

T.C.

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA ALFA-NAFTİLTİÖRE İLE
OLUŞTURULAN AKUT AKCİĞER HASARI MODELİ
ÜZERİNE HESPERİDİN'İN ETKİSİ**

OSMAN CENGİL

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DR.ÖĞR. ÜYESİ METE KEÇECİ

ZONGULDAK

2025

T.C.

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA ALFA-NAFTİLTİÖRE İLE
OLUŞTURULAN AKUT AKCİĞER HASARI MODELİ
ÜZERİNE HESPERİDİN'İN ETKİSİ**

OSMAN CENGİL

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DR.ÖĞR. ÜYESİ METE KEÇECİ

ZONGULDAK

2025

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince sabrı ve hoşgörüsü ile her zaman yanımda olup bilgilerini benimle paylaşan, önerileri ve görüşleri ile beni teşvik ederek desteğini hiç esirgemeyen tez danışmanım saygıdeğer hocam Dr. Öğretim Üyesi Mete KEÇECİ'ye, doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgisi ve tecrübesiyle her konuda görüş ve desteğini hiç esirgemeyen Ana bilim dalı başkanımız saygıdeğer hocam Prof. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH'a, doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bilimsel katkılarıyla desteğini sunan, Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü değerli hocam Prof. Dr. Zehra SAFİ ÖZ'e, çalışma süresince yardımlarını esirgemeyen lisansüstü eğitim gören tüm arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca hedeflerimi gerçekleştirmem için beni yüreklendiren, maddi ve manevi destekleri ile beni güçlü kılan kıymetli aileme ve her zorlukta yanımda olan, benimle mücadele eden, anlayış ve desteklerini hep hissettiğim, varlıklarıyla bu süreci kolaylaştıran hayat arkadaşım sevgili eşime sonsuz ve en içten duygularıyla teşekkür ediyorum.

Bu çalışma, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. (Proje Numarası: 2022-98210206-01).

Ayrıca bu çalışmada gerçekleştirilen Western Blot analizi TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı tarafından desteklenmiştir. (Proje Numarası:123S161).

Osman CENGİL

Ocak 2025, ZONGULDAK

ÖZET

Osman CENGİL, ‘Sıçanlarda Alfa-Naftiltioüre ile Oluşturulan Akut Akciğer Hasarı Modeli Üzerine Hesperidin’in Etkisi’, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji AD, Doktora Tezi, Zonguldak, 2025.

Çalışmamızda 16 haftalık 32 adet Wistar albino dişi sıçan kullanılmıştır. 7 gün boyunca her gün gavaj yoluyla Kontrol (KON) ve ANTU grubuna 1 ml fosfat tamponlu salin (PBS), Hesperidin (HES) ve Alfa-naftiltioüre+Hesperidin (ANTU+HES) grubuna ise PBS’de çözünmüş 100 mg/kg hesperidin verilmiştir. Ayrıca ANTU gruplarına 7. gün 4 mg/ml olacak şekilde zeytinyağında süspansiyon haline getirilen ANTU intraperitoneal (ip.) olarak uygulanmış ve 4 saat sonunda denekler kurban edilmiştir. ANTU gruplarında plevral aralıkta birikmiş olan efüzyon sıvısı (PE) miktarı ölçülmüştür. Deneklerden alınan sağ akciğer dokusunda Hematoksilen-Eozin (H&E) boyaması ile akciğer morfolojisi incelenmiştir ve hesperidin’in inflamatuvar yanıtı etkisini değerlendirmek için TNF- α , IL-1 β , iNOS, NF- κ B ve okludin ekspresyon düzeyleri immünohistokimyasal yöntemle çalışılmıştır. Deneklerden alınan sol akciğer dokusunda ise western blot ve MDA, SOD ve GPx biyokimyasal analiz düzeyleri incelenmiştir.

ANTU grubunda, alveoler boşlukta belirgin ödem, perivasküler genişleme, interstisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve alveolar septum kalınlaşması izlenmiştir ve okludin hariç tüm ifadeler daha yüksek seviyede saptanmıştır. ANTU+HES grubunda, sınırlı alanlarda hasar gözlenirse de hesperidin bu hasarı anlamlı düzeyde azaltmıştır.

Çalışmamız, hesperidin tedavisinin oksidatif stresi azaltarak ve inflamatuvar mediyatörlerin üretimini engelleyerek ANTU aracılı akciğer hasarını önlediğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: ARDS, Alfa-naftiltioüre, Akciğer, Hesperidin, Oksidatif stres, İnflamasyon

İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

Osman CENGİL, 'The Effect of Hesperidin on an Acute Lung Injury Model Induced by Alpha-Naphthylthiourea in Rats', Zonguldak Bülent Ecevit University, Institute of Health Sciences, Department of Histology and Embryology, PhD Thesis, Zonguldak, 2025.

In our study, 32 Wistar albino female rats aged 16 weeks were used. Control (CON) and ANTU groups were given 1 ml phosphate buffered saline (PBS), Hesperidin (HES) and Alpha-naphthylthiourea+Hesperidin (ANTU+HES) groups were given 100 mg/kg hesperidin dissolved in PBS by gavage every day for 7 days. In addition, ANTU suspended in olive oil was administered intraperitoneally (ip) to ANTU groups on the 7th day at a dose of 4 mg/ml and the rats were sacrificed after 4 hours. The amount of effusion fluid (PE) accumulated in the pleural space in ANTU groups was measured. Lung morphology was examined with Hematoxylin-Eosin (H&E) staining in the right lung tissue taken from the subjects and TNF- α , IL-1 β , iNOS, NF- κ B and occludin expression levels were studied by immunohistochemical method to evaluate the effect of hesperidin on the inflammatory response. Western blot and MDA, SOD and GPx biochemical analysis levels were examined in the left lung tissue taken from the subjects.

In the ANTU group, significant edema in the alveolar space, perivascular expansion, inflammatory cell infiltration in the interstitium and alveolar septum thickening were observed and all expressions except occludin were detected at higher levels. Although damage was observed in limited areas in the ANTU+HES group, hesperidin significantly reduced this damage.

Our study demonstrated that hesperidin treatment prevented ANTU-mediated lung injury by reducing oxidative stress and inhibiting the production of inflammatory mediators.

Key Words: ARDS, Alpha-naphthylthiourea, Lung, Hesperidin, Oxidative stress, Inflammation

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ KABUL VE ONAY:.....	iii
ÖNSÖZ	iv
ÖZET.....	v
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİL DİZİNİ	xii
TABLO DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akciğer Anatomisi	3
2.1.1. Akciğerin damarları	7
2.1.2. Akciğerin lenfatikleri.....	8
2.1.3. Akciğerin sinirleri	10
2.1.4. Plevra	11
2.2. Akciğer Embriyolojisi	11
2.2.1. Solunum sistem primordiyumu.....	11
2.2.2. Akciğerlerin gelişimi	12
2.2.3. Akciğerlerin olgunlaşması	14
2.3. Akciğer Histolojisi	16
2.3.1. Solunum sisteminin iletili bölümü	17
2.3.1.1. Bronşlar	24
2.3.1.2. Bronşiyoller.....	25
2.3.1.3. Terminal bronşiyoller.....	25
2.3.2. Solunum sisteminin solunum (respiratuar) bölümü.....	26
2.3.2.1. Respiratuar bronşiyoller	26
2.3.2.2. Alveol kanal (duktus alveolaris)	26
2.3.2.3. Alveol keseler (sakkus alveolaris)	26
2.3.2.4. Alveoller.....	27
2.4. Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu (ARDS)	30
2.4.1. ARDS patofizyolojisi.....	32

2.4.1.1. ARDS patogenezinin aşamaları	33
2.4.1.2. ARDS patofizyolojisindeki mediatörler.....	34
2.4.2. ARDS tedavi	38
2.4.3. ARDS deneysel hayvan modelleri.....	39
2.4.4. Alfa-Naftiltioüre (ANTU).....	40
2.5. Serbest Radikaller.....	42
2.5.1. Serbest radikallerin tipleri.....	42
2.5.2. Serbest radikallerin kaynakları	44
2.5.3. Anti-oksidan savunma sistemi	45
2.6. İnflamasyon	47
2.6.1. İnterlökin 1 beta	47
2.6.2. Tümör nekroz faktörü- α	48
2.6.3. Nükleer faktör-kappa B	49
2.6.4. iNOS	50
2.6.5. Okludin	51
2.7. Flavonoid.....	51
2.7.1. Hesperidin.....	53
2.7.2. Hesperidin oksidatif stres.....	55
2.7.3. Hesperidin inflamasyon etkisi	56
2.7.4. Damar sistemi üzerindeki etkiler	57
2.7.5. Diğer etkileri	57
3. GEREÇ VE YÖNTEM	59
3.1. Deney Hayvanları.....	59
3.2. Akut Akciğer Hasarı Deney Modelinin Oluşturulması	59
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	59
3.4. Vücut Ağırlıklarının Ölçülmesi	60
3.5. Doku Örneklerinin Alınması	60
3.6. Akciğer Ağırlığı ve Plevral Efüzyon Hesaplama	61
3.7. Akciğer Doku Takibi.....	62
3.8. Bloklardan Kesit Alınması ve Boyama	63
3.9. Histolojik Değerlendirme ve Akciğer Hasarın Skorlanması	69
3.10. İmmünohistokimyasal İncelemeler	69
3.11. Western Blot Analiz	72

3.12. Biyokimyasal Analizler	75
3.12.1. Akciğer dokusunda MDA seviyesi (nmol/L).....	75
3.12.2. Akciğer dokusunda SOD seviyesi (U/ml)	76
3.12.3. Akciğer dokusunda GPx seviyesi (U/L)	76
3.13. İstatiksel Analiz	76
4. BULGULAR.....	78
4.1. Akciğer Ağırlığı/Vücut Ağırlığı (AA/VA) (g/g) ve Plevral Efüzyon/Vücut Ağırlığı (PE/VA) (ml/g) Oranlarına Ait Bulgular	78
4.2. Biyokimyasal Bulgular	80
4.3. Histolojik Bulgular	84
4.3.1. Hematoksilen+ Eozin (H&E) boyama	84
4.3.2. Gruplara göre akciğer skorlamasının istatistiksel analizi	96
4.3.3. PAS	99
4.3.4. Masson Trikrom.....	101
4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular	102
4.5. Western Blot Analiz Bulguları	111
5. TARTIŞMA	113
6. SONUÇLAR	119
KAYNAKLAR	121
EKLER.....	141
ÖZGEÇMİŞ	142

SİMGELER VE KISALTMALAR

AECC	Amerika-Avrupa Konsensüs Konferansı
ALI	Akut Akciğer Hasarı
ANTU	Alfa-Naftiltioüre
ANTU+HES	Alfa-Naftiltioüre + Hesperidin
ARDS	Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu
BALF	Bronkoalveolar Lavaj Sıvısında
BALT	Bronşla İlişkili Lenfoid Doku
CRP	C-Reaktif Protein
DAH	Diffüz Alveolar Hasar
DNES	Difüz Nöroendokrin Sistem Hücresi
ELISA	Enzim Bağlı İmmünosorbent Analizi
ER	Endoplazmik Retikulum
FİO ₂	İnspire Edilen Oksijen Oranı
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSSG	Oksitlenmiş Glutasyon
H&E	Hematoksilen Eozin
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HES	Hesperidin
HNE	4-Hidroksi-2-Nonenal
H-SKOR	Histolojik Skor
IL-1 β	İnterlökin 1 Beta
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
İP	İntraperitoneal
KON	Kontrol
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LPS	Lipopolisakkarit
MDA	Malondialdehit
MIF	Makrofaj Hareketlilik İnhibitör Faktörü

MPO	Miyeloperoksidaz
NF- κ B	Nükleer Faktör-Kappa B
NMBA	Nöromüsküler Bloke Edici Ajan
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentazlar
OH ⁻	Hidroksil Radikali
PAO ₂	Parsiyel Oksijen Basıncı
PAS	Periyodik Asit Schiff
PBS	Fosfat Tamponlu Salın
PDE	Fosfodiesteraz
PE	Plevral Efüzyon
PMN	Polimorfonükleer Lökosit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Superoksit Dismutaz
T-AOC	Toplam Anti-Oksidan Kapasite
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TJ	Sıkı Bağlantı
TNFR	Tnf Reseptörü
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
ZBEÜ	Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi
ZO	Zonula Okludens

ŞEKİL DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. Akciğer anatomisi.	3
2. Akciğer lenfatik damar ve düğümleri.	10
3. Solunum divertikülünün gelişimsel evreleri.	12
4. Akciğer tomurcukları, bronşlar ve akciğerlerin gelişim evreleri.	14
5. Bronşiyal ağacın bölümleri ve histolojik özellikleri.	29
6. ARDS patofizyolojisinde etkili mediatörler	35
7. Alfa-naftiltioürenin yapısal formülü	40
8. NF-κB'nin biyolojik süreçlerdeki rolü	50
9. Hesperidinin kimyasal yapısı	54
10. Kolonda hesperidin metabolizması.	55
11. Tüm gruplara ait makroskopik akciğer görüntüleri.....	61
12. Tüm gruplara ait makroskopik akciğer görüntüleri ve plevral efüzyon sıvısı.	78
13. AA/VA oranlarının gruplar arası karşılaştırması.	79
14. PE/VA oranlarının gruplar arası karşılaştırması.	80
15. MDA seviyesinin gruplar arası karşılaştırması.	81
16. SOD enzim seviyesinin gruplar arası karşılaştırması.....	82
17. GPx enzim seviyesinin gruplar arası karşılaştırması..	83
18. Kontrol grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri.	84
19. Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri.	85
20. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X5.....	86
21. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X5.....	86
22. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X10.....	87
23. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X10.....	87
24. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X20.....	88
25. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X20.....	88
26. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X40.....	89
27. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X40.....	89
28. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X40.....	90
29. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X40.....	90
30. ANTU+Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X5.	91
31. ANTU+Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X5.	92
32. ANTU+Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X10.	92
33. ANTU+Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X10.	93
34. ANTU+Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X20.	93

35. ANTU+Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X20.	94
36. ANTU+Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X40.	94
37. ANTU+Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X40.	95
38. ANTU+Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X40.	95
39. Ödemin gruplar arası karşılaştırması.	97
40. İnteralveoler septum kalınlığının gruplar arası karşılaştırması.	97
41. İnterstisyel inflamatuvar hücre sayısının gruplar arası karşılaştırması.	98
42. Vakuolizasyonun gruplar arası karşılaştırması.	98
43. Tüm gruplara ait akciğer dokularının PAS boyama görüntüleri.	100
44. Tüm gruplara ait akciğer dokularının Masson trikrom boyama görüntüleri.	101
45. Tüm gruplara ait akciğer dokularının IL-1 β proteini için yapılan immünohistokimyasal boyama görüntüleri X20.	102
46. IL-1 β boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması.	103
47. Tüm gruplara ait akciğer dokularının NF- κ B proteini için yapılan immünohistokimyasal boyama görüntüleri X20.	104
48. NF- κ B boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması.	105
49. Tüm gruplara ait akciğer dokularının TNF- α proteini için yapılan immünohistokimyasal boyama görüntüleri X20.	106
50. TNF- α boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması.	107
51. Tüm gruplara ait akciğer dokularının iNOS proteini için yapılan immünohistokimyasal boyama görüntüleri X20.	108
52. iNOS boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması.	109
53. Tüm gruplara ait akciğer dokularının okludin proteini için yapılan immünohistokimyasal boyama görüntüleri.	110
54. Okludin boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması.	111
55. Okludin western blot analiz bant görüntüleri.	112
56. Okludin western blot analiz bulguların gruplar arası karşılaştırması.	112

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1. Solunum sisteminin histolojik olarak sınıflandırılması	17
2. ARDS'nin etiyolojik rijs faktörleri	32
3. Akciğer Doku Takip Aşamaları	62
4. Akciğer Dokusu İçin Uygulanan H&E Boyama Protokolü	64
5. Akciğer Dokusu İçin Uygulanan Masson Trikrom Boyama Protokolü.....	66
6. Akciğer Dokusu İçin Uygulanan PAS Boyama Protokolü	68
7. Akciğer hasar skorlaması kriterleri	69
8. Akciğer Dokusu İçin Uygulanan İmmünohistokimyasal Yöntem Protokolü	71
9. AA/VA oranlarının gruplar arası karşılaştırması	79
10. PE/VA oranlarının gruplar arası karşılaştırması	80
11. MDA seviyesinin gruplar arası karşılaştırması	81
12. SOD seviyesinin gruplar arası karşılaştırması	82
13. GPx seviyesinin gruplar arası karşılaştırması	83
14. Tüm gruplara ait akciğer skorlaması sonuçları.	96
15. IL-1 β boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması	102
16. NF-kB boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması	104
17. TNF- α boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması.....	106
18. iNOS boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması	108
19. Okludin boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması	111

1. GİRİŞ

Akut akciğer hasarı (ALI), ilerleyici hipoksemi, dispne ve artan solunum sayısı ile kendini gösteren bir hastalıktır. ALI'de klinik tablo pek çok farklı şekilde tanımlansa da günümüzde orta veya hafif akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) olarak yeniden isimlendirilmiştir (1).

ARDS; pnömoni veya aspirasyonun yanı sıra sepsis, travma ve yanıklar, boğulma, aşırı dozda ilaç, yağ embolisi, toksik dumanların solunması, kardiyopulmoner by-pass ve pankreatit gibi çeşitli nedenlere bağlı olarak doğrudan veya dolaylı akciğer hasarının olduğu ve esasen alveolo (epitel)- kapiller (endotel) bariyerde permeabilite artışına ikincil gelişen non-kardiyojenik pulmoner ödem ve iki taraflı akciğer infiltrasyonu ve ciddi ilerleyici hipoksemi ile karakterize olan akut bir hastalıktır (2-4).

ARDS patogeneğinde birçok hücrel ve biyokimyasal mediyatör rol oynamaktadır. Bu faktörlerden biri de proinflamatuvar sitokinlerdir. Akciğerdeki inflamatuvar hücreler, alveoler epitel hücreleri ve fibroblastlardan salınan tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinler doku için toksik enzimlerin ve serbest oksijen ürünlerinin ortaya çıkmasına neden olarak ARDS'de önemli bir rol oynar. Böylece alveol ve kapiller hasarla giden bir dizi olaylar zinciri başlar. Normalde alveol epitel hücrelerinin arasındaki sıkı bağlantılar sıvının alveoler alana geçişini engellerken inflamatuvar mediyatörlerin neden olduğu lökosit aktivasyonu sonucunda ortaya çıkan reaktif oksijen ürünleri ve proteazlar, kapiller endotel ve alveol epiteline zarar verirler ve böylece alveolo-kapiller bariyer özelliğini kaybeder (4, 5).

Doğal ürünler ve bu kaynaklardan elde edilen biyoaktif moleküller geleneksel tedavi yöntemlerine ek olarak veya alternatif olarak kullanılmakta ve daha az yan etkiyle birçok hastalığın yönetiminde umut verici sonuçlar sunmaktadır. Flavanon grubuna giren bir flavonoid ailesinden bir üye olan hesperidin, doğal ürünlerden izole edilen ve çeşitli biyolojik aktivitelere sahip bir biyoaktif molekül olarak, farmakolojik araştırmaların odağında yer almaktadır. Özellikle inflamatuvar hastalıklar ve oksidatif stresle ilişkili patolojilerde potansiyel terapötik etkileri nedeniyle ilgi görmektedir (6).

Flavonlar, flavonoller veya izoflavonlar gibi diğer bazı yaygın flavonoid gruplarından farklı olarak flavanonlar, genel flavonoid yapısının C halkasındaki 2 ve 3 pozisyonları arasındaki çift bağdan yoksundur (7). Portakal (*Citrus sinensis*), greyfurt (*Citrus paradisi*), mandalina (*Citrus reticulata*), limon (*Citrus aurantifolia*) ve limon (*Citrus limon*) gibi turunçgiller zengin bir hesperidin kaynağıdır (8, 9). Turunçgil türlerine ek olarak çeşitli bitkilerde hesperidin bulunduğuna dair çalışmalar vardır (10, 11). Hesperidinin güçlü bir anti-oksidan, anti-inflamatuar, anti-aterosklerotik, kardiyoprotektif, nöroprotektif, anti-alerjik, anti-viral, anti-mikrobiyal ve anti-kanser bileşiği olarak geniş bir yelpazede farmakolojik aktivite gösterdiği gösterilmiştir (8, 11).

Kimyasal açıdan hesperidin yapısı, rutinoza bağlı metil eriodiktyol (hesperetin) olarak bilinen bir aglikonu barındırır. Hesperidin, neohesperidoz ve rutinoz olmak üzere iki izomerik formda bulunan bir disakkarit (glikoz ve ramnoz) olan bir glikozit parçasını içerir (12). Hesperidinin anti-oksidatif, şelatlayıcı ve güçlü indirgeyici özelliklerinin yanı sıra hidroksil, hidrojen peroksit, süperoksit ve serbest radikal temizleme aktiviteleri konsantrasyona bağlı olarak ortaya çıkmakta ve radikal moleküllere hidrojen donörü gibi davranan kimyasal yapısından kaynaklanmaktadır. B halkasındaki 300-hidroksi, 400-o-metoksi sisteminin varlığı sayesinde anti-oksidan radikaller ile lipid radikalleri arasında yeni komplekslerin oluşmasında radikal hedef rol oynamıştır (13, 14).

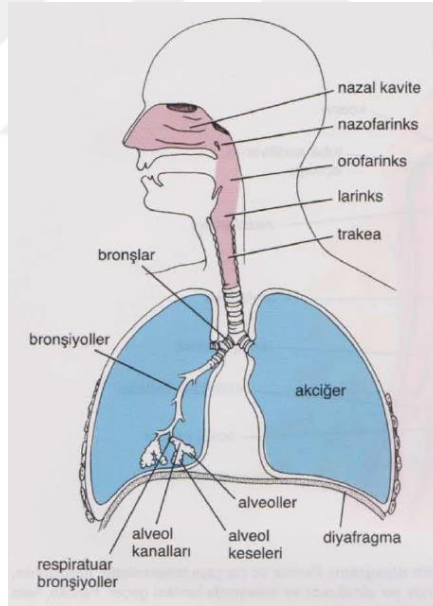
Rodendisit olarak tiyoureden geliştirilen ANTU, pulmoner ödem ve plevral efüzyon geliştirerek, akut akciğer yetmezliği ile ölüme neden olan kimyasal bir ajandır. Literatür çalışmalarında, ANTU'nun akciğer hasar mekanizmasındaki hedef yapısının kapiller endotel hücreleri hasarı oluşturarak endotel bariyer fonksiyonunun ortadan kalkmasıyla kapiller permeabilitenin artmasına ve sonuçta interstisyel ve alveoler ödem gelişimine neden olduğu gösterilmiştir. Sıçan deneysel modellerinde ip. olarak ANTU uygulaması sonrası 4. saatte akciğer ödemi ve plevral efüzyonun maksimum düzeye ulaştığı gösterilmiştir (15,16).

Çalışmamızda; kuvvetli anti-oksidan ve anti-inflamatuar özellikleri olan hesperidinin ANTU ile indüklenen akut akciğer hasarı üzerindeki etkisini oksidatif mekanizma ve inflammatuar yollar üzerinden araştırmayı amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Anatomisi

Solunum sistemi, temel gazların taşınmasından ve değiştirilmesinden sorumlu olan vücudumuzun hayati öneme sahip sistemlerinden biri olup, hava iletilici yollar ve akciğerler olmak üzere iki temel bölümden oluşur (17). Hava iletilici yollar, oksijenin dış ortamdan alınıp akciğerlere, karbondioksitin ise akciğerden alıp dış ortama iletilmesini sağlayan boru şeklindeki yapılardır. Akciğerler ise bu hava iletilici yolların son durağı olup, hava yollarındaki hava ile kılcal damarlardaki kan arasında oksijen ve karbondioksit alışverişinin yapıldığı gaz değişim organlarıdır (18). Solunum sisteminin bu iki ana bölümü, vücudumuzdaki tüm hücrelerin oksijenle beslenmesini ve karbondioksitten arınmasını sağlar. Solunum sistemini oluşturan organlar üst ve alt solunum yolları olmak üzere ikiye ayrılır (17, 18).



Şekil 1. Akciğer anatomisi (19).

Üst solunum yolu burun, paranasal sinüsler ve nazofarenksten oluşur (Şekil 1). Burun, soluduğumuz havayı filtrelemek, ısıtmak ve nemlendirmek için birincil organdır. Paranasal sinüsler, kafatasının kemiklerinde bulunan ve burun boşluğuna bağlı olan içi boş boşluklardır. Hava yollarını nemlendirmeye ve korumaya yardımcı olan mukus üretmeye yardımcı olurlar. Nazofarenks, farenksin burnun arkasında

bulunan kısımdır. Burundan gelen havanın solunum yollarına girdiği yerdir (17, 18, 20).

Alt solunum yolu larenks, trakea, bronşlar ve akciğerlerden oluşur (Şekil 1). Larenks, ses üreten organdır. Trakea veya nefes borusu, larenksi akciğerlere bağlayan uzun ve dar bir tüptür. Bronşlar, akciğerlere girerken daha küçük ve daha küçük tüplere ayrılan trakeanın dallarıdır. Akciğerler, hava yollarındaki hava ile kılcal damarlardaki kan arasında oksijen ve karbondioksit alışverişinin yapıldığı gaz değişim organlarıdır (17, 18, 20).

Solunum sistemi fonksiyonel olarak ise iki bölüme ayrılır;

İletici Bölüm: Havanın gaz değişiminin gerçekleştiği bölgelere girmeden önce uygun hale getirildiği bölüm olup burun, farinks, larinks, trakea, bronşlar ve terminal bronşiooller oluşur (19, 21).

Respiratuar Bölüm: Hava ile kan arasında gaz değişiminin gerçekleştiği bölüm olup, respiratuar bronşioelleri, duktus alveolaris (alveol kanalları), saccus alveolaris (alveol keseleri) ve alveollerini kapsar (19, 21).

Akciğerler, göğüs boşluğunda önde kaburgalar arkada columna vertebralis ve altta diyafram ile sınırlı süngerimsi, genişleyebilen organlardır. Plevral zar içinde serbestçe asılı dururlar ve birbirlerinden mediastinumla sağ ve sol akciğer olarak ikiye ayrılır. Sağ akciğer sol akciğerden biraz daha kısa ve geniştir. Bu farklılıklar karaciğerin sağ hemidiyafragma altında bulunmasından ve kalbin sol tarafta yerleşiminden kaynaklanmaktadır. Genel olarak sağ akciğer, sol muadilinden daha büyüktür. Sağ akciğer yaklaşık 650 gram ağırlığında iken, sol akciğer ise 550 gramdır (20). Erkeklerde akciğerler vücut ağırlığının yaklaşık olarak 1/37'sini oluştururken, kadınlarda ise yaklaşık olarak 1/43'ünü oluşturur (18, 20).

Plevra, her bir akciğeri çevreleyen seröz bir zardır. Akciğere dış yüzeyine yapışık visseral plevra ve göğüs iç duvarına yapışık parietal plevra olmak üzere iki katmandan oluşur. İki tabaka arasında içerisinde seröz sıvı ile dolu plevral boşluk vardır. Seröz sıvı yüzeyleri yağlamaya ve nefes alma sırasında sürtünmeyi azaltmaya yardımcı olur (18-20).

Akciğer renginde yaşam boyunca bazı değişiklikler görülür. İntrauterin dönemde fonksiyon görmeyen akciğer kahverengi kırmızı, doğumda fonksiyon görerek ilk nefes alma ile içerisine çok miktarda kan girmesi ile gül pembesi renk alır. Yaş ilerlemesi ile gri-siyah renkte lekeler meydana gelir (20).

Akciğerler, anatomik olarak bir apeks, üç kenar ve üç yüzeye sahip olarak tanımlanırlar. Ayrıca, loblara ve bölümlere ayrılırlar (17, 18, 20).

Her bir akciğer, tepesi ve tabanı olan irregüler bir koni şeklindedir. Akciğerlerin tepe noktası, boyun köküne uzanan yuvarlak tepedir. Apex pulmonis olarak da adlandırılır. Apex pulmonis yaklaşık 2.5 ila 4 cm uzunluğundadır ve birinci kaburga seviyesinin üzerinde çıkıntı yapar. Boyun ile toraks arasındaki açıklık olan superior torasik girişte bulunur. Akciğerlerin tabanı, diyaframın üzerinde duran yaklaşık 10 ile 12 cm genişliğinde, içbükey kısımdır. Basis pulmonis olarak da adlandırılır. Her bir akciğerin mediastenindeki yapıları akciğerlere bağlayan kısa tübüler yapılara radix pulmonis denir. Mediasten, kalbi, büyük damarları, trakeayı, yemek borusunu ve diğer yapıları içeren göğsün merkezi kısmıdır. Radix pulmonis, pulmoner arter, pulmoner ven, bronşiyal arter, bronşiyal ven ve akciğerleri besleyen sinirleri içerir (17, 18, 20).

Akciğer anterior, inferior ve posterior kenarlarını içerir ve akciğerlerin sırasıyla vücudun önüne, altına ve arkasına bakan kenarlarıdır. Akciğerin anterior kenarı en görünür kenardır ve plevral yansımaya karşılık gelir. Sternum ve kaburgalar boyunca bulunur. Sol akciğerde bir kardiyak çentik oluşturur. Kardiyak çentik, akciğerde kalbe uyum sağlamak için oluşan bir içbükeyliktir. Inferior kenar diaphragmatik ve kostal yüzleri birleştiren keskin ve ince alt kenardır. Posterior kenar arkada, kostal yüz ile mediastinal yüzü birleştiren kalın ve küt kenardır (18, 20).

Her bir akciğerin kostal, mediastinal ve diaphragmatik olmak üzere üç yüzeyi vardır. Facies costalis; kostal plevra ile kaplıdır ve sternum ve kaburgalar boyunca uzanan konveks dış yüzüdür. Facies mediastinalis; Akciğerlerin mediastinuma dolayısıyla birbirine bakan iç yüzleridir. Akciğer hilusunu içerir ve anterior ve posterior olarak bölünmüştür. Önde sternumla, arkada vertebra ilişkilidir. Facies diaphragmatica; konkavdır ve diyaframın kubbesine dayanır.

Hilum, akciğerin mediastinal yüzeyinin merkezinde çökük bir yüzeydir ve beşinci ile yedinci torasik omurun önünde yer alır. Sinir ve damarların akciğere girip çıktığı noktadır.

Sağ ve sol akciğer anatomisi benzer ancak asimetriktir. Sağ akciğer üç lobdan oluşur: sağ üst lob, sağ orta lob ve sağ alt lob. Sol akciğer iki lobdan oluşur: sol üst lob ve sol alt lob. Sağ lobda, fissura obliqua, alt lobu, üst ve orta lobundan ayırır, fissura horizontalis ise üst lobu orta lobdan ayırır. Sol lobda sadece üst ve alt lobu ayıran fissura horizontalis vardır (18, 20). Loblar ayrıca spesifik segmental bronşlarla ilişkili segmentlere ayrılır. Segmental bronşlar, ana bronştan çıkan ikinci sıradaki dallardan (lobar bronşlar) çıkan üçüncü sıradaki dallardır. Sağ akciğer on segmentten (üst 3 segment, orta 2 segment alt 5 segment), sol akciğerde ise lobun bölünmesine bağlı olarak sekiz ila dokuz segment (üst 4 segment, alt 4-5 segment) vardır (20).

Akciğerlerde, trakea beşinci torakal vertebra'nın üst kenarı seviyesinde sağ ve sol ana bronş olmak üzere ikiye ayrılır. Bronşlar, trakeadan akciğerlere hava taşıyan iki büyük tüptür. Ekstrapulmoner ve intrapulmoner olmak üzere iki kategoriye ayrılırlar. Ekstrapulmoner bronşlar, akciğerlerin dışında bulunan sağ ve sol ana bronşlardır. İntrapulmoner bronşlar, akciğerlerin içinde bulunan bronşların daha küçük dallarıdır. Akciğerlerdeki en küçük hava yolları olan bronşiyollere ulaşana kadar dallanmaya devam ederler (18, 20).

Sağ ana bronş sol ana bronştan daha geniş, daha kısa ve daha diktir. Bunun nedeni sağ akciğerin sol akciğerden daha büyük olmasıdır. Sağ ana bronş da kanı baş ve boyuna taşıyan büyük bir atardamar olan arkus aortanın altından geçer. Sol ana bronş yemek borusu ve torasik aortun önünden geçer (20).

Bronşlar, hava yollarını enfeksiyondan korumaya yardımcı olan bir mukoza zarı ile kaplıdır. Ayrıca hava akışındaki değişikliklere yanıt olarak bronşların daralmasına ve genişlemesine izin veren düz kas içerirler. Bronşlar, gaz değişiminin gerçekleştiği küçük hava kesecikleri olan alveollere hava taşıyarak solunum sisteminde önemli bir rol oynar. Bronşlar ayrıca akciğerleri enfeksiyondan korumaya yardımcı olur.

Ana bronşlar akciğer hilusuna girerek akciğerde dallanarak bronşiyal ağacı oluşturur. Her bir ana bronş, lobar bronşlara ayrılır. Lobar bronşlar da daha sonra

segmental bronşlara bölünür. Terminal bronşiyoller, respiratuar bronşiyoller, alveoler duktus, alveoler kese ve son olarak pulmoner alveollere doğru giderek daralmaktadır. Lobar bronşların çapı 7-12 mm iken segment bronşların çapı 4-7 mm kadardır. Bronşiyollerde kıkırdak bulunmaz. Bronşlar, hilusta 7-8 ve periferde 10-14 çatallanma ile terminal bronşiyollere ulaşır. Terminal bronşiyollerin çapı 0,5 mm kadardır (18, 20, 21).

Terminal bronşiyollerin çatallanmasıyla respiratuar bronşiyoller oluşur. Respiratuar bronşiyollerin distalinde bulunan akciğer ünitesine asinüs denir. Asinüs, gaz alışverişinin gerçekleştiği akciğerin en küçük fonksiyonel ünitesidir. Akciğerde yaklaşık 20-30 bin asinüs bulunur. Respiratuar bronşiyollerin distalinde alveol kanalı ve keseler bulunur. Bu yapılar kıkırdak veya bez içermez, ancak kas hücreleri ve bağ dokusu lifleri bulunur. Her bir respiratuar bronşiyolden 3-8 alveol kanalı çıkabilir. Her bir asinüste 800 kadar alveol kanalı ve akciğerlerde yaklaşık 300 milyon alveol olduğu tahmin edilmektedir (20).

2.1.1. Akciğerin damarları

Akciğerler, gaz değişimi ve akciğerlerin kendilerinin desteklenmesi için gerekli olan ikili bir kan kaynağına sahiptir ve pulmoner ve sistemik dolaşım olarak adlandırılır. Pulmoner dolaşım, oksijeni giderilmiş kanı gaz değişimi için akciğerlere getirmekten sorumludur, sistemik dolaşım ise akciğer parankimine oksijenli kan sağlar.

Pulmoner dolaşım, pulmoner arterlerin sağ ventrikülden akciğerlere oksijeni giderilmiş kanı taşıdığı düşük basınçlı bir sistemdir. Pulmoner arterler, bronşları takip ederek akciğerlere giden daha küçük dallara ayrılır ve burada alveolleri çevreleyen bir kılcal damar ağı oluştururlar. Alveollerdeki havadaki oksijenin kana yayılması ve kandaki karbondioksitin alveollere difüzyonu ile gaz değişimi burada gerçekleşir. Oksijenli kan daha sonra dört pulmoner ven yoluyla kalbin sol atriyumuna geri döner (20).

Sistemik dolaşım, bronşiyal arterler yoluyla akciğer parankimine oksijenli kan sağlar. Bronşiyal arterler, aortun bronşları, bronşiyolleri ve akciğerlerdeki diğer

yapıları besleyen dallarıdır. Bronşiyal damarlar akciğer parankimini boşaltır ve kanı azigos damarı veya superior vena kava yoluyla kalbe geri döndürür.

Sağ ventrikül oksijeni giderilmiş kanı pulmoner arterler aracılığıyla akciğerlere pompalar. Bu damarlar, her bir akciğere bir damar vermek üzere superior vena kavanın arkasında çatallanırken pulmoner gövdeden çıkar. Her pulmoner arter dallar oluşturmak üzere bölünmeye uğrar ve akciğer içinde bronşları takip ederek dış ve arka yüzlerde ilerler ve respiratuvar bronşiyollerin düzeyinde kapiller damarlar haline gelir (18).

Alveol duvarları içindeki kapiller ağlar, pulmoner venöz dolaşımı oluşturmak için distal olarak birleşir. Her bir bronkopulmoner segment içindeki çok sayıda segment içi damar, segmental venleri oluşturmak için birleşir. Segmentler arasındaki damarlar daha sonra her lobda daha büyük soliter damarları oluşturmak için birleşir. Her akciğerden iki pulmoner ven çıkar ve düşük basınçlı damarlar, oksijenli kanı sol atriyuma geri götürür (18, 20).

Bronşiyal arterler solda iki, sağda bir damar olarak bulunur ve oksijenli kanı yüksek basınçlarda organa ve destek elemanlarına iletir. Sağ bronşiyal arter, posterior interkostal arterin yanında interkosto bronşiyal gövdeden çıkar. Sol tarafta, bronşiyal arterler torasik aortanın doğrudan dallarıdır.

Pulmoner venler akciğer parankimi drene ederken, hilus bronşiyal venler tarafından drene edilir. Bronşiyal ven için kol görevi gören yüzeysel ve derin bronşiyal damarlar vardır. Her hilusa tek bir bronşiyal ven hizmet eder. İntrabronşiyal venöz pleksuslar, derin bronşiyal venleri oluşturmak için birleşmeden önce hilumdaki bronşlara bitişik olarak hareket eder. Pulmoner vene veya doğrudan sol atriyuma boşalırlar.

2.1.2. Akciğerin lenfatikleri

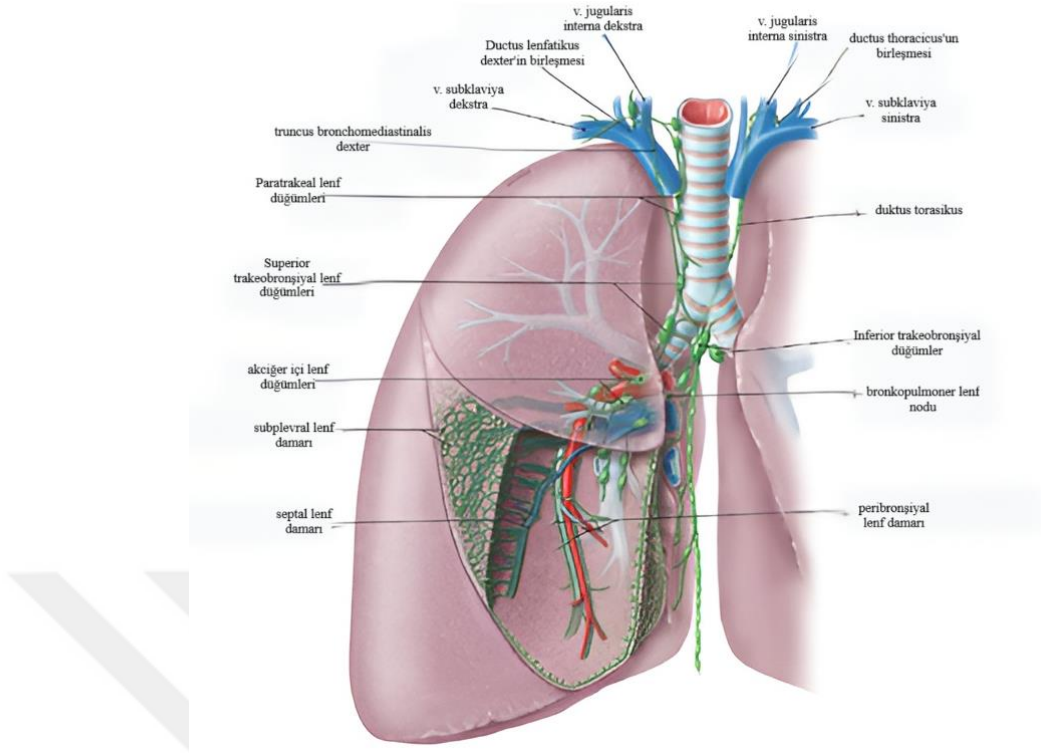
Akciğerlerin lenfatik drenajı, akciğerlerden sıvı ve atık ürünlerin boşaltılmasından ve dolaşım sistemine geri döndürülmesinden sorumludur. Akciğerlerin lenfatik damarları derin lenfatik pleksus ve yüzeysel lenfatik pleksus olmak üzere iki pleksus halinde düzenlenmiştir (Şekil 2) (18, 20).

Derin lenfatik pleksus, bronşların submukozasında ve peribronşiyal bağ dokusunda yer alır. Rolü, akciğerlerin interstisyel boşluklarındaki ve bronşların duvarlarındaki sıvıyı intrinsik pulmoner lenf düğümlerine boşaltmaktır. Derin lenfatik pleksustan gelen lenf, akciğerin hilumunda bulunan bronkopulmoner (hiler) lenf düğümlerine akar.

Yüzeysel lenfatik pleksus, akciğerlerin interlobüler septasında bulunur. Alveollerden ve akciğerlerin interstisyel boşluklarındaki sıvıyı boşaltır. Yüzeysel lenfatik pleksustan gelen lenf, mediastende bulunan mediastinal lenf düğümlerine akar.

Hiler ve mediastinal lenf düğümlerinden lenf, solda duktus torasikus'a, sağda ise trunkus lenfaticus dekster'e dökülürler. Duktus torasikus ve trunkus lenfaticus dekster, iç juguler ve subklavian venlerin birleştiği yerde lenfleri kan dolaşımına boşaltır (18, 20).

Akciğerlerin lenfatik sistemi birkaç nedenden dolayı önemlidir. Birincisi, akciğerlerdeki sıvının boşaltılmasına yardımcı olur, bu da akciğerlerin tıkanmasını önlemeye yardımcı olur. İkincisi, lenfatik sistem, hücre artıklarını ve diğer yabancı maddeleri akciğerlerden uzaklaştırmaya yardımcı olur. Üçüncüsü, akciğerlerdeki lenf düğümleri lenfleri filtreler ve bakterileri, virüsleri ve diğer yabancı partikülleri uzaklaştırır. Ayrıca enfeksiyonla savaşmaya da yardımcı olurlar.



Şekil 2. Akciğer lenfatik damar ve düğümleri (18).

2.1.3. Akciğerin sinirleri

Otonom sinir sistemi hava yollarının kontrolünde önemli bir rol oynar. Parasempatik sinir sistemi, solunum yollarını daraltan bronkokonstriksiyona neden olur. Bu, strese, duygulara veya alerjenlere maruz kalmaya yanıt olarak olabilir. Sempatik sinir sistemi, hava yollarını genişleten bronkodilatasyona neden olur. Bu, egzersize yanıt olarak veya vücut soğuk havaya maruz kaldığında olabilir (18, 20, 21).

Otonom sinir sistemi ayrıca öksürme gibi refleksleri ve akciğerlerin oksijen ve karbondioksit seviyelerini düzenleme yeteneğini de kontrol eder. Bu refleksler, akciğerleri korumak ve doğru nefes almayı sürdürmek için önemlidir.

Hava yollarını kontrol eden sinirler vagus sinirinden ve ikinci ve beşinci torasik gangliyonlardan çıkar. Vagus siniri en uzun kafa siniridir ve solunum yolları da dahil olmak üzere vücudun birçok fonksiyonunun kontrolünde önemli bir rol oynar. İkinci ve beşinci torasik gangliyonlar göğüste bulunur ve hava yollarına sinyal göndermekten sorumludurlar (18, 20). Hava yollarını kontrol eden sinirler daha sonra bronşları takip

ederek akciğerlere girer ve kas liflerini, bezleri ve kan damarlarını innerve etmek için dallanır. Hava yollarındaki kas lifleri, hava yollarının daralmasından ve genişlemesinden sorumludur. Hava yollarındaki bezler, hava yollarını enfeksiyondan korumaya yardımcı olan mukus üretir. Hava yollarındaki kan damarları, hava yollarına oksijen ve besin sağlar.

2.1.4. Plevra

Akciğerler, seröz bir zar olan plevra ile çevrili bir boşluk içinde bulunur. Sağ ve sol akciğerler mediasten ile sağ ve sol plevra ayrılır. Plevra, arasında plevral boşluk yer alan visseral plevra ve parietal plevra olmak üzere iki tabakadan meydana gelir. Visseral plevra, akciğerlere yüzeyel olan ve akciğer fissürlerinin içine doğru uzanan ve onları çevreleyen tabakadır. Buna karşılık, parietal plevra göğüs duvarı, mediasten ve diyaframa bağlanan dış tabakadır. Visseral ve parietal plevra hilumda birbirine bağlanır (18, 20, 21).

Plevranın, sıvı üretmek ve organları birbirinden ayıran boşluklar oluşturmak gibi önemli görevleri vardır. Plevral sıvı, her iki plevrayı döşeyen mezotelyal hücreler tarafından salgılanan ince bir sıvı tabakasıdır. Solunum sırasında sürtünmeyi ve hasarı önlemeye yardımcı olan plevranın yüzeylerini yağlamaya yarar. Plevral sıvı ayrıca akciğerlerin göğüs duvarına bağlı kalmasına yardımcı olan yüzey gerilimi oluşturmaya da yardımcı olur. Bu da nefes aldığımızda akciğerlerin genişlemesini ve hava ile dolmasını sağlar (18, 20).

