



**HACETTEPE  
ÜNİVERSİTESİ**

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ  
KOORDİNASYON BİRİMİ

## Oleik Asitle Oluşurulan akut Akciğer Hasarında Erdosteinin Koruyucu Rolü

THD-2015-7586

HızlıDestekProjesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü

Doç.Dr. AYŞEN ERDEM  
Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D.

Araştırmacılar

Arş.Gör. SERKAN KARAİSMAİLOĞLU (Fizyoloji A.D.)  
Arş.Gör. NİLGÜN ÇABUŞ (HistolojiA.D.)  
Doç.Dr. MELTEM TUNCER (FizyolojiA.D.)  
Arş.Gör. ESRA GEDİKLİ (FizyolojiA.D.)  
Prof.Dr. SEVDA FATMA MÜFTÜOĞLU (HistolojiA.D.)  
Prof.Dr. ERSİN FADILLIOĞLU (FizyolojiA.D.)

Eylül 2016  
ANKARA



## **TEŞEKKÜRLER**

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir.

Proje no: THD-2015-7586

## İÇİNDEKİLER

|                                 | Sayfa No |
|---------------------------------|----------|
| TEŞEKKÜRLER                     | 2        |
| İÇİNDEKİLER                     | 3        |
| ÖZET                            | 4        |
| ABSTRACT                        | 5        |
| 1. AMAÇ VE KAPSAM               | 6        |
| 2.GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER       | 6        |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM              | 8        |
| 3.1. Deney Grupları             | 8        |
| 3.2. Biyokimyasal Analizler     | 9        |
| 3.3. Histopatolojik İncelemeler | 10       |
| 3.4. İstatistiksel Analizler    | 12       |
| 3.5. Etik Kurul İzni            | 12       |
| 4. BULGULAR                     | 14       |
| 5. TARTIŞMA                     | 25       |
| 6. REFERANSLAR                  | 29       |

## ÖZET

### **Oleik Asitle Oluşturulan Akut Akciğer Hasarında Erdosteine Ön-Uygulamasının Koruyucu Rolü**

**Giriş ve Amaç:** Akut akciğer hasarı, akciğerlerde fonksiyon kaybıyla seyreden, yüksek mortaliteye sahip bir durumdur. Erdosteine antioksidan ve anti-inflamatuvar özelliğe sahip mukolitik bir ajandır. Nötrofil birikimini önleyerek hasar şiddetinin azaltmaktadır. Özellikle kronik akciğer hastalıklarında kullanılmaktadır. Ancak akut etkisi hakkında çok az çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle erdosteine ön-uygulamasının oleik asitle (OA) oluşturulan akut akciğer hasarındaki koruyucu rolünün araştırmayı amaçladık.

**Yöntem:** 24 adet Erkek Wistar Albino sıçanlar 4 gruba ayrıldı: Kontrol grubuna oral serum fizyolojik (SF) uygulamasından bir saat sonra kuyruk veninden 50 mikrolitre SF, OA grubuna oral SF uygulamasından bir saat sonra kuyruk veninden 50 mikrolitre OA, Erdosteine grubuna oral Erdosteine (150 mg/kg tek doz) uygulamasından bir saat sonra kuyruk veninden 50 mikrolitre SF, Erdosteine + OA grubuna ise oral Erdosteine (150 mg/kg tek doz) uygulamasını takiben bir saat sonra kuyruk veninden 50 mikrolitre OA enjeksiyonu yapıldı. OA enjeksiyonlarından 4 saat sonra anestezide edilen sıçanların akciğer dokularında katalaz, glutatyonperoksidaz, superoksitdismutaz aktivitesi, malondialdehit ve protein karbonil düzeyleri ölçüldü. Ayrıca akciğerler histopatolojik olarak ışık ve elektronmikroskopisi ile incelendi. İmmüno-histokimyasal olarak akciğer hasarı değerlendirildi. (Bu çalışma “HÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince” desteklenmiştir. Proje no: THD-2015-7586).

**Bulgular:** OA uygulanan sıçanların akciğer ağırlıkları ( $P<0,05$ ), doku malondialdehit ve protein karbonil düzeyleri ( $P<0,05$ ) artarken katalaz ( $P<0,01$ ), superoksitdismutaz ( $P<0,001$ ), glutatyon peroksidaz ( $P<0,001$ ) aktivitelerinin baskılanmış olduğu, erdosteine ön-uygulaması ile bu bulguların düzeldiği gözlemlendi. Histopatolojik incelemede, OA’nın intra-alveolar ve interstisyel alanda sıvı birikimine, makrofaj ve nötrofil sayısında artışa yol açtığı, erdosteine ön-uygulaması ile alveolar alandaki sıvı birikiminin, interstisyel ödem, kapiller konjesyonun, makrofaj ve nötrofil sayısının belirgin azaldığı saptandı.

**Sonuç:** Erdosteine ön-uygulaması akut akciğer hastalıklarda da akciğerleri korumakta, oleik asidin oluşturduğu inflamasyonu ve oksidan stresi azaltmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Erdosteine, Oleik Asit, Akut Akciğer Hasarı,

## ABSTRACT

### **The Protective Role of Erdosteine Pre-treatment on Oleic Acid-Induced Acute Lung Injury**

**Introduction and Objective:** Acute lung injury is a condition characterized by acute respiratory failure with high mortality rate. Erdosteine is a mucolytic agent with antioxidant and anti-inflammatory effects. It reduces the severity of injury by preventing neutrophil accumulation. It is particularly used in chronic lung diseases. However there are few studies on its acute effects. Therefore, we aimed to investigate the protective effect of erdosteine pre-treatment on oleic acid (OA)-induced acute lung injury.

**Methods:** 24 male Wistar Albino rats were assigned into four groups: Control group received oral saline and one hour later 50 microliters of i.v.saline. OA group was administered oral saline and one hour later 50 microliters of i.v. OA. Erdosteine group received a single dose of erdosteine (150 mg/kg) orally and one hour later 50 microliters of i.v.saline. OA + Erdosteine group received oral erdosteine (150 mg/kg) and one hour later 50 microliters of i.v. OA. Tail vein was used for all i.v.injections. Four hours later following OA injection, rats were anesthetized. Lung tissues were excised to evaluate the tissue malondialdehyde and protein carbonyl levels, catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase activity, and histopathological changes (light, electron microscopy and immunocytochemistry). (This work was supported by Hacettepe University Scientific Research Coordination Unit. Project Number:THD-2015-7586).

**Results:** OA administration increased lung weight ( $P<0,05$ ), tissue malondialdehyde and protein carbonyl levels ( $P<0,05$ ) and decreased catalase( $P<0,01$ ),glutathione peroxidase ( $P<0,001$ ), superoxide dismutase ( $P<0,001$ ) activities. Erdosteine pre-treatment ameliorated all these changes and OA-induced alveolar fluid, capillary congestion, interstitial edema, macrophage and neutrophil accumulation.

**Conclusion:** Erdosteine pre-treatment reduces OA-induced inflammation and oxidant stress and protects the lung tissue against acute lung injury.

**KeyWords:** Erdosteine, Oleic Acid, Acute Lung Injury

## 1.AMAÇ VE KAPSAM

Bu çalışmada erdosteinin oleik asitle oluşturulan akut akciğer hasarında koruyucu rolünü araştırmayı amaçladık. Bunu gösterebilmek için oleik asidin akciğerlerde oluşturduğu patolojiyi ışık ve elektron mikroskopisi ile gösterip erdosteinin bu hasarı düzeltip düzeltemediğini göstermeyi amaçladık. Ayrıca oleik asidin oluşturduğu yağ ve protein oksidasyonu üzerine erdosteinin koruyucu rolünü de biyokimyasal analizlerle değerlendirmek istedik. Tüm bunların yanında oleik asit akciğerlerde nötrofil infiltrasyonuna da neden olmaktadır. Erdosteinin anti-inflamatuar özelliği sayesinde bu nötrofil infiltrasyonu ve buna bağlı oluşan hasarı da azaltma derecesini immunohistokimyasal olarak göstermeyi hedefledik.

## 2. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) pulmoner veya ekstrapulmoner nedenlerle gelişen, bölgesel veya sistemik inflamatuvar yanıtla bağlı olarak akciğerlerde ciddi fonksiyon kaybıyla seyreden, yüksek mortaliteye sahip bir durumdur(Bernard et al., 1994; Ranieri et al., 2012; Repine, 1992). ARDS oksijen tedavisine dirençli hipoksemi ile karakterizedir. ARDS’ de akciğer kompliyansı azalır, mikrovasküler geçirgenlik artar. Buna bağlı olarak da yaygın alveolar hasar ve alveolar ödem gözlenir. Birçok yeni tedavi yöntemleri geliştirilse de hala ARDS’li hastalarda ölüm oranı yüksektir(Ranieri et al., 2012). ARDS’de birçok farklı ajana karşı verilen abartılmış inflamasyon yanıtı vardır.

İntravenöz oleik asit (OA) uygulaması ARDS modeli oluşturmada sıklıkla tercih edilen bir yoldur. Oleik asit modeli,ortopedik cerrahiler sonrasında da yağ embolisi sonucu gelişebilen akut solunum sıkıntısı tablosu ile de benzerlik göstermektedir(Schuster, 1994).Bu durumlar hasta yatış süresini ve ilaç kullanım süresini uzatmakta ve hatta hastanın ölümüyle sonuçlanmaktadır.İntravenöz yolla verilen OA’nın akciğerlerde oluşturduğu patolojik değişiklikler insandaki akut akciğer hasarı (AAH) ve ARSD’de gözlenen değişikliklere benzerdir(Matute-Bello, Frevert, & Martin, 2008). Bu nedenle OA ile oluşturulan akut akciğer hasarı modeli, deneysel çalışmalarda sık olarak kullanılmakta ve çok sayıda farmakolojik ajan, ARDS tedavisine katkı sağlamak amacıyla denenmektedir.

Oleik asit hasarındaki değişikliklerin patolojisi, interstisyel ve intra-alveolar ödem, intra-alveolar hemoraji, vasküler konjesyon ve intravasküler koagülasyondan ibarettir(Matute-

Bello et al., 2008; Ulrich et al., 2005). Akut akciğer hasarındaki histopatolojik değişiklikler, nötrofillerin artması ve aktifleşmesi ile başlar. Buna ilave olarak akciğer hücrelerinde serbest oksijen radikallerinin oluşmasıyla başlayan oksidan hasar da tüm bu patolojik sürece ciddi katkı sağlamaktadır. OA uygulanmasından sonra oluşan akut akciğer hasarında serum ve doku total antioksidan kapasitesinde azalma gözlenir(Lang, McArdle, O'Reilly, & Matalon, 2002).OA'le gelişen akut akciğer hasarı multifokal ve heterojendir. Bazı bölgelerde minimal değişiklikler olurken bazı bölgelerde yoğun interstisyel ödem ve hemorajik infiltrasyon gözlenir. Burada kritik olayın OA'nın endotel hücreleri üzerine direkt etkisi olduğu ileri sürülmektedir. Endotel ve alveol epitel hücrelerindeki nekroz da hasarda önemli etkenlerdendir. Tüm bu hasarlar OA'in dozunu ile doğru orantılıdır ve yaklaşık bir-iki saat içinde başlar ve sekiz saatlik bir süre içerisinde de düzelme trendine geçer(Derks & Jacobovitzderks, 1977; Matute-Bello et al., 2008; Ulrich et al., 2005).

