyen gruplarda tespit edilemediğinden akciğer dokusunda steroidlerin YKL-40 ifadesini artırdığı sonucuna ulaşıldı. Bu artışın kontüzyon oluşturulan grupta daha yüksek düzeyde olması, steroidlerin akciğer kontüzyon tedavisinde oksidan kaynaklı hasarı azaltması ve bağ dokusunu degradatif etkiden koruması bakımından değerlidir. Aynı zamanda anti-patojen özelliğide belirtilen YKL-40 daki bu artış sayesinde, akciğer kontüzyonu sonrası pnömöni oluşmasının önlenmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Akciğer kontüzyonu uygulanan hayvan modellerinde, NO'nun pulmoner vasküler reaktivite için önemli bir belirteç olduğu rapor edilmektedir (Villamor ve ark., 2003; Lakshminrusimha ve ark., 2007). Yapılan son çalışmalarda ALI'ya yol açan etkenlerin; TNF- α , IL-1 β , ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin yüksekliği ile birlikte nitrat/nitrit artışı olduğu belirtilmektedir (Lin ve ark., 2006; Su ve ark., 2012). Akciğer kontüzyonlu hastaların akciğer dokusunda nitrotirozin ve ditirozin düzeyinin yaklaşık 2 kat arttığı rapor edilmektedir (Suresh ve ark., 2013). Akciğerlerde L-NAME; pro-oksidadant bir ajan olan vitamin A'nın oksidatif ve nitrozatif etkilerini peroksinitrit oluşumunu önleyerek azaltmaktadır (de Bittencourt Pasquali ve ark., 2012). Çalışmamızda, akciğer kontüzyonunda iNOS sentezinin arttığı görülürken tedavi için kullanılan DXM ve L-NAME'nin artan iNOS düzeyini düşürdüğü görüldü. Böylelikle bu ilaçların kullanımı, nitrit kaynaklı oksidatif stresten akciğer dokusunun korunmasına katkı sağlamaktadır.

Yüksek doz L-NAME uygulamasının normotansif ratlarda, maksimum bir kan basıncı artışından sonra kompensatuvar mekanizmaların devreye girdiğini ve NOS sentezini indüklediği gösterilmektedir (Yamada ve ark., 1996; Chou ve ark., 1998; Qiu ve Baylis, 2000). Çalışmamızda, DXM ve L-NAME'nin sham gruplarında, kompensatuvar mekanizmalar ile iNOS düzeyinde artış yaptığı görüldü.

Künt göğüs travmasını takiben makrofajlar tarafından IL-10 üretiminin hipoksemi ile azaldığı gösterilmiştir (Knöferl MW ve ark., 2000). Akciğer kontüzyonu; dalak, akciğer gibi farklı kompartımanlardaki monosit ve makrofajların immündefonksiyonuna sebep olabilmektedir. Bu durum IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinlerin azalmasına yol açmaktadır. Dolayısıyla makrofajlardaki bu gecikmiş bozukluk ARDS, pnömöni gelişmesine sebep olmaktadır (Perl ve ark., 2005). Çalışmamızda DXM veya L-NAME uygulanan kontüzyon gruplarında TNF- α düzeyi bazal seviyede iken IL-10 düzeyinin artmış olması, inflamasyonun çözülmesine katkı sağlamaktadır.

IL-10, M2 makrofajlarda STAT3 üzerinden Ym1 (kitinaz-like protein) up-regülasyonu sağlamaktadır (Fernando ve ark., 2014). Çalışmamızda YKL-40 ile IL-10 arasında orta düzey bir korelasyon olduğu tespit edildi. Bu durum DXM'nin her iki markırın sentezini benzer yollar üzerinden gerçekleştirdiğini göstermektedir.

NO tarafından IL-10 üretiminin düzenlenmesine dair literatürde karışık sonuçlar bulunmaktadır. LPS-indüklü hasarda NOS inhibitörleri, fare alveolar makrofajlarında IL-10 üretimini artırırken (Qiu ve ark., 1999), serebral iskemili ratlarda kronik L-NAME tedavisi, IL-10 düzeyini düşürmektedir (Clarkson ve ark., 2007). L-NAME; akut tedavide renal dokuda TNF- α , IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinleri artırırken IL-10 düzeyini düşürmektedir (Singh ve ark., 2012; Singh ve ark., 2014). Kronik L-NAME tedavili ratlarda ise hem proinflamatuvar sitokinler hem de IL-10 artışı gözlenmektedir (Miguel-Carrasco ve ark., 2008). Çalışmamızda, L-NAME uygulamasının sham grubuna göre kontüzyon grubunda IL-10 düzeyini artırdığı saptandı.

Akciğer kontüzyonunda ve kontrol grubunda deksametazonun; CC-16, YKL-40 ve IL-10 gibi sitokinlerin sentezini artırması, hastalık ve fizyolojik şartlara bağlı kalmaksızın bu sitokinlerin sentezini artırdığı kanısına varıldı.

Yüksek doz L-NAME veya steroidler ile NO üretiminin yoğun bir şekilde inhibisyonu parasempatikte azalma, sempatetik vazokonstriktör tonusunda önemli artış sağlamaktadır (Sander ve ark., 1995; Scrogin ve ark., 1998). L-NAME (10 mg/kg) ve DXM (5µg/gün) kombine kullanımı, yalnız L-NAME kullanımına göre kan basıncında ortalama 10 mmHg artış sağlamakta ve malign hipertansiyon oluşturmaktadır (Qiu ve Baylis, 2000). Çalışmamızda DXM (15 mg/kg) ve L-NAME (60 mg/kg) kombinasyonunun hem kontrol hem de kontüzyon gruplarındaki ratlarda toksik etki göstererek ölüme yol açması bu iki ilacın yüksek doz kombine kullanımında şüphe oluşturmaktadır. Bu ilaçların yüksek doz kombine kullanımındaki toksik etki mekanizması araştırılmalıdır.

Sonuç olarak; (i) akciğer kontüzyonunda steroidlerin veya NOS inhibitörlerinin kullanımı; alveolar eksudat, granuloma ve nekrozis de tamamen düzelme sağlarken, peribronşiyal hücre infiltrasyonu, alveolar septal infiltrasyon, alveolar histiyosit ve interstisyel fibrozis fokal minimal seviyeye düşmektedir. (ii) Steroidler akciğer dokusunda, YKL-40 ve IL-10 gibi sitokinler ve CC-16 sentezini artırmasının akciğer kontüzyonunda, pnömöni, ALI/ARDS ve sepsis oluşmasının önlenmesi bakımından değerlidir. (iii) Yüksek doz steroid ve NOS inhibitörlerinin kombine kullanımı ratlarda ölüme yol açmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Akciğer kontüzyonu sonrası 7. gün inflamatuvar sitokinler (TNF- α ve IL-10) ile CC-16 bazal seviyeye dönerken iNOS seviyesi yüksek düzeyde kaldı.
YKL-40 ise tespit edilemedi.
2. DXM, kontrol ve kontüzyon gruplarında CC-16 sentezini artırdı.
3. DXM'nin, YKL-40 ve IL-10 sentezini kontüzyon oluşturulan gruplarda sham gruplarındakine göre daha çok artırdığı tespit edildi.
4. L-NAME, akciğer kontüzyonunda IL-10 artışı yaptı.
5. İlaç verilmeyen kontüzyon grubunda IL-10, TNF- α ve YKL-40'ın bazal seviyeye gelmesi, ilaç uygulanan gruplar ile karşılaştırmada çelişki oluşturduğundan akciğer kontüzyonu oluşturulan gruplarda, deksametazon ve L-NAME tedavi etkinliğinin zamana bağlı değişiminin gösterilmesi için 4, 24, 72. saat biyokimyasal markır analizi yapılması önerilmektedir.
6. DXM uygulaması ile sentezi artan YKL-40 ve IL-10 arasında orta derecede korelasyon bulunması dolayısıyla steroidlerin YKL-40 ve IL-10 sentez yollarının benzerliği moleküler düzeyde araştırılmalıdır.
7. Yüksek doz DXM ve L-NAME kombine kullanımının ratlarda ölüme yol açması nedeniyle; (i) kombine kullanımında ilaçların etkileşim mekanizmasının moleküler düzeyde incelenmesi, (ii) kalp ritmi, kan basıncı gibi parametrelerin ölçülmesi, (iii) rat ölümü gerçekleştiğinde postmortem histopatolojik incelemenin yapılması önerilmektedir.
8. ALI/ARDS teşhisi konmuş hastalarda, steroid tedavisinin etkinliği için YKL-40 ve CC-16 bakılması önerilmektedir.
9. Akciğer kontüzyonu subakut dönemde yapılacak IL-10 ve TNF- α testlerinin ELISA çalışmasında dilüsyon yapılmamalıdır.