2.2. Akciğer Embriyolojisi

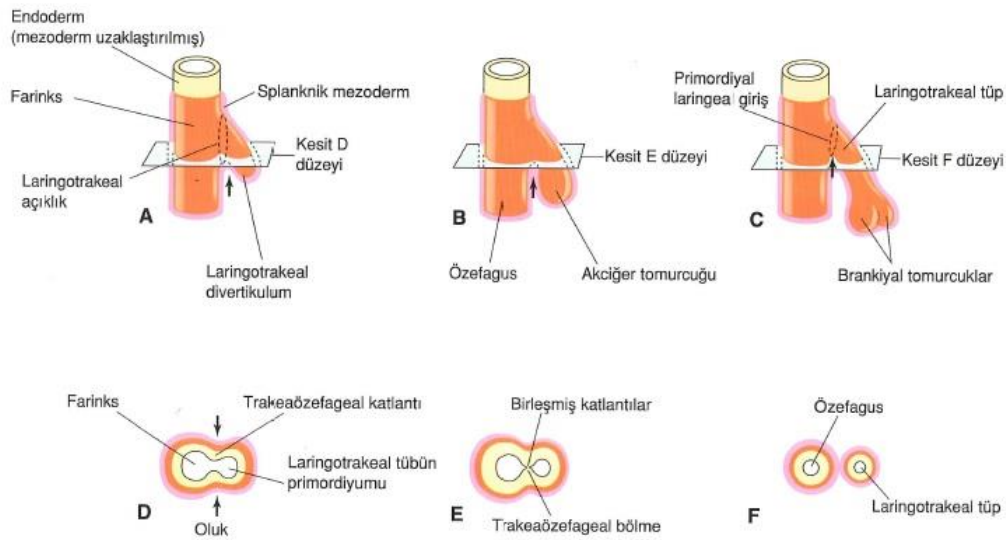
2.2.1. Solunum sistem primordiyumu

Trakeobronşiyal ağacın öncüsü olan respiratuar primordiyum, gebeliğin yaklaşık 28. gününde primitif farenksin ventral duvarının kaudal ucunda laringotrakeal oluk olarak ortaya çıkar. Laringotrakeal oluk, larinks, trakea, bronşlar ve akciğerlerin

epiteli endoderm ile kaplanmıştır. Bu yapıların bağ dokusu, kıkırdak ve düz kası, ön bağırsağın etrafındaki splanknik mezodermden gelişir (22).

Dördüncü haftanın sonunda, laringotrakeal oluk ön bağırsağın kaudal ucunda bir çıkıntı oluşturarak kese şeklinde bir laringotrakeal divertikül oluşturur. Bu divertikül uzar ve splanknik mezoderm ile çevrelenir. Divertikülün distal ucu genişleyerek yuvarlak bir solunum tomurcuğu oluşturur. Laringotrakeal divertikül kısa sürede primordial farinksten ayrılır, ancak primordial laringeal giriş ile bağlantısını sürdürür

Beşinci haftanın sonunda laringotrakeal divertikül içinde gelişen longitudinal trakeoözofageal kıvrımlar birbirine yaklaşarak birleşerek trakeoözofageal septumu oluşturur. Bu septum, ön bağırsağın kranial kısmını, laringotrakeal tüpü oluşturan (larenks, trakea, bronşlar ve akciğerlerin primordiyum) ventral ve dorsal kısımlarına (orofarinks ve özofageal primordiyum) ayırır (Şekil 3) (22).



Şekil 3. Solunum divertikülünün gelişimsel evreleri (22).

2.2.2. Akciğerlerin gelişimi

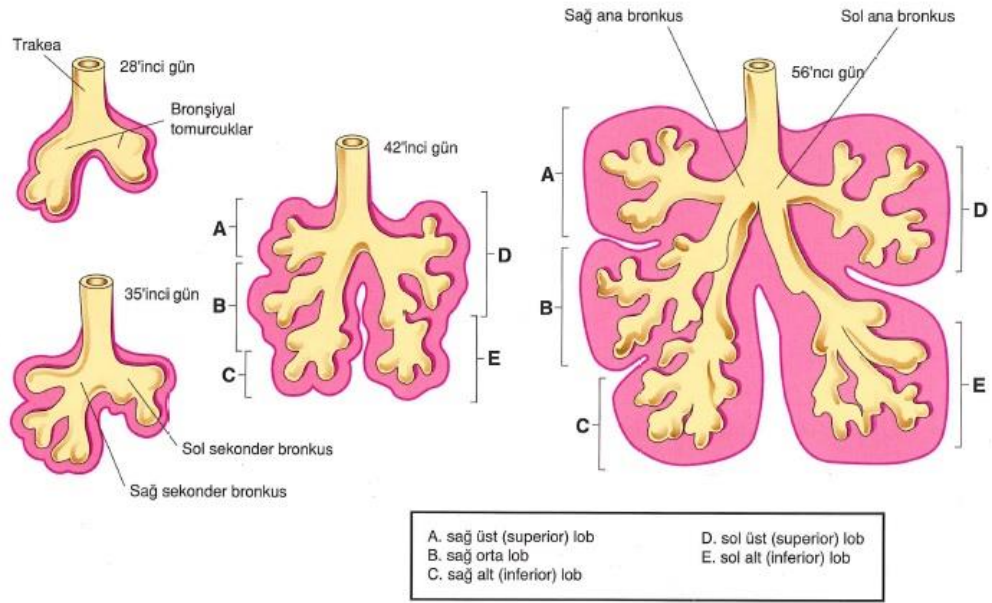
Akciğer tomurcuğu olarak da bilinen solunum divertikülü, gebeliğin yaklaşık 4. haftasında ön bağırsağın ventral duvarında belirir. Solunum divertikülü, retinoik asit (RA) üreten çevredeki splanknik mezoderm tarafından indüklenir. Solunum divertikülü başlangıçta ön bağırsakla temas eder, ancak sonunda trakeoözofageal

kıvrımlarla ayrılır (23). Gelişmekte olan akciğer tomurcuğu, birincil bronş tomurcukları adı verilen iki keseye ayrılır. Bu keseler daha sonra yanal olarak plevral boşlukların primordiyumları olan perikardiyo-peritoneal kanallara doğru gelişir. Daha sonra ikincil ve üçüncül akciğer tomurcukları gelişir.

Akciğer tomurcuklarını çevreleyen splanknik mezenşim, bronşlara ve dallarına farklılaşır. Bronş tomurcuğunun trakea ile bağlantısı genişleyerek primer bronşların başlangıç formlarını oluşturur. Sağ primer bronş soldan biraz daha büyük ve daha dikeydir. Primer bronşlar, lobar, segmental ve intrasegmental dallar oluşturan sekonder bronşlara ayrılır. Sağ akciğerde üç lobar bronş bulunurken, sol akciğerde iki lob vardır. Lobar bronş kendi içinde dallanarak segmental bronşları oluşturur. Yedinci haftadan itibaren segmental bronşlar oluşmaya başlar ve sayıları sağ akciğerde on, sol akciğerde sekiz veya dokuzdur.

Akciğer tomurcuklarını çevreleyen splanknik mezenşim, tersiyer bronşlar oluşurken bölünür. Bu bölünme bir bronkopulmoner segmentin başlangıcını oluşturur. Gebeliğin 24. haftasında yaklaşık 17 sıra dallanma oluşmuş ve solunum bronşiyolları oluşmuştur. Doğumdan sonra 7 sıra hava yolu daha oluşur (22). Bronşiyal dallanma, akciğer tomurcuklarının endodermi ile onu çevreleyen splanknik mezenşim arasında meydana gelen epitelyal-mezenkimal etkileşimler tarafından düzenlenir. Dallanmayı başlatan sinyaller, mezodermdaki fibroblast büyüme faktörü ailesinden gelir (24).

Bronşlar geliştikçe, çevreleyen splanknik mezenkimden kıkırdak plakaları, bronşiyal düz kas ve bağ dokusu ve pulmoner bağ dokusu ve kılcal damarlar oluşur. Akciğerler geliştikçe splanknik mezodermden oluşan bir visseral plevra tabakası ile kaplanır. Akciğerler ve plevral boşluklar genişledikçe, kaudal olarak vücut duvarının mezenkimine doğru büyürler ve kısa süre sonra kalbe bitişik hale gelirler. Göğüs bölgesindeki vücut duvarı, somatik mezodermden oluşan bir paryetal plevra tabakası ile kaplıdır. Parietal ve visseral plevra arasındaki boşluk plevral boşluğu oluşturur (22).



Şekil 4. Akciğer tomurcukları, bronşlar ve akciğerlerin gelişim evreleri (22).

2.2.3. Akciğerlerin olgunlaşması

Akciğerlerin olgunlaşması, psödöglândular evre, kanaliküler evre, sakküler evre (terminal kese evresi) ve alveoler evre olmak üzere dört evreye ayrılır (Şekil 4) (22, 24-26).

Psödöglândular Evre

Psödöglândüler evre, gebeliğin 6. ve 16. haftaları arasında meydana gelen akciğer gelişiminin ikinci aşamasıdır. Bu aşamada, akciğerler hava yollarının dallanan bir sistemine dönüşür, ancak alveoller henüz oluşmamıştır. Gelişmekte olan akciğerler, endodermal tübülleri kaplayan tek bir silindirik epitel tabakası ile histolojik olarak ekzokrin bezlerine benzer. Tübüller, az miktarda kılcak içeren mezoderm ile çevrilidir (27). 16. haftanın sonunda akciğerlerin gaz alışverişinde rol oynayanlar dışındaki tüm temel elementleri oluşmuştur. Ancak bu aşamada solunum mümkün olmadığı için bu aşamada doğan fetüsler yaşayamazlar (22).

Kanaliküler Evre

Kanaliküler evre, gebeliğin 16. ve 26. haftaları arasında meydana gelen, akciğer gelişiminin üçüncü aşamasıdır. Bu aşamada, akciğerler dallanan bir hava yolu

sistemine dönüşmeye devam eder ve alveoller oluşmaya başlar. Bronşların ve terminal bronşiyollerin lümenleri genişler. Akciğer dokusu multivasküler hale gelir, yani kılcal damarlarla dolar. Bunun nedeni, kılcal damarların oluşumunu destekleyen vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) etkisidir (22, 24-26). İnterstisyel dokular küçülür ve gaz değişim birimleri oluşur. 24. haftada, terminal bronşiyollerden iki veya daha fazla respiratuar bronşiyol oluşur. Respiratuar bronşiyoller alveoler kanallara ayrılır. Kanaliküler aşamanın sonunda nefes almak mümkün hale gelir. Bunun nedeni, ince duvarlı terminal keselerin bir kısmının respiratuar bronşiyollerinin uçlarında oluşması ve akciğer dokusunda vaskülarizasyonun artmasıdır. Bu dönemin sonlarına doğru doğan bir fetüsün yoğun bakımda yaşaması mümkün olsa da bu fetüsler genellikle solunum ve diğer sistemleri görece eksik olduğu için ölmektedir.

Sakküler Evre

Sakküler evre, 26. gebelik haftasından doğuma kadar meydana gelen akciğer gelişiminin dördüncü evresidir. Bu aşamada alveoller büyümeye ve olgunlaşmaya devam eder. Terminal keseler çok ince hale gelir ve bu keselerin epiteli çok skuamöz hale gelir. Kılcal damarlar bu keselerin içine doğru çıkıntı yapmaya başlar ve kan-hava bariyeri oluşur (22). Apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesi, hava boşlukları arasındaki bağ dokusunu inceltir (24-26). Bu, gaz değişimi için gerekli olan epitel ve endotel hücreleri arasındaki yakın teması sağlar. 26. haftada terminal keseler, gaz değişimini gerçekleştiren endodermal kökenli skuamöz hücrelerle (tip I alveoller hücre) kaplanır. Gelişen alveollerin etrafındaki mezenkimdeki kılcal ağ hızla çoğalır ve aynı zamanda lenfatik kılcal damarlar da aktif bir gelişim gösterir. Yassı epitel hücreleri arasında dağılmış yuvarlak salgılayıcı epitel hücreleri- tip 2 alveoller hücre-fosfolipitler ve proteinlerin bir karışımı olan pulmoner sürfaktan salgılar. Sürfaktan, alveoler keselerin iç yüzeylerinde, hava-alveolar arayüzündeki yüzey gerilimi kuvvetlerine karşı tek moleküllü bir tabaka oluşturur. Bu atelettaziyi (solunum sırasında veziküllerin sönmesi ve küçülmesi) önler ve veziküllerin genişlemesini kolaylaştırır (22). Sakküler evre, akciğerlerin tamamen işlevsel hale geldiği aşama olduğu için akciğer gelişiminde kritik bir aşamadır. Akciğerlerin gaz değişimi için kullanılmadan önce belirli bir olgunluk düzeyine ulaşması gerekir ve bu işlem için sakküler aşama şarttır.

Alveoler Evre

Alveolar evre, gebeliğin 32. haftasından 8 yaşına kadar meydana gelen akciğer gelişiminin son aşamasıdır. Bu aşamada alveoller büyümeye ve olgunlaşmaya devam eder. Terminal keseler, yetişkin alveolleri oluşturmak için sekonder septa ile bölünür (27). Terminal keselerin epiteli incelir ve ince bir skuamöz epitel tabakasına dönüşür. Tip 1 alveoller o kadar incedir ki bitişik kılcal damarlar terminal keselere doğru çıkıntı yapar (22). Mikrovasküler olgunlaşma, alveoler septanın çift kapiller tabakasının tek tabakaya dönüşmesi ile gerçekleşir (25, 28). Geç fetal aşamada, alveolokapiller membran (pulmoner difüzyon bariyeri veya solunum membranı) gaz değişimine izin verecek kadar ince hale geldiğinden solunum gerçekleşebilir. Olgun alveollerin yaklaşık %95'i doğum sonrası dönemde gelişir. Alveol gelişimi büyük ölçüde üç yaşına kadar tamamlanır, ancak yaklaşık sekiz yaşına kadar yeni alveoller eklenebilir. Zamanında doğmuş bir bebeğin akciğerlerindeki ilkel alveollerin sayısı yaklaşık 150 milyondur, yani yetişkinlerin yarısı kadardır. Kalan alveoller, doğum sonrası ilk on yılda sürekli yeni ilkel alveol oluşumu ile ortaya çıkar ve yetişkinlerde 300 milyon alveol sayısına ulaşır (22).

2.3. Akciğer Histolojisi

Solunum sistemi, oksijenin vücuda getirilmesi ve karbondioksitin atılmasından sorumludur. Akciğerlerden ve akciğerlere giden hava yollarından oluşur (19,21). Hava yolları gittikçe küçülen tüplere ayrılır ve sonunda gaz değişiminin gerçekleştiği küçük hava keseleri olan alveollere ulaşır. Oksijen, hücre metabolizması için gereklidir ve karbondioksit, hücre metabolizmasının bir atık ürünüdür. Solunum sistemi vücuttaki bu gazların dengesinin korunmasına yardımcı olur. Gaz değişimine ek olarak, solunum sistemi seslendirme ve koku almada da rol oynar. Larinksteki ses telleri titreştiğinde ses üretir ve burun boşluğundaki koku reseptörleri kokuları algılar (19,21).

Solunum sistemi histolojik olarak iki kısma ayrılır: iletim kısmı ve respiratuar (solunum) kısmı. İletici kısım, alveollere giden hava yollarını içerirken respiratuar kısım, gaz değişiminin gerçekleştiği alveolleri içerir ve Tablo 1 da belirtilen bölümleri içerir.

Tablo 1. Solunum sisteminin histolojik olarak sınıflandırılması (19)

SOLUNUM SİSTEMİ	
İLETİCİ BÖLÜM	RESPIRATUAR BÖLÜM
Nazal Kavite	Respiratuar bronşiyoller
Nazofarinks	Alveol kanalı (Duktus alveolaris)
Larinks	Alveol kesesi (Sakkus alveolaris)
Trakea	Alveoller
Bronşlar	
Bronşiyoller	
Terminal bronşiyoller	

2.3.1. Solunum sisteminin iletili bölümü

Solunum sisteminin iletili kısmı, gaz değişiminin gerçekleşmediği, havanın akciğerlere taşınmasından, solunan havanın ısıtılıp nemlendirilmesinden ve yabancı maddeleri hapsederek havanın temizlenmesinden sorumludur (21, 29, 30). Üç tabaka ile kaplıdır: mukoza, submukoza ve adventisya. Mukoza en içteki tabakadır ve epitel hücreleri, mukus salgılayan hücreler ve destekleyici hücrelerden oluşur. Üst solunum yolu epiteli ve alt solunum yolu epiteli çeşitli bölümlerinde farklılık gösterir. Nazal vestibulum, orofarinks, larinks (vokal kordların yüzeyi) ve epiglottis (apeks ve üst yüzeyi) çok katlı keratinsiz yassı epitel ile örtülüdür; nazal kaviteler, paranasal sinüsler, nazofarinks, larinks, epiglottis (alt yüzü), trakea ve bronşiyollere kadar devam eden bronş mukozası respiratuar epitel olarak adlandırılan yalancı çok katlı kinosilyalı prizmatik epitel ile örtülüdür. Bronşiyollerin epiteli tek katlı silli prizmatik epitel iken alveoler epiteli tek katlı yassı epiteldir. Submukoza orta tabakadır ve gevşek bağ dokusu, kan damarları ve sinirlerden oluşur. Adventisya en dıştaki katmandır ve yoğun bağ dokusundan oluşur (21, 31).

Bronş ağacı, trakeada başlayan ve alveollerde son bulan dallanan bir hava yolu sistemidir. Trakea akciğerin dışında daha küçük dallara ayrılarak primer bronş (ekstrapulmoner bronş), akciğerin içinde ise sekonder ve tersiyer bronş, bronşiyoller, terminal bronşiyoller, respiratuar bronşiyoller ve alveollerini oluşturur (Şekil 5) (21).

Bronşlar, açık kalmalarına yardımcı olmak için kıkırdak halkaları içeren daha büyük hava yollarıdır. Bronşiyoller, kıkırdak halkaları içermeyen daha küçük hava yollarıdır. Alveoller, gaz alışverişinin yapıldığı en küçük hava yollarıdır. Bronş ağacı terminal bronşiyollere ulaşmadan önce yaklaşık 15-20 kez bölünür. Hava yolları bölündükçe küçülürler ve kıkırdak miktarı, bez, goblet hücreleri ve epitel boyu azalır. Solunum sırasında hava yollarının çapının ayarlamasına yardımcı olan düz kas ve elastik doku miktarı artar.

Respiratuar mukozanın (solunum) yalancı çok katlı silyumlu prizmatik epitel beş hücre tipi içerir: (19,31)

1. Kinosilyalı silindirik (prizmatik) hücre: Bu hücreler, solunum epitelinde en bol bulunan hücre tipidir. Silindirik bir şekle sahiptirler ve mukusu ve sıkışmış yabancı maddeleri solunum yolundan çıkarmaya yardımcı olan tüy benzeri yapılar olan kinosilyum ile kaplıdır. Kinosiller, karakteristik bir aksonemde düzenlenmiş mikrotübüllerden oluşur. 9 periferik mikrotübül çifti ve 1 merkezi mikrotübül çifti vardır. Mikrotübüller, kinosilyum hareketini sağlayan dynein kolları ile birbirine bağlanır. Kinosiller koordineli bir şekilde hareket eder, bu da mukusu hava yollarından yukarıya ve akciğerlerden dışarı taşımaya yardımcı olur (19,32).

2. Mukus (goblet) hücresi: Goblet hücreleri, kinosilyalı silindirik hücrelerden sonra solunum epitelinde en bol bulunan hücre tipidir. Solunum yolu boyunca bulunurlar ancak en çok trakea ve bronşlarda yoğunlaşırlar. Aşağı indikçe sayıları azalır ve terminal ve respiratuar bronşiyollerin yüzeyini örten tek katlı silli prizmatik epitel içinde goblet hücreleri bulunmaz. Goblet hücreleri, yabancı maddeleri yakalamaya ve hava yollarını nemli tutmaya yardımcı olan yapışkan bir sıvı olan mukus üretir. Goblet hücreleri tarafından üretilen mukus, şekerlere bağlı proteinler olan glikoproteinlerden oluşur. Musin salgısı H&E ile boyanmaz ve bu nedenle teka kısmı boş görülür ancak Periyodik asit-Schiff boyama (PAS) ile boyanabilir. Mukustaki glikoproteinler, mukusa yapışkan ve viskoz özelliklerini verecek şekilde düzenlenir. Bu, bakteri ve toz gibi yabancı maddelerin tutulmasına yardımcı olur ve akciğerlere girmelerini engeller. Mukus ayrıca hava yollarının nemli kalmasına yardımcı olur. Hava yollarını kaplayan mukus tabakası, nefes almayı zorlaştırabilecek şekilde hava yollarının kurumasını önlemeye yardımcı olur. Sigara içmek veya hava kirliliğine maruz kalmak gibi kronik tahrişe yanıt olarak goblet hücrelerinin sayısı artar. Elektron mikroskobunda goblet

hücreleri, salgı vezikülleri ile dolu geniş bir apikal bölge ile genişlemiş hücreler olarak görünür. Salgı kesecikleri, mukusu oluşturan glikoproteinleri içerir. Goblet hücreleri ayrıca mukus üretiminde yer alan iyi gelişmiş endoplazmik retikulum (ER) ve Golgi aparatına sahiptir (19, 31).

3. Seröz (küçük granüllü) hücre: Morfolojik olarak submukoza bezinin seröz hücrelerine benzerler, bu da benzer bir görünüme sahip oldukları anlamına gelir. Seröz hücreler, elektron mikroskobu altında görülebilen küçük, yoğun yapılar olan elektron yoğun granüller içerir. Protein üretiminde yer alan bir zar ağı olan ER, seröz hücrelerde çok bol miktarda bulunur. Seröz hücrelerdeki granüllerin çapı yaklaşık 600 nanometredir. İnsanlar da dahil olmak üzere birçok memelide bulunurlar. Bazı memelilerde seröz hücrelerden salgı mukoid değildir, yani mukus içermez. Ancak seröz hücreler sigara dumanına maruz kaldığında salgı mukusa dönüşür (19, 21, 29, 30).

4. Difüz nöroendokrin sistem hücresi (DNES hücresi): APUD hücreleri, argirofil hücreleri ve enteroendokrin hücreler olarak da bilinirler. DNES hücreleri, her zaman bez lümenine ulaşmayan küçük hücrelerdir. Epitelin bazal kısmında bulunurlar ve küçük, zarla çevrili salgı granülleri içerirler. DNES hücreleri H&E boyama ile boyanmaz, ancak gümüş boyalarla veya immüno-histokimyasal tekniklerle gösterilebilirler. Gümüşle boyandıkları için argentaflin veya argirofil hücreleri olarak da adlandırılırlar. DNES hücreleri, nöral krestten kaynaklanır ve tek başlarına veya kümeler halinde olabilirler. DNES hücrelerindeki granüllerin çapı yaklaşık 70-150 nanometredir ve elektron-ışıldayan bir halo ile çevrilidirler. Granüllerin alt tipleri tanımlanmıştır. Granüller, çekirdeğin altındaki sitoplazmanın bazal kısmında lokalizedir. Serbest bırakıldıklarında siliyer aktiviteyi, mukus sekresyonunu ve vasküler bronşiyal düz kas tonusunu etkileyebilirler. Sindirim ve solunum sistemlerinde görülen bu hücreler parakrin ve endokrin etkiler gösterirler (19, 21, 29, 30).

5. Bazal hücre: Epitelin bazal tabakasında bulunurlar ve epitelin yenilenmesinden sorumludurlar. Bazal hücreler, keratin için immünoreaktif monofilament bantlar içerir; bu, siliyer hücreler ve goblet hücreleri gibi diğer hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahip oldukları anlamına gelir. Normal koşullar altında bazal hücreler

%1 oranında mitotik aktiviteye sahiptir. Ancak solunum epiteli hasar gördüğünde bazal hücrelerin mitotik aktivitesi artar (19, 21, 29, 30).

Hava yollarını kaplayan solunum epitelinde bulunmayan, ancak terminal yüzeyini ve solunum bronşiyollerini kaplayan tek katmanlı silyalı küboidal epitelde bulunan başka bir hücre tipi Clara hücreleridir (silyasız bronşiyoler hücre). İnsanlarda Clara hücrelerinin dağılımı terminal ve respiratuar bronşiyollerle sınırlıdır. Clara hücrelerinin, alveolleri açık tutmaya yardımcı olan bir madde olan sürfaktan üretiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Bağışıklık yanıtında da rol oynayabilirler (19, 21, 29, 30).

Hücrelerarası Bağlantılar

Hücreler arası bağlantılar, epitel hücrelerine yapısal ve fonksiyonel destek sağlayan yapılardır (19, 21, 33). Üç türe ayrılırlar:

- Geçirgen Olmayan Bağlantılar: Zonula okludens (Sıkı Bağlantılar, Tight junction)
- Tutucu Bağlantılar: Zonula adherens ve Makula adherens
- İletişim Sağlayan Bağlantılar: Gap junction

Epitellerde lateral yüzde bağlantılar hücrenin apikalinden bazaline 4 grupta incelenir.

1. Sıkı Bağlantılar (Tight junction, Zonula Okludens): Sıkı bağlantılar (zonula occludens olarak da bilinir), hücreler arası boşluğu tamamen kapatan bir tür hücreler arası bağlantıdır. Okludin, claudin ve ZO-1 dahil olmak üzere çeşitli proteinlerden oluşurlar. Sıkı bağlantılar, komşu hücreler arasında su ve suda çözünen moleküllerin geçişini engelleyerek epitel dokularının bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynar. Bu, bağırsak lümeni gibi belirli vücut bölümlerini kan dolaşımından izole etmeye yardımcı olur. Sıkı bağlantılar ayrıca hücre sinyalinin ve hücre göçünün düzenlenmesinde rol oynar. Örneğin, sıkı bağlantılar, hücre büyümesini ve farklılaşmasını etkileyebilecek şekilde iyonların ve besinlerin hücrelere girip çıkmasını kontrol edebilir. Sıkı bağlantıların geçirgenliği, sıkı bağlantı proteinlerinin bileşimi, sinyal moleküllerinin varlığı ve hücre üzerindeki mekanik stres dahil olmak üzere bir dizi faktör tarafından düzenlenebilir. Örneğin, sıkı bağlantılar, hücrelerin daha hareketli olduğu gelişimin ilk aşamalarında daha geçirgendir. Hücreler

olgunlaştıkça, sıkı bağlantılar daha sıkı bir şekilde kapatılır ve bu da dokunun yapısal ve işlevsel bütünlüğünün korunmasına yardımcı olur (19, 33).

2. Zonula Adherens (Yapıştırıcı kuşak, Kuşak desmozom): Hücreyi bir kemer gibi çevreleyen bir tür hücreler arası bağlantıdır. Kadherinler, kateninler ve aktin filamentleri içeren yapışık bağlantı kompleksi adı verilen bir protein kompleksinden oluşur. Zonula adherens, hücreleri birbirine tutturmaya ve birbirlerinden ayrılmasını önlemeye yardımcı olur. Zonula adherens bağlantıları arasındaki hücreler arası boşluk açıktır ve hatta normal alanlardan daha geniş olabilir. Epitel dokularının yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynar. Hücrelerin birbirinden ayrılmasını önlemeye ve hücreler arasındaki maddelerin hareketini düzenlemeye yardımcı olurlar (19, 33).

3. Makula Adherens (Desmozom): Hücreler arasında nokta benzeri adezyonlar oluşturan bir tür hücreler arası bağlantıdır. Desmozomal plak adı verilen, desmoplakin, plakoglobin ve diğer proteinleri içeren bir protein kompleksinden oluşurlar. Desmozomlar, hücreleri birbirine bağlamaya yardımcı olur ve birbirlerinden ayrılmasını önler. Makula adherens bağlantıları arasındaki hücreler arası boşluk, maddelerin hücreler arasında geçişine izin veren 30 nanometre genişliğindedir. Bununla birlikte, makula adherens bağlantıları, zonula adherens bağlantıları kadar geçirgen değildir ve hücreler arasında büyük moleküllerin geçişini önlemeye yardımcı olur (19, 33).

4. Gap Junction (Nexus, Boşluk bağlantıları): İyonların ve küçük moleküllerin hücreler arasında geçişine izin veren bir tür hücreler arası bağlantıdır. Hücre zarında bir gözenek oluşturan, konneksin adı verilen bir protein kompleksinden oluşurlar. Gap junction, ortamdaki belirli maddelerin konsantrasyonuna bağlı olarak açılıp kapanabilir (19, 21, 29, 30).

Bazal Membran

Bazal membran, epitel hücrelerin bazal bölgesi ile alttaki bağ dokusu yapısındaki stroma arasında uzanan ince, aselüler bir tabakadır ve bazal lamina veya lamina densa diye de adlandırılır. PAS (+) boyanır ve ışık mikroskobu ile görüntülenebilir.

Bazal lamina: epitel hücreleri tarafından yapılır ve 50 nanometre kalınlığındadır. Laminin, entaktin ve integrinlerden oluşur.

Lamina retikülaris: Bazal laminaya komşu olan bağ dokusu hücreleri tarafından yapılır ve tip III kollajen, tip VII kollajen, tip I kollajen ve tip IV kollajenden oluşur. 100-200 nanometre kalınlığındadır ve hem bazal laminaya hem de alttaki bağ dokusuna bağlıdır.

Bazal membran, epiteli altta yatan bağ dokusuna tutturmada, yapısal destek sağlamada ve iki doku arasındaki maddelerin hareketini düzenlemede önemli bir rol oynar. Ayrıca hücre sinyalleşmesi ve hücre farklılaşmasında rol oynar. Bazal membranın kalınlığı doku tipine ve epitelin işlevine göre değişir. Örneğin, bazal membran deride çok kalındır ve burada mekanik strese karşı koruma sağlar. Aksine, bazal membran akciğer alveollerinde çok incedir ve burada verimli gaz değişimine izin verir. Bazal membran sürekli olarak yeniden şekillenen dinamik bir yapıdır. Bu yeniden yapılanma, epitelin bütünlüğünü korumak ve epitelyumun çevredeki değişikliklere yanıt vermesine izin vermek için gereklidir (19, 21, 29, 30).

Submukoza

Trakeanın submukozası içinde destek sağlayan ve trakeayı açık tutan 16-20 C şeklindeki hiyalin kıkırdak halkaların vardır. Kıkırdak halkaların açık uçları, soluk borusunun yemek borusuna bakan tarafında bulunur. Kıkırdak halkalar ayrıca trakeanın nefes alma sırasında çökmesini önlemeye yardımcı olur (19, 21, 29, 30).

Hiyalin kıkırdak halkalarına ek olarak, trakeanın submukozası ayrıca tubuloalveoler tip ekzokrin bezleri içerir. Bu bezler, solunum yollarını enfeksiyon ve tahrişten korumaya yardımcı olan mukus salgılar. Mukus iki tip hücre tarafından üretilir: seröz hücreler ve mukus hücreleri. Seröz hücreler mukusun parçalanmasına yardımcı olan enzimler salgılayarak, mukus hücreleri partikülleri ve bakterileri tutan kalın, yapışkan bir mukus salgılar. Seröz hücrelerin bazalinde yuvarlak büyük nükleus ve granüllü endoplazmik retikulumunun yoğun olarak yer alırken apikal bölgesinde salgı granülleri yer alır ve bundan olayı apikal asidofili boyanır. Müköz hücrelerin bazalinde yassı nükleus yer alır ve soluk boyanırlar. Bezler ayrıca mukusun bezlerden atılmasına yardımcı olan miyoepitelyal hücrelerle çevrilidir (19, 21, 29, 30). Ayrıca submukozada fibroelastik bağlar ve kas demetleri içerir. Bu yapılar, solunum yollarını

mukus ve yabancı partiküllerden temizlemeye yardımcı olan öksürük refleksinde kullanılır. Öksürük refleksi tetiklendiğinde, trakeadaki kaslar kasılarak lümeni daraltır ve dışarı verilen havanın hızını artırır (19, 21, 29, 30).

Bronşların submukozası, hiyalin kıkırdak, bezler ve sinirler içermesi bakımından trakeaya benzer. Bununla birlikte, bronşlardaki kıkırdak parçalanmıştır ve daha fazla düz kas dizisi vardır. Düz kas miktarı bronşların iletken kısmının sonuna doğru artar. Bronşlardaki kıkırdağın parçalanması onların daha esnek olmalarını sağlar ki bu da hava yollarının solunum sırasında genişleyip daralması için gereklidir. Elastik lifler, lenfositler ve lenf düğümleri de nodüler çatallanma bölgelerinde daha yaygındır (19, 21, 29, 30).

Bronşiyoller, çapı 1 mm'den az olan akciğerlerdeki en küçük hava yollarıdır. Kıkırdak veya bez içermezler ve epitel kademeli olarak tek katlı prizmatik ve ya tek katlı kübik şekle dönüşür. Terminal bronşiyoller, Clara hücreleri de dahil olmak üzere tek katlı bir kübik epitel ile kaplıdır. Terminal bronşiyollerin submukozası, elastik lifler ve düz kas bakımından zengindir (19, 21, 29, 30).

Trakea ve bronşların submukozasındaki düz kaslar, vagus ve sempatik sinir sistemlerinin kontrolü altındadır. Parasempatik sinir sisteminin bir parçası olan vagus siniri, kasların kasılmasına neden olarak hava yollarının çapını daraltır. Sempatik sinir sistemi ise kasların gevşemesine neden olarak hava yollarının çapını genişletir. Submukoza vagus ve sempatik sinirlere ek olarak nöroepitelyal cisimcikler de içerir. Bunlar, kolinerjik sinir uçları içeren hücre kümeleridir. Kolinerjik sinirler, nörotransmitter asetilkolini serbest bırakan bir sinir türüdür. Asetilkolin, düz kasların kasılmasına neden olan bir kimyasaldır. Nöroepitelyal cisimlerin hava yollarının çapının düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Trakea ve bronşların submukozasında yaklaşık 80-100 nöroepitelyal cisimcik vardır (19, 21, 29, 30).

Adventisya

Adventisya, trakea ve bronşların en dış tabakasıdır. Hava yollarının iletken kısmındaki bağ dokusuna yapı olarak benzeyen ince bağ dokusundan yapılmıştır. Adventisya elastik lifler, kollajen lifler ve kan damarları içerir. Ayrıca solunum yollarını enfeksiyondan korumaya yardımcı olan lenf düğümleri içerir. Adventisya, trakea ve bronşların çevre dokulara bağlanmasından sorumludur. Ayrıca yaralanmaya

karşı korumaya yardımcı olur. Adventisya'nın inceliği, nefes alma sırasında trakea ve bronşların genişlemesine ve büzülmesine izin verir (19, 21, 29, 30).

Lenfoid Doku

Solunum yolu üç tip lenfoid doku içerir: (19, 21, 29, 31, 32)

Lenf düğümleri: Bunlar, hava yollarının çatallanma alanlarında bulunan küçük, yuvarlak yapılardır. Kapsülsüzdürler ve mukozal epitel ile temas etmezler. Lenf düğümleri yaşamın ilk yıllarında daha fazladır ve periferik hava yollarında veya plevrada bulunmazlar.

Bronşla ilişkili lenfoid doku (BALT): Bu, bronşlarda bulunan bir tür lenfoid dokudur. BALT, lenfositler, plazma hücreleri ve diğer bağışıklık hücreleri açısından zengindir. BALT çatallanma bölgelerinde daha fazla bulunur ve ayrıca venüllerin endoteli çevresinde ve parafoliküler bölgelerde bulunur.

Lenforetiküler kümeler: Bunlar küçük lenfosit, plazma hücreleri ve eozinofil kümeleridir. Bronşlarda, interlobüler septumda, alveolar dokuda ve plevrada bulunabilirler. Lenforetiküler kümeler, respiratuar bronşiyol ve yanında seyreden arter çevresinde kümeler oluşturabilir. Bu alanlarda makrofajlar da görülür.

Solunum yollarındaki lenfoid doku, akciğerlerin bağışıklık savunmasında önemli bir rol oynar. Lenf düğümleri yabancı partikülleri ve mikroorganizmaları filtreler ve ayrıca enfeksiyonla savaşmaya yardımcı olan antikorlar üretir. BALT ve lenforetiküler kümeler, özellikle solunum yolu patojenlerini hedefleyen bağışıklık hücrelerinin üretiminde yer alır.

2.3.1.1. Bronşlar

Bronşlar, trakeanın akciğerlere giren iki ana dalıdır. Giderek daha küçük bronşlara ayrılırlar ve sonunda gaz değişiminin gerçekleştiği alveollere ulaşırlar (19, 21, 31). Bronş duvarı beş katmandan oluşur: mukoza, muskularis, submukoza, kıkırdak plakalar ve adventisya (19, 21). Mukoza, siliyer hücreler, goblet hücreleri ve seröz hücreler içeren yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Muskularis, bronşların çapını kontrol etmeye yardımcı olan bir düz kas tabakasıdır. Submukoza,

kan damarlarını, lenfatik damarları ve sinirleri içeren gevşek bir bağ dokusu tabakasıdır. Bronş çapı küçüldükçe kıkırdak halkaların yerini hiyalin kıkırdak plakaları oluşur. Kıkırdak plakalar bronşlara destek sağlar ve bronşların çökmesini engeller. Adventisya, bronşları çevreleyen ve onları çevredeki yapılara bağlayan bir bağ dokusu tabakasıdır (19, 21, 32).

2.3.1.2. Bronşiyoller

Bronşiyoller, bronşların en küçük dallarıdır ve kıkırdak veya bez içermezler. Bronşiyollerin epiteli, silyalı prizmatik hücreler ve Clara hücreleri adı verilen silyalı olmayan salgı hücreleri ile kaplıdır. Silyalar, mukusu ve birikintileri akciğerlerden çıkarmaya yardımcı olur ve Clara hücreleri, akciğerleri enfeksiyondan korumaya yardımcı olan bir sıvı üretir. Bronşiyoller başlangıçta silli yalancı çok katlı epitele sahipken, çapı küçüldükçe epitel tek katlı silli prizmatik hale gelir. Bronş duvarının en belirgin tabakası, bronşiyollerin çapını kontrol etmeye yardımcı olan sirküler düz kas tabakasıdır (19, 21, 32).

2.3.1.3. Terminal bronşiyoller

Terminal bronşiyol, solunum sisteminin iletken bölgesinin en küçük dalıdır. Altta yatan düz kas hücrelerinin kasılması nedeniyle genellikle lümen içine katlanan tek katlı silli kübik ya da prizmatik epitel tabakası ile kaplanmıştır. Clara hücreleri, terminal bronşiyol epitelindeki hücre popülasyonunun yaklaşık %80'ini oluşturur. Clara hücreleri, yüzey aktif maddenin hipofaz bileşenini, bir antiproteazı ve CC16'yı (Clara Hücre Proteini) salgılar. Ayrıca bronşiyolar epitel hücrelerinin rejenerasyonu için kök hücreler olarak işlev görürler (19, 21, 31, 32).

2.3.2. Solunum sisteminin solunum (respiratuar) bölümü

2.3.2.1. Respiratuar bronşiyoller

Terminal bronşiyoller, akciğerlerin iletili ve solunum bölümleri arasındaki geçiş noktası olan iki veya daha fazla respiratuar bronşiyolüne ayrılır. Respiratuar bronşiyollerinin epiteli tek katlıdır ve silyalı kübik epitel hücreleri ve Clara hücrelerinden oluşur. Clara hücrelerinin sayısı, bronşiyoller daha distal hale geldikçe artar. Respiratuar bronşiyoller, alveollere yaklaştıkça Clara hücrelerinin sayısı artar ve epiteli tek katlı yassı epitele dönüşür.

Terminal bronşiyoller ile respiratuar bronşiyoller arasındaki fark, terminal bronşiyol duvarının alveol içermemesi, respiratuar bronşiyol duvarının içermesidir. Bunun nedeni, respiratuar bronşiyolünün, gaz değişiminin gerçekleştiği solunum bölgesinin ilk kısmı olmasıdır (19, 21, 31, 32).

2.3.2.2. Alveol kanal (duktus alveolaris)

Alveoler kanal, respiratuar bronşiyolünü alveolar keselere bağlayan küçük, ince duvarlı bir tüptür (19, 32). Tip I ve Tip II alveoler hücreleri içeren tek katlı yassı epitel ile kaplıdır. Epitelin oturduğu bazal membran, elastik ve kollajen lifler içerir. Alveoler kanallar, alveoler keselerle ilişkili küçük keseler olan atriyumla açılır. Her atriyumdan iki veya daha fazla alveolar kese çıkar. Alveol keseleri, akciğerlerde gaz alışverişinin yapıldığı yerdir. Alveoler kanal ve keselerdeki elastik lifler, inhalasyon sırasında akciğerlerin genişlemesine yardımcı olur. Retiküler lifler, aşırı genişleme sırasında kılcal damarları ve alveolar septumları hasardan korumaya yardımcı olur (19, 21, 31, 32).

2.3.2.3. Alveol keseler (sakkus alveolaris)

Alveoler keseler, ortak bir boşlukla çevrili alveol kümeleridir. Alveol kesesindeki alveoller, atriyum olarak da bilinen bu boşluğa açılır. Atriyumlar, havayı

respiratuar bronşiyollerinden alveollere taşıyan tüpler olan alveolar kanallara bağlıdır (19, 21, 31, 32).

2.3.2.4. Alveoller

Alveoller, solunum sisteminin gaz değişiminin gerçekleştiği en küçük birimleridir. Çapları yaklaşık 200-250 mikrometredir ve tek bir yassı epitel tabakası ile kaplanmıştır. Alveol duvarı, alveollerdeki hava ile kılcıl damarlardaki kan arasındaki oksijen ve karbondioksit difüzyonunu artıran özel bir yapıya sahiptir (19, 21, 31, 32).

İnteralveoler septum, bitişik alveolleri ayıran ince dokudur. Kılcıl damarları, fibroblastları, elastik ve kollajen lifleri ve makrofajları içerir. İnteralveoler septumdaki kılcıl damarlar, gaz değişimi için geniş bir yüzey alanı sağlar. Kan-hava bariyeri, alveollerdeki havayı kılcıl damarlardaki kandan ayıran ince bir doku tabakasıdır. Üç katmandan oluşur: tek katmanlı yassı alveoler epitel, kılcıl damarların tek katmanlı yassı endotel hücreleri ve bu iki katmanın kaynaşmış bazal membranı. Kan-hava bariyerinin kalınlığı yalnızca yaklaşık 0.1-1.5 mikrometredir, bu da oksijen ve karbondioksitin hava ile kan arasında etkili bir şekilde difüzyonuna izin verir (19, 31, 32).

Kohn gözenekleri, bitişik alveolleri birbirine bağlayan interalveoler septumdaki küçük açıklıklardır. Çapları yaklaşık 10-15 mikrometredir. Kohn gözenekleri, alveoller arasındaki basıncı eşitlemeye ve alveollerin çökmesini önlemeye yardımcı olur. Akciğerlerdeki hava dolaşımında da rol oynarlar (19, 21, 31, 32).

İnteralveoler septumda rastlanan 5 çeşit hücre vardır. Bunlar;

Tip I pnömosit hücreler (Tip I alveoler hücre, yassı alveol hücresi),

Tip II pnömosit hücreler (Tip II alveoler hücre, septal hücre),

Kapiller endotel hücresi,

İnterstisyel bağ dokusu hücresi,

Alveoler makrofajlar (toz hücreleri).

1) Tip I pnömosit hücreler (Tip I alveoler hücre, yassı alveol hücresi):

Tip I alveol hücreleri, alveollerde en bol bulunan hücre tipidir. Alveol yüzey alanının yaklaşık %90-97'sini oluştururlar. Gazların maksimum difüzyonuna izin veren çok ince ve düzdürler. Sıvının alveollerden dışarı sızmasını önlemeye yardımcı olan sıkı bağlantılarla tip II hücrelere bağlanırlar. Tip I alveol hücrelerinin çok sayıda organeli yoktur, bu da onları çok ince yapar. Tip I alveoler hücrelerde bulunan organeller çoğunlukla hücrenin periferinde bulunur. Bu, hücrenin merkezini gaz difüzyonu için temiz tutmaya yardımcı olur (19, 21, 32).

2) Tip II pnömosit hücreler (Tip II alveoler hücre, septal hücre):

Tip II alveoler hücreler, alveollerde en bol bulunan ikinci hücre tipidir. Alveolar yüzey alanının yaklaşık %5'ini oluştururlar, ancak sayıları toplamda Tip I hücrelerden daha fazla olabilir. Kübik veya küre şeklindedirler ve apikal yüzeylerinde kısa mikrovilluslara sahiptirler. Tip II alveoler hücreler, alveollerin çökmesini önlemeye yardımcı olan bir madde olan yüzey aktif maddeyi üretmekten sorumludur. Sürfaktan, alveollerin yüzey gerilimini düşüren karmaşık bir lipid ve protein karışımıdır. Bu, akciğerlerdeki basınç düşük olsa bile alveollerin açık kalmasını sağlar. Yüzey aktif maddenin ayrıca bazı antibakteriyel özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir. Alveolleri enfeksiyondan korumaya yardımcı olur. Tip II alveoler hücreler de kök hücrelerdir. Bu, bölünebilecekleri ve yeni Tip II hücreler üretebilecekleri anlamına gelir. Tip I hücrelere de farklılaşabilirler (19, 21, 32).

