

**T.C.**  
**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI**  
**ANABİLİM DALI**

**YAVRU SIÇANLARDA ENDOTOKSEMİ İLE OLUŞAN**  
**AKUT AKCİĞER HASARINDA İNTRANAZAL RHO KİNAZ**  
**İNHİBİTÖRÜ Y-27632’NİN PULMONER APOPTOZİSE**  
**ETKİSİ**

**Dr. Mustafa Kemal DAĞDELEN**  
**UZMANLIK TEZİ**

**İZMİR-2010**

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI

YAVRU SIÇANLARDA ENDOTOKSEMİ İLE OLUŞAN  
AKUT AKCİĞER HASARINDA İNTRANAZAL RHO KİNAZ  
İNİHİTÖRÜ Y-27632’NİN PULMONER APOPİTOZİSE  
ETKİSİ

Dr. Mustafa Kemal DAĞDELEN  
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Durgül ÖZDEMİR

İZMİR-2010

## TEŞEKKÜR

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları uzmanlık eğitimim süresince eğitimime katkıda bulunan hocalarıma, tezimi hazırlarken, tecrübesi ve deneyimi ile her türlü desteğini ve emeğini esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Durgül Özdemir'e, yardımlarından dolayı Histoloji ve Embriyoloji ABD'den Doç. Dr. Kazım Tuğyan ve Dr. Serap Çilaker'e, Deney Hayvanları ABD'den Doç. Dr. Ensari Güneli'ye teşekkür ederim.

Asistanlık eğitimim süresince bana güç veren aileme, tüm zorluklara dayanmam için bana destek olan, her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim Nesrin'e ve hayatıma anlam veren biricik oğlum Oğuz'a teşekkür ederim.

Dr. Mustafa Kemal Dağdelen

# İÇİNDEKİLER

## TEŞEKKÜR

TABLO/ ŞEKİL/ FOTOĞRAF LİSTESİ.....	III
KISALTMA LİSTESİ.....	V
ÖZET .....	VI
ABSTRACT .....	VIII
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Sepsis .....	3
2.2. AAH/ARDS tanımı.....	3
2.2.1. ARDS Epidemiyolojisi .....	3
2.2.2.ARDS Patofizyolojisi.....	4
2.2.3. ARDS Patolojisi.....	4
2.2.3.1. Eksudatif Evre.....	5
2.2.3.2. Proliferatif Evre .....	5
2.2.3.3. Fibrotik Evre .....	7
2.2.4. ARDS patogeneğinde Apoptozis .....	7
2.2.4.1.TNF Aracılı Apoptozis .....	9
2.3. Rho/Rho kinaz Ailesi .....	11
2.3.1. Rho/Rho kinaz Yolunun Organ Sistemlerine Etkileri .....	12
2.3.2. Rho kinaz Ailesi ve TNF Aracılı Apoptozis .....	13
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	15
3.1.Histolojik İnceleme .....	18
3.1.1.İşık Mikroskopisi .....	18
3.1.2.Hematoksilen-Eozin Boyama.....	18
3.1.3.TUNEL Yöntemi .....	18

<b>3.1.4.İndirek İmmunohistokimyasal Yöntem .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.5.Elektron Mikroskopik Doku Takibi.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.6.Işık Mikroskopik Bulguları Değerlendirme Yöntemi.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.İstatistiksel Analiz.....</b>	<b>20</b>
<b>4.BULGULAR .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1.Genel Gözlemler.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1.1. Elektron Mikroskopi Bulguları .....</b>	<b>21</b>
<b>4.2.Hematoksilen-Eozin Boyama Bulguları.....</b>	<b>23</b>
<b>4.3.TUNEL Boyama Bulguları .....</b>	<b>27</b>
<b>4.4.Caspase-3 Boyama Bulguları.....</b>	<b>29</b>
<b>5.SONUÇLAR .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1.Kontrol Grubu ile AAH Grubunun Karşılaştırılması.....</b>	<b>33</b>
<b>5.2.Kontrol Grubu ile Tedavi Grubunun Karşılaştırılması .....</b>	<b>33</b>
<b>5.3.AAH Grubu ile Tedavi Grubunun Karşılaştırılması.....</b>	<b>34</b>
<b>5.4.İntranazal ve İntraperitoneal Grupların Karşılaştırılması.....</b>	<b>34</b>
<b>6.TARTIŞMA .....</b>	<b>36</b>
<b>7.SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>41</b>
<b>8.KAYNAKLAR.....</b>	<b>42</b>

## TABLO/ŞEKİL /RESİM LİSTESİ

<b>Şekil 1:</b> Apoptozise yol açan TNF sinyal yolu .....	10
<b>Şekil 2 :</b> Rho-aracılı endotel hücre iskeleti düzenlenmesi ve mikrotübül depolarizasyonu ile indüklenen bariyer fonksiyonu.....	12
<b>Resim 1:</b> İntraperitoneal ilaç uygulama yöntemi.....	16
<b>Resim 2:</b> İntranazal ilaç uygulama yöntemi .....	16
<b>Resim 3:</b> Sakrifikasyon sonrası çıkarılan akciğer dokusu örneği.....	17
<b>Resim 4:</b> A1 grubu elektron mikroskopi görüntüsü.....	21
<b>Resim 5:</b> A2 grubu elektron mikroskopi görüntüsü.....	22
<b>Resim 6:</b> B1 grubu elektron mikroskopi görüntüsü.....	22
<b>Resim 7:</b> B2 grubu elektron mikroskopi görüntüsü.....	23
<b>Grafik 1:</b> A(intranazal) ve B(intraperitoneal) gruplarının histolojik dereceleri. Dikey sütun histolojik dereceyi göstermekte .....	24
<b>Resim 8:</b> Grupların histolojik görüntüsü, sol sütun yukarıdan aşağıya doğru A1,A2 ve A3 grubu, sağ sütun yukarıdan aşağıya doğru B1, B2 ve B3 grubu .....	25
<b>Resim 9:</b> Grupların TUNEL boyama görüntüsü, sol sütun yukarıdan aşağıya doğru A1,A2 ve A3 grubu, sağ sütun yukarıdan aşağıya doğru B1, B2 ve B3 grubu .....	26
<b>Grafik 2:</b> A(intranazal) ve B(intraperitoneal) gruplarının TUNEL boyama sonuçları. Dikey sütun TUNEL pozitif hücre sayısını göstermekte .....	27
<b>Resim 10:</b> Grupların caspase-3 boyama görüntüsü, sol sütun yukarıdan aşağıya doğru sırayla A1,A2 ve A3 grubu, sağ sütun yukarıdan aşağıya doğru sırayla B1, B2 ve B3 grubu.....	28
<b>Grafik 3:</b> A(intranazal) ve B(intraperitoneal) grubunun caspase-3 boyanan hücre sayıları .....	29
<b>Tablo 1:</b> Grupların histopatolojik derecelendirmesi ortalama ve ortanca değerleri.....	30

**Tablo 2:** Grupların TUNEL pozitif boyanan hücre sayılarının ortalama ve ortanca değerleri.....31

**Tablo 3:** Grupların caspase-3 pozitif boyanan hücre sayılarının ortalama ve ortanca değerleri.....32

## **KISALTMA LİSTESİ**

**LPS:** Lipopolisakkarid

**AAH:** Akut Akciğer Hasarı

**ARDS:** Akut Respiratuar Distres Sendromu

**TUNEL:** Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling

**kD:** Kilo dalton

**GTPaz:** Guanozin trifosfataz

**NADPH:** Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

**TNF:** Tümör Nekrozis Faktör

**DNA:** Deoksiribonükleik asit

**GM-CSF:** Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör

**PAF:** Trombosit Aktive Edici Faktör

**FAS/FASL:** Fibroblast ilişkili Ligand

**ASK-1:** Apoptozis Sinyal Düzenleyici Kinaz 1

**TNFR 1-2:** Tümör Nekrozis Faktör Reseptör 1-2

**LT:** Lenfotoksin

**TRAIL:** TNF Bağımlı Apoptozis İndükleyici Ligand

**DR3L:** Ölüm Reseptörü 3 Ligand

**FADD:** Fas İlişkili Ölüm Alanı ile İlişkili Protein

**TRADD:** Tümör Nekrozis Faktör İlişkili Ölüm Alanı ile İlişkili Protein

**RIP:** Reseptör İlişkili Protein

**NaCl:** Sodyum Klorür



## ÖZET

### **Yavru Sıçanlarda Endotoksemi ile Oluşan Akut Akciğer Hasarında İntranazal Rho kinaz İnhibitörü Y-27632'nin Pulmoner Apoptozise Etkisi**

**Amaç:** Sepsis akut akciğer hasarı ve akut respiratuar distres sendromu için en büyük risk faktörüdür. Endotokseminin oluşturduğu akut akciğer hasarı (AAH) patogenezinden artmış pulmoner hücre apoptozisi sorumlu tutulmaktadır. Bu çalışmada, endotoksemi ile oluşturulan deneysel akut akciğer hasarı modelinde intranazal Rho kinaz inhibitörü Y-27632'nin pulmoner hücre apoptozisine etkisinin değerlendirilmesi amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Toplam kırk iki yavru sıçan, 2 deney grubuna randomize olarak ayrıldı: (A)İntranazal grup; (B)İntraperitoneal grup. Herbir grup üç altgruba ayrıldı: (1)Kontrol grubu; (2)Akut akciğer hasarı grubu; (3) Akut akciğer hasarı + tedavi grubu. Sıçanlarda endotoksemi, intraperitoneal olarak lipopolisakkarid (*Escherichia coli* lipopolysaccharide LPS serotype 0111:B4; 10 mg/kg) verilerek oluşturuldu. Rho kinaz inhibitörü (Sigma Chemical, St Louis, MO) serum fizyolojik solüsyonunda çözünüp, seyreltildi. İntraperitoneal ve intranazal olarak 5 mg/kg üç kez, LPS enjeksiyonundan hemen sonra, LPS enjeksiyonundan 8 saat sonra ve LPS enjeksiyonundan 16 saat sonra uygulandı. Kontrol ve akut akciğer hasarı alt gruplarına Y-27632 yerine sadece aynı volümde serum fizyolojik verildi. LPS enjeksiyonundan 24 saat sonra, yavru sıçanlar sakrifiye edilerek akciğer dokuları hemotoksilen eozin, TUNEL ve caspase-3 boyası ile histopatolojik olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Lipopolisakkarit enjeksiyonunun, yavru sıçanlarda belirgin akciğer hasarı ve pulmoner apoptozise yol açtığı görüldü. İntranazal grubun akut akciğer hasarı alt grubunda, histolojik derece anlamlı düzeyde yüksek saptandı. TUNEL ve caspase-3 boyası ile bu altgrupta apoptozisin anlamlı oranda arttığı görüldü. İntranazal grubun tedavi alt grubunda, histolojik derecenin, TUNEL ve caspase-3 boyası ile boyanan apoptotik hücrelerin anlamlı oranda azaldığı saptandı. İntraperitoneal grubun akut akciğer hasarı alt grubunda, histolojik derece anlamlı düzeyde yüksek saptandı. TUNEL ve caspase-3 boyası ile bu altgrupta apoptozisin anlamlı oranda arttığı görüldü. İntraperitoneal grubun tedavi alt grubunda, histolojik derecenin, TUNEL ve caspase-3 boyası ile boyanan apoptotik hücrelerin anlamlı oranda azaldığı saptandı. Rho kinaz inhibitörü Y-27632'nin, intranazal ve intraperitoneal gruplar kendi içlerinde değerlendirildiğinde iki yöntemin de etkin olduğu görüldü. İntranazal

ve intraperitoneal grupların tedavi altgrupları karşılaştırıldığında, histolojik derece ve TUNEL boyama açısından arada fark saptanmadı. İntraperitoneal grubun tedavi alt grubunda caspase-3 pozitif boyanan hücre sayısı intranazal grubun tedavi alt grubuna göre daha düşüktü ve bu sonuç da istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p=0.002$ ).

**Sonuç:** Rho kinaz yolağının AAH'da pulmoner apoptozisin düzenlenmesinde önemli rolü vardır. Bu çalışmada, yavru sıçanlarda endotoksemi ile oluşan akut akciğer hasarı modelinde rho kinaz inhibitörünün intranazal ve intraperitoneal uygulanmasının apoptozis inhibisyonu üzerine benzer etki yaptığı görülmüştür. Rho kinaz inhibitörünün intranazal kullanımını gerek kullanım kolaylığı gerekse düşük sistemik yan etki profili nedeniyle endotoksemi ile oluşan AAH'da umut vaad edici tedavi seçeneği olabilir.

**Anahtar kelimeler:** Sepsis, akut akciğer hasarı, akut respiratuar distres sendromu, Rho kinaz inhibitörü, apoptozis

## ABSTRACT

### **The Effect of Intranasal Rho Kinase Inhibitor Y-27632 on Pulmonary Apoptosis in Endotoxemia-Induced Acute Lung Injury in Infant Rats**

**Background and Aims:** Sepsis is the leading clinical risk factor for acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS). Increased pulmonary cell apoptosis is responsible for the pathogenesis of endotoxemia-induced acute lung injury. The aim of this study is to evaluate the efficiency of intranasal Rho kinase inhibitor, Y-27632 on pulmonary apoptosis in endotoxemia-induced acute lung injury.

**Material and Methods:** Forty-two infant rats were randomised to two experimental groups: (A) Intranasal group; (B) Intraperitoneal group. Each group has three subgroups: (1) Control group; (2) Acute lung injury group; (3) Acute lung injury + therapy group. Endotoxemia was induced in rats by intraperitoneal (i. p.) injection of lipopolysaccharide (*Escherichia coli* LPS serotype 0111:B4; 10 mg/kg). Rho kinase inhibitor (Sigma Chemical, St Louis, MO) was dissolved and diluted with physiological saline. It was administered both intraperitoneal and intranasal 5 mg/kg at three times, just after LPS injection, 8 hours after LPS injection and 16 hours after LPS injection. The control and LPS groups received only physiological saline in the same volume, instead of Y-27632. Infant rats were sacrificed on the 24th hour of LPS injection and lung tissue samples were assessed by TUNEL, caspase-3 and hematoxylin eosin histopathologically.

**Results:** Lipopolysaccharide injection caused evident pulmonary injury and apoptosis in rat lung. In acute lung injury subgroup of intranasal group, histologic grade was significantly high. Apoptosis was significantly high with TUNEL and caspase-3 stain in this subgroup. Both in intranasal and intraperitoneal groups, subgroup of ALI has lower histological grade than the therapy subgroup and it is statistically significant. The number of TUNEL-positive and caspase-3-positive cell count and histologic grade was detected fewer in the therapy subgroup of intranasal group and this finding is statistically significant. In ALI subgroup of intraperitoneal group, histologic grade detected significantly high. In this subgroup apoptosis

was significantly high with TUNEL and caspase-3 stain. In the therapy subgroup of intraperitoneal group, hystologic grade and the number of apopitotic cells stained with TUNEL and caspase-3 were significantly low. Intranasal and intraperitoneal administration of Rho kinase inhibitor, Y-27632 was found effective in each group. Comparing the therapy subgroups of intranasal and intraperitoneal groups there was no significant difference for hystologic grade and TUNEL stain. The number of caspase-3 positive cells in the therapy subgroup of Intraperitoneal group was significantly lower than the therapy subgroup of intranasal group (p=0.002).

**Conclusion:** Rho kinase pathway has a important role for the regulation of pulmonary apoptosis in acute lung injury. In this study, it was found that intranasal and intraperitoneal administration of Rho kinase inhibitor has similar effect on apoptosis inhibition in endotoxemia-induced acute lung injury in infant rats. Intranasal administration of Rho kinase inhibitor has both low systemic side effect profile and easy usage so it gives hope to be a new alternative therapeutic agent.

**Keywords:** Sepsis, acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, Rho kinase inhibitor, apoptosis

## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

Çocukluk çağında akut respiratuar distres sendromu (ARDS) önemli bir hastalık ve ölüm nedeni olmaya devam etmektedir. Günümüzde geniş olanaklara sahip yoğun bakım ünitelerinin varlığına karşın ARDS'ye bağlı ölüm oranı % 40-60 olarak bildirilmektedir. ARDS'ye yol açan akut akciğer hasarı; bilateral pulmoner infiltrasyon, hipoksemi, nötrofil sekestrasyonu, pulmoner ödem, intravasküler koagülasyon ve endotelyal-epitelyal hücre apoptozisi ile karakterizedir (1-3).