KAYNAKLAR

- Abe M, Hayashi Y, Murai A, Shibata K, Sakata N, Igarashi R, Katsuragi T, Tanaka K. Effects of inducible nitric oxide synthase inhibitors on asthma depending on administration schedule. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006;40:1083-1095.
- Agassandian M, Mallampalli RK. Surfactant phospholipid metabolism. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2013;1831:612-625.
- Agorreta J, Garayoa M, Montuenga LM, Zulueta JJ. Effects of acute hypoxia and lipopolysaccharide on nitric oxide synthase-2 expression in acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2003;168:287-296.
- Ahmad MA, Sante ED, Giannoudis PV. Assessment of severity of chest trauma: Is there an ideal scoring system? *Injury-International Journal of the Care of the Injured*. 2010;41:981-983.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783-801.
- Alaçam H, Karli R, Alici O, Avci B, Güzel A, Kozan A, Mertoglu C, Murat N, Salis O, Güzel A, Sahin M. The effects of α -tocopherol on oxidative damage and serum levels of Clara cell protein 16 in aspiration pneumonitis induced by bile acids. *Hum Exp Toxicol*. 2013;32:53-61.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 2001;357:593-615.
- Annane D, Sebille V, Bellissant E, Ger-Inf-05 Study G. Effect of low doses of corticosteroids in septic shock patients with or without early acute respiratory distress syndrome. *Critical Care Medicine*. 2006;34:22-30.
- Aono Y, Ledford JG, Mukherjee S, Ogawa H, Nishioka Y, Sone S, Beers MF, Noble PW, Wright JR. Surfactant Protein-D Regulates Effector Cell Function and Fibrotic Lung Remodeling in Response to Bleomycin Injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2012;185:525-536.
- Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 1967;2:319-323.

- Ayuse T, Brienza N, Revelly JP, Odonnell CP, Boitnott JK, Robotham JL. Alterations in Liver Hemodynamics in an Intact Porcine Model of Endotoxin-Shock. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1995;268:H1106-H1114.
- Banerjee A, Gugasyan R, McMahon M, Gerondakis S. Diverse Toll-like receptors utilize Tpl2 to activate extracellular signal-regulated kinase (ERK) in hemopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103:3274-3279.
- Barnes NC, Qiu YS, Pavord ID, Parker D, Davis PA, Zhu L, Johnson M, Thomson NC, Jeffery PK, Grp SCOS. Antiinflammatory effects of salmeterol/fluticasone propionate in chronic obstructive lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2006;173:736-743.
- Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JAC, Berkowitz DE, Hare JM. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature*. 2002;416:337-340.
- Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, Chang B, Duramad O, Coffman RL. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;202:1131-1139.
- Basak S, Hoffmann A. Crosstalk via the NF-kappa B signaling system. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2008;19:187-197.
- Bastos R, Calhoun JH, Baisden CE. Flail chest and pulmonary contusion. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2008;20:39-45.
- Battle CE, Hutchings H, Evans PA. Risk factors that predict mortality in patients with blunt chest wall trauma: A systematic review and meta-analysis. *Injury-International Journal of the Care of the Injured*. 2012;43:8-17.
- Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology*. 2001;11:372-377.

- Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R. Report of The American-European Consensus Conference on Acute Respiratory-Distress Syndrome - Definitions, Mechanisms, Relevant Outcomes, and Clinical-Trial Coordination. *Journal of Critical Care*. 1994;9:72-81.
- Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, ..., Robotham J, Zapol W. The American-European Consensus Conference on ARDS - Definitions, Mechanisms, Relevant Outcomes, and Clinical-Trial Coordination. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1994;149:818-824.
- Bernardin B, Troquet J-M. Initial Management and Resuscitation of Severe Chest Trauma. *Emergency Medicine Clinics of North America*. 2012;30:377-+.
- Berridge MJ. Cell Signalling Pathways. Shaw Laureate in Life Science and Medicine. Portland Press. 2008;2.58
- Bhargava M, Wendt CH. Biomarkers in acute lung injury. *Translational Research*. 2012;159:205-217.
- Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007;81:1-5.
- Bianchi ME, Manfredi AA. Dangers In and Out. *Science*. 2009;323:1683-1684.
- Bigg HF, Wait R, Rowan AD, Cawston TE. The mammalian chitinase-like lectin, YKL-40, binds specifically to type I collagen and modulates the rate of type I collagen fibril formation. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281:21082-21095.
- Bitterman PB. Pathogenesis of Fibrosis in Acute Lung Injury. *American Journal of Medicine*. 1992;92:S39-S43.
- Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2008;19:41-52.
- Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen F. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1998;157:2000-2006.

- Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen F. Number and proliferation of Clara cells in normal human airway epithelium. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1999;159:1585-1591.
- Boonstra A, Rajsbaum R, Holman M, Marques R, Asselin-Paturel C, Pereira JP, Bates EEM, Akira S, Vieira P, Liu Y-J, Trinchieri G, O'Garra A. Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *Journal of Immunology*. 2006;177:7551-7558.
- Bove PF, van der Vliet A. Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006;41:515-527.
- Brasel KJ, Atls S, Amer Coll Surg Comm T, Int AWG. Advanced trauma life support (ATLS (R)): The ninth edition. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2013;74:1363-1366.
- Broeckaert F, Clippe A, Knoop B, Hermans C, Bernard A. Clara cell secretory protein (CC16): Features as a peripheral lung biomarker. *Uteroglobin/Clara Cell Protein Family*. 2000;923:68-77.
- Brower RG, Matthay MA, Morris A, Schoenfeld D, Thompson BT, Wheeler A, Wiedemann HP, Arroliga AC, Fisher CJ, Komara JJ, Perez-Trepichio P, Parsons PE,..., Sibbald WJ, Acute Resp Distress Syndrome N. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2000;342:1301-1308.
- Burdin N, Rousset F, Banchereau J. B-cell-derived IL-10: Production and function. *Methods-a Companion to Methods in Enzymology*. 1997;11:98-111.
- Bush FMdBaA. Corticosteroids in Respiratory Diseases in Children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:12-23.
- Busillo JM, Azzam KM, Cidlowski JA. Glucocorticoids sensitize the innate immune system through regulation of the NLRP3 inflammasome (vol 286, pg 38703, 2011). *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287:13559-13559.

- Busillo JM, Cidlowski JA. The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2013;24:109-119.
- Calfee CS, Eisner MD, Parsons PE, Thompson BT, Conner ER, Jr., Matthay MA, Ware LB, Syndrome NARD. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and clinical outcomes in patients with acute lung injury. *Intensive Care Medicine*. 2009;35:248-257.
- Celli BR, Owen CA. The club cell and its protein, CC16: time to shine. *Lancet Respiratory Medicine*. 2013;1:757-759.
- Chandrasekharan UM, Siemionow M, Unsal M, Yang L, Poptic E, Bohn J, Ozer K, Zhou Z, Howe PH, Penn M, DiCorleto PE. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) receptor-II is required for TNF-alpha-induced leukocyte-endothelial interaction in vivo. *Blood*. 2007;109:1938-1944.
- Chinenov Y, Rogatsky I. Glucocorticoids and the innate immune system: Crosstalk with the Toll-like receptor signaling network. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2007;275:30-42.
- Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension*. 1998;31:643-648.
- Christin F, Meyer N, Launoy A, Roedlich MN, Diebolt JR, Veillon F, Pottecher T. Lung contusion: relevance of initial injured pulmonary volume measurement by computed tomography. *Annales Francaises D Anesthesie Et De Reanimation*. 2003;22:408-413.
- Chronos ZC, Sever-Chroneos Z, Shepherd VL. Pulmonary Surfactant: An Immunological Perspective. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2010;25:13-26.
- Chuan Hua He, Chun Geun Lee, Charles S. Dela Cruz, Chang-Min Lee, Yang Zhou, Farida Ahangari, Bing Ma, Erica L. Herzog, Stephen A. Rosenberg, Yue Li, Adel M. Nour, Chirag R. Parikh, Insa Schmidt, Yorgo Modis, Lloyd Cantley, Elias JA. Chitinase 3-like 1 Regulates Cellular and Tissue Responses via IL-13 Receptor $\alpha 2$. *Cell Rep*. 2013;4:830-841.