3) Kapillerler endotel Hücresi:

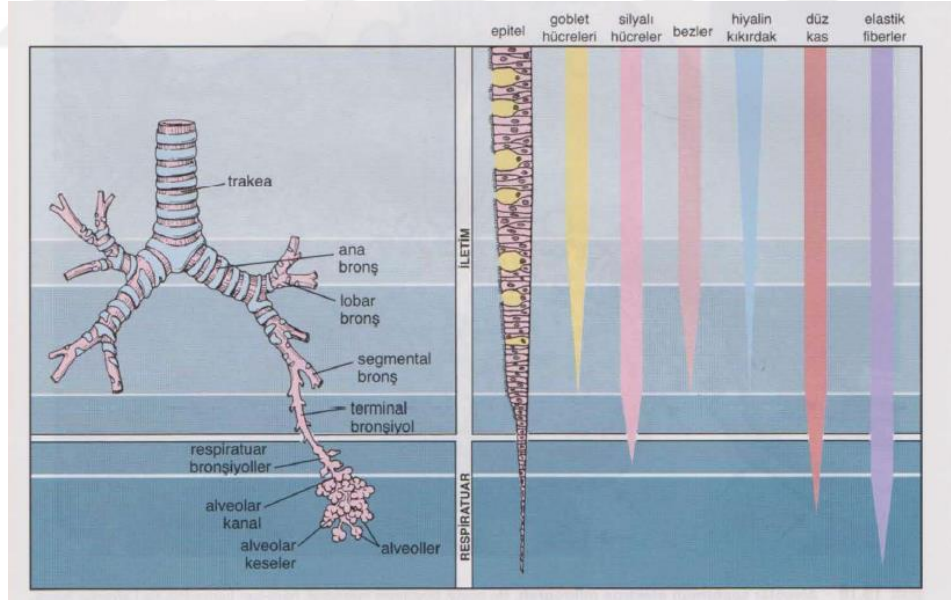
Kapillerler vücuttaki en küçük kan damarlarıdır. Gazların ve diğer maddelerin difüzyonuna izin veren ince ve düz hücreler olan endotel hücreleri ile kaplanmıştır. Endotel hücreleri, sıvının kapillerden dışarı sızmasını önlemeye yardımcı olan sıkı bağlantılarla birbirine bağlanır. Kapillerin endotel hücreleri de birçok metabolik olayda yer alır. Kapillerin dış yüzeyi, kasılma hücreleri olan perisitler ile çevrilidir. Perisitler, kılcal damarlardaki kan akışını düzenlemeye yardımcı olur (19, 21, 32).

4) İnterstisyel hücre:

İnterstisyel hücreler, akciğerlerdeki alveolleri ve kılcal damarları çevreleyen doku olan interstisyumu oluşturan hücrelerdir. İnterstisyumun en önemli hücresi fibroblasttır. Fibroblastlar kollajen, elastik lifler ve glikozaminoglikanların sentezlenmesinden sorumludur. Kollajen, akciğerlere yapısını veren bir proteindir. Elastik lifler, akciğerlerin solunum sırasında genişlemesine ve büzülmesine yardımcı olur. Glikozaminoglikanlar, akciğerleri nemli tutmaya yardımcı olan bir şeker türüdür (19, 21, 32).

5) Alveoler Makrofajlar (toz hücreleri):

Alveoler makrofajlar (toz hücreleri), akciğerlerde bulunan bağışıklık hücreleridir. Kemik iliği kökenlidirler ve kandaki monositlerden farklılaşırlar. Makrofajlar, akciğerleri enfeksiyondan ve diğer yabancı maddelerden korumada önemli bir rol oynadıkları interstisyuma ve alveolar boşluğa göç ederler. Lizozomlar, fagozomlar ve fagolizozomlar, alveolar makrofaj sitoplazmasında bol miktarda bulunur. Makrofajların ömrü yaklaşık 7 gündür (19, 21, 32).



Şekil 5. Bronşiyal ağacın bölümleri ve histolojik özellikleri (19).

2.4. Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu (ARDS)

ALI, ilerleyici hipoksemi (kandaki düşük oksijen seviyeleri), dispne (nefes darlığı) ve artan solunum hızı ile kendini gösteren solunum yetmezliğine ve ölüme yol açabilen bir hastalıktır. ALI'nin klinik tablosu değişken tanımlansa da orta veya hafif akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) olarak yeniden isimlendirilmiştir. ARDS, popülasyonda önemli bir morbidite ve mortalite kaynağı olarak tüm yoğun bakım ünitesi yatışlarının %10'undan fazlasını ve tüm hastane yatışlarının %4'ünü oluşturur (34).

1967'de Ashbaugh ve arkadaşları akut başlangıçlı ve pozitif basınçlı mekanik ventilasyon gerektiren 12 hastada (7'si öldü), "ağır dispne, takipne, oksijen tedavisine dirençli siyanoz, akciğer kompliyansının kaybı ve göğüs röntgeninde görülen yaygın alveolar infiltrasyon" gibi klinik belirtileri gösteren sendromu tanımladılar (35).

Sonraki çalışmada Petty ve Ashbaugh, "yetişkin solunum sıkıntısı sendromu" olarak isimlendirip ve detaylandırdıkları 40 vakada, akciğer hasarının mekanizmasının doğrudan (göğüs travması, aspirasyon) ya da dolaylı (pankreatit, sepsis) akciğer hasarına bağlı olduğunu ve bazı vakalar mekanik ventilasyona gereksinim duyulduğunu saptadı (36).

Hastalığın belirtilerini tanımlayan çok sayıda faktör olduğundan daha kesin bir tanıma ihtiyaç duyulmuştu. 1994 yılında Amerikan-Avrupa Uzlaşma Konferansı Komitesi, ARDS için bir konsensüs oluşturarak 3 kriter oluşturmuşlardır:

- Göğüs radyografisiyle diffüz bilateral pulmoner infiltratların akut başlangıcı;
- ALI için bir $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \leq 300$ ve ARDS için ≤ 200 ; (PaO_2 : arteriyel oksijen basıncı FiO_2 : Solunan her 100 birim hava molekülü içindeki toplam oksijen molekülü)
- Pulmoner arter kan basıncı ≤ 18 veya klinik olarak sol atriyal hipertansiyon (37).

ARDS'nin tarihi 3 ana döneme ayrılmalıdır:

(1) 1995'ten önce (Amerika-Avrupa Konsensüs Konferansı (AECC) kriterlerinin yayınlanmasından önce),

(2) 1995'ten 2000'e kadar (AECC kriterlerinin uygulanması ve akciğer koruyucu mekanik ventilasyonun geliştirilmesi)

(3) 2001'den günümüze (akciğer koruyucu mekanik ventilasyon dönemi) (34).

2000 yılında yayınlanan ARDS çalışmasında 60 günlük mortalitenin %40 iken hastalığın şiddetinin artmasına rağmen 2011'de yayınlanan en son ARDS çalışmasında mortalitenin %21'e düştüğü gösterilmiştir (35). ARDS'li 3022 hasta üzerinde yapılan çok merkezli büyük bir çalışmada mortalite oranının yaklaşık %40 olduğunu göstermektedir. Bu ölüm oranı ARDS'nin ciddiyeti arttıkça artmaktadır; hafif vakalar için %35, orta vakalar için %40 ve ciddi vakalar için %46 olarak rapor edilmiştir (36).

ARDS'yi sıklıkla diğer hayati organlarda yetmezlik takip eder ve ölüm daha sıklıkla çoklu organ fonksiyon bozukluğu nedeniyle meydana gelir. Montgomery ve ark. çoklu organ yetmezliği ile birlikte sepsis sendromunun en sık görülen ölüm nedeni olduğunu (%84) ve geri dönüşümsüz solunum yetmezliğinin toplam vaka ölümünün yalnızca %16'sından sorumlu olduğunu bulmuşlardır (37).

Klinisyenler ve araştırmacılar, ARDS'nin patofizyolojik özelliklerine sahip hastaları tanımlamak ve klinik uygulama kılavuzlarını uygulamak için risk faktörlerini doğrudan (pulmoner) ve dolaylı (ekstrapulmoner) hasar olmak üzere iki kategoriye ayırmışlardır (Tablo 2). Doğrudan hasar, yaygın pulmoner enfeksiyon (örn., bakteriyel, viral, mantar, pnömokist), toksik gaz/duman soluma, pulmoner kontüzyon ve mide içeriğinin aspirasyonu gibi toksik bir maddenin doğrudan akciğer epiteline zarar verdiği durumları içerir. Dolaylı hasar daha yaygındır ve akut pankreatit ve majör cerrahi, travma, çoklu transfüzyonlar, nefes darlığı, iskemi-reperfüzyon hasarı dahil diğer klinik olaylar ve azalmış akciğer kompliyansı, sepsis, septik şok gibi kan yoluyla bulaşan sistemik inflamatuvar süreçler aracılığıyla oluşur (38, 39).

Tablo 2. ARDS'nin etiyolojik risk faktörleri (39)

Doğrudan ARDS risk faktörleri	Dolaylı ARDS risk faktörleri
Pnömoni (bakteriyal, viral, fungal)	Sepsis
Mide içeriğinin aspirasyonu	Göğüs dışı travma veya hemorajik şok
Toksik inhalasyon	Pankreatit
Pulmoner kontüzyon	Yanık
Suda boğulma	Kardiyopulmoner baypas
	Aşırı dozda ilaç
	Kan transfüzyonu
	Akciğer transplantasyonu veya embolektomi sonrası reperfüzyon ödemi

2.4.1. ARDS patofizyolojisi

ARDS'nin temel özelliği, akciğerin alveoler-kılcal bariyerinin bütünlüğünün bozulmasından sonra proteinden zengin alveoler ödemin oluşmasıdır. Doğuştan gelen bağışıklık tepkisi ARDS patogenezinde önemlidir ve aktive edilmiş nötrofiller, makrofajlar ve dendritik hücreler yoluyla dokulara zarar verir. Akciğer dokusunda hasar meydana geldiğinde, biriken nötrofiller proteolitik enzimleri, reaktif oksijen türlerini, sitokinleri ve nötrofil hücre dışı tuzaklarını serbest bırakır. Özellikle pulmoner sürfaktanın salgılanmasını ve akciğerdeki su dengesini düzenleyen tip II alveoler epitel hücrelerinin hasar görmesi kritik öneme sahiptir. ARDS'de yaygın alveolar tasma, yayılma kapasitesini azaltır ve yüzey aktif maddeyi etkisiz hale getirir; bu da akciğer kompliyansını azaltır, ventilasyon-perfüzyon uyumsuzluğunu artırır ve intrapulmoner şant oluşturarak dirençli hipoksemiye neden olur (40).

2.4.1.1. ARDS patogenezinin aşamaları

ARDS'de akciğerde meydana gelen histolojik değişiklikler ilk kez 1977'de Bachofen ve Weibel tarafından tanımlanmıştır (41). ALI/ARDS'nin histolojik karşılığı diffüz alveolar hasar (DAH) olarak adlandırılır. ARDS'de hasarlı akciğerin üç aşamadan geçtiğine inanılır: eksüdatif (akut), proliferatif (subakut) ve fibrotik, ancak her fazın seyri ve genel hastalık ilerlemesi değişkendir (42, 43).

Akut faz (ilk 1-7. gün): Alveollerde bir nötrofil, makrofaj ve kırmızı kan hücresi akışı ile karakterizedir. Alveolar boşlukları kaplayan ayırt edici hiyalin membranların ilk gelişimi vardır. Endotel hücreleri şişer, hücreler arası bağlantılar genişler ve pinositik veziküller artarak kılcal membranın bozulmasına neden olarak kılcal sızıntı ve ödem oluşumuna neden olur. İnterstisyumda sıvı birikimi bakteriyemi ve sepsise yatkınlık yaratır. Tip I pnömositler sonunda bazal membrandan ayrılır sitoplazmik vakuollerle şişer. Tip I hücrelerin bazal yüzeyinde, NF- κ B yoluyla inflamatuvar yanıtın yayılmasından sorumlu olan gelişmiş glikasyon son ürünleri için reseptör tanımlanır, böylece proinflamatuvar sitokinlerin, reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve proteazların üretimi artar. Endotel hücreleri ve pnömositler nekroza uğrar (42, 44).

Proliferatif faz (8-21. günler): Hiyalin membranlar, DAH subakut faza devam ederken olgunlaşır ve alveolar boşluklarda granülasyon dokusu gelişir. Alveoler tip II pnömositler çoğalmaya başlar ve soyulmuş bazal membranı yeniden döşer ve hiperplastik hale gelir. Fibrozis bu aşamada belirginleşir. Fibroblastlar ve miyofibroblastlar, alveolar membrandaki çatlaklardan fibrinöz intraalveolar eksüdaya göç ederek hücrel bir granülasyon dokusu oluşturur. Kollajen biriktikçe seyrek hücrel, yoğun fibröz doku oluşur (43).

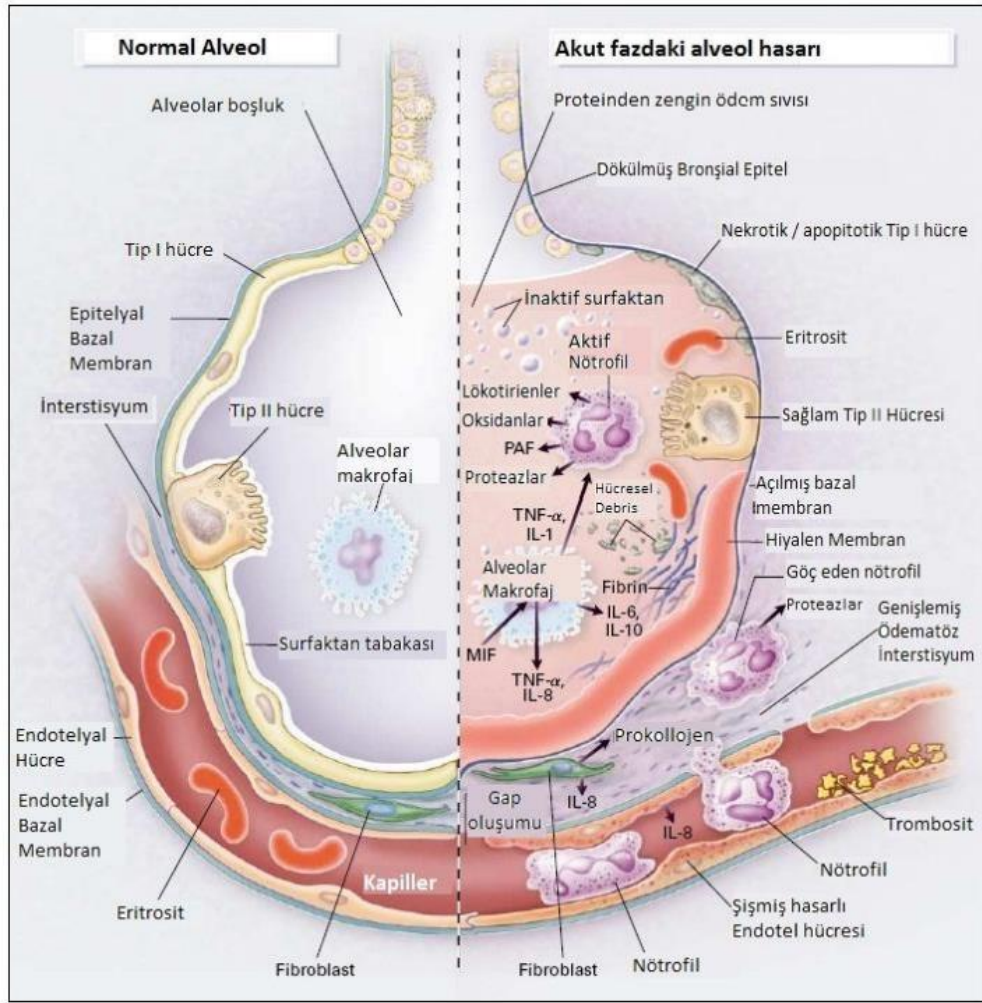
Fibrotik faz (>21. Gün): Hasarın başlangıcından 36 saat sonra başlayabilir. Seyrek hücreli kollajen doku tarafından akciğerin kapsamlı yeniden şekillenmesi, solunum yetmezliğinin üçüncü veya dördüncü haftasında meydana gelir. Hava boşlukları düzensiz olarak genişler ve alveolar kanal fibrozu vardır. Tip III kollajen, zamanla sert bir akciğere yol açan tip I sert kollajen ile değiştirilir. Fibrozisin yaygınlığı mortalite ile ilişkilidir. ARDS'nin başlarında, tümü potansiyel olarak geri döndürülebilir olan pulmoner vazokonstriksiyon, tromboembolizm ve interstisyel

ödem pulmoner arter basıncını yükseltir. Birkaç hafta sonra, mikrosirkülasyonun fibröz obliterasyonu ve arteriyel muskularizasyon, geri dönüşümsüz pulmoner hipertansiyona katkıda bulunur (43).

2.4.1.2. ARDS patofizyolojisindeki mediatörler

ARDS'nin patofizyolojisinde doğuştan gelen bağışıklık cevabı kritik bir rol oynar. Makrofajlar, nötrofiller, epitelyal ve endotelyal hücreler gibi bağışıklık hücreleri içeren karmaşık süreçler doku hasarına aracılık eder. Sitokinler ve diğer pro-inflamatuar moleküller bu süreçte önemli bir yere sahiptir. Bu ajanlar, ARDS'de inflammatuar cevabı başlatır ve sürdürür. Sitokinler sadece inflammatuar hücrelerden değil, aynı zamanda fibroblastlar ve akciğer epitel hücrelerinden de salgılanabilir.

TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 gibi proinflammatuar sitokinler ve hem de anti-inflamatuar sitokinlerin IL-10 ve IL-13 salınır. Bu sitokinler, alveol ve kılcal duvarlara zarar vererek sıvı ve proteinlerin interstisyum ve alveollere sızmasına neden olabilir. Ayrıca, daha fazla proinflammatuar sitokinleri ve dokuya zarar veren enzimleri serbest bırakabilen nötrofilleri aktive edebilirler. NF- κ B, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 ve diğer proteinlerin transkripsiyonunu düzenleyen bir regülatör transkripsiyon faktörüdür. Bundan dolayı ARDS patofizyolojisinde önemli bir yere sahiptir. Şekil 6' da ARDS patofizyolojisinde etkili mediatörler gösterilmiştir.



Şekil 6. ARDS patofizyolojisinde etkili mediatörler (45).

Nötrofiller

Nötrofiller ARDS'ye aracılık etmede önemli bir role sahiptir. Bir enfeksiyon bölgesine toplandıklarında fagositoz, reaktif oksijen türlerinin ve nitrik oksit türlerinin üretimi ve litik enzimlerin degranülasyonu gibi çeşitli yararlı işlevler sergilerler ve iyi düzenlendiğinde istilacı patojenin temizlenmesini sağlarlar. Bununla birlikte, aynı işlevler düzensiz olduğunda ve yaralanma ve organ hasarıyla sonuçlanması sonucu aktive edilmiş polimorfonükleer lökositlerin (PMN) toplanmasının potansiyel olarak zararlı olabileceği de varsayılmaktadır. Nötrofillerin aktivasyonu, TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflatuar araçlar ve IL-8 ve monosit kemotaktik protein-1 gibi kemokinlerle yakından ilişkilidir.

Sistemik inflamatuvar yanıtının bir sonucu olarak, PMN'ler, genel dolaşım içinde aktive olur ve bazıları daha sonra pulmoner mikrosirkülasyon içinde

kalır. Hasar ilerledikçe, lökositler pulmoner interstisyuma göç eder ve artan endotelyal geçirgenlik doku ödemeine yol açar. Akciğerlerdeki epitelyal ve endotelyal bariyerlerin bozulması, normalde hava boşluklarından dışlanan yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerin birikmesiyle epitelyal ve endotelyal geçirgenlikte büyük bir artış ile ilişkilidir (45, 46). Bu, belirgin bir PMN akışı ile birlikte gerçekleşir ve böylece PMN'ler alveolar boşluklarda baskın lökositler haline gelir. Nötrofiller pulmoner mikrovaskülatürde birikir ve aktive olurlar ve proteazlar, reaktif oksijen türleri, proinflamatuvar sitokinler ve prokoagülan moleküller dahil olmak üzere birçok toksik mediatörün salınmasına yol açarlar. Bu damar geçirgenliğinin artmasına neden olur (47). Normalde hava boşluğu hücrelerinin %90 veya daha fazlası alveolar makrofajlardır, <%10'u lenfositlerdir ve sadece %1-2'si PMN'dir. ARDS'li hastalarda, %90'a kadar hava boşluğu hücreleri PMN'dir. ARDS sürdürüldüğünde, PMN'ler hava boşluklarında kalır ve makrofajların sayısı azalır. ARDS çözüldüğünde, makrofajların sayısı artar, ancak lenfosit birikimi nadiren meydana gelir (48).

PMN'ler, ARDS sürecinde yer alan, ROS üreten ve alveolar epitel hücrelerinin ölümüne yol açan başlıca inflamatuvar hücrelerdir. ROS'un birçok insan hastalığının patogeneze katıldığı gösterilmiştir. Aşırı ROS, alveolar epitel hücreleri tarafından hücre içi transdüksiyon yollarının aktivasyonunu ve proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını indükleyerek hem doğrudan hücre toksinleri hem de ikincil haberciler olarak hareket eder. Bu, alveolar-kapiller bariyerin tahrip olmasına, pulmoner geçirgenliğin artmasına, endotelyal ve epitel hücre ölümüne ve PMN'nin alveolar boşluklara göç etmesine neden olur (49).

Alveolar makrofajlar

Alveolar makrofajlar, hasar görmemiş akciğerdeki yerleşik lökositlerin en az %90'ını oluşturur. Bu inflamatuvar hücreler, üst solunum yolu mukosilyer savunma mekanizmasından kaçıp distal hava yoluna ulaşacak kadar küçük olan parçacıkların fagositozundan ve yok edilmesinden sorumludur. Fagositoz ve alveolar temizlenme sürecinde makrofajlar proteazları, metaloproteazları ve oksidan türleri serbest bırakır ve potansiyel olarak bitişik endotel ve/veya epitelyuma zarar verir. Doğrudan akciğer hasarı oluşturma yanı sıra makrofajlar, sistemik inflamasyona sahip hayvan modellerinde akut akciğer hasarını ortaya çıkaran ve inflamatuvar yanıtı etkili bir

şekilde güçlendiren erken yanıt T hücre-1 sitokinleri olan IL-1 ve TNF- α 'yı salgılar (50).

Alveolar epitel

Alveolar epitel, akciğer alveollerinin iç yüzeyini kaplayan ve solunum sisteminde önemli rol oynayan özel bir epitel tipidir ve iki farklı hücre içerir. Tip I alveoler epitel hücreleri alveolar hava sahasının yüzeyinin %90-95'ini kaplar. Tip I hücreler son derece ince ve yassı, alveolar duvar boyunca yayılmış sitoplazmik uzantılarla karakterize edilir. Bu yapısal değişiklikler, hava-kan arayüzünde gaz değişimi için difüzyon mesafesini en aza indirir. Aksine, tip II alveolar epitel hücreleri alveolar hava sahasının yüzeyinin %3-5'ini kaplayan kübik şekillidir, apikal yüzeylerinde çok sayıda mikrovilli bulunur ve pulmoner yüzey aktif maddeyi depolayan lameller cisimcikler içerir.

Alveolar epitel, solüt değişimi açısından pulmoner endotelden daha kısıtlayıcı olmasının yanı sıra, yaralanmaya karşı vasküler bariyerden daha dirençlidir. Bununla birlikte, alveolar epitel bariyeri, mide asidi aspirasyonu veya bakteriyel toksin gibi belirli koşullar altında hasar görebilir, bu da bariyerin bozulmasına ve geçirgenlik ödeme neden olabilir. Spesifik bakterilerin veya bakteriyel ürünlerin neden olduğu hasara ek olarak, inflamatuvar lökositlerden türetilen oksidanların ve proteazların alveoler epitel bariyerine doğrudan zarar verdiğine dair kanıtlar da vardır (51, 52).

Alveolar endotel

Alveolar-kılcal membran, mikrovasküler endotel, interstisyum ve alveolar epitelden oluşur. Normal pulmoner kapiller endotel hücreleri seçici olarak geçirgendir ve serum proteinlerinin geçişini engeller. Her gün yaklaşık 500 mL su ile küçük çözünen maddelerin geçmesine izin verir. Bunun nedeni, daha büyük moleküllerin geçişini engelleyen bir bariyer oluşturan endotel hücreleri arasındaki bağlantıların varlığıdır. Bu bağlantıların yapısal bileşenleri, sıkı bağlantıların ana bileşeni olan okludin ve yapışık bağlantı noktasını oluşturan kadherinlerden oluşur (53, 54). Endotel hücrelerinden geçen sıvı daha sonra interstisyel boşluktan lenfatikler yoluyla yeniden sirküle edilir. ARDS'de artan transvasküler sıvı ve protein sızıntısının, endotel hücre disfoksiyonundan ve hücreler arası sıkı bağlantılar (okludin vb) ve yapışık bağlantılarının bütünlüğünün bozulmasından kaynaklandığı fikri dolaylı kanıtlarla

güçlü bir şekilde desteklenmektedir (55). Ayrıca endotelial bağlantılar nötrofil sekestrasyonunu, migrasyonunu ve protein sızıntısını önleyebilir ve organizmanın iç ortamının stabilitesini koruyabilir. Aktive nötrofiller, endotel hücrelere zarar vererek ve vasküler bariyer bütünlüğünü bozarak ARDS'ye katkıda bulunur.

2.4.2. ARDS tedavi

ARDS'de temel tedavi stratejisi; altta yatan primer nedenin tedavisi, yeterli oksijenasyonun sağlanması, metabolik destek, hastanın semptomlarının tedavisinden ve genel durumunu iyileştirmekten oluşmaktadır. Bununla birlikte, sonuçları iyileştirmek için kullanılabilecek bir dizi farmakolojik olmayan ve farmakolojik müdahale vardır.

Farmakolojik olmayan müdahaleler arasında akciğer koruyucu mekanik ventilasyon, yüzüstü pozisyonlama ve konservatif sıvı yönetimi yer alır. Akciğer koruyucu mekanik ventilasyon, düşük tidal hacimler ve sınırlı inspiratuar plato basınçları kullanarak daha fazla akciğer hasarını önlemeye yardımcı olur. Yüzüstü pozisyon, ARDS'li bazı hastalarda oksijenlenmeyi ve akciğer fonksiyonunu iyileştirir. Konservatif sıvı yönetimi pulmoner ödeme azaltmaya ve akciğer fonksiyonunu iyileştirmeye yardımcı olur (56, 57).

ARDS için farmakolojik müdahaleler, nöromusküler bloke edici ajanları (NMBA'lar), kortikosteroidleri, fosfodiesteraz (PDE) inhibitörlerini ve aspirini içerir. NMBA'lar hasta-ventilatör senkronizasyonunu iyileştirebilir ve oksijen tüketimini azaltabilir (58). Kortikosteroidlerin anti-inflamatuar ve ödem önleyici etkileri vardır (59). PDE inhibitörleri, anti-inflamatuar, anti-oksidan ve anti-ödem etkileri dahil olmak üzere geniş bir etki spektrumuna sahiptir (60, 61). Aspirinin ARDS insidansını azalttığı gösterilmiştir (62, 63).

ARDS için klinik deneylerde incelenen diğer tedaviler arasında statinler, beta-agonistler, nonsteroidal anti-inflamatuar ilaçlar, anti-oksidanlar, ekzojen sürfaktan, nötrofil elastaz inhibitörleri, antikoagülanlar ve anti-TNF biyolojik maddeler yer alır. Ancak bu tedavilerin ARDS'li tüm hastalarda etkili olduğu gösterilmemiştir (64, 65).

Hücre terapileri ve intravenöz mezenkimal kök hücre tedavisi, ARDS için potansiyel tedaviler olarak araştırılmaktadır. Bu terapiler akciğer hasarını onarmaya ve akciğer fonksiyonunu iyileştirmeye yardımcı olabilir (65).

2.4.3. ARDS deneysel hayvan modelleri

Akut akciğer hasarı ile ilgili insan çalışmaları, akciğerdeki patofizyolojik değişiklikler hakkında önemli bilgiler sağlar ve akciğer hasarının mekanizmalarının aydınlatılmasına yardımcı olur. Bu hasar mekanizmaların tam olarak aydınlatılması amacıyla hayvan modelleri yapılmakta fakat bu modeller insanlardaki klinik tabloyu tam oluşturmamaktadır. Hayvanlarda ARDS tanımlamasında klinik tablodan daha çok insandaki ARDS’de gözlenen histopatolojik kriterler kullanılmaktadır. ARDS için ideal hayvan modeli, nötrofilik alveolit, hiyalin membran birikimi ve mikrotrombüs oluşumunun patolojik üçlüsünü tam olarak taklit eden model olacaktır. Ancak böyle ideal bir model yoktur (66).

İnsanlardaki ARDS özelliklerini taklit etmek amacıyla hayvanlarda çok sayıda farklı model geliştirilmiştir. Bu modeller temel olarak, akciğerin direkt veya indirekt hasarlandığı modeller olarak ikiye ayrılmaktadır. Direkt hasarlanma modelleri, kimyasal tahriş edici veya mekanik yaralanma gibi zararlı bir maddenin akciğere doğrudan uygulanmasını içerir. İndirekt hasarlanma modelleri, sepsis veya pankreatit gibi akciğer hasarına yol açan sistemik bir hasarın indüklenmesini içerir (67).

Akciğerin direkt hasarlandığı modeller: Akciğere zararlı bir maddenin doğrudan uygulanmasını içerir. Bu, bakterilerin veya lipopolisakkarit (LPS) gibi bakteriyel bir ürünün intratrakeal veya intranazal olarak uygulanması, aspirasyon oluşturmak için hidroklorik asit veya mide partikülleri gibi bir asidin uygulanması, yüksek bir inspiratuar fraksiyonda oksijen verilmesi, %0,9 sodyum klorür ile seri lavaj yoluyla yüzey aktif madde tüketim yoluyla, hilumun klemplenmesiyle iskemi/reperfüzyon oluşturulması veya yüksek tidal hacimlerde mekanik ventilasyon kullanılarak mekanik gerilmeye maruz bırakma sayılabilir (66, 67).

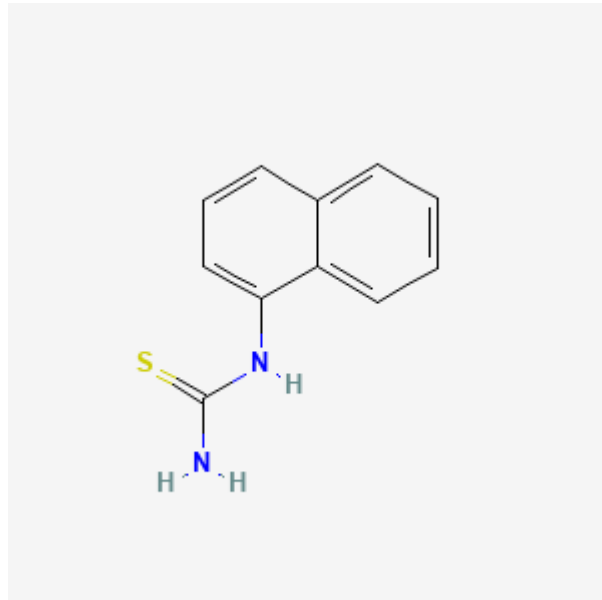
Akciğerin indirekt hasarlandığı modeller: Akciğer hasarına yol açan sistemik bir hasara neden olmayı içerir. Bu, sepsis oluşturarak, bakteri veya LPS gibi bir bakteriyel ürün uygulayarak veya mezenterik iskemi/reperfüzyona neden olarak

yapılabilir. Dolaylı yaralanma modeline bir örnek, çekal ligasyon ve delmedir. Bu modelde çekum bağlanır ve delinir, bu da bakteri ve endotoksinleri kan dolaşımına salar. Bu sepsis ve akciğer hasarına yol açar. Dolaylı yaralanma modelinin bir başka örneği de oleik asit modelidir. Bu modelde periton boşluğuna oleik asit enjekte edilir. Bu, akciğer hasarına neden olan inflamatuvar mediatörlerin salınmasına yol açar (66, 67). İndirek akciğer hasarı bir kemirgen öldürücü ilaç olan ANTU'nun ip. uygulamasıyla da indüklenebilir. ANTU kan dolaşımına emilir ve akciğer hasarına yol açan sistemik iltihaplanmaya neden olur (68).

2.4.4. Alfa-Naftiltioüre (ANTU)

ANTU, 1945'te Richter tarafından bir rodentisit olarak keşfedilmiştir. Özellikle Norveç fareleri için çok zehirli bir bileşiktir ve oral LD50 değeri 6-6.9 mg/kg'dır. Genç Norveç fareleri, ANTU'ya yetişkinlerden biraz daha dirençlidir (69, 70).

ANTU, renksiz (gri), kokusuz ve acı tatlı, kristal bir tozudur. Erime noktası 198°C'dir (saf). 25°C'de suda çözünürlüğü 0.06 g/100 ml'dir; aseton içinde, 2.43 g/100 ml; ve trietilen glikol içinde, 8.6 g/100 ml'dir. Kimyasal formülü C₁₁H₁₀N₂S'dir ve moleküler ağırlığı 220.28'dir (71, 72). Yapısal formülü, Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. Alfa-naftiltioürenin yapısal formülü (72).

Deney hayvanlarında ip. olarak ANTU uygulaması yaygın PE ve akut pulmoner vasküler hasar ile karakterize doza ve zamana bağılı bir inflamatuvar reaksiyon oluşturan bir indirekt akciğer hasarı modelidir (73). Yapılan morfolojik çalışmalar, akciğerdeki kapiller endotel hücreleri hasarının, ANTU'nun akciğer hasar mekanizmasındaki birinci hedefi olduğunu göstermiştir.

Endotel hücre hasarı nedeniyle hücre bütünlüğü kaybolur ve endotel bariyer fonksiyonu ortadan kalkar. Bunun sonucunda da kapiller geçirgenlik artışı ve bunu takiben interstisyel ve alveolar ödem gözlenmektedir (74). Meydana gelen PE ve ödem akciğer ağırlığında artışına neden olmaktadır. ANTU uygulamasından 1 saat sonra pulmoner ödem ve PE meydana gelmeye başlar, 4 saat sonra ise maksimum seviyeye oluşur ve bir-iki gün içinde tamamen yok olabilir veya ölüme neden olur (75). ANTU modelinde PE oluşumunun ana mekanizması, akciğer interstisyel sıvısının visseral plevradaki lenfatik damarların kapasitesini aşması nedeniyle plevral boşluğa drenajıdır (76). ANTU'nun neden olduğu pulmoner ödeme, hava yollarından ve pulmoner vasküler yataktan kaynaklanan vazoaktif maddelerin neden olduğu tahmin edilesede kesin etki mekanizması bilinmemektedir. Bu hasara kısmen araşidonik asit metabolitlerinin aracılık ettiği ve ANTU'nun sitokrom P-450 monooksijenaz katalizli bir metabolitinin pulmoner makromoleküllere kovalent bağlanmasından kaynaklandığı gösterilmiştir (77, 78).

Son çalışmalar, L-arginin/ nitrik oksit (NO) yolu, anjiyotensin II sinyali ve araşidonik asit metabolitlerinin ANTU aracılı akut akciğer hasarında rol oynadığını göstermiştir. ANTU uygulaması, akciğer dokusunda indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ifadesini artırarak NO üretimine yol açar. NO, kan damarlarının genişlemesine ve sıvının akciğerlere sızmasına neden olabilen güçlü bir damar genişleticidir (77). ANTU ayrıca akciğerlerde anjiyotensin I'in anjiyotensin II'ye dönüşümünü azaltır. Anjiyotensin II, kan basıncını korumaya yardımcı olan bir vazokonstriktördür. Anjiyotensin II seviyeleri düştüğünde, kan basıncı düşer ve kan damarları genişler. Bu da akciğerlere sıvı kaçmasına neden olabilir (79, 80).

2.5. Serbest Radikaller

Bir serbest radikal, atomik bir yörüngede eşleşmemiş bir elektron içeren, bağımsız olarak var olma yeteneğine sahip bir molekül olarak tanımlanabilir. Bu tanım hidrojen atomunu (eşleştirilmemiş e⁻), geçiş metallerini ve oksijen molekülünü içerir. Eşleşmemiş bir elektronun varlığı, çoğu radikal tarafından paylaşılan bazı ortak özelliklerle sonuçlanır. Birçok radikal kararsızdır ve oldukça reaktiftir. Diğer moleküllere bir elektron verebilir veya onlardan bir elektron alabilirler, bu nedenle oksidan veya indirgeyici gibi davranırlar (81).

Bu moleküller birçok hastalık durumunda vücutta sürekli olarak oluşur ve anti-oksidan savunma sistemi tarafından yok edilirler. Eğer anti-oksidan sistem yeterli çalışmazsa denge serbest radikal yönünde bozulur ve hücre hasarlarına yol açar. Bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır. Oksidatif stres, anti-oksidan sistemin düzgün çalışmaması veya artan serbest radikaller vücutta negatif bir zincirleme reaksiyonu tetiklemesiyle hücrelerde; DNA, proteinler, karbonhidratlar, lipitler ve enzimlerin zarar görmesidir (82).

2.5.1. Serbest radikallerin tipleri

Süperoksit Radikali

Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), 17 elektronlu ve negatif elektrik yüklü iki oksijen atomundan oluşan (O_2) moleküler oksijenin indirgenmiş formudur ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$). Enzimatik süreç, otooksidasyon reaksiyonu ve bir elektronun moleküler oksijene transfer edildiği enzimatik olmayan elektron transfer reaksiyonları tarafından oluşturulan en önemli yaygın reaktif oksijen türüdür. Çoğunlukla mitokondri içinde üretilir ve biyomoleküllerle reaktivitesi düşüktür. Süperoksit üretebilen enzimler arasında ksantin oksidaz, lipooksijenaz, siklooksijenaz ve NADPH bağımlı oksidaz yer alır. Seviyeleri *in vivo* olarak iki farklı enzim türü, süperoksit redüktaz ve süperoksit dismutaz (SOD) ile sınırlıdır (83).

Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit (H_2O_2), iki elektron alarak veya SOD enzimi tarafından katalize edilen bir dismutasyon reaksiyonunda *in vivo* olarak oluşturulur. Biyolojik zarlara kolayca nüfuz edebilir. Serbest radikal değildir. Hafif bir oksitleyici veya hafif bir indirgeyici madde olarak hareket edebilir, ancak lipitler, DNA ve proteinler dahil olmak üzere çoğu biyolojik molekülü kolayca oksitlemez. H_2O_2 tehlikesi, büyük ölçüde geçiş metali iyonlarının varlığında hidroksil radikali ($OH^\cdot$) üreterek DNA'ya zarar vermesinden kaynaklanır. H_2O_2 'yi elimine edebilen başlıca antioksidan enzimler arasında katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx) ve peroksiredoksinler yer alır (84).

Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali ($OH^\cdot$), hidroksit iyonunun nötr formudur ve oldukça reaktif bir serbest radikaldir. DNA, proteinler, lipitler ve karbonhidratlar dahil olmak üzere hem organik hem de inorganik moleküllerle güçlü bir şekilde reaksiyona girebilir ve hücrelerde diğer herhangi bir ROS'un yapabileceğinden daha ciddi hasara neden olabilir (85). $OH^\cdot$, aşağıdakileri içeren çeşitli mekanizmalar tarafından *in vivo* olarak üretilir:

- Fenton reaksiyonu, belirli geçiş metali iyonlarının (özellikle Fe^{2+} ve Cu) H_2O_2 ile reaksiyonu yoluyla
- H_2O_2 'nin homolizi ile
- İyonlaştırıcı radyasyona maruz kaldığında H_2O 'nun parçalanması

Peroksil Radikali

Canlı sistemlerde oksijenden elde edilir. Peroksil radikalının en basit şekli, süperoksitin protonlanmasıyla oluşan perhidroksil radikali ($HOO^\cdot$). Tipik bir hücrenin sitozolündeki toplam $O_2^{\cdot-}$ 'nin yaklaşık %0,3'ü protonlanmış formdadır. Yağ asidi peroksidasyonunu başlatır (86).

Nitrik Oksit

Bu reaksiyonda terminal guanido nitrojen atomlarından biri oksidasyona uğrar ve NO üretir. NO, argininden nitrik oksit sentazlar (NOS) tarafından üretilen çeşitli biyolojik aktivitelere sahip eşleşmemiş bir elektron içeren serbest radikal bir gazdır.

NOS'un nöronal NOS (nNOS), endotelyal NOS (eNOS) ve indüklenabilir NOS (iNOS) gibi üç izoformu NO radikalının oluşumunda yer alır. En önemlisi süperoksit olmak üzere bir dizi molekülle etkileşime girerek peroksinitrit oluşturarak bakterisidal veya sitotoksik reaksiyonlara aracılık edebilir. NO ayrıca birçok organ sisteminde ve patofizyolojik durumda düz kas gevşemesine, nörotransmisyonu ve inflamasyonun modülasyonuna aracılık eder (87).

2.5.2. Serbest radikallerin kaynakları

Organizmadaki serbest radikaller hem endojen hem de eksojen kaynaklar tarafından ortaya çıkan oksidasyon ve indirgeme reaksiyonları sırasında meydana gelir (88).

Endojen Serbest Radikal Kaynakları

Mitokondride oksidatif fosforilasyon yoluyla enerji üretmek için moleküler oksijeni kullanır. Mitokondri, ATP'nin %90'ından fazlasını oksidatif fosforilasyonla üretir ve bunu yapmak için hücrenin oksijen gereksinimlerinin yaklaşık %85'ini tüketir. Oksijenin çoğu suya indirgenir ve küçük bir kısmı serbest radikallere dönüştürülür (89).

Peroksizomlar, hücrelerde bulunan ve çeşitli metabolik reaksiyonlara ev sahipliği yapan organellerdir. Bu reaksiyonlardan biri, solunum yolu olarak da bilinen elektronların çeşitli metabolitlerden oksijene transferini içerir, bu da ısı şeklinde serbest enerjinin salınmasıyla H_2O_2 oluşumuna yol açar. Yağ asitlerinin β -oksidasyonu, peroksizomlarda H_2O_2 üreten ana metabolik süreçtir. Bununla birlikte, açıl coa oksidaz, d-amino asit oksidaz, ksantin oksidaz ve D-aspartat oksidaz gibi farklı peroksizomal enzimlerin farklı ROS'ları ürettiği gösterilmiştir (90).

Endoplazmik retikulum (ER), hücrelerde proteinlerin sentezi, katlanması ve taşınması gibi birçok önemli işlevi yerine getiren bir organeldir. ER'nin elektron taşıma zinciri, ROS'un en büyük kaynağıdır. ROS oluşumuna katkıda bulunan ER enzimleri, sitokrom P450, b5 enzimleri ve diamin oksidazdır (91).

Hücrelerde meydana gelen çeşitli oksidatif enzimler serbest radikaller üretebilir. ROS üretimini katalizleyenler arasında NOS, NADPH oksidaz,

prostaglandin sentaz, ksantin oksidaz, lipoksijenazlar, ribonükleotit redüktaz, glikoz oksidaz, miyeloperoksidaz (MPO), siklooksijenazlar ve sitokrom P450 bulunur (92). Yüksek ROS seviyeleri ayrıca vücudu istilacı mikroorganizmalara karşı koruyan bağışıklık hücreleri (lenfositler, granülositler ve makrofajlar) tarafından üretilir (93).

Eksojen Serbest Radikal Kaynakları

Ekzojen serbest radikal kaynakları arasında radyasyon, hava ve su kirliliği, sigara dumanındaki NO, alkol, kullanılmış sıvı yağ, endüstriyel solventler, sudaki klor ve ozon gibi çevresel kirleticiler, ağır veya geçiş metalleri (Cd, Hg, Pb, Fe, As), bazı ilaçlar (siklosporin, takrolimus, gentamisin, bleomisin) bulunur. Vücuda farklı yollardan girdikten sonra, bu eksojen bileşikler parçalanır veya serbest radikallere metabolize edilir (94).

2.5.3. Anti-oksidan savunma sistemi

Organizma, serbest radikalleri nötralize eden veya onlarla reaksiyona giren anti-oksidan adı verilen savunma moleküllerine sahiptir. Farklı şekillerde anti-oksidan sınıflandırılması yapılmaktadır (95-97).

Metabolizma ve işlevlerine göre: Plazma anti-oksidanları (beta-karoten, askorbik asit, ürik asit, seruloplazmin, vb.), hücre zarı anti-oksidanları (alfa-tokoferol) ve hücre içi anti-oksidanlar (SOD, katalaz, GPx vb.)

Yapılarına ve aktivitelerine göre: Enzimatik anti-oksidanlar (SOD, katalaz ve GPx) ve enzimatik olmayan anti-oksidanlar (karotenoidler, tokoferoller (E vitamini), askorbik asit ve fenolik bileşikler (hesperidin vb))

Kimyasal yapılarına göre: Lipoksil anti-oksidanlar (E vitamini ve karotenoidler) ve hidrofil anti-oksidanlar (C vitamini ve glutatyon) hidrofil

Kaynaklarına göre: Endojen anti-oksidanlar (SOD, katalaz ve GPx) ve eksojen anti-oksidanlar (C vitamini, E vitamini, karotenoidler ve fenolik bileşikler)

Reaktivitelerine göre: Primer anti-oksidanlar (C vitamini ve E vitamini) ve sekonder anti-oksidanlar (Glutatyon (GSH) ve ubikinon (koenzim Q10))

Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması: flavonoidler (hesperidin vb.), polifenoller, stilbenler ve tanenler

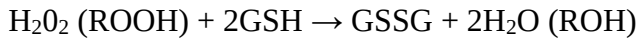
Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, metabolizmanın küçük yan ürünleri olarak üretilen ROS'u daha az reaktif türlere katalize eden bir anti-oksidan enzimdir. İnsanlarda üç tip SOD bilinmektedir; SOD1 (sitoplazmik), SOD2 (mitokondriyal) ve SOD3 (hücre dışı). SOD'un ana işlevi, süperoksit anyon (O_2^-) adı verilen oldukça reaktif bir serbest radikal türünü hidrojen peroksit (H_2O_2)'ye dönüştürmektir (98, 99).