Sepsis, akut akciğer hasarı veya ARDS açısından en önemli klinik risk faktörüdür (4). Gram negatif organizma endotoksininin patogenetik olarak septik ARDS ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (5). Endotokseminin oluşturduğu akut akciğer hasarı patogenezinden artmış pulmoner hücre apoptozisi sorumlu tutulmaktadır. Yoğun bakım hastalarında yapılan çalışmalarda, akut akciğer hasarının artmış hücre ölümü ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (6-8). Deneysel sepsis ve ARDS modellerinde de, apoptozis inhibisyonunun yaşam oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterilmiştir (9-13).

Apoptozis programlı hücre ölüm sürecidir ve DNA fragmantasyonu, hücre volümünde azalma ve apoptotik hücrelerin fagositozisi ile sonuçlanmaktadır. ARDS patogenezinde önemli rol oynayan hücre apoptozisi ile ilişkili iki ana hipotez ileri sürülmektedir: (1) Nötrofilik hipotez, (2) Epitelyal hipotez. Nötrofillerdeki apoptozisin inhibisyonu ve apoptotik nötrofillerin makrofaj veya diğer fagositik hücreler tarafından temizlenmesinin inhibisyonu ARDS patogenezini kötüleştirici yönde etkileyebileceği ileri sürülmektedir. Apoptotik nötrofillerden salınan sitokinler akciğer hasarını arttırarak pulmoner hücre ölümünü yol açmaktadır. Epitelyal hipotez ise ARDS'de görülen epitelyal hasarın alveoler hücrelerin apoptotik ölümü ile ilişkili olduğunu ileri sürmektedir.

Rho monomerik, 21 kD molekül ağırlığında, küçük bir GTPaz'dır. Rho ve efektörü Rho kinaz düz kas kontraksiyonu, hücre adezyon ve migrasyonu, sitokinezis ve gen ekspresyonu gibi bir çok hücre fonksiyonunda önemli rol almaktadırlar. Rho kinaz, NADPH oksidaz aktivasyonu aracılığı ile nötrofillerde reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu da düzenlemektedir (14-18). Deneysel ve klinik araştırmalarda, Rho kinazın bir çok kardiyovasküler hastalık patogenezi ile ilişkili olduğu ve Rho kinaz inhibisyonunun düz kas gevşemesi ile bronkodilatasyon ve vazodilatasyon sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca, Rho kinaz inhibisyonu subaraknoid kanama sonrası serebral vazospazm ve angina pectoris gibi iskemik

hastalıklarda da yararlı olduğu saptanmıştır. Son zamanlarda yayınlanan in vitro deneysel bir araştırmada, Rho kinazın kaspaz aktivasyonunu dñzenleyerek, pulmoner hñcrelerde TNF aracılı oluşan apoptozis açısından önemli olduğu gñsterilmiřtir. Rho GTPaz ve Rho kinazın hem farmakolojik hem de molekñler inhibisyonunun, pulmoner hñcre apoptozisini belirgin şekilde azalttığı saptanmıştır (19). Diğer bir gñncel araştırmada da, intravenñz *E. coli* endotoksini ile oluşturulan akut akciğer hasarı modelinde, bir Rho kinaz inhibitñrñ olan Y-27632 (10 mg/kg i.p.) uygulamasının akciğer parankimi içine nñtrofil migrasyonunu azalttığı saptanmıştır (20). Aynı araştırmanın in vitro deney kısmında Rho kinaz yolak inhibisyonunun TNF aracılı oluşan pulmoner hñcre hasarına karşı koruyucu olduğu gñsterilmiřtir. Klinik uygulama açısından dñřñnñldñėinde bu araştırma yeterli kanıt sağlamamaktadır, ñnkñ Rho kinaz inhibisyonunun hipotansiyon oluşturucu etkileri değerlendirilmemiş ve ayrıca Rho kinaz inhibitñrñ, endotoksin uygulamasından önce verilmiştir. Bir çok deneysel ve klinik araştırmada Rho kinaz inhibitorñnñn ağızdan veya intravenñz verilmesinin hipotansiyona yol açarken, inhalasyon yolu ile uygulamanın sistemik arteriyel kan basıncını etkilemediği gñsterilmiřtir (21-23).

Bu çalışmanın amacı, endotoksemi ile oluşturulan deneysel akut akciğer hasarı modelinde intranazal Rho kinaz inhibitñrñ Y-27632'nin pulmoner hñcre apoptozisine etkisini değerlendirmektir.

## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1.Sepsis**

Sepsis, ciddi enfeksiyonla komplike olan ve sistemik inflamasyon ve yaygın doku hasarı ile karakterize bir klinik durumdur (24). Bakteriyemi ve mikroorganizmanın kendisi ya da toksik ürünlerinin neden olduğu belirti ve bulguların bütünü olup, enfeksiyona karşı geliştirilen sistemik inflamatuvar bir cevaptır. Bir başka deyişle sepsis, patojenler ve konakçı savunma mekanizmaları arasındaki kompleks etkileşimden doğan bir sendromdur. Bu sendromda, inflamasyon asıl konakçı cevabı olmasına rağmen sepsisin başlangıcı ve progresyonu konusundaki güncel yaklaşımlar, normal cevabın düzenlenmesinde varolan sorunlara odaklanmaktadır. Bu durum, masif ve kontrolsüz proinflamatuvar mediatorler salarak yaygın doku hasarına yol açan olaylar zincirini başlatırlar (24). Ciddi sepsis vakalarının yaklaşık % 30'unda pulmoner disfonksiyon görülür (37).

### **2.2. Akut Akciğer Hasarı (AAH)/ARDS Tanımı**

ARDS(akut respiratuvar distres sendromu) tanımı ilk kez, akciğer kaynaklı ya da akciğer dışı kaynaklı inflamatuvar nedenlere bağlı olarak gelişmiş ciddi hipoksemi, azalmış akciğer kompliansı ve göğüs radyografisinde bilateral yeni infiltratlarla karakterize bir terim olarak Ashbaugh ve arkadaşları tarafından 1967 yılında yapılmıştır. AAH(akut akciğer hasarı) tanımı hemen hemen ARDS tanımı ile aynıdır. Tek farkı ARDS'de hipoksemi daha ağırdır. AAH/ARDS, akciğer kaynaklı ya da akciğer dışı kaynaklı inflamatuvar bir sürece bağlı olarak gelişir. Çocukluk çağında, AAH/ARDS vakalarının % 34'ünde sebep septik şoktur (39).

#### **2.2.1.ARDS Epidemiyolojisi**

ARDS tanısı alan çocuklarda etiyolojinin üçte birini sepsisli hastalar oluşturur. Özellikle sepsis zemininde gelişen ARDS tablosunda mortalite daha yüksektir (6). Yoğun bakımda yatan çocuklarda yapılan ulusal bir çalışmada, 25 merkezde toplam 12018 hastadan 7269 tanesinin ciddi hastalık belirtisi gösterdiği ve bunların %1,44'ünde (n:105) ARDS tablosunun geliştiği ve ARDS gelişen hasta grubunda da mortalitenin %61 olduğu

saptanmıştır. Bu hastalarda ARDS etyolojilerine bakıldığında %80'inde sepsis veya pnomoni olduğu görülmüştür (30).

Çocuk yoğun bakım ünitelerine kabul edilen hastaların yaklaşık % 40'ında mekanik ventilasyon ihtiyacı vardır, mekanik ventilasyon ihtiyacı gösteren çocukların % 9'unda akut akciğer hasarı gelişir ve bu grubun % 80'inde hipoksi ağırlaşarak ARDS'ye dönüşür. AAH'nın mortalitesi %18 ile %27 arasındadır. ARDS'ye ilerlemiş AAH'nın mortalitesi %29 ve %50 arasında değişir (39).

### **2.2.2.ARDS Patofizyolojisi**

ARDS kontrolsüz bir sistemik inflamatuvar yanıt sonucunda oluşur. Yapılan çalışmalarda inflamatuvar hücrelerden salınan sitokinlerin ve hücrel mediyatörlerin ARDS patofizyolojisinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. ARDS'li hastalarda bronkoalveolar sıvıdaki hücrelerin %80'ini nötrofiller oluşturmaktadır. Akut inflamatuvar sürecin oluşması sonrasında pulmoner epitelyal hücreler, vasküler endotelyal hücreler, nötrofiller ve stromal hücrelerden salınan sitokin ve hücrel moleküller ile nötrofiller aktive olur ve saatler içerisinde inflamasyon bölgesine ulaşır. Bu sitokin ve moleküllerden en önemlileri kemotaktik molekülleri, nötrofil aktivasyonunu ve anjiyogenezisi güçlü şekilde uyaran IL8, endotoksine yanıt olarak salgılanan, akciğerde nötrofil sekestrasyonunu, degranülasyonunu ve sitokin salınımını başlatan TNF $\alpha$  ve hem endotel adezyon moleküllerinin hem de nötrofiller ve monositler için kemotaktik faktörlerin sentezini arttıran IL1 $\beta$ 'dir. Akciğere ulaşan aktive nötrofillerden salınan oksidatif metabolit ve proteolitik enzimler epitelyal ve endotelyal hasarı artırır. Bunun sonucunda bariyer fonksiyonu kaybolur, kapiller geçirgenlik artar, gaz değişimi bozulur (57,58).

### **2.2.3.ARDS Patolojisi**

Akut respiratuvar distres sendromunda asıl patoloji alveolokapiller ünitedeki hasarlanmadır. Bu hasarlanma sonucu intravasküler sıvı damar dışına kaçar ve pulmoner ödem gelişir. Zaman ilerledikçe ödem yerini hücrel nekroz, epitelyal hiperplazi, inflamasyon ve fibroza bırakır. Alveolokapiller hasarlanma eksudatif, proliferatif ve fibrotik evre olarak 3 aşamada gerçekleşir (57,58).



### **2.2.3.1. Eksudatif Evre**

Pulmoner arteriyolde fibrin, nötrofil ve platelet birikimi ve kapiller konjesyonla karakterize ilk 6 saatlik evredir. 12-24 saat içinde kapiller konjesyon ilerler ve periarteriyel-interstisyel hemoraji olur. 72. saatte hiyalin membran gelişir. Endotelyal hücrelerde ve alveolar epitelyal hücrelerde hasarlanma vardır. Eksudatif faza özgü histolojik özellikler, alveoler duktuslarda daha belirgin olan hiyalin membranlardır. Genelde hiyalin membranlar alveoler septumun ucuna yapışırlar ve komşu alveolün ağzını kapatırlar. Hiyalin membranlar endotelyal epitelyal bariyerde oluşan hasarı izleyerek alveoler boşluğa sızan plazma proteinleri ve hücresel debrislerden oluşurlar (31,57,58). İmmunohistokimyasal ve immunfloresan boyamalarda immunoglobulin, fibrinojen, surfaktan ve daha az miktarda komplemanın hiyalin membranı oluşturduğu , fibronektinin membranın yüzeyini az miktarda kapladığı gösterilmiştir (57,58).

Hiyalin membranların alveol kanal boyunca depolanmasının ve bu bölgede daha fazla hasar oluşmasının nedeni açık değildir, ama alveoler kanaldaki fazla miktardaki oksijenin patogenetik rolü olabileceği düşünülmektedir. Yaygın alveoler hasarın eksudatif fazında, endotelyal hücrelerin şişmesi, endotel arası bağlantılarda genişleme ve pinositik veziküllerde artış gibi endotelyal hasarın ultrastrüktürel delilleri vardır (32). Ciddi endotelyal hasar bulguları, hücresel nekroz ve bozulma, kapiller bazal membranın soyulması ve intravasküler fibrin depolanmasıdır. Kapiller içi nötrofillerin fokal agregasyonu belirgindir. Alveoler septum intertisyel ödem, fibrin ve ekstrasvaze olan eritrositler nedeniyle genişlemiştir. Alveoler epitelyumda tip 1 hücrelerinin aşırı nekrozu ve alveoler yüzeyden dökülmesi, çıplak bazal membran oluşumuna neden olur. Tip 2 hücrelerde de hasar ve nekroz söz konusudur. Alveoler epitelyal bariyerin kaybıyla, intertisyel sıvı alveol boşluğunun içine sızar. Eksudatif fazın ileri dönemindeki bu tipik histopatolojik görüntüye 'şok akciğeri' adı verilir (37).

### **2.2.3.2. Proliferatif Evre**

Akciğer hasarlanmasının ikinci veya üçüncü haftasında, epitelyal hücre proliferasyonu ile karakterizedir. Yaygın alveol hasarının proliferatif fazında, akut fazda oluşan alveol içi ve intertisyel eksudanın organizasyonu söz konusudur. Tip 2 hücrelerin alveoler septum boyunca

çoğalmaya başlaması ARDS'nin klinik bulgularının başlamasından üç gün sonra olabilir ve onuncu günde fibrozis belirebilir. Akciğerin genişleyemeyen, son dönem organa hızla dönüşümü ARDS'de yaşamı kısıtlayan faktördür (57,58).

Histolojik ve ultrastrüktürel olarak, epitelyal hücre yenilenmesi proliferatif fazın habercisidir, soyulmuş olan bazal membranı kaplamak için keratin içeren küboidal hücreler alveol duvarı boyunca uzanırlar. Bu hücrelerin çoğunda sitoplazmik lameller, cisimler ve yüzey mikrovillusları vardır ve immunohistokimyasal olarak bu bölgelerde surfaktan apoproteini boyanır ki bu tip 2 hücre dönüşümünün göstergesidir. Tip 2 hücrelerde tümör nekrozis faktör saptanabilir. Alveoler duvarda fibroblast ve miyofibroblastlar, çoğalarak alveoler bazal membranın hasarlanan yerlerinden fibrinöz alveol içi eksudaya geçerler. Fibroblastlar, eksudayı hücresele granülasyon dokusuna dönüştürürler ve kollajenin depolanmasıyla yoğun fibröz doku gelişir. Fibronektin proliferatif fazda eksudatif faza göre daha belirgin olarak fibrinöz eksudayı kaplar. Fibröz gelişim ARDS'de akciğer yeniden yapılanmasının en önemli mekanizmasıdır (33). Bu yeniden şekillenme olayı klasik pnömonide gerçekleşenle aynıdır ve akciğerlerin hasarlanmaya karşı verdiği özgün olan yanıtıdır (57,58).

ARDS'de fibröz yeniden şekillenmede iki ayrı morfogenetik mekanizma rol oynamaktadır. Alveoler duvarda fibroblastlar in situ olarak kollajen depolayarak alveol septumunun genişlemesine neden olur. Diğer mekanizma ise kollaps endurasyonu alveoler boşluğun ve duvarın fibroplazisi sonucu gelişir ve pulmoner interstisyel fibrozisin birçok formunda rol oynamaktadır. Alveolokapiller birimde gerçekleşen hasar sonucu alveoler duvarlar kısmen veya tamamen kollabe olur ve organize olan fibrin ve hiperplastik epitelyum ile kaplanır. Ultrastrüktürel olarak kollaps endurasyonu kalınlaşmış piramidal, alveoler duvarlarla karakterizedir. Özellikle alveol bazal membranı tutulur. Surfaktanın yapısal ve fonksiyonel bozuklukları ARDS'de alveoler kollapsa katkıda bulunan faktördür (34). Kollaps endürasyonunun net sonucu az ve daha büyük alveoller ve genişlemiş alveoler kanallardır. Travmatik ve septik şoka bağlı ARDS gelişen hastalarda yapılan ultrastrüktürel çalışmalar, akciğer yapısında ilerleyici bozulma göstermiştir (35). Akut eksudatif fazda interstisyel ödem nedeniyle interstisyel kompartmanın volümünde artış söz konusudur. Solunum yetersizliği başladıktan sonra alveoler epitelyum volüm yoğunluğunda azalma, hemen sonrasında epitelyal katta 2-3 kat artış gözlenmiştir. Tip 2 hücrelerin proliferasyon ve rejenerasyonu artar. Kapillerlerin hacmi eksudatif fazda azalır ve bu azalma proliferatif fazda devam eder.

Kantitatif olarak diğerk hücre populasyonları incelendiğinde erken fazda kapiller içi granulositler artarken, proliferatif fazda interstiyel fibroblastlar artar (57,58).

### **2.2.3.3. Fibrotik Evre**

Bu evrede alveolar septa ve hava boşluklarının duvarları kalınlaşır, konnektif doku ile kaplanır. ARDS başlangıcından sonra 3-4 hafta ventilatöre bağılı yaşayan hastalarda, akciğer tamamen kollajen doku ile yeniden şekillenmiştir. Makroskopik olarak plevral yüzeyde kaldırım taşı manzarası vardır. iyileşmiş abseler ve kronik interstiyel amfizem ek bulgulardır. Periferik bronşlarda dilatasyon vardır ve bunlar viseral plevral yüzeye çok yakındır (Traksiyon bronşektazileri). Mikroskopik olarak fibrotik evrede alveolar septa ve hava boşluk duvarları kalınlaşmış, nadiren hücre içeren konnektif doku ile kaplanmıştır. Hava boşlukları düzensiz olarak genişler. On dört günden uzun yaşayan hastalarda total kollajen artar ve hastalık süresince kollajen miktarında progresif artış gözlenir (57,58).