- Chupp GL, Lee CG, Jarjour N, Shim YM, Holm CT, He S, Dziura JD, Reed J, Coyle AJ, Kiener P, Cullen M, Grandsaigne M, Dombret M-C, Aubier M, Pretolani M, Elias JA. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *New England Journal of Medicine*. 2007;357:2016-2027.
- Clark AR, Belvisi MG. Maps and legends: The quest for dissociated ligands of the glucocorticoid receptor. *Pharmacology & Therapeutics*. 2012;134:54-67.
- Clarkson AN, Liu H, Schiborra F, Shaw O, Sammut IA, Jackson DM, Appleton I. Angiogenesis as a predictive marker of neurological outcome following hypoxia-ischemia. *Brain Research*. 2007;1171:111-121.
- Clemmedson CJ, Pettersson H. Genesis of respiratory and circulatory changes in blast injury. *Am J Physiol*. 1953;174:316-320.
- Coffman FD. Chitinase 3-Like-1 (CHI3L1): A Putative Disease Marker at the Interface of Proteomics and Glycomics. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2008;45:531-562.
- Coggins MP, Bloch KD. Nitric oxide in the pulmonary vasculature. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2007;27:1877-1885.
- Cohn SM. Pulmonary contusion: Review of the clinical entity. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*. 1997;42:973-979.
- Cohn SM, DuBose JJ. Pulmonary Contusion: An Update on Recent Advances in Clinical Management. *World Journal of Surgery*. 2010;34:1959-1970.
- Cohn SM, Zieg PM. Experimental pulmonary contusion: Review of the literature and description of a new porcine model. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*. 1996;41:565-571.
- Connelly L, Palacios-Callender M, Ameixa C, Moncada S, Hobbs AJ. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *Journal of Immunology*. 2001;166:3873-3881.
- Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The master regulator of immunity to infection. *Journal of Immunology*. 2008;180:5771-5777.

- Daff S. NO synthase: Structures and mechanisms. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*. 2010;23:1-11.
- Davenpeck KL, Gauthier TW, Lefer AM. Inhibition of Endothelial-Derived Nitric-Oxide Promotes P-Selectin Expression and Actions in The Rat Microcirculation. *Gastroenterology*. 1994;107:1050-1058.
- de Bittencourt Pasquali MA, de Oliveira MR, De Bastiani MA, da Rocha RF, Schnorr CE, Gasparotto J, Gelain DP, Fonseca Moreira JC. L-NAME co-treatment prevent oxidative damage in the lung of adult Wistar rats treated with vitamin A supplementation. *Cell Biochemistry and Function*. 2012;30:256-263.
- Dewar D, Moore FA, Moore EE, Balogh Z. Postinjury multiple organ failure. *Injury-International Journal of the Care of the Injured*. 2009;40:912-918.
- Dos Santos CC. Advances in mechanisms of repair and remodelling in acute lung injury. *Intensive Care Medicine*. 2008;34:619-630.
- Dubinsky I. Non-life-threatening blunt chest trauma: Appropriate investigation and treatment. *American Journal of Emergency Medicine*. 1997;15:240-243.
- Eck MJ, Sprang SR. The Structure of Tumor Necrosis Factor-Alpha at 2.6-A Resolution - Implications for Receptor-Binding. *Journal of Biological Chemistry*. 1989;264:17595-17605.
- Eissner G, Kolch W, Scheurich P. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2004;15:353-366.
- El Kasmi KC, Holst J, Coffre M, Mielke L, de Pauw A, Lhocine N, Smith AM, Rutschman R, Kaushal D, Shen Y, Suda T, Donnelly RP, Myers MG, Jr., Alexander W, Vignali DAA, Watowich SS, Ernst M, Hilton DJ, Murray PJ. General nature of the STAT3-activated anti-inflammatory response. *Journal of Immunology*. 2006;177:7880-7888.
- Epler GR. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. *Archives of Internal Medicine*. 2001;161:158-164.

- Erickson SE, Martin GS, Davis JL, Matthay MA, Eisner MD, Network NNA. Recent trends in acute lung injury mortality: 1996-2005. *Critical Care Medicine*. 2009;37:1574-1579.
- Ermert M, Ruppert C, Gunther A, Duncker HR, Seeger W, Ermert L. Cell-specific nitric oxide synthase-isoenzyme expression and regulation in response to endotoxin in intact rat lungs. *Laboratory Investigation*. 2002;82:425-441.
- Evans RM. The Steroid and Thyroid-Hormone Receptor Superfamily. *Science*. 1988;240:889-895.
- Evgenov OV, Hevroy O, Bremnes KE, Bjertnaes L. Effect of aminoguanidine on lung fluid filtration after endotoxin in awake sheep. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000;162:465-470.
- Fahy JV, Dickey BF. MEDICAL PROGRESS Airway Mucus Function and Dysfunction. *New England Journal of Medicine*. 2010;363:2233-2247.
- Fantino E, Gangell CL, Hartl D, Sly PD, Arest CF. Airway, but not serum or urinary, levels of YKL-40 reflect inflammation in early cystic fibrosis lung disease. *Bmc Pulmonary Medicine*. 2014;14:
- Fernandez C, Fukata M, Bernatchez P, Fukata Y, Lin M, Bredt DS, Sessa WC. Identification of Golgi localized acyl transferases that palmitoylate and regulate endothelial nitric oxide synthase. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*. 2006;14:A3-A3.
- Fernando MR, Reyes JL, Iannuzzi J, Leung G, McKay DM. The Pro-Inflammatory Cytokine, Interleukin-6, Enhances the Polarization of Alternatively Activated Macrophages. *Plos One*. 2014;9.
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. 2 Types of Mouse T-Helper Cell .4. Th2 Clones Secrete a Factor That Inhibits Cytokine Production by Th1 Clones. *Journal of Experimental Medicine*. 1989;170:2081-2095.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, Ogarra A. IL-10 Inhibits Cytokine Production by Activated Macrophages. *Journal of Immunology*. 1991;147:3815-3822.

- Flierl MA, Perl M, Rittirsch D, Bartl C, Schreiber H, Fleig V, Schlaf G, Liener U, Brueckner UB, Gebhard F, Huber-Lang MS. The role of C5a in the innate immune response after experimental blunt chest trauma. *Shock*. 2008;29:25-31.
- Flori HR, Ware LB, Milet M, Matthay MA. Early elevation of plasma von Willebrand factor antigen in pediatric acute lung injury is associated with an increased risk of death and prolonged mechanical ventilation. *Pediatric Critical Care Medicine*. 2007;8:96-101.
- Foerstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2012;33:829-+.
- Furuhashi K, Suda T, Nakamura Y, Inui N, Hashimoto D, Miwa S, Hayakawa H, Kusagaya H, Nakano Y, Nakamura H, Chida K. Increased expression of YKL-40, a chitinase-like protein, in serum and lung of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Medicine*. 2010;104:1204-1210.
- Fusetti F, Pijning T, Kalk KH, Bos E, Dijkstra BW. Crystal structure and carbohydrate-binding properties of the human cartilage glycoprotein-39. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278:37753-37760.
- Gabbai FB, Boggiano C, Peter T, Khang S, Archer C, Gold DP, Kelly CJ. Inhibition of inducible nitric oxide synthase intensifies injury and functional deterioration in autoimmune interstitial nephritis. *Journal of Immunology*. 1997;159:6266-6275.
- Garcia O, Carraro G, Navarro S, Bertoncetto I, McQualter J, Driscoll B, Jesudason E, Warburton D. Cell-based therapies for lung disease. *British Medical Bulletin*. 2012;101:147-161.
- GarciaCardena G, Oh P, Liu JW, Schnitzer JE, Sessa WC. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: Implications for nitric oxide signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93:6448-6453.
- Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19:71-82.
- Genovese T, Cuzzocrea S, Di Paola R, Failla M, Mazzon E, Sortino MA, Frasca G, Gili E, Crimi N, Caputi AP, Vancheri C. Inhibition or knock out of Inducible nitric oxide synthase result in resistance to bleomycin-induced lung injury. *Respiratory Research*. 2005;6.

- Gilchrist M, McCauley SD, Befus AD. Expression, localization, and regulation of NOS in human mast cell lines: effects on leukotriene production. *Blood*. 2004;104:462-469.
- Giordano A, Tonello C, Bulbarelli A, Cozzi V, Cinti S, Carruba MO, Nisoli E. Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus. *Febs Letters*. 2002;514:135-140.
- Giulivi C, Kato K, Cooper CE. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption I: cellular physiology. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2006;291:C1225-C1231.
- Gow AJ, Ischiropoulos H. Nitric oxide chemistry and cellular signaling. *Journal of Cellular Physiology*. 2001;187:277-282.
- Grant LR, Yao ZJ, Hedrich CM, Wang F, Moorthy A, Wilson K, Ranatunga D, Bream JH. Stat4-dependent, T-bet-independent regulation of IL-10 in NK cells. *Genes and Immunity*. 2008;9:316-327.
- Grasemann H, Yandava CN, van's Gravesande KS, Deykin A, Pillari A, Ma J, Sonna LA, Lilly C, Stampfer MJ, Israel E, Silverman EK, Drazen JM. A neuronal NO synthase (NOS1) gene polymorphism is associated with asthma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;272:391-394.
- Griffiths MR, Gasque P, Neal JW. The regulation of the CNS innate immune response is vital for the restoration of tissue homeostasis (repair) after acute brain injury: a brief review. *Int J Inflam*. 2010;2010:151097.
- Grutz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *Journal of Leukocyte Biology*. 2005;77:3-15.
- Guillot L, Balloy V, McCormack FX, Golenbock DT, Chignard M, Si-Tahar M. Cutting edge: The immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves toll-like receptor 4. *Journal of Immunology*. 2002;168:5989-5992.
- Guillot L, Nathan N, Tabary O, Thouvenin G, Le Rouzic P, Corvol H, Amselem S, Clement A. Alveolar epithelial cells: Master regulators of lung homeostasis. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2013;45:2568-2573.

- Guo RF, Lentsch AB, Sarma JV, Sun L, Riedemann NC, McClintock SD, McGuire SR, Van Rooijen N, Ward PA. Activator protein-1 activation in acute lung injury. *American Journal of Pathology*. 2002;161:275-282.
- Guo RF, Ward PA. Role of C5A in inflammatory responses. *Annual Review of Immunology*. 2005;23:821-852.
- Hacker H, Redecke V, Blagoev B, Kratchmarova I, Hsu LC, Wang GG, Kamps MP, Raz E, Wagner H, Hacker G, Mann M, Karin M. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature*. 2006;439:204-207.
- Hagen G, Wolf M, Katyal SL, Singh G, Beato M, Suske G. Tissue-Specific Expression, Hormonal-Regulation and 5'-Flanking Gene Region of The Rat Clara Cell-10 kDA Protein - Comparison to Rabbit Uteroglobin. *Nucleic Acids Research*. 1990;18:2939-2946.
- Hamrick MC, Duhn RD, Carney DE, Boswell WC, Ochsner MG. Pulmonary Contusion in the Pediatric Population. *American Surgeon*. 2010;76:721-724.
- Hartl D, Lee CG, Da Silva CA, Chupp GL, Elias JA. Novel biomarkers in asthma: chemokines and chitinase-like proteins. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2009;9:60-66.
- Hayashi T, Beck L, Rossetto C, Gong X, Takikawa O, Takabayashi K, Broide DH, Carson DA, Raz E. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;114:270-279.
- Headley AS, Tolley E, Meduri GU. Infections and the inflammatory response in acute respiratory distress syndrome. *Chest*. 1997;111:1306-1321.
- Hector A, Kormann MSD, Mack I, Latzin P, Casaulta C, Kieninger E, Zhou Z, Yildirim AO, Bohla A, Rieber N, Kappler M, Koller B, Eber E, Eickmeier O, Zielen S, Eickelberg O, Griese M, Mall MA, Hartl D. The Chitinase-Like Protein YKL-40 Modulates Cystic Fibrosis Lung Disease. *Plos One*. 2011;6:
- Helleday R, Segerstedt B, Forsberg B, Mudway I, Nordberg G, Bernard A, Blomberg A. Exploring the time dependence of serum Clara cell protein as a biomarker of pulmonary injury in humans. *Chest*. 2006;130:672-675.

- Henneicke H, Gasparini SJ, Brennan-Speranza TC, Zhou H, Seibel MJ. Glucocorticoids and bone: local effects and systemic implications. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2014;25:197-211.
- Hermans C, Bernard A. Lung epithelium-specific proteins - Characteristics and potential applications as markers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1999;159:646-678.
- Hermans C, Dong P, Robin M, Jadoul M, Bernard A, Bersten AD, Doyle IR. Determinants of serum levels of surfactant proteins A and B and Clara cell protein CC16. *Biomarkers*. 2003;8:461-471.
- Hietbrink F, Koenderman L, Althuisen M, Pillay J, Kamp V, Leenen LPH. Kinetics of The Innate Immune Response After Trauma: Implications For The Development of Late Onset Sepsis. *Shock*. 2013;40:21-27.
- Hietbrink F, Koenderman L, Leenen LPH. Intramedullary nailing of the femur and the systemic activation of monocytes and neutrophils. *World Journal of Emergency Surgery*. 2011;6:
- Hoth JJ, Hudson WP, Brownlee NA, Yoza BK, Hiltbold EK, Meredith JW, McCall CE. Toll-like receptor 2 participates in the response to lung injury in a murine model of pulmonary contusion. *Shock*. 2007;28:447-452.
- Hoth JJ, Wells JD, Brownlee NA, Hiltbold EM, Meredith JW, McCall CE, Yoza BK. Toll-Like Receptor 4-Dependent Responses to Lung Injury in a Murine Model of Pulmonary Contusion. *Shock*. 2009;31:376-381.
- Houston DR, Recklies AD, Krupa JC, van Aalten DMF. Structure and ligand-induced conformational change of the 39-kDa glycoprotein from human articular chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278:30206-30212.
- Hsiao C-C, Lee C-H, Tsao L-Y, Lo H-C. The Dose-Dependent Immunoregulatory Effects of the Nitric Oxide Synthase Inhibitor N-G-Nitro-L-Arginine Methyl Ester in Rats with Sub-Acute Peritonitis. *Plos One*. 2012;7:
- Huang K, Wu LD. YKL-40: a Potential Biomarker for Osteoarthritis. *Journal of International Medical Research*. 2009;37:18-24.

- Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ. Clinical Risks for Development of The Acute Respiratory-Distress Syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1995;151:293-301.
- Inoue H, Aizawa H, Nakano H, Matsumoto K, Kuwano K, Nadel JA, Hara N. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate ozone-induced airway inflammation in guinea pigs - Possible role of interleukin-8. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000;161:249-256.
- Jiang D, Liang J, Li Y, Noble PW. The role of Toll-like receptors in non-infectious lung injury. *Cell Research*. 2006;16:693-701.
- Jiang DH, Liang JR, Fan J, Yu S, Chen SP, Luo Y, Prestwich GD, Mascarenhas MM, Garg HG, Quinn DA, Homer RJ, Goldstein DR, Bucala R, Lee PJ, Medzhitov R, Noble PW. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nature Medicine*. 2005;11:1173-1179.
- Johansen JS, Jensen BV, Roslind A, Nielsen D, Price PA. Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients? *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2006;15:194-202.
- Johansen JS, Schultz NA, Jensen BV. Plasma YKL-40: a potential new cancer biomarker? *Future Oncology*. 2009;5:1065-1082.
- Johansen JS, Stoltenberg M, Hansen M, Florescu A, Horslev-Petersen K, Lorenzen I, Price PA. Serum YKL-40 concentrations in patients with rheumatoid arthritis: relation to disease activity. *Rheumatology*. 1999;38:618-626.
- Johansen JS, Williamson MK, Rice JS, Price PA. Identification of Proteins Secreted by Human Osteoblastic Cells in Culture. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1992;7:501-512.
- Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;117:979-987.
- Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Burdick MD, Kunkel SL. Regulation of Neutrophil-Derived Chemokine Expression by IL-10. *Journal of Immunology*. 1994;152:3559-3569.

- Kawada M, Hachiya Y, Arihiro A, Mizoguchi E. Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions. *Keio J Med.* 2007;56:21-27.
- Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury-International Journal of the Care of the Injured.* 2005;36:691-709.
- Kelly PAT, Ritchie IM, Collins FM. Cerebrovascular Consequences of Repeated Exposure to N-G-Nitro-L-Arginine Methyl-Ester. *British Journal of Pharmacology.* 1995;116:2771-2777.
- Kim JM, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Khan TA, Moore KW. Structure of The Mouse IL-10 Gene and Chromosomal Localization of The Mouse and Human Genes. *Journal of Immunology.* 1992;148:3618-3623.
- Kiraly L, Schreiber M. Management of the crushed chest. *Critical Care Medicine.* 2010;38:S469-S477.
- Knoferl MW, Liener UC, Seitz DH, Perl M, Bruckner UB, Kinzl L, Gebhard F. Cardiopulmonary, histological, and inflammatory alterations after lung contusion in a novel mouse model of blunt chest trauma. *Shock.* 2003;19:519-525.
- Knöferl MW, Jarrar D, Schwacha MG, Angele MK, Cioffi WG, Bland KI, IH. C. Severe hypoxemia in the absence of blood loss causes a gender dimorphic immune response. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279:C2004-2010.
- Kobara M, Tatsumi T, Takeda M, Mano A, Yamanaka S, Shiraishi J, Keira N, Matoba S, Asayama J, Nakagawa M. The dual effects of nitric oxide synthase inhibitors on ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Basic Research in Cardiology.* 2003;98:319-328.
- Koenderman L, Buurman W, Daha MR. The innate immune response. *Immunol Lett.* 2014;162:95-102.
- Kohl J. The role of complement in danger sensing and transmission. *Immunologic Research.* 2006;34:157-176.

- Kornblit B, Helleman D, Munthe-Fog L, Bonde J, Strom JJ, Madsen HO, Johansen JS, Garred P. Plasma YKL-40 and CHI3L1 in systemic inflammation and sepsis-Experience from two prospective cohorts. *Immunobiology*. 2013;218:1227-1234.
- Kriegler M, Perez C, Defay K, Albert I, Lu SD. A Novel Form of TNF/Cachectin is a Cell-Surface Cyto-Toxic Transmembrane Protein - Ramifications for The Complex Physiology of TNF. *Cell*. 1988;53:45-53.
- Kristof AS, Goldberg P, Laubach V, Hussain SNA. Role of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-induced acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1998;158:1883-1889.
- Kruit A, Grutters JC, Ruven HJT, van Moorse CCM, van den Bosch JMM. A CHI3L1 gene polymorphism is associated with serum levels of YKL-40, a novel sarcoidosis marker. *Respiratory Medicine*. 2007;101:1563-1571.
- Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *Journal of Immunology*. 2003;171:4672-4679.
- Kzhyshkowska J, Gratchev A, Goerdts S. Human chitinases and chitinase-like proteins as indicators for inflammation and cancer. *Biomark Insights*. 2007;2:128-146.
- Lakind JS, Holgate ST, Ownby DR, Mansur AH, Helms PJ, Pyatt D, Hays SM. A critical review of the use of Clara cell secretory protein (CC16) as a biomarker of acute or chronic pulmonary effects. *Biomarkers*. 2007;12:445-467.
- Lakshminrusimha S, Suresh MV, Knight PR, Gugino SF, Davidson BA, Helinski JD, Nielsen LC, Russell JA, Yu B, Zeng L, Pennathur S, Raghavendran K. Role of Pulmonary Artery Reactivity and Nitric Oxide in Injury and Inflammation Following Lung Contusion. *Shock*. 2013;39:278-285.
- Lakshminrusimha S, Wiseman D, Black SM, Russell JA, Gugino SF, Oishi P, Steinhorn RH, Fineman JR. The role of nitric oxide synthase-derived reactive oxygen species in the altered relaxation of pulmonary arteries from lambs with increased pulmonary blood flow. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2007;293:H1491-H1497.

- Lander HM, Hajjar DP, Hempstead BL, Mirza UA, Chait BT, Campbell S, Quilliam LA. A molecular redox switch on p21(ras) - Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:4323-4326.
- Laurent TC. The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives - Introduction. *Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and Its Derivatives*. 1998;72:1-2.
- Lee S-H, Jang A-S, Kim Y-E, Cha J-Y, Kim T-H, Jung S, Park S-K, Lee Y-K, Won J-H, Kim Y-H, Park C-S. Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis. *Respiratory Research*. 2010;11:
- Lesur O, Langevin S, Berthiaume Y, Legare M, Skrobik Y, Bellemare J-F, Levy B, Fortier Y, Lauzier F, Bravo G, Nickmilder M, Rousseau E, Bernard A, Critical Care Res Grp Quebec R. Outcome value of Clara cell protein in serum of patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Medicine*. 2006;32:1167-1174.
- Letuve S, Kozhich A, Arouche N, Grandsaigne M, Reed J, Dombret M-C, Kiener PA, Aubier M, Coyle AJ, Pretolani M. YKL-40 is elevated in patients with chronic obstructive pulmonary disease and activates alveolar macrophages. *Journal of Immunology*. 2008;181:5167-5173.
- Li JM, Fan LM, Christie MR, Shah AM. Acute tumor necrosis factor alpha signaling via NADPH oxidase in microvascular endothelial cells: Role of p47(phox) phosphorylation and binding to TRAF4. *Molecular and Cellular Biology*. 2005;25:2320-2330.
- Libreros S, Garcia-Areas R, Shibata Y, Carrio R, Torroella-Kouri M, Iragavarapu-Charyulu V. Induction of proinflammatory mediators by CHI3L1 is reduced by chitin treatment: Decreased tumor metastasis in a breast cancer model. *International Journal of Cancer*. 2012;131:377-386.
- Liener UC, Perl M, Huber-Lang MS, Seitz DH, Brueckner UB, Gebhard F, Knoefel MW. Is the function of alveolar macrophages altered following blunt chest trauma? *Langenbecks Archives of Surgery*. 2011;396:251-259.
- Lin NT, Yang FL, Lee RP, Peng TC, Chen HI. Inducible nitric oxide synthase mediates cytokine release: The time course in conscious and septic rats. *Life Sciences*. 2006;78:1038-1043.