Glutasyon peroksidaz (GPx)

GPx enzimi, hücreleri oksidatif hasardan korumayı sağlayan önemli bir anti-oksidan enzimdir. GPx, fosfatazların H_2O_2 veya lipid hidroperoksitler tarafından inaktivasyonunun önlenmesi yoluyla fosforilasyon basamaklarını azaltır. GPx, H_2O_2 'yi su ve oksijene dönüştürmek için GSH kullanır. Bu reaksiyon sırasında GSH, oksitlenmiş glutasyon (GSSG)'ye dönüştürülür. GSSG, glutasyon redüktaz (GSH-Rd) enzimi tarafından tekrar GSH'ye indirgenir (100).



Memelilerde peroksidazlar, GPx1-GPx8 olmak üzere 8 üyeden oluşmaktadır. Bu aileden GPx1-GPx4 katalitik merkezinde selenosistein bulunan selenoproteinlerdir, GPx6 ise yalnızca insanlarda bulunan bir selenoproteindir. Diğer üyeler ise selenosistein içermezler. Diğerlerinin yanı sıra şu ana kadar tanımlanan 8 glutasyon peroksidazı (GPx1-GPx8) içerir (101).

Malondialdehit (MDA)

Süperoksit radikali ve peroksit radikali gibi reaktif oksijen türleri hem enzimler yoluyla hem de moleküler oksijenin enzimatik olmayan kimyasal indirgenmesiyle üretilir. ROS oldukça reaktiftir ve proteinler, DNA ve çoklu doymamış yağ asitleri

(PUFA'lar) gibi lipidler dahil olmak üzere çeşitli biyomolekül sınıflarına zarar verir ve olay genel olarak “oksidatif stres” olarak bilinir. PUFA araşidonik asit peroksidize edilerek en sonunda MDA, 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) ve F2- izoprostanlar gibi diğer reaksiyon ürünleri oluşturulur. ROS'un lipidlerle özel reaksiyonu genellikle "lipit peroksidasyonu" olarak bilinir. MDA, HNE ve F2- izoprostanlar oksidatif stresin, yani lipit peroksidasyonunun yaygın olarak kabul edilen biyobelirteçleridir (102).

MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile kolayca reaksiyona girer ve bu reaksiyon sonucu oluşan pembe renkli ürün spektrofotometrik olarak kolayca ölçülür. Bu kolay ölçümleme yöntemi, MDA'yı klinik ve araştırma ortamlarında yaygın olarak kullanılan bir biyobelirteç haline getirir (102).

2.6. İnflamasyon

2.6.1. İnterlökin 1 beta

IL-1 sitokin ailesi, akciğerler de dahil olmak üzere çeşitli dokularda inflamasyon ve fibrozisin temel aracısı olarak kabul edilir ve agonist aktiviteye sahip yedi ligand, üç reseptör antagonisti ve bir anti-inflamatuar sitokin olmak üzere 11 üyeden oluşur. IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-36Ra, IL-37 ve IL-38 tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (103). IL'ler, doğuştan bağışıklık hücrelerinin büyümesine, aktivasyonuna, yapışmasına, farklılaşmasına, göçüne, çoğalmasına ve olgunlaşmasına katkıda bulunan immün glikoproteinlerdir ve daha sonra çok çeşitli reseptörlerle etkileşimleri yoluyla vücudun pro ve anti-inflamatuar tepkilerinde rol oynarlar. IL-1'in, IL-1 α ve IL-1 β olmak üzere farklı genler tarafından izole edilmiş iki ayrı formu vardır, ancak biyolojik işlevleri açısından ayırt edilemezler. Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin nöbetçi hücreleri (makrofajlar ve monositler), IL-1 α ve IL-1 β 'nin başlıca kaynağıdır, ancak epitel hücreleri, endotel hücreleri ve fibroblastlar dahil olmak üzere birçok başka hücre tipi de IL-1 α ve IL-1 β üretebilir (104). IL-1 α öncelikle membrana bağlıdır ve otokrin veya jukstakrin mekanizmalar aracılığıyla sinyal verir. IL-1 α öncüsü bir sinyal peptidine sahip değildir, nükleer DNA'ya bağlanır, integral bir zar proteini olabilir ve hücre ölümü üzerine serbest bırakılır. Keratinositler, timik epitel, hepatositler, endotel hücreleri,

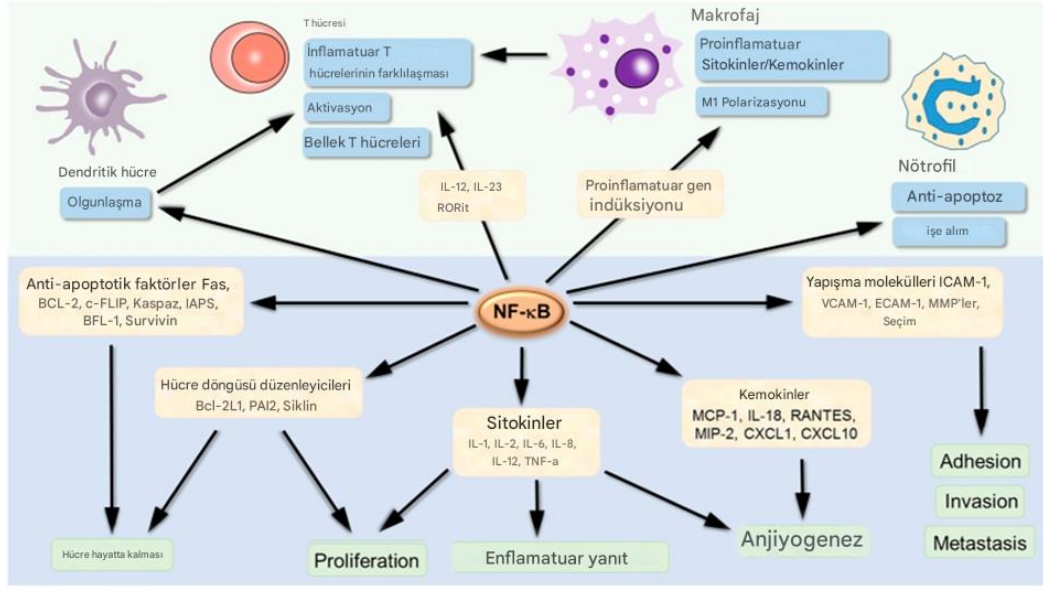
fibroblastlar ve mukoza zarlarının epitel hücreleri gibi birçok farklı hücre tipinde yüksek seviyelerde IL-1 α öncüsü bulunur. Zarla ilişkili IL-1 α biyolojik olarak aktiftir. IL-1 α öncülünün işlenmesi, kalpain II adı verilen bir enzim tarafından parçalanarak aktif hale gelir. Hücre içine kalsiyum iyonlarının girmesi, kalpain II enzimini aktive eder ve böylece IL-1 α öncüsünün işlenmesini ve aktif hale gelmesini sağlar ve hücre dışına salınarak inflamasyonu başlatır (105). IL-1 β , esas olarak monositler, makrofajlar ve dendritik hücrelerin bir ürünü olan bir sitokindir. IL-1 α öncüsünün aksine, IL-1 β öncüsü aktif değildir. İnflamazomlar tarafından hücre içi sistein proteaz kaspaz-1'in aktivasyonu ve nötrofil türevi serin proteazlar veya istilacı mikroorganizmalar tarafından salınan proteazlar IL-1 β 'nin inaktif bir öncüden biyolojik olarak aktif bir sitokine dönüştürülmesi sağlar. Aktif IL-1 β , hücre dışına salınarak inflamatuvar yanıtı başlatır ve sürdürür (104, 105).

2.6.2. Tümör nekroz faktörü- α

TNF- α , akut inflamasyon sırasında makrofajlar/monositler tarafından üretilen bir inflamatuvar sitokindir ve hücreler içinde nekroza veya apoptoza yol açan çeşitli sinyal olaylarından sorumludur. Ayrıca enfeksiyona ve kanserlere karşı direnç için de önemlidir (106). TNF- α , transmembran TNF- α adı verilen bir öncü form olarak üretilir ve TNF- α dönüştürücü enzim gibi metalloproteinazlar tarafından işlendikten sonra çözünür TNF- α formu salınır ve biyolojik aktivitelerini uzak dokuların TNFR-1 veya TNFR-2 adı verilen hücre zarı reseptörüne bağlanarak gerçekleştirir. Bu reseptörlerin ligand kaynaklı aktivasyonu, öncelikle IKK kompleksi ve NF- κ B'yi içeren kanonik yol tarafından aracılık edilen karmaşık sinyal yollarını tetikler (107). TNF- α , vazodilatasyon, ödem ve lökositlerde solunum patlamasının uyarılması dahil olmak üzere çeşitli biyolojik etkiler uygular. Vazodilatasyon, öncelikle iNOS ve COX-2'nin indüklenmesi yoluyla NO ve prostanooidlerin üretimiyle aracılık edilir. Ödem muhtemelen TNF- α kaynaklı endotel bütünlüğündeki bozulmalar tarafından kolaylaştırılır. Ayrıca TNF- α nötrofillerde oksidatif patlamayı artırarak fagosite edilen yabancı elementlerin inaktivasyonuna yardımcı olur (108).

2.6.3. Nükleer faktör-kappa B

Transkripsiyon faktörlerinin bir ailesi olan NF- κ B, immün ve inflamatuvar yanıtları düzenlemede kritik bir rol oynar (109). NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB ve c-Rel dahil olmak üzere yapısal olarak ilişkili beş üyeden oluşan NF- κ B, sitoplazmada tipik olarak inaktiftir ancak aktivasyon üzerine çekirdeğe taşınır ve burada inflamatuvar süreçlerde yer alan çok sayıda genin ifadesini düzenler. NF- κ B aktivasyonu iki ayrı sinyal yolu aracılığıyla gerçekleşir: kanonik ve kanonik olmayan yollar (110, 111). Kanonik NF- κ B yolu, mikrobiyal ürünler ve TNF α ve IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinler, desen tanıma reseptörleri, TNF reseptörü (TNFR) süperfamilya üyeleri ve T hücresi reseptörü ve B hücresi reseptörü dahil olmak üzere geniş bir uyarıcı yelpazesine yanıt verir ve genellikle RelA veya cRel içeren komplekslerin aktivasyonuna yol açar (112). Kanonik NF- κ B yolunun aksine, kanonik olmayan NF- κ B yolu, LT β R, BAFFR, CD40 ve RANK gibi TNFR süperfamilya üyelerinin bir alt kümesinin ligandları da dahil olmak üzere belirli bir uyarıcı grubuna seçici olarak yanıt verir ve RelB/p52 komplekslerinin aktivasyonuna neden olur (110). NF- κ B'nin birincil işlevi, inflamatuvar yanıtların düzenlenmesidir. Hem doğrudan hem de adaptif bağışıklık hücrelerinde proinflamatuvar genlerin indüksiyonunu aracılık ederek, NF- κ B vazodilatasyona, bağışıklık hücrelerinin toplanmasına ve enfeksiyonların veya doku hasarının çözülmesine katkıda bulunur. Ancak, düzensiz NF- κ B aktivasyonu aşırı veya uzun süreli inflamasyona yol açabilir ve akut veya kronik inflamatuvar hastalıkların gelişimine katkıda bulunabilir (113). NF- κ B'nin biyolojik süreçlerdeki rolleri Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8. NF-κB'nin biyolojik süreçlerdeki rolü (114).

2.6.4. iNOS

NO, akciğer fizyolojisi ve inflamasyonunda kritik rolleri olan biyoaktif bir moleküldür (115). NOS tarafından L-argininin oksidasyonu yoluyla üretilen NO, hücre zarlarından yayılan bir vazodilatör ve bronkodilatördür. NOS'un üç izoformu vardır: endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) (116). iNOS ekspresyonu, makrofajlar, dendritik hücreler ve epitel hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde çeşitli inflamatuvar uyarıcılar tarafından indüklenir (115, 116).

iNOS'tan türetilen NO, hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerde önemli bir rol oynar. Serbest radikal olarak NO, biyoaktivitesine katkıda bulunan reaktif ara maddeler üretir. Akciğerde, alveolar makrofajlar, sitokin üretimini ve NF-κB aktivasyonunu etkileyebilen NO üretir. Yüksek NO seviyeleri, inflamatuvar yanıtların önemli bir düzenleyicisi olan NF-κB'nin artan aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (117). NF-κB, iNOS ve Akt, alveolar makrofajların inflamatuvar yanıtını düzenlemede rol oynar. ALI sırasında, alveolar makrofajlarda, nötrofillerde ve akciğer epitelinde NF-κB ve iNOS aktivasyonu, IL-1β, IL-6 ve TNF-α gibi proinflamatuvar mediatörlerin ekspresyonunu indükleyerek inflamasyonu hızlandırır (117, 118).

2.6.5. Okludin

İlk olarak 1960'ların başında Farquhar ve Palade tarafından tanımlanan sıkı bağlantı (TJ), epitel ve endotel hücreleri arasında seçici bir paraselüler bariyer oluşturan, doku bütünlüğünü koruyan ve çeşitli fizyolojik süreçlerde moleküllerin geçişini düzenlemek için yapışık bağlantılar, boşluk bağlantıları ve desmozomlar gibi diğer bağlantılarla birlikte çalışan temel zar içi komplekslerdir (119). TJ'ler, ZO-1, ZO-2 ve ZO-3 gibi sitoplazmik adaptör proteinlerinden ve okludin, klaudinler ve bağlantısal yapışma molekülleri gibi transmembran proteinlerden oluşur (120). Bu bileşenler doku bütünlüğünü korumak ve hücre-hücre yapışmasını kolaylaştırmak için birlikte çalışır. Furuse ve arkadaşları tarafından sıçanlarda hazırlanan anti-tavuk okludin antiserumları kullanılarak kuş dokularında ilk keşfedilen okludin (~65 kDa) epitel ve endotel TJ'lerinde lokalize bulunmuş ve daha sonra tanımlanan ilk integral membran TJ proteini olarak doğrulanmıştır (54).

Akciğer epitelinde TJ'ler, çevresel uyaranlara verilen ilk tepkiyi düzenlemede, gaz değişimini sürdürmede ve sıvı sızıntısını önlemede önemli bir rol oynar. Akciğer epitelinin bütünlüğü, sıvı dengesi ve moleküllerin taşınması sıkı bağlantılar tarafından belirlenir. Epitel hücreleri, hava-sıvı arayüzündeki apikal yüzeylerindeki sıkı bağlantı proteinleri aracılığıyla bağlanır. Akciğer epitelinin TJ'leri, solunan patojenlerin istilasını önleyen ve hava boşluklarına seçici olmayan sıvı sızmasını önleyen hava-kan taşıyıcısı için yapısal bir temel sağlar (121).

Çeşitli patojenler, reseptörlerine ulaşmak ve konağın bağışıklık tepkilerini değiştirmek için TJ'leri bozmak üzere stratejiler geliştirirken, diğerleri hücrelere girmek için reseptör olarak TJ proteinlerini kullanırlar. Okludin de dahil olmak üzere TJ'lerin bozulması, hücre içi geçirgenlikte artışa ve viral veya bakteriyel hücre girişini ve yayılmasını kolaylaştıran polarite kusurlarına yol açar (122).

2.7. Flavonoid

Flavonoidler, polifenolik bir yapıya sahip, düşük moleküler ağırlıklı, bitkilerin sekonder metabolitlerinden oluşan önemli biyoaktif bileşiklerdir. Flavonoidler meyvelerde, sebzelerde, baharatlarda ve yağlarda yaygın olarak bulunur (123). Sarı

renkli olmaları nedeniyle latince “sarı” anlamına gelen “flavus” sözcüğünden türetilerek “flavonoid” adını almışlardır. Tüm flavonoidler, temel iskeletlerinde iki altı üyeli halka ve bunlara C6-C3-C6 olarak bağlı bir üç karbonlu birim olarak dağıtılan 15 karbon atomu içerir (124). Fenil gruplarını birbirine bağlayan 3 karbonlu birim, genellikle üçüncü bir halka oluşturmak için oksijenle siklize olur. Bu çekirdek yapı 2-fenilbenzopiranon olarak adlandırılır. Flavonoidler çoğunlukla O-glikozitler veya C-glikozitler olmak üzere konjuge formda şekerle ilişkilendirilir. Aglikonlar olarak da var olabilirler (125).

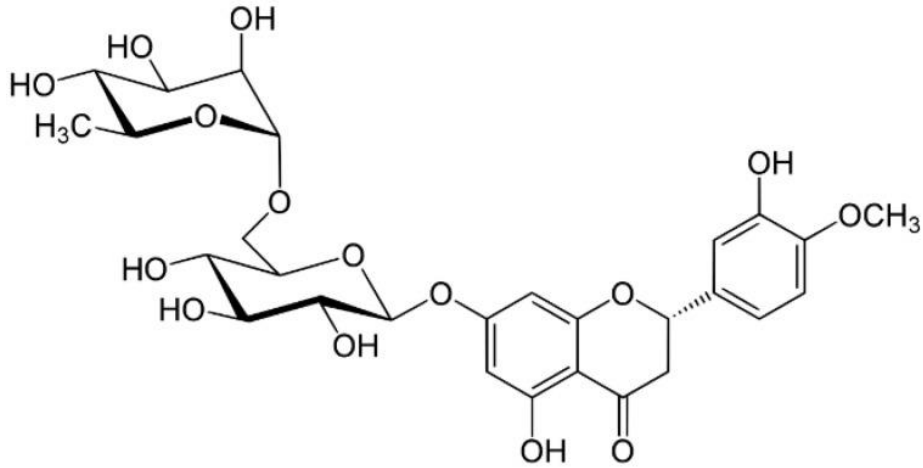
Bitkilerde flavonoidler, hücre büyümesini düzenlemek, tozlayıcı böcekleri çekmek ve biyotik ve abiyotik streslere karşı koruma gibi birçok işlevi yerine getirmesi ile birlikte UV filtreleri ve ROS temizleyiciler olarak çalışabilir ve kuraklık, ısı ve donma toleransında çeşitli fonksiyonel rollere sahiptir (123, 126). İnsanlarda bu bileşikler, anti-enflamatuar, anti-kanser, yaşlanma karşıtı, kardiyoprotektif, nöroprotektif, immünomodülatör, anti-diyabetik, anti-bakteriyel, anti-paraziter ve anti-viral özellikler gibi biyoaktif özelliklerinden kaynaklanan çok çeşitli sağlık yararları ile ilişkilidir (123, 127, 128). Flavonoidler, serbest radikal yakalanması, peroksitlerin ve diğer reaktif oksijen türlerinin etkisizleştirilmesi, metallerin şelatlanması ve ikincil lipid oksidasyon ürünlerinin söndürülmesi gibi farklı aktivite mekanizmalarına sahiptir (124, 129).

Flavonoidler genel olarak üç gruba ayrılabilir: biyoflavonoidler, izo-flavonoidler (fitoöstrojenler) ve neo-flavonoidler (beyaz flavonoidler). Flavonoidlerin farklı sınıfları ve alt sınıflarındaki varyasyonlar, doymamışlık derecesi, B halkasının bağlı olduğu C halkasının karbonu, hidroksilasyon derecesi, oksidasyon derecesi, glikosilasyon modeli ve diğer ikameler gibi faktörlere atfedilir (123, 124, 129). B halkasının C halkasının 3. pozisyonunda bağlı olduğu flavonoidlere izoflavonlar denir. İzo-flavonoidler yapısal olarak 17-beta estradiol benzer ve östrojen reseptörlerine bağlanır. Bu nedenle fitoöstrojenler olarak da bilinirler. Bazı izoflavon örnekleri genistein, daidzein, glisitin, biokanin A ve formononetindir. B halkasının 4. pozisyonunda bağlı olduğu bileşiklere neoflavonoidler olarak bilinir. İzole edilen ilk neoflavon, calophyllum inophyllum tohumlarından elde edilen calophyllolide idi. Neoflavonoidler, 4-fenilkumarinler (dalbergin grubu) ve difenil allil bileşikleri (latifolin grubu) olmak üzere iki geniş gruba ayrılmıştır. B halkasının C halkasının 2. pozisyonuna bağlandığı flavonoid sınıfı, biyo-flavonoidler olarak adlandırılır. C

halkasının yapısal özelliklerine bağlı olarak farklı alt sınıflara ayrılabilirler. Bu alt sınıflar flavonlar, flavonoller, flavononlar, flavan-3-oller/kateşinler, antosiyanidinler ve kalkonlardır. Flavonoller, bitkiler aleminde en yaygın olarak bulunur ve örnek olarak kuersetin, kaempferol, fisetin, isorhamnetin ve mirisetin verilebilir. Flavonlar büyük ölçüde kereviz, marul ve kırmızıbiber gibi gıdalarda bulunur ve örnek olarak apigenin ve luteolin verilebilir. Flavan-3-oller olarak bilinen kateşinler, C halkasının C3'ünde (bir dihidro-piran heterosikl) bir hidroksil grubuna sahiptir. Kateşinler, gallokateşin, epigallokateşin, epikateşin ve gallat, bu kategoriye giren birkaç bileşiktir. Flavanonların temel iskeleti 2-fenilbenzopiran-4-on'dur. Diğer flavonoidlerin metabolik yollarının düzenlenmesinde hayati bir rol oynarlar. Neredeyse tüm turunçgillerde bulunurlar ve acı tatlarından sorumludurlar. Hesperitin, naringin ve eriodictyol bu alt sınıfın birkaç örneğidir. Antosiyanidinler, suda çözünebilen ve tüm yüksek bitkilerin yapraklarında, gövdelerinde, köklerinde, çiçeklerinde ve meyvelerinde bulunan biyo-flavonoidlerin bir başka alt sınıfıdır ve siyanidin, peonidin, pelargonidin, delfinidin, petunidin ve malvidin en yaygın bileşiklerdir. Son alt sınıf olan chalcones, açık zincirli flavonoidlerdir. 3-karbonlu bir a,b-doymamış karbonil grubu ile birleştirilmiş iki aromatik halka A ve B'den oluşurlar. Leguminosae, Asteraceae ve Moraceae en fazla sayıda doğal kalkon içeren üç familyadır. Kalkon örnekleri arasında naringenin chalcone, isoliquiritigenin, phloretin, licodione, echinatin vb. yer alır (123, 124, 129, 130).

2.7.1. Hesperidin

Hesperidin (3,5,7-trihidroksiflavanon 7-rhamnoglucoside, hesperetin-7- O -rutino-side), narenciye meyvelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunan bir biyoflavonoid alt sınıflarından biri olan flavanon bileşikleridir (Şekil 9) (11). İlk olarak 1827 yılında Fransız kimyacı Lebreton tarafından Hesperides familyasına ait portakal kabuğunun albedo adı verilen iç süngerimsi kısmından elde edilmiştir (12). Kullanımı, anti-oksidan, anti-bakteriyel, anti-mikrobiyal, anti-inflamatuar ve anti-karsinojenik özellikler dahil olmak üzere çok sayıda sağlık yararı ile ilişkilendirilmiştir.

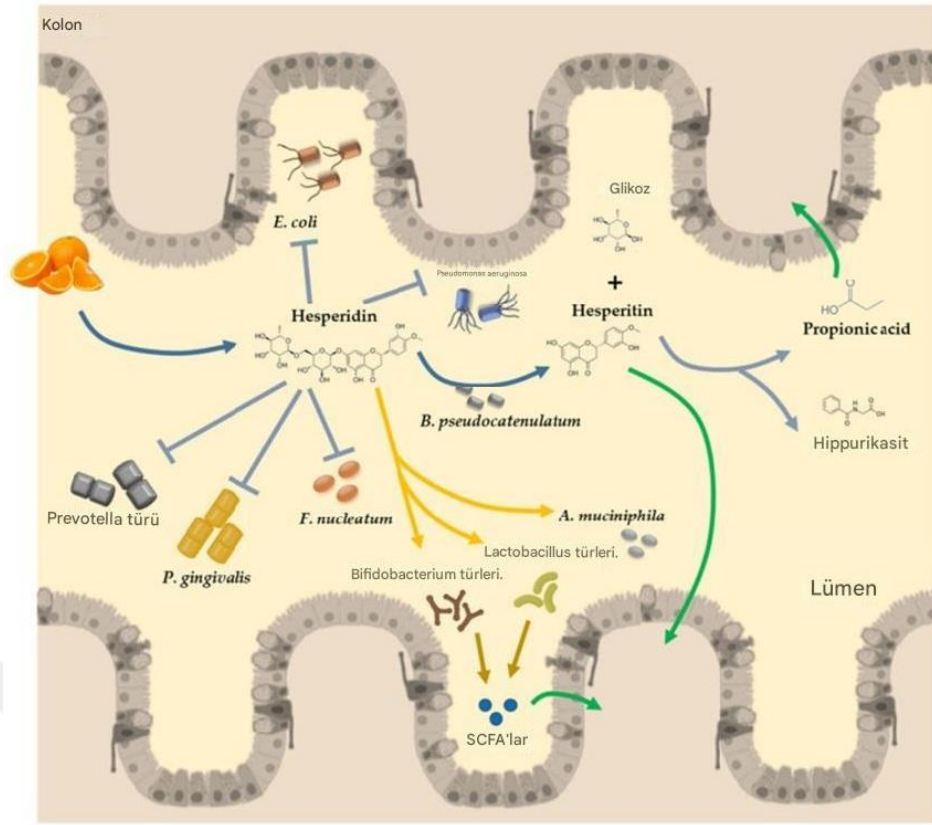


Şekil 9. Hesperidin kimyasal yapısı (11).

Hesperidin ve türevleri, portakal (*Citrus sinensis*), greyfurt (*Citrus cenneti*), mandalina (*Citrus reticulata*), misket limonu (*Citrus aurantifolia*) ve limon (*Citrus limon*) gibi turuncgillerin (*Rutaceae* familyası) karakteristik bileşikleridir (131). Narenciye dışında, hesperidin ayrıca nane (*Mentha*) (132) ve bal çalısında (*Cyclopia maculata*) (133) bulunur.

Turuncgillerdeki hesperidin içerikleri, meyve çeşidine, meyvenin kendi kısmına, iklime ve olgunlaşma derecesine bağlıdır. Gattuso ve ark. 100 mL meyve suyunda portakal için 20–60 mg, mandalina için 8–46 mg, limon için 4–41 mg ve greyfurt için 2–17 mg hesperidin içerdiğini belirtmişlerdir (134). Narenciye flavedo (kabuğun renkli dış tabakası) ve albedo (beyaz yumuşak orta tabaka kısmı), elle sıkılmış meyve suyuna kıyasla daha yüksek miktarlarda hesperidin içerir (134-136). Başka bir çalışmada ise, 100 gram meyvede greyfurtta 0.35 mg, portakalda 11.95 mg, kan portakalında 12.72 mg mandalinada 17.11 mg ve limonda 27.90 mg hesperidin konsantrasyonlarına ulaşmışlardır (137).

Oral alımdan sonra, hesperidin bağırsak mikrobiyal rhamnosidazlar tarafından ince bağırsakta ve esas olarak kolonda aglikon formuna (hesperetin) hidrolize edilir ve daha sonra kalın bağırsakta glukuronidlere dönüştürülür. Hesperetin, alımdan 3 saat sonra plazma, idrar ve safrada glukuronidler (%87) ve sülfaglukooronitler (%13) şeklinde ortaya çıkar ve 5 ila 7 saat arasında maksimuma ulaşır. Daha sonra halka bölünmesine uğrarlar ve katabolize edilerek fenolik asitler ve ilgili metabolitleri üretilir (Şekil 10) (138).



Şekil 10. Kolonda hesperidin metabolizması (139).

Hesperidin'in anti-oksidan, anti-enflamatuar, anti-apoptoz, damar geçerliği, anti-kanser, kardiyoprotektif ve nörodejeneratif gibi biyolojik ve farmakolojik özelliklerini ortaya çıkarmak için kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.

2.7.2. Hesperidin oksidatif stres

Hesperidin, güçlü bir anti-oksidan olarak kabul edilir ve süperoksit anyon radikalleri, hidroksil radikalleri ve lipid peroksil radikalleri gibi serbest radikalleri yakalama yeteneğine sahiptir. Bu, serbest radikallere hidrojen atomları vermesi, böylece onları nötralize edebilen ve hücrel hasara neden olmalarını önleyebilen hesperidin içindeki fenolik grupların varlığından kaynaklanmaktadır (140-142).

Hesperidin ayrıca anti-oksidan etkilerini daha da artıran SOD ve katalaz gibi anti-oksidan enzimlerin aktivitesini artırma yeteneğine de sahiptir. SOD, süperoksit radikallerini daha sonra katalaz tarafından su ve oksijene parçalanmış hidrojen peroksit dönüştürür. Ek olarak, hesperidin, ksantin oksidaz ve lipoksijenaz gibi serbest

radikaller oluşturan enzimlerin aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Hesperidin bu enzimleri inhibe ederek serbest radikallerin oluşumunu önleyebilir ve oksidatif stresi azaltabilir (13, 141).

Hesperidinin anti-oksidan aktivitesinin sadece radikal süpürme aktivitesi ile sınırlı olmadığını, aynı zamanda ERK/Nrf2 sinyal yolu yoluyla anti-oksidan hücresel savunmaları da arttırdığını gösterilmiştir (143). ERK/Nrf2 yolu ile hesperidin, anti-oksidan düzeylerinde artışa neden olarak ve oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunda azalmaya yol açarak hücresel elementlerin, DNA, proteinlerin ve lipidlerin korunmasını sağlar (13, 144).

2.7.3. Hesperidin inflamasyon etkisi

Hesperidinin dokularda meydana gelen inflamasyona karşı koruyucu etkilere sahip oluşu ve inflamatuvar markırların miktarında azalma meydana getirdiği saptanmıştır. Hesperidinin anti-inflamatuvar etkisini pro-inflamatuvar sitokinleri ve inflamatuvar enzimleri baskılayarak gösterdiği ifade edilmektedir.

Yapılan bir çalışmada, wistar albino sıçanlara orta serebral arter oklüzyonu (felç) modeli yapılarak hesperidinin (50 mg/kg oral, 15 gün) nöroprotektif etkileri incelenmiştir. Çalışma sonunda sıçanların hem frontal korteksinde hem de striatumunda TNF- α , IL-1 β gibi inflamatuvar mediatörler ve iNOS ve glial fibril asidik protein ekspresyonlarının önemli ölçüde düştüğü görülmüştür (145).

Huntington hastalığı modeli uygulanmış bir sıçan modelinde, hesperidin tedavisinden sonra (100 mg/kg, 21 gün), TNF- α ve kaspaz-3 seviyelerinde bir azalma bulunmuştur (146).

Streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda, hesperidin (100, 200 mg/kg günlük, 12 hafta) uygulaması sonucu pro-inflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-1 β ve VEGF), hücreler arası adhezyon molekülü-1 ve ileri glikosilasyon son ürünlerinin seviyelerinde bir azalma meydana gelerek diyabetik retinopati gelişiminin kısmen önlediği gösterilmiştir (147). Başka bir çalışmada diyabetik sıçanlara 20 günden daha fazla 100 mg/kg/gün dozlarında hesperidin verilmesinin kaspaz-3 ekspresyon seviyesini azalttığı rapor edilmiştir (146, 148).

Wistar albino sıçanlarında ferrik nitrilotriasetatın neden olduğu renal oksidatif strese ve karsinogeneze karşı 16 haftalık bir süre boyunca oral olarak 100 mg/kg dozda hesperidinin kaspaz-3, kaspaz-9 ve bax ekspresyonunu indüklerken, bcl-2, NF- κ B, iNOS, TNF- α ve çoğalan hücre nükleer antijeni ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (149).

2.7.4. Damar sistemi üzerindeki etkiler

Hesperidin, kılcal damar duvarlarının geçirgenliğini azaltarak sıvı ve proteinlerin sızıntısını önlediği ve kılcal damar duvarlarının dayanıklılığını ve bütünlüğünü artırarak kolay yaralanmayı önlediği rapor edilmiştir (150, 151).

2.7.5. Diğer etkileri

Sıçan pankreası üzerinde yapılan başka bir çalışma, hesperidinin Bcl-2 düzeylerini yükselttiği, PARP aktivasyonunu inhibe ettiğini ve Bax ve kaspaz-3 seviyelerini düşürerek apoptozu önlediğini göstermiştir (152).

Hesperidinin birçok kanser modelinde hücre çoğalmasını geciktirdiği kanıtlanmıştır. p53 seviyelerinin artması ve sikline bağımlı kinaz inhibitörlerinin aktivasyonu ile kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını durdurarak hücre döngüsünü durdurduğu rapor edilmiştir (153, 154). Ayrıca pro- ve anti-apoptotik proteinlerin oranlarının değişmesi, kaspaz aktivasyonu, c-Jun N-terminal kinaz (JNK) yolu aktivasyonu ve kaspazdan bağımsız yollar ile kanser hücrelerinin apoptozunu indükleyerek kanser hücrelerinin sayısını azaltabilir (154, 155).

Hesperidin ve türevlerinin antioksidan etkileri, NO biyoyararlanımını artırarak ve endotel fonksiyonunu reaktif oksijen türlerinden koruyarak hipertansiyon üzerindeki yararlı etkilerini sergilediği gösterilmiştir. Ayrıca, renin-anjiyotensin sistemi kaskadını baskılayarak oksidatif stresi azaltarak kan basıncını düşürdü gösterilmiştir (139, 156).

Hesperidinin Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi nörodejeneratif durumların gelişimine karşı inhibe edici bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Hesperidinin nöroprotektif etkisinin, nöral büyüme faktörlerinin ve endojen anti-oksidan savunma fonksiyonlarının iyileştirilmesi, nöro-inflamatuar ve apoptotik yolların azalması yoluyla beyin hücrelerini korumaya yardımcı olduğu düşünülmektedir (157-159).

Hesperidinin, ensefalomiyokardit virüsü ve *Staphylococcus aureus* ile enfekte olmuş farelerde, tekli veya kombine viral-bakteriyel enfeksiyonlardan önce verildiğinde koruyucu etkilere sahip olduğu bulunmuştur (160).

Hesperidin, hem *Candida albicans* hem de *Staphylococcus aureus* gibi kutanöz enfeksiyonlardaki yaygın patojenler dahil olmak üzere antimikrobiyal aktivite sergilediği gösterilmiştir (161).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi (ZBEÜ) Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve ZBEÜ Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışma öncesi ZBEÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 03.02.2022 tarihinde 2022-03-03/02 protokol numaralı etik kurulu onayı alınmıştır (Ek 1).

3.1. Deney Hayvanları

ZBEÜ Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde üretilen 16 haftalık 32 adet 200-250 gram ağırlığında dişi Wistar Albino sıçan kullanılmıştır. Tüm denekler günlük değiştirilen taze musluk suyu ve %21 ham protein içerikli pelet yemlerle ad libitum beslenmiştir ve rahat hareket edebilecekleri büyüklükte üstü kapalı tel kafeslerde gruplar halinde barındırılıp 12 saat aydınlık 12 saat karanlık sirkadiyen ritimde, sıcaklığın 20-25°C ve nemin %50-60 olduğu optimum laboratuvar koşullarında barındırılmıştır.

3.2. Akut Akciğer Hasarı Deney Modelinin Oluşturulması

Akut akciğer hasarı deney modelini oluşturmak amacıyla ANTU, 4 miligram/mililitre (mg/ml) olacak şekilde zeytinyağında süspansiyon halinde hazırlanmış ve 10 mg/kg dozda ip. olarak sıçanlara uygulanmıştır. ANTU uygulamasını takip eden 4 saat sonunda maksimum seviyede akut akciğer hasarı oluşturularak denekler kurban edilmiştir (76).

3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Denekler her grupta 8 adet sıçan olacak şekilde ve biri kontrol, üçü deney grubu olmak üzere rastgele 4 gruba ayrılmıştır (162). Gruplar aşağıda tariflenmiştir;

Kontrol Grubu (KON) (n:8): 7 gün boyunca tek doz 1 ml PBS gastrik gavaj yoluyla verilmiştir (hesperidin çözücüsü).

Hesperidin Grubu (HES) (n:8): 7 gün boyunca tek doz 100 mg/kg hesperidin gastrik gavaj yoluyla verilmiştir. (Hesperidin 1 ml PBS çözünmüştür)

Alfa-naftiltioüre Grubu (ANTU) (n:8): 7 gün boyunca tek doz 1 ml PBS gastrik gavaj yoluyla verilmiştir (hayvanlarda gavaj stresi oluşturmak amacıyla). Deneyin son gününde, 4 mg/ml olacak şekilde zeytinyağında süspansiyon haline getirilen ANTU, hayvanlara 10 mg/kg dozunda ip. olarak uygulanmıştır. ANTU uygulaması sonrası 4. saat sonunda hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

Alfa-naftiltioüre+Hesperidin Grubu (ANTU+HES) (n:8): 7 gün boyunca tek doz 100 mg/kg hesperidin gastrik gavaj yoluyla verilmiştir ve deneyin son gününde hesperidin uygulamasından 30 dakika sonra ip. yolla 10 mg/kg dozunda ANTU verilmiş ve 4. saatin sonunda hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

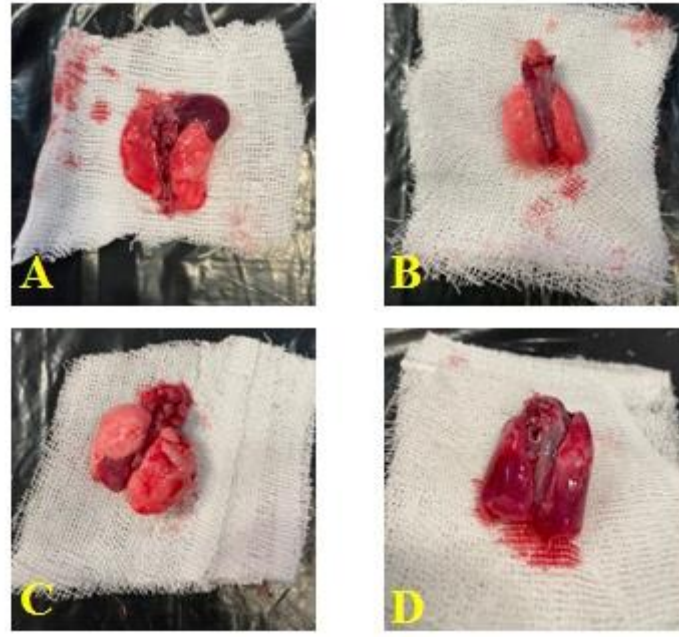
3.4. Vücut Ağırlıklarının Ölçülmesi

Hesperidin gruplarındaki deneklerde deney süresince (7 gün) hesperidin doz hesaplaması yapmak amacıyla ağırlık takibi yapılmıştır. Diğer iki gruptaki deneklerde aynı stresi oluşturmak amacıyla ağırlık takibi yapılmıştır. Deney süresinin son günü olan 7. gün tüm gruplardaki deneklerin ağırlıkları ölçülmüştür ve hesaplamalarda kullanılmak üzere nihai ağırlık olarak alınmıştır.

3.5. Doku Örneklerinin Alınması

Tüm gruplardaki denekler sakrifikasyon günü 90 mg/kg ketamin (Ketalat-Eczacıbaşı/Türkiye), 10 mg/kg ksilazin (Rompun-Bayer/Türkiye) ip. yolla anesteziye alınmıştır. Deneklere abdominal kesit yapılarak abdominal aortadan kan örnekleri alınmıştır. Bu sayede dolaşım sistemindeki tüm kanın boşaltılması sağlanarak akciğerlerde ve plevral efüzyonda kan olması engellenmiştir. Daha sonra göğüs kafesi dikkatlice açılmıştır, ANTU gruplarında plevral aralıkta birikmiş olan efüzyon sıvısı

enjektörle çekilmiştir ve miktarı mililitre olarak kaydedilmiştir. Akciğerler bütün olarak çıkartılmış sonra, çevre dokulardan temizlenip, hassas terazide tartılarak ağırlıkları kaydedilmiştir (Şekil 11). Sol akciğer histopatolojik inceleme için %10 formalin solüsyonuna alınmış, sağ akciğer ise ikiye bölünerek üst yarımı biyokimyasal analizler için alt yarımı western blot analizi için -80 °C’de saklanmıştır.



Şekil 11. Tüm gruplara ait makroskobik akciğer görüntüleri. A: KON Grubu, B: HES Grubu, C: ANTU grubu, D: ANTU+HES grubu.

3.6. Akciğer Ağırlığı ve Plevral Efüzyon Hesaplama

Denekler arasında standardizasyonu sağlayabilmek amacıyla, akciğer ağırlığı (AA) ve plevral efüzyon (PE) miktarı vücut ağırlığına oranlanarak incelenmiştir. Akut akciğer hasarı göstergeleri olarak akciğer ağırlığı gram (g), efüzyon sıvısının miktarı ise mililitre (ml), akciğer ağırlığı/vücut ağırlığı (g/g) ve plevral efüzyon/vücut ağırlığı (ml/g) oranları hesaplanarak değerlendirilmiştir.

3.7. Akciğer Doku Takibi

Sakrifikasyonun hemen ardından %10 formalin solüsyonuna alınan sol akciğer dokusu dört eşit parçaya bölünerek makroskopisi gerçekleştirilmiştir ve 24 saat boyunca fiksasyona devam edilmiştir. Doku takip aşamalarında %10 formaldehit (MERCK- Almanya), %96 Alkol (Teksol, Türkiye), Toluen ve parafin (MERCK- Almanya) kullanılmıştır. Doku takip aşamaları Tablo 3'te gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3. Akciğer Doku Takip Aşamaları

İşlem	Kullanılan Kimyasal	Uygulama Süresi
Fiksasyon	% 10 formaldehit	24 saat
Fiksatifin Uzaklaştırılması	Akan çeşme suyu	24 saat
Akciğer Dokusunun Suyunun alınması	% 70 Alkol (Birinci)	24 saat
	% 70 Alkol (İkinci)	1 saat
	% 90 Alkol (Birinci)	1 saat
	% 90 Alkol (İkinci)	1 saat
	% 96 Alkol (Birinci)	1 saat
	% 96 Alkol (İkinci)	1 saat
	% 100 Alkol (Birinci)	1 saat
	% 100 Alkol (İkinci)	1 saat
Seffaflaştırma	Toluen (Birinci)	15 dakika
	Toluen (İkinci)	15 dakika
Emme	56.3 C Etüvde sıvı parafin	48 saat
Gömme	Akciğer dokuların kasetlere gömülmesi	

3.8. Bloklardan Kesit Alınması ve Boyama

Bloklanan akciğer dokularından yarı otomatik Shandon Finesse 325 marka silindirli mikrotom kullanılarak H&E, PAS ve Masson Trikrom boyamaları için normal lamlara 5µ kalınlığında kesitler alınırken immünohistokimyasal boyamalar (Tnf- α , IL-1 β , iNOS, NF- κ B ve occludin) için polilizin kaplı lamlara 3µ kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan kesitler 37C° sıcaklıktaki su banyosunda kırıxıklıkları giderildikten sonra lamlara alınıp oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Akciğerin genel histolojik özelliklerini değerlendirmek amacıyla elde edilen kesitlere H&E, PAS ve Masson Trikrom boyamaları yapılmış ve boyanan preparatlar Axio Lab A1 (Zeiss Germany) marka ışık mikroskobunda incelenmiştir.

Hematoksilen-Eozin (H&E) boyama: Akciğer dokusunun genel morfolojisini göstermek amacıyla 5µ kalınlığında kesitlere H&E boyaması uygulanmıştır. H&E boyamada iki boya kullanılmıştır. Bu boyalardan hematoksilen hücre çekirdeklerini mavi renge, diğer boya olan eozin ise hücre sitoplazmalarını pembeye boyamıştır. Ayrıca akciğer dokusunda yer alan kaslar ve kıkırdak pembe renkte boyanmıştır. Kesitlere uygulanan H&E boyama işlemi ve protokol aşamaları Tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 4. Akciğer Dokusu İçin Uygulanan H&E Boyama Protokolü

İşlem	Kullanılan Kimyasal	Uygulama Süresi
Deparafinizasyon	Kesitlerin 56.3 C Etüve alınması	30 dakika
	I. Toluen	15 dakika
	II. Toluen	15 dakika
Rehidratasyon (Suya indirme)	%100 Alkol	1 dakika
	%96 Alkol	3 dakika
	%90 Alkol	3 dakika
	%70 Alkol	5 dakika
	Durgun su	3 dakika
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
	Asit-Alkol	Batır-Çıkar
Yıkama	Çeşme suyu ile yıkama	Batır-Çıkar
Diferansiasyon	Morartma (Çeşme Suyu)	20 dakika
Boyama	Eozin	5 dakika
Yıkama	Çeşme suyu ile yıkama	Batır-Çıkar
	%70 Alkol	Batır-Çıkar
Dehidratasyon (Suyunu alma)	%90 Alkol	Batır-Çıkar
	%96 Alkol	5 dakika
	I. %100 Alkol	10 dakika
	II. %100 Alkol	10 dakika
Seffaflaştırma	I. Toluen	10 dakika
	II. Toluen	10 dakika
Kapatma	Entellan	Kuruyuncaya kadar

Masson trikrom boyama: Bağ dokusunda kollajen lifleri ayırıt etmek için kullanılan ve Weigert, Ponzo ve ışık yeşili boyalarını içeren üçlü boyama yöntemidir. Weigert hematoksilin ile hücrelerin çekirdekleri koyu kahverengi, ponzo ile hücrelerin sitoplazmaları kırmızı, ışık yeşili ile ise bağ dokusunda yer alan kollajen lifler yeşil renge boyanmıştır. Kesitlere uygulanan mason trikrom boyama işlemleri ve protokol aşamaları Tablo 5’de gösterilmiştir.



Tablo 5. Akciğer Dokusu İçin Uygulanan Masson Trikrom Boyama Protokolü

İşlem	Kullanılan Kimyasal	Uygulama Süresi
Deparafinizasyon	Kesitlerin 56.3 C Etüve alınması	30 dakika
	I. Toluen	15 dakika
	II. Toluen	15 dakika
	%100 Alkol	1 dakika
	%96 Alkol	3 dakika
Rehidratasyon (Suya indirme)	%90 Alkol	3 dakika
	%70 Alkol	5 dakika
	Durgun su	3 dakika
Boyama	Weigert	10 dakika
Yıkama	Çeşme suyu ile yıkama	Batır-Çıkar
Diferansiasyon	Morartma (Çeşme Suyu)	20 dakika
Boyama	Ponzo	15 dakika
Yıkama	Çeşme suyu ile yıkama	Batır-Çıkar
	%1 Asitik Asit	Batır-Çıkar
Boyama	Fosfotungustik asit	15 dakika
	%1 Asitik Asit	Batır-Çıkar
Boyama	Işık Yeşili	3 dakika
Yıkama	Çeşme suyu ile yıkama	Batır-Çıkar
	%1 Asitik Asit	Batır-Çıkar
Dehidratasyon (Suyunu alma)	%70 Alkol	Batır-Çıkar
	%90 Alkol	Batır-Çıkar
	%96 Alkol	5 dakika
	I. %100 Alkol	10 dakika
	II. %100 Alkol	10 dakika
	I. Toluen	10 dakika
Seffaflaştırma	II. Toluen	10 dakika
Kapatma	Entellan	Kuruyuncaya kadar

Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama: Dokularda ve hücrelerde şekerleri, glikoproteinleri ve mukopolisakkaritleri belirlemek amacıyla yapılan boyama tekniğidir. Periyodik asit ile şekerlerdeki komşu diolller arasında meydana gelen tepkimeden bir çift aldehit oluşur. Bu aldehitler Schiff ayıracı ile tepkime vererek mor-menekşe rengi verirler. Akciğer dokusuna bazal membranlar ve goblet hücreleri PAS (+) boyanma gösterirler. Kesitlere uygulanan PAS boyama işlemi ve protokol aşamaları Tablo 6'da gösterilmiştir.



Tablo 6. Akciğer Dokusu İçin Uygulanan PAS Boyama Protokolü

İşlem	Kullanılan Kimyasal	Uygulama Süresi
Deparafinizasyon	Kesitlerin 56.3 C Etüve alınması	30 dakika
	I. Toluen	15 dakika
	II. Toluen	15 dakika
Rehidratasyon (Suya indirme)	%100 Alkol	1 dakika
	%96 Alkol	3 dakika
	%90 Alkol	3 dakika
	%70 Alkol	5 dakika
	Durgun su	3 dakika
Boyama	Periyodik asit	15 dakika
Yıkama	Akar su	10 dakika
	Distile Su	Batır-Çıkar
Boyama	Schiff	20 dakika
Yıkama	I Yıkama Solüsyonu	5 dakika
	II Yıkama Solüsyonu	5 dakika
	III Yıkama Solüsyonu	5 dakika
Yıkama	Akar su	10 dakika
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
	Asit-Alkol	Batır-Çıkar
Yıkama	Çeşme suyu ile yıkama	Batır-Çıkar
Diferansiyasyon	Morartma (Çeşme Suyu)	20 dakika
Dehidratasyon (Suyunu alma)	%70 Alkol	Batır-Çıkar
	%90 Alkol	Batır-Çıkar
	%96 Alkol	5 dakika
	I. %100 Alkol	10 dakika
	II. %100 Alkol	10 dakika
Seffaflaştırma	I. Toluen	10 dakika
	II. Toluen	10 dakika
Kapatma	Entellan	Kuruyuncaya kadar

3.9. Histolojik Değerlendirme ve Akciğer Hasarın Skorlanması

Tüm gruplardaki deneklerden elde edilip H&E, Masson trikrom ve PAS boyaları ile boyanmış preparatlar histolojik değerlendirme yapmak için ışık mikroskobu kullanılarak incelenmiş ve bulgular fotoğraflanmıştır. Akciğer hasarının skorlamasını yapmak amacıyla H&E ile boyanmış tüm deneklere ait kesitler ışık mikroskobunda 20 büyütmede rastgele 10 alan seçilerek yapılmıştır. Her alan Tablo 7’de tanımlanmış parametreler açısından, her parametre için 0 ila 3 arasında puan verilerek skorlanmıştır. Skorlamada 0; hasar yok, 1; hafif, 2; orta, 3; şiddetli olarak derecelendirilmiştir (163-165).

Tablo 7. Akciğer hasar skorlaması kriterleri

Parametre	Alan Başına Puan			
	0	1	2	3
İntersitisyel Hücre	Yok	0-5	5-10	>10
Makrofaj	Yok	0-5	5-10	>10
Perialveoler Hemoraji (eritrosit)	<5	5-10	10-15	>15
Perivasküler Genişleme	Yok	Hafif	Orta	Şiddetli
İnteralveoler Septum Kalınlığı	Yok	Hafif	Orta	Şiddetli
Ödem	Yok	Hafif	Orta	Şiddetli

3.10. İmmünohistokimyasal İncelemeler

İnflamasyon düzeyini belirlemek için pro-inflamatuar sitokinler olan TNF- α , IL-1 β , iNOS, bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B ve epitel hücrelerinin yan yüzlerinde bulunan zonula okludens bağlantı kompleksinin transmembran proteinlerinden biri olan ve miktarı paraselüler yolak bariyerinin geçirgenliğini belirleyen occludin proteini miktarındaki değişiklikler tüm gruplardaki denekler için prafin bloklardan elde edilen 3 μ kalınlığında kesitlere immünohistokimyasal yöntem kullanılarak

belirlenmiştir. Boyanmış kesitler Zeiss marka Axio Lab ışık mikroskopunda X20 objektif büyütmesinde rastgele seçilen 10 alanda incelenerek elde edilen fotoğraflardan semikantitatif histolojik skorlama (h-skor) yapılmıştır. Semikantitatif olarak yapılan h-skorunda; 0 tespit edilebilir bir boyanma yok, +1 tespit edilebilir boyanma var ama zayıf, +2 belirgin tespit edilebilir boyanma ve +3 yoğun tespit edilebilir boyanma kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Her bir kesit için h-skor değeri, her bir yoğunluk kriterine ait boyanmış hücre yüzdesinin yoğunluk ile çarpımından elde edilmiştir (166). Kesitlere uygulanan immünohistokimyasal yöntem işlemi ve protokol aşamaları Tablo 8’de gösterilmiştir.



Tablo 8. Akciğer Dokusu İçin Uygulanan İmmünohistokimyasal Yöntem Protokolü

İşlem	Kullanılan Kimyasal	Uygulama Süresi
Deparafinizasyon	Kesitlerin 56.3 C Etüve alınması	30 dakika
	I. Toluene	15 dakika
	II. Toluene	15 dakika
	%100 Alkol	1 dakika
	%96 Alkol	3 dakika
Rehidratasyon (Suya indirme)	%90 Alkol	3 dakika
	%70 Alkol	5 dakika
	Durgun distile su	3 dakika
	X10 sitrat buffer tamponu	5 dakika
Antijen retrieval	Aynı tampon içinde mikrodalga fırında ısı işlemi	Kaynadıktan sonra 10 dakika
Yıkama	3 kez PBS yıkama	Her yıkama 5 dakika
Endojen peroksidaz aktivitesini nötralize etmek	%3 H ₂ O ₂	20 dakika
Yıkama	3 kez PBS yıkama	Her yıkama 5 dakika
Blocking	Ultra V block	10 dakika
Primer antikor	Primer antikor (TNF- α , IL-1 β , İNOS, NF- κ B ve okludin)	24 saat
Yıkama	3 kez PBS yıkama	Her yıkama 5 dakika
Sekonder antikor	Sekonder antikor	30 dakika
Yıkama	3 kez PBS yıkama	Her yıkama 5 dakika
	Streptavidin peroksidaz kompleksi	20 dakika

Yıkama	3 kez PBS yıkama	Her yıkama 5 dakika
	diaminobenzidine (DAB)	Her antikor için ayrı belirlenmiştir
Yıkama	3 kez PBS yıkama	Her yıkama 5 dakika
Zıt boyama	Hematoksilen	10 dakika
	Asit-Alkol	Batır-Çıkar
Yıkama	Çeşme suyu ile yıkama	Batır-Çıkar
Diferansiasyon	Morartma	20 dakika
Dehidratasyon (Suyunu alma)	%70 Alkol	Batır-Çıkar
	%90 Alkol	Batır-Çıkar
	%96 Alkol	5 dakika
	I. %100 Alkol	10 dakika
	II. %100 Alkol	10 dakika
Seffaflaştırma	I. Toluen	10 dakika
	II. Toluen	10 dakika
Kapatma	Entellan	Kuruyuncaya kadar

3.11. Western Blot Analiz

Protein izolasyonu

Western blot analizi için -80 °C’de saklanan sağ akciğer dokusu numuneleri derin dondurucudan çıkarılıp üzerine 1 mL 1X PBS eklendi ve 2500 rpm’de 3 dk. santrifüj edilerek yıkanmıştır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra peletin üzerine 1 ml ProtinEx Total Protein Extraction Solution ve 10 µL proteaz inhibitör coctail eklenerek 10 dk buz içerisinde bekletilmiştir. 16000 rpm’de +4 °C’de 15 dk. santrifüj yapılmıştır. Supernatant temiz bir tüpe alınmıştır.

Protein miktar ölçümü

Abp biosciences bradford protein assay kit kullanılarak protein tayini yapılmıştır.

Protein Örneklerinin Denatüre Edilmesi

Bradford hesabına göre koyulacak protein örneği üzerine 5x PAGESTA Reducing sds-page buffer (751-001) eklenmiştir. Toplam hacim 20 µl olacak şekilde distile su eklenmiştir. Hazırlanan karışım 95 °C’de 10 dk. İnkübe edildi ve ardından buz üzerine alınmıştır.

Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Sds-Page Elektroforez

Xcell surelock dikey jel sistemi tankı (invitrogen) içerisine yerleştirilmiş ve %4-12’lik bis-tris gradient jeli (invitrogen, nupage 4-12% bis-tris gel) hazırlanmıştır. 20x mes running buffer’dan 50 ml alıp bir mezüre eklenmiş ve üzerine 950 ml distile su ekleyerek 1x mes buffer’a sulandırılmıştır. Buffer core üzerine eklenecek olan 200ml 1x mes running buffer içerisine 500ul nupage™ antioxidant eklenmiş ve buffer core içerisine eklenmiştir. Tankın içerisinde buffer core dışına 600ml 1x mes running buffer eklenmiştir. Jel kasetinde yer alan kuyucuklardan en baştaki ve sondakine 5 µl marker (prime-step™ prestained broad range protein ladder, biolegend) yüklenmiştir. Kalan kuyuculara hazırlanan protein örneğinden 20 µl protein örneği yüklenmiştir. Güç kaynağı 200 volt, 135 amper elektik ortamında 35 dk. yürütülmüştür.

Blotlama

Blotlama kısmında iblot gel transfer sistemi kullanılmıştır. Iblot transfer stack nitrocellulose (nc) (IB401001) kitinde yer alan anot stack cihaza yerleştirilmiştir. Jelin üstüne ıslak filtre kâğıdı koyulmuştur. Hava kabarcıkları uzaklaştırılmıştır. Kit içerisinde yer alan katot stack bakır yüzey yukarı/jelimsi yüzey ıslak filtre kâğıdına bakacak şekilde filtre kâğıdının üzerine dikkatlice yerleştirilmiş ve roller kullanarak hava kabarcıklarını tekrar uzaklaştırılmıştır. Program düğmesinden p3 programı seçilmiş ve 7 dk’lık sürede işlem tamamlanmıştır. Transfer işleminin gerçekleştiği marker bantlarının hepsinin membrana geçmiş olduğu gözlenerek kontrol edildikten sonra nitroselüloz membran dikkatli bir şekilde distile su içerisine alınmıştır.

Bloklama

Bloklama işleminde kullanılmak üzere %0.1 tween-20 içeren pbs-t solüyonu içerisine %5 oranında bsa (bovine serum albumin) eklenerek bloklama solüsyonu hazırlanmıştır. Nitroselüloz membran bloklama solüsyonu (%5 bsa-pbst) içerisine alınmıştır. Membran, shaker kullanılarak hafif şekilde çalkalanarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.

Primer antibody uygulanması

Yıkama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra membran 10 ml dilüe edilmiş occludin (1:100, 62 kDA, Santa Cruz, sc-133256) ve β -actin (1:30000, 43 kDA, Affinity Biotech, AF7018) primer antikor içerisinde gece boyunca +4 °C’de inkübe edilmiştir. Ertesi gün +4 °C’den çıkarılan membranlar 2 saat boyunca oda sıcaklığında shaker üzerinde hafifçe çalkalanarak inkübasyona devam edilmiştir.

Yıkama

Primer antibody inkübasyonu bittikten sonra primer antikor solüsyonu uzaklaştırılmıştır. Daha sonra membran pbst içerisinde 3 kere 5dk. shaker içerisinde hafifçe çalkalanarak yıkanmıştır.

Sekonder Antikor Uygulanması

Sekonder antibody (goat-anti-rabbit ıgg (h+l), hrp conjugate, advansta) bloklama solüsyonu (%5bsa-pbst) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda 10.000 kat sulandırılmıştır. Yıkama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra membran 10 ml dilüe edilmiş m-IgGk BP-HRP (1:200) ve Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP (1:2000) sekonder antikor içerisinde oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.

Yıkama

Sekonder antibody inkübasyonu bittikten sonra sekonder antikor solüsyonu uzaklaştırılmıştır. Daha sonra membran pbst içerisinde 3 kere 5 dk. shaker içerisinde hafifçe çalkalanarak yıkanmıştır.

Görüntüleme

Yıkama işlemi bittikten sonra membranlar 6 ml ecl solüsyonu (Advansta, WesternBright ECL HRP substrate, Cat.No:K-12045-D50) içerisinde alınarak görüntüleme cihazına (Syngene G: Box Chemi XRQ) yerleştirilmiştir. ECL içerisinde 1 dk. inkübasyon sonrasında görüntü alınmıştır (167).

3.12. Biyokimyasal Analizler

- 80 °C saklanan sağ akciğerin üst yarımı kullanılarak SOD (Rel assay, Türkiye), (MDA (Rel assay, Türkiye) ve GPx (Rel assay, Türkiye) düzeyi ELISA yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Çalışma günü akciğer dokuları derin dondurucudan çıkarılıp analizler için tartılmıştır. Daha sonra dokular 1/9 oranında fosfat tamponu ilavesi ile 12.000 rpm'de 1-2 dakika süreyle homojenize edilerek homojenat elde edilmiştir. Daha sonra doku homojenatları +4 °C'de 7000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant elde edilmiştir.

3.12.1. Akciğer dokusunda MDA seviyesi (nmol/L)

MDA seviyesi, Ohkawa ve ark. tarafından açıklanan 100 °C'de tiyobarbitürik asit (TBA) tabanlı bir yöntem kullanılarak belirlenmiştir (168). Bu yöntemde MDA veya MDA benzeri bileşikler TBA ile reaksiyona girerek 532 nm'de maksimum absorbansa sahip pembe bir kromofor üretmektedir. Reaksiyon asidik koşullar altında (pH 2-3) 100 °C'de 15 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Proteinleri uzaklaştırmak için örnekler trikloroasetik asit ile muamele edilmiş ve çöken proteinler santrifüjleme ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra üstteki sıvının bir kısmı eşit hacimde TBA reaktifi ile karıştırılmış ve kaynar su banyosunda 15 dakika ısıtılmıştır. Soğutulduktan sonra, elde edilen kromoforun absorbansı Rel Assay Diagnostics'ten ticari bir TBA deney kiti kullanılarak 532 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar nmol/L yaş doku olarak sunulmuştur.

3.12.2. Akciğer dokusunda SOD seviyesi (U/ml)

Hazırlanan akciğer süpernatantdaki SOD aktivitesi Sun ve ark. yöntemi kullanılarak ölçülmüştür (169). SOD, süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalize eder. Ksantin ve ksantin oksidaz, kırmızı bir formazan boyası oluşturmak için 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorür ile reaksiyona giren süperoksit radikalleri üretmek için kullanılmıştır. SOD aktivitesi, bu reaksiyonun inhibisyonu ile ölçülmüş ve ölçümler bir Mindray BS-400 biyokimya analizörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar U/ml protein olarak sunulmuştur.

3.12.3. Akciğer dokusunda GPx seviyesi (U/L)

Hazırlanan akciğer süpernatantdaki GPx aktivitesi Paglia ve Valentine'in yöntemi kullanılarak ölçülmüştür (170). GPx, kümen hidroperoksit tarafından glutatyonun oksidasyonunu katalize eder. Glutatyon varlığında, NADPH'nin NADP'ye eş zamanlı oksidasyonu ile hemen indirgenmiş forma dönüştürülür. 340 nm'deki absorbanstaki azalma ölçülür. Sonuçlar U/L protein olarak sunulmuştur.

3.13. İstatiksel Analiz

Verilerin analizi için Jamovi 24.2 paket programı kullanılmıştır. Biyokimyasal parametrelerin indeksi ortalama $\pm$ standart sapma kullanılarak hesaplanmıştır. Akciğer dokusunun morfolojik skorlaması sonucu elde edilen değerler ve immunohistokimyasal h-skoru sonucu elde edilen değerlerin indeksi medyan (min-max) olarak hesaplanmıştır. Shapiro-Wilk testi kullanılarak verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığı incelenmiş ve tek yönlü varyans analizi kullanılarak normal dağılım gösteren niceliksel değerlerin karşılaştırılmıştır. Gruplar arasında fark bulunduğu bu farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemede varyansların homojenlik durumuna göre, Bonferroni ya da Dunnet doğrulama testleri yapılmıştır. Normal dağılım gösteren niteliksel değerlerin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi

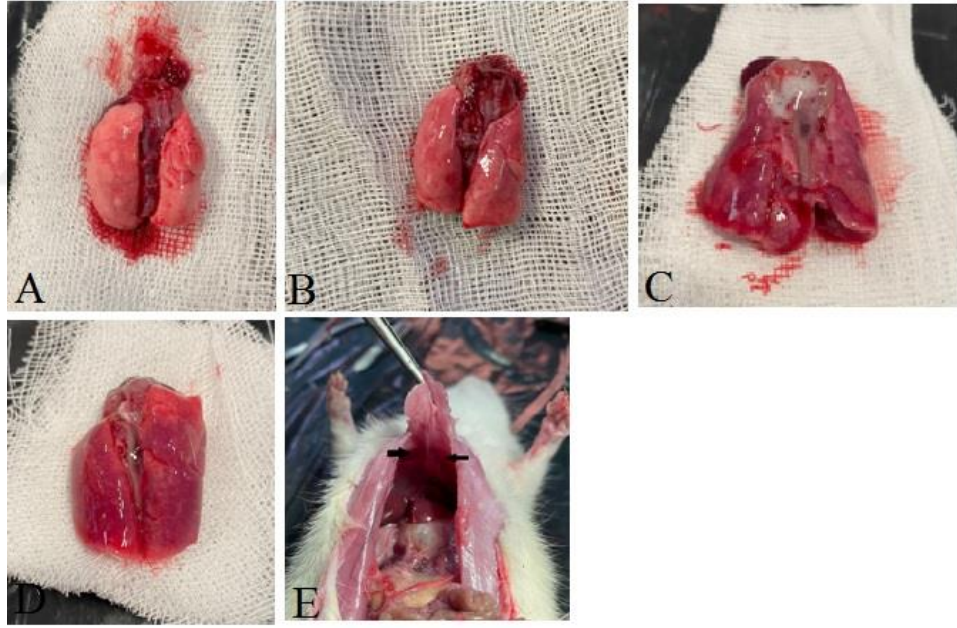
kullanılmıştır. İkili karşılaştırmada Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi $P<0.05$ olarak belirlenmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Akciğer Ağırlığı/Vücut Ağırlığı (AA/VA) (g/g) ve Plevral Efüzyon/Vücut Ağırlığı (PE/VA) (ml/g) Oranlarına Ait Bulgular

Sağlıklı KON grubu ve HES grubu akciğerlerinin makroskopik görüntüsünde herhangi bir ödem, hemoraji ve plevral efüzyon bulgusuna saptanmamıştır ve akciğerler normal açık pembe görünümündedir. ANTU grubu ve ANTU+HES grubunda ise akciğer kavitesini dolduran hemorajik olmayan eksudatif özellikte efüzyon sıvısı tespit edilmiştir. Ayrıca akciğer ödemli ve normal renginde olmayan koyu kırmızı renk görünümündedir. Şekil 12’de akciğerin makroskopik görüntüleri ve PE gösterilmiştir. Ayrıca Şekil 12 E’de akciğer kavitesi içindeki plevral efüzyon sıvısı siyah okla gösterilmiştir.



Şekil 12. Tüm gruplara ait makroskopik akciğer görüntüleri ve plevral efüzyon sıvısı. A: KON Grubu, B: HES Grubu, C: ANTU Grubu, D: ANTU+HES Grubu, E: ANTU Grubu

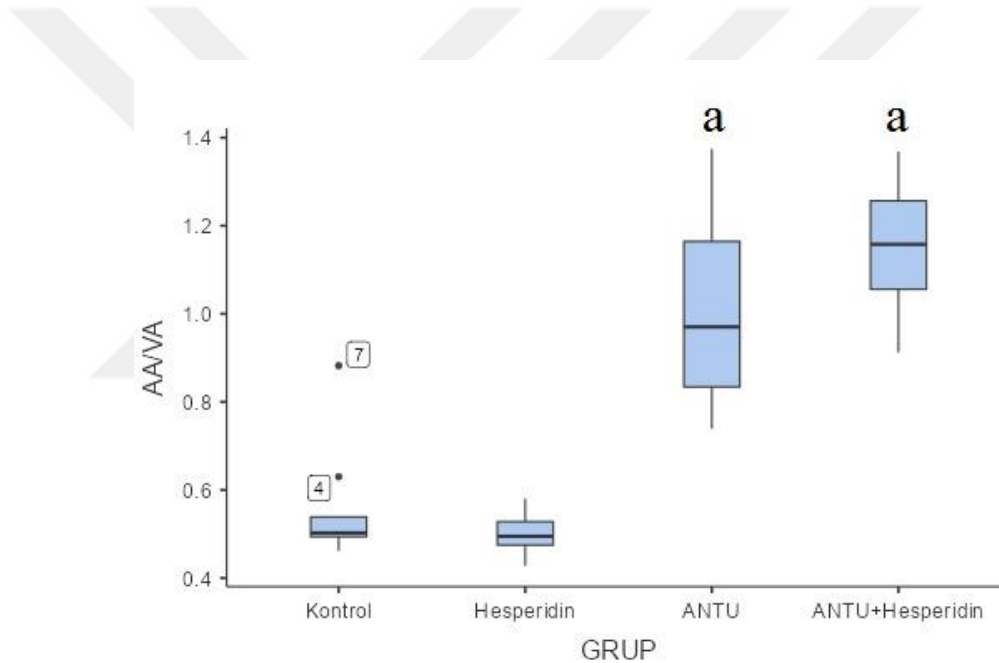
ANTU grubu AA/VA oranında, kontrol grubuna ($p<0.005$) ve HES grubuna ($p<0.001$) göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış tespit edilmiştir. Aynı zamanda ANTU+HES grubu, KON grubuna ($p<0.002$) ve HES grubuna ($p<0.001$) göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış tespit edilmiştir. KON grubu ortanca

(minimum-maksimum) cinsinden 0.558 (0.462-0.882), HES grubu 0.502 (0.428-0.581), ANTU grubu 1.02 (0.739-1.37) ve ANTU+HES grubunda ise 1.16 (0.913-1.37) olarak saptanmıştır (Şekil 13, Tablo 9).

Tablo 9. AA/VA oranlarının gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	Hesperidin	ANTU	ANTU+Hesperidin	p
AA/VA	0.558	0.502	1.02	1.16	<0.05
	(0.462-0.882)	(0.428-0.581)	(0.739-1.37) ^a	(0.913-1.37) ^a	

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: KON grubuna ve HES grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



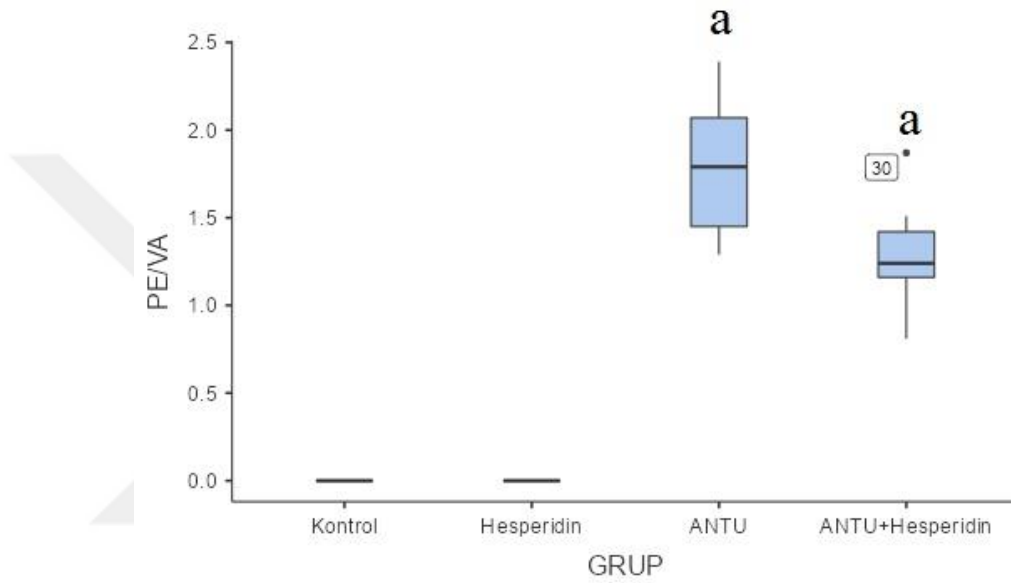
Şekil 13. AA/VA oranlarının gruplar arası karşılaştırması. a: KON grubuna ve HES grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

PE/VA oranı KON ve HES grubunda hiç elde edilememişken ANTU grubunda 1.77 (1.29-2.39) ve ANTU+HES grubunda ise 1.29 (0.810-1.87) olarak saptanmıştır (Şekil 14, Tablo 10). ANTU ve ANTU+HES grubunda PE/VA oranında, KON ve HES grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

Tablo 10. PE/VA oranlarının gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	Hesperidin	ANTU	ANTU+Hesperidin	p
PE/VA	0	0	1.77 (1.29-2.39) ^a	1.29 (0.810-1.87) ^a	<0.05

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: KON grubuna ve HES grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 14. PE/VA oranlarının gruplar arası karşılaştırması. a: KON grubuna ve HES grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4.2. Biyokimyasal Bulgular

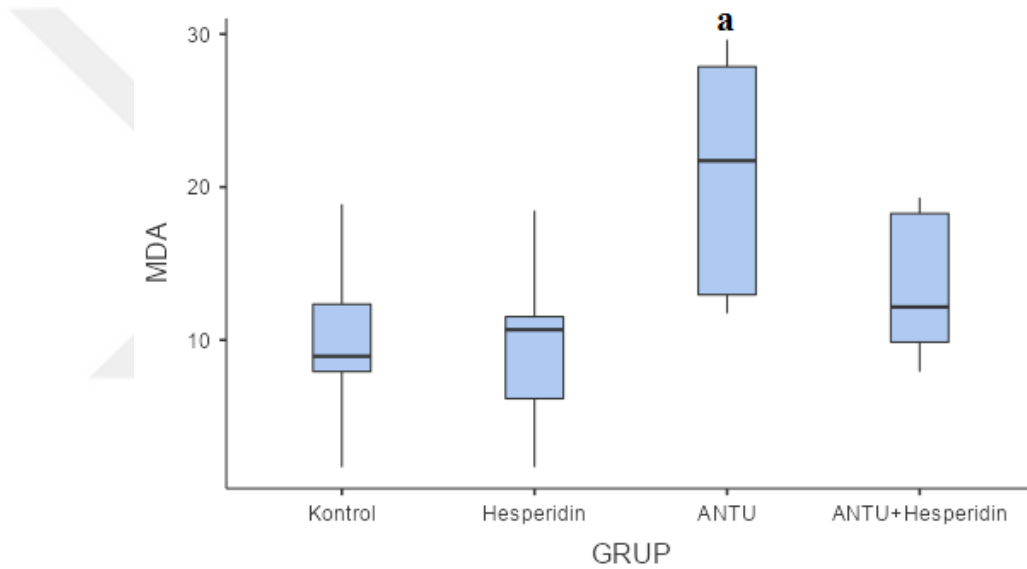
Malondialdehit (MDA): Lipit peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyleri KON ve HES gruplarında benzer sonuçlar göstermiş ve elde edilen sonuçlar bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). KON ve HES gruplarından elde edilen değerler ANTU grubundan elde edilen veriler ile karşılaştırıldığı zaman ANTU grubundaki verilerin daha yüksek olduğu, bu farklılığın ise istatistiksel anlamda anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). ANTU+HES grubundan elde edilen değerlerin ise ANTU grubundan elde edilenlere göre düşük

olduğu bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 15, Tablo 11).

Tablo 11. MDA seviyesinin gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	Hesperidin	ANTU	ANTU+Hesperidin	p
MDA	9.61	9.74	20.3	13.5	<0.05
	(1.69-18.9)	(1.69-18.5)	(11.7-29.6) ^a	(7.93-19.3)	

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: KON grubuna ve HES grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 15. MDA seviyesinin gruplar arası karşılaştırması. a: KON grubuna ve HES grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

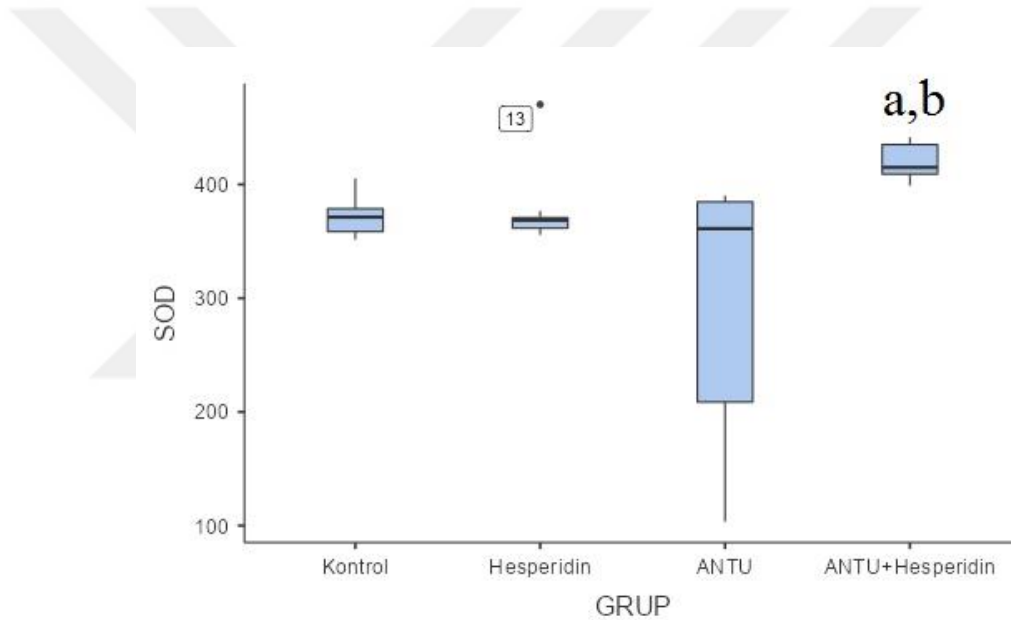
Süperoksitdismutaz (SOD): Akciğer dokusunda antioksidan enzim olan SOD enziminin düzeyi KON ve HES gruplarında benzer değerler göstermiş ve elde edilen sonuçlar bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). KON ve HES gruplarından elde edilen değerler ANTU grubundan elde edilen veriler ile karşılaştırıldığında ANTU grubundaki ortanca değer düşük olduğu ve bu farklılığın ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir ($p>0.05$). ANTU+HES grubundan elde edilen değerlerin ise KON, HES ve ANTU grubundan

elde edilenlere göre yüksek olduğu ve grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir (KON ve ANTU $p<0.01$, HES $p<0.05$) (Şekil 16, Tablo 12).

Tablo 12. SOD seviyesinin gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	Hesperidin	ANTU	ANTU+Hesperidin	p
SOD	372	376	290	419	<0.05
	(352-405)	(356-470)	(104-390)	(399-442) ^{a,b}	

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: KON ve ANTU grubuna ($p<0.01$), b: HES grubuna ($p<0.05$) göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



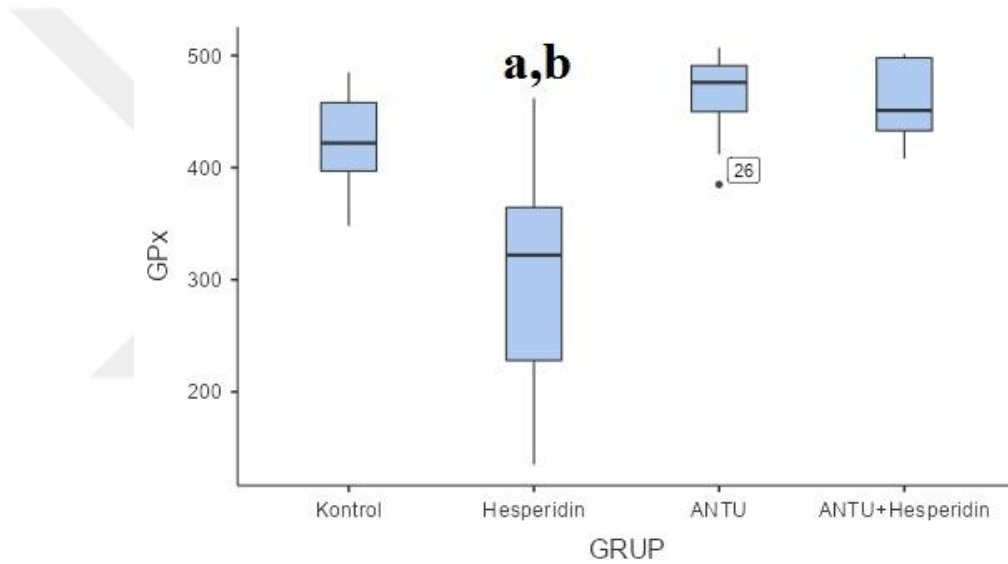
Şekil 16. SOD enzim seviyesinin gruplar arası karşılaştırması. a: KON ve ANTU grubuna ($p<0.01$), b: HES grubuna ($p<0.05$) göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.

Glutasyon peroksidaz (GPx): GPx enzim seviyesi en düşük HES grubunda bulunmuştur. KON, ANTU ve ANTU+HES grupları arasında grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Ancak bu üç grup ile HES grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir (KON $p<0.05$, ANTU ve ANTU+HES $p<0.01$) (Şekil 17, Tablo 13).

Tablo 13. GPx seviyesinin gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	Hesperidin	ANTU	ANTU+Hesperidin	p
GPx	421	303	463	460	<0.05
	(348-485)	(135-462) ^{a,b}	(385-507)	(408-501)	

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: KON grubuna ($p<0.05$), b: ANTU ve ANTU+HES grubuna ($p<0.01$) göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



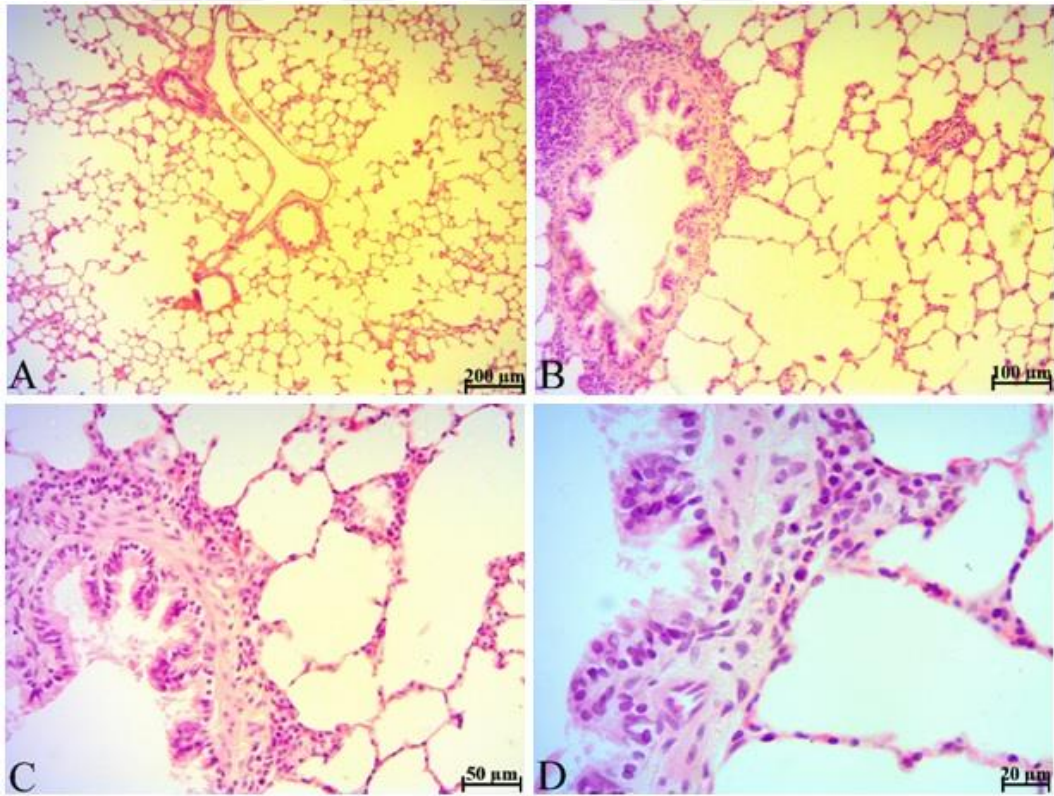
Şekil 17. GPx enzim seviyesinin gruplar arası karşılaştırması. a: KON grubuna ($p<0.05$), b: ANTU ve ANTU+HES grubuna ($p<0.01$) göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.

4.3. Histolojik Bulgular

4.3.1. Hematoksilen+ Eozin (H&E) boyama

Kontrol Grubuna Ait H&E Bulguları

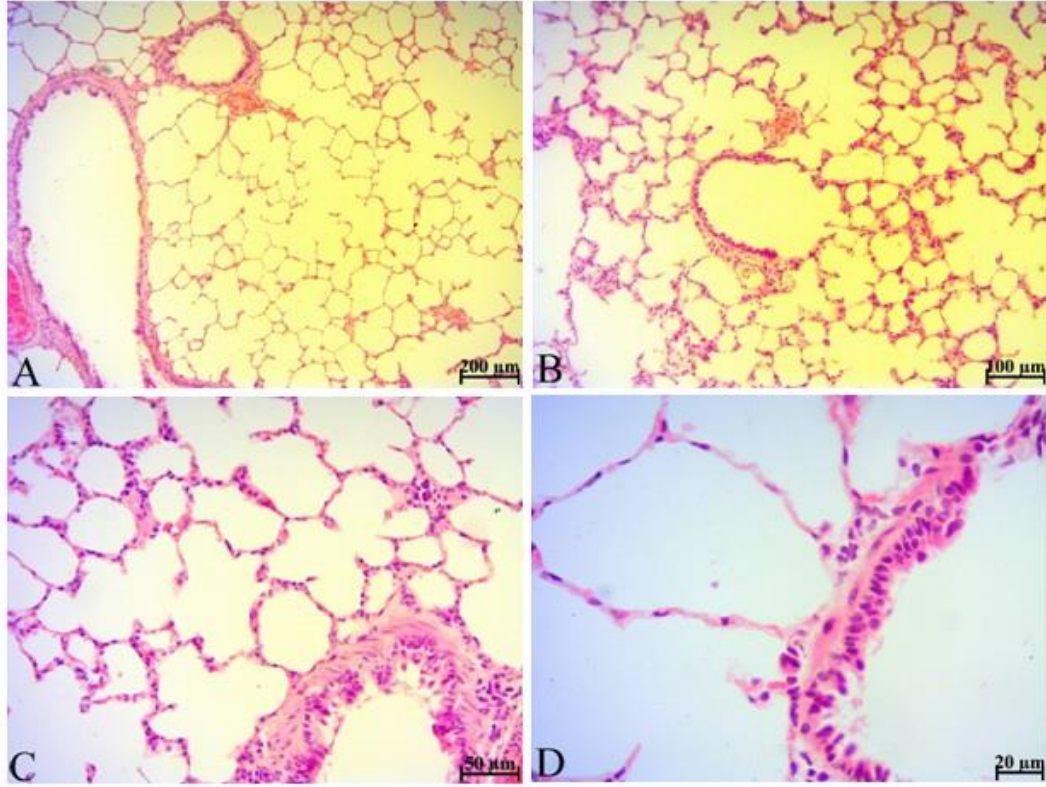
KON grubunun H&E boyalı akciğer kesitlerinde bronşların, bronşiollerin ve alveollerin normal morfolojik özellikleri gözlemlenmiştir. Küçük büyütmede alveollerin tek katlı yassı epitel tabakasıyla kaplı olduğu görülmüştür. İnteralveolar septalar, kılcal damarlar içeren ince bağ dokusu şeklinde olduğu ve interalveolar septalar Kohn gözenekleri oluşturmak için kesintiye uğradığı gözlenmiştir. Alveolar kanalların genişleyerek alveolar keseler meydana getirdiği görülmüştür. X40 büyütmede, alveolar yüzeyde hem Tip 1 hem de Tip 2 pnömositler gözlenmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. Kontrol grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri. Normal morfolojiye sahip alveoler septum, alveoler kese, alveoler duktus ve bronşiol. Ölçü çubuğu: A; 200 µm, B 100 µm, C; 50 µm, D; 20 µm.

Hesperidin Grubuna Ait H&E Bulguları

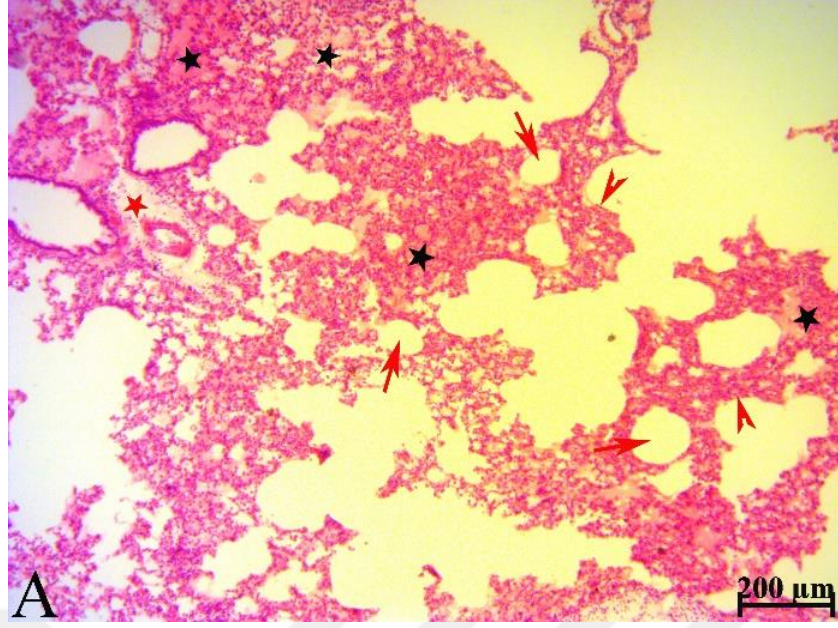
HES grubunun H&E boyalı akciğer kesitleri KON grubuna benzer şekilde normal histolojik yapıya sahip özellikler gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 19).



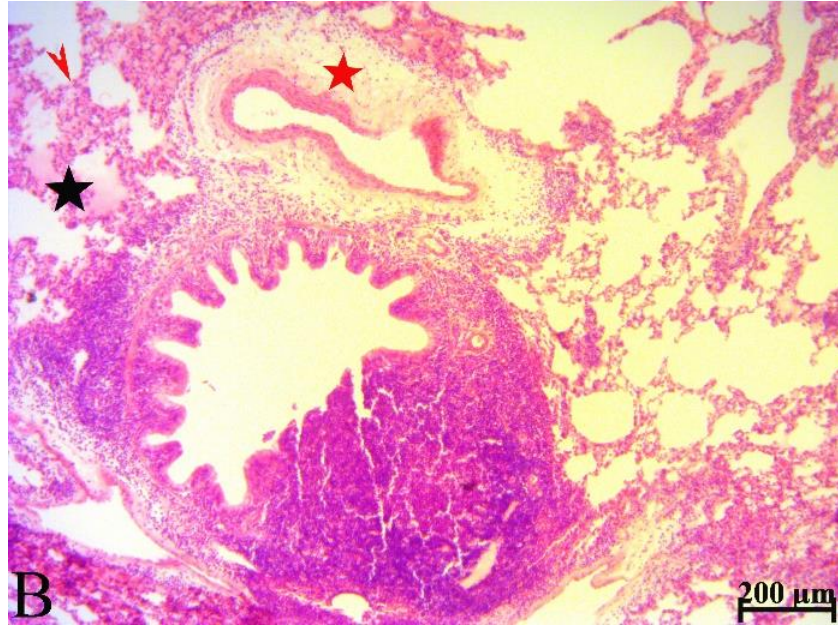
Şekil 19. Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri. Normal kalınlıkta interalveolar septumlar, normal görünümlü alveoler kese ve duktus. Epitel bütünlüğünü koruyan bir bronşiol. Ölçü çubuğu: A; 200 µm, B 100 µm, C; 50 µm, D; 20 µm.

ANTU Grubuna Ait H&E Bulguları

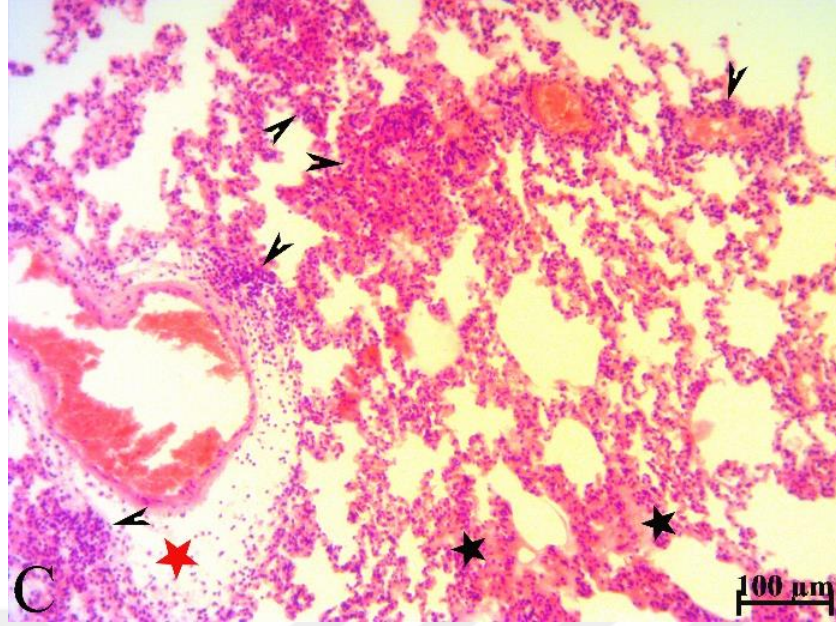
ANTU grubuna ait deneklerin akciğer dokularının H&E boyama sonucunda akciğer dokusunda yaygın alveol içi ödem, damarların adventisya tabakasında belirgin genişleme ile birlikte iltihabi hücre infiltrasyonları, alveoler septumlarda kalınlaşma ve buna bağlı alveollerde vakuolizasyonlar izlenmiştir. İltihabi hücre infiltrasyonunun özellikle lenfosit ve makrofaj ağırlıklı olduğu ve alveol içi ile septumlarda ve yer yer bronş ve bronşiol lümenlerinde de izlendiği dikkat çekmiştir (Şekil 20-29).



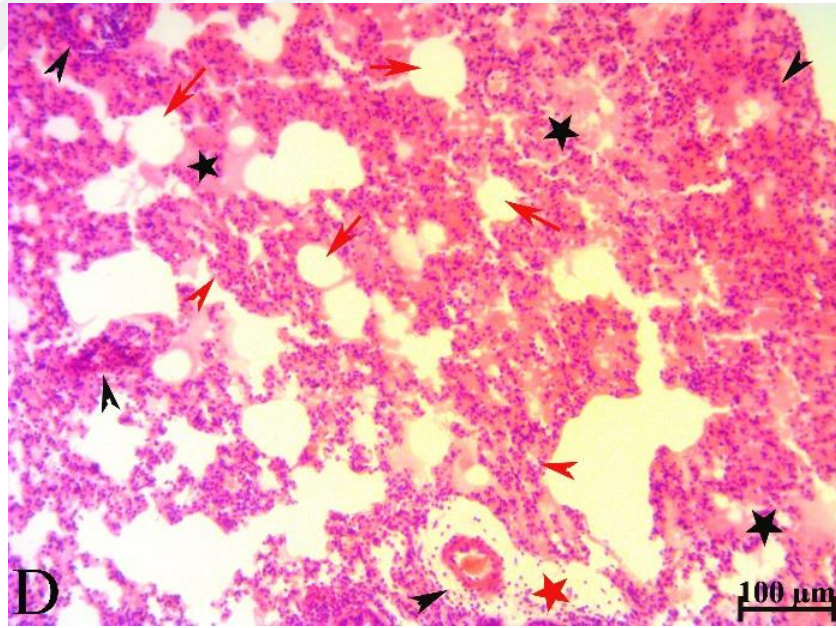
Şekil 20. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X5. Alveol içi ödem (siyah yıldız), perivasküler genişleme (kırmızı yıldız), vakuolizasyon (kırmızı ok) ve septal kalınlaşma (kırmızı ok başı). Ölçü çubuğu: A; 200 μ m lenfosit infiltrasyonu; siyah ok başı, makrofaj; siyah ok.



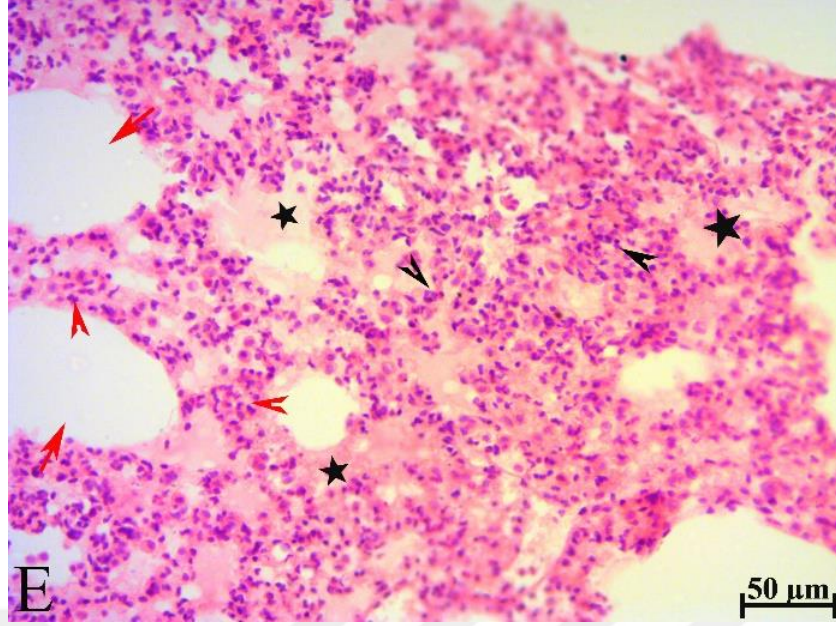
Şekil 21. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X5. Alveol içi ödem (siyah yıldız), perivasküler genişleme (kırmızı yıldız) ve septal kalınlaşma (kırmızı ok başı). Ölçü çubuğu: B; 200 μ m



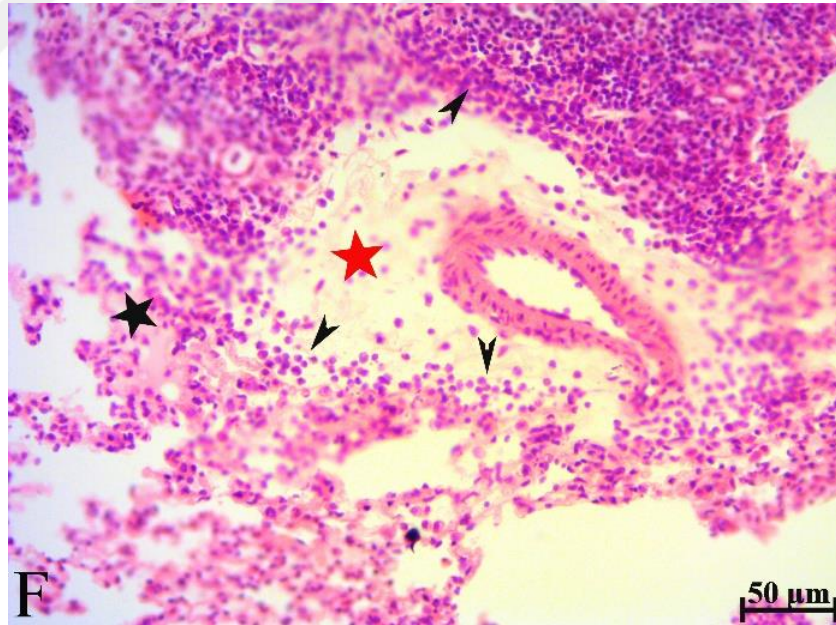
Şekil 22. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X10. Alveol içi ödem (siyah yıldız), perivasküler genişleme (kırmızı yıldız) ve lenfosit infiltrasyonu (siyah ok başı). Ölçü çubuğu: C; 100 µm



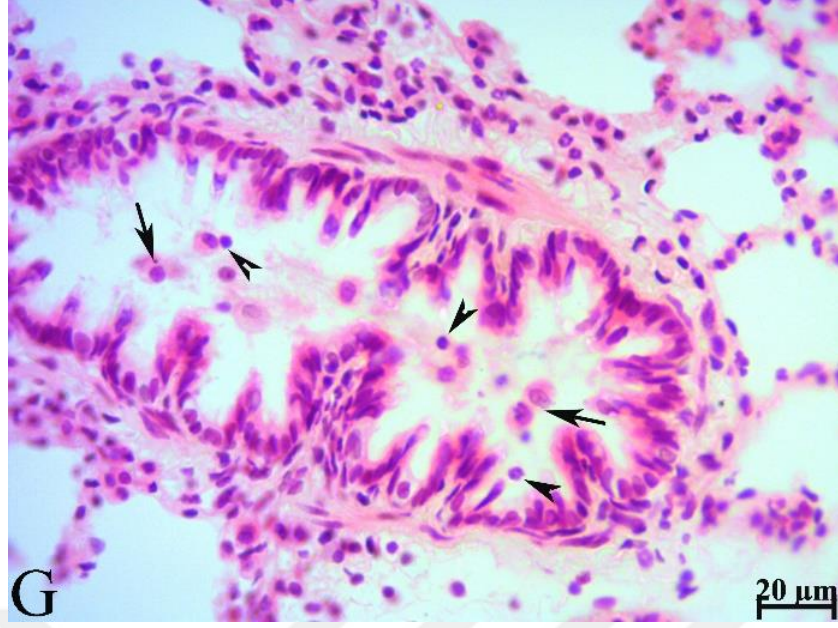
Şekil 23. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X10. Alveol içi ödem (siyah yıldız), perivasküler genişleme (kırmızı yıldız), septal kalınlaşma (kırmızı ok başı), lenfosit infiltrasyonu (siyah ok başı) ve vakuolizasyon (kırmızı ok). Ölçü çubuğu: D; 100 µm



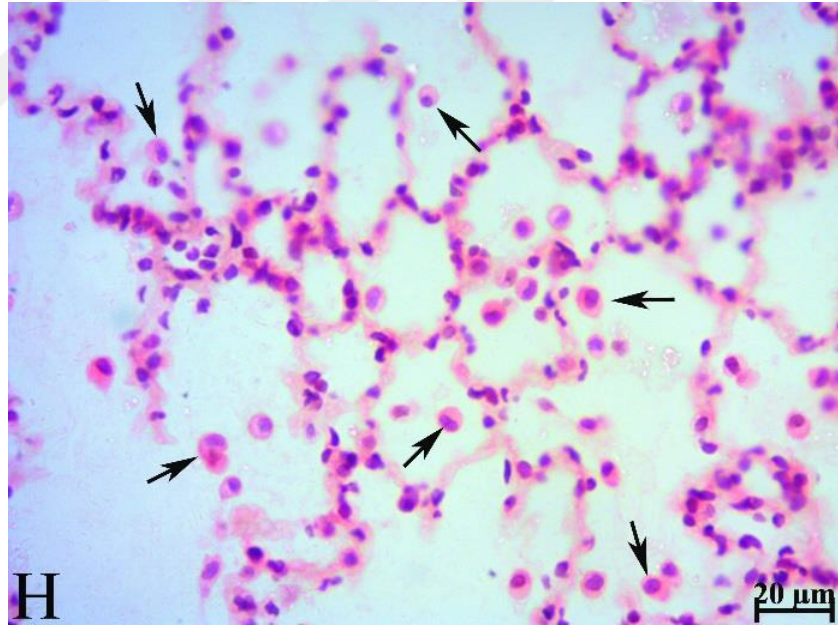
Şekil 24. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X20. Alveol içi ödem (siyah yıldız), vakuolizasyon (kırmızı ok) ve septal kalınlaşma (kırmızı ok başı) ve lenfosit infiltrasyonu (siyah ok başı). Ölçü çubuğu: E; 50 µm



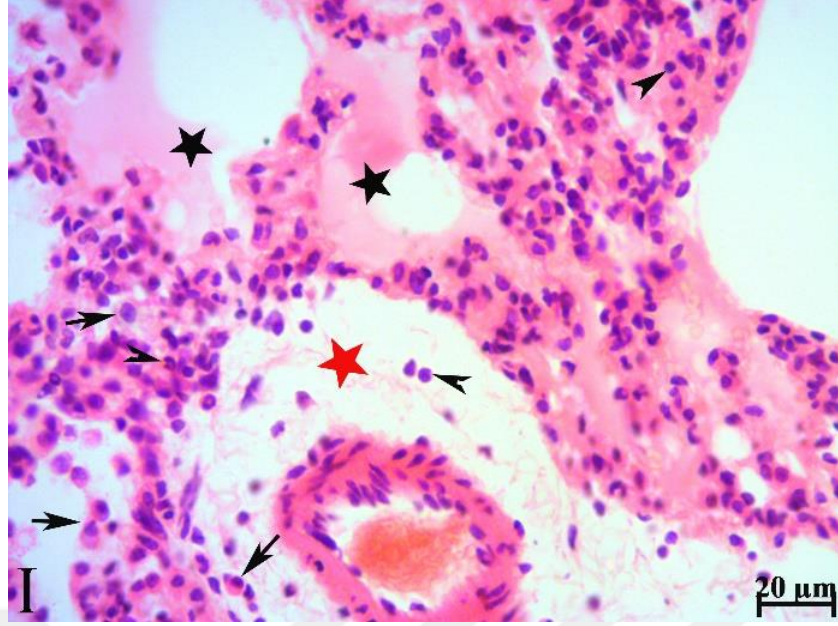
Şekil 25. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X20. Alveol içi ödem (siyah yıldız), perivasküler genişleme (kırmızı yıldız) ve lenfosit infiltrasyonu (siyah ok başı). Ölçü çubuğu: F; 50 µm



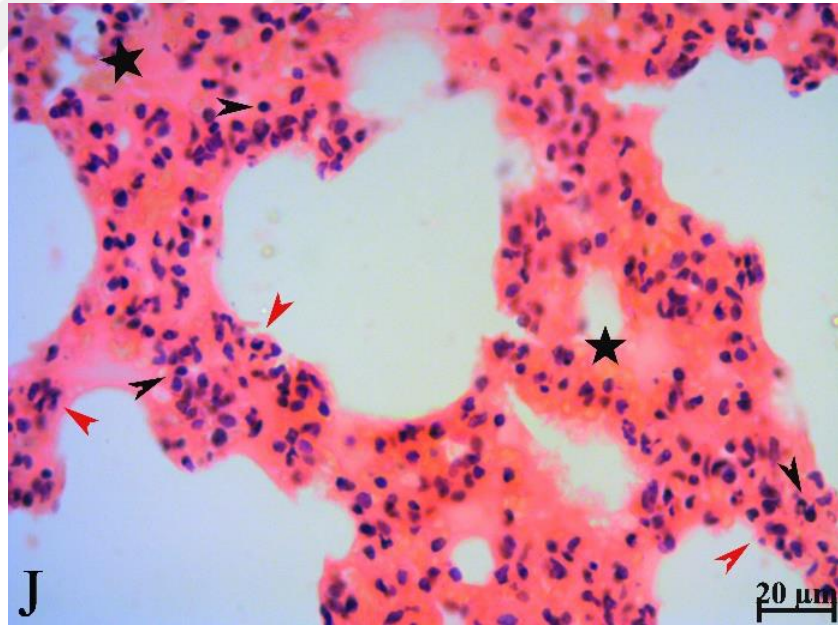
Şekil 26. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X40. Lenfosit infiltrasyonu (siyah ok başı) ve makrofaj (siyah ok). Ölçü çubuğu: G; 20 µm



Şekil 27. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X40. Makrofaj (ok). Ölçü çubuğu: H; 20 µm



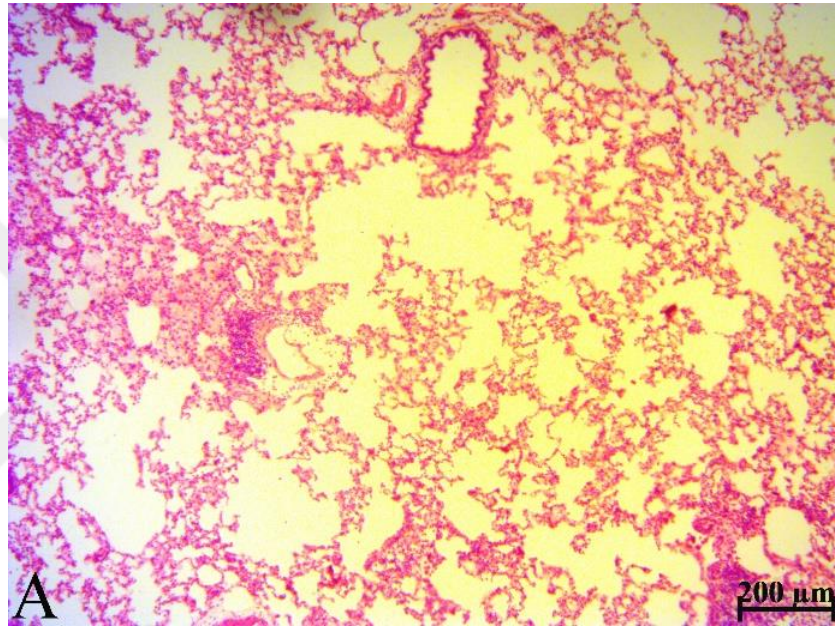
Şekil 28. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X40. Alveol içi ödem (siyah yıldız), perivasküler genişleme (kırmızı yıldız), lenfosit infiltrasyonu (siyah ok başı) ve makrofaj (siyah ok). Ölçü çubuğu: I; 20 µm



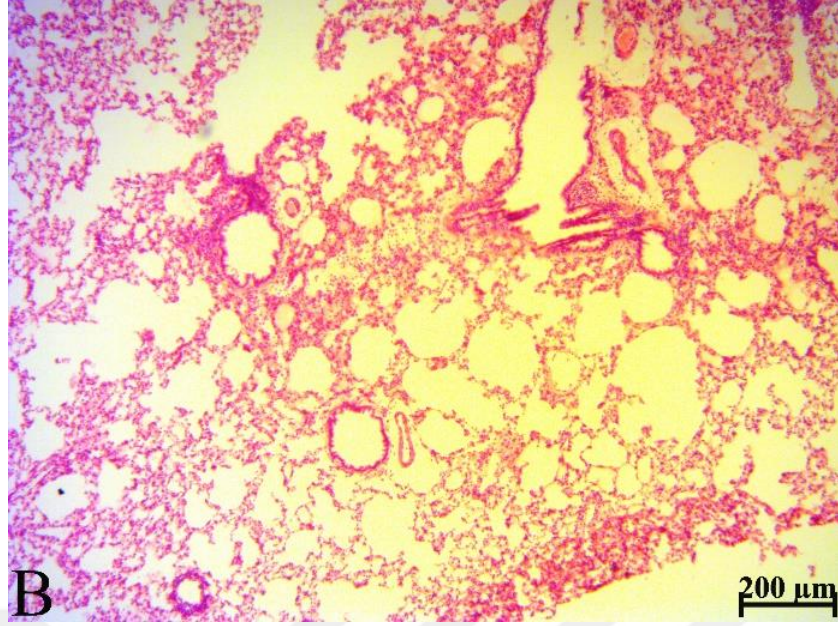
Şekil 29. ANTU grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X40. Alveol içi ödem (siyah yıldız), lenfosit infiltrasyonu (siyah ok başı) ve septal kalınlaşma (kırmızı ok başı). Ölçü çubuğu: J; 20 µm

ANTU+Hesperidin Grubuna Ait H&E Bulguları

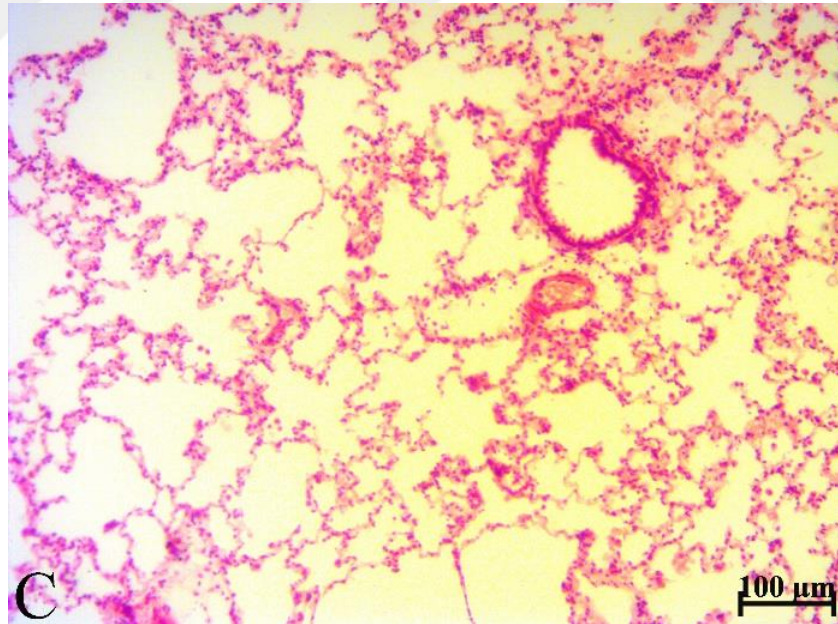
ANTU+HES grubuna ait deneklerin akciğer dokularının H&E boyama sonucunda akciğer dokusunda ANTU grubundakine benzer şekilde yer yer alveol içi ödem, perivasküler genişleme, alveoler septum kalınlaşması, vakuolizasyonlar ve iltihabi hücre infiltrasyonları gibi bulguları içeren alanlar olmak ile birlikte bu alanların çok sınırlı olduğu ve bulguların ANTU grubuna göre daha hafif olduğu dikkat çekmiştir. Özellikle ödemin zayıfladığı bu alanlarda makrofaj sayısında belirgin bir artış gözlenmiştir (Şekil 30-38).



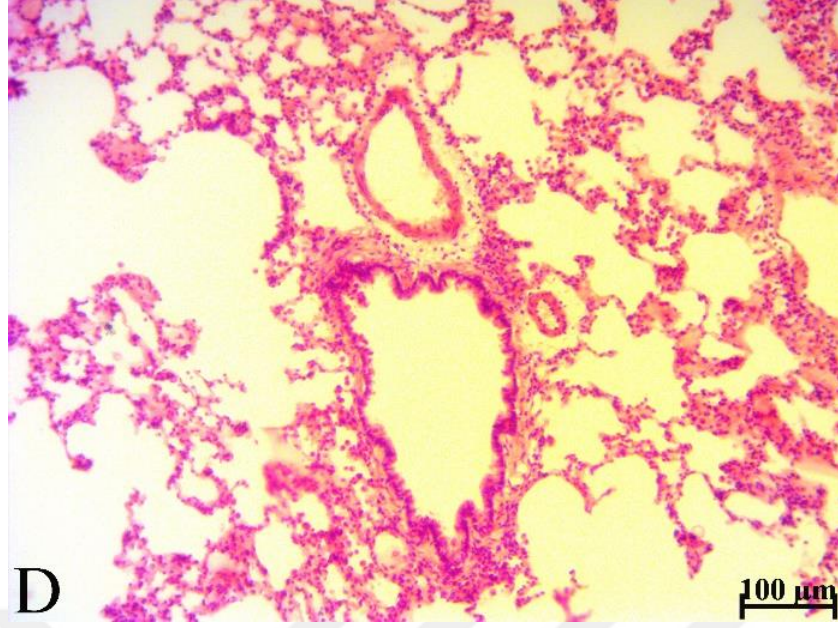
Şekil 30. ANTU+Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X5. Normal morfolojiye yakın akciğer dokusu. Ölçü çubuğu: A; 200 µm



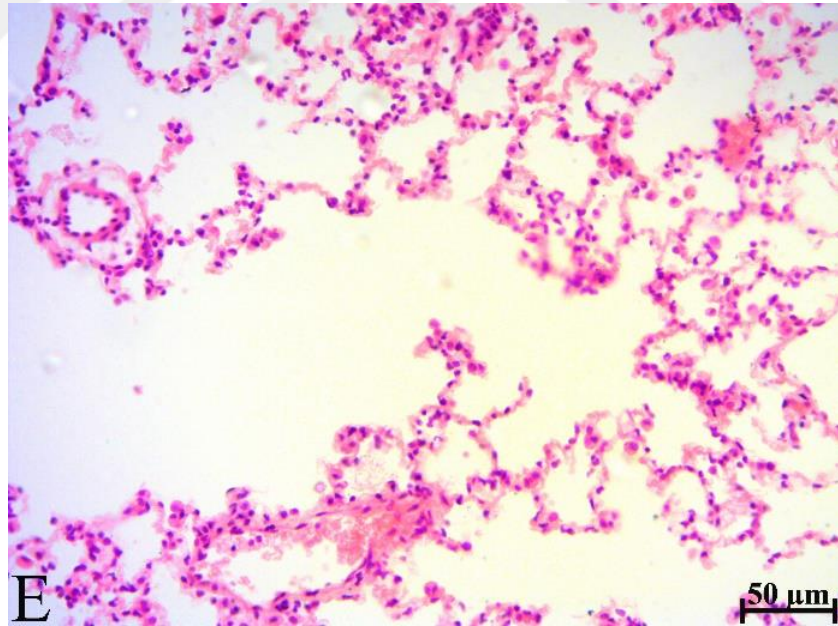
Şekil 31. ANTU+Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X5. Normal görünüme yakın alveoler kese ve duktus, interalveolar septumlar. Ölçü çubuğu: B; 200 μ m



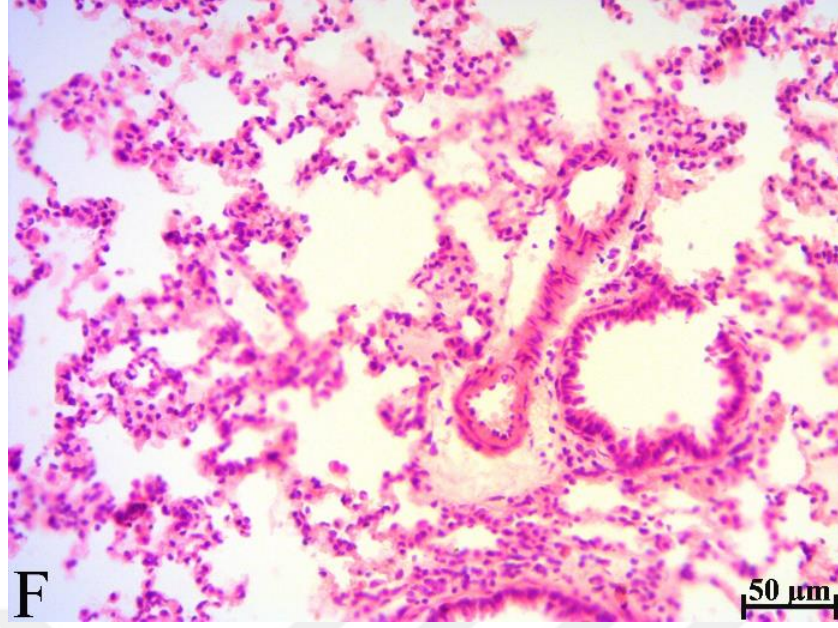
Şekil 32. ANTU+Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X10. Normal görünüme yakın interalveolar septum ve alveoler yapı, azalmış perivasküler genişleme. Ölçü çubuğu: C; 100 μ m



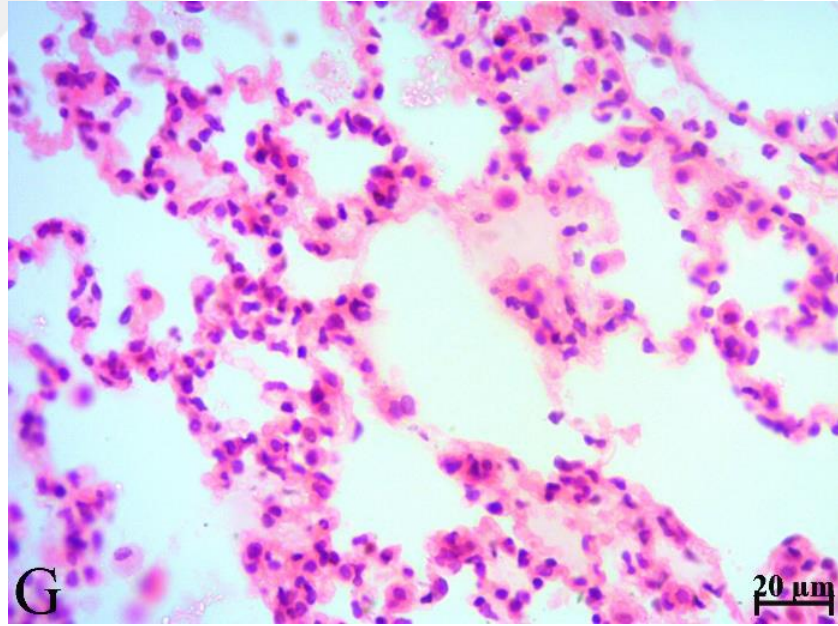
Şekil 33. ANTU+Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X10. Normal görünüme yakın azalmış perivasküler genişleme. Ölçü çubuğu: D; 100 µm



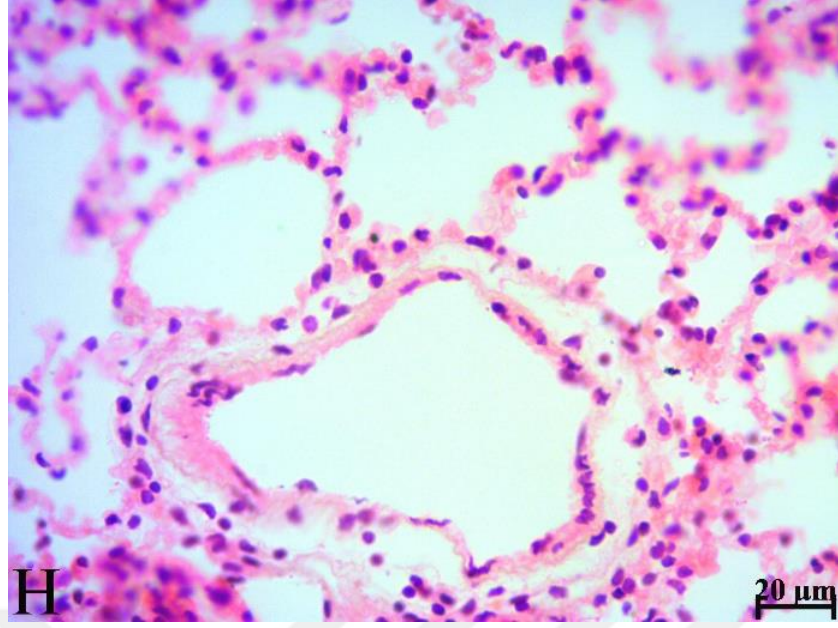
Şekil 34. ANTU+Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X20. Ölçü çubuğu: E; 50 µm



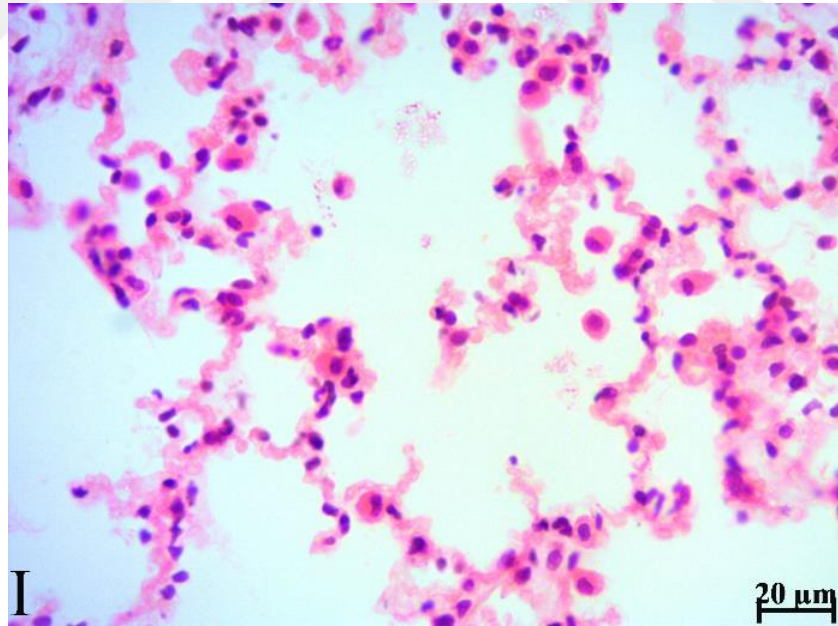
Şekil 35. ANTU+Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X20. Normal görünüme yakın interalveolar septum ve alveoler yapı, azalmış perivasküler genişleme ve ödem. Ölçü çubuğu: F; 50 µm



Şekil 36. ANTU+Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X40. Normal görünüme yakın interalveolar septum ve alveoler yapı, az miktarda ödem. Ölçü çubuğu: G; 20 µm



Şekil 37. ANTU+Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X40. Normal görünüme yakın interalveolar septum, alveoler yapı ve perivasküler genişleme. Ölçü çubuğu: H; 20 µm



Şekil 38. ANTU+Hesperidin grubuna ait akciğer dokularının H&E boyama görüntüleri X40. Normal görünüme yakın interalveolar septum ve alveoler yapı, alveoler içi makrofaj. Ölçü çubuğu: I; 20 µm

4.3.2. Gruplara göre akciğer skorlamasının istatistiksel analizi

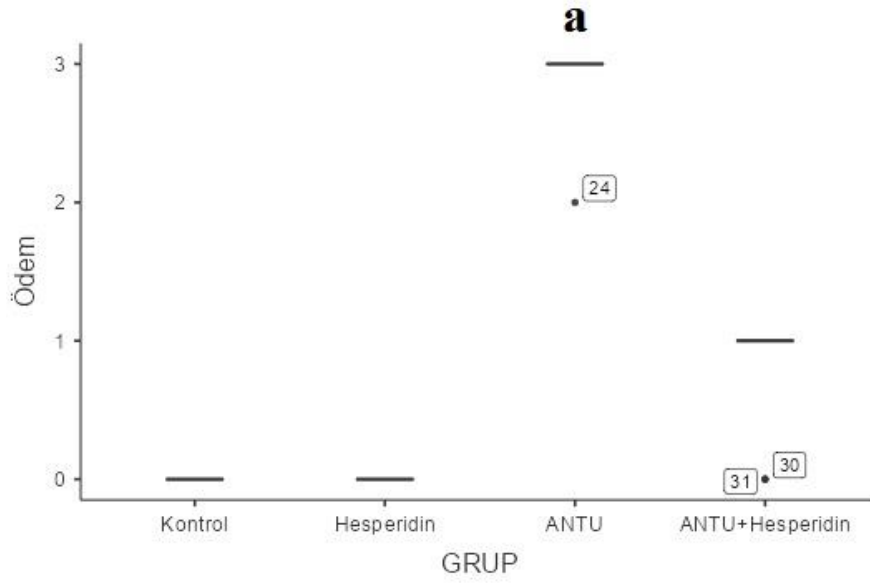
Akciğer dokusunda hasarı derecelendirilmek amacıyla tüm grupların H&E ile boyanmış kesitler ışık mikroskopunda 20 büyütmede ödem, interalveoler septum kalınlığı, interstisyel inflamatuvar hücre sayısı ve perivasküler aralık parametreleri 0; hasar yok, 1; hafif, 2; orta, 3; şiddetli olarak derecelendirilip skorlanmıştır. Elde edilen değerler Tablo 14'te ifade edilmiştir.

Tablo 14. Tüm gruplara ait akciğer skorlaması sonuçları.

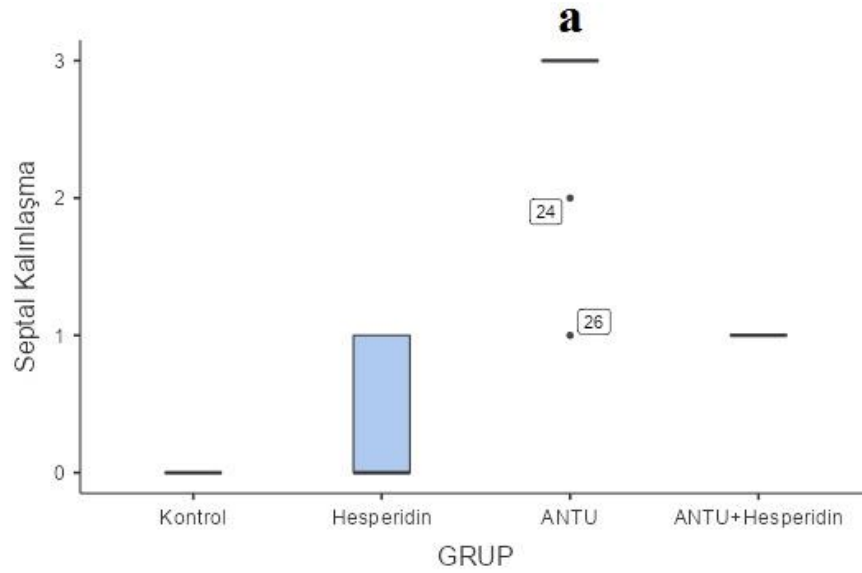
	Kontrol	Hesperidin	ANTU	ANTU+Hesperidin	p
Ödem	0	0	2.89	0.778	<0,05
	(0-0)	(0-0)	(2-3) ^a	(0-1)	
İnteralveoler septum kalınlığı	0	0.400	2.67	1	
	(0-0)	(0-1)	(1-3) ^a	(1-1)	
İnterstisyel inflamatuvar hücre sayısı	0	0.100	2.28	1.22	
	(0-0)	(0-1)	(2-3) ^a	(1-2)	
Vakuolizasyon	0	0	0.556	0	
	(0-0)	(0-0)	(0-2)	(0-0)	

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: KON, HES ve ANTU+HES grubuna (p<0.01) göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.

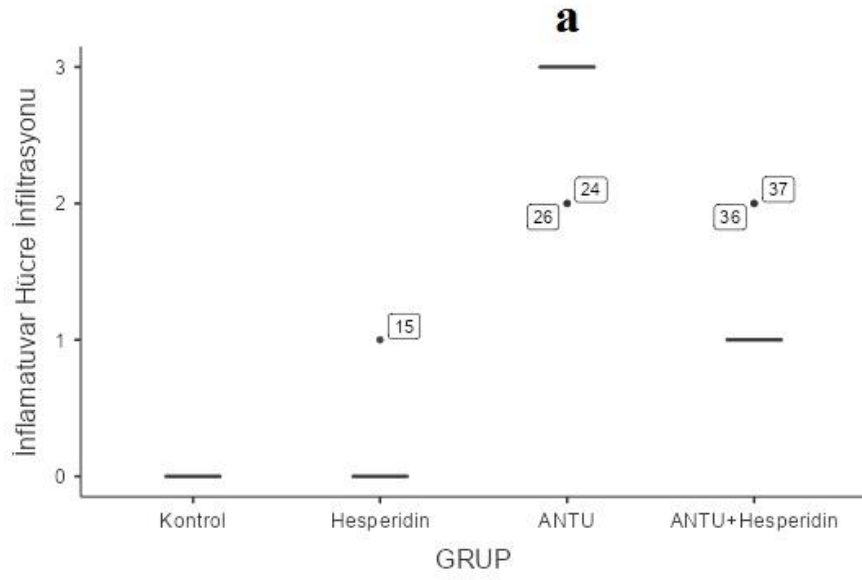
ANTU grubunda, ödem, interalveoler septum kalınlığı ve interstisyel inflamatuvar hücre sayısı (p<0.01) ve KON, HES ve ANTU+HES gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır. Vakuolizasyon (p>0.05) ANTU grubunda bir artış göstermiş olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 39-42, Tablo 14).



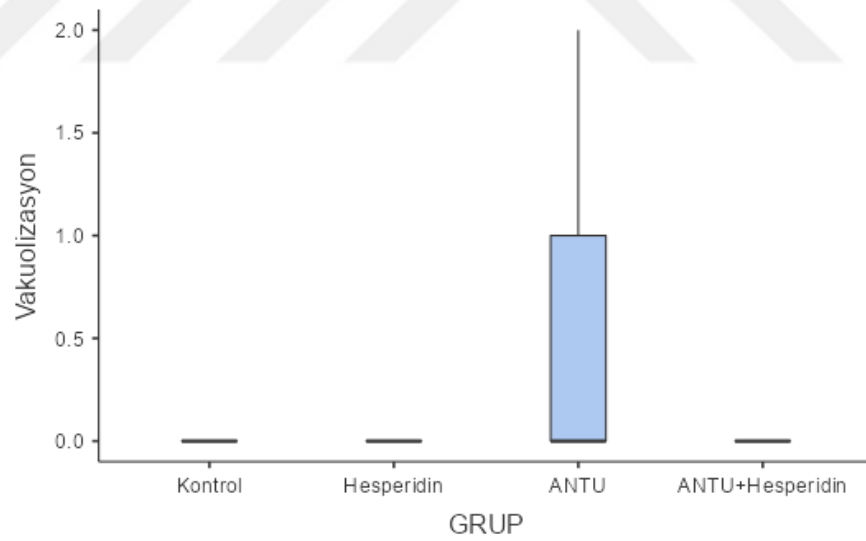
Şekil 39. Ödemin gruplar arası karşılaştırması. a: KON, HES ve ANTU+HES gruplarına ($p<0.01$) göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



Şekil 40. İntervalveoler septum kalınlığının gruplar arası karşılaştırması. a: KON, HES ve ANTU+HES gruplarına ($p<0.01$) göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



Şekil 41. İnterstisyel inflamatuvar hücre sayısının gruplar arası karşılaştırması. a: KON, HES ve ANTU+HES gruplarına ($p<0.01$) göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.

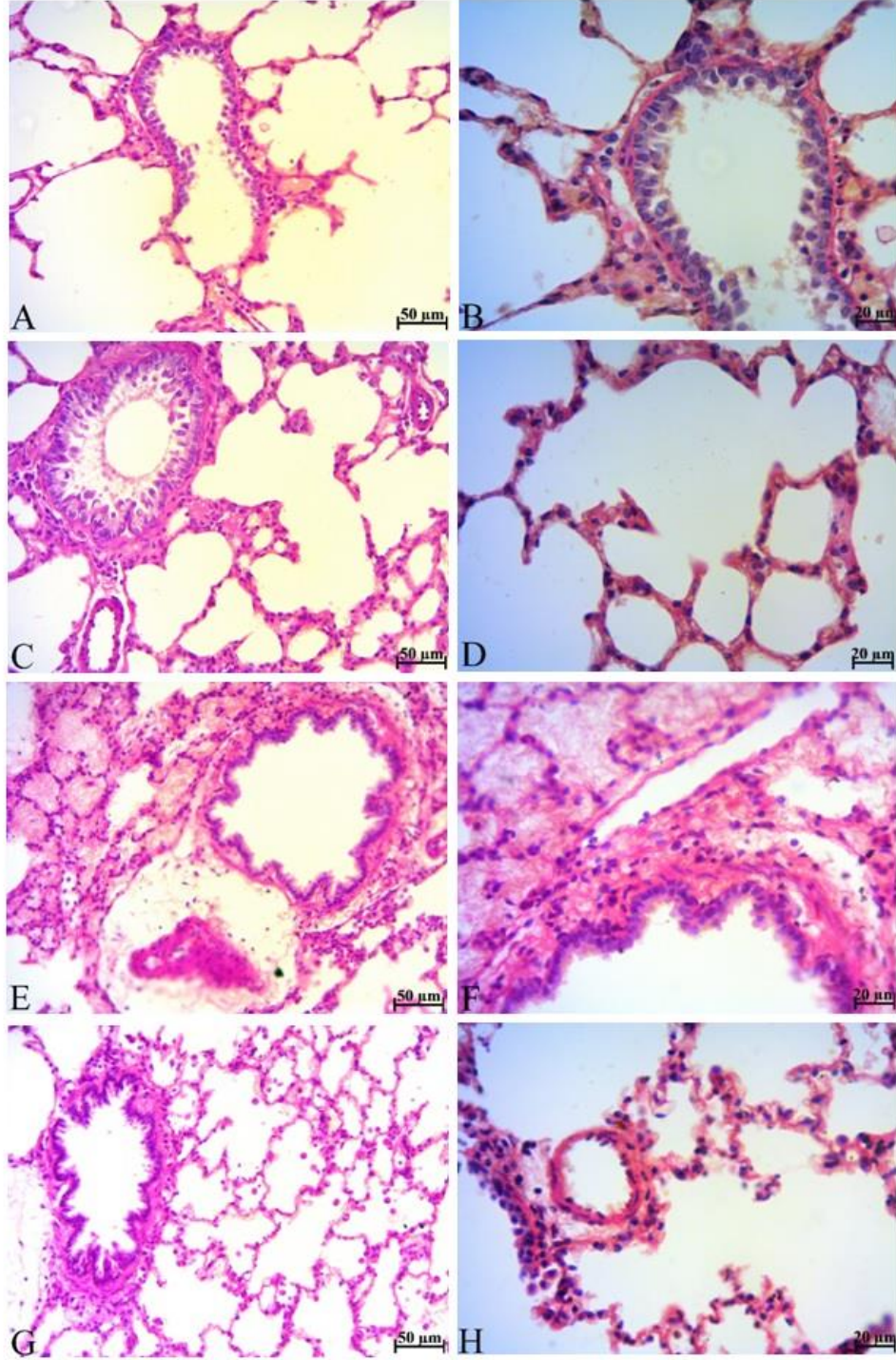


Şekil 42. Vakuolizasyonun gruplar arası karşılaştırması. Gruplar arası ($p>0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemektedir.

4.3.3. PAS

Tüm gruplara ait akciğer dokularının PAS boyama sonucunda KON ve HES gruplarında bronş ve bronşiol bazal membranları düzgün kontürlüydü ve net bir şekilde seçilebiliyordu. ANTU grubunda bronş ve bronşiol bazal membranlarının kontürü düzensizleşmişti ve özellikle bronşiolle ait bazal membranların yer yer seçilemediği dikkat çekmekteydi. ANTU+HES grubunda ise KON ve HES grubuna benzer şekilde bronşiol bazal membranları düzgün kontürlüydü ve bütünlüğünü korumaktaydı. Tüm gruplarda alveoler bazal membranlar değerlendirilememiştir (Şekil 43).

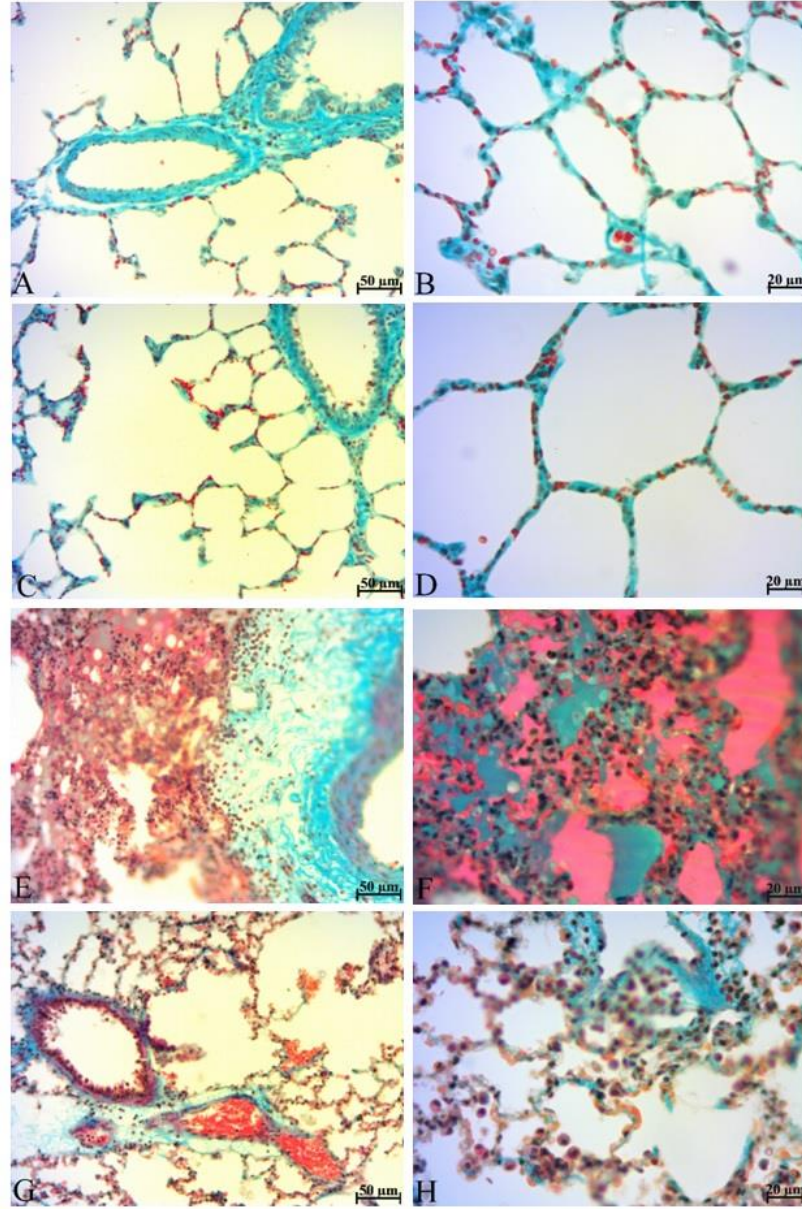




Şekil 43. Tüm gruplara ait akciğer dokularının PAS boyama görüntüleri. A, B; KON, C, D; HES, E, F; ANTU, G, H; ANTU+HES grubu. Ölçü çubuğu: A, C, E, G; 50 µm, B, D, F, H; 20 µm.

4.3.4. Masson Trikrom

Tüm gruplara ait akciğer dokularının Masson trikrom boyaması sonucunda alveoler septumların kalınlaştığı alanlar ile perivasküler genişleme alanları da dahil olmak üzere gruplar arasında bağ dokusu artışına işaret edecek anlamlı farklılık gözlenmemiştir (Şekil 44).

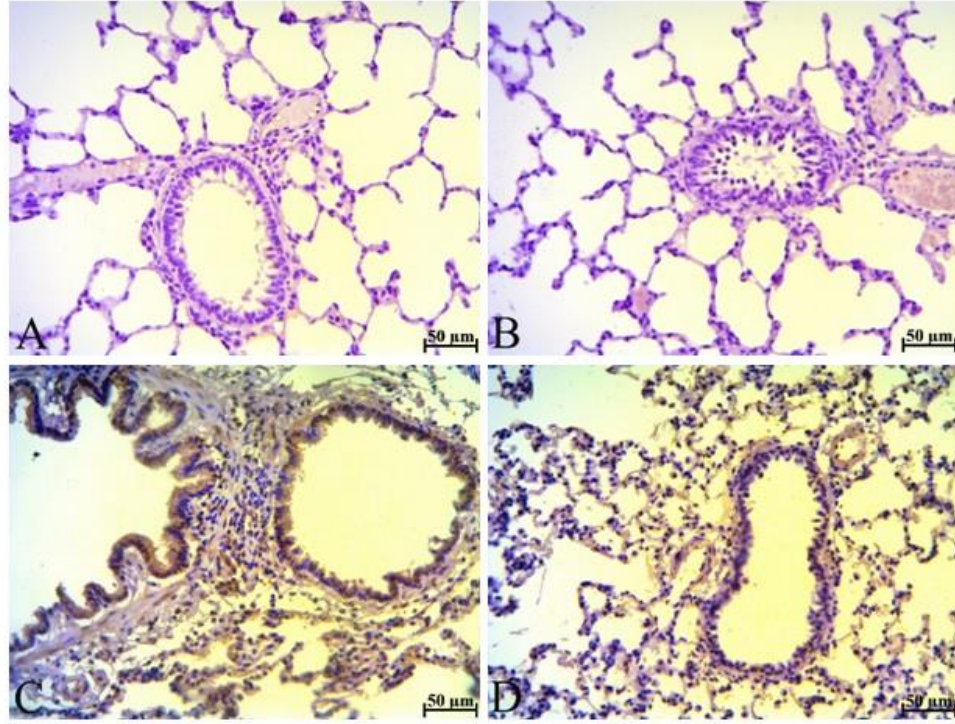


Şekil 44. Tüm gruplara ait akciğer dokularının Masson trikrom boyama görüntüleri. A, B; KON, C, D; HES, E, F; ANTU, G, H; ANTU+HES grubu. Ölçü çubuğu: A, C, E, G; 50 µm, B, D, F, H; 20 µm.

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

IL-1 β

İmmünohistokimyasal boyama ile IL-1 β ifadesinin H skoruna göre, ANTU grubunda KON, HES ve ANTU+HES gruplarına göre ($p<0.01$) istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 45-46, Tablo 15).

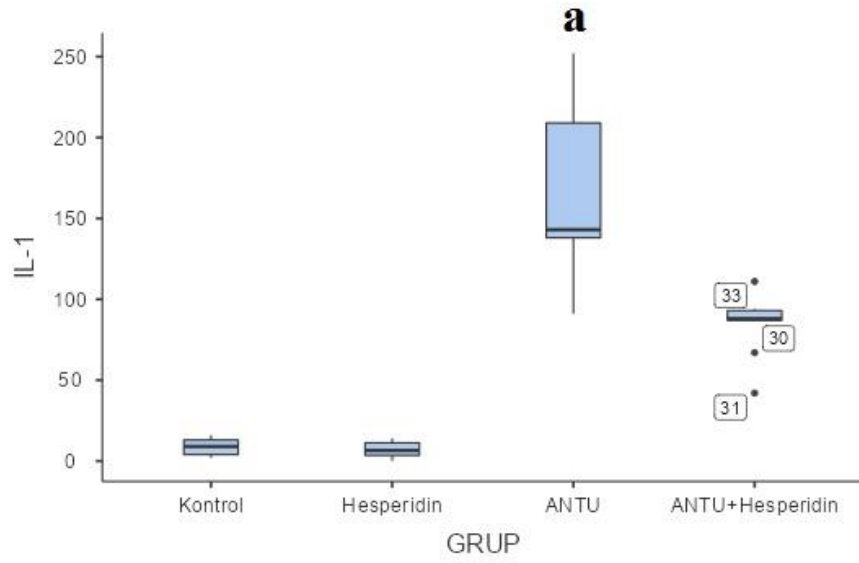


Şekil 45. Tüm gruplara ait akciğer dokularının IL-1 β proteini için yapılan immünohistokimyasal boyama görüntüleri X20. A: KON, B: HES, C: ANTU, D: ANTU+HES. Ölçü çubuğu: 50 μ m.

Tablo 15. IL-1 β boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	Hesperidin	ANTU	ANTU+Hesperidin	p
IL-1 β	8.44	7.20	170	84.4	<0.05
	(2-16)	(0-14)	(91-252) ^a	(42-111)	

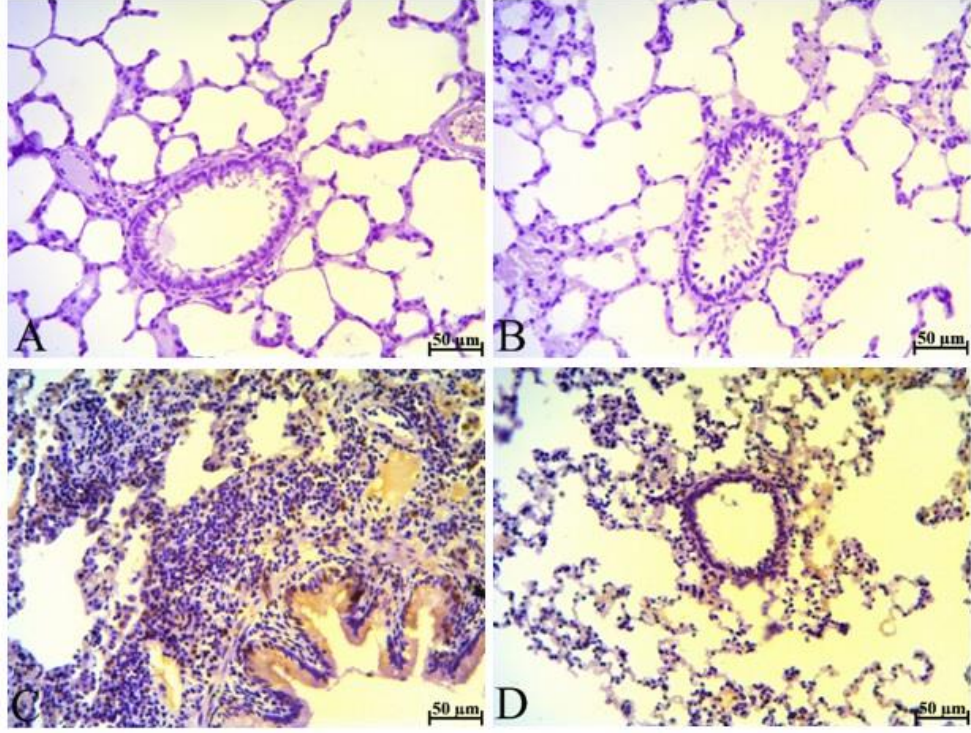
Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: KON, HES ve ANTU+HES grubuna ($p<0.01$) göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



Şekil 46. IL-1 β boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması. a: KON, HES ve ANTU+HES grubuna ($p<0.01$) göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.

NF- κ B

İmmünohistokimyasal boyama ile NF- κ B ifadesinin H skoruna göre, ANTU grubunda KON, HES ($p<0.01$) ve ANTU+HES ($p<0.05$) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 47-48, Tablo 16).

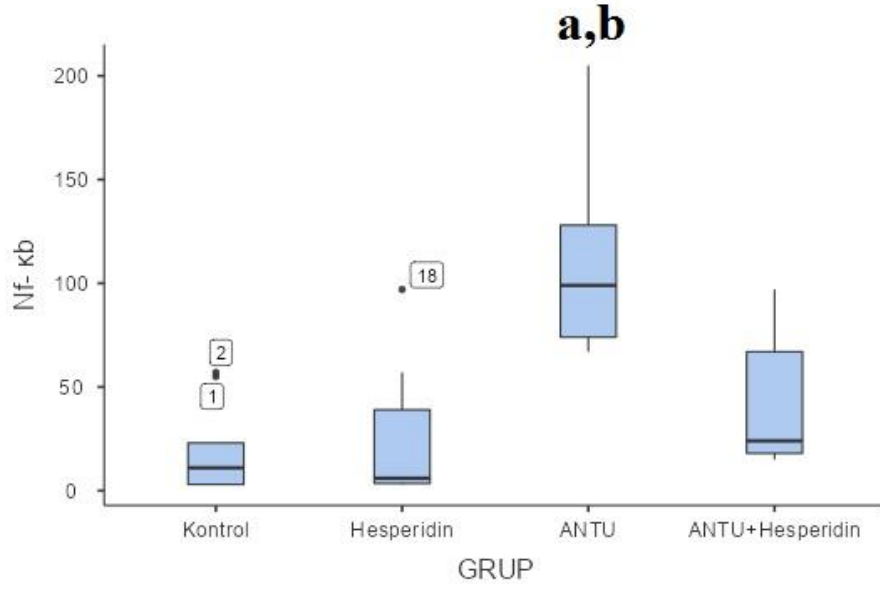


Şekil 47. Tüm gruplara ait akciğer dokularının NF-κB proteini için yapılan immünohistokimyasal boyama görüntüleri X20. A: KON, B: HES, C: ANTU, D: ANTU+HES. Ölçü çubuğu: 50 μm.

Tablo 16. NF-κB boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	Hesperidin	ANTU	ANTU+Hesperidin	p
NF-κB	19.2	24.6	110	42.6	<0.05
	(3-57)	(3-97)	(67-205) ^{a,b}	(15-97)	

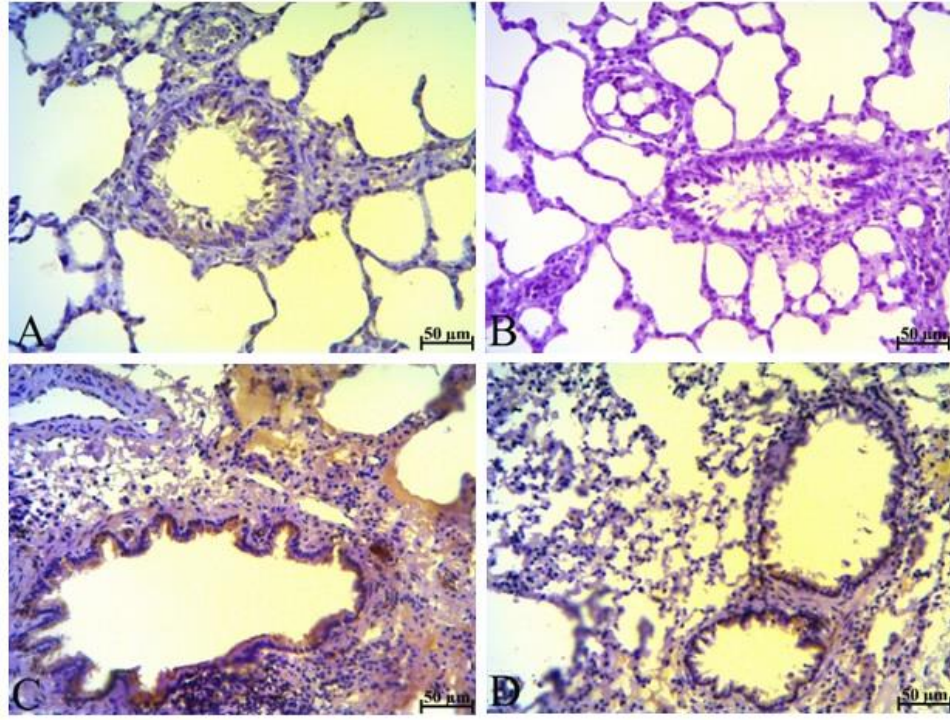
Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: KON ve HES grubuna ($p<0.01$) ve b: ANTU+HES grubuna ($p<0.05$) göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



Şekil 48. NF-kB boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması. a: KON ve HES grubuna ($p<0.01$) ve b: ANTU+HES grubuna ($p<0.05$) göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.

TNF- α

İmmünohistokimyasal boyama ile TNF- α ifadesinin H skoruna göre, ANTU grubunda KON ve HES göre ($p<0.01$) istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmışken ANTU+HES grubuna göre ($p>0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemiştir (Şekil 49-50, Tablo 17).

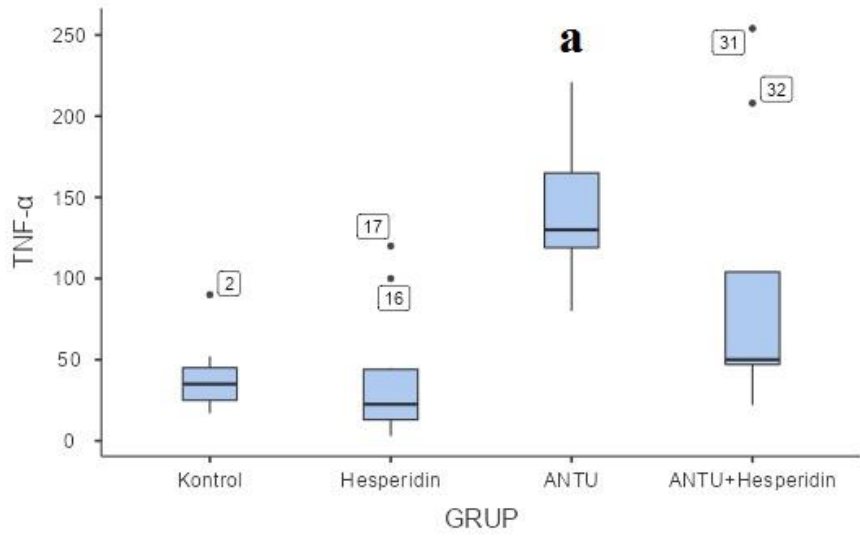


Şekil 49. Tüm gruplara ait akciğer dokularının TNF- α proteini için yapılan immünohistokimyasal boyama görüntüleri X20. A: KON, B: HES, C: ANTU, D: ANTU+HES. Ölçü çubuğu: 50 μ m.

Tablo 17. TNF- α boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	Hesperidin	ANTU	ANTU+Hesperidin	p
TNF-α	40.1	39.1	138	89.9	<0.05
	(17-90)	(3-120)	(80-221) ^a	(22-254)	

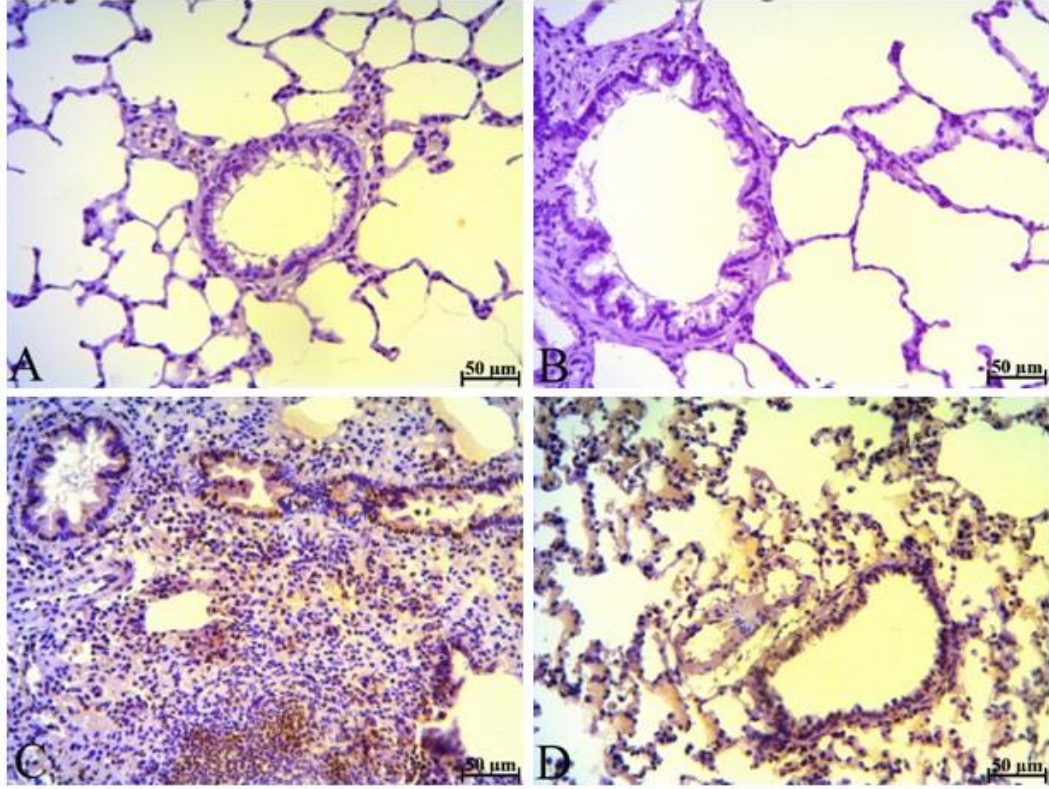
Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: KON ve HES grubuna ($p < 0.01$) göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



Şekil 50. TNF- α boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması. a: KON ve HES grubuna ($p<0.01$) göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.

iNOS

İmmünohistokimyasal boyama ile iNOS ifadesinin H skoruna göre, ANTU grubunda KON, HES ($p<0.01$) ve ANTU+HES ($p<0.05$) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Şekil 51-52, Tablo 18).

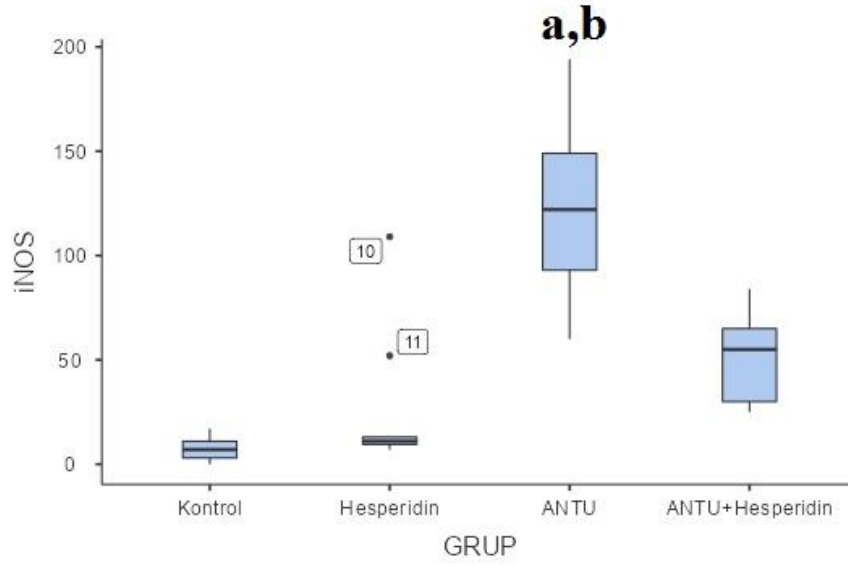


Şekil 51. Tüm gruplara ait akciğer dokularının iNOS proteini için yapılan immünohistokimyasal boyama görüntüleri X20. A: KON, B: HES, C: ANTU, D: ANTU+HES. Ölçü çubuğu: 50 µm.

Tablo 18. iNOS boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	Hesperidin	ANTU	ANTU+Hesperidin	p
iNOS	7.44	24.5	120	51.9	<0.05
	(0-17)	(7-109)	(60-194) ^{a,b}	(25-84)	

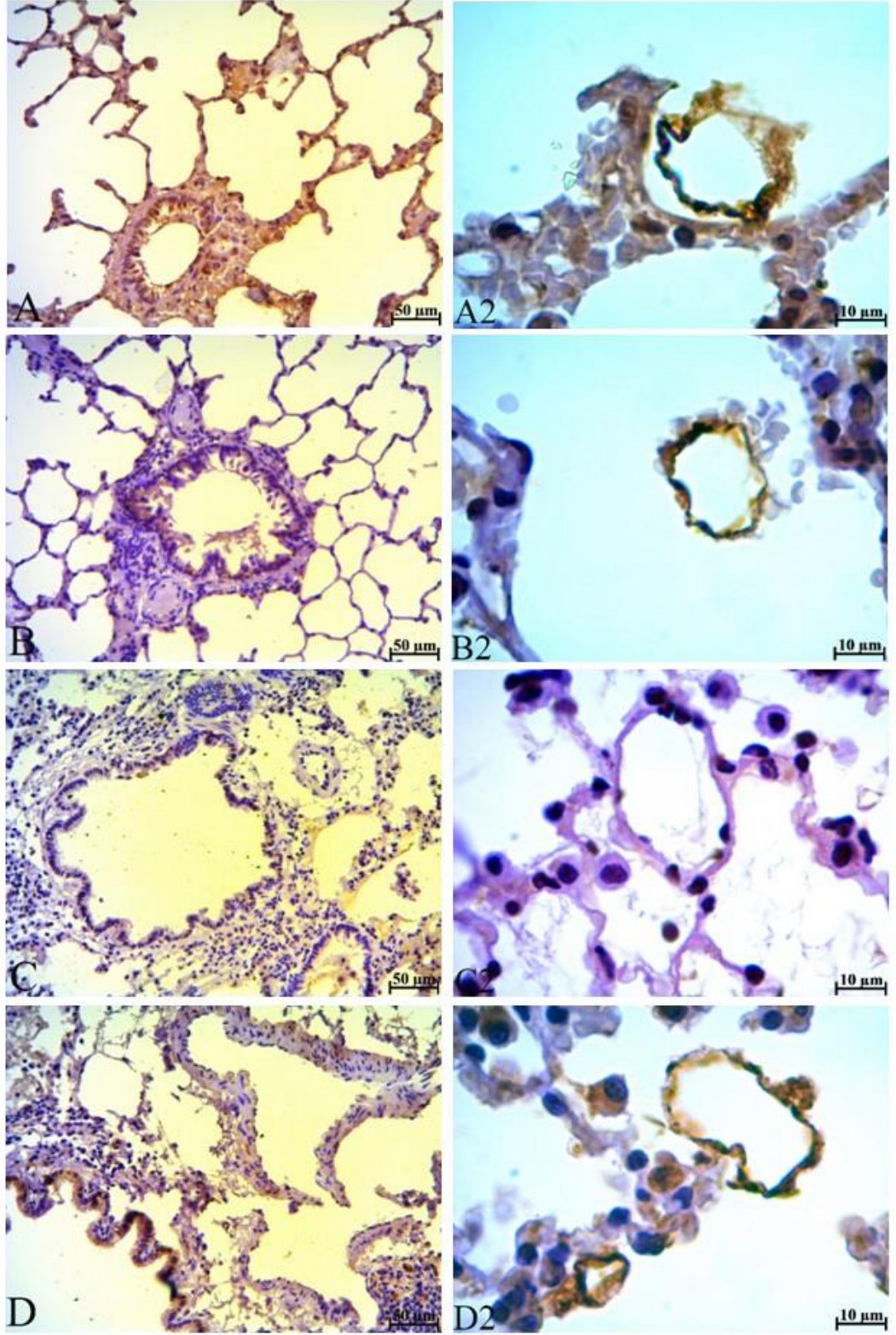
Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: KON ve HES grubuna ($p<0.01$) ve b: ANTU+HES grubuna ($p<0.05$) göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



Şekil 52. iNOS boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması. a: KON ve HES grubuna ($p<0.01$) ve b: ANTU+HES grubuna ($p<0.05$) göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.

Okludin

İmmünohistokimyasal boyama ile Okludin ifadesinin H skoruna göre, ANTU grubunda KON grubuna göre ($p<0.01$) ve HES ve ANTU+HES gruplarına göre ($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. (Şekil 53-54, Tablo 19).

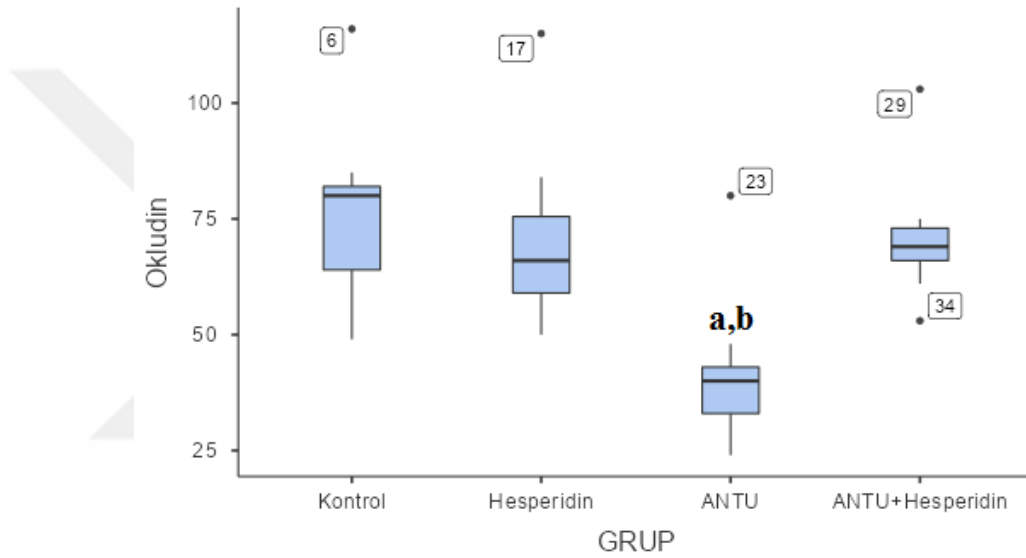


Şekil 53. Tüm gruplara ait akciğer dokularının okludin proteini için yapılan immünohistokimyasal boyama görüntüleri. A-A2: KON, B-B2: HES, C-C2: ANTU, D-D2: ANTU+HES. Ölçü çubuğu: A, B, C, D: 50 µm. A2, B2, C2, D2: 10 µm.

Tablo 19. Okludin boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	Hesperidin	ANTU	ANTU+Hesperidin	p
Okludin	76.8	70.7	41.4	71.1	<0.05
	(49-116)	(50-115)	(24-80) ^{a,b}	(53-103)	

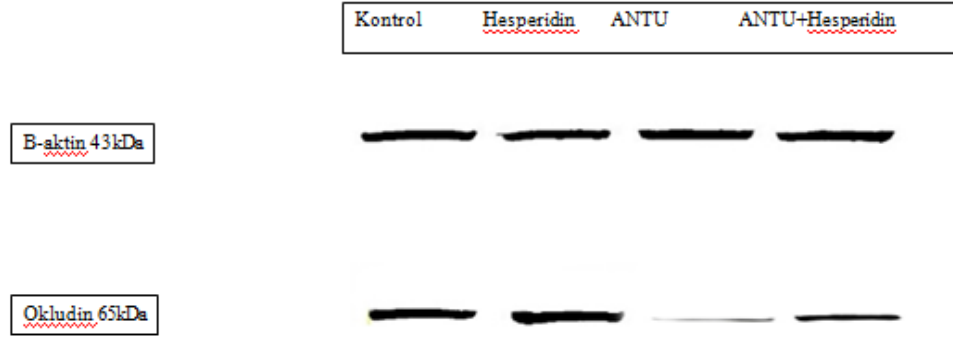
Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: KON grubuna ($p<0.01$) ve b:HES ve ANTU+HES ($p<0.05$) göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



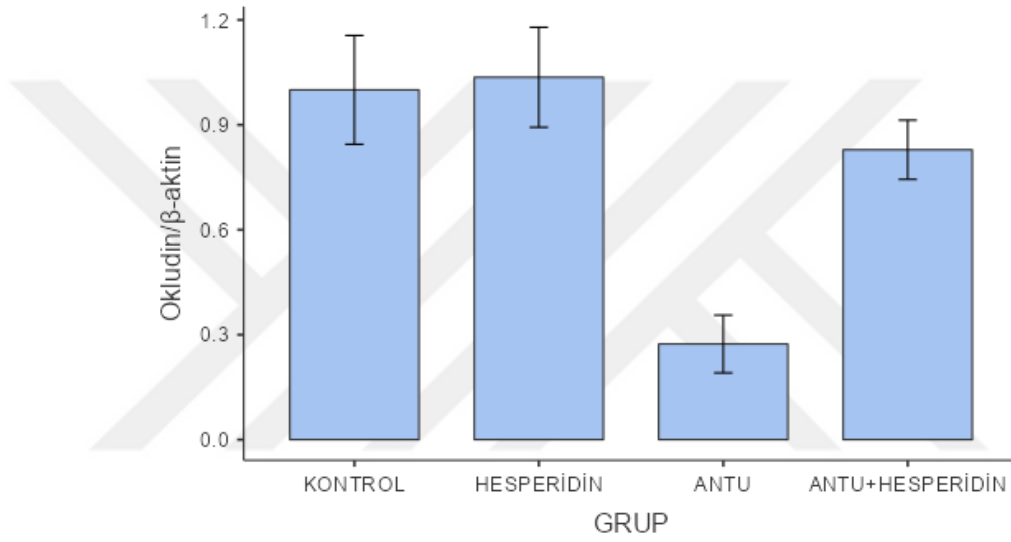
Şekil 54. Okludin boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması. a: KON grubuna ($p<0.01$) ve b:HES ve ANTU+HES ($p<0.05$) göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.

4.5. Western Blot Analiz Bulguları

Okludin ifadesinin belirlenebilmesi için yapılan western blot analiz sonucunda ANTU grubunda okludin bant kalınlığının KON ve HES gruplarına göre oldukça zayıfladığı, ANTU+HES grubu deneklerin akciğer dokularında ise okludin bant kalınlığının KON ve HES grupları ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Şekil 55-56).



Şekil 55. Okludin western blot analiz bant görüntüleri



Şekil 56. Okludin western blot analiz bulguların gruplar arası karşılaştırması

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda sıçanlara ANTU enjeksiyonu sonucu oluşan akut akciğer hasarı modeli üzerine hesperidinin etkisi inceledik. Bu kapsamda akciğer hasarını değerlendirmek amacıyla akciğer ağırlığı, plevral efüzyon miktarı, interalveoler septum kalınlığı, ödem, interstisyel inflamatuvar hücre ve perivasküler aralık parametreleri, oksidan-anti-oksidan dengedeki değişiklikleri değerlendirmek için MDA, SOD ve GPx enzim düzeylerinin ölçümü ve inflamasyon düzeyini belirlemek için pro-inflamatuvar sitokinler olan TNF- α , IL-1 β , iNOS, bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B ve epitel hücreleri arasında bağlantı yapısını göstermek için okludin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikleri gösterebilmek için immunohistokimyasal boyama gerçekleştirdik. Ayrıca western blot yöntemi ile okludin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikleri inceledik.

ARDS, pulmoner ödem, hiyalin membran oluşumu ve alveolar hemoraji dahil olmak üzere yaygın alveolar hasarla karakterize ciddi bir akciğer rahatsızlığıdır. Genellikle intrapulmoner veya ekstrapulmoner faktörlerden kaynaklanan bu hasar, kılcal damar geçirgenliğinin artmasına ve alveolar boşluğa aşırı nötrofil göçüne yol açar (171). Epitel bariyerinin bozulması, hücreler ve makromoleküller içeren sıvının doku içerisine akmasına izin vererek ARDS gelişimine katkıda bulunur. Akciğerlere nötrofil göçü önemli bir faktör olsa da bu durumdan tek başına sorumlu değildir. Nötrofil aktivasyonu ve pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımı, ARDS'nin ilerlemesini yönlendirmedi son derece önemlidir (172).

Sıçanlarda ANTU'nun ip. uygulanmasının ardından pulmoner ödem ve plevral efüzyon hızla gelişir ve 4 saat içinde zirveye ulaşır. Bu, interstisyel akciğer boşluğunun sıvı ile dolması ve bunun visseral plevra yoluyla plevral boşluğa boşalmasına neden olmasıyla oluşur. Ödemin şiddeti değişebilir, bazı vakalarda 24-48 saat içinde tamamen çözülürken, diğerlerinde durum kötüleşebilir ve ölümcül sonuçlara yol açabilir (173). Pulmoner ödem ve plevral efüzyon sıklıkla birbiriyle bağlantılı patolojilerdir ve biri sıklıkla diğerine yol açar (174). Pulmoner ödem, akciğer dokusunda anormal sıvı birikimi ile karakterize, gaz değişimini engelleyen ve potansiyel olarak solunum yetmezliğine yol açan bir durumdur. Altta yatan nedenler, kalp yetmezliğinden ve akciğerlerden yetersiz kan alınmasından kaynaklanan

kardiyojenik nedenler ve akciğer parankimasının hasar görmesinden kaynaklanan kardiyojenik olmayan nedenler şeklinde sınıflandırılır. Kardiyojenik pulmoner ödem, sıvı aşırı yüklenmesi nedeniyle pulmoner kılcal damarlardaki hidrostatik basıncın artmasından kaynaklanır (175). Buna karşılık, kardiyojenik olmayan pulmoner ödem, artan vasküler geçirgenliğin protein açısından zengin sıvının alveoler ve interstisyel boşluklara sızmasına izin vermesiyle oluşur ve genellikle akciğer yaralanmasından kaynaklanır (176). Bu aşırı sıvı daha sonra plevral boşlukta birikerek plevral efüzyon oluşturabilir. Şiddetli hipoksemi ile birlikte kardiyojenik olmayan pulmoner ödemin şiddetli bir formu, zatürre, inhalasyon yaralanmaları, sepsis, pankreatit, travma veya kan transfüzyonu gibi çeşitli faktörler tarafından tetiklenebilen ARDS olarak bilinir.

Çalışmamızda, 10 mg/kg ANTU'nun ip. olarak uygulandığı tüm sıçanlarda dört saat sonunda ciddi akut akciğer hasarı görüldü. Bu hasara eşlik eden pulmoner ödem ve plevral efüzyonun yanı sıra, akciğer/vücut ağırlığı (AA/VA) ve plevral efüzyon/vücut ağırlığı (PE/VA) oranlarında artış tespit edildi. Sıçanlarda ANTU ile indüklenen pulmoner ödem üzerinde melatonin (MLT) yoksunluğunu ve ekzojen MLT uygulamasının etkilerini incelendiği bir çalışmada PE oluşumu, AA/ VA ve PE/VA oranlarında artış tespit edilmiştir (177). Morfin ve deksmedetomidinin sıçanlarda ANTU kaynaklı pulmoner ödem üzerindeki potansiyel etkileri incelendiği iki bağımsız çalışmada ANTU'ya maruz kalan sıçanların kontrol ve tedavi gruplarına kıyasla artmış PE, AA/VA ve PE/VA sergilediği bulunmuştur (76, 173). Yine sıçanlarda lipopolisakkarid kaynaklı akut akciğer hasarı üzerine glabridin (178) ve *Portulaca oleracea* ekstresinin (179) etkilerinin incelendiği çalışmalarda AA/VA oranlarında artış tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda ANTU grubunda ortalama PE, AA/VA ve PE/VA değerleri kontrol ve hesperidin gruplarından önemli ölçüde daha yüksekti. Ancak ANTU grubuna kıyasla hesperidin injeksiyonu (100 mg/kg) yapılan ANTU+HES (10 mg/kg) grubunda ortalama PE, AA/VA ve PE/VA değerlerinde de anlamlı bir düşüş saptanmadı. Farelerde 10 gün boyunca gasrik gavaj yoluyla 500 µg/kg hesperidin uygulamasının yapıldığı LPS kaynaklı akut akciğer hasarı çalışmasında AA/VA oranının, toplam hücrelerin, nötrofillerin, makrofajların ve miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ve akciğer histolojik hasarının azalmasıyla oluşumunu önemli ölçüde azalttığı ortaya konmuştur (180).

ROS, moleküler oksijenin suya dönüştürülmesi sırasında üretilir ve ARDS dahil olmak üzere çeşitli solunum yolu hastalıklarının patogenezinde merkezi bir rol

oynayan oksidatif stresin temelini oluşturur. Bu son derece reaktif moleküller DNA'ya zarar verir ve pro-inflamatuar sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin salınımını teşvik ederek doku hasarına ve pulmoner ödeme neden olur. Ek olarak akciğerlerde endotel ve epitel bariyerlerinin bütünlüğünü bozarak etkilenen bölgelere nötrofillerin akın etmesine yol açar (181). Akciğerler oksidatif hasara karşı koymak için çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan anti-oksidan savunma sistemine sahip olsa da ROS üretimiyle bu savunma mekanizmalarını baskılanır. Endojen antioksidan savunma sistemi, SOD, GPx ve katalaz gibi enzimlerin yanı sıra enzimatik olmayan glutatyon (GSH) içerir. Lipid peroksidasyonunun bir yan ürünü olan MDA, oksidatif stresin hassas bir biyobelirteci olarak görev yapar (182). Yeşil çayın ana bileşenlerinden biri olan epigallocatechin-3-gallate'nin LPS kaynaklı pnömoni üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada LPS grubunda SOD, katalaz, GSH ve GPx enzimlerinin aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azaldığını buna karşın MDA düzeyinde anlamlı bir artış bulunduğu gösterilmiştir (183). Yine yeni bir tıbbi bileşik olan aspirin öjenol esterinin LPS kaynaklı akut akciğer hasarı üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada akciğer ıslak-kuru ağırlığı, bronkoalveolar lavaj sıvısında (BALF) beyaz kan hücreleri sayısı ve toplam protein konsantrasyonu, GSH, GPx, CAT, SOD, toplam anti-oksidan kapasite (T-AOC), laktat dehidrogenaz (LDH), C-reaktif protein (CRP), MPO, MDA, makrofaj hareketlilik inhibitör faktörü (MIF), TNF- α , IL-6 ve IL-1 β protein düzeyleri değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, LPS grubuyla karşılaştırıldığında, aspirin öjenol esteri histopatolojik değişiklikleri iyileştirdiği, MDA, CRP, MPO, MDA ve MIF üretimini azalttı, BALF'de WBC sayısını ve toplam protein içeriğini azalttı, proinflamatuar sitokin seviyeleri, bağışıklık organ indeksi ve akciğer ıslak-kuru ağırlığını (W/D), anti-oksidan enzim aktivitesini ise doza bağlı bir şekilde arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca GSH, GPx, CAT, T-AOC ve SOD düzeyleri doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde artarken, LDH ve MDA düzeylerin de önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur (184).

Çalışmamızda endojen oksidan-antioksidan sistemin rolünü araştırmak amacıyla akciğer dokusunda oksidatif stres belirteci olarak MDA ve anti-oksidan parametreler olarak SOD ve GPx düzeylerini değerlendirilmiştir. ANTU grubunda MDA ve GPx düzeyi ise en fazla iken SOD düzeyi en düşük bulunmuştur.

Önemli bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B, sitoplazmada inaktif bir halde bulunur ve I κ B olarak bilinen inhibitör proteinlere bağlıdır. Uyarı üzerine, I κ B kinaz

(IKK), IκB'leri fosforile eder ve bunların bozunmasına ve ardından NF-κB'nin nükleer translokasyonuna yol açar. Çekirdeğe girdikten sonra NF-κB, bağışıklık tepkileri, inflamasyon, hücre çoğalması ve apoptozda yer alan çeşitli genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Bakteriye lipopolisakkaritler, iyonlaştırıcı radyasyon, ROS, sitokinler (TNF-α, IL-1β) ve viral DNA/RNA dahil olmak üzere çeşitli uyarılar NF-κB aktivasyonunu tetikleyebilir. Aktive edilmiş NF-κB, sitokinler, kemokinler, yapışma molekülleri, akut faz proteinleri ve iNOS ve COX-2 gibi indüklenbilir enzimler dahil olmak üzere çok sayıda genin ekspresyonunu indükler. Sonuç olarak, NF-κB enfeksiyona karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde önemli bir rol oynar ve kronik inflamatuvar hastalıklar, viral enfeksiyonlar, septik şok ve çoklu organ yetmezliğinde rol oynar. Dahası, NF-κB ile ilişkili yolların konstitütif aktivasyonu multipl skleroz ve romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklarda gözlemlenmiştir (185).

ARDS, akciğer epitel ve endotel hücrelerinde hasara neden olmada önemli bir rol oynayan hem lokal hem de sistemik akut inflamasyonla karakterize edilen karmaşık bir inflamatuvar yanıt ve pulmoner mikrovasküler bariyerin bozulması sürecidir (186). Sağlıklı akciğer hava boşluklarında normalde bulunmayan nötrofiller, ARDS'nin erken evrelerinde pulmoner damar sisteminden alveolar boşluğa göç eder. Hava boşluğuna girdikten sonra, bu aktif nötrofiller ROS, proteazlar ve prostaglandinler ve lökotrienler gibi proinflamatuvar lipid medyatörleri dahil olmak üzere çeşitli zararlı maddeler salgılar. Bu inflamatuvar yanıt, nötrofillerin, alveoler makrofajların ve trombositlerin aktivasyonu ile daha da kötüleşerek inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonuna ve TNF-α, IL-1β ve IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimine yol açar (187).

Makrofajlarda, iNOS, TNF-α, IFN-γ, IL-6 ve IL-1β gibi sitokinler ve LPS ve bakteriyel veya viral bileşenler gibi Toll benzeri reseptör (TLR) ligandları dahil olmak üzere çeşitli uyarılara yanıt olarak önemli ölçüde yukarı düzenlenir. iNOS'un transkripsiyonu, NF-κB, interferon düzenleyici faktör-1 (IRF-1) ve fosforile edilmiş STAT-1 dimerleri dahil olmak üzere bir transkripsiyon faktörleri kombinasyonu tarafından düzenlenir (188).

Akciğer hasarı, epitel bariyerinin bozulması ve proteinlere ve sıvılara karşı alveoler-kılcal geçirgenliğin artmasıyla karakterizedir. Bu geçirgenlik, sıkı bağlantılar, boşluk bağlantıları ve yapışan bağlantılar dahil olmak üzere hücreler arası bağlantılar

tarafından düzenlenir. Okludin ve ZO-1 gibi proteinlerden oluşan sıkı bağlantılar, epitel bariyer bütünlüğünün korunması için çok önemlidir. Bir transmembran protein olan okludin, komşu epitel hücrelerini birbirine bağlar ve hücre içi sitoskeletonla bağlantı kuran ZO-1 ile etkileşime girer. Bu karmaşık ağ, sıkı bağlantıları stabilize ederek akciğerin hassas bariyer fonksiyonunu korur. Ancak, genellikle inflamatuvar süreçler tarafından tetiklenen bu bariyerdeki bozulmalar, inflamatuvar hücrelerin ve plazma proteinlerinin alveoler boşluğa sızmasına izin vererek artan geçirgenliğe yol açar. Bu akış, gaz değişimini bozarak pulmoner ödeme katkıda bulunur ve hipoksemiye şiddetlendirir (189).

Oleik asit kaynaklı ARDS üzerine minosiklinin terapötik etkilerinin değerlendirildi bir çalışmada oleik asit uygulaması, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında amfizem, inflamasyon, vasküler konjesyon, hemoraji, MDA miktarı, Bax/Bcl-2 oranı, kaspaz-3, IL-1 β , TNF- α seviyelerini artırmış ve GSH, SOD ve CAT seviyelerini azaltmış ve minosiklin uygulaması oleik asit tarafından indüklenen patolojik ve biyokimyasal değişiklikleri önemli ölçüde geri çevirmiştir (190). Taraxasterolün sepsis kaynaklı ARDS üzerindeki etkisinin ve mekanizmasının incelendiği bir çalışmada LPS grubuyla karşılaştırıldığında, taraxasterol pulmoner ödemi önemli ölçüde azalttığı, akciğer dokusundaki histopatolojik değişiklikleri iyileştirdi, nötrofil, makrofaj ve toplam hücre sayısını azalttı ve MPO içeriğini ve IL-12 ve iNOS ekspresyonunu azaltırken ve SOD ve CAT aktivitesini ve Arg-1 ve Mrc1 protein ekspresyonunu artırdığı bulunmuştur (191). Antitrombosit etkisini olan dianneksin sepsis kaynaklı ARDS üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmada ARDS grubundaki sıçanlarının histolojik incelemesinde, sham grubuna kıyasla ciddi akciğer hasarı, pulmoner ve interstisyel ödem, alveolar kollaps ve hemoraji gözlemlenirken bu olumsuz morfolojik değişiklikler dianneksin grubunda azalmıştır. Ayrıca dianneksinin, BALF'deki makrofaj ve nötrofil sayısını ve TNF- α , NF- κ B, IL-1 β ve IL-8 düzeylerini ARDS grubuna kıyasla önemli ölçüde azalttı bulunmuştur (192). LPS kaynaklı ARDS üzerine ST36 ve BL13'e akupunktur noktası katgüt yerleştirmenin (ACE) potansiyel terapötik etkilerinin araştırıldığı çalışmada LPS uygulaması, BALF'de TNF- α , IL-6, IL-10 ve toplam protein konsantrasyonlarını ve akciğerde MPO ve MDA'yı artırarak PaO₂ /FiO₂ ve basınç-hacim oranlarını önemli ölçüde azaltmış ve akciğer iltihabı ve hasarını indüklemiştir. Ayrıca akciğerlerde SOD aktivitesini, AQP1 ve Okludin protein seviyelerini düşürmüştür. Aksine, ACE,

LPS'nin indüklediği akciğer hasarını, iltihabı ve oksidatif stresi önemli ölçüde hafifletmiş ve sıçanların akciğerindeki AQP1 ve Okludin içeriğini korumuştur (193).

Hesperidin, oksidatif stresi azaltan ve lipid peroksidasyonunu engelleyen güçlü bir doğal anti-oksidadır. Önceki araştırmalar, anti-oksidad, anti-inflamatuar, anti-kanser, anti-hiperglisemik ve anti-obezite ajanı olarak potansiyelini göstermiştir. Kadmiyum kaynaklı pankreatite karşı hesperidinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada hesperidinin, serum amilaz ve lipaz aktivitelerini azatlığı, insülin düzeyleri ve anti-oksidad savunma mekanizmalarını güçlendirirken, iNOS, NF-κB, IL-6 ve TNF-α seviyelerini azaltarak pankreas fonksiyonunu önemli ölçüde iyileştirdiği bulunmuştur (194). Hesperidinin sıçanlarda karbimazol kaynaklı akciğer hasarı üzerine etkilerinin incelendiği başka bir çalışmada tiroit uyarıcı hormon, NF-κB/TNF-α yolu, iNOS, lipid peroksidasyonu, Ki-67 ve inflammatuar medyatörleri baskılayarak değişken akciğer hasarı mekanizmalarını baskıladığı ve antioksidan parametreleri ve Nrf2/HO-1 yolunu iyileştirdiği bulunmuştur (195). Hesperidinin bağırsak bariyer fonksiyonu üzerindeki etkisini incelemek için insan bağırsağı Caco-2 hücre monokatmanları üzerine yapılan çalışmada sıkı bağlantı ile ilişkili genler tarafından kodlanan okludin, MarvelD3, JAM-1, klaudin-1 ve klaudin-4'ün mRNA ve protein düzeylerini yükselttiği ve bağırsak bariyer fonksiyonunun iyileştiği gösterilmiştir (196).

Bizim çalışmamızda ANTU uygulaması öncesi 7 gün boyunca hesperidin takviyesi yapılması hesperidin tedavisi yapılmayan gruba göre (ANTU) akciğer IL-1 β, TNF- α, NF- κ B, İNOS ve okludin seviyelerinde düşüşe sebep olmuştur.

Çalışmamızda histopatolojik olarak ANTU grubunda ödem, septal kalınlaşma, yaygın inflammatuar hücre infiltrasyonu ve vakuolizasyon tespit edilmiştir. Hesperidin tedavisi yapılan grupta akciğer hasarı ile ilişkili histopatolojik değişikliklerin belirgin olarak azaldığı tespit edilmiştir. Hesperidin tedavisi akciğer ödeminin ve efüzyon sıvısının gerilemesini ve akciğer morfolojisinin iyileşmesini desteklemiştir.

6. SONUÇLAR

ANTU'nun neden olduğu akciğer hasarına karşı hesperidin koruyucu etkisini incelendiğimiz çalışmamızda: akciğer hasarının incelenmesinde ANTU enjeksiyonunun sıçanlarda ARDS modeli oluşturduğunu gözlemledik.

1. AA/VA ve PE/VA oranları ANTU gruplarında artış göstermiştir. PE/VA oranında hesperidin tedavisi ile istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma olmuştur.
2. Biyokimyasal incelemelerde, akciğer dokusunda MDA, SOD ve GPx düzeyini incelenmiştir. MDA ANTU grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmişken, SOD seviyesi ANTU+HES grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. GPx seviyesinde ise HES grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir.
3. Histopatolojik incelemede, ANTU grubunda belirgin akciğer doku hasarı ortaya çıkmıştır. Akciğer hasarının histolojik skorlamasında ödem, septal kalınlaşma, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve vakuolizasyon parametreleri incelenmiş ve ANTU grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde histopatolojik değişiklikler saptanmıştır.
4. Hesperidin, ANTU'nun neden olduğu tüm histopatolojik değişiklikleri istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltmıştır.
5. İmmünohistokimyasal incelemede, IL1 β , TNF- α , NF- κ B, İNOS ve okludin ifadesi indirekt immuno histokimyasal yöntemle gösterilmiştir. ANTU grubunda IL1 β , TNF- α , NF- κ B ve İNOS ifadesi daha yüksek seviyede iken okludin ifadesi düşük seviyede saptanmıştır. Hesperidin tedavisi IL1 β , TNF- α , NF- κ B ve İNOS sitokinlerin ifadelerinde düşüşe sebep olmuşken IL-1 β ifadesi istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir. Ayrıca hesperidin tedavisi okludin ifadesinde artışa sebep olarak istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiştir.
6. Western blot analizi sonuçlarına göre, ANTU grubunda okludin protein ifadesi diğer gruplara kıyasla belirgin şekilde daha düşük seviyelerde tespit edilmiştir.

7. Bu bulgular, hesperidinin solunum sistemi hastalıklarında, özellikle oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı durumlarda, koruyucu bir ajan olarak kullanılabileceği hipotezini desteklemektedir.



KAYNAKLAR

1. Zambon M, Vincent JL. Mortality rates for patients with acute lung injury/ARDS have decreased over time. *Chest* 133(5):1120-1127, 2008.
2. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2(7511):319-323, 1967.
3. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 149(3 Pt 1):818-824, 1994.
4. Mann A, Early GL. Acute respiratory distress syndrome. *Mo Med* 109(5):371-375, 2012.
5. Fulkerson WJ, MacIntyre N, Stamler J, Crapo JD. Pathogenesis and treatment of the adult respiratory distress syndrome. *Arch Intern Med* 156(1):29-38, 1996.
6. Ferraz CR, Carvalho TT, Manchope MF, Artero NA, Rasquel-Oliveira FS, Fattori V, Casagrande R, Verri, WA Jr. Therapeutic Potential of Flavonoids in Pain and Inflammation: Mechanisms of Action, Pre-Clinical and Clinical Data, and Pharmaceutical Development. *Molecules* 25(3):762, 2020.
7. Barreca D, Gattuso G, Bellocco E, Calderaro A, Trombetta D, Smeriglio A, Laganà G, Daglia M, Meneghini S, Nabavi SM. Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties. *Biofactors* 43(4):495-506, 2017.
8. Tommasini S, Calabrò ML, Stancanelli R, Donato P, Costa C, Catania S, Villari V, Ficarra P, Ficarra R. The inclusion complexes of hesperetin and its 7-rhamnoglucoside with (2-hydroxypropyl)-beta-cyclodextrin. *J Pharm Biomed Anal* 39(3-4):572-580, 2005.
9. Hwang SL, Shih PH, Yen GC. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. *J Agric Food Chem* 60(4):877-885, 2012.
10. Tang KS, Konczak I, Zhao J. Identification and quantification of phenolics in Australian native mint (*Mentha australis* R. Br.). *Food Chem* 192:698-705, 2016.

11. Pyrzynska K. Hesperidin: A Review on Extraction Methods, Stability and Biological Activities. *Nutrients* 14(12):2387, 2022.
12. Garg A, Garg S, Zaneveld LJ, Singla AK. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother Res* 15(8):655-669, 2001.
13. Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytother Res* 29(3):3, 2015.
14. Ahmadi A, Shadboorestan A. Oxidative stress and cancer; the role of hesperidin, a citrus natural bioflavonoid, as a cancer chemoprotective agent. *Nutr Cancer* 68(1):29-39, 2016.
15. Vivet P, Brun-Pascaud M, Mansour H, Pocidallo JJ. Non-hypoxaemic pulmonary oedema induced by alpha-naphthyl thiourea in the rat. *Br J Exp Pathol* 64(4):361-366, 1983.
16. Scott AM, Powell GM, Upshall DG, Curtis CG. Pulmonary toxicity of thioureas in the rat. *Environ Health Perspect* 85:43-50, 1990.
17. Lawrence EW. Snell's Clinical Anatomy by Regions. 10th Edition, pp. 192-278, Wolters Kluwer, 2018.
18. Friedrich WP, and Jens. Sobotta Atlas of Anatomy. 16th Edition, pp. 60-74, Elsevier, Urban&Fischer Verlag, 2018.
19. Michael HR, Wojciech P. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. 6. Baskı, s. 664-686, Palme Yayıncılık, Ankara, 2017.
20. Standring S. Gray's Anatomy The Anatomical Basis of Clinical Practice. pp. 957-963, Churchill Livingstone Elsevier, London, UK, 2008.
21. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. s. 179-204, İstanbul Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2016.
22. Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi (Çevirenler: Yıldırım M, Dalcık H) 2. Baskı, s. 198-209, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2009.

23. Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji (Çeviren: Basaklar C) 11. baskı, s. 201-205, : Palme Yayıncılık, Ankara, 2010.
24. Herriges M, Morrissey EE. Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development* 141(3):502-513, 2014.
25. Coalson JJ. Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol* 8(1):73-81, 2003.
26. Mullassery D, Smith NP. Lung development. *Semin Pediatr Surg* 24(4):152-155, 2015.
27. Ronald WD. BRS Embriyoloji (Çevirenler: İrez T, Erken M) 6.baskı, s. 134-140, İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, 2016.
28. Thébaud B, Goss KN, Laughon M, Whitsett JA, Abman SH, Steinhorn RH, Aschner JL, Davis PG, McGrath-Morrow SA, Soll RF, Jobe AH. Bronchopulmonary dysplasia. *Nat Rev Dis Primers* 5(1):78, 2019.
29. Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology (Çeviri: Aytekin Y, Solakoğlu S) Temel Histoloji s. 349-368, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2009.
30. Ovalle WK, Nahirney PC. Netter Temel Histoloji (Çevirenler: Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P) s. 334-352, Güneş Tıp Kitap Evleri, Ankara, 2009.
31. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi (Çeviri: Demir R) Patolojiye Giriş s. 339-362, Palme Yayıncılık, Ankara, 2006.
32. Gartner LP, Hiatt JL. Color Atlas of Histology 2th edn. s. 343-364, Baltimore : Lippincott Williams&Wilkins, 2005.
33. Geoffrey MC. Hücre Moleküler Yaklaşım 7th baskı, s. 571—597, İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 2016.
34. Máca J, Jor O, Holub M, Sklienka P, Burša F, Burda M, Janout V, Ševčík P. Past and Present ARDS Mortality Rates: A Systematic Review. *Respir Care* 62(1):113-122, 2017.
35. Wang CY, Calfee CS, Paul DW, Janz DR, May AK, Zhuo H, Bernard GR, Matthay MA, Ware LB, Kangelaris KN. One-year mortality and predictors of death among

hospital survivors of acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 40(3):388-396, 2014.

36. Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, Gattinoni L, van Haren F, Larsson A, McAuley DF, Ranieri M, Rubenfeld G, Thompson BT, Wrigge H, Slutsky AS, Pesenti, A, LUNG SAFE Investigators, ESICM Tri. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA* 316(3):350, 2016.

37. Montgomery AB, Stager MA, Carrico CJ, Hudson LD. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 132(3):485-489, 1985.

38. Fein AM, Calalang-Colucci MG. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock. *Crit Care Clin* 16(2):289-317, 2000.

39. Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 377(6):562-572, 2017.

40. Huppert LA, Matthay MA, Ware LB. Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* 40(1):31-39, 2019.

41. Bachofen M, Weibel ER. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis* 116(4):589-615, 1977.

42. Butt Y, Kurdowska A, Allen TC. Acute Lung Injury: A Clinical and Molecular Review. *Arch Pathol Lab Med* 140(4):345-350, 2016.

43. Jr, Tomashefski JF. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 21(3):435-466, 2000.

44. Crimi E, Slutsky AS. Inflammation and the acute respiratory distress syndrome. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 18(3):477-492, 2004.

45. Matthay MA, Zimmerman GA. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. . . *Am J Respir Cell Mol Biol* 33(4):319-327, 2005.

46. Looney MR, Su X, Van Ziffle JA, Lowell CA, Matthay MA. Neutrophils and their Fc gamma receptors are essential in a mouse model of transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 116(6):1615-1623, 2006.
47. Martin TR, Hagimoto N, Nakamura M, Matute-Bello G. Apoptosis and epithelial injury in the lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2(3):214-220, 2005.
48. Steinberg KP, Milberg JA, Martin TR, Maunder RJ, Cockrill BA, Hudson LD. Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 150(1):113-122, 1994.
49. Tasaka S, Amaya F, Hashimoto S, Ishizaka A. Roles of oxidants and redox signaling in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Antioxid Redox Signal* 10(4):739-753, 2008.
50. Aggarwal NR, King LS, D'Alessio FR. Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 306(8):L709-L725, 2014.
51. Modelska K, Pittet JF, Folkesson HG, Courtney Broadus V, Matthay MA. 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(5 Pt 1):1450-1456, 1999.
52. Wiener-Kronish JP, Albertine KH, Matthay MA. Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to *Escherichia coli* endotoxin. *J Clin Invest* 88(3):864-875, 1991.
53. Lampugnani MG, Resnat M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP, Dejana E. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* 118(6):1511-1522, 1992.
54. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123(6 Pt 2):1777-1788, 1993.
55. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 55(5):662-675, 1994.

56. Umbrello M, Formenti P, Bolgiaghi L, Chiumello D. Current Concepts of ARDS: A Narrative Review. *Int J Mol Sci* 18(1):64, 2016.
57. Semler MW, Wheeler AP, Thompson BT, Bernard GR, Wiedemann HP, Rice TW, National Institutes of Health National Heart, Lung, and Blood Institute Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Impact of Initial Central Venous Pressure on Outcomes of Conservative Versus Liberal Fluid Management in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Crit Care Med* 44(4):782-789, 2016.
58. Hraiech S, Yoshida T, Papazian L. Balancing neuromuscular blockade versus preserved muscle activity. *Curr Opin Crit Care* 21(1):26-33, 2015.
59. Mokra D, Mokry J, Tonhajzerova I. Anti-inflammatory treatment of meconium aspiration syndrome: benefits and risks. *Respir Physiol Neurobiol* 187(1):52-57, 2013.
60. Kosutova P, Mikolka P, Balentova S, Kolomaznik M, Adamkov M, Mokry J, Calkovska A, Mokra D. Effects of phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil on the respiratory parameters, inflammation and apoptosis in a saline lavage-induced model of acute lung injury. *J Physiol Pharmacol* 69(5):10.26402, 2018.
61. Mokra D, Drgova A, Pullmann R Sr, Calkovska A. Selective phosphodiesterase 3 inhibitor olprinone attenuates meconium-induced oxidative lung injury. *Pulm Pharmacol Ther* 25(3):216-222, 2012.
62. Boyle AJ, Di Gangi S, Hamid UI, Mottram LJ, McNamee L, White G, Cross LJ, McNamee JJ, O'Kane CM, McAuley DF. Aspirin therapy in patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) is associated with reduced intensive care unit mortality: a prospective analysis. *Crit Care* 19(1):109, 2015.
63. Du F, Jiang P, He S, Song D, Xu F. Antiplatelet Therapy for Critically Ill Patients: A Pairwise and Bayesian Network Meta-Analysis. *Shock* 49(6):616-624, 2018.
64. Spadaro S, Park M, Turrini C, Tunstall T, Thwaites R, Mauri T, Ragazzi R, Ruggeri P, Hansel TT, Caramori G, Volta CA. Biomarkers for Acute Respiratory Distress syndrome and prospects for personalised medicine. *J Inflamm (Lond)* 16:1, 2019.

65. Abraham A, Krasnodembskaya A. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for the treatment of acute respiratory distress syndrome. *Stem Cells Transl Med* 9(1):28-38, 2020.
66. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295(3):L379-L399, 2008.
67. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, Kuebler WM, Acute Lung Injury in Animals Study Group. n official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44(5):725-738, 2011.
68. Atalay F, Yurdakan G, Yilmaz-Sipahi E. Effect of the endothelin receptor antagonist tezosentan on alpha-naphthylthiourea-induced lung injury in rats. *Kaohsiung J Med Sci* 28(2):72-78, 2012.
69. Richter CP. The development and use of alpha-naphthyl thiourea (ANTU) as a rat poison. *J Am Med Assoc* 129:927-931, 1945.
70. Cunningham AL, Hurley JV. Alpha-naphthyl-thiourea-induced pulmonary oedema in the rat: a topographical and electron-microscope study. *J Pathol* 106(1):25-35, 1972.
71. Sobonya RE, Kleinerman J. Recurrent pulmonary edema induced by alpha 1-naphthyl thiourea. *Am Rev Respir Dis* 108(4):926-932, 1973.
72. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 736366, Alpha-Naphthylthiourea, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Alpha-Naphthylthiourea>, Erişim Adresi . <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/736366>, Erişim Tarihi: 01.11.2024.
73. Hardwick SJ, Skamarauskas JT, Smith LL, Upshall DG, Cohen GM. Protection of rats against the effects of alpha-naphthylthiourea (ANTU) by elevation of non-protein sulphhydryl levels. *Biochem Pharmacol* 42(6):1203-1208, 1991.
74. Barton CC, Bucci TJ, Lomax LG, Warbritton AG, Mehendale HM. Stimulated pulmonary cell hyperplasia underlies resistance to alpha-naphthylthiourea. *Toxicology* 143(2):167-181, 2000.

75. Sipahi E, Hodoğlugil U, Ercan ZS, Türker RK. Acute effect of endothelin-1 on lung oedema induced by alpha-naphthylthiourea (ANTU). *Pharmacol Res* 33(6):375-378, 1996.
76. Hanci V, Yurdakan G, Yurtlu S, Turan IÖ, Sipahi EY. Protective effect of dexmedetomidine in a rat model of α -naphthylthiourea-induced acute lung injury. *J Surg Res* 178(1):424-430, 2012.
77. 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(1):45-51, 1997.
78. Lee PW, Arnau T, Neal RA. Metabolism of alpha-naphthylthiourea by rat liver and rat lung microsomes. *Toxicol Appl Pharmacol* 53(1):164-173, 1980.
79. 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):243-259, 1985.
80. 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,.
81. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 49(3):481-493, 1993.
82. Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C R Biol* 327(7):649-662, 2004.
83. Andrés CMC, Pérez de la Lastra JM, Andrés Juan C, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. Superoxide Anion Chemistry-Its Role at the Core of the Innate Immunity. *Int J Mol Sci* 24(3):1841, 2023.
84. Halliwell B, Adhikary A, Dingfelder M, Dizdaroglu M. Hydroxyl radical is a significant player in oxidative DNA damage in vivo. *Chem Soc Rev* 50(15):8355-8360, 2021.

85. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 486(1):10-13, 2000.
86. López-Alarcón C, Fuentes-Lemus E, Figueroa JD, Dorta E, Schöneich C, Davies MJ. Azocompounds as generators of defined radical species: Contributions and challenges for free radical research. *Free Radic Biol Med* 160:78-91, 2020.
87. Tejero J, Hunt AP, Santolini J, Lehnert N, Stuehr DJ. Mechanism and regulation of ferrous heme-nitric oxide (NO) oxidation in NO synthases. *J Biol Chem* 94(19):7904-7916, 2019.
88. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 4(2):89-96, 2008.
89. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29(3-4):222-230, 2000.
90. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311401. *Circ Res* 122(6):877-902, 2018.
91. Gross E, Sevier CS, Heldman N, Vitu E, Bentzur M, Kaiser CA, Thorpe C, Fass D. Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(2):299-304, 2006.
92. Hawkins CL, Davies MJ. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *J Biol Chem*. *J Biol Chem* 294(51):19683-19708, 2019.
93. Rosen GM, Pou S, Ramos CL, Cohen MS, Britigan BE. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J* 9(2):200-209, 1995.
94. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1):44-84, 2007.
95. Neha K, Haider MR, Pathak A, Yar MS. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur J Med Chem* 178:687-704, 2019.

96. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63(7):1035-1042, 2000.
97. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 179-194, 2003.
98. Miller AF. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Curr Opin Chem Biol* 8(2):162-168, 2004.
99. Salvemini D, Muscoli C, Riley DP, Cuzzocrea S. Superoxide dismutase mimetics. *Pulm Pharmacol Ther* 15(5):439-447, 2002.
100. Brigelius-Flohé R, Flohé L. Regulatory Phenomena in the Glutathione Peroxidase Superfamily. *Antioxid Redox Signal* 33(7):498-516, 2020.
101. Shen Y, Huang H, Wang Y, Yang R, Ke X. Antioxidant effects of Se-glutathione peroxidase in alcoholic liver disease. *J Trace Elem Med Biol* 74:127048, 2022.
102. Busch CJ, Binder CJ. Malondialdehyde epitopes as mediators of sterile inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1862(4):398-406, 2017.
103. Boraschi D, Italiani P, Weil S, Martin MU. The family of the interleukin-1 receptors. *Immunol Rev* 281(1):197-232, 2018.
104. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev* 281(1):8-27, 2018.
105. Netea MG, van de Veerdonk FL, van der Meer JW, Dinarello CA, Joosten LA. Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines. *Annu Rev Immunol* 33:49-77, 2015.
106. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 50(3):184-195, 2000.
107. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)* 49(7):1215-1228, 2010.
108. Zelová H, Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm Res* 62(7):641-651, 2013.

109. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation . Cold Spring Harb Perspect Biol 1(4):a000034, 2009,.
110. Sun SC. The noncanonical NF-κB pathway. Immunol Rev 246(1):125-140, 2012.
111. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. Annu Rev Immunol 27:693-733, 2009.
112. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. Annu Rev Immunol 18:621-663, 2000.
113. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol 1(6):a001651, 2009.
114. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. Signal Transduct Target Ther 2:17023, 2017.
115. Sonar SA, Lal G. The iNOS Activity During an Immune Response Controls the CNS Pathology in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Front Immunol 10:710, 2019.
116. Xue Q, Yan Y, Zhang R, Xiong H. Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. Int J Mol Sci 19(12):3805, 2018.
117. Zheng H, Liang W, He W, Huang C, Chen Q, Yi H, Long L, Deng Y, Zeng M. Ghrelin attenuates sepsis-induced acute lung injury by inhibiting the NF-κB, iNOS, and Akt signaling in alveolar macrophages. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 317(3):L381-L391, 2019.
118. Speyer CL, Neff TA, Warner RL, Guo RF, Sarma JV, Riedemann NC, Murphy ME, Murphy HS, Ward PA. Regulatory effects of iNOS on acute lung inflammatory responses in mice. Am J Pathol 163(6):2319-2328, 2003.
119. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. J Cell Biol 17(2):375-412, 1963.
120. Aijaz S, Balda MS, Matter K. Tight junctions: molecular architecture and function. Int Rev Cytol 248:261-298, 2006.

121. Godbole NM, Chowdhury AA, Chataut N, Awasthi S. Tight Junctions, the Epithelial Barrier, and Toll-like Receptor-4 During Lung Injury . *Inflammation* 45(6):2142-2162, 2022.
122. Vaswani CM, Varkouhi AK, Gupta S, Ektesabi AM, Tsoporis JN, Yousef S, Plant PJ, da Silva AL, Cen Y, Tseng YC, Batah SS, Fabro AT, Advani SL, Advani A, Leong-Poi H, Marshall JC, Garcia CC, Rocco P, Albaiceta GM, Sebastian-Bolz S, Dos Santos CC. Preventing occludin tight-junction disruption via inhibition of microRNA-193b-5p attenuates viral load and influenza-induced lung injury. *Mol Ther* 31(9):2681-2701, 2023.
123. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci* 5:e47, 2016.
124. Dias MC, Pinto DCGA, Silva AMS. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules* 26(17):5377, 2021.
125. Xie L, Deng Z, Zhang J, Dong H, Wang W, Xing B, Liu X. Comparison of Flavonoid O-Glycoside, C-Glycoside and Their Aglycones on Antioxidant Capacity and Metabolism during In Vitro Digestion and In Vivo. *Foods* 11(6):882, 2022.
126. Rodríguez De Luna SL, Ramírez-Garza RE, Serna Saldívar SO. Environmentally Friendly Methods for Flavonoid Extraction from Plant Material: Impact of Their Operating Conditions on Yield and Antioxidant Properties. *ScientificWorldJournal* 6792069, 2020.
127. Fraga CG, Croft KD, Kennedy DO, Tomás-Barberán FA. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct* 10(2):514-528, 2019.
128. Jucá MM, Cysne Filho FMS, de Almeida JC, Mesquita DDS, Barriga JRM, Dias KCF, Barbosa TM, Vasconcelos LC, Leal LKAM, Ribeiro JE, Vasconcelos SMM. Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. *Nat Prod Res* 34(5):692-705, 2020.
129. Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr* 133(10):3248S-3254S, 2003.

130. Kawser Hossain M, Abdal Dayem A, Han J, Yin Y, Kim K, Kumar Saha S, Yang GM, Choi HY, Cho SG. Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids. *Int J Mol Sci* 17(4):569, 2016.
131. Moufida S, Marzouk B. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry* 62(8):1283-1289, 2003.
132. Bodalska A, Kowalczyk A, Włodarczyk M, Fecka I. Analysis of Polyphenolic Composition of a Herbal Medicinal Product-Peppermint Tincture. *Molecules* 25(1):69, 2019.
133. Dudhia Z, Louw, J, Muller C, Joubert E, de Beer D, Kinnear C, Pheiffer C. *Cyclopia maculata* and *Cyclopia subternata* (honeybush tea) inhibits adipogenesis in 3T3-L1 pre-adipocytes. *Phytomedicine* 20(5):401-408, 2013.
134. Gattuso G, Barreca D, Gargiulli C, Leuzzi U, Caristi C. Flavonoid composition of Citrus juices. *Molecules* 12(8):1641-1673, 2007.
135. Aruoma OI, Lande, B, Ramful-Baboolall D, Bourdon E, Neergheen-Bhujun V, Wagner KH, Bahorun T. Functional benefits of citrus fruits in the management of diabetes. *Preventive medicine* 54 Suppl, S12–S16, 2012.
136. Chen Q, Wang D, Tan C, Hu Y, Sundararajan B, Zhou Z. Profiling of Flavonoid and Antioxidant Activity of Fruit Tissues from 27 Chinese Local Citrus Cultivars. *Plants* 9(2):196, 2020.
137. Tejada S, Pinya S., Martorell M, Capó X, Tur JA, Pons A, & Sureda A. Potential Anti-inflammatory Effects of Hesperidin from the Genus Citrus. *Curr Med Chem* 25(37):4929-4945, 2018.
138. Pla-Pagà L, Companys J, Calderón-Pérez L, Llauradó E, Solà R, Valls RM, Pedret A. Effects of hesperidin consumption on cardiovascular risk biomarkers: a systematic review of animal studies and human randomized clinical trials. *Nutr Rev* 77(12):845-864, 2019.

139. Mas-Capdevila A, Teichenne J, Domenech-Coca C, Caimari A, Del Bas JM, Escoté X, Crescenti A. Effect of Hesperidin on Cardiovascular Disease Risk Factors: The Role of Intestinal Microbiota on Hesperidin Bioavailability. *Nutrients* 12(5):1488, 2020.
140. Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 76(3):560-568, 2002.
141. Balakrishnan A, Menon VP. Effect of hesperidin on matrix metalloproteinases and antioxidant status during nicotine-induced toxicity. *Toxicology* 238(2-3):90-98, 2007.
142. Fiander H, Schneider H. Dietary ortho phenols that induce glutathione S-transferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer chemopreventives that act by two mechanisms: the alleviation of oxidative stress and the det. *Cancer Lett* 156(2):117-124, 2000.
143. Elavarasan J, Velusamy P, Ganesan T, Ramakrishnan SK, Rajasekaran D, Periandavan K. Hesperidin-mediated expression of Nrf2 and upregulation of antioxidant status in senescent rat heart. *J Pharm Pharmacol* 64(10):1472-1482, 2012.
144. Kheradmand E, Hajizadeh Moghaddam A, Zare M. Neuroprotective effect of hesperetin and nano-hesperetin on recognition memory impairment and the elevated oxygen stress in rat model of Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother* 97:1096-1101, 2018.
145. Raza SS, Khan MM, Ahmad A, Ashafaq M, Khuwaja G, Tabassum R, Javed H, Siddiqui MS, Safhi MM, Islam F. Hesperidin ameliorates functional and histological outcome and reduces neuroinflammation in experimental stroke. *Brain Res* 1420:93-105, 2011.
146. Kumar B, Gupta SK, Srinivasan BP, Nag TC, Srivastava S, Saxena R, Jha KA. Hesperetin rescues retinal oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis in diabetic rats. *Microvasc Res* 87:65-74, 2013.

147. Shi X, Liao S, Mi H, Guo C, Qi D, Li F, Zhang C, Yang Z. Hesperidin prevents retinal and plasma abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecules* 17(11):12868-12881, 2012.
148. Rotelli AE, Guardia T, Juárez AO, de la Rocha NE, Pelzer LE. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol Res* 48(6):601-606, 2003.
149. Siddiqi A, Hasan SK, Nafees S, Rashid S, Saidullah B, Sultana S. Chemopreventive efficacy of hesperidin against chemically induced nephrotoxicity and renal carcinogenesis via amelioration of oxidative stress and modulation of multiple molecular pathways. *Exp Mol Pathol* 99(3):641-653, 2015.
150. Beiler JM, Martin GJ. Inhibition of hyaluronidase action by derivatives of hesperidin. *J Biol Chem* 174(1):31-35, 1948.
151. Uchiyama N, Kim IH, Kawahara N, Goda Y. HPLC separation of hesperidin and the C-2 epimer in commercial hesperidin samples and herbal medicines. *Chirality* 17(7):373-377, 2005.
152. Hanchang W, Khamchan A, Wongmanee N, Seedadee C. Hesperidin ameliorates pancreatic β -cell dysfunction and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rat model. *Life Sci* 235:116858, 2019.
153. Wang Y, Yu H, Zhang J, Gao J, Ge X, Lou G. Hesperidin inhibits HeLa cell proliferation through apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress pathways and cell cycle arrest. *BMC Cancer* 15:682, 2015.
154. Aggarwal V, Tuli HS, Thakral F, Singhal P, Aggarwal D, Srivastava S, Pandey A, Sak K, Varol M, Khan MA, Sethi G. Molecular mechanisms of action of hesperidin in cancer: Recent trends and advancements. *Exp Biol Med (Maywood)* 245(5):486-497, 2020.
155. Ferreira de Oliveira JMP, Santos C, Fernandes E. Therapeutic potential of hesperidin and its aglycone hesperetin: Cell cycle regulation and apoptosis induction in cancer models. *Phytomedicine* 73:152887, 2020.

156. Cao R, Zhao Y, Zhou Z, Zhao X. Enhancement of the water solubility and antioxidant activity of hesperidin by chitooligosaccharide. *J Sci Food Agric* 98(6):2422-2427, 2018.
157. Shagirtha K, Bashir N, MiltonPrabu S. Neuroprotective efficacy of hesperetin against cadmium induced oxidative stress in the brain of rats. *Toxicol Ind Health* 33(5):454-468, 2017.
158. Ali AM, Gabbar MA, Abdel-Twab SM, Fahmy EM, Ebaid H, Alhazz, IM, Ahmed OM. Antidiabetic Potency, Antioxidant Effects, and Mode of Actions of Citrus reticulata Fruit Peel Hydroethanolic Extract, Hesperidin, and Quercetin in Nicotinamide/Streptozotocin-Induced Wistar Diabetic Rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 1730492, 2020.
159. Hajjalyani M, Hosein Farzaei M, Echeverría J, Nabavi SM, Uriarte E, Sobarzo-Sánchez E. Hesperidin as a Neuroprotective Agent: A Review of Animal and Clinical Evidence. *Molecules* 24(3):648, 2019.
160. Panasiak W, Wleklik M, Oraczewska A, Luczak M. Influence of flavonoids on combined experimental infections with EMC virus and Staphylococcus aureus in mice. *Acta Microbiol Pol* 38(2):185-188, 1989.
161. Cvetnić Z, Vladimir-Knezević S. Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharm* 54(3):243-250, 2004.
162. Rotimi SO, Bankole GE, Adelani IB, Rotimi OA. Hesperidin prevents lipopolysaccharide-induced endotoxicity in rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 38(5):364-371, 2016.
163. Chian CF, Chiang CH, Yuan-Jung C, Chuang CH, Liu SL, Yi-Han J, Zhang H, Ryu JH. Apocynin attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury in an isolated and perfused rat lung model. *Shock* 38(2):196-202, 2012.
164. Hassan NH, El-Wafaey DI. Histopathological scoring system role in evaluation of electronic cigarette's impact on respiratory pathway in albino rat: Biochemical, histo-morphometric and ultrastructural study. *Tissue Cell* 79:101945, 2022.

165. Chimenti L, Morales-Quinteros L, Puig F, Camprubi-Rimblas M, Guillamat-Prats R, Gómez MN, Tijero J, Blanch L, Matute-Bello G, Artigas A. Comparison of direct and indirect models of early induced acute lung injury. *Intensive Care Med Exp* 8(Suppl 1):62, 2020.
166. Sapmaz-Metin M, Topcu-Tarlacalisir Y, Uz YH, Inan M, Omurlu IK, Cerkezayabekir A, Kizilay G, Akpolat M. Vitamin E modulates apoptosis and c-jun N-terminal kinase activation in ovarian torsion-detorsion injury. *Exp Mol Pathol* 95(2):213-219, 2013.
167. Hu Q, Yao J, Wu X, Li J, Li G, Tang W, Liu J, Wan M. Emodin attenuates severe acute pancreatitis-associated acute lung injury by suppressing pancreatic exosome-mediated alveolar macrophage activation. *Acta Pharm Sin B* 12(10):3986-4003, 2022.
168. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95(2):351-358, 1979.
169. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34(3):497-500, 1988.
170. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70(1):158-169, 1967.
171. Johnson ER, Matthay MA. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment. . . *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 23(4):243-252, 2010.
172. Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med* 17(3-4):293-307, 2011.
173. 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.
174. Gayen S, Kim JS, Desai P. Pulmonary Point-of-Care Ultrasonography in the Intensive Care Unit. *AACN Adv Crit Care.*, s. 34(2):113-118, 2023.

175. Zanza C, Saglietti F, Tesauro M, Longhitano Y, Savioli G, Balzanelli MG, Romenskaya T, Cofone L, Pindinello I, Racca G, & Racca F. Cardiogenic Pulmonary Edema in Emergency Medicine. *Adv Respir Med* 91(5):445-463, 2023.
176. Unger K, Martin LG. Noncardiogenic pulmonary edema in small animals. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 33(2):156-172, 2023.
177. Al Gburi MRA, Altinoz E, Elbe H, Onal MO, Yilmaz U, Yilmaz N, Karayakali M, Demir M. Pinealectomy and melatonin administration in rats: their effects on pulmonary edema induced by α -naphthylthiourea. *Drug and chemical toxicology* 46(5), 1024–1034, 2023.
178. Zhang LP, Zhao Y, Liu GJ, Yang DG, Dong YH, Zhou LH. Glabridin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting p38MAPK/ERK signaling pathway. *Oncotarget* 8(12):18935-18942, 2017.
179. Baradaran Rahimi V, Rakhshandeh H, Raucci F, Buono B, Shirazinia R, Samzadeh Kermani A, Maione F, Mascolo N, Askari VR. Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Activity of *Portulaca oleracea* Extract on LPS-Induced Rat Lung Injury. *Molecules* 24(1):139, 2019.
180. Liu, X. X., Yu, D. D., Chen, M. J., Sun, T., Li G, Huang WJ, Nie H, Wang C, Zhang YX, Gong Q, Ren BX. Hesperidin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by inhibiting HMGB1 release. *Int Immunopharmacol* 25(2):370-376, 2015.
181. Muhammad W, Zhu J, Zhai Z, Xie J, Zhou J, Feng X, Feng B, Pan Q, Li S, Venkatesan R, Li P, Cao H, Gao C. ROS-responsive polymer nanoparticles with enhanced loading of dexamethasone effectively modulate the lung injury microenvironment. *Acta Biomater* 148:258-270, 2022.
182. Dhlamini Q, Wang W, Feng G, Chen A, Chong L, Li X, Li Q, Wu J, Zhou D, Wang J, Zhang H, Zhang JS. FGF1 alleviates LPS-induced acute lung injury via suppression of inflammation and oxidative stress. *Mol Med* 28(1):73, 2022.
183. Shen M, You Y, Xu C, Chen Z. Epigallocatechin-3-Gallate attenuates lipopolysaccharide-induced pneumonia via modification of inflammation, oxidative stress, apoptosis, and autophagy. *BMC Complement Med Ther* 24(1):147, 2024.

184. Tao Q, Zhang ZD, Qin Z, Liu XW, Li SH, Bai LX, Ge WB, Li JY, Yang YJ. Aspirin eugenol ester alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats while stabilizing serum metabolites levels. *Front Immunol* 13:939106, 2022.
185. Hariharan A, Hakeem AR, Radhakrishnan S, Reddy MS, Rela M. The Role and Therapeutic Potential of NF-kappa-B Pathway in Severe COVID-19 Patients. *Inflammopharmacology* 29(1):91-100, 2021.
186. Bos LDJ, Ware LB. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes. *Lancet* 400(10358):1145-1156, 2022.
187. Wu W, He Y, Lin D, Zhang G, Zhang X, Zhang N, Xie T, Wei H. Dexmedetomidine mitigates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by modulating heat shock protein A12B to inhibit the toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B signaling pathway. *Chem Biol Interact* 398:111112, 2024.
188. Guimarães LMF, Rossini CVT, Lameu C. Implications of SARS-Cov-2 infection on eNOS and iNOS activity: Consequences for the respiratory and vascular systems. *Nitric Oxide* 111-112:64-71, 2021.
189. Sim TY, Harith HH, Tham CL, Md Hashim NF, Shaari K, Sulaiman MR, Israif DA. The Protective Effects of a Synthetic Geranyl Acetophenone in a Cellular Model of TNF- α -Induced Pulmonary Epithelial Barrier Dysfunction. *Molecules* 23(6):1355, 2018.
190. Ghasemzadeh Rahbardar M, Razavi BM, Naraki K, Hosseinzadeh H. Therapeutic effects of minocycline on oleic acid-induced acute respiratory distress syndrome (ARDS) in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 396(11):3233-3242, 2023.
191. Bu C, Wang R, Wang Y, Lu B, He S, Zhao X. Taraxasterol Inhibits Hyperactivation of Macrophages to Alleviate the Sepsis-induced Inflammatory Response of ARDS Rats. *Cell Biochem Biophys* 80(4):763-770, 2022.
192. Ju YN, Tai QH, Xu GX, Zhao XQ, Sun HB, Gao W. Diannexin Can Ameliorate Acute Respiratory Distress Syndrome in Rats by Promoting Heme Oxygenase-1 Expression. *Mediators Inflamm* 1946384, 2021.

193. Li D, Sun T, Chi L, Zhao D, Li W. Acupoint Catgut Embedding Improves the Lipopolysaccharide-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome in Rats. *Biomed Res Int* 2394734, 2020.
194. Aja PM, Izekwe FI, Famurewa AC, Ekpono EU, Nwite FE, Igwenyi IO, Awoke JN, Ani OG, Aloke C, Obasi NA, Udeh KU, Ale BA. Hesperidin protects against cadmium-induced pancreatitis by modulating insulin secretion, redox imbalance and iNOS/NF- κ B signaling in rats. *Life Sci* 259:118268, 2020.
195. Hegazy W, Sakr HI, Abdul Hamid M, Abdelaziz MA, Salah M, Abdel Rehiem ES, Abdel Moneim A. Hesperidin Attenuates Hypothyroidism-Induced Lung Damage in Adult Albino Rats by Modulating Oxidative Stress, Nuclear Factor Kappa-B Pathway, Proliferating Cell Nuclear Antigen and Inflammatory Cytokines. *Biomedicines* 11(6):1570, 2023.
196. Park HY, Yu JH. Hesperidin enhances intestinal barrier function in Caco-2 cell monolayers via AMPK-mediated tight junction-related proteins. *FEBS Open Bio* 13(3):532-544, 2023.

EKLER

Ek-1: Etik Kurul Onayı



T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



TOPLANTI TARİHİ : 03/02/2022
TOPLANTI NO : 2022/02

- 1- Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2022-03-03/02 Protokol no'lu "Sıçanlarda Alfa-naftiltioüre ile Oluşturulan Akut Akciğer Hasarı Modeli Üzerine Hesperidin'in Etkisi" konulu çalışmanın Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

Prof. Dr. Emine YILMAZ CAN
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

2003 yılında Beyşehir Ali Akkanat Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2008 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde lisan eğitimimi tamamladım. 2019 yılında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimini tamamladım. Aynı yıl Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladım ve bu bölümde çalışmalarımı sürdürmekteyim.