### **2.2.4. ARDS Patogeneğinde Apoptozis**

Apoptozis programlı hücre ölüm sürecidir. Fizyolojik bir olaydır. Embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik mekanizma ve programlı hücre ölümü vardır. Bazı hücreler yıllarca yaşarken bir kısmı sadece birkaç saat yaşarlar. Deri, gastrointestinal sistem ve immün sistem gibi pek çok dokuda devamlılık apoptozis ve hücre yenilenmesine bağılıdır. Dört evrede gerçekleşir; Sinyal evresi, kontrol ve regülasyon evresi, ölüm evresi ve ölen hücrenin fagositozu (37).

Sinyal evresinde hipoksi, ultraviyole radyasyon, toksinler, serbest radikaller ve çeşitli ilaçlar gibi iç ve dış uyarılar hücre içi sinyal sistemini apoptozisi başlatmak üzere uyarır. Hücre içi protein yıkımı başlar.

Kontrol ve regülasyon fazında eğer hücre sinyal kaskadını durdurursa apoptozise uğramaz, fakat sinyal kaskadı devam ederse, aktive kaspazlar mitokondri membranı geçirgenliğini değiştirir ve deoksiribonükleik asit yıkımına yol açan sitokrom c serbestleşir.

Ölüm fazında, kaspaz proteazlar nükleer DNA'yı yıkan enzimleri aktive eder. Kromatin kondansasyonu başlar, membran tomurcuklanması oluşur. Mitokondri gevşer, endoplazmik retikulum dilate olur.

Ölen hücrenin fagositozu evresinde, apoptotik cisimler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından fagosite edilir. Apoptozise uğrayan hücre inflamatuvar cevabı uyarmaksızın immün sistem hücreleri tarafından ortadan kaldırılır. Apoptozisin anormal regülasyonu, astım, amfizem ve ARDS patogeneğinde önemli rol oynar. Deneysel sepsis ve ARDS modellerinde de, apoptozis inhibisyonunun yaşam oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterilmiştir (9-13).

Sepsis/septik şok, akut akciğer hasarı veya akut respiratuvar distres sendromu açısından en önemli klinik risk faktörüdür. Gram negatif organizma endotoksini patogenetik olarak septik ARDS ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (5). Endotokseminin oluşturduğu akut akciğer hasarı patogeneğinden artmış pulmoner hücre apoptozisi sorumlu tutulmaktadır. Yoğun bakım hastalarında yapılan çalışmalarda, akut akciğer hasarının artmış hücre ölümü ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (6-8).

ARDS patogeneğinde önemli rol oynayan hücre apoptozisi ile ilişkili iki ana hipotez ileri sürülmektedir ;

*Nötrofilik hipotez:* Komplike olmamış pnömonili hastalarda akciğere olan nötrofil göçü akciğer hasarına yol açmaz. Bunun sebebi nötrofillerin aktive olmamasıdır. Normal bir inflamatuvar süreçte akciğer dokusuna ulaşan ve aktive olan nötrofiller, patojen elimine edildikten sonra hızlıca apoptozise uğrayarak elimine olur. ARDS'li hastalarda, inflamatuvar sürecin uzamasına bağlı olarak aktive nötrofillerin eliminasyonu gecikir. Antiapoptotik etkileri olan GM-CSF, IL8 ve IL2 bu gecikmede önemli rol oynar. Erken ARDS döneminde bu hücrel molekül ve sitokinlerin antiapoptotik etkisi en belirgindir. ARDS'nin ileri dönemlerinde bu antiapoptotik etki azalır. Apoptozisi inhibe eden hücrel moleküllerden GM-CSF'nin major rol oynadığı düşünülmektedir. ARDS'li hastalarda GM-CSF düzeyi yüksekliği konak savunmasını artırdığı ve pulmoner epitelyal hücreleri Fas-aracılı apoptozisten koruduğu için iyi prognozla ilişkili olduğu düşünülmektedir. GM-CSF'nin nötrofil apoptozisini PI3-k ve ekstraselüler ERK yolunu aktive ederek uyarır. Aktive nötrofillerden salgılanan oksidan ürünler, proteazlar, lökotrienler ve PAF(Trombosit aktive edici faktör) gibi proinflamatuvar moleküller akciğer zedelenmesine neden olur. Alveolar boşlukta proteinden zengin eksuda, surfaktan inaktivasyonuna yol açar. Klinik ve deneysel çalışmalar, ARDS'li hastaların pulmoner ödem sıvısı ve bronkoalveolar lavaj sıvısında nötrofil birikimi olduğunu göstermiştir. Bronkoalveolar sıvıdaki nötrofil sayısı, kötü prognoz

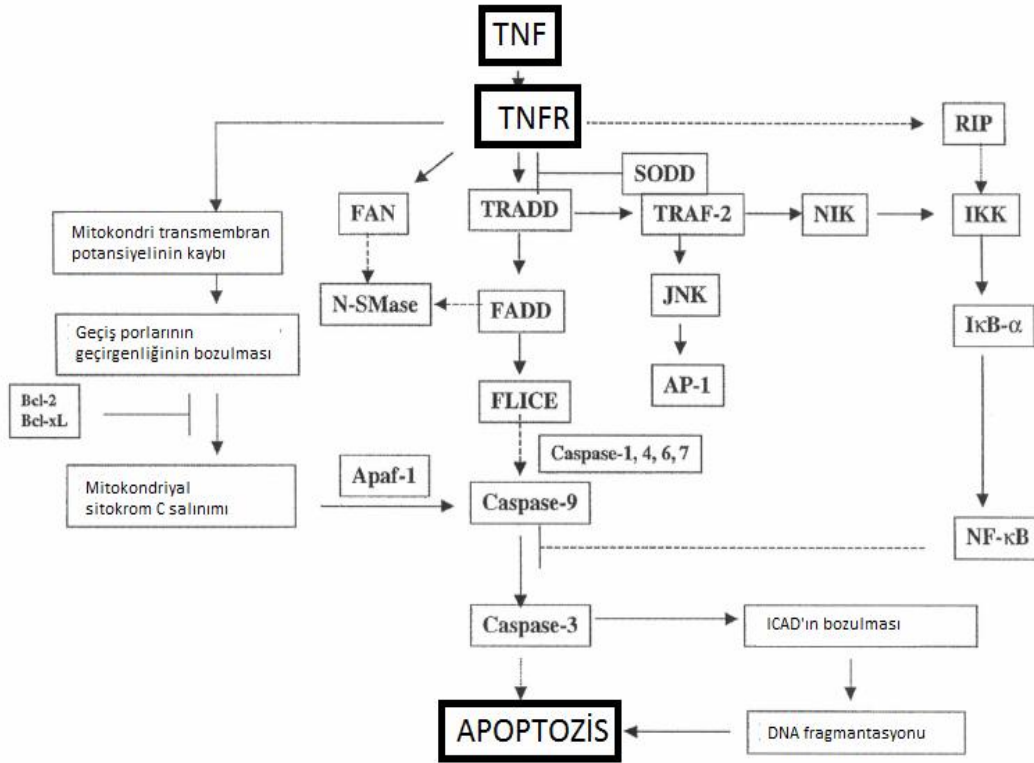
ile doğru orantılıdır. Erken dönem ARDS'li hastaların bronkoalveolar lavaj sıvılarından alınan örneklerin nötrofil apoptozisini geciktirdiği gösterilmiştir. Ayrıca bronkoalveolar lavaj sıvısında yüksek miktarda granülosit koloni stimüle edici faktör(GM-CSF) ve interlökin 8 saptanmıştır. İnsan nötrofilleri bu sıvı ile inkübe edildiğinde apoptozisin suprese edildiği gösterilmiştir. Nötrofillerin akciğeri zedeleyen ürünleri salgılamalarının yanısıra salgıladıkları hepatosit büyüme faktörü ve keratinosit büyüme faktörü, tip 2 pnömositler için potent büyüme faktörleridir (36,59).

*Epitelyal hipotez:* ARDS patogeneğinde alveolokapiller bariyerin hasarlanması önemli bir faktördür. Bu hasarlanmada mekanik faktörler, lokal iskemi ve bakteriyel ajanlar rol oynar. Alveolar epitelyal hücre apoptozisi de alveolokapiller bariyerin hasarlanmasında önemli bir etkidir. ARDS'nin erken döneminde tip 1 alveolar epitelyal hücrelerde, hücre boyutlarında azalma ve kromatin yoğunlaşması, DNA fragmantasyonu gözlenmiştir. Bu hücrelerde proapoptotik olan Bax ve Bcl-2 geni ürünlerinde önemli oranda artış saptanmıştır. ARDS nedeniyle ölen hastaların akciğer dokusunda, akciğer patolojisinden başka nedenle ölenlere oranla apoptozis göstergesi olan TUNEL, caspase-3, Bax ve p53 artmış olarak saptanmıştır. ARDS'li hastaların tip 2 alveolar epitelyal hücrelerinde apoptozisin FAS/FASL aktivasyonu ile indüklendiği bilinmektedir. FAS veya FASL spesifik inhibitörler ile Fas-FasL sisteminin bloke edilmesi ile apoptozisin inhibe edildiği gösterilmiştir (36,59). Sürfaktan protein A (SP-A)'nın tip II epitelyal hücre apoptozisini inhibe eder. O halde ARDS'li hastalarda surfaktan replasman tedavisi, apoptozis inhibisyonu yoluyla epitelyal hücre zedelenmesini azaltarak klinik olarak fayda sağlayabilir (36,59). Ayrıca TNF- $\alpha$ , anjiyostatin ve ASK-1 (apoptozis sinyal düzenleyici kinaz 1)'in endotelyal hücre zedelenmesi ve apoptozise neden olduğu bildirilmiştir (36,59). Bronkoalveolar lavaj sıvısının sitotoksik etkisinin, TNF- $\alpha$  ve anjiyostatin nötralizasyonu ile inhibe edildiği gösterilmiştir (36,59).

#### **2.2.4.1.TNF Aracılı Apoptozis**

Apoptosis çeşitli intrensek ve ekstrensek uyaranlarla başlatılabilmektedir. Apoptozisi başlatan mekanizmalar arasında en iyi bilinen ve üzerinde en çok çalışılan TNF süper ailesidir. Bu süperailenin 20'den fazla üyesi tanımlanmıştır. TNF ligandı, esas olarak reseptörleri TNFR-1 veya TNFR-2 ile bağlandığında apoptozisi aktive eder. TNFR-1(p60) ,

pek çok dokuda bu sinyalin aktivasyonundan ve iletiminden sorumlu iken TNFR-2(p80) , immün sistem hücrelerinde TNF bağımlı sinyalden sorumludur. TNF süper ailesinden LT(Lenfotoksin), FasL(Fibroblast-ilişkili ligand), TRAIL(TNF-bağımlı apoptosis indükleyici ligand) ve DR3L(Ölüm reseptörü 3 ligand) da apoptozisi başlatan uyarıyı iletebilmektedirler. TNF aracılı apoptozis, immünmodülasyon, otoimmünite, sepsis, artrit, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, kronik kalp yetmezliği, periodontal hastalıklar, allograft rejeksiyonu, neovaskularizasyon, obezite ve tümör oluşumu gibi birçok hastalığın patogenezinde kritik rol oynadığı gözlemlenmiştir (40).



**Şekil 1:** Apoptozise yol açan TNF sinyal yolu (40).

TNF aracılı apoptoziste, TNF sinyalini iki farklı reseptör aracılığı ile iletir. Bu reseptörler p60 ve p80'dir. p60 reseptörü, bütün hücreleri tarafından eksprese edilir , p80 reseptörü ise yalnızca immün sistem ve endotel hücrelerinde eksprese olur (40).

TNF, TNFR-1(p60) ile bağlandıktan sonra apoptotik sinyal iki ayrı yol üzerinden iletilir. Birinci yolda, TRADD, ölüm sinyalini caspase-8'e FADD/MORT1 üzerinden iletir. ikinci yolda ise TRADD, RIP(Reseptör aracılı protein) denilen ayrı bir protein üzerinden

ölüm sinyalini iletir. RIP, bir serin treonin kinaz olup ölüm bölgeleri içermektedir ve TRADD'ye ölüm bölgeleri ile yaptığı etkileşim ile bağlanır. RIP eğer ortamda fazlaca bulunursa apoptozisi indükler. RIP'in ölüm bölgesi, ölüm sinyalinin iletilmesinden sorumludur. Her iki apoptotik yolun sonunda da kromozomal DNA yıkımı ile hücre ölümü meydana gelmektedir. TNFR-2'nin apoptozisteki işlevi yapılan laboratuvar çalışmalarında TNFR-1'inki kadar açık anlaşılamamıştır (40).

### **2.3.Rho/Rho kinaz Ailesi**

Küçük G proteinleri, tüm ökaryot hücrelerde bulunan, moleküler kütleleri 20-40 kD arasında 100'den fazla üyesi olan monomerik proteinlerdir. G proteini ailesinin bugün için tanımlanmış en az beş alt ailesi vardır. Bunlar Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf ve Ran'dır. Küçük G proteinleri, sentezlendikten sonra, palmitoil, farnesil ve geranil gibi lipid yapılarla posttranslasyonel değişikliğe uğrar. Bu lipid yapılar, hücre membranına ve düzenleyicilere bağlanma, alt efektörleri aktifleştirmek için gereklidir (41).

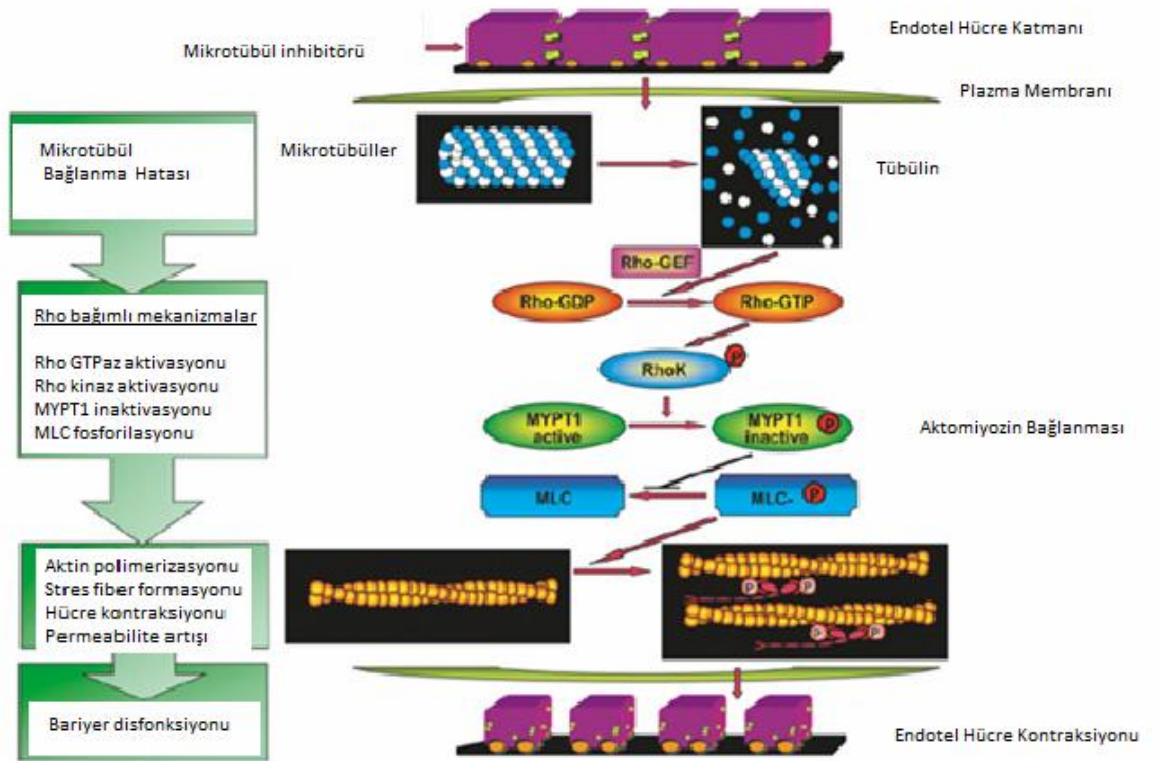
Rho, 21 kD molekül ağırlığında, küçük bir GTPaz'dır. Memelilerde Rho ailesine ait yaklaşık 21 protein tanımlanmıştır. Bunlar: Rho A,B,C,D,E ve G izoformları, Rac(1 ve 2 izoformları), Cdc42, Chp(1,2) ve TC10'dur (41). Rho ve efektörü Rho kinaz düz kas kontraksiyonu, fagositoz, pinositoz, hücrelerarası bağlantıların düzenlenmesi, hücre adezyon ve migrasyonu, sitokinezis ve gen ekspresyonu gibi birçok hücre fonksiyonunda önemli rol almaktadır. Rho/Rho kinaz yolağı birçok organ sisteminin fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir kalsiyum duyarlaştırıcı sistemdir (41). Bu ailenin üyelerinden Rho, Rac ve Cdc42 hücrede aktin iskeletinin düzenlenmesinde kilit rol oynarlar.

