

**T. C.**  
**DÜZCE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NÜKLEER FAKTÖR KAPPA B İNHİBİTÖRÜ PİROLİDİN  
DİTİYOKARBAMAT'IN PULMONER HİPERTANSİYON  
TEDAVİSİNDE ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Kimya Mühendisi Aşlı MACİT**

**Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin Farmakoloji  
Programı İçin Öngördüğü YÜKSEK LİSANS TEZİ Olarak Hazırlanmıştır.**

**DÜZCE**  
**2009**

T. C.  
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÜKLEER FAKTÖR KAPPA B İNHİBİTÖRÜ PİROLİDİN  
DİTİYOKARBAMAT'IN PULMONER HİPERTANSİYON TEDAVİSİNDE  
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Kimya Mühendisi Aslı MACİT

Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin Farmakoloji Programı  
İçin Öngördüğü YÜKSEK LİSANS TEZİ Olarak Hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Özge UZUN

DÜZCE  
2009

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu alışma jürimiz tarafından Farmakoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı Doç. Dr. Özge UZUN  
Abant İzzet Baysal Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Farmakoloji AD (İmza)

Üye Doç.Dr. Özlem Yavuz  
Düzce Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Biyokimya AD (İmza)

Üye Prof. Dr. Meryem am  
Düzce Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD (İmza)

ONAY:

Bu tez, Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.

İmza  
Doç.Dr. Özlem Yavuz  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, beni her konuda destekleyen; tezimin hazırlanması aşamasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sevgili tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Özge UZUN' a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince bilgilerinden yararlandığım Sayın Yrd. Doç. Dr. Coşkun SILAN, Dr. Nuran PARLAK ve Dr. Hanife RAHMANLAR' a teşekkür ederim.

Deneylerin yapılması aşamasında bana her türlü desteği veren ve yardımcı olan Dücce Üniversitesi Tıp Fakóltesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Sayın Doç. Dr. Özlem YAVUZ ve asistanlarına; patolojik değerlendirmelerde yardımcı olan Doç.Dr. Nil ÇOMUNOĐLU'na ve ayrıca tezimin oluşumunda desteği ve yardımı olan Yrd. Doç.Dr. Taner YAVUZ' a teşekkür ederim.

Eğitimim süresince göstermiş oldukları anlayıştan dolayı, başta genel müdürümüz Sayın Dr. Eczacı Ömer Hulki OCAK olmak üzere tüm Nobelfarma İlaç ailesine; özellikle de tez çalışmama katkılarından ve gösterdiği iyi niyetten dolayı sevgili müdürüm Salih PAK' a ve beni her konuda destekleyen sevgili arkadaşım Gülden Özen KAHVECİ' ye teşekkür ederim.

Sevgi ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim, bugünlere gelmemi sağlayan sevgili anneme, sevgili babama, biricik kardeşim Akın'ıma; anneannem, dedem ve teyzem başta olmak üzere tüm aileme en içten teşekkürlerimi sunarım. Bana her zaman, her konuda destek olan; ilgi ve sevgisi ile hep yanımda olan sevgili eşim Mesut MACİT'e ve eşimin değerli ailesine, eğitimim süresince beni destekledikleri için teşekkür ederim.

## ÖZET

Pulmoner hipertansiyon (PH), oksidatif stres, pulmoner damar sistemindeki yapısal değişiklikler ve enflamatuvar yanıtlarla ilişkili, ölümcül bir hastalıktır. Bu çalışmada, monokrotalinle (MCT) tetiklenen pulmoner hipertansiyonda pirolidin ditiyokarbamat (PDTC)'ın bir antioksidan ve antienflamatuvar olarak potansiyel koruyucu etkisini araştırmayı amaçladık.

Erişkin erkek sıçanlar, randomize olarak üç gruba ayrıldı: 1. Kontrol grubu, 2. MCT enjekte edilen sıçanlar (60 mg/kg MCT i.p) 3. MCT enjekte edilen ve NF-κB inhibitörü PDTC ile tedavi edilen sıçanlar (3. gün ve 28. günler arasında, günde bir kez, 100 mg/kg i.p (MCT/PDTC tedavi grubu). Tüm sıçanlar, 28 günün sonunda sakrifiye edildi. MCT'ye bağlı olarak yükselen sağ ventrikül ağırlığının, sol ventrikül+septal duvar ağırlığına oranı ( $0,24 \pm 0,01$ 'ten  $0,33 \pm 0,01$ 'e,  $p < 0,05$ ,  $n=6$ ), MCT/PDTC tedavi grubunda, ciddi anlamda düşüş gösterdi ( $0,26 \pm 0,02$ ,  $p < 0,05$ ,  $n=6$ ). MCT'ye bağlı olarak MDA düzeyleri yükselirken ( $0,022 \pm 0,001$   $\mu\text{mol/mg}$  protein ve  $0,031 \pm 0,001$   $\mu\text{mol/mg}$  protein,  $p < 0,05$ ,  $n=6$ ), toplam antioksidan kapasitesinde (TAK), anlamlı bir değişiklik gerçekleşmedi ( $0,78 \pm 0,06$   $\mu\text{mol/mg}$  protein ve  $0,80 \pm 0,03$   $\mu\text{mol/mg}$  protein,  $p < 0,05$ ,  $n=6$ ). MCT enjekte edilen grubun aksine, MCT/PDTC tedavi grubunda ise, MDA düzeyinde anlamlı bir düşüş saptandı ( $0,026 \pm 0,002$   $\mu\text{mol/mg}$  protein,  $p < 0,05$ ,  $n=6$ ). Pulmoner hipertansif sıçanlarla karşılaştırıldığında, MCT/PDTC tedavi grubunda, toplam antioksidan kapasite, anlamlı olarak yüksek bulundu ( $0,91 \pm 0,06$   $\mu\text{mol/mg}$  protein,  $p < 0,05$ ,  $n=6$ ). Histopatolojik incelemeler ise, MCT ile oluşturulmuş pulmoner hipertansiyonda PDTC ile tedavinin, enflamasyon gelişimini, hemorajiyi, konjesyonu ve kollajen birikimini azalttığını göstermektedir. Sonuç olarak, araştırmamız PH patogenezinde NF-κB'nin önemli bir rolü olduğunu ve yeni bir tedavi hedefi oluşturduğunu ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** NF-κB, PDTC, pulmoner hipertansiyon

## ABSTRACT

Pulmonary hypertension (PH) is a fatal disorder that is associated with oxidative stress, structural changes and inflammatory responses in the pulmonary vasculature. In this study, we aimed to investigate the potential protective effects of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) as an antioxidant and anti-inflammatory agent on monocrotaline (MCT)-induced pulmonary hypertension.

Adult male rats randomized into three groups: 1. Control group, 2. MCT-injected rats (60 mg/kg MCT i.p) 3. MCT-injected rats treated with NF- $\kappa$ B inhibitor PDTC (100 mg/kg once daily i.p on days 3 to 28 (the MCT/PDTC group) All rats were sacrificed after 28 days. The MCT-induced increase in right ventricle to left ventricle plus septum weight ratio (from  $0,24\pm 0,01$  to  $0,33\pm 0,01$ ,  $p<0.05$ ,  $n=6$ ) was reduced significantly in the MCT+PDTC-treated group ( $0,26 \pm 0,02$ ,  $p<0.05$ ,  $n=6$ ). MDA levels were elevated (from  $0,022\pm 0,001$   $\mu\text{mol/mg}$  protein to  $0,031\pm 0,001$   $\mu\text{mol/mg}$  protein,  $p<0.05$ ,  $n=6$ ) and total antioxidant status was not changed significantly (from  $0,78\pm 0,06$   $\mu\text{mol/mg}$  protein to  $0,80\pm 0,03$   $\mu\text{mol/mg}$  protein,  $p<0.05$ ,  $n=6$ ) by MCT. In contrast to the MCT-injected group, MDA levels were significantly decreased in the MCT+PDTC-treated group ( $0,026\pm 0,002$ ,  $p<0.05$ ,  $n=6$ ). Total antioxidant status ( $0,91\pm 0,06$   $\mu\text{mol/mg}$  protein,  $p<0.05$ ,  $n=6$ ) was significantly higher in MCT+PDTC-treated rats when compared to pulmonary hypertensive rats. Histopathological examination demonstrated that PDTC treatment reduced the development of inflammation, hemorrhages and congestion, attenuated collagen deposition in MCT-induced PH. In conclusion, our research suggest that NF- $\kappa$ B plays a primary role in the pathogenesis of PH and represent a new target for therapeutic intervention in PH.

**Keywords:** NF- $\kappa$ B, PDTC, pulmonary hypertension

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER.....	xi
TABLolar.....	xii
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1.Pulmoner Hipertansiyon.....	3
2.1.1. Pulmoner hipertansiyonun patobiyolojik mekanizmaları.....	5
2.1.2. Pulmoner hipertansiyon tedavisine yaklaşım.....	10
2.1.3. Deneysel pulmoner hipertansiyon modelleri .....	15
2.2. Reaktif Oksijen Türleri.....	19
2.2.1. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu.....	19
2.2.2. Reaktif oksijen türlerinin sınıflandırılması.....	20
2.2.3. Reaktif oksijen türlerinin kaynakları.....	21
2.2.4. Oksidatif stres ve hasar.....	22
2.2.5. Antioksidan sistemler.....	25
2.2.6. Oksidatif stresin değerlendirilmesi .....	27
2.3. NF kappa B ve oksidatif stres.....	30
2.3.1. NF kappa B.....	30
2.3.2. NF kappa B, oksidatif stres ilişkisi.....	32
2.3.3. NF-κB'nin antioksidanlar tarafından inhibisyonu.....	34
2.3.4. Antioksidanların NF-κB inhibitörü olarak terapötik değeri.....	35
<b>3. ARAÇ GEREÇLER VE YÖNTEM.....</b>	<b>37</b>
3.1. Deney Hayvanları.....	37
3.2. Kullanılan Malzeme ve Kimyasal Maddeler.....	37

3.3. Deney Grupları.....	38
3.4. Örneklerin alınması.....	39
3.4.1. Histopatolojik inceleme için örnek hazırlanması.....	39
3.4.2. Biyokimyasal analizler için örnek hazırlanması.....	39
3.5. Biyokimyasal Çalışmalar.....	40
3.5.1. Akciğer dokusunda MDA ve TAK tayini.....	40
3.5.2. Kanda hematokrit tayini.....	42
3.6. Histopatolojik Çalışmalar.....	42
3.6.1. Sağ ventrikül hipertrofisinin değerlendirilmesi.....	42
3.6.2. Akciğer doku örneklerinin histopatolojik olarak incelenmesi.....	42
3.7. Bulguların Değerlendirilmesi.....	43
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>44</b>
4.1. Sağ ventrikül hipertrofisi.....	44
4.2. Hematokrit.....	44
4.3. Toplam Antioksidan Kapasite (TAK).....	45
4.4. Doku MDA.....	45
4.5. Histopatolojik bulgular.....	46
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>51</b>
<b>6. SONUÇ .....</b>	<b>55</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>56</b>



## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>AA</b>	Araşidonik Asit
<b>ACVRL-1</b>	Aktivin Benzeri kinaz-1
<b>AO</b>	Antioksidan savunma sistemi
<b>AP-1</b>	Aktive protein-1
<b>BAFFR</b>	B hücresi Aktive edici Faktör Reseptörü
<b>BHA</b>	Butil Hidroksi Anisol
<b>BMPR2</b>	Bone Morfogenetik Protein Reseptör Proteini
<b>CAL</b>	Kalibratör
<b>CTRL1</b>	Kontrol 1
<b>CTRL2</b>	Kontrol 2
<b>ÇDYA</b>	Çoklu doymamış yağ asitleri
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>EBV</b>	Epstein-Barr Virüsü
<b>EDE</b>	Endotelin Dönüştürücü Enzim
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasetik asit
<b>eNOS</b>	Endotelial nitrik oksit sentaz
<b>ESR</b>	Elektron spin rezonans
<b>ET</b>	Endotelin
<b>ET<sub>1</sub></b>	Endotelin-1
<b>ETRA</b>	Endotelin Reseptör Antagonisti
<b>FDA</b>	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
<b>GPx</b>	Glutatyon peroksidaz
<b>HE</b>	Hemotoksilen Eozin
<b>HOCl</b>	Hipoklorikasit
<b>HPLC</b>	Yüksek performanslı likit kromatografisi
<b>HTLV</b>	Human T-cell Leukemia Virüsü
<b>5-HTT</b>	5-Hidroksitriptamin taşıyıcısı
<b>İκB</b>	İnhibitör kappa B
<b>IL-</b>	İnterlökin-
<b>i.p</b>	intraperitoneal

<b>KAT</b>	Katalaz
<b>KKB</b>	Kalsiyum Kanal Blokörü
<b>LOOH</b>	lipid hidroperoksitler
<b>LTBR</b>	Lenfotoksin $\beta$ Reseptörü
<b>LPS</b>	Lipopolisakkarit
<b>MCT</b>	Monokrotalin
<b>MDA</b>	Malondialdehit
<b>NAC</b>	N-asetilsistein
<b>NEMO</b>	NF- $\kappa$ B esansiyel modülatörü
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nükleer Faktör Kappa B
<b>NIK</b>	NF- $\kappa$ B indükleyici kinaz
<b>NO</b>	Nitrik Oksit
<b>PDE5i</b>	Fosfodiesteraz İnhibitörü
<b>PDE-5</b>	Fosfodiesteraz
<b>PDGF</b>	Platelet türevi büyüme faktörü
<b>PDTC</b>	Pirolidin Ditiyokarbamat
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostasiklin
<b>PH</b>	Pulmoner Hipertansiyon
<b>PS</b>	Prostasiklin sentaz
<b>ROT</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>sAMP</b>	Siklik Adenozin Monofosfat
<b>sGMP</b>	Siklik Guanozin Monofosfat
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>SOR</b>	Serbest oksijen radikalleri
<b>TAK</b>	Toplam antioksidan kapasite
<b>TBA</b>	Tiyobarbitürik asit
<b>TBARS</b>	Tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddeler
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Faktör $\beta$
<b>TLR</b>	Toll-Like Reseptörler
<b>TNF</b>	Tümör Nekroz Faktör
<b>VEGFR-2</b>	Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 2
<b>VIP</b>	Vazoaktif intestinal peptit

## ŞEKİLLER

**Şekil 2.1.** Pulmoner hipertansiyon patogenezinde rolü olan 3 yolak ve bu yollara ilişkin ilaçların etki yerleri

**Şekil 2.2.** Pulmoner hipertansiyon gelişiminde ve modülasyonunda rolü olan pulmoner vasküler sinyal ileti yolları

**Şekil 2.3.** Reaktif oksijen türleri, antioksidan savunma sistemi ve oksidatif stres arasındaki ilişki

**Şekil 2.4.** Antioksidan savunma sistemleri

**Şekil 2.5.** NF- $\kappa$ B aktivasyonunun klasik ve alternatif yolları

**Şekil 2.6.** NF- $\kappa$ B aktivasyonu ve oksidatif stres ilişkisi

**Şekil 4.1.** Normal Akciğer Dokusu (H&Ex100)

**Şekil 4.2 (A)** MCT'ye bağlı yoğun hemoraji gelişmiş akciğer dokusu (H&Ex400)  
**(B)** MCT ile pulmoner hipertansiyon oluşturulup PDTC ile tedavi edilen sıçanların akciğerinde hemoraji (H&Ex400).

**Şekil 4.3. (A)** MCT'ye bağlı yoğun enflamasyon gelişmiş akciğer dokusu (H&Ex400), **(B)** MCT ile pulmoner hipertansiyon oluşturulup PDTC ile tedavi edilen sıçanların akciğerinde hafif enflamasyon (H&Ex400)

**Şekil 4.4. (A)** MCT'ye bağlı kollajen depolanması (H&Ex400), **(B)** MCT ile pulmoner hipertansiyon oluşturulup PDTC ile tedavi edilen sıçanların akciğerinde kollajen depolanması (H&Ex400)

## **TABLÖLAR**

**Tablo 2.1.** Pulmoner hipertansiyon sınıflandırılması

**Tablo 2.2.** Pulmoner hipertansiyon için risk faktörleri

**Tablo 2.3.** Pulmoner hipertansiyonda vazoaktif maddelerin etkinliğinde oluşan bozukluklar

**Tablo 2.4.** Deneysel pulmoner hipertansiyon modelleri

**Tablo 2.5.** Reaktif oksijen türleri

**Tablo 2.6.** Reaktif oksijen türlerinin kaynakları

**Tablo 3.1.** Deney gruplarına göre ilaç uygulaması

**Tablo 4.1.** (Sağ Ventrikül) / (Sol Ventrikül+Septum) oranı

**Tablo 4.2.** Hematokrit değerleri

**Tablo 4.3.** TAK değerleri

**Tablo 4.4.** Doku MDA değerleri

**Tablo 4.5.** Akciğerlerdeki morfolojik değişikliklerin semikantitatif değerlendirilmesi

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Klinik olarak pulmoner hipertansiyon (PH), ortalama pulmoner arter basıncının 25 mmHg'nin ya da egzersizde 30 mmHg'nin üzerinde olması durumudur (Barst ve ark., 2004). PH, kronik obstruktif akciğer hastalıkları, akut solunum yetmezliği sendromu, akut akciğer hasarı, sistemik skleroz, vasküler akciğer hastalıkları (akut pulmoner emboli, vaskülit) ve interstisyel akciğer hastalıkları ile ilişkilidir.

Pulmoner basıncın artışı pulmoner arter duvarının kalınlaşmasına, endotel disfonksiyonuna ve özellikle dar çaplı pulmoner arterlerde vazokonstriksiyona neden olmaktadır (Pietra ve ark., 1989). Son yıllarda bu patogeneze bağlı gelişen süreçlerde enflamatuvar mediyatörler üzerinde sıkça durulmaktadır. Bu açıdan enflamatuvar yanıtın oluşmasında, hücre büyümesinin kontrolünde, apoptozda rolleri olduğu bilinen sitokinlerin, hücre adezyon moleküllerinin, kemoatraktan proteinlerin ve büyüme faktörlerinin önemi olduğu açıktır. Sözkonusu moleküllerin, genlerinin transkripsiyonunun kontrolünde ise önemli bir düzenleyici faktör olan Nükleer Faktör Kappa B (NF- $\kappa$ B)'nin rolü olduğu anlaşılmıştır (Ghosh ve Karin, 2002). Bu nedenle, enflamasyona ilişkin NF- $\kappa$ B ile bağlantılı yolların aydınlatılması, çeşitli hücrel ve viral proteinlerin bu yolları nasıl etkilediğinin anlaşılması, son yılların önemli araştırma alanlarından birisi olmuştur. Diğer taraftan, pulmoner farmakoloji açısından enflamatuvar akciğer hastalıkları ve oksidatif stres ilişkisi, araştırmacıların üzerinde yoğun çalıştığı konulardan biri olmaya devam etmektedir. Nitekim akciğer ve pulmoner arterlerde PH'ye bağlı yapısal bozuklukların antioksidanlarla engellenebileceğini ortaya koyan deneysel çalışmalar bulunmaktadır. Etiyoloji içinde enflamasyonun rolü olduğu düşünüldüğünde, PH'de serbest oksijen radikalleri ve NF- $\kappa$ B arasındaki ilişki, tedaviye yaklaşımda ilginç bir araştırma konusu olarak görülmektedir. Bunu düşündüren, oksidan maddelerin NF- $\kappa$ B indüksiyonuna (Schoonbroodt ve Piette, 2000), antioksidanların ise NF- $\kappa$ B inhibisyonuna neden olabileceğinin anlaşılmış olmasıdır (D'Acquisto ve ark., 2002).

Yukarıda özetini sunduğumuz veriler ışığında planladığımız bu çalışmada, sıçanlarda monokrotalinle (MCT) oluşturulmuş deneysel PH modelinde, NF-κB inhibitörü, pırolidin ditiyokarbamatın (PDTC) etkinliğinin değerlendirilmesini amaçladık. Bu amaçla, çalışmamızın ilk aşamasında, PDTC'nin doku düzeyinde lipit peroksidasyonunu ve toplam antioksidan durumu nasıl etkilediğini araştırdık. İkinci aşamada ise PDTC tedavisinin, akciğer dokusunda PH'ye bağlı patoloji üzerinde etkili olup olmadığını değerlendirdik.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Pulmoner Hipertansiyon**

Klinik olarak ortalama pulmoner arter basıncının, dinlenme durumunda 25mmHg'den; egzersiz durumunda da 30 mmHg'den yüksek olması durumu olarak bilinen PH, ilk kez 1891 yılında Romberg tarafından tanımlanmıştır. Romberg'in bu ilk makalesinde PH, başka hiçbir önemli belirti olmaksızın oluşan sağ ventrikül hipertrofisi ve pulmoner arterial sklerozis olarak ifade edilmektedir (Nicod, 2007). Tanımlanan bu pulmoner damar hastalığına bağlı hemodinamik değişiklikler ise sağ kalp kateterizasyonu ile pulmoner basıncın ölçülebilmesi ve pulmoner direncin değişik ilaçlarla düşürülebilmesi ile daha iyi anlaşılmasına başlanmıştır (Dresdale ve ark., 1951; Wood, 1958). Daha sonraları hastalığın histopatolojik olarak da tanımlaması yapılmış; pulmoner arter basıncının yüksek düzeylerde olmasına damarların proliferasyonu ve yeniden yapılanmasının eşlik ettiği, pleksiform lezyonların olduğu gösterilmiştir. PH'nin gelişim mekanizmaları ve tedavisi üzerine çok sayıda araştırma yapılmış ve yapılmaktadır. Bununla birlikte günümüzde PH tedavisi çok sınırlıdır ve tanıdan sonra ortalama yaşam süresi 3 yıl olarak belirlenmiştir (D'alonzo ve ark., 1991).

#### **PH sınıflandırılması:**

PH, önceleri primer (idiyopatik) ve sekonder (başka hastalıklara bağlı olarak gelişen) olarak iki grupta sınıflandırılmıştı. Ancak daha sonra araştırmacılar ikincil nedenlere bağlı olarak gelişen PH'de oluşan histopatolojik değişikliklerin de idiyopatik PH'ye benzediğini farkettiler. Bu nedenle 2003 yılında klinik tanıya göre yapılan PH sınıflandırılması güncellik kazandı. Bundan 5 yıl sonra yapılan 4. Dünya Pulmoner Hipertansiyon Sempozyumu'nda ise sözü edilen sınıflandırmaya bazı küçük eklemeler yapıldı (Rabinovitch, 2008). Tablo 2.1'de bu son değişiklikleri de kapsayan PH sınıflandırılması verilmiştir (Boutet ve ark., 2008). Tabloda belirtildiği gibi günümüzde PH tanımı hem idiyopatik PH'yi hem de kollagen doku hastalıkları,

hemoglobino patiler, konjenital kalp hastalıkları, portal hipertansiyon, ilaçlar, toksinler ve diğer nedenlere bağlı gelişen PH'yi kapsamaktadır.

**Tablo 2.1.** PH sınıflandırılması. (Boutet ve ark., 2008'den alınmıştır.)

<b>Pulmoner arteriyel hipertansiyon (Kategori I)</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- İdiyopatik</li><li>- Ailesel</li><li>- Kollajen vasküler hastalıklar, PA şantlar, portal hipertansiyon, HIV enfeksiyonu, ilaç ve toksinler vs'nin eşlik ettiği durumlar (herediter hemorajik telenjiyektazi, hemoglobino patiler, tiroid hastalıkları)</li><li>- Pulmoner veno-okluziv hastalık, pulmoner kapiller hemangiomatozis ve yeni doğanın persistent pulmoner hipertansiyonu sonucu olarak önemli venöz veya kapiler tutulum</li></ul>
<b>Sol kalp yetmezliğine bağlı olarak gelişen PH (Kategori II)</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- Sol valvular kalp hastalıkları veya miyokardiyal disfonksiyon sonucu gelişen sol atriyal ya da ventriküler kalp hastalıkları</li></ul>
<b>Akciğer hastalıkları ve/veya hipokseminin eşlik ettiği PH (Kategori III)</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- Kronik obstruktif pulmoner hastalıklar</li><li>- İnterstisyel akciğer hastalıkları</li><li>- Uykuda solunum bozuklukları</li><li>- Alveolar hipoventilasyon</li><li>- Yüksek irtifada yaşıyor olmak</li><li>- Gelişimsel bozukluklar</li></ul>
<b>Kronik trombotik ve/veya embolik hastalıklara bağlı PH</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- Proksimal pulmoner arterin tromboembolik obstrüksiyonu</li><li>- Distal pulmoner arterin tromboembolik obstrüksiyonu</li><li>- Nontrombotik pulmoner emboli (tümör, parazitler, yabancı cisim vs.)</li></ul>
<b>Değişik nedenlerden kaynaklanan PH</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- Sarkoidozis, pulmoner Langerhans hücreleri histiositozisi, lenfanjiolemyomatozis</li><li>- Pulmoner damarların sıkışması (adenopati, tumor fibrosing mediastinitis)</li></ul>



### **Risk faktörleri:**

Pulmoner hipertansiyon için belirlenen risk faktörlerinin bir kısmı hastalığa neden olanlar, diğer kısmı ise hastalığın ilerlemesini kolaylaştıranlar olarak sınıflandırılabilir (Clarke, 2002). Tablo 2.2’de PH için risk olabilecek etkenler kesin, olası ve zayıf olasılıklı olarak değerlendirilmiştir.

**Tablo 2.2.** PH için risk faktörleri. (Clarke, 2002’den alınmıştır).

İlaç ve Toksinler	Demografik ve Tıbbi Koşullar	Hastalıklar
<b>Kesin</b> Aminoreks Fenfluramin Toksik yağlar	<b>Kesin</b> Seks	<b>Kesin</b> HIV enfeksiyonu
<b>Büyük olasılık</b> Amfetamin Triptofan		<b>Büyük olasılık</b> Portal hipertansiyon Kollajen vasküler hastalıklar
<b>Olası</b> Meta amfetaminler Kokain	<b>Olası</b> Gebelik Sistemik hipertansiyon Splenektomi	<b>Olası</b> Tiroit hastalıkları Hemoglobinopatiler Glikojen depo hastalıkları Lipit depo hastalıkları
<b>Zayıf olasılık</b> Antidepresanlar Oral kontraseptifler Östrojen tedavisi Sigara içiciliği	<b>Zayıf olasılık</b> Obezite	

### **2.1.1. Pulmoner hipertansiyonun patobiyolojik mekanizmaları**

#### **Genetik:**

1980’lerde Amerika Birleşik Devletleri’nde günümüzde idiyopatik PH olarak adlandırılan, primer PH tanısı konulan hastaların kayıtları incelendiğinde, bu

hastaların % 6'sının birinci derece yakınlarında da PH olduğu belirlenmişti (McGoan ve Kane, 2009). Ancak PH'nin bazı ailesel olgularda genetik geçişli olabileceğine dair ilk kesin bulgular 2000 yılında elde edildi (Lane ve ark., 2000; Deng ve ark., 2000). Bu araştırmalarda kromozom 2'de bulunan ve Bone Morfogenetik Protein Reseptör proteinini (*BMPR2*) kodlayan transforming growth faktör  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) reseptörü geninin allelik varyantının ailesel PH ile ilişkisi gösterilmiştir. Araştırmaların sonucuna göre allelik varyantların *BMPR2* proteininde amino asit değişikliğine yol açması, pulmoner damarların düz kas hücrelerinde hücre apoptozu ile ilgili sinyal iletimini bozup hücre proliferasyona neden olmaktadır.

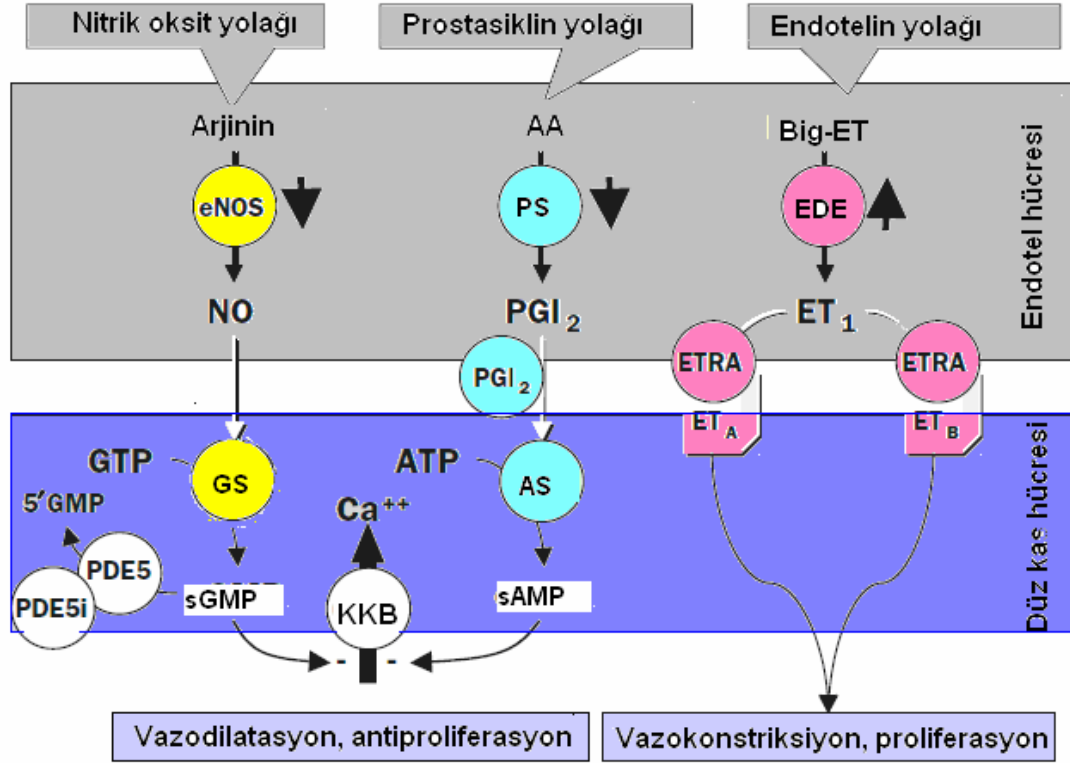
PH'nin genetik nedenlerinin incelenmesi sonucu bir başka TGF- $\beta$  reseptörü olan ve kromozom 12'de bulunan Aktivin Benzeri kinaz-1 (*ACVRL-1*) reseptörünü kodlayan gen üzerinde de durulmuştur (Trembath ve ark., 2001). Bu çalışmada endotel hücrelerinde bulunan *ACVRL-1* reseptörü genindeki allelik varyantların, herediter hemorajik telenjiyektazi ve PH'ye neden olduğu belirlenmiştir.

5-Hidroksitriptamin taşıyıcısı (5-HTT) aktivitesinin, pulmoner damar düz kas hücrelerinde proliferasyona aracılık ettiği bilinmektedir. PH'nin genetik nedenlerine ilişkin araştırmalarda bu taşıyıcının gen promotörünün allelik varyantlarının (*SLC6A4* olarak da bilinir) 5-HTT taşıyıcısı ekspresyonunu artırdığı ortaya konmuştur (Eddahibi ve ark., 2002; Marcos ve ark., 2004). Bu açıdan idiyopatik PH hastalarının % 65'inin homozigot olduğu belirlenmiştir (Eddahibi ve ark., 2001).

Bu alanda genetik araştırmaların ilerlemesi, toplumda PH oluşabilme riskinin öngörülüp önleyici tedbirleri erkenden almak açısından yararlı olacaktır.

### **Moleküler ve hücresel mekanizmalar:**

Pulmoner hipertansiyona neden olan ya da pulmoner hipertansiyon patogeneze katılan mekanizmalar Şekil 2.1' de özetlenmiştir. Bu mekanizmalar; nitrik oksit (NO) yolağı, prostasiklin yolağı ve endotelin yolağı üzerinden açıklanmıştır. Günümüzde PH tedavisinde ilaç olarak kullanılan maddeler de bu yolaklar üzerinden etki göstermektedir.



**Şekil 2.1.** Pulmoner hipertansiyon patogenezinde rolü olan 3 yolak ve bu yolağlara ilişkin ilaçların etki yerleri (Şekil McGoon ve Kane, 2009'dan alınmıştır) (Kısaltmalar: KKB: Kalsiyum kanal blokörü, ETRA: Endotelin reseptör antagonisti, PDE5i: Fosfodiesteraz inhibitörü, AA: araşidonic asit).

**NO yolağı:** Nitrik oksit tip III endotel hücrelerinde endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) aracılığı ile sentezlenir ve düz kas hücrelerinde guanilat siklazı aktive ederek sGMP oluşmasına neden olur. sGMP, düz kas hücrelerinin kalsiyum içeriğinin azalmasını ve düz kasın gevşemesini sağlar. sGMP etkinliği ise PDE-5 enzimi ile sonlandırılır. PH hastalarında eNOS aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir.

**Prostasiklin (PGI<sub>2</sub>) Yolağı:** PGI<sub>2</sub> oluşumu endotel hücrelerinde prostasiklin sentaz (PS) enzimi tarafından yapılır. Oluşan PGI<sub>2</sub> adenilat siklaz enzimini aktive ederek sAMP oluşmasına ve düz kasın gevşemesine neden olur. sAMP etkinliği de PDE-5 enzimi ile sonlandırılır. PH hastalarında PS aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir.

Hem NO hem de PGI<sub>2</sub> vazodilatasyona ve antiproliferatif etkiye sahiptir.

**Endotelin Yolağı:** Big-(pro-) endotelin (ET), endotel hücrelerinde Endotelin Dönüştürücü Enzim (ECE) aracılığı ile ET<sub>1</sub>'e (21 amino asitli bir peptit) dönüşür. ET<sub>1</sub> düz kas hücrelerinde ET<sub>A</sub> ve ET<sub>B</sub> reseptörleri aracılığı ile kontraksiyona, proliferasyona ve hipertrofiye neden olur. ET<sub>1</sub> aynı zamanda endotelial ET<sub>A</sub> ve ET<sub>B</sub> reseptörlerine de bağlanır. PH'si olan hastalarda EDE aktivitesinin ve ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir.

PH oluşumunda rolü olan ve Şekil 2.1’de özetlenen mekanizmalar dışında düz kastaki potasyum kanallarının ( $K_v$ ) inhibisyonunun da hastalığın patogenezi katıldığı düşünülmektedir (Weir ve ark., 1998; Michelakis ve Weir, 2001). PH patogenezi açısından diğer vazoaaktif maddeler de incelenmiştir. Tablo 2.3’de bu maddelerin, PH’de değişen aktiviteleri, vazokonstriksiyon, hücre proliferasyonu ve trombozis üzerine etkileri verilmiştir.

**Tablo 2.3.** PH’de vazoaaktif maddelerin etkinliğinde oluşan bozukluklar. (Chan ve Loscalzo, 2008’den değiştirilerek alınmıştır).

Etken	PH’de değişen etkinlik	Vazkonstriksiyon üzerine etkisi	Hücre proliferasyonu üzerine etkisi	Trombozis üzerine etkisi
-Serotonin	Artma	Artma	Artma	Artma
-Tromboksan	Artma	Artma	Artma	Artma
-Vazoaaktif intestinal peptit (VIP)	Artma	Artma	Artma	Artma
-Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)	Artma	Etki yok	Artma	Etki yok
-Rho-kinaz	Artma	Artma	Artma	Artma
-Anjiopietin	Artma	Etki yok	Artma	Etki yok
-5-Lipoksijenaz (5-LO)	Artma	Artma	Artma	Artma
-Vasküler elastaz	Artma	Artma	Artma	Artma

### **Enflamasyon:**

Hayvan modellerinde yapılan araştırmalar PH’nin oluşumu ve ilerlemesinde enflamasyonun önemine dikkat çekmektedir (Voelkel ve ark., 1994; Kimura ve ark., 1998).

İnsanlarda değişik nedenlere bağılı olarak gelişen PH'nin bazı tiplerinde enflamatuvar mekanizmaların önemli bir rol oynadığı anlaşılmıştır. İmmün yetmezliği ya da başka bir sistemik hastalığı olmayan PH hastalarında, dolaşımda antinükleer antikörlerin saptanmış olması (Isern ve ark., 1992), IL-1 ve IL-6 gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin düzeyinin yükselmiş olması (Humbert ve ark., 1995), akciğerlerde platelet türevi büyüme faktörü (Humbert ve ark., 1998) ve makrofaj enflamatuvar protein 1 $\alpha$  proteininin ekspresyonunun artmış olması (Fartoukh ve ark., 1998) bu durumun göstergeleridir. Sözü edilen enflamatuvar mekanizmaların oluşturduğu patolojik değişiklikler ise pulmoner damarlarda hipertrofi, intimal fibrozis ve tipik pleksiform lezyonlardır (Pietra, 1997). Ayrıca perivasküler enflamatuvar infiltrasyon ve okluzif lezyonlar da dikkat çekicidir (Tuder ve ark., 1994) Perivasküler enflamatuvar infiltrasyonunun hücreleri T-, B- lenfositleri ve makrofajlar olarak belirlenmiştir (Dorfmueller ve ark., 2003). Tanımlanan enflamatuvar patern, PH'nin etkilediği akciğerlerin hem pleksiform hem de diğer vasküler lezyonlarında da gösterilmiştir (Dorfmueller ve ark., 2003). Bu bulgulara ek olarak anormal bağ doku depozisyonu, akciğerde aşırı kollagen oluşumu ve elastin sentezinden de söz edilebilir (Botney ve ark., 1993; Kerr ve ark., 1987).

Yukarıda sözü edilen veriler ışığında PH'nin bazı tiplerinde, özellikle bağ doku hastalıklarının eşlik ettiği durumlarda, kortikosteroidler ve immunosüpresif ilaçlar tedavi için denenmiştir. Ancak veriler henüz vaka sunumu şeklindedir ya da küçük grupları içermektedir; dolayısıyla yorum için henüz erkendir (Dorfmueller ve ark., 2003; Sanchez ve ark., 1999; Bellotto ve ark., 1999). Ayrıca bu hastalarda vazodilatör ilaç kullanmak gerekliliği olduğundan immunosüpresif tedavilerin etkinliğini tek başına değerlendirmek de biraz güçtür. PH'nin enflamatuvar bir süreç olduğu dikkate alınarak PH'de deneysel modellerde sitokin antagonistlerinin tedavi edici etkinliği üzerinde de durulmuştur. MCT ile oluşturulmuş PH'de bu tarz bir yaklaşımla sağ ventrikül hipertrofisi engellenebilirken; kronik hipoksi ile oluşturulmuş PH modelinde sitokin antagonistleri etkili olamamıştır (Dorfmueller ve ark., 2003).

### 2.1.2. Pulmoner hipertansiyon tedavisine yaklaşım

Günümüzde PH'nin kesinleşmiş bir tedavisi yoktur. Bu nedenle tedavide pulmoner damar direncini düşürmek ve semptomların azalmasını sağlamak amaçlanır. Örneğin, PH hastalarının sedanter yaşam biçimi, kalp yetmezliği ve bazen de trombofili nedeniyle oluşan pulmoner emboli riskini azaltmak amacıyla antikoagulanlar PH tedavisinin bir parçası olarak kullanılabilirler (Boutet ve ark., 2008). Ayrıca PH hastalarında sağ ventriküler yük, kötü prognozun nedeni olduğundan diüretikler ve tuzsuz diyet, hipervolemi ve ona eşlik eden semptomların düzeltilebilmesi amacıyla yararlı olabilir (Boutet ve ark., 2008). Ancak hipovolemiye neden olmayacak dikkatli bir doz seçimi gerekmektedir.

Digoksin de inotropik etkinliğinden dolayı bazı PH hastaları için yararlı olabilir. Bununla birlikte PH'de etkinliği kanıtlanmamıştır. İlerlemiş sağ kalp yetmezliklerinde hastanede tedavi görmek durumunda olan hastalar için dobutamin ya da milrinon gibi intravenöz inotropik etkili maddeler de kullanılabilir (McGoon ve Kane, 2009).

PH hastaları için uzun süreli oksijen desteği de gerekebilir. Oksijen desteğinin bütün hastalarda düşük oksijen saturasyonunu düzeltmesi mümkün olmasa bile pek çok kişide fonksiyonel bir yarar sağlayabilir. Ayrıca oksijen pulmoner damar direncinin düşmesine neden olacak bir pulmoner vazodilatördür. Bununla birlikte oksijen tedavisinin uzun süreli yararları henüz kesin olarak gösterilememiştir (McGoon ve Kane, 2009).

Yukarıda sözü edilenler dışında, hipoksemik olan hastalara hava yolu yolculuklarından kaçınmaları, yüksek irtifalı bölgelere gitmemeleri de önerilir. Bu hastalar günlük aktiviteleri ve kontrollü koşullarda yapacakları rehabilitasyon ve formda kalma programlarına özendirilirken, ağır egzersizlerden de kaçınmaları istenir (McGoon ve Kane, 2009). PH hastalarının akciğer enfeksiyonlarından korunmaları için influenza ve pnömokokal aşılarını yaptırmaları gereklidir. Bu hastalarda üst solunum yolu hastalıklarında erken antibiyotik tedavisi önemlidir.

Bunun yanı sıra dekonjestanlar gibi vazokonstriktör ilaçlardan da uzak durmaları yararlı olacaktır (McGoon ve Kane, 2009).

PH tedavisinde hastanın yaşam süresini uzatabilmek amacıyla kullanılan spesifik ilaçlar dört sınıfta değerlendirilebilir (McGoon ve Kane, 2009). Bunlar; kalsiyum kanal blokörleri, prostasiklin analogları, PDE-5 enzim inhibitörleri ve endotelin reseptör antagonistleridir. Bu gruplardan seçilecek ilaçlarla yapılacak kombine tedavi prosedürlerinin etkinliği ve güvenliğine ilişkin literatürdeki bilgiler henüz çok yetersizdir (McGoon ve Kane, 2009).

### **Kalsiyum kanal blokörleri:**

PH tedavisi için pek çok vazodilatör ilaç (fentolamin, diazoksit, hidralazin, izoproteranol, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri) düşünülmele birlikte yalnızca kalsiyum kanal blokörlerinin az sayıda dikkatle seçilmiş hastadaki yararı doğrulanmıştır (Sitbon ve ark., 2005). Bu hastalarda vazoselektif ilaçlarla (nifedipin, diltiazem ya da amlodipin) pulmoner basınçta 10 mmHg'lik bir düşme sağlanabilmiştir. PH hastaları için kalsiyum kanal blokörleri içinde, negatif inotropik etkileri olan verapamilin kontrendike olduğunu da unutmamak gerekir.

### **Prostasiklin analogları:**

PGI<sub>2</sub>, araşidonik asit metaboliti olup damar endoteli tarafından da üretilen potent bir vazodilatördür. PH hastalarında göreceli bir PGI<sub>2</sub> sentezi eksikliği olduğu da bilinmektedir. Bir PGI<sub>2</sub> analogu olarak epoprostenol bu amaçla 1995 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından, PH hastalarında kullanılmak üzere onay almıştır. Epoprostenol yarı ömrü kısa bir bileşiktir ve devamlı intravenöz infüzyon yolu ile uygulanmaktadır. Bununla birlikte bu tedavi yaklaşımı pahalı ve riskleri de olan bir yöntem olarak görülmektedir. Çünkü hastaların infüzyon pompalarını sürekli taşımaları ve kontrol altında bulundurmaları gerekmektedir. Ayrıca epoprostenol kullanan hastalar baş ağrısı, albasması, alt ekstremitelerde ağrı, diyare ve bulantı gibi yan etkilere de katlanmak durumundadırlar. Epoprostenol uygulaması devamlı intravenöz infüzyon biçiminde olduğundan katatere bağlı venöz

tromboz, enfeksiyonlar, trombositopeni gibi komplikasyonlarla da karşılaşımla olasılığı da vardır (McGoon ve Kane, 2009). Bütün bu sayılan zorluklara rağmen epoprostenol, PH hastalarında diğer tedavilere göre daha etkin ve yararlı görülmektedir. Çünkü uygulama hastaların egzersiz kapasitelerini geliştirmekte, yaşam kalitelerini artırmakta ve hemodinamik açıdan da düzelme sağlanabilmektedirler (McGoon ve Kane, 2009).

PH tedavisi için kullanılan bir başka PGI<sub>2</sub> analogu treprostinildir. Yarı ömrü daha uzun (3-4 saat) ve oda ısısında epoprostenolden daha stabildir. İntravenöz infüzyonla kullanılan treprostinilin epoprostenole göre efikasitesini değerlendirebilmek için henüz karşılaştırmalı çalışmalar yeterli değildir. İlacın inhale ve oral formlarının hazırlanabilmesi için de araştırmalar sürdürülmektedir (McGoon ve Kane, 2009).

PH tedavisi için 2004 yılında onay alan bir başka PGI<sub>2</sub> analogu da iloprosttur. İloprost, inhalasyon şeklinde uygulanmaya hazır bir preparat olarak çıkarılmıştır. İloprostun da hastaların egzersiz kapasitesini artırdığı, hemodinamik parametrelerini düzelttiği gözlenmiştir. Teorik olarak ventilasyon perfüzyon dengesini de iyileştirdiği kabul edilmektedir (McGoon ve Kane, 2009).

### **Fosfodiesteraz enzim inhibitörleri:**

Pulmoner arterlerin kontraktıl hücrelerinde bulunan PDE-5'in sGMP'nin yıkımı sağlayıp, böylece düz kas hücrelerinde kontraksiyonu azalttığı bilinmektedir. Bunun dışında PDE-5 enzim inhibitörlerinin damarların yeniden yapılanması ve vazodilatasyon oluşturma anlamında yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir (Schermyly ve ark., 2004; Ghofrani ve ark., 2002). Bu ilaçlardan biri olan sildenafil, 2005 yılından beri idiyopatik PH tedavisi için kullanılmaktadır. Araştırmalar günde üç kere 80 mg sildenafil alan hastalarda fonksiyonel ve hemodinamik açıdan gelişmeler olduğunu ortaya çıkarmıştır (Galie ve ark., 2005). Oysa Avrupa ülkelerinde günlük doz günde üç kere 20 mg ile sınırlandırılmıştır. Sildenafil kullanımına bağlı yan etkiler kabul edilebilir niteliktedir. Bunlar genellikle kızarma ya da sindirime ilişkin etkilerdir. Karaciğer enzimlerinde bir yükselme de belirlenmemiştir.



Piyasaya sunulmuş olan diğer PDE-5 enzim inhibitörleri, tadalafil ve vardenafilin de PH tedavisindeki etkinlikleri araştırılmaktadır (Boutet ve ark., 2008).

### **Endotelin reseptör antagonistleri:**

PH hastalarında ET düzeylerinin yüksek olduğu ve bu yüksekliğin hastalığın ciddiyetiyle de orantılı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle ET reseptör antagonistleri, günümüzde PH tedavisinde yer bulmaktadırlar. Bunlardan biri olan bosentanın hem ET<sub>A</sub> hem de ET<sub>B</sub> reseptörlerini bloke edebilen bir ilaç olarak PH hastalarında hemodinamiği düzeltmekte, egzersiz kapasitesini ve yaşam kalitesini artırmakta olduğu ortaya çıkmıştır (McGoon ve Kane, 2009). Bosentan oral kullanıma elverişli bir ilaçtır. Advers etkileri yüz ve boyunda kızarma, ödem, nazal konjesyon, teratojenite, hafif anemi ve doz bağımlı olarak hastaların %10 kadarında transaminazlarda yükselme şeklindedir. Bosentan kullanan hastaların aylık olarak karaciğer fonksiyon testlerini yaptırılmaları gerekmektedir. Diğer taraftan bosentan gliburid, siklosporin, östrojen bazlı oral kontraseptifler ve sildenafil ile ilaç etkileşimleri de gösterebilir.

PH tedavisi için 2007 yılında FDA'dan onay alan benzer etkinlikli bir başka ET reseptör antagonisti ise ambrisentandır. Ambrisentanın bosentandan farkı, ET<sub>A</sub> reseptörlerine selektivite göstermesidir. Bu özelliğinden dolayı teorik olarak düz kaslardaki ET<sub>A</sub> reseptörlerini bloke edip vazokonstriksiyonu engellerken, ET fazlalığı durumunda vazodilatasyona aracılık etmesi olası ET<sub>B</sub> reseptörlerine dokunmaması avantaj olarak kabul edilebilir.

### **Pulmoner Hipertansiyon Tedavisinde Olası Gelişmeler:**

#### **Platelet türevi büyüme faktörü (PDGF) inhibitörleri:**

PDGF'nin endotel hücrelerinde disfonksiyon ve düz kas hücrelerinde de migrasyon ve proliferasyon üzerine etkileri anlaşıldıktan sonra, PH patogenezi de katıldığı gösterilmiştir (Perros ve ark., 2008; Barst, 2005). Bu nedenle PH tedavisi

için imatinib mezilat iyi bir aday olarak görülmektedir. Aslında kronik myeloit tedavisi için çıkarılan PDGF reseptör antagonisti imatinib mezilatın PH hastalarında da yararlı etkileri olabileceğine ilişkin çalışmalar yayınlanmıştır (Patterson ve ark., 2006; Souza ve ark., 2006). Bununla birlikte uzun süreli kullanım açısından bazı kardiyak yan etkilerin ortaya çıkabilme olasılığı (Kerkela ve ark., 2006) düşündürücüdür.

### **Rho kinaz inhibitörleri:**

Rho protein ailesinin en iyi bilinen üyesi ve Rho kinaz aktivitesine sahip olan RhoA, migrasyon, proliferasyon, kasılma ve apoptoz gibi çok sayıda temel hücre fonksiyonunu kontrol etmektedir. RhoA/Rho kinaz yolağının, vazokonstriksiyon ve damarın yeniden yapılanmasına katıldığını gösteren çok sayıda araştırma da vardır. Bu araştırmalarda, akut ve kronik hipoksiye bağlı vazokonstriksiyon ve yeniden yapılanma sürecinde Rho kinaz inhibitörü fasudilin olumlu etkileri belirlenmiştir (Nagaoka ve ark., 2005; Guilluy ve ark., 2005). Bunun dışında sekiz PH hastasında intravenöz fasudilin kısa süreli etkisi, sağ kalp kateterizasyonu ile çalışılmış (Ishikura ve ark., 2006); ortalama pulmoner basıncın ve direncin düştüğü, kardiyak indeksin de arttığı belirlenmiştir. Bu sonuç Rho kinaz inhibitörlerinin gelecekte PH tedavisi için ilaç olarak geliştirilebileceği umudunu vermektedir.

### **Statinler:**

Hayvan modellerinde statinlerin antiproliferatif ve antiapoptotik etkinliklerinin gözlenmesinden sonra, pulmoner arter düz kas hücrelerinde simvastatinin, *BMP2* ekspresyonunu artırdığının belirlenmesi, özellikle ailesel PH tedavisi için yeni bir umut olmuştur. Ancak bu konuda daha fazla karşılaştırmalı sonuca gereksinim vardır (McGoon ve Kane, 2009).

### **Vazoaktif intestinal peptit (VIP) :**

VIP daha çok nörotransmitter olarak rol oynayan, sAMP ve sGMP aktivasyonu yapabilen bir nöropeptittir. Güçlü bir bronkodilatör etkinliği olan VIP'in damar düz kası proliferasyonu ve platelet agregasyonunu da inhibe ettiği

bilinmektedir. PH'si olan hastaların pulmoner arterlerinde, düşük VIP immunoreaktivitesi ve düşük VIP serum konsantrasyonları belirlenmiştir (Petkov ve ark., 2003). Bu ve benzeri gözlemlerin sonuçlarından yola çıkarak yapılan bir araştırmada, sekiz PH hastasında inhalasyonla yapılan VIP uygulamasının üç ay sonra klinik ve hemodinamik açıdan olumlu sonuçlar sağladığı gösterilmiştir. Sözü edilen araştırmada inhalasyonla VIP uygulanması herhangi bir yan etkiye de neden olmamıştır (Petkov ve ark., 2003). Bununla birlikte elde edilen bu sonuçları destekleyecek başka çalışmaların sonucunda VIP, PH için ilaç olarak düşünülebilir.

### **Selektif serotonin re-uptake inhibitörleri:**

5-HT'nin vazokonstriktör ve mitojenik özelliklere sahip bir madde olduğu bilinmektedir. PH hastalarında da 5-HT'nin plazma konsantrasyonları normale göre yüksek bulunmuştur (Herve ve ark., 1995). Bununla birlikte 5-HT'nin etki mekanizması ve PH patogenezindeki rolü karmaşıktır ve henüz kesin olarak aydınlatılamamıştır. Hayvan modellerinde selektif serotonin re-uptake inhibitörlerine ilişkin, PH'ye karşı koruyucu etkinlik belirlenmiş olmasına (Marcos ve ark., 2003) rağmen; bu maddelerin PH'de kullanılabilmesi için daha fazla araştırmaya gerek vardır.

### **Adrenomedullin:**

PH tedavisi için aday görülebilecek maddelerden biri de vazodilatör bir peptid olan ve antiproliferatif özellikleri de olan adrenomedullindir. Adrenomedullinin intravenöz ve inhalasyonla uygulamalarından umut verici sonuçlar çıkmıştır (Nagaya ve ark., 2003; Kandler ve ark., 2003).

### **2.1.3. Deneysel pulmoner hipertansiyon modelleri**

Pulmoner hipertansiyonun mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için değişik deneysel modeller üzerinde çalışılmıştır. Hayvanlarda geliştirilen in-vivo modeller, insanda oluşan pulmoner hipertansiyondaki damarsal patolojilerin ve fiyopatolojinin özelliklerini farklı

derecelerde taklit edebilmektedir. İlk deneysel PH modellerinde, hipoksiye maruz bırakılan ya da monokrotalin enjekte edilen sıçanlar ve kobaylar kullanılırken; son zamanlarda, sıçanlarda, VEGFR-2 (vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 2) inhibisyonu yöntemi uygulanmaktadır. Ayrıca anjiyopietin-1'in aşırı derecede ekspresyonunu yapan deney hayvanları da PH oluşturmak için kullanılmaktadır (Marsboom ve Janssens, 2004).

Deneysel PH oluşturmak için fizyolojik ya da patofizyolojik uyarılar kullanılabilir. Hipoksi uygulaması bu duruma örnek olarak verilebilir. Deney hayvanlarının düşük atmosfer basıncında bulundurulması ya da buldukları ortamda oksijen konsantrasyonunun düşürülmesi gibi yöntemler seçilebilir. PH oluşturmak için kimyasal uyarılar da kullanılabilir. Monokrotalin, alfa naftilüre, bleomisin gibi akciğer üzerine toksisitesi bilinen maddeler bu amaçla kullanılabilir. Yukarıda belirtilen VEGFR-2 inhibisyonu ve anjiyopietin-1'in aşırı ekspresyonunu oluşturma gibi moleküler uyarılar dışında PH oluşturmak için, genetik yöntemler de son yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. Tablo 2.4.'de deneysel PH oluşturmak amacıyla kullanılan yöntemler sınıflandırılmış ve bunlara örnekler verilmiştir. Bu yöntemlerle PH oluşturma mekanizmaları ise Şekil 2.2'de şematik olarak verilmiştir (Marsboom ve Janssens, 2004). Araştırmamızda ise MCT ile oluşturulan PH modeli seçilmiştir.

**Monokrotalin (MCT)** *Crotalaria spectabilis* tohumlarından ekstrakte edilmiş, pirolizidin alkaloidi bir fitotoksindir (Adams ve Rogers, 1939). İlginç olarak MCT, sistemik damarlar üzerinde bir etki göstermemektedir. Pulmoner damarlar üzerinde seçici bir toksik etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır (Marsboom ve Janssens, 2004).

Deneysel çalışmalar sıçanlarda, MCT'nin intravenöz (1-5 mg/kg) ya da subkutan enjeksiyonunun (60-80 mg/kg) dört hafta sonra, sağ ventrikül sistolik basıncını 22 mmHg' dan 49 mmHg'ya yükselttiğini göstermektedir (Campbell ve ark., 2001). Diğer pirolizidin alkaloidlerinde olduğu gibi bu basınç artışına interstisyel ödem, enflamasyon, hemoraji, fibrozis eşlik etmekte ve sağ ventrikül hipertrofisi oluşmaktadır (Baybutt ve Molteni, 1999). MCT'ye bağımlı PH'de

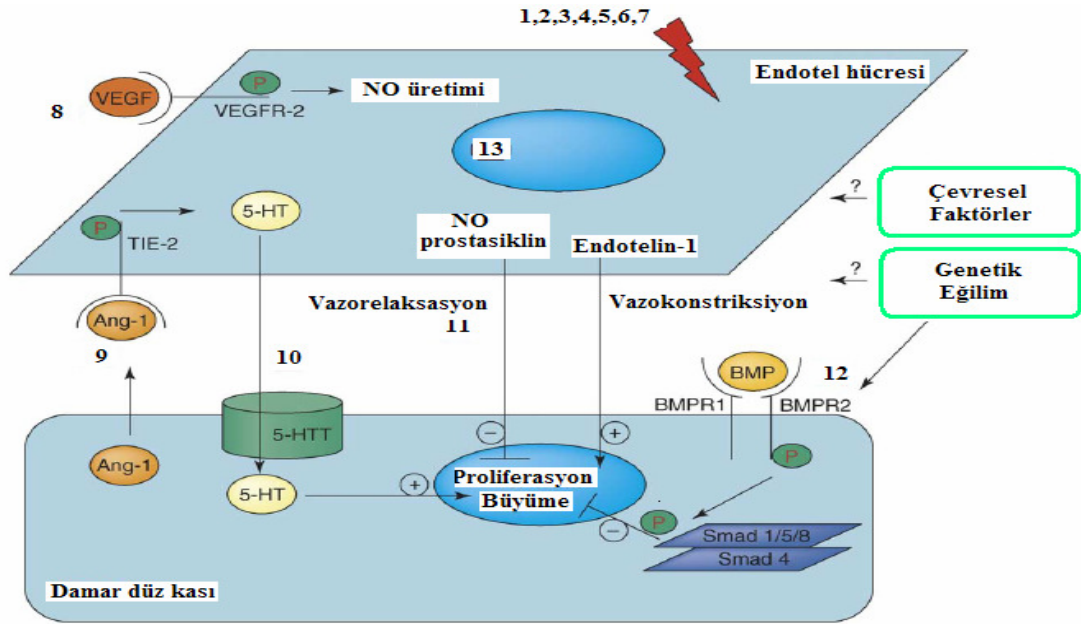
pulmoner basıncın artışı ve sağ ventrikül hipertrofisinin gelişmesinin, hipoksi ile oluşturulan PH'ye göre daha yavaş olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, MCT enjeksiyonunu takiben, güçlü bir enflamatuvar reaksiyon gerçekleşirken, vazokonstriksiyon ya da polisitemi gözlenmediği de gösterilmiştir (Cowan ve ark., 2000).

MCT'ye bağlı pnömotoksitenin kesin mekanizması üzerinde daha fazla bilgiye gereksinim vardır. Bununla birlikte MCT'nin karaciğerde, karma fonksiyonlu oksidazlar tarafından, reaktif iki ana metabolite dönüştüğü ve bunlardan birinin çok toksik bir madde olan pirol olduğu bilinmektedir. Bu aktif metabolitin bazı türlerde hepatotoksik ve pnömotoksik olduğu gösterilmiştir (Baybutt ve Molteni, 1999). Bu aktif metabolitin in-vitro koşullarda endotel hücrelerinde sitozolik (galektin-1) ve sitoskeletal (aktin ve tropomiyozin içeren) proteinlere ve DNA'ya kovalent bağlandığı da gösterilmiştir (Petry ve ark., 1984; Marsboom ve Janssens, 2004).

MCT'ye bağlı toksisitede önemli payı olduğu düşünülen bir başka mekanizma da oksidatif streştir. Bunun bir kanıtı, pulmoner arterlerin endotel hücrelerinde MCT'nin neden olduğu lezyonların oksidasyondan kaynaklandığının gösterilmiş olmasıdır (Aziz ve ark., 1997). Bu hücrelerde MCT etkisine bağlı olarak oluşan ekstraselüler matriks proteinleri upregülasyonunun, antioksidan bir madde olan dimetilüre ile engellendiğinin belirlenmiş olması da MCT bağımlı PH'de oksidatif stresin önemli rolü olduğu varsayımını desteklemektedir. Bu noktada literatürde başka dolaylı kanıtlar da bulunmaktadır. Örneğin MCT'ye bağlı olarak akciğer, karaciğer ve serumda bakır düzeylerinin yükselmiş olduğu gösterilmiş; bu yükselme, antioksidan özellikleri ile de bilinen anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü kaptopril ile kontrol edilerek geri döndürülebilmıştır (Molteni ve ark., 1988).

**Tablo 2.4.** Deneysel pulmoner hipertansiyon modelleri. (Marsboom ve Janssens, 2004'den kısaltılarak alınmıştır).

	<b>Deneysel model</b>	<b>Kullanılan Tür</b>
<b>Patofizyolojik uyarılar</b>	Akut ve kronik hipoksi Artırılmış akım Vasküler obstrüksiyon	Kuş, köpek, kobay, koyun, Sıçan Köpek, domuz, sıçan, koyun Köpek, domuz, sıçan, koyun
<b>Kimyasal uyarılar</b>	Monokrotalin $\alpha$ -Naftilüre Bleomisin B grubu streptokoklar	Köpek, sıçan, koyun Sıçan Fare, tavşan, sıçan Domuz, koyun
<b>Moleküler uyarılar</b>	VEGFR-2 inhibisyonu+hipoksi Anjiopietin-1'in aşırı ekspresyonu	Sıçan Sıçan
<b>Genetik uyarılar</b>	S100A4 aşırı ekspresyonu BMPR2 knockout	Fare Fare



**Şekil 2.2.** PH gelişiminde ve modülasyonunda rolü olan pulmoner vasküler sinyal ileti yolları. 1. Hipoksi, 2. Artırılmış akım 3. Vasküler obstrüksiyon 4. MCT, 5.  $\alpha$ -naftilüre 6. B grubu streptokoklar 7. Değişik nedenlerin endotel hücrelerini etkilemesi 8. Spesifik reseptörlerin aracılığı 9. Anjiopietin aşırı ekspresyonu 10. Serotonin ve reseptörleri 11. Broiler tavuk modeli 12. BMPR2 mutasyonu 13. Kalsiyum bağlayıcı protein S1004 aşırı ekspresyonu (Marsboom ve Janssens, 2004'den alınmıştır).

## 2.2. Reaktif Oksijen Türleri

Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren moleküllere "oksidan moleküller" veya "reaktif oksijen türleri (ROT)" denmektedir (Halliwell, 1991). Bu terim, hem serbest radikal olan hem de radikal olmayan oksidanları anlatmaktadır (Finkel ve Holbrook, 2000). Serbest radikaller, dış orbitalinde bir ya da daha fazla çiftleşmemiş elektron içeren molekül ya da molekül parçalarını ifade etmektedir. Yapılarındaki çiftlenmemiş elektron, genellikle bu yapıya önemli derecede kimyasal reaktivite kazandırmaktadır (Sinclair ve ark., 1990).

### 2.2.1. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu

Doku ve hücre hasarı oluşumundaki rolleri ile reaktif oksijen türleri son yıllarda tıbbın en ilgi çekici konularından biri durumuna gelmiştir. Toksik olan reaktif oksijen türleri, normal bir metabolizmanın devamı ve hücrede enerji üretimi için gerekli olan birçok reaksiyon tarafından üretilebilmektedir. Reaktif oksijen türleri organizmada normal metabolizma sonucu ortaya çıkabildiği gibi; ısı, ışık ve radyasyon gibi çeşitli dış kaynakların etkisi ile de oluşabilmektedir (Sinclair ve ark., 1990). Serbest radikaller son derece kısa yarı ömürlerine rağmen, çok yüksek reaksiyon hızına sahip maddelerdir ve düşük kimyasal spesifite gösterirler. Hem in vivo hem de in vitro olarak oluşabilmektedirler (Sinclair ve ark., 1990). Bir serbest radikalın 3 yolla oluşabileceği anlaşılmıştır (Halliwell ve Gutteridge, 2001). Bu yollar:

1. *Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yikımı:* Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır.  $X : Y \rightarrow X \cdot + Y \cdot$
2. *Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi:* Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.  $X : Y \rightarrow X^- + Y^+$
3. *Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi*  $A + e^- \rightarrow A \cdot^{(+,-)}$

### 2.2.2. Reaktif oksijen türlerinin sınıflandırılması

Reaktif oksijen türleri (ROT) (Tablo 2.5) en sık olarak lipit yapıların katkısıyla oluşmaktadır. Buna göre doymamış yağ asitlerinin allil grubundan bir hidrojenin çıkması ile oluşan lipit radikali, oksijen ile reaksiyona girer ve lipit peroksi radikalini oluşturur. Lipid peroksi radikali ise diğer lipitlerle zincir reaksiyonu başlatarak lipid hidroperoksitlerin oluşumuna neden olmaktadır. Ortamda bulunan demir ve bakır iyonları da lipid peroksidasyonunu hızlandırmaktadır (Kaur ve Perkins, 1991). Lipid radikaller yüksek derecede sitotoksik ürünlere de dönüşebilmektedir. Bunlar arasında en çok bilinen ürün aldehit grubundan malondialdehiddir (MDA). Hidrojen peroksit de membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı etkilere neden olabilir, ama çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığından aslında serbest oksijen radikali tanımına uymamaktadır. Bu nedenle Serbest radikal tanımı ya da ROT, süperoksit gibi radikaller dışında hidrojen peroksit gibi radikal olmayanlar için de ortak olarak kullanılan bir ad olarak kabul edilmektedir (McCord, 1993). Oksijen molekülü, orbitalinde çiftlenmemiş elektron taşıyorsa süperoksit radikali olarak adlandırılır. Bir başka reaktif oksijen radikali ise normal oksijenden çok daha hızlı bir biyolojik molekül olan "singlet oksijen"dir. Singlet oksijen, molekül yapısında iki adet çiftlenmemiş elektron taşıyan bir yapıdır ve hücre membranındaki poliansatüre yağ asitleriyle doğrudan reaksiyona girerek lipid peroksitlerin oluşumuna yol açmaktadır (Halliwell, 1991).

ROT arasında en güçlü olanları, süperoksit, hidroksil ve nitrik oksit radikalleridir (Finkel ve Holbrook, 2000). Bu radikaller, öyle reaktif ve kararsızdır ki, daha zarar verici bileşiklere dönüşmeleri, sadece mikro- ya da nano-saniyeler sürmektedir. Radikal olmayan oksidanların başlıcaları ise hidrojen peroksit, hipoklorik asit ve singlet oksijendir. Hidrojen peroksit, radikallere oranla daha uzun süre, dakikalarca, kararlıdır ve radikal olmayan bu türler de biyomoleküllere zarar verirler (Surai, 2002).



**Tablo 2.5.** Reaktif Oksijen Türleri (Kaur ve Perkins, 1991'den alınmıştır).

<b>1 - Radikaller</b>	<b>2 - Radikal olmayanlar</b>	<b>3 -Singlet oksijen</b>
Süperoksit radikal ( $O_2\cdot^-$ ) Hidroksil radikal ( $OH\cdot$ ) Alkoksil radikal ( $LO\cdot$ ) Peroksil radikal ( $LOO\cdot$ ) Semikinon radikal (HQ.) Hemoproteine bağlı serbest radikaller Organik radikaller (R.) Organik peroksit radikali (RCOO.) Nitrik oksit (NO.)	Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) Lipid hidroperoksit ( LOOH ) Hipoklorikasit ( HOCl )	

### 2.2.3. Reaktif oksijen türlerinin kaynakları

Mitokondrilerdeki oksijenli solunumda olduğu gibi birçok anabolik ve katabolik işlemler sırasında gerçekleşen reaksiyonlarda, moleküler düzeyde elektron kaçışları olur ve bu sırada ROT' lar oluşur. Tablo 2.6.'da ROT' ların kaynakları görülmektedir (Cross, 1987).

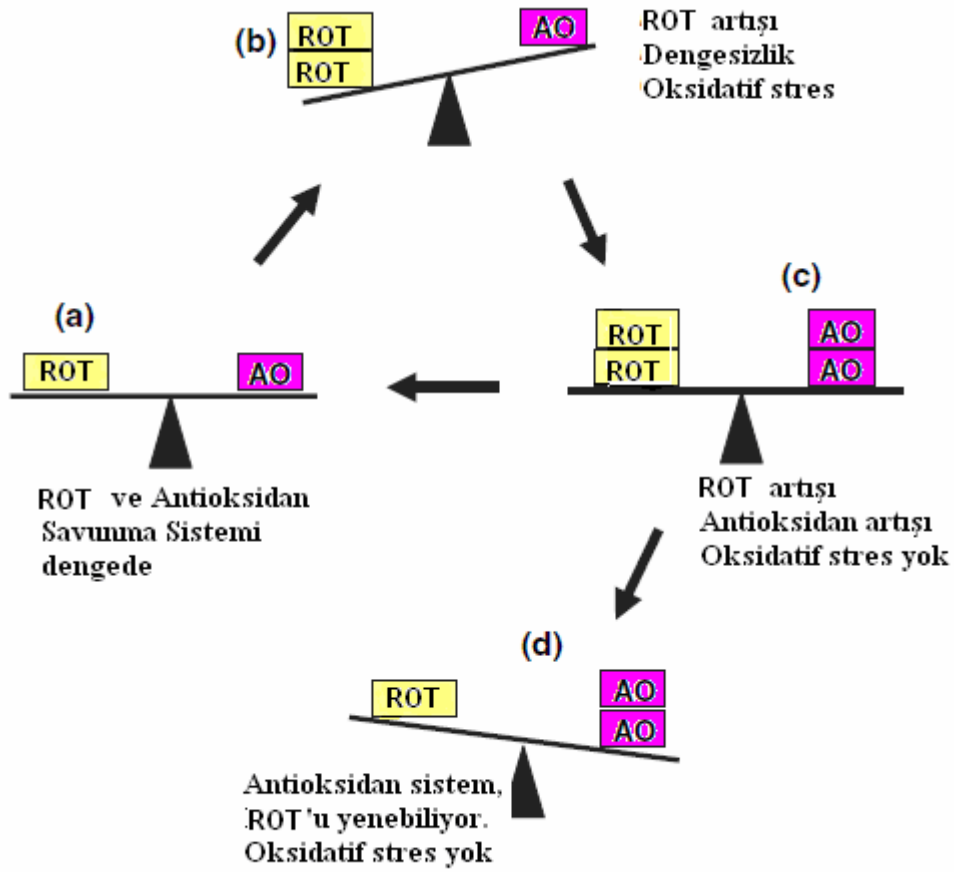
Serbest oksijen radikallerinin kaynakları konusunda damar endoteli üzerinde de durulabilir. Çünkü damar endotelinin az da olsa süperoksit radikali üretme yeteneğine sahip olduğu anlaşılmıştır (Saran ve ark., 1990). Vasküler endotelin ürettiği başka bir vazodilatör olan NO ile süperoksit radikalının bazı sitotoksik etkileri olmakla birlikte, damar tonüsünün düzenlenmesine birlikte katkıda bulunabilecekleri gösterilmiştir (Lowenstein ve ark., 1994; Grozdanovic ve ark., 1994).

**Tablo 2.6.** Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları. (Cross, 1987’den alınmıştır).

<b>Normal biyolojik işlemler</b>	<b>Oksidatif stres yapıcı durumlar</b>	<b>Yaşlanma süreci</b>
Oksijenli solunum Katabolik ve anabolik işlemler	İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite -intoksikasyon Ksenobiotik maddelerin etkisi Oksidan enzimler Ksantin oksidaz İndolamin dioksigenaz Tryptofan dioksigenaz Galaktozoksidaz Siklooksigenaz Lipooksigenaz Monoamino oksidaz Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu Fagositik enflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelial hücreler) Uzun süreli metabolik hastalıklar Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara	protein karboksilasyonunun artışı ve katalize edici tüm enzimlerin azalması

#### **2.2.4. Oksidatif stres ve hasar**

Organizmada ROT’ların oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı, bir denge içerisinde sürmektedir ve bu durum *oksidatif denge* olarak adlandırılmaktadır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, ROT’lardan etkilenmemektedir. ROT’ların oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme ise bu dengenin bozulmasına neden olmakta ve ‘*Oksidatif stres*’ olarak adlandırılmaktadır. Bu durum özetle reaktif oksijen türleri oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (Serafini ve Del Rio, 2004; Altan ve ark., 2006) (Şekil 2.3) .



**Şekil 2.3.** Reaktif oksijen türleri (ROT), antioksidan savunma sistemi (AO) ve oksidatif stres arasındaki ilişki (Monaghan ve ark., 2009'dan alınmıştır).

ROT oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengesizliğin serbest radikaller lehine bozulması, anahtar biyolojik moleküllerin tümünü, özellikle DNA'yı, protein ve lipit yapıları, olumsuz yönde etkileyebilir. Bu anlamda mitokondrial DNA, en kontrolsüz ROT üretiminin olduğu bölgeye yakınlığı ve en düşük onarım düzeyi nedeniyle, özellikle önemlidir (Finkel ve Holbrook, 2000; Balaban ve ark., 2005; Falnes ve ark., 2007). Bir kromozomun ucunda yer alan ve genom stabilitesi açısından kritik olan telomerler, ROT'dan gelebilecek bir saldırıya karşı savunmasız kalabilir. Böylece oksidatif stresten kaynaklanan hücre yaşlanmasını hızlanabilir (Richter ve von Zglinicki, 2007). ROT, nükleik asitlerde mutasyona neden olarak kanser oluşumuna da yol açabilmektedir (Bingöl ve ark., 1993).

Proteinlerin oksidasyonu ise, tersinir disülfit köprülerinin oluşumuna yol açarak, onların yapısını değiştirip, sonunda işlevlerini bozabilir. Hasarın büyüklüğü, proteinlerin, ROT'un üretildiği yere göre, buldukları konuma, bileşimine ve yapısına bağlı olarak değişebilmektedir (Dröge, 2002). Bazı amino asitlerin, özellikle triptofan, tirozin, histidin ve sisteinin, oksidasyona diğerlerinden daha duyarlı oldukları anlaşılmıştır. ROT aynı zamanda proteinlerin sekonder ve tersiyer yapısını da değiştirebilmektedir (Dröge, 2002; Surai, 2002).

ROT'un lipitlere verdiği hasar da, membran yapısı ve fonksiyonu açısından ciddi sonuçlar doğurabilmektedir (Hulbert ve ark., 2007; Valencak ve Ruf, 2007). Bu açıdan çoklu doymamış yağ asitlerinin (ÇDYA), tekli doymamış ya da doymuş yağ asitlerine oranla, peroksidasyona karşı daha az dirençli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, membranlarda ÇDYA kısmındaki değişiklik, oksidatif hasarın hızını ve oranını etkilemektedir (Hulbert ve ark., 2007). Lipid peroksidasyonu, protein ve DNA hasarına da yol açabilecek bir zincir reaksiyonu tetiklediği için, lipitlerin oksidatif hasarının, yaygın etkileri ortaya çıkabilmektedir (Hulbert ve ark., 2007). Lipid peroksidasyonu ve yapısal olarak önemli protein oksidasyonlarının sonucunda membran geçirgenliğinin artması, transmembranal iyon dengesini ve sekretuar fonksiyonları bozup, bağlantılı hücrel metabolik olayları inhibe edebilir.

Hücre dışında oluşan ROT'un, hücre içi diğer bileşenlere ulaşabilmesi için hücre membranından geçmesi gerekmektedir. ROT bu sırada da hücre membranında toksik reaksiyonları başlatabilir. Hücre membranlarını geçiş aşısından  $H_2O_2$  suya benzemektedir. Süperoksit radikali ise hücreye transmembran anyon kanallarından girmektedir. Diğer taraftan hücre yüzeyi yüksek miktarda hidrojen iyonu içerdiğinden, süperoksit radikali hidrojen iyonu ile birleşerek perhidroksil radikalini de ( $HO_2^{\cdot}$ ) oluşturur.  $HO_2^{\cdot}$  radikali süperoksit radikalinden çok daha kuvvetli bir oksidandır. Lipidlere ve proteinlere hidrofobik uçlardan bağlanarak toksik etki gösterir (Bingöl ve ark., 1993).

## 2.2.5. Antioksidan sistemler

ROT'ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar '*antioksidan savunma sistemleri*' olarak bilinirler (Halliwell, 1995). Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere de *antioksidanlar* denir (Halliwell, 1991). Bunlar, SOR oluşumunu önleyenler (transferin, albumin, seruloplazmin, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz) ve zincir kıran ajanlardır (alfa tokoferol, ubikuinon,  $\beta$  karoten, ürat, sistein, askorbat). Antioksidan sistemin elemanları, Şekil 2.4.'de gösterilmektedir (Altan ve ark., 2006)



**Şekil 2.4.** Antioksidan Savunma Sistemleri (Altan ve ark., 2006'dan alınmıştır).

Memeli hücrelerinde oksidatif strese karşı korunma sağlayan antioksidan mekanizmalar aşağıda verilen genel çerçeve altında özetlenebilir:

1. Savunmanın ilk adımı, hücre içinde kontrolsüz ROT salıverilmesini en aza indirmektir. İnsanda önemli hücre içi antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleridir. SOD'un

yapısında bakır, çinko ve manganez; GPx'de ise selenyum iyonu bulunmaktadır ve bu eser elementler, enzimlerin fonksiyonlarını sürdürebilmeleri açısından önemlidirler (Halliwell, 1995; Altan ve ark., 2006). Serbest radikale karşı vücutta ilk savunma SOD enzimi ile gerçekleşmektedir. SOD, süperoksitin, hidrojen perokside dönüşümünü katalize eder. Hidrojen peroksit ise GPx ve KAT enzimleri tarafından suya dönüştürülür. Normal koşullarda hücrede oluşan hidrojen peroksidin detoksifikasyonunda esas olarak bir selenoenzim olan GPx fonksiyona sahiptir. KAT'ın ise hidrojen peroksit oluşumunun arttığı durumlarda önemli etkinliğinin olduğu kabul edilmektedir (Halliwell, 1991). Burada sözü edilen enzimlerin hücre düzeylerinin, SOR'lardaki artışa bağlı olarak yükseldiği gösterilmiştir (Demircin ve Öner, 1998).

2. ROT'u nötralize eden zincir-kıran antioksidan bileşikler, oksidan oluşumlara karşı koruyucu olabilirler. Bunlar, endojen olarak üretilen antioksidanların ve beslenme ile elde edilen antioksidanların bir karışımıdır. Endojen bileşikler, hücre içi tiyoredoksin sistemlerini, ubikuinonları ve glutatyonu içermektedir (Surai, 2002). Glutatyon, büyük olasılıkla, biyolojik sistemlerdeki en aktif antioksidandır. Endojen olarak üretilen diğer antioksidanlar, suda çözünen C vitamini ve ürik asittir. Bunlardan ürik asidin üretimi, daha başka radikallerin oluşumuna da neden olabilmektedir (Dröge, 2002). E vitamini (tokoferol ve tokotrienollerin ortak adı) ve karetonoitler gibi bitkisel kaynaklı bileşikler de içeren pek çok antioksidan, beslenme yoluyla elde edilmektedir (Catani ve ark., 2008). Bu maddeler genellikle yağda çözünürler.

3. ROT hasarına karşı savunmanın diğer bir basamağı, yapısal olandır. Bu durum; oksidatif stresin ürettiği hasarın derecesi bakımından, dokular, bireyler veya türler arasındaki farklılıklar açısından önemlidir. Ayrıca, dokuların ROT saldırısına karşı savunmasızlığı/zayıflığı yaşa bağlı olarak da artabilir (Hulbert ve ark., 2007).

4. Tüm bu savunmalara rağmen, oksidatif stres yine de hasar oluşturabilmektedir. Oksidanların hasar verici etkilerine karşı savunmanın son basamağı, hasarlı moleküllerin onarılması ya da ortadan kaldırılmasıdır. DNA onarımı, hücre fonksiyonu için son derece önemlidir ve pek çok karmaşık hasar tanı ve onarım yolları bulunmaktadır (Kastan ve Bartek, 2004).

#### **2.2.6. Oksidatif stresin değerlendirilmesi**

Oksidatif strese ilişkin araştırmalarda daha çok serbest radikallerin artışı veya antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliği üzerinde durulmaktadır. Bunun için de kan, eritrosit ya da doku örnekleri gibi çeşitli biyolojik materyallerde analiz yapmaya uygun yöntemler geliştirilmiştir (Akkuş İ, 1995).

#### **ROT ölçülmesi:**

ROT ölçümü, yüksek reaktiviteleri, yarı ömürlerinin kısa oluşu ve biyolojik örneklerde düşük konsantrasyonda bulunmaları nedeni ile zordur (Halliwell ve Gutteridge, 2007). Bu nedenle ROT'un neden olduğu hasara ilişkin sekonder ürünlerin değerlendirilmesine yönelik dolaylı ölçüm yöntemleri kullanılmaktadır (Coughlan ve ark., 2004). Bu yöntemler serbest radikallerin lipitlerle, proteinlerle ve DNA ile reaksiyonları sonucu oluşan çeşitli ürünlerin ölçümü esasına dayanır. Bunlar arasında lipid peroksidasyonunun son ürünlerinin ölçümü, en çok kullanılan yöntemdir (Akkuş İ, 1995).

ROT'u doğrudan ölçebilen tek analitik teknik, elektron spin rezonans spektrometrisidir (ESR) (Halliwell ve Gutteridge, 2007). Spin rezonans spektrometrisi ileri bir teknik donanım gerektirmektedir. Üstelik çok duyarlı olmaması ve mikromolar düzeyde sabit konsantrasyonlarda serbest radikaller gerektirmesi nedeniyle de kullanımı yaygınlaşamamıştır (Akkuş İ, 1995).

Oksidatif hasarın tek bir belirteci henüz yoktur. Bu nedenle bir organizmanın oksidatif durumunun değerlendirilmesinde, çeşitli yöntemlerin kombine şekilde

kullanılması gerekmektedir (Mateos ve Bravo, 2007). Oksidatif stresin ana hedefi olan lipitler, peroksidasyon sonucunda, daha zararlı ikincil ürünler oluşturabilmektedir. Bu bağlamda, lipid peroksidasyon zincir reaksiyonu sonucunda lipid hidroperoksitler (LOOH) ve konjuge dienler oluşmaktadır. LOOH ve konjuge dienler ise daha sonra alkan aldehitler, alken aldehitler, hidroksialken aldehitler, MDA ve uçucu hidrokarbonlar oluşturmak üzere parçalanırlar. Bu nedenle oksidatif hasarın değerlendirilmesinde lipit peroksidasyonuna bağlı doku yıkımını değerlendirmek için LOOH, konjuge dienlerin, MDA ve dışındaki aldehitlerin ölçümü, uçucu hidrokarbonların ve lipit peroksidasyonu fluoresan ürünlerinin ölçümü yapılabilir (Chi ve ark., 1989). Her bir tekniğin kendine göre zorlukları vardır ve hiçbir yöntemin lipit peroksidasyonunu tam bir doğrulukta ölçtüğü söylenemez. Ayrıca daha doğru bir yaklaşım olarak, oluşan ürünlerin miktarı çeşitli faktörlerden etkilenebildiğinden, bir tek ürün yerine birden fazla ürünü ölçmek idealdir.

Lipid peroksidasyonunun en çok kullanılan biyomarkerlarından biri, MDA ölçümüdür. MDA, üç karbonlu bir dialdehittir. MDA dışındaki aldehitlerin ölçümü genellikle zaman alıcı, pahalı ve rutin olarak kullanılmaya uygun olmayan yöntemleri gerektirmektedir. MDA ölçümü için kolay ve duyarlı bir yöntem olduğu bilinen tiyobarbitürik asit (TBA) reaksiyonuna dayanan yöntem sıklıkla kullanılmaktadır. Bazı deneysel sistemler ise lipit hidroperoksitlerin biyolojik sistemlerde MDA'nın tek kaynağı olmaması ve MDA'ya dönüşen lipid peroksidasyon ürünlerinin saptanması nedeniyle, tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddelerin (TBARS) ölçümüne dayanmaktadır (Tietz, 1999). Araştırmalar TBARS ölçümü ile lipid peroksidasyonunu ölçen diğer yöntemler arasında iyi bir korelasyon olduğunu göstermektedir. TBARS ölçümü çok basit ve hızlı olmakla birlikte biyolojik materyallere uygulanmasında çeşitli sorunlar da ortaya çıkabilmektedir. Bunlardan biri numunelerde mevcut olan ya da reaksiyon sırasında açığa çıkan pigmentlerin, kolorimetrik ölçümü bozabilmesidir. Ayrıca MDA dışındaki aldehitler de TBA ile renkli kompleks oluşturmak üzere reaksiyona girebilirler (Halliwell ve Gutteridge, 2007) .



Günümüzde serbest MDA'nın doğrudan tayini için en güvenilir yöntem yüksek performanslı likit kromatografisidir (HPLC). Bu açıdan HPLC çok hassas ve hızlı bir yöntemdir ve üstelik ölçüm için az numune gerektirir. Tek zorluk, numunenin analize hazırlanmasının çok dikkatli bir şekilde yapılması gerekliliğidir (Tietz, 1999).

### **Antioksidan aktivitenin ölçülmesi:**

Oksitativ stres çalışmalarında, organizmada antioksidan savunma sistemlerinin durumunu belirleyebilmek için biyolojik materyallerde çeşitli antioksidanların aktiviteleri veya konsantrasyonlarının ölçülmesi gerekmektedir. Enzim olan ve enzim olmayan birçok antioksidan (İndirgenmiş glutatyon, Süperoksit dismutaz, Glutatyon redüktaz, Glutatyon peroksidaz, Katalaz aktiviteleri,  $\beta$ - karoten, askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferol ölçümü vb.) farklı doku ve sıvılarda, çeşitli yöntemlerle ölçülmektedir (Selman ve ark., 2002). Bu ölçümler, bazı deneysel çalışmalar için uygun olabilir. Ancak, antioksidan kapasite, bir numunedeki antioksidanların her birinin konsantrasyonlarının ayrı ayrı toplanmasından ibaret değildir çünkü antioksidanlar arasında sinerjistik ve antagonistik etkileşimler bulunmaktadır. Bu nedenle, toplam antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi, antioksidanların ayrı ayrı konsantrasyonlarının ölçümüne dair verileri yorumlamaktan daha kolay ve anlamlı olmaktadır (Cohen ve ark., 2007; Somogyi ve ark., 2007).

Biyolojik sıvı ya da dokularda toplam antioksidan kapasiteyi (TAK) değerlendirebilen pek çok yöntem bulunmaktadır (Cohen ve ark., 2007; Somogyi ve ark., 2007). Bu yöntemler, antioksidan ve substratın, termal olarak oluşmuş peroksil radikalleri için birbiriyle yarıştığı kompetitif reaksiyon planını uygulayanlar ve bir antioksidanın, bir oksidantı indirgeme kapasitesini kolorimetrik olarak ölçen yöntemler olarak sınıflandırılabilir (Halliwell ve Gutteridge, 2007). Her ne kadar bu yöntemler TAK değerlendirmede kullanılsa da, bazı açılardan dikkatli olmak gerekir. Bunlar:

1. Sonuçları yorumlarken, plazma veya serumdaki TAK değerlendirmede kullanılan miktar tayini yöntemlerinin, sadece spesifik bir serbest radikalle ilgili olarak, dolaşan antioksidanların kapasitesini yansıttığı ve yanıtın, bu serbest radikalın etkinliğine göre değişebileceği akıldan çıkarılmamalıdır.
2. Doku antioksidan savunması, daha çok enzimatik olduğundan antioksidan savunma sisteminin dolaşımdaki bileşenleri ve enzimatik bileşenleri arasındaki korelasyonun ne derece iyi olduğu bilinmemektedir.
3. In-vitro ve in-vivo ortamlardaki TAK ölçümleri arasındaki korelasyon bilinmemektedir. Bu nedenle in-vitro ortamlardaki TAK ölçümleri, in-vivo ortamlardaki TAK ölçümleri ile doğrudan bağdaştırılamaz (Somogyi ve ark., 2007)

## **2.3. NF-κB ve Oksidatif Stres**

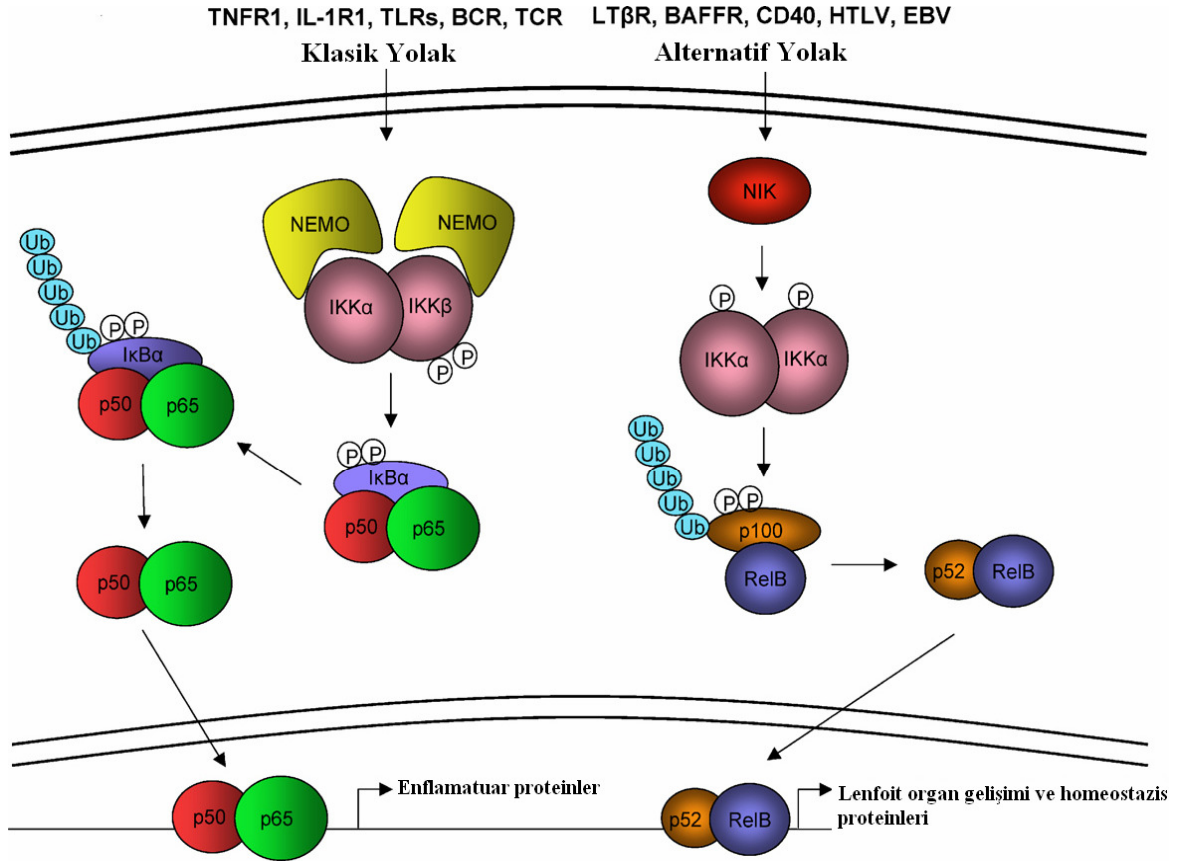
### **2.3.1 NF-κB**

NF-κB, ilk kez 1986 yılında aktive B hücrelerinde immünglobulin κ hafif zincirinin enhancer'ına bağlanan bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştı (Sen ve Baltimore, 1986). İlerleyen yıllarda, araştırmalar, NF-κB'nin apoptoz, hücre büyümesi, farklılaşması ve immün yanıtla ilgili genlerin kontrolündeki önemini ortaya çıkarttı. İlginç bir başka nokta da NF-κB'nin evrimleşme sürecinde, yapısı ve fonksiyonlarının oldukça iyi korunduğunun görülmüş olmasıydı. Bugün, NF-κB etkinliğindeki değişikliklerin, otoimmün hastalıklar, kanser ve enflamatuvar hastalıklarla ilişkisinin anlaşılması (Srivastava ve Ramana, 2009), yeni tedavi stratejileri açısından önemli bir araştırma alanını da ortaya çıkartmıştır.

NF-κB proteinleri, aynı zamanda Rel ailesi proteinleri olarak bilinmekte ve p50, p52, p65(RelA), c-Rel ve RelB birimleri olarak ifade edilmektedir (Srivastava ve Ramana, 2009). Sözü edilen bu alt birimler, homo ya da heterodimerize şekilde aktive NF-κB'nin yapısında bulunmaktadır. NF-κB proteinleri Rel homolog domainiyle tanımlanmaktadır. Bu bölgenin DNA'ya bağlanma, dimerizasyon ve

sitoplazmadaki inhibitör alt ünite olarak bilinen I $\kappa$ B proteinleri ile etkileşim için çok önemli olduğu anlaşılmıştır(Srivastava ve Ramana, 2009). Araştırmalar NF- $\kappa$ B aktivasyonuna neden olan iki ana sinyal yolağına dikkat çekmektedir (Şekil 2.5) (Srivastava ve Ramana, 2009):

- 1. Kononikal (Klasik) yolak:** Ligandın bağlanması, katalitik kinaz alt birimleri olan IKK $\alpha$  ve IKK $\beta$ 'yi içeren I $\kappa$ B kompleksini aktive etmekte ve nonenzimatik olarak düzenlenen yapısal protein olarak isimlendirilen NEMO da (NF- $\kappa$ B esansiyel modülatörü ya da IKK $\gamma$ ) I $\kappa$ B'nin fosforilasyonuna neden olmaktadır. Fosforile edilmiş olan I $\kappa$ B alt ünitelerinin proteozomal degradasyonu da aktif NF- $\kappa$ B'nin nukleusa translokasyonunu sağlamakta ve bu da hedef genlerinin transkripsiyonunda değişikliklerle sonuçlanmaktadır. Kononikal yolak, genel olarak I $\kappa$ K kompleksine duyarlı p50, p65, c-Rel ve RelB alt ünitelerinden oluşmuş NF- $\kappa$ B dimerlerini aktive etme yeteneğine sahiptir.
- 2. Nonkononikal (Alternatif) yolak:** Reseptör aktivasyonu, NF- $\kappa$ B indükleyici kinazın (NIK) aktivasyonuna neden olmakta ve daha sonra IKK kompleksini aktive etmektedir. I $\kappa$ K kompleksinin aktivasyonu, inaktif NF- $\kappa$ B p100/RelB dimerinin fosforilasyonuna neden olmaktadır. Daha sonra p52/RelB dimer şeklini almakta, aktif NF- $\kappa$ B dimeri nukleusa geçerek gen transkripsiyonunda değişiklikler yapabilmektedir. Bu aktivasyon yolağının B ve T lenfositlerinden kaynaklanan az sayıdaki uyarın tarafından tetiklendiği anlaşılmıştır (Kumar ve ark., 2004).



**Şekil 2.5.** NF-κB aktivasyonunun klasik ve alternatif yolları. TNFR1, IL-1/TLR, TCR ve BCR ile bağlanma, IκK-bağımlı IκBα'nın S32 ve 36 üzerinden fosforilasyonunu uyararak NF-κB'nin çekirdeğe geçmesine neden oluyor. LTβR, BAFFR, CD40 ya da HTLV veya EBV gibi bazı enfeksiyonlar, alternatif yolağın harekete geçmesine neden oluyor. Alternatif yolağı aktive eden uyarılar, aynı zamanda klasik yolağı da aktive edebilir (Gloire ve ark., 2006'dan alınmıştır).

### 2.3.2. NF-κB, oksidatif stres ilişkisi

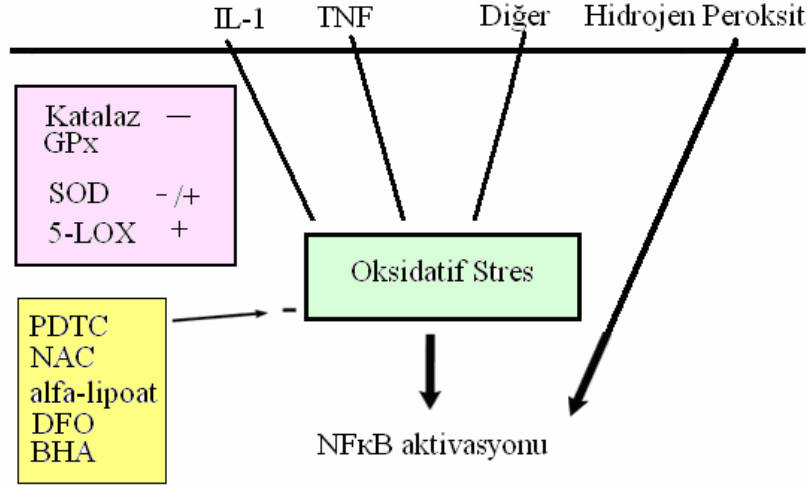
Serbest oksijen radikallerinin üretiminin, hücrenin antioksidan kapasitesini yenmesi durumunda; hücresel hasarlara yol açan ve pek çok hastalığın patogeneziye katkıda bulunan oksidatif stres durumunu ortaya çıkıdığı bilinmektedir. Bununla birlikte, serbest oksijen radikallerinin normal sınırlar içinde, pek çok hücre tipinde sinyal iletiminde önemli bir ikinci mesajcı olarak görev aldıklarını da unutmamak gerekir (Hensley ve ark., 2000; Lander, 1997). Bunun bir örneği olarak, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in, sistein rezidülerinin oksidasyonu üzerinden tirozin fosfatazları inhibe etme ve ardından tirozin kinazları aktive edebilme özelliği gösterilmiştir. Bu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in hücresel

sinyalizasyonda bir mediyatör olarak rol aldığını ortaya koymaktadır (Tonks, 2005; Aslan ve Ozben, 2003). Serbest oksijen radikallerinin düzeyine bağlı olarak, redoks-duyarlı farklı transkripsiyon faktörlerinin aktive edilebileceği ve bu faktörlerin biyolojik yanıtların eşgüdümünü sağladığına ilişkin başka çalışmalar da vardır. Örneğin, düşük düzeyde oksidatif stres, antioksidan enzimlerin gen kodlamasının transaktivasyonunda yer alan bir transkripsiyon faktörü olan Nrf2'yi indüklemektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Orta derecede oksidatif stresin ise NF-κB ve AP-1(aktive protein-1)'in aktivasyonu üzerinden enflamatuvar yanıtı başlatabileceği anlaşılmıştır (Schreck ve ark., 1991). Oksidatif stres, yüksek düzeyde ise mitokondriyal PT porunun perturbasyonu ve elektron transferinin engellenmesi; böylelikle apoptoz ya da nekrozun gerçekleşmesi indüklenmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

Oksidatif stres ve NF-κB arasındaki ilişki için dört önemli nokta üzerinde durulabilir (Şekil 2.6). Bunlardan birincisi, bazı hücre kültürlerinde ortama doğrudan hidrojen peroksit ilave edilmesi ile NF-κB'nin aktive olduğu gözlemdir (Schreck ve ark., 1991; Meyer ve ark., 1993). İkincisi, bazı hücre tiplerinde aynı zamanda NF-κB'yi de aktive eden maddelere yanıt olarak, SOR'un arttığı bulgusudur (Schreck ve ark., 1992; Schmidt ve ark., 1995; Los ve ark., 1995). Üçüncü nokta, PDTC gibi antioksidan içeriğe sahip bileşiklerin, NF-κB aktivasyon yolağını inhibe edebildiklerinin gösterilmesidir (Schreck ve ark., 1992). Üzerinde durulması gereken son nokta da, bazı maddelerin NF-κB aktivasyonunu düzenleyen hücre içi serbest oksijen radikali düzeyini etkileyen enzimlerin inhibisyonu veya aktivasyonuna neden olduklarının anlaşılmasıdır (Schmidt ve ark., 1995; Manna ve ark., 1998; Brigelius-Flohe ve ark., 1997; Bonizzi ve ark., 2000).

Yukarıda anlatılan deneysel gözlemlere rağmen, NF-κB aktivasyonu-oksidatif stres ilişkisinin anlaşılması için çok daha fazla araştırmaya gerek vardır. Bu bağlamda NF-κB aktivasyonunda IκK'lar ve serbest oksijen radikalleri konusuna da odaklanılabilir. Diğer taraftan NF-κB aktivasyonunun IL-1 ve TNF'yi içeren iki anahtar yolağı, reseptörden çekirdeğe tanımlanmış olmakla birlikte; her iki yolağın

da serbest oksijen radikalleri ya da  $H_2O_2$ 'ye gereksinim duyduğuna dair bilgiler henüz yetersizdir (Schmidt ve ark., 1995).



**Şekil 2.6.** NF-κB aktivasyonu ve oksidatif stres ilişkisi. Bu modele göre; 1. Hidrojen peroksit bazı hücrelerde NF-κB'yi doğrudan aktive edebilir. 2. Bazı uyarılara yanıt olarak hücre içi oksidatif stres artışı ölçülebilir. 3. PDTC, NAC, alfa-lipoat, DFO ve BHA gibi antioksidanlar NF-κB aktivasyonunun bu yollarını inhibe edebilir. 4. Katalaz, GPx, SOD ve 5-LOX gibi enzimler, hücrenin redoks durumunu module edebilir, NF-κB aktivasyonunu pozitif ya da negatif yönde etkileyebilir (Bowie ve O'Neill, 2000'den alınmıştır).

### 2.3.3. NF-κB'nin antioksidanlar tarafından inhibisyonu

Oksidatif stres-NF-κB ilişkisini anlamaya yönelik araştırmaların bir kısmında NF-κB aktivasyonunu inhibe etmek için antioksidanlar kullanılmıştır. Bu araştırmalarda yaygın olarak kullanılan iki bileşik N-asetilsistein (NAC) ve pirolidin ditiyokarbamattır (PDTC). E vitamini türevleri ve  $\alpha$ -lipoik asit gibi diğer antioksidanlar da kullanılmışlar ve bazı hücre tiplerinde NF-κB aktivasyonunu inhibe ettikleri gösterilmiştir (Suzuki ve Packer, 1993; Suzuki ve ark., 1992). NAC ile yapılan çalışmalarda, NAC etkinliğine bağlı olarak hücre içi tiyol düzeylerindeki azalmanın önlenmesinin, NF-κB aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Staal ve ark., 1990). NAC'ın serbest oksijen radikallerini baskılaması sonucu NF-κB aktivasyonunu önlediğini gösteren başka araştırmalar yanında (Schreck ve ark., 1991; Meyer ve ark., 1993), NF-κB'nin NAC-duyarsız yolları olduğu da

bildirilmiştir (Moynagh ve ark., 1994; Brennan ve O'Neill, 1995; Bowie ve ark., 1997; Bonizzi ve ark., 1996). Eldeki bu bilgiler antioksidanların NF-κB aktivasyonu üzerindeki etkilerinin, uyarıya ve hücreye özgü nitelikleri olduğunu düşündürmektedir.

NF-κB'nin en bilinen inhibitörlerinden biri PDTC'dir. Bir ditiyokarbamat olarak PDTC, hem metal şelatörü, hem de antioksidan özelliklere sahiptir ve stabil bir ditiyokarbamattır (Sunderman, 1991; Topping ve Jones, 1988). PDTC, hücrelere kolaylıkla penetre olduğundan hücre kültürü çalışmalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır. PDTC'nin insan lenfositik hücrelerinde ve fare fibroblastlarında IL-1, TNF, PMA, LPS ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından yapılan NF-κB aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Schreck ve ark., 1992). Bu inhibe edici etkinliğin metal şelatörü olmasından kaynaklandığını söyleyen gözlemler de bulunmaktadır. Günümüzde PDTC, NF-κB için spesifik bir inhibitör olarak kabul edilmektedir (Schreck ve ark., 1992).

#### **2.3.4. Antioksidanların NF-κB inhibitörü olarak terapötik değeri**

Fagositik lökositlerin serbest radikal üretiyor olması, eflamatuvar süreçlerin önemli özelliklerinden biri olarak değerlendirilmektedir. Bu anlamda; oluşan oksidan maddeler, mikroorganizmalara karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadırlar (Hensley ve ark., 2000) Bu özellikleriyle serbest oksijen radikalleri, genel sitotoksisteyi desteklemenin yanısıra, NF-κB'yi de aktive ederek proinflamatuvar gen ekspresyonunu artırabilirler (Schoonbroodt ve Piette, 2000). Serbest radikallerin NFκ-B aktivasyonundaki rolleri koşullara göre değişebilir. Bununla birlikte deneysel çalışmalar antioksidan moleküllerin, enflamatuvar uyarılara bağlı oluşan NF-κB aktivasyonunu inhibe edebildiklerine ilişkin kanıtlar ortaya koymaktadır.

Antioksidanların, NF-κB inhibitörü olarak potansiyel terapötik değeri, deney hayvanlarında oluşturulan enflamatuvar hastalık modellerinde gösterilmiştir (Kovacich ve ark., 1999; D'Acquisto ve ark., 1999). Örneğin güçlü bir antioksidan olan PDTC'nin, sıçanlarda omurilikte NF-κB aktivasyonunu inhibe ederek deneysel alerjik ensefalomyelitin klinik semptomlarını hafiflettiği gösterilmiştir (Pahan ve

Scmid, 2000). Benzer şekilde NAC de, LPS (Lipopolisakkarit) aracılı NF-κB aktivasyonunun söz konusu olduğu nötrofilik akciğer enflamasyonunu baskılayabilmektedir (Blackwell ve ark., 1996). Günümüzde doğal antioksidanlar olarak popülarite kazanan yeşil çay polifenolleri, resveratrol gibi maddelerin de antienflamatuvar etkilerinde, NF-κB inhibisyonunun rolü olduğu anlaşılmaktadır. Bu maddelerden yeşil çay polifenollerinin İκK aktivitesini bloke ettiği anlaşılmıştır (D'Acquisto ve ark., 2002).

Enflamasyon, oksidatif stres ve NF-κB aktivasyonuna ilişkin literatürdeki bilgiler, NF-κB inhibitörlerinin terapötik değeri açısından henüz yeterli değildir. Ayrıca daha önce de belirtildiği gibi araştırmalar oksidatif stres-NF-κB aktivasyonu arasındaki ilişkinin hücreye özgü niteliği üzerinde de durmaktadır. Bununla birlikte, bu konu hakkındaki çalışmalar, gelecekte enflamatuvar hastalıkların tedavisine yeni yaklaşımlar getirecektir.



### **3. ARAÇ GEREÇLER VE YÖNTEM**

#### **3.1. Deney Hayvanları**

Araştırmamız Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları laboratuvarından sağlanan erkek, sağlıklı, erişkin, 200-300 gr arasında olan Wistar-Albino cinsi sıçanlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar kafeslerde 12 saat gece 12 saat gündüz sirkadiyen ritimde, ortam sıcaklığı 20-26°C olacak şekilde tutulmuşlardır. Beslenmeleri standart sıçan yemi ve suyla yapılmış, yiyecek ve su ile ilgili herhangi bir kısıtlama getirilmemiştir. Araştırma protokolü ve deneysel yöntemimiz Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu'nun onayı alınarak başlatılmıştır.

#### **3.2. Kullanılan Malzemeler ve Kimyasal Maddeler**

1. Santrifüj (Nüve NF 1215, Türkiye)
2. Derin dondurucu (Angelantoni Platinium 300V-plus, İtalya)
3. Hassas terazi (Presica XB220A, İsviçre)
4. Vorteks karıştırıcı (MS1 MINISHAKER, ThermoFisher Scientific, ABD)
5. Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)
6. Spektrofotometre (StatFax 1904, Awareness Technology, ABD)
7. pH metre (Mettler, Seven Easy pH Meter, Çin)
8. Manyetik karıştırıcı (Heidolph DIAX 900 homogenizer, Fisher Scientific, Malezya)
9. Homojenizatör (Ultra-Turrax T25, IKA; Werke 24,000 r.p.m.j. Almanya)
10. ELIZA cihazı (Bio-Tek ELx808, Ultra Microplate Reader, İngiltere)
11. 37°C'yi sağlayabilmek için inkübasyon çemberi (Nüve EN-055, İndem, Türkiye)
12. Hemo-counter (Cell-Dyn 1700, Abbott Diagnostics, ABD).
13. Işık Mikroskobu (Nikon UFX-IIA, Japonya)

1. Monocrotaline (MCT) (Sigma-Aldrich; İsviçre), 0.1 N HCL'de çözüldü ve pH~7'ye gelecek şekilde, 0.1 N NaOH ile nötralize edildi. (Swamidas ve ark., 1999)
2. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) (Sigma-Aldrich; İsviçre), %0.9'luk (a/h) NaCl'de çözüldü.
3. Sodyum Azit (Merck, Almanya)
4. n-Butanol (Merck, Almanya)
5. 1,1,3,3-tetraetoksipropan (Sigma-Aldrich; İsviçre)
6. Formol (Merck, Almanya)
7. Tiyobarbitürik asit (TBA) (Merck, Almanya)
8. Hemotoksilen Eozin (Bioptica, İtalya)
9. Mason Trikrom boyası (Bioptica, İtalya)
10. Van Gieson boyası (Bioptica, İtalya)
11. Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) tayini için kullanılan Elisa kiti (ImAnox ELİSA kiti, Almanya)

Kit içeriği :

- 1- 2 parça Microplate
- 2- 3 adet kalibratör (0,5,10,20,40,100 U/ml) (liyofilize)
- 3- 3'er adet Kontrol ( Kontrol 1 ve Kontrol 2) (liyofilize)
- 4- 1 adet 0.25 ml Peroksit çözeltisi
- 5- 1 adet 1.5 ml Reaksiyon tamponu A
- 6- 1 adet 1.5 ml Reaksiyon tamponu B
- 7- 1 adet 35 µl Enzim çözeltisi
- 8- 1 adet 11 ml STOP solüsyonu
- 9- 1 adet 5 ml Rekonstitüsyon solüsyonu

### 3.3. Deney Grupları

Çalışmalarda kullanılan deney hayvanları 3 gruba ayrılmıştır. Bu gruplar ve yapılan ilaç uygulamaları aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

**Tablo 3.1.** Deney gruplarına göre ilaç uygulaması

<b>Deney Grubu</b>	<b>n</b>	<b>Uygulama</b>
I (Kontrol)	6	Serum fizyolojik (intraperitoneal (i.p) ): Deneyler süresince her gün
II (MCT)	6	60 mg/kg MCT (i.p) (Baybutt ve Molteni, 1999)
III (MCT+PDTC)	6	60 mg/kg MCT (i.p): Deneylerin birinci günü, tek uygulama 100 mg/kg PDTC (i.p) : 3. ve 28. günler arasında her gün, günde bir kez, tedavi amaçlı (Sawada ve ark., 2007)

### **3.4. Örneklerin alınması**

#### **3.4.1. Histopatolojik inceleme için örnek hazırlanması**

Sıçanlar sakrifiye edilerek, kalp, sağ akciğer ve pulmoner arter doku örnekleri izole edilmiştir. Sağ akciğer ve pulmoner arter doku örnekleri serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra, histopatolojik inceleme için % 10'luk formalin tampon çözeltisine alınmış ve tespit edilmiştir. Kalpler ise sağ ventrikül hipertrofisinin değerlendirilmesi için ayrılmış; sağ ventrikülün, sol ventrikül ve septal duvardan düzgün biçimde ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra her iki parça ayrı ayrı tartılmıştır.

#### **3.4.2. Biyokimyasal analizler için örnek hazırlanması**

Biyokimyasal analizler için sıçanlar sakrifiye edilirken daha önceden EDTA ile yıkanmış enjektörlerle kan örnekleri de alınmış ve EDTA'lı tüplere konmuştur. EDTA'lı kanlar 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, plazmaları ayrılarak ependorf tüplerine alınmış ve daha sonra yapılacak analizler için -80 °C'deki derin dondurucuda saklanmışlardır. Akciğerlerden alınan doku örneklerinin bir kısmı da soğuk serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra, alüminyum folyoya sarılarak sıvı azotta dondurulmuş ve biyokimyasal çalışmalar yapılana kadar -80 °C'de saklanmıştır.

### 3.5. Biyokimyasal Çalışmalar

#### 3.5.1. Akciğer dokusunda MDA ve TAK tayini

Bu grup deneylerin yapılabilmesi için sıçanlardan alınan akciğer örnekleri tartılmış ve daha sonra 1:10 (a/h) oranında, pH 7.4'deki % 0.05 sodyum azit içeren 100 mmol/L fosfat tamponunda homojenize edilmiştir. İşlem sonunda elde edilen homojenatlar 4000 rpm'de, 10 dk süreyle santrifüj edilerek süpernatantlar elde edilmiştir. Süpernatantlar daha sonra MDA ve TAK düzeylerinin ölçümü için kullanılmıştır.

#### MDA tayini:

Akciğer dokusundaki lipit peroksidasyonu, MDA oluşumunu ölçen Tiyobarbitürat (TBA) Reaksiyonu ile belirlenmiştir (Ohkawa ve ark., 1979). Bu yöntem, MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit ile oluşturduğu pembe rengin optik dansitesinin 535 nm'de ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.

Deneylerde, akciğer dokusundan elde edilen homojenatların 0.5 ml'si, 10 ml'lik kapaklı cam deney tüplerine konularak üzerlerine 3 mL %1' lik(h/h) fosforik asit ve 1 mL %0.6'luk (a/h) TBA solüsyonu eklenmiştir. Örnekler karıştırma işleminden sonra 45 dakika kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Soğutmadan sonra üzerlerine 4 ml n-Butanol eklenerek karıştırılmıştır. Örnekler 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant ölçümler için ayrılmıştır. süpernatantın absorbansı, 535 nm dalga boyunda, spektrofotometrede, suya karşı (kör) okutulmuştur. Standart olarak kullanılan 1,1,3,3-tetraetoksipropan, 5-20 nmol/ml arası konsantrasyonlarda hazırlanmış ve çizilen kalibrasyon grafiğinden, numunedeki MDA miktarı nmol/ml olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar µmol/mg protein doku olarak verilmiştir.

#### Toplam Antioksidan Kapasite tayini:

Toplam Antioksidan Kapasite'yi belirlemek için ImAnOx ticari kiti kullanılmıştır. ImAnOx ticari kiti, in-vitro çalışmalarda kullanılabilen, Toplam

Antioksidan Kapasite'nin (TAK) kantitatif tayininde kullanılmak üzere tasarlanmış bir fotometrik test sistemidir. Bu sistemde antioksidan kapasitenin tayin edilmesi, numunedeki antioksidanların, belirli miktardaki ekzojen hidrojen peroksit ile reaksiyon vermesi esasına dayanmaktadır. Numunedeki antioksidanlar, sağlanan hidrojen peroksitin belirli bir miktarını elimine etmektedir. Kalan hidrojen peroksit, TMB (kromojen)'nin renkli bir ürüne dönüşümünü içeren enzimatik bir reaksiyonla, fotometrik olarak tayin edilebilmektedir. Bu yöntemde belirli bir zaman aralığında, uygulanan ve ölçülen peroksit konsantrasyonları arasındaki fark, örnekteki antioksidanların reaktivitesi (antioksidan kapasite) ile orantılıdır.

### **Reaktiflerin hazırlanması ve saklanması:**

Tüm reaktifler, 2-8°C'de, kalibratör (CAL) ve kontroller (CTRL1 ve CTRL2) ise -20°C'de saklanmışlar ve ImAnOx kiti kullanım kılavuzunda belirtilen şekilde çalışma için hazırlanmışlardır. Daha sonra numunelerdeki ölçüm yine ImAnOx kit kullanım kılavuzunda belirtilen yöntemine uygun olarak aşağıdaki gibi yapılmıştır:

1. 10'ar µl numune, kalibratör (CAL) ya da kontrol (CTRL 1, CTRL 2); uygun kuyucuklara pipetlenmiştir (Örnekler ve kalibratör 4 kuyucuğa pipetlenmiştir. 2 kuyucuk enzimli ölçüm, 2 kuyucuk enzimsiz ölçüm için).
2. 100 µl Reaktif 1 eklenmiştir.
3. 37°C'de, 10 dakika boyunca enkübe edilmiştir.
4. 100'er µl Reaktif 2a ve Reaktif 2b, sırayla eklenmiştir.
5. Oda sıcaklığında, 5 dakika boyunca enkübe edilmiştir.
6. 50 µl Stop solüsyonu (STOP) eklenmiştir.
7. Stop solüsyonu eklenmesinin hemen ardından, 450 nm de ELİZA okuyucuda optik dansiteleri ölçülmüştür.

### **Sonuçların değerlendirilmesi:**

Enzimli ve enzimsiz ölçülen numune değerleri arasındaki fark ( $\Delta OD$ ), Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) ile ters orantılıdır.  $\Delta OD$  değerini bulmak için,

numunelerin enzimli ölçülmüş OD değerlerinden, enzimsiz ölçülmüş OD değerleri çıkartılmıştır. Daha sonra TAK, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{TAK } (\mu\text{mol/l}) = 392 - (392 - \text{Kalibratör Konsantrasyonu}) * \frac{\Delta\text{OD}_{\text{numune}}}{\Delta\text{OD}_{\text{kalibratör}}}$$

### **3.5.2. Kanda hematokrit tayini**

Kan örnekleri heparinli tüplere alınmış ve bir süre çalkalanmıştır. Ardından hemen santrifüjlenerek (10 dk, 3000 rpm), elde edilen plazma ependorf tüplerine alınmıştır. Daha sonra soğutucu taşıyıcılarla laboratuvara getirilerek, hematokrit ölçümleri için kullanılmıştır. Hematokrit değerleri, hemo-counter kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

## **3.6. Histopatolojik Çalışmalar**

### **3.6.1. Sağ ventrikül hipertrofinin değerlendirilmesi**

Kalpte, sağ ventrikül ağırlığının, sol ventrikül ve septal duvarın toplam ağırlığına oranı, sağ ventrikül hipertrofinin değerlendirilmesi için bir ölçü olarak kullanılmıştır. Araştırmamızda sağ ventrikül hipertrofinin gelişmiş olması, pulmoner hipertansiyonun göstergesi olarak kabul edilmiştir.

### **3.6.2. Akciğer doku örneklerinin histopatolojik olarak incelenmesi**

1 hafta boyunca, %10'luk formalin çözeltisi ile tespit edilen doku örneklerinin tümü takibe alınarak parafin bloklar hazırlanmıştır. Bu parafin bloklardan her doku örneği için 4 µm kalınlığında seri kesitler hazırlanmıştır. Daha sonra kesitlerin, ışık mikroskopunda incelenmesi için rutin protokol kullanılarak, Hemotoksilen Eozin (HE) boyası ile boyanmıştır (Allen, 1992). Yine standart protokoller uygulanarak, bazı kesitler, kolajen lifler için, Mason Trikrom boyası; elastin için Van Gieson boyası ile boyanmıştır (McElroy, 1992a, b). Hazırlanan örnekler, gruplara kör olan bir patolog tarafından, ışık mikroskopunda incelenmiştir.

Akciğerlerdeki patolojik değişikliklerin derecesini ifade edebilmek için, yapılan semikantitatif değerlendirmede, hasar skor puanları hesaplanmıştır (Molteni ve ark, 1985, 1986; Baybutt ve Molteni, 1999). Her bir akciğer için, septal ve intra-alveolar kanama (hemoraj) ve konjesyon, enflamasyon ve intraalveolar septa ve damar duvarlarında kolajen birikiminin varlığı ve derecesi belirlenmiştir. Bu hasarları skorlayabilmek için kullandığımız yöntemde, + (belirgin hasarın göstergesi) ile + + + (çok ciddi ve geniş çapta hasar, parenkimanın büyük bir bölümünün yok olması) arasında değişecek şekilde bir değerlendirme yapılmıştır. Ayrıca  $\pm$  sembolü, bazı bölgelerin hasarlı (artı işareti), bazı bölgelerin hasarsız (eksi işareti) olduğunu belirtmek için kullanılmıştır. Daha sonra '0' sembolü, normal doku görünümü olarak değerlendirilmiş ve işaretlere sayısal değerler atanmıştır: bir + sembolü 10 puan, bir  $\pm$  sembolü 5 puan ve bir '0' sembolü 0 puan olarak kabul edilmiştir. Bulgular kısmında değerlendirmeler sayısal olarak ifade edilmiştir.

### **3.7. Bulguların Değerlendirilmesi**

Deneylede elde edilen sonuçlar, ortalama  $\pm$  standart hata olarak ifade edilmiştir. Gruplar arasındaki farkın saptanması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmış, anlamlılık saptanmışsa post test olarak Tukey testi kullanılmıştır ( $p < 0.05$ ).

## 4. BULGULAR

### 4.1. Sağ Ventrikül Hipertrofisi

Araştırmamızda sıçanlarda pulmoner hipertansiyon oluşturmak amacıyla kullandığımız MCT (60 mg/kg i.p) enjeksiyonuna bağlı olarak, sağ ventrikül hipertrofisinin olduğu saptandı. Tablo 4.1.'de görüldüğü gibi, kontrol grubundaki sıçanların ortalama Sağ Ventrikül/Sol Ventrikül+Septum oranı (Sağ V/Sol V+S)  $0,24 \pm 0,01$  iken, MCT grubundakiler için bu değer  $0,33 \pm 0,01$  bulunmuştur. İki grup arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,05$ ). Buna karşılık MCT enjeksiyonuna bağlı olarak oluşan sağ ventrikül hipertrofisinin, 100 mg/kg/gün PDTC (i.p) ile tedavi edilen sıçanlarda anlamlı bir şekilde azaldığı saptanmıştır. Bu grupta Sağ V/Sol V+S oranı  $0,26 \pm 0,01$  olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** (Sağ Ventrikül) / (Sol Ventrikül+Septum) oranı

Deney Grubu	n	Sağ V/Sol V+S
Kontrol	6	$0,24 \pm 0,01$
MCT	6	$0,33 \pm 0,01^*$
MCT+PDTC	6	$0,26 \pm 0,02^\ddagger$

\* $p < 0,05$ , Kontrol ve MCT grupları arasındaki farkın anlamlılığı,  $^\ddagger p < 0,05$ , MCT ve MCT+PDTC grupları arasındaki farkın anlamlılığı.

### 4.2. Hematokrit

Kontrol grubunda ortalama  $39,7 \pm 1,3$  olan hematokrit değerinin, pulmoner hipertansiyon oluşturulan grupta ortalama  $50,3 \pm 0,7$  düzeyine kadar yükseldiği gözlenmiştir (Tablo 4.2). Bu iki grubun hematokrit değerleri arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. PDTC tedavisi ile hematokrit değerlerinde anlamlı bir düşüş olduğu anlaşılmıştır ( $40,2 \pm 1,7$ ).

**Tablo 4.2.** Hematokrit değerleri

Deney Grubu	n	Hematokrit
-------------	---	------------



Kontrol	6	39,7 ± 1,3
MCT	6	50,3 ± 0,7*
MCT+PDTC	6	40,2 ± 1,7 <sup>¥</sup>

\*p<0.05, Kontrol ve MCT grupları arasındaki farkın anlamlılığı, <sup>¥</sup>p<0.05, MCT ve MCT+PDTC grupları arasındaki farkın anlamlılığı.

### 4. 3. Toplam Antioksidan Kapasite (TAK)

Denelerimizde kontrol grubu ve MCT uygulaması yapılan gruplarda TAK düzeyleri açısından önemli bir değişiklik belirlenmemiştir (0,78 ± 0,06 µmol/mg protein'den 0,80 ± 0,03 µmol/mg protein'e çıktı). Ancak PDTC ile tedavi edilen sıçanlarda, TAK düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (0,91 ± 0,06 µmol/mg protein) (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3.** TAK değerleri

Deney Grubu	n	TAK (µmol/mg protein)
Kontrol	6	0,78 ± 0,06
MCT	6	0,80 ± 0,03
MCT+PDTC	6	0,91 ± 0,06 <sup>*¥</sup>

\*p<0.05, Kontrol ve MCT+PDTC grupları arasındaki farkın anlamlılığı, <sup>¥</sup>p<0.05, MCT ve MCT+PDTC grupları arasındaki farkın anlamlılığı.

### 4.4. Doku MDA

MCT enjeksiyonu yoluyla pulmoner hipertansiyon oluşturulmuş sıçanlarda, kontrol grubuna göre doku MDA düzeyinin belirgin şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tablo 4.4'de görüldüğü gibi, kontrol grubundaki sıçanların ortalama MDA düzeyi 0,022 ± 0,001 µmol/mg protein iken, MCT grubundakilerin ortalama MDA düzeyi 0,031 ± 0,001 µmol/mg protein olarak belirlenmiştir. PDTC ile tedavi ise bu artışı anlamlı bir şekilde inhibe etmiştir (0,026 ± 0,001 µmol/mg) (Tablo 4.4).

**Tablo 4.4.** Doku MDA değerleri

<b>Deney Grubu</b>	<b>n</b>	<b>MDA (µmol/mg protein)</b>
Kontrol	6	0,022 ± 0,001
MCT	6	0,031 ± 0,001*
MCT+PDTC	6	0,026 ± 0,002 <sup>¥</sup>

\*p<0.05, Kontrol ve MCT grupları arasındaki farkın anlamlılığı, <sup>¥</sup>p<0.05, MCT ve MCT+PDTC grupları arasındaki farkın anlamlılığı.

#### **4.5. Histopatolojik bulgular**

Araştırmamızda akciğerlerdeki morfolojik değişiklikler hemoraji, konjesyon, enflamasyon, septa ve damarlarda kollajen birikim düzeyleri açısından değerlendirilmiştir. Bu değişikliklerin semikantitatif değerlendirilmesi Tablo 4.5’de ve Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4’de verilmiştir. Buna göre MCT ile pulmoner hipertansiyon oluşturulmuş grupta, tüm değerlendirme kriterlerimiz açısından kontrole göre anlamlı artışlar saptanmıştır. Diğer taraftan MCT+PDTC grubunda hemoraji/konjesyon ve enflamasyonda anlamlı bir azalma belirlenmiş, kollajen birikimi gözlenmemiştir (Tablo 4.5, Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4).

**Tablo 4.5.** Akciğerlerdeki morfolojik değişikliklerin semikantitatif değerlendirilmesi

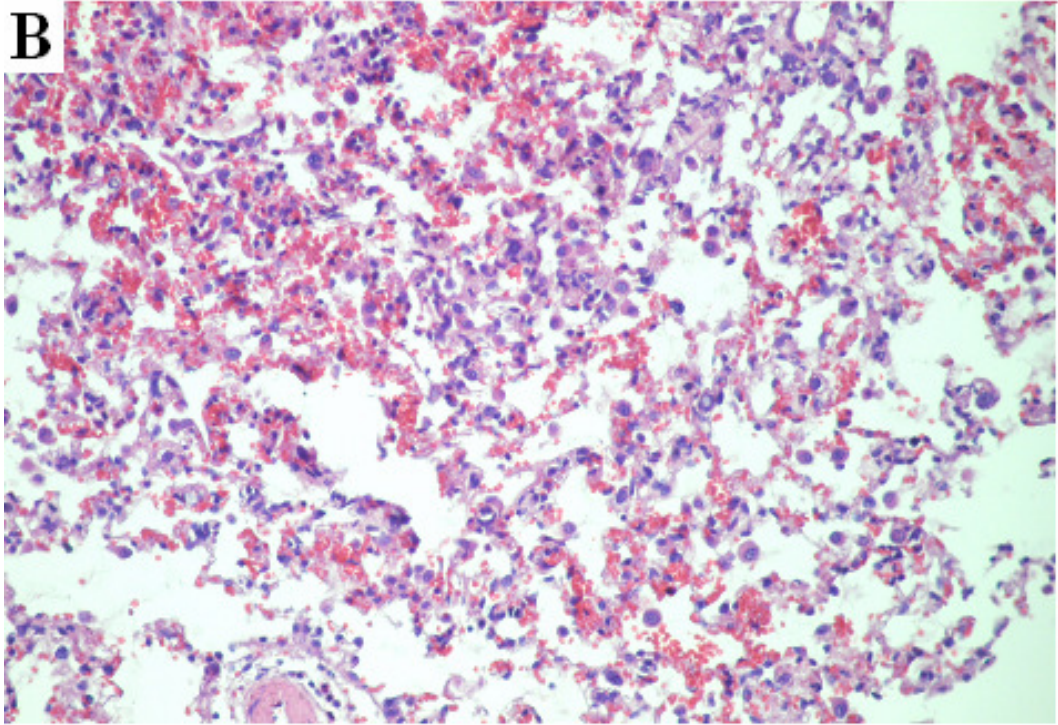
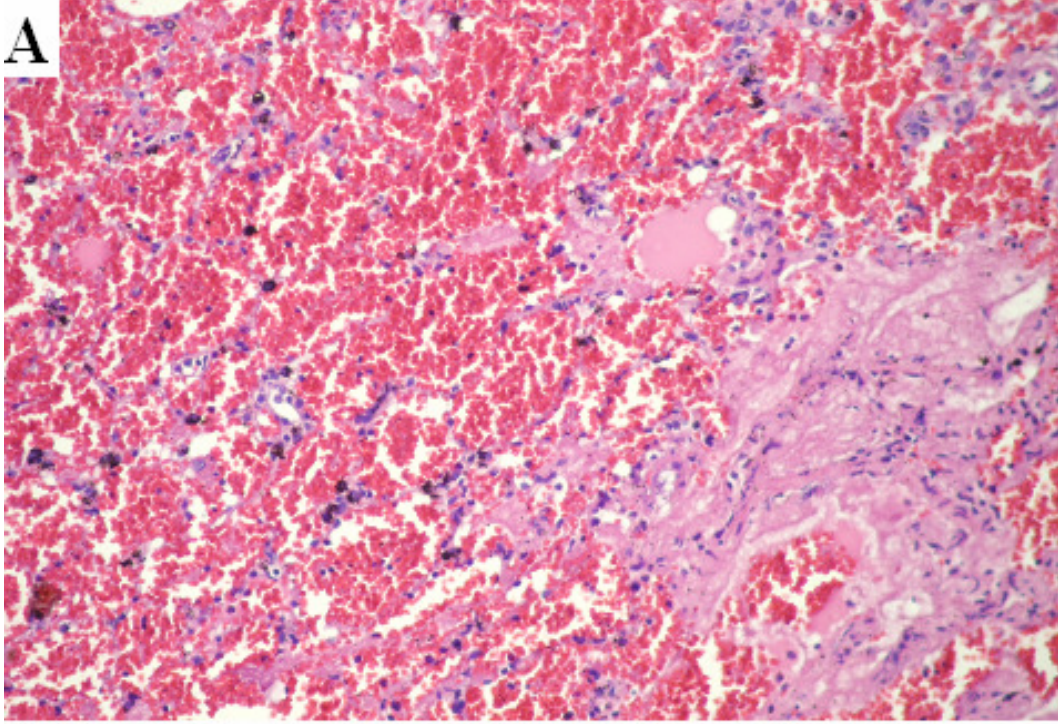
<b>Deney Grubu</b>	<b>n</b>	<b>Hemoraji/Konjesyon</b>	<b>Enflamasyon</b>	<b>Kollajen Depolanması</b>
Kontrol	6	2,5±1,1	0,0±0,0	0±0
MCT	6	20±2,6*	23,3±4,9*	10±2,2*
MCT+PDTC	6	5,0±1,3 <sup>¥</sup>	6,7±1,1 <sup>*¥</sup>	0±0

\*p<0.05, Kontrol ve MCT grupları arasındaki farkın anlamlılığı, <sup>¥</sup>p<0.05, MCT ve MCT+PDTC grupları arasındaki farkın anlamlılığı.



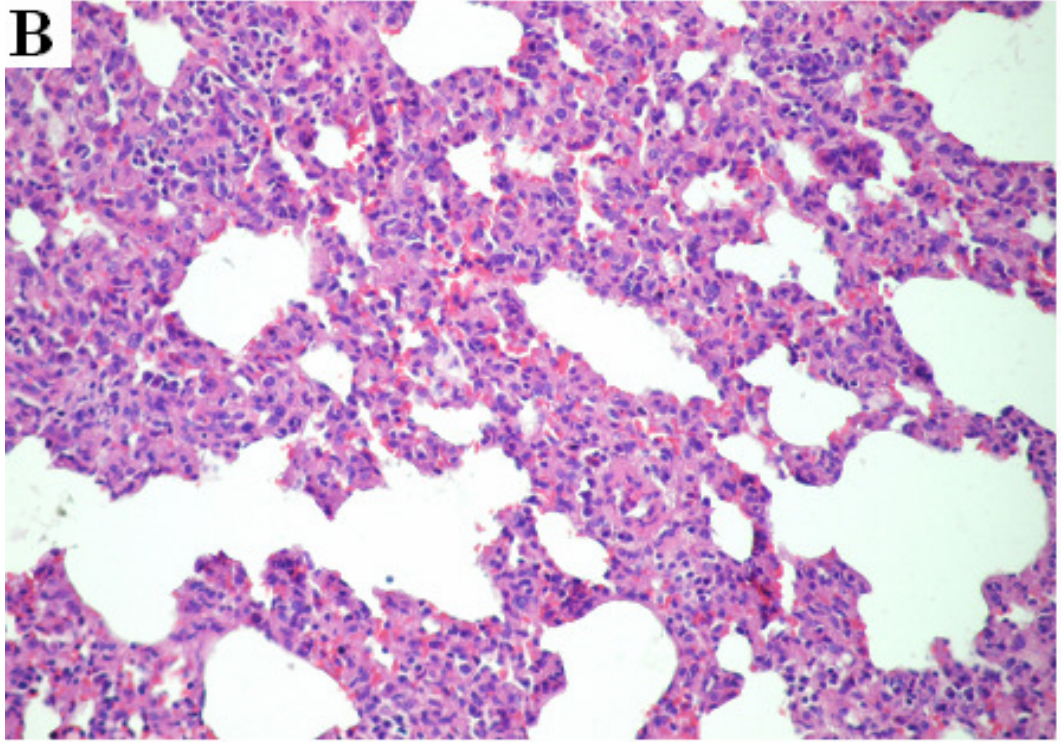
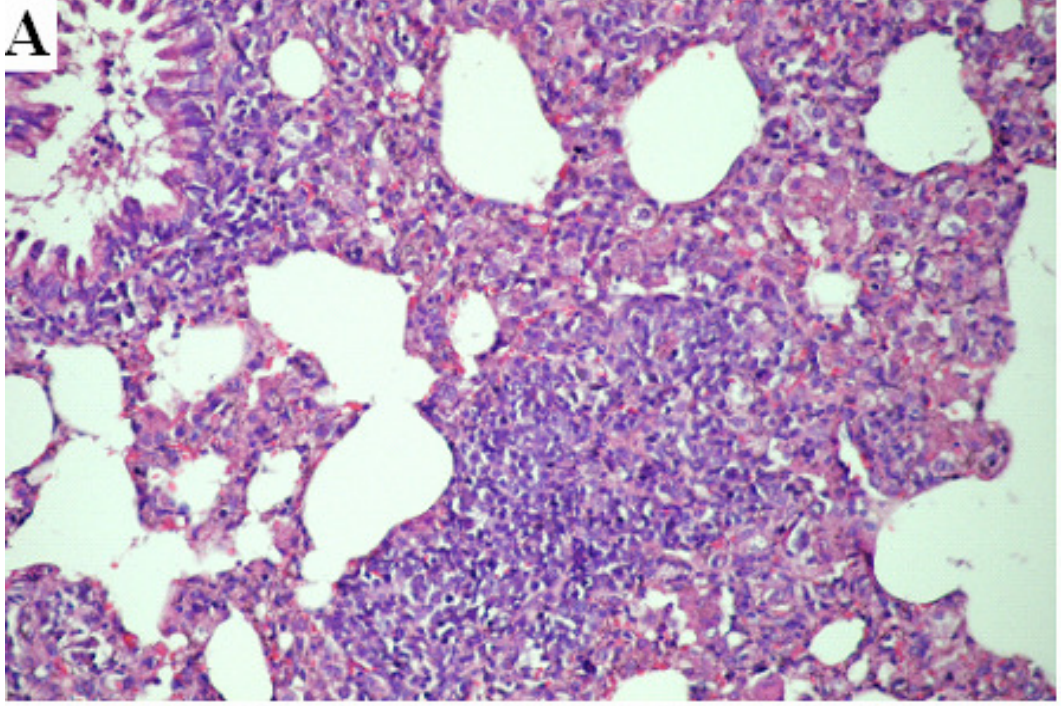
**Şekil 4.1.** Normal Akciğer Dokusu (H&Ex100)





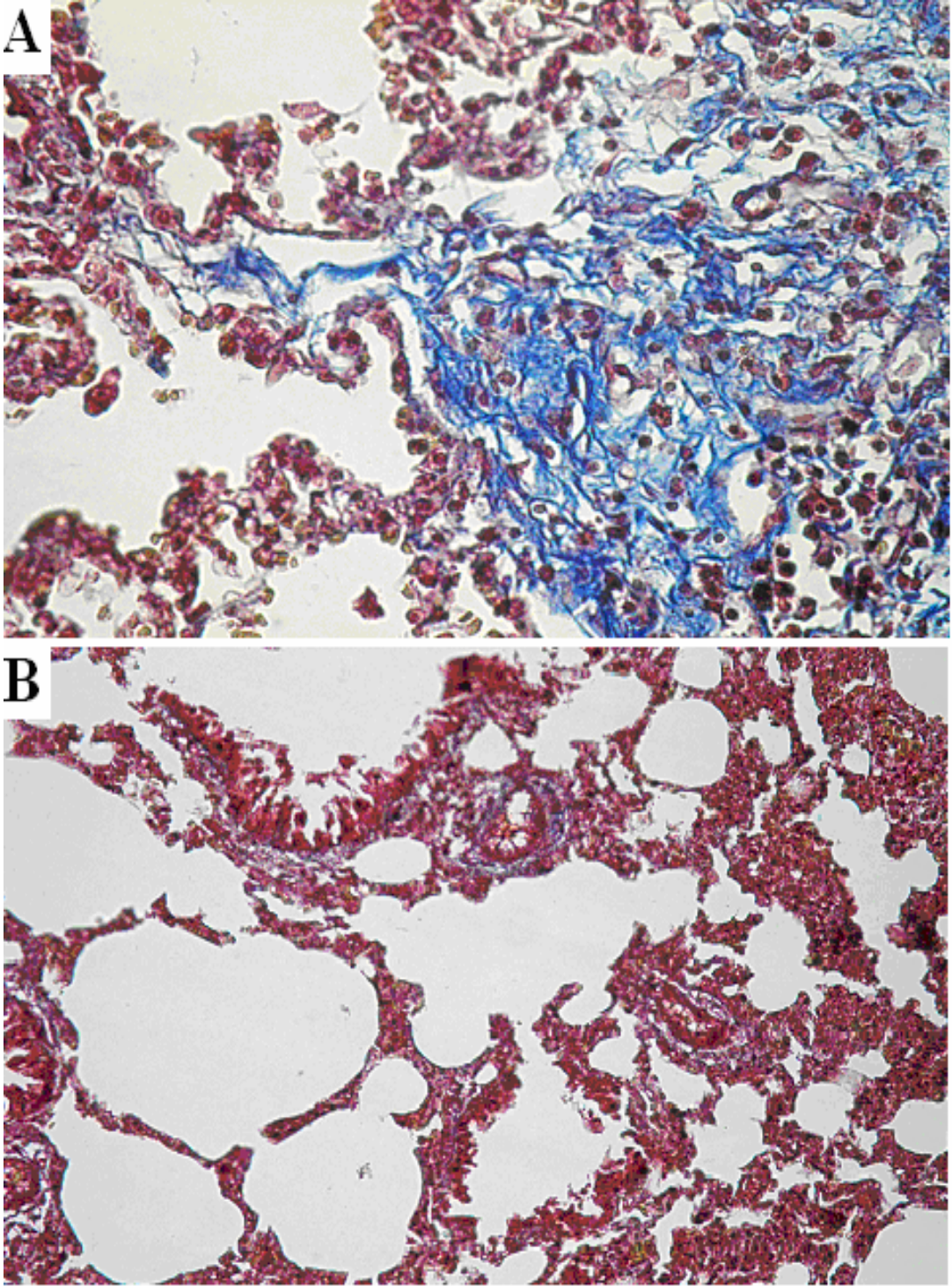
**Şekil 4.2.** (A) MCT'ye bağlı yoğun hemoraji gelişmiş akciğer dokusu (H&Ex400) (B) MCT ile pulmoner hipertansiyon oluşturulup PDTC ile tedavi edilen sıçanların akciğerinde hemoraji (H&Ex400).





**Şekil 4.3.** (A) MCT'ye bağlı yoğun enflamasyon gelişmiş akciğer dokusu (H&Ex400), (B) MCT ile pulmoner hipertansiyon oluşturulup PDTC ile tedavi edilen sıçanların akciğerinde hafif enflamasyon (H&Ex400)





**Şekil 4.4.** (A) MCT'ye bağlı kollajen depolanması (H&Ex400), (B) MCT ile pulmoner hipertansiyon oluşturulup PDTC ile tedavi edilen sıçanların akciğerinde kollajen depolanması (H&Ex400)

## 5. TARTIŞMA

PH, klinik olarak pulmoner arter basıncının yüksekliği ile; histopatolojik olarak da vasküler proliferasyon, fibrozis ve yeniden yapılanma süreci ile karakterize, karmaşık bir hastalıktır. Günümüzde etkin ve kesin bir tedavisi olmayan bu hastalık için ortalama yaşam süresinin üç yıldan kısa olduğu bilinmektedir. Araştırmalar, PH patogenezinde pulmoner damarlarda endotel fonksiyonlarında bozulma, vazokonstriktör maddelerin sentez ve salıverilmesinde artma yanında enflamasyon ve ona bağlı değişiklikler üzerinde durmaktadır. Bunların yanı sıra oksidatif stresin de bu patogeneze katıldığı anlaşılmıştır.

Son yıllarda, enflamatuvar bir süreç olarak değerlendirilen PH'de NF-κB'nin rolüne ilişkin araştırmalar dikkati çekmektedir (Sawada ve ark., 2007, Huang ve ark., 2008). Bu nedenle biz de çalışmamızda MCT bağımlı PH'de oksidatif stres, enflamasyon ve bağılı süreçler açısından NF-κB inhibitörü PDTC'nin etkinliğini değerlendirmeyi amaçladık. Sonuçlarımız PDTC uygulamasına bağılı olarak; 1.Hematokrit değerlerinin normalleştiğini ve sağ ventrikül hipertrofinin önlendiğini 2. Lipit peroksidasyonunun inhibe edildiğini, 3. Akciğerlerde enflamasyon, hemoraji, konjesyonun azaldığını ve kollajen depolanmasının engellendiğini ortaya çıkartmıştır.

Bu araştırmada, sıçanlarda PH oluşturmak için tek doz MCT (60mg/kg) uygulaması yöntemi tercih edilmiştir. Günümüzde PH'nin patogenezinin anlamak ve yeni tedavi stratejileri geliştirebilmek amacıyla kullanılan deneysel modeller arasında MCT uygulaması en çok tercih edilen iki yöntemden biri olarak dikkat çekmektedir (Campian ve ark., 2006). Makrosiklik yapıda bir pirolizidin alkaloidi olan MCT, akciğerlere selektif bir etki göstermektedir. Önceleri bu etki intrinsik toksisite olarak açıklanmıştır. Ancak bugün MCT enjeksiyonuna bağılı pnömotoksitenin akciğere taşınan pirol metabolitleri ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır (Wilson ve ark., 1992). Bu reaktif metabolitlerin ilk hedefinin de pulmoner damar endoteli olduğu gösterilmiştir.

Damar endotel hücrelerinin fonksiyonlarında bozulma, insanda PH gelişiminde de çok önemli bir durumdur (Loscalzo, 1992; Tudor ve ark., 1994). Araştırmalar MCT'ye bağlı PH'de, ET-1 gibi vazokonstriktör maddeler, NO ve PGI<sub>2</sub> gibi vazodilatör maddeler ve sitokinlerin rolüne de dikkat çekmektedir (Tanino, 2001). Diğer taraftan sıçanlarda MCT'ye bağlı olarak mediyal hipertrofi, enflamatuvar adventisyal yeniden yapılanma, pulmoner ödem ve endotelial apoptoz da gelişmektedir (Naeije ve Dewachter, 2007). MCT bağımlı PH'de (insandaki PH'ye göre) tipik pleksiform lezyon bulguları açısından farklar olsa bile PH'nin patofizyolojisini anlamak açısından bu yöntem kolay uygulanabilir, elverişli bir model olarak değerlendirilebilir.

Araştırmamızda MCT'ye bağlı PH gelişiminin göstergesi olarak sıçanlarda sağ ventrikül hipertrofisi oluşması değerlendirilmiştir. Buna göre MCT'ye bağlı oluşan sağ ventrikül hipertrofisi ( $0,24 \pm 0,01$  ve  $0,33 \pm 0,01$ , n=6) PDTC tedavisi alan grupta anlamlı bir şekilde engellenmiştir ( $0,26 \pm 0,02$ , n=6). Bu bulgumuz daha önce yapılan araştırmaların sonucuyla benzerlik göstermektedir (Sawada ve ark., 2007, Huang ve ark., 2008). Spesifik bir NF- $\kappa$ B inhibitörü olan PDTC'nin aynı zamanda antioksidan özellikleri de gösterilmiştir (Sunderman, 1991; Topping ve Jones, 1988). Antioksidanların, PH modellerinde sağ ventrikül hipertrofisini engelleyebildikleri anımsandığında (Langleben ve ark., 1989, Baybutt ve Molteni, 1999), elde ettiğimiz sonuç şaşırtıcı değildir. Bu bulgularla uyumlu olarak çalışmamızda PH'ye bağlı olarak yükselen hematokrit değerlerinin ( $39,7 \pm 1,3$  ve  $50,3 \pm 0,7$ , n=6) PDTC tedavisi sonucu normaleştiğini de belirledik ( $40,2 \pm 1,7$ , n=6).

MCT bağımlı PH modelinde güçlü bir enflamatuvar yanıt ve (Cowan ve ark., 2000) oksidatif strese kaynaklanan hasarın söz konusu olduğu gösterilmiştir (Aziz ve ark., 1997). Hem MCT'ye bağlı olarak hem de başka deneysel PH modellerinde lipid peroksidasyonunda artış gelişmesi pek çok araştırma grubunun bulguları arasında yer almaktadır (Uzun ve ark., 2006, Jin ve ark., 2008, Cui ve ark., 2009). Bizim bulgularımız da bu yöndedir. Deneylerimizin sonucuna göre akciğer dokusunda, MCT enjeksiyonuna bağlı olarak MDA düzeyleri  $0,022 \pm 0,001$   $\mu$ mol/mg protein'den  $0,031 \pm 0,001$   $\mu$ mol/mg protein'e (n=6) çıkmıştır. Bu artış MCT



uygulamasından sonra PDTC ile tedavi ettiğimiz sıçanlarda  $0,026 \pm 0,002$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein düzeyine gerilemiştir. PDTC' nin lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak MDA düzeylerindeki artışı inhibe edebildiğini gösteren başka araştırmalar da vardır (Tian ve ark., 2006; Kabay ve ark., 2007). Bu araştırmalar bizim deneysel modelimizle birebir örtüşen çalışmalar değildir. Bununla birlikte elde edilen veriler PDTC'nin antioksidan özelliklerini desteklemektedir. Deneilerimizde TAK düzeyleri açısından da bir değerlendirme yapılmış, kontrol ve MCT uygulaması yapılan gruplar arasında anlamlı bir fark belirlenemezken ( $0,78 \pm 0,06$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein'den  $0,80 \pm 0,03$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein'e çıktı); PDTC ile tedavi edilen sıçanlarda, TAK düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ( $0,91 \pm 0,06$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein). Sonuç olarak, deneilerimizin bu aşaması MCT bağımlı PH-oksidadif stres ilişkisini ve PDTC'nin antioksidan özelliklerini doğrulamaktadır.

Çalışmamızın bulguları, akciğerlerde oluşan patolojik değişimler açısından değerlendirildiğinde; MCT ile oluşturduğumuz PH'de akciğerlerde enflamasyon, hemoraji, konjesyonun oluştuğu ve kollajen depolanmasının arttığı sonucu ortaya çıkmıştır. Hem MCT hem de hipoksiye bağılı olarak oluşturulan deneysel PH modelleri ile birlikte değerlendirildiğinde; bulgularımızın daha önceki araştırmaların sonuçları ile benzer olduğu anlaşılmaktadır (Baybutt ve Molteni, 1999; Uzun ve ark., 2006). Deneilerimizin bu bölümünde yukarıda sözü edilen MCT'ye bağılı patolojik değişikliklerin PDTC ile önlenebileceği anlaşılmıştır. PDTC'nin antienflamatuvar olarak etkisi iki açıdan tartışılabilir. Bunlardan biri PDTC'nin antioksidan özelliği diğeri de PDTC'nin spesifik ve potent bir NF- $\kappa$ B inhibitörü olmasıdır.

PDTC hem bir metal şelatörü, hem de antioksidan özelliklere sahip bir ditiyokarbamattır (Sunderman, 1991; Topping ve Jones, 1988). Tiyoil gruplarının genellikle HOCl süpürücüsü olduğu dikkate alındığında stabil bir ditiyokarbamat olarak PDTC'nin de antioksidan etkilerini kısmen HOCl süpürücüsü olarak gösterdiği düşünülebilir (Zhu ve ark., 2002). Antioksidanların PH'ye bağılı yukarıda sayılan patolojileri olumlu yönde değiştirebileceğine ilişkin bilgiler hem MCT hem de PH'nin başka deneysel modellerinde daha önce de gösterilmiştir (Baybutt ve Molteni, 1999; Uzun ve ark., 2006).

PDTC'nin PH'de enflamasyona karşı koruyucu bir madde olması, sadece antioksidan özelliği ile açıklanamaz. Çünkü PDTC aynı zamanda potent bir NF-κB inhibitörüdür. PDTC'nin IL-1, TNF, PMA ve LPS tarafından yapılan NF-κB aktivasyonunu inhibe ettiğini gösteren araştırmalar da bulunmaktadır (Schreck ve ark., 1992). Bir NF-κB inhibitörü olarak PDTC'nin antienflamatuvar etkileri de değişik çalışmalarla ortaya konmuştur (Blackwell ve ark., 1996; D'Acquisto ve ark., 2002; Kwak ve ark., 2008). Bu bilgilere dayanarak enflamatuvar bir süreç olarak değerlendirilebilecek PH'nin de, enflamasyona ait bulguları inhibe etmesi beklenebilir. Nitekim bizim bulgularımız da bu yöndedir.

PH'ye bağlı akciğer patolojisinde pulmoner damarlarda yapısal ve fonksiyonel değişiklikler, anormal bağ doku depozisyonu, akciğerde aşırı kollajen oluşumu ve elastin sentezi söz konusudur (Kerr ve ark., 1987; Botney ve ark., 1993). Araştırmamızda, MCT ile oluşturduğumuz PH modelinde, daha önceki gözlemlere benzer şekilde biz de kollajen depolanması oluştuğunu gözlemledik. Ancak bu durum PDTC ile tedavi ettiğimiz sıçanlarda önlenmiştir. PH'de artan lipit peroksidasyonu, fibrojenik sitokinlerin ve buna bağlı olarak da kollajen sentezinin artmasına neden olmaktadır. Antioksidanlar bu süreci engelleyebilirler (Poli and Parola, 1997; Uzun ve ark., 2006). Bizim çalışmamızda da PDTC etkinliği bu kapsamda değerlendirilebilir.

Sonuç olarak; çalışmamızda MCT ile oluşturulan PH'de akciğer hasarının nedenlerinden biri olarak görülen lipit peroksidasyonundaki artışın, PDTC ile engellenebildiği; TAK değerlerinin ise yükseldiği gösterilmiştir. PDTC, PH'nin bir sonucu olarak sağ ventrikül hipertrofisi gelişmesini de önlemektedir. Potent bir NF-κB inhibitörü olan PDTC, akciğerlerde MCT'ye bağlı olarak gelişen enflamasyonu belirgin şekilde azaltmakta ve kollajen depolanmasını da inhibe etmektedir. Bulgularımıza dayanarak, PDTC'nin, PH'nin olası tedavi seçenekleri içinde araştırmaya ve geliştirmeye değer bir molekül olduğu sonucuna varabiliriz.

## 6. SONUÇ

Araştırmamızda, monokrotalinle oluşturulmuş deneysel PH modelinde NF- $\kappa$ B inhibitörü PDTC'nin tedavi edici etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, öncelikle, PDTC'nin etkinliği doku düzeyinde, lipit peroksidasyonu ve Toplam antioksidan durum açısından değerlendirilmiştir. İkinci aşamada ise PDTC tedavisinin akciğer dokusunda PH'ye bağlı patolojiyi etkileyip etkilemediği araştırılmıştır. Sonuçlarımız monokrotalinle oluşturulmuş deneysel PH modelinde PDTC tedavisinin;

1. Hematokrit değerlerini normalleştirdiğini ve sağ ventrikül hipertrofisini önlediğini,
2. Lipit peroksidasyonunu inhibe ettiğini,
3. Akciğerlerde hemoraji ve konjesyonu azalttığını,
4. Enflamasyonu azalttığını,
5. Kollajen depolanmasını engellediğini göstermektedir.

Araştırmamızın bulguları, NF-kappa B - oksidatif stres ilişkisinin değerlendirilmesi açısından, bundan sonraki çalışmalara ve PH tedavisine yeni yaklaşımlar getirmesi bakımından değerli olacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Adams R, Rogers EF.** The structure of monocrotaline, the alkaloid in *Crotalaria spectabilis* and *Crotalaria retusa*. *J. Am. Chem.* **1939**; 61: 2815–2819.
2. **Akkuş İ.** *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*. Konya: Mimoza Yayınları, **1995**: 42-5.
3. **Allen CT.** Hematoxylin and eosin. In: **Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, editors.** *Laboratory methods in histochemistry*. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, **1992**: 53.
4. **Altan N, Dinçel AS, Koca C.** Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stress. *Türk Biyokimya Dergisi* **2006**; 31(2):51-56.
5. **Aslan M, Ozben T.** Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways. *Antioxid Redox Signal* **2003**; 5(6):781–8.
6. **Aziz SM, Toborek M, Herring B, Olson JW, Chuing S and Lipke DW.** Oxidative stress mediates monocrotaline-induced alterations in tenascin expression in pulmonary artery endothelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1997**; 29: 775–787
7. **Balaban RS, Nemoto S, Finkel T.** Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **2005**; 120: 483–495.
8. **Barst RJ, McGoon M, Torbicki A, Sitbon O, Krowka MJ, Olschewski H, Gaine S.** Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **2004**; 43(12):40-47.
9. **Baybutt RC, Molteni A.** Dietary beta-carotene protects lung and liver parenchyma of rats treated with monocrotaline. *Toxicology* **1999**;137(2): 69-80.
10. **Baybutt RC, Molteni A.** Dietary  $\beta$ -carotene protects lung and liver parenchyma of rats treated with monocrotaline. *Toxicology* **1999**;137: 69-80.
11. **Bellotto F, Chiavacci P, Laveder F, Angelini A, Thiene G, Marcolongo R.** Effective immunosuppressive therapy in a patient with primary pulmonary hypertension. *Thorax*. **1999**; 54(4):372-4.
12. **Bingöl S, Aydın S, Açıkgöz Ş.** Free radicals. *Medical Journal of Ankara Hospital.* **1993**; 28(1): 2.
13. **Blackwell, T.S., Blackwell, T.R., Holden, E.P., Christman, B.W., and Christman, J.W.** In vivo antioxidant treatment suppresses nuclear factor-kappa B activation and neutrophilic lung inflammation. *J. Immunol.* **1996**; 157:1630–1637.
14. **Bonizzi G, Dejardin E, Piret B, Piette J, Merville MP and Bours V,** Interleukin-1 beta induces nuclear factor kappa B in epithelial cells independently of the production of reactive oxygen intermediates. *Eur J Biochem* **1996**; 242: 544–549.

15. **Bonizzi G, Piette J, Schoonbroodt S, Greimers R, Havard L, Merville MP, Bours V.** Reactive oxygen intermediate dependent NF-kappaB activation by interleukin-1beta requires 5 lipoxygenase or NADPH oxidase activity. *Mol Cell Biol* **1999**; 19: 1950–1960.
16. **Botney MD, Liptay MJ, Kaiser LR, Cooper JD, Parks WC, Mecham RP.** Active collagen synthesis by pulmonary arteries in human primary pulmonary hypertension. *Am J Pathol* **1993**; 143:121-9.
17. **Boutet K, Montani D, Jais X, Yaïci A, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M.** Therapeutic advances in pulmonary arterial hypertension. *Ther Adv Respir Dis* **2008**;2(4): 249-65.
18. **Bowie A, O'Neill LA.** Oxidative stress and nuclear factor-κB activation\*: A reassessment of the evidence in the light of recent discoveries *Biochemical Pharmacology* **2000**; 59(1):13-23.
19. **Bowie AG, Moynagh PN and O'Neill LA,** Lipid peroxidation is involved in the activation of NF-kappaB by tumor necrosis factor but not interleukin-1 in the human endothelial cell line ECV304. Lack of involvement of H2O2 in NF-kappaB activation by either cytokine in both primary and transformed endothelial cells. *J Biol Chem* **1997**; 272: 25941–25950.
20. **Brennan P and O'Neill LA,** Effects of oxidants and antioxidants on nuclear factor kappa B activation in three different cell lines: Evidence against a universal hypothesis involving oxygen radicals. *Biochim Biophys Acta* **1995**; 1260: 167–175.
21. **Brigelius-Flohe R, Friedrichs B, Maurer S, Schultz M, Streicher R.** Interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation is inhibited by overexpression of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase in a human endothelial cell line. *Biochem J* **1997**; 328: 199–203.
22. **Campbell AI, Zhao Y, Sandhu R, Stewart DJ.** Cell-based gene transfer of vascular endothelial growth factor attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* **2001**;104:2242–2248
23. **Campian ME, Hardziyenka M, Michel MC, Tan HL.** How valid are animal models to evaluate treatments for pulmonary hypertension? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **2006**; 373:391–400
24. **Catani C, Peters A, Schaefer HM.** Life-history tradeoffs are influenced by the diversity, availability and interactions of dietary antioxidants. *Anim. Behav* **2008**; 76: 1107–1119.
25. **Chan SY, Loscalzo J.** Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. *J Mol Cell Cardiol* **2008**; 44(1): 14-30.
26. **Chi VD, Kuypers F, Lubin B.** Lipid peroxidation in human red cells. *Semin hematol* **1989**; 26: 257-76
27. **Clarke B.** The pathology of pulmonary arterial hypertension. *Current Diagnostic Pathol* **2002**; 8: 412-420.
28. **Cohen A, Klasing K, Ricklefs R.** Measuring circulating antioxidants in wild birds. *Comp. Biochem. Physiol* **2007**; 147: 110– 121.
29. **Coughlan MT, Vervaart PP, Permezel M.** Altered placental oxidative stress status in gestational diabetes mellitus. *Placenta* **2004**;25:78-84.
30. **Cowan KN, Heilbut A, Humpl T, Lam C, Ito S, Rabinovitch M.** Complete reversal of fatal pulmonary hypertension in rats by a serine elastase inhibitor. *Nat. Med.* **2000**; 6: 698–702.

31. **Cross CE.** Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* **1987**; 107: 526-545.
32. **Cui B, Cheng YS, Dai DZ, Li N, Zhang TT, Dai Y.** CPU0213, a non-selective ETA/ETB receptor antagonist, improves pulmonary arteriolar remodeling of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **2009**; 36(2):169-75.
33. **D'Acquisto, F., Ialenti, A., Iuvone, T., Di Rosa, M., and Carnuccio, R.** Inhibition of nuclear factor-kappaB prevents the loss of vascular tone in lipopolysaccharide-treated rats. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**; 365: 253–257.
34. **D'Acquisto F, May MJ, Ghosh S.** Inhibition of Nuclear Factor Kappa B (NF-B): An Emerging Theme in Anti-Inflammatory Therapies. *Molecular Interventions* **2002**; 2: 22-35.
35. **D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT, et al.** Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* **1991**;115(5): 343-9.
36. **Demircin G, Öner A.** Serbest radikaller, reaktif oksijen molekülleri ve oksijen hasar. *Klinik Bilimler* **1998**; 4: 439-445.
37. **Deng Z, Morse JH, Slager SL, Cuervo N, Moore KJ, Venetos G, Kalachikov S, Cayanis E, Fischer SG, Barst RJ, Hodge SE, Knowles JA.** Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet* **2000**; 67(3): 737-44.
38. **Dorfmüller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M.** Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* **2003**;22(2):358-63.
39. **Dresdale Dt, Schultz M, Michtom Rj.** Primary pulmonary hypertension. I. Clinical and hemodynamic study. *Am. J. Med* **1951**; 11 (6): 686-705.
40. **Dröge W.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev* **2002**; 82: 47–95.
41. **Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, Raffestin B, Darmon M, Capron F, Simonneau G, Darteville P, Hamon M, Adnot S.** Hyperplasia of pulmonary artery smooth muscle cells is causally related to overexpression of the serotonin transporter in primary pulmonary hypertension. *Chest* **2002**; 121(3):97-98.
42. **Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, Raffestin B, Darmon M, Capron F, Simonneau G, Darteville P, Hamon M, Adnot S.** Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* **2001**;108 (8): 1141-50.
43. **Falnes PØ, Klungland A, Alseth I.** Repair of methyl lesions in DNA and RNA by oxidative demethylation. *Neuroscience* **2007**;145: 1222–1232.
44. **Fartoukh M, Emilie D, Le Gall C, Monti G, Simonneau G, Humbert M.** Chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha mRNA expression in lung biopsy specimens of primary pulmonary hypertension. *Chest.* **1998**;114(1 Suppl):50S-51S.
45. **Finkel T, Holbrook NJ.** Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **2000**; 408: 239–247.
46. **Galiè N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, Fleming T, Parpia T, Burgess G, Branzi A, Grimminger F, Kurzyna M, Simonneau G.** Sildenafil Use in

- Pulmonary Arterial Hypertension (SUPER) Study Group. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* **2005**;353(20): 2148-57.
47. **Ghofrani HA, Wiedemann R, Rosse F, Schermuly RT, Olschewski H, Weissmann N, Gunther A, Walmrath D, Seeger W, Grimminger F.** Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet* **2002**; 360(9337): 895-900.
  48. **Ghosh S, Karin M.** Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **2002**; 109: 81-96.
  49. **Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J.** NF-κB activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochemical Pharmacology* **2006**; 72(11): 1493-1505.
  50. **Grozdanic Z, Briining G, Baumgarten H.** Nitric Oxide: A novel autonomic neurotransmitter. *Acta Anat* **1994**; 150: 16-24
  51. **Guilluy C, Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, Guérin P, Sagan C, Pacaud P, Loirand G.** Inhibition of RhoA/Rho kinase pathway is involved in the beneficial effect of sildenafil on pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol* **2005**; 146(7): 1010-8.
  52. **Halliwell B, Gutteridge J. (2007).** *Free Radicals in Biology and Medicine*. Fourth Edition, Oxford UK: Oxford University Press, **2007**.
  53. **Halliwell B, Gutteridge J.** *Free radicals in biology and medicine*. Third Edition, Oxford: Oxford University Press, **1999**.
  54. **Halliwell B, Gutteridge JMC.** *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third Edition, Oxford UK: Oxford Science Publications, **2001**.
  55. **Halliwell B.** Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology* **1995**; 49 (10): 1341-1348
  56. **Halliwell B.** Drug antioxidant effects. *Drugs* **1991**; 42(4): 569 – 605
  57. **Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA.** Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Rad Biol Med* **2000**; 28(10):1456–62.
  58. **Hervé P, Launay JM, Scrobahaci ML, Brenot F, Simonneau G, Petitpretz P, Poubeau P, Cerrina J, Duroux P, Drouet L.** Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med.* **1995**; 99(3): 249-54.
  59. **Huang J, Kaminski PM, Edwards JG, Yeh A, Wolin MS, Frishman WH, Gewitz MH, Mathew R.** Pyrrolidine dithiocarbamate restores endothelial cell membrane integrity and attenuates monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2008** ; 294(6):L1250-9.
  60. **Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA.** Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol. Rev* **2007**; 87: 1175–1213.
  61. **Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D.** Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* **1995**; 151(5):1628-31.
  62. **Humbert M, Monti G, Fartoukh M, Magnan A, Brenot F, Rain B, Capron F, Galanaud P, Duroux P, Simonneau G, Emilie D.** Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *Eur Respir J.* **1998**;11(3):554-9.

63. **Isern RA, Yaneva M, Weiner E, Parke A, Rothfield N, Dantzker D, Rich S, Arnett FC.** Autoantibodies in patients with primary pulmonary hypertension: association with anti-Ku. *Am J Med.* **1992**; 93(3):307-12.
64. **Ishikura K, Yamada N, Ito M, Ota S, Nakamura M, Isaka N, Nakano T.** Beneficial acute effects of rho-kinase inhibitor in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ J* **2006**; 70(2):174-8
65. **Jin HF, Du SX, Zhao X, Wei HL, Wang YF, Liang YF, Tang CS, Du JB.** Effects of endogenous sulfur dioxide on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Acta Pharmacol Sin.* **2008**;29(10): 1157-66.
66. **Kabay B, Teke Z, Aytakin FO, Yenisey C, Bir F, Sacar M, Erdem E, Ozden A.** Pyrrolidine dithiocarbamate reduces lung injury caused by mesenteric ischemia/reperfusion in a rat model. *World J Surg.* **2007**; 31(8):1707-15.
67. **Kandler MA, Von Der Hardt K, Mahfoud S, Chada M, Schoof E, Papadopoulos T, Rascher W, Dötsch J.** Pilot intervention: aerosolized adrenomedullin reduces pulmonary hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* **2003**; 306(3):1021-6.
68. **Kastan MB, Bartek J.** Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **2004**; 432: 316–323.
69. **Kaur H, Perkins MJ.** *The free radical chemistry of food additives.* New York, **1991**.
70. **Kerkelä R, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C, Walters B, Shevtsov S, Pesant S, Clubb FJ, Rosenzweig A, Salomon RN, Van Etten RA, Alroy J, Durand JB, Force T.** Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Thorax* **2006**; 61(8):736.
71. **Kerr JS, Ruppert CL, Tozzi CA, Neubauer JA, Frankel HM, Yu SY, Riley DJ.** Reduction of chronic hypoxic pulmonary hypertension in the rat by an inhibitor of collagen production. *Am Rev Respir Dis.* **1987**;135(2):300-6.
72. **Kimura H, Kasahara Y, Kurosu K, Sugito K, Takiguchi Y, Terai M, Mikata A, Natsume M, Mukaida N, Matsushima K, Kuriyama T.** Alleviation of monocrotaline-induced pulmonary hypertension by antibodies to monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1. *Lab Invest* **1998**; 78(5): 571-81.
73. **Kovacich, J.C., Boyle, E.M.Jr., Morgan, E.N., Canty, T.G.Jr., Farr, A.L., Caps, M.Y., Frank, N., Pohlman, T.H., and Verrier, E.D.** Inhibition of the transcriptional activator protein nuclear factor kappaB prevents hemodynamic instability associated with the whole-body inflammatory response syndrome. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **1999**; 118: 154–162.
74. **Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB.** Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med.* **2004**; 82(7):434-48.
75. **Kwak HJ, Song JS, Heo JY, Yang SD, Nam JY, Cho YS, Cheon HG.** Protective effects of pyrrolidine dithiocarbamate against airway inflammation in the ovalbumin-induced mouse model. *Eur J Pharmacol.* **2008**; 590(1-3):355-62.
76. **Lander HM.** An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* **1997**; 11(2):118–24.
77. **Lane KB, Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, Phillips JA 3rd, Loyd JE, Nichols WC, Trembath RC.** Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *The International PPH Consortium. Nat Genet* **2000**; 26(1): 3-4.



78. **Langleben D, Fox RB, Jones RC, Reid LM.** Effects of dimethylthiourea on chronic hypoxia-induced pulmonary arterial remodelling and ventricular hypertrophy in rats. *Clin Invest Med.* **1989**;12(4): 235-40.
79. **Los M, Schenk H, Hexel K, Baeuerle PA, Droge W, Schulze-Osthoff K.** IL-2 gene expression and NF-kappa B activation through CD28 requires reactive oxygen production by 5-lipoxygenase. *EMBO J* **1995**; 14: 3731–3740.
80. **Loscalzo J.** Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **1992**; 27(2):117–119
81. **Lowenstein C, Dinerman J, Snyder S.** Nitric Oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med* **1994**; 120:227- 237.
82. **Manna SK, Zhang HJ, Yan T, Oberley LW, Aggarwal BB.** Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J Biol Chem* **1998**; 273: 13245–13254.
83. **Marcos E, Adnot S, Pham MH, Nosjean A, Raffestin B, Hamon M, Eddahibi S.** Serotonin transporter inhibitors protect against hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2003**; 168(4): 487-93.
84. **Marcos E, Fadel E, Sanchez O, Humbert M, Darteville P, Simonneau G, Hamon M, Adnot S, Eddahibi S.** Serotonin-induced smooth muscle hyperplasia in various forms of human pulmonary hypertension. *Circ Res* **2004**;94(9): 1263-70.
85. **Marsboom GR, Janssens SP.** Models for pulmonary hypertension. *Drug Discovery Today: Disease Models* **2004** ; 1(3): 289-296
86. **Mateos R, Bravo L.** Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins). *J. Sep. Sci.* **2007**; 30: 175–191.
87. **McCord J.** Human disease, free radicals and the oxidant /antioxidant balance. *Clin Biochem* **1993**; 26: 351-357.
88. **McElroy DA.** Connective tissues. In: **Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, editors.** Laboratory methods in histochemistry. Washington, DC: Armed Forced Institute of Pathology, American Registry of Pathology, **1992a**: 132-3.
89. **McElroy DA.** Connective tissues. In: **Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, editors.** Laboratory methods in histochemistry. Washington, DC: Armed Forced Institute of Pathology, American Registry of Pathology, **1992b**: 135-6.
90. **McGoon MD, Kane GC.** Pulmonary hypertension: diagnosis and management. *Mayo Clin Proc* **2009**;84(2): 191-207.
91. **Meyer M, Schreck R , Baeuerle PA.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J* **1993**; 12: 2005–2015,
92. **Michelakis ED, Weir EK.** The pathobiology of pulmonary hypertension. Smooth muscle cells and ion channels. *Clin Chest Med* **2001**; 22(3): 419-32.
93. **Molteni A, Ward WF, Ts'ao CH and Fitzsimons EJ.** Serum copper concentration as an index of cardiopulmonary injury in monocrotaline-treated rats. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **1988**; 18: 476–483.

94. **Molteni A, Ward WF, Ts'ao CH, Solliday NM, Dunn M.** Prevention of monocrotaline-induced pulmonary fibrosis in the rat by administration of captopril and penicillamine. *Proc Soc Exp Biol Med* **1985**;180: 112-20.
95. **Molteni A, Ward WF, Ts'ao CH, Solliday NM.** Monocrotaline-induced cardiopulmonary damage in rats: amelioration by the angiotensin-converting enzyme inhibitor CL242817. *Proc Soc Exp Biol Med* **1986**;182: 483-93.
96. **Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R.** Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters* **2009**; 12: 75–92
97. **Moynagh PN, Williams DC and O'Neill LA.** Activation of NF-kappa B and induction of vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular adhesion molecule-1 expression in human glial cells by IL-1. Modulation by antioxidants. *J Immunol* **1994**;153: 2681–2690.
98. **Naeije R, Dewachter L.** Animal models of pulmonary arterial hypertension. *Rev Mal Respir.* **2007**; 24(4 Pt 1): 481-96.
99. **Nagaoka T, Fagan KA, Gebb SA, Morris KG, Suzuki T, Shimokawa H, McMurtry IF, Oka M.** Inhaled Rho kinase inhibitors are potent and selective vasodilators in rat pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2005**; 171(5): 494-9.
100. **Nagaya N, Miyatake K, Kyotani S, Nishikimi T, Nakanishi N, Kangawa K.** Pulmonary vasodilator response to adrenomedullin in patients with pulmonary hypertension. *Hypertens Res* **2003**;26 Suppl: S141-6.
101. **Nicod LP.** The endothelium and genetics in pulmonary arterial hypertension. *Swiss Med Wkly* **2007**; 137 (31-32): 437-42.
102. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** Assay for peroxidases in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **1979**; 95: 351-358.
103. **Pahan, K. and Schmid, M.** Activation of nuclear factor-kB in the spinal cord of experimental allergic encephalomyelitis. *Neurosci. Lett.* **2000**; 287: 17–20.
104. **Patterson KC, Weissmann A, Ahmadi T, Farber HW.** Imatinib mesylate in the treatment of refractory idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Ann Intern Med* **2006**;145(2):152-3.
105. **Perros F, Montani D, Dorfmueller P, Durand-Gasselini I, Tcherakian C, Le Pavec J, Mazmanian M, Fadel E, Mussot S, Mercier O, Hervé P, Emilie D, Eddahibi S, Simonneau G, Souza R, Humbert M.** Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2008**; 178(1): 81-8.
106. **Petkov V, Mosgoeller W, Ziesche R, Raderer M, Stiebellehner L, Vonbank K, Funk GC, Hamilton G, Novotny C, Burian B, Block LH.** Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* **2003**; 111(9): 1339-46.
107. **Petry TW, Bowden GT, Huxtable RJ and Sipes IG.** Characterization of hepatic DNA damage induced in rats by the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. *Cancer Res.* **1984**; 44: 1505–1509.
108. **Pietra GG, Edwards WD, Kay JM, Rich S, Kernis J, Schloo B, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM.** Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National Heart, Lung, and Blood Institute, Primary Pulmonary Hypertension Registry. *Circulation* **1989**; 80(5): 1198-206.

109. **Pietra GG.** The pathology of primary pulmonary hypertension. In: **Rubin LJ, Rich S.** *Primary Pulmonary Hypertension: Lung biology in health and disease.* Vol 99, New York: Marcel Dekker, **1997**; 19–61.
110. **Poli G, Parola M.** Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic Biol Med.* **1997**; 22(1-2): 287-305.
111. **Rabinovitch M.** Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest.* **2008**; 118(7): 2372–2379.
112. **Richter T, von Zglinicki T.** A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Exp. Gerontol* **2007**; 42: 1039–1042.
113. **Sanchez O, Humbert M, Sitbon O, Simonneau G.** Treatment of pulmonary hypertension secondary to connective tissue diseases. *Thorax.* **1999**;54(3):273-7.
114. **Saran M, Michel C, BorsW.** Reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res* **1990**; 10: 221-226.
115. **Sawada H, Mitani Y, Maruyama J, Jiang BH, Ikeyama Y, Dida FA, Yamamoto H, Imanaka-Yoshida K, Shimpo H, Mizoguchi A, Maruyama K, Komada Y.** A nuclear factor-kappaB inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate ameliorates pulmonary hypertension in rats. *Chest* **2007**;132(4): 1265-74.
116. **Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Yilmaz H, Butrous G, Ermert L, Ermert M, Weissmann N, Rose F, Guenther A, Walmrath D, Seeger W, Grimminger F.** Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* **2004**;169(1): 39-45.
117. **Schmidt KN, Amstad P, Cerutti P, Baeuerle PA.** The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chem Biol* **1995**; 2: 13–22.
118. **Schoonbroodt S, Piette J.** Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways. *Biochem Pharmacol* **2000**; 60(8): 1075-83.
119. **Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droge W, Baeuerle PA.** Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J Exp Med* **1992**;175: 1181–1194.
120. **Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA.** Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* **1991**; 10(8):2247–58.
121. **Selman C, McLaren JS, Collins AR, Duthie GG, Speakman JR.** Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative damage: the effects of short-term voluntary wheel running. *Arch. Biochem. Biophys* **2002**; 401: 255–261.
122. **Sen R, Baltimore D.** Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* **1986**;47(6):921-8.
123. **Serafini M, Del Rio D.** Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Report* **2004**; 9(3): 145- 152.
124. **Sinclair AJ, Barnett AH, Lunec JL.** Free radicals and antioxidant systems in health and diseases. *British J Hosp. Med* **1990**; 43:334-344.

125. **Sitbon O, Humbert M, Jaïs X, Ioss V, Hamid AM, Provencher S, Garcia G, Parent F, Hervé P, Simonneau G.** Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **2005**;111(23): 3105-11.
126. **Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, Tulassay Z, Nagy G.** Antioxidant measurements. *Physiol. Meas* **2007**; 28: 41–55.
127. **Souza R, Sitbon O, Parent F, Simonneau G, Humbert M.** Long term imatinib treatment in pulmonary arterial hypertension. *Thorax* **2006**; 61(8): 736.
128. **Srivastava SK, Ramana KV.** Focus on molecules: nuclear factor-kappaB. *Exp Eye Res.* **2009**; 88(1):2- 3.
129. **Staal FJ, Roederer M, Herzenberg LA.** Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kappa B and transcription of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci* **1990**; 87: 9943–9947.
130. **Sunderman FW Sr,** Therapeutic properties of sodium diethyldithiocarbamate: Its role as an inhibitor in the progression of AIDS. *Ann Clin Lab Sci* **1991**; 21: 70–81.
131. **Surai PF.** *Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction.* Nottingham, UK: Nottingham University Press, **2002**.
132. **Suzuki YJ, Aggarwal BB, Packer L.** Alpha-lipoic acid is a potent inhibitor of NF-kappa B activation in human T cells. *Biochem Biophys Res Commun* **1992**;189: 1709–1715.
133. **Suzuki YJ, Packer L.** Inhibition of NF-kappa B DNA binding activity by alpha-tocopheryl succinate *Biochem Mol Biol Int* **1993**; 31: 693–700.
134. **Swamidas GP, Basaraba RJ, Baybutt RC.** Dietary retinol inhibits inflammatory responses of rats treated with monocrotaline. *J.Nutr.* **1999**; 129:1285-1290.
135. **Tanino Y.** Monocrotaline-induced pulmonary hypertension in animals. *Nippon Rinsho.* **2001**; 59(6): 1076-80.
136. **Tian XF, Yao JH, Li YH, Zhang XS, Feng BA, Yang CM, Zheng SS.** Effect of nuclear factor kappa B on intercellular adhesion molecule-1 expression and neutrophil infiltration in lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *World J Gastroenterol.* **2006**; 12(3):388-92.
137. **Tietz NW.** *Clinical Guide to Laboratory Tests.* Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, **1999**.
138. **Tonks NK.** Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signalling. *Cell* **2005**; 121(5):667 - 70.
139. **Topping RJ and Jones MM,** Optimal dithiocarbamate structure for immunomodulator action. *Med Hypotheses* **1988**; 27: 55–57.
140. **Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, Morgan NV, Atkinson C, Winship I, Simonneau G, Galie N, Loyd JE, Humbert M, Nichols WC, Morrell NW, Berg J, Manes A, McGaughran J, Pauciulo M, Wheeler L.** Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* **2001**;345(5): 325-34.
141. **Tuder RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF.** Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesion of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* **1994**; 144 (2):275–285.

142. **Uzun O, Balbay O, Comunoğlu NU, Yavuz O, Nihat Annakkaya A, Güler S, Silan C, Erbaş M, Arbak P.** Hypobaric-hypoxia-induced pulmonary damage in rats ameliorated by antioxidant erdosteine. *Acta Histochem.* **2006**;108(1): 59-68.
143. **Valencak TG, Ruf T.** N-3 polyunsaturated fatty acids impair lifespan but have no role for metabolism. *Aging Cell* **2007**; 6: 15–25.
144. **Voelkel NF, Tudor RM, Bridges J, Arend WP.** Interleukin-1 receptor antagonist treatment reduces pulmonary hypertension generated in rats by monocrotaline. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1994**;11(6): 664-75.
145. **Weir EK, Reeve HL, Johnson G, Michelakis ED, Nelson DP, Archer SL.** A role for potassium channels in smooth muscle cells and platelets in the etiology of primary pulmonary hypertension. *Chest* **1998**;114(3):200-204.
146. **Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Lamé MW, Estep JE, Morin D.** Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Crit Rev Toxicol.* **1992**;22(5-6):307-25
147. **Wood P.** Pulmonary hypertension with special reference to the vasoconstrictive factor. *Br Heart J* **1958**; 20(4):557-70.
148. **Zhu BZ, Carr AC, Frei B.** Pyrrolidine dithiocarbamate is a potent antioxidant against hypochlorous acid-induced protein damage. *FEBS Lett.* **2002**; 532(1-2):80-4.