Erdostein (N-karboksimetiltioasetil-homosisteintiolakton) kronik pulmoner hastalıklarda yaklaşık 20 yıldır kullanılan mukolitik bir ajandır(Dal Negro, 2008; Moretti & Marchioni, 2007).Antioksidan ve anti-inflamtuar özelliği vardır. Erdosteinin bloklanmış iki sülfidril grubu içeriği hepatik metabolizma sonrası serbestleşmekte ve bu sülfidril grupları serbest radikal süpürücüsü olarak görev yapmakta, lipid peroksidasyonunu azaltmaktadır (Dechant & Noble, 1996; Scuri, Giannetti, & Paesano, 1988). İlave olarak hücre sel antioksidan koruyucu aktiviteyi artırarak hücreleri korumaktadır. Ayrıca nötrofil birikimini de önleyerek hasar şiddetinin azaltılmasında önemli rol oynamaktadır. Daha önceki çalışmalarla farelerde hipoklorus asit veya lipopolisakkarit uygulanarak oluşturulan akut akciğer hasarında serbest radikal oluşumunun erdosteinle azaltıldığı gösterilmiştir(Hayashi, Hosoe, Kaise, & Ohmori, 2000). Ancak erdosteinin koruyucu etkisini göstermek amacıyla profilaktik olarak, ön uygulama şeklinde veren az sayıda çalışma mevcuttur. Ayrıca bilgilerimize göre klinikte akut hastalıklarda veya yağ embolisi sonucu gelişebilen solunum sıkıntısı sendromunun öncesinde veya sonrasında kullanılmamaktadır. Bu nedenlerle çalışmamızda sıçanlarda oleik asitle oluşturulan akut akciğer hasarında tek doz erdostein ön-uygulamasının koruyuculuğunu araştırmayı planladık.

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edilen 28 adet, 300-400 gr ağırlığında Wistar Albino soyu erkek sıçanlar kullanıldı. Bütün gruplardaki sıçanlar standart yem ve sınırsız miktarda su ile beslendi. Tüm sıçanlar deney öncesi Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Biriminde, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamda, sıcaklığı ve bağıl nemi sabit, havalandırma kontrollü odada tutuldu. Deneysel çalışmalar Helsinki Deklarasyonu'na ve Amerikan Ulusal Sağlık Örgütü (USA NIH) tarafından bildirilen Laboratuvar Hayvanlarının Kullanımına ve Bakımına İlişkin Rehber'e uygun olarak gerçekleştirildi.

#### 3.1. Deney Grupları

Hayvanlar rasgele dört gruba ayrılarak tartıldı. Kontrol grubuna (C)(n=6) ora-gastrik gavajla serum fizyolojik(SF) uygulamasını takiben bir saat sonra kuyruk veninden 50 mikrolitre SF (%0,9'luk NaCl solüsyonu) enjeksiyonu yapıldı. Oleik asit grubuna (O)(n=7) ora-gastrik gavajla serum fizyolojik uygulamasından bir saat sonra kuyruk veninden 50 mikrolitre OA enjekte edildi. Erdosteine grubuna (E)(n=7) ora-gastrik gavajla erdosteine (150mg/kg tek doz) uygulamasını takiben bir saat sonra kuyruk veninden 50 mikrolitre SF enjeksiyonu yapıldı. Erdosteine + OA (E+O) grubuna (n=8) iseyine ora-gastrik gavajla erdosteine (150mg/kg tek doz) uygulamasına ek olarak bir saat sonra kuyruk veninden 50 mikrolitre OA enjekte edildi. Kuyruk veni enjeksiyonları sıçanların lateral kuyruk veninden 24 G iv kateter yardımı ile yapıldı. Tüm bu işlemlere sirkadiyen değişiklikleri minimize etmek amacıyla sabah 9.30 ila 10 arasında başlandı. Sıçanlar, OA enjeksiyonunu takiben 4. saatte 90mg/kg ketamin ve 10 mg/kg xylazine ile anesteziye edildi. Karın bölgeleri orta hattın açılarak toraksa ulaşıldı. Sol ventrikülden enjektör yardımıyla kan alınarak hayvanlar telef edildi. Hemen arkasından akciğerleri çevre dokulardan izole edilerek çıkartıldı ve sonra tartıldı. Akciğer dokusunun bir kısmı biyokimyasal incelemeler için sıvı azotta hızlıca dondurularak deney gününe kadar - 80 derece C' da saklandı. Bir kısmı ise histopatolojik olarak akciğer hasarını değerlendirmek üzere formalin ve glutaraldehitte fikse edildi. Anestezi sonrası tüm bu işlemler iki dakika içerisinde tamamlandı. Histopatolojik incelemeler H.Ü.T.F. Histoloji AD. Laboratuvarlarında yapıldı. Değerlendirmesi yine aynı laboratuvarlarda gruplar hakkında bilgisi olmayan iki histolog tarafından değerlendirildi.

### **3.2. Biyokimyasal Analizler**

Tüm biyokimyasal analizler H.Ü.T.F. Fizyoloji AD. Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

#### **Akciğer dokusu homojenizasyonu ve protein ölçümü**

Akciğer dokusu tartıldıktan sonra TrisBuffer (pH: 7.4) eklenerek homojenize edildi. Bu homojenattan MDA ve protein karbonil ölçümleri yapılırken homojenatın bir kısmı 5000 rpm da 40 dak santrifüj edildi ve süpernatanı ayrıldı. Süpernatanda da katalaz (CAT) ve glutayon peroksidaz (Gpx) aktiviteleri ölçüldü. Ayrıca süpernatanın bir kısmına etil alkol kloroform karşımı eklenerek karıştırıldı ve sonra 5000 rpm de 40 dak santrifüj edildi. Etanol fraksiyonunda süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümü yapıldı. Homojenat, süpernatan ve ekstraktlarda Lowry yöntemi ile protein analizi yapıldı (15).

Protein analizi spektrofotometrik olarak Lowry yöntemi ile yapıldı(Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951) Protein analizleri için standart solüsyonlar hazırlandı ve elde edilen grafiğe göre protein miktarları belirlendi.

#### **Malondialdehid (MDA) Miktarının Tayini**

Akciğer dokusunda oksidatif stres için, lipid peroksidasyonunun göstergesi olan Malondialdehid (MDA) miktarı,tiobarbitürik asit ile 95°C’de reaksiyona giren tiobarbitürik asit reaktif ürünlerinin elde edilmesi prensibine göre çalışıldı (Esterbauer & Cheeseman, 1990).Homojenizasyon sonrası örnekler % 10’luk triklorasetik asit (TCA) ile 95°C’de 15 dakika inkübe edildi. 10 dakika santrifüj edilmesinden sonra elde edilen süpernatan %0.675’lik tiobarbitürik asit ile karıştırılarak yeniden 95°C’de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örnekler 532 nm’de köre karşı okutuldu. Sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi.

#### **Protein Karbonil Miktarının Tayini**

Oksidatif stresin değerlendirilmesi için protein oksidasyonunun belirteci olan protein karbonil düzeyleri ölçüldü. 2,4-dinitro-fenilhidrazininkarbonil grupları ile reaksiyona girmesi sonrası oluşan 2,4-dinitro-fenilhidrazon miktarı ölçülerek portein oksidasyonu değerlendirildi (Levine et al., 1990). Homojenizasyon sonrası %20 TCA ile karıştırılan örnekler sonra 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatan dikkatlice dökülerek tüplerde kalan pelletlerin üzerine 10 nM 2,4-dinitro fenil hidrazin (2 M HCl içinde hazırlanmış) eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda %20 TCA eklenerek reaksiyon durduruldu. Ardından 4 dakika

santrifüj yapıldı ve süpernatant dikkatlice dökülerek pellet ayrıldı. Pellet 3 kere etanol-etil asetat karışımı ile yıkandı. Sonra 100 mM NaOH ile 37°C'de 15 dakika çözülmesi için inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant ile ölçüm 360 nm'de köre karşı yapıldı. Sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi.

### **Katalaz Aktivitesi Ölçümü**

Enzim aktivitesi, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ile hazırlanan fosfat tamponunun (50mM, pH=7) ortamda bulunan katalaz enzimi sayesinde su ve oksijenin dönüşmesi prensibine göre hesaplandı. Maksimum ışımanın alındığı 240 nm  $H_2O_2$  miktarının ölçümü için kullanıldı. Zamana karşı 15 saniyede bir yapılan ölçümler sonucu elde edilen azalma katalaz aktivitesinin hızını gösterdi. Sonuçlar her bir örnekte doku protein başına verildi (k/gr prot). (Aebi 1974)

### **Süperoksit Dismutaz aktivitesinin ölçümü**

Toplam Süperoksit Dismutaz (Cu/Zn and Mn) (SOD) aktivitesi Sunve ark.'nın metodunda yapılan küçük değişikliklerle ölçüldü (Durak, Yurtarslanı, Canbolat, & Akyol, 1993; Sun, Oberley, & Li, 1988). Metotsüperoksitjenaratörü olarak ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile nitroblue tetrazolium (NBT) indirgenmesinin inhibisyonu prensibine dayanır. Aktivite akciğer homojenatının etanol fazında değerlendirildi. NBT indirgenme hızındaki %50 inhibisyona neden olan enzim miktarı bir ünite SOD tanımlandı. SOD aktivitesi miligram doku protein başına ünite olarak ifade edildi.

### **Glutasyon peroksidaz aktivitesinin ölçümü**

Glutasyon peroksidaz (Gpx,) aktivitesi Paglia ve Valentine'nin metoduna göre ölçüldü (Paglia & Valentine, 1967). NADPH, indirgenmiş glutasyon (GSH), sodium azide ve glutasyon reduktaz içeren tüplerde reaksiyon  $H_2O_2$  ilavesi ile başlatılarak 340 nm dalga boyunda absorbandaki değişiklik spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar miligram doku protein başına ünite olarak ifade edildi.

## **3.3. Histopatolojik İncelemeler**

### **Işık Mikroskopisi**

Akciğer dokuları %10 tamponlu nötral formalinde 48 saat tespit edildi. Doku örnekleri takip için Leica TP 1020 ışık mikroskobu takip cihazına alındı. Takip cihazında dehidratasyonu

sağlamak için sırayla %70, %80, %90, %96 ve %100'lük alkollerden geçirildi. Şeffaflandırma için doku örnekleri 1'er saatten 2 kere xylol'den geçirildikten sonra parafine alıştırma için 2,5 saat saf parafinde bekletildi. Doku takip cihazından alınan örnekler Leica Eg1150H parafin istasyonunda saf parafine gömülerek parafin bloklar elde edildi. Elde edilen parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Hazırlanan kesitler bir gece 60 °C etüvde bırakıldıktan sonra 45 dakika ksilolde tutularak deparafinize edildiler. Örnekler dereceli alkol serilerinden (%100, % 96, %80) geçirilerek rehidrate edildi. Hematoksilen-Eozin ile boyandıktan sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildiler. Hematoksilen-Eozin ile boyanan kesitler ksilolde şeffaflandırıldıktan sonra kanada balsamı ile kapatıldı. Leica DM 6000 mikroskobu ile incelenip fotoğrafları çekildi.

### **Ultrastrüktürel Değerlendirme (Elektron Mikroskopisi)**

Karaciğer dokuları hızlıca 1mm3'lük küçük parçalara ayrıldı ve %2.5gluteraldehit ile +4 0C de 24 saat ve %1 osmiumtetroksit ile oda sıcaklığında,karanlıkta 1 saat tespit edildi. Tespit işleminden sonra doku örnekleri takip için LeicaEM TP takip cihazına alındı. Takip cihazında tampon solüsyonu ile 45 dakika yıkanarak dehidratasyonu sağlamak için sırayla %50 (15 dakika), %60 (15 dakika),%70 (15 dakika), %80 (10 dakika), %90 (10 dakika), %96 (15 dakika, 2 defa) ve%100'lük (15 dakika,2 defa) alkollerden geçirildi. Ardından doku örnekleri propilenoksit ile iki defa 15 dakika yıkandı.Sudan kurtarılan doku parçaları bloklanmadan önce dörtlü plastik karışımında alıştırıldı. Alıştırma yapılırken dokular 2 saat süreyle 3 ölçü propilen oksit + 1 ölçü dörtlü plastik karışımında bekletildi. Ardından sırasıyla 2 saat 1 ölçü propilen oksit +1 ölçü dörtlü plastik karışımında ve sonra 8 saat 1 ölçü propilen oksit + 3 ölçü dörtlü plastik karışımında tutuldu. Son olarak da 10 saat dörtlü plastik karışımında tutulduktan sonra dörtlü plastik karışımla bloklanarak etüvde 60 0C'de 48 saat polimerize edildi. Leica RM 2265 mikrotomunda alınan 1µm yarı ince kesitler %1'lik boraks içindeki %1'lik metilen mavisi- Azur II karışımında boyandı. TEM'de incelenecek alanın belirlenebilmesi için DC490 digital kamera (Leica, Wetzlar24Germany) bağlı Leica DM6000B (Wetzlar-Germany) mikroskop ile incelendi ve fotoğraflandı. Elektron mikroskopunda görüntüleme alabilmek için Leica Ultracut Rile 70 nm'lik ince kesitler bakır gridler üzerine alındı. Gridler Leica EM AC20 cihazı kullanılarak uranil asetat ve kurşun sitat ile boyandıktan sonra elektron mikroskobu (JEOL 1400) ile incelendi ve fotoğraflandı.

### **İmmünohistokimyasal Değerlendirme**

Akciğer dokusunda gruplar arasında nötrofil ve makrofaj infiltrasyonunu değerlendirmek amacıyla immuno-histokimya yapıldı. Hücreler işaretlendikten sonra her hayvandan alınan kesitlerden X40'lık büyütmede 5 farklı alanda hücreler sayıldı. Her belirlenen alanda intra-alveolar makrofaj, intra-alveolar nötrofil ve İnterstisyel nötrofil sayıları belirlendi. Sırasıyla her biri için sonuçlar, o hayvana ait toplam sayı olarak ifade edildi. İmmuno-histokimya için parafin bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Deparafinizasyon işleminden sonra kesitler düşen alkol serilerinden geçirilerek rehidratasyon işlemi yapıldı ve TBS ile [1L 25x TBS [pH7.4] ab64248] 3 kez 5'er dk yıkandı. Antijen retrieval işlemi sodyum sitrat [AntigenRetrievalBuffer 100X CitrateBufferpH 6.0ab93678] kullanarak mikrodalgada yapıldı. Kesitler TBS ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz blokajı için kesitler sekonder antikor kitindeki hidrojen peroksit blok solüsyonu ile 30 dk inkübe edildi ve TBS ile 3 kez 5'er dk yıkandı. Permeabilizasyon işlemi için TBS de hazırlanmış %0.1 Triton X-100 ile dokular 10 dk inkübe edildi ve TBS ile 3 kez 5'er dk yıkandı. Primer antikor [Anti-NeutrophilElastaseantibodyab21595] için uygun dilusyon oranı 1/300 olarak belirlendi. Diluent olarak %1 BSA içeren TBS kullanıldı. Primer antikor ile gece boyunca 4C' de inkubasyon yapıldı. Primer antikor ile inkubasyondan sonra kesitler TBS ile 3 kez 5'er dk yıkandı. Sekonder antikor basamağına geçmeden önce zemin boyamasını engellemek için blok solusyonu ile inkubasyon yapıldı. Sekonder antikor kitindeki protein blok ile kesitlerin üzeri kaplandı ve 30 dkinkübe edildi. Blok solüsyonundan sonra yıkama yapılmadı. Sekonder antikor[EXPOSE Mouse andRabbitSpecific HRP/DAB Detection IHC Kitab80437] ile 1 saat inkubasyon yapıldı ve kesitler TBS ile 3 kez 5'er dk yıkandı. Kromojen olarak DAB kullanıldı. 1.5 ml DAB substrata 30µl DAB kromojen eklenerek hazırlanan solusyonla dokular 2 dkinkübe edildi. Önce TBS ve daha sonra çeşme suyunda yıkama yapıldıktan sonra kesitler zıt boyama için Mayer's hematoksilen ile 1dk boyandı. Çeşme suyunda yıkama yapıldı ve yükselen alkol serilerinden geçirilen kesitlerksilende 15 dk bekletildikten sonra kapama yapıldı ve LEICA DMR mikroskop ile görüntülendi.

### **3.4. İstatistiksel Analizler**

İstatistiksel analizler "IBM® SPSS Statisticsfor Windows" (Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp., 2011) ile biyoistatistik anabilim dalında yapıldı. Deneyler sonucunda elde edilen veriler (akciğer ağırlıkları, MDA, PC, SOD, Katalaz, ve Gpx) normal dağılım gösterdiği için (Shapiro-Wilk testi ile) gruplar arası farklılıklar tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirildi.

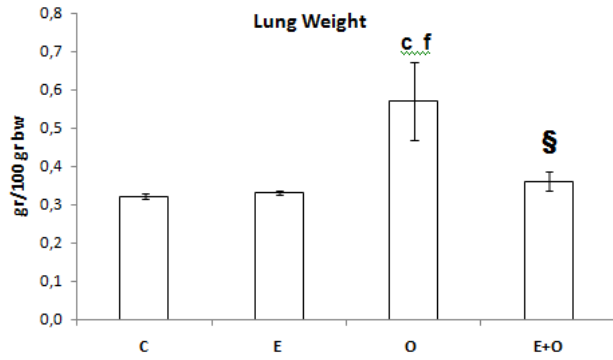
Gruplar arasında anlamlılık olması durumunda alt gruplardaki ikili karşılaştırmalar için post-hoc test olarak Tukey testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama (mean)  $\pm$  Standart hata (SEM) olarak verildi. Ancak gruplar arası intra-alveolar makrofaj, intra-alveolar nötrofil ve interstiyel nötrofilgibi sayılabilir sonuçları karşılaştırmak için non parametrik testlerden Kruskal-Wallis kullanıldı. Gruplar arasında anlamlılık olması durumunda alt gruplardaki ikili karşılaştırmalar için post-hoc test olarak Mann-Whitney Test uygulandı. Sonuçlar orta değer (median) ve Minimum-Maximum olarak verildi. Sonuçlar %95 güven aralığında, anlamlılık  $P<0,05$  düzeyinde değerlendirildi.

### **3.5. Etik Kurul izni**

Bu araştırma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulunun 23/06/2015 tarih ve 2015/06 no'lu toplantısında 2015/56 sayılı izni ile gerçekleşmiştir.

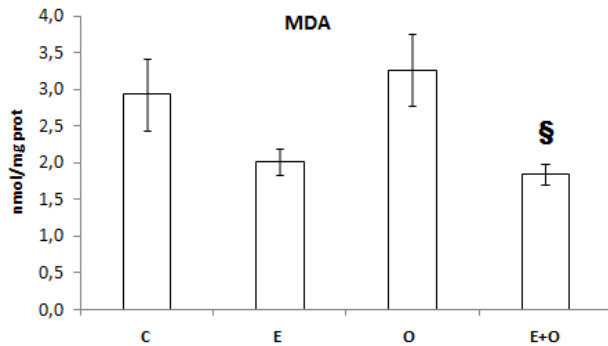
#### 4- BULGULAR

Sıçanların 100 gr vücut ağırlığı başına düşen akciğer ağırlıkları şekil 1’de gösterilmektedir. Kontrol grubu ile erdostein grubu arasında bir fark gözlenmedi. Oleik asit grubunda ise 100 gr vücut ağırlığı başına düşen akciğer ağırlıkları ( $0.57\pm0.1$ ), kontrol grubuna ( $0.32\pm0.01$ ) kıyasla artmış bulundu. Erdostein ön-uygulaması akciğer ağırlığındaki bu artışı önledi ( $0.36\pm0.02$ ) ( $P<0,05$ ).



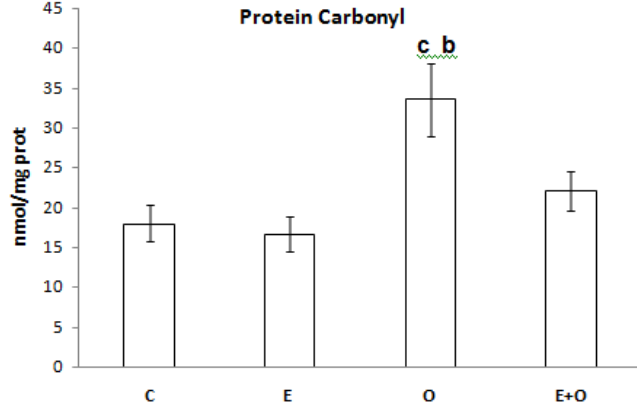
**Şekil 1.** Sıçanların 100 gr vücut ağırlığı başına düşen akciğer ağırlıklarının karşılaştırılması (gr/100gr vücut ağırlığı). C: Kontrol grubu (n=6), E: Erdostein grubu (n=7), O: Oleik asit grubu (n=7), E+O: Erdostein ve Oleik asit grubu (n=8) n: hayvan sayısı, c; ( $P<0,05$ ) Kontrol grubuna göre, f; ( $P<0,05$ ) Erdosteingrubuna göre, s; ( $P<0,05$ ) Oleik asit grubuna göre

Sıçanların akciğer dokusunda lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak incelediğimiz MDA düzeylerini, anlamlı olmamakla birlikte kontrol grubuna ( $2.94\pm0.49$ ) kıyasla erdostein grubunda  $2.02\pm0.18$  azalmış, oleik asit grubunda ( $3.27\pm0.48$ ) artmış bulduk (şekil 2). Erdostein ön-uygulaması ( $1.84\pm0.15$ ) oleik asitele kıyaslandığında anlamlı düzeyde doku MDA düzeyini azalttı ( $P<0,05$ ) .