Rho kinaz bir serin-treonin protein kinazdır. Günümüzde ROCK-1 ve ROCK-2 olarak bilinen 2 izoformu tanımlanmıştır. ROCK-1 geni 18. kromozom üzerinde bulunur, kodladığı protein 1354 aminoasitten oluşur. ROCK-2 geni ise 12. kromozom üzerinde bulunur ve kodladığı protein 1388 aminoasitten oluşur (42). Rho kinazın N-terminalinde kinaz bölgesi vardır. Orta bölüm kıvrılmış bölge olarak isimlendirilir, C-terminal bölgesinde de plekstrin homoloji bölgesi bulunur. Araşidonik asit, plekstrin homoloji bölgesine bağlanarak Rho-kinazı aktive eder. Aktive olmuş Rho, kıvrılmış bölgenin C-terminal kısmıyla etkileşerek Rho kinazın kinaz bölgesini aktive eder (43). Çok sayıda Rho kinaz substratı tanımlanmıştır. Bunlar, miyozin fosfatazın miyozin bağlayıcı alt ünitesi, miyozin hafif zinciri, addusin, intermediyer filamentler, ezrin-radiksin-moezin ve kofilindir.

### 2.3.1.Rho/Rho kinaz Yolunun Organ Sistemlerine Etkileri

Rho/Rho kinaz sinyal mekanizması başta kardiyovasküler sistem, solunum sistemi ve gastrointestinal sistem olmak üzere birçok organ sistemini etkilemektedir.

Rho/Rho kinaz yolağının, vasküler sistemin tonusunun düzenlenmesinde büyük rol oynamaktadır. ROCK inhibitörü fasudilin inflamatuvar aterosklerotik lezyonların gelişmesini önlediği gösterilmiştir (45). Ayrıca Rho kinaz inhibitörü hidroksi fasudilin, köpek efor anjinasındaki miyokardiyal iskemiye önlediği saptanmıştır (46). Bir başka ROCK inhibitörü Y-27632, aritmilere karşı miyokardı koruyucu etki yapmaktadır (47). Rho/Rho-kinaz yolağı, hipertansiyon, ateroskleroz, koroner arter hastalığı, aritmi, diyabetik komplikasyonlar ve hipertrofik kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir terapötik hedefdir.



**Şekil 2 :** Rho-aracılı endotel hücre iskeleti düzenlenmesi ve mikrotübül depolarizasyonu ile indüklenen bariyer fonksiyonu (44).

Rho/Rho kinaz yolağının, havayolu düz kas tonusunun düzenlenmesinde önemi bilinmektedir. Hayvan deneyleri bu yolağın hava yolu duyarlılık artışı durumlarında özellikle



aktive olduğunu göstermiştir. Rho kinazın selektif inhibitörü Y-27632 inhalasyonu, asetilkolin ve ovalbümin ile indüklenen solunum yolu rezistans artışını inhibe etmiştir (54). Ayrıca inhale ROCK inhibitörlerinin pulmoner hipertansiyonda oldukça etkili ve selektif vazodilatasyon yaptığı bildirilmektedir (21). Sonuçta ROCK inhibitörlerinin, havayolu rezistansının arttığı hastalıklarda ve pulmoner hipertansiyonda tedavi değeri olan yeni ajanlar gibi görünmektedirler.

Yapılan bir çalışmada kobay ileumunda Rho kinazın, agonistle indüklenen artmış miyozin fosforilasyon düzeylerinde düz kas kasılmasına aracılık ettiği gösterilmiştir (55).

Rho ve Rho kinaz proteinlerinin beyinde oldukça yoğun bir şekilde eksprese edildiği bilinmektedir. Fakat bu yolağın santral sinir sistemi fonksiyonlarına etkisini araştıran yeterince çalışma bulunmamaktadır.

### **2.3.2.Rho kinaz Ailesi ve TNF Aracılı Apoptozis**

Rho kinaz, hücre içi miyozin hafif zincir fosforilasyonunu düzenleyen önemli bir sinyal efektörüdür. Miyozin hafif zincir fosforilasyonu, aktin-miyozin etkileşiminin gerçekleşebilmesi için anahtar olaydır. TNF ile indüklenmiş apoptoziste, Rho kinazın, miyozin hafif zincir fosforilasyonunda artış ve aktin miyozin etkileşiminde düzenleyici görevi ile önemli rolü vardır. Hücre içi iskeletini düzenleyerek, apoptozis sürecinde membran tomurcuklanmasını sağlar. Rho A GTPaz aktivitesinin inhibisyonu TNF ile indüklenmiş hücre iskelet formasyonunu azaltır (19). Rho kinaz, miyozin hafif zinciri defosforile eden, miyozin hafif zincir fosfataz enzimini fosforile edip inaktive ederek miyozin hafif zincirin fosforile kalmasını sağlar böylece hücre iskeletini düzenler (48). Aktin filamanı, mikrotübüller ve ara filamanlardan oluşan endotelial hücre iskeletinin organizasyonu, hücre şeklinin oluşturulması ve vasküler geçirgenliğin düzenlenmesi gibi görevlerde rol alarak astım, sepsis ve akut akciğer hasarı gibi birçok hastalığın patogeneğinde önemli yeri vardır (44). Rho kinazın apoptotik yoldaki düzenleyici etkilerinin erken dönemde, caspase-8 aktivasyonu başlamadan önce gerçekleştiği gösterilmiştir (19). Yapılan bir çalışmada, intravenöz E. coli endotoksini ile oluşturulan akut akciğer hasarı modelinde, bir Rho kinaz inhibitörü olan Y-27632 uygulamasının akciğer parankimi içine nötrofil migrasyonunu azalttığı saptanmıştır. Aynı araştırmanın in vitro deney kısmında Rho kinaz yolak inhibisyonunun TNF'nin neden olduğu endotelial hücre hasarına karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (20).

Bu çalışmada, endotoksemi ile oluşturulan deneysel akut akciğer hasarı modelinde intranazal Rho kinaz inhibitörü Y-27632'nin pulmoner hücre apoptozisine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

### 3.YÖNTEM ve GEREÇLER

Araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Hayvan Denepleri Etik Kurulu onayı alındıktan sonra başlatıldı. Araştırmamızda ağırlıkları 15-20g. arasında değişen ortalama 15-17 günlük toplam 42 adet Wistar albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar DEÜTF Deneş Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edildi. Sıçanlara intranasal veya intraperitoneal olarak, Rho kinaz inhibitörü; Y-27632 (Sigma Chemical, St. Louis, MO), Escherichia coli LPS serotype 0111:B4 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) ve % 0,9'luk NaCl uygulandı.

Bu çalışmada akut akciğer hasarı, Escherichia coli' den elde edilen lipopolisakkarid (LPS) ile oluşturuldu. Bu amaçla liyofilize toz halindeki LPS 0111:B4 serotipi ticari olarak temin edilip, toz halindeki LPS, % 0.9 NaCl solüsyonu içinde çözündürölüp, sıçanlara 10 mg/kg dozunda intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edildi. LPS sonrası gelişen tablo, doz ve tür bağımlı olarak değiştii için 1-2 hayvanda ön çalışma yapıldı.

Intranasal yol ile Rho kinaz inhibitörü, Y-27632, % 0.9 NaCl içinde çözündürölerek 5 mg/kg dozunda 26 GA kanül ile intranasal verildi. İntraperitoneal yol ile Rho kinaz inhibitörü, Y-27632, % 0.9 NaCl içinde çözündürölerek ve 5 mg/kg dozunda i.p. olarak enjekte edildi. Her iki tedavi uygulamaları, LPS enjeksiyonundan hemen sonra başlanarak ve 8 saat ara ile 3 kez uyguladı. Dozlar mevcut literatürlere göre belirlendi (10, 20, 21). % 0.9 NaCl; LPS ve Y-27632'in kontrolü olacak şekilde eşit hacim ve sürelerde uygulandı. LPS enjeksiyonundan 24 saat sonra sıçanlar sakrifiye edilerek akciğer dokusu örnekleri alındı.

Araştırmada kullanılan hayvanların tümünün aynı yaş grubunda, aynı ağırlıkta sıçanlar olmasına, aynı laboratuvar, beslenme ve çevresel ortama sahip olmalarına dikkat edildi. Böylece çalışmanın çevresel şartlardan etkilenmesi en aza indirildi.



**Resim 1:** İnterperitoneal ilaç uygulama yöntemi



**Resim 2:** İntranazal ilaç uygulama yöntemi

Deney grupları tedavi şekline göre iki ana gruba ayrıldı ve bu gruplar da 3 altgruptan oluşturuldu (her alt grupta hayvan sayısı (n = 7)).

İntranazal grubu (A grubu) 3 alt gruptan oluşmaktadır:

A1 grubu: % 0.9 NaCl (i.p.) + % 0.9 NaCl (Kontrol)

A2 grubu: LPS (i.p.) + % 0.9 NaCl (AAH)

A3 grubu: LPS (i.p.) + Y-27632 (AAH+Tedavi)

İntraperitoneal grubu (B grubu) 3 alt gruptan oluşmaktadır:

B1 grubu: % 0.9 NaCl (i.p.) + % 0.9 NaCl (Kontrol)

B2 grubu: LPS (i.p.) + % 0.9 NaCl (AAH)

B3 grubu: LPS (i.p.) + Y-27632 (AAH+Tedavi)



**Resim 3:** Sakrifikasyon sonrası çıkarılan akciğer dokusu örneği

### **3.1Histolojik İnceleme**

#### **3.1.1.Işık Mikroskobisi**

Deney sonunda elde edilen akciğer doku örnekleri %10'luk formaldehit ile tespit edildi. Işık mikroskobik doku takibinin yapılabilmesi için fiksatifin uzaklaştırılmaları amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandıktan sonra dehidratasyon amacıyla 20'şer dakika %70'den %95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 20'şer dakika 4 değişim aseton solusyonlarından geçirildikten sonra 2 değişim 30'ar dakika ksilolde tutuldu. 60°C'lik etüv içerisinde 2 değişim parafin uygulanıp 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisinde gömüldü. Parafin bloklardan inceleme yapmak amacıyla mikrotom aracılığı ile 5µm'lik kesitler alındı.

#### **3.1.2.Hematoksilen-Eozin Boyama**

Mikrotom (Leica, RM 2255) aracılığı ile alınan 5µ'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 20'ar dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Ardından dehidratasyon işlemi için %95'den %70'e azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 10 dakika akarsu altında yıkandı. 10 dakika hematoxilen (Surgipath, 01562E, Bretton, Cambridgeshire) ile boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (Surgipath, 01602, Canada) boyası ile boyandı. Ardından sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulmuş kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilolde tutulduktan sonra entellan (Merck 1.07961.0100, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı. Görüntüler BH2 Olympus (JAPAN) ışık mikroskobu ile değerlendirildi, DP71 Olympus kamera yardımı ile fotoğraflandı.

#### **3.1.3.TUNEL Yöntemi**

Bu teknik için DeadEnd Colorimetric TUNEL system kiti (Roche, Cat. No:11 684 817 910) kullanıldı. Kesitler boyama için bir gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra, bir iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dakika bekletildi. Kesitler 10 dakika 37°C'deTripsin (Roche, 10 109 819 001) ile inkübe edildikten sonra PBS ile 3X5 dakika

yıkandı. Ardından kesitler Tdt-Enzim solusyonu karışımı ile 37°C’de 1 saat inkübe edildi. Yıkama yapıldıktan sonra doku kesitlerini ışık mikroskopunda görünür hale getirmek amacıyla Converter-POD 30 dakika süreyle 37°C’de bekletildi. TUNEL reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra Harris hematoksilen ile artalan boyaması sağlanan kesitler %80 ve %95’lik alkollerde dehidratasyon ve 30 dk ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda incelendi.

### **3.1.4.İndirekt İmmunohistokimyasal Yöntem**

Caspase-3 immunoreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla caspase-3 (RB-1197, Neomarkers) antikoru kullanıldı. İmmunohistokimyasal inceleme için 60°C lik etüvde 1 gece ve ksilolde 3 değişim 20’şer dakika deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra 10 dakika distile su ile yıkandı. Dokuya zarar vermeden kurulanıp dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandı. 10mM sitrat buffer (15-M103, Bio optica), pH 6.0 da 5 dakika ısıtılan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3’lük Hidrojen peroksit uygulandı. 3 defa 5’er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler 1 saat oda ısısında bloklama solusyonu (İnvitrogen, Histostain-Plus Broad Spectrum, 85-9043) ile enkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan Caspase-3 antikoru ile bir saat +4°C’de enkübe edildi. Ardından fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor (İnvitrogen- Plus Broad Spectrum 85-9043) ile 30 dk enkübe edildi. PBS solusyonu ile yıkama yapıldıktan sonra enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) (Histostain- Plus Broad Spectrum 85-9043) 30 dakika uygulandı. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) (1718096, Roche) kullanıldı. Zemin boyaması Harris hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda incelendi.

### **3.1.5.Elektron Mikroskopik Doku Takibi**

Alınan doku örnekleri 1mm<sup>3</sup> lük parçalara ayrıldı. %2.5 lik fosfat tamponlu glutraldehitte 48 saat tespit edildi. Fosfat tamponları ile yıkandı. 1 saat boyunca 1 e 1 oranında tampon solüsyonu ve OsO<sub>4</sub> (osmiyum tetroksit) ile ikinci kez tespit edildi ve

boyandı. Fosfat tamponları ile yıkandı. Dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Propilen oksitten geçirilerek şeffaflandırıldı. Dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Propilen oksitten geçirilerek şeffaflandırıldı. Araldit (E006 Araldite CY212 RESIN, TAAB) + DDSA (D025, Dodecenyl Succinic Anhydride, TAAB) ön gömme materyaline gömülerek bir gece bekletildi. Daha sonra Araldit +DDSA +BDMA (B008 Accelerator BDMA (benzyl dimethylamine, TAAB) karışımı olan gömme materyaline gömüldü. Ultramikrotom ile alınan yarı ince kesitler toluidin blue ile boyanarak ışık mikroskopik olarak incelendi ve işaretlendi. İşaretlenen yerlerden alınan ince kesitler uranylacetate-lead citrate boyaları ile boyanarak Carl Zeiss Libra 120 Elektron mikroskopunda incelenerek resimlendirildi.

### **3.1.6. Işık Mikroskopik Bulguları Değerlendirme Yöntemi**

Histolojik değerlendirme pulmoner yapı, doku ödem formasyonu, infiltrasyon ve inflamatuvar hücrelerin varlığı göz önüne alınarak yapıldı. Bu değerler ile aşağıdaki kriterleri içeren bir histolojik skorlama yapıldı (49,50).

Her denekten alınan akciğer doku örneklerinde 5'er alan değerlendirildi ve ortalama ve standart sapma ve median değerleri alındı.

Derece 1: Normal pulmoner histoloji

Derece 2: Az miktarda lökosit infiltrasyonu

Derece 3: Orta derecede lökosit infiltrasyonu, perivasküler ödem formasyonu, akciğerin normal yapısının kısmen bozulması

Derece 4: Nötrofil, lökosit infiltrasyonu, abse formasyonu ve pulmoner yapının tamamen bozulması

### **3.2. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analizler 'SPSS for Windows, Version 15.0' istatistik programı kullanılarak yapıldı. Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal-Wallis varyans analizi onu izleyen post-hoc testler (Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi) uygulandı. Anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  kabul edildi.



## 4.BULGULAR

### 4.1.Genel Gözlemler

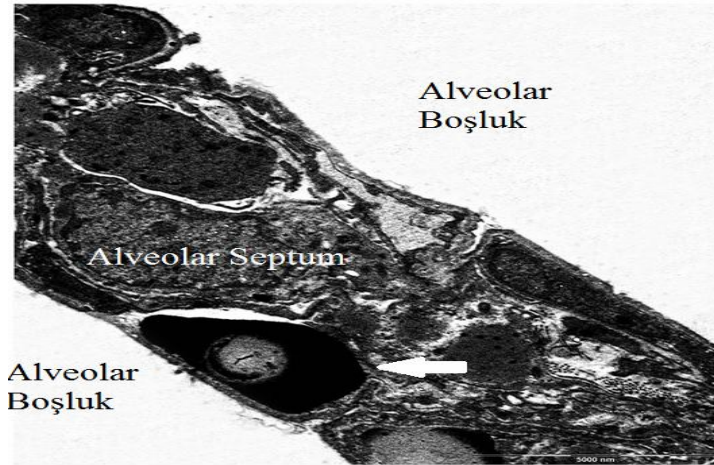
Kontrol grubundaki hayvanlarda, deney süresince beslenme alışkanlıklarında ve davranış paternlerinde herhangi bir değişiklik saptanmadı. İntraperitoneal enjeksiyon bölgelerinde lokal enfeksiyon bulgusu gözlenmedi.

AAH grubundaki hayvanlarda, LPS enjeksiyonundan, sakrifikasyona kadar olan süreçte, hayvanların ajitasyon gösterdiği ve beslenmelerinin azaldığı gözlemlendi. İntraperitoneal enjeksiyon bölgelerinde lokal enfeksiyon bulgusu gözlenmedi.

Tedavi grubundaki(AAH+Y-27632) hayvanlarda deney süresince beslenme alışkanlıklarında ve davranış paternlerinde değişiklik gözlemlenmedi. İntraperitoneal enjeksiyon bölgelerinde lokal enfeksiyon bulgusu görülmedi. Deneye katılan hayvan gruplarından hiçbirinde ölen hayvan olmadı.

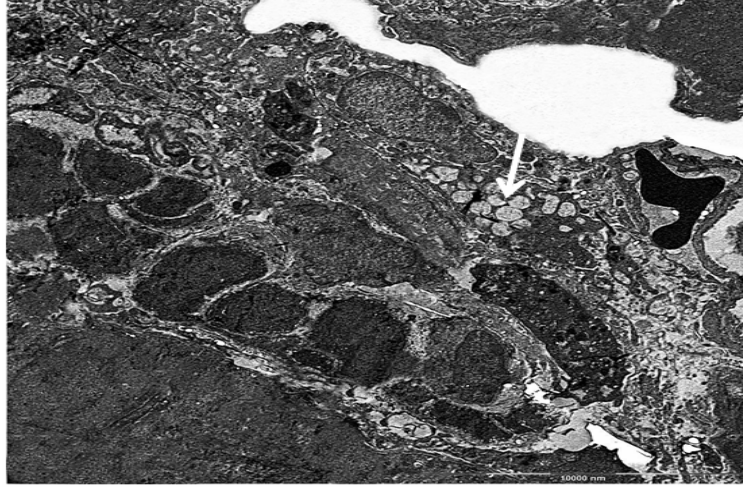
#### 4.1.1.Elektron Mikroskopi Sonuçları

A1 grubunda, normal akciğer alveol yapısı gözlemlendi. Alveolar septum, alveolar kapiller normal görünümdeydi. Alveolar hücrelerde inklüzyon cisimcikleri ve vakuolizasyon saptanmadı. Alveolar boşlukta inflamatuvar hücre gözlenmedi.



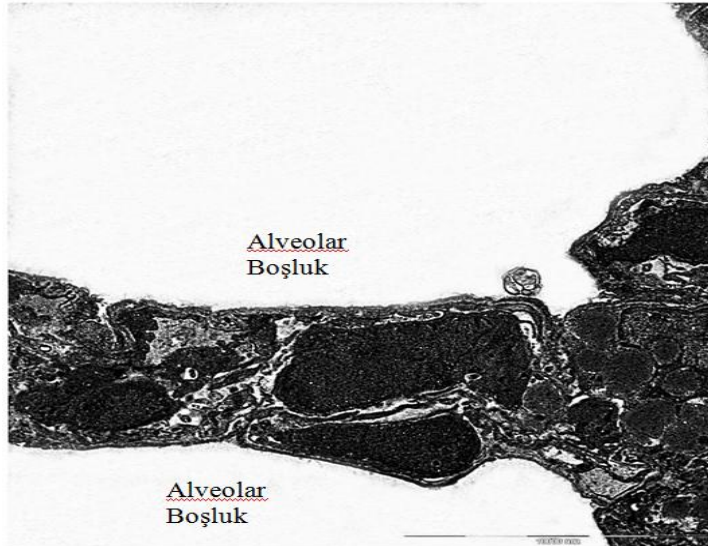
**Resim 4:** A1 grubu elektron mikroskopi görüntüsü. Beyaz okla gösterilen normal alveolar kapiller

A2 grubunda, alveolar septumun normal yapısının bozulmuş olduğu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, alveolar hücrelerde sitoplazmik inklüzyon ve vakuoller gözlenmiştir.



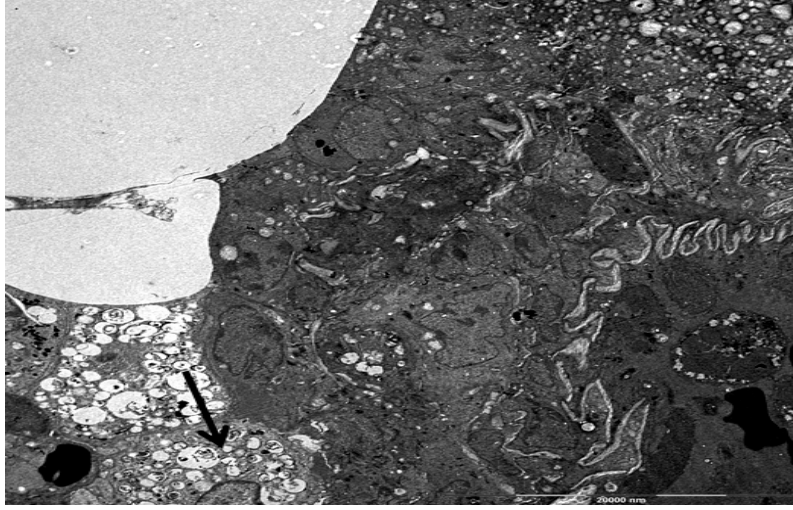
**Resim 5:** A2 grubunu elektron mikroskopi görüntüsü. Beyaz okla apoptotik hücrelerin sitoplazmik inklüzyon ve vakuolleri görülmekte

B1 grubunda, normal akciğer alveol yapısı gözlemlendi. Alveolar septum, alveolar kapiller normal görünümdeydi. Alveolar hücrelerde inklüzyon cisimcikleri ve vakuolizasyon saptanmadı. Alveolar boşlukta inflamatuvar hücre gözlenmedi.



**Resim 6:** B1 grubu elektron mikroskopi görüntüsü.

B2 grubunda tip 1 alveolar hücrelerinde hücrelerinde sitoplazmik kondensasyon, inklüzyon ve vakuoller gözlemlendi. Alveolar septumda bağ doku artışı gözlemlendi.



**Resim 7:** B2 grubu elektron mikroskopi görüntüsü. Siyah ok apoptozise uğrayan hücrelerin sitoplazmik vakuollerini göstermekte

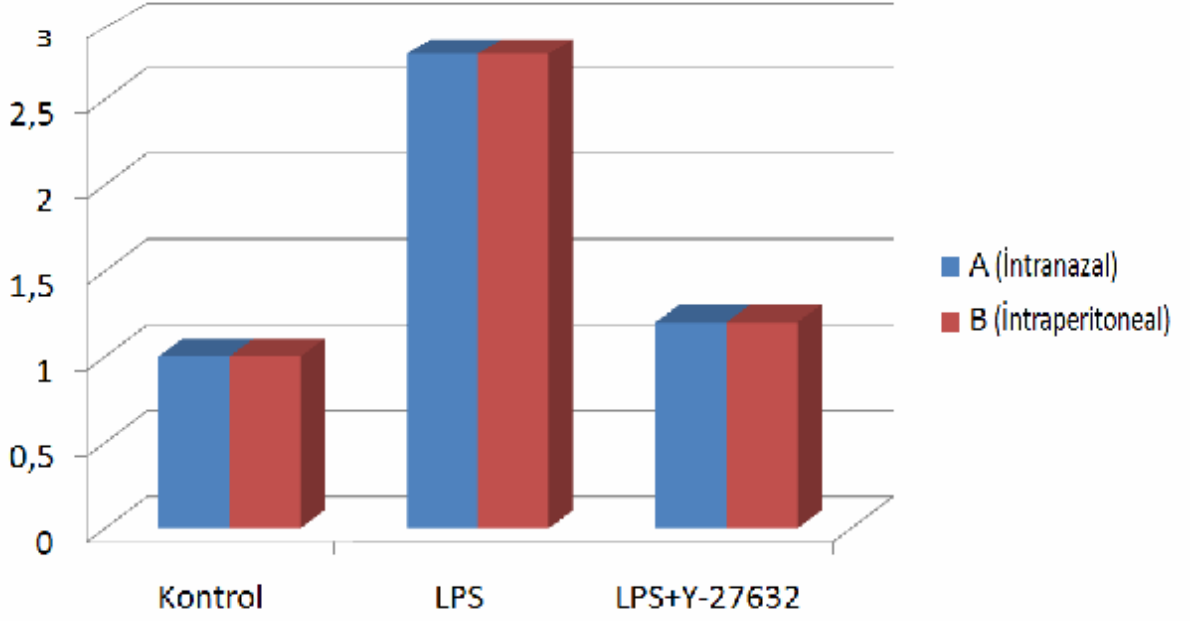
Elektron mikroskopisi bulgularında, kontrol gruplarını AAH gruplarıyla karşılaştırdığımızda, lipopolisakkarid enjeksiyonu ile akut akciğer hasarı bulgularının oluştuğu ve pulmoner epitelyal hücrelerde apoptozis bulgusu olan sitoplazmik inklüzyonlar ve vakuollerin oluştuğu gözlemlendi. Sadece lipopolisakkarid uygulanan sıçanlarda akut akciğer hasarı bulgularının oluştuğu elektron mikroskopisi ile teyit edildi.

#### **4.2.Hematoksilen-Eozin Boyama Bulguları**

**A1 grubu** normal akciğer histolojisi gösterdi ve A1 grubu, derece 1 histolojik değişiklikler olarak derecelendirildi.

**A2 grubunda**, akciğerin normal pulmoner histolojisinin bozulduğu gözlemlendi. Dokuda interstisyel ödem ve konjesyon ile birlikte alveolar septum, alveolar boşluk ve interstisyumda mononükleer hücre infiltrasyonu ve alveolar ödem gözlemlendi. Ayrı ayrı bakılan beş sahanın ortalama histolojik derecesi 2.68 olarak saptandı.

**A3 grubunda** normal akciğer histolojisine benzer görünüm saptandı. Histolojik olarak derece 1.34 olarak derecelendirildi.

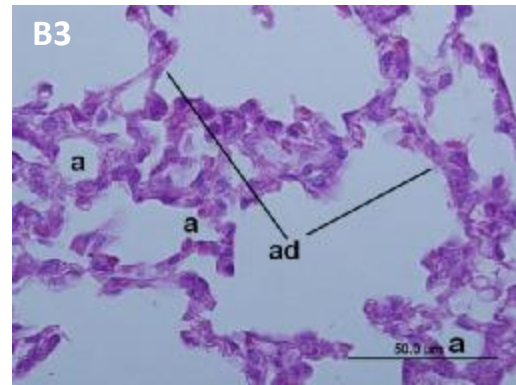
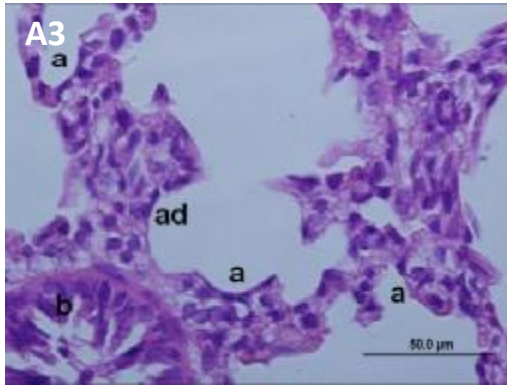
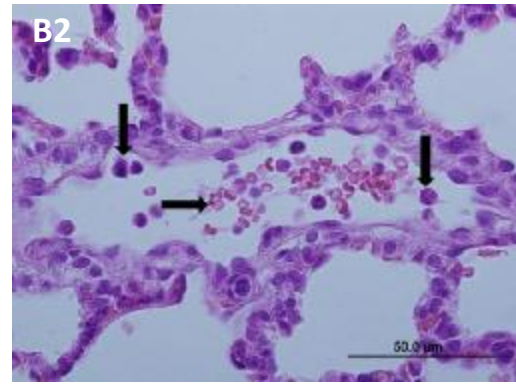
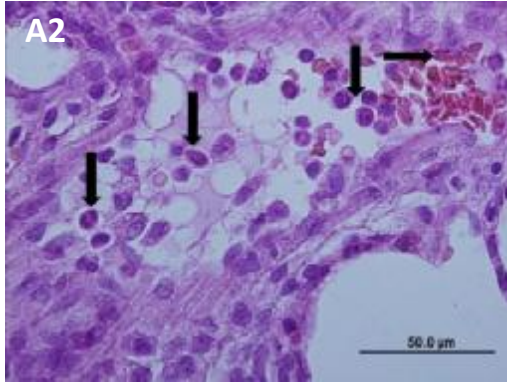
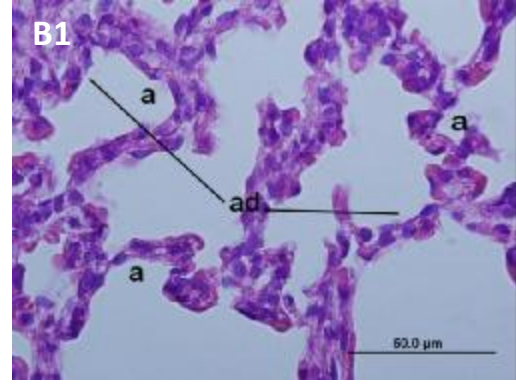
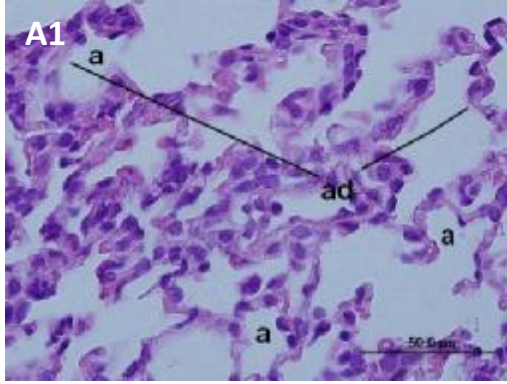


**Grafik 1:** A(intranazal) ve B(intraperitoneal) gruplarının histolojik dereceleri. Dikey sütun histolojik dereceyi göstermekte.

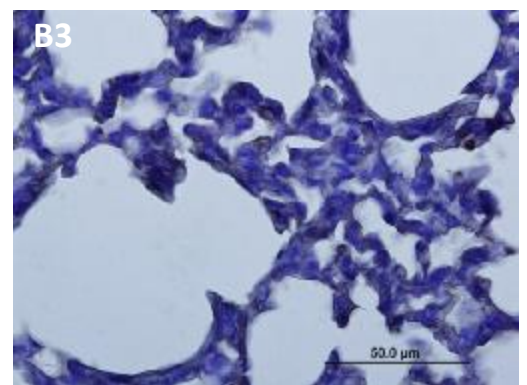
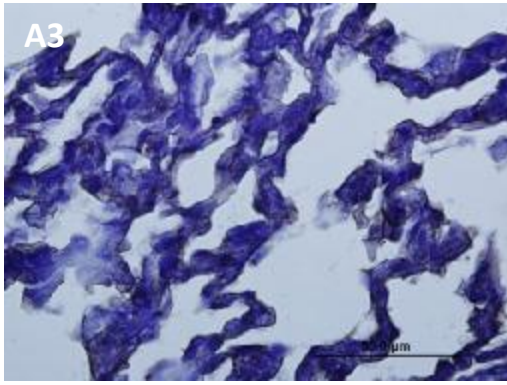
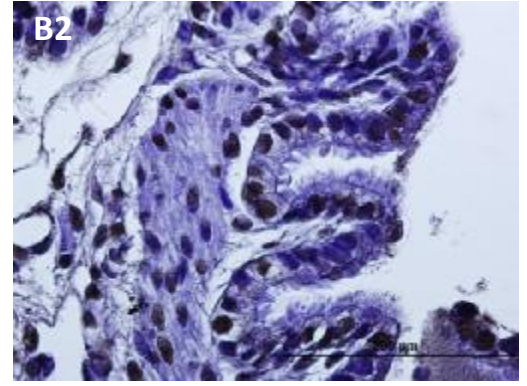
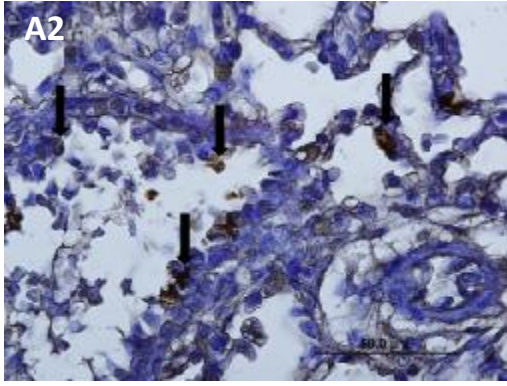
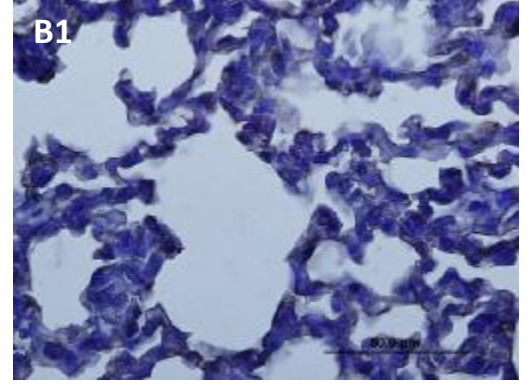
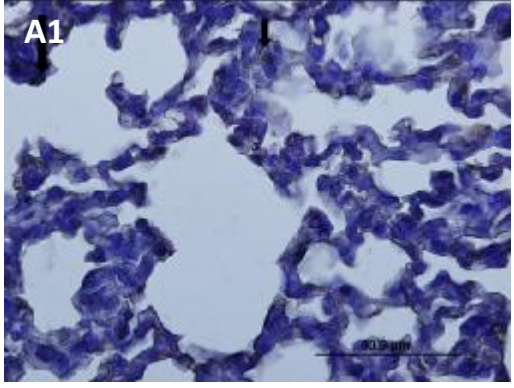
**B1 grubu** normal pulmoner histoloji gösterdi. Akciğer yapısı bronşlar, bronşioler (terminal ve respiratör), alveolar kanal, alveolar kese ve alveollerden oluşmaktaydı. Alveoller Tip 1 pnömosit olarak adlandırılan tek katlı yassı alveolar hücreler ve sürfaktan salgılayan Tip 2 (büyük alveolar hücreler) hücrelerinden oluşmaktaydı. B1 grubunun histolojik derecesi 1.05 olarak belirlendi.

**B2 grubunda** akciğerin normal pulmoner histolojisinin bozulduğu gözlemlendi. Dokuda interstisyel ödem ve konjesyon ile birlikte alveolar septum, alveolar boşluk ve interstisyumda mononükleer hücre infiltrasyonu ve alveolar ödem gözlemlendi. B2 grubunun histolojik derecesi ortalama 2.85 olarak saptandı.

**B3 grubunda** kontrol grubuna benzer doku histolojisi gözlemlendi. Histolojik derece 1.17 olarak saptandı.



**Resim 8:** Grupların histolojik görüntüsü, a:alveol, ad: alveol duvarı, Yatay ok eritrosit ekstravazasyonunu, dikey ok mononükleer hücre infiltrasyonunu göstermekte



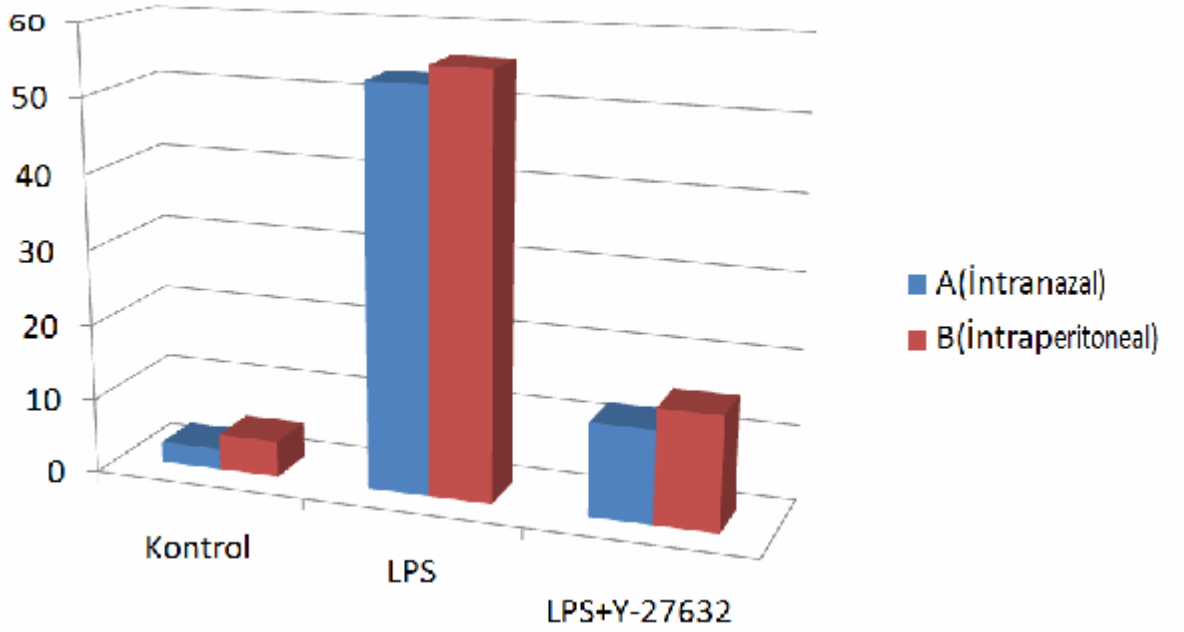
**Resim 9:** Grupların TUNEL boyama görüntüsü, dikey ok TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücreleri göstermekte

### 4.3.TUNEL Boyama Bulguları

**A1 grubunda** bazı sahalarda nadiren TUNEL pozitif hücelere rastlanmıştır. Mikroskop altında beş sahada ortalama 2.97 adet TUNEL pozitif hücre saptandı.

**A2 grubunda**, beş farklı alanda sayılan ortalama TUNEL pozitif hücre sayısı 51.42 olarak saptandı.

**A3 grubunda** ortalama her sahada 12.62 TUNEL pozitif apoptotik hücre saptandı.

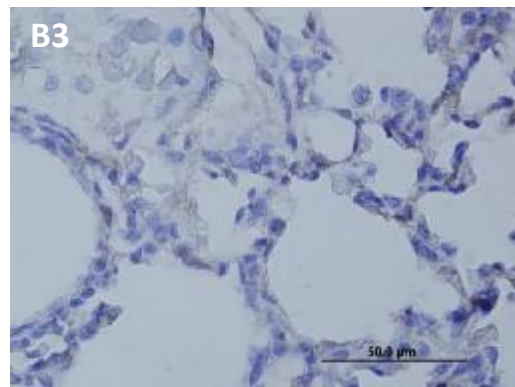
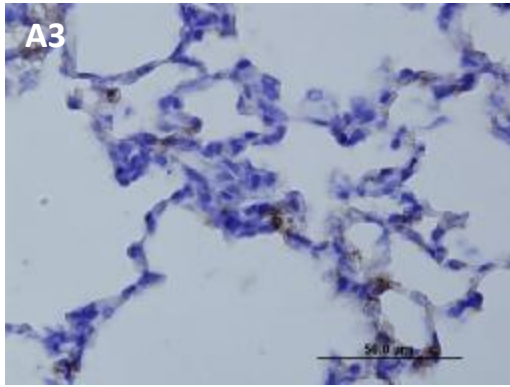
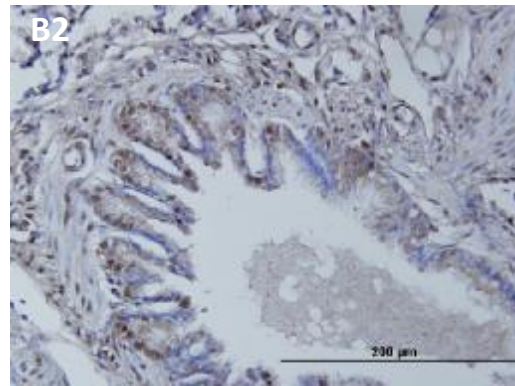
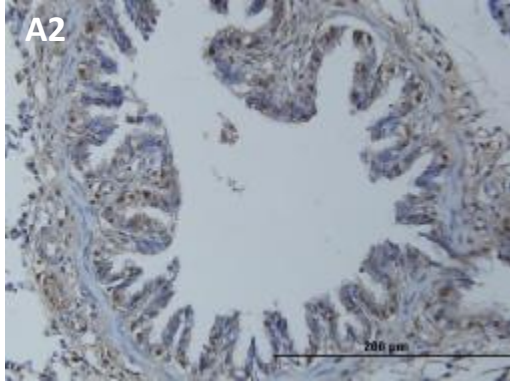
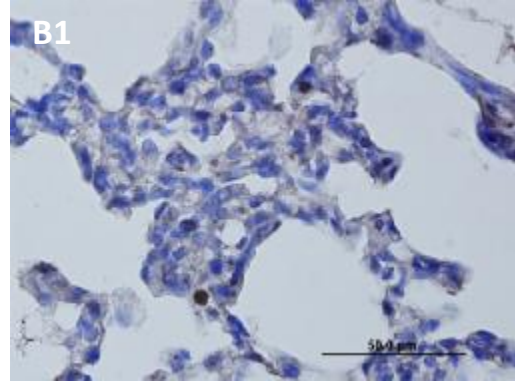
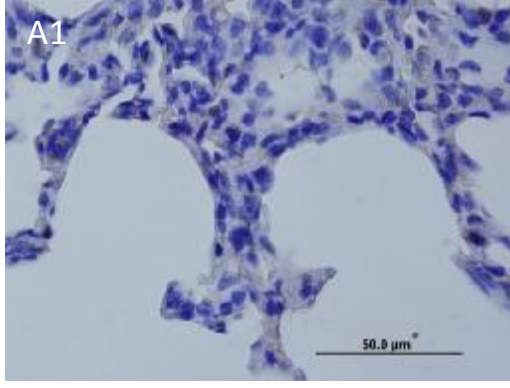


**Grafik 2:** A(intranazal) ve B(intraperitoneal) gruplarının TUNEL boyama sonuçları. Dikey sütun TUNEL pozitif hücre sayısını göstermekte.

**B1 grubunda** mikroskop altında her sahada ortalama TUNEL pozitif hücre sayısı 4.85 saptandı.

**B2 grubunda** ortalama her sahada TUNEL pozitif boyanan 55.80 hücre saptandı.

**B3 grubunda** her alanda ortalama 15.2 TUNEL pozitif hücre saptandı.



**Resim 10:** Grupların caspase-3 boyama görüntüsü, sol sütun yukarıdan aşağıya doğru sırayla A1,A2 ve A3 grubu, sağ sütun yukarıdan aşağıya doğru sırayla B1, B2 ve B3 grubu

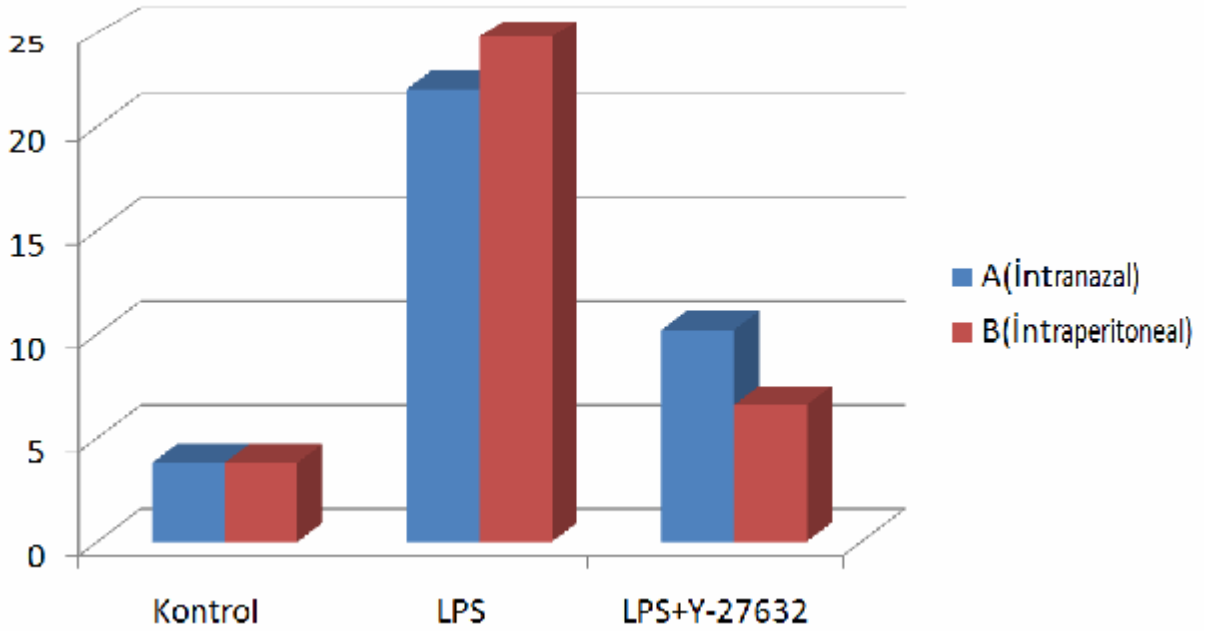


#### 4.4.Caspase-3 Boyama Bulguları

**A1 grubu** caspase-3 boyamasında mikroskop altında nadir sayıda apoptotik hücre saptandı. Mikroskop altında beş ayrı alanda sayılan ortalama caspase-3 pozitif hücre sayısı 3.77'dir.

**A2 grubunda** caspase-3 pozitif boyanan hücreler belirgin derecede artmış saptandı. Toplam beş sahada sayılan ve bir sahaya düşen ortalama caspase-3 pozitif hücre sayısı 22.11'dir.

**A3 grubunda** her sahada ortalama 10.05 caspase-3 pozitif boyanan apoptotik hücre saptandı.



**Grafik 3:** A(intranazal) ve B(intraperitoneal) grubunun caspase-3 boyanan hücre sayıları.

**B1 grubunda** ortalama her sahada 3.94 caspase-3 pozitif hücre saptandı.

**B2 grubunda** her sahada ortalama 24.22 caspase-3 pozitif hücre saptandı.

**B3 grubunda** caspase-3 pozitif boyanan hücre sayısı her alanda ortalama 6.45'dir.

<b>Tablo 1: Grupların histopatolojik derecelendirmesi ortalama ve ortanca değerleri</b>					
<b>İNTRANAZAL</b>			<b>İNTRAPERİTONEAL</b>		
	<b>Ort SD</b>	<b>Ortanca</b>		<b>Ort SD</b>	<b>Ortanca</b>
<b>A1</b>	<b>1.00±0.00<sup>e</sup></b>	<b>1.00</b>	<b>B1</b>	<b>1.05±0.09<sup>f</sup></b>	<b>1.00</b>
<b>A2</b>	<b>2.68±0.25<sup>a,c</sup></b>	<b>2.80</b>	<b>B2</b>	<b>2.85±0.45<sup>b,d</sup></b>	<b>2.80</b>
<b>A3</b>	<b>1.34±0.27</b>	<b>1.20</b>	<b>B3</b>	<b>1.17±0.17<sup>g</sup></b>	<b>1.20</b>

<sup>a</sup>:p=0.01 A1 grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>b</sup>:p=0.001 B1 grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>c</sup>:p=0.002 A3 grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>d</sup>:p=0.002 B3 grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>e</sup>:p=0.003 A3 grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>f</sup>:p=0.196 B3 grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>g</sup>:p=0.232 A3 grubu ile karşılaştırıldığında

<b>Tablo 2: Grupların TUNEL pozitif boyanan hücre sayılarının ortalama ve ortanca değerleri</b>					
<b>İNTRANAZAL</b>			<b>İNTRAPERİTONEAL</b>		
	<b>Ort SD</b>	<b>Ortanca</b>		<b>Ort SD</b>	<b>Ortanca</b>
<b>A1</b>	<b>2.97±0.31<sup>e</sup></b>	<b>2.80</b>	<b>B1</b>	<b>4.85±0.90<sup>f</sup></b>	<b>4.80</b>
<b>A2</b>	<b>51.42±5.78<sup>a,c</sup></b>	<b>53.20</b>	<b>B2</b>	<b>55.80±3.06<sup>b,d</sup></b>	<b>55.60</b>
<b>A3</b>	<b>12.62±0.97</b>	<b>12.40</b>	<b>B3</b>	<b>15.20±0.95<sup>g</sup></b>	<b>15.20</b>

<sup>a</sup>:p=0.002 A1 grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>b</sup>:p=0.002 B1 grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>c</sup>:p=0.002 A3 grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>d</sup>:p=0.002 B3 grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>e</sup>:p=0.002 A3 grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>f</sup>:p=0.002 B3 grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>g</sup>:p=0.063 A3 grubu ile karşılaştırıldığında

<b>Tablo 3: Grupların caspase-3 pozitif boyanan hücre sayılarının ortalama ve ortanca değerleri</b>					
<b>İNTRANAZAL</b>			<b>İNTRAPERİTONEAL</b>		
	<b>Ort SD</b>	<b>Ortanca</b>		<b>Ort SD</b>	<b>Ortanca</b>
<b>A1</b>	<b>3.77±0.31<sup>e</sup></b>	<b>3.80</b>	<b>B1</b>	<b>3.94±0.53<sup>f</sup></b>	<b>3.80</b>
<b>A2</b>	<b>22.11±1.44<sup>a,c</sup></b>	<b>21.80</b>	<b>B2</b>	<b>24.22±1.11<sup>b,d</sup></b>	<b>24.80</b>
<b>A3</b>	<b>10.05±0.69</b>	<b>10.20</b>	<b>B3</b>	<b>6.45±0.69<sup>g</sup></b>	<b>6.60</b>

<sup>a</sup>:p=0.002 A1 grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>b</sup>:p=0.002 B1 grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>c</sup>:p=0.002 A3 grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>d</sup>:p=0.002 B3 grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>e</sup>:p=0.002 A3 grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>f</sup>:p=0.002 B3 grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>g</sup>:p=0.002 A3 grubu ile karşılaştırıldığında

## 5.SONUÇLAR

### 5.1.Kontrol Altgrupları ile AAH Altgruplarının Karşılaştırılması

İntranazal grupta, kontrol alt grubunun histolojik derecesi AAH alt grubuna göre daha düşüktür ve bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlıdır. (p=0.001)

İntranazal grupta, TUNEL pozitif hücre sayısı, kontrol alt grubunda, AAH alt grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük saptandı. (p=0.002)

İntranazal grupta, caspase-3 pozitif boyanan hücreler kontrol alt grubunda, AAH alt grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük saptandı. (p=0.002)

İntraperitoneal grupta, kontrol alt grubunun histolojik derecesi, AAH alt grubuna göre daha düşüktür ve bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlıdır. (p=0.001)

İntraperitoneal grupta, apoptozis göstergesi olarak uygulanan TUNEL ile boyanan hücreler kontrol alt grubunda, AAH alt grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük saptandı. (p=0.002)

İntraperitoneal grupta, apoptozis göstergesi olarak uygulanan caspase-3 boyası ile boyanan hücreler kontrol alt grubunda, AAH alt grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük saptandı. (p=0.002)

### 5.2.Kontrol Grubu ile Tedavi Grubunun Karşılaştırılması

İntranazal grupta, kontrol alt grubunun histolojik derecesi LPS+Y-27632 verilenlere göre daha düşüktür ve bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlıdır. (p=0.003)

İntranazal grupta, TUNEL ile boyanan hücreler kontrol alt grubunda, LPS+Y-27632 verilenlere göre anlamlı derecede düşük saptandı. (p=0.002)

İntranazal grupta, caspase-3 boyası ile boyanan hücre sayısı kontrol alt grubunda, LPS+Y-27632 verilen sıçanlara göre anlamlı derecede düşük saptandı. (p=0.002)

İntraperitoneal grupta, kontrol alt grubunun histolojik derecesi ile LPS+Y-27632 verilenlerin histolojik derecesi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi. (p=0.196)

İntraperitoneal grupta, TUNEL ile boyanan hücreler kontrol alt grubunda, LPS+Y-27632 verilenlere göre anlamlı derecede düşük saptandı. (p=0.002)

Apoptozis göstergesi olarak uygulanan caspase-3 boyası ile pozitif boyanan hücre sayısı kontrol alt grubunda, LPS+Y-27632 verilen sıçanlara göre anlamlı derecede düşük saptandı. (p=0.002)

### **5.3.AAH Grubu ile Tedavi Grubunun Karşılaştırılması**

İntranazal grupta, AAH alt grubunun histolojik derecesi, LPS+Y-27632 verilen sıçanlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir. (p=0.002)

TUNEL ile boyanan hücre sayısı, AAH alt grubunda, LPS+Y-27632 verilenlere göre anlamlı derecede yüksek saptandı. (p=0.002)

Caspase-3 boyası ile boyanan hücre sayısı, AAH alt grubunda, LPS+Y-27632 verilenlere göre anlamlı derecede yüksek saptandı. (p=0.002)

İntraperitoneal grupta, AAH alt grubunun histolojik derecesi LPS+Y-27632 verilenlere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir. (p=0.002)

TUNEL ile pozitif boyanan hücre sayısı, AAH grubunda, LPS+Y-27632 verilen sıçanlara göre anlamlı derecede yüksek saptandı. (p=0.002)

Caspase-3 boyası ile boyanan hücre sayısı, AAH grubunda, LPS+Y-27632 verilenlere göre anlamlı derecede yüksek saptandı. (p=0.002)

### **5.4.İntranazal ve İntraperitoneal Grupların Karşılaştırılması**

İntranazal ve intraperitoneal grupların kontrol grupları arasında, histolojik derecelendirme açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur. (p=0.141)

İntraperitoneal grubun kontrol alt grubundaki TUNEL pozitif hücre sayısı, intranazal grubun kontrol alt grubundaki TUNEL pozitif hücre sayısından fazladır. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır. (p=0.002)

İntranazal ve intraperitoneal grupların kontrol altgrupları arasında, caspase-3 pozitif boyanan hücre sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur. (p=0.650)

İntranazal ve intraperitoneal grupların AAH altgrupları arasında, histolojik derecelendirme açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. (p=0.691)

İntranazal ve intraperitoneal grupların AAH altgrupları arasında, TUNEL pozitif boyanmış hücre sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. (p=0.096)

İntraperitoneal grubun AAH alt grubunda caspase-3 pozitif boyanan hücre sayısı intranazal grubun AAH alt grubuna göre daha yüksektir, bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıdır. (p=0.021)

İntranazal ve intraperitoneal grupların LPS+Y-27632 verilen altgrupları arasında, histolojik derecelendirme açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. (p=0.232)

İntranazal ve intraperitoneal grupların LPS+Y-27632 verilen altgrupları arasında, TUNEL pozitif boyanmış hücre sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. (p=0.063)

İntraperitoneal grubun LPS+Y-27632 verilen alt grubunda caspase-3 pozitif boyanan hücre sayısı, intranazal grubun LPS+Y-27632 verilen alt grubuna göre daha düşüktür, bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıdır. (p=0.002)

## 6.TARTIŞMA

Çocukluk çağında akut respiratuar distres sendromu (ARDS) önemli bir hastalık ve ölüm nedenidir. Günümüzde geniş olanaklara sahip yoğun bakım ünitelerinin varlığına karşın ARDS'ye bağlı ölüm oranı % 40-60 olarak bildirilmektedir. ARDS'ye yol açan akut akciğer hasarı: bilateral pulmoner infiltrasyon, hipoksemi, nötrofil sekestrasyonu, pulmoner ödem, intravasküler koagülasyon ve endotelyal-epitelyal hücre apoptozisi ile karakterizedir (1-3).

Sepsis, akut akciğer hasarı veya ARDS açısından en önemli klinik risk faktörüdür (4). Gram negatif organizma endotoksininin patogenetik olarak septik ARDS ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (5). Çocuklarda da ARDS için en büyük risk faktörü sepsis olarak bildirilmiştir (39). ARDS gelişen hastaların %34'ünü sepsisli çocuklar oluşturmaktadır (39). Yoğun bakım ünitelerinde yatan sepsisli hastaların en sık bulgularından birisi akciğer disfonksiyonudur. Sepsisli hastalarda akciğer disfonksiyonu gelişme riski %30 olarak bildirilmiştir (37).

Deneysel akut akciğer hasarı modeli oluşturmak için mekanik ventilasyon, lipopolisakkarid uygulanması, canlı bakteri enjeksiyonu, hiperoksi, bleomisin verilmesi, oleik asit, çekal bağlama ve patlatma gibi yöntemler kullanılmaktadır (60). İntraperitoneal lipopolisakkarit enjeksiyonu akut akciğer hasarı oluşturulmasında en sık kullanılan yöntemlerden birisidir (60). Lipopolisakkarid, gram negatif bakterilerin dış membranında bulunan, lipid A ve tekrarlayan disakkarid dizilerinden oluşan glikolipid bir yapıdır. Lipopolisakkaridin biyolojik etkilerinin birçoğu lipid A'ya bağlıdır. Serumda lipopolisakkarid, lipopolisakkarid bağlayan proteine bağlanır. Bu kompleks, monosit, makrofaj ve diğer hücrelerde bulunan CD14/TLR4 reseptör kompleksini aktive eder ve inflamatuvar mediatörlerin salınımını uyarır (61). Bu hücreler en sık akciğerde olmak üzere uç organ hasarının gelişmesine katkıda bulunurlar. Endotoksemi ile oluşturulan sepsis modelinde, akciğerlerdeki bulguların 2-4 saat gibi kısa bir sürede ortaya çıkmaya başladığı ve 18. saatte akut akciğer hasarının tipik bulguları olan nötrofil hücre infiltrasyonu, eritrosit ekstravazasyonu, perivasküler ve alveolar ödemin gözlenebileceği bildirilmektedir (56,61). Bu araştırmada, sepsise bağlı ARDS modeli oluşturmak için yavru sıçanlara 10 mg/kg intraperitoneal lipopolisakkarid enjeksiyonu uygulandı. Lipopolisakkarid enjeksiyonundan 24 saat sonra çıkarılan akciğer doku örneklerinde nötrofil infiltrasyonu, eritrosit ekstravazasyonu, perivasküler ve alveolar ödem formasyonu ve alveolar yapıda bozulmaların olduğunu saptandı. Bu bulgular, daha önce aynı uygulama yolu ve aynı



lipopolisakrit dozu ile yapılan deneysel araştırmalar ile uyumlu olarak akut akciğer hasarını gösteren bulgulardır (56).

Endotokseminin oluşturduğu akut akciğer hasarı patogenezinde artmış pulmoner hücre apoptozisi sorumlu tutulmaktadır. Yoğun bakım hastalarında yapılan çalışmalarda, akut akciğer hasarının artmış hücre ölümü ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (6-8). Deneysel sepsis ve ARDS modellerinde de, apoptozis inhibisyonunun yaşam oranını anlamlı derecede arttırdığı gösterilmiştir (9-13). Bu deneysel araştırmada da, endotoksemi ile oluşan akut akciğer hasarında apoptotik akciğer dokusu hücrelerinin akciğer hasarının derecesi ile orantılı olarak artmış olduğu saptandı.

Laboratuvar çalışmalarında apoptozisi saptamak için, Anneksin V, TUNEL, sitokeratin 18 ve caspase-3 boyama gibi histokimyasal yöntemler kullanılmaktadır. TUNEL yöntemi hücre nükleusundaki DNA kırıklarını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir (62-64). Apoptozisteki DNA kırıkları, nükleik asitin terminal ucunun TUNEL yöntemi ile işaretlenmesi ile saptanabilir. Fakat TUNEL yönteminin apoptozise özgüllüğü ile ilgili şüpheler vardır (64). Zira DNA kırıkları, apoptozisin dışında, nekrozda, mitoz bölünmedeki DNA rekombinasyonu, DNA replikasyonu, DNA tamiri, sıkışma ve gevşeme sırasında, doku elektrokoaglasyonunda, otolizde, dokuların laboratuvarda fiksasyonu sırasında, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması sonrasında, deterjan, proteinaz K ve mikrodalga maruziyetinde de görülebilmektedir (64). Apoptozis kaskadının son basamağı caspase-3'n aktive olmasıdır. Aktive caspase-3, DNAaz aktivasyonu, mitokondriden proapoptotik proteinlerin salınması gibi hücredeki apoptozise bağlı oluşan morfolojik değişikliklerin enzimatik sürecinde rol oynar (65,66). Hücredeki caspase-3 varlığının gösterilmesi de apoptozis belirteci olarak kullanılan duyarlı bir yöntemdir. Her ne kadar literatürde caspase-3 ve TUNEL yönteminin özgüllüğü ve duyarlılığı net olarak belirtilmese de, yapılan çalışmalardaki bulgular TUNEL yönteminin caspase-3 ile karşılaştırıldığında duyarlılığının ve özgüllüğünün daha düşük olduğunu düşündürmektedir (62-67).

Rho/Rho kinaz yolağı, son yıllarda üzerinde birçok inceleme ve araştırma yapılan ve birçok organ sistemini ilgilendiren birçok hastalığın patogenezinde önemli rol oynayan bir kalsiyum duyarlaştırıcı yolaktır. Rho küçük bir G proteindir ve en önemli efektörü bir serin-treonin protein kinaz olan Rho kinazdır. Rho'nun başlattığı bu kalsiyum duyarlaştırıcı sinyal mekanizmasının birçok fizyolojik ve patolojik srecde önemli rolü vardır. Bu konuda çalışmalar, özellikle kardiyovasküler sistem ve solunum sistemi üzerinde yoğunlaşmış ve

yakın gelecekte yeni bir farmakolojik tedavi seçeneği olabilmesi açısından umut vaat etmektedir (21,45,46,47,54).

Bu çalışmada, yavru sıçanlarda endotoksemi ile oluşturulan deneysel akut akciğer hasarı modelinde Rho kinaz inhibitörü Y-27632'nin hem intraperitoneal hem de intranasal yol ile uygulanması pulmoner hücre apoptozisini belirgin şekilde azalttığı saptandı. Rho kinaz sinyal yolağının Y-27632 ile inhibisyonunun üzerinde özellikle asetilkolin ve ovalbümin ile indüklenmiş deneysel astım modellerinde düz kas tonusunu azaltarak solunum yolu rezistans artışını inhibe ettiği gösterilmiştir (54). Ishizaki ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada Rho A ile aktive edilen Rho kinazın, hücre içinde stres fiberlerinin ve fokal adezyonların oluşumu ve düzenlenmesinde anahtar rolü olduğu gösterilmiştir (51). Bir başka güncel çalışmada oleik asitle oluşturulan ARDS modelinde Rho kinaz ekspresyonunun arttığı ve Y-27632 uygulanmasının akciğer hasarını önlemede etkili olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada Rho kinaz yolunun endotel aktivasyonu ve pulmoner bariyer disfonksiyonuna yol açarak ARDS'de akciğer ödeminin patogenezinde rol oynayabileceği belirtilmiştir. Bununla birlikte bu araştırmada Rho kinaz yolunun inhibisyonunun, pulmoner apoptozis üzerine etkisi incelenmemiştir (52).

Rho kinaz, hücre içi miyozin hafif zincir fosforilasyonunu düzenleyen önemli bir sinyal efektörüdür. Miyozin hafif zincir fosforilasyonu, aktin-miyozin etkileşiminin gerçekleşebilmesi için anahtar olaydır. Apoptozisin morfolojik aşamalarından membran tomurcuklanması, apoptotik hücre fragmentasyonu ve apoptotik hücre fagositozu miyozin hafif zincir fosforilasyonu ve aktomiyozin kontraksiyona bağımlı olaylardır (53). TNF ile indüklenmiş apoptosiste, Rho kinazın uyarılması, miyozin hafif zincir fosforilasyonunu artırır, transselüler elektrik rezistansını azaltır, paraselüler gap proteini formasyonunu artırır, stres fiberleri oluşumunu artırır, tüm bunlar apoptozise uzanan olaylar dizisinin bir parçasıdır. Petrache ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Rho kinaz yolunun hücre içi iskeletini düzenleyerek, apoptozis sürecinde membran tomurcuklanmasını sağladığı, Rho A GTPaz aktivitesinin inhibisyonunun TNF ile indüklenmiş hücre iskelet formasyonunu azalttığı saptanmıştır. Bu etki caspase-8 aktivasyonundan önceki basamakta gerçekleşmekte ve diğer mediyatörlerin aktivasyonunun engellenmesi ile sonuçlanmaktadır (19). Birukova ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir başka çalışmada ise, aktin filamanı, mikrotübüller ve ara filamanlardan oluşan endotelial hücre iskeletinin organizasyonunun, hücre şeklinin oluşturulması ve vasküler geçirgenliğin düzenlenmesi gibi görevlerde rol alarak astım, sepsis ve akut akciğer hasarı gibi birçok hastalığın patogenezinde önemli yeri olduğu ve Rho kinaz

yolunun bu hücre içi iskeletin organizasyonu işlevinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (44). Diğer bir güncel araştırmada da, intravenöz E. coli endotoksini ile oluşturulan akut akciğer hasarı modelinde, bir Rho kinaz inhibitörü olan Y-27632 (10 mg/kg i.p.) uygulamasının akciğer parankimi içine nötrofil migrasyonunu azalttığı saptanmıştır (20).

Bu çalışmada intraperitoneal ve intranasal Y-27632 uygulanan deney grupları kendi alt grupları içinde değerlendirildiğinde endotoksemi ile oluşan histolojik hasar ve apoptotik hücre artışını önlediği saptandı. Y-27632'nin uygulama yolu etkinliğinin değerlendirilmesi açısından intraperitoneal ve intranasal grupların tedavi altgrupları karşılaştırıldığında histolojik derece ve TUNEL boyama açısından iki alt grup arasında anlamlı fark saptanmadı. Fakat caspase-3 pozitif boyanan hücreler dikkate alındığında intraperitoneal uygulamanın apoptozisi inhibe edici etkisinin daha fazla olduğu görüldü. Yukarıda da belirtildiği gibi caspase-3 boyama yönteminin duyarlılığının daha fazla olduğu göz önüne alınırsa, endotoksemi ile oluşan akut akciğer hasarını ve pulmoner apoptozisi önlemede intraperitoneal Y-27632 uygulamasının daha etkili olduğu söylenebilir. Bununla birlikte, bu çalışmada sadece histopatolojik etkiler incelendi; sistemik yan etkiler değerlendirilmedi.

Literatürde bir Rho kinaz inhibitörü olan Y-27632'nin ağızdan, parenteral ve inhalasyon yolu ile uygulandığı çalışmalar bulunmaktadır. Parenteral uygulamanın, bazı çalışmalarda hipertansif sıçanlarda kan basıncını düşürdüğü, normotansif sıçanlarda hipotansiyona yol açmadığı belirtilmekte, bazı çalışmalarda ise normotansif sıçanlarda da kan basıncını düşürücü etkisi olduğu bildirilmektedir (69,70). Y-27632'nin düz kas hücreindeki hedefi sadece patolojik kasılma süreci olabileceği gibi normal düz kas kasılmasını da etkilediği yapılan çalışmalarda görülmüştür (23). Y-27632'nin ağızdan kullanılması sonucu da, uygulamadan 2-3 saat sonrasında hem ortalama pulmoner arteriyel kan basıncında hem de sistemik arteriyel kan basıncında ciddi oranda düşme gözlemlendiği bildirilmiştir (21). Y-27632'nin suda çözünürlüğünün iyi olması, özellikle inhalasyon ile kullanımı açısından çok büyük bir avantajdır (23). İnhalasyon yöntemi ile daha az sistemik yan etki görüldüğü bildirilmiştir (23). Hedef doku akciğer olduğu takdirde inhalasyon yolu seçilebilecek en uygun yoldur.

Biz araştırmamızda, literatürde üzerinde daha önce çalışılmamış bir konu olan, Y-27632'nin yavru sıçanlarda endotoksemi ile oluşturulan akut akciğer hasarındaki apoptozis üzerine etkisinin intranasal ve intraperitoneal kullanımındaki farkını inceledik ve intranasal kullanımın da en az intraperitoneal kullanım kadar etkin olduğunu gördük. Bu bulgu konu ile

ilgilenen araştırmacılara daha yeni ve kapsamlı bir çalışma yapma konusunda yol gosterecek bir bulgudur. Konu ile ilgili daha geniş kapsamlı ve bizim ulaştığımız sonucu destekleyecek araştırmalara gereksinim vardır.

## 7.SONUÇ VE ÖNERİLER

Rho/Rho kinaz yolağı, insan vücudunda birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynayan önemli bir sinyal sistemidir.

Literatürde Rho kinaz inhibitörleri özellikle kardiyovasküler sistem ve solunum sistemi hastalıklarında tedavi seçeneği olarak denenmiş ve çoğunda başarılı sonuçlar alınmıştır.

Bu araştırmada intranazal Rho kinaz inhibitörü Y-27632 uygulanmasının endotoksemi ile oluşturulan ARDS modelinde pulmoner apoptozis üzerine etkisinin, intraperitoneal kullanımı ile benzer olduğu saptandı.

Bu, Rho kinaz inhibitörü Y27632'nin intranazal etkinliğinin, intraperitoneal etkinliği ile karşılaştırıldığı literatürdeki ilk araştırmadır ve bundan sonra bu konu ile ilgilenen araştırmacılara yol gösterecektir.

Yakın gelecekte Rho/Rho kinaz yolu inhibitörleri özellikle kardiyovasküler ve solunum yolu hastalıkları tedavisinde etkili bir farmakolojik ajan olarak kullanılacaktır.

İnhalasyon veya nebulizasyon yolu ile kullanım sistemik yan etkilerden korunmak ve kullanım kolaylığı açısından iyi bir seçenek olabilir.

## 8.KAYNAKLAR

1. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2000;342:1334–49.
2. Zilberberg MD, Epstein SK. Acute lung injury in the medical ICU: Co-morbid conditions, age, etiology, and hospital outcome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:1159–64.
3. Abel SJ, Finney SJ, Brett SJ, Keogh BF, Morgan CJ, Evans TW. Reduced mortality in association with the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Thorax* 1998; 53: 292–4.
4. Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 151: 293–301.
5. Martin TR, Rubenfeld G, Steinberg KP, Hudson LD, Raghu G, Moriarty AM, Leturcq DJ, Tobias PS, Ulevitch RJ. Endotoxin, endotoxin-binding protein and soluble CD14 are present in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Chest.* 1994; 105:55-56.
6. Bardales RH, Xie SS, Schaefer RF, Hsu SM. Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type II pneumocytes in acute lung injury. *Am J Pathol.* 1996;149:845-852.
7. Guinee D Jr, Brambilla E, Fleming M, Hayashi T, Rahn M, Koss M, Ferrans V, Travis W. The potential role of BAX and BCL-2 expression in diffuse alveolar damage. *Am J Pathol.* 1997;151:999-1007.
8. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med.* 1999;27:1230-1251
9. Kawasaki M, Kuwano K, Hagimoto N, Matsuba T, Kunitake R, Tanaka T, Maeyama T, Hara N. Protection from lethal apoptosis in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by a caspase inhibitor. *Am J Pathol.* 2000;157:597-603.
10. Rudkowski JC, Barreiro E, Harfouche R, Goldberg P, Kishta O, D’Orleans-Juste P, Labonte J, Lesur O, Hussain SN. Roles of iNOS and nNOS in sepsis-induced pulmonary apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286:793-800.

11. Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, Xanthoudakis S, Roy S, Black C, Grimm E et al.: Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol.* 2000;1:496-501.
12. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Chang KC, Cobb JP, Buchman TG, Korsmeyer SJ, Karl IE. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:14541-14546.
13. Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson CM, Chang KC, Cobb JP, Osborne DF, Zollner KM, Buchman TG, Korsmeyer SJ, Karl IE. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol.* 1999;162:4148-4156.
14. Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulation of cytoskeleton and adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68: 459–486.
15. Amano M, Chihara K, Kimura K, et al. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science.* 1997; 275: 1308– 1311.
16. Horwitz AR, Parsons JT. Cell migration: movin' on. *Science.* 1999;286:1102–1103.
17. Narumiya S. The small GTPase Rho: cellular function of signal transduction. *J Biochem.* 1996; 120: 215–228.
18. Arai M, Sasaki T, Nozawa R. Inhibition by the protein kinase inhibitor HA1077 (fasudil) of the activation of NADPH oxidase in human neutrophils. *Biochem Pharmacol.* 1993; 46: 1487–1490.
19. Petrache I, Crow MT, Neuss M, Garcia JG. Central involvement of Rho family GTPases in TNF-alpha-mediated bovine pulmonary endothelial cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;306:244-149.
20. Tasaka S, Koh H, Yamada W, Shimizu M, Ogawa Y, Hasegawa N, Yamaguchi K, Ishii Y, Richer SE, Doerschuk CM, Ishizaka A. Attenuation of endotoxin-induced acute lung injury by the Rho-associated kinase inhibitor, Y-27632. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32:504-510.
21. Nagaoka T, Fagan KA, Gebb SA, Morris KG, Suzuki T, Shimokawa H, McMurtry IF, Oka M. Inhaled Rho kinase inhibitors are potent and selective vasodilators in rat pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:494-499.
22. Tokuyama K, Nishimura H, Iizuka K, Kato M, Arakawa H, Saga R, Mochizuki H, Morikawa A. Effects of Y-27632, a Rho/Rho kinase inhibitor, on leukotriene D(4) and

histamine-induced airflow obstruction and airway microvascular leakage in guinea pigs in vivo. *Pharmacology* 2002;64:189-195.

23. Iizuka K, Shimizu Y, Tsukagoshi H, Yoshii A, Harada T, Dobashi K, Murozono T, Nakazawa T, Mori M. Evaluation of Y-27632, a rho-kinase inhibitor, as a bronchodilator in guinea pigs. *Eur J Pharmacol.* 2000;406:273-279.

24. Sibbald WJ, Nevier R. Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome: Definitions and prognosis. [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com)

25. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992;20:864.

26. Balk RA. Severe sepsis and septic shock. Definitions, epidemiology, and clinical manifestations. *Crit Care Clin.* 2000;16:179.

27. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsey G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31:1250-1256.

28. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J. Bacteremia and severe sepsis in adults: A multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154:617.

29. Tenhoo T, Mannino DM, Moss M. Risk factors for ARDS in the United States: analysis of the 1993 National Mortality Followback Study. *Chest* 2001;119:1179–1184.

30. Wen-Liang Y, Zhu-Jin L, Ying W, Li-Ping S, Feng-Wu K, Su-Yun Q, Qi-Yi Z, Min-Hui X, Guo-Ying Z, De-Yi Z, Xun-Mei F, Bo S, Collaborative Study Group of Pediatric Respiratory Failure. The epidemiology of acute respiratory distress syndrome in pediatric intensive care units in China. *Intensive Care Med.* 2009;35:136-143.

31. Pugin J, Vergheze G, Widmer M-C, Matthay MA. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 1999;27:304-312.

32. Tomashefski JF. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med.* 2000;21:435- 466.



33. Ingbar DH. Mechanisms of repair and remodeling following acute lung injury, *Clin Chest Med* 2000;21:589-616.
34. Grene KE, Wright JR, Steinberg KP. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:1843-1850.
35. Fein AM, Calalang-Colucci MG. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock. *Crit Care Clin*. 2000;16:289-317.
36. Xiaopeng L, Ruijie S, Gerasimos F, Bruce DU. Apoptosis in lung injury and remodeling. *J Appl Physiol*. 2004; 97:1535-1542.
37. Chopra M, Reuben JS, Sharma AC. Acute Lung Injury. Apoptosis and Signaling Mechanisms. *Exp Biol Med*. 2009;234:361-371.
38. Bernard G, Artigas A, Carlet J, Dreyfuss D, Gattioni L. The American- European Consensus Conference on ARDS; definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149:818-824.
39. Dahlem P, Van Aalderen WMC, Bos AP. Pediatric acute lung injury. *Paediatr Respir Rev*. 2007;8:348-362.
40. Rath PC and Aggarwal BB. TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immun*. 1999;19: 353-364.
41. Wojciak-Stothard B, Ridley AJ. Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol*. 2003;39:187-199.
42. Liao JK, Seto M, Noma K. Rho Kinase (ROCK) Inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;50:17-24.
43. Amano M, Fukato Y, Kaibuchi K. Regulation and function of Rho-associated kinase. *Exp. Cell Res*. 2000;261:44-51.
44. Birukova AA, Smurova K, Birukov KG, Usatyuk P, Liu F, Kaibuchi K, Ricks-Cord A, Natarajan V, Alieva I, Garcia JGN, Verin AD. Microtubule disassembly induces cytoskeletal remodeling and lung vascular barrier dysfunction: Role of rho-dependent mechanisms. *J Cell Physiol*. 2004;201:55-70.
45. Shimokawa H, Morishige K, Miyata K, Kandabashi T, Eto Y, Ikegaki I, Asano T, Kaibuchi K, Takeshita A. Longterm inhibition of Rho-kinase induces a regression of arteriosclerotic lesion in porcine model in vivo. *Cardiovasc. Res*. 2001; 51:169-177.

46. Utsunomiya T, Satoh S, Ikegaki I, Toshima Y, Asano T, Shimokawa H. Antianginal effects of hydroxy fasudil, a Rho.-kinase inhibitor, in a canine model of efor angina. *Br J Pharmacol.*2001;134:1724-1730.
47. Demiryürek S, Kara AF, Çelik A, Tarakçioğlu M, Bağcı C, Demiryürek AT. Effects of Y-27632, a selective Rho-kinase inhibitor, on myocardial preconditioning in anesthetized rats. *Biochem Pharmacol.*2005;69:49-58.
48. Essler M, Hermann K, Amano M, Kaibuchi K, Heesemann J, Weber PC, Aepfelbacher M. Pasteurella multocida toxin increases endothelial permeability via Rho kinase and myosin light chain phosphatase. *J Immunol.*1998;161:5640-5646.
49. Özdülger A, Cinel I, Koksel O, Cinel L, Avlan D, Unlu A, Okçu H, Dikmengil M, Oral U. The protective effect of N-acetylcysteine on apoptotic lung injury in cecal ligation and puncture- induced sepsis model. *Shock* 2003;19(4):366–72.
50. Koksel O, Ozdulger A, Tamer L, Cinel L, Ercil M, Degirmenci U, Unlu S, Kanik A. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats, *Pulm Pharmacol Ther.*2006;19(2):90-95.
51. Ishizaki T, Naito M, Fujisawa K, Maekawa M, Watanabe N, Saito Y, Narumiya S. p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Lett.* 1997;404:118-124.
52. Köksel O, Yıldırım C, Tiftik RN, Kubat H, Tamer L, Cinel L, Kaplan MB, Değirmenci U, Özdülger A, Büyükaşar K. Rho-kinase (ROCK-1 ve ROCK-2) upregulation in oleic acid-induced lung injury and its restoration by Y-27632. *Eur J Pharmacol.*2005;510:135-142.
53. Shi J, Wei L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp.* 2007;55:61-75.
54. Iizuka K, Shimizu Y, Tsukagoshi H, Yoshi A, Harad T, Dobashi K, Murozono T, Nakazawa T, Mori M. Evaluation of Y-27632, a rho-kinase inhibitor, as a bronchodilator in guinea-pigs. *Eur J Pharmacol.* 2000;406:273-279.

55. Sward K, Dreja K, Susnjar M, Hellstrand P, Hartshorne DJ, Walsh MP. Inhibition of Rho associated kinase blocks agonist-induced  $Ca^{2+}$  sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ilium. *J Physiol.* 2000;522:33-49.
56. Watkins AC, Caputo FJ, Badami C, Barlos C, Barlos D, Xu DZ, Lu Q, Feketeova E, Deitch EA. Mesenteric lymph duct ligation attenuates lung injury and neutrophil activation after intraperitoneal injection of endotoxin in rats. *J Trauma* 2008;64:126-130.
57. Tomashefski JF. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med.* 2000; 21:435- 66.
58. Pugin J, Verghese G, Widmer M-C, Matthay MA. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 1999;27:304-312.
59. Galani V, Tatsaki E, Bai M, Kitsoulis P, Lekka M, Nakos G, Kanavaros P. The role of apoptosis in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome (ARDS):An up-to-date cell-specific review. *Path-Res Prac.* 2010;206:145-150.
60. Poli-de-Figueiredo LF, Alejandra G, Garrido AG, Nakagawa N, Sannomiya P, Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock.* 2008;30:53-59.
61. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;208:379-399.
62. Pulkkanen KJ, Laukkanen MO, Naarala J, Yla-Herttuala S. False-positive apoptosis signal in Mouse kidney and liver detected with TUNEL assay. *Apoptosis* 2000;5:329-333.
63. Ishaque A, Al-Rubeai M. Monitoring of apoptosis. *Cell Engineering.* 2004;4:281-306
64. Labot-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A. *J Histochem Cytochem.* 1998;46:327-334.
65. Saraste A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz.* 1999;24:189-195.
66. Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2007;14:32-43.
67. Hughes J, Gobe G. Identification and quantification of apoptosis in the kidney using morphology, biochemical and molecular markers. *Nephrology* 2007;12:452-458.
68. Park K, Kim SW, Rhu KS, Paick JS. Chronic administration of an oral Rho kinase inhibitor prevents the development of vasculogenic erectile dysfunction in a rat model. *J Sex Med.* 2006;3:996-1003.
69. Satoh S, Kreutz R, Wilm C, Ganten D, Pfitzer G. Augmented agonist-induced  $Ca^{2+}$ -sensitization of coronary artery contraction in genetically hypertensive rats. Evidence for

altered signal transduction in the coronary smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1994;94:1397–1403.

70. Somlyo AP, Somlyo AV. 1994. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994;372:231–236.