- Ling H, Recklies AD. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular responses to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *Biochemical Journal*. 2004;380:651-659.
- Lippross S, Klueter T, Steubesand N, Oestern S, Mentlein R, Hildebrandt F, Podschun R, Pufe T, Seekamp A, Varoga D. Multiple trauma induces serum production of host defence peptides. *Injury-International Journal of the Care of the Injured*. 2012;43:137-142.
- Locicero J. Epidemiology of Chest Trauma. *Surgical Clinics of North America*. 1989;69:15-19.
- Luce JM, Montgomery AB, Marks JD, Turner J, Metz CA, Murray JF. Ineffectiveness of High-Dose Methylprednisolone in Preventing Parenchymal Lung Injury and Improving Mortality in Patients with Septic Shock. *American Review of Respiratory Disease*. 1988;138:62-68.
- Luettig B, Decker T, Lohmannmatthes ML. Evidence for The Existence of 2 Forms of Membrane Tumor Necrosis Factor - an Integral Protein and a Molecule Attached to Its Receptor. *Journal of Immunology*. 1989;143:4034-4038.
- MacCallum NS, Evans TW. Epidemiology of acute lung injury. *Current Opinion in Critical Care*. 2005;11:43-49.
- Mark KS, Trickler WJ, Miller DW. Tumor necrosis factor-alpha induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001;297:1051-1058.
- Marshall RP, Bellingan G, Webb S, Puddicombe A, Goldsack N, McAnulty RJ, Laurent GJ. Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000;162:1783-1788.
- Mason RJ. Biology of alveolar type II cells. *Respirology*. 2006;11:S12-S15.
- Mathiasen AB, Henningsen KMA, Harutyunyan MJ, Mygind ND, Kastrup J. YKL-40: a new biomarker in cardiovascular disease? *Biomarkers in Medicine*. 2010;4:591-600.

- Matthay MA, Zimmerman GA. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome - Four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2005;33:319-327.
- Matthews JR, Botting CH, Panico M, Morris HR, Hay RT. Inhibition of NF-kappa B DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Research*. 1996;24:2236-2242.
- Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2008;295:L379-L399.
- McAuley DF, Frank JA, Fang XH, Matthay MA. Clinically relevant concentrations of beta(2)-adrenergic agonists stimulate maximal cyclic adenosine monophosphate-dependent airspace fluid clearance and decrease pulmonary edema in experimental acid-induced lung injury. *Critical Care Medicine*. 2004;32:1470-1476.
- McGhan LJ, Jaroszewski DE. The role of toll-like receptor-4 in the development of multi-organ failure following traumatic haemorrhagic shock and resuscitation. *Injury-International Journal of the Care of the Injured*. 2012;43:129-136.
- Meduri GU, Belenchia JM, Estes RJ, Wunderink RG, Eltorky M, Leeper KV. Fibroproliferative Phase of ARDS - Clinical Findings and Effects of Corticosteroids. *Chest*. 1991;100:943-952.
- Meduri GU, Chinn AJ, Leeper KV, Wunderink RG, Tolley E, Winermuram HT, Khare V, Eltorky M. Corticosteroid Rescue Treatment of Progressive Fibroproliferation in Late ARDS - Patterns of Response and Predictors of Outcome. *Chest*. 1994;105:1516-1527.
- Meduri GU, Kohler G, Hendley S, Tolley E, Stentz F, Postlethwaite A. Inflammatory Cytokines in The BAL of Patients with ARDS - Persistent Elevation Over Time Predicts Poor Outcome. *Chest*. 1995;108:1303-1314.
- Miguel-Carrasco JL, Mate A, Monserrat MT, Arias JL, Aramburu O, Vazquez CM. The Role of Inflammatory Markers in the Cardioprotective Effect of L-Carnitine in L-NAME-Induced Hypertension. *American Journal of Hypertension*. 2008;21:1231-1237.
- Miller DL, Mansour KA. Blunt traumatic lung injuries. *Thorac Surg Clin*. 2007;17:57-61, vi.

- Miller PR, Croce MA, Bee TK, Qaisi WG, Smith CP, Collins GL, Fabian TC. ARDS after pulmonary contusion: Accurate measurement of contusion volume identifies high-risk patients. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*. 2001;51:223-230.
- Mills CD, Ley K. M1 and M2 Macrophages: The Chicken and the Egg of Immunity. *Journal of Innate Immunity*. 2014;6:716-726.
- Mills CD, Thomas AC, Lenz LL, Munder M. Macrophage: SHIP of Immunity. *Front Immunol*. 2014;5:620.
- Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *British Journal of Pharmacology*. 2009;158:638-651.
- Mygind ND, Iversen K, Kober L, Goetze JP, Nielsen H, Boesgaard S, Bay M, Johansen JS, Nielsen OW, Kirk V, Kastrup J. The inflammatory biomarker YKL-40 at admission is a strong predictor of overall mortality. *Journal of Internal Medicine*. 2013;273:205-216.
- Naismith JH, Devine TQ, Brandhuber BJ, Sprang SR. Crystallographic Evidence for Dimerization of Unliganded Tumor-Necrosis-Factor Receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270:13303-13307.
- Nathan C. Nitric-Oxide as a Secretory Product of Mammalian-Cells. *Faseb Journal*. 1992;6:3051-3064.
- Neher MD, Weckbach S, Flierl MA, Huber-Lang MS, Stahel PF. Molecular mechanisms of inflammation and tissue injury after major trauma-is complement the "bad guy"? *Journal of Biomedical Science*. 2011;18:
- Neumann P, Gertzberg N, Johnson A. TNF-alpha induces a decrease in eNOS promoter activity. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2004;286:L452-L459.
- Newton K, Dixit VM. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012;4:
- Noble PW, Jiang D. Matrix regulation of lung injury, inflammation, and repair: the role of innate immunity. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:401-404.

- Nojgaard C, Johansen JS, Christensen E, Skovgaard LT, Price PA, Becker U, Grp E. Serum levels of YKL-40 and PIINP as prognostic markers in patients with alcoholic liver disease. *Journal of Hepatology*. 2003;39:179-186.
- Nosratabadi AR, Ljungman AG, Lindahl M, Welch R, Pilon A, Tagesson C. Clara cell 10-kDa protein inhibits endotoxin-induced airway contraction in isolated perfused rat lungs. *Experimental Lung Research*. 2003;29:455-473.
- Osterloh A, Geisinger F, Piedavent M, Fleischer B, Brattig N, Breloer M. Heat shock protein 60 (HSP60) stimulates neutrophil effector functions. *Journal of Leukocyte Biology*. 2009;86:423-434.
- Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annual Review of Immunology*, Vol 29. 2011;29:71-109.
- Pancer Z, Cooper MD. The evolution of adaptive immunity. *Annual Review of Immunology*. 2006;24:497-518.
- Park J-A, Drazen JM, Tschumperlin DJ. The Chitinase-like Protein YKL-40 Is Secreted by Airway Epithelial Cells at Base Line and in Response to Compressive Mechanical Stress. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285:29817-29825.
- Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, Ruzinski JT, Radella F, Park DR, Pugin J, Skerrett SJ, Hudson LD, Martin TR. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2001;164:1896-1903.
- Parsons PE, Eisner MD, Thompson BT, Matthay MA, Ancukiewicz M, Bernard GR, Wheeler AP, Net NARDSCT. Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury. *Critical Care Medicine*. 2005;33:1-6.
- Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and Stabilization of I-Kappa-B-Alpha by Nitric-Oxide Mediates Inhibition of NF-Kappa-B. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270:14214-14219.
- Perez-Gil J. Structure of pulmonary surfactant membranes and films: The role of proteins and lipid-protein interactions. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*. 2008;1778:1676-1695.

- Perl M, Gebhard F, Bruckner UB, Ayala A, Braumuller S, Buttner C, Kinzl L, Knoferl MW. Pulmonary contusion causes impairment of macrophage and lymphocyte immune functions and increases mortality associated with a subsequent septic challenge. *Critical Care Medicine*. 2005;33:1351-1358.
- Piantadosi CA, Schwartz DA. The acute respiratory distress syndrome. *Annals of Internal Medicine*. 2004;141:460-470.
- Plurad DS. Blast injury. *Mil Med*. 2011;176:276-282.
- Pons J, Sauleda J, Regueiro V, Santos C, Lopez M, Ferrer J, Agusti AGN, Bengoechea JA. Expression of Toll-like receptor 2 is up-regulated in monocytes from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research*. 2006;7:
- Prakash M, Bodas M, Prakash D, Nawani N, Khetmalas M, Mandal A, Eriksson C. Diverse pathological implications of YKL-40: Answers may lie in 'outside-in' signaling. *Cellular Signalling*. 2013;25:1567-1573.
- Qiu CB, Baylis C. Dexamethasone worsens nitric oxide inhibition-induced hypertension and renal dysfunction. *American Journal of Hypertension*. 2000;13:1097-1102.
- Qiu HB, Chen DC, Pan JQ, Liu DW, Ma S. Inhibitory effects of nitric oxide and interleukin-10 on production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 in mouse alveolar macrophages. *Acta Pharmacologica Sinica*. 1999;20:271-275.
- Raghavendran K, Davidson BA, Knight PR, Wang Z, Helinski J, Chess PR, Notter RH. Surfactant Dysfunction in Lung Contusion with and Without Superimposed Gastric Aspiration in a Rat Model. *Shock*. 2008;30:508-517.
- Raghavendran K, Davidson BA, Woytash JA, Helinski JD, Marschke CJ, Manderscheid PA, Notter RH, Knight PR. The evolution of isolated bilateral lung contusion from blunt chest trauma in rats: Cellular and cytokine responses. *Shock*. 2005;24:132-138.
- Raghavendran K, Notter RH, Davidson BA, Helinski JD, Kunkel SL, Knight PR. Lung Contusion: Inflammatory Mechanisms and Interaction with Other Injuries. *Shock*. 2009;32:122-130.

- Razavi HM, Wang LF, Weicker S, Rohan M, Law C, McCormack DG, Mehta S. Pulmonary neutrophil infiltration in murine sepsis - Role of inducible nitric oxide synthase. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2004;170:227-233.
- Recklies AD, White C, Ling H. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase beta-mediated signalling pathways. *Biochemical Journal*. 2002;365:119-126.
- Rehli M, Niller HH, Ammon C, Langmann S, Schwarzfischer L, Andreesen R, Krause SW. Transcriptional regulation of CHI3L1, a gene for late stages of macrophage differentiation. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278:44058-44067.
- Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciruba FC, Rogers RM, Hayashi S, Hogg JC. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2001;164:469-473.
- Reynolds HY. Lung inflammation and fibrosis - An alveolar macrophage-centered perspective from the 1970s to 1980s. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2005;171:98-102.
- Reynolds SD, Giangreco A, Hong KU, McGrath KE, Ortiz LA, Stripp BR. Airway injury in lung disease pathophysiology: selective depletion of airway stem and progenitor cell pools potentiates lung inflammation and alveolar dysfunction. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2004;287:L1256-L1265.
- Reynolds SD, Malkinson AM. Clara cell: Progenitor for the bronchiolar epithelium. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2010;42:1-4.
- Rock JR, Hogan BLM. Epithelial Progenitor Cells in Lung Development, Maintenance, Repair, and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol 27. 2011;27:493-512.
- Rosseau S, Hammerl P, Maus U, Walmrath HD, Schutte H, Grimminger F, Seeger W, Lohmeyer J. Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2000;279:L25-L35.

- Ruuls SR, Sedgwick JD. Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatibility complex: Lessons from human genetics and animal models. *American Journal of Human Genetics*. 1999;65:294-301.
- Sabat R, Gruetz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J. Biology of interleukin-10. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2010;21:331-344.
- Sander M, Hansen PG, Victor RG. Sympathetically Mediated Hypertension Caused by Chronic Inhibition of Nitric-Oxide. *Hypertension*. 1995;26:691-695.
- Sanders DB, Larson DF, Hunter K, Gorman M, Yang B. Comparison of tumor necrosis factor-alpha effect on the expression of iNOS in macrophage and cardiac myocytes. *Perfusion-Uk*. 2001;16:67-74.
- Saraiva M, Christensen JR, Veldhoen M, Murphy TL, Murphy KM, O'Garra A. Interleukin-10 Production by Th1 Cells Requires Interleukin-12-Induced STAT4 Transcription Factor and ERK MAP Kinase Activation by High Antigen Dose. *Immunity*. 2009;31:209-219.
- Schilling K, Opitz N, Wiesenthal A, Oess S, Tikkanen R, Mueller-Esterl W, Icking A. Translocation of endothelial nitric-oxide synthase involves a ternary complex with caveolin-1 and NOSTRIN. *Molecular Biology of the Cell*. 2006;17:3870-3880.
- Scrogin KE, Hatton DC, Chi Y, Luft FC. Chronic nitric oxide inhibition with L-NAME: effects on autonomic control of the cardiovascular system. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 1998;274:R367-R374.
- Seitz DH, Palmer A, Niesler U, Froeba JS, Heidemann V, Rittlinger A, Braumueller ST, Zhou S, Gebhard F, Knoefel MW. Alveolar Macrophage Phagocytosis is Enhanced After Blunt Chest Trauma and Alters The Posttraumatic Mediator Release. *Shock*. 2011;36:621-627.
- Seitz DH, Perl M, Mangold S, Neddermann A, Braumueller ST, Zhou S, Bachem MG, Huber-Lang MS, Knoefel MW. Pulmonary Contusion Induces Alveolar Type 2 Epithelial Cell Apoptosis: Role of Alveolar Macrophages and Neutrophils. *Shock*. 2008;30:537-544.

- Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LAJ, Perretti M, Rossi AG, Wallace JL. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *Faseb Journal*. 2007;21:325-332.
- Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID. The use of exhaled nitric oxide to guide asthma management - A randomized controlled trial. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2007;176:231-237.
- Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2004;18:385-405.
- Shibata T, Nagata K, Kobayashi Y. Pivotal Advance: A suppressive role of nitric oxide in MIP-2 production by macrophages upon coculturing with apoptotic cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2006;80:744-752.
- Siewe L, Bollati-Fogolin M, Wickenhauser C, Krieg T, Mueller W, Roers A. Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA. *European Journal of Immunology*. 2006;36:3248-3255.
- Singh P, Castillo A, Islam MT, Majid DSA. Effects of acute systemic inhibition of nitric oxide synthase on plasma levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in anesthetized mice. *Faseb Journal*. 2012;26:
- Singh P, Castillo A, Majid DS. Decrease in IL-10 and increase in TNF- α levels in renal tissues during systemic inhibition of nitric oxide in anesthetized mice. *Physiol Rep*. 2014;2:e00228.
- Sivagurunathan S, Muir MM, Brennan TC, Seale JP, Mason RS. Influence of glucocorticoids on human osteoclast generation and activity. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2005;20:390-398.
- Sohn MH, Kang MJ, Matsuura H, Bhandari V, Chen NY, Lee CG, JA. E. The chitinase-like proteins breast regression protein-39 and YKL-40 regulate hyperoxia-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182:918-928.
- Söderlund T, Ikonen A, Pyhälä T, Handolin L. Factors associated with in-hospital outcomes in 594 consecutive patients suffering from severe blunt chest trauma. *Scand J Surg*. 2014;

- Stahel PF, Barnum SR. The role of the complement system in CNS inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol*. 2006;2:445-456.
- Stahel PF, Smith WR, Moore EE. Role of biological modifiers regulating the immune response after trauma. *Injury-International Journal of the Care of the Injured*. 2007;38:1409-1422.
- Stahel PF, Smith WR, Moore EE. Current trends in resuscitation strategy for the multiply injured patient. *Injury-International Journal of the Care of the Injured*. 2009;40:S27-S35.
- Stamler JS, Lamas S, Fang FC. Nitrosylation: The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*. 2001;106:675-683.
- Strehl C, Spies CM, Buttgerit F. Pharmacodynamics of glucocorticoids. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2011;29:S13-S18.
- Stripp BR, Lund J, Mango GW, Doyen KC, Johnston C, Hultenby K, Nord M, Whitsett JA. Clara cell secretory protein: A determinant of PCB bioaccumulation in mammals. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1996;271:L656-L664.
- Stripp BR, Reynolds SD, Boe IM, Lund J, Power JHT, Coppens JT, Wong V, Reynolds PR, Plopper CG. Clara cell secretory protein deficiency alters Clara cell secretory apparatus and the protein composition of airway lining fluid. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2002;27:170-178.
- Su CF, Kao SJ, Chen HI. Acute respiratory distress syndrome and lung injury: Pathogenetic mechanism and therapeutic implication. *World J Crit Care Med*. 2012;1:50-60.
- Sugiyama Y, Kato S, Abe M, Mitsufuji S, Takeuchi K. Different effects of dexamethasone and the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on caerulein-induced rat acute pancreatitis, depending on the severity. *Inflammopharmacology*. 2005;13:291-301.
- Suresh MV, Yu B, Lakshminrusimha S, Machado-Aranda D, Talarico N, Zeng L, Davidson BA, Pennathur S, Raghavendran K. The protective role of MnTBAP in oxidant-mediated injury and inflammation in a rat model of lung contusion. *Surgery*. 2013;154:980-990.

- Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Forster I, Akira S. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*. 1999;10:39-49.
- Takeda K, Miyahara N, Rha YH, Taube C, Yang ES, Joetham A, Kodama T, Balhorn AM, Dakhama A, Duez C, Evans AJ, Voelker DR, Gelfand EW. Surfactant protein D regulates airway function and allergic inflammation through modulation of macrophage function. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2003;168:783-789.
- Takıl A, Umuroglu T, Yılmaz FG, Eti Z, Yildizeli B, R A. Histopathologic Effects of Lipid Content of Enteral Solutions After Pulmonary Aspiration in Rats. *Nutrition* 2003;19:666-669.
- Tang H, Yan C, Cao J, Sarma JV, Haura EB, Wu M, Gao H. An essential role for Stat3 in regulating IgG immune complex-induced pulmonary inflammation. *Faseb Journal*. 2011;25:4292-4300.
- Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC. Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *Journal of Experimental Medicine*. 2002;195:99-111.
- Terry RL, Miller SD. Molecular control of monocyte development. *Cellular Immunology*. 2014;291:16-21.
- Thorley AJ, Grandolfo D, Lim E, Goldstraw P, Young A, Tetley TD. Innate Immune Responses to Bacterial Ligands in the Peripheral Human Lung - Role of Alveolar Epithelial TLR Expression and Signalling. *Plos One*. 2011;6:
- Tighe RM, Liang J, Liu N, Jung Y, Jiang D, Gunn MD, Noble PW. Recruited Exudative Macrophages Selectively Produce CXCL10 Following Noninfectious Lung Injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2011;45:781-788.
- Toczyłowska-Maminska R, Dolowy K. Ion transporting proteins of human bronchial epithelium. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2012;113:426-432.

- Turut H, Ciralik H, Kilinc M, Ozbag D, Imrek SS. Effects of early administration of dexamethasone, N-acetylcysteine and aprotinin on inflammatory and oxidant-antioxidant status after lung contusion in rats. *Injury-International Journal of the Care of the Injured*. 2009;40:521-527.
- Urbanska J, Karewicz A, Nowakowska M. Polymeric delivery systems for dexamethasone. *Life Sci*. 2014;96:1-6.
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Hacker H, Wagner H. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:31332-31339.
- Vallance P, Leiper J. Blocking NO synthesis: How, where and why? *Nature Reviews Drug Discovery*. 2002;1:939-950.
- Villamor E, Kessels CGA, Fischer MAJ, Bast A, De Mey JGR, Blanco CE. Role of superoxide anion on basal and stimulated nitric oxide activity in neonatal piglet pulmonary vessels. *Pediatric Research*. 2003;54:372-381.
- Villanueva C, Giulivi C. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010;49:307-316.
- Villar J, Slutsky AS. The Incidence of The Adult Respiratory-Distress Syndrome. *American Review of Respiratory Disease*. 1989;140:814-816.
- Visser T, Hietbrink F, Groeneveld KM, Koenderman L, Leenen LPH. Isolated blunt chest injury leads to transient activation of circulating neutrophils. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*. 2011;37:177-184.
- Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*. 1997;390:350-351.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death and Differentiation*. 2003;10:45-65.
- Wanek S, Mayberry JC. Blunt thoracic trauma: flail chest, pulmonary contusion, and blast injury. *Critical Care Clinics*. 2004;20:71-+.

- Wang D, Wei J, Hsu K, Jau JC, Lieu MW, Chao TJ, Chen HI. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on systemic hypotension, cytokines and inducible nitric oxide synthase expression and lung injury following endotoxin administration in rats. *Journal of Biomedical Science*. 1999;6:28-35.
- Wang LF, Patel M, Razavi HM, Weicker S, Joseph MG, McCormack DG, Mehta S. Role of inducible nitric oxide synthase in pulmonary microvascular protein leak in murine sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2002;165:1634-1639.
- Wang SZ, Rosenberger CL, Bao YX, Stark JM, Harrod KS. Clara cell secretory protein modulates lung inflammatory and immune responses to respiratory syncytial virus infection. *Journal of Immunology*. 2003;171:1051-1060.
- Ward PA. Acute lung injury: how the lung inflammatory response works. *European Respiratory Journal*. 2003;22:22S-23S.
- Ware LB, Matthay MA. Medical progress - The acute respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2000;342:1334-1349.
- Weiss DJ, Bertonecello I, Borok Z, Kim C, Panoskaltsis-Mortari A, Reynolds S, Rojas M, Stripp B, Warburton D, Prockop DJ. Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases. *Proc Am Thorac Soc*. 2011;8:223-272.
- Wesselkamper SC, Case LM, Henning LN, Borchers MT, Tichelaar JW, Mason JM, ..., Leikauf GD. Gene expression changes during the development of acute lung injury - Role of transforming growth factor beta. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2005;172:1399-1411.
- Wheeler AP, Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *Lancet*. 2007;369:1553-1564.
- Windsor WT, Syto R, Tzarbopoulos A, Zhang RM, Durkin J, Baldwin S, Paliwal S, Mui PW, Pramanik B, Trotta PP, Tindall SH. Disulfide Bond Assignments and Secondary Structure-Analysis of Human and Murine Interleukin-10. *Biochemistry*. 1993;32:8807-8815.
- Wink DA, Hines HB, Cheng RYS, Switzer CH, Flores-Santana W, Vitek MP, Ridnour LA, Colton CA. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *Journal of Leukocyte Biology*. 2011;89:873-891.

- Wong AP, Keating A, Waddell TK. Airway regeneration: the role of the Clara cell secretory protein and the cells that express it. *Cytotherapy*. 2009;11:676-687.
- Wright JR. Host defense functions of pulmonary surfactant. *Biology of the Neonate*. 2004;85:326-332.
- Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;496:445-455.
- Xian W, McKeon F. Adult stem cells underlying lung regeneration. *Cell Cycle*. 2012;11:887-894.
- Yamada SS, Sasaki AL, Fujihara CK, Malheiros D, DeNucci G, Zatz R. Effect of salt intake and inhibitor dose on arterial hypertension and renal injury induced by chronic nitric oxide blockade. *Hypertension*. 1996;27:1165-1172.
- Zahm JM, Chevillard M, Puchelle E. Wound Repair of Human Surface Respiratory Epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1991;5:242-248.
- Zambon M, Vincent J-L. Mortality rates for patients with acute lung injury/ARDS have decreased over time. *Chest*. 2008;133:1120-1127.
- Zedler S, Faist E. The impact of endogenous triggers on trauma-associated inflammation. *Current Opinion in Critical Care*. 2006;12:595-601.
- Zelova H, Hosek J. TNF-alpha signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflammation Research*. 2013;62:641-651.
- Zemans RL, Colgan SP, Downey GP. Transepithelial Migration of Neutrophils Mechanisms and Implications for Acute Lung Injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2009;40:519-535.
- Ziegler DW, Agarwal NN. The Morbidity and Mortality of Rib Fractures. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*. 1994;37:975-979.
- Zimmermann K, Opitz N, Dedio J, Renne C, Muller-Esterl W, Oess S. NOSTRIN: A protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99:17167-17172.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ahmet KOZAN

Doğum Yeri: Kayseri

Doğum Tarihi: 20.08.1972

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu:

Lisans; İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 1995

Tıpta Uzmanlık; T.C. Sağlık Bakanlığı, Biyokimya ve Klinik Biyokimya, 2004

Çalıştığı Kurum: TC Sağlık Bakanlığı 2000-2015

E-posta: ahmet.kozan1@saglik.gov.tr