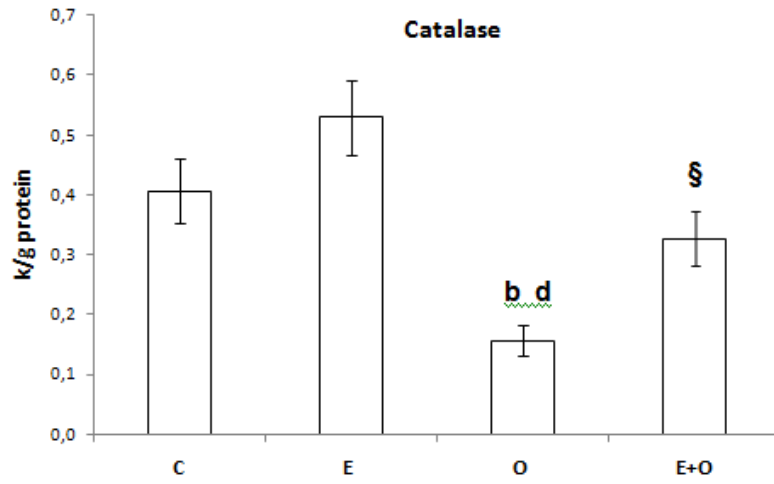
**Şekil 2.** Sıçanlarda oleik asitin neden olduğu akciğer hasarında Malondialdehit (MDA) (nmol/mg protein) düzeyleri üzerine erdosteinin etkisi C: Kontrol grubu (n=6), E: Erdostein grubu (n=7), O: Oleik asit grubu (n=7), E+O: Erdostein ve Oleik asit grubu (n=8) n: hayvan sayısı, s; ( $P<0,05$ ) Oleik asit grubuna göre

Protein oksidasyonunu göstermek amaçlı incelediğimiz protein karbonil düzeyleri oleik asit grubunda ( $33,57 \pm 4,6$ ) kontrol grubuna ( $18 \pm 2,3$ ) kıyasla yüksek bulundu ( $P < 0,01$ ). Erdosteine ön-uygulaması protein karbonil düzeylerini kontrol değerlerine yaklaştırdı ( $22,1 \pm 2,55$ ) (şekil 3). Erdosteine+oleik asit grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark yoktu.

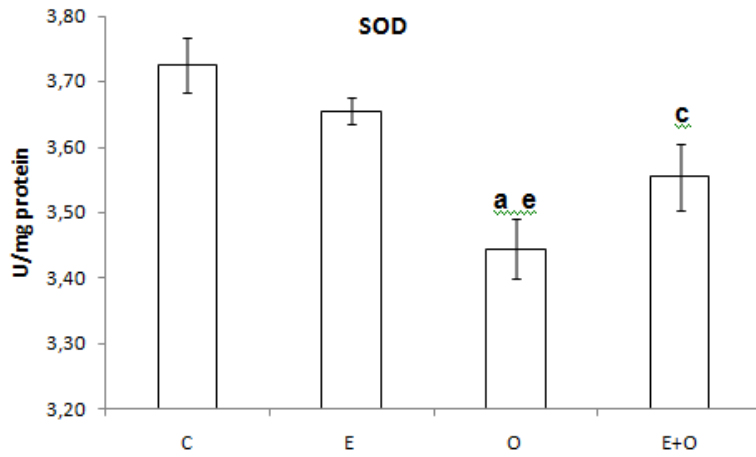


**Şekil 3.** Sıçanlarda oleik asit'in neden olduğu akciğer hasarında protein karbonil (PC) (nmol/mg protein) düzeyleri üzerine erdosteinein etkisi. C: Kontrol grubu (n=6), E: Erdosteine grubu (n=7), O: Oleik asit grubu (n=7), E+O: Erdosteine ve Oleik asit grubu (n=8) n: hayvan sayısı, b; ( $P < 0,01$ ) Kontrol grubuna göre, c; ( $P < 0,05$ ) Kontrol grubuna göre.

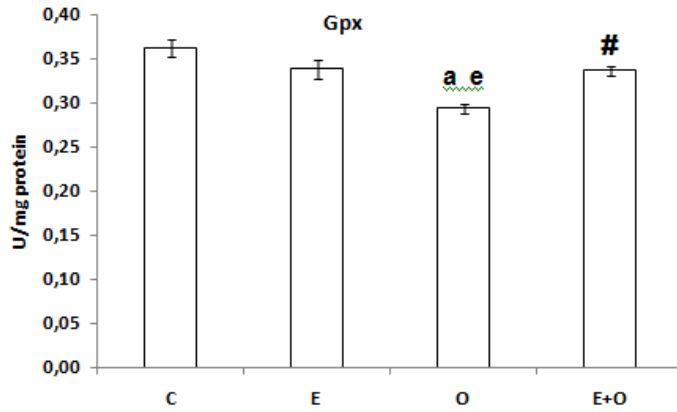
Çalışmamızda oleik asit uygulamasının akciğer dokusundaki antioksidan enzim aktivitelerini (oleik asit grubuna ait katalaz, SOD, Gpx aktivite değerleri sırasıyla:  $0,16 \pm 0,03$ ;  $3,45 \pm 0,05$ ;  $0,3 \pm 0,01$ ) ( $P < 0,01$ ) baskılamış olduğunu, buna karşın erdosteine ön-uygulamasıyla enzim aktivitelerinin arttırdığını (oleik asit + erdosteine grubuna ait katalaz, SOD, Gpx aktivite değerleri sırasıyla:  $0,33 \pm 0,05$ ;  $3,55 \pm 0,05$ ;  $0,34 \pm 0,01$ ) bulduk (şekil 4, 5 ve 6). Katalaz ve Gpx enzimlerinde, erdosteine+oleik asit grubu ile sadece oleik asit uygulanan grup arasındaki fark anlamlı iken SOD enzimi için bu fark anlamlı değildi. Ancak SOD enzim aktivitesierdosteine+oleik asit grubunda kontrol değerlerine yaklaşmış ve aradaki farkazalmıştı. Her üç enzim için kontrol grubu ile erdosteine grubu arasında bir fark bulamadık.



**Şekil 4.**Sıçanlarda Oleik asit'in neden olduğu akciğer hasarında katalaz (k/g protein) aktivitesi üzerine erdosteinin etkisi. C: Kontrol grubu (n=6), E: Erdostein grubu (n=7), O: Oleik asit grubu (n=7), E+O: Erdostein ve Oleik asit grubu (n=8) n: hayvan sayısı, b; ( $P<0,01$ ) Kontrol grubuna göre,d; ( $P<0,01$ ) Erdostein grubuna göre, §; ( $P<0,05$ ) Oleik asit grubuna göre



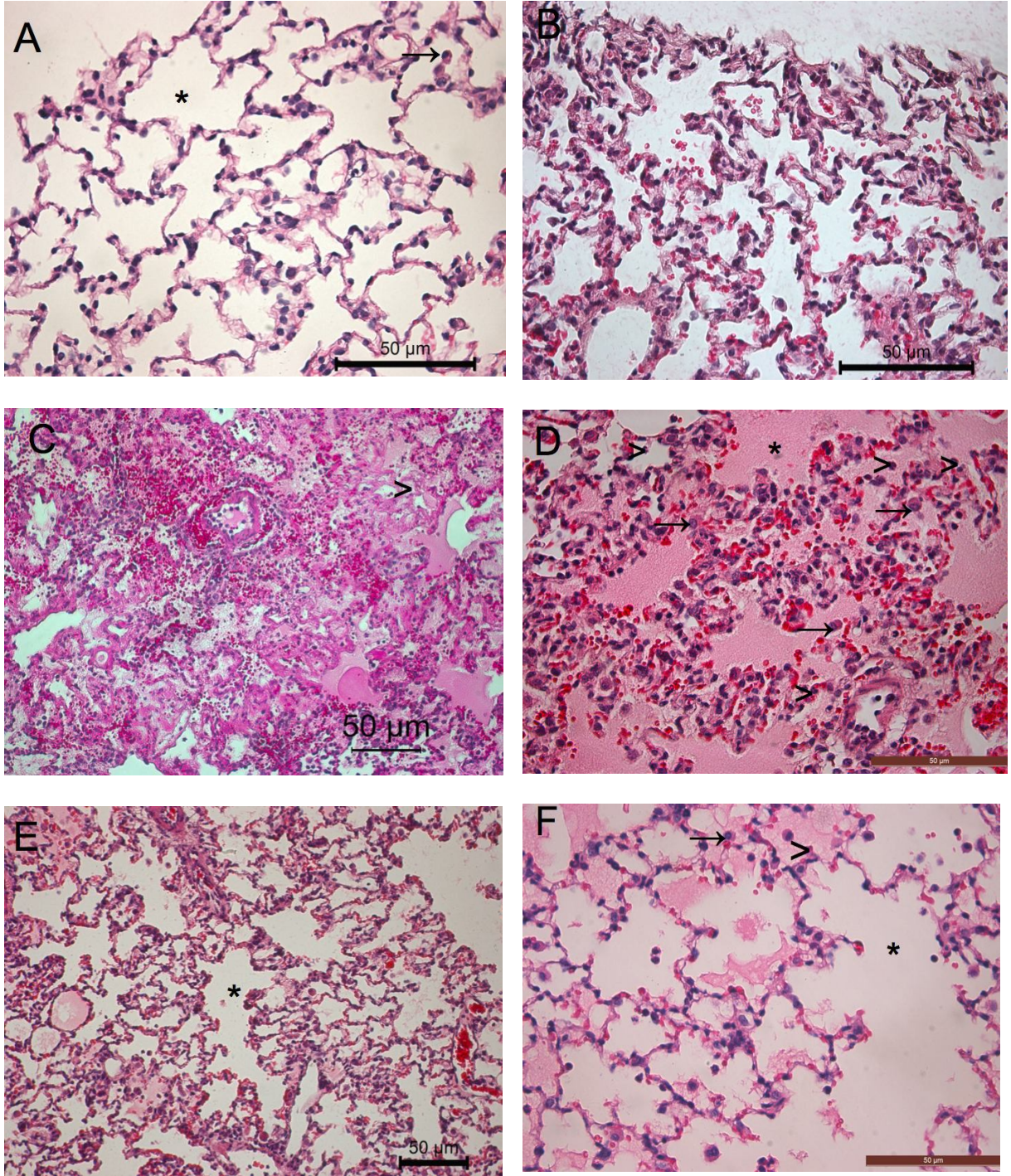
**Şekil 5.**Sıçanlarda oleik asit'in neden olduğu akciğer hasarında superoksit dismutaz (SOD) (U/mg protein) aktivitesi üzerine erdosteinin etkisi. C: Kontrol grubu (n=6), E: Erdostein grubu (n=7), O: Oleik asit grubu (n=7), E+O: Erdostein ve Oleik asit grubu (n=8) n: hayvan sayısı, a; ( $P<0,001$ ) Kontrol grubuna göre c; ( $P<0,05$ ) Kontrol grubuna göre,e; ( $P<0,01$ ) Erdostein grubuna göre.



**Şekil 6.**Sıçanlarda oleik asit'in neden olduğu akciğer hasarında glutatyon peroksidaz (Gpx) (U/mg protein) aktivitesi üzerine erdosteinin etkisi. C: Kontrol grubu (n=6), E: Erdostein grubu (n=7), O: Oleik asit grubu (n=7), E+O: Erdostein ve Oleik asit grubu (n=8) n: hayvan sayısı, a; ( $P<0,001$ ) Kontrol grubuna göre, e; ( $P<0,01$ ) Erdostein grubuna göre, #; ( $P<0,01$ ) Oleik asit grubuna göre.

