

**T.C.  
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**



**RATLARDA TOKSİK DUMAN İNHALASYONU  
MODELİNDE OLUŞAN AKUT  
AKCİĞER HASARI ÜZERİNE  
ANTİTROMBİN III'ÜN ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Sonay KIVRAKDAL**

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Özgür BAŞARAN

Ankara / 2006

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini özveriyle aktaran, yol gösterici sayın hocalarım;

Prof. Dr. Mehmet Haberal,

Prof. Dr. Nevzat Bilgin,

Prof. Dr. Esat Hersek,

Prof. Dr. Zafer Öner,

Prof. Dr. Ahmet Özenç,

Prof. Dr. Hamdi Karakayalı,

Doç. Dr. Gökhan Moray,

Doç. Dr. Remzi Emiroğlu,

Doç. Dr. Mahmut Can Yağmurdur,

Yrd. Doç. Dr. Özgür Başaran,

Dr. Şinasi Sevmiş,

Dr. Feza Karakayalı,

Dr. Yahya Ekici'ye saygı ve şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Tez çalışmamda desteği olan; Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Suna Türkoğlu'na, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Derya Aldemir'e, Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Handan Özdemir'e, Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Hale Tufan'a, Aile hekimi Dr. Altuğ Kut'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Uzun eğitimim boyunca destek ve sevgilerini esirgemeyen değerli ailem ve tüm dostlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Sonay KIVRAKDAL

## ÖZET

Her yıl hastanelere başvuran yanıklı hastaların %32-38'inde yanığa ek olarak inhalasyon yaralanmaları bildirilmiştir. Dumana maruziyet sonrası inhale edilen toksik gazlar organizmada önemli dinamik değişiklikler meydana getirir. Zehirli kimyasalların ve gazların inhalasyonu, doğrudan lokal hava yolu hasarının yanı sıra, aynı zamanda sistemik inflamatuvar mediatörlerin salınımıyla, inflamatuvar sürecin başlamasına neden olarak akut akciğer hasarının gelişimine neden olmaktadır. Duman inhalasyonunun eşlik ettiği yanık olgularında akciğer hasarının derecesi belirgin olarak artmakta olup mortalite oranları inhalasyon hasarının şiddetine bağlı olarak %45-78 arasında bildirilmektedir. İnhalasyon hasarının eşlik ettiği yanık olgularında gelişen akut akciğer hasarını önlemeye yönelik yapılan çok sayıda çalışmaya rağmen etkinliği kanıtlanmış terapötik bir ajan henüz bulunmamakta ve bu konuda çalışmalar hala devam etmektedir.

Alfa 2 globulin yapısında antikoagülan bir ajan olan Antitrombin III'ün (AT-III) endotelial hücre yüzeyindeki heparin benzeri glikozaminoglikanlarla (GAG) etkileşimi, endotelial hücreden PGI<sub>2</sub> salınımını kolaylaştırır. Bu sayede inflamatuvar reaksiyonlar sırasında lökosit ve monositlerin aktivasyonunu ve endotelial hücrelere nötrofil adezyonunu inhibe ederek lizozomal enzimlerin ve serbest oksijen radikallerinin oluşumunu engeller. Bu nedenle de AT-III'ün aktive lökositlerin indüklediği organ hasarını önlediği belirtilmektedir.

AT-III'ün antienflamatuvar etkilerini dikkate alarak yapmış olduğumuz bu çalışmada ratlarda duman inhalasyon modeli oluşturarak gelişen akciğer hasarı üzerinde etkili faktörler ve ilacın tötropatik etkileri değerlendirildi. Çalışmaya alınan toplam 35 adet rat 3 gruba ayrıldı. Gruplar; duman inhalasyon grubu (Grup 1; n=15), duman inhalasyon + AT-III grubu (Grup 2; n=15) ve kontrol grubu (Grup 3; n=5) olarak belirlendi. Aralıklı olarak duman ve oksijen inhalasyonu ile gaz intoksikasyonuna bağlı mortalite önlenerek ağır-orta derecede duman inhalasyon hasarı oluşturuldu. Gerçekleştirilen duman inhalasyon hasarı sonrası akciğerlerden doku örnekleri alınarak yapılan histopatolojik incelemelerde; telanjiektazi, atelektazi, amfizem, interalveoler septal konjesyon ve intraalveoler hemoraji durumları ile lökosit, lenfosit ve plazma hücresi infiltrasyonu değerlendirildi. Tüm histopatolojik parametreler standardize edilmiş bir organ hasar skalası kullanılarak değerlendirildi. Yapmış olduğumuz çalışmanın sonucu olarak duman inhalasyon grubunda (Grup 1) oluşturduğumuz ağır-orta derecede akciğer hasarının duman inhalasyon + AT-III

grubunda (Grup 2) anlamlı bir şekilde düzeldiği ve yerini hafif-orta derecede histolojik değişikliklerin aldığı saptandı ( $p=0,008$ ).

Sakrifikasyon işlemi öncesi alınan kan örneklerinde plazma 6-keto Prostaglandin  $F_{1\alpha}$  (6-keto  $PGF_{1\alpha}$ ) ile serum TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeyleri değerlendirildi. Duman inhalasyon + AT-III (Grup 2) ve duman inhalasyon (Grup 1) grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı (6-keto  $PGF_{1\alpha}$  için  $p= 0,046$ , TNF- $\alpha$  için  $p= 0,008$  ve IL-6 için  $p= 0,045$ ). Duman inhalasyon + AT-III grubunda (Grup 2); plazma 6-keto  $PGF_{1\alpha}$  değerlerindeki artışın ve serum TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerindeki azalmaların en fazla olduğu saptandı.

Akciğer dokusundan alınan örneklerde myeloperoksidaz (MPO) ve TNF- $\alpha$  aktiviteleri değerlendirildi. Duman inhalasyon + AT-III grubunda (Grup 2) doku MPO ve TNF- $\alpha$  aktivitelerinde duman inhalasyon grubuna (Grup 1) göre belirgin azalmalar saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu (MPO için  $p=0,003$  ve TNF- $\alpha$  için  $p=0,003$ ). Ayrıca daha önce AT-III'ün GSH antioksidan enzim sistemi ile ilişkisini gösteren bir çalışma mevcut olmayıp yapmış olduğumuz bu çalışmada AT-III'ün GSH antioksidan enzim sistemi ile ilişkisi değerlendirildi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmadı. Bu verilere dayanarak AT-III'ün doku hasarını önleyici etkisini GSH antioksidan enzim sisteminden bağımsız olarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada ayrıca Evans Blue metodu ile pulmoner vasküler permeabilite değişiklikleri incelendi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p=0,000$ ). Duman inhalasyon + AT-III grubunda (Grup 2) pulmoner vasküler permeabilitenin belirgin olarak azaldığı bulundu.

İnhalasyon hasarının eşlik ettiği yanık olgularında, iNOS aracılı NO üretiminin artışına neden olan inflamatuvar yanıt oluşmaktadır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada; AT-III'ün respiratuvar endotelial ve epiteliyal nitrik oksit sentetaz (NOS) aktivitelerinin modülasyonu üzerine etkileri ilk kez değerlendirildi ve AT-III ile tedavi sonrası iNOS aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar saptandı ( $p=0,03$ ). Ayrıca AT-III ile tedavi sonrası iNOS aktivitelerindeki azalma ile histopatolojik düzelmelerin birbirine korele olduğu gösterildi ve bu sonuç bize AT-III'ün inhalasyon hasarında artmış NO'in zararlı etkilerine karşı koruyucu etki gösterebileceği fikrini telkin etmektedir.

Yapmış olduğumuz bu çalışma ile, AT-III'ün duman inhalasyonu sonrası akciğer hasarının önlenmesinde bir çok yol üzerinden etki ederek histopatolojik düzelmeler sağlayan bir antienflamatuvar ajan olduğu ortaya konmuş olup yakın gelecekte bu amaçla klinikte yaygın olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

ÖNSÖZ .....	ii
ÖZET .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	v
KISALTMALAR .....	vii
ŞEKİLLER .....	ix
TABLolar .....	x
RESİMLER .....	xi
I. GİRİŞ .....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	3
II.1. İNHALASYON HASARI.....	3
II.2. İNHALASYON HASARININ FİZYOPATOLOJİSİ.....	6
II.3. İNHALASYON HASARINDA ROL ALAN MEDIATÖRLER.....	12
II.3.1. Araşidonik Asit Metabolitleri.....	12
II.3.2. Endotelial Hücre Mediatörleri.....	16
II.3.3. Lökositlere Bağlı Doku Hasarı.....	21
II.3.4. Sitokin Kaskadı.....	24
II.3.5. Komplemanın Rolü.....	27
II.3.6. İntrasellüler Mediatörler.....	28
II.4. İNHALASYON HASARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	32
II.4.1. Diğer Biyokimyasal ve İmmünohistokimyasal Parametreler.....	32
II.4.1a. Myeloperoksidaz (MPO).....	32
II.4.1b. Glutasyon (GSH).....	33
II.4.2. Histopatolojik Değerlendirme.....	34
II.4.3. İnflamatuar Hücre Ölümünün Regülasyonu.....	36
II.5. ANTİTROMBİN III (AT-III).....	40
III. GEREÇ VE YÖNTEM.....	50
III.1. ARAŞTIRMA TİPİ .....	50
III.2. ARAŞTIRMA YERİ VE ORTAMI.....	50
III.3. ANESTEZİ.....	50
III.4. DUMAN İNHALASYON MODELİ.....	50

<b>III.5. ARAŞTIRMA GRUPLARI .....</b>	<b>54</b>
<b>III.6. ARAŞTIRMA PARAMETRELERİ.....</b>	<b>58</b>
<b>III.6.1. Biyokimyasal Analiz.....</b>	<b>58</b>
<b>III.6.2. Histopatolojik Değerlendirme.....</b>	<b>60</b>
<b>III.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....</b>	<b>62</b>
<b>IV. BULGULAR .....</b>	<b>63</b>
<b>IV.1. GAZ ANALİZİ VE ISI TAKİBİ.....</b>	<b>63</b>
<b>IV.2. BİYOKİMYASAL SONUÇLAR .....</b>	<b>65</b>
<b>IV.3. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR .....</b>	<b>72</b>
<b>V. TARTIŞMA .....</b>	<b>90</b>
<b>VI. SONUÇLAR .....</b>	<b>103</b>
<b>VII. KAYNAKLAR.....</b>	<b>104</b>

## KISALTMALAR

- ARDS:** Adult respiratuar distress sendromu  
**AT-III:** Antitrombin III  
**Ca:** Kalsiyum  
**CO:** Karbon monoksit  
**COHb:** Karboksihemoglobin  
**cGMP:** Siklik Guanozin Monofosfat  
**ÇOYS:** Çoklu Organ Yetmezliği Sendromu  
**DIC:** Dissemine İntravasküler Koagülasyon  
**EDRF:** Endotel Kaynaklı Relakse Edici Faktör  
**GAG:** Glikozaminoglikan  
**G-CSF:** Granülosit koloni stimüle edici faktör  
**GSH:** Glutatyon  
**HETE:** Hidroksieikozatetraenoik asit  
**HMG CoA:** 3-hidroksi-3-metilgluteril Koenzim A  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Hidrojen peroksit  
**HPETE:** Hidroperoksieikozatetraenoik asit  
**ICAM:** Hücre içi adezyon molekülü  
**IL:** İnterlökin  
**iNOS:** Uyarılabilen Nitrik Oksit Sentetaz  
**6-Keto PGF<sub>1α</sub>:** 6 Keto Prostaglandin F<sub>1α</sub>  
**LT:** Lökotrien  
**MPO:** Myeloperoksidaz  
**NAD:** Nikotinamid Adenin Dinükleotid  
**NF-κB:** Nükleer Faktör Kapa  
**NK:** Doğal öldürücü hücre  
**NO:** Nitrik oksit  
**NOS:** Nitrik oksit sentetaz  
**O<sub>2</sub>:** Oksijen  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Süperoksit  
**P II:** Tip II Pnömosit

**PAF:** Platelet aktive edici faktör  
**PaO<sub>2</sub>:** Parsiyel oksijen basıncı  
**PARS:** Poli ADP Riboz Sentetaz  
**PEEP:** Pozitif basınçlı ventilasyon  
**PGI<sub>2</sub>:** Prostaglandin  
**PMNL:** Polimorfonükleer lökosit  
**SOD:** Süperoksit dismutaz  
**SOR:** Serbest oksijen radikalleri  
**TNF- $\alpha$ :** Tümör Nekroz Faktörü-Alfa  
**TNF-R:** Tümör Nekroz Faktör Reseptörü  
**TxA<sub>2</sub>:** Tromboksan A2  
 **$\gamma$ - IFN:** Gama İnterferon



## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** Duman inhalasyonu sonrası akciğerlerde gelişen fonksiyonel değişiklikler
- Şekil 2.** Duman inhalasyonuna bağlı gelişen akut solunum yetmezliğinin fizyopatolojisi
- Şekil 3.** Araşidonik asit kaskadı
- Şekil 4.** Doku hasarında endotelial hücrelerin rolü
- Şekil 5.** İnhalasyon hasarında iNOS'un rolü
- Şekil 6.** İnhalasyon hasarında PARP'ın rolü
- Şekil 7.** İnflamatuar hücre ölümünde aktive olan yollar
- Şekil 8.** AT-III'ün koagülasyon kaskadındaki etki mekanizması
- Şekil 9.** AT-III'ün endotelial hücre etkileşimi
- Şekil 10.** AT-III'ün endotelial hücre etkileşiminde heparinin rolü
- Şekil 11.** AT-III'ün antienflamatuar etkileri
- Şekil 12.** Duman inhalasyonu sırasında duman odasındaki gaz ölçümleri
- Şekil 13.** Plazma 6 keto PGF1 $\alpha$  derişimlerinin (pg/ml) gruplara göre dağılım grafiği
- Şekil 14.** Serum TNF- $\alpha$  derişimlerinin (pg/ml) gruplara göre dağılım grafiği
- Şekil 15.** Serum IL-6 derişimlerinin (pg/ml) gruplara göre dağılım grafiği
- Şekil 16.** Akciğer dokusunda GSH derişimlerinin (nmol/mg) gruplara göre dağılım grafiği
- Şekil 17.** Evans Blue boyası derişimlerinin ( $\mu$ gEB boyası/g doku) gruplara göre dağılım grafiği
- Şekil 18.** Toplam histolojik hasarlanma skor ortalamalarının gruplara göre dağılım grafiği
- Şekil 19.** Akciğer dokusunda lenfosit infiltrasyon derecelerinin gruplara göre dağılım grafiği
- Şekil 20.** Akciğer dokusunda nötrofil infiltrasyon derecelerinin gruplara göre dağılım grafiği
- Şekil 21.** Akciğer dokusunda alveolar kanama durumunun gruplara göre dağılım grafiği
- Şekil 22.** Akciğer dokusunda alveolar konjesyon durumunun gruplara göre dağılım grafiği
- Şekil 23.** Akciğer dokusunda amfizem durumunun gruplara göre dağılım grafiği
- Şekil 24.** Akciğer dokusunda telanjiektazi durumunun gruplara göre dağılım grafiği
- Şekil 25.** Akciğer dokusunda iNOS aktivitelerinin gruplara göre dağılım grafiği
- Şekil 26.** Akciğer dokusunda MPO aktivitelerinin gruplara göre dağılım grafiği
- Şekil 27.** Akciğer dokusunda TNF- $\alpha$  aktivitelerinin gruplara göre dağılım grafiği
- Şekil 28.** Alveoler epitel hücrelerindeki apoptotik hücre oranlarının gruplara göre dağılım grafiği

## TABLÖLAR DİZİNİ

**Tablo 1.** Plazma 6-keto PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  ile serum TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeyleri

**Tablo 2.** Akciğer dokusunda GSH aktivitesi, vasküler permeabilite ve alveoler apoptozisin değerlendirilmesi

## RESİMLER DİZİNİ

- Resim 1.** AT-III preparatı (Kybernin P® 500 İU/flakon)
- Resim 2.** Duman inhalasyon hasarı oluşturmak için kullanılan düzenek
- Resim 3.** Gaz analizi cihazı (Multi gas analyser 'MGA 23')
- Resim 4.** Kontrol grubunda normal yapıdaki alveoller
- Resim 5.** Duman inhalasyon hasarının histopatolojik olarak doğrulanması
- Resim 6.** Kybernin'in ratlara intraperitoneal yolla verilmesi
- Resim 7.** Ratlara laparotomi yapılışı
- Resim 8.** Ratlara torakotomi yapılışı
- Resim 9.** Biyokimyasal analizler için vena kavadan kan örneklerinin alınması
- Resim 10.** Vena kavadan Evans Blue boyasının verilmesi
- Resim 11.** İnteralveoler stromada lökosit infiltrasyonu (H&E x200)
- Resim 12.** İnteralveoler stromada mononükleer hücre infiltrasyonu (H&E x200)
- Resim 13.** Atelektazi ve amfizem (H&E x100)
- Resim 14.** İntraalveoler septal kanama ve septal konjesyon (H&E x200)
- Resim 15.** Endotel ve respiratuar epitel hücrelerinde iNOS boyaması (iNOS x200)
- Resim 16.** İnflamatuar hücrelerde MPO boyaması (MPO x200)
- Resim 17.** Endotel, respiratuar epitel ve inflammatuar hücrelerde TNF- $\alpha$  boyaması (TNF- $\alpha$  x200)
- Resim 18.** Duman inhalasyon grubunda alveoler epitel ve inflammatuar hücrelerdeki apopitozis (Apopitok x200)
- Resim 19.** Duman inhalasyon + AT-III grubunda alveoler epitel ve inflammatuar hücrelerdeki apopitozis (Apopitok x200)

# I. GİRİŞ

Yanık deri dışında bir çok sistemi etkilemektedir. Yanık sonrası oluşan lokal inflamatuvar sitokinler kan dolaşımına geçerek sistemik inflamatuvar cevaba yol açmaktadırlar. Bu sistemik cevabın en önemli bulgularından birisi akut akciğer hasarı olup mortaliteyi önemli oranda arttırmaktadır (1-4). Her yıl hastanelere başvuran yanıklı hastaların %32-38'inde yanıkla birlikte toksik duman inhalasyonuna bağlı akciğer hasarı bildirilmiştir (5). Duman inhalasyonunun eşlik ettiği yanık olgularında akciğer hasarının derecesi belirgin olarak artmakta olup mortalite oranları inhalasyon hasarının şiddetine bağlı olarak %45-78 arasında bildirilmektedir (5).

Duman inhalasyonunun erken fazında toksik kimyasal ajanlar ve oldukça yüksek çözünürlüğü olan aldehitlerin etkisiyle akciğer dokusunda direkt epitelyal yaralanmalar meydana gelir. Direkt epitel hasarına bağlı olarak; bronkospazm, mukozal ödem ve epitel nekrozu gelişir. Burada en önemli zedelenme yüzey gerilimini sağlayan sürfaktan'ın sentezlendiği pnömosit II'ye bağlı olmaktadır. Bronşial epitelyal alanlardaki ani kayıplar ve alveoler sürfaktanda azalmanında eşlik etmesi alveolar kollaps ve atelektazi ile sonuçlanarak adult respiratuvar distress sendromu (ARDS) gelişimine zemin hazırlar (2-4,6). Yanıklarla beraber sıklıkla ARDS gelişir. Yapılan klinik çalışmalarda inhalasyon hasarının eşlik etmediği yanık olgularında %2,6-14,3 oranında ARDS geliştiği bildirilmektedir (11,12). İnhalasyon hasarının eşlik ettiği yanık olgularında ise ARDS gelişiminin daha sık olduğu bildirilmektedir (2-4,12,13).

Duman inhalasyonu sonrası ilk 24-48 saat içerisinde hasarlanan dokulardan salınan çeşitli inflamatuvar mediatörlere bağlı olarak mikrovasküler permeabilite artar. Duman inhalasyonu sonrası gelişen akciğer hasarının patogenezinde; sitokinler, araşidonik asit metabolitleri, serbest oksijen radikalleri (SOR), nitrik oksit (NO) ve peroksinitritler gibi aktif radikaller, kompleman komponentleri ve koagülasyon faktörleri rol oynamaktadır (7,8). Duman inhalasyonu sonrası hasarlanan dokulardan salınan bu çeşitli proinflamatuvar ve kemotaktik ajanların etkisiyle dolaşımdaki nötrofiller aktive olarak yaralanma bölgesine yerleşip akciğer nötrofil infiltrasyonunda belirgin artışa neden olurlar. Aktive lökosit-endotel hücre etkileşimi akciğerde mikrovasküler geçirgenliği artırır ve alveoler alana proteinden zengin sıvı kaçışına yol açarak akut akciğer ödemine neden olur. Aktive lökositler aynı zamanda serbest oksijen radikali, sekonder inflamatuvar mediatör ve proteaz üretimi ile hücresel hasara neden olmakta ve böylece organ hasarını arttırarak ARDS gelişimine neden olmaktadır (9). Multisistem organ

yetmezliği gelişiminde de akciğer ve diğer organlardaki n6trofil aktivasyonunun etiopatogenezde 6nemli yeri olduğu g6sterilmiştir (10).

AT-III, karaciğer tarafından 6retilen tek zincirli bir alfa 2 globulin yapısında glikoproteindir. Antikoag6lan bir ajan olan AT-III, koag6lasyonun intrinsek, ekstrinsek ve ortak yolunda rol almaktadır. Hemostaz reg6lasyonunda AT-III'6n oynadığı santral yol, heparin ve endoteldeki heparin bağımlı yapılar tarafından hızlandırılan inhibit6r fonksiyonuna dayanmaktadır (14). AT-III'6n bu etkisini endotel h6cre y6zeyindeki heparin benzeri glikozaminoglikanlarla (GAG) etkileşmesi sonucunda ortaya çıktığı ileri s6r6lmektedir (15). AT-III'6n endotel h6cre y6zeyindeki heparin benzeri GAG ile etkileşmesi, in vitro ve in vivo olarak endotel h6creden protasiklin (PG I<sub>2</sub>) salınımını kolaylaştırır ve bu sayede monositlerden TNF- $\alpha$  6retimini, n6trofil aktivasyonunu ve endotel h6crelere n6trofil adezyonunu inhibe eder. Bu nedenle de AT-III'6n aktive l6kositlerin ind6klediği organ hasarını 6nlemede etkili olabileceği ileri s6r6lmektedir (10,16,17).

## AMAÇ

Bu 6alışmada; antitrombotik bir ajan olan AT-III'6n antienflamatuar etkinliği dikkate alınarak, toksik duman inhalasyonu sonrası gelişen akut akciğer hasarında mikrovask6ler dolaşıma katkısı ve akciğer hasarını azaltmada terap6tik etkilerinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

## II. GENEL BİLGİLER

### II.1. İNHALASYON HASARI

Duman inhalasyonu, alevin neden olduğu termal yaralanmalarda mortaliteyi arttıran önemli nedenler arasındadır. İnhalasyon yaralanmaları insidansı, tanısal kriterler ile değişir. Anamnez ve fizik muayene ile tanı konma oranı %2-15'e kadar düşmekte iken, fiberoptik bronkoskopi gibi tanı yöntemleri kullanılarak bu oran %32-38'a kadar yükselmektedir (5,18-20). İnhalasyon hasarı varlığında mortalite oranı inhalasyon hasarının şiddetine bağlı olarak %45-78 arasında değişmektedir (5). Özellikle ağır inhalasyon hasarının eşlik ettiği 60 yaş üzeri termal yaralanmalarda bu oran %100'lere kadar çıkmaktadır (18,19).

Yanıklarda sistemik inflamatuvar mediatörlerin salınımı ile akciğer hasarı duman inhalasyonundan bağımsız olarak artmaktadır. Duman inhalasyonu sonrası, ortamda oksijenin (O<sub>2</sub>) azalması, CO'in artması ve inhale edilen dumandaki toksik kimyasal ajanların etkisiyle gelişen çok sayıda patolojik olay hipoksi ile sonuçlan akut akciğer hasarını oluşturur. Duman içeriğinde bulunan toksik gaz ve ajanların inhalasyonu, doğrudan lokal hava yolu ve pulmoner alveollerin hasarına neden olmakla kalmaz, aynı zamanda inflamatuvar mediatörlerin salınımıyla, inflamatuvar sürecin başlamasına yol açar ve bu da hipoksiyle giden akut solunum yetmezliğine neden olur. Akciğer hasarı gelişiminde, yanık ve duman inhalasyonu birlikteliği, kendi başlarına yol açtıklarından daha şiddetli bir tablo meydana getirir (2-4,21).

Duman inhalasyonundan şüphelenilen hastalarda yüz ve orofarengeal hava yolunun muayenesi erken dönemde dikkatlice yapılmalıdır. Yüz yanığı, oral mukoza ve burun kıllarının yanmış olması, mukozal ödem, kurumlu balgam, sekresyon artışı, ses kısıklığı, hava açlığı, hırıltılı solunum, stridor, ekspiratuvar wheezing veya ronküs, ciddi hava yolu ödemi ve duman zehirlenmesinin işaretleridir. Bilinç düzeyinde değişiklik ve spesifik nörolojik bozuklukların varlığında özellikle CO zehirlenmesi yönünden testler yapılmalıdır. Kanda tespit edilen yüksek COHb seviyeleri duman zehirlenmesi ile ilişkili bir kanıt olarak kabul edilmelidir.

İnhalasyon yaralanmaları klinik olarak 3 farklı bölüme ayrılır. Bunların semptom ve tedavileri de farklılık gösterir. Bunlar;

### **1) Karbon Monoksit Zehirlenmesi**

Kapalı ortam yanığı olan bir hastada bilinç bulanıklığının olması CO intoksikasyonunu akla getirmeli ve aksi ispatlanana kadar duman inhalasyon hasarının varlığı kabul edilmelidir (2-5,22-25). Ev yangını nedeniyle ölenlerin %60-70'inin karbon monoksit zehirlenmelerinden etkilendiği bildirilmiştir. Duman inhalasyon yaralanmalarında erken ölüm en sık CO intoksikasyonuna bağlı olarak gelişmekte ve yangınla ilgili ölümlerin %50 sebebi olarak gösterilmektedir (26).

Karbon monoksit; renksiz, kokusuz ve hemoglobine oksijenden 200 kat daha fazla bağlanma kapasitesi olan bir gazdır. İnhalasyon ve absorbe edildiğinde hemoglobine bağlanarak karboksi hemoglobin (COHb) haline gelir. COHb, oksijenin dokulara taşınmasını ve kullanımını çeşitli yollarla önler. COHb oksijen-hemoglobin disosiyasyon eğrisini sola kaydırır ve bu şekilde doku düzeyinde normal hemoglobinden oksijenin ayrılmasını azaltır. CO sitokrom a3 kompleksini inhibe ederek intrasellüler solunumun etkinliğini azaltır. Ayrıca CO kalp ve iskelet kaslarına bağlanarak direkt olarak toksisiteye neden olur, santral sinir sisteminde demiyelinizasyona neden olarak nörolojik hasar meydana getirir.

### **2) Termal Hava Yolu Yaralanmaları**

Isının yaptığı hasar, kuru havanın ısıyı taşıma kapasitesinin düşük olması sebebi ile genelde vokal kordların üzerindeki alanlarda gözlenir. Alt solunum yolu ve akciğer parankiminde gerçek termal hasar kuru havaya oranla ısıyı taşıma kapasitesi 4000 kat daha fazla olan sıcak buhar ya da uzun süreli ve akımın olduğu dumana maruziyet olmadıkça oldukça nadirdir (23,27). Bu durumda buhar suya dönüşür ve alt solunum yolları alveollerinde ciddi yaralanmalar meydana getirebilir. Derin parankimal hasar 12-96 saat sonra belirginleşir. Bu hastalarda alt solunum yolları çok çabuk tıkanır ve tedavi edilemeyen asfiksiden dolayı genellikle ölümlerle sonuçlanır (4,28).

Hava ısısı yanan odada 540 C (1000 F) veya daha fazlasına ulaşır. Fakat hava ısıyı iyi iletme kapasitesine sahip olmadığından genelde vokal kordların üzerinde kalarak büyük bir kısmı nazofarinks ve üst solunum yolunda dağılır ve üst solunum yollarında önemli termal yaralanmalara neden olabilir. Solunum yollarının termal yaralanmalarında genellikle mukozal ve submukozal ödem, eritem, hemoraji ve ülserasyon oluşur. Termal yaralanmalarda duman içeriğindeki ısının yaptığı hasar genellikle üst solunum yolu ve trakea ile iki nedenle sınırlıdır.

Nazofarinks ve orofarinks, relatif geniş yüzey alanı ve türbülansı olduğu kadar mukozal sıvı tabakası nedeniyle bir ısı deposu gibi görev yaparak çok etkili bir ısı değişimi mekanizması sağlar. Ayrıca ani sıcak hava vokal kordların refleks olarak kapanmasını tetikler ve böylece alt solunum yolları yaralanması potansiyeli azaltılmış olur.

### 3) Toksik Duman İnhalasyonu

İnhale edilen havadaki karbonmonoksit (CO) ve O<sub>2</sub> gibi gaz oranlarındaki değişiklikler ani gelişen ölüm sebepleri arasında önemli yer tutsa da akut solunum yetmezliğinin gelişimine katkıda bulunan ve mortaliteyi arttıran asıl neden duman içerisinde bulunan diğer toksik kimyasal ajanlar (Siyanit, asit ve aldehytleri vs.) dir. Dumana maruziyet sonrası inhale edilen CO, hidrojen siyanid, hidrojen klorid gibi toksik gazlar organizmada önemli dinamik değişiklikler meydana getirir. Duman inhalasyonu orofarinksten alveole kadar tüm solunum yolu düzeyinde direkt epitelyal hasara neden olabilir. Duman inhalasyonu sonrası solunum sistemini etkileyen çok sayıda toksik gazların etkisiyle bronşial epitelyal alanlarda ani kayıp ve alveoler sürfaktanda azalmaya neden olarak özellikle küçük hava yollarında mukozal ödem ve mikroatelektaziler bazen de makroatelektaziler meydana gelebilir. Bu durum bölgesel hipoventilasyon, alveoler atelektazi, intrapulmoner şant ve sonrasında persistan hipoksi ile giden akut solunum yetmezliği ile sonuçlanır. Solunum yolunun kimyasal gazlar ile irritasyonu üst ve alt solunum yolunun akut inflamatuvar cevabına da yol açmaktadır (4,25,29).

Duman inhalasyonu sonrası oluşan solunum sistemi hasarı; partikül konsantrasyonu, partikül büyüklüğü ve kimyasal komponentler ile ilişkili olarak dumanın içeriğine, inhale edilen dumanın yoğunluğuna, duman içinde kalınan süreye ve akciğerin verdiği yanıtı bağlı olarak değişmektedir. Dumanın içeriğindeki partikül büyüklüğü yanan materyalin türüne göre 0,1-15 µm arasında değişmekte olup ortalama 3-5 µm'dir. 5µm'nin üzerindeki partiküller nazofarenksten temizlenirken daha küçük partiküller alveollere kadar ulaşmaktadır.

Yaralanmanın kimyasal mekanizması, farklı toksik ürünlerde farklı olabilmektedir. Toksik ürünlerin dağılımı; yanan yakıtın çeşitine, yüksek veya düşük oksijenli ortamlarda yanabilmesine ve gerçek yanma ısısına bağlı olarak yanma veya piroliz sürecine bağlıdır. Odun dumanında 280 toksik ürün belirlenmiştir. Tamamlanmamış yanmanın önde gelen ürünleri sülfür, nitrojen ve aldehytlerin oksidasyonlarıdır. Duman inhalasyonundan sonra yanma ve pirolizle oldukça yüksek çözünürlüğü olan aldehytler olan formaldehit, asetaldehit ve akrolein oluşur. Bu aldehytler üst ve alt solunum yolu mukozası üzerindeki sıvıda çok hızlı bir şekilde çözünür ve direkt epitel yaralanmasına neden olur. Bir aldehyt olan akrolein 10 ppm gibi düşük konsantrasyonlarda bile ciddi pulmoner ödeme neden olmaktadır. Ayrıca amonyak oldukça



çözünebilirdir ve solunum yolu sıvısı ile reaksiyona girerek çok kuvvetli bir alkali olan amonyum hidroksiti oluşturur. İnhal edilen sülfür oksit, benzer şekilde hidrolize ve sonra okside edilerek sülfür ve sülfürik asit haline gelir. Hidrojen klorür de dahil olmak üzere bu kostik asitler önemli mukozal koagülasyon ve likefaksiyon nekrozuna yol açarlar (30). Üst solunum yollarında oluşan epitel nekrozu, ödem ve submukozal hemoraji olarak alt solunum yollarını da etkiler. Hidrojen siyanid polyüretan yanmasının yaygın bir ürünü olup CO'in sellüler respirasyonundan daha etkin bir inhibitördür. Bu toksik gaz doku düzeyinde normal oksijen kullanımını bozar oksidatif fosforilasyonun son basamağı olan sitokrom a3 düzeyini inhibe ederek aerobik metabolizmayı durdurur ve laktik asidoza neden olur. Siyanidin etkisi özellikle santral sinir sistemi gibi sınırlı anaerobik rezervli yaralanmış dokularda olur. Siyanid ve CO etkilerinin kombine olarak etkisi doku oksijen dağılımında sinerjik azalma ölümle sonuçlanır. Tedavide antidotu olarak sodyum tiosülfat veya hidrosikobalamin kullanılır (25,30).

## **II.2. İNHALASYON HASARININ FİZYOPATOLOJİSİ**

Duman inhalasyonu sonrası gelişen akciğer hasarı sirkulatuar ve mikrosirkulatuar disfonksiyonun kompleks bir sürecidir. Duman içerisindeki aldehit, nitrojen dioksit, sülfür dioksit, hidrojen klorit gibi toksik kimyasal ajanlara bağlı olarak direkt alveoler epitel ve mikrovasküler endotel hasarı, silier aktivite kaybı, bronşial ödeme bağlı obstrüksiyon ve sürfaktan salgılayan PII hasarı ile alveoler atelektaziler meydana gelir.

Zehirli kimyasalların ve gazların inhalasyonu, doğrudan lokal hava yolu ve pulmoner alveollerin hasarının yanı sıra, aynı zamanda sistemik inflamatuvar mediatörlerin salınımıyla, inflamatuvar sürecin başlamasına neden olarak akut akciğer hasarının gelişimine neden olmaktadır.

### **Direkt Endotel ve Epitelyal Hasar**

Alveolo-kapiller bariyeri oluşturan yapı; Tip I ve II pnömositlerden oluşan alveol epiteli ile pulmoner kapiller endoteldir (31). Alveol yüzey alanının normalde %90'ını oluşturan düz, tip I hücreler kolaylıkla hasara uğrayabilirken, geri kalan %10'luk alanı kaplayan küboidal, PII hücreler ise hasara karşı daha dayanıklıdır ve sürfaktan yapımı, iyon taşınması, hasar sonrası çoğalma ve tip I hücrelere diferansiyasyon gibi görevleri vardır. PII hücrelerinde hasar sürfaktan üretimi azaltarak karakteristik sürfaktan eksikliği anormalliklerine neden olur.

Alveol epitelinin hasarlanma derecesi, sonucun önemli bir belirleyicisidir (25,32,33). Başlangıçta alveoler-kapiller membranda permeabilite artışı ne kadar şiddetli ise prognoz o kadar kötüdür. Duman inhalasyonu sonrası birkaç saat içinde trakeobronşial ve alveoler epitel zarar görmeye başlar. Duman inhalasyonunun akut fazında, toksik kimyasal ajanların alveolo-kapiller bariyerin bütünlüğünü bozmasına bağlı olarak proteinden zengin sıvının alveoler boşluğu doldurması ile pulmoner interstisyel ödem oluşur (33-35). Alveolo-kapiller bariyerin bütünlüğünü bozması bakteriyel pnömonisi olan hastalarda septik şoka sebep olabilir. Eğer epitelyal hasar ciddiye, düzensiz veya yetersiz epitel onarımı fibrozise yol açabilir (25,31,33).

Duman zehirlenmesinin erken dönemlerinde pulmoner fonksiyonlar değişkendir. Pulmoner fonksiyonların kötüleşmesinin majör nedeni havayolu obstrüksiyonudur. Birkaç saat içinde trakeal ve bronşial epitel zarar görmeye başlar ve hemorajik trakeobronşit, küçük hava yollarındaki mukozal ödem nedeniyle mikro ve makroatelektaziler meydana gelebilir. küçük hava yolu tıkanıklıklarına sürfaktan kaybına bağlı alveoler kollapın eşlik etmesiyle yaygın alveoler atelektaziler oluşur. Buna alveoler-endotelyal epitel bütünlüğünün bozulması sonucu yaygın intersitisyel ödemin de eşlik etmesiyle klinik tablo ağırlaşır. Obstrüktif döküntü materyalleri havayolu lümenini tıkarlar, bu da ventilasyonun fokal kaybı veya hipoventilasyonla sonuçlanır. Bölgesel hipoventilasyon, alveoler atelektazi, intrapulmoner şant ve sonrasında gelişen hipoksi ile sonuçlanır (25,36,37). Ventilasyon sahasındaki vazokonstrüksiyon ile perfüzyon yetersiz kalır, bu da ventilasyon-perfüzyon oranında uygunsuzluğa neden olur. Ventile alandan ventile olmayan alana kan transferi arteriyel kanda oksijenizasyon yetersizliği ile dolayısıyla organlarda hipoksemik değişikliklerle sonuçlanır. Tıkanmayan kısımda hiperventilasyon oluşur. Böylece volüm kontrollü mekanik ventilasyon yapıldığında havayolu basıncı artar. Tipik olarak azalmış fonksiyonel rezüdüel kapasite, azalmış vital kapasite, obstrüktif hastalığın kanıtı olan akım hızlarında azalma ve ölü boşlukta artma meydana gelir.

## **İnflamasyon**

Zehirli kimyasalların ve gazların inhalasyonu, doğrudan havayolu ve pulmoner alveollerin hasarına neden olmakla kalmaz, solunum yollarında akut inflamatuvar cevabın başlamasına da yol açar (21,29). Duman inhalasyonuna bağlı gelişen akciğer hasarının fizyopatolojisinin anlaşılması ve hasarın önlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda, duman inhalasyonuna karşı gelişen inflamatuvar cevabın etkili olduğu ortaya çıkarılmıştır. Duman hasarına cevap olarak çeşitli lokal ve sistemik inflamatuvar mediatörler salınır. Bu inflamatuvar mediatörlerden bazıları; TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-8 gibi sitokinler, PAF, PG, TxA<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub> gibi araziidonik asit metabolitleri, endotelyal-lökosit adezyon molekülleri ve endotelyal kaynaklı NO gibi vazoaktif

ajanlar ve serbest O<sub>2</sub> radikalleri olup bunlar dolaşımdaki lökositleri aktive ederek akut akciğer hasarının gelişmesine neden olmaktadır.

Duman inhalasyonu sonrası, inhale edilen duman partikülleri alveolar makrofajlar tarafından fagosite edilir. Bu fagositoz esnasında alveoler makrofajlardan güçlü kemotaktik ajanlar olduğu bilinen TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi proinflamatuvar sitokinler salınır TNF- $\alpha$  alveoler ve endotelial hücreleri nekrozuna neden olarak doku hasarını artırır. Yapılan çalışmalarda TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ 'nin sistemik dolaşımdaki seviyeleri ile akciğer hasarlanma derecesinin şiddetinin birbiri ile korele olduğu bildirilmiştir (38). Bu proinflamatuvar sitokinler daha sonra akciğer hasarının oluşmasında majör rolleri olduğu bildirilen IL-6 ve IL-8 gibi diğer sitokinlerin salınımını indüklemektedirler (33,38,39).

Duman içeriğindeki toksinler ve serbest oksijen radikalleri, akciğer mikrovasküler damar endotelini ve alveoler epiteli aktive eder. Duman inhalasyonu sonrası erken fazda olmak üzere ilk birkaç saatte proteolitik sistem aktivasyonu sonucu serin proteaz kallikrein tarafından kininojen degradasyonu ile oluşan kininlerden özellikle histaminin dokulardan, mast hücrelerinden ve trombositlerden büyük miktarlarda salınımı gerçekleşir ve bu kapiller vazodilatasyon ve vasküler permeabilityi artırır, bronkokonstriksiyon ve trombosit agregasyonunu stimüle eder ve pulmoner vasküler rezistansta artışa neden olur. Aktive olan endotel hücrelerinden ayrıca, PAF, LTB<sub>4</sub>, TxA<sub>2</sub> gibi güçlü kemotaktik ajanlar olduğu bilinen arakidonik asit metabolitleri salınır (33,35).

Duman inhalasyonu sonrası oluşan histamin ve diğer inflamatuvar mediatörler solunum sisteminde ilk 12-96 saat içerisinde vasküler permeabilite artışına neden olmaktadır (22,25,40). Akciğerlerde anormal onkotik basınç gradyenti oluşturan yanmış ve yanmamış dokulardaki permeabilite artışı ile damarlardan plazma proteinlerinin kaybı, plazma onkotik basıncını düşürür. Tüm bunlar pulmoner hipertansiyon ile birleşince yaygın intersitisyel ödem gelişir. Bu da akciğerlerde ventilasyon- perfüzyon dengesizliğine neden olarak oksijenizasyon yetersizliği ile giden akut akciğer hasarı ile sonuçlanır (25,33,41).

Duman inhalasyonuna bağlı gelişen akciğer hasarının fizyopatolojisinin anlaşılması ve hasarın önlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda, duman inhalasyonuna karşı gelişen akciğer parankim hasarının ortaya çıkmasına neden olan inflamatuvar cevap oluşumunda, dolaşımda bulunan uyarılmış lökositlerin ve özellikle nötrofiller tarafından salgılanan proteazlar ve toksik oksijen metabolitlerinin önemli rolü olduğu bildirilmektedir (22,33,42-46).

Duman hasarının eşlik etmediği yanık olgularında ve iskemi-reperfüzyon modelinde yapılan çok sayıda deneysel çalışmada lokal doku hasarı sonucu aktive olan nötrofillerin en fazla

akciğerlere göç ederek uzak organ hasarı oluşturdukları bildirilmektedir. Aktive olan nötrofillerin akciğerleri daha çok tercih etmesinin bir çok nedeni vardır;

- 1- Pulmoner vasküler yatak oldukça geniştir.
- 2- Pulmoner kapillerler sistemik kapillerden daha dardır.
- 3- Pulmoner kapiller basınç sistemik basınçtan daha düşüktür.
- 4- Alveoler makrofajlar nedeniyle akciğerde daha fazla sitokin üretilir.
- 5- Nötrofiller aktive olduklarında şekil değiştirebilmeleri güç olup kapillere takılırlar.

Duman inhalasyonu sonucu toksik ajanların alveoler ve endotel dokularında yapmış olduğu direkt hasar, yukardaki sebeplerle aktive nötrofillerin akciğerlerde yoğun olarak birikmesi ile daha da artar. Ayrıca duman inhalasyonu sonrası vasküler permeabilite artışı nedeniyle protein içeriğinden zengin pulmoner lenf akım hızı yaklaşık 10 kat artar. Alveollerin aşırı gerilmesi nötrofiller için majör kemotaktik olarak bilinen IL-8 başta olmak üzere diğer sitokinlerin sentezini de indüklemektedir (33,36), (Şekil 1).

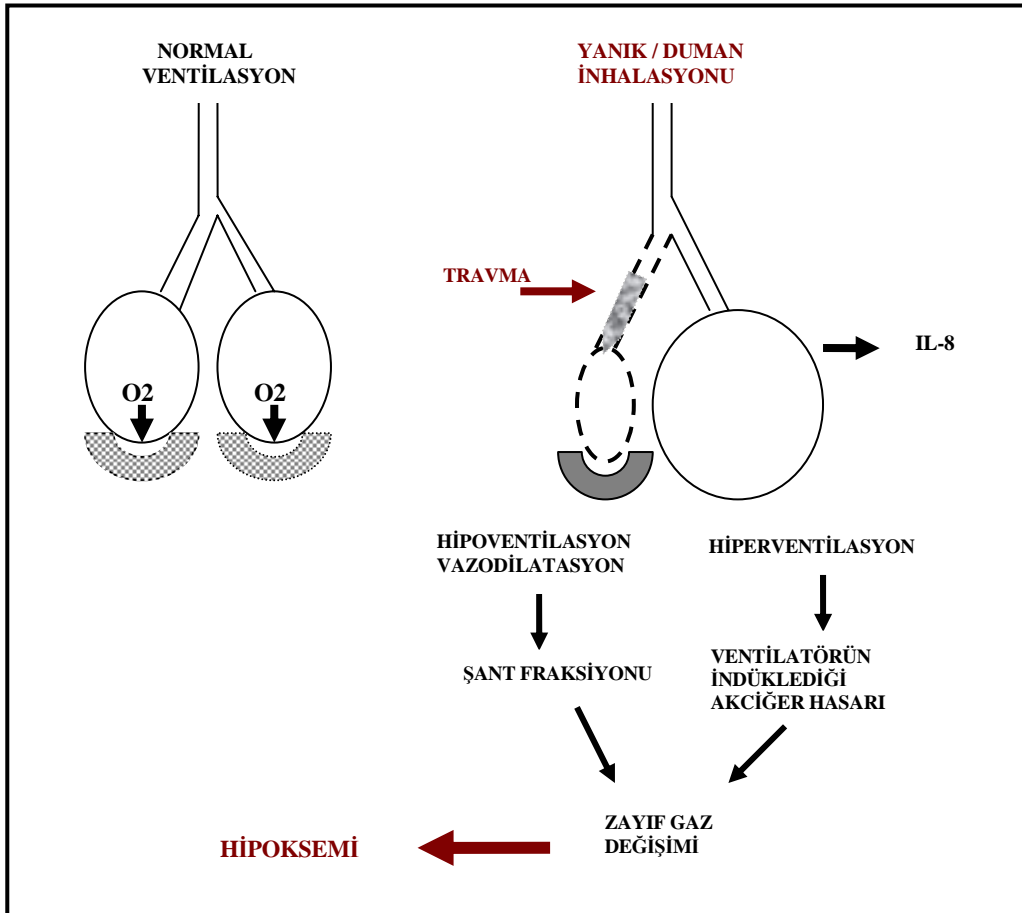
Kemotaksi ile uyarılan dolaşımdaki lökositler, aktive olarak rolling, adezyon ve migrasyon basamaklarından geçerek damar dışından yaralanan akciğer dokusuna geçer. Lökositler, önce geçici daha sonra da sıkıca endotele yapışır. Lökosit adezyonu bir anahtar-kilit gibi birbirini tamamlayan lökosit ve endotel yüzeylerinde yer alan adezyon moleküllerinin bağlantısı ile gerçekleşir. Endotele yapışan lökositler damar çeperinden interstisyel dokuya göç ederler. Bu lökosit-endotel adezyonu daha sonraki lökositlere bağlı olaylar için bir başlangıçtır.

Aktive lökositlerden salınan serbest oksijen radikalleri ve doku proteazlarının etkisiyle vasküler permeabilite artışı devam eder ve akciğer parankim hasarı ortaya çıkar (28,45,47). Bu olaylar zinciri birbirleri ile ilişkili olup, akut solunum yetmezliğine giden tabloyu hazırlar (48), (Şekil 2). Pulmoner alveoler makrofajların kemotaksisindeki yetersizlik yanıklı hastalarda geç dönem pnömonilerinin yüksek sıklıkla görülmelerine neden olur (49).

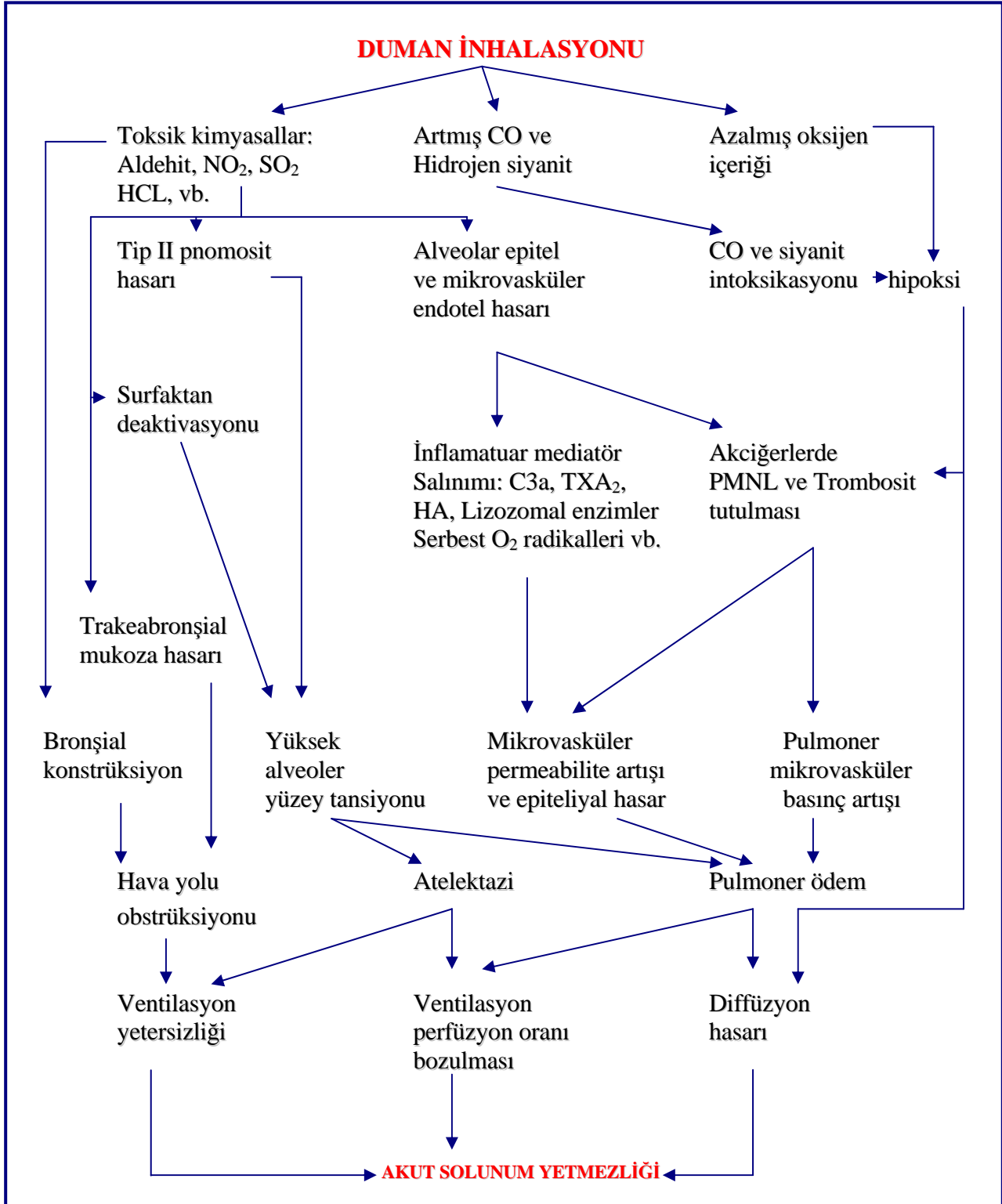
Lökositlerin parçalanmasıyla açığa çıkan lizozomal enzimler ve endotoksinin etkisiyle kapiller endotel zedelenir. Endotel hücre hasarı sonucu endotel hücreleri tarafından salgılanan doku tromboplastini koagülasyon mekanizması da aktive olur. Damar duvarındaki geçirgenliğin artması ile proteinden zengin sıvı damar dışı dokuya geçer. Küçük damarlarda kanın hücresel elemanlarının konsantrasyonunu ve kanın viskozitesi artar. Kan akımı yavaşladıkça, nötrofiller, eritrositler ve trombositler, vasküler endotel boyunca periferik doğru yönelir. Pulmoner kapillerlerde trombosit agregasyonu ve fibrin birikimi ile hyalen mikrotrombüsler oluşur. İnhalasyon hasarının ilerleyen dönemlerinde jeneralize trombozisin bulgularının saptanması klinik tabloyu ağırlaştırır. Alveoler eksüda ise mikroorganizmalar için zengin bir kültür vasatı olduğundan sekonder infeksiyonlar sıktır. Hasta akut fazı atlarsa,

diffüz interstisyel fibrozis gelişir ve respiratuar fonksiyonlar giderek bozulur. Sonuçta, pulmoner ödem, hemoraji, atelektazi, hyalen membran oluşumu ve kapiller trombüslerle karakterize ARDS tablosu ortaya çıkar.

ARDS; oksijenizasyonun ileri derecede bozulduğu fizyolojik anormalliklerle ilişkili, sol atrial veya pulmoner kapiller hipertansiyon ile açıklanamayan fakat beraber olabilen ve radyolojik olarak bilateral diffüz pulmoner infiltrasyon görünümü ile seyreden, pulmoner vasküler geçirgenlik artışının eşlik ettiği akut başlangıçlı ve persistan akciğer inflamasyonu ile giden bir klinik sendromdur (50,51). ARDS'de prognoz iyi değildir ve son yıllarda patofizyolojisi daha iyi anlaşılmasına rağmen tedavisinde önemli bir gelişme olmamıştır. Hipoksemiye tedavi etmek için verilen yüksek konsantrasyondaki oksijen tedavisinde O<sub>2</sub>'den kaynaklanan serbest radikaller hastalığın progresini hızlandırır. Hasta özelliklerine bağlı olarak rapor edilmiş ARDS mortalite oranları %31-70 arasında değişmektedir (52). Hastaların yaklaşık %50'si akut fazda ölür.



Şekil 1. Duman inhalasyonu sonrası akciğerlerdeki fonksiyonel değişiklikler



**Şekil 2.** Duman inhalasyonuna bağlı gelişen akut solunum yetmezliğinin fizyopatolojisi.

**NO<sub>2</sub>**; nitrojen dioksit, **SO<sub>2</sub>**; sülfür dioksit, **HCL**; hidrojen klorit,

**HA**; histamin, **TXA<sub>2</sub>**; tromboksan A2, **C3a**; aktif kompleman 3,

**PMNL**; polimorfonükleer nötrofil lökosit.

## II.3. İNHALASYON HASARINDA ROL ALAN MEDIATÖRLER

### II.3.1. ARAŞIDONİK ASİT METABOLİTLERİ

Araşidonik asit metabolitleri travma sonrası hasarlanan dokuda oluşan inflamatuvar yanıtın majör komponentleridir. Fosfolipidlerden arşidonik asit sentezi için fosfolipaz A<sub>2</sub>'nin enzimatik aktivasyonu gereklidir. Araşidonik asitin okside olduğu iki majör yol, siklooksijenaz ve lipooksijenaz döngüleridir. Prostaglandinler ve tromboksanlar siklooksijenaz döngüsünde oluşurlar. PGI<sub>2</sub> oluşumu için prostasiklin sentetaz, TxA<sub>2</sub> oluşumu için tromboksan sentetaz enzimlerinin aktivitelerine gereksinim vardır. Lipooksijenaz döngüsünde ise lökotrienler ve HETE meydana gelir (237), (Şekil 3).

Duman inhalasyonu sonrası siklooksijenaz ve lipooksijenaz ürünleri başta alveoler epitel ve kapiller endotel olmak üzere alveoler makrofajlar gibi inflamatuvar hücreler tarafından fagositoz sırasında da salgılanabilirler.

#### PROSTASİKLİN (PGI<sub>2</sub>)

Vasküler stres ve hipoksiye yanıt olarak arşidonik asitten ilk olarak salındığı bildirilen vazoaaktif ajanlardır. PGI<sub>2</sub> üretimi, arşidonik asit salan membran fosfolipidlerinin fosfolipaz aktivitesiyle başlatılır. Araşidonik asit siklooksijenaz ile prostaglandin endoperoksitlerine (PGH<sub>2</sub>), o da sırasıyla prostasiklin sentetaz ile prostasikline dönüştürülür. Prostrasiklin, başta endotel hücreleri olmak üzere lökositler gibi diğer inflamatuvar hücreler tarafından da sentezlenir. Prostaglandin sentezinin hız kısıtlayıcı basamağı, sitokinler ve çeşitli inflamatuvar mediatörler tarafından stimüle edilen bir enzim olan fosfolipaz A<sub>2</sub> tarafından sağlanır. PGI<sub>2</sub> sentezini, steroidler fosfolipaz A<sub>2</sub>'yi inhibe ederek, aspirin benzeri ilaçlar da siklooksijenaz enzimini inhibe ederek azaltırlar. PGI<sub>2</sub> üretimi, yaş, sigara içimi, diyabet, ateroskleroz gibi durumlarda azalır. AT-III endotel hücrelerinden PGI<sub>2</sub> serbestleşmesini arttırmaktadır.

Endotel kaynaklı güçlü bir vazodilatatör olup endotelial nitrik okside benzer fonksiyonları vardır. Ayrıca c GMP'yi arttırarak trombosit deaktivasyonu vasküler endoteliuma adezyonunu ve agregasyonunun önlenmesine neden olur. Sadece trombüs formasyonunu önlemekle kalmaz, aynı zamanda var olan agregatları da ortadan kaldırır. İnflamatuvar reaksiyonlar sırasında lökosit ve monositlerin aktivasyonunu ve lizozomal enzim salınımını inhibe edebilir. Özellikle septik şok ve hipoksi sırasında dolaşımda endojen PGI<sub>2</sub> salınımının arttığı bildirilmekte ve bunu da sitokinlerin aracılık ettiği siklooksijenaz izoenzim-2'nin indüksiyonu ile olduğu bildirilmektedir.

## **TROMBOSİT AKTİVE EDİCİ FAKTÖR (PAF)**

PAF, fosfolipaz A<sub>2</sub> etkisiyle bir membran fosfolipidinden oluşur ve endotel hücre tarafından üretilirler. PAF sekresyonu yapan diğer hücreler PMNL'ler, mast hücreleri ve eozinofiller olup salınımı TNF- $\alpha$ , IL-1 ve diğer inflamatuvar mediatörler tarafından indüklenmektedir. Bu güçlü inflamatuvar mediatörler siklooksijenaz döngüsünü stimüle ederek TxA<sub>2</sub> yapımını artırır ve trombosit aktivasyonuna ve agregasyonuna yol açarlar. PAF endotel hücrelerini kontrakte ederek şeklini değiştirir ve bu yolla vasküler permeabilitenin artmasına neden olur. Duman inhalasyonu sonrası lökosit aktivasyonu, adheransı, diyapedezine neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda PAF'ın mikrovasküler endotelyuma lökosit adheransını kolaylaştırdığı gösterilmiştir. PAF özellikle lökosit ve diğer hücreler tarafından prostaglandinler ve LTB<sub>4</sub> gibi diğer kemotaktik mediyatörlerin sentezini de uyarmaktadır.

## **TROMBOKSAN A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>)**

Araşidonik asit metaboliti olup siklooksijenaz yolu ile üretilirler. TxA<sub>2</sub>' nin etkileri; vazokonstriksiyon, artmış kapiller permeabilite, trombosit agregasyon ve adezyonu, membran destabilizasyonu, miyosit ve endotel hücrelerin sitolizini içermektedir. TxA<sub>2</sub> aynı zamanda endotele nötrofil adezyonunu indükleyen güçlü bir kemoatraktandır. PMN aktivasyonu sonucu marjinyasyon yoluyla genel bir lökositopeni gelişimini de indükler. Ayrıca pulmoner hipertansiyon ve bronkokonstriksiyon yapıcı etkileri de bildirilmektedir. Mikrodolaşım ve trombositler üzerindeki net etki dominant olarak TxA<sub>2</sub> ve PGI<sub>2</sub> düzeylerine bağlıdır. Fizyolojik koşullarda trombosit agregasyonu ve vazokonstriksiyonun derecesi TxA<sub>2</sub> ve PGI<sub>2</sub> tarafından dengede tutulmaktadır.

TxA<sub>2</sub> sentezini, steroidler fosfolipaz A<sub>2</sub>'yi inhibe ederek, NSAİD ilaçlar ise siklooksijenaz enzimini inhibe ederek azaltmaktadırlar. TxA<sub>2</sub> reseptör blokajı veya sentez inhibisyonu ile pulmoner hasarın azaltılabileceği bildirilmektedir. Bir NSAİD olan ketorolak siklooksijenaz enzim inhibisyonu yaparak PG ve TxA<sub>2</sub> sentezini engellediği bunu da NO üretimini inhibe ederek yaptığı bildirilmiştir (18). Yapılan bir diğer çalışmada ise selektif TxA<sub>2</sub> sentetaz inhibitörü OKY-046 ile pulmoner disfonksiyonun düzeltilebileceği ileri sürülmektedir (53).

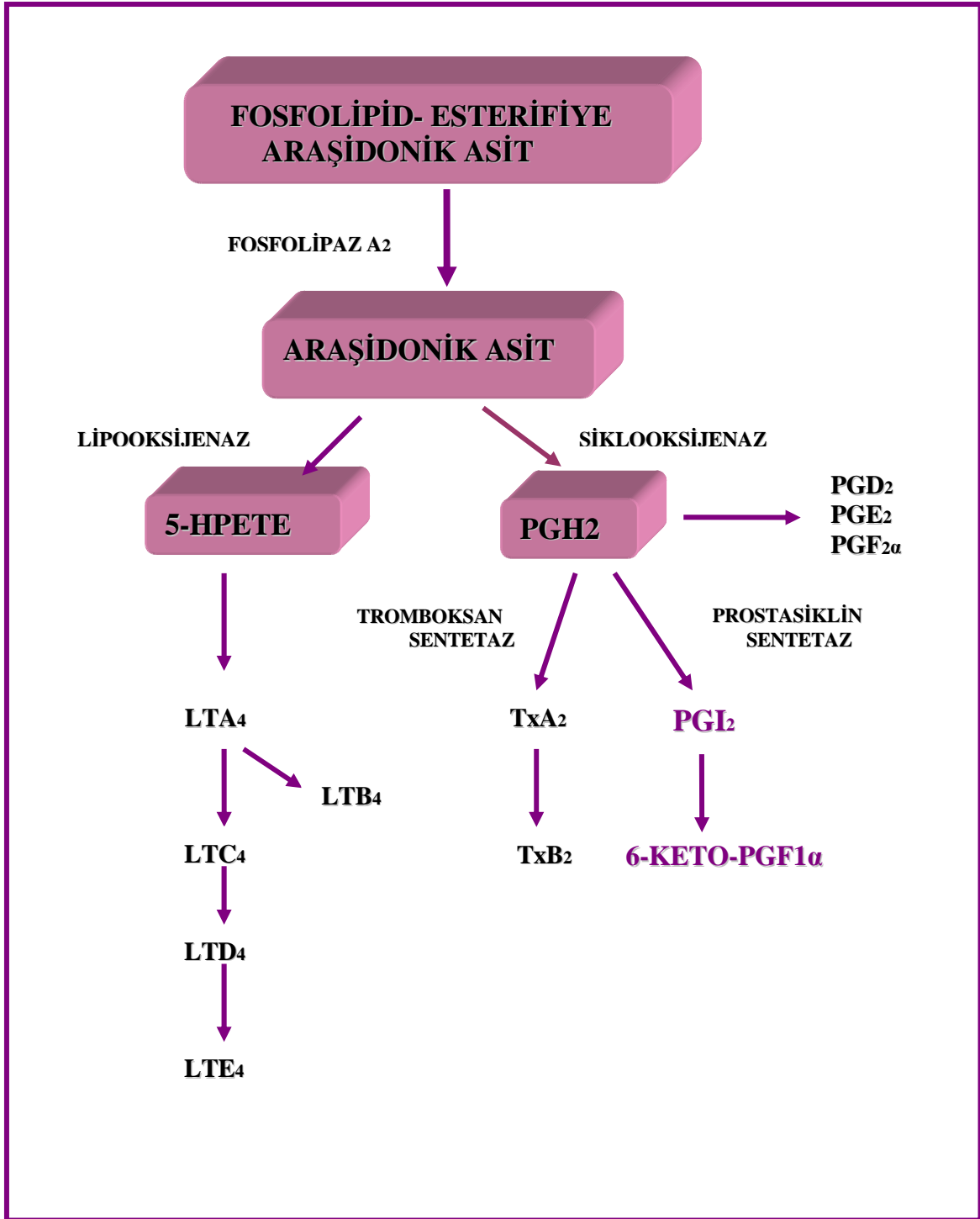
## **LÖKOTRIEN B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>)**

LTB<sub>4</sub>, inhalasyon hasarında endotel disfonksiyonda önemli rol oynayan araşidonik sit metabolitleri olup lipooksijenaz yolu ile üretilir. Endotel geçirgenliğinin ve nötrofillerin doku göçünün artırılmasından sorumludurlar. LTB<sub>4</sub>, nötrofil yüzeyindeki özel reseptörlere



bağlanır ve adezyon moleküllerinin (CD18) aktivasyonu ile lökositlerin endotele yapışmasını artırır. Böylece endotele yapışan lökositlerde serbest O<sub>2</sub> radikalleri ve proteazların oluşumuna neden olarak hücre hasarını artırır. Süperoksit radikali, nötrofil kemotaktik素i için gerekmede olup LTB<sub>4</sub> salınımı için de olası bir uyarıdır (6). Serbest O<sub>2</sub> radikallerinin inhibisyonu, araşidonik asit metabolitlerinin salınımını önlemektedir. LTB<sub>4</sub>'ün aynı zamanda TNF- $\alpha$  ve IL-1 gibi sitokinlerin sentezine de aracılık ettiği bildirilmektedir.

LTB<sub>4</sub> sentezinin inhibisyonu, inhalasyon hasarına neden olan nötrofil infiltrasyonunu azaltmaktadır (6,7,54). Yapılan bir çalışmada; LTB<sub>4</sub> inhibitörü olan montelukast'ın deri ve uzak organlarda yanığa bağlı oksidatif hasarı azaltıcı etkisi olduğu belirtilmektedir (55). Artan LT'lerin ARDS ve ÇOYS'da rol oynadığı ve yoğun bakımda kalış süresini arttırdıkları gösterilmiştir (56).



**Şekil 3.** Araşidonik asid kaskadı (**TXA<sub>2</sub>**; tromboksanlar, **LT**; Lökotrienler, **PGI<sub>2</sub>**; Prostaglandinler, **PG**; Prostaglandinler, **HPETE**; Hidroperoksieikozatetraenoik asit)

## II.3.2. ENDOTELİYAL HÜCRE MEDIATÖRLERİ

Vasküler endotelial tabaka, koagülasyon ve vazomotor aktivitelerin düzenlenmesine ek olarak, travma sonrasında vasküler endotelden salınan çeşitli lokal hormonlar ve mediatörlerin salınımıyla inflamatuvar sürece katılırlar. İnflamatuvar sürece katılan endotelial kaynaklı bu mediatörler; prostasiklin (PGI<sub>2</sub>), tromboksan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) ve lökotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) gibi araşidonik asit metabolitleri, endotelden kaynaklanan relakse edici faktör (EDRF), histamin ve çeşitli sitokinlerdir (236) (Şekil 4). Endotel aynı zamanda lipid transportunda ve immünolojik cevapta belirgin bir role sahiptir.

Endotelial hücreler aynı zamanda nötrofil integrinlerine (CD11/CD18) bağlanan adezyon moleküllerinin (ICAM-1, ICAM-2, ELAM) ekspresyonunu düzenleyerek inflamatuvar yanıtı modifiye etmekte ve nötrofil infiltrasyonuna aracılık etmektedirler. Vasküler permeabilite artışına ve lökositlerin hasarlı akciğer dokusuna göçüne neden olduğundan endotele olan nötrofil adezyonunun klinik önemi büyüktür. Bunlar duman inhalasyonu sonrası akut akciğer hasarının gelişiminde önemlidir. Aktive endotel hücrelerinde E-selektin (endotelial lökosit adezyon molekülü-1 'ELAM-1'), P-selektin ve intrasellüler adezyon molekülleri (ICAM-1 ve ICAM-2) gibi lökosit adezyon reseptörü ekspresyonunda artış olur. İnflamatuvar sürecin erken evrelerinde endotel yüzeyine lökosit ve trombosit adezyonunda rol alan adezyon moleküllerinin aktif hale geçebilmesi için TNF- $\alpha$  ve IL-1 gibi sitokinler ve diğer inflamatuvar mediatörlerin stimülasyonuna gerek vardır.

### ENDOTEL KAYNAKLI NİTRİK OKSİT

1980'de Furchgott ve Zawadzki tarafından endotel kaynaklı relakse edici faktör olarak (EDRF) adlandırılan, lokal olarak etki gösterdiği saptanan endotel kaynaklı prostaglandin olmayan bir vazodilatatörün varlığı gösterilmiş ve bu faktör daha sonra nitrik oksit (NO) olarak tanımlanmıştır. Endotel kaynaklı nitrik oksit, bazal koşullar dışında travma sonrası gelişen hipoksi ve hücresele yaralanmaya yanıt olarak da salınmaktadır.

NO, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP)'a ihtiyaç duyan kalsiyum ve kalmodule bağımlı ya da bunlardan bağımsız olarak çalışan spesifik sitozolik bir enzim olan nitrik oksit sentaz (NOS) yoluyla, aminoasit L-arjinin'den serbestleşen bir radikaldir. NOS spesifik sitozolik bir enzim olup endotel hücreleri başta olmak üzere PMN ve makrofajlar gibi diğer inflamatuvar hücre elemanlarında da bulunmaktadır (57). NOS'un molekül ağırlıkları 125-160 kDa arasında değişen üç izoformu vardır;

**1- Konstitüsyonel NOS (cNOS):** Az miktarda endotel ve nöronal nitrik oksit yapımından sorumludur.  $Ca^{++}$  ve kalmodulin bağımlıdır. Uyarılma sonucu saniyeler veya dakikalar içinde düşük veya orta derecede yapılan NO, daha çok fizyolojik amaçlı olaylarda etkilidir.

**2- İndüklenebilir NOS (iNOS):** Sitokinler ve enzimlere maruz kaldıktan sonra, özellikle makrofajlarda NO yapımından sorumludur.  $Ca^{++}$  ve kalmoduline gereksinim göstermez. Bu enzim daha çok sitotoksik ve immünomodülatör etkilerden sorumlu, uzun sürede fazla miktarda NO yapımı ile ilişkilidir. iNOS aktivasyonu gen transkripsiyonu gerektirdiğinden, NO yapımı birkaç saat sonra görülür ancak birkaç gün devam edebilir.

**3- Üçüncü tip NOS:** Nötrofillerde bulunur, kalsiyuma bağımlıdır ancak kalmoduline gereksinim göstermez (58).

NO, yapısal NOS (eNOS) enzimi ile oluşursa organizmada olumlu etkiler yapar. Endotelial NO'nun düşük düzeyleri organizmada; nöro-iletiminde, kan basıncı regülasyonunda ve periferik dolaşımda vazodilatasyonda fizyolojik düzenleyici olarak görev yapmaktadır. Endotelial NO, nötrofil adezyonu ve agregasyonunu inhibe ederek bu hücrelerden lizozomal enzimlerin salınımını engeller (59-62). Ayrıca düşük seviyelerde mikrosirkülasyonda önemli etkileri bulunmaktadır. EDNO'nun damar düz kasını gevşetebilmesi için solubl guanilat siklazın aktive olması ve myositler içindeki sitozolik siklik guanozin monofosfat'ın (cGMP) artması gereklidir. Trombositlerde de cGMP vardır ve EDNO tarafından aktive edilirler. Trombositlerde cGMP arttığında adezyon ve agregasyon azalır. Yapılan çalışmalarda endotelial NO'nun düz kaslar üzerine antiproliferatif etkisi olduğu gösterilmiş ve bunu cGMP'yi artırarak sağladığı bildirilmiştir.

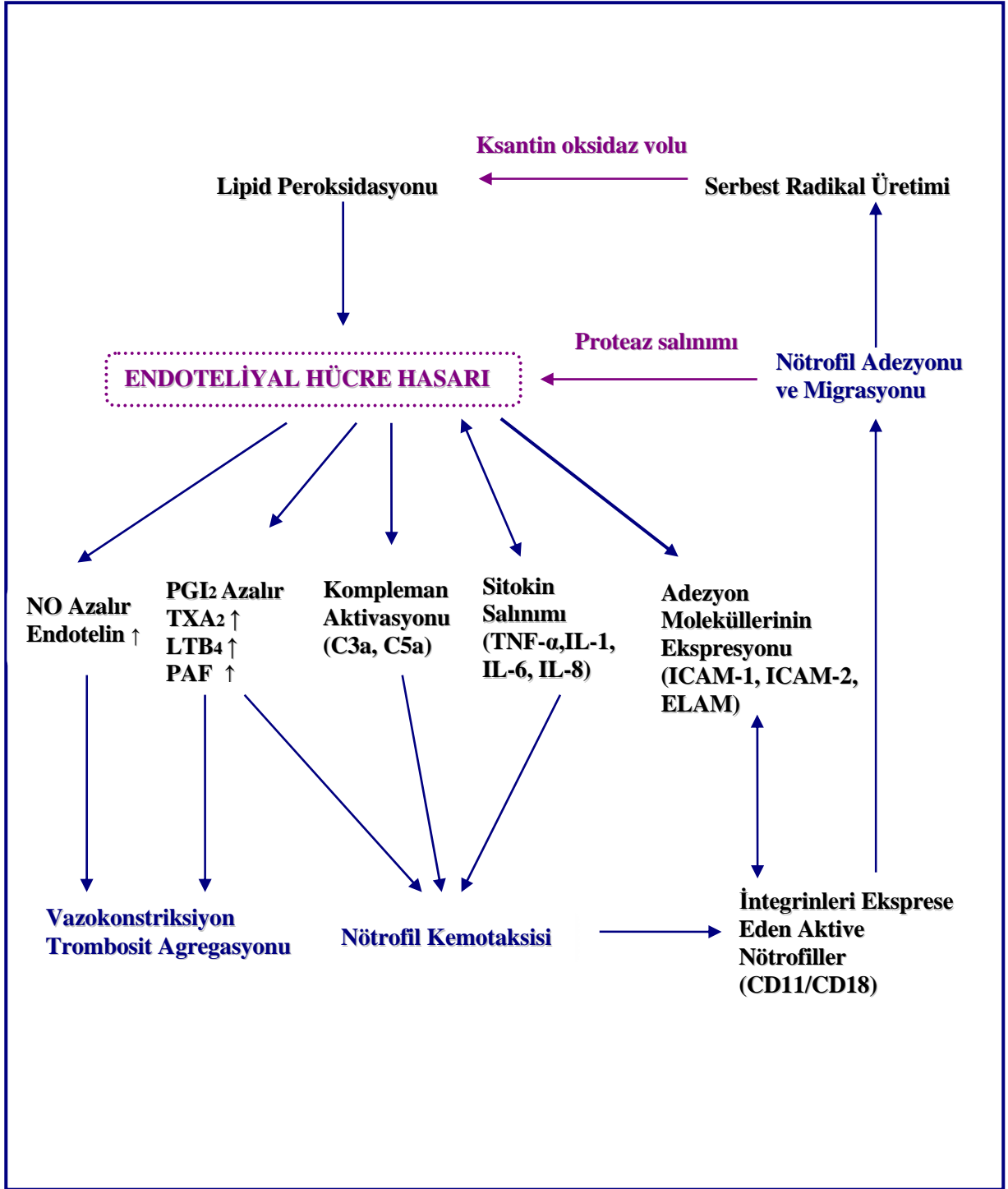
Yanık travması, uyarılabilen nitrik oksit sentetaz (iNOS) artışına neden olan inflamatuvar yanıtı neden olur. Artmış iNOS aktivitesinin yanık sonrası gelişen hücresel hasara katkısı olduğu gösterilmiştir. Yanık travması sonrası ilk birkaç saat içinde iNOS aracılı NO üretimi artar. NO'nun bu aşırı üretimi, birkaç mekanizma ile hücre hasarına neden olur. Birincisi aşırı periferik vazodilatasyona neden olarak vasküler dekompanseasyon yaratırken, ikinci olarak da transkripsiyon faktör Nükleer Faktör kappa B (NF- $\kappa$ B)'yi artırarak inflamatuvar sinyal yollarını uyarabilir ve inflamatuvar sitokinlerin salınımını tetikler (36,63-65) (Şekil 5).

NO'nun mikrovasküler sistem üzerinde yararlı vazodilatatör etkileri varmış gibi görünmesine karşın paradoksik olarak sitotoksik radikallerin üretimine katkıda bulunarak doku hasarının artmasına neden olur. Son derece reaktif bir serbest radikal gaz olan NO, hızlı difüzyona uğrayan ve yarı ömrü çok kısa olan bir maddedir. Son zamanlarda, NO'nun pek çok patolojik durumda peroksinitrit anyonu (ONOO-) vasıtasıyla sekonder sitotoksik ürünler

vermek üzere süperoksitle reaksiyona girerek peroksinitrit oluşumuna neden oldukları ileri sürülmektedir (65). Süperoksit ve NO üretim hızındaki küçük artışlar, peroksinitrit oluşum hızını sitotoksik düzeylere gelecek kadar arttırabilir. Nitrik oksit (NO) ve peroksinitritler gibi aktif radikaller ve akciğer nötrofil infiltrasyonunda belirgin artış sağlarlar (66). Lökosit kaynaklı NO pulmoner ve bronşiyal mikrovasküler geçirgenlikte artışa sebep olarak patolojik vazodilatasyon, vazomotor kontrolün kaybı ve parankimal ödeme neden olarak iskemik sürecin ilerlemesine yol açar (54,65,67,68). Son derece toksik ve reaktif bir radikal olan peroksinitritlerin dolaşımdaki nötrofiller için güçlü bir kemotaktik ajanlar olmasının yanı sıra, bunlar mitokondriyal enzimleri etkileyerek hücrenin enerji kaynakları ile bağlantısını keserek hücresel hasarı arttırır. Yapılan çalışmalarda NO'nun, nükleik asitlerde yapısal bozulmaya neden olarak apoptotik hücre ölümünü tetiklediği bildirilmiştir (69-72). Ayrıca NO, supresör T hücrelerini inhibe ederek lenfositlerde DNA sentezini artırır ve blastojenik çoğalmayı sağlar (73).

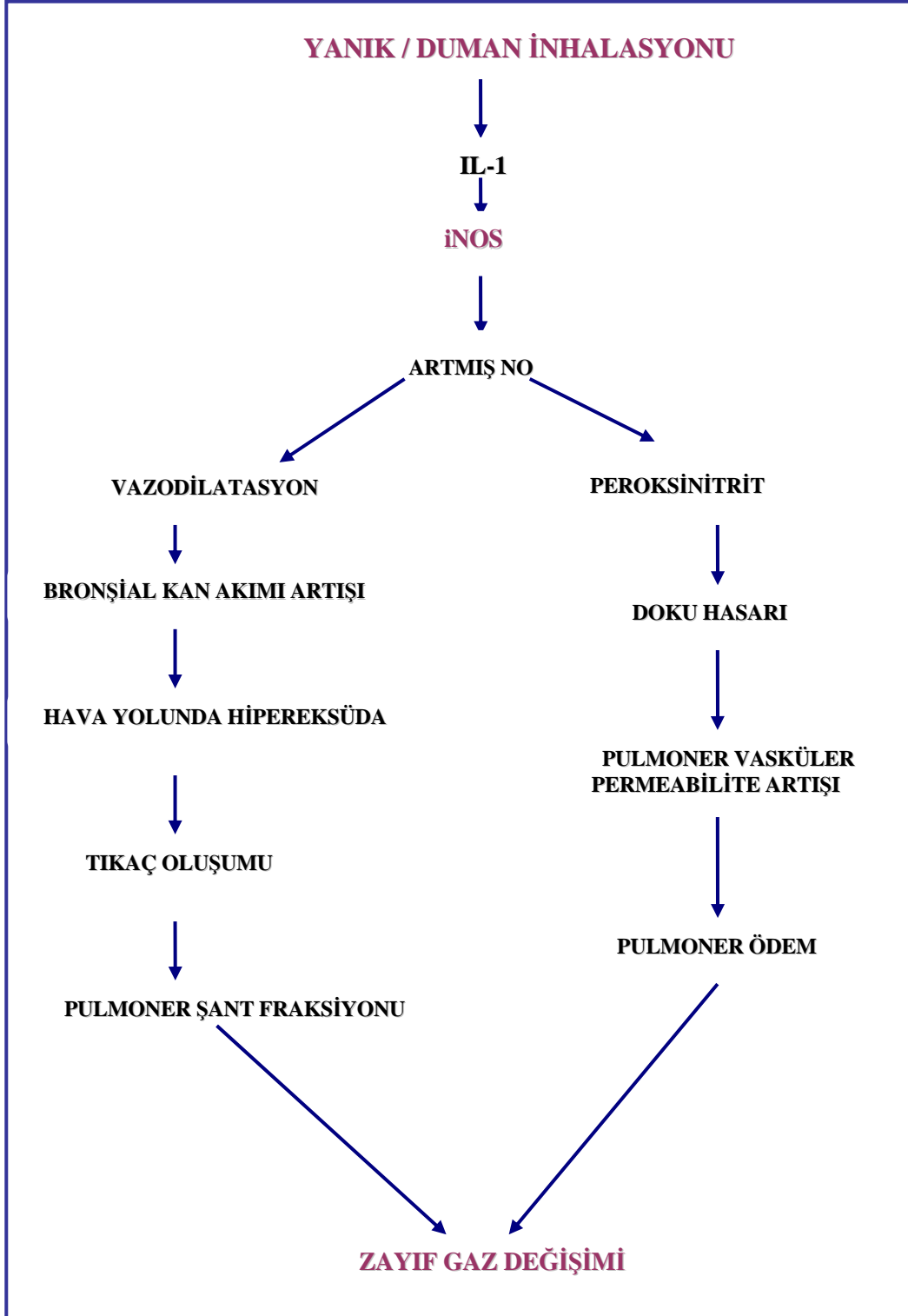
İnhalasyon hasarının eşlik ettiği yanık modelinde sepsis ve ARDS ile komplike hale gelen olgularda NO'nun up-regülasyonu gösterdiği ve bunun da vasküler rezistansta düşme ve endotoksin düzeyinde artış ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (31).

İnhalasyon hasarının eşlik ettiği yanık modelinde bir başka çalışmada; NO derivesi olan iNOS'un, denovo sentezini selektif olarak inhibe eden BBS-2 ile pulmoner fonksiyonların, vasküler permeabilitenin ve histolojik hasarlanma derecesinin önemli oranda düzeltildiği bildirilmiştir (74,75). Yapılan bir diğer çalışmada ise nNOS'un 7-nitroindazol ile inhibisyonunun akut akciğer hasarını azaltabileceği ileri sürülmüştür (76).



**Şekil 4.** Doku hasarında endotelial hücrelerin rolü

(C; Kompleman, ELAM; Endotelial lökosit adezyon molekülü, ICAM; İntersellüler adezyon molekülü, IL; İnterlökin, LTB4; Lökotrien B4, NO; Nitrik oksit, PAF; Platelet aktive edici faktör, PGI2; Prostaglandin, TNF- $\alpha$ ; Tümör nekrotizan faktör alfa, TxA2; Tromboksan A2)



Şekil 5. Duman inhalasyon hasarında iNOS'un etkileri (IL; İnterlökin iNOS; Uyarılabilen Nitrik Oksit Sentetaz, NO; Nitrik Oksit)

### II.3.3. LÖKOSİTLERE BAĞLI DOKU HASARI

Dolaşımdaki nötrofillerin akciğerlerde oluşan hasardan sorumlu olduğu konusunda çok sayıda çalışma mevcut olup nötrofil-endotelyal hücre etkileşiminin hasarı başlattığı bildirilmektedir (7-9,66,77,78). Lokal organ hasarında aktive olan nötrofillerin sistemik dolaşıma geçmesi akciğer ve diğer organlarda multisistem organ yetmezliği ile sonuçlanabilmektedir (10). Travma sonrasında aktive olan nötrofiller serbest radikallerin, peroksidazların ve proteolitik enzimlerin salımına neden olarak organ hasarını arttırmaktadırlar (7,8). Dolaşımdaki nötrofillerin sistemik dolaşımdan uzaklaştırılması ile akciğerlerdeki permeabilite artışı ve ödemin gerilediği gösterilmiştir (79).

Normal şartlarda, endotelin dolaşımdaki lökositleri tanıma ve bağlama kapasitesi düşüktür. Duman inhalasyonu sonrası toksik gaz ve hasarlanan alveoler ve endotelden çeşitli inflamatuvar mediatörlerin salınımı ile uyarılan lokositler, dokuda bölgesel lökosit infiltrasyonu ve lökositlere bağlı erken doku hasarına yol açarlar. TNF, IL-1 $\beta$ , IL-8 gibi sitokinler, endotel kaynaklı faktörler, araşidonik asit metabolitleri olan PAF, lökotrienler, prostaglandinler ve TxA<sub>2</sub>, histamin, SOR ve komleman komponentleri PNL'lerin uyarılmasında rol oynayan önemli mediyatörlerdir. Ayrıca IL-6'nın da nötrofil tarafından süperoksit yapımı için güçlü bir indükleyici olduğu bildirilmektedir. Kompleks bir yapı olan bu olayın düzenlenmesi, yüzey adezyon molekülleri tarafından sağlanır. Dolaşımdaki lökositlerin aktive olarak postkapiller venüllerden hasarlanan akciğer dokusuna geçişi birbirini izleyen üç aşamada gerçekleşir. Bu mekanizma lokal doku inflamasyonu ve mikroorganizmaların eradikasyonu için yararlı olmalarına karşın, sistemik dolaşıma geçerek, reaktif oksijen metabolitleri, proteazlar ve çeşitli inflamatuvar mediatörlerin salınımına yol açarak akut akciğer hasarının gelişiminden sorumlu tutulmaktadır.

### LÖKOSİTLERİN DOKUYA GEÇİŞİNİN BASAMAKLARI

#### Rolling

Dolaşımdaki lökositler damar endoteli ile nadiren temasta bulunurlar. Dolaşımdaki lökositlerin hasarlanan dokuya göçünde ilk basamak olan bu aşamada; lökositlerin ve damar endotelinin inflamatuvar mediatörlerle uyarılması, lökositlerin özellikle de nötrofillerin aksial akımlarını kaybetmesine ve kendi etraflarında yuvarlanmalarına neden olur. Sonuçta normal koşullarda post kapiller venülden 300  $\mu$ m/saniye hızla hareket eden lökositlerin hızı, rolling olayı ile 50  $\mu$ m/saniye hıza iner. Bu olaya 'rolling' adı verilir. Rolling olayı ile hızları düşen lökositler



birbirleri ile ve endotel hücreleri ile temasa geçer ve geçici yapışmalara bağlı yumuşak adezyonlar ve serbestleşmeler olur (80,81).

Bu rolling olayı aynı gruptan olan L, P ve E- selektinler olarak bilinen adezyon molekülleri tarafından yönlendirilir. L-selektin, lökositlerde özellikle de nötrofillerde daha yoğun olarak bulunur. E-selektin endotel hücrelerinde bulunur. P-selektin ise, endotel hücrelerinin Weibel-Palade organellerinde ve trombositlerin  $\alpha$  granüllerinde bulunur. İnflamatuvar mediatörlerin uyarısı; L ve E-selektin sekresyonunda artışa, P-selektinlerinde hücre yüzeyine çıkmasına neden olur.

PMNL ve endotel hücre aktivasyonu sırasında E-selektin ekspresyonu 4-6 saat sonra başlarken, P ve L-selektin ekspresyonu dakikalar içinde başladığından E-selektinin inhibisyonu ile pulmoner ödemin azaltılmasının mümkün olabileceği ileri sürülmüştür (82). Yapılan bir çalışmada, kombine yanıklı hastalarda plazma ve akciğer lenfatiklerindeki nitrit miktarının önemli oranda artış gösterdiği olgularda bu değişikliklerin anti-L-selektin lökosit adezyon molekülü olan 'LAM-(1-3)' ile zayıflatılarak akciğer lenfatik akımının ve permeabilitesinin düzeltilebildiği gösterilmiştir (83). Yapılan başka bir çalışmada ise; P-selektin blokajının yanık sonrası ilk 48 saatte akciğer hasarını azaltmadığı ortaya konulmuştur (84). İntraperitoneal olarak fucoidin verilerek yapılan bir çalışmada da fucoidinin rolling olayını L, P ve E-selektin düzeyinde bloke ettiği, bunda akciğerlere nötrofil invazyonunu engellemek suretiyle nötrofillerin neden olduğu inhalasyon hasarını azalttığı belirtilmiştir (83).

## **Adezyon**

Akış hızları düşen ve endotel hücreleri ile yumuşak adezyonlar oluşturan lökositlerin damar dışına çıkışındaki ikinci basamak sıkı adezyondur. Adezyon olayı, lökositlerde bulunan ve  $\beta_2$  integrinler olarak adlandırılan lökosit integrini CD11/CD18 ile endotel hücrelerinde bulunan intersellüler adezyon molekülü ICAM-1 veya ICAM-2 arasında gerçekleşir (85). Endotel-lökosit adhezyonu, lökositlerin endotel üzerindeki spesifik bölgelere yapışmasını sağlayan integrin CD11/CD18 glikoprotein reseptörlerinin ekspresyonunu uyarmaktadır. Bu adezyon moleküllerinin salınımı ve birbirlerine karşı olan afiniteleri çeşitli inflamatuvar mediatörlerle uyarılmaktadır (81,86,87). Adezyon molekülleri, özellikle de  $\beta_2$  integrinler; nötrofillerin pulmoner endotele bağlanmasında görev aldıkları gibi nötrofil aktivasyonu ve mediyatör salınımına da etkileri vardır (88,89).

Ağır inhalasyon hasarının eşlik ettiği yanık olgularında, nötrofillerde CD11/CD18 adezyon moleküllerinin ekspresyonunda yetersizlikler nedeniyle nötrofillerde azalmış

intrasellüler öldürme kapasitesinin olduğu ileri sürülmüş ve bununla ilgili olarak yapılan bir çalışmada bu azalmanın bakteriyemi ve pnömoni ile direkt olarak ilişkili olduğu belirtilmiştir.

## **Migrasyon**

PMNL'lerin endotel adezyon reseptörlerine yapışması ile kemotaksi ve fagositoz fonksiyonları uyarılmaktadır. Fagositoz esnasında nötrofillerden proteolitik enzimler, toksik O<sub>2</sub> radikalleri ve inflamatuvar mediyatör salgılamaktadır. Bu arada komşu dokularda da doku hasarı meydana gelmektedir. PMNL'ler tarafından salınan ve çevre dokularında hasarına yol açan maddeler, endotel hücre bağlantılarının ayrılmasına ve kapiller sızıntı gelişmesine neden olmaktadır. Sıkı adezyonu takiben lökositler, endotel hücreleri arasından açılan aralıklardan dokuya geçerler. PMNL'lerin damar dışına migrasyonuna diapedez adı verilmektedir. Migrasyon olayına, immunglobulin gen süperfamilyasının bir üyesi olan platelet/endotelial bağlanma molekülü-1 aracılık eder (47,90). Dokuya geçen lökositler salgıladıkları proteazlar ve toksik oksijen metabolitleri ile doku hasarı oluştururlar (22,42-45,91-94).

ARDS'li hastalardan alınan bronkoalveoler lavaj sıvısı ve histolojik örneklerinde egemen olan inflamatuvar hücrelerin nötrofiller olduğu ve bunların ürünü olan elastaz, kollajenaz, reaktif oksijen ürünleri ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinleri içeren mediatörlerin buralarda aşırı miktarda bulunduğu belirtilmektedir (95,96-101) Yapılan çok sayıda deneysel çalışmada, pek çok hayvan modelinde nötrofil akımının engellenmesi ile akciğer hasarlanma derecesinin dramatik olarak azaldığı bildirilmektedir (102-104).

Duman inhalasyonu sonrası gelişen solunum sistemi hasarından sorumlu tutulan uyarılmış lökositlerin, özellikle de nötrofillerin damar dışına göçündeki bu basamaklardan herhangi birinin engellenmesi ile oluşacak doku hasarı azaltılabilir. Bu yolda önemli görevleri bulunan adezyon moleküllerinin selektif ve selektif olmayan inhibasyonlarının yanı sıra bu süreçte görev alan inflamatuvar mediatör inhibitörlerinin ve serbest oksijen radikal antagonistlerinin kullanımı ile de akciğer dokusunda oluşacak hasar engellenmeye çalışılmıştır (44). Duman inhalasyon hasarını önlemeye yönelik yapılan bir çalışmada, lökositler için major kemotaktik ajan olan ve monositler, endotel hücreleri ve nötrofiller tarafından salınan IL-8'in monoklonal antikorlar ile nötralizasyonunun duman inhalasyon hasarını azalttığı ileri sürülmüştür (105).

Sepsisli hastalarda kemik iliğinden PMNL salınımı ve üretiminin uyarılması ile sıklıkla lökositöz gözlenmekle birlikte bazılarında başlangıçta geçici nötropeni gözlenebilmektedir. Bu durum, baskılanmış kemik iliği fonksiyonu veya dolaşımdaki lökositlerin tüketiminin artmış olmasına bağlanmaktadır. Akciğer hasarının nötropenik hastalarda da gelişebildiği bildirilmekle

ve bu hastalarda nötropheninin düzeltilmesiyle pulmoner fonksiyonların daha da bozulduğunu gösterilmesi ile nötrofillerin akciğer inflamasyonunda önemli rollerinin olduğunu birkez daha hatırlatmıştır (106-107).

Yapılan bir çalışmada melatoninin kombine yanıkta akciğerdeki nötrofil birikimini deprese ederek MPO aktivitesini azalttığı ve azalan GSH düzeyini arttırdığı saptanmıştır (108). Granülosit koloni uyarıcı faktörlerin denendiği başka bir çalışmada ise, G-CSF verilmesini takiben nötrofillerin aracılık ettiği akciğer hasarında belirgin bir artış saptanmaması, ARDS'nin patogeneğinde başka faktörlerin de rol aldığını göstermektedir (107,109).

Yakın dönemde yapılan çalışmalarda; akciğer hasarının oluşmasında önemli rolü olan lökositlerin dokuya göçünde, trombinin de görev aldığı bildirilmektedir (110,111). Trombin 14 amino asitli bir peptid olup, P ve E-selektinlerinin ekspresyonunu uyararak lökositlerin kümelenmesini artırır. Trombinin endotel hücresi ile temasından sonra dakikalar içinde P-selektin artışı gözlenirken, E-selektin'in artışı ortalama 4 saat sonra başlar. Ayrıca trombin, hızlı bir şekilde hücreler arası bağlantı molekülü olan ICAM-1, IL-8 ve PAF üretimini artırır. Tüm bunların sonucunda lökositlerin endotele yapışması artmaktadır (110). Aynı zamanda trombin; TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  üretimini de artırarak etkisini güçlendirir (111).

Yapılan çok sayıda iskemi-reperfüzyon çalışmalarında; lökositlerin neden olduğu doku hasarının önlenmesinde trombinin doğal inhibitörü olan AT-III denenmiştir. Bu çalışmaların sonucu olarak da AT-III'ün lökositlerin dokuya göçünü ve vasküler permeabiliteyi azalttığı gösterilmiştir.

### **II.3.4. SİTOKİN KASKADI**

Sitokinler, yaralanma bölgesindeki çeşitli hücre grupları ve immün sistem hücreleri tarafından regülatör kimyasallar olarak salınan, etkilerini düşük konsantrasyonlarda gösterebilen küçük polipeptid veya glikoprotein yapısında mediatördürler. Hücre yüzeyindeki reseptörlere etki ederek hücrelerin büyümesini, matürasyonunu ve tamirini düzenleyen sitokinler; bazen lenfokin, monokin, IL, interferon olarak da isimlendirilebilen heterojen bir grubu içermektedirler.

Sitokinlerin salınımı termal hasar, iskemi-reperfüzyon, endotoksin salınımı, kompleman aktivasyonu ve diğer sitokinler gibi birçok nedene bağlı olabilir. Aktive lökositlerden, özellikle monositlerden, aktive fibroblast ve endotel hücrelerinden salgılanırlar. Bunlar lokal olarak akciğerlerde inflamatuvar hücrelerce, akciğer epitel hücrelerince veya fibroblastlarca da üretilebilirler. Bu hücrelerin aktivasyonu doku harabiyetine en erken hücresel yanıtı oluştururlar. Sitokinler, araşidonik asit metabolitleri, kompleman sisteminin aktivasyonu,

nötrofil degradasyonu ve serbest oksijen radikali oluşumu gibi çeşitli inflamatuvar mediyatörlerin salınımı ile de ilişkilidir. İnflamatuvar olayların yanı sıra hücre büyüme ve diferansiyasyonuna ve organizmanın hücre aracılıklı savunma mekanizmalarına da aracılık ederler.

Travmaya yanıt olarak aktive olan sitokin döngüsü, fizyolojik regülatuar mekanizmalar üzerine farklı etkileri olan kompleks bir ağdan meydana gelir. Sitokinler etkilerini spesifik hücre reseptörlerine bağlanarak ve gen transkripsiyonunu modüle eden intrasellüler mekanizmaları aktive ederek gösterirler. Yanık sonrası hastalarda uzak organ ve çoklu organ yetmezliklerinin gelişiminde ve mortalite üzerinde sitokinlerin etkisi vardır. Duman inhalasyonu sonrası hasarlanan dokudan proinflamatuvar sitokin olan TNF- $\alpha$  hızla indüklenir. Dolaşımda erken dönemde tespit edilen TNF- $\alpha$ 'nın maksimum düzeyi tüm dönemlerde prognostik öneme sahiptir.

TNF- $\alpha$  vasküler endotelin nötrofil aracılı saldırıya karşı duyarlılığını artırır. TNF- $\alpha$  tarafından makrofajlardan ve endotelial hücrelerinden salınımı indüklenen IL-1 $\beta$  ve PAF, PMNL'lerin aktivasyonu için oldukça güçlü kemotaktik ajanlardır (56). TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ , nötrofil-endotel adezyonunun, nötrofil aktivasyonunun, mikrovasküler sızıntının gelişmesine yardımcı olabilir ve diğer proinflamatuvar cevapları arttırabilirler (88,96). TNF- $\alpha$  ve IL-1 tarafından başlatılan inflamatuvar döngünün sonraki aşamalarında ise IL-2, IL-6, IL-8, granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) ve interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) gibi sitokinler de olaya katılarak ARDS ile sonuçlanabilen akut akciğer hasarının seyrindeki inflamatuvar cevabı arttırırlar (112). Bu sitokinlerden TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-8'nin ARDS'li hastaların bronkoalveoler lavaj sıvısı ve plazma örneklerinde artmış oldukları bildirilmiştir (96-99).

Yoğun nötrofil akımına sebep olan kemotaktik faktörler arasında önceleri kompleman sisteminin en önemli etken olduğu belirtilirken, son zamanlarda IL-8 gibi sitokin ve ENA-78, monosit kemotaktik peptidleri gibi kemokinlerin aktivasyonunun daha önemli bir yer tuttuğu bildirilmektedir (88,113). Yapılan bir çalışmada; ARDS gelişen olgularda, Yüksek Mobilite Grup Protein-1 'HMG-1'in nötrofilik inflamasyonu arttıran TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve bir kemokin olan makrofaj inflamatuvar protein-2 (MIP-2) üretimini indükleyerek alveoler-kapiller bariyerin permeabilitesini artırıp akciğer ödemi gelişimine neden olduğu bildirilmektedir (114). HMG-1, gen transkripsiyonunu kolaylaştıran ve steroid hormon aktivitesini regüle eden bir DNA bağlantı proteindir. Daha önce yapılan bir çalışmada sitokin serbestlenmesiyle aktive olan gecikmiş endotoksin ölümcüllüğünün geç mediatörü olduğu saptanmıştır (114). Bir başka nötrofil kemoatraktanı olan Duffy antijeni ve  $\alpha$ -2 makroglobulinin de ARDS gelişiminde kemokinlerin modülasyonunda önemli role sahip oldukları bildirilmiştir (115).

## **TNF- $\alpha$**

Yanık sonrası gelişen doku hasarı, proinflamatuvar sitokinlerin salınımı ile kompleks bir inflamatuvar yanıtın oluşmasına neden olmaktadır. Bu sitokinler arasında TNF- $\alpha$ , konakçı yanıtının oluşmasına yol açan ilk ve en güçlü mediatörlerdendir (116). TNF- $\alpha$ ; monositler, makrofajlar ve T hücreleri tarafından sentezlenmektedirler. TNF- $\alpha$ 'nın yanık hasarını takip eden erken ve daha geç dönemlerde yükseldiğini gösterilmiştir (117). Fakat yapılan bir çalışmada da TNF- $\alpha$ 'ın erken dönemde arttığı fakat daha sonra pulmoner mikrovasküler basıncın artması sonrasında akciğer lenf akımında artış göstermediği saptanmıştır (118). Akut travmaya yanıt olarak TNF- $\alpha$  salınımı hızlı ve kısa sürelidir. Proinflamatuvar uyarıyı takiben TNF- $\alpha$  düzeyi hızla yükselir ve başta IL-1 olmak üzere diğer sitokinleri aktive ettikten sonra çok çabuk kaybolur. Endotoksin uyarısı ile akut inflamatuvar yanıt oluşturulan deneysel çalışmalarda, TNF- $\alpha$  salınımının monofazik bir eğri izlediği, 90 dakikada pik yapıp 4 saat içinde düzeylerinde düşme saptandığı ve IL-1'in başlangıç indüksiyonundan sonra sentezi birkaç gün daha devam ettiği bildirilmektedir. Yarı ömrü 15-18 dakika olmasına rağmen, TNF- $\alpha$ 'nın dolaşımında kısa süreli olması bile önemli metabolik ve hemodinamik değişikliklerin gelişmesine ve döngünün sonraki basamaklarındaki sitokinlerin aktive olmasına neden olmaktadır. TNF- $\alpha$  seviyelerindeki artış yanık sonrası sepsisle korele olsa da komplike olmayan yanıklar bile artmış TNF- $\alpha$  dolaşım düzeyleriyle ilişkilidir.

TNF- $\alpha$ , serbest oksijen radikal üretiminin stimülasyonu, endotelial adezyon moleküllerinin ekspresyonu, lökosit aktivasyonu ve NO üretimi ile akciğer hasarının oluşumuna katkıda bulunmaktadır (119). TNF- $\alpha$ 'nın diğer fonksiyonları arasında; koagülasyonun faktörlerinin aktivasyonu, prostaglandin E2 (PGE2), platelet aktive edici faktör (PAF), glukokortikoidler ve eikozanoidlerin salınımının artırılması yer almaktadır (120).

Akut akciğer hasarının patogeneğinde yer alan TNF- $\alpha$  ile nötrofiller arasındaki ilişkinin varlığı yapılan deneysel çalışmalar ile ortaya konulmuştur (121,122). Proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- $\alpha$  da nötrofil aktivasyonu ve adezyonuna katkıda bulunmakta, adezyon reseptörlerinde upregulation oluşturarak doku sekestrasyonuna, nötrofil degranülasyonuna ve toksik oksijen ürünlerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (123). Yapılan başka bir çalışmada; anti-TNF $\alpha$  serumunun akciğerlerdeki nötrofil sekestrasyonunu kısmen azaltmasından yola çıkarak, TNF- $\alpha$ 'nın lökositleri direkt olarak aktive etmesi ve pulmoner endotel hücrelerini lökositlere karşı daha adeziv hale getirmesi sonucunda akciğer hasarına neden olduğu ileri sürülmektedir (9).

## IL-6

IL-6'nın travma sonrası oluşan antiinflamatuvar döngü üzerine çeşitli mekanizmalar aracılığı ile mediatör etkisi vardır. Akut faz yanıtının modülasyonunu sağlar. İmmun yanıtın ve hematopoezin düzenlenmesinde görev alır. Yanık sonrası gelişen inflamasyon sırasında IL-6, PMNL aktivasyonunu indükler ve yaşlanmış ya da disfonksiyonel PMNL'lerin fagositozunu geciktirir. İnflamatuvar PMNL'lerin travmayı takiben sebat etmesi akciğer hasarı gibi uzak organ hasarını açıklamaktadır. IL-6 ayrıca,  $\alpha$  glukoprotein, C-3, fibronektin gibi antibakteriyel ürünleri de kapsayan akut faz proteinlerinin hepatik sentezini indüklemektedirler. IL-6'nın majör indüktörleri TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ 'dir. Bütün hücre tipleri tarafından sentezlenebilirler. IL-6, doku harabiyetinin, cerrahi travmanın boyutu ile plazma/serum düzeyleri arasında korelasyon gösteren sensitif ve erken bir belirteç olarak görülmektedir (126). Travmadan sonraki 60 dakika içinde dolaşımdaki düzeyi ölçülebilir, 4-6 saatte pik yapar ve dolaşımda kalma süresi 10 güne kadar uzayabilir. Ölçülebilirliğinin kolay olmasının nedeni daha uzun bir yarı ömrü olmasıdır. IL-6'nın ulaştığı kan düzeyi doku hasarı ile doğru orantılıdır. Akut travma sırasında IL-6'nın kan düzeyi yükseldiğinden genellikle sistemik inflamatuvar yanıt indikatörü olarak kullanılır. Yapılan çalışmalarda IL-6 aktivasyonu ve salınımına TNF- $\alpha$  bağımlı mekanizmaların aracılık ettiği bildirilmekte olup çoklu organ yetmezliğinden ölen hastalarda dolaşımda TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerinin dramatik olarak arttığı ve özellikle de IL-6'daki artışın %100 mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (127,128)

### II.3.5. KOMPLEMANIN ROLÜ

Kompleman kaskadının aktivasyonu, biyolojik olarak aktif peptidlerin oluşumu ile sonuçlanır. Bu peptidler, artmış kapiller permeabilite ve vazodilatasyona neden olurlar. C5a, inflamatuvar cevabı güçlendiren TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 üretimini artırır. İnflamatuvar etkisi C3a ya göre 20 kez daha güçlüdür. C3b ise nükleer  $\kappa$ B faktör yolu ile  $\beta$ 2 integrin (CD11b, CD18), endotelial lökosit adezyon moleküllerinden vasküler hücre adezyon molekülü, hücreler arası adezyon molekülü 1, E-selektin ve P-selektin üretimini artırır. C5b-9 ve IL-8, monosit aktive edici protein 1 salgılanmasını artırır. Bütün bunların sonucunda kompleman sistemi, vasküler hemostazis ile birlikte lökositlerin endotele yapışmasını artırır.

Kompleman kaskadının aktivasyonunun nötrofiller üzerindeki etkileri; kemotaksis, CD18 reseptör ekspresyonu, endotelyuma artmış adherans, serbest O<sub>2</sub> radikallerinin üretimi ve degranülasyondur. Yapılan çalışmalarda artmış akciğer permeabilitesinin kompleman inhibitörü

olan solübl human kompleman reseptör tip 1 'sCR1' ile azaltılabildiği gösterilmiştir. Ancak yapılan bazı çalışmalarda pulmoner permeabilitedeki artışın kompleman bağımlı, akciğerdeki nötrofil sekestrasyonunun ise komplemandan bağımsız olduğu bildirilmektedir (7,9).

## **II.3.6. İNTRASELLÜLER MEDİATÖRLER**

### **REAKTİF OKSİJEN METABOLİTLERİNİN ROLÜ**

Hücrelerin yaşamı ve ölümü arasındaki denge çeşitli faktörlere bağlıdır. Serbest oksijen radikalleri bu faktörler arasında önemli bir yer tutmaktadır. Reaktif oksijen metabolitleri (ROM), yaşam süresi kısa olan ileri derecede reaktif, dış yörüngelerinde bir veya daha çok çiftleşmemiş elektron içeren stabil olmayan serbest oksijen molekülleridir. Bütün dokularda, koruyucu ve antioksidan enzimler (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, tokoferol, askorbik asit, co-enzimQ vs.) ve reperfüzyon hasarına yardımcı olan prooksidan elementler ( $O^-$ ,  $OH$ ,  $H_2O_2$ , lipid, protein ve DNA radikalleri) arasında bir denge vardır (131). Kontrol edilemeyen fazla miktardaki serbest oksijen radikalleri lipid, protein ve DNA gibi hücre yapılarının yok edilmesine ve hücrenin apoptozis ya da nekroz yolu ile ölümüne sebep olmaktadır.

Serbest radikaller, patolojik durumlarda ksantin oksidaz enzim aktivitesi ile oluştuğu bilinmektedir. Yanık travmasında oluşan serbest oksijen radikallerinin ana kaynağının şimdiye kadar ksantin oksidaz enzimi olduğu düşünülürken, günümüzde aktive nötrofillerden kaynaklandığı bildirilmektedir (132-135). Yanık travması sonrasında aktive nötrofillerin oluşturduğu serbest radikaller ksantin oksidaz aktivitesini arttırarak akciğerlerde doku hasarı meydana getirmektedir (136). Normal hücre metabolizmasında ise serbest radikal üretiminin kaynakları; pürin oksidasyonu, nötrofillerdeki NADPH bağımlı oksidaz sistemi, prostaglandin ve lökotrienlerin oluşumunu başlatan araşidonik asitin yıkılmasıdır.

ROMS'nin yapımı, anaerobik glukoz oksidasyonu ile birlikte oksijenin süperoksit anyonlarına redüksiyonunu da içeren kompleks bir süreçtir. Hücreler kendi ROMS'nin etkilerine karşı bağışık değildir. Fakat genellikle glutatyon ve katalazlar tarafından korunurlar. İskemik dokularda ROMS'nin oluşturulması için intrasellüler mekanizmalar aktive haldedir. Fakat oksijen yokluğundan dolayı nonfonksiyoneldir. Dokulardaki Adenozin Trifosfat (ATP) miktarı azalırken, Adenozin Monofosfat (AMP) artar ve bir dizi biyokimyasal reaksiyon sonucu hipoksantin yıkımı gerçekleşir. Normalde hipoksantin ksantin dehidrogenaz enzimi ile ksantine okside olur. Bununla birlikte iskemi sırasında ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza

dönüştürülür. Ksantin dehidrogenaz ön madde olarak ADP'yi kullanırken ksantin oksidaz ön madde olarak oksijeni kullanır. Bu nedenle iskemi sırasında hipoksemi nedeniyle hipoksantin ksantine dönüştürülemez, dokuda hipoksantin birikir. Reperfüzyonla ortama oksijen girmesi ile özellikle ilk dakikalarda daha fazla olmak üzere ksantin oksidaz yolu ile aşırı düzeyde serbest oksijen radikalleri üretilir. Devam eden hipoperfüzyon zaman içerisinde hücrenin ölümü ile sonuçlanırken, hipoperfüzyonun düzeltilmesi iskemi-reperfüzyon hasarı yapar. Bu durum 'oksijen paradoksu' olarak ifade edilir (62).

SOR bir taraftan lipid peroksidasyonuna neden olurken, diğer taraftan fosfolipaz A<sub>2</sub>'yi aktive ederek araşidonik asitten lipooksijenaz yolu ile TxA<sub>2</sub> ve LTB<sub>4</sub> oluşturur bunlar da lökosit aktivasyonuna ve kemotaksisine neden olur. SOR ayrıca nükleer κB faktör yolu ile lökosit adezyon molekülleri ve sitokin gen üretimini arttırlar. Bu yolla lökosit aktivasyonunu ve kemotaksisini arttırlar.

ROMS apoptozisi de indükler. T lenfositlerle yapılan çalışmalarda, intrasellüler glutasyon veya ROM engelleyicilerinin azalmasının mediatörlüğünde majör bir apoptotik mekanizmanın geliştiği gösterilmiştir. GSH'ın azalması ve bunun sonucunda intrasellüler ROM birikimi ve hücre ölümü oluşmasından proapoptotik Fas/CD95 reseptör aktivasyonu sorumlu tutulmaktadır. Bu hücrelerde GSH'nin artması bu etkileri tersine çevirebilir.

## **REAKTİF NİTROJEN METABOLİTLERİN ROLÜ**

NO'lerin süperoksit radikaller ile etkileşime girerek doku hasarını arttıran bir bileşik olan peroksinitritlere dönüşüp DNA'daki kırıkları arttırarak hücre ölümüne neden olduğu bildirilmektedir. Reaktif nitrojen ürünlerinin aracılık ettiği hasarın nükleer enzim olan PARP'ın (Poly ADP-Ribose-Polymerase) aktivasyonu sonucu DNA hasarlanması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (36) (Şekil 6). PARP bir çok hücrenin ekspresyonunu oluşturan kromatin bağlı bir enzim olup DNA onarımında da rolü vardır. PARP'ın, nükleer enzim poli ADP riboz sentetaz (PARS) ile aktive olması hücresel enerjiyi azaltması ve sonuçta hücre nekrozunun oluşumu ile sonuçlanır (140,141). PARS aktivasyonu sonucu Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NAD)'in azalması ile elektron transportu, ATP sentezi ve glikoliz bozulur. Şok ve resusitasyonda peroksinitritin zararlı etkileri, sülfidril gruplarının oksidasyonu, tirozin, triptofan ve guanin aminoasitlerinin nitrasyonu ve membran Na-K ATPaz'ının inhibisyonu ile olur (63,64).

NF-κB'nin aktivasyonu iNOS'un up-regülasyonuna neden olur, bunun sonucunda NO ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) formasyonu hızlanır. RNS DNA hasarı için yüksek potansiyele sahip olması nedeniyle PARP aktivasyonunun potent stimulanıdır.

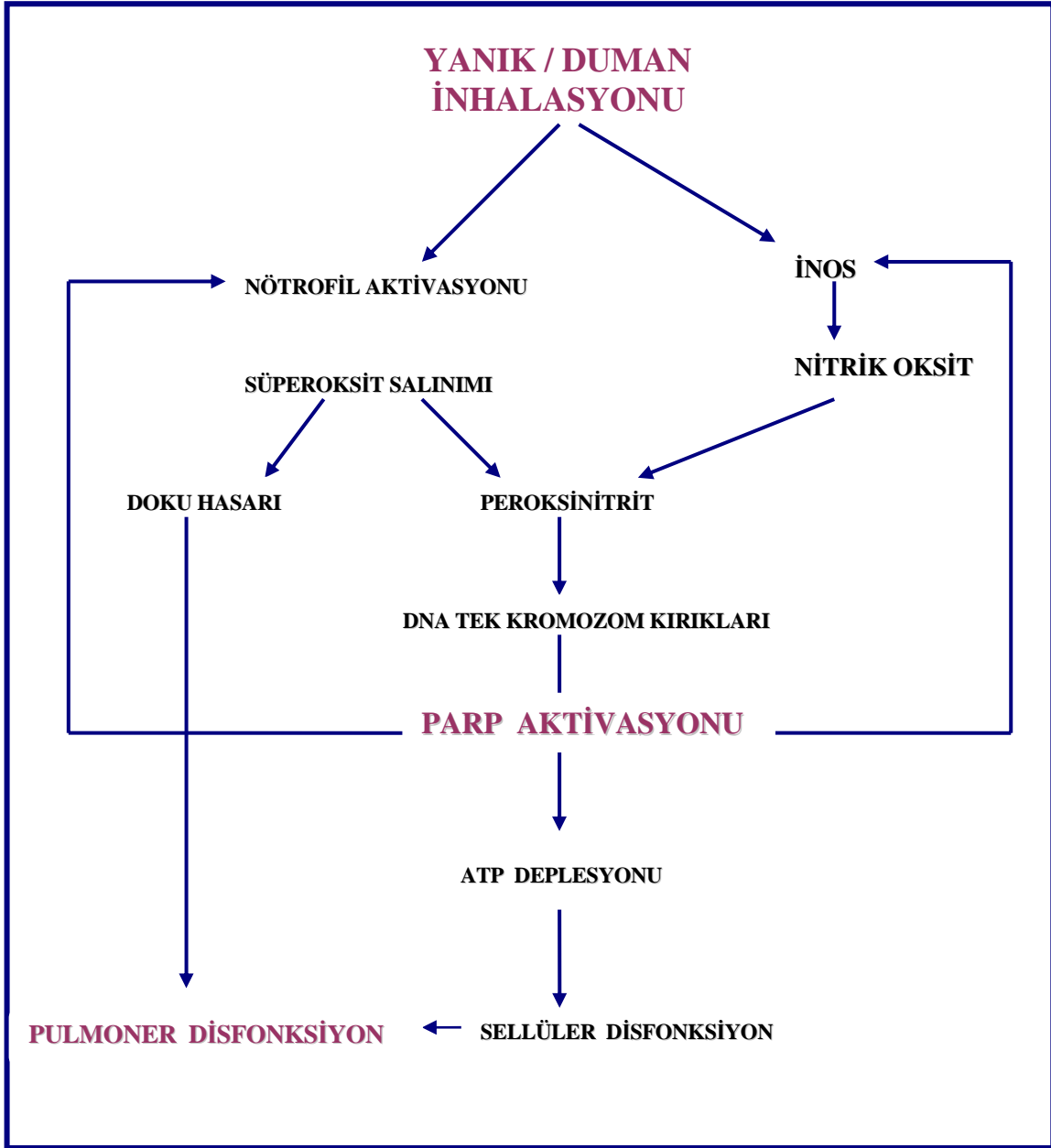


Yapılan çalışmalarda PARP'in inflamatuvar sürecin regülasyonunda rol aldığı, özellikle NF-kB olmak üzere önemli transkripsiyon faktörleri ile ilişkili fonksiyonları başlattığı gösterilmiştir (142). PARP-1'in supresyonu ile TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve MIP-1 (makrofaj inflamatuvar protein-1) gibi kemokinlerin azaldığı ve rat akciğerlerinde MPO (myeloperoksidaz) aktivitesinin suprese edildiği bildirilmiştir (142,143). Yapılan başka bir çalışmada ise LPS'nin bronkoalveolar lavaj sıvısındaki reaktif nitrojen ürünlerinin seviyesinde artışa neden olduğu bunun da PARP inhibisyonu ile önemli oranda azaltıldığı saptanmıştır (142).

Duman inhalasyonu sonrası akciğer dokusunda yapılan histopatolojik değerlendirilmelerde akciğer dokusuna nötrofil ekstrasvazasyonu olmakta ve nötrofillerin aktive olması ile oksijen radikalleri ve elastaz serbestlenerek doku hasarı ortaya çıkmaktadır (144). MPO aktivitesini baz alınarak yapılan değerlendirmelerde akciğerde nötrofil birikimi PARP inhibitörleri ile zayıflatılmıştır (145). Böylece fazla miktarda PARP aktivasyonu inhibisyonu fazla miktarda NOP inhibisyonu yolu ile ve NF-kB gibi transkripsiyonel faktörlerle ilişkili olarak nötrofillerin aktivasyonu pulmoner fonksiyonu düzeltir.

İnhalasyon hasarının eşlik ettiği yanık modellerinde yapılan çalışmalarda PARP inhibisyonunun, oksijenizasyonu düzelttiği, pulmoner vasküler permeabiliteyi azaltarak akciğer ödemi azalttığı ve pulmoner fonksiyonlarda düzelmeye gözlendiği bildirilmiştir (145).

PARS (Poly ADP ribose sentetaz) selektif inhibitörü olan INO-1001'in; sistemik vasküler permeabiliteyi azaltarak ve havayolundaki artmış kan akımını azaltarak akciğer ödem formasyonunu azalttığı, havayolunda basınç değişiklikleri ile alveollerden efektif gaz değişimlerini sağlayarak oksijenizasyonu düzelttiği ve akciğer dokusunda histolojik hasarı azalttığı bildirilmektedir (145).



**Şekil 6.** İnhalasyon hasarında PARP aktivasyonunun rolü (iNOS; Uyarılabilen Nitrik Oksit Sentetaz, NO; Nitrik Oksit, PARP; Poly ADP-Ribose-Polymerase)

## II.4. İNHALASYON HASARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

### II.4.1. DİĞER BİYOKİMYASAL VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL PARAMETRELER

#### II.4.1a. Myeloperoksidaz (MPO)

Lökosit aktivasyonu inflamasyon ile ilgili teorilerin temelini oluşturur. Nötrofil aktivasyonu oksijen radikalleri, proteazlar ve araşidonik asit metabolitlerinin salınımına yol açar. Bu ürünlerin yanı sıra aktive makrofajlar ve trombositlerden salınan maddelerde doku hasarını artırır. Multifaktöryel nedenle aktive olan nötrofillerden salınan serbest oksijen radikalleri, hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu gibi toksik radikaller protein destrüksiyonu ve lipid membran hasarı oluşturur. Kompleman aktivasyonu bu yanıtı şiddetlendirir (146,147).

Nötrofil degranülasyonu ile başta myeloperoksidaz (MPO) olmak üzere nötrofil elastaz, laktoferrin,  $\beta$ -glukuronidaz, ve N-asetil glukozaminidaz gibi toksik sindirim enzimleri salınır. Bu reaksiyon doku harabiyetine ve immün direncin azalmasına neden olur (146,147).

Lökositlerin dokuya geçerek doku hasarını başlattıklarının en önemli kanıtlarından biri doku MPO düzeyidir. MPO, lökositlerin pirimer granüllerinden (azurofil) salınır ve hidrojen peroksidin klorit iyonları ile dokuya zararlı hipoklorik asit oluşturma reaksiyonunu katalize eder (146,147).

Nötrofil sekestrasyonunun kantitatif olarak ölçülmesinde duyarlı bir gösterge olduğu kabul edilen MPO aktivitesi, iskemi-reperfüzyon modelinine dayanan birçok çalışmada gelişen akut akciğer hasarı ile ilişkili olarak bulunmuştur (121,148,149). Bu çalışmaların sonuçlarına göre, akciğer dokusu MPO aktivitesinde artış ile ortaya konan doku hasarı, ilginç olarak komplemandan bağımsız olarak gerçekleşmekte olduğu bildirilmiş ve proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- $\alpha$  inhibisyonunun MPO düzeyleri üzerine etkili olmadığı belirtilmiştir (149,150).

AT-III tedavisinin etkinliğini değerlendiren iskemi-reperfüzyon çalışmalarında; tedavinin etkinliği doku MPO aktivite düzeyi ile değerlendirilmiş ve AT-III tedavisinin MPO düzeyinin yanı sıra akciğer dokusunda histopatolojik inceleme bulgularını da anlamlı derecede düzelttiği bildirilmiştir (151,152).

#### II.4.1b. Glutasyon (GSH)

Glutasyon (GSH) enzim sistemi, oksidatif hasarın azaltılmasında rol oynayan en önemli mekanizmalardan biri olup oksidatif strese karşı öncül savunma rolü üstlenerek stres durumunda, antioksidan olarak fonksiyon göstermektedir. GSH, serbest radikallerin hücre içinde detoksifikasyonuna neden olan ve lipid peroksidasyonunu önleyen en önemli endojen mekanizmalardan birisidir (163,164). GSH intrasellüler bir tripeptid olup,  $\gamma$ -glutamylcysteinylglycine yapısındadır (165).

GSH direkt ya da indirekt olarak glutasyon peroksidaz enzimi ile ilişkili bir çok radikali nötralize eder (166). Glutasyon peroksidaz (GP) enzimi, GSH'dan elektronları ayırarak hidrojen peroksiti suya dönüştüren selenyuma bağlı sitoplazmik bir enzim olup peroksidasyon ürünlerinin detoksifikasyonunu sağlar (155). GP'ın  $H_2O_2$ 'e bağlı hücre hasarında hücreyi koruyucu etkisinin katalazdan daha fazla olduğu bilinmektedir. Glutasyon, redüktaz enzimi ile redükte glutasyon haline geçer. GP'ın antioksidan aktivitesi göstermesi, hücre içinde yeterli konsantrasyonda glutasyon redüktaz, GSH ve NADPH bulunmasına bağlıdır (167,168).



Endojen ya da ekzojen olarak oluşan radikaller, GSH düzeyini azaltmakla birlikte, GSH metabolizmasına bağlı enzimlerin aktivitesini de inhibe ederek, pulmoner alveolar makrofaj fagositozunu bozar ve lökositlerin kemotaksisini inhibe ederek oksidanlar tarafından hasarın ilerlemesine neden olurlar. GSH-redoks döngüsünün kritik bileşenleri olan doku glutasyon düzeyi, glutasyon redüktaz ve glutasyon peroksidaz aktiviteleri oksidatif stres sırasında önemli oranda azalır. Septik şokta GSH düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir ve hücre içi GSH depolarının azalması ile birlikte mortalite oranlarında da artış görülmektedir (169).

Hücresinin apoptozisi başlatmasında yada devam ettirmesinde hücre içi GSH seviyesinin önemli olduğu görülmüştür. Hücre içi GSH seviyesi düşük olduğunda hücre içi serbest oksijen radikalleri artmakta ve buda apoptotik süreçteki kaspaz aktivasyonunu uyarmaktadır (170). GSH'nın azalmasına bağlı olarak artan serbest oksijen radikalleri lipid, protein, DNA gibi bir çok biyolojik molekülle reaksiyona girerek, bu moleküllerde yapısal hasarlanmaya yol açmaktadır (56).

## II.4.2. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Duman inhalasyonu sonrası toksik gazların alveolo-kapiller membranda oluşturduğu ciddi hasar ARDS'na ilerleyen akut solunum yetmezliği ile sonuçlanabilir. Hastalığın başlangıcında vasküler permeabilite artışına bağlı olarak akut akciğer ödemi gelişir. Süreç ilerledikçe hücresel nekroz, epiteliyal hiperplazi, inflamasyon ve fibrozis gelişir. ARDS ile sonlanabilen diffüz alveoler zedelenme 'Diffuse alveolar damage' histopatolojik olarak hasarlanma derecesi ve geçen süreye bağlı olarak birbiriyle ilişkili olarak eksüdatif, proliferatif ve fibrotik evrelerinden oluşur (88,171).

### **Eksüdatif faz**

Duman inhalasyonu sonrası ilk patolojik bozuklukların görüldüğü bu faz, semptomların başlamasından sonra bir hafta kadar sürer (171). Makroskopik olarak hastalığın erken fazında akciğerler koyu kırmızı, sert, havasız ve ağır görünümündedir. Işık mikroskopunda saptanabilen ilk değişiklikler kapiller konjesyon, interstisyel ve alveoler ödem ve intraalveoler kanamadır. Kapiller ve alveoler boşlukta nötrofil birikimi vardır. Bu fazın en karakteristik bulgusu, özellikle genişlemiş alveoler duktusları döşeyen, endotel-epitel bariyerinde hasar sonucu alveoler boşluğa sızan yoğun plazma proteinleri ve epitel hücre kalıntılarından oluşan eozinofilik hiyalen membranlardır. Komşu konjesyone, ödemli ve sürfaktan yapımında kayıp nedeni ile alveoler kollaps gelişen alveollerin tersine alveoler kanallar genişlemiş görünümündedir. Endotelyal zedelenme ışık mikroskobu ile görülebilecek kadar belirgin olabileceği gibi bazen elektron mikroskopunda görülebilir. Elektron mikroskopisinde yapılan incelemede ise endotel hasarı; endotel hücrelerinde şişme, endotel hücreler arası birleşme yerlerinde genişleme ve pinositik veziküllerde artış olarak gözlenir. Bunun yanı sıra endotel hücre nekrozu, kapiller bazal membranın soyulması ve damar içi fibrin birikimi gözlenebilir. Alveoler septum; interstisyel ödem, fibrin ve ekstrasvaze olmuş eritrositler nedeni ile genişlemiştir. Endoteldeki düzensiz ve genelde hafif değişikliklerin tersine tip I alveoler epitel hücrelerinde yaygın nekroz gözlenir. Bu alveoler epitel bariyerinin kaybı ile interstisyel sıvı serbestçe alveoler boşluğa kaçabilir.

## **Proliferatif faz**

Bu evre akut fazda oluşan intraalveoler ve interstisyel eksüdanın organizasyonu ile karakterizedir ve tipik olarak hasardan sonra en erken 3-4. gün başlar, 10. günde belirginleşir ve üçüncü haftaya kadar gözlenmektedir. Kapiller ağ hasarlanmıştır ve kapillerlerin profilinde ilerleyici bir azalma vardır, sonradan lüminal alanı daha da azaltan intimal proliferasyon gözlenmektedir. İnterstisyel boşluk belirgin şekilde genişler, tip I pnömositlerin nekrozu epiteliyal bazal membranı ortaya çıkarır ve alveoler lümen lökositler, eritrositler, fibrin ve hücre kalıntıları ile dolar. PII hücreleri soyulmuş epiteliyal yüzeyi kaplayacak şekilde çoğalır ve tip I hücrelere differansiye olur, bu değişimleri immunhistokimyasal boyamalarla takip etmek de mümkündür. Alveol duvarında fibroblastlar ve myofibroblastlar çoğalırlar ve takiben alveol bazal membranındaki aralıklar yoluyla alveol içindeki fibrinöz eksudaya göç edip bunu kollajen depozisyonuyla hücresel granülasyon dokusuna çevirirler. Epiteliyal hücreler organize olan granülasyon dokusunun yüzeyi üzerinden göç ederler ve böylece alveol içi eksudayı interstisyel dokuya çevirirler. Bu işlem ARDS'deki akciğer remodellinginin en önemli mekanizmasıdır. Fibrozisin esas yeri alveol boşluğu olmasına rağmen interstisyumda da olabilir ve geniş alveolar septaya sebep olabilir. Sonuçta, artarak alveoler boşlukları dolduran fibröz doku akciğer parankim yapısını büyük ölçüde bozar. Bazı alanlarda alveoler kollaps vardır ve normal alveoler kapiller ünite oblitere edilir. Fakat diğer alanlarda alveoller ve alveoler duktuslarda dilatasyon görülür.

## **Fibrotik faz**

Bu dönem başlangıçtaki hasardan 10 gün sonra başlayabilir. Makroskopik olarak akciğerdeki skarlaşma ve kollajen depolanması nedeni ile kaldırım taşı manzarası olup gri renktedir. Myointimal kalınlaşma ve mural fibrozis nedeni ile damarlarda daralma mevcuttur. Hasta iyileştikçe histolojik veri azaldığından mikroskopik olaylar yeterince iyi dökümanite edilememiştir. Diffüz interstisyel fibrozis alanları arasında düzensiz ve dilate hava boşlukları görülür. Buna bal peteği akciğeri 'Honey comb lung' adı verilir. Bronkoalveolar lavaj (BAL) bulguları, nötrofildeki azalma, lenfosit ve makrofajdaki rölatif artışı desteklemektedir. En dramatik değişiklikler akciğer kollajeninde gözlenmektedir. Total akciğer kollajen içeriği ilk 2 hafta içinde 2 katına çıkabilir (172), fakat bu yol yok edilebilir ve birkaç çalışmada gösterildiği gibi sağ kalanlar rölatif olarak normal akciğer fonksiyonlarına geri dönebilirler (95). Yapılan bir çalışmada miyofibroblast ve prokollajen tip-1 üretiminin ARDS'nin erken fazında arttığı

gösterilmiştir (173). İlginç olarak, ilk birkaç hafta içindeki patolojik değişikliklerin ciddiyeti (hyalin membran, hava boşluklarının organizasyonu, hücre artışı, vb) geç fonksiyonel iyileşme ile ilişkili görünmemesine rağmen fibrozisin derecesi sonucun anahtar belirleyicisidir. Fibrozis akciğer kompliyansını azaltarak solunum işini arttırır, tidal volümü azaltır ve hiperkapniye sebep olur. Öte yandan alveoler obliterasyon ve interstisyel kalınlaşmadan dolayı gaz alışverişi azalır ve hipoksi ve ventilatör bağımlılığına neden olur. Ventilatör ilişkili pnömoninin veya ventilatör bağımlılığına bağlı diğer nazokomiyal infeksiyonların sonucu olarak da, ARDS'deki geç ölümlerden genelde sorumlu olan, sepsistir.

Son yayınlarda, inflamatuvar ve fibroproliferatif evrelerde önceki düşüncelerin aksine daha fazla örtüşme olduğu ve pek çok mediyatörün ortak olduğu öngörülmektedir (174,175).

### **II.4.3. İNFLAMATUAR HÜCRE ÖLÜMÜNÜN REGÜLASYONU**

Herhangi bir patoloji olmadan gerçekleşen programlı hücre ölümü olan apoptozis sırasında, yaşlanmış ve disfonksiyonel makrofajlar ve PMNL'ler diğer immünoisitleri aktive etmeden ve proinflamatuvar içeriklerini serbestleştirmeden sistemik olarak ortamdaki yok edilirler. Ortamda inflamasyon olması, disfonksiyonel veya yaşlanmış hücrelerde apoptotik mekanizmanın bozulmasına yol açarak aktive makrofaj ve PMNL'lerin imhasının gecikmesine neden olur. İn vitro ortamda, makrofaj ve PMNL apoptozisinin seyri çeşitli proinflamatuvar sitokinler tarafından geciktirilebilir. Bunlar arasında TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF, granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) ve IFN- $\gamma$  sayılabilir. Bunun aksine IL-4 ve IL-10 ise aktive monositlerde apoptozisi hızlandırır. İnflamatuvar immünoisitlerin yaşam sürelerinin uzaması, travma ve infeksiyona olan inflamatuvar yanıtın artmasına ve uzamasına yol açar. Bu da, ciddi travmaya uğramış olanlarda multipl organ yetmezliği riskini ve ölüm oranını arttırır .

İnhalasyon hasarında akciğerlerde nötrofil ve endotelial hücre apoptozisi yapılan deneysel çalışmalarla gösterilmiş olup ARDS gelişen olgularda akciğerlerde nötrofil apoptozunun gecikmiş olduğu bildirilmiştir. Endotelial apoptozis ise alveoler epitelin ve alveoler kapiller endotelin hasarlanması olup epitel fonksiyonu bozulmuştur. Epitel ve endotelial hücrelerin hasarlanması sonucunda akciğer permeabilitesinde ciddi bir artış ve alveoler boşluklarda proteinden zengin eksuda özelliğinde sıvı ile dolma gözlenmektedir. Erken dönemde kaybedilen kişilerde Tip I pnömosit'lerin boyutlarının azaldığı ve nükleer

kromatinlerin yoğunlaştığı gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, alveoler epiteliyal hücrelerin DNA'sında fragmentasyon ve apoptozise yol açan bir bcl-2 analogu olan bax geninde artmış ekspresyon olduğu bildirilmiştir.

İnflamatuar hücre ölümünün regülasyonunda TNF-R ve Fas (CD95/APO-1) reseptörlerinin aracılık ettiği iki ayrı hücre ölümü tanımlanmıştır (Şekil 7). Tümör nekroz faktörü reseptörleri (TNF-R), immünoisitlerin de dahil olduğu yaklaşık 15 transmembran proteinden oluşmaktadır. Bu reseptörlerin aktivasyonu ile programlı hücre ölümünü de içeren çeşitli hücresel yanıtlar indüklenir. İki farklı spesifik transmembran TNF-R'ü vardır. Bunlar Tip I p55 ve Tip II p75 olup bunların intrasellüler etki alanları farklıdır. p55 TNF-R, apoptozis, sitotoksinite, endotelyal hücrelerdeki adezyon moleküllerinin etkinliği, ve nükleer faktör-kappa B'yi (NF-κB) indükler. p75 TNF-R ise T hücrelerinin, fibroblastların, doğal öldürücü hücrelerin proliferasyonunu ve proinflammatuar sitokinlerin salınımını indükler. p55 TNF-R, apoptozisin tetiklenmesinde majör rol oynamasına rağmen bu sürecin başlatılabilmesi için hem Tip I hem de Tip II TNF-R'lerinin olaya katılması gereklidir. Endotoksin uyarısı ile sepsis oluşturulan deneysel çalışmalarda makrofaj ve PMNL'lerde TNF-R aktivitesinde azalma gözlenmiş ve bu azalma inflammatuar makrofajlar ve PMNL'lerdeki apoptozisi geciktirerek inflammatuar yanıtın uzamasına neden olduğu bildirilmiştir (176).

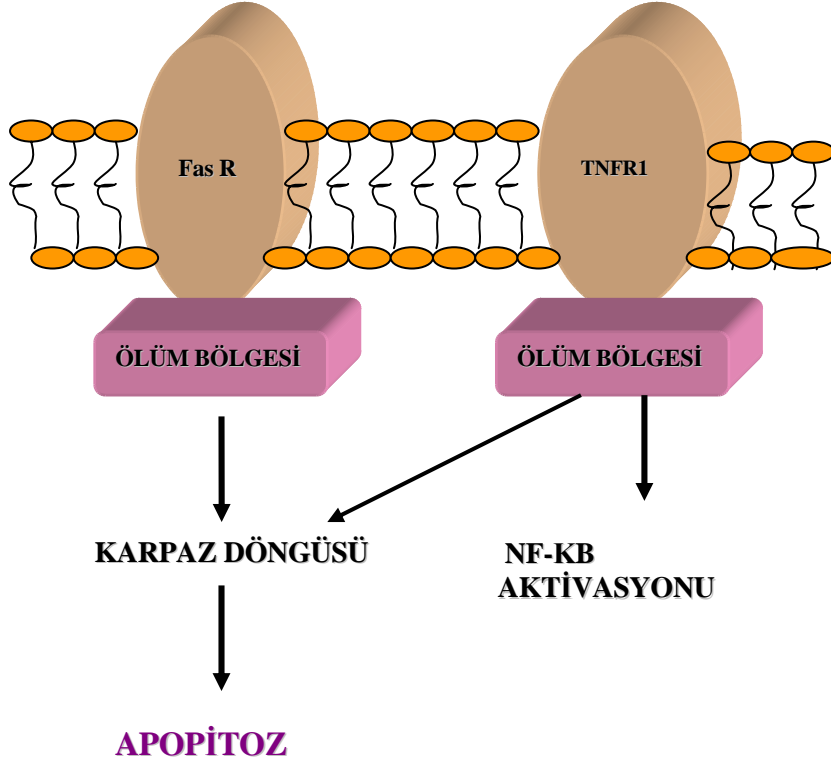
Fas reseptörlerinin ise bilinen tek rolü programlı hücre ölümünü başlatmaktır. Fas ve TNF-R'nin intrasellüler özellikleri benzer olduğundan, her ikisinin de apoptozisi indükleme mekanizmaları birbirine benzemektedir. Fakat, Fas'ın aracılık ettiği apoptozis, p55 TNF-R'ne oranla saatler içinde gerçekleşecek şekilde çok daha hızlıdır. Bu da Fas'ın TNF-R Tip I'e oranla daha direkt olmak üzere daha az kompleks bir mekanizma ile apoptozisi başlattığının göstergesidir. Aktive edilmiş immünoisitlerde apoptozisin Fas/FasL çapraz bağları aracılığı ile indüklenmesi sistemik inflamasyon sırasında avantajlı olmasına karşın doku düzeyinde zararlı olabilir. Özellikle karaciğerde inflamasyon sırasında Fas'ın aracılık ettiği aktivite hepatik harabiyet miktarını artırır. Akut travmalarda karaciğer parankimindeki Fas reseptörlerinde artış olurken, infiltre eden lenfositlerdeki FasL belirginleşmesi de artar. Fas/FasL etkileşimine yönelik geliştirilecek tedavi stratejileri istenmeyen organ yaralanmalarını engelleyebilmek için mutlaka selektif olmalıdır.

p55 TNF-R ve Fas reseptörlerinin sitoplazmik dizilim şekilleri benzer olup bu kısma ölüm bölgesi adı verilmektedir. Bu ölüm bölgeleri diğer intrasellüler proteinlerle etkileşime girerek programlı hücre ölümü emrinin daha ileriye ulaşmasını sağlarlar. TNF-Ri bütün hücre tiplerinde bulunmasına karşın, Fas (CD95, APO-1) daha çok karaciğer, akciğer, kalp, barsaklar, deri ve lenfositlerde bulunur. İnsanlarda Fas etkisi dokuya spesifik olup spesifik hormon olan FasL



tarafından tetiklendiğinde Fas, bilinen tek fonksiyonu olan apoptozisi başlatma işini yapar. Fas ve FasL'de olan mutasyonlar lenfoproliferatif hastalıkların gelişmesinden ve inflamatuvar makrofajların imhasının gecikmesinden sorumlu tutulmaktadır. ARDS gelişen olgularda pulmoner ödem sıvılarında Fas ligandının ölçülebilir olduğu belirtilmekte olup Fas bağımlı yollar alveoler makrofajlar tarafından sitokin yapımını stimüle etmektedir. Böylece Fas bağımlı yolların inflamasyona neden olduğu ve akciğerlerde tekrarlanan inflamasyonlar sonucunda hücre membran bütünlüğünde bozulmaya, hava yolu ve alveoler epitelde nekroza yol açtığı belirtilmektedir (177,178).

Programlanmış hücre ölümü olan apoptozis, 'caspase-3' ve 'caspase-8' proteinlerinin aktivasyonu ile meydana gelmektedir. Bu proteinler, mitokondrial membranda birtakım değişikliklere sebep olmalarının yanısıra, sitoplazmaya sitokrom c salınmasına ve sonuçta nükleer DNA'nın yıkılıp hücrenin ölmesine sebep olmaktadır (179-182). Ligandları ile bağlandıktan sonra Fas ve TNF-RI, adaptör proteinler ve pro-caspaslardan oluşan bir ölüm kompleksinin oluşmasına aracılık ederler. Bu kompleks, caspase-8 ve caspase-3'ün aktivasyonunu sağlar (183). Pre-apoptotik proteinlerin aktivasyonu sonrası gelişen hücresel stress oluşturarak sitokrom c'nin salınmasına yol açar. Sitokrom c, Apaf-1'e bağlanarak caspase-9'u aktive eder. Bu noktadan sonra caspase-9 efektör caspase'ları aktive ederek anahtar proteinlerin sıralı bir şekilde aktivasyon ve yıkılması ile apoptozis olayı gerçekleşir (183). Mitokondrial ve reseptör yollarının, Bid proteini üzerinden birbiri ile ilişkide oldukları düşünülmektedir. Bid proteini, caspase-8 tarafınca aktive edildikten sonra mitokondrilerden sitokrom c salınmasını sağlamaktadır (183).



**Şekil 7.** İnflamatuar hücre ölüm yolları (**Fas R**; Fas Reseptörü, **NF-kB**; Nükleer Faktör Kapa, **TNFR1**; TNF 1 Reseptörü)

## II.5. ANTİTROMBİN III (AT-III)

Antikoagülan mekanizmalar, damar endotelinden kaynaklanan antikoagülan maddelere ve plazmada bulunan karaciğer kaynaklı antikoagülan faktörlere bağlıdır. Normal koşullarda adhezyon-agregasyon olayı kandan ve zedelenen damar dokusundan gelen antiagregan fibrinolitik aktive ile dengelenmiş durumdadır. Antiagregan ve fibrinolitik aktiviteyi sağlayan olaylardan birincisi damar endotelinden gelen PGI<sub>2</sub>'dir. Trombosit kümeleşmesi olayını başlatan damar duvarı zedelenmesi PGI<sub>2</sub>'nin de hızla sentezine yol açar ve böylece trombositlerin damar duvarına yapışmasını ve agregasyonlarını inhibe eder. PGI<sub>2</sub> ayrıca güçlü bir vazodilatatör etki sağlayarak kan akımını hızlandırır. Bu şekilde trombositlerdeki TxA<sub>2</sub> ile antagonist fizyolojik etki gösterir. Normalde bir denge içerisinde bulunan agregan antiagregan etkileşim damar endotelinde ortaya çıkan belirgin ve uzamış bir zedelenmede ile bozularak bu denge trombosit agregasyonu lehine döner ve trombosit kümeleşmesi irreversible bir döneme geçerek pıhtı ve tromboz oluşur. Burada kandan ve zedelenen dokudan gelen pıhtılaşma faktörlerinin birleşmesi sonucu fibrin oluşur. Fibrin, trombositleri ve diğer kan hücrelerini sararak pıhtı oluşturur. Trombüs oluşumunda önemli bir olay da fibrinolizisdir. Fibrinolizis, kan pıhtılaşması sonucu oluşan fibrinin parçalanması ve pıhtının erimesi olayıdır. Fibrinolitik aktivitenin azalması trombüs oluşumunu kolaylaştırır.

### II.5.1. BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ VE FARMAKOKİNETİĞİ

İlk olarak 1932'de tanımlanmış bir plazma glikoproteini olan AT-III terminolojisinin tarihi 1905'lere kadar uzanır. Bu dönemlerde Morawitz tarafından trombinin aşırı koagülasyonun engellenebilmesi için nötralize edilmesi gerekliliği anlaşılmıştır. 1965 yılında Egeberg yüksek tromboz riskinin düşük antitrombin aktivitesine bağlı olduğunu göstermiştir. 1968 yılında Abildgaard tarafından homojen antitrombin elde etme yöntemi ile ilk olarak biyolojik aktivitesi tanımlanmıştır. AT-III insan plazmasından elde edilerek 1974 yılından bu yana tedavide kullanılmaktadır.

Plazmada bulunan antikoagülan faktörlerden olan AT-III, 58.000 dalton molekül ağırlıklı, 432 aminoasitten oluşan, zincir yapısında 3 adet disülfid bağı ve 4 karbonhidrat yan zincirleri olan tek zincirli  $\alpha_2$  globülin yapısında bir glikoproteindir. %15 oranında karbonhidrat içerir. Aktif bölgesi Arg 385 – Ser 386 peptid bağındadır. Fonksiyonel olarak AT-III molekülünün trombinin bağlandığı ve heparin ve diğer glikozaminoglikanların bağlandığı bölgeler olmak üzere iki önemli bölgesi vardır. AT-III karboksil grubunun yanındaki arginil grubu ile trombinin

aktif serin bölümüne yapışarak kompleks yapmaktadır. Bu yolla trombin 1/1 kompleks oluşumu ile inaktive edilmektedir. AT-III molekülünün heparini bağlayan bölgeleri lizin dalları olup heparini 1/1 molar oranında bağlamaktadır. Endotel hücrelerinin lümene bakan yüzeyini kaplayan heparin sülfat adlı heparin benzeri moleküller plazmada dolaşan antitrombinin etkinliğini artırır (212).

AT-III'ün primer sentez yeri karaciğer olup ancak vasküler endotel hücrelerinde de en az kandaki miktarda AT-III bulunması endotel hücrelerinden de sentezlenebildiği şekilde yorumlanmıştır. Antitrombinler 6 adet olarak tanımlanmıştır; Antitrombin I, fibrinojen olup koagülasyon esnasında kendisi fibrine dönüşürken trombinin bağlar. Antitrombin II, heparinin kofaktörüdür. Son zamanlarda AT-II ve AT-III'ün aynı olduğu yani heparin ile aktive edilmiş AT-III olduğu görüşü hakimdir. AT-IV, koagülasyon esnasında meydana gelen bir antitrombin olup fonksiyonu tartışmalıdır. AT-V, kollagen doku hastalıkları ve immünolojik hastalıklarda görülen bir gamma globulin olup normal kişilerde rastlanmamıştır. AT-VI ise fibrinojen ve fibrin yıkım ürünleri (FDP) olup trombin ile kompetitif bir etki gösterir (212).

AT-III'ün plazmadaki normal düzeyi %80 - %120 arasındadır. Radyoaktif çalışmalarda antitrombinin dolaşımdaki yarılanma ömrü 2,6-2,8 gün olarak bulunmuştur. AT-III molekülü, bir proteinaz olan alfa-trombin ile kompleks yaptığında hepatositler üzerindeki serpin reseptör I adı verilen bağlanma bölgeleri tarafından dolaşımdan temizlenir (212).

AT-III'ün aktive edilmiş pıhtılaşma enzimlerinin fizyolojik bir inhibitörü olarak önemi, plazmada fonksiyonel AT-III'ün gerekli seviyesi sağlanmadığında, tromboza eğilimin belirgin olarak arttığının gösterilmesi ile ortaya konmuştur. AT-III eksikliği ailesel olabilir ve geçiş peterni genellikle otozomal dominanttır. AT-III geni I. kromozomun 1q23-q25 loküsü üzerinde tanımlanmıştır. Erkek ve kadınları eşit olarak etkilemektedir. Herediter AT-III eksikliğinin prevalansı genel popülasyonda 1/2.000-5.000 arasında olduğu tahmin edilmektedir (212).

Edinsel eksiklik, AT-III sentezinin azalması, vasküler yoldan kaybının artması ve harcamanın artması durumlarında ortaya çıkar. AT-III'ün harcanmasının akut artışı özellikle DIC'de görülür. Septik hastalarda da AT-III'ün yarılanma ömrü kısalmıştır. Bu vakalarda AT-III'ün harcanması temel olarak koagülasyonun aktif serin proteazları ile masif kompleks oluşturmasına bağlıdır. Sepsis gibi ağır vakalarda çoklu organ yetmezliğine bağlı olarak sentez azalması da olabilir. DIC'in giderek artmasının nedeni AT-III'ün azalmasıdır. DIC'de AT-III ekstresi verilmesinin hayat kurtarıcı olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Edinsel AT-III eksikliklerinde intravasküler trombotik olayın ciddiyeti ile AT-III düzeyi arasında genel bir paralellik vardır. Sepsis olgularında erken dönemde ve yüksek dozda AT-III kullanımı hastayı sepsis komplikasyonlarından koruyarak ÇOYS gelişimini önlemede yarar sağlamaktadır.

ARDS'de AT-III düzeyinin düşük düzeylerde olduğu gösterilmiştir. AT-III'ün sepsis ve DIC'de kullanımını sınırlayan durumlardan biri trombinin fibrin plaklarına bağlanıp, böylece inaktivasyonunun engellenmesidir.

## II.5.2. BİYOLOJİK ÖZELLİKLER

### Antikoagülan Özellikler

Duman inhalasyonu sonrası aktive olan TNF- $\alpha$  ve diğer sitokinler inflamatuvar yanıt ile birlikte koagülasyon sistemini de aktive etmektedir. Hemostaz dengesi prokoagülanların artışına karşın koagülasyon inhibitörlerinin azalması ile bozulmaktadır (213).

Alfa 2 globulin yapısında antikoagülan bir ajan olan AT-III, koagülasyon kaskadında yer alan trombin gibi serin proteazlarının fizyolojik inhibitörüdür (151). İnhibitör profili koagülasyonun intrinsik (F XIa, F IXa), ekstrinsik (F VIIa'ya bağlı doku faktörü) ve ortak yolunu (F Xa, trombin) içerir. Ayrıca aktif bölgelerinde birer serin grubu içeren Protein C gibi serin proteazları, kompleman inhibitörü olarak bilinen Protein S ve yüksek molekül ağırlıklı kininojeni de inhibe ettikleri bildirilmektedir. Trombin ve diğer serin proteazlarını ilerleyici ve tersinir olmayan biçimde inhibe eder.

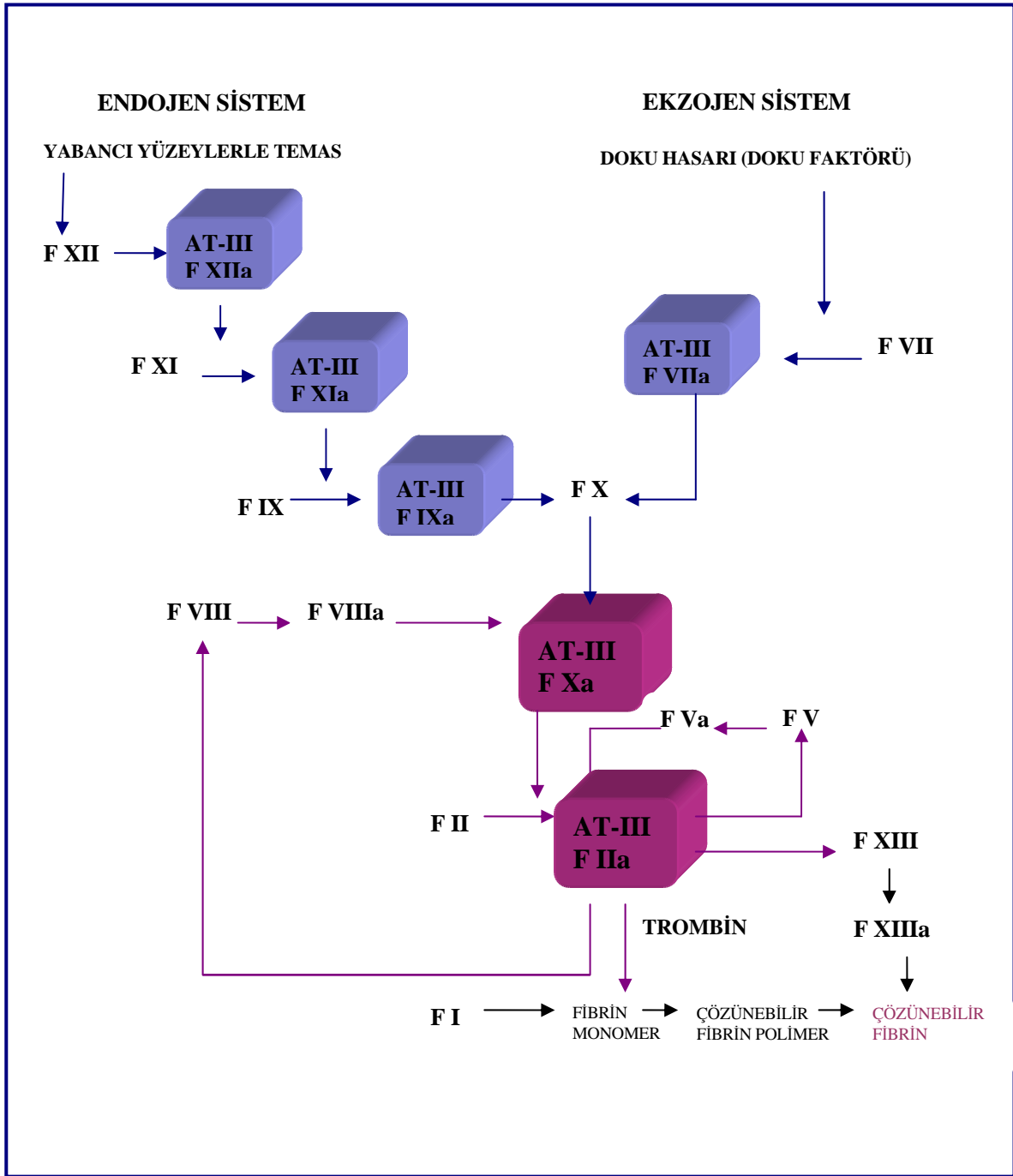
Endotel hücrelerinden salınan PGI<sub>2</sub>, trombosit aktivasyonunu önleyen ve aynı zamanda var olan trombosit agregatlarını ortadan kaldıran güçlü bir vazodilatatördür. PGI<sub>2</sub> trombositlerin vasküler endotele adezyonunu önler. PGI<sub>2</sub> antiagregan etkisini trombositlerdeki adenil siklaz enzimini aktive ederek, hücre içindeki siklik AMP düzeyini yükseltmek suretiyle gösterir (214).

Endotel hücre bütünlüğünün bozulması, trombositlerin buraya adezyonuna, aktive olarak granüllerinde depo edilmiş olan ürünlerinin sekresyonuna ve tromboksan A<sub>2</sub> sentezine neden olur. Vasküler duvarda hasarlanma membran glikoproteinleri (GP) olan trombosit reseptörlerini aktive eder. GP1b reseptörü von Willebrand faktörününün, GP1a reseptörü subendotelyal kollajenin, GP11b ve GP111a reseptörü ise fibrinojenin trombositlere bağlanmasını sağlar. Bu reseptörler, endoplazmik retikulumdan kalsiyum salımını sağlayarak trombositlerin aktive olmasını sağlarlar. Trombosit kalsiyumunda artma trombosit agregasyonunu sağlayan faktörlerden birisidir. Trombosit kalsiyumunda artma sonucunda, trombosit içi aktin ve miyozin aktive olarak kasılır ve bu da trombosit agregasyonuna yol açar. Bu kontraksiyon sonucunda, trombosit glikoprotein reseptörleri, von Willebrand faktör, fibrinojen ve trombin kapsayan değişik makromoleküllerle daha büyük oranda reaksiyona girip daha çok trombositin agregasyonunu ve damar duvarına adezyonunu sağlar.

Hemostaz regülasyonunda AT-III'ün oynadığı santral yol, heparin veya endoteldeki heparin bağımlı yapılar tarafından hızlandırılan inhibitör fonksiyonuna dayanmaktadır (14,215). AT-III'ün bu etkisini endotel hücre yüzeyindeki heparin benzeri glikozaminoglikanlarla (GAG) etkileşmesi sonucunda ortaya çıktığı ileri sürülmektedir (15,215,216).

AT-III, endotel yüzeyindeki heparin sülfat proteoglikanlar ile kompleks oluşturduğunda proteazları inhibe edici etkisi güçlenmektedir. Normal şartlarda az miktarda AT-III, heparin sülfat proteoglikanlarına bağlı olarak durmaktadır. Bunun sonucu olarak da AT-III intrinsek pıhtılaşma yolu enzimlerinin olduğu yüzeylerde seçici olarak aktivedir ve bu hemostatik enzimleri nötralize ederek doğal yüzeyleri trombus oluşumuna karşı korur. Herhangi bir nedenle endotel hasarı oluşmuş damar duvarında trombinin koagülan aktivitesi ortaya çıkar. Yaralanma bölgesinde her yaranın etrafında hemostaz sağlamak için fibrin formasyonunu sağlayan koagülasyon enzimleri kuvvetle aktive olur. Lokalize pıhtılaşma olayı tamamlandıktan sonra koagülasyon faktörlerinin inhibe edilmesi için bir yol bulamazlarsa aktif serin proteazlar dolaşımında sürekli olarak tromboza neden olacaktır.

AT-III koagülasyon proteazlarını 1/1 oranında inhibe eden bir glikoproteindir. AT-III ile trombin arasındaki reaksiyonda AT-III'ün arginin kısmı trombinin aktif serin kısmına bağlanarak irreversibl bir reaksiyon ile inaktif bimoleküler bir kompleks oluşur. Bu reaksiyon progresiftir. Bu kompleks oluşumu belli bir dengeye eriştiğinde durmaktadır. Trombin-antitrombin kompleksi genelde stabildir. Heparin AT-III'ü aktive eder. AT-III'ün epsilon-lizin kısmına heparinin bağlanması konformasyonel bir değişikliğe sebep olarak serin bölgesini bağlayan argininin daha duyarlı hale gelmesine neden olur. Bu değişiklik sonucu trombin ve inhibitörün arginin reaktif ucu arasında daha hızlı bir reaksiyona imkan verir. Böylece AT-III'ün inhibitör potansiyeli artmış olur. Bu enzim inhibisyonu heparinin yokluğunda daha yavaş ilerler. Heparin AT-III'e yüksek aktivite gösterirken trombin-antitrombin kompleksine olan afinitesi düşüktür. Heparin-AT III kompleksi oluşuktan sonra heparin serbestleşir ve serbest inhibitöre bağlanmaya hazırdır. Böylelikle heparin ard arda trombin-AT III kompleks oluşumu turlarını katalize edebilir. Heparinin bu özelliği küçük miktarlarının bile nasıl büyük miktarlarda aktif enzimi inaktive ettiğini göstermektedir. Bu da heparinin katalizör rol oynadığını, reaksiyon sonucu yapısının bozulmadığı ve AT III-trombin kompleksi oluşur oluşmaz kompleksten ayrılarak serbestleştiği anlamına gelmektedir. Bu durumda AT-III antikoagülan, heparin ise kofaktör olarak görev yapmaktadır (215).



Şekil 8. AT-III'ün koagülasyon kaskadı üzerindeki blokaj yerleri (a; aktive, AT III; Antitrombin 3, F; Faktör)

## Antienflamatuar Özellikler

AT-III'ün iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı organ disfonksiyonunda yararlı olabileceğini bildiren çalışmalarda; ajanın antikoagülan özelliklerinden bağımsız olarak etki mekanizmasında prostasiklin üretiminin de rol oynadığı öne sürülmekte ve bu öngörü prostasiklinin stabil metaboliti olan 6-keto-PGF1 $\alpha$  düzeyinin saptanması ile desteklenmektedir (15). Kimyasal olarak anstabil olan PGI $_2$ 'nin yarılanma ömrü 2-3 dakika olup stabil formu olan 6-keto-PGF1 $\alpha$ 'ya hidrolize olarak böbreklerden atılır.

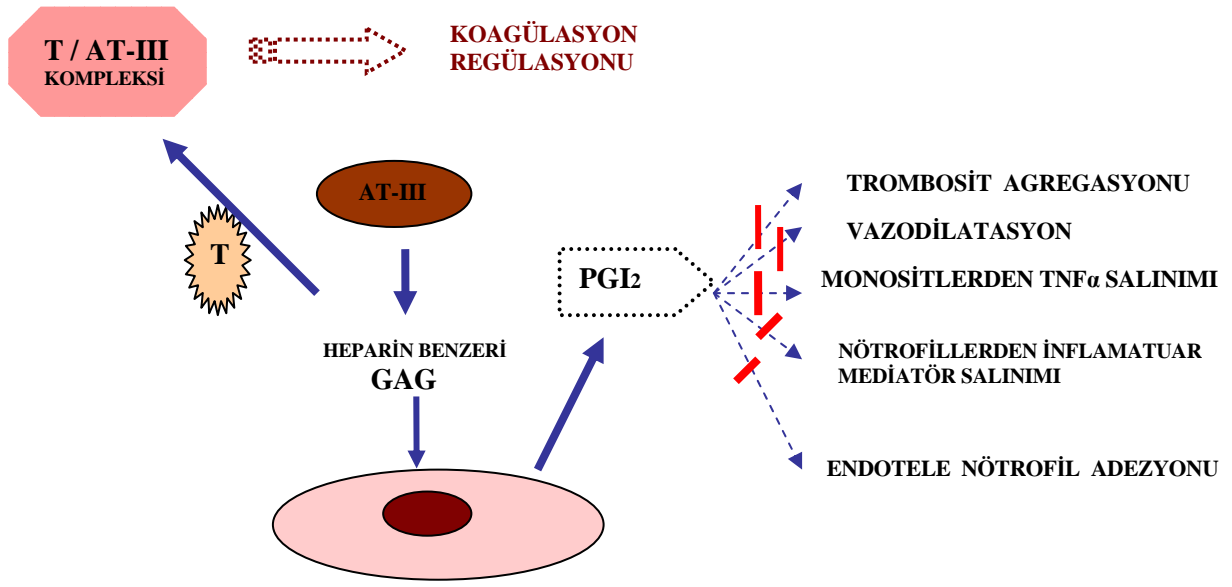
AT-III'ün endotelial hücre yüzeyindeki heparin benzeri glikozaminoglikanlarla etkileşimi, in vitro ve in vivo olarak endotelial hücreden PGI $_2$  salınımını kolaylaştırır. Bu sayede inflammatuar reaksiyonlar sırasında monositlerden TNF- $\alpha$  üretimini baskılar, intrasellüler cAMP'yi arttırarak lökosit ve monositlerin aktivasyonunu ve endotelial hücrelere nötrofil adezyonunu inhibe eder ve lizozomal enzimlerin ve serbest oksijen radikallerinin oluşumunu engeller. Bu nedenle de AT-III'ün aktive lökositlerin indüklediği organ hasarını önlediği belirtilmektedir (10,16,17,217,218), (Şekil 9,10,11).

Dolaşımda hemorajik ve endotoksemiye bağlı gelişen septik şokta ve hipoksi sırasında endojen PGI $_2$  oluşumu artar (176). AT-III tedavisinin etkilerini araştıran bir çalışmada; rat karaciğerinde oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarında AT-III'ün PGI $_2$  üretimi üzerinden mikrodolaşımı iyileştirdiği ve histolojik hasarı azalttığı bildirilmiştir (219,220). Yapılan çalışmalarda, AT-III'ün iskemi-reperfüzyon sonrası akciğerdeki histolojik hasarı, lipid peroksidasyonu ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe ederek önlediği gösterilmiştir (151,152). Yapılan bir başka çalışmada da AT-III'ün sadece antitrombotik değil aynı zamanda antienflamatuar etkisinin de olduğu belirtilip, nötrofil akümüülasyonu ve adezyonuna karşı sadece profilaktik olarak değil terapötik olarak da kullanılarak mikrovasküler disfonksiyonun düzeltilmesinde etkili olabileceği belirtilmiştir (221,222).

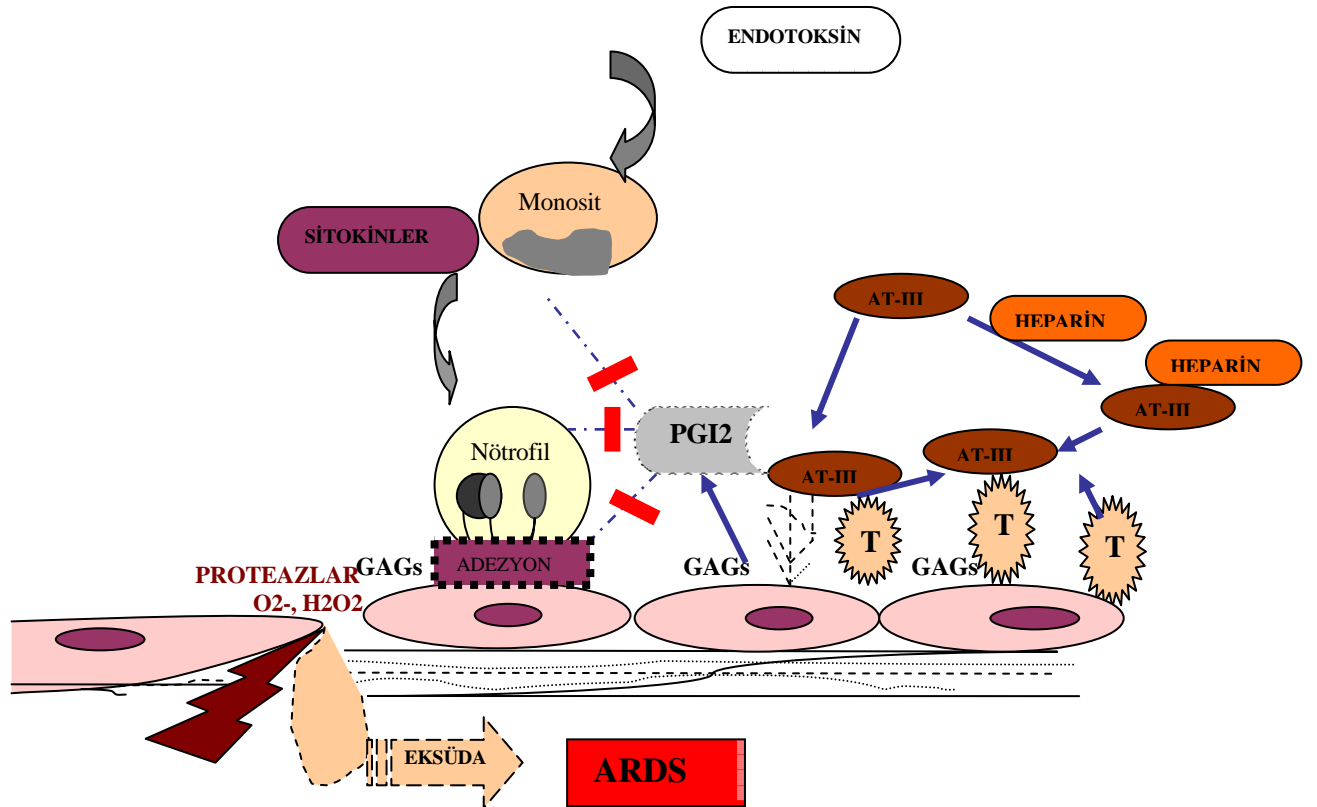
Sağlıklı bireylerde AT-III'ün yarı ömrü yaklaşık 55 saat olup, bu süre ciddi sepsisli hastalarda azalmaktadır (223). İnflamatuar süreçte sitokinlerin uyarısı ile aktive olan nötrofillerden salınan elastaz gibi proteolitik enzimlerin AT III'ü yıktığı belirtilmektedir. Ciddi sepsisi olan hastalarda uygulanan AT-III desteğinin; özellikle düşük plazma AT-III düzeyi olan ve dissemine intravasküler koagülasyon belirtileri sergileyen hastalarda, organ koruyucu özelliklerinin yanı sıra iyi tolere edilebilir bir tedavi seçeneği oluşturduğu bildirilmektedir (224-227). Ciddi sepsisli olguların değerlendirildiği bir meta-analizde; AT-III ile tedavi edilen hastalarda, 30 günlük izlem sırasında saptanan mortalitenin %22.9 oranında azaldığı bildirilmiştir (223).



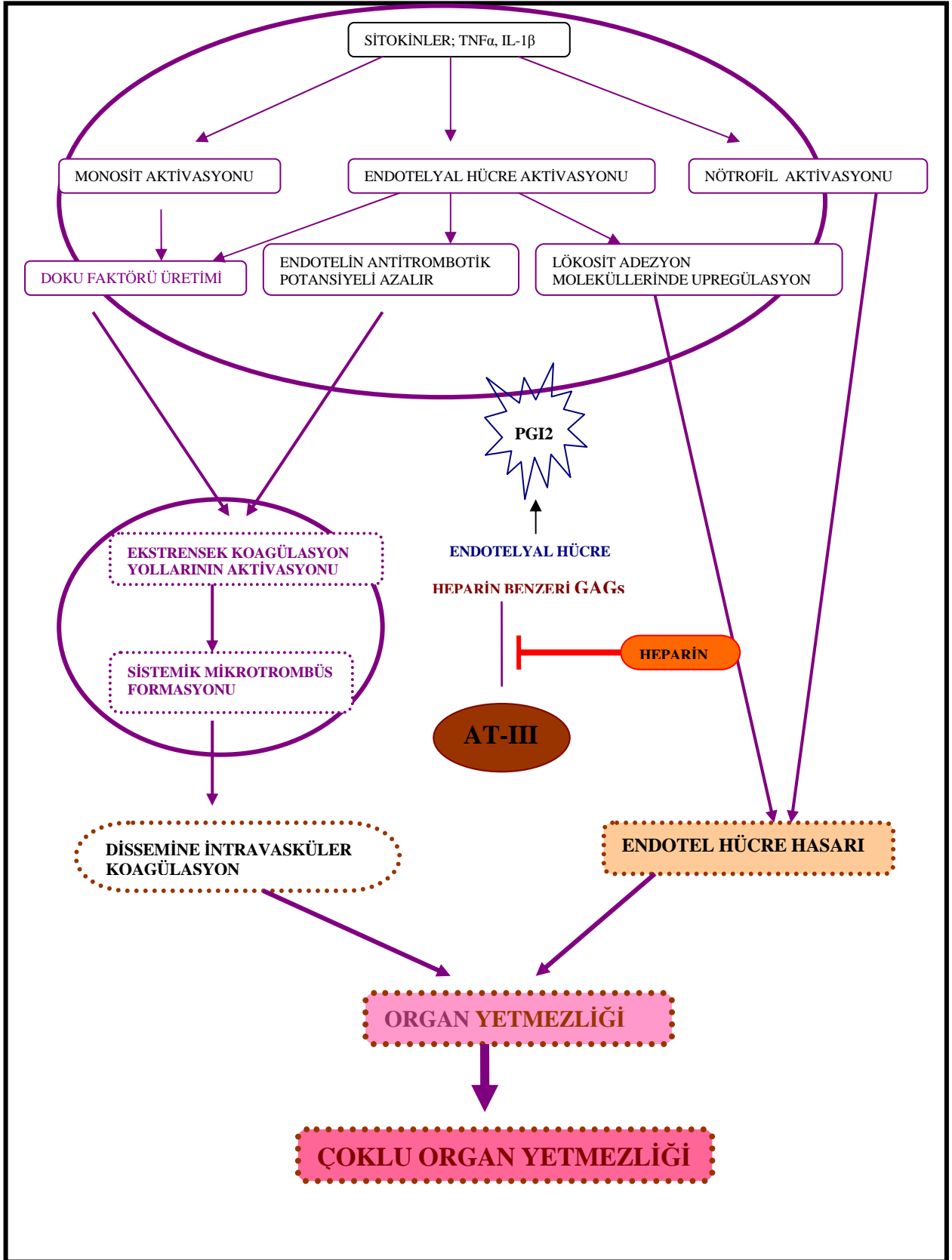
Endotel hasarı sırasında oluşan trombinin vasküler düz kas hücresinde mitojen özellikle olduğu konusunda bulgular mevcuttur. Alfa trombin ile yapılan bir çalışmada alfa trombinin arteriyel düz kas hücresinde konsantrasyona bağlı olarak DNA sentezini arttırdığı ve hücre proliferasyonuna neden olduğu tespit edilmiş ve AT-III'ün, alfa trombinin trombine bağlı DNA sentezini inhibe ettiği belirtilmektedir. AT-III'ün vasküler düz kas hücresi üzerindeki proliferatif etkiyi indirekt yoldan bloke ettiği düşünülmektedir. İmmünolojik hasarda endotel hasarına sekonder prokoagülan aktivitenin varlığının belirlenmesinin ardından AT-III'ün trombin ve düz kas proliferasyonundaki inhibisyon gücünün anlaşılması, dikkatleri rejeksiyon olgusundaki koagülasyon faktörlerinin değerlendirmesine yöneltmiştir. Fonksiyonel kaybı olan allogreftlerde vasküler AT-III'ün kaybı ve fibrin birikimi tespit edilmiştir. Yapılan deneysel bir çalışmada; AT-III'ün, T hücre aktivasyonunun inhibisyonu, antienflamatuar ve antitrombotik etkileri dikkate alınarak transplantasyonda da terapötik etkinliğinin olabileceği bildirilmiştir (228).



Şekil 9. AT-III'ün endotelial hücre etkileşimleri (AT-III; Antitrombin 3, GAG; Glikozaminoglikan, PGI<sub>2</sub>; Prostasiklin, T; Trombin)



Şekil 10. AT-III'ün endotelial hücre etkileşimlerinde heparinin rolü (AT-III; Antitrombin 3, GAG; Glikozaminoglikan, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Hidrojen peroksit, O<sub>2</sub><sup>-</sup>; Süperoksit, PGI<sub>2</sub>; Prostasiklin, T; Trombin)



Şekil 11. İnhalasyon hasarının önlenmesinde AT-III'ün etkileri (AT-III; Antitrombin 3, GAG; Glikozaminoglikan, IL; İnterlökin, PGI<sub>2</sub>; Prostaglandin, TNF- $\alpha$ ; Tümör Nekroz Faktörü-Alfa)

### II.5.3. ANTİTROMBİN III KONSANTRELERİ

AT-III konsantreleri, heparin-sepharose gel kromotografi yöntemi ile pürifiye edilmiş insan plazmasından yüksek derecede saflaştırılarak izole edilmiştir. Günümüzde ürünlerin tümü virüsten arındırılmak üzere 10 saat boyunca 60 C'lik solüsyonlarda ısıya maruz bırakılmıştır. Konsantreler suda çözünmektedir (Resim 1). Aktiviteleri şişe başına 500-1000 I.Ü'dir. Şişelerde belirtilen aktivite  $\pm 10$  oranında doğru bulunmuştur. Radyal immunodifüzyon ile simultane konsantrasyon ölçümleri aktivite ölçümlerinden %0-9 arasında daha yüksek sonuçlar vermiştir. Bu küçük farklılıklar plazmadan izolasyon sırasında bazı AT-III moleküllerinin bir şekilde değişerek antijenitelerini korudukları halde aktivitelerini kaybetmelerinin bir sonucu olarak kabul edilmektedir. Preparatların saklanma şekli (+2)-(+8) C derecede 3 yıl, oda ısısında ise 1 aydır. %5 dekstroz ya da %0.9 NaCl solüsyonları ile infüzyon çözeltileri hazırlanabilir. Sulandırılmış çözeltiler en geç 12 saat içinde verilmelidir. İnfüzyon hızı 50 I.U/dk olmalıdır.

AT-III insan plazmasında 24-37 mg/dl düzeylerinde bulunmaktadır. Yüksek derecede saflaştırılmış ve plazmaya oranla AT-III konsantrasyonları 150-600 mislidir. Uluslararası standartlara göre 1 ml plazmadaki AT-III miktarı 1 ünite olarak belirlenmiştir. Çeşitli çalışmalarda 1 IU/Kg dozunda verilen AT-III'ün plazma AT-III aktivitesini %1-1,8 oranında arttırdığı bildirilmektedir. AT-III düzeyi normalin yaklaşık % 50'nin altında olan hastalara intravenöz yolla 50 IU/Kg verilmesi ve replasman tedavisinin düzey tayininden sonra, AT-III aktivitesini %100'de tutacak şekilde uygulanması veya yükleme dozunun %60'ının her 24 saatte bir verilerek AT-III aktivitesinin % 80'in üzerine çıkarılması önerilmektedir. Hayvan deneylerinde ise AT-III 250 IU/Kg dozunda kullanılmaktadır. Birçok çalışmada, plazmada AT-III düzeylerinin RIA veya son zamanlarda daha yaygın olarak kullanılan ELISA yöntemi ile ölçüldüğü belirtilmektedir.

## **III. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **III.1. ARAŞTIRMA TİPİ**

Deneysel çalışma protokolu Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Kurulu tarafından etik ve bilimsel yönden onaylandıktan sonra Ulusal Sağlık Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Bakım ve Kullanım Kılavuzu ‘National Institute of Health Guide for the care and use of laboratory animals’ kurallarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Deneyde kullanılan ratlar Başkent Üniversitesi Araştırma Merkezine bağlı Deney Hayvanları Üretim Merkezinden temin edilmiştir.

### **III.2. ARAŞTIRMA YERİ VE ORTAMI**

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada herbiri randomize olarak seçilen, ağırlıkları 300-400 gram arasında değişen, 12 aylık matür, 35 adet Wistar Albino cinsi erkek rat kullanılmıştır. Denekler çalışmaya başlamadan 1 hafta önce üretim merkezinden araştırma merkezine getirilerek sıcaklığı sabit ortamda (22 °C°), 12 saat gündüz, 12 saat gece ortamında tutularak ve standart rat yemi verilerek deneye hazırlandı. Deneyde kullanılacak ratlar 12 saat önce aç bırakılarak sadece su içmelerine izin verildi.

Deney sonrası, denekler normal oda ısısı ve atmosferine bırakılarak standart rat yemi ve su verilerek 48 saat izlendi.

### **III.3. ANESTEZİ**

Deneklere, 48 saat sonra yapılacak sakrifikasyon işlemi öncesi anestezi, 60 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar® Eczacıbaşı Warner-Lambert ilaç sanayi, Levent, İstanbul) ve 10 mg/kg xylazine hidroklorit (Rompun® Bayer , Şişli, İstanbul) aseptik şartlarda intraperitoneal verilmesi ile sağlandı.

### **III.4. DUMAN İNHALASYON MODELİ**

Duman inhalasyon hasarı modeli oluşturmak için 70x20x16 cm boyutlarında, birbiri ile ilişkili 7 bölmeden oluşan, iç hacmi 22.4 lt olan duman odası yapıldı. Ön kısım açılabilir cam

sürgü ile kapatıldı. Kutunun üst kısmına 2 cm yüksekliğinde dumanın hareketine olanak verebilen, bölme yapıldı. Ratların konulduğu bölümlere duman geçişini sağlamak için, her bölümde 2 adet olmak üzere toplam 14 tane havalandırma deliği açıldı. Ratların konulduğu bölmenin bir tarafına duman, diğer tarafına oksijen girişi yapıldı (229,230), (Resim 2).

Duman elde etmek için ham pamuk, silindir şeklinde çelikten yapılmış özel yanma odasında yakıldı. Oluşan duman, yanma odasının üstündeki konik yapıdaki bacadan bir aspiratör yardımı ile toplandı. Aspire edilen duman, deney standartizasyonu ve ısı hasarını önlemek amacıyla, aspiratör ile yanma odası arasına yerleştirilen içi su dolu cam fanustan geçirilerek soğutuldu. Aspiratöre gelen hava, borular ile duman odasına aktarıldı (229,230), (Resim 2). Çalışma sırasında, duman odasındaki gaz profili oranları ve ısı değişimleri monitörize edildi. Gaz profili ve ısı ölçümleri, gaz analiz cihazı (Multi Gas Analyser MGA 23) ile yapıldı (Resim 3). Aspiratörden çıkan havanın hızı  $27,93 \pm 0,5$  m/sn idi ve gruplar arası yapılan ölçümlerde değişme göstermedi.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, deneklerin canlı kalabildiği en uzun duman inhalasyon süresi tespit edildi ve yapılan histopatolojik incelemelerde literatür ile uyumlu inhalasyon hasarının oluştuğu belirlendi (Resim 4,5).



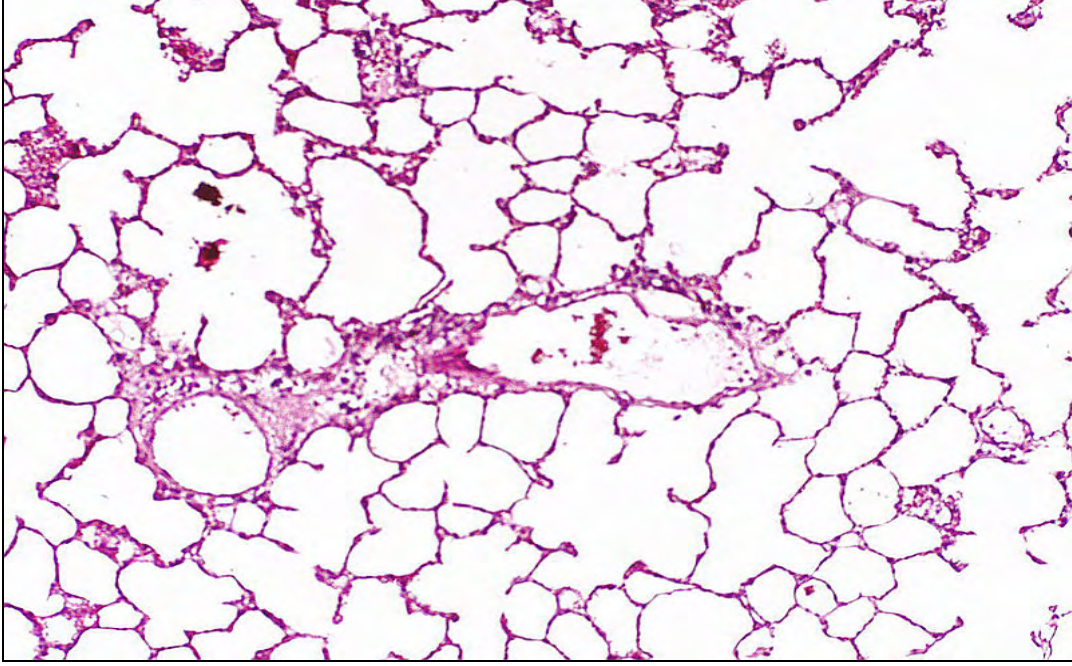
**Resim 1.** AT III konsantreleri (Kybernin P®, 500 IU/flk)



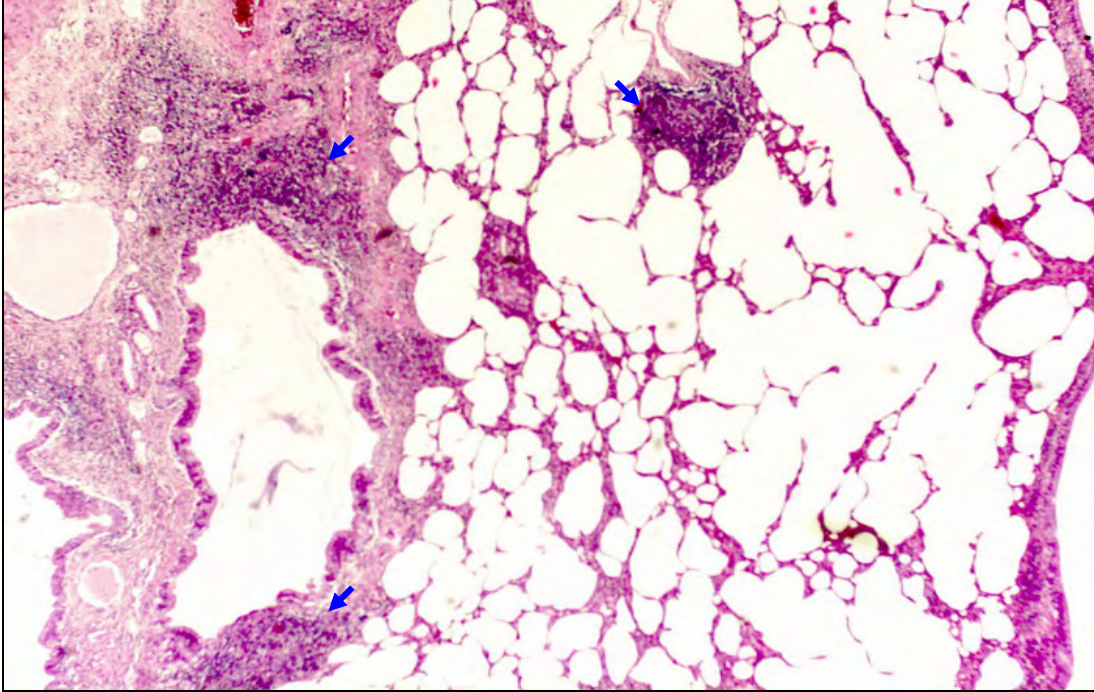
**Resim 2.** Duman inhalasyon hasarı oluşturmak için kullanılan düzenek



**Resim 3.** Gaz analiz cihazı (MultiGasAnalyser MGA 23)



**Resim 4.** Kontrol grubunda normal yapıda alveoller izlenmektedir (H&E x200).



**Resim 5.** Duman inhalasyon grubunda bronş duvarlarında yoğun miks tip iltihabi hücre infiltrasyonu, alveollerde amfizematöz değişiklikler, alveoller arası interstisyel alanda lenfoid agregatlar ve plevrada belirgin kalınlaşma izlenmektedir (H&E x200).



### **III.5. ARAŞTIRMA GRUPLARI**

Bu deneysel çalışma her biri randomize olarak seçilen 35 rat üzerinde yapıldı. Ratlar 3 çalışma grubuna ayrılarak herbir hayvan yer alacağı gruba göre işaretlendi.

#### **Grup 1 (Duman İnhalasyon Grubu, n=15)**

Denekler duman odasına konularak aşağıdaki sıraya göre duman ve oksijen inhalasyonu uygulandı.

- 3 dk duman
- 3 dk 10 lt/dk oksijen
- 4 dk duman
- 4 dk 10 lt/dk oksijen
- 5 dk duman
- 5 dk 10 lt/dk oksijen
- 5 dk duman
- 5 dk 10 lt/dk oksijen
- 5 dk duman
- 5 dk 10 lt/dk oksijen inhalasyonu yaptırıldı.

Duman inhalasyonu sonrası plasebo olarak 2., 24. ve 48. saatlerde intraperitoneal yolla 2 ml % 0,9 NaCl verildi. Terapötik bir ilaç verilmeyen denekler 48 saat sonra sakrifiye edildi.

#### **Grup 2 (Duman İnhalasyonu + AT-III Grubu, n=15)**

Kontrol grubundaki süre ve oranlarda, deneklere duman ve oksijen inhale ettirildi. İnhalasyondan 2, 24 ve 48 saat sonra ratlara 250 IU/kg/gün dozunda (~2 cc) intraperitoneal yolla Antitrombin III (Kybernin P®, Aventis Behring GmbH Marburg/ Almanya, Fama-Tek) verildi (Resim 6).

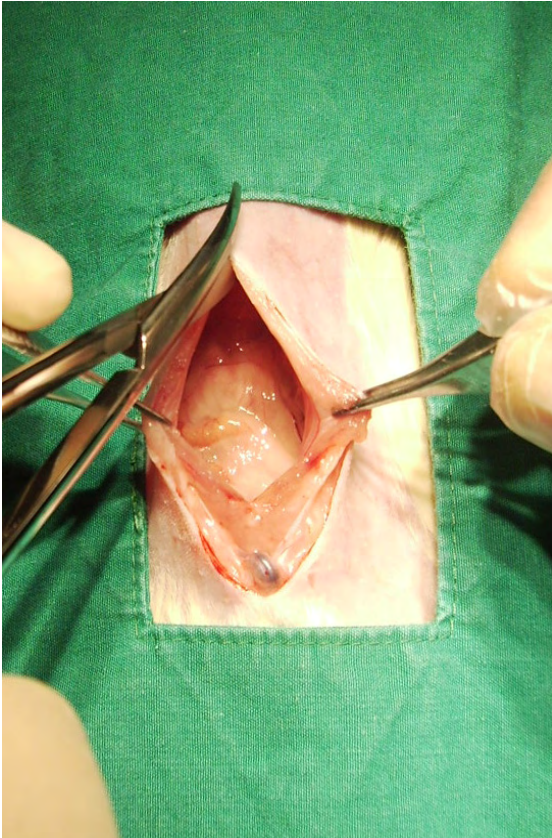
#### **Grup 3 (Kontrol Grubu, n=5)**

Duman ve oksijen verilmeksizin duman odasında 44 dk tutuldu. Plasebo olarak intraperitoneal yolla 2 ml % 0,9 NaCl verildi.

48 saat sonra son ilaç dozunu aldıktan 2 saat sonra deneklere anestezi verilerek karın orta hat insizyonu ile laparotomi yapıldı (Resim 7). Laparotomi esnasında vena kava inferior bulundu ve intraket ile kanülüze edilerek kan örnekleri alındı (Resim 9). Ardından orta hat insizyonu ilerletilerek diyafragma ulaşıldı. Diyafragma insizyon yapıp akciğerlerin kollapsı sağlandı. Orta hattan sternum açılarak torakotomi yapıldı (Resim 8). Bu çalışmada pulmoner vasküler permeabilite analizi için kullanılacak olan Evans Blue metodunda verilen boya sistemik dolaşıma geçtiğinde aynı ratda akciğer dokusunda GSH gibi diğer biyokimyasal parametreler, immünohistokimyasal ve histopatolojik değerlendirmeler yapılamamaktadır. Bu nedenle Evans Blue boyasını elimine edebilmek için; deneklere vena kavadan Evans Blue boyası verilmeden önce sağ akciğer hilusu klemplenerek perfüzyon engellendi. Ardından vena kava inferiorundan 30 mg/kg Evans Blue boyası verildi (Resim 10). Evans Blue vena kavadan tüm sistemik dolaşıma geçtikten sonra rezidüel boyayı elimine etmek amacıyla sol akciğer pulmoner arter yolu ile % 0,9 NaCl SF ile yıkandı. Servikal dislokasyon sonrası rat akciğerleri trakea ile birlikte blok olarak çıkarılarak sakrifiye edildi (Resim 11).



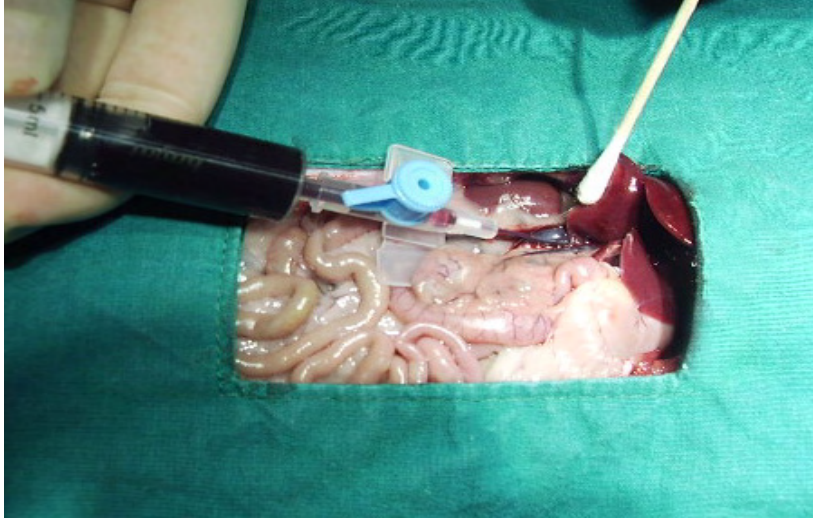
**Resim 6.** Kybernin'in ratlara intraperitoneal yolla verilmesi



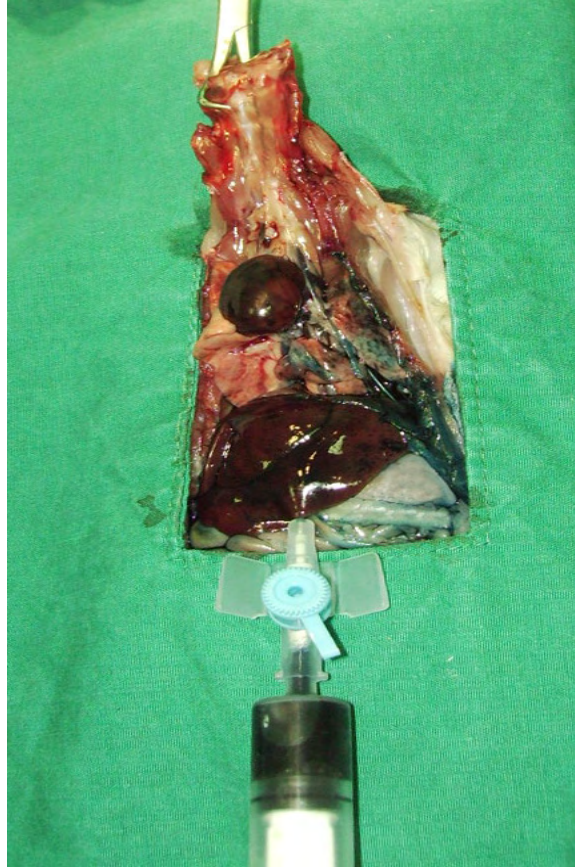
**Resim 7.** Ratlara laparotomi yapılışı



**Resim 8.** Ratlara torakotomi yapılışı



**Resim 9.** Biyokimyasal analizler için vena kavadan kan örneklerinin alınması



**Resim 10.** Vena kavadan evans blue boyasının verilmesi

## III.6. ARAŞTIRMA PARAMETRELERİ

### III.6.1. BİYOKİMYASAL ANALİZ

Vena kavadan kan alımından hemen sonra serumda sitokin çalışması için düz biyokimya tüpüne ve plazmada 6-Keto-prostaglandin F1 $\alpha$  analizleri için ise CBC tüpüne yalaşık 3'er cc kan örnekleri konuldu. 2000 g'de 10 dk santrifüj edilerek serum ve plazma örnekleri elde edildi. Elde edilen serum ve plazma örnekleri ependorf tüpleri içerisine konularak soğuk zincir prensiplerine uygun olarak analiz süresine kadar -80°C' de saklandı.

Tüm deneklerin sağ akciğer üst lobundan alınan doku örnekleri önce +4 °C' de serum fizyolojik ile yıkanıp kurulandıktan sonra ependorf tüpleri içerisine alınarak soğuk zincir prensiplerine uygun olarak analiz süresine kadar -80°C'de saklandı. Tüm biyokimyasal analizler çift çalışma şeklinde gerçekleştirildi.

Evans blue boyası ile boyanmış sol akciğer lobunun tamamı pulmoner mikrovasküler permeabilite analizi yapılmak üzere hemen değerlendirmeye alındı.

#### **Serum TNF- $\alpha$ ve IL- 6 Analizi**

Serum TNF $\alpha$  ve IL-6 düzeyleri ELİSA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay") yöntemi ile ticari kitler kullanılarak analiz edildi (Biosource International Inc.,California, USA; TNF $\alpha$ : KRC3011, IL-6: KRC0061 ve IL-10: KRC0101)

Sitokinlerin analiz prensibi her ikisinde de benzer bir mekanizma ile "solid phase sandwich ELISA" yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu yöntemde, sıçan TNF $\alpha$  ve IL-6'ya karşı oluşturulmuş spesifik antikor ile kaplanmış 'microtiter' plaklara örnek, standard ve kontrol serumlarının pipetlenmesi sonrasında biotin ile işaretlenmiş ikinci bir antikor reaksiyon ortamına eklendi. Böylece ilk inkübasyon sırasında örneklerde ölçülmek istenen sitokin (antijen) farklı iki bağlanma bölgesinden iki antikor ile bağlanmış olmaktadır. Ortamdaki ikinci antikorun fazla miktarının uzaklaştırılması sonrasında, Streptavidin-Peroksidaz enziminin eklenmesi ile biotin ile işaretli Ab'a bağlanması sonucu dörtlü 'sandwich' kompleksi oluşturuldu (mikroplaktaki immobil Ab-serumda aranan sitokin-biotin ile işaretli Ab-Enzim). İkinci bir inkübasyonu izleyerek bağlanmamış fazla enzim ortamdan uzaklaştırılıp bir substrat solüsyonu eklenerek, enzimatik reaksiyonla oluşan ürünün absorbansı 450nm'de 'microplate reader' kullanılarak ölçüldü (Bio-Tek Instruments, INC. ELX 800, USA). Sıçan örneklerindeki derişimler; 'four parameter curve fit' metodu kullanılarak, absorbanslar y-ekseninde derişimler

x-ekseninde olacak şekilde çizilen kalibrasyon grafiğinden hesaplandı. TNF- $\alpha$  ve IL-6 serum derişimleri pg/ml şeklinde ifade edildi.

TNF- $\alpha$  için analitik sensitivite 4 pg/ml, linearite 1000 pg/ml olarak belirtilmektedir. Analiz içi tekrarlanabilirlik ('intra-assay precision') % CV, % 2,6-2,7; analizler arası tekrarlanabilirlik ('inter-assay precision') % CV, % 3,5-4,3 olarak bulunmuştur.

IL-6 için analitik sensitivite 8 pg/ml, linearite 2000 pg/ml olarak belirtilmektedir. Analiz içi tekrarlanabilirlik ('intra-assay precision') % CV, % 3,7-4,9; analizler arası tekrarlanabilirlik ('inter-assay precision') % CV, % 5,9-9,9 olarak bulunmuştur.

### **Plazma 6-keto Prostaglandin F<sub>1 $\alpha$</sub> (6-keto PGF<sub>1 $\alpha$</sub> ) Analizi**

EDTA'lı kan örnekleri 2000g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra ayrılan plazmalar analiz edilinceye kadar iki hafta -80°C'de saklandı. Plazma örnekleri farklı iki dilüsyonda Enzim Immunoassay (EIA) yöntemi ile (Cayman Chemical Company, Catalog No: 515211, USA) çalışıldı. Bu yöntem 6-keto PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  ve 6-keto PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  –asetilkolinesteraz (AChE) konjugatının 6-keto PGF<sub>1 $\alpha$</sub> 'ya spesifik tavşan antiserum bağlama bölgesi için yarışması esasına dayanmaktadır. Oluşan antijen-antikor kompleksi EIA plak kuyucuklarına kaplanmış olan ikinci bir antikora, fare monoklonal anti-rabbit Ig G antikoru ile, bağlanır. Bağlanmamış fazla reaktifin yıkama ile uzaklaştırılması sonrası AChE'nin substratını içeren Ellman reaktifi ile oluşturulan enzimatik reaksiyon sonucu oluşan sarı rengin şiddeti fotometrik olarak 'microplate reader'ullanılarak ölçülür (Bio-Tek Instruments, INC. ELX 800, USA). Ölçülen rengin şiddeti plazma örneğindeki 6-keto PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  derişimi ile ters orantılıdır. Sıçan örneklerindeki derişimler 'four parameter logistic' metodu kullanılarak %B/B<sub>0</sub> y-ekseninde, derişimler x-ekseninde olacak şekilde çizilen kalibrasyon grafiğinden hesaplandı. Sonuçlar pg/ml olarak ifade edildi. % 20-80 arasında elde edilen % B/B<sub>0</sub> sonuçları kabul edilebilir ölçüm aralığı olarak alındı. Yöntemin analitik sensitivitesi 11pg/ml olarak belirtilmektedir.

### **Doku GSH Analizi**

Doku örneklerinde redükte glutatyon (GSH) analizleri için akciğer doku homojenatları soğukta 0,15 M KCl içinde (%10, w/v) cam homojenizatör kullanılarak hazırlandı. Doku homojenatlarında redükte glutatyon (GSH) düzeyleri Ellman tarafından tanımlanan sülfidril grup analizi prensibine göre tayin edildi (232). Bu yöntemde örneklerin deproteinizasyonu sonrasında Ellman'ın renk reaktifi (%40 DTNB, w/v %1 sodyum sitrat içinde) ile

supernatantların reaksiyonu sonucu oluşan renkli kompleksin absorbanası 412 nm'de reaktif körü'ne karşı spektrofotometrik olarak hemen ölçüldü. GSH derişimleri GSH kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplandı . Sonuçlar nmol GSH/mg protein olarak ifade edildi.

Doku homojenatlarında protein analizi Lowry ve arkadaşlarının yöntemine göre gerçekleştirildi (233). Bu yöntem proteinlerdeki peptid bağlarının alkali ortamda  $Cu^{+}$  oluşturmak üzere  $Cu^{++}$  ile reaksiyona girmesi prensibine dayanmaktadır. Oluşan kupröz iyonlar ( $Cu^{+}$ ) Folin reaktifi ile reaksiyona girerek fosfomolibdotungstatı bakır katalizli aromatik amino asit oksidasyonu yolu ile heteromolibden mavisine indirgemektedir. Reaksiyon sonrası oluşan renkli kompleksin absorbanası 550 nm'de reaktif körü'ne karşı spektrofotometrik olarak ölçüldü. Protein derişimleri standard kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar mg/ml olarak ifade edildi.

### **Pulmoner Mikrovasküler Permeabilite Analizi (Evans Blue Yöntemi)**

Evans blue uygulaması ve % 0,9 NaCl SF ile perfüzyon sonrası sağ akciğer lobu çıkartıldı. % 0,9 NaCl SF ile yıkama sonrası tartıldı ve 90°C'de 24 saat ısıtma sonrası 2 ml formamid içinde 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Formamid ekstraksiyonu sonrası elde edilen eluentin boya derişimi 620 nm'de spektrofotometrik ölçüm (Shimadzu uv-1600) sonrası hesaplandı. Evans blue standardı kullanılarak yapılan ölçüme göre 1 µg boya absorbanası 0.068 olarak bulundu. Buna göre akciğerlerden ekstrakte edilen Evans blue boya derişimi hesaplanarak sonuçlar µg EB boyası/g yaş ağırlık şeklinde ifade edildi (77,234).

### **III.6.2. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME**

Yapılacak histopatolojik değerlendirme için tüm ratlardan, akciğerlerin aynı bölgelerinden kesitler alındı. Formolin ile 24 saat tespit edilmiş olan akciğer spesimenleri örneklenmiş ve parafine gömülerek her bir parafin örnekten Hemotoksilen & Eozin boyaları için 4 µ, immünohistokimyasal boyalar için 3 µ kalınlığında kesitler alınmıştır. Akciğer spesimenlerinin rutin işlem sonrasında hazırlanan Hemotoksilen & Eozin kesitlerinde bronşitis, talenjiyektazi, atelektazi, amfizem, bronkopnömoni, interalveolar septal konjesyon, intralveolar hemoraji ile lökosit ve lenfosit hücre infiltrasyon durumu araştırıldı. Bütün patoloji preparatları aynı patolog tarafından değerlendirildi.

Akciğerde meydana gelen patolojik değişiklikler 4 skor şeklinde sınıflandırılmıştır. Skorlama aşağıdaki gibidir;

- (0) = Hasar yok
- (1) = Az hasar veya histolojik değişiklikler
- (2) = Orta derecede hasar veya histolojik değişiklikler
- (3) = İleri derecede hasar veya histolojik değişiklikler

### **İmmünohistokimyasal Değerlendirme**

Parafin bloklardan hazırlanan 3 µ incelikteki kesitler, poly-L-lysin ile kaplanmış lamlara alındıktan sonra 56 C°' lik etüvde 14 saat, sonrasında sırasıyla ksilen ve alkolde 30'ar dakika bekletilmiştir. Çeşme suyunda yıkanan lamlar, Citrat Buffer Solüsyonu'na (ph= 6,0) alınmıştır. Orta ısıda 20 dakika kaynatılıp, 20 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Daha sonra avidin-biotin kompleks metod kullanılarak kesitler İNOS ( İNOS Rabbit polyclonal antibody RB-9242-R7) dilüe edilmeden kullanıma hazır formda, MPO (Myeloperoxidase DAKO polyclonal rabbit A 0398) 1:300 dilisyonla ve TNFα (TNFα monoclonal mouse antibody, Histopathology Ltd., H-7608) 1:75 dilisyonla primer antikorda 2 saat oda ısısında inkübe edildi. Son olarak da kromojen 3,3 – diamino - benzidine – tetrahydrochloryde ile reaksiyon görünür hale getirildi.

İnteralveolar septumdaki inflamatuvar hücreler, respiratuvar epitel ve endotel hücrelerde meydana gelen patolojik değişiklikler 4 skor şeklinde sınıflandırılmıştır. Boyanma yüzdelere göre skorlama aşağıdaki gibidir;

- (0) = Boyanma yok
- (1) = < %20 Boyanma
- (2) = %20-40 Boyanma
- (3) = > %40 Boyanma

### **Apopitozisin Değerlendirilmesi (TUNNEL Yöntemi)**

DNA fragmanları ticari bir kit (ApopTag, Intergen, NY, US) ile terminal TdT ilişkili dUTP-biotin ile etiketlenerek (TUNEL) ölmek üzere olan DNA bölgesi varlığı saptandı. Parafin bloklardan hazırlanan 3 µ incelikteki kesitler parafinizasyon kaldırıldıktan sonra PBS solusyonu ile 5 dakika yıkama sonrası 'Proteinase K' solusyonu ile oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Ardından distile su ile 2 kez 2 dakika durulandı. Slaytlar % 3.0 hidrojen peroksit ile oda sıcaklığında 5 dakika alevden geçirildi ve 5 dakika 2 kez PBS ile durulandı. Ardından oda sıcaklığında 10 saniye dengeli çözeltiye tatbik edildi. TdT enzimi (33ul) işaretli tampon solusyonu (77ul) ile karıştırıldı. Fazla sıvı atıldı ve işaretli belirteç (20 µl/sample) eklendi.



Slaytlar nemli tüp içinde 37°C sıcaklıkta 1 saat bekletildi ve engelleyici solüsyonlar oda sıcaklığında 10 dakika slaytlara tatbik edildi. Ardından 'anti-Diogoxigenin' konjugatı slaytlar üzerine eklendi ve nemli tüp içinde oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Daha sonra PBS ile 2 dakika 4 kez yıkandı. Slaytlara 'DAB peroxidase' eklendi ve boya oda sıcaklığında 5-6 dakika bekletildi. Optimal boyama için reaksiyon mikroskop altında monitörize edildi. Boya tuttuktan sonra slaytlar 3 kez distile su ile yıkandı. Her bir değerlendirme için 100 hücre sayıldı ve boyama pozitif hücrelerin total hücre sayısına oranı (TUNNEL indeksi) hesaplanarak apoptozis yüzdeleri hesaplandı.

### **III.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Çalışmanın verileri SPSS 12 paket programı (Statistical Software for Social Sciences, version 12.0) kullanılarak analiz edildi. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata (Ortalama $\pm$ SEM) hesaplanarak ifade edildi. Örneklem grubunun 30'dan küçük olduğu dikkate alınarak istatistiksel analizler non-parametrik testlerden Kruscal-Wallis ve Mann-Whitney U yöntemleri kullanılarak analiz edildi. Analizlerde parametrelerin ortalamaları arasındaki anlamlılık için Kruscal-Wallis testi kullanıldı ve 0,05'den küçük olan p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Kruscal-Wallis testi istatistiksel olarak anlamlı bulunan parametrelerde 2 grup arasındaki anlamlılık Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi ve Bonferonni düzeltmesi doğrultusunda 0,017'den küçük olan p değerleri anlamlı olarak kabul edildi. Kesikli veriler ki-kare yöntemiyle analiz edilmiş olup 0,05'den küçük değerler anlamlı olarak kabul edildi.

## IV. BULGULAR

Bu deneysel çalışma her biri randomize olarak seçilen 35 rat üzerinde yapıldı. Ratlar 3 çalışma grubuna ayrılarak her bir hayvan yer alacağı gruba göre işaretlendi. Gruplar; duman inhalasyon grubu, (Grup 1; n=15), duman inhalasyon + AT-III grubu (Grup 2; n=15) ve kontrol grubu (Grup 3; n=5) olarak belirlendi. Duman inhalasyon (Grup 1) grubundan 2 adet, duman inhalasyon + AT-III (Grup 2) grubundan 1 adet denek, CO intoksikasyonuna bağlı olarak duman inhalasyonu sonrası erken dönemde kaybedildi. Geriye kalan duman inhalasyon (Grup 1) grubundan 13 adet, duman inhalasyon + AT-III (Grup 2) grubundan 14 adet rat deney süresi olan 48 saat boyunca yaşatıldı ve çalışmaya alındı. 48 saat sonra kurban edilen ratların kan ve akciğer doku örnekleri alınarak yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. Yapmış olduğumuz istatistiksel analizlerde tüm parametreler her bir grup için ayrı ayrı değerlendirildi ve çalışma aralığı dışında kalan değerler ile doku örneklerinin yetersiz olması nedeniyle değerlendirmeyen veriler çalışma dışı bırakıldı. Her bir grup için değerlendirilmeye alınan denek sayıları ilgili grafiklerde gösterilmektedir.

### IV.1. GAZ ANALİZİ VE ISI TAKİBİ

Duman inhalasyonu sırasında, duman odasındaki gaz ölçümleri ve ısı takibi gaz analiz cihazı (MultiGasAnalyser MGA 23) ile yapıldı.

#### **Kontrol grubunda duman odasındaki gaz oranları**

O<sub>2</sub>: %20,9

CO oranları: 0 ppm

NO oranları: 0 ppm

SO<sub>2</sub> oranları: 0 ppm olarak saptandı.

#### **Duman inhalasyonu sırasında duman odasındaki gaz ölçümleri (Şekil 12)**

##### Duman infüzyonu sırasında

CO oranları: 3500 - 4520 ppm

NO oranları: 11 - 22 ppm

SO<sub>2</sub> oranları: 41-97 ppm

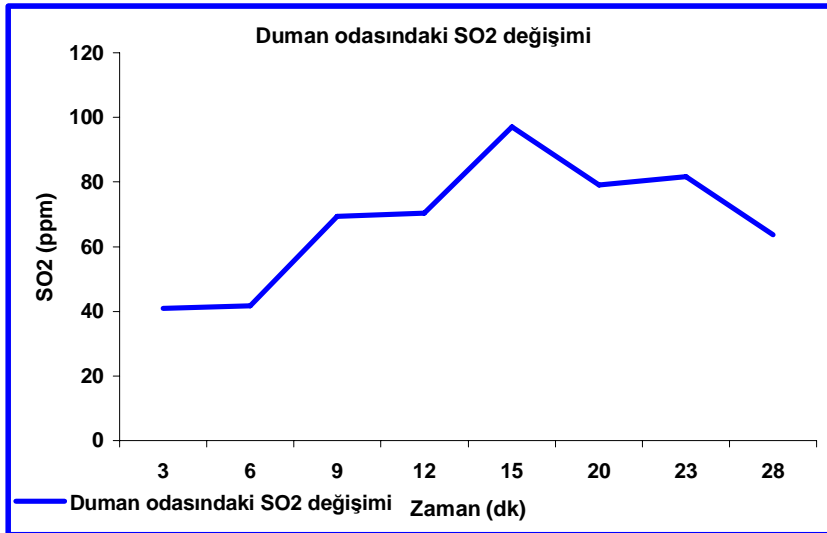
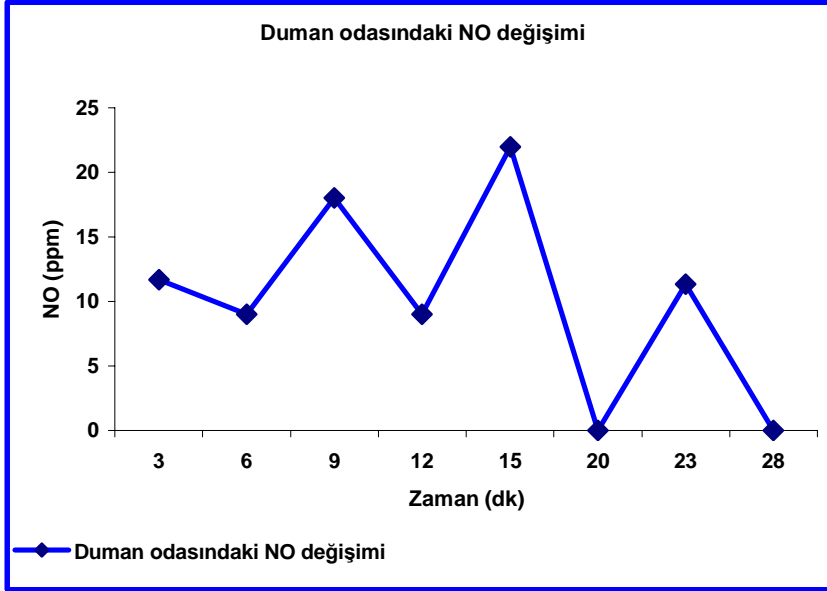
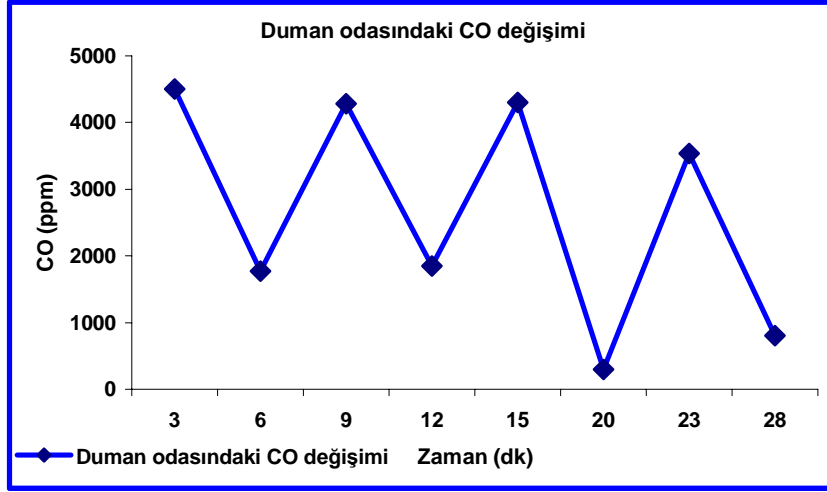
##### Oksijen infüzyonu sırasında

299 - 1797 ppm

0 -9 ppm

42-79 ppm

Duman inhalasyonu sırasında, duman odasındaki O<sub>2</sub> oranı %18,1'in altına inmedi. Isı ölçümlerinde, laboratuvarın ısısı 18°C idi, duman odasının ısısı 20±1°C arasında değişti.



şekil 12. Duman inhalasyonu sırasında duman odasındaki gaz ölçümleri

## IV.2. BİYOKİMYASAL SONUÇLAR

### Plazma 6 -keto prostaglandin F1 $\alpha$ analizi

Plazma 6-keto prostaglandin F1 $\alpha$  düzeyleri için Kruskal-Wallis testi ile yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptandı (p=0,046). Mann-Whitney U testi ile yapılan gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalarda Bonferroni düzeltmesine göre p<0,017 değerleri anlamlı olarak kabul edildi. Buna göre; 1. ve 2. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanırken (p=0,010), 1. ve 3. grup arasında (p=0,797) ve 2. ve 3. grup arasında (p=0,206) istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmadı (Tablo 1). Plazma 6-keto prostaglandin F1 $\alpha$  değerlerinin gruplara göre dağılımı şekil 13’de gösterilmektedir.

### Serum TNF- $\alpha$ ve IL- 6 analizi

Serum TNF- $\alpha$  düzeyleri için Kruskal-Wallis testi ile yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptandı (p=0,008). Mann-Whitney U testi ile yapılan gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalarda; 1. ve 2. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanırken (p=0,004), 1. ve 3. grup arasında (p=0,354) ve 2. ve 3. grup arasında (p=0,028) istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmadı (Tablo 1). Serum TNF- $\alpha$  değerlerinin gruplara göre dağılımı şekil 14’de gösterilmektedir.

Serum IL-6 düzeyleri için Kruskal-Wallis testi ile yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptandı (p=0,045). Mann-Whitney U testi ile yapılan gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalarda; 1. ve 2. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanırken (p=0,004), 1. ve 3. grup arasında (p=0,354) ve 2. ve 3. grup arasında (p=0,028) istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmadı (Tablo 1). Serum IL-6 değerlerinin gruplara göre dağılımı şekil 15’de gösterilmektedir.

### Doku GSH analizi

Doku GSH düzeyleri için Kruskal-Wallis testi ile yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptandı (p=0,013). Mann-Whitney U testi ile yapılan gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalarda ise Bonferroni düzeltmesi dikkate alındığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmadı (p>0,017), (Tablo 2). Doku GSH değerlerinin gruplara göre dağılımı şekil 16’da gösterilmektedir.

### **Pulmoner mikrovasküler permeabilite analizi**

Yapmış olduğumuz bu çalışmada duman inhalasyonu sonrası pulmoner vasküler permeabilite değişiklikleri Evans Blue metodu kullanılarak değerlendirildi. Pulmoner mikrovasküler permeabilite analizinden elde edilen değerlerin gruplara göre dağılımı şekil 17’de gösterilmektedir.

Pulmoner mikrovasküler permeabilite analizinden elde edilen değerler için Kruskal-Wallis testi ile yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptandı ( $p=0,000$ ). Mann-Whitney U testi ile yapılan gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalarda; 1. ve 2. grup arasında ( $p=0,000$ ) ve 1. ve 3. grup arasında ( $p=0,014$ ) istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı. 2. ve 3. grup arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmadı ( $p=0,075$ ), (Tablo 2).

**Tablo 1.** Plazma 6 Keto PG-F1 $\alpha$ , serum TNF- $\alpha$  ve IL-6 parametrelerinin değerlendirilmesi. Her bir parametre için elde edilen değerlerin her bir grup için aritmetik ortalamaları, standart hataları ve ortalamalar arasındaki farkın anlamlılık durumları gösterilmiştir (Grup 1; Duman inhalasyon grubu, Grup 2; Duman inhalasyonu + AT-III grubu, Grup 3; Kontrol grubu).

\* Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi sonuçları (p<0,017 değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.)

\*\* Kruskal-Wallis testi sonuçları

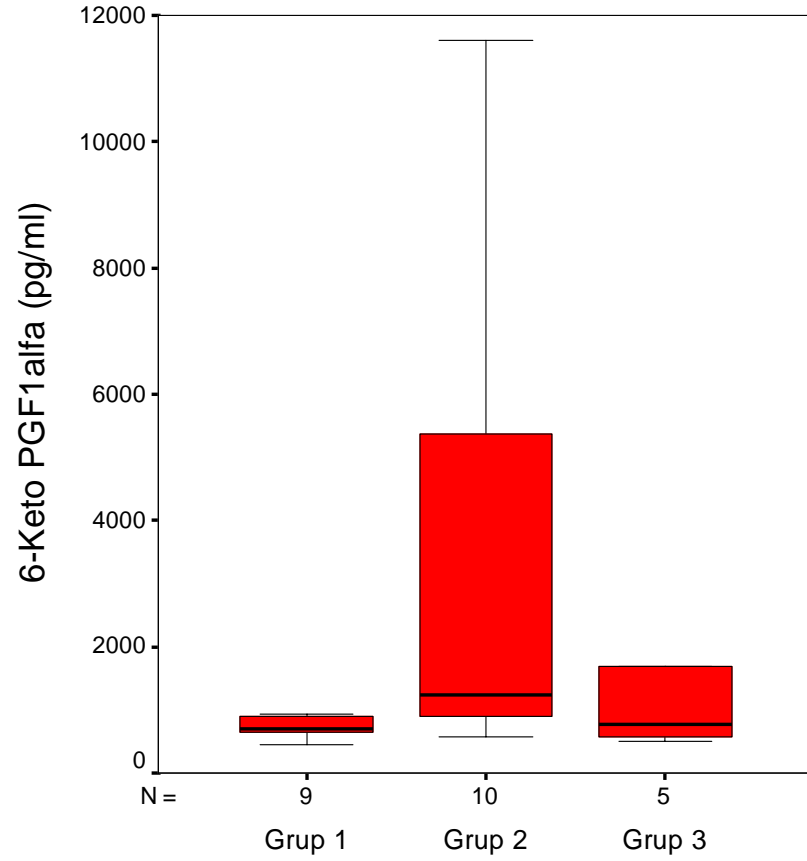
Karşılaştırılan gruplar	6 Keto PG-F1 $\alpha$			TNF- $\alpha$			IL-6		
	X $\pm$ SEM	Önemlilik Durumu		X $\pm$ SEM	Önemlilik Durumu		X $\pm$ SEM	Önemlilik Durumu	
		MWU*	KW**		MWU*	KW**		MWU*	KW**
Grup 1	744,10 $\pm$ 54,83	p=0,010	p=0,046	46,91 $\pm$ 7,79	P=0,004	p=0,008	382,11 $\pm$ 63,22	p=0,004	p=0,045
Grup 2	3322,58 $\pm$ 1184,02			20,42 $\pm$ 4,08			200,10 $\pm$ 33,92		
Grup 1	744,10 $\pm$ 54,83	p=0,797		46,91 $\pm$ 7,79	P=0,354		382,11 $\pm$ 63,22	p=0,354	
Grup 3	1609,81 $\pm$ 755,37			35,65 $\pm$ 3,68			220,99 $\pm$ 37,71		
Grup 2	3322,58 $\pm$ 1184,02	p=0,206		20,42 $\pm$ 4,08	P=0,028		200,10 $\pm$ 33,92	p=0,028	
Grup 3	1609,81 $\pm$ 755,37			35,65 $\pm$ 3,68			220,99 $\pm$ 37,71		

**Tablo 2.** Akciğer dokusunda GSH aktiviteleri, pulmoner mikrovasküler permeabilite ve alveoler apoptozisin değerlendirilmesi. Her bir parametre için elde edilen değerlerin her bir grup için aritmetik ortalamaları, standart hataları ve ortalamalar arasındaki farkın anlamlılık durumları gösterilmiştir (Grup 1; Duman inhalasyon grubu, Grup 2; Duman inhalasyonu + AT-III grubu, Grup 3; Kontrol grubu).

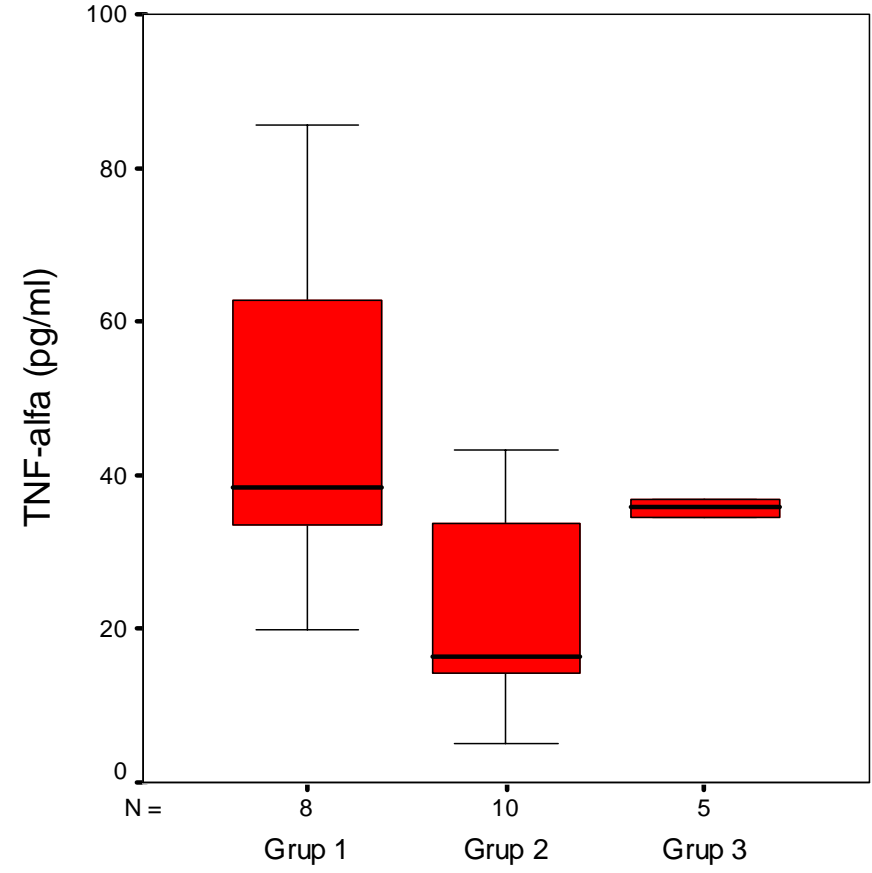
\* Bonferonni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi sonuçları ( $p < 0,017$  değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.)

\*\* Kruskal-Wallis testi sonuçları

Karşıtılan gruplar	GSH			Permeabilite			Alveoler Apoptozis		
	X±SEM	Önemlilik Durumu		X±SEM	Önemlilik Durumu		X±SEM	Önemlilik Durumu	
		MWU*	KW**		MWU*	KW**		MWU*	KW**
Grup 1	10,82±0,77	p=0,022	p=0,013	1284,80±241,42	p=0,000	p=0,000	10,92±2,35	p=0,002	p=0,003
Grup 2	8,39±0,42			203,28±37,73			2,77±0,533		
Grup 1	10,82±0,77	p=0,019		1284,80±241,42	p=0,014		10,92±2,35	p=0,550	
Grup 3	7,26±0,31			337,15±71,92			7±1,22		
Grup 2	8,39±0,42	p=0,130		203,28±37,73	p=0,075		2,77±0,533	p=0,01	
Grup 3	7,26±0,31			337,15±71,92			7±1,22		

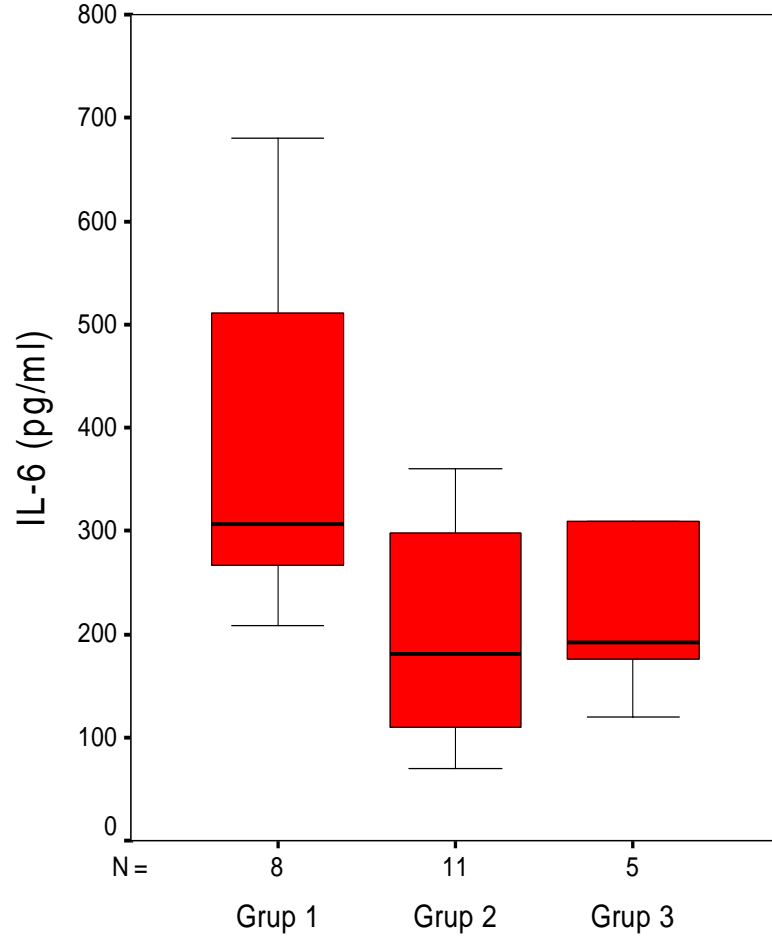


**Şekil 13.** Plazma 6 keto PGF1 $\alpha$  derişimlerinin (pg/ml) gruplara göre dağılım grafiği (Grup 1: Duman inhalasyon grubu, Grup 2: Duman inhalasyonu + AT-III grubu, Grup 3: Kontrol grubu)

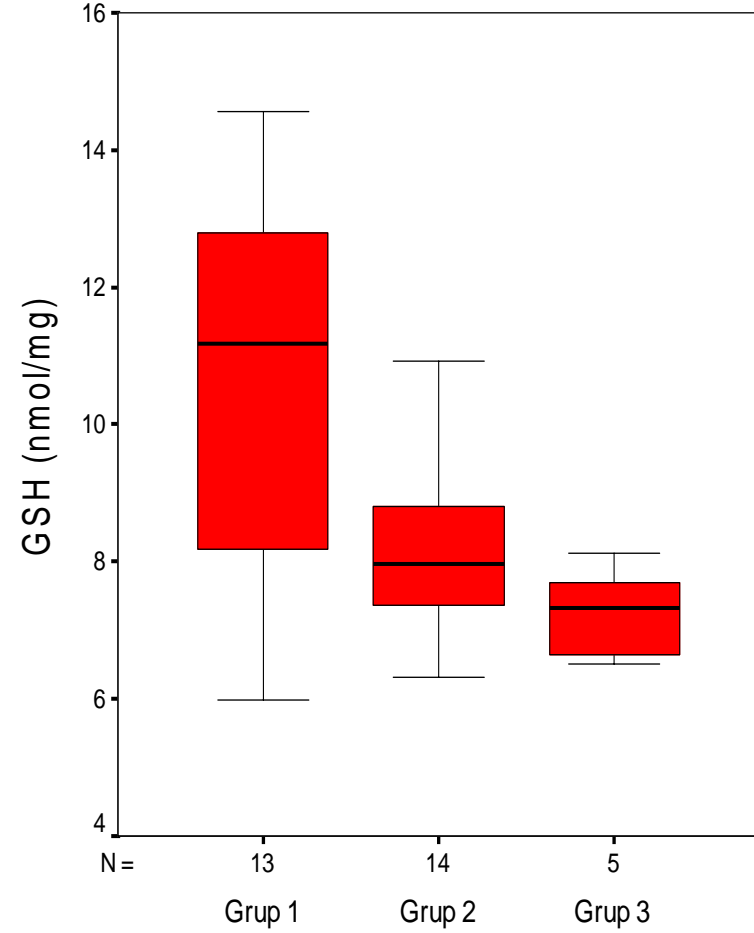


**Şekil 14.** Serum TNF- $\alpha$  derişimlerinin (pg/ml) gruplara göre dağılım grafiği (Grup 1: Duman inhalasyon grubu, Grup 2: Duman inhalasyonu + AT-III grubu, Grup 3: Kontrol grubu)

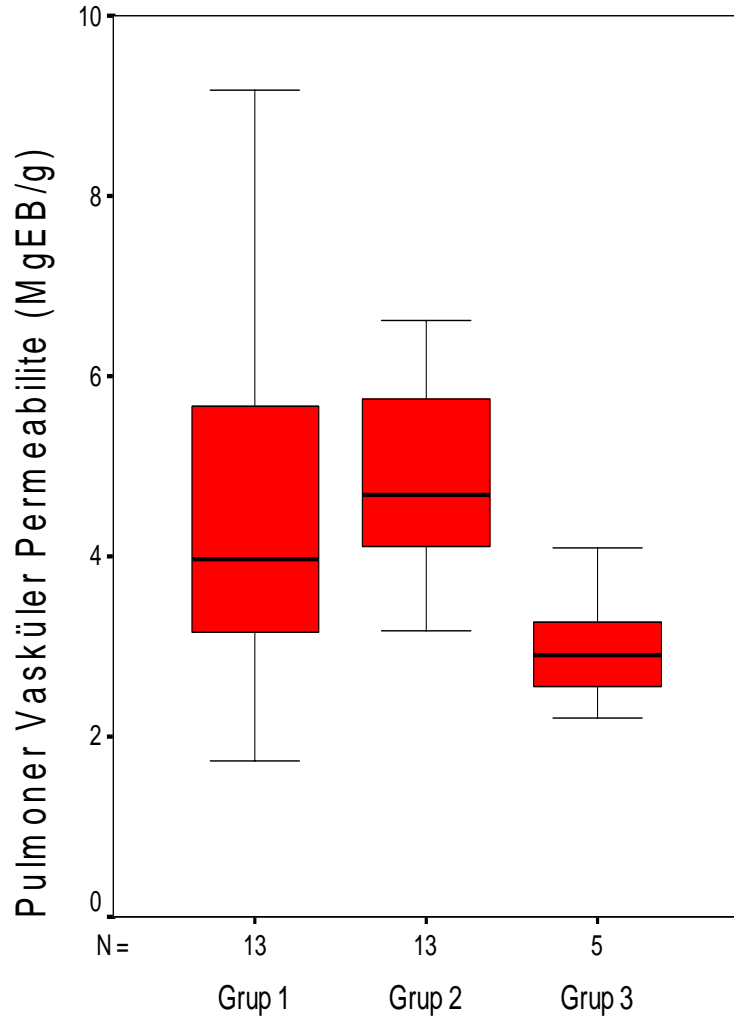




**Şekil 15.** Serum IL-6 derişimlerinin (pg/ml) gruplara göre dağılım grafiği (Grup 1: Duman inhalasyon grubu, Grup 2: Duman inhalasyonu + AT-III grubu, Grup 3: Kontrol grubu)



**Şekil 16.** Doku GSH derişimlerinin (nmol/mg) gruplara göre dağılım grafiği (Grup 1: Duman inhalasyon grubu, Grup 2: Duman inhalasyonu + AT-III grubu, Grup 3: Kontrol grubu)



**Şekil 17.** Evans blue boyası derişimlerinin ( $\mu\text{gEB}$  boyası/g doku) gruplara göre dağılım grafiği (Grup 1: Duman inhalasyon grubu, Grup 2: Duman inhalasyonu + AT-III grubu, Grup 3: Kontrol grubu)

### IV.3. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Akciğer dokusunun ışık mikroskobunda histopatolojik incelemelerinde; lökosit ve lenfosit hücre infiltrasyonu ile alveolar kollaps, intraalveolar septal kanama, intraalveolar septal konjesyon, amfizem ve telanjiektazi durumları değerlendirildi (Resim 11-14).

Akciğer dokusunda değerlendirilen histopatolojik parametrelerin her biri histolojik hasarlanma skoruna göre değerlendirildi. Skorlar;

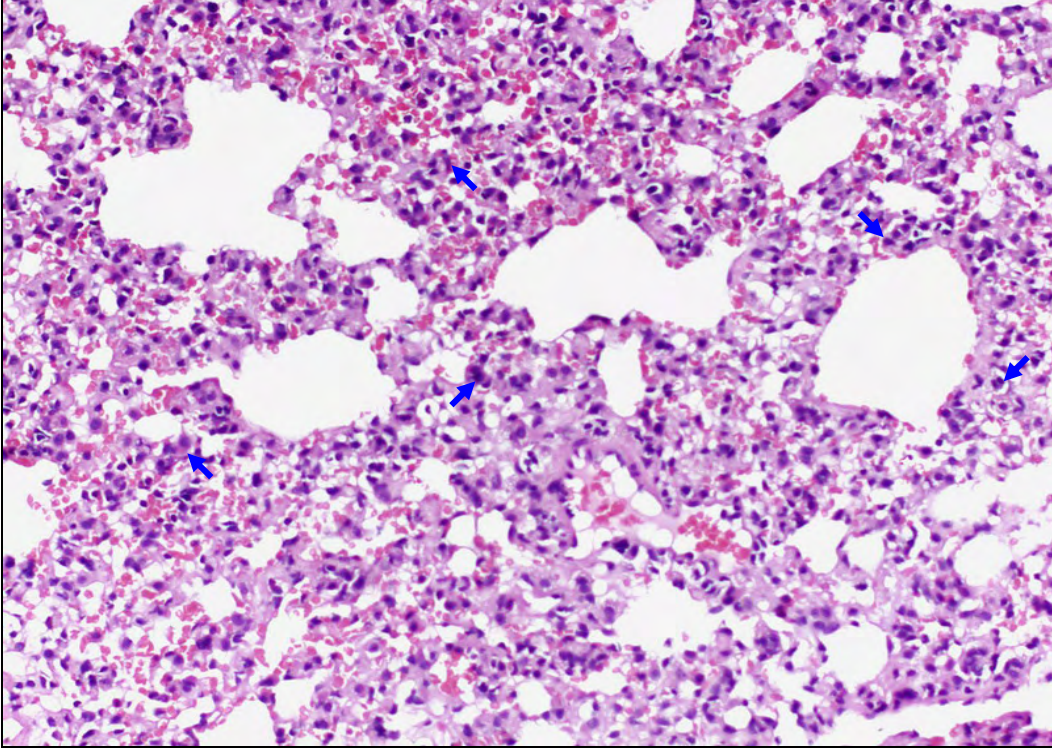
0 : Hasar yok

1 : Az hasar veya histolojik değişiklik

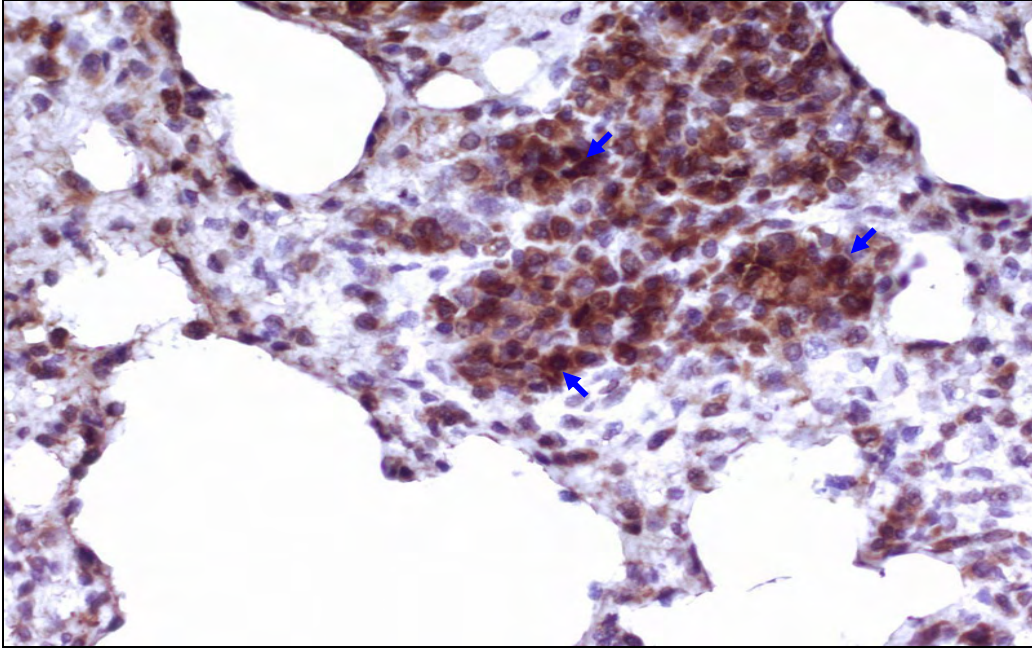
2 : Orta derecede hasar veya histolojik değişiklik

3 : İleri derecede hasar veya histolojik değişiklik

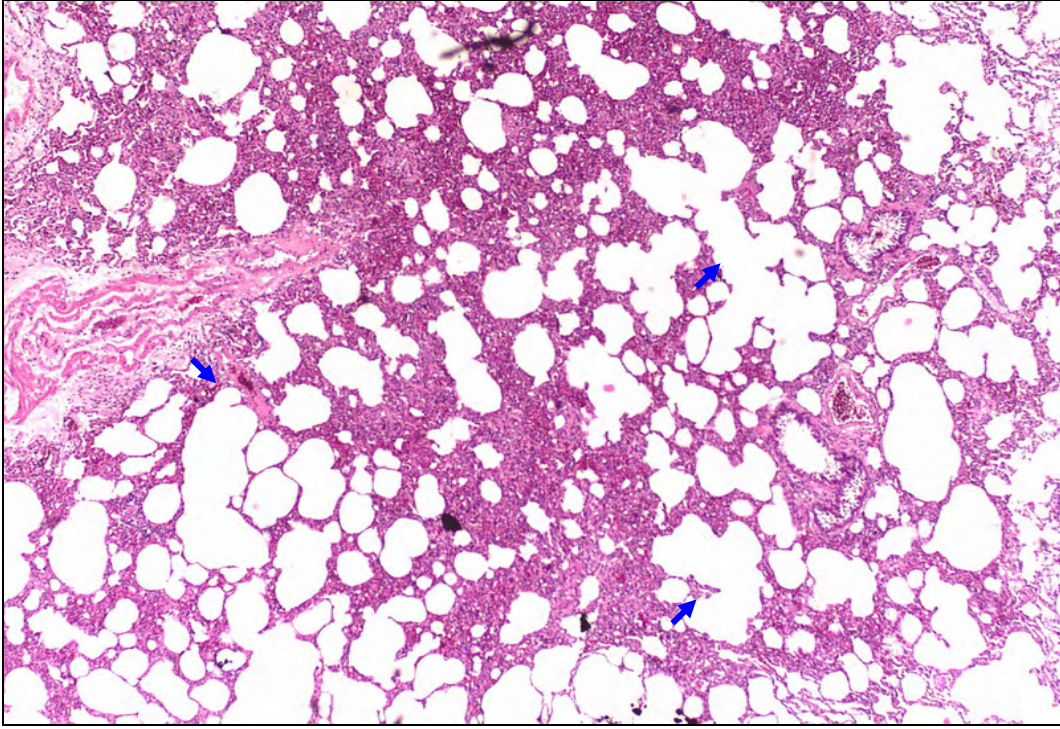
Tüm histopatolojik parametreler bir arada değerlendirildiğinde elde edilen toplam histolojik skor ortalamalarının, istatistiksel olarak gruplar arası anlamlılık durumları ki- kare testi kullanılarak hesaplandı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p=0,008$ ). Yapılan değerlendirme sonucu; ağır-orta derece hasarlanmanın sadece duman inhalasyonu grubunda olduğu ve bu grupta hafif derecede histopatolojik değişikliklerin en az sıklıkta olduğu saptandı. Buna karşın duman inhalasyonu + AT-III ve kontrol gruplarında ağırlıklı olarak hafif histopatolojik değişikliklerin olduğu gözlemlendi (Şekil 18).



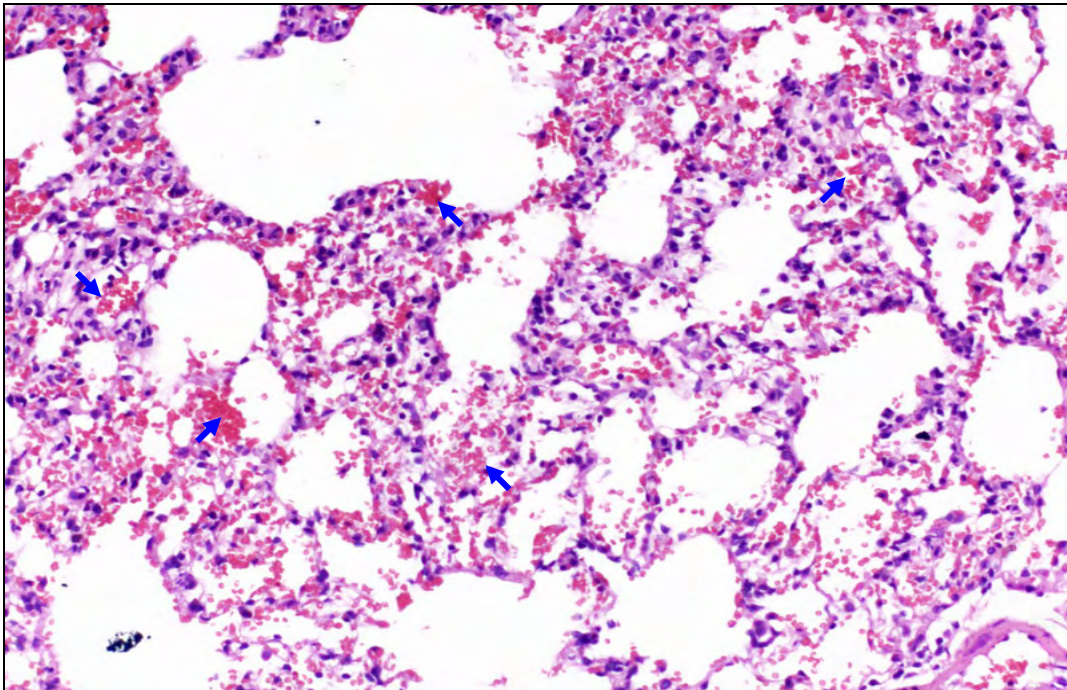
**Resim 11.** İnteralveoler stromada lökosit infiltrasyonu (H&E x200). Duman inhalasyon grubunda alveoller arası septalar genişlemiş olup, alveolleri destrükte ederek ortadan kaldıran yoğun miks tip iltihabi hücre infiltrasyonu interstisyel aralıkta izlenmektedir. Çok sayıda nötrofil ve arada eozinofil lökositler dikkati çekmektedir.



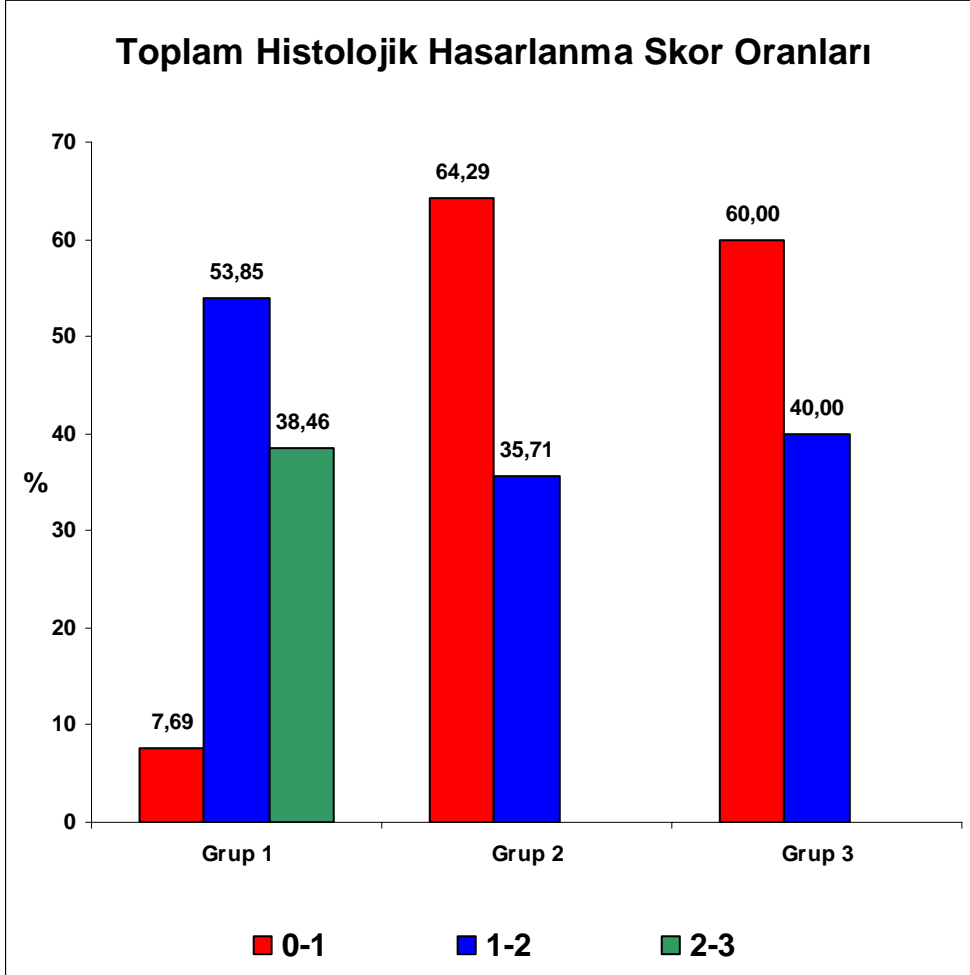
**Resim 12.** İnteralveoler stromada lenfosit infiltrasyonu (TNF- $\alpha$  x200). Duman inhalasyon grubunda TNF- $\alpha$  ile boyama sonrası mononükleer iltihabi hücrelerinin belirgin olarak sitoplazmik boyanma gösterdiği izlendi.



**Resim 13.** Atektazi ve amfizem (H&E x100). Duman inhalasyon grubunda alveolleri destrükte ederek ortadan kaldıran yoğun mikstip iltihabi hücre infiltrasyonu ve alveollerin ortadan kalkması ile eşlik eden amfizematöz ve atelektazik değişiklikler izlenmektedir.



**Resim 14.** İntraalveoler septal kanama ve septal konjesyon (H&E x200). Duman inhalasyon grubunda alveoller arasında interstisyumda belirgin konjesyon ve kanama dikkati çekmektedir.



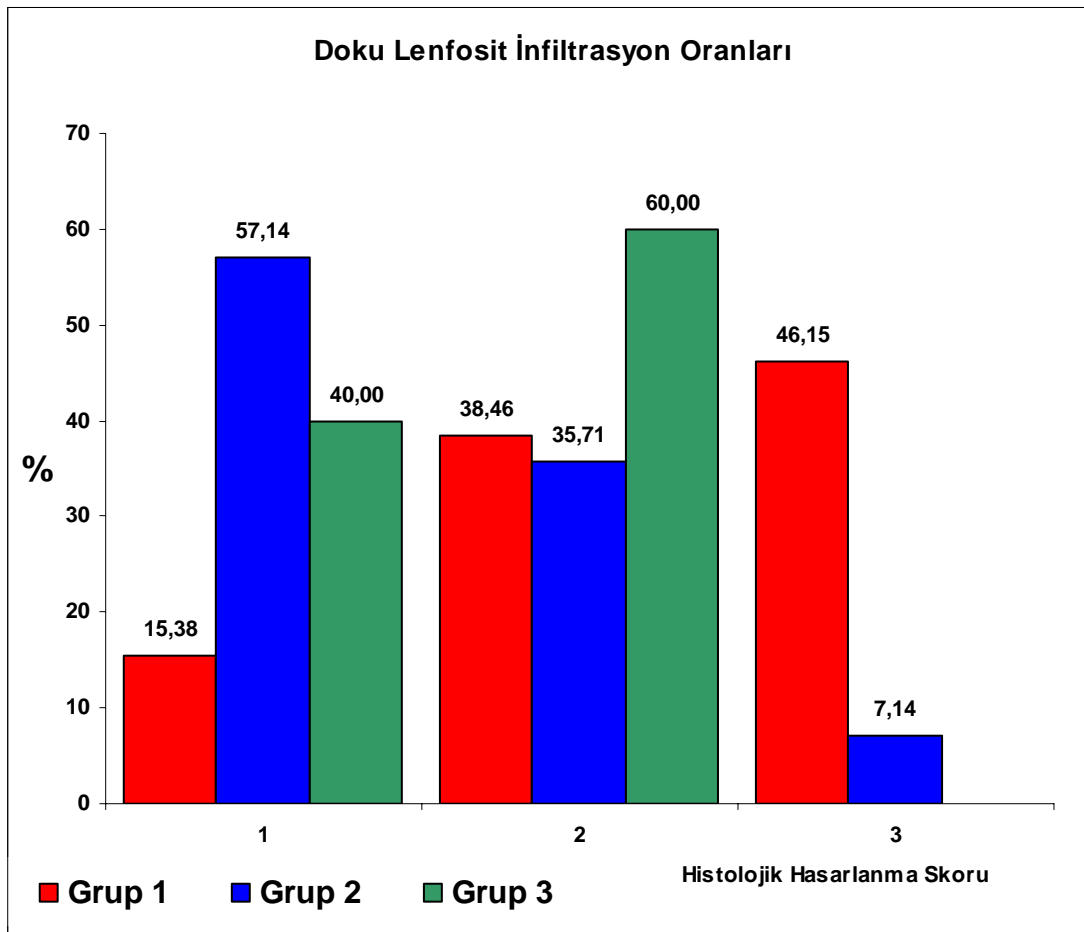
**Şekil 18.** Toplam histolojik hasarlanma skor ortalamalarının gruplara göre dağılım grafiği

\*Grup 1: Duman inhalasyon grubu; n=13, Grup 2: Duman inhalasyonu + AT-III grubu; n=14, Grup 3: Kontrol grubu; n=5

\*\* Skorlar: 0-1; Hasar yok veya hafif histolojik değişiklikler, 1-2; Hafif-orta derecede histolojik değişiklikler, 2-3; Orta-ağır derecede histolojik değişiklikler

Her bir histopatolojik parametre tek başına değerlendirildiğinde istatistiksel olarak gruplar arası anlamlılık durumları ki kare testi kullanılarak hesaplandı.

Doku lenfosit infiltrasyonunun değerlendirildiği histolojik skorlamada gruplar arası anlamlı farklılıklar saptandı ( $p=0,046$ ). Duman inhalasyon grubunda ileri derecede lenfosit infiltrasyonuna eğilim gözlenirken, duman inhalasyonu + AT-III grubunda hafif derecede lenfosit infiltrasyonuna eğilim saptandı (Şekil 19).

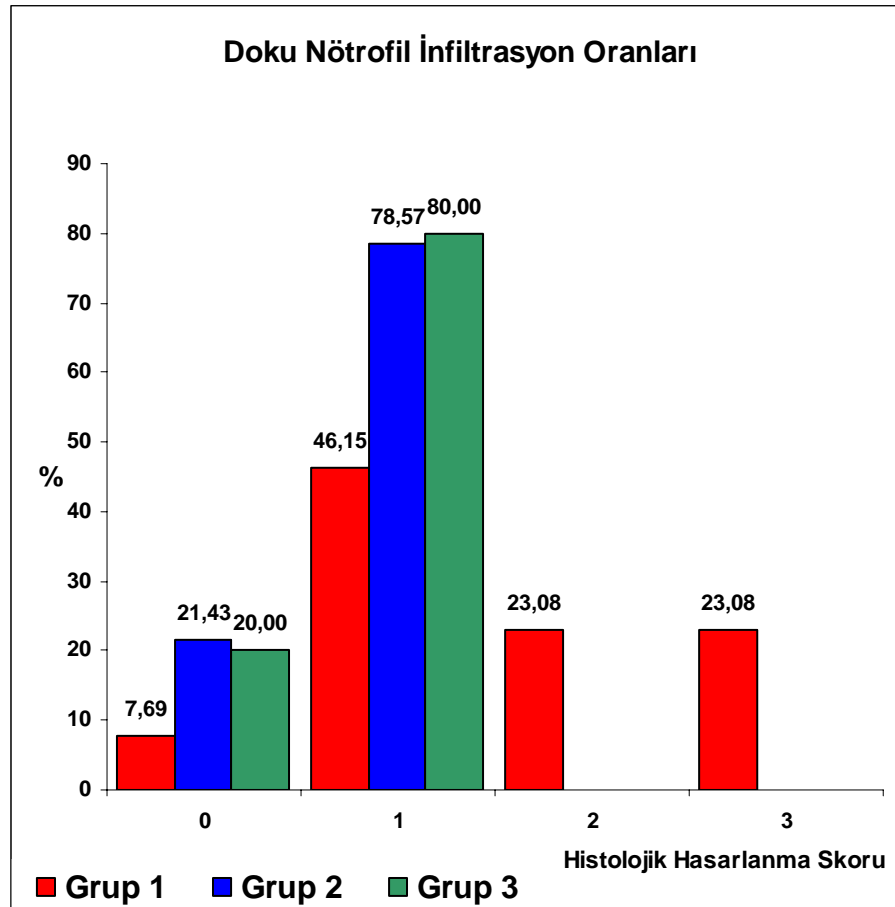


**Şekil 19.** Akciğer dokusundaki lenfosit infiltrasyon derecelerinin gruplara göre dağılım grafiği

\*Grup 1: Duman inhalasyon grubu; n=13, Grup 2: Duman inhalasyonu + AT-III grubu; n=14, Grup 3: Kontrol grubu; n=5

\*\* Skorlar: 0; Lenfosit infiltrasyonu yok, 1; Hafif derecede lenfosit infiltrasyonu, 2; Orta derecede lenfosit infiltrasyonu, 3; İleri derecede lenfosit infiltrasyonu

Doku nötrofil infiltrasyonunun değerlendirildiği histolojik skorlamada gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmadı ( $p=0,091$ ). İlginç olarak ileri ve orta derecede nötrofil infiltrasyonu sadece duman inhalasyon grubunda gözlemlendi. Buna karşın hafif derecede nötrofil infiltrasyonu ise en fazla duman inhalasyonu + AT-III ve kontrol gruplarında saptandı (Şekil 20).



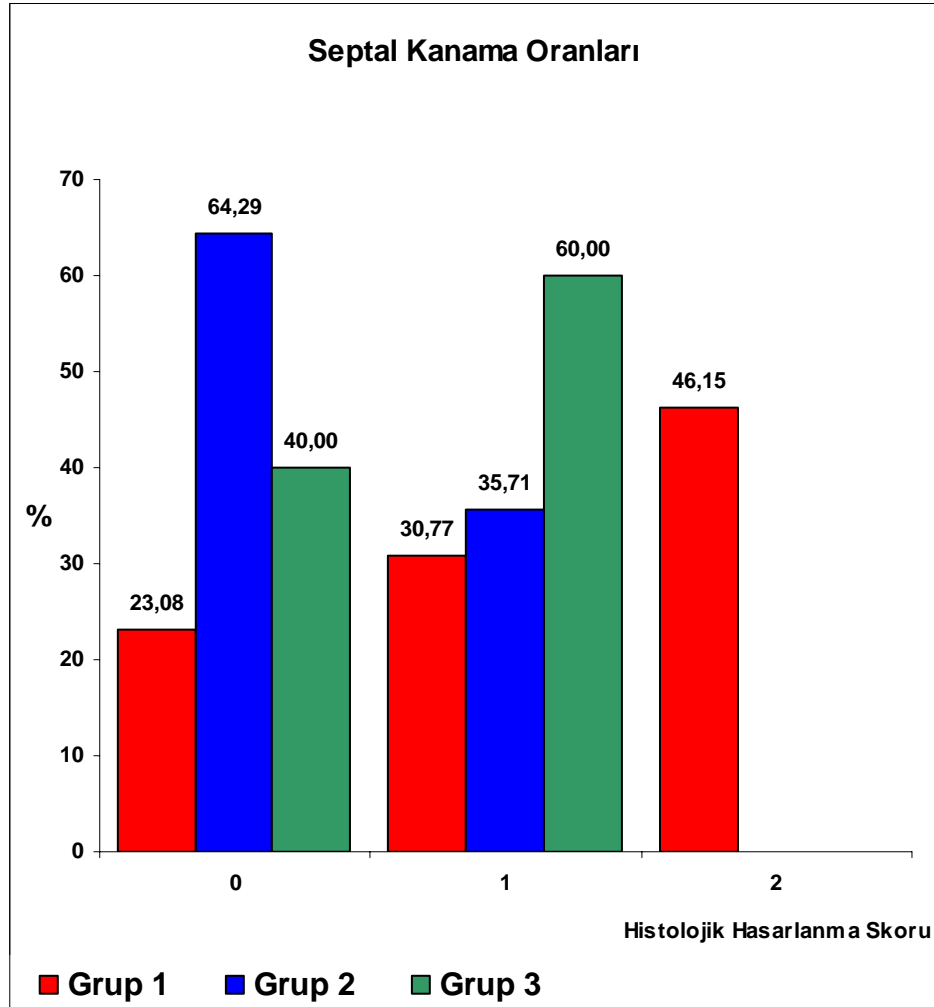
**Şekil 20.** Akciğer dokusundaki nötrofil infiltrasyon derecelerinin gruplara göre dağılım grafiği

\*Grup 1: Duman inhalasyon grubu; n=13, Grup 2: Duman inhalasyonu + AT-III grubu; n=14, Grup 3: Kontrol grubu; n=5

\*\*Skorlar: 0; Nötrofil infiltrasyonu yok, 1; Hafif derecede nötrofil infiltrasyonu, 2; Orta derecede nötrofil infiltrasyonu, 3; İleri derecede nötrofil infiltrasyonu



İntraalveoler septal kanama durumunun değerlendirildiği histolojik skorlamada gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı (p=0,016). İleri derecede intraalveoler septal kanamaya hiçbir grupta rastlanmazken orta derecede intraalveoler septal kanamaya en fazla ve sadece duman inhalasyon grubunda rastlandı. Duman inhalasyonu + AT-III grubunda ise ağırlıklı olarak intraalveoler septal kanamaya rastlanılmadı (Şekil 21).

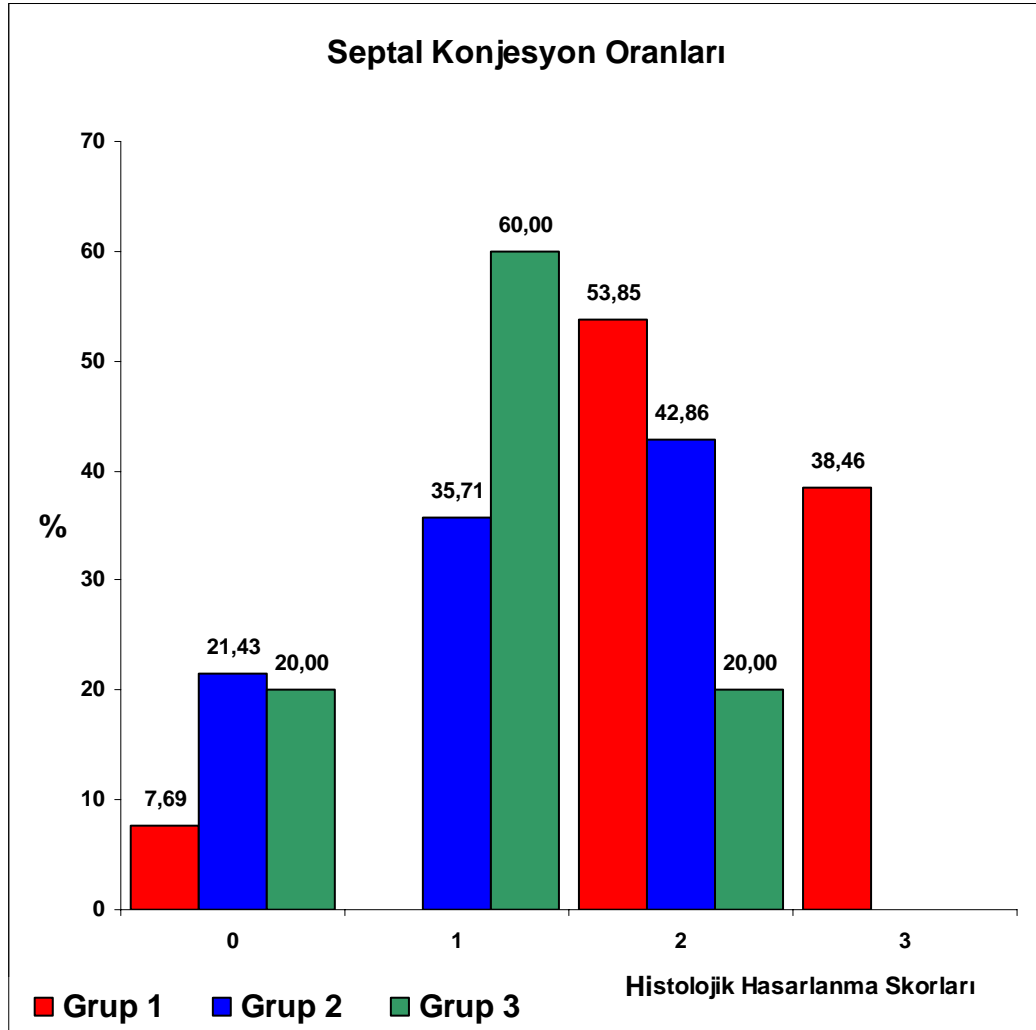


Şekil 21. İntraalveoler septal kanama durumunun gruplara göre dağılım grafiği

\*Grup 1: Duman inhalasyon grubu; n=13, Grup 2: Duman inhalasyonu + AT-III grubu; n=14, Grup 3: Kontrol grubu; n=5

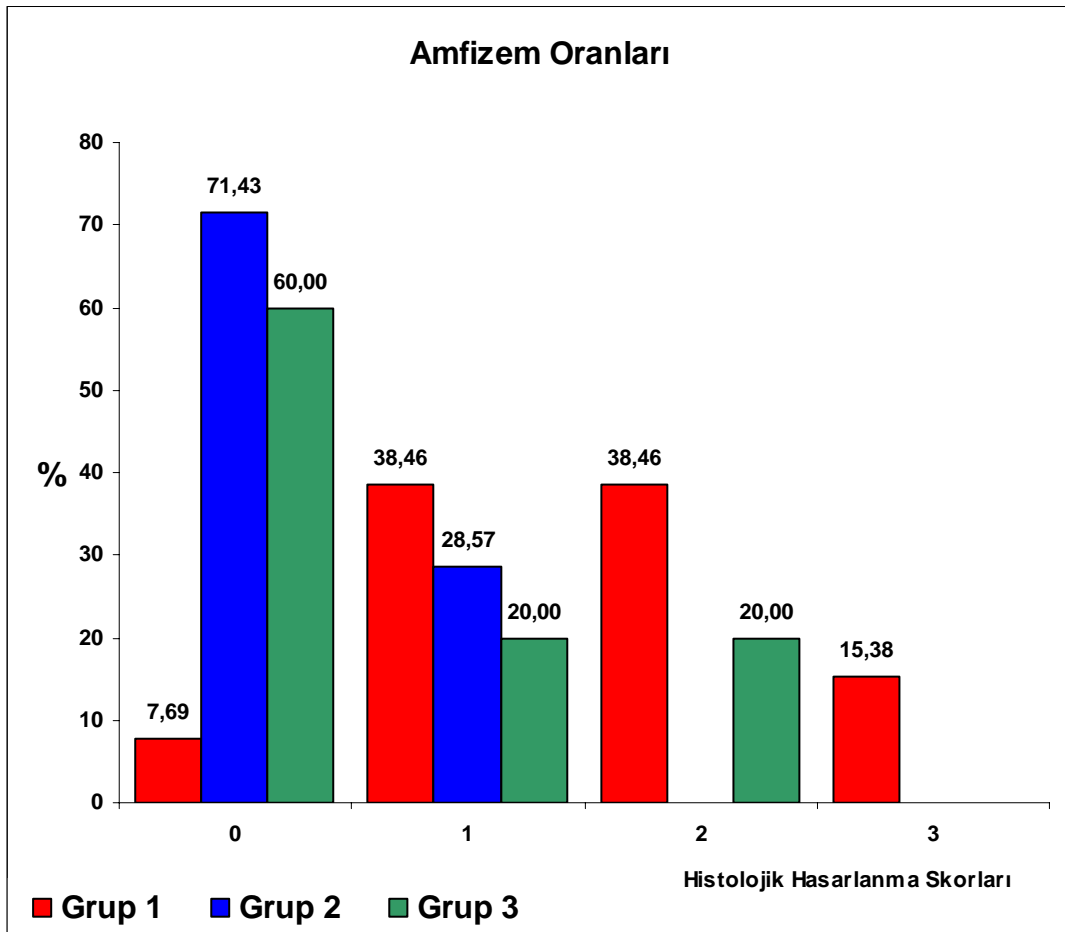
\*\*Skorlar: 0; Kanama yok, 1; Hafif derecede kanama, 2; Orta derecede kanama, 3; İleri derecede kanama

İntraalveoler septal konjesyon durumlarının değerlendirildiği histolojik skorlamada gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı (p=0,017). İleri derecede intraalveoler septal konjesyona sadece duman inhalasyon grubunda rastlandı. Duman inhalasyon grubunda orta-ileri derecede intraalveoler septal konjesyona eğilim saptanırken, duman inhalasyonu + AT-III grubunda hafif-orta derecede intraalveoler septal konjesyona eğilim saptandı (Şekil 22).



**Şekil 22.** Akciğer dokusundaki septal konjesyon durumunun gruplara göre dağılım grafiği  
 \*Grup 1: Duman inhalasyon grubu; n=13, Grup 2: Duman inhalasyonu + AT-III grubu; n=14, Grup 3: Kontrol grubu; n=5.  
 \*\*Skorlar: 0; Konjesyon yok, 1; Hafif derecede konjesyon, 2; Orta derecede konjesyon, 3; İleri derecede konjesyon

Amfizem durumlarının değerlendirildiği histolojik skorlamada gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı (p=0,018). İleri derecede amfizeme sadece duman inhalasyon grubunda rastlandı. Duman inhalasyon grubunda hafif-orta derecede amfizeme eğilim saptanırken, duman inhalasyonu + AT-III ve kontrol gruplarının büyük bir kısmında amfizeme rastlanılmadı (Şekil 23).

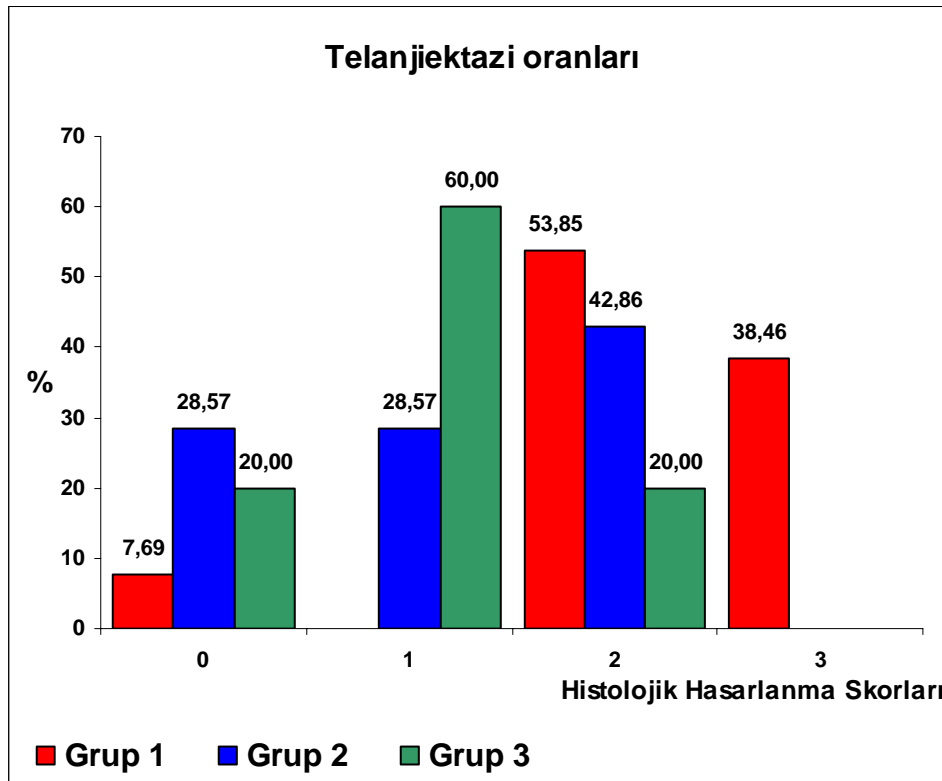


**Şekil 23.** Akciğer dokusundaki amfizem durumunun gruplara göre dağılım grafiği

\*Grup 1: Duman inhalasyon grubu; n=13, Grup 2: Duman inhalasyonu + AT-III grubu; n=14, Grup 3: Kontrol grubu; n=5).

\*\*Skorlar: 0; Amfizem yok, 1; Hafif derecede amfizem, 2; Orta derecede amfizem, 3; İleri derecede amfizem

Telanjiektazi oranlarının değerlendirildiği histolojik skorlamada gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p=0,012$ ). İleri derecede telanjiektaziye sadece duman inhalasyon grubunda rastlandı. Duman inhalasyon grubunda orta-ileri derecede telanjiektaziye eğilim saptanırken, duman inhalasyonu + AT-III grubunun büyük bir kısmında hafif-orta derecede telanjiektazi gözlemlendi (Şekil 24).

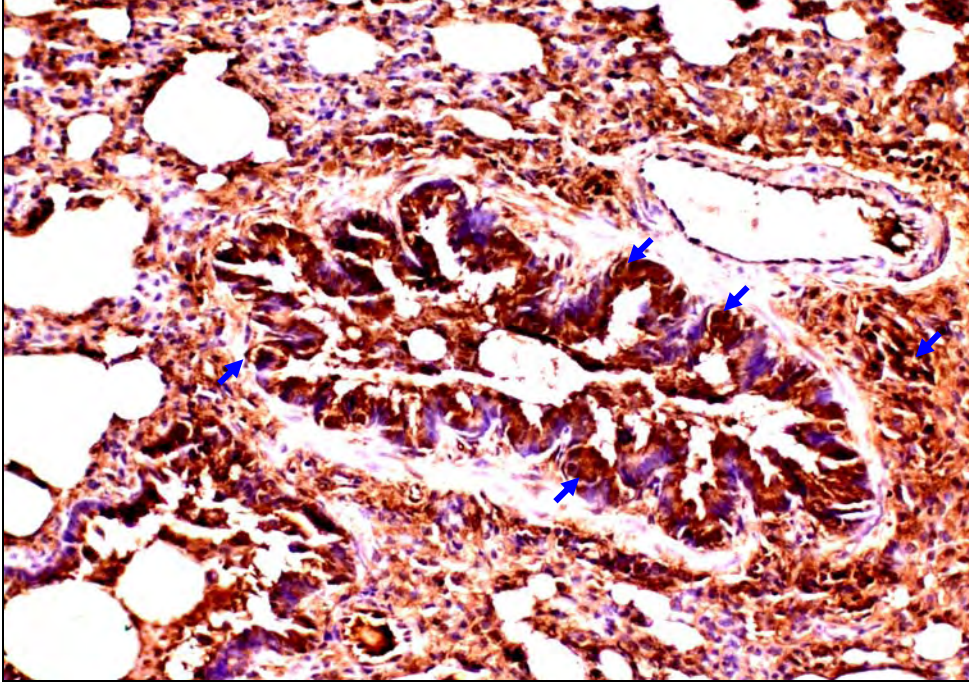


**Şekil 24.** Akciğer dokusundaki telanjiektazi durumunun gruplara göre dağılım grafiği  
 \*Grup 1: Duman inhalasyon grubu; n=13, Grup 2: Duman inhalasyonu + AT-III grubu; n=14, Grup 3: Kontrol grubu; n=5.  
 \*\* Skorlar: 0; Telanjiektazi yok, 1; Hafif derecede telanjiektazi, 2; Orta derecede telanjiektazi, 3; İleri derecede telanjiektazi

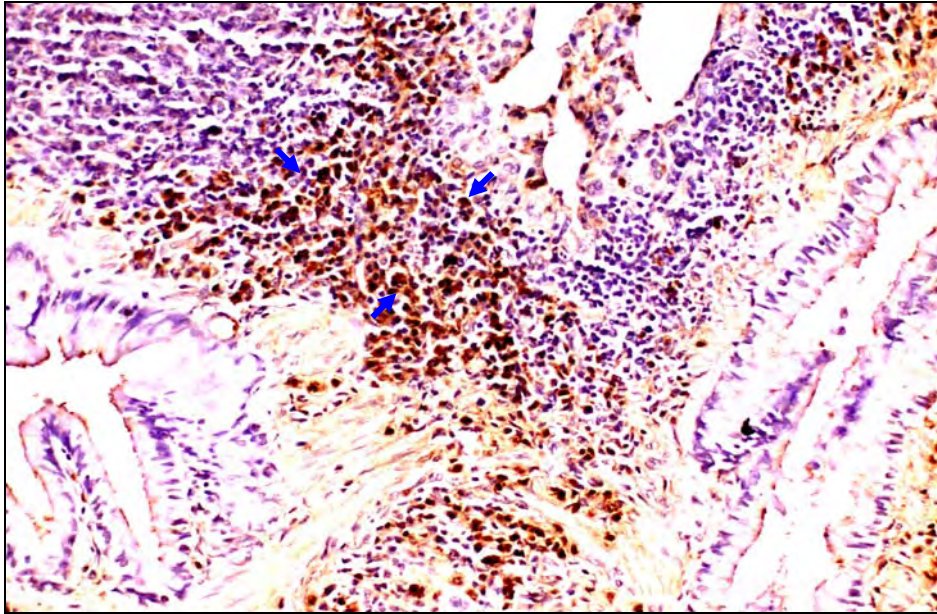
Akciğer dokusunun immünohistokimyasal incelemesinde boyanma yüzdelere göre; interalveoler septumdaki inflamatuvar hücrelerde MPO, respiratuvar epitel ve endotel hücrelerinde iNOS ve TNF- $\alpha$  aktiviteleri değerlendirildi (Resim 15-17). Akciğer dokusunda değerlendirilen parametrelerin her biri gruplar arasında immünohistokimyasal hasarlanma skoru ile karşılaştırıldı. Skorlar; MPO, iNOS ve TNF $\alpha$  için şu şekildedir;

- 0 : Hücrelerde boyanma yoksa
- 1 : Hücrelerde boyanma %20'den azsa
- 2 : Hücrelerde boyanma %20-40 arasındaysa
- 3 : Hücrelerde boyanma %40'dan çoksa

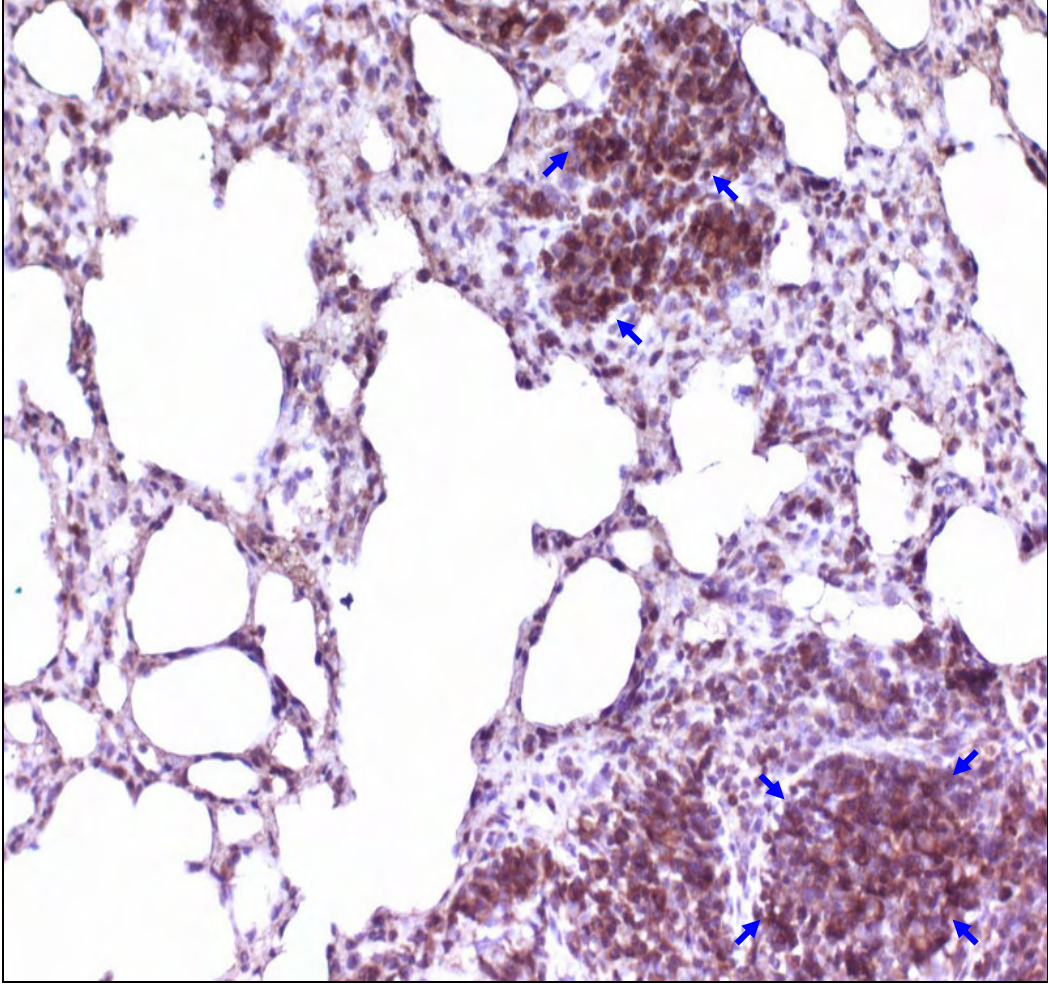
İmmünohistokimyasal parametrelerin analizinden elde edilen değerlerin önemlilik durumları ki-kare testi kullanılarak hesaplandı ve  $p < 0,05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



**Resim 15.** Endotel ve respiratuar epitel hücrelerinde NOS boyaması (NOS x200). Duman inhalasyon grubunda alveoller arası septalarda ve bronş duvarında infiltrasyon gösteren iltihabi hücrelerin büyük bir kısmında şiddetli derecede iNOS ile pozitif boyanma izlenmektedir.

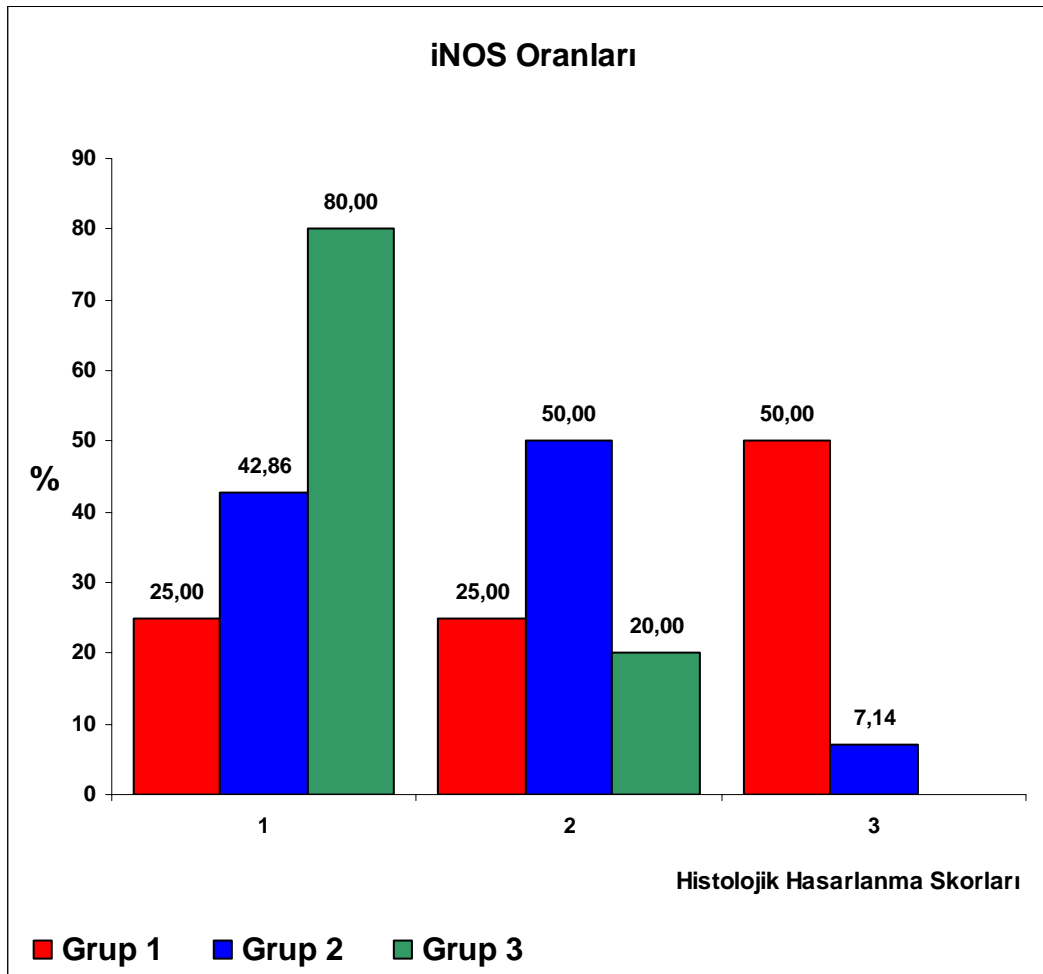


**Resim 16.** İnflammatuar hücrelerde MPO boyaması (MPO x200). Duman inhalasyon grubunda alveoller arası septalarda inflamasyona bağlı genişleme ve inflammatuar hücrelerin büyük bir kısmında myeloperoksidase ile şiddetli derecede boyanma izlenmektedir.



**Resim 17.** Endotel ve respiratuar epitel hücrelerinde TNF- $\alpha$  boyaması (TNF- $\alpha$  x200). Duman inhalasyon grubunda endotel, respiratuar epitel ve alveoller arası septalarda izlenen inflamatuvar hücrelerde TNF- $\alpha$  ile yaygın olarak şiddetli derecede boyanma izlenmektedir.

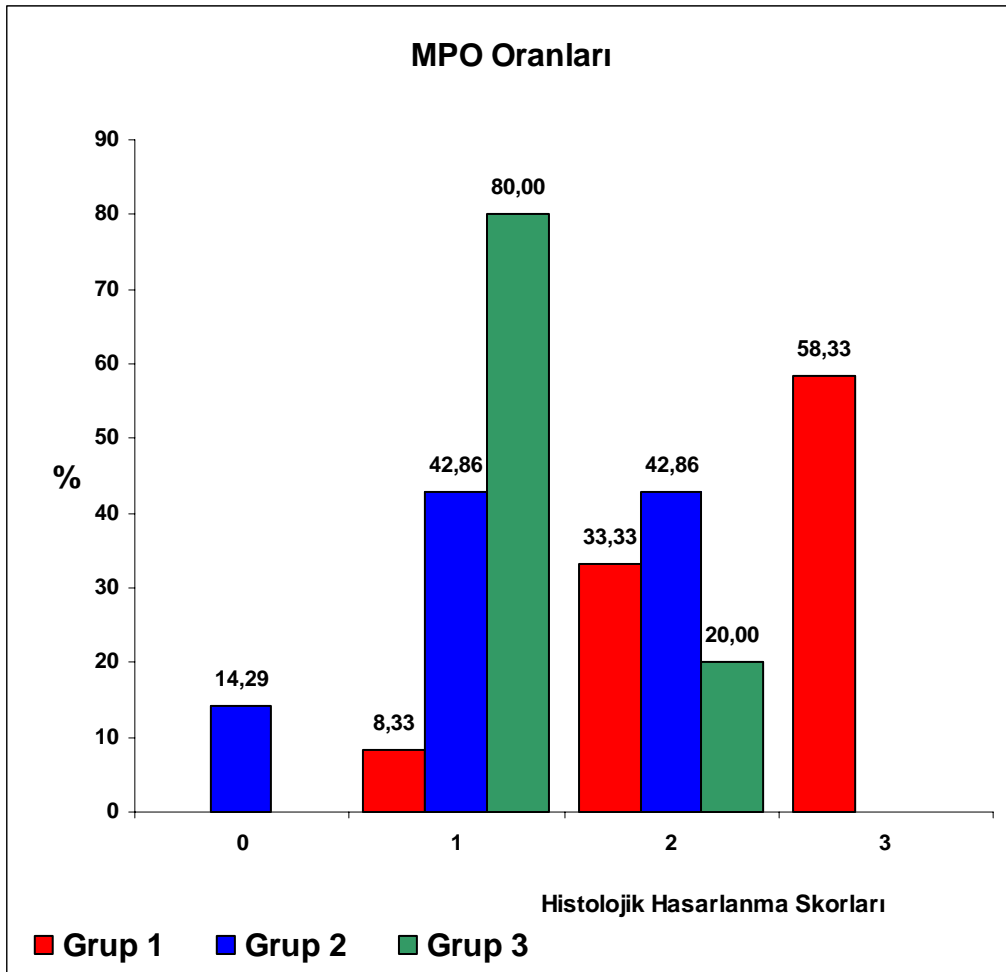
Akciğer dokusunda iNOS aktiviteleri için yapılan değerlendirmede gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p=0,03$ ). Duman inhalasyon grubunda ileri derecede iNOS aktivitesine eğilim saptanırken, duman inhalasyonu + AT-III grubunda hafif-orta derecede iNOS aktivitesine eğilim saptandı. Kontrol grubunun büyük bir kısmında ise hafif derecede iNOS aktivitesine eğilim saptandı (Şekil 25).



**Şekil 25.** Akciğer dokusundaki iNOS aktivitelerinin gruplara göre dağılım grafiği  
 \*Grup 1: Duman inhalasyon grubu; n=12, Grup 2: Duman inhalasyonu + AT-III grubu; n=14, Grup 3: Kontrol grubu; n=5.  
 \*\* iNOS için skorlar şu şekildedir: 0; Hücrelerde boyanma yok, 1; Hücrelerde boyanma %20'den az, 2; Hücrelerde boyanma %20-40 arasında, 3; Hücrelerde boyanma %40'dan fazla



Akciğer dokusunun MPO aktivitesi değerlendirildiğinde; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p=0,003$ ). İlginç olarak ileri derecede MPO aktivitesi en fazla ve sadece duman inhalasyon grubunda saptandı. Duman inhalasyonu + AT-III grubunda ise hafif-orta derecede MPO aktivitesine eğilim gözlemlendi. Kontrol grubunun büyük bir kısmında ise hafif derecede MPO aktivitesi saptandı (Şekil 26).

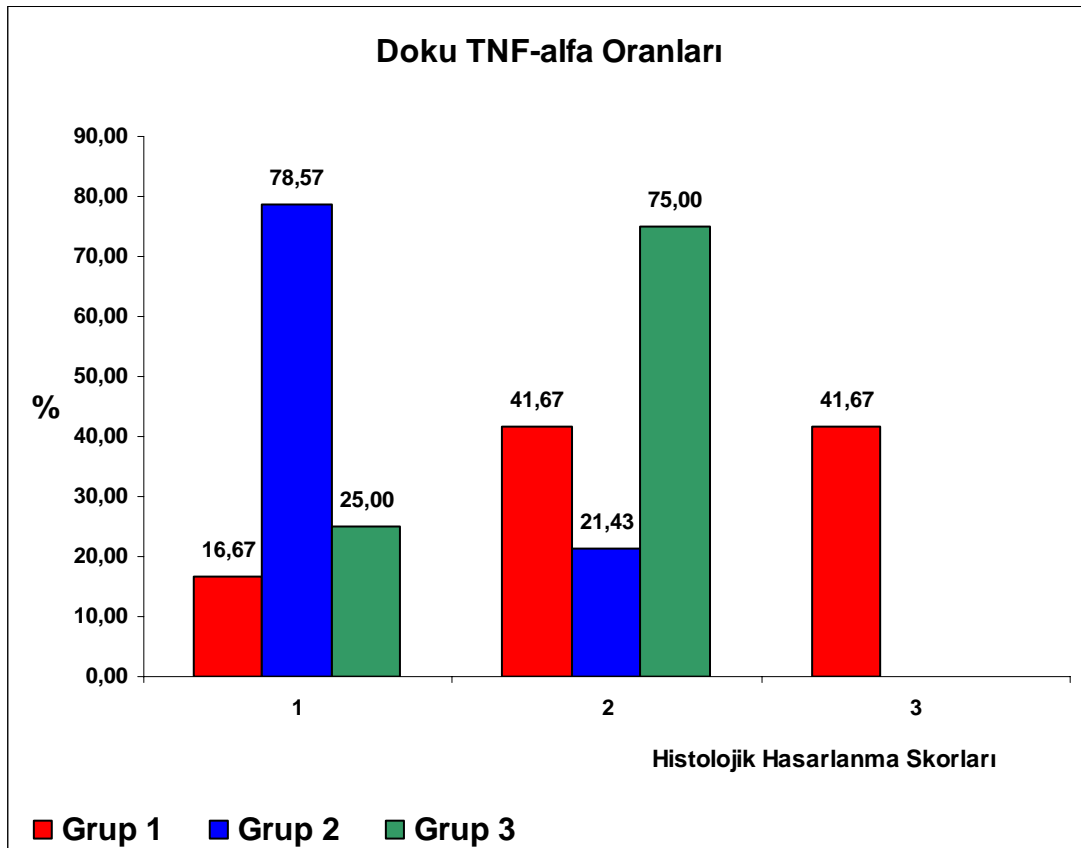


**Şekil 26.** Akciğer dokusundaki MPO aktivitesinin gruplara göre dağılım grafiği

\*Grup 1: Duman inhalasyon grubu; n=12, Grup 2: Duman inhalasyonu + AT-III grubu; n=14, Grup 3: Kontrol grubu; n=5.

\*\* MPO için skorlar şu şekildedir: 0; Hücrelerde boyanma yok, 1; Hücrelerde boyanma %20'den az, 2; Hücrelerde boyanma %20-40 arasında, 3; Hücrelerde boyanma %40'dan fazla

Akciğer dokusunda TNF- $\alpha$  reseptör aktivitesini değerlendirmek üzere yapmış olduğumuz analizde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı (p=0,003). İleri derecede TNF- $\alpha$  reseptör aktivitesi sadece duman inhalasyon grubunda gözlemlendi. Duman inhalasyonu + AT-III grubunun büyük bir kısmında ise hafif derecede TNF- $\alpha$  reseptör aktivitesi saptandı (Şekil 27).



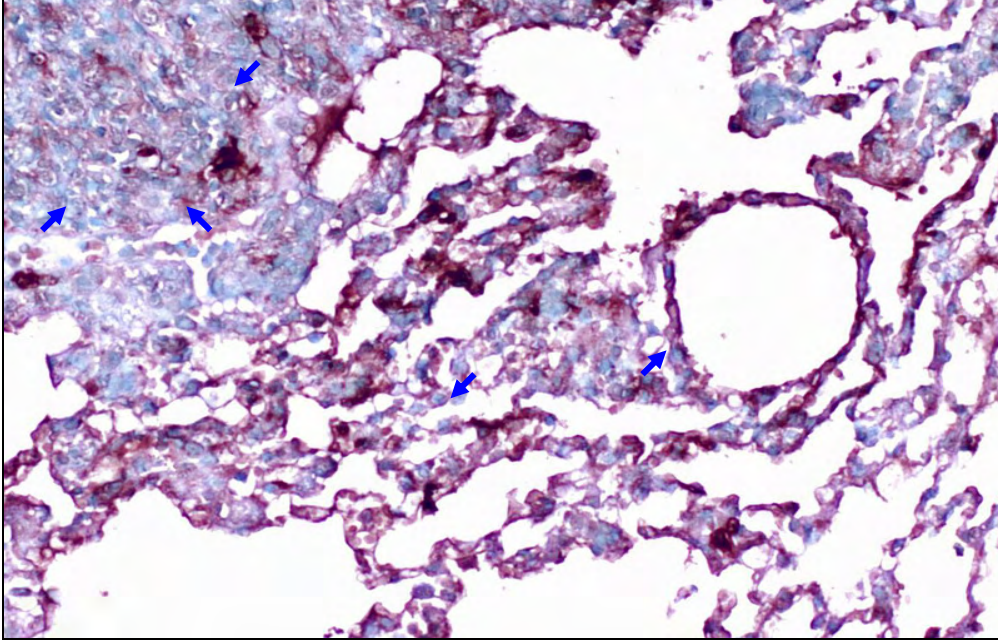
**Şekil 27.** Akciğer dokusundaki TNF- $\alpha$  reseptör aktivitesinin gruplara göre dağılım grafiği

\*Grup 1: Duman inhalasyon grubu; n=12, Grup 2: Duman inhalasyonu + AT-III grubu; n=14,

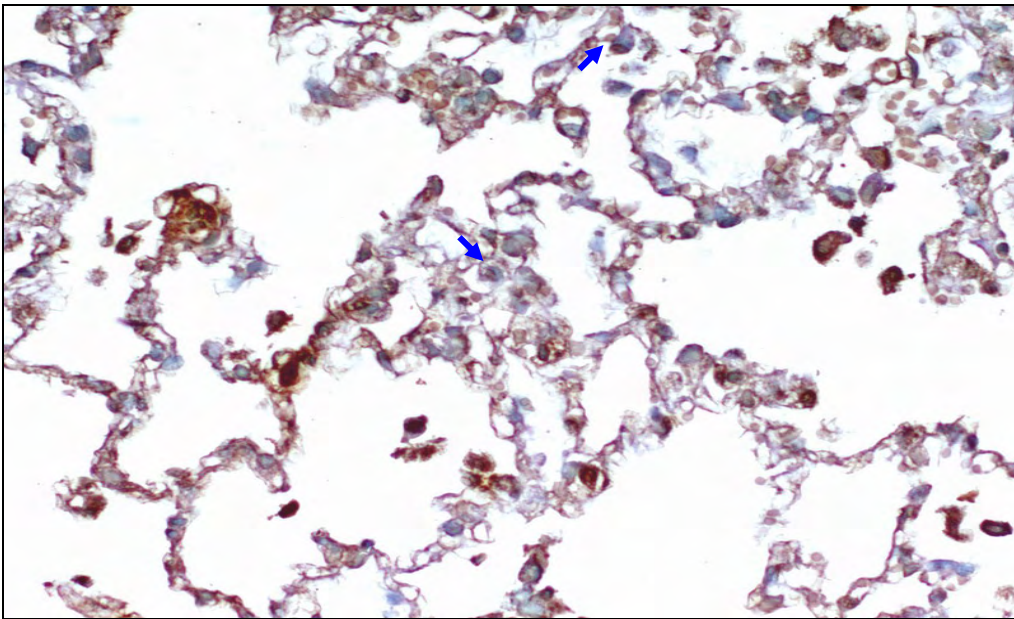
Grup 3: Kontrol grubu; n=4

\*\* TNF- $\alpha$  için skorlar şu şekildedir: 0; Hücrelerde boyanma yok, 1; Hücrelerde boyanma %20'den az, 2; Hücrelerde boyanma %20-40 arasında, 3; Hücrelerde boyanma %40'dan fazla

Akciğerlerde, sürfaktan salgılayan ve duman inhalasyonu sonrası gelişen akut solunum yetmezliğinde önemli rol oynayan PII alveoler hücrelerindeki apoptozis TUNNEL yöntemi kullanılarak değerlendirildi (Resim 18,19).

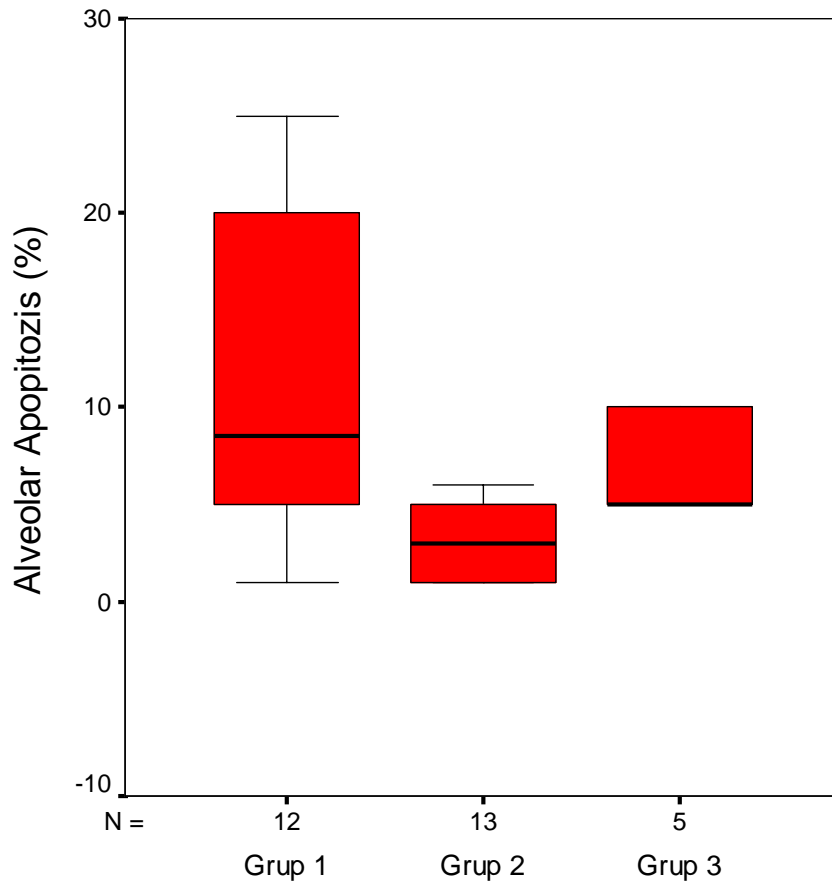


**Resim 18.** Alveoler epitel ve inflamatuvar hücrelerde apoptotik boyanma (Apoptok x200). Duman inhalasyon grubunda alveolleri döşeyen pnömositler ve inflamatuvar hücrelerin büyük bir kısmında artmış oranda apoptozis izlenmektedir.



**Resim 19.** Alveoler epitel ve inflamatuvar hücrelerde apoptotik boyanma (Apoptok x200). Duman inhalasyonu + AT-III grubunda alveolleri döşeyen pnömositlerde ve inflamatuvar hücrelerde azalmış oranda apoptozis izlenmektedir.

Alveoler epitel hücrelerindeki apoptotik hücre oranları için yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptandı ( $p=0,003$ ). Alveoler epitel hücrelerindeki apoptotik hücre oranlarının gruplara göre dağılımı şekil 28’de gösterilmektedir.



**Şekil 28.** Alveoler epitel hücrelerindeki apoptotik hücre oranlarının gruplara göre dağılım grafiği  
\*Grup 1: Duman inhalasyon grubu; n=12, Grup 2: Duman inhalasyonu + AT-III grubu; n=13,  
Grup 3: Kontrol grubu; n=5

## V. TARTIŞMA

Dumana maruziyet sonrası inhale edilen toksik gazlar organizmada önemli dinamik değişiklikler meydana getirir. Zehirli kimyasalların ve gazların inhalasyonu, doğrudan lokal hava yolu ve pulmoner alveolar hasarın yanı sıra, sistemik inflamatuvar mediatörlerin salınımıyla inflamatuvar sürecin başlamasına neden olarak akut akciğer hasarının gelişimine neden olmaktadır (21,29,38,44).

Normal koşullarda adezyon-agregasyon olayı kandan ve zedelenen damar dokusundan gelen antiagregan fibrinolitik aktive ile dengelenmiş durumdadır. Antiagregan ve fibrinolitik aktiviteyi sağlayan faktörlerden en önemlisi damar endotelinden salınan PGI<sub>2</sub>'dir. Mikrodolaşım ve trombositler üzerindeki net etki dominant olarak TxA<sub>2</sub> ve PGI<sub>2</sub> düzeylerine bağlı olarak dengede tutulmaktadır. Normalde bir denge içerisinde bulunan agregan-antiagregan etkileşim damar endotelinde ortaya çıkan belirgin ve uzamış bir zedelenmede bozularak damar duvarında koagülasyon enzimlerinin kuvvetle aktive olmasına neden olur. Hemostaz dengesi prokoagülanların artışına karşın koagülasyon inhibitörlerinin azalması ile bozulmaktadır (213).

Bu vazoaktif ajanlar aynı zamanda inflamatuvar reaksiyonlar sırasında lökosit ve monositlerin aktivasyonunu ve lizozomal enzim salınımını inhibe edebilir. Özellikle septik şok ve hipoksi sırasında dolaşımda endojen PGI<sub>2</sub> salınımının arttığı bildirilmekte ve bunu da sitokin aracılığıyla ettiği siklooksijenaz izoenzim-2'nin indüksiyonu ile gerçekleştirdiği gösterilmiştir.

Alfa 2 globulin yapısında antikoagülan bir ajan olan AT-III, koagülasyon kaskadında yer alan trombin gibi serin proteazlarının fizyolojik inhibitörüdür (151). AT-III'ün endotelial hücre yüzeyindeki heparin benzeri glikozaminoglikanlarla etkileşimi, in vitro ve in vivo olarak endotelial hücreden PG I<sub>2</sub> salınımını kolaylaştırır. Bu sayede inflamatuvar reaksiyonlar sırasında monositlerden TNF- $\alpha$  üretimini baskılar, intrasellüler cAMP'yi artırarak lökosit ve monositlerin aktivasyonunu ve endotelial hücrelere nötrofil adezyonunu inhibe eder ve lizozomal enzimlerin ve serbest oksijen radikallerinin oluşumunu engeller. Bu nedenle de AT-III'ün aktive lökositlerin indüklediği organ hasarını önlediği belirtilmektedir (10,16,17,151,152,221).

AT-III'ün antienflamatuvar etkilerini dikkate alarak yapmış olduğumuz bu çalışmada ratlarda duman inhalasyon modeli oluşturarak gelişen akciğer hasarı üzerinde etkili faktörler ve ilacın tıropatik etkileri değerlendirildi. Aralıklı olarak duman ve oksijen inhalasyonu ile

gaz intoksikasyonuna bağlı mortalite önlenerek ağır-orta derecede duman inhalasyon hasarı oluşturuldu. Duman inhalasyonu sonrası akciğerlerden doku örnekleri alınarak yapılan histopatolojik incelemelerde; telanjiektazi, amfizem, interalveolar septal konjesyon, intraalveolar hemoraji ile lökosit ve lenfosit hücre infiltrasyon durumları tespit edildi ve bulgular literatürle uyumlu olarak bulundu (22,93).

Bu çalışmada; gerçekleştirilen duman inhalasyonu sonrası AT-III'ün etkinliğini araştırmak üzere duman inhalasyonu + AT-III grubuna, yüksek saflıkta AT-III konsantresi içeren 'Kybernin P®' verildi. AT-III'ün uygulama dozu seçiminde Kybernin'in hayvan deneylerinde 250 IU/kg/24 h olarak uygulanan dozunun etkin olduğunu gösteren çalışmalar dikkate alınarak belirtilen dozlarda intraperitoneal olarak uygulandı (95,174,183).

AT-III'ün iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı organ disfonksiyonunda yararlı olabileceğini bildiren çalışmalarda; ajanın antikoagülan özelliklerinden bağımsız olarak PGI<sub>2</sub> üretimi üzerinden mikrodolaşımı iyileştirerek histolojik hasarı azalttığı bildirilmektedir (219,220). Bu öngörü kanda prostasiklinin stabil metaboliti olan 6-keto-PGF<sub>1α</sub> düzeyinin saptanması ile desteklenmektedir (15). AT-III verildikten ortalama 120 dakika sonra 6-keto-prostaglandin F<sub>1α</sub> düzeylerinin kanda maksimum değerlere ulaştığı iskemi-reperfüzyon modelleri dikkate alınarak ratlar son ilaç dozunu aldıktan 120 dakika sonra sakrifiye edildi (95,170).

Sakrifikasyