

T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

AKUT AKCİĞER HASARINDA PERİFERİK BENZODİAZEPİN
RESEPTÖR LİGANDLARININ İNFLAMASYON VE APOPTOZ ÜZERİNE
ETKİLERİ

ECZ. BİLLUR BORAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. EMİNE YILMAZ SİPAHİ

ZONGULDAK

2019

T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

AKUT AKCİĞER HASARINDA PERİFERİK BENZODİAZEPİN
RESEPTÖR LİGANDLARININ İNFLAMASYON VE APOPTOZ ÜZERİNE
ETKİLERİ

ECZ. BİLLUR BORAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. EMİNE YILMAZ SİPAHİ

ZONGULDAK

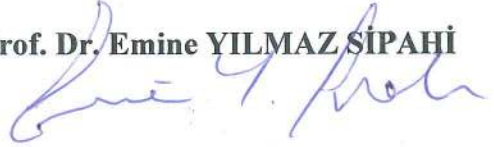
2019

KABUL VE ONAY:

“AKUT AKCİĞER HASARINDA PERİFERİK BENZODİAZEPİN RESEPTÖR LİGANDLARININ İNFLAMASYON VE APOPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİ” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

26/06/2019

Başkan: Prof. Dr. Emine YILMAZ SİPAHİ



Üye: Prof. Dr. Günnur ÖZBAKİŞ DENGİZ



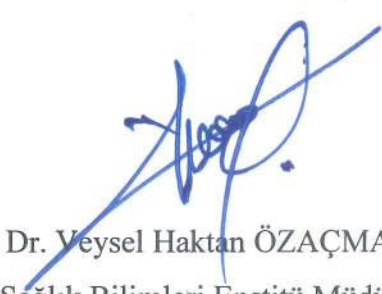
Üye: Dr. Öğr. Üyesi Namık BİLİCİ



ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

TARİH: 26/06/2019



Prof. Dr. Veysel Haktan ÖZAÇMAK
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu tezi hazırlamamda, çalışma süresinde ve yapım aşamasında yapıcı ve bilimsel eleştirilerini esirgemeyen her fırsatta bilgi ve deneyimleri ile bana güç ve güven veren saygıdeğer hocam ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Emine YILMAZ SİPAHİ'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam sırasında tüm sorularına anlayışla yaklaşan, bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan saygıdeğer hocalarım, sayın Prof. Dr. Zekiye Nur BANOĞLU'na, sayın Prof. Dr. Zehra YILMAZ'e, sayın Prof. Dr. Günnur ÖZBAKIŞ DENGİZ'e ve sayın Doç. Dr. Gamze YURDAKAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Deneysel çalışma aşamasında vermiş olduğu destekten dolayı doktora öğrencisi Anver Hamdiev'e teşekkür ederim.

Eğitim sürecinde ve ötesinde, bana her zaman destek olan, varlıklarıyla güç bulduğum aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Billur BORAN
Zonguldak, 2019

ÖZET

Billur BORAN, Akut Akciğer Hasarında Periferik Benzodiazepin Reseptör Ligandlarının İnflamasyon ve Apoptoz Üzerine Etkileri. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak, 2019.

Bu çalışma, selektif periferik benzodiazepin reseptör agonisti, 4'-klorodiazepamın (Ro 5-4864), α -naftiltiyöüre (ANTU) ile oluşturulan akut akciğer hasarındaki inflamasyon ve apoptoz üzerine etkilerini araştırmak amacıyla planlanmıştır. Sıçanlara; ANTU 10 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak verilmiş, ANTU uygulamasından 4 saat sonra akut akciğer hasarı gelişimi incelenmiştir. Ro 5-4864 sıçanlara, ANTU'dan 30 dakika önce 2 ve 4 mg/kg i.p. olarak uygulanmış ve akut akciğer hasarı üzerine olan olası koruyucu etkileri incelenmiştir. ANTU uygulamasından 4 saat sonra göğüs kafesi açılmış, plevral efüzyon mayi toplanmış, akciğer ağırlığı ölçülmüş ve akciğer dokusunun histopatolojik incelemeleri yapılmıştır. Akciğer dokusunda iNOS, TNF- α , periferik benzodiazepin reseptörü, kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama çalışmaları yapılmıştır. Serum numunelerinde ise, IL-1 α , IFN- γ ve MCP-1 düzeyleri ELISA metoduyla ölçülmüştür. Akciğer dokusunda Annexin V/propidium iodide boyaması ile apoptoz değerlendirilmesi yapılmıştır.

ANTU ile oluşturulan akut akciğer hasarı modelinde, selektif periferik benzodiazepin reseptör agonisti Ro 5-4864, 2 ve 4 mg/kg dozlarında, akciğer ağırlığı/vücut ağırlığı (AA/VA) oranlarında azalmaya neden olmuştur fakat bu azalma sadece 2 mg/kg dozunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ro 5-4864, kullanılan her iki dozunda da efüzyon gelişimini (PE/VA) istatistiksel anlamlı düzeyde azaltmış ve efüzyon gelişimine karşı koruyuculuk sağlamıştır.

Histopatolojik incelemede, ANTU grubundaki hasarda, Ro 5-4864'ün her iki dozda da inflamasyon üzerinde koruyucu etkinlik gösterdiği, hemorajiyi ise sadece 2 mg/kg dozunda anlamlı oranda azalttığı saptanmıştır.

İmmünohistokimyasal analizler incelendiğinde, Ro 5-4864'ün ANTU grubunda, iNOS immünohistokimya boyanması üzerinde anlamlı bir koruyuculuk etkisinin olmadığı, TNF boyanmasını her iki dozda da anlamlı düzeyde azalttığı, kaspaz-3 boyanmasını 2 mg/kg dozunda azalttığı, PBR boyanmasını her iki dozda da azalttığı saptanmıştır.

Serum örneklerinde çalışılan IL-1 ve IFN- γ düzeyleri, gruplar arasında farklılık göstermemiştir. MCP-1 düzeyleri ANTU grubunda artış göstermiş ve bu artış 2 ve 4 mg/kg dozundaki Ro 5-4864 ile istatistiksel anlamlı düzeyde azalmıştır. Apoptoz açısından değerlendirme yapıldığında, ANTU grubunda anlamlı oranda nekroz gözlemlendiği, 2 ve 4 mg/kg dozlarındaki Ro 5-4864'ün bu duruma karşı anlamlı oranda koruyuculuk gösterdiği izlenmiştir.

Sonuç olarak, selektif periferik benzodiazepin reseptör agonisti Ro 5-4864, ANTU ile oluşturulan akciğer hasarı ve efüzyon gelişiminde koruyucu etki göstermiştir. Bu sonuçlar, benzodiazepinlerin, santral sinir sistemindekilerden farklı olarak periferde yerleşmiş olan reseptörleri aracılığıyla, akciğer hasar mekanizmalarını etkileyerek koruyucu etki gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Periferik benzodiazepin reseptörlerinin doku hasarı ve inflamasyon üzerinde gösterilen bu olumlu ve koruyucu etkileri, onların akciğer hastalıklarında potansiyel bir ilaç olabilmelerine olanak sağlayacaktır.

Anahtar Sözcükler: Akut akciğer hasarı (ALI), akut solunum sıkıntı sendromu (ARDS), α -naftiltiyoüre (ANTU), periferik benzodiazepin reseptörü (TSPO), 4'klorodiazepam, (Ro-5 4864), plevral efüzyon

ABSTRACT

Billur BORAN, The Effects of Peripheral Benzodiazepine Receptor Ligands on Inflammation and Apoptosis in Acute Lung Injury. Zonguldak Bulent Ecevit University, Health Science Institute, Department of Medical Pharmacology, Master of Science Thesis, Zonguldak, 2019.

This study was designed to investigate the effects of selective peripheral benzodiazepine receptor agonist 4'-chlorodiazepam (Ro 5-4864) on inflammation and apoptosis in acute lung injury induced by α -naphthylthiourea (ANTU). ANTU is applied to rats at 10 mg/kg dose via intraperitoneally. Development of acute lung injury has been investigated 4 hours after ANTU. Injection of ANTU (10 mg/kg i.p.) produced pulmonary edema as indicated by an increase in lung weight/body weight ratio (LW/BW) and pleural effusion (PE) reaching a maximum within 4 h in rat. Ro 5-4864 (2 and 4 mg/kg, i.p.) carried out to rats 30 min prior to ANTU. After 4 hours, the thorax was opened and pleural effusion was carefully collected by suction and lung weight was measured and histopathological examination of the lung tissue was conducted. In both groups, iNOS, TNF- α , peripheral benzodiazepine receptor, caspase-3 immunohistochemical staining applied to the lung tissue. In serum samples IL-1 α , IFN- γ ve MCP-1 levels are measured by ELISA method. Through Annexin V/propidium iodide staining, apoptosis assessment is made on the lung tissue.

In acute lung damage model induced by ANTU, selective peripheral benzodiazepine receptor agonist caused a decrease in the lung weight/body weight (LW/BW) ratio at the doses of 2 ve 4 mg/kg Ro 5-4864. However, it is only considered statistically different in 2 mg/kg dose. Ro 5-4864 has decreased the effusion development (PE/VA) in statistically different levels in both doses and provided protection against the development of effusion.

In histopathological assessment, it is observed that Ro 5-4864 has displayed protective activity on the inflammation at both doses, whereas reduced the hemorrhage at statistically different levels only at 2 mg/kg dose. When immunohistochemical analyses were considered, it is detected that Ro 5-4864 has no statistically different protective effect on iNOS in ANTU group. Significantly reduced the TNF and PBR at both doses in ANTU group, and reduced caspase-3 in ANTU group at only 2 mg/kg dose.

IL-1 and IFN gamma levels did not display any difference between the groups. MCP-1 levels has increased in ANTU group and such increase reduced at statistically different levels with Ro 5-4864 at 2 and 4 mg/kg doses. When assessed with respect to apoptosis, necrosis were observed in ANTU group, and Ro 5-4864 at the doses of 2 and 4 mg/kg was found to provide protection at statistically different levels against such situation.

In conclusion selective peripheral benzodiazepine receptor agonist Ro 5-4864 displayed a protective effect in lung damaged caused by ANTU and effusion development. These results shows that benzodiazepines may display protective effect over the lung damage mechanisms through their peripheral receptors located at periphery as different from those located at central nervous system. This positive and protective effect of peripheral benzodiazepine receptors on tissue damage and inflammation will enable them to be used as a potential medication in lung diseases.

Keywords: Acute lung injury (ALI), acute respiratory distress syndrome (ARDS), α -naphthylthiourea (ANTU), peripheral benzodiazepine receptor, 4' chlorodiazepam (Ro-5 4864), pleural effusion.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL ve ONAY	ii
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
ŞEKİL DİZİNİ	x
TABLO DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akut Akciğer Hasarı/Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu	3
2.1.1. Akut akciğer hasarı/Akut solunum sıkıntısı sendromunda patogeneze	8
2.1.2. Apoptoz mekanizması.....	10
2.1.3. Nekroz mekanizması.....	15
2.1.4. Akut akciğer hasarı deneysel hayvan modelleri.....	18
2.1.5. Akut akciğer hasarı deney modeli: α -Naftiltiyöre (ANTU).....	21
2.2. Benzodiazepinler	22
2.2.1. Benzodiazepinlerin etki mekanizmaları.....	24
2.2.2. Benzodiazepinlerin solunum sistemi üzerine etkileri	25
2.2.3. Periferik benzodiazepin reseptörleri	25
2.2.4. Periferik benzodiazepin reseptörlerinin patolojik durumlardaki rolü	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Akut Akciğer Hasarı Deney Modelinin Oluşturulması.....	31
3.1.1. ANTU modeli	31
3.2. Deney Protokolü.....	32
3.2.1. İmmünohistokimyasal boyama metodu	33
3.2.2. Histopatolojik inceleme metodu	33
3.2.3. Serumda sitokin tayini	34
3.2.4. Flow sitometri ile apoptoz değerlendirmesi.....	35
3.3. Kimyasal Maddeler	35
3.4. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi	35

4. BULGULAR	36
4.1. ANTU'nun Pulmoner Sistem Üzerine Etkisi	36
4.2. Ro 5-4864'ün ANTU Aracılı Akut Akciğer Hasarı Üzerine Etkileri	37
4.3. ANTU 'nun ve Ro 5-4864'ün Sitokin, iNOS, PBR, Kaspaz-3, TNF, Histopatolojik İnceleme, Apoptoz/Nekroz Üzerine Etkileri	41
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	57
7. KAYNAKLAR	58
8. EKLER	73
Ek 1: Etik Kurul Onayı	73
9. ÖZGEÇMİŞ	74



ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

1. ANTU ile oluşturulan akut akciğer hasarında Ro 5-4864, akciğer ağırlığı/vücut ağırlığı oranı (AA/VA x104) üzerine olan etkileri. Her grupta n=10, *p<0.05..	38
2. ANTU ile oluşturulan akut akciğer hasarında Ro 5-4864'ün plevral efüzyon miktarı (PE) (ml) üzerine olan etkileri. Her gruptan=10, *p<0.05.	38
3. ANTU ile oluşturulan akut akciğer hasarında Ro 5-4864'ün, plevral efüzyon/vücut ağırlığı oranı (PE/VA x 104) üzerine olan etkileri. Her grupta n=10, *p<0.05..	39
4. Kontrol sıçan akciğeri (H&E x10).	39
5. ANTU sıçan akciğeri (H&E x10).	40
6. ANTU + RO (2 mg/kg) sıçan AKC X10H&E	40
7. ANTU + RO (4 mg/kg) sıçan AKC X10H&E	41
8. Kontrol AKC TNF-alfa X5	42
9. ANTU AKC TNF-alfa X20	42
10. ANTU+RO (2 mg/kg) TNF-alfa sıçan AKC X20	43
11. ANTU+RO (4 mg/kg) TNF-alfa sıçan AKC X20	43
12. Kontrol AKC kaspaz-3 X40.....	44
13. ANTU AKC kaspaz-3 X20	44
14. ANTU+RO (2 mg/kg) kaspaz-3 sıçan AKC X20	45
15. ANTU+RO (4 mg/kg) kaspaz-3 sıçan AKC X20	45
16. Kontrol AKC PBR X20	46
17. ANTU AKC PBR X20.....	46
18. ANTU+RO (2 mg/kg) PBR sıçan AKC X20.....	47
19. ANTU+RO (4 mg/kg) PBR sıçan AKC X20.....	47

TABLO DİZİNİ

Sayfa

1. ALI Ve ARDS için Amerikan-Avrupa Konsensus Konferansında Önerilen Tanı Kriterleri.....	4
2. Akut Akciğer Hasarında GOCA Sistemi	5
3. Önerilen Yeni Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu Sınıflaması.....	6
4. ALI/ARDS Gelişiminde Risk Faktörleri ve Bu Patolojilerin Varlığında ALI/ARDS Oluşma İnsidansları	7
5. Apoptozis ve Genler.....	14
6. Apoptoz ve Nekrozla Ölüm Rrasındaki Temel Farklar.	15
7. Normal ve Patolojik Şartlarda Olası PBR Fonksiyonları.....	28
8. Deney Grupları.....	32
9. Tüm Grupların AA/VA, PE/VA Oranları ve PE Miktarları	36

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA/VA	Akciğer ağırlığı/Vücut ağırlığı
AIF	Apoptoz indükleyici faktör
ALI/ARDS	Akut akciğer hasarı / Akut solunum sıkıntısı sendromu
ANTU	Alfa-naftiltiyöre
APAF-1	Apoptotik proteaz aktive eden faktör-1
BDR	Benzodiazepin reseptörü
BZ	Benzodiazepin
CPAP	Devamlı pozitif hava yolu basıncı
CRS	İstirahatte akciğer kompliyansı
CSF	Koloni uyarıcı faktör
DBI	Diazepam bağlayan inhibitör
DDL	Düşük dansiteli lipoprotein
FiO₂	Solunan havadaki fraksiyonel O ₂
GABA	gama-aminobütirik asit
GABA_A	gama-aminobütirik asit A reseptörü
GABA_B	gama-aminobütirik asit B reseptörü
G-CSF	Granülosit koloni uyarıcı faktör
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
IL-1	İnterlökin-1
IL-1α	İnterlökin-alfa
IL-1β	İnterlökin-1 beta
IL-2	İnterlökin-2
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
IFN-γ	interferon-gama
i.p.	intraperitoneal
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginin metil ester
LBP	Lipopolisakkarid bağlayan protein
LIS	Akciğer hasarı skoru
LTB₄	Lökotrien B ₄
MCP-1	Monosit kemotaktik protein-1
NaCl	Sodyum Klorür
NGF	Nöron büyüme faktörü

NF-kappaB	Nükleer faktör kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartat
NO	Nitrik oksit
PaO₂	Parsiyel oksijen basıncı
FiO₂	Solunan Oksijen Fraksiyonu
PARP	Poli ADP riboz polimeraz
PBR	Periferik Benzodiazepin reseptörü
PE	Plevral efüzyon
PEEP	Pozitif ekspiryum sonu basınç (positive end-expiratory pressure)
PE/VA	Plevral efüzyon/Vücut ağırlığı
PIM	Pulmoner intravasküler olgun makrofaj
ROS	Reaktif oksijen türleri
SSS	Santral Sinir Sistemi
TNF	Tümör nekrozis faktör
TNF-α	Tümör nekrozis faktör-alfa
TXA₂	Tromboksan A ₂
ZEEP	Sıfır ekspiryum sonu basınç

1. GİRİŞ

Akut akciğer hasarı (ALI), artan vasküler permeabilite ile gelişen akut ve persistan akciğer inflamasyonu sendromudur. Akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) ise, ALI ile aynı belirtileri olup hipoksisi daha ağırdır (1).

ARDS; akciğer üzerinde doğrudan veya dolaylı yoldan hasarlar oluşturabilen farklı nedenlerle tetiklenen; akut başlayan; akciğerlerde inflamasyon; proliferasyon ve fibrozis ile önemli yapısal değişikliklere sebep olan; oksijene refrakter hipoksemi, komplians ve fonksiyonel rezidüel kapasitede azalma, akciğer grafisinde diffüz infiltratların varlığı ile karakterize; alveolo-kapiller permeabilite artışıyla gelişen nonkardiyak pulmoner ödemdir (2).

ARDS oluşumuna neden olabilecek bir çok sebep gösterilmiştir; pnömoni, gastrik içeriğinin aspirasyonu, üst solunum yolu obstrüksiyonunu önlemek için yapılan işlemler, sepsis, ciddi travmalar ve yanıklar, multipl kan transfüzyonu, akciğer ve kemik iliği transplantasyonu, yüksek doz ilaç kullanımı, duman inhalasyonu, pulmoner kontüzyon, kardiyopulmoner “by-pass”, yağ, hava ve amniyotik sıvı embolisi, akut pankreatit, şok, oksijen toksisitesi, akut eozinofilik pnömoni, miliyer tüberküloz, boğulma tehlikesi geçirme, bronşiyolitits obliterans organize pnömoni, dissemine intravasküler koagülasyon gibi. Bu durumlar direkt veya indirekt yolla akciğer hasarı oluştururlar (3).

ALI ve ARDS patogenezinde inflamasyon, apoptozis ve trombozis gözlenmektedir (4). İlk yanıt olarak tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-8 (IL-8) gibi proinflamatuvar sitokinler salgılanmaktadır (5,6). Bunu takiben akciğerlerde oluşan yoğun nötrofil birikimi ile bu hücreler aktive olmakta ve bunun sonucunda reaktif oksijen türevleri ve protezlar gibi toksik medyatörlerin salgılanmalarıyla kapiller endotel ve alveoler epitel harabiyeti oluşmaktadır (7,8).

Benzodiazepinler (BZ), trankilizan, antidepresan, kas gevşetici, antikonvülzan, sedatif, analjezik, antiinflamatuvar ve anksiyolitik etki gibi geniş kullanım alanları bulunan bileşiklerdir, santral ve periferik tipte farklı reseptörlerle etkileşmektedirler, dolayısıyla, etkilerini sadece santral sinir sistemi üzerinde göstermezler. Benzodiazepinler farmakolojik etkilerini γ -aminobütirik asit (GABA) reseptörü üzerindeki kendilerine özgü bağlanma yerlerine (BZ reseptörlerine) bağlanarak gösterirler. GABA, santral sinir sisteminin majör inhibitör nörotransmitteridir (9).

Klinikte tedavide kullanılan bütün benzodiazepinler, GABA'nın GABA_A reseptör alt tipine bağlanmasını uyarırlar. Bu reseptörler çok alt birimli, ligantla açılan klor kanallarıdır ve bu kanallar yardımıyla GABA bağımlı iyonik iletiyi güçlendirirler (10). Klorür kanalları ve GABA_A reseptörleriyle kenetli santral benzodiazepin reseptörlerinden farklı olarak, çeşitli hücrelerin mitokondri dış membranı üzerinde yerleşmiş benzodiazepin reseptörleri de mevcuttur. Bunlara periferik tipte benzodiazepin reseptörü (PBR) denmiştir (11). Yapılan çalışmalar PBR'lerin hem beyin hem de periferik dokularda var olduğunu göstermektedir. PBR'lere ilk olarak böbrek dokusunda rastlanmıştır (12). Daha sonra, PBR'lerin kalp, akciğer, hipofiz, karaciğer, trombositler, mast hücreleri, makrofaj, dalak, timus, barsak, lenf nodu ve testis dokularında da mevcut olduğu bulunmuştur (13).

Benzodiazepinlerin solunum sistemi üzerindeki etkilerini inceleyen çok az sayıda çalışma vardır. Benzodiazepin reseptörlerinin uyarılmasıyla, solunum yolu düz kas hücresinde hiperpolarizasyon olur, bu durum kasta gevşemeye, mevcut obstrüksiyonun ortadan kalkmasına yol açmakta ve gevşemeye neden olan ilaçların etkisini arttırmaktadır. Bu etkileriyle, astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi bronkospazmin var olduğu durumlarda tedavi seçeneği olarak değerlendirilebilirler.

Santral sinir sistemi (SSS) dışında, periferde bulunan non-nöronal GABA reseptörleri hakkında çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu reseptörlerin akciğer hücre hasarı ve inflamasyonu üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar ise oldukça kısıtlıdır (14). Benzodiazepinlerin solunum sistemi üzerine olan potansiyel koruyucu etkilerinin ayrıntılı olarak inceleneceği çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda, alfa-naftiltiyöre (ANTU) ile ALI/ARDS deney modeli oluşturulmuştur. ANTU, rodentisit olarak geliştirilmiş, pulmoner ödem ve plevral efüzyon geliştirerek, pulmoner yetmezlikle ölüme neden olan kimyasal bir ajandır. Yapılan çalışmalarda, doz ve zaman bağımlı olarak ALI geliştirdiği saptanmıştır (15). Çalışmamızda selektif periferik benzodiazepin reseptör agonisti Ro 5-4864'ün, ANTU aracılı ALI/ARDS üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akut Akciğer Hasarı / Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu

Akut akciğer hasarı, İngilizce karşılığı 'Acute lung injury; ALI', artmış vasküler permeabilite ile karakterize akut ve persistan akciğer inflamasyonu sendromu olarak tanımlanmıştır. Akut akciğer hasarı tanısı koyduran başlıca klinik özellikler şunlardır;

- 1- Akut gelişen ve pulmoner ödem ile birlikte iki taraflı radyolojik infiltrasyonlar,
- 2- Uygulanan pozitif ekspiryum sonu basınç (positive end-expiratory pressure; PEEP) düzeyinden bağımsız olarak arteriyel oksijen kısmi basıncının solunan oksijen fraksiyonuna oranının ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) 201 ile 300 arasında olması (burada PaO_2 mmHg olarak hesaplanır ve FiO_2 0.21 ile 1.00 arasında bir değer olarak verilir),
- 3- Sol atriyal basınçta artış görülmemesi,
- 4- Pulmoner kapiller wedge basıncının 18 mmHg'nın altında olmasıdır.

Akut solunum sıkıntısı sendromu (Acute respiratory distress syndrome; ARDS) ALI ile aynı belirtiler verir farkı hipoksinin daha ağır gözlenmesidir ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ oranı 200'ün altındadır). Arter kan gazı ölçümü ARDS ve ALI tanısında bakılması gereken tetkiktir fakat bazı hastalarda arter kan gazı örneği almak zor olabilmektedir. Bu tür vakalarda pulse oksimetre ile ölçülen SaO_2 değeri kullanılabilir. Yapılan bir çalışmada $\text{SaO}_2/\text{FiO}_2$ oranının 235 bulunmasının $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2=200$ ile ilişki gösterdiği ve $\text{SaO}_2/\text{FiO}_2$ oranının 315 bulunmasının $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2=300$ ile ilişki gösterdiği bulunmuştur (1).

ARDS; akciğer üzerinde doğrudan veya dolaylı yoldan hasar meydana getirebilen çok farklı nedenlerle oluşabilen, akut olarak başlayan, akciğerlerde inflamasyon, proliferasyon ve fibrozisin birlikte görüldüğü ciddi yapısal değişiklikler oluşturan, oksijene refrakter hipoksemi, komplians ve fonksiyonel rezidüel kapasite azalması, akciğer grafisinde diffüz infiltratların varlığı ile karakterize, alveolokapiller permeabilite artışıyla birlikte gözlenen nonkardiyak pulmoner ödem tablosudur. ALI/ARDS ilk olarak 1967 yılında Ashbaugh ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (2).

Akut solunum sıkıntısı sendromu her iki akciğeri de etkileyebilen nonkardiyojenik özellikte diffüz infiltrasyonla birlikte, oksijen ile tedaviye cevap vermeyen akut solunum yetmezliği sendromudur. ARDS, akciğerlerin hava ve dolaşım yollarını etkileyen çok çeşitli nedenlere bağlı oluşan akut klinik tablo olup, farklı hastalıklarla bağlantılı geliştiğinden, hastalık değil sendrom olarak tanımlanmaktadır (16). Yapılan ilk çalışmalarda erişkin solunum sıkıntısı sendromu (adult respiratory distress syndrome) olarak isimlendirilmesine rağmen daha sonra çocuklarda da ortaya çıkışı ile akut solunum sıkıntısı sendromu (acute respiratory distress syndrome) olarak adlandırılmıştır (17,18).

Tablo 1. ALI Ve ARDS için Amerikan-Avrupa Konsensus Konferansında Önerilen Tanı Kriterleri

ALI	ARDS
Akut başlangıç	
$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$
Akciğer grafisinde bilateral infiltratlar	
PCWP (Pulmoner kapiller kama basıncı) $< 18 \text{ mmHg}$ veya klinik olarak sol atrial hipertansiyon bulgusunun olmaması	

1994 yılında yayınlanan Amerikan-Avrupa konsensus konferansı raporu ile ARDS'nın ALI'nin ilerlemiş şekli olduğu kabul edilmiştir. Aynı konferans raporunda ALI ve ARDS için klinik kullanımı daha kolay olan tanı kriterleri de belirlenmiştir. (Tablo 1) (17).

Tablo 2. Akut Akciğer Hasarında GOCA Sistemi

HARF	ANLAM	SKALA	TANIMLAMA
G	Gaz değişimi	0	PaO ₂ /FiO ₂ >301
		1	PaO ₂ /FiO ₂ =201-300
		2	PaO ₂ /FiO ₂ =101-200
		3	PaO ₂ /FiO ₂
	Gaz değişimi (numerik tanımlayıcı ile kombine edilecek)	A	Spontan solunum, ZEEP
		B	Asiste solunum, PEEP=0-5 cmH ₂ O
		C	Asiste solunum, PEEP=6-10 cmH ₂ O
		D	Asiste solunum, PEEP> 10 cmH ₂ O
O	Organ yetmezliği	0	Sadece akciğer
		1	Akciğer+1 organ
		2	Akciğer+2 organ
		3	Akciğer + ≥ 3 organ
C	Neden	0	Bilinmiyor
		1	Direkt akciğer hasarı
		2	İndirekt akciğer hasarı
A	Birlikte bulunan hastalıklar	0	Takip eden 5 yıl içinde ölüme yol açabilecek başka hastalık yok
		1	6 ay-5 yıl içinde ölüme neden olabilecek ilave hastalık
		2	6 ay içinde ölüme yol açabilecek ilave hastalık

ZEEP: Sıfır end-ekspiratuar basınç PEEP: Pozitif end-expiratory pressure

1998’de yayınlanan 2. Amerikan-Avrupa konsensus konferansı raporunda epidemiyolojik verilerin toplanabilmesi, araştırma sonuçlarının kıyaslanabilmesi ve koordineli olarak yürütülebilmesi için ilk konsensus toplantısında önerilen tanı kriterlerine ek olarak, akciğer hasarının şiddetini belirleyen ve risk faktörleri de dahil olacak şekilde klinik durumu değerlendiren sistemlerin de kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır (18). Bu amaçla akciğer hasarı skorunun (Lung injury score: LIS) kullanılabileceği; ancak prognostik açıdan önemli olabilecek ve olayın başlangıcında mevcut olan veya sonradan eklenen diğer faktörlerin de dikkate alınması açısından GOCA sisteminin kullanılabileceği belirtilmiştir. GOCA sistemi basit ALI’den şiddetli ARDS’ye kadar tüm oluşumu kapsayacak şekilde prognostik açıdan önemli olan ek faktörlerin de değerlendirilmesini sağlayabilecek bir sistemdir (Tablo 2) (19).

ARDS için tanımlama, 2011 yılı Kasım ayında Berlin/Almanya’da “European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)” 24. Kongresinde American Thoracic Society (ATS)ile birlikte ESICM’nin yaptığı çalışmalar ile Marco Ranieri tarafından sunulmuştur. Önerilen yeni Berlin ARDS tanımına göre; ARDS, tanımlanmış risk

faktörlerinin eşlik ettiği akut difüz akciğer hasarının bir tipi olup, havalı akciğer doku kaybı ve artmış pulmoner vasküler permeabiliteye neden olan inflamasyon ile karakterizedir. (Tablo 3) (20)

Tablo 3. Önerilen Yeni Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu Sınıflaması (21)

Kriter	Hafif	Orta	Ağır
Zamanlama	Akut başlangıç, bir hafta içinde başlayan klinik veya yeni/kötüleşen solunum semptomları		
Hipoksemi	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 = 201-300$ ve $\text{PEEP}/\text{CPAP} \geq 5$	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ ve $\text{PEEP} \geq 5$	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100$ ve $\text{PEEP} \geq 10$
Ödem nedeni	Kalp yetmezliği veya sıvı yüklenmesi ile tamamen açıklanamayan solunum yetmezliği**		
Radyolojik anormallikler	Bilateral opasiteler*	Bilateral opasiteler*	En az üç kadranı kaplayan opasiteler**
Ek fizyolojik düzensizlikler	N/A	N/A	$\text{CRS} < 40$ $\text{mL}/\text{cmH}_2\text{O}$ veya $\text{VE}_{\text{corr}} > 10$ L/dakika

* Efüzyon, nodül, kitle veya lobar/akciğer kollapsı ile tamamen açıklanamayan.

** Hiçbir risk faktörü yoksa objektif değerlendirmeye ihtiyaç vardır. $\text{VE}_{\text{corr}} = \text{VE} \times \text{PaCO}_2/40$ (vücut yüzey alanı ile düzeltilmiş dakika ventilasyonu), CRS: İstirahatte akciğer kompliyansı, CPAP: Devamlı pozitif hava yolu basıncı, N/A: Uygulanabilir değil, kullanılamaz.

Yeni önerilen Berlin tanımlaması, hastalığın tedavisinde klinisyenleri yönlendirecek ve bu tanımlama kullanılarak yapılacak bilimsel çalışmalarda daha doğru sonuçlar alınabilecektir.

ALI ve ARDS gelişiminde rol alan risk faktörleri direkt olarak akciğer hasarı oluşturabilmektedir ki bu durumda primer ya da pulmoner ALI/ARDS söz konusudur. Daha sık olarak ise indirekt yolla, yani sistemik inflamatuvar yanıtı tetikleyerek endotelial taraftan başlayan akciğer hasarı oluşabilmektedir ki; bu durumda da sekonder veya ekstrapulmoner ALI/ARDS söz konusu olmaktadır (Tablo 4) (22,23).

Tablo 4. ALI/ARDS Gelişiminde Risk Faktörleri ve Bu Patolojilerin Varlığında ALI/ARDS Oluşma İnsidansları

Sıklık	Direkt Akciğer Hasarı	İndirekt Akciğer Hasarı
	Pnömoni	Sepsis/Şiddetli sepsis (%35-45)
Sık	Mide içeriği aspirasyonu (%22-36)	Major travma (%25)
	Akciğer kontüzyonu (%17-22)	Çoklu uzun kemik kırıkları (%5-10)
		Fazla miktarda transfüzyon (%5-36)
		Hipovolemik şok
Nadir	Yağ embolisi	Pankreatit
	Boğulma	Kardiopulmoner bypass
	İrritan gaz inhalasyonu	İlaç aşırı dozu

ARDS gelişimine neden olabilecek birçok sebep gösterilmiştir; pnömoni, gastrik içeriğinin aspirasyonu, üst solunum yolu obstrüksiyonunu önlemek için yapılan müdahalelerden sonra, sepsis, ciddi travmalar ve yanıklar, multipl kan transfüzyonu, akciğer ve kemik iliği transplantasyonu, yüksek dozda ilaç kullanımı, duman inhalasyonu, pulmoner kontüzyon, kardiyopulmoner “by-pass”, yağ, hava ve amniyotik sıvı embolisi, akut pankreatit, şok, oksijen toksisitesi, akut eozinofilik pnömoni, miliyer tüberküloz, boğulma tehlikesi geçirme, bronşiyolitisi obliterans organize pnömoni, dissemine intravasküler koagülasyon gibi. Bu durumlar direkt veya indirekt yolla akciğer hasarı oluşturmaktadırlar (3).

Amerikan Ulusal Kalp ve Akciğer Enstitüsü’nün 1972 yılında yayınlanan sonuçlarına göre ARDS insidansı yılda 75/100000 oranında gerçekleşmektedir (24). Berlin’ de yapılan araştırmanın sonuçlarına göre Lung Injury Score (LIS)>2.5 olan hastaların insidansı yılda 3/100000 iken LIS=1.75-2.5 olan hastaların insidansı 17.1/100000 olarak bulunmuştur (25). İskandinav ülkelerinde gerçekleştirilen ve konsensus konferansı tanı kriterlerinin kullanıldığı çok geniş çaplı bir araştırmada ise ALI insidansı 17.9/100000, ARDS insidansı ise 13.5/100000 olarak bulunmuştur (26). 2002 yılında yayınlanan ve Avustralya’da gerçekleştirilmiş bir araştırmada da konsensus konferansı tanı kriterleri kullanılarak 34/100000 ALI ve 28/100000 ARDS insidansı tespit edilmiştir (27).

2.1.1. Akut akciğer hasarı/ Akut solunum sıkıntısı sendromunda patogenezi

Alveolo-kapiller permeabilite artışına bağlı oluşan ALI, akciğerlerin hava yolları veya dolaşım yoluyla maruz kaldığı farklı nedenlere bağlı olarak gelişebilen akut klinik bir durumdur.

Sağlıklı akciğerler, alveol içi sıvı birikimini önleyecek ve interstisyel alanda fazla sıvı kalmayacak şekilde dengede çalışır. İntravasküler proteinlerin onkotik basıncı, interstisyel lenfatikler ve alveoller arasında bulunan ve sızmayı önleyen sıkı bağlantılar bu dengeyi korur. Fakat akciğerin herhangi bir nedenle hasarlanması durumunda bu işleyiş bozulur, alveoller içinde ve interstisyumda sıvı birikimi normal değerlerin üzerine çıkar. Bununla birlikte damar dışına çıkmaması gereken protein yapıda maddeler de interstisyum ve alveol içine geçmeye başlar. Bir süre sonra alveollerin içi kanlı, proteinöz yapıda ödem sıvısı ve ölü hücrelerle dolar. Sürfaktan fonksiyonunun bozulması sonucunda da alveollerde kollaps oluşur (28,29).

Alveoler epitelde iki tür hücre vardır. Tip I pnömositler epitel yüzeyinin %90'ını kaplar. Metabolik olarak fazla aktif değildir ve hasarlanmaya karşı dayanıksızdır. Tip II pnömositler ise %10 luk miktarda bulunur, surfaktan üretimi ve iyon pompalanması gibi önemli metabolik olaylarda görev alırlar. Tip II pnömositler hasarlanmaya karşı daha dayanıklıdır ve hasar sonrası bölünüp farklılaşarak tip I pnömositleri oluştururlar. Normal şartlarda alveoler epitelin permeabilitesi vasküler endotele kıyasla daha düşüktür (30,31). Primer (pulmoner) ALI/ARDS'de ilk hasar alveoler epitelde oluşur, hasar sonucualveoler makrofajlar aktive olur ve pulmoner inflamasyon gelişir. Sekonder (ekstrapulmoner) ALI/ARDS' de akciğer dışı kaynaklarla tetiklenen hücresel ve humoral yanıt sonucu sistemik dolaşıma salınan mediyatörler akciğer hasarı oluşturur (30). ALI ve ARDS 'de inflamatuvar yanıt, dolayısıyla endotelial/epitelial hasar oluşumundaki ana faktör nötrofiller ve multiple mediyatör kaskadıdır (32). Enflamasyonun başlamasıyla nötrofil yapımı artar, artan nötrofiller inflamasyon bölgeleri ve akciğerlerde birikirler. Primer ALI'de oluşan hasarla aktive olan alveoller ve interstisyel makrofajlardan TNF- α , IL-1, IL-8ve özellikle β -integrinler olmak üzere sitokinler ve adhezyon molekülleri salınır ve bunlar nötrofillerin kemotaksisini ve aktivasyonunu stimüle ederler (32,33). Sekonder ALI/ARDS'de nötrofil aktivasyonu açısından en önemli faktörlerden birisi endotoksindir (Lipopolisakkarit, LPS). Plazmadaki lipopolisakkarit bağlayan protein (LBP), LPS'yi bağlayarak aktivitesinin artmasına neden olur. LPS+LBP kompleksi

CD18, CD14, kompleman sistemi ve nötrofil aktivasyonuna, nötrofillerin akciğerde birikimine ve sitokin salımının tetiklenmesine neden olur (34). Primer ALI/ARDS'nin akut fazında protein içeriği yüksek alveoler ödem oluşum hızı ve miktarı, sekonder ALI/ARDS'ye göre daha fazladır. Tip II pnömositlerde hasar oluşması, ödem sıvısının alveollerden atılımına neden olur, sürfaktan yapımı ve dönüşümü de bozulur (35,36). Proteinden zengin alveoler ödem sıvısı ve inflamasyon, mevcut sürfaktanın fonksiyonunun bozulmasına yol açar. Bunun sonucunda alveoller kollaps, şant fraksiyonu artışı, V/Q uyumsuzlukları ve gaz değişim anormallikleri ile nötrofil migrasyonu, intraalveoler fibrin, kollajen ve hücrel debris birikimi oluşur (30,31).

ARDS patogenezinde inflamasyon, apoptozis ve trombozis gibi farklı biyolojik süreçler rol almaktadır (4). Öncelikle çeşitli uyaranlara yanıt olarak TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinler salgılanmaktadır (5,6). Sonrasında akciğerlerde yoğun nötrofil birikimi olmakta ve bu hücreler aktive olarak kapiller endotel ve alveoler epitel harabiyetine yol açan reaktif oksijen türevleri ve protezlar gibi toksik mediyatörler salgılamaktadır (7,8). ARDS'nin erken dönemlerinde alveoler sıvıda granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ve granülosit makrofaj koloni uyarıcıfaktör (GM-CSF) konsantrasyonlarının artmasıyla nötrofil apoptozisi bozulur ve bunun sonucunda nötrofillerin meydana getirdiği hasar artar (37).

ARDS hastalarında üç belirgin patolojik evre görülür. İlk evre 1 hafta kadar süren, diffüz alveoler hasar görülen eksüdatif evredir. İkinci evrede pulmoner ödem çözülmeye uğrar, tip II alveoler hücreler proliferer olur, skuamöz metaplazi gelişir, interstisyel alanda miyofibroblastlar birikir ve ilk defa kollajen depolanmaya başlanır. Bu evre proliferatif evredir. Üçüncü evrede ise normal akciğer hava yolları oblitere olur, fibrozis ve kist formasyonları gelişir. Bu son evre fibrotik evredir (38).

ARDS'li hastalarda sıklıkla pulmoner vasküler tonus artışı ve pulmoner hipertansiyon gelişmektedir. Trombosit kümelenmesi uyarılmaktadır. ALI/ARDS akciğerinde sıklıkla pulmoner rezistansı arttıran mikrotrombozis ve mikroemboli oluşmaktadır. Vasküler yapıdameydana gelen tıkanıklıklara bağlı iskemik hasar ve mediyatör salınımı artmaktadır. Trombin aktivasyonu ve fibrin oluşumu trombositlerden TXA₂ ve serotonin salınımına neden olarak, bu mediyatörlerin güçlü vazokonstriktör etkisiyle pulmoner vasküler rezistansın daha da artmasına yol açmaktadır (31).

ALI/ARDS patogenezinde akciğerlerden salınan vazodilatör etkili mediyatörler de mevcuttur. Prostoglandinler, endotoksinlerin etkisi ile pulmoner

alanda etkinliği artmış olan COX-2 ve indüklenabilir nitrik oksit sentetaz (İNOS) gibi mediyatörler vazodilatör etki oluşumunu sağlamaktadır (32).

ALI/ARDS akciğerinde kaybolan hipoksik pulmoner vazokonstriktör yanıt, pulmoner tromboembolik olaylar, artan pulmoner vasküler rezistans, alveolar kollaps, alveoler konsolidasyon gibi patolojiler, alveoler ventilasyon ile pulmoner perfüzyon oranının bozulmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda oluşan şant fraksiyonu artışı, ya da V/Q oranındaki normal dışı sapmalar oksijene yanıtsız hiopsemiye yol açar. Alveolokapiller membranda oluşan ödem, inflamasyon ve fibrozis sonucunda da gaz difüzyonu bozulur. İlk başta hipo- veya normokapni oluşumu gözlenirken hiperkapni gelişimi de olabilmektedir. ALI/ARDS geç döneminde akciğerin yapısı fibrozis, kapiller hasarı, amfizematöz ve bronşiektazik gelişmelerle önemli oranda bozulur. Yapısal değişiklikler hipoksemi ile birlikte CO₂ birikimine de neden olabilmektedir. Hastalığın bu geç döneminde PEEP uygulanmasının iyileşme sağlama olasılığı yoktur; ama PEEP uygulanması ventilasyon veya perfüzyon redistribüsyonu yolu ile oksijenasyonun devamını sağlamaktadır (39).

2.1.2. Apoptoz mekanizması

Apoptosis (programlanmış hücre ölümü), hücre intiharı olarak da bilinen fizyolojik bir olaydır. Organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlayan veya hasarlı hücreler apoptozis ile genetik olarak kontrol edilerek ortadan kaldırılırlar. Apoptozis farklı genler ile ilişkili aktif bir sistem olup, Yunancada apo (=ayrı) ve ptozis (=düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş sonbaharda yaprak dökümünü, yaprakların ağaçtan, taç yaprakların çiçekten doğal olarak düşmesini tanımlayan bir kelimedir (40). Teorikte apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilir. Hücre kendisi tarafından programlanmış bir mekanizmayla ölümünü kontrol eder ve bu olay hücrenin intiharı olarak tanımlanabilir (41). Apoptoz ile vücudun bütünündeki hücre sayısı sabit kalır ve immün sistem faaliyetlerinin gerçekleşmesi sağlanır (42). Apoptozis süreci; DNA hasarına genlerin yanıtı, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı) ve hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi (granzim) olmak üzere üç farklı şekilde işleyebilir (43). Apoptoz sürecinin belli başlı bileşenleri; Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) proteinidir. Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu ile, apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı

kırılması, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişiklikler meydana gelir (44). Apoptoz sürecinde kalsiyum iyonu, seramid, Bcl-2 genleri, p53, kaspazlar, sitokrom-c proteini ve mitokondri etkilidir. Kaspazlar, aspartik asitten sonraki peptid bağı kırarak sistein proteazlardır. Hücre içinde inaktif durumdadırlar, proteolitik olarak birbirlerini aktive ederler. Başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2,8,9,10), efektör kaspazlar (kaspaz 3,6,7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz 1,4,5,11,12,13,14) olmak üzere 3 tipte sınıflandırılırlar. Hücre iskeletindeki 100 farklı hedef proteinini keserler, hücre zarının tomurcuklanmasına ve apoptoza neden olurlar (45,46).

Apoptoz mekanizmasında iki temel yol vardır. Birinci yol, hücre dışı uyaranlarla tetiklenen, pozitif (TNF- α varlığı) ya da negatif (büyüme faktörü yokluğu) hücre dışı yoldur, ikinci yol ise hücre içinde DNA hasarı, endoplazmik retikulum stresi ya da mitokondriden tetiklenen hücre içi yoldur. Apoptotik süreç hangi yolla başlamış olursa olsun kaspazlar adı verilen proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilirler. Kaspazlar, farklı türleri tanımlanmış, aktif katalitik bölgesinde sistein içeren ve substratlarını aspartat içeren özgül bir bölgeden kesen proteaz enzimlerdir.

2.1.2.1. Hücre dışı uyaranlarla tetiklenen apoptoz (ölüm reseptörleri yolu)

Apoptozis mekanizmasındaki ilk yol hücre dışı uyaranlarla tetiklenen yoldur. Hücre dışı uyaranlar olarak TNF, koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler sayılabilir. Otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilmiş olan Fas/FasL, sFas proteinleri, virüsler de (HIV; influenza, adenovirüs) hücreyi apoptozise götürebilmektedirler (47).

Apoptoz uyarılmasında, ölüm reseptörleri olarak da adlandırılan, birbiriyle yapısal olarak akraba olan TNF- α ve Fas reseptörleri görev almaktadır. Ölüm reseptörleri hücre zarı iç kısmına tutunmuş olan, bir ucu hücre dışına, bir ucu hücre içine bakan, hücre içi tarafında prokaspaz 8'in aktiflenmesini sağlayan bir ölüm bölgesi bulunan reseptörlerdir. Hücre zarındaki kendileri için özgün reseptörlere bağlanan ligandlar, reseptörü trimerik bir yapıya dönüştürür ve hücre içinde adaptör moleküller adı verilen bir dizi molekülle etkileşmeye girerek prokaspaz 8'i iki farklı büyüklükte parçaya bölerler. Kaspaz 8 aktifleşir vebaşlatıcı etkidedir, inaktif proenzimler olan kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7'nin bir zincir biçiminde

aktifleşmesini sağlar. Aktif duruma geçen tüm kaspazlar hücre makromoleküllerini parçalar ve tipik apoptoz morfolojisini oluştururlar (48).

Aktif kaspaz 8, diğer yandan, Bcl-2 ailesi proteinlerinden biri olan Bid'in de proteolitik olarak aktifleşmesine yol açar. Bid, mitokondriden proteinlerin ve kalsiyumun serbestlenmesine yol açar. Böylece ölüm reseptörleriyle mitokondriyal yol da aktifleşmiş olur (49).

Virüslerle enfekte olmuş hücrelerde veya aktiflenen p53'ün etkisi ile uyarılan Fas reseptörü, o hücrenin sitotoksik T lenfositlerce öldürülmesini sağlar. FAS ve TNF- α dışında TNF ilişkili apoptoz indükleyen ligand reseptörleri (TRAIL) de hücre içinde benzer yolla ölümü uyabilir (50).

2.1.2.2.Hücre içi apoptotik yollar (mitokondriyal yol):

Sitokinler, kalsiyumun hücre içinde miktarının artması, TNF, DNA hasarıyla tümör süpressör gen olan p53'ün aktif hale geçmesi, viral-bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler ve onkojenler apoptozu etkileyen hücre içi uyaranlardır. Hipertermi, radyasyon, sitotoksik onkoloji ilaçları ve hipoksi gibi nekroza neden olabilecek etkenler az miktarda apoptoz meydana getirirler. Apoptozda hücre ölümü çevre dokuya zarar vermez fakat bazen apoptoz dolaylı olarak çevre dokuda nekroza neden olabilir ya da nekroz apoptozisi başlatabilir (51).

Mitokondri, hücre içi ATP üretiminden sorumludur, aynı zamanda hücre içi ve dışı yollarla gelen ölüm sinyalleri bu organel üzerinde birleşmektedir. İçi ve dışı zarla çevrili yapıda olan mitokondri, hücre zarında olduğu gibi bir zar potansiyeline sahiptir. Normal işleyişi bozulan mitokondrinin dış zar geçirgenliğinde artış oluşması, dış zarda şişme oluşmasına neden olur. Bunun sonucunda iki zar arasında bulunan çeşitli proteinler hücre sitoplazmasına geçer. Bu geçiş, zarda geçirgen transisyon poru meydana gelmesiyle ya da dış zarın patlamasıyla oluşabilir. Mitokondride solunum fonksiyonunda yer alan enzim olan sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AIF), SMAC ve ENDO G adlı DNAaz enzimi sitoplazmaya dağılır. Sitokrom c, sitoplazmada Apaf-1 molekülüne bağlanır, inaktif yapıdaki bu monomer apoptozom adı verilen yapıya dönüşür (52). Apoptozom, kaspaz 9'u aktifleştirmek üzere keser, kaspaz 9, efektör kaspazlardan prokaspaz 3'ü aktive eder ve kromatin kondensasyonu ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonu ile gelişen apoptozun gerçekleşmesini

sağlar. Mitokondride dış zar potansiyelinin değişmesi Bcl-2 ailesi adı verilen bir protein grubu tarafından düzenlenir.

p53 hücre sitoplazmasında bulunur. DNA'nın ya da hücrenin ağır hasar görmesi durumunda, DNA'da belli genlerin aktivasyonu ile yapımlarının artmasına (Bax, Apaf-1, Fas), belli genlerin de baskılanmasına (Bcl-2, Bcl-X) yol açarak apoptozu tetikler (53). Hücrenin hasarı onarılabilecek düzeyde ise, hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptozu indükler.

Sonuç olarak ister intrinsek ister ekstrinsek yoldan aktivasyon başlasın, “ateşleyici” enzimler olan kaspaz 8 ve 9, aktive olduklarında “ölüm işlemi” başlamıştır, geriye dönüş yoktur. Kaspaz 8 ya da 9 aktivasyonunu, bitirici (executioner) olarak bilinen caspase 3 ve 6'nın aktivasyonu izler. Bitirici kaspaz'lar çok sayıda hücre komponentini etkiler; sitoskeletal ve nükleer matriks proteinlerini parçalayarak sitoskeletal ve nükleer yıkıma yol açarlar, transkripsiyon, DNA replikasyon ve DNA onarımı ile ilgili proteinleri parçalarlar, caspase-3 özellikle sitoplazmik DNAAz enzimini aktive ederek sarmalda ayrışmalara neden olur.

Aktif duruma geçen kaspazlar hücre yapısı bileşenlerinden aktin, miyozin, spektrin gibi proteinleri keser, böylece hücre küçülür ve yapıştığı ortamdan ayrılır. Aktin ve miyozinin etkileşimi ile hücre zarla sarılı tomurcuklar halinde kopar. Transkripsiyon faktörleri gibi proteinler, ribozomlar, RNA, golgi ve endoplazmik retikulum gibi tüm organeller parçalanır (54). Mitokondri zar potansiyelinin bozulmasıyla normal hücrede çift tabakalı hücre zarının dış katında bulunmayan bir fosfolipid olan fosfatidilserin dış yaprağa geçer ve oksitlenir. Bu değişim apoptotik hücrelerin makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilmesi için bir sinyal oluşturur. Zarla sarılı apoptotik cisimlerin fagositozuyla apoptotik süreç tamamlanmış olur.

Tablo 5. Apoptozis ve Genler (51)

Apoptozisi baskılayan genler	Apoptozisi indükleyen genler
• Bcl-2 grubundan; BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, A1 • c-abl geni • ras onkogeni • çözünebilir fas • p35 • A20	• Bcl-2 grubundan; Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, bid, bik, Hrk1 • c-myc • p53, p21 • fas (CD95/APO1) FADD/MORT, RIP, FAST • interlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE) • LOH (MTS1/CDK41)

Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar:

- Apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Nekroz fizyolojik bir ölüm şekli değildir.
- Nekrozda kromatin paterni hemen hemen normaldir ama hücre şişer, apoptotik hücre ise tam tersine küçülür.
- Apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve yoğunlaşır. Apoptozun en önemli spesifik yönü DNA'nın internükleozomal bölgelerden parçalanmasıdır.
- Nekrotik hücrenin plazma membran bütünlüğü kaybolmuştur, apoptotik hücre membranı ise sağlamdır.
- Nekrotik hücre sonradan lizise uğrar. Apoptotik hücre küçük cisimciklere parçalanır.
- Nekrozda inflamasyon oluşurken apoptozda oluşmaz (55,56,57,58).

Tablo 6. Apoptoz ve Nekrozla Ölüm Arasındaki Temel Farklar

	Apoptoz	Nekroz
Morfolojik özellikler	Küçülme, çekirdekte kromatin yoğunlaşması, tomurcuklanmayla apoptotik cisimlerin oluşması, komşu hücreler tarafından fagosite edilme	Şişme, hücre geçirgenliğinin hızlaartması ve blebleşme (kabarcık oluşturma), hücre içeriğinin dış ortama dağılması
Tetikleyen mekanizmalar	Hücre dışından (TNF- α , büyüme faktör eksikliği, antikanserojen ilaçlar, oksidatif stres, DNA hasarı) Hücre içinden (mitokondri, ER)	Ani toksik etki sonucu zar geçirgenliğinin çok büyük ölçüde bozulması
Biyokimyasal değişimler	Hücre içinde proteolitik enzimlerin aktivasyonu, hücre içi proteinlerin ve DNA'nın yıkımı (kaspaz ve DNaz aktivasyonu)	Hücrede çok hızlı bir enerji yetmezliği ya da toksik etki sonucu zar geçirgenliğinin hızla artmasıyla osmotik dengenin bozulması, hücrenin patlaması
Sonuçları	Apoptoza uğrayan hücrenin inflamasyon oluşturmaksızın ortamdan temizlenmesi	Hücre içi maddelerin dağılmasıyla oluşan inflamasyon

(TNF, tümör nekrozis faktör; ER, endoplazmik retikulum)

2.1.3. Nekroz mekanizması

Nekroz da apoptoz gibi hücre ölüm biçimi olmasına rağmen, histolojik ve fizyolojik olarak apoptozdan büyük farklılıkları vardır (59,60).

Nekroz, kendiliğinden gelişen, genlerle kontrol edilemeyen düzensiz bir süreçtir. Ayırıcı özelliği ölümün hücre grubunda meydana gelmesidir ve en yaygın nedeni hipoksidir. Hipoksi dışında arsenik, siyanid, insektisitler gibi toksik maddeler ve ağır metaller de nekroza neden olabilirler. Bu maddeler, membran geçirgenliğinin artmasına yol açar, hücre ve organeller parçalanır, sitoplazma ve çekirdek içeriği hücreler arasındaki boşluğa salınır (59,60,61).

Nekroz oluşmasında, fiziksel uyarılar ve ısı, yanma, donma, toksik maddeler gibi kimyasal uyarılar hücrenin iyon dengesini bozarak etkili olurlar. DNA tamirinden sorumlu nükleer enzim PARP (Poli ADP-riboz polimeraz) NAD⁺'ı ikiye bölerek NAD kaybına neden olur. Buna bağlı ATP noksanlığı olur, bu durum iyon pompası yetersizliğine yol açar, hücre içine sıvı geçişiyle organeller şişer. Plazmanın membran bütünlüğü bozulur ve oluşan osmotik basınç hücrenin patlamasına neden olur. Hücre

ölümüyle hücrelerarası boşluğa salınan hücre içeriği enflamasyon oluşturur. Makrofaj ve nötrofillerin nekrotik dokuya göçü bu olayın karakteristik özelliğidir. Göç eden bu hücreler nekrotik dokuyu fagosite eder. Bu nedenle enflamasyon nekrozun önemli bir işaretidir. Nekroz sırasında mitokondriyal ROS üretimi artar, nonapoptotik proteazlar aktive olur, ATP üretimi azalır ve Ca^{+2} kanalları açılır (62,63).

Nekroz tipleri:

- 1. Koagülasyon nekrozu:** En sık oluşan ve her türlü iskemik olayda gözlenen nekroz türüdür. Sitoplazma proteinleri koagülasyona uğrar, hücre çekirdeği kaybolur. Protein denatürasyonu sonucunda beyin haricindeki tüm dokularda hipoksik ölüm gerçekleşir. Bu nekroz türünde organel yıkımı da görülür (64).

Koagülasyon nekrozu apoptozla çok benzer özellik gösterir. İkisini farklılıkları bakımından kıyaslayacak olursak;

- Apoptoz fizyolojik ve patolojik olaylar sonucunda gen ve enzimlerin aktivasyonundan kaynaklanır, transdüksiyonun kesin işaretini takip eden fizyolojik bir uyarana vardır. Nekrozda ise bu uyarana ekzojen kaynaklı hipoksi ya da çeşitli toksinler olabilir.
- Apoptoz tek hücrede ortaya çıkan bir olaydır ve bunun sonucu apoptotik cisim oluşur. Apoptotik hücre, hücre olma özelliğini kaybeder ve tamamen cansız bir kitle haline dönüşür. Nekrozda ise organellerin parçalanması, şişme, zar zedelenmesi ve serbest radikal hasarı gibi olaylar söz konusudur ve nekroz belli bir hücre grubunu etkiler.
- Nekrozun en belirgin özelliği olan inflamasyon apoptozda yoktur.
- Dokuda apoptoza uğrayan hücreler komşu hücreler tarafından fagosite edilir. Nekrozda ise immünolojik bir fagositoz vardır (59,60,61).

- 2. Likefaksiyon nekrozu (kolliküasyon nekrozu, erime nekrozu):** En sık beyin dokusu ve apselerde görülen dokunun enzimatik sindirimi ile gerçekleşen nekroz türüdür.

3. **Kazeöz nekrozu:** Tüberküloz hastalığında ortaya çıkan, granülomların merkezinde eozinofilik heterojen hücre kitleleri birikmesiyle karakterize nekroz türüdür.
4. **Yağ nekrozu:** Hasarlı pankreas hücreleri ve makrofajlarda rastlanan, lipaz enzimi aracılıyağ asitlerinin kalsiyumla birleşmesiyle beyaz tebeşirimsi bölgelerle karakterize nekroz türüdür.
5. **Kangrenöz nekroz:** Büyük ve derin yaralanmalarda dokuya implante olan bakterilerin etkisiyle oluşan nekroz türüdür.
6. **Fibrinoid nekroz:** Bağ dokusunda ve damarsı yapılarda gözlenen, damar duvarında fibrin benzeri protein materyal birikimi ile karakterize nekroz türüdür.

Nekroz mekanizmasında; Fas, TNF reseptörlerinin aktivasyonu veya hücrel stres sonucu RIP1 ve RIP3 (Receptor interacting proteinler) aktive olmaktadır. RIP1 ve RIP3 mitokondriyi direkt aktive edebilir ya da NADPH oksidazın oluşturduğu ROS ile indirekt olarak etkileyip nekrozu indükleyebilir (65). Nekrotik uyarı PARP'ı da aktive eder. PARP1 de kalpain aktivasyonu, RIP kinazların aktivasyonu ya da PARP yoluyla nekroza neden olur. PARP ve kalpain, AIF salınımını sağlayarak nekrotik hücreleri indüklerler. Kalpain, Ca^{+2} ile aktive olan kaspaz proteaz ailesi üyesidir ve lizozomal enzim salınımına neden olan kathepsin aktivasyonuna katkıda bulunur (62,63,66,67). Bcl-2 ailesinden bir başka protein olan BNIP, direkt olarak mitokondriyal por oluşumunu aktive eder. Mitokondriyal porlar; mitokondri dış membranında voltaj bağımlı anyon kanalı (VDAC), iç membranında adenin nukleotit translokaz (ANT), matrikste peptidil prolil izomerazdan oluşmaktadır. Mitokondriyal porlar, aşırı reaktif oksijen türleri (ROS) ve Ca^{+2} üretiminde açılan geniş kanallardır (68,69,70). Bcl-2 ailesinin diğer bir proteini Nix ise endoplazmik retikülünden Ca^{+2} salınımına neden olur. Salınan kalsiyum, endoplazmik retikülüne yakın olan mitokondri matriksine geçer ve mitokondriyal porların açılmasına neden olur. RIP kinazlar da ROS üretimini elektron transport zinciri yoluyla sağlarlar. Artan Ca^{+2} ve ROS sonucu por uzun süre açık kalır. Bunun sonucunda hücre oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretemez hale gelir ve nekroz gerçekleşir (69).

Akut Akciğer Hasarında Tedavi: ALI ve ARDS için yapılan tüm çalışmalara rağmen etkinliği kanıtlanmış direkt bir tedavi yöntemi bulunamamıştır. Tedavi için uygulanan

yöntemler, altta yatan risk faktörlerinin ortadan kaldırılmasına, semptomların düzeltilmesine ve destek tedavisi sağlanmasına yöneliktir. Tedavide etkinliği kanıtlanmış bir yöntem mevcut olmamasına rağmen geçen yıllar içerisinde ALI/ARDS mortalitesinde eskiye oranla azalma sağlanabilmiştir. Akciğer koruyucu ventilasyon stratejileri, küçük tidal volüm ve basınçlı ventilasyon uygulamaları mortalite oranlarında azalmayı sağlayan destek tedavilerinin başında gelmektedir. ALI/ARDS tedavilerini, yeterli gaz değişiminin sağlanmasına yönelik mekanik ventilasyon tedavileri ve non-ventilatör tedaviler olmak üzere iki gruba ayırmak mümkündür. Mekanik ventilasyon tedavisi, güvenli oksijenasyonu sağlamanın yanında artmış solunum ihtiyacı, artmış alveoler ölü boşluk ve solunum sisteminin azalmış kompliyansı nedeniyle artmış olan solunum sıkıntısının giderilmesinde etkili olmaktadır. Kalbe venöz dönüşün azalmasını sağlayan etkisiyle ödem oluşumunu da engellemektedir. Nonventilatör tedaviler ya da farmakolojik tedavilerden ALI/ARDS mortalitesini azaltan bir tedavi bugüne kadar gösterilememiştir. Bunun başlıca nedenleri arasında, ALI/ARDS için uygun bir deneysel model geliştirilememesi, ALI/ARDS'nin en önemli nedeni olan sepsisin akciğer harici diğer organları da etkileyen bir durum olması, Amerikan Avrupa konsensus kriterleriyle oluşturulan deney grubundaki hastaların eksüdatif ve fibrotik olarak heterojen grup oluşturmaları sayılabilmektedir (71,72).

2.1.4. Akut akciğer hasarı deneysel hayvan modelleri

ALI ve ARDS hastalarındaki incelemelerde, akciğer değişiklikleri hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Bu hastalar üzerindeki hasar mekanizmalarına yönelik araştırmalar, kritik durumdaki hastaların kontrol edilmesi zor olan birçok klinik değişkenleri barındırmaları nedeniyle başarılı olamamıştır. Bu nedenle ALI'yi başlatan veya ALI'den ARDS'ye geçişe neden olan faktörler ve bu faktörlere zemin hazırlayan fizyolojik ve inflamatuvar değişiklikler tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. İnsan araştırmalarındaki bu zorluklar nedeniyle, fizyopatolojiye yönelik araştırmalarda hayvan deneylerine ağırlık verilmiştir. Hayvan deneyleri ve oluşturulan hasar modelleri, hastalarla laboratuvar verileri arasındaki köprüyü oluşturmakta ve tedaviye yönelik fikirlere yol göstermektedir (73,74).

İdeal bir ALI/ARDS hayvan modeli, insanda görülen ALI/ARDS 'ın 3 önemli patolojik özelliği olan nötrofilik alveolit, hyalen membran birikimi ve mikrotrombüs

formasyonunun oluşturulduğu modeldir. Ancak bu özelliklerin hepsinin bir arada bulunduğu, insandaki patolojiyi tam olarak taklit eden ideal bir model yoktur (73). Bu faktörlerden birinin yokluğu bu modelin bir akut akciğer hasarı veya akut solunum sıkıntısı sendromu modeli olmadığı anlamına gelmez. Dolayısıyla, deneysel çalışmalarda hangi faktörlerin etkisini incelemek istiyorsak, o faktörlerin aktive olduğu modeli seçmek daha doğru olacaktır. Bu sebepten ALI ve ARDS'de farklı patolojik mekanizmaların incelenmesi için farklı deney modelleri kullanılmaktadır.

İdeal bir hayvan modelinde olması gereken parametreler:

- İnsandaki ALI'nin gaz değişim anormallikleri, akciğer kompliansında azalma, alveolo-kapiller membranda permeabilite artışı gibi bir veya daha fazla fizyolojik ve patolojik mekanizma ve sonuçlarını taklit edebilmeli
- İnsan akciğerinin hasara cevabı zaman içinde değiştiğinden dolayı deney süreci hayvan desteklenebiliyorsa uzatılabilir
- İnsan akciğeri ALI/ARDS için altta yatan sebepten (örneğin sepsis gibi) etkilendiği kadar tedavide kullanılan yöntemlerden de (mekanik ventilasyon gibi) etkilenebilmektedir. Hayvan modelinde de mümkünse bu durum sağlanabilmelidir.

Sayılan bu parametreler hayvan deneylerinde tam olarak yerine getirilemediğinden insanda gözlenen ALI/ARDS'yi tam olarak taklit eden bir hayvan deney modeli bulunmamaktadır (75).

Hayvanlarda, insan ALI/ARDS özelliklerini oluşturmaya yönelik çok sayıda farklı model stratejileri geliştirilmiştir (73,74):

Zararlı bir stimulusla akciğerin direkt olarak hasarlandığı modeller:

Akciğeri direkt olarak hasara uğratan modeller arasında; intratrakeal veya intranazal olarak bakteri veya lipopolisakarit gibi bakteriyel bir ürünün verilmesi; aspirasyon oluşturmak üzere hidroklorik asit (HCl) gibi bir asidin veya gastrik partiküllerin verilmesi, oksijenin yüksek inspirasyon fraksiyonunda verilmesi, %0,9 sodyum klorür (NaCl) ile seri lavajlar yapılarak sürfaktanın tüketilmesi, hilusun klampe edilerek iskemi/reperfüzyon oluşturulması veya yüksek tidal volümlerde

mekanik ventilasyon kullanarak mekanik germeye maruziyet sayılabilmektedir (73,75,76).

Akciğerin indirekt olarak hasarlandığı modeller:

Bu modeller çoğunlukla sepsis oluşturma temeline dayanır. Bunlardan bazılarına örnek olarak; çekal bağlama ve delme, intravenöz olarak bakteri veya lipopolisakkarit verilmesi ve mezenterik iskemi/reperfüzyon modelleri sayılabilir. Rodentisit bir ilaç olan ANTU'nun intraperitoneal olarak verilmesi ile oluşturulan akut akciğer hasarı da indirekt modele uygun bir yöntemdir. Oleik asit modeli de bu kategoriye girmektedir ve bu model multipl kemik kırıklı hastalarda kemik iliğinden oleik asit serbestleşmesini taklit etme temeline dayanmaktadır (77).

Kombinasyon modelleri:

İnsandaki ALI/ARDS'yedaha benzer bir model yaratmak için farklı hasar mekanizmaları kombine edilebilmektedir. Bunların içinde en sık yer alanlar; % 0.9 NaCl lavajını takiben mekanik ventilasyon veya çekal bağlama ve delme işlemini takiben hemoraji oluşturma gibi yaklaşımlardır (73,75,76).

Model seçimi:

Hayvan modellerinde ALI/ARDS'de gözlenen histopatolojik bulgular insana göre hafif bulgulardır. Bu nedenle ALI/ARDS hayvan modelini seçerken çalışma hipotezi ile test edilecek olan ALI/ARDS anahtar özelliğini dikkate almak ve o özellikleri sergileyebilecek bir model seçmek gerekmektedir. Örneğin, akciğerlere nötrofil akışı kontrol mekanizmaları araştırılıyorsa, lipopolisakkarit enjeksiyonu ile primer olarak alveoler nötrofili ile karakterize bir model seçilmelidir. Hayvan türü olarak ise çoğunlukla deney modellerinde avantajları olan fare modeli seçilmektedir. Genetik olarak farklı çok sayıda türlerinin olması mekanizma çalışmalarına imkan vermektedir, öte yandan küçük olmaları nedeniyle fizyolojik çalışmaların çok zor yapılabilmesi yada yapılamaması, insanlarda bulunan IL-8'in farelerde olmaması gibi bazı yönlerden farklılık göstermeleri dezavantajları sayılabilir. Domuz ve tavşan gibi

hayvanlar bu dezavantajları içermemelerine rağmen fareye göre deney maliyetini arttırmaları nedeniyle deney modeli olarak tercih edilmemektedir.

2.1.5. Akut akciğer hasarı deney modeli: α -Naftiltiyöüre (ANTU)

Alfa-naftiltiyöüre, rodendisit olarak geliştirilmiş, pulmoner ödem ve plevral efüzyon geliştirerek, pulmoner yetmezlikle ölüme neden olan kimyasal bir ajandır. Yapılan çalışmalarda, uygulanan dozuna ve zamana bağımlı olarak ALI geliştirdiği saptanmıştır. Bunun sonucunda deneysel ALI deney modeli olarak kullanılabileceği ortaya konulmuştur. Elektron ve ışık mikroskopisinde yapılan morfolojik çalışmalar, ANTU'nun akciğer hasar mekanizmasında hedef yapının kapiller endotel hücreleri olduğunu göstermiştir (17). Endotel hücre hasarı sonucu, endotel bariyer fonksiyonu ortadan kalkar, kapiller permeabilite artar ve buna bağlı olarak interstisyel ve alveoler ödem gelişimi olur. Standart deney modelinde sıçan veya fareye intraperitoneal olarak ANTU uygulaması yapıldığında, 4 saat içinde akciğer ödemi ve plevral efüzyon maksimum düzeye ulaşmaktadır (78,79). Bu hasarın şiddeti doza ve zamana bağlı değişmektedir. Oluşan ödem ise 24-48 saat içinde tamamen kaybolmakta ya da ilerleyip kemirgenin ölümüne neden olmaktadır (16).

ANTU'nun etki mekanizması kesin olarak bilinmemektedir, ANTU'ya bağlı akciğer ödemi, pulmoner vasküler yatak ve hava yolukaynaklı bir kısım vazoaaktif maddeler aracılığıyla olabileceği gibi ANTU'nun doğrudan hasarı sonrası bu vazoaaktif maddelerin ortaya çıkabileceği şeklinde de olabilmektedir. Deney modelinde, işaretli ANTU verilerek yapılan çalışmalarda, işaretli ANTU'nun akciğer ve karaciğerde makromoleküllere bağlandığı ve bu toksik yapıların desülfürasyonu sonucu reaktif moleküllerinin oluştuğu gözlenmiştir. ANTU'nun kısmen de karaciğer ve akciğerdeki mikrozomlarda sitokom P450 monoksijenaz ile metabolize edilmesiyle kovalent bağlanmaya ve toksik etkiye neden olabilecek ara moleküller oluşturabildiği ifade edilmektedir (80,81,82).

ANTU aracılı akut akciğer hasarında L-arginin/NO yolağının rol oynadığı, iNOS ekspresyonunun akciğer dokusunda artış gösterdiği son yıllarda yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, NOS inhibitörü, N^G-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) uygulamasının akciğer ödem gelişimini inhibe ettiği saptanmıştır. Bu bulgular NO'nun ANTU aracılı gelişen akciğer hasarında sitotoksik bir molekül olarak hareket ettiğini göstermektedir (17). Endotelin peptidlerin de ANTU aracılı akciğer

hasarında rol oynadıkları benzer şekilde ortaya konmuştur (83). ANTU uygulanan sıçan akciğerlerinde anjiotensin dönüştürücü enzim aktivitesiyle birlikte anjiotensin I'in anjiotensin II'ye dönüşümünün azaldığı saptanmıştır (84,85). ANTU aracılı patolojide araşidonik asit metabolitlerinin de rol oynadığı bildirilmektedir (81,85). ANTU toksisitesinde reaktif oksijen radikallerinin rol oynadığı, ANTU aracılı gelişen oksidatif stresin düşük dansiteli lipoprotein (DDL) oksidasyonuna neden olduğu ve okside DDL'nin akciğer dokusunda biriktiği gösterilmiştir (86).

Anestezik maddelerle yapılan çalışmalarda pek çok anestezik maddenin, anestezik özelliklerinin yanında, vasküler endotel ve düz kas fonksiyonlarını etkileyerek akciğer inflamatuvar cevaplarını modüle ettiği görülmüştür. Örneğin, morfin santral analjezik etkisinin yanı sıra, periferik alanda doku hasarı ve inflamasyon üzerine de etki etmektedir ve diğer bazı ödem modellerinde olduğu gibi, ANTU aracılı akciğer ödeminde de koruyucu etki göstermektedir (87). Morfin gibi, üretan, tiopental ve pentobarbitalin de ANTU aracılı akut akciğer hasarında koruyucu etki yaptığı saptanmıştır (78). Anestezik maddeler bu etkilerini kısmen NO oluşumunu inhibe ederek göstermektedir, yapılan çalışmalarda morfinin iNOS'u inhibe ettiği de gözlenmiştir (87).

2.2. Benzodiazepinler

1,4-Benzodiazepin türevleridir; molekül yapısında heterosiklik halka içinde azot atomları 1 ve 4 numaralı yerlerde bulunur. Benzodiazepinler günümüzde dünyada en fazla kullanılan ilaç gruplarından biridir. Ancak 1986'dan itibaren Türkiye'de kontrollerinin artması nedeniyle kullanımları önemli ölçüde azalmıştır. Benzodiazepinler barbitüratlara benzer şekilde anestezi oluşturabilmelerine rağmen anestezi oluşturan dozlarının uzun süreli sedasyon ve amnezi yapabilmesi nedeniyle, genel anestezi yerine genellikle sedasyon oluşturmak üzere kullanılırlar. Benzodiazepinlerin terapötik indeksleri yüksektir yani terapötik dozları ile ciddi yan etki oluşturan dozları arasındaki aralık geniştir. Bu nedenle yüksek dozda tek başına alındığında ölüme neden olmaları nadir görülen bir durumdur. Karaciğerde oksidatif enzimleri pek indüklemeyiz ve diğer ilaçlarla bu bakımdan etkileşme olasılıkları barbitüratlar ve diğer bazı hipnosedatiflere göre düşüktür. Anksiyolitik etkilerini belirgin bir sedasyonla birlikte olmaksızın yaparlar ve üyelerinin çoğunun psikik bağımlılık oluşturma potansiyelleri barbitüratlarınkine kıyasla daha düşüktür. Bu gibi

üstünlükleri nedeniyle hipnotik, sedatif ve anksiyolitik ilaçlar olarak 1960 yılında ilk kez pazarlanmalarından itibaren giderek, barbitüratların ve diğer hipnosedatif ilaçların yerini almışlardır. Benzodiazepinler arasında kullanılış yerine ilişkin farklar, farmakokinetik özellikleri arasındaki farktan ileri gelir. Etki sürelerine göre sınıflandıracak olursak üç gruba ayrılırlar:

- 1. Uzun etki süreli benzodiazepinler:** Diazepam, klordiazepoksid, klorazepat, prazepam, medazepam, flurazepam ve nitrazepamdır. İçlerinde en fazla kullanılan diazepam olmakla birlikte flurazepam ve nitrazepam hipnotik olarak, diğerleri ise anksiyolitik olarak kullanılır. Uzun etki süreli benzodiazepinler genellikle karaciğerde aktif metabolitlere dönüşürler.
- 2. Orta etki süreli benzodiazepinler:** Oksazepam, alprazolam, lorazepam, temazepam ve loprazolamdır. Oksazepam ve alprazolam anksiyolitik olarak diğerleri ise hipnotik olarak kullanılırlar. Flunitrazepam yan tesirleri nedeniyle artık kullanılmamaktadır.
- 3. Kısa etki süreli benzodiazepinler:** Midazolam ve triazolamdır. Hipnotik olarak veya preanestezik medikasyon için kullanılırlar. Midazolam genel anestezi indüksiyonu yapmak için de kullanılabilir. Etkilerinin kısa sürmesi esas olarak belirgin derecede redistribüsyon göstermelerine ve birazda eliminasyon yarılanma ömürlerinin kısa oluşuna bağlıdır.

Santral benzodiazepin reseptörlerine bağlanarak etkinlik gösteren maddelerin farmakolojik etkilerinin niteliğine göre üç türü ayırt edilir:

- 1. BZ reseptör agonistleri;** anksiyolitik ve hipnotik etki yapan benzodiazepinler ve zopiklon bu gruba örnek verilebilir.
- 2. Ters (inverse) agonistler;** benzodiazepin reseptörünü aktive ederler, fakat benzodiazepinlere zıt yönde agonist etki (konvülsan, prokonvülsan ve anksiyojenik etki gibi) oluştururlar. Bu agonistlerin yaptığı reseptör aktivasyonunun GABA'nın klorür kanallarını açmasını engellediği sanılmaktadır. Benzodiazepin reseptörünün endojen agonist ligandının bu gruptan bir madde olabileceğine inanılmaktadır. Ters agonistlerin örnekleri

konvülsan etki yapan bazı β -karbolin-3-karboksilat esterleri, diğer bir β -karbolin türevi olan FG7142 ve bir benzodiazepin türevi olan Ro 15-3503'tür.

- 3. BZ reseptör antagonistleri;** Bunlar agonistlerin etkisini antagonize eden maddelerdir. Gerek agonistlerin gerekse ters agonistlerin etkisini ortadan kaldırırlar. En fazla incelenen örneği, flumazenil'dir.

2.2.1. Benzodiazepinlerin etki mekanizmaları

Klinikte kullanılan bütün benzodiazepinler, ana inhibitör nörotransmitter olan GABA'nın GABA_A reseptör alt tipine bağlanmasını artırır. Bu reseptörler çok alt birimli, ligantla açılan klor kanallarıdır ve bu kanallar yardımıyla GABA bağımlı iyonik iletiyi güçlendirirler.

GABA postsinaptik nöron membranında kendine özgü reseptörleri (GABA_A reseptörleri) aktive ederek, bu reseptörlere kenetlenmiş klorür kanalının açılmasına (nöronda hiperpolarizasyona) neden olur. Böylece GABA, nöronlarda postsinaptik ve duruma göre presinaptik inhibisyon yapar.

GABA_A reseptörü, ortasında bir anyon (Cl⁻) kanalı bulunan oligomerik bir yapıdadır. Beyindeki GABA_A reseptörlerinde bulunan başlıca alt birimler alfa, beta, gama, delta ve epsilon alt birimleridir; ayrıca pi ve teta türleri de bulunur. Benzodiazepinler, GABA_A reseptörü üzerinde kendilerine özgü BZ bağlanma yerlerine (veya BZ reseptörlerine) bağlanarak farmakolojik etkilerini oluştururlar. Ancak GABA_A reseptörleri üzerinde direkt etkinlik göstermezler, GABA'ya sinir uçlarından salıverilen GABA ile ilişkili ve ona bağımlı olarak etki oluştururlar. BZ bağlanma yerleri GABA_A reseptör pentamerinin alfa ve gama alt-birimlerinin bitişme yerleri üzerindedir. Bu nedenle BZ reseptörleri GABA_A reseptörlerinin hepsi üzerinde değil, sadece alfa ve gama alt-birimine sahip olanlar üzerinde bulunur. Nöronlar üzerinde benzodiazepinlerin etkinlik gösterebilmeleri için ortamda GABA bulunması gerekir ve ortamdaki GABA düzeyinin artması benzodiazepinlerin etkinliğini de artırır. Benzodiazepinlerin GABA salıverilmesini artırmadıkları, GABA uptake'ini etkilemedikleri veya GABA metabolizmasında başka türlü bir değişiklik yapmadıkları biyokimyasal incelemelerle saptanmıştır. Benzodiazepin moleküllerinin BZ reseptörlerine bağlanması allosterik bir değişiklik yaparak GABA reseptörlerinin GABA'ya afinitesini ve GABA moleküllerinin kendi reseptörlerine bağlanmasını artırır. Böylece ortamda benzodiazepinlerin olmadığı durumdakinden daha az sayıda

GABA molekülü klorür kanalını aynı derecede açar. Başka bir deyişle benzodiazepinler GABA'nın gravimetrik etki gücünü artırır (10).

2.2.2. Benzodiazepinlerin solunum sistemi üzerine etkileri

Normal olgularda benzodiazepinler hipnotik mutad dozlarında solunum sistemini etkilemezler fakat pediatrik tedavide ve alkolizm gibi karaciğer fonksiyon bozukluğu olan kişilerde dikkatli kullanılması gerekir. Preanestezik olarak ya da endoskopi uygulamasında daha yüksek dozlarda kullanımlarında, alveoler ventilasyonu hafifçe baskılar ve hipoksik durumun azalmasından dolayı respiratuvar asidoza neden olabilir. KOAH'lı hastalarda bu etkiler daha da artar ve alveoler hipoksi ile CO₂ narkozu gelişebilir. Anestezi sırasında veya opioidlerle birlikte kullanımında apneye neden olabilirler. Etanol veya santral sinir sistemini baskılayan bir ilaç ile birlikte alındıklarında hastada şiddetli entoksikasyon gelişebilir ve solunum desteği gerekebilir. Benzodiazepinler hipnotik dozda üst solunum yolu kaslarının kontrolünü ters etkileyerek veya CO₂'ye olan ventilatör yanıtı azaltarak uykuya bağlı solunum bozukluklarını daha da kötüleştirebilirler. Ciddi KOAH'lı hastaların bazılarında geç etki olarak hipoventilasyon ve hipoksemiye neden olabilirler fakat bazı durumlarda uyku ve uyku kalitesini düzeltebilirler. Hipnotik dozlarda obstrüktif uyku apneli hastalarda üst solunum yollarındaki kas tonusunu azaltabilir ve apneli epizodların, alveolar hipoksi, pulmoner hipertansiyon ve kardiyak ventriküler yük üzerindeki etkisini tetikleyebilir (10).

Beyin sapındaki GABA_A reseptörleri, akciğerdeki kolinerjik iletimi modüle etmektedir. Hem GABA_A kanalları hem de GABA_B reseptörleri, akciğer post gangliyonik parasempatik sinirlerin presinaptik yüzeylerinde farmakolojik olarak tanımlanmışlardır ve kolinerjik sinir aktivitesini inhibe etmektedirler (9).

2.2.3. Periferik benzodiazepin reseptörleri

Araştırmacılar anksiyete, konvülsiyon ve uykusuzluk tedavisinde kullanılan benzodiazepinler için, periferik dokular üzerinde bağlanma alanları bulma çalışmaları yapmışlar ve 1977 yılında periferik tip benzodiazepin reseptörünü tanımlamışlardır (88). İlk olarak böbrek dokusunda diazepam-bağlanma alanı olarak keşfedilmiş ve beyin dışındaki yerleşimi nedeniyle, santral benzodiazepin reseptörlerinden ayırmak

için ‘periferik tip’ benzodiazepin reseptörü olarak tanımlanmıştır. Memeli dokularında santral-tip ve periferik tip benzodiazepin reseptörleri tanımlanmıştır. Santral reseptörler nöronlarda lokalizedirler, klorür kanalları ve GABA_A reseptörleri ile kenetlenmişlerdir, PBR ise çok daha fazla bir yaygınlık göstermektedir. PBR esas olarak mitokondri dış membranında lokalize olmaktadır ve steroid sentezleyen hücrelerde bol miktarda bulunmaktadır. PBR’lerin farmakolojik ve yapısal olarak santral benzodiazepin reseptörlerinden farklı oldukları rapor edilmiştir. PBR ismi yaygın olarak kabul görmüş olmakla birlikte, bu proteini ifade etmek için ‘mitokondriyal benzodiazepin reseptörü’, ‘mitokondriyal diazepam-bağlanmasını inhibe eden reseptör kompleksi (diazepam-binding inhibitor receptor complex-DBI)’ ve ‘PK11195-bağlanma alanları’ gibi farklı isimler de kullanılmıştır. Bununla birlikte, diğer proteinler veya ligandlarla olan etkileşimlerinden bağımsız olarak, PBR, 2006’da HUGO Gen Adlandırma Kurulu tarafından, protein veya ligand taşıma / translokasyondaki varsayılan işlevini yansıtan 18 kDa Translokator Protein (TSPO) olarak yeniden adlandırılmıştır (89). Daha sonra yapılan çalışmalarda, PBR’lerin hem beyin hem de periferik dokularda bulundukları gösterilmiştir. Bu reseptörler, santral sinir sisteminde temel olarak glia hücrelerinin mitokondrilerinde ve periferde steroid hormon sentez eden (adrenal korteks ve gonadlardaki gibi) endokrin hücrelerin mitokondrilerinde bulunurlar. Steroid hormon sentezinin ilk maddesi olan kolesterolün hücre içine transferine aracılık eder ve steroid sentezini düzenlerler (11).

PBR’lere ilk olarak böbrek dokusunda rastlanmıştır (12). Periferik benzodiazepin reseptörlerinin varlığı kalp, akciğer, hipofiz, karaciğer, trombositler, mast hücreleri, makrofaj, dalak, timus, barsak, lenf nodu ve testis dokularında da gösterilmiştir. Tüm bu dokulardaki reseptörlerin fonksiyonları henüz aydınlatılamamıştır (13).

Benzodiazepinler, SSS’deki GABA_A reseptörlerinden başka, periferik dokulardaki farklı bölgelere de bağlanırlar. PBR ligandı 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N(1-methylpropyl)-3-isoquinoline carboxamide (PK11195, antagonist) ve 7-chloro-5-(4-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2-H-1,4-benzodiazepin-2-1 (Ro 5-4864, agonist) çok sayıda hücresel fonksiyonu etkilemektedir. Benzodiazepinlerin bu reseptörlere bağlanma özellikleri değişiklik göstermektedir. Klonazepam ve flumazenil santral benzodiazepin reseptörleri için spesifik ligand olarak etki ederken, flunitrazepam, diazepam ve midazolam mikst etki etmekte (hem santral hem de periferik reseptörleri etkilemektedirler), Ro5-4864 ve PK11195 ise PBR’lere yüksek

afinite ile bağlanmaktadır. Bu durumda, benzodiazepin reseptör ligandlarını santral (klonazepam, flumazenil), mikst (flunitrazepam, diazepam, midazolam) ve periferik etkili (4'kloradiazepam, PK 11195) olarak sınıflayabiliriz (13). PBR'lerin rol oynadığı en belirgin fonksiyon steroid sentezidir. Yapılan çalışmalar PBR'lerin immün sistem fonksiyonlarının regülasyonunda da rol oynadığını göstermektedir. Bu reseptörler, monosit, nötrofil, NK hücresi, lenfosit CD4 ve CD8 hücreleri, trombosit ve eritrositlerde tanımlanmışlardır. Dolayısıyla, bu reseptör ligandlarının kemotaksis ve lenfoid hücre proliferasyonu gibi monosit fonksiyonlarının modülasyonunda da etkili oldukları düşünülmektedir (90).

Ro5-4864 ile yapılan çalışmalarda bu bileşiğin insan periferik kan mononükleer hücrelerinde IL-2 üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (91). Ro5-4864'ün fareler üzerinde yapılan deneylerde, makrofajlardan reaktif oksijen ürünleri, IL-1, TNF- α ve IL-6 gibi inflamatuvar mediyatörlerin üretimini anlamlı oranda azalttığı saptanmıştır (92). Torres ve arkadaşları, PBR agonistlerinin anti-inflamatuvar etkileri olduğunu ve karagenin ile oluşturulan pençe ödeminde koruyucu etki gösterdiğini bulmuşlardır (93).

Periferik benzodiazepin reseptörleri stres cevabının düzenlenmesinde de önemlidir ve panik bozukluğu, travma sonrası stres bozukluğu ve yaygın anksiyete bozukluğu gibi duygu durum bozukluklarında düzeylerinin azalmış olduğu gösterilmiştir. Johnson ve arkadaşlarının sosyal anksiyete bozukluğu olan 53 hasta üzerinde yaptığı bir çalışmada, periferik benzodiazepin reseptör sayısının hasta grubunda sağlıklı kontrollere göre anlamlı ölçüde düşük olduğu saptanmıştır (94).

2.2.4. Periferik benzodiazepin reseptörlerinin patolojik durumlardaki rolü

Periferik benzodiazepin reseptörlerinin; iskemi reperfüzyon hasarı (95,96), beyin hasarı (97,98), epilepsinin belirli formları (96,97,98), nörodejeneratif bozukluklar, Alzheimer (96,98) ve Parkinson (98) hastalığı ve periferik nöropati (99) gibi değişik patolojik durumlarda rolleri olduğu gösterilmiştir. (Tablo 7).

Tablo 7. Normal ve Patolojik Şartlarda Olası PBR Fonksiyonları

Fonksiyon	Deneyisel Veriler	Referanslar
Steroid biyosentezi	En yaygın çalışılan fonksiyon: PBR çok yüksek afiniteli kolesterol bağlayıcı bir proteindir; PBR ligandı mitokondri içine kolesterol naklini sağlar.	(98,100,101,102)
Protein nakli	PBR, proteinlerin mitokondri içine naklinde görev almaktadır.	(103,104)
Porfirin nakli ve hem biyosentezi	Hem biyosentezi yolu kısmen, porfirine bağlanan PBR tarafından düzenlenir.	(105,106)
İyon Nakli	Yüksek benzeşimli PBR ligandları Ca^{+2} 'nin gastrik mukozaya mitokondriyal salınımını sağlamaktadır.	(107)
Hücre Proliferasyon ve farklılaşma	Gözlemlerin çoğu kanser hücreleri üzerinde yapılmıştır; PBR'nin rolü hücrelerin orijinine dayanıyor olabilir.	(108)
Bağışıklık düzenlemesi (immünomodülasyon)	PBR sitokinlerin ve immünokompetan hücrelerce immünoglobülin salgılanmasından sorumludur.	(97,109)
Hücre solunumun oksidatif işlemler ile ilişkisi	PBR erken embriyonun gelişimsel stres cevap yollarının potansiyel mediyatörü olarak önemli olabilir.	(110,111)
Mitokondriyal metabolizma ve fonksiyonların düzenlenmesi	PBR solunum durumlarının modülasyonunda ve Ca^{+2} akışının düzenlenmesinde görev alır.	(97,100,107,110)
Apoptoz	In vitro veriler, apoptozda PBR ve ligandlarının rolüne işaret eder.	(112)
Patolojik fonksiyon	Yorum	
İskemi –reperfüzyon hasarı	PBR'nin hayvan tipi iskemik – reperfüzyon hasarı modellerinde rolü	(95,113)
Beyin hasarı	PBR ligandları, in vivo CNS hasarı sonrası proliferasyon, kültür astrositlerinin mitotik oranını düşürmektedir.	(97,98)
Epilepsi	Bazı PBR ligandları hayvan modellerinde epilepsiyi azaltmaktadır.	(98,114)
Nörodejeneratif Hastalıklar	Alzheimer hastalarında mikrogial proliferasyonla karakterize olarak daha yüksek olan PBR seviyeleri, Parkinson hastalarında daha düşüktür.	(97,98)
Periferik Nöropati	PBR seviyeleri siyatik sinir rejenerasyonunda daha yüksektir; PBR ligandları periferik sinir dejenerasyonunu önlemektedir.	(99)
Psikiyatrik bozukluklar	PBR stres kaynaklı psikiyatrik hastalıklarda etkindir.	(96,97,98)
Kanser	PBR hücre büyümesinde etkindir; Aşırı PBR üretimi bazı tip kanser türlerinin ilerlemesi ile korelasyon göstermektedir.	(97,108,115,116,117)
Görüntüleme	PBR CNS nöropatolojisinin iyi bir göstergesidir.	(118,119)

Ancak, PBR'nin insan hastalıkları üzerindeki rollerine ilişkin araştırma çalışmalarının çoğu iki terapötik alan üzerinde yoğunlaşmıştır: Onkoloji ve Psikiyatri (120).

2.2.4.1 Psikiyatrik rahatsızlıklar

Ex vivo deneyler, organizmaların kompleks hücresel mekanizmalarını tümüyle yansıtmada, epilepsili farelerden elde edilen kültürdeki astrositler üzerinde yapılan çalışmalar, PBR'nin majör stresin düzenleyici mekanizmalarında rol aldıklarını ortaya çıkarmıştır (96). Ayrıca, PBR ligandları yeni sentezlenen nörosteroidler aracılığıyla anti-anksiyete etkisi gösterebilirler. PBR ligandlarının bağlanması nedeniyle, mitokondri içine kolesterol geçiş ve glial hücreler aracılığıyla steroid sentezinin gerçekleşmesi, hayvan anksiyete deneylerinde gösterildiği üzere, GABA_A reseptörünün fonksiyonlarını olumlu olarak değiştiren ve anksiyolitik etkilere sahip allo-pregnanolon ve pregnanolon gibi pregnan nörosteroidlerinin oluşumuna neden olmaktadır (98). PBR ligandlarının, stres kaynaklı CNS fonksiyon dengesizliklerinden doğan psikiyatrik bozuklukları önleyebildiği düşünülmektedir.

Anksiyete ve post travmatik stres bozukluğu olan hastaların trombositlerinde daha düşük seviyede (diazepam tedavisi sonrasında seviyede yükselme görülmüştür) PBR bağlanması gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, savaş sırasında veya tekrarlanan stres egzersizleri uygulanan askerlerde düşük PBR yoğunluğu gözlenmiştir. İntihara meyilli ergenlerde de düşük PBR bağlanımı tespit edilmiştir, ancak PBR değişikliklerinin majör depresyon ve obsesif-kompulsif bozukluğu bulunanlarda etkili olmadığı görülmüştür (97).

Diazepam bağlayan inhibitörün (DBI) şizofreni semptomlarını hafiflettiği ileri sürülmüştür (121). Normal kontroldeki ve tedavi edilmeyen hastalara göre nöroleptiklerle tedavi edilen şizofreni hastalarında, başlangıçta düşük PBR yoğunluğu tespit edilmiştir (97). Sonraki çalışmalar, trombosit hücrelerindeki PBR yoğunluğu ve şizofreni hastalarında agresif davranış ve kaygı skorları arasında önemli derecede negatif korelasyon tespit etmiştir (112).

2.2.4.2 Kanser

PBR ligandları, in vitro hücre siklusu blokajını ve insan kalın bağırsak kanser hücre dizilerinde apoptozu uyarmaktadır (103,122). İnsan kolon kanser dokularında, normal insan kolon dokularına oranla PBR sayısının arttığı gözlenmiştir (97). Yakın zamandaki çalışmalar, III. safha bağırsak kanserinde PBR'nin fazla üretilmesinin, kötü bir netice ve kısalmış bir yaşam süresi ile korele olan bağımsız bir prognostik faktör

olduğunu ortaya koymuştur (115). Ayrıca, PBR üretimindeki artış ile göğüs, bağırsak ve prostat kanserlerinin ilerlemesi arasında da korelasyon bulunduğu görülmüştür (108,123). Ancak, hücre profilerasyonunda PBR'nin rolünü belirlerken, dokunun başlangıç durumu gibi faktörlerin de önemli olabileceği belirtilmelidir (124). Bu gözlemler, PBR'nin antikanser tedavilerinin geliştirilmesinde ilginç bir hedef olabileceğini göstermektedir.

PBR ekspresyonu, nükleer lokalizasyonu, kolesterol transportundaki rolü ve agresif fenotipli göğüs kanser hücrelerinin proliferasyonu arasındaki ilişkiler rapor edilmiştir (125). PBR'lerin antisense tekniklerle azaltılmasının, in vitro ve in vivo koşullarda Leydig tümör hücrelerinin tümörojenitelerinde artışla sonuçlanması, PBR ekspresyonu ya da fonksiyonlarındaki bozuklukların, tümör progresyonu esnasındaki apoptoz gibi hücresel değişikliklerde rolü olduğuna dair öne sürülen hipotezleri desteklemektedir (116). Kanser hücrelerinin artan metabolik gereksinimleri, kısmen proliferasyon artışına, PBR aracılı mitokondriyal lipid metabolizmasına ve respiratuvar denge değişikliklerine bağlıdır (126).

İmmünohistokimya boyama teknikleri ile PBR seviyelerinin normal dokudaki ve çoklu kanser tiplerindeki tümörlerde dağılımının incelendiği çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar, sağlıklı meme dokularıyla karşılaştırıldığında, fibroadenomlar, primer ve metastatik adenokarsinomlarda, tümörün invazyon ve metastaz özelliklerine paralel olarak PBR seviyelerinde progresif bir artış olduğu görülmüştür. Kolorektal ve prostat karsinomlarında da PBR düzeyleri tümör hücrelerinde sağlıklı hücrelere göre daha yüksek bulunmuştur. Buna karşılık, normal adrenal kortikal hücrelerde ve hepatositlerde PBR seviyesi yüksekken, adrenokortikal tümörlerde ve hepatomada PBR seviyelerinde azalma görülmüştür. Kötü huylu cilt tümörlerinde de normal cilde göre PBR seviyeleri azalmıştır. Bu sonuçlar, yüksek PBR ekspresyonunun agresif tümörlerin ortak bir özelliği olmadığını ortaya koymaktadır. PBR aşırı ekspresyonunun meme, kolorektal ve prostat kanserlerinde agresif bir fenotipin yeni bir prognostik göstergesi olarak değerlendirilebileceği bu çalışmayla anlaşılmaktadır. (127).

Özefagus kanseri dünyadaki en yaygın altıncı kanser türüdür ve son kanıtlar insidansının arttığını göstermiştir. PBR lokalizasyonu özefagus tümör dokularında yoğunlaşmıştır. Yapılan çalışmalar PBR'nin özofagial tümörlerin patogenezinde ve muhtemelen kanserojen anjiyogeneizde rol oynadığını göstermektedir. (128).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Akut Akciğer Hasarı Deney Modelinin Oluşturulması

Deneyler, 200-240gram (g) ağırlığında, her iki cinsiyetten Wistar albino sıçanlarda gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar, Bülent Ecevit Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden alınmıştır. Hayvanlar 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortam düzeninde, standart laboratuvar koşullarında yetiştirilmiştir. Çalışma etik kurallara uygun olarak gerçekleştirilmiştir. (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (US National Institute of Health, revised 1985). Hayvanlar üzerinde yapılan uygulamalar ve protokoller için, "Bülent Ecevit Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan" onay alınmıştır (Ek 8.1.). Her grupta 10 hayvan çalışılmıştır. Deney süresince, hayvanlar ayrı kafeslerde, oda ısısında (22°C) tutulmuştur.

3.1.1. ANTU modeli

ANTU, 4 miligram/mililitre (mg/ml) olacak şekilde zeytinyağında süspansiyon halinde hazırlandıktan sonra sıçanlara, 10 mg/kilogram (kg) dozda intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanmıştır. Çözücü kontrolü olarak hayvanlara zeytinyağı intraperitoneal olarak uygulanmış ve akciğer dokusu üzerine etkisi olup olmadığı incelenmiştir. ANTU i.p. olarak 10 mg/kg dozunda uygulandıktan sonra, 4 saat içinde maksimum düzeye ulaşan akut akciğer hasarı oluşmaktadır ve bu hasarda, plevral efüzyon (PE) oluşumu, akciğer ağırlığı/vücut ağırlığı (AA/VA) ve plevral efüzyon/vücut ağırlığı (PE/VA) oranlarında artma saptanmaktadır.

4 saat sonra tiopental sodyum anestezisi (50 mg/kg) altında abdomen açılmış, abdominal aortadan kan örneği alınmıştır. Göğüs kafesi dikkatlice açılmış ve ANTU grubundan plevral aralıkta birikmiş olan efüzyon sıvısı enjektörle çekilmiş ve miktarı mililitre olarak ölçülmüştür. Bu esnada çevre dokulardan kanama olmamasına ve efüzyon sıvısına kan karışmamasına özen gösterilmiştir. Efüzyon ve serum örnekleri inceleme yapılincaya kadar -80°C'de saklanmıştır. Akciğer çıkarıldıktan sonra, çevre dokulardan temizlenmiş ve hassas terazide tartılmıştır. Akciğerin sol lobu histopatolojik inceleme için formaldehit içinde muhafaza edilmiştir. Akciğer sağ lobu ise soğuk serum fizyolojik ile yıkandıktan hemen sonra, apoptoz/nekroz çalışması için taze doku şeklinde kullanılmıştır. Hayvanlar arası standardizasyonu sağlayabilmek

amacıyla, akciğer ağırlığı ve plevral efüzyon miktarı vücut ağırlığına oranlanarak incelenmiştir. Efüzyon sıvısının miktarı (PE, ml), akciğer ağırlığı/vücut ağırlığı (AA/VA) ve plevral efüzyon/vücut ağırlığı (PE/VA) oranları hesaplanmış ve akut akciğer hasarı göstergeleri olarak değerlendirilmiştir.

3.2. Deney Protokolü

Hayvanlar 4 gruba ayrılmıştır (Tablo 8). Her grupta 10 hayvan incelenmiştir. Sıçanlara; ANTU 10 mg/kg dozunda intraperitoneal (i.p.) olarak verilmiştir. ANTU uygulamasından 4 saat sonra akut akciğer hasarı gelişimi incelenmiştir. Selektif periferik benzodiazepin reseptör agonisti Ro 5-4864 sıçanlara, ANTU'dan 30 dakika önce 2 ve 4 mg/kg i.p. olarak uygulanmış ve akut akciğer hasarı üzerine olan olası koruyucu etkisi incelenmiştir.

Tablo 8. Deney Grupları

Çalışma Grupları		
Gruplar	Kimyasallar	Uygulama Yolu
1	Kontrol	
2	ANTU (10 mg/kg)	i.p.
3	ANTU+ Ro 5-4864 (2 mg/kg) ^a	i.p./i.p.
4	ANTU + Ro 5-4864 (4 mg/kg) ^a	i.p./i.p.

^aTüm uygulamalar ANTU'dan 30 dakika önce yapılmıştır.

Histopatolojik inceleme için, akciğerler %10 formaldehit içinde 2-3 gün bırakılarak fikse edilmiştir. 10 µm'lik kesitler halinde, hematoxilen-eozin boyası ile boyanmıştır. Boyanmış olan kesitler, ışık mikroskopunda incelenmiştir. Akciğer dokusu histopatolojik incelemesinde, intraalveoler ödem, perialveoler hemoraji ve interstisyel inflamatuvar hücre reaksiyonu açısından değerlendirilmiş ve skorlanmıştır. Skorlama 0-3 arasında yapılmıştır. Ayrıca skorlama haricinde akciğer dokusundaki histomorfolojik değişiklikler belirlenmiştir.

ANTU grubunda akciğer dokusunda iNOS, TNF-alfa, periferik benzodiazepin reseptörü, kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama çalışması yapılmıştır. Serum numunelerinde ise, IL-1 alfa, IFN-gama ve MCP-1 düzeyleri ELISA metoduyla

ölçülmüştür. Akciğer dokusunda Annexin V/propidium iodide boyaması ile apoptoz değerlendirilmesi yapılmıştır.

3.2.1. İmmünohistokimyasal boyama metodu

ANTU grubunda akciğer dokusunda iNOS, TNF-alfa, periferik benzodiazepin reseptörü, kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama çalışması yapılmıştır. İmmünohistokimyasal çalışma, formalin fiske parafin gömülü dokularda streptavidin-biotin tekniği kullanılarak uygulanmıştır. 4 mikron kalınlığındaki kesitler deparafinize edildikten sonra etanol ve ksilen ile dehidrate edilmiştir. Otuz dakika % 0.3 hidrojen peroksit içeren metanol ile endojen peroksidaz aktivitesi bloke edilmiştir. iNOS ve kaspaz 3 için 10mM pH 6.0 sitrat buffer, periferik tip benzodiazepin reseptörü için pepsin ve TNF alfa için sodyum sitrat buffer ön aşamaları uygulandıktan sonra PBS ile 10 dakika nonimmünize edilen kesitler primer antikorlarla inkübe edilmiştir. Primer antikor olarak; anti-Nitric oxide synthase, inducible (anti-iNOS) (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA 1:200 dilüsyon, anti-Caspase 3 (CCP32) (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA 1:200 dilüsyon, anti-Peripheral-type Benzodiazepine Receptor (BioVision Incorporated, Milpitas, CA, USA 1:200 dilüsyon ve Anti-TNF alpha antibody (ab66579) (abcam Incorporated, Cambridge, UK) 1:2000 dilüsyonda kullanılmıştır. Ultravision Large Volume Detection System (Thermo Scientific Lab Vision Corporation Fremont, CA, USA) kiti ile inkübe edilmiştir. Kromojen olarak diaminobenzidine tetrahydrochloride kullanılmıştır. Mayer's hematoksilen ile karşıt boyama yapılmıştır. Kaspaz 3, TNF-alfa ve periferik benzodiazepin reseptör için tonsil dokusu; iNOS için akciğer dokusu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.2. Histopatolojik inceleme metodu

Histolojik inceleme için doku örnekleri eksizyondan hemen sonra %10 luk formalinde fiske edilmiştir. Değişik derecelerdeki etanol ile dehidrate edilip ksilen ile berraklaştırılmış ve parafine gömülmüştür. Parafin bloklardan 3-5 mikron kalınlığında kesilen dokular hematoksilen eosin ile boyanmıştır. Histolojik incelemeye alınan tüm akciğer lobları ışık mikroskobu ile bir patolog tarafından incelenmiştir. Her bir doku örneğindeki patolojik değişiklikler intraalveolar hemoraji, intraalveolar ödem ve inflamasyon açısından değerlendirilmiştir. Alveolar ödem ve intraalveolar hemoraji 0-

3 arasında skorlanmıştır. Alanların %5'inden azında patolojik değişim 0, % 10'un altında 1, %15-20 değişim 2 ve %20-25 patolojik değişim 3 olarak yorumlanmıştır (129). Alveolar inflamasyonun şiddeti lökosit infiltrasyonunun şiddetiyle belirlenmiştir. 10 büyük büyütme alanındaki (BBA) lökosit sayısına göre ekstrasvasküler lökosit yokken 0 olan değerlendirme, 10 lökositin altında 1; 10-45 lökositte 2; 45 lökositten fazlası ise 3 olarak skorlanmıştır (130).

3.2.3. Serumda sitokin tayini

Kan örnekleri abdominal aortadan alınmıştır. Serum örnekleri santrifüj ile ayrılmış ve ölçüm yapılacak zamana kadar -80 °C'de bekletilmiştir. Sıçan serumunda IL-1 α , TNF- α , IFN- γ ve MCP-1 düzeylerinin ölçümü, floresan boncuk immünoassay yöntemi ve FlowCytomix Multiple Analyte Detection Rat Cytokine 6plex kiti (eBioscience Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler kitin kullanma kılavuzu esas alınarak yapılmıştır. Bir başka anlatımla; farklı sitokin ve kemokine spesifik monoklonal antikorlarla kaplanmış floresan boncuklarla, sitokin ve kemokine spesifik biotinle konjuge monoklonal antikorlar birlikte serum numuneleri ya da seri dilüe standartlarla süspansiyon haline getirilmiştir. 2 saatlik inkübasyonun ardından, boncuklar iki kez yıkanmış ve Streptavidin-fitoeritrin solüsyonu ile 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Tekrarlayan yıkama prosedüründen sonra, örnekler flow sitometri analizi için uygun duruma gelmiştir. İleri ve yana saçılım voltajları ayarlanmış; boncuk farklılaşmasını göstermek için 675 nm (flöresan 4) dedektör kullanılmış, boncuk ölçümü için 575 nm (flöresan 2) dedektör kullanılmıştır. Standart eğri aralığı, her sitokin ve kemokin için belirtilen şekilde belirlenmiştir: IL-1 α ve TNF- α için 0–20.000 pg/ml, MCP-1 için 0–5.000 pg/ml, ve IFN- γ için 0–2.000 pg/ml. Örneklerde Beckman Coulter Cytomics FC500 flow sitometri cihazı kullanılarak ölçümler yapılmıştır. Her analiz için 3000 boncuk toplanmıştır. Konsantrasyon değerleri, Flow Cytomix Pro 3.0 programı (e-Bioscience Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria) kullanılarak ilgili standartlardan hesaplanmıştır.

3.2.4. Flow sitometri ile apoptoz değerlendirmesi

Flow sitometri ile apoptoz değerlendirme metodunun temeli, anneksin V'in, apoptozise uğrayan hücrelerde, bulunduğu hücre zarının iç yüzünden hücre zarının dış yüzüne transloke olan fosfatidilserine olan afinitesinin ölçülmesine dayanmaktadır. Çalışma taze akciğer dokusunda yapılmıştır. Akciğer sağ lobları soğuk serum fizyolojik ile yıkandıktan hemen sonra, apoptoz/nekroz çalışması için kullanılmıştır. Önce akciğer dokusundan hücreler ayrı ayrı toplanmıştır. Her örnek için 100 µl hücre süspansiyonu kullanılmıştır. Hücreler, propidium iodide (PI) varlığında, anneksin V kaplı floresan izotiosiyanat (FITC) ile boyanmıştır. Bu uygulama, apoptotik hücrelerin yüzeyindeki fosfatidilserinin belirlenmesini sağlamaktadır. Hem PI hem de anneksin V pozitif hücreler % olarak nekrozu göstermektedir. Çalışmada annexin-FITC kiti (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA) kullanım klavuzu talimatlarına uygun olarak kullanılmış ve Coulter FC500™ flow cytometer (Beckman-Coulter) cihazında ölçümler yapılmıştır.

3.3. Kimyasal Maddeler

α -naphthylthiourea (ANTU) (Interchim), Dr. E. Schillinger, Schering AG, Berlin, Germany. Zeytinyağı ve Ro 5-4864, (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA.

3.4. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Elde edilen verilere ait tanımlayıcı değerler ortama $\pm$ standart hata (SH) olarak verilmiştir. Gruplar arası farklılıklar 'Tek Yönlü Varyans Analizi' (One-Way ANOVA) ile, farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı ise, LSD testi ile araştırılmıştır. Analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde, $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. ANTU'nun Pulmoner Sistem Üzerine Etkisi

Tüm grupların AA/VA oranları, PE miktarları ve PE/VA oranları Tablo 9'da verilmektedir.

Tablo 9. Tüm Grupların AA/VA, PE/VA Oranları ve PE Miktarları

GRUPLAR	Akciğer Ağırlığı/Vücut Ağırlığı Oranı (AA/VA x 10 ⁴)	Plevral Efüzyon/Vücut Ağırlığı Oranı (PE/VA x 10 ⁴)	Plevral Efüzyon Miktarı (ml)
Kontrol	47.2 ± 2.3	0	0
ANTU	91.1 ± 8.2 [#]	142.7 ± 10.4 [#]	3.9 ± 0.3 [#]
ANTU + Ro 5-4864 (2 mg/kg)	76.6 ± 2.9 [*]	90.6 ± 9.3 [*]	2.3±0.2 [*]
ANTU + Ro 5-4864 (4 mg/kg)	82.4 ± 2.4	43.1 ± 9.9 [*]	0.96 ±0.2 [*]

[#]p<0.05 Kontrol grubuna göre anlamlı; ^{*}P<0.05 ANTU grubuna göre anlamlı.

10 mg/kg dozunda i.p. olarak ANTU verildikten 4 saat sonra, AA/VA oranlarında, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı düzeyde (p<0.05) farklılık gösteren bir artış saptanmıştır. AA/VA oranı kontrol grubunda 47.2 ± 2.3, ANTU grubunda ise 91.1 ± 8.2 hesaplanmıştır (Şekil 1).

Sağlıklı kontrol grubu sıçan akciğerlerinde plevral efüzyon saptanmamıştır. ANTU verilen grupta, eksuda özelliğinde, hemorajik olmayan plevral efüzyon gelişimi gözlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ANTU grubunda (3.9 ± 0.3 ml) istatistiksel anlamlı olarak yüksek miktarda efüzyon gelişimi saptanmıştır (p<0.05) (Tablo 9).

Histopatolojik incelemede, akut akciğer hasar modeli olarak kullanılan ANTU'nun, akciğer dokusunda yoğun ve yaygın lökosit infiltrasyonuna ve orta düzeyde alveolar ödeme ve intraalveolar hemorajiye neden olduğu saptanmıştır.

4.2. Ro 5-4864'ün ANTU Aracılı Akut Akciğer Hasarı Üzerine Etkileri

ANTU ile oluşturulan akut akciğer hasarı modelinde, selektif periferik benzodiazepin reseptör agonisti Ro 5-4864, 2 ve 4 mg/kg dozlarında, akciğer ağırlığı/vücut ağırlığı (AA/VA) oranlarında azalmaya neden olmuştur (Şekil 1);

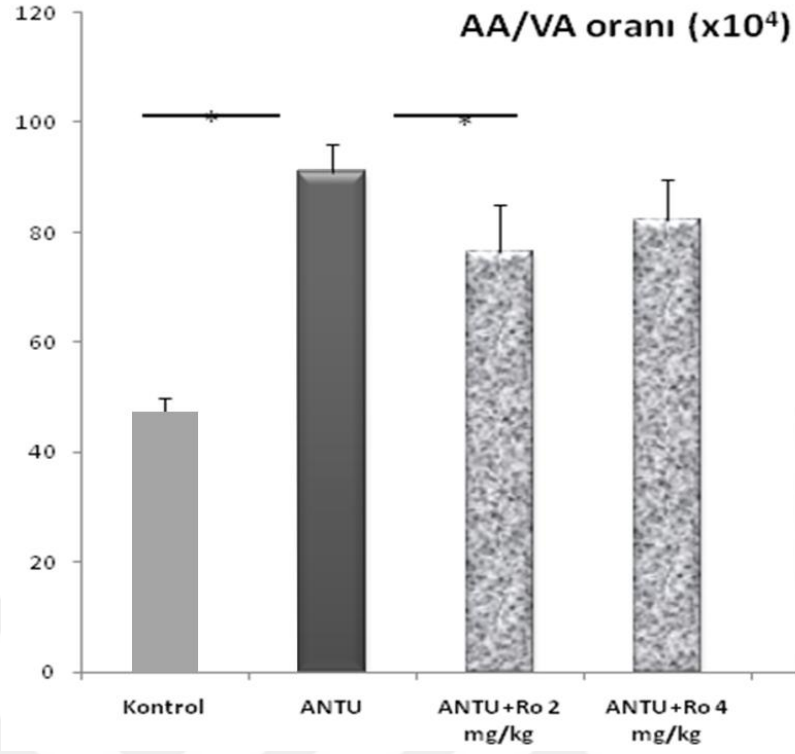
Kontrol AA/VA	: 47.2±2.3
ANTU	: 91.1±8.2
ANTU+2 mg/kg Ro 5-4864	: 76.6±2.9
ANTU+4 mg/kg Ro 5-4864	: 82.4±2.4

Bu azalma sadece 2 mg/kg dozunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

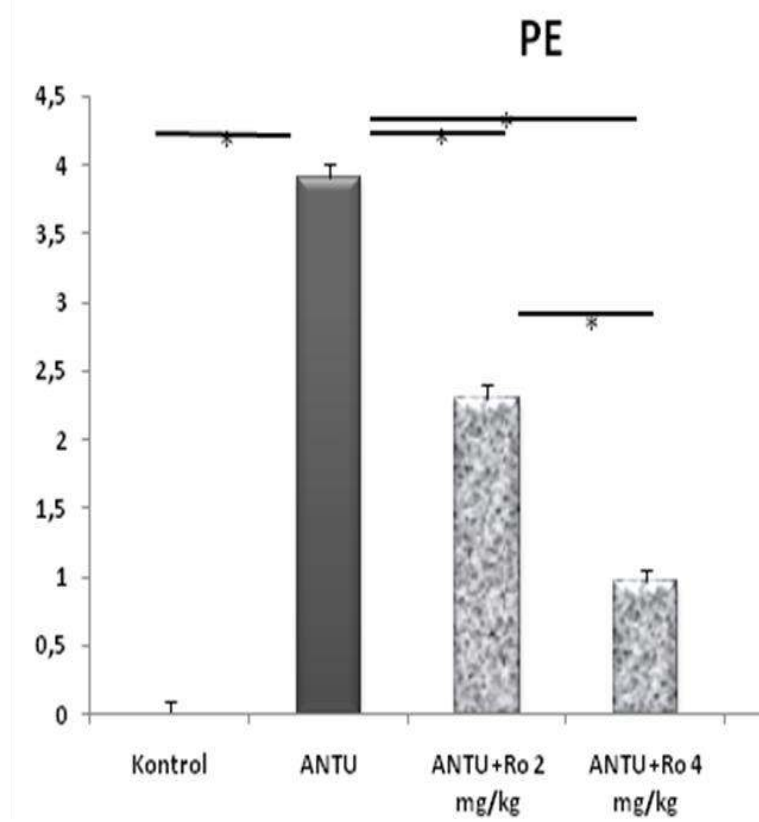
Ro 5-4864 kullanılan her iki dozunda da, ANTU grubundaki efüzyon gelişimini (PE/VA) istatistiksel anlamlı düzeyde azaltmış ve efüzyon gelişimine karşı koruyuculuk sağlamıştır;

Kontrol PE/VA	: 0.00;
ANTU	: 142.7 ± 10.4 (3.9±0.3 ml)
ANTU+2 mg/kg Ro 5-4864	: 90.6 ± 9.3 (2.3±0.2 ml)
ANTU+4 mg/kg Ro 5-4864	: 43.1 ± 9.9 (0.96±0.2 ml)

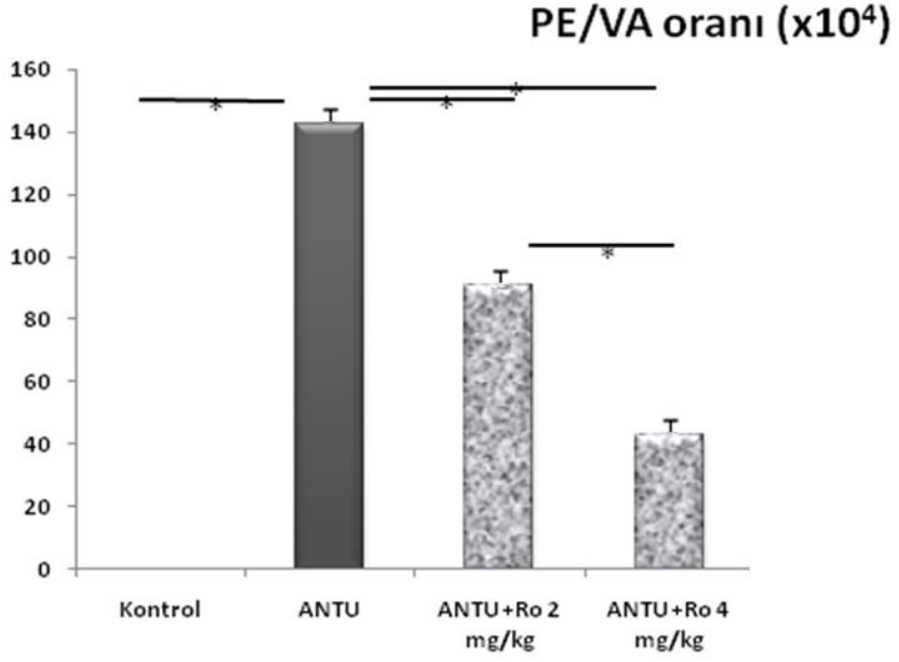
Ro 5-4864'ün kullanılan tüm dozlarında, PE oluşumuna karşı istatistiksel anlamlı ve doz bağımlı bir koruyuculuk sağladığı saptanmıştır (Şekil 2-3).



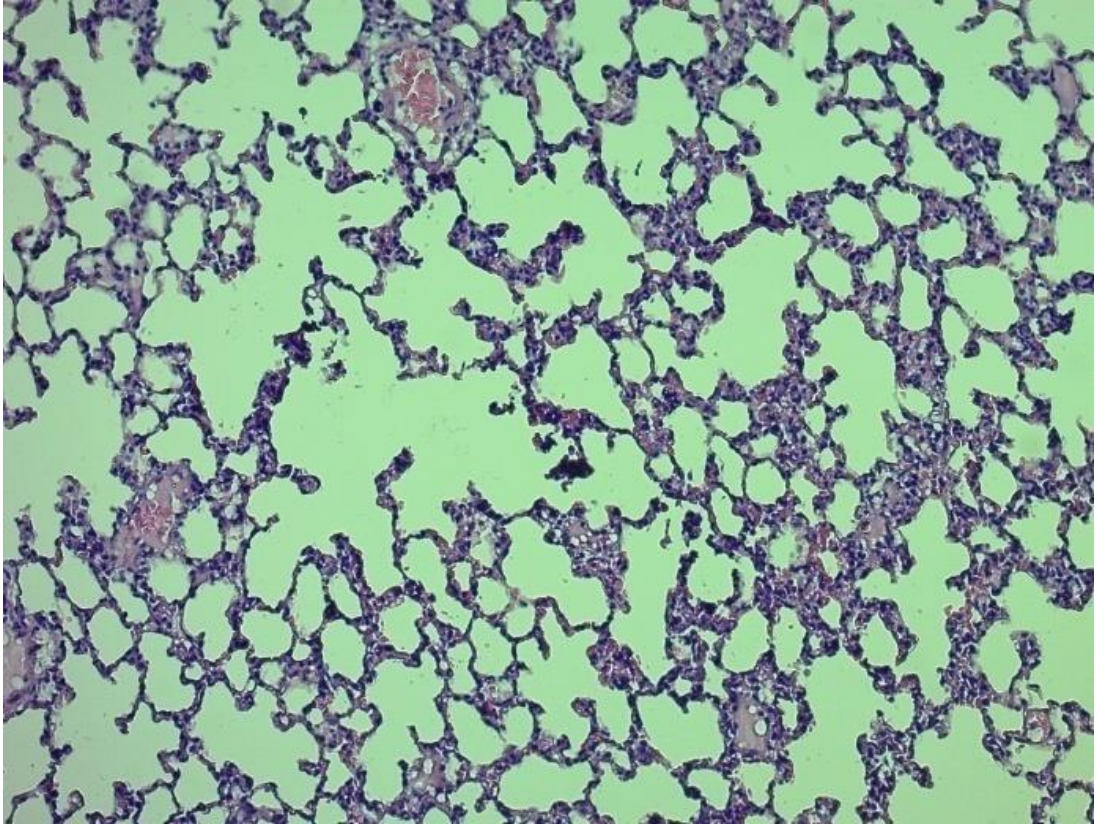
Şekil 1. ANTU ile oluşturulan akut akciğer hasarında Ro 5-4864, akciğer ağırlığı/vücut ağırlığı oranı üzerine olan etkileri. Her grupta $n=10$, $*p<0.05$.



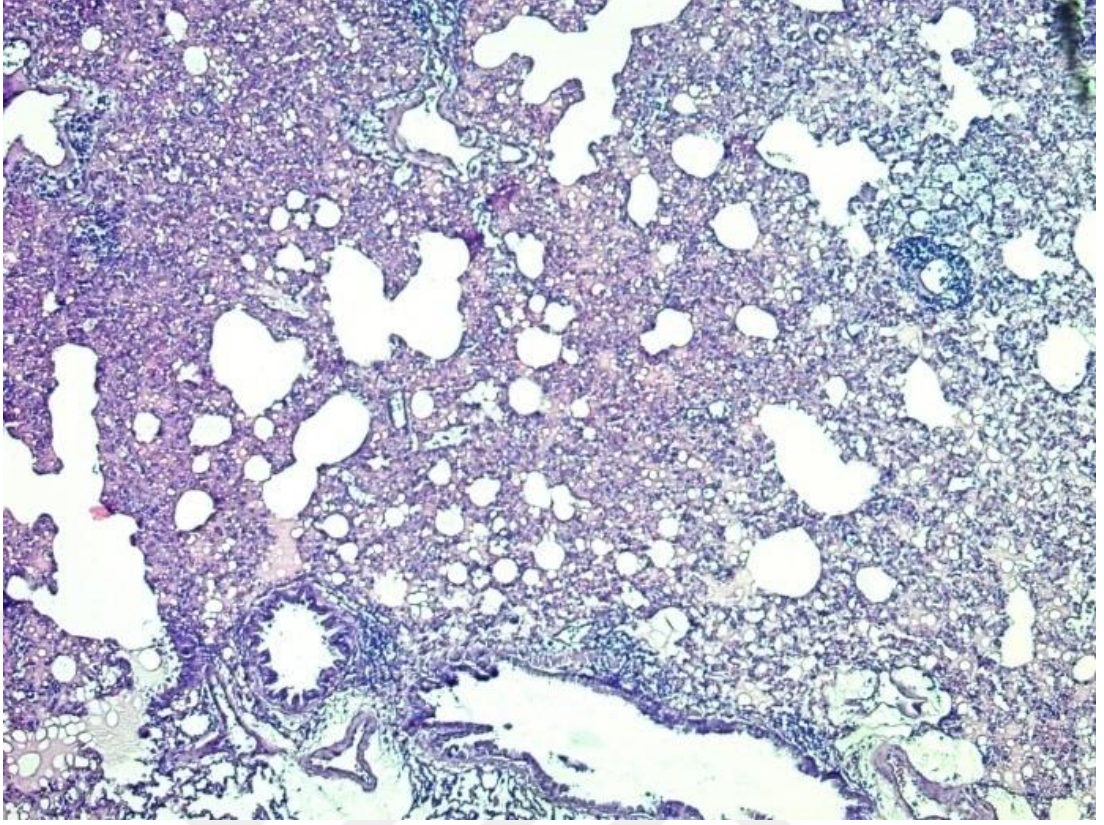
Şekil 2. ANTU ile oluşturulan akut akciğer hasarında Ro 5-4864'ün plevral efüzyon (PE) miktarı (ml) üzerine olan etkileri. Her gruptan $n=10$, $*p<0.05$.



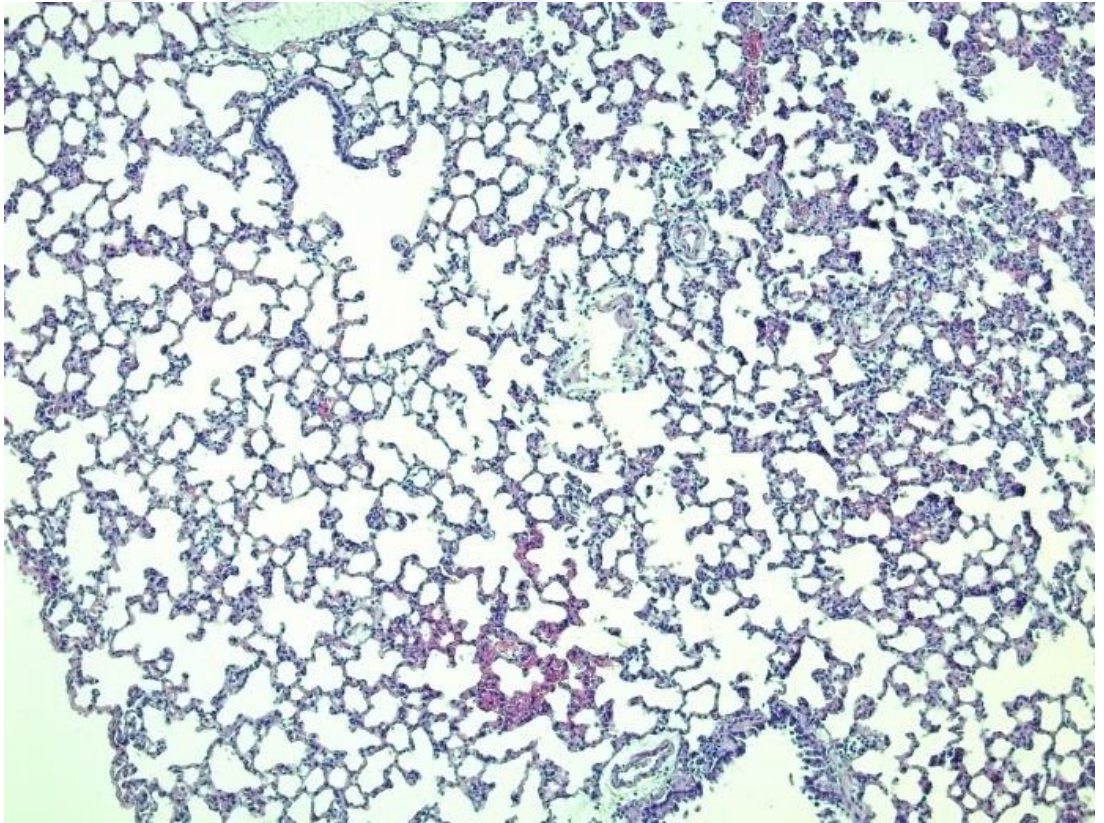
Şekil 3. ANTU ile oluşturulan akut akciğer hasarında Ro 5-4864'ün, plevral efüzyon/vücut ağırlığı oranı (PE/VA x 104) üzerine olan etkileri. Her grupta n=10, *p<0.05.



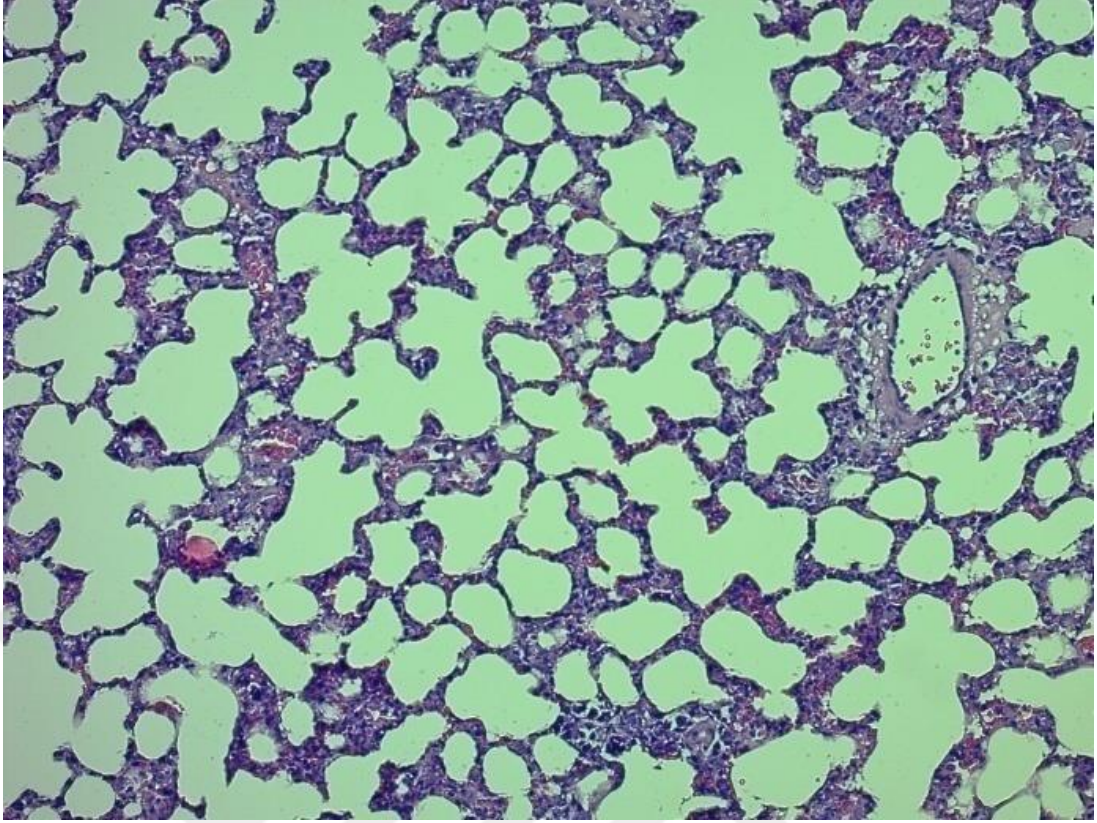
Şekil 4. Kontrol sıçan akciğeri (H&E x10).



Şekil 5. ANTU sıçan akciğeri (H&E x10).



Şekil 6. ANTU + RO (2 mg/kg) sıçan akciğeri (H&E X10).



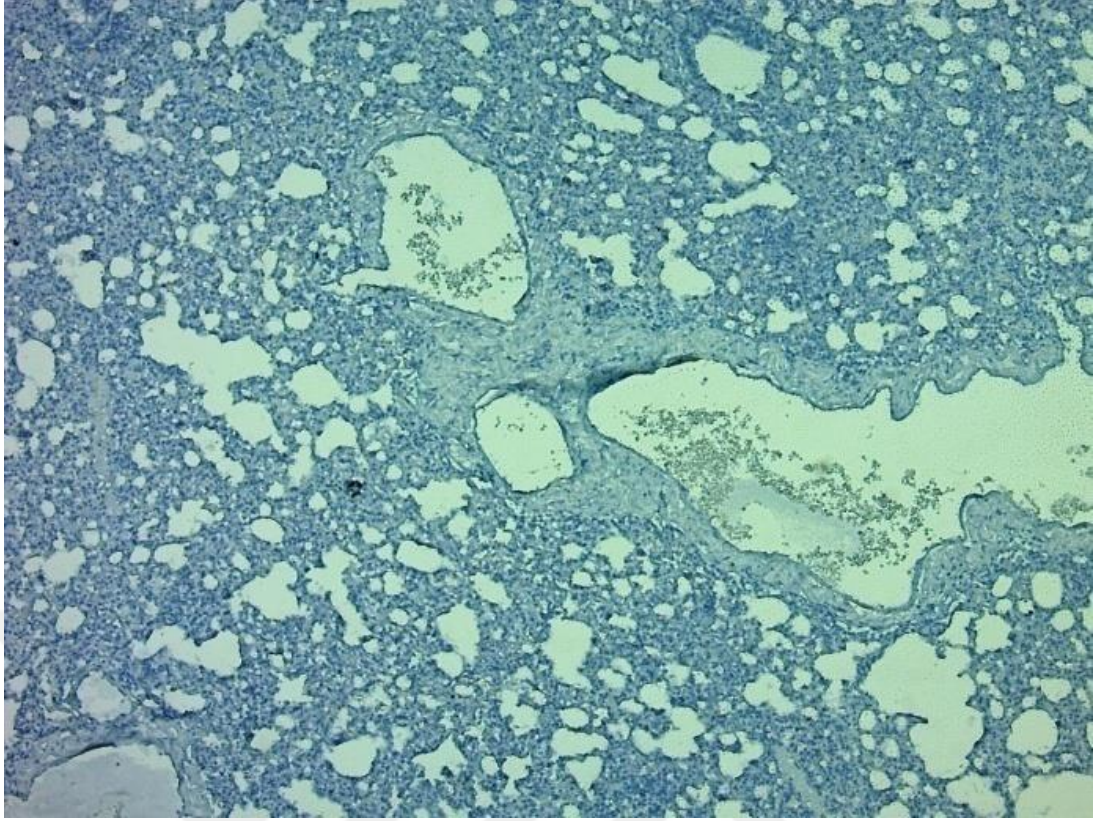
Şekil 7. ANTU + RO (4 mg/kg) sıçan akciğeri (H&E X10).

4.3. ANTU 'nun ve Ro 5-4864'ün Sitokin, iNOS, PBR, Kaspaz-3, TNF, Histopatolojik İnceleme, Apoptoz/Nekroz Üzerine Etkileri

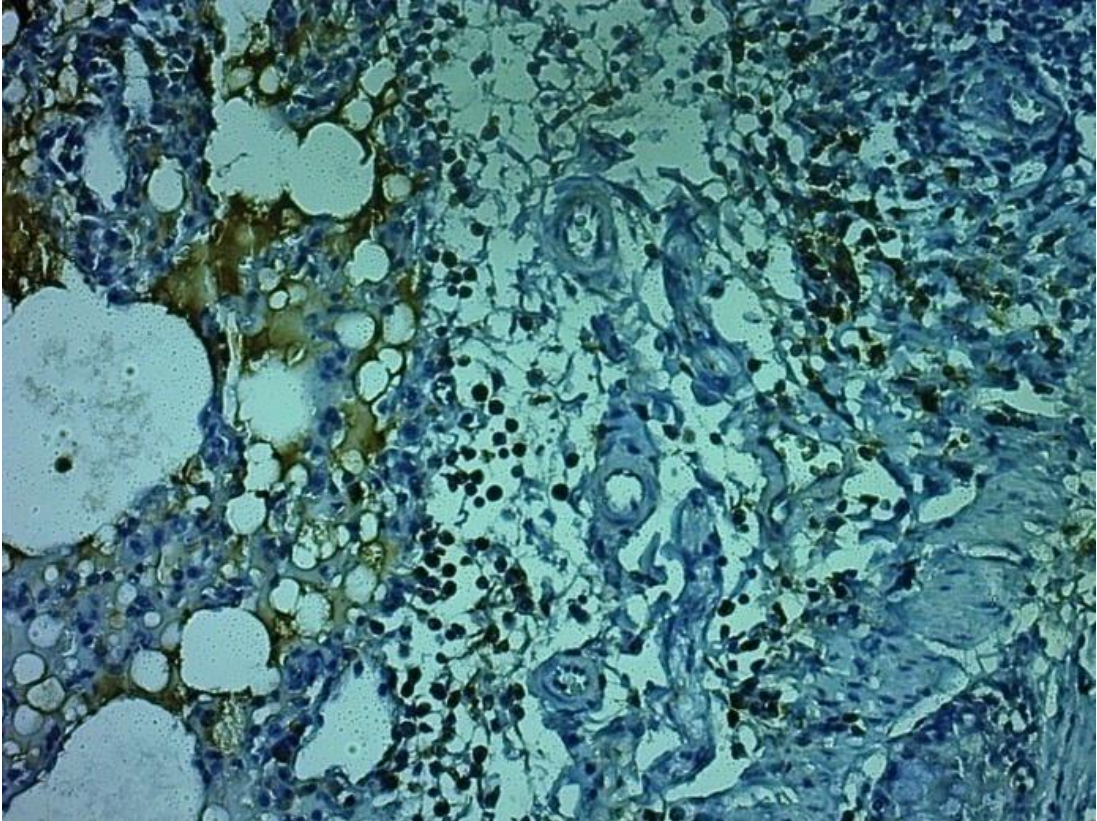
Serum örneklerinde çalışılan IL-1 ve IFN-gama düzeyleri, gruplar arasında farklılık göstermemiştir. MCP-1 düzeyleri ANTU grubunda artış göstermiş ve bu artış 2 ve 4 mg/kg dozundaki Ro 5-4864 ile istatistiksel anlamlı düzeyde azalmıştır.

Gruplarda apopitoz açısından değerlendirme yapıldığında, ANTU grubunda anlamlı oranda nekroz gözleendiği, 2 ve 4 mg/kg dozlarındaki Ro 5-4864'ün bu duruma karşı anlamlı oranda koruyuculuk gösterdiği izlenmiştir.

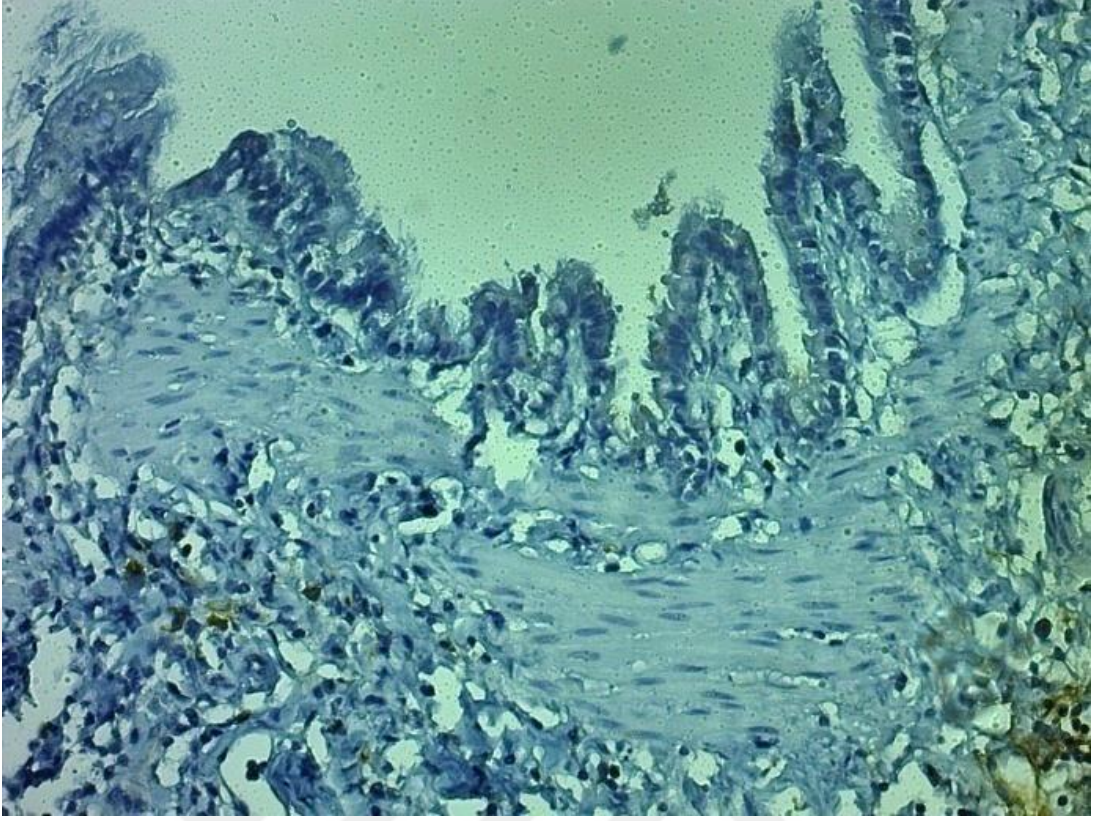
Histopatolojik incelemede, ANTU grubundaki hasarda, Ro 5-4864'ün her iki dozda da inflamasyon üzerinde koruyucu etkinlik gösterdiği, hemorajiyi ise sadece 2 mg/kg dozunda anlamlı oranda azalttığı saptanmıştır. İmmünohistokimyasal analizler incelendiğinde, Ro 5-4864'ün; ANTU grubunda iNOS immünohistokimyasal boyanması üzerinde anlamlı bir koruyuculuk etkisinin olmadığı, TNF boyanmasını her iki dozda da anlamlı düzeyde azalttığı, kaspaz-3 boyanmasını 2 mg/kg dozunda azalttığı, PBR boyanmasını her iki dozda da azalttığı saptanmıştır.



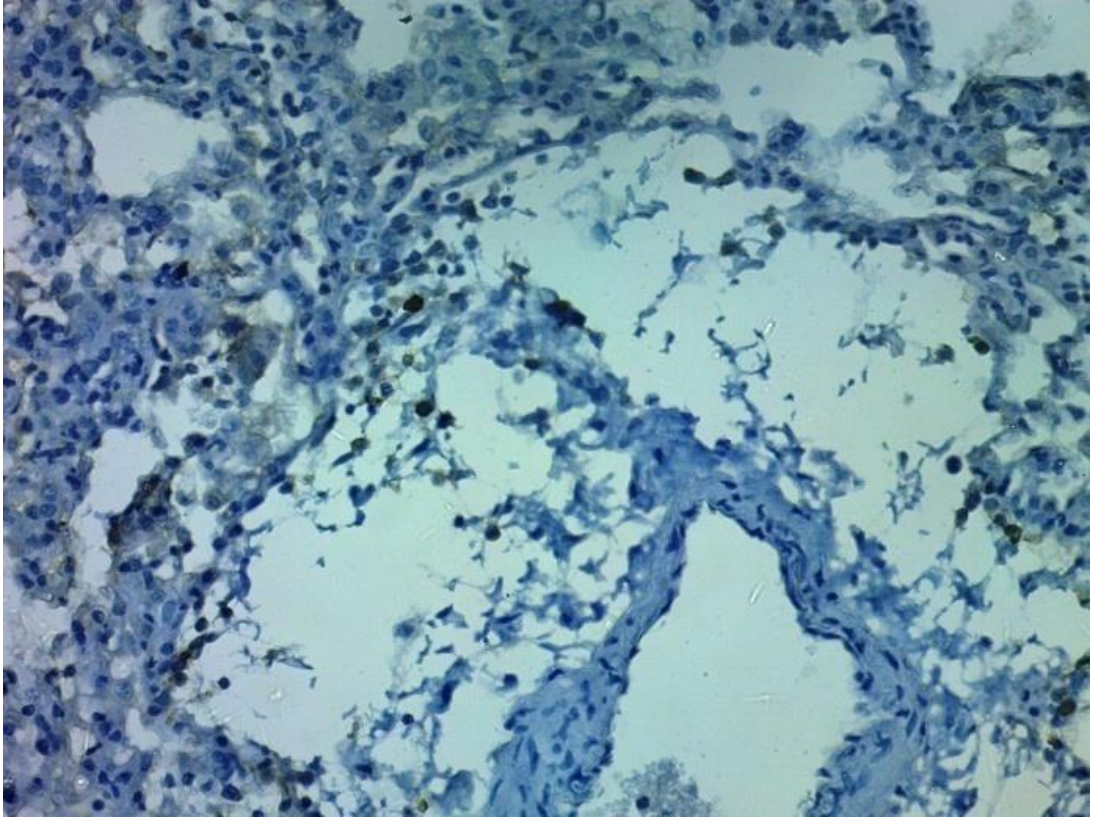
Şekil 8. Kontrol akciğeri TNF-alfa X5.



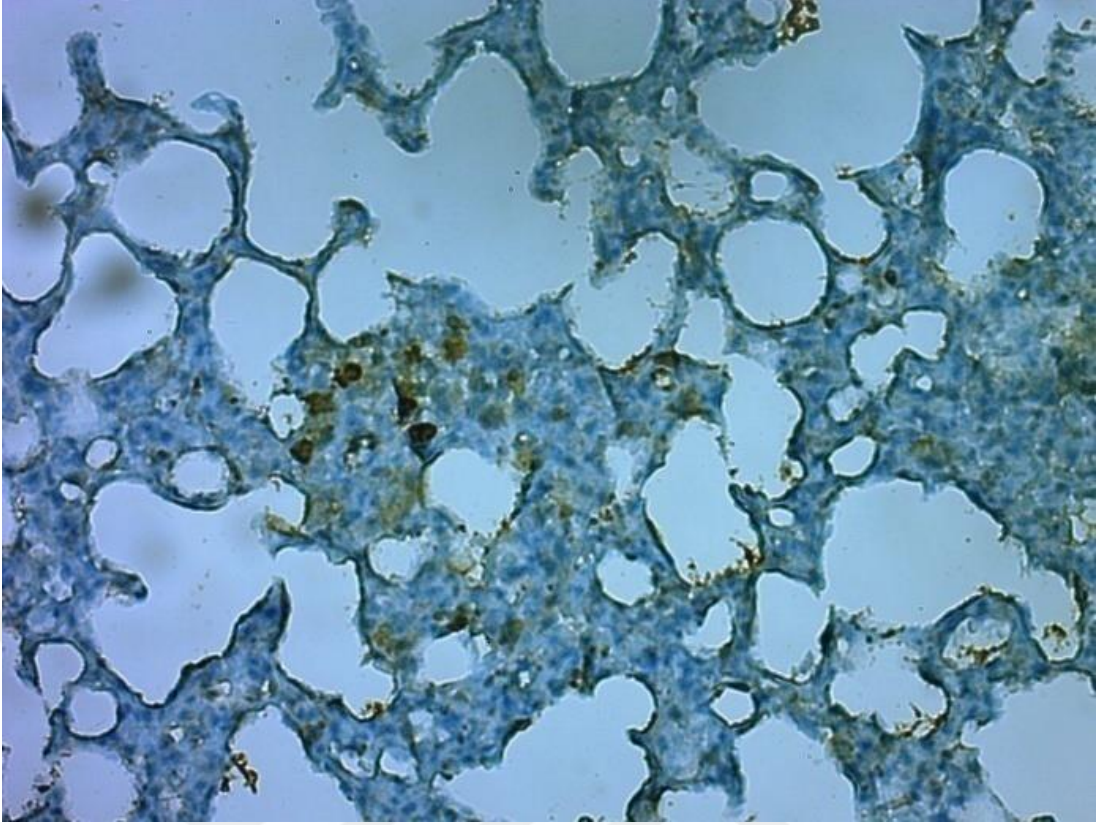
Şekil 9. ANTU akciğeri TNF-alfa X20.



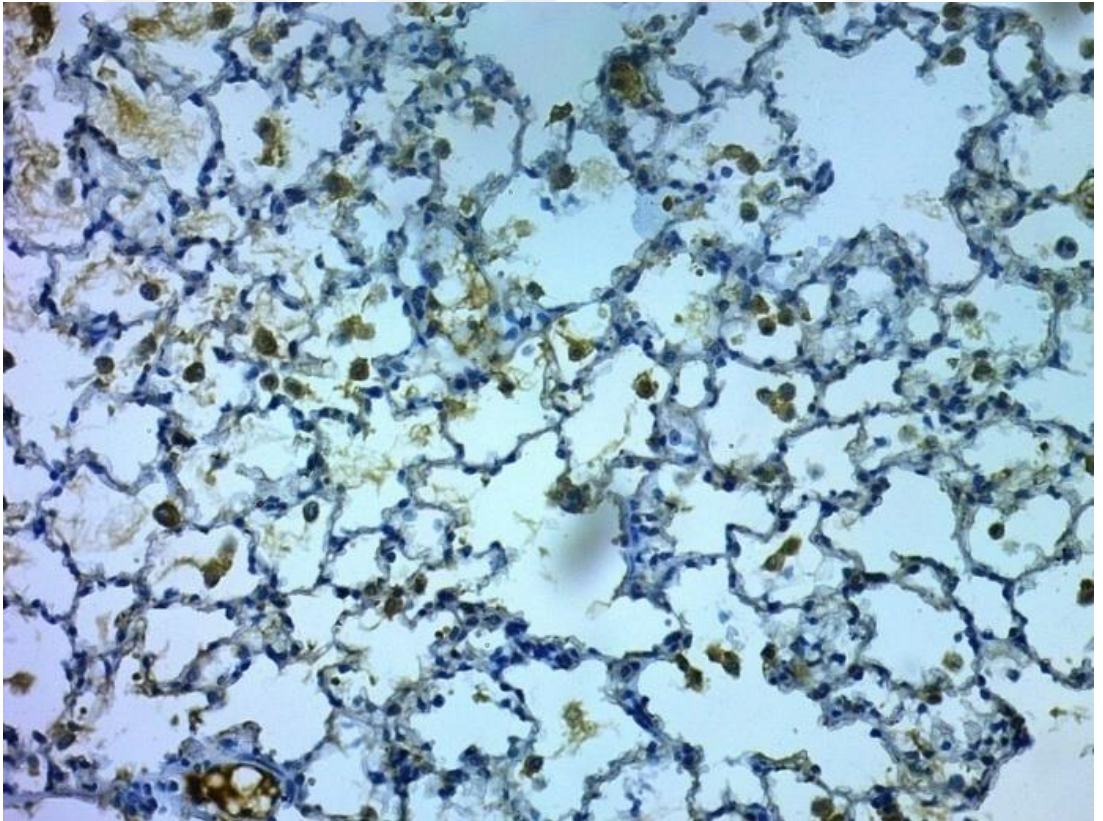
Şekil 10. ANTU+RO (2 mg/kg) TNF-alfa sıçan akciğeri X20.



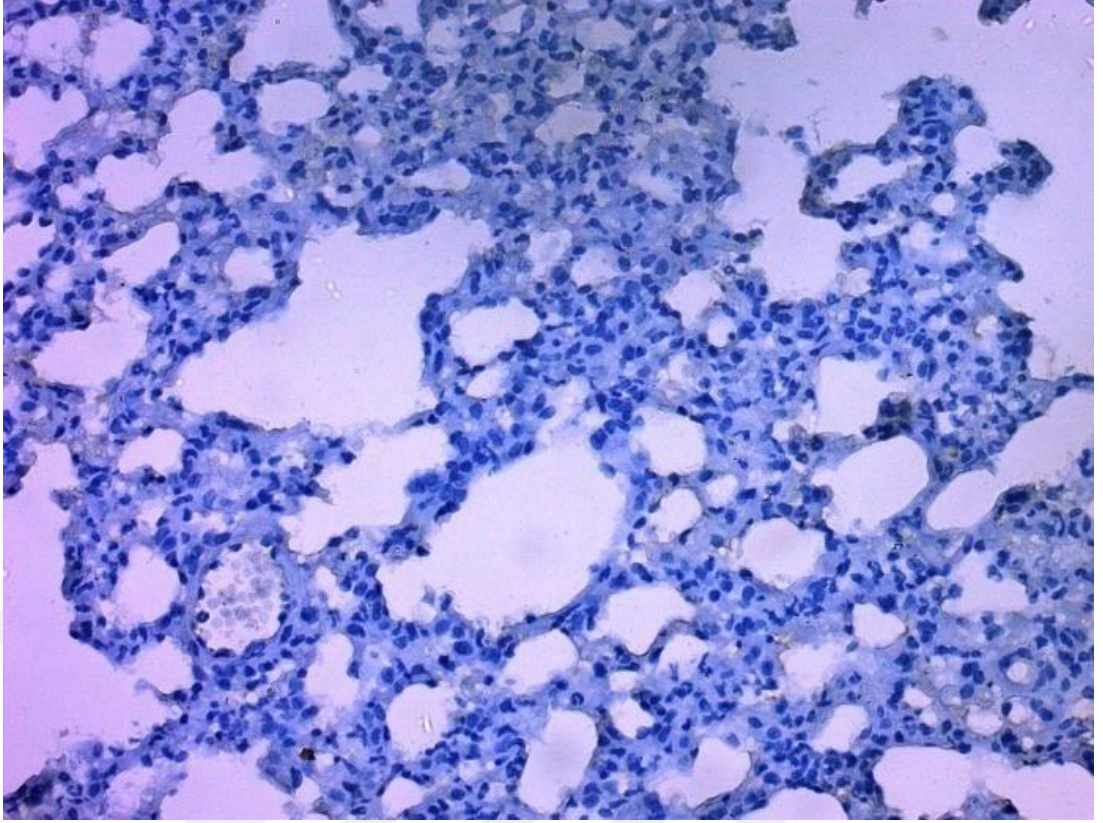
Şekil 11. ANTU+RO (4 mg/kg) TNF-alfa sıçan akciğeri X20.



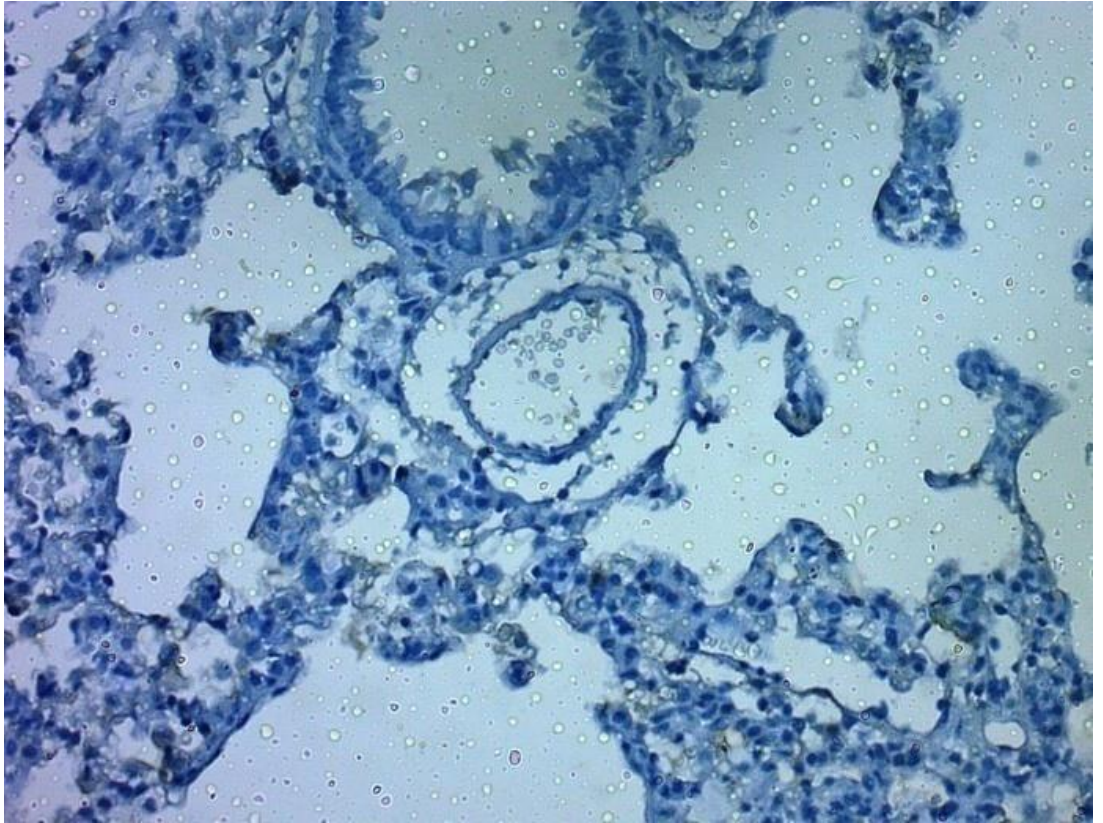
Şekil 12. Kontrol akciğeri kaspaz-3 X40.



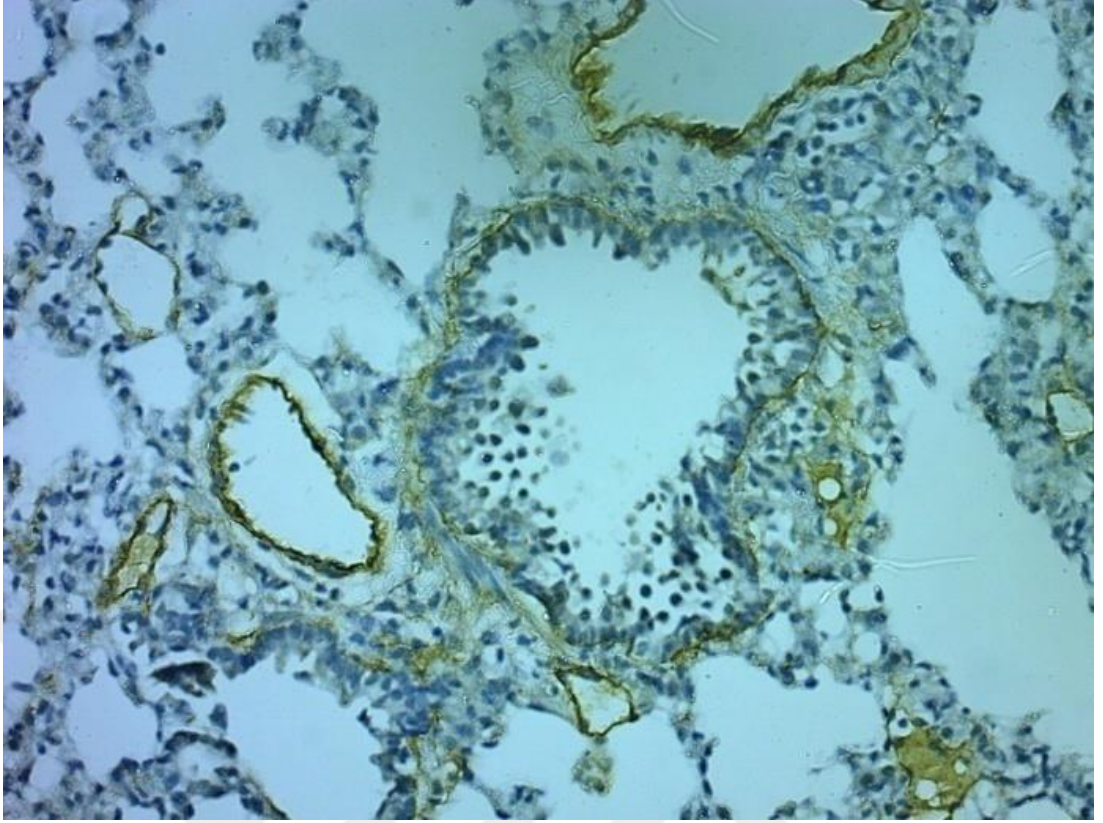
Şekil 13. ANTU akciğeri kaspaz-3 X20.



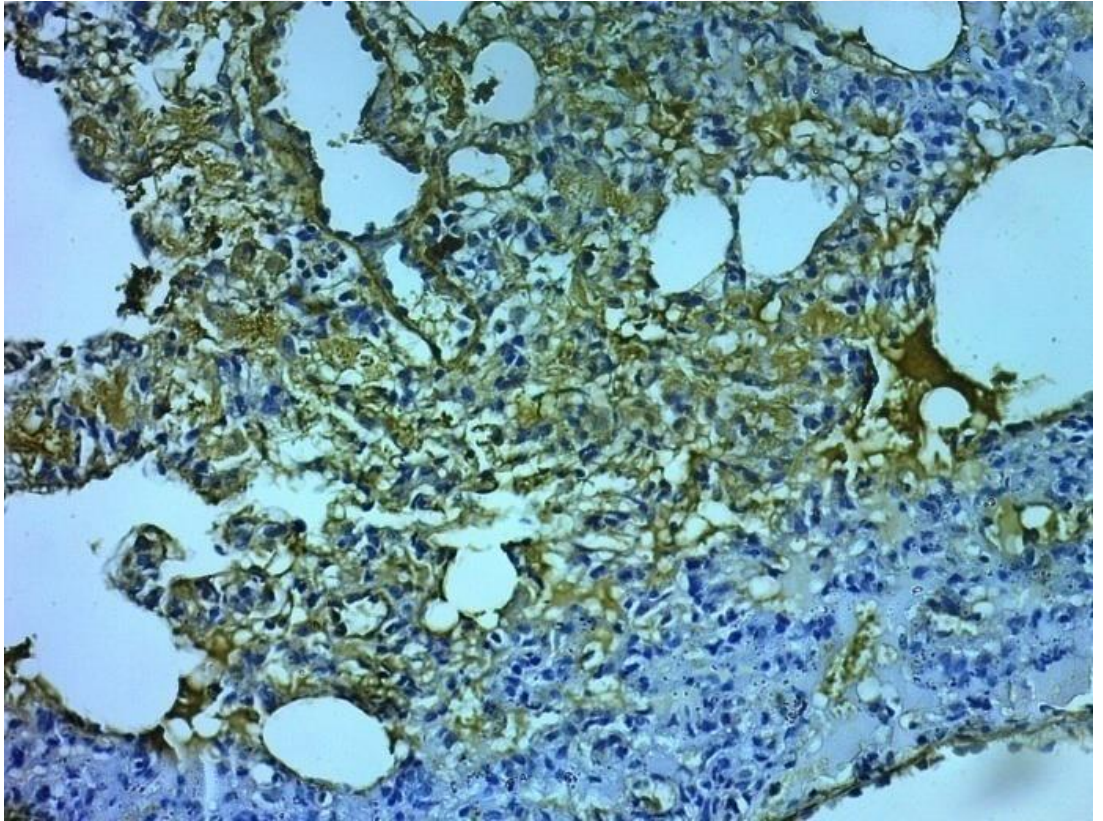
Şekil 14. ANTU+RO (2 mg/kg) Kaspaz-3 sıçan akciğeri X20.



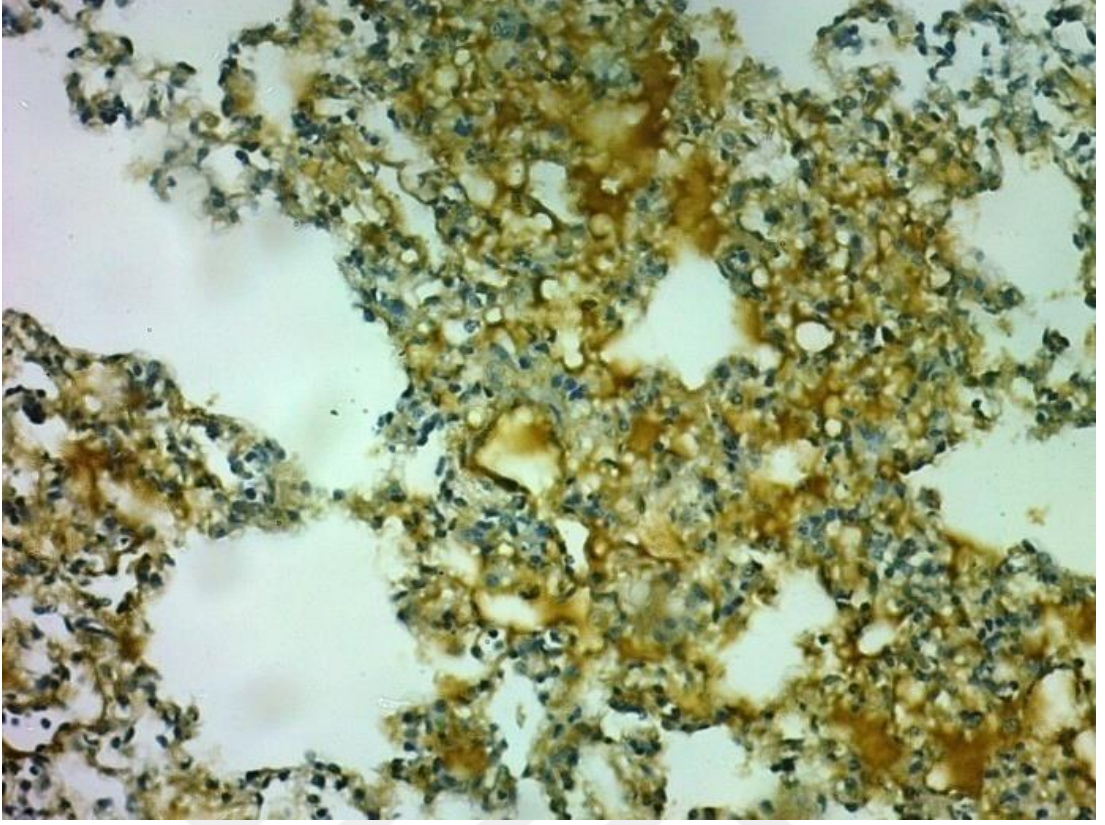
Şekil 15. ANTU+RO (4 mg/kg) kaspaz-3 sıçan akciğeri X20.



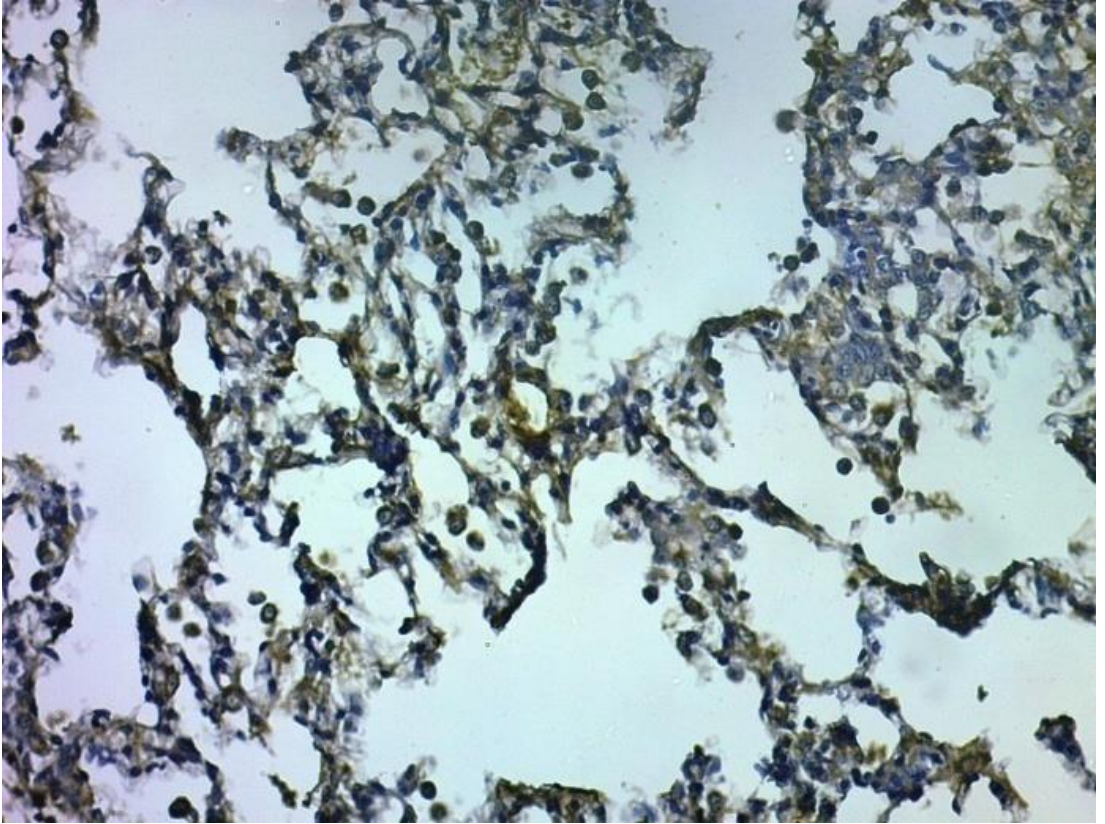
Şekil 16. Kontrol akciğeri PBR X20.



Şekil 17. ANTU akciğeri PBR X20.



Şekil 18. ANTU+RO (2 mg/kg) PBR sıçan akciğeri X20.



Şekil 19. ANTU+RO (4 mg/kg) PBR sıçan akciğeri X20.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda klinikte kullanım alanı oldukça yaygın olan benzodiazepinlerin, santral sinir sistemi dışındaki periferik reseptörleri üzerinde selektif agonistik etki gösteren Ro 5-4864'ün, ANTU aracılı ALI/ARDS modelinde, inflamasyon ve apoptoz üzerine olan olası koruyucu etkileri araştırılmıştır.

Çalışma sonuçlarımız incelendiğinde, literatürle uyumlu olduğu, periferik yerleşimli benzodiazepin reseptör türlerinin, doku hasarı ve inflamasyon üzerinde olumlu ve koruyucu etki gösterebildikleri teyit edilmektedir. Solunum sisteminde PBR'lerin rolü incelendiğinde, yeterli düzeyde çalışma bulunmadığı görülmektedir. Çalışmamızda, literatürde ilk olarak ANTU ile oluşturulan ALI/ARDS modelinde, bu reseptörlerin apoptoz/nekroz üzerine olan olası etkileri incelenmiştir. Benzodiazepinlerin günümüzde kullanılan klinik endikasyonları dışında, şu anda deneysel sonuçlarla sınırlı olsa da, doku hasarında rol oynayan mekanizmalara etkili oldukları izlenmektedir ve mevcut çalışmalarımız bu yeni endikasyonların oluşmasına zemin hazırlayabilecektir. Yapılan çalışma sonuçları incelendiğinde, PBR'lerin, inflamasyon mediyatörleri, serbest oksijen türevleri, NO gibi inflamasyon ve doku hasarında rol oynayan mekanizmaları etkileyebildiklerini ve bu mekanizmalar üzerindeki etkileri nedeniyle de doku hasarını modüle edebildiklerini göstermektedir (90,93).

ALI, artmış vasküler permeabilitenin eşlik ettiği akut ve persistan akciğer inflamasyonu olarak tanımlanmış pulmoner ödem ile uyumlu klinik bir tablodur. ARDS ise, ALI ile aynı olup tek farkı hipoksinin daha ağır olmasıdır (1). ARDS, akciğerlerin hava yolları veya dolaşım yoluyla etkilendiği çok çeşitli nedenlere bağlı olarak ortaya çıkan akut bir klinik tablo olup, farklı hastalıklara bağlı olarak geliştiğinden dolayı hastalık değil sendrom olarak tanımlanmıştır (16). ARDS gelişimine neden olabilecek birçok sebep gösterilmiştir (pnömoni, gastrik içeriğinin aspirasyonu, sepsis, ciddi travmalar ve yanıklar, multipl kan transfüzyonu gibi). Bu durumlar direkt veya indirekt yolla akciğer hasarı oluşturmaktadırlar (3). Pulmoner ALI/ARDS'de öncelikle alveoler epitelde bir hasar oluşmakta, bu durum alveoler makrofajları aktive etmekte ve takibinde pulmoner inflamasyon gelişmektedir. Ekstrapulmoner ALI/ARDS'de ise, akciğer dışı kaynaklardan tetiklenen hücresel ve humoral yanıt ile bunun sonucunda sistemik dolaşıma salınan mediyatörler, akciğer hasarını oluşturan temel mekanizmalardır (30). ARDS; akut olarak başlayan;

akciğerlerde inflamasyon; proliferasyon ve fibrozisin de dahil olduğu ciddi yapısal değişiklikler oluşturan; oksijene refrakter hipoksemi, komplians ve fonksiyonel rezidüel kapasite azalması, akciğer grafisinde diffüz infiltratların varlığı ile karakterize; alveolokapiller permeabilite artışına sekonder nonkardiyak pulmoner ödem tablosudur (2).

ALI/ARDS oluşumuna neden olan çok sayıda etken olması, bu değişik etkenlere bağlı gelişen patofizyolojik mekanizmaların yeterli düzeyde aydınlatılamaması gibi nedenlerden dolayı, ALI/ARDS tedavisinde genel kabul görmüş etkili ve standart bir tedavi bulunmamaktadır. Tedavinin temeli destekleyici düzeyde kalmış durumdadır. ALI/ARDS'deki mekanizmaların daha iyi anlaşılabilmesi ve yeni tedavi seçeneklerinin oluşturulabilmesi ve bu sayede özellikle yoğun bakımlardaki mortalite oranlarının düşürülebilmesi için, deneysel çalışmalar sürdürülmektedir. ARDS tüm dünyada yılda yaklaşık 3 milyon insanı etkilemektedir ve ölüm oranı %35-46 gibi yüksek değerlerde seyretmektedir (131). ALI/ARDS patofizyolojisinde farklı nedenlere bağlı olarak farklı mekanizmaların ortaya çıkması nedeniyle, deneysel çalışmalarda da bu mekanizmaların olası mediyatörlerini anlayabilmek için farklı modeller oluşturulmakta ve incelenmektedir (119).

ALI/ARDS deney modeli oluşturmak için kullanılan ajanlardan biri de ANTU'dur. ANTU, rodendisit olarak geliştirilmiş, pulmoner ödem ve plevral efüzyon geliştirerek, pulmoner yetmezlikle ölüme neden olan kimyasal bir ajandır. Yapılan çalışmalarda, doz ve zaman bağımlı olarak akut akciğer hasarı geliştirdiği saptanmıştır. ANTU'nun akciğer hasar mekanizmasında hedef yapının kapiller endotel hücreleri olduğunu gösterilmiştir (15). ANTU'nun etki mekanizması kesin olarak aydınlatılamamakla birlikte, ANTU'ya bağlı akciğer ödeminin, pulmoner vasküler yatak ve hava yolundan kaynaklandığı düşünülen bir kısım vazoaaktif maddeler aracılığıyla olduğu veya ANTU'nun doğrudan hasarı sonrası bu vazoaaktif maddelerin ortaya çıktığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, ANTU aracılı akut akciğer hasarında, L-arginin/NO yolağı, endotelin ve angiotensin peptidler, eikozanoidler, reaktif oksijen radikalleri, lipid peroksidasyonu ve okside DDL gibi pek çok inflamasyon ve doku hasar mediyatörünün rol oynadığı gösterilmiştir (17,80,81,82,83,84,85,86).

Benzodiazepinler santral GABA_A reseptörleri dışında, periferel dokularda başka bölgelere de bağlanmaktadır. Çeşitli hücrelerin mitokondri dış membranı üzerinde yerleşmiş bu reseptörlere periferel tip benzodiazepin reseptörü ismi

verilmiştir. 2006 yılında da, protein veya ligand taşıma/translokasyondaki varsayılan işlevini yansıtan 18 kDa ‘Translokator Protein’ (TSPO) olarak yeniden adlandırılmıştır (89). Daha sonra bu tip reseptörlerin SSS’de de bulunduğu saptanmıştır. Bu tip reseptörlerin yaygın olarak immün sistem organları ve hücrelerinde de bulunduğu gösterilmiştir. Bu reseptör ligandlarının kemotaksi ve lenfoid hücre proliferasyonu gibi monosit fonksiyonlarının modülasyonunda da etkili oldukları düşünülmektedir (11,90). Bu bulgular, PBR’lerin immün/inflamatuvar olaylarda rol oynayabileceklerini bu nedenle de, doku hasarı ve inflamasyonunda potansiyel koruyucu ajanlar olarak kullanılabileceklerini düşündürmektedir.

Benzodiazepinlerin klinikteki yaygın kullanım alanlarının dışında, periferik etkileri ile immün fonksiyonları modüle edebildikleri, selektif PBR agonisti Ro5-4864’ün, monositlerden IL-2 (36,91), makrofajlardan IL-1, TNF- α ve IL-6 gibi inflamasyon mediyatörlerinin ve reaktif oksijen ürünlerinin (11,36,92,42) üretimini anlamlı oranda azalttığı, karagenin ile oluşturulan pençe ödeminde koruyucu etki gösterdiği ve anti-inflamatuvar etkileri olduğu (37) gösterilmiştir. Benzer şekilde Ro 5-4864, romatoid artrit şiddetini azaltmakta, kronik tedavide inflamatuvar hücrelerin eklem aralığına göçünü bloke etmekte, kıkırdak ve kemik yıkımına karşı koruyucu etki göstermektedir (48). PBR’lerin ayrıca, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında da rol oynadığı, meme kanseri ve glioma hücrelerinde gösterilmiştir (49). PBR ligandlarının, iskemi-reperfüzyon hasarı gibi oksidatif stresin geliştiği patolojilerde antiapoptotik olarak davrandığı, oksidatif stres ve iskemi-reperfüzyon hasarına karşı kalpte koruyucu oldukları gösterilmiştir (50,51). Benzer şekilde, PBR’lerin iskemi reperfüzyon hasarı (95,96) yanı sıra, beyin hasarı (97,98), epilepsinin belirli formları (96,97,98), nörodejeneratif bozukluklar, Alzheimer (97,98) ve Parkinson (98) hastalıkları ve periferik nöropati (99) gibi değişik patolojik durumlarda da rolleri olduğu gösterilmiştir.

Farges ve ark. Ro 5-4864’ün, karagenin ile oluşturulan plörezi modelinde, antiinflamatuvar bir etki gösterdiklerini ve bu etkisini de kısmen glukokortikoidler üzerinden yaptığını saptamışlardır. Çalışmalarında, Ro 5-4864, erken fazda görülen nötrofil birikimini ve geç fazda görülen mononükleer hücre akışını inhibe etmiştir. Ayrıca Ro 5-4864’ün, myeloperoksidaz ve adenosin deaminaz aktivitelerini de azalttığını göstermişlerdir (10).

Kısa etkili bir benzodiazepin olan midazolam, sayılan sitokin yapımının modülasyonu yanı sıra, NO oluşumunu azaltmakta, nötrofil fonksiyonlarını inhibe

etmekte, iNOS ve siklooksijenaz-2 ekspresyonunu ve süperoksit anyon oluşumunu azaltmaktadır (11,43,44). Monosit ve mast hücrelerindeki NO ve TNF- α sentezini modüle etmekte, makrofaj hücrelerinden proinflamatuvar mediyatörlerin salınımını ve süperoksit üretimini baskılamaktadır (9,47). Midazolamin, ANTU ile oluşturulan ALI'deki efüzyon oluşumuna karşı anlamlı düzeyde koruyuculuk gösterdiği de saptanmıştır (14,132). Ayrıca midazolamin, endotel hücrelerindeki TNF- α aracılı vasküler hücre adezyon molekülü-1 ekspresyonunu ve monosit adezyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir. Midazolamin bu etkileri santral benzodiazepin reseptör blokörü flumazenil ile bloke edilememekte, PBR blokörü ile bloke edilebilmektedir (9,47). Bu sonuçlar, midazolamin endotel hücresi üzerindeki PBR'leri etkileyerek antiinflamatuvar etkide bulunduğunu göstermektedir. Bu bulgular, midazolamin ANTU ile oluşturulan akciğer hasarındaki kısmi koruyucu etkisini periferik reseptörleri aracılığı yapabileceğini düşündürmektedir ki bizim çalışmamızın hipotezi olan, PBR'lerin ANTU aracılı hasarda rolü olduğu görüşü, midazolamin etkilerine de kısmen açıklama getirmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız PBR agonisti Ro 5-4864, ANTU'nun oluşturduğu pulmoner ödemde (2 mg/kg dozunda) ve efüzyonda (2 ve 4 mg/kg dozlarında) istatistiksel anlamlı düzeyde azalma ve koruyuculuk sağlamıştır. Benzer şekilde, ANTU aracılı meydana gelen yoğun ve yaygın lökosit infiltrasyonunu (2 ve 4 mg/kg dozlarında) ve intraalveolar hemorajiyi (2 mg/kg dozunda) de azaltmıştır. Bu sonuçlar, Ro 5-4864'ün PBR'lerini etkileyerek, akciğer patolojisindeki mekanizmalar üzerinden özellikle 2 mg/kg dozunda kısmi koruyucu etkinlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. ANTU aracılı doku hasarında yoğun bir inflamasyon olayının da devam ettiği düşünüldüğünde, Ro 5-4864'ün, antiinflamatuvar etkinliğe de sahip olabileceği düşünülmektedir. ANTU aracılı akut akciğer hasarında L-arginin/NO yolağının rol oynadığı, iNOS ekspresyonunun akciğer dokusunda artış gösterdiği son yıllarda yaptığımız çalışmalarımızda gösterilmiştir. ANTU aracılı akut akciğer hasarında iNOS ekspresyonunun arttığı, NO sentaz inhibitörü, N^G-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) kullanımında ise hem plevral efüzyonun hem de akciğer ödeminin doz bağımlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Bu bulgular L-arginin/NO yolağının ANTU aracılı gelişen akut akciğer hasarında rol oynadığını ve NO'nin sitotoksik bir molekül olarak hareket ettiğini göstermektedir (15). Mevcut çalışmamızda ise, ANTU uygulamasıyla akciğer dokusunda iNOS ekspresyon artışı gözlenmiş, Ro 5-4864 uygulamasıyla ekspresyonun azaldığı saptanmıştır, fakat bu değişiklikler istatistiksel

olarak anlamlı bulunmamıştır. Benzer şekilde, Li ve ark. yaptıkları çalışmada da, lipopolisakkarit ile oluşturulan akciğer hasarında, midazolamın iNOS ekspresyonunu anlamlı olarak azalttığı gözlenmiştir (133). Literatür verilerinin de desteklediği gibi, çalışma sonuçlarımız, benzodiazepin reseptörlerinin iNOS ekspresyonu üzerinde etkili olduğunu dolayısıyla doku hasarında rol oynayabildiğini göstermektedir.

Çalışmamızda, ANTU ile oluşturulan akut akciğer hasarında TNF- α ekspresyonunun anlamlı düzeyde artış gösterdiği, Ro 5-4864'ün TNF- α ekspresyon artışını, 2 mg/kg dozunda daha fazla olmak üzere, kullanılan her iki dozda da anlamlı oranda azalttığı saptanmıştır. Bilindiği üzere, ALI/ARDS patogenezinde gözlenen inflamasyon, apoptozis ve trombozide, ilk yanıt olarak tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-8 (IL-8) gibi proinflamatuvar sitokinler salgılanmaktadır (5,6). Bunu takiben akciğerlerde oluşan yoğun nötrofil birikimi ile bu hücreler aktive olmakta, bunun sonucunda reaktif oksijen türevleri ve proteazlar gibi toksik mediyatörlerin salgılanmalarıyla kapiller endotel ve alveoler epitel harabiyeti oluşmaktadır (4,7,8). ANTU aracılı artış gösteren TNF- α düzeyinin Ro 5-4864 ile azaltılabilmesi, periferik benzodiazepin reseptörlerinin hasar mekanizmasındaki önemli bir mediyatör üzerinden koruyucu etkinlik sağladığını göstermektedir. TNF- α 'nın iNOS ekspresyonunu da arttırdığı bilinmektedir. Çalışmamızda, ANTU aracılı hasarda hem TNF- α hem de iNOS ekspresyon artışının gözlemlendiği, Ro 5-4864'ün her iki ekspresyon üzerinde de baskılayıcı etki gösterdiği saptanmıştır.

TNF- α , pro-inflamatuvar etkinlik başta olmak üzere proliferasyon, apoptoz, morfogenetik değişiklikler ve farklılaşma gibi olaylarda rol oynayan, birçok hücre tipi tarafından salgılanan bir sitokin ve önemli bir endojen mediyatördür. Nötrofil ve monositler için kemotaktik etki göstermekte diğer yandan endotelial hücreleri ve makrofajları kemokin salgılamak üzere uyarmaktadır. Mononükleer fagositlerden IL-1 salınımını da tetiklemektedir. Virus ile infekte olmuş veya tümöral hücreler gibi bazı hücre tiplerinde apoptozis'i indüklemektedir. TNF ailesine ait polipeptidler, immün sistemde apoptozu uyaran reseptörleri aktive ederek apoptozu gerçekleştirmektedirler. TNF- α , bağışıklık cevabı oluşturacak sitokin kaskadının indüksiyonu için de gereklidir. TNF- α , ayrıca, inflamasyonda, yara iyileşmesinde ve doku onarımında da görev almaktadır. Çalışmamızda, ANTU aracılı

hasarda rol oynadığı ve artış gösterdiği saptanan TNF'nin Ro 5-4864 ile baskılanması, Ro 5-4864'ün koruyuculuğunu desteklemektedir. Matsumoto ve ark.'ları in vitro makrofajlar üzerinde yapmış oldukları çalışmalarında, periferik benzodiazepin reseptör ligandlarının, LPS ile indüklenen TNF aktivitesini baskıladığını saptamışlardır (13). Helmy ve ark. yoğun bakım hastalarında, midazolamın plazma TNF- α , IL-1beta, IL-6 ve IL-8 düzeylerini baskıladığını göstermişlerdir (134). Midazolam hem santral sinir sistemindeki benzodiazepin reseptörlerini hem de periferik benzodiazepin reseptörlerini eşit ölçüde etkileyen bir ilaçtır. Li ve ark. yaptıkları çalışmalarında, lipopolisakkarit ile oluşturulan karaciğer hasarında, midazolamın doku hasarını ve karaciğer makrofajları ve kemik iliği monositlerindeki TNF- α ve IL-1beta artışını azalttığını, midazolamın periferik benzodiazepinler üzerindeki etkisini baskılayan PK-11195 kullanımında ise, bu koruyucu etkilerin tersine döndüğünü göstermişlerdir. Bu sonuçlar, midazolamın koruyucu etkilerini periferik benzodiazepin reseptörleri üzerinden gösterdiğini ortaya koymaktadır (131). Dolayısıyla, literatür verileri de, hasar mekanizmasında rol oynayan mediyatörlerin, periferik benzodiazepin reseptörlerinin aktivasyonundan etkilendiğini desteklemektedir. Mevcut çalışmamızda, IL-1 alfa ve IFN-gama düzeyleri açısından, ANTU ve tedavi gruplarımız arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Kemokinler; inflamasyonun önemli göstergelerinden olup inflamasyon ve doku hasarı ile ilişkisi olduğu ileri sürülen geniş polipeptid ailesinden oluşmaktadırlar. Kemokinlerin bir üyesi olan monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1), CCL2 geni tarafından kodlanmaktadır. MCP-1'in mononükleer hücrelerin aktivasyonu ve inflamasyon bölgesine getirilmesi, sitokin sentezi ve inflamatuvar süreçte etkili olduğu ve doku hasarının başlamasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (135). Çalışmamızda, serum MCP-1 düzeyleri, ANTU aracılı akciğer hasarında kontrole göre anlamlı düzeyde artış göstermiş, kullanılan 2 ve 4 mg/kg dozlarındaki Ro 5-4864 ise bu artışı istatistiksel olarak anlamlı oranda azaltmıştır.

Apoptozis, çeşitli uyarıların peşpeşe tetiklediği moleküler nitelikteki bir dizi olayın sonucudur. Apoptoz mekanizmasında iki temel yol vardır. Birinci yol, hücre dışı uyarımlarla tetiklenen, ekstremsel, ölüm reseptörlerine bağlı yoldur. Bu yol, apoptozisi tetikleyen hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas ve tümör nekrozis faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in, ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılması) sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri, membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı

almış olduklarından bir seri etkileşimden geçerler. Ölüm reseptörleri, etkilerini, sitoplazmadaki ölüm alanlarını (TRADD; TNFR-1 associated death domain, FADD; Fas associated death domain) hedefleyerek ve protein-protein etkileşimlerine yol açarak gösterirler. Bu ölüm bölgeleri ise, prokaspaz 8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzındaki aktivasyonlarını başlatırlar. Kaspaz 8 daha sonra, kaspaz 3, 6 ve 7'nin zincir şeklinde aktifleşmesini sağlar. Bu aktivasyon, hücre makromoleküllerinin parçalanmasına ve tipik apoptoz morfolojisinin oluşumuna yol açar. Diğer yandan, aktif kaspaz 8, Bcl-2 ailesi proteinlerinden biri olan Bid'in de proteolitik olarak aktifleşmesine neden olur. Bid, mitokondriden sitokrom c, bazı başka proteinlerin ve kalsiyumun serbestleşmesine yol açar. Böylece ölüm reseptörleri yolu (birinci/ekstresek yol) mitokondriyal yolu (ikinci/intrensek yol) da aktifleştirmiş olur. Çalışmamızda ANTU ile oluşturulan akciğer doku hasarında TNF- α ekspresyonunun istatistiksel anlamlı düzeyde arttığı, Ro 5-4864'ün kullanılan her iki dozunda da TNF- α artışını istatistiksel anlamlı düzeyde azalttığı saptanmıştır. TNF- α , biyolojik aktivitelerini tip 1 ve tip 2 reseptörlerine (TNFR-1 ve TNFR-2) bağlanarak çeşitli sinyal yollarını aktive ederek göstermektedir. TNFR-2 reseptörlerinin, TNFR-1 reseptörleri aracılığıyla gelişen apoptozu arttırdığı ifade edilmektedir (136). Çalışmamızda, Ro 5-4864'ün TNF- α 'nın, mitokondri üzerindeki özellikle TNFR-1 reseptörleri üzerinden tetiklediği apoptotik gelişimi azaltabildiğini göstermektedir. Diğer yandan, aktif kaspaz 8, Bcl-2 ailesi proteinlerinden biri olan Bid'in de proteolitik olarak aktifleşmesini sağlamaktadır. Bid ise, mitokondriden sitokrom c, bazı başka proteinlerin ve kalsiyumun serbestleşmesine yol açmaktadır. Böylece ölüm reseptörleri yolunun, mitokondriyal yolu da aktifleştirdiği görülmektedir. Sonuçlarımız, ANTU aracılı doku hasarında, TNF- α aracılı ekstrensek apoptoz yolağının aktive olduğunu ve Ro 5-4864'ün bu aktivasyonu önlediğini göstermektedir. Bu durumda, TNF- α aracılı ekstrensek yolun aktivasyonunun, kaspaz 8 aracılı intrinsek yolu da aktifleştirdiği bilindiğinden, her iki yol üzerinde de apoptotik aktive artışı olduğunu söylemek mümkün olmaktadır.

Apoptoz mekanizmasındaki ikinci yol, intrinsek (mitokondrial) yoldur. Mitokondrilerin geçirgenliğini dengeleyen pro-apoptotik ve anti-apoptotik moleküllerin işlevindeki bozulmanın sonucu tetiklenir. Mitokondri, hücre içinde ATP üretiminin kaynağı olmasının yanı sıra, hücre içi ya da dışı yollardan gelen ölüm sinyallerinin üzerinde birleştiği bir organeldir. Mitokondri iç ve dış zarla çevrili yapıdadır, bu zarlar tıpkı hücre zarında olduğu gibi bir zar potansiyeline sahiptir. Dış

zar geçirgenliğinde artış sonucu mitokondri zar potansiyelinin bozulması dış zarda hızlı bir şişmeyi izleyerek iki zar arasında bulunan çeşitli proteinlerin hücre sitoplazmasına çıkmasına yol açmaktadır. Bu kaçış, ya zarda oluşan mitokondriyal permeabilite geçiş poru (permeability transition pore-PT) aracılığıyla ya da dış zarın patlamasıyla oluşabilir. Mitokondriyal permeabilite geçiş poru; periferik benzodiazepin reseptörü (PBR), adenin nükleotid taşıyıcısı (ANT-adenine nucleotide transporter) ve voltaj bağımlı iyon kanalından (voltage dependent anion channel-VDAC) oluşmaktadır. PT porunun açılmasıyla, temel olarak mitokondrideki solunum zincirinde yer alan bir enzim olan sitokrom C, apoptoz indükleyici faktör (*AIF-apoptosis inducing factor*; mitokondriyal PT porlarından salgılanır, hücre nükleusuna transloke olur ve onu parçalara ayırır), endonükleaz G (*ENDO-G*; mitokondriyal PT porlarından salınır, hücre nükleusuna transloke olur, tek sarmallı DNA'ları parçalar) ve SMAC/DIABLO (*second mitochondrial activator of caspase*; mitokondriyal PT porlarından salgılanır, AIP'i-inhibitors of apoptosis proteins inhibe eder) salınarak sitoplazmaya dağılır ve apoptozu hızlandırırlar. Sitokrom C, sitoplazmada inaktif monomerler halinde bulunan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive eden faktör) molekülüne bağlanarak apoptozom adı verilen yapının oluşumunu sağlar. Apoptozom, kaspaz 9'u aktive etmek üzere keser, kaspaz 9, efektör kaspazlardan prokaspaz 3'ü aktive eder ve kromatin kondensasyonu ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonu ile gelişen apoptozun gerçekleşmesini sağlar. Çalışmamızda, ANTU ile oluşturulan akut akciğer hasarında, PBR ekspresyonunun arttığı ve Ro 5-4864'ün kullanılan her iki dozunda da PBR ekspresyon artışını istatistiksel anlamlı düzeyde azalttığı saptanmıştır. PBR'ler, mitokondriyal hasar sonucu, mitokondri zarları arasındaki çeşitli proteinlerin sitoplazmaya çıkışı ve apoptozisin indüklenmesinde rol oynayan mitokondriyal permeabilite geçiş porunun önemli bir parçasını oluşturmaktadırlar. PBR ve apoptozdaki ortak yol olan kaspaz 3 ekspresyonu ANTU aracılı akut akciğer hasarında artış göstermektedir. Ro 5-4864'ün bu artışı ve doku hasarını anlamlı düzeyde azaltması, PBR'lerin hasar mekanizmasında rol oynadığını ve tedavi hedefleri arasında olabileceğini göstermektedir. Literatür sonuçları incelendiğinde, PBR'lerinin pulmoner sistem başta olmak üzere, immün sistem ve inflamasyon regülasyonunda rol oynadığını göstermektedir (14). PBR ekspresyonunun romatoid artritte kondrositlerde artış gösterdiği ve PBR ligandlarının kullanımıyla ekspresyonun azaldığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, tavşanlarda yapılan

bir çalışmada, pulmoner inflamasyon modelinde PBR sayısında artış saptanmıştır (137).

Apoptoz mekanizmalarından ister intrinsek ister ekstrinsek yoldan aktivasyon başlasın, “ateşleyici” enzimler olan kaspaz 8 ve 9, aktive olduklarında “ölüm işlemi” başlamıştır ve geriye dönüş yoktur. Kaspaz 8 ya da 9 aktivasyonunu, bitirici (executioner) olarak bilinen caspase 3 ve 6’nın aktivasyonu izler. Bitirici kaspaz’lar çok sayıda hücre komponentini etkileyerek apoptozu gerçekleştirirler. Çalışmamızda, ANTU ile oluşturulan akciğer doku hasarında kaspaz 3 ekspresyonunun da istatistiksel anlamlı düzeyde artış gösterdiği ve Ro 5-4864’ün 2 mg/kg dozunda bu artışı anlamlı düzeyde azalttığı görülmüştür. ANTU aracılı doku hasarında, TNF- α ve PBR ve kaspaz 3 ekspresyonu anlamlı düzeyde artış göstermiş ve Ro 5-4864 bu artışı anlamlı düzeyde azaltmıştır. iNOS ekspresyonu yine ANTU grubunda artış göstermiş, Ro 5-4864 ile azalma saptanmıştır (istatistiksel anlamlı değil).

Çalışmamızda, flow sitometri ile apoptoz/nekroz gelişimi de değerlendirilmiştir, bu çalışma, anneksin V’in, apoptozise uğrayan hücrelerde, bulunduğu hücre zarının iç yüzünden hücre zarının dış yüzüne transloke olan fosfatidilserine olan afinitesinin ölçülmesine dayanmaktadır. Hücreler, propidium iodide (PI) varlığında, anneksin V kaplı floresan izotiosiyanat (FITC) ile boyandığında apoptotik hücrelerin yüzeyindeki fosfatidilserinin belirlenmesi sağlamaktadır. Hem PI hem de anneksin V pozitif hücreler nekrozu göstermektedir. Flow sitometri sonuçlarımız nekroz ağırlıklı çıkmıştır. ANTU grubunda anlamlı oranda nekroz gözlenmiş, 2 ve 4 mg/kg dozlarındaki Ro 5-4864’ün bu duruma karşı anlamlı oranda koruyuculuk gösterdiği izlenmiştir. Tüm veriler değerlendirildiğinde, ANTU aracılı hasarda, hücrelerde nekroz yönünde değişikliğin görüldüğü aynı zamanda da apoptotik mekanizmaların tetiklendiği izlenmektedir.

Tüm sonuçlar göz önüne alındığında, akciğerde varlığı gösterilen PBR’lerin, ANTU aracılı ALI/ARDS patofizyolojik mekanizmaları üzerinde rol oynayabildiğini ve selektif PBR agonisti Ro 5-4864’ün bu hasara karşı koruyucu potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda, ANTU ile deneysel ALI/ARDS modeli oluşturulmuştur. Selektif PBR agonisti Ro5-4864'ün, ANTU aracılı ALI/ARDS'ye karşı koruyucu olup olmadığı araştırılmıştır.

1. Ro5-4864'ün kullanılan doz ve sürede, ANTU ile oluşturulan ALI/ARDS modelinde, akciğer parankim doku hasarı üzerinde istatistiksel anlamlı bir koruyuculuk sağladığı,
2. Akciğer ödemi ve efüzyon oluşumu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir gerilemeye neden olduğu,
3. Akciğer dokusunda ANTU aracılı gözlenen nekroz gelişiminin, Ro5-4864'ün kullanılan her iki dozunda da anlamlı düzeyde azalma gösterdiği,
4. ANTU aracılı hasarda TNF, PBR ve kaspaz-3 ekspresyonlarının arttığı, dolayısıyla intrensek ve ekstresek apoptoz mekanizmalarının aktive olduğu, Ro5-4864 kullanımı ile bu ekspresyon artışlarının azaltılabildiği,
5. İnflamasyon ve doku hasarında önemli bir kemokin olan MCP-1'in ANTU aracılı akciğer hasarında artış gösterdiği ve Ro5-4864'ün bu artış üzerinde anlamlı azaltıcı etki gösterdiği saptanmıştır.
6. Bu sonuçlar, PBR'lerin, temelde permeabilite artışı ile karakterize fakat aynı zamanda yoğun bir inflamasyon reaksiyonunun da olduğu ALI/ARDS patofizyolojisinde rol oynayan mediyatörler üzerine etki gösterdiklerini, özellikle de mitokondriyal apoptoz yolları üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.
7. Çalışma sonuçlarımız, Ro5-4864'ün ve genel anlamda PBR agonistlerinin, pulmoner hastalıkların tedavisinde potansiyel bir tedavi hedefi olabileceklerini desteklemektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Rice TW, Wheeler AP, Bernard GR, Hayden DL, Schoenfeld DA, Ware LB, et al. Comparison of the SpO₂/FiO₂ ratio and the PaO₂/FiO₂ ratio in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest*.132:410-417; 2007.
2. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2: 319-323, 1967.
3. Flick MR. Pulmonary edema and acute lung injury. In: Murray JF, Nadel JA, eds. *Textbook of Respiratory Medicine*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1725-77, 1994.
4. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342:1334-49, 2000.
5. Parsons PE, Eisner MD, Thompson BT, Matthay MA, Ancukiewicz M, Bernard GR, et al. Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury. *Crit Care Med*. 33:1-6, 2005.
6. Chollet-Martin S, Gatecel C, Kermarrec N, Gougerot-Pocidalo MA, Payen DM. Alveolar neutrophil functions and cytokine levels in patients with the adult respiratory distress syndrome during nitric oxide inhalation. *Am J Respir Crit Care Med* 153:985-90, 1996.
7. Piantadosi CA, Schwartz DA. The acute respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med*; 141:460-70, 2004.
8. Gadek JE, Pacht ER. The interdependence of lung antioxidants and antiprotease defense in ARDS. *Chest* 110(6 Suppl):273-77, 1996.
9. Mizuta K, Xu D, Pan Y, Comas G, Sonett JR, Zhang Y, Panettieri RA Jr, Yang J, Emala CW Sr. GABA_A receptors are expressed and facilitate relaxation in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294(6): L1206-L1216, 2008.

10. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Tedavinin Farmakolojik Temeli, Goodman & Gilman (Çev. Ed: Öner Süzer) s 407, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul. 2009.
11. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 1. Cilt, 10. Basım, s 828, Hacettepe Taş Kitapçılık, Ankara, 2002.
12. Snyder SH, Verma A, Trifiletti RR. The peripheral-type benzodiazepine receptor: a protein of mitochondrial outer membranes utilizing porphyrins as endogenous ligands. FASEB J 1(4): 282-288, 1987.
13. Matsumoto T, Ogata M, Koga K, Shigematsu A. Effect of peripheral benzodiazepine receptor ligands on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor activity in thioglycolate-treated mice. Antimicrob Agents and Chemother 38(4): 812-816, 1994.
14. Kaynar G, Yurdakan G, Sipahi EY. Effects of the peripheral benzodiazepine receptor ligand Ro5-4864 in four animal models of acute lung injury. J Surg Res 182: 277-84, 2013.
15. Sipahi E, Hodoğlugil U, Ustün H, Zengil H, Türker RK, Ercan ZS. “An unexpected interaction between NG-nitro-L-arginine methyl ester and L-arginine in alpha naphthylthiourea-induced pulmonary oedema in rats” Eur J Pharmacol 321: 45-51, 1997.
16. Udobi KF, Childs E, Touijer K. Acute respiratory distress syndrome. Am Fam Physician 67(2):315-322, 2003.
17. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL. Report of the American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. Intensive Care Med 20: 225-232, 1994.
18. Artigas A., Bernard GR, Carlet J. The American, European consensus conference on ARDS, part 2: ventilatory, pharmacologic, supportive therapy, study design strategies, and Issues related to recovery and remodelling. Am J Respir Crit Care Med 157: 1332-47, 1998.

19. Jegal Y, Lee SI, Lee KH, Oh YM, Shim TS, Lim CM. The clinical efficacy of GOCA scoring system in patients with acute respiratory distress syndrome. *J Korean Med Sci* 23:383-9, 2008.
20. Çalışkan T, Çiftçi F. Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu (ARDS) Dün, Bugün, Yarın. *Yoğun Bakım Dergisi* 11(1): 13-20, 2013.
21. Mei SH, McCarter SD, Deng Y, Parker CH, Liles WC. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1. *PLoS Med* 4 (9): 1525-73, 2007.
22. Hudson LD, Steinberg KP. Epidemiology of ARDS. Incidence and outcome. A changing Picture. In: Marini JJ, Evans TW. *Acute Lung Injury*, Berlin, Springer, 3-15, 1999.
23. Brower RG, Matthay MA, Morris A, Schoenfeld D, Thompson BT, Wheeler A. The acute respiratory distress syndrome network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *NEJM* 342: 1301-8, 2000.
24. Atabai K, Matthay MA. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: definitions and epidemiology. *Thorax* 57: 452-8, 2002.
25. Lewandowski K, Metz J, Deutschmann C. Incidence, severity, and mortality of acute respiratory failure in Berlin, Germany. *Am J Respir Crit Care Med* 151:1121-5, 1995.
26. Luhr OR, Antonsen K, Karlsson M. and the ARF Study Group. Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1849-61, 1999.
27. Bersten AD, Edibam C, Hunt T, Incidence and Mortality of Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome in Three Australian States. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 443-8, 2002.

28. Calandrino FS Jr, Anderson DJ, Mintun MA, Schuster DP. Pulmonary vascular permeability during the adult respiratory distress syndrome: a positron emission tomographic study. *Am Rev Respir Dis* 138:421-8, 1988.
29. Ware LB, Matthay MA. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 163:1376-83, 2001.
30. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *NEJM* 342: 1334-49, 2000.
31. Günther A, Walmrath D, Grimminger F, Seeger W. Pathophysiology of acute lung injury. *Seminers in respiratory and critical care medicine* 22: 247-58, 2001.
32. Bellingan GJ. The pulmonary physician in critical care 6: The pathogenesis of ALI/ARDS. *Thorax* 57:540-6, 2002.
33. Folkesson HG, Matthay MA. Inhibition of CD18 or CD11b attenuates acute lung injury after acid instillation in rabbits. *J Appl Physiol* 82:1743-50, 1997.
34. Round Table Conference: Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 158:675-9, 1998.
35. Modelska K, Pittet JF, Folkesson HG. Acid- induced lung injury: protective effect of anti-interleukin-8 pretreatment on alveolar epithelial barrier function in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1450-6, 1999.
36. Greene KE, Wright JR, Steinberg KP, Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1843-50, 1999.
37. Matute-Bello G, Liles WC, Radella F 2nd, Steinberg KP, Ruzinski JT, Hudson LD, Modulation of neutrophil apoptosis by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor

during the course of acute respiratory distress syndrome. Crit Care Med 28:1-7, 2000.

38. Tomashefski JF Jr. Pulmonary pathology of the adult respiratory distress syndrome. Clin Chest Med 11:593-619, 1990.
39. Gattinoni L, Pelosi P, Brazzi L, Valenza F. Acute Respiratory Distress Syndrome. In: Albert RK, Spiro SG, Jett JR. Comprehensive Respiratory Medicine. 1st ed. Mosby Inc, London, 69.1-69.16, 1999.
40. Özvaran M K Malign mezotelyomada gen tedavisi. Toraks Dergisi, 5 (2): 110-115, 2004.
41. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. Pathol Annu. 17: 229-59, 1982.
42. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. Science 281: 1317-21, 1998.
43. Roshal M, Zhu Y, Planelles V Apoptosis in AIDS. Apoptosis, 6: 103-116, 2001.
44. Staley K, Blaschke A J, Chun J Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semiquantitative ligation-mediated PCR of blunt DNA ends. Cell Death and Differentiation, 4: 66-75, 1997.
45. Adams JM, Cory S. Life or death decions by the Bcl-2 family. Trends. Biochem Sci; 26:61-6, 2001.
46. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. Trends Biochem Sci; 26:390-7, 2001.
47. Erdoğan BB. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis. Akciğer arşivi, 4: 165-174, 2003.
48. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 35(4): 495-516, 2007.

49. Suda T, Nagata S. Purification and characterisation of the Fas ligand that induces Apoptosis. *J. Exp. Med.* 179:873-79, 1994.
50. Spierings DC de Vries EG, Vellenga E. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J. Histochem. Cytochem.* 52(6): 821-31;2004.
51. Öktem S, Özhan M H, Özöl D. Apoptozisin önemi. *Toraks dergisi*, 2 (1): 91-95, 2001.
52. Ow Y-L P, Green RD, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Vol 9:532-42, 2008.
53. Erişim adresi: Gewies A. Introduction to apoptosis: <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm>. Erişim tarihi: 17.01.2019
54. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis Controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Vol 9:231-41 March; 2008.
55. Barisic K, Petrik J, Rumora L. Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta Pharm.*, 53: 151-164, 2003.
56. Brouckaert G, Kalai M, Krysko D V, Saelens X, Vercammen D, Ndlovu M, Haegeman G, D'herde K, Vandenabeele P. Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Molecular Biology of the Cell*, 15: 1089-1100, .2004
57. Huppertz B, Frank H G, Kaufmann P. The apoptosis cascade; morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat. Embryol*, 200: 1-18, 1999.
58. Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47 (9): 1101-1109, 1999.
59. Walker NI, Harnon BW, Gobe GC, Kerr JF. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol.* 13: 18-54, 1988.

60. Wyllie AH. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 68: 251-306, 1980.
61. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Review* 14: 133-150, 1993.
62. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 32: 37-43, 2007.
63. Nicotera P, Bernassola F, Melino G. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 23: 2757-65, 2004.
64. Cotran RS, Robbins SL, Kumar V. *Robbins Basic Pathology*. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 4-31, 2002.
65. Hengartner MO, Ellis RE., Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356: 494-99, 1992.
66. Palmer AM. Greengrass PM. Cavalla D. The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News & Perspectives*, Vol. 13, No.6, 378-384, 2000.
67. Galluzi L, Aaronson SA, Abrams J. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* 16: 1093-1107; 2006.
68. Franz TA, Kidson SH. Mapping of interdigital apoptosis in the chick and duck hindlimb. *Embryology*. 93(2):85-94. 1997.
69. Baines CP. Role of the mitochondrion in programmed necrosis. *Front Physiol.* Nov 29;1:156, 2010.
70. Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* Jan 1;20(1):1-15, 2006.
71. Cepkova M, Matthay MA. Pharmacotherapy of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *J Intensive Care Med* 21:119-43, 2006.

72. Ünal N. Akut akciğer hasarı ve multi organ disfonksiyonu patogeneğinde mekanik ventilasyonun yeri ve mekanik ventilasyonda yeni strateji: Akciğer koruyucu ventilasyon. *Anestezi dergisi* 8(3): 160-74, 2000.
73. Mutate-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L379-L399, 2008.
74. Lopez-Aguilar J, Quilez ME, Marti-Sistac O, Garcia-Martin C, Fuster G, Puig F, Flores C, Villar J, Artigas A, Blanch L. Early physiological and biological features in three animal models of induced acute lung injury. *Intensive Care Med* DOI 10.1007/s00134-009-1695-x, 2009.
75. Matute-Bello G, Downey GB, Moore BD, Groshong S, Matthay MA, Slutsky A, et al. An Official American Thoracic Society Workshop Report: features and measurements of experimental acute lung injury animals. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44: 725-38, 2011.
76. Matute-Bello G, Matthay MA. Animal models of acute lung injury. <http://www.thoracic.org/clinical/critical-care/critical-care-research/animal-models-of-acute-lung-injury.php>, 2013.
77. Atalay F, Yurdakan G, Yilmaz-Sipahi E. The Effect of the endothelin receptor antagonist tezosentan on acute lung injury induced by alpha-naphthylthiourea in rats. *Kaohsiung J Med Sci* 28: 72-8, 2012.
78. Sipahi E, Ustun H, Niyazi Ayoglu F. Acute effects of thiopental, pentobarbital and urethane on lung oedema induced by alpha naphthylthiourea (ANTU). *Pharmacol Res* 45: 235-9, 2002.
79. Hancı V, Yurdakan G, Yurtlu S, Turan I, Sipahi EY. The protective effect of dexmedetomidine in a rat model of Alpha-naphthylthiourea (ANTU) induced acute lung injury. *J Surg Res* 178: 424-30, 2012.
80. Cunningham AL, Hurley JV. Alpha-naphthylthiourea-induced pulmonary edema in the rat: a topographical and electron microscopy study. *J Pathol* 106(1):25-35, 1972.

81. Minty BD, Scudder CM, Grantham CJ, Jones JG, Bakhle YS. Sequential changes in lung metabolism, permeability, and edema after ANTU. *J Appl Physiol* 62(2):491-6,1987.
82. Scott AM, Powell GM, Upshall DG. Pulmonary toxicity of thioureas in the rat. *Environ Health Perspect* 85: 43-50,1990.
83. Sipahi E, Hodoglugil U, Ercan ZS, and Türker RK. Acute effect of endothelin-1 on lung edema induced by alpha naphthylthiourea (ANTU). *Pharmacol Res* 33 (6): 375-378, 1996.
84. O'Brien RF, Makarski JS, Rounds S. Studies on the mechanism of decreased angiotensin I conversion in rat lungs injured with alpha-naphthylthiourea. *Exp Lung Res* 8(4): 243-59,1985.
85. Ercan ZS, Eren S, Zengil H, Türker RK. Possible involvement of eicosanoids in alpha-naphthylthiourea-induced pulmonary oedema and alteration of angiotensin-converting enzyme activity. *Pharmacology* 46(5):274-280, 1993.
86. Sipahi EY, Ozel Tekin I, Comert M, Barut F, Ustun H, Sipahi TH. Oxidized low-density lipoproteins accumulate in rat lung after experimental lung edema induced by alpha-naphthylthiourea (ANTU). *Pharmacological Research* 50(6):585-591, 2004.
87. Comert M, Sipahi EY, Ustun H, Isikdemir F, Numanoglu G, Barut F, Altunkaya H, Ozer Y, Niyazi Ayoglu F, Sipahi TH, Tekin IO, Banoglu ZN. Morphine modulates inducible nitric oxide synthase expression and reduces pulmonary oedema induced by alpha-naphthylthiourea. *Eur J Pharmacol* 511(2-3):183-189,2005.
88. Braestrup C. Squires, R.F. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H) diazepam binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3805–3809, 1977.

89. Frederick B, Sangeetha Sukumari-Ramesh. TSPO: An Evolutionarily Conserved Protein with Elusive Functions. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1694; doi:10.3390/ijms19061694, 2018.
90. Canat X, Carayon P, Bouaboula M, Cahard D, Shire D, Roque C, Le Fur G, Casellas P. Distribution profile and properties of peripheral-type benzodiazepine receptor on human hematopoietic cells. *Life Sci* 52: 107-118, 1993.
91. Bessler H, Weizman R, Gavish M, Notti I, Djaldetti M. Immunomodulatory effect of peripheral benzodiazepine receptor ligands on human mononuclear cells. *J Neuroimmunol* 38(1-2): 19-25, 1992.
92. Zavala F, Taupin V, Descamps-Latscha B. In vivo treatment with benzodiazepine inhibits murine phagocyte oxidative metabolism and production of interleukin-1, tumor necrosis factor and interleukin-6. *J Pharmacol Exp Ther* 255(2): 442-450, 1990.
93. Torres SR, Nardi GM, Ferrara P, Ribeiro-do-Valle RM, Farges RC. Potential role of peripheral benzodiazepine receptors in inflammatory responses. *Eur J Pharmacol* 385(2-3): R1-R2, 1999.
94. Sayın Aslıhan. Klinik Psikiyatri Sosyal Anksiyete Bozukluğunun Nörobiyolojisi 10(Ek 2):3-10, 2007.
95. Hauet T. Modulation of peripheral-type benzodiazepine receptor levels in a reperfusion injury pig kidney- graft model. *Transplantation* 74, 1507-1515, 2002.
96. Ducis I. The benzodiazepine receptor in cultured astrocytes from genetically epilepsy-prone rats. *Brain Res.* 531, 318-321, 1990.
97. Gavish M. Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacol. Rev.* 51, 629-650, 1999.

98. Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders. *Neuroscience* 138, 749-756, 2006.
99. Leonelli E. Ro5-4864, a synthetic ligand of peripheral benzodiazepine receptor, reduces aging associated myelin degeneration in the sciatic nerve of male rats. *Mech. Ageing Dev.* 126, 1159-1163, 2005.
100. Lacapere JJ, and Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis steroids. *68*: 569–585, 2003.
101. Costa E. The pharmacology of neurosteroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 49: 385–389, 1994.
102. Jamin N. Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Mol. Endocrinol* 19: 588–594, 2005.
103. Wright G. and Reichenbecher V. The effects of superoxide and the peripheral benzodiazepine receptor ligands on the mitochondrial processing of manganese-dependent superoxide dismutase. *Exp. Cell Res.* 246: 443–450, 1999.
104. Hauet T. Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into Leydig cell mitochondria. *Mol. Endocrinol.* 19: 540–554, 2005.
105. Taketani S. Induction of peripheral-type benzodiazepine receptors during differentiation of mouse erythroleukemia cells. A possible involvement of these receptors in heme biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 269: 7527–7531, 1994.
106. O'Hara MF. Mitochondrial transduction of ocular teratogenesis during methylmercury exposure teratology. *65*: 131–144, 2002.

107. Ostuni MA. Functional characterization and expression of PBR in rat gastric mucosa: stimulation of chloride secretion by PBR ligands. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286: G1069–G1080, 2004.
108. Galiegue S. Immunohistochemical assessment of the peripheral benzodiazepine receptor in breast cancer and its relationship with survival. *Clin. Cancer Res.* 10, 2058-2064, 2004.
109. Veenman L. and Gavish, M. The peripheral-type benzodiazepine receptor and the cardiovascular system: implications for drug development. *Pharmacol. Ther.* 110: 503–524, 2006.
110. Larcher JC. Effects of peripheral benzodiazepines upon the O₂ consumption of neuroblastoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* 161: 197–202, 1989.
111. Charlap JH. Exposure–disease continuum for 2-chloro-2'-deoxyadenosine, a prototype ocular teratogen. 3. Intervention with PK11195. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 67: 108–115, 2003.
112. Ritsner M. Decreased platelet peripheral-type benzodiazepine receptors in persistently violent schizophrenia patients. *J. Psychiatr. Res.* 37, 549-556, 2003.
113. Faure JP. Polyethylene glycol reduces early and longterm cold ischemia-reperfusion and renal medulla injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 861-870, 2002.
114. Veenman L. PK 11195 attenuates kainic acid-induced seizures and alterations in peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) components in the rat brain. *J. Neurochem.* 80:917–927, 2002.
115. Maaser K. Overexpression of the peripheral benzodiazepine receptor is a relevant prognostic factor in stage III colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 8, 3205- 3209, 2002.

116. Weisinger G. Peripheral benzodiazepine receptor antisense knockout increases tumorigenicity of MA-10 Leydig cells in vivo and in vitro. *Biochemistry* 43, 12315-12321, 2004.
117. Li H. Identification, localization, and function in steroidogenesis of PAP7: a peripheral-type benzodiazepine receptor- and PKA ($RI\alpha$)-associated protein. *Mol. Endocrinol.* 15: 2211–2228, 2001.
118. Zhang MR. Development of a new radioligand, N-(5-fluoro-2-phenoxyphenyl)-N-(2-[^{18}F] fluoroethyl-5-methoxybenzyl)acetamide, for PET imaging of peripheral benzodiazepine receptor in primate brain. *J. Med. Chem.* 47:2228–2235, 2004.
119. Chen MK. Peripheral benzodiazepine receptor imaging in CNS demyelination: functional implications of anatomical and cellular localization. *Brain.* 127: 1379–1392, 2004.
120. Papadopoulos V. Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends in Pharmacological Sciences* 27(8): 403-409, 2006.
121. Van Kammen DP. CSF diazepam binding inhibitor and schizophrenia: clinical and biochemical relationships. *Biol. Psychiatry* 34, 515-522, 1993.
122. Maaser K. Specific ligands of the peripheral benzodiazepine receptor induce apoptosis and cell cycle arrest in human colorectal cancer cells. *Br. J. Cancer* 85, 1771-1780, 2001.
123. Han Z. Expression of peripheral benzodiazepine receptor in human tumors: relationship to breast, colorectal and prostate tumor progression. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 23, 225-238, 2003.
124. Kletsas D. Peripheral-type benzodiazepine receptor and PBR drug ligands in fibroblast and fibrosarcoma cell proliferation: role of ERK, c-Jun and ligand-activated PBR-independent pathways. *Biochem, pharmacol.* 67, 1927-1937, 2004.

- 125.Hardwick M. Peripheral-type benzodiazepine receptor in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol. *Cancer Res.* 59, 831-842, 1999.
- 126.Ravagnan L. Lonidamine triggers apoptosis via a direct, Bcl-2-inhibited effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Oncogene* 18, 2537-2546, 1999.
- 127.Han Z, Slack RS, Li W, Papadopoulos V. Expression of peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in human tumors: Relationship to breast, colorectal, and prostate tumor progression. 23 (2-3): 225-38. 2003.
- 128.Dlamini Z, Mbele M, McCabe M, Rees J, Naicker S, Mbita Z. Significant up-regulation of 1-ACBP, B-ACBP and PBR genes in immune cells within the oesophageal malignant tissue and a possible link in carcinogenic Angiogenesis. 32(6):561-570.2017
- 129.Torre D, Minoja G, Marraggia D. Effect of recombinant IL-1 beta and recombinant gamma interferon on septic acute lung injury in mice. *Chest*; 105:1241,1994.
- 130.Calikoglu M, Tamer L, Sucu N. The effects of caffeic acid phenetyl ester on tissue damage in lung after hindlimb ischemia-reperfusion. *Pharmacol Res*;48:397, 2003.
- 131.Yalçın A. Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi Akut Respiratuar Distres Sendromu; 6(2): 146-156, 2018.
- 132.Erdem MK, Yurdakan G, Yilmaz-Sipahi E. The effects of ketamine, midazolam and ketamine/xylazine on acute lung injury induced by α -naphthylthiourea in rats. *Adv Clin Exp Med*.;23(3):343-51. 05-06 2014.
- 133.Jian Li, Hong Tan, Xiaona Zhou, Chunpan Zhang, Hua Jin, Yue Tian, Xinyan Zhao, Xinmin Li, Xuelian Sun, Meili Duan, Dong Zhang. The protection of midazolam against immune mediated liver injury induced by lipopolysaccharide and galactosamine in mice; 9,1528, 08 01 2019.

134. Helmy SA, Al-Attiyah RJ. The immunomodulatory effects of prolonged intravenous infusion of propofol versus midazolam in critically ill surgical patients. *Anaesthesia* 56, 4–8. 2001.
135. Zhao H, Chen H, Xiaoyin M, Yang G, Hu Y, Xie K, Yu Y. Autophagy Activation Improves Lung Injury and Inflammation in Sepsis. *Inflammation*. doi:10.1007/s10753-018-00952-5. 01 15 2019.
136. Sudhir Gupta, Sastry Gollapudi. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology Molecular mechanisms of TNF- α -induced apoptosis in aging human T cell subsets; 37 1034–1042, 2005.
137. SH. Audi, C. A. Dawson, S. B. Ahlf, D. L. Roerig. Lung Tissue Mitochondrial Benzodiazepine Receptors Increase in a Model of Pulmonary Inflammation *Lung* 180:241–250, 2002.

8. EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onayı



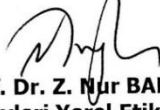
T.C.
Zonguldak Karaelmas Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

TOPLANTI TARİHİ : 25/01/2012
TOPLANTI NO : 2012/01

4- Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın, 2012-04-25/01 Protokol no'lu "Akut Akciğer Hasarında Periferik Benzodiazepin Ligandlarının İnflamasyon ve Apoptoz Üzerine Etkileri" konulu başvurusunun Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Z. Nur BANOĞLU".

Prof. Dr. Z. Nur BANOĞLU
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı

9. ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Zonguldak'da doğdu. İlköğrenimini Zonguldak İlköğretim Okulunda, orta öğrenimini Zonguldak Atatürk Anadolu Lisesi ve lise öğrenimini ise Zonguldak Fen Lisesi'nde tamamladı. 2004-2008 yıllarında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde lisans eğitimini tamamladı. 2009-2010 yıllarında Zonguldak Atatürk Devlet Hastanesi başeczacılığını yaptı. 2010 yılında halen sahibi ve mesul müdürlüğünü yaptığı Billur Eczanesi'ni açtı. 2011 yılında Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.