Kontrol grubundan alınan akciğer örneklerinin histopatolojik incelenmesinde alveolar boşluklar açıktı ve alveolar epiteldeki tipI ve tipII pnömosit hücreleri normal populasyonlarında gözlemlendi. İntraalveolar boşluklarda birkaç makrofaj izlendi. İnterstisyel alanda infiltratif hücreye rastlanmadı ve bu alanda kapiller konjesyon yoktu [Şekil 7A]. Erdostein grubundan alınan akciğer örneklerinde de bulgular kontrol grubuna benzer olarak izlendi. İnflamasyon bulgularına rastlanmadı. Ancak intraalveolar alanda az miktarda eritrosit gözlemlendi [Şekil 7 B].

Oleik asit grubundan alınan akciğer örnekleri ışık mikroskopisinde incelendiğinde, intraalveolar alanlar sıvı birikimi nedeni ile dolu olarak gözlemlendi. Birçok intraalveolar alanda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında makrofaj sayısı artmıştı. İntraalveolar ve interstisyel alanlarda nötrofil artışı dikkat çekiciydi. İnterstisyel alandaki nötrofil artışı özellikle konjestif kapillere yakın olarak izlendi. İnteralveolar alan ödem nedeniyle kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha genişlemiş olarak gözlemlendi [Şekil 7C ve D]. Oleik asit+erdostein grubundan alınan örneklerinde ise alveolar alanlarının bazıları sıvı ile dolu iken çoğu alveolar alanda sıvı birikimi izlenmedi. Oleik asit grubu ile karşılaştırıldığında daha az sayıda makrofaj ve nötrofil gözlemlendi. İnterstisyel ödem ve kapiller konjesyon oleik asit grubu kadar belirgin değildi [Şekil 7 E ve F]



**Şekil 7.**

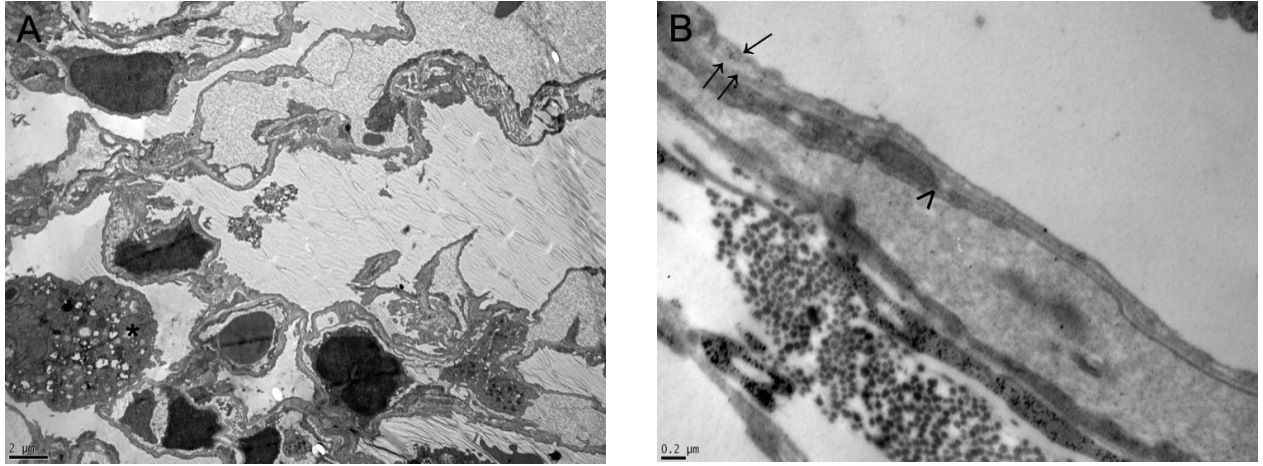
A. Kontrol grubu akciğer örnekleri; alveolar boşluklar açık [yıldız], alveolarepiteldeki tip1 ve tip2 pnömosit hücreleri normal popülasyonlarında ve intraalveolar boşluklarda birkaç makrofaj [ok]

B.Erdosteine grubu akciğer örnekleri; İnflamasyon bulgularına rastlanmadı. İntraalveolar alanda az miktarda eritrosit

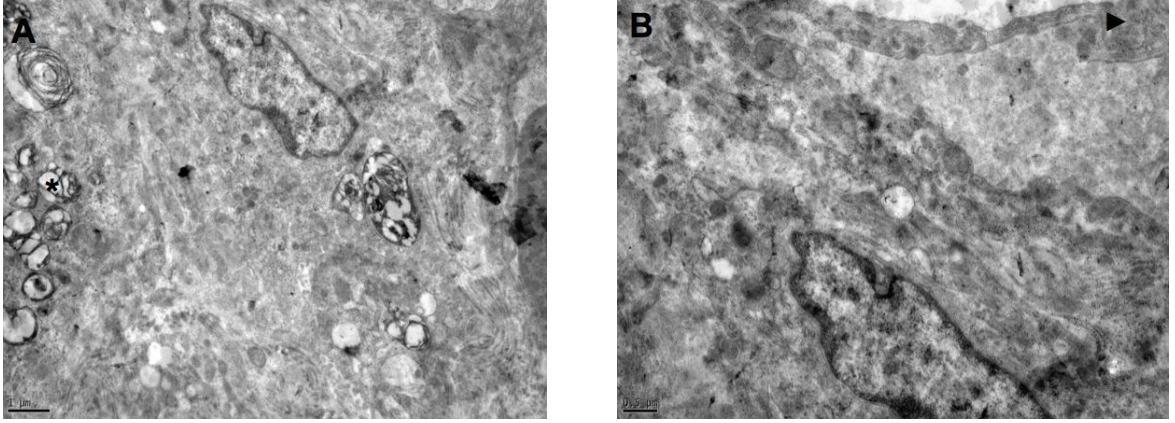
C,D.Oleik asit grubu akciğer örnekleri;intra-alveolar alanlar sıvı dolu olarak gözlemlendi [yıldız]. İntra-alveolar alanda makrofaj [ok],intraalveolar ve interstisyel alanlarda nötrofil artışı [ok başı] belirgindi. İnteralveolar alan ödem nedeniyle daha kalındı.

E.F.Oleik asit +erdosteine grubu akciğer örnekleri; çoğu alveolar alanda sıvı birikimi izlenmedi [yıldız]. Oleik asit grubu ile karşılaştırıldığında daha az sayıda makrofaj [ok] ve nötrofil [ok başı] vardı. İnterstisyel ödem ve kapillerkonjesyonoleik asit grubu kadar belirgin değil.

Elektron mikroskobu ile yapılan inceleme sonucu elde edilen bulgular ışık mikroskobu bulgularını destekledi. Kontrol grubunda alveolar boşluklar açıktı. Tip1 pnömositler ve sürfaktan granülleri ile Tip 2 pnömositlerde herhangi bir dejeneratif değişiklik gözlenmedi. Tip1 pnömosit, birleşmiş bazal membran ve endotelden oluşan kan-hava bariyeri devamlı ve bazal membran ölçümü ortalama 0,02µm kalınlığında saptandı. İnterstisyel alanda kapiller konjesyon gözlenmedi [Şekil 8].Erdosteine grubunda interstisyel alan kontrol grubunda olduğu gibi inceydi. Tip 1 pnömositler normal olarak izlendi. Tip 2 pnömosit sitoplazmasında sürfaktan içeren lameller görüldü [Şekil 9].

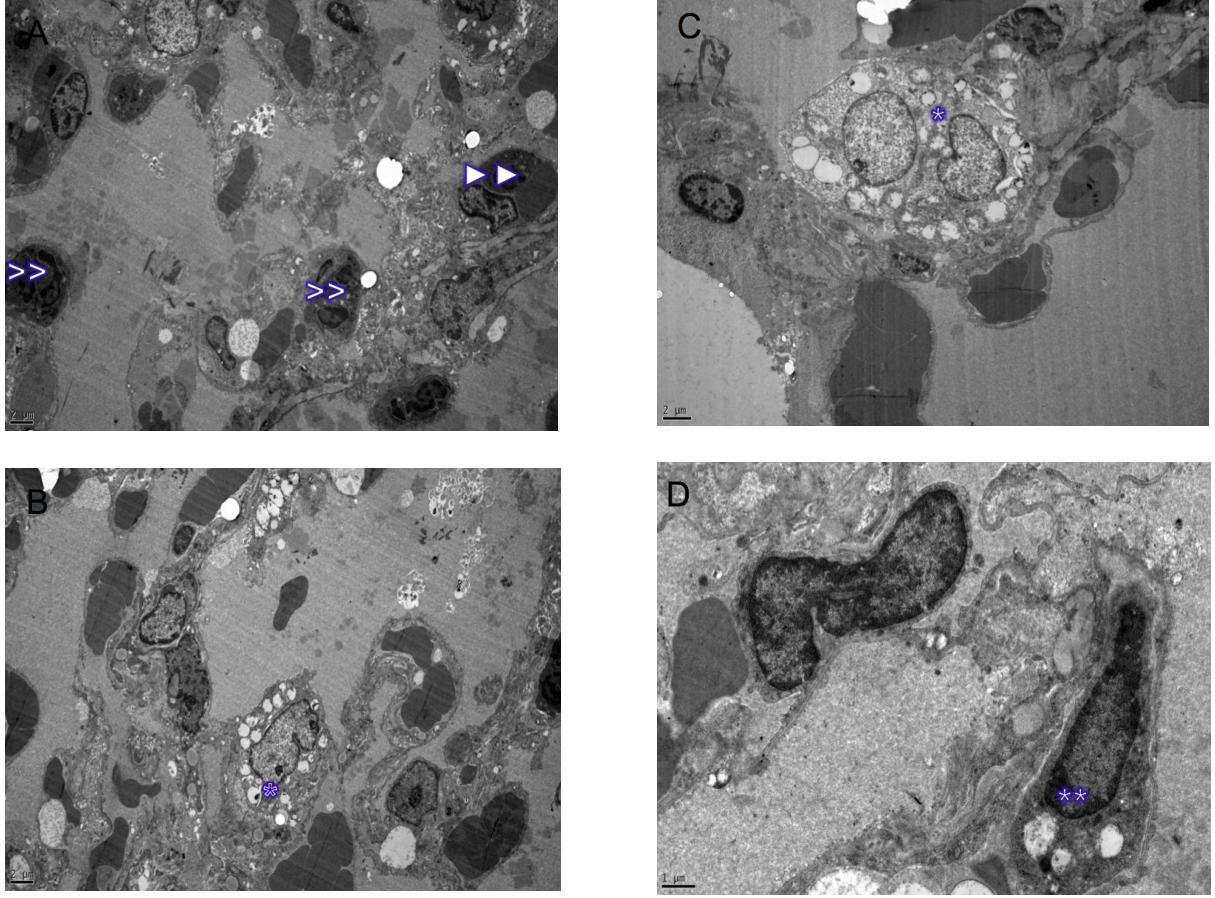


**Şekil 8.** Kontrol grubu sıçan akciğerinin elektron mikroskobu görüntüsü. Alveol duvarını döşeyen Tip1 pnömosit ve sürfaktan granülleri ile Tip 2 pnömosit [yıldız] Kan-hava bariyeri; Tip 1 pnömosit [ok], 0.02 µm kalınlığında bileşik bazal membran[çift ok] ve endotel [ok başı]. A. Uranil asetat - kurşun sitrat; X6000, B. Uranil asetat – kurşun sitrat; X40000



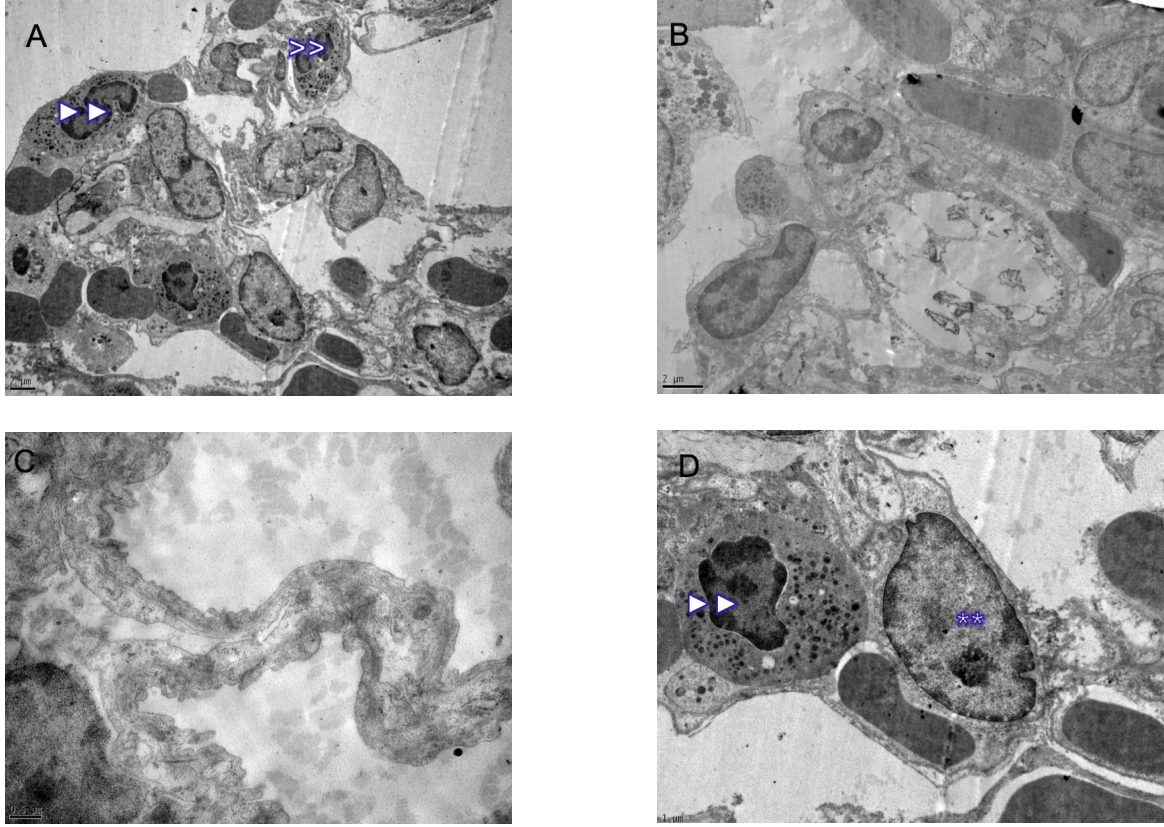
Şekil 9. Erdosteine grubu sıçan akciğerinin elektron mikroskopi görüntüsü. Tip1 ve Tip2 pnömosit hücreleri [yıldız] oldukça sağlıklı olarak izlendi ve interstisyel alan [siyah ok başı] kontrol grubuna benzer şekilde inceydi. Tip2 pnömosit sitoplazmasında sürfaktan içeren lamelli cisimcikler gözlemlendi. A. Uranil asetat - kurşun sitrat; X15000, B. Uranil asetat – kurşun sitrat; X25000

Oleik asit grubunda alveol boşlukları sıvı birikimi nedeni ile kapalıydı. Tip 2 pnömositlerde sayısal artış ve interstisyel alanda aktif fibroblast ve hemen komşuluğunda kollagenfibrilleri gözlemlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında İntra-alveolar ve interstisyel alanda nötrofil artışı ve intra-alveolar alanda makrofaj artışı dikkat çekiciydi. Kan hava bariyeri ortalama 0,04µm kalınlığında kontrol grubuna göre kalınlaşmış olarak izlendi [Şekil 10].



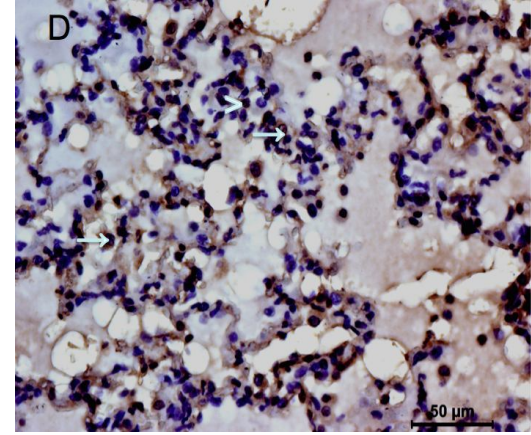
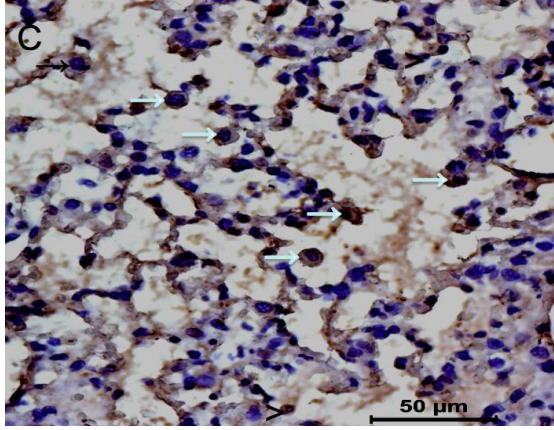
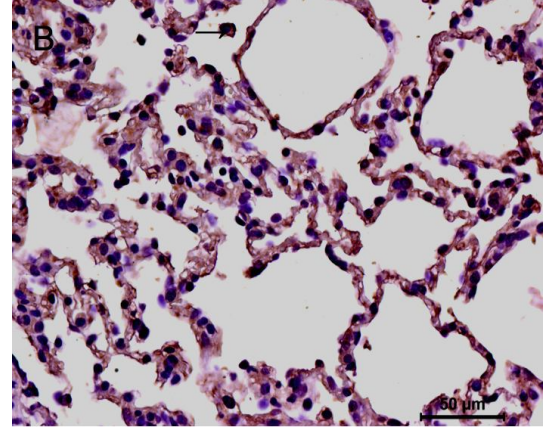
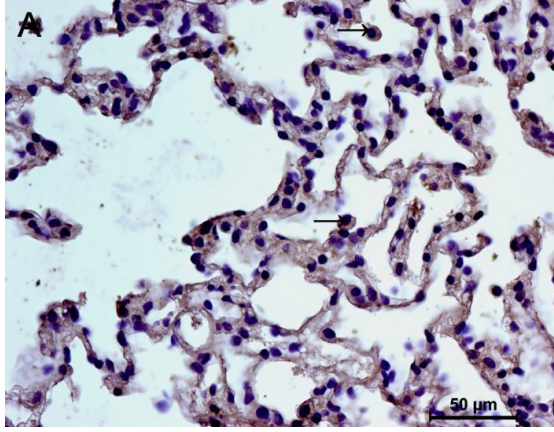
**Şekil 10.** Oleik asit grubu sıçan akciğerinin elektron mikroskopi görüntüsü. Alveol boşlukları kapalı, Tip 2 pnömositlerde [yıldız] sayısal artış ve interstisyel alanda aktif fibroblast [çift yıldız] ve hemen komşuluğunda kollagen fibrilleri, intra-alveolar ve interstisyel alanda nötrofil artışı [çift ok başı] ve makrofaj artışı [içi dolu çift ok başı]. A. Uranilasetat-kurşunsitrat; X4000, B. Uranil asetat – kurşun sitrat; X4000, C. Uranil asetat – kurşun sitrat; X5000, D. Uranil asetat – kurşun sitrat; X12000

Oleik asit + erdostein grubunda ise Tip 1 ve Tip 2 pnömositlerin çekirdek görünümü ve sitoplazma içerikleri normal olarak izlendi. İnterstisyel alan oleik asit grubu kadar infiltratif hücre ile dolu değildi. Çoğu alanda alveol içi sakin ve boş olarak gözlemlendi. İnterstisyel alanda fibroblast ve kollagen fibrilleri izlendi. Kan hava bariyeri kalınlığı ortalama 0,03μm olarak ölçüldü [Şekil 11].



**Şekil 11.** Oleik asit + erdostein grubu sıçan akciğerinin elektron mikroskopi görüntüsü. Tip 1 ve Tip 2 pnömositlerin çekirdek görünümü ve sitoplazma içerikleri normal. İnterstisyel alan oleik asit grubu kadar infiltratif hücre [makrofaj, çift siyah ok başı. nötrofil, çift ok başı] ile dolu değil. Çoğu alanda alveol içi sakin ve bol, interstisyel alanda fibroblast [çift yıldız] ve kollagenfibrilleri. A. Uranil asetat – kurşun sitrat; X5000, B. Uranil asetat – kurşun sitrat; X8000, C. Uranil asetat – kurşun sitrat; X25000, D. Uranil asetat – kurşun sitrat; X12000

Akciğer doku örneklerinde intra-alveoler makrofaj, intra-alveoler nötrofil ve interstisyel nötrofil sayılarını hesaplamak için yapılan immünohistokimya boyaması sonucu kontrol ve erdostein grubunda intra-alveoler nötrofile ve interstisyel nötrofile rastlanmadı. İntra-alveoler makrofaj sayısı ortalaması ise sırasıyla 6,5 (kontrol grubu) ve 7 (erdostein grubu) idi. Kontrol ve erdostein grupları arasında bir fark yoktu (tablo1). Oleik asit grubunda ise intra-alveoler makrofaj, intra-alveoler nötrofil ve interstisyel nötrofil sayıları hem kontrol hem de erdostein grubuna göre belirgin olarak artmıştı ( $P<0,001$ ) (tablo1)(şekil 12). Erdostein ön uygulaması yapılan grupta intra-alveoler makrofaj, intra-alveoler nötrofil ve interstisyel nötrofil sayıları oleik asit grubuna kıyasla azalmıştı ( $P\leq 0,001$ ) (tablo1) (şekil 12).



**Şekil 12.** Akciğer örneklerinde elastazın immunohistokimyasal olarak boyanması. A. Kontrol grubu akciğer örnekleri B. Erdosteine grubu akciğer örnekleri C. Oleik asit grubu akciğer örnekleri; Kontrol grubuna göre artmış makrofaj ve nötrofil. D. Oleik asit+Erdosteine grubu akciğer örnekleri; Oleik asit grubu ile karşılaştırıldığında azalmış makrofaj ve nötrofil. [Ok, makrofaj. Ok başı, nötrofil]

Tablo 1:Akciğer doku örneklerinde intra-alveoler makrofaj, intra-alveoler nötrofil ve interstisyel nötrofil sayıları.

| Group    |        | İntra-alveolar makrofage | İntra-alveolar nötrofil | İnterstitial nötrofil |
|----------|--------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|
| C(n=6)   | Median | 6,5                      | 0                       | 0                     |
|          | Min    | 5                        | 0                       | 0                     |
|          | Max    | 11                       | 0                       | 0                     |
| E(n=7)   | Median | 7                        | 0                       | 0                     |
|          | Min    | 3                        | 0                       | 0                     |
|          | Max    | 9                        | 0                       | 0                     |
| O(n=7)   | Median | 29 <sup>ad</sup>         | 17 <sup>ad</sup>        | 15 <sup>ad</sup>      |
|          | Min    | 27                       | 10                      | 11                    |
|          | Max    | 37                       | 31                      | 18                    |
| E+O(n=8) | Median | 12,5 <sup>b e *</sup>    | 4 <sup>ad *</sup>       | 6,5 <sup>ad *</sup>   |
|          | Min    | 8                        | 2                       | 4                     |
|          | Max    | 18                       | 10                      | 11                    |

C: Kontrol grubu, E: Erdosteine grubu, O: Oleik asit grubu, E+O: Erdosteine ve Oleik asit grubu, n: hayvan sayısı, a; ( $P \leq 0,001$ ) Kontrol grubuna göre, b; ( $P \leq 0,01$ ) Kontrol grubuna göre, d; ( $P \leq 0,001$ ) Erdosteine grubuna göre e; ( $P \leq 0,01$ ) Erdosteine grubuna göre, \*; ( $P \leq 0,001$ ) Oleik asit grubuna göre. Min: Minimum, Max: Maximum

## 5. TARTIŞMA:

Akut solunum sıkıntısı sendromu, pulmoner ödem, hipoksi ve sonuçta akciğerlerde fonksiyon kaybına neden olan, yüksek mortaliteye sahip bir durumdur(Bernard et al., 1994; Ranieri et al., 2012; Repine, 1992).OA’le oluşturan akut akciğer hasarı ARDS’nin fizyopatolojik açıdan iyi bir modelidir(Matute-Bello et al., 2008). Erdosteine 20 yıldan uzun bir süredir kronik akciğer hastalıklarında kullanılan antioksidan ve anti-inflamatuvar özelliğe sahip mukolitik bir ajandır. Nötrofil birikimini önleyerek hasar şiddetinin azaltmaktadır. Ancak akut etkisi ve profilaktik kullanımı hakkında çok az çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada erdosteine ön-uygulamasının oleik asitle (OA) oluşturulan akut akciğer hasarındaki koruyucu rolünün araştırmayı amaçladık. Çalışmamızın sonunda erdosteine ön-uygulamasının oleik asitle artan lipid ve protein oksidasyonunu azaltıldığını, yine OA’le baskılanan hücre içi antioksidan savunma sisteminin erdosteinele güçlendirildiğini gözlemledik. Ayrıca erdosteinein OA uygulaması sonucu bozulan akciğer morfolojisini düzelttiğini, interstisyel nötrofil, intra-alveolar nötrofil ve makrofaj birikimini belirgin olarak azalttığını saptadık.

ARDS modeli oluşturmak için uygulanan intravenöz OA enjeksiyonu bir iki saat içinde akut etkilerini göstermeye başlamakta ve sıçanlara verilen doza bağlı olarak ARDS nin şiddeti değişmektedir. 30 mikrolitre OA enjeksiyonu çok hafif, 50 mikrolitre hafif, 60 mikrolitre orta derecede, 75 mikrolitre şiddetli, 90 mikrolitre çok şiddetli akciğer hasarı oluşturmaktadır. Hatta 90 mikrolitre OA enjekte edilen sıçanların ortalama yaşam süreleri pulmoner yetersizlik nedeniyle yaklaşık 20 dk. İken, 75 mikrolitre enjekte edilen sıçanların 63. dakikaya uzamaktadır. Bunun yanında 60 mikrolitre enjekte edilenler ise 120 dakikadan uzun yaşamaktadırlar(Akella, Sharma, Pandey, & Deshpande, 2014). Biz çalışmamızda erdosteine ön-uygulamasının akciğer dokularındaki morfolojik değişiklikler ve oksidan sistem üzerine etkisini araştırmak istediğimiz için OA dozunu seçerken sıçanların pulmoner yetmezlik nedeniyle ölmeyecekleri ama akciğerlerinde de belirgin hasarın oluşacak olan dozu yani 50 mikrolitreyi tercih ettik. Eğer 30 mikrolitre OA dozunu tercih etseydik sıçanlarda akciğer hasarı çok hafif olacağı için erdosteinein net etkisini maskeleyebilirdi.

Erdosteine dozu için literatürde çok farklı dozlara bulunmaktadır. Erdosteine çalışmalarda 10 mg/kg/gün ila 500 mg/kg/gün arasında farklı süre ve dozlarda uygulanmaktadır(Demiralay, Gursan, & Erdem, 2006; Tutanc et al., 2012). Düşük dozlar daha çok uzun süreli tedavilerde tercih edilirken yüksek dozlar kısa süreli tedavilerde tercih edilmektedir (Moretti & Marchioni, 2007). Biz çalışmamızda tek doz ve ön-uygulama

şeklinde erdosteini vereceğimiz için literatürle uyumlu olarak çok düşük olmayan bir dozu, 150 mg/kg'ı tercih ettik (Dokuyucu et al., 2014). Ayrıca OA enjeksiyonunu erdostein uygulamasından bir saat sonra yapmamızın nedeni erdosteinin hepatik metabolizasyonunun gerçekleşip farmakolojik olarak aktif hale geçmesini beklemektir.

OA'le oluşan akut akciğer hasarı bir-iki saat içinde başlamakta ve 8-12 saatlik bir süre içerisinde de düzelme trendine geçmektedir (Derks & Jacobovitzderks, 1977; Matute-Bello et al., 2008). Bu nedenle de OA'in akciğerlerde oluşturacağı hasarın belirgin hale gelmesi ve henüz düzelme trendine geçmemesi için ki erdosteinin gerçek etkisi maskelenmesin, OA enjeksiyonundan dört saat sonra akciğer dokuları çıkartıldı. Nitekim çalışmamızda ışık ve elektron mikroskopisi bulguları OA'in akciğer dokusu üzerinde belirgin hasar oluşturduğunu desteklemektedir. OA grubunda intraalveolar alanlar sıvı ile doluydu ve makrofaj, nötrofil sayıları artmıştı. Kapiller konjesyon belirgindi. Tip 2 pnömositler literatürle uyumlu olarak artmıştı (Derks & Jacobovitzderks, 1977). Akciğer dokusunda bol miktarda aktif fibroblast ve hemen komşuluğunda kollojen fibriller gözlemlendi. Kan hava bariyeri kalınlaşmıştı. Erdostein ön-uygulaması yapılan grupta ise OA'in oluşturduğu hasarlar belirgin olarak azaldı. Çoğu alveolar alanda sıvı yoktu. Makrofaj ve nötrofil sayıları anlamlı olarak azalmıştı. Tip 1 ve 2 pnömositler normal görünümdeydiler. İnterstisyel alanlar infiltratif hücrelerle dolu değildi. Kan hava bariyeri OA grubundaki kadar kalın değildi, 0,03 mikrometreydi.

OA'le gelişen akut akciğer hasarı heterojendir. Bazı bölgelerde belirgin değişiklik gözlenmezken bazı bölgelerde ise yoğun interstisyel ödem ve hemorajik infiltrasyon gözlenir (Matute-Bello et al., 2008). Temelde OA'in endotel hücreleri üzerine direkt etki ile endotel ve alveol epitel hücrelerinde nekrozu tetiklediği ileri sürülmektedir. Endotel hücre hasarı kapiller geçirgenliği artırmakta bu da kapiller konjesyona ve takiben alveolar alana sıvı sızmasına neden olmaktadır. Olayın şiddeti arttıkça hemorajik infiltrasyon ve fibrin birikimi göze çarpmaktadır (Matute-Bello et al., 2008; Ulrich et al., 2005). Tüm bu olaylar inflamasyonu tetiklemekte ve o bölgeye nötrofil ve makrofaj göçüne neden olmaktadır (Eiermann, Dickey, & Thrall, 1983).

Sıçanların akciğer ağırlıklarındaki değişimleri incelediğimizde oleik asit uygulanan grupta, kontrol ve sadece erdostein uygulanan gruplara kıyasla belirgin arttığı görülmektedir. Benzer şekilde literatürde de OA uygulamasının pulmoner ödeme bağlı olarak akciğer sıvı içeriğini arttırdığı gösterilmiştir (Akella et al., 2014; Rylander, Hogman, Perchiazzi, Magnusson, & Hedenstierna, 2004). Erdostein ön-uygulaması yapıldığında ise oleik asit

grubuna kıyasla anlamlı olarak akciğer ağırlıklarının azaldığı saptandı. Bu da erdosteinin akciğerlerde alveol ödemi azalttığını, kapiller konjesyonu önlediğini desteklemektedir.

Oksidatif stres ve buna bağlı olarak gelişen lipid peroksidasyonu ile protein oksidasyonu OA'le oluşturulan akut akciğer hasarındaki temel sorumlu mekanizmalardandır (Bulmus et al., 2013). OA hücre içi oksidan stres ve antioksidan savunma sistemi arasındaki dengeyi oksidan stres lehine bozmaktadır (Lang et al., 2002). Ayrıca hücre içi antioksidan kapasiteyi baskılamaktadır. Bu ise hücre ölümünü hızlandırmaktadır. Bizim çalışmamızda da OA uygulanan grupta lipid peroksidasyonunun göstergesi olan doku MDA düzeyleri anlamlık düzeyine ulaşmamakla birlikte arttı. E+O grubunda ise MDA düzeyi sadece oleik asit uygulanan gruba kıyasla anlamlı olarak azaldı ve kontrol grubu düzeylerine indi. Literatürde OA'le oluşturulan akut akciğer hasarında serbest radikallerin yeri konusunda hala tartışmalar mevcuttur. Bazı çalışmalarölçülebilir serbest radikallerin daha geç dönemde nötrofil birikimine sekonder ortaya çıktığını ileri sürmektedir (McGuigan et al., 2003). Bu nedenle ilk saatlerde serbest radikallerin artmadığı, buna bağlı olarak oksidatif hasarın başlangıç aşamasında etkili olmadığı (McGuigan et al., 2003), polimorfonükleer lökosit göçüne sekonder artan süperoksitin ancak ilerleyen saatlerde oksidan hasarı oluşturduğu belirtilmektedir (Dickey, Thrall, McCormick, & Ward, 1981; Salman et al., 2014). Ayrıca tavşanlarda yapılan bir çalışmada OA enjeksiyonundan 10-12 saat sonra nötrofil birikiminin görüldüğü belirtilmektedir (Zhu et al., 1998). Bununla birlikte biz çalışmamızda sıçanların akciğerinde OA enjeksiyonundan yaklaşık 4 saat sonra yoğun nötrofil ve makrofaj artışı gözledik. Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde Akella ve ark. 50 mikrolitre OA enjekte ettikleri sıçanların akciğerlerinde ikinci saatte infiltratif hücre artışını tesbit etmişlerdir. Bu fark olasılıkla kullanılan deney hayvanı farkından kaynaklanıyor olabilir. Bir diğer yanda, literatürde OA enjeksiyonundan hemen sonra reaktif oksijen radikallerinin arttığını ve 30.dk' da pik yaptığını gösteren çalışmalar da vardır (Liu, Zhang, Zhao, & Zhao, 2004). Biz de literatürdeki bu çalışmalarla uyumlu olarak OA uygulanan grupta doku MDA düzeylerini anlamlı olmamakla birlikte artmış bulduk. Erdosteinön-uygulaması ise MDA düzeylerini azalttı. Benzer şekilde protein karbonil düzeylerininliteratürle uyumlu olarak OA uygulanan grupta anlamlı olarak artarken E+O grubunda azalmış ve kontrol grubu değerlerine yaklaşmış olarak bulduk(Önal Ö., 2011). Ancak E+O grubu ile O grubu arasında anlamlı fark oluşmadı.

Hücre içi anti-oksidan savunma sistemleri incelendiğinde ise literatürle uyumlu olarak, OA uyguladığımız sıçanlarda SOD, Gpx ve katalaz aktivitesinde belirgin azalma gözledik (Önal Ö., 2011).Erdostein ön-uygulaması yapılan grupta ise özellikle katalaz ve Gpx

olmak üzere her üç enzim aktivitesini artmış bulduk. Yalnızca erdosteine verilen grupta ise enzim aktiviteleri açısından kontrole arasında bir fark oluşmadı. MDA düzeyini ise kontrole kıyasla anlamlı olmamakla birlikte azalttı. Erdosteine bloklanmış iki sülfidril grubu içermektedir. Bu sülfidril grupları karaciğerde gerçekleşen metabolizma sonrası serbestleşmektedir ve ancak bundan sonra serbest radikal süpürücüsü olarak görev yapmaktadırlar (Dechant & Noble, 1996; Scuri et al., 1988). OA enjeksiyonunu takiben artan nötrofil ve makrofajların ürettikleri superoksit SOD enzimi ile hidrojen peroksit çevrilmektedir. Eğer SOD enzim aktivitesinde bir azalma gerçekleşecek olursa bu süperoksit anyonunun arışına ve hücre hasara neden olacaktır (Fadillioğlu & Erdoğan, 2003). Ayrıca oluşan hidrojen peroksit de hücre için toksiktir. Katalaz ve Gpx enzimleri ile suya indirgenmelidir. Yine bu enzimlerdeki aktivite azalması hücre hasarını artırır. Çalışmamızda OA uygulamasından bir saat önce verilen erdosteine, bu üç enzimin aktivitesini artırarak hücre hasarı önlemiştir. Bunun yanında nötrofil ve makrofaj birikimini de önleyerek ve dolayısıyla süperoksit anyonu oluşumunu azaltarak akciğerler üzerinde koruyucu etki göstermiştir

Özetle oleik asitle başlatılan akut akciğer hasarında tek doz erdosteine ön-uygulaması yaptığımız grupta, erdosteine hem nötrofil ve makrofaj birikimini önleyerek, hem de hücre içi anti-oksidan enzimleri artırarak akciğerleri korumuştur. Ayrıca sadece erdosteine uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla herhangi bir farka rastlanılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmamızda akut akciğer hasarı gelişme riski olabilecek hastalara profilaktik erdosteine uygulaması için klinik araştırmalara öncülük yapılabilir.

## 6. REFERANSLAR

- Aebi, H. (1974). *Catalase*. Book. Methods of enzymatic analysis., (p.673–7). Academic Press, New York: .
- Akella, A., Sharma, P., Pandey, R., & Deshpande, S. B. (2014). Characterization of oleic acid-induced acute respiratory distress syndrome model in rat. *Indian Journal of Experimental Biology*, 52(7), 712-719.
- Bernard, G. R., Artigas, A., Brigham, K. L., Carlet, J., Falke, K., Hudson, L., . . . Zapol, W. (1994). The American-European Consensus Conference on Ards - Definitions, Mechanisms, Relevant Outcomes, and Clinical-Trial Coordination. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 149(3), 818-824.
- Bulmus, F. G., Gursu, M. F., Muz, M. H., Yaman, I., Bulmus, O., & Sakin, F. (2013). Protective Effects of Alpha-Lipoic Acid on Oleic Acid-Induced Acute Lung Injury in Rats. *Balkan Medical Journal*, 30(3), 309-314. doi:10.5152/balkanmedj.2013.8426
- Dal Negro, R. W. (2008). Erdosteine: Antitussive and anti-inflammatory effects. *Lung*, 186, S70-S73. doi:10.1007/s00408-007-9065-3
- Dechant, K. L., & Noble, S. (1996). Erdosteine. *Drugs*, 52(6), 875-881. doi:Doi 10.2165/00003495-199652060-00009
- Demiralay, R., Gursan, N., & Erdem, H. (2006). The effects of erdosteine, N-acetylcysteine, and vitamin E on nicotine-induced apoptosis of pulmonary cells. *Toxicology*, 219(1-3), 197-207. doi:10.1016/j.tox.2005.11.020
- Derks, C. M., & Jacobovitzderks, D. (1977). Embolic Pneumonopathy Induced by Oleic-Acid - Systematic Morphologic Study. *American Journal of Pathology*, 87(1), 143-158.
- Dickey, B. F., Thrall, R. S., McCormick, J. R., & Ward, P. A. (1981). Oleic-Acid-Induced Lung Injury in the Rat - Failure of Indomethacin Treatment or Complement Depletion to Ablate Lung Injury. *American Journal of Pathology*, 103(3), 376-383.
- Dokuyucu, R., Karateke, A., Gokce, H., Kurt, R. K., Ozcan, O., Ozturk, S., . . . Duru, M. (2014). Antioxidant effect of erdosteine and lipoic acid in ovarian ischemia-reperfusion injury. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 183, 23-27. doi:10.1016/j.ejogrb.2014.10.018
- Durak, I., Yurtarslanl, Z., Canbolat, O., & Akyol, O. (1993). A Methodological Approach to Superoxide-Dismutase (Sod) Activity Assay Based on Inhibition of Nitroblue Tetrazolium (Nbt) Reduction. *Clinica Chimica Acta*, 214(1), 103-104. doi:Doi 10.1016/0009-8981(93)90307-P
- Eiermann, G. J., Dickey, B. F., & Thrall, R. S. (1983). Polymorphonuclear Leukocyte Participation in Acute Oleic-Acid-Induced Lung Injury. *American Review of Respiratory Disease*, 128(5), 845-850.
- Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). Determination of Aldehydic Lipid-Peroxidation Products - Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186, 407-421.
- Fadillioglu, E., & Erdogan, H. (2003). Effects of erdosteine treatment against doxorubicin-induced toxicity through erythrocyte and plasma oxidant/antioxidant status in rats. *Pharmacological Research*, 47(4), 317-322. doi:10.1016/S1043-6618(03)00010-0
- Hayashi, K., Hosoe, H., Kaise, T., & Ohmori, K. (2000). Protective effect of erdosteine against hypochlorous acid-induced acute lung injury and lipopolysaccharide-induced neutrophilic lung inflammation in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52(11), 1411-1416. doi:Doi 10.1211/0022357001777414

- Lang, J. D., McArdle, P. J., O'Reilly, P. J., & Matalon, S. (2002). Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. *Chest*, 122(6), 314s-320s. doi:DOI 10.1378/chest.122.6\_suppl.314S
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., . . . Stadtman, E. R. (1990). Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods in Enzymology*, 186, 464-478.
- Liu, H. L., Zhang, D. L., Zhao, B. L., & Zhao, J. Y. (2004). Superoxide anion, the main species of ROS in the development of ARDS induced by oleic acid. *Free Radical Research*, 38(12), 1281-1287. doi:10.1080/10715760400006940
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Matute-Bello, G., Frevert, C. W., & Martin, T. R. (2008). Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295(3), L379-399. doi:10.1152/ajplung.00010.2008
- McGuigan, R. M., Mullenix, P., Norlund, L. L., Ward, D., Walts, M., & Azarow, K. (2003). Acute lung injury using oleic acid in the laboratory rat: establishment of a working model and evidence against free radicals in the acute phase. *Curr Surg*, 60(4), 412-417. doi:10.1016/S0149-7944(02)00775-4
- Moretti, M., & Marchioni, C. F. (2007). An overview of erdosteine antioxidant activity in experimental research. *Pharmacological Research*, 55(4), 249-254. doi:10.1016/j.phrs.2006.12.006
- Önal Ö., E. A., Akinci S.B., Erden G., Karabulut I., Zeybek N.D., Fadillioglu E., Müftüoglu S., Saricaoglu F., Balkanci Z.D., Baser K.H.C., Aypar Ü. (2011). The Effect Of Carvacrol In Oleic Acid Induced Acute Lung Injury In Rats. *Journal of Anesthesia*, 19(2), 90-98.
- Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 70(1), 158-169.
- Ranieri, V. M., Rubenfeld, G. D., Thompson, B. T., Ferguson, N. D., Caldwell, E., Fan, E., . . . Force, A. D. T. (2012). Acute Respiratory Distress Syndrome The Berlin Definition. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 307(23), 2526-2533. doi:10.1001/jama.2012.5669
- Repine, J. E. (1992). Scientific Perspectives on Adult Respiratory-Distress Syndrome. *Lancet*, 339(8791), 466-469.
- Rylander, C., Hogman, M., Perchiazzi, G., Magnusson, A., & Hedenstierna, G. (2004). Oleic acid lung injury: a morphometric analysis using computed tomography. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 48(9), 1123-1129. doi:10.1111/j.1399-6576.2004.00482.x
- Salman, A. E., Yetisir, F., Kilic, M., Onal, O., Dostbil, A., Zeybek, D., . . . Unver, S. (2014). The impact of pretreatment with bolus dose of enteral glutamine on acute lung injury induced by oleic acid in rats. *Journal of Anesthesia*, 28(3), 354-362. doi:10.1007/s00540-013-1745-y
- Schuster, D. P. (1994). Ards - Clinical Lessons from the Oleic-Acid Model of Acute Lung Injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 149(1), 245-260.
- Scuri, R., Giannetti, P., & Paesano, A. (1988). Effect of Erdosteine and Its Metabolites on Tracheo-Bronchial Mucus Production and Transport. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 14(11), 693-698.

- Sun, Y., Oberley, L. W., & Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 34(3), 497-500.
- Tutanc, M., Arica, V., Yilmaz, N., Nacar, A., Zararsiz, I., Basarslan, F., . . . Nacar, E. (2012). Effects of erdosteine on cyclosporin-A-induced nephrotoxicity. *Hum Exp Toxicol*, 31(6), 565-573. doi:10.1177/0960327111417907
- Ulrich, K., Stern, M., Goddard, M. E., Williams, J., Zhu, J., Dewar, A., . . . Alton, E. W. F. W. (2005). Keratinocyte growth factor therapy in murine oleic acid-induced acute lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 288(6), L1179-L1192. doi:10.1152/ajplung.00450.2004
- Zhu, G. F., Sun, B., Niu, S. F., Cai, Y. Y., Lin, K., Lindwall, R., & Robertson, B. (1998). Combined surfactant therapy and inhaled nitric oxide in rabbits with oleic acid-induced acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 158(2), 437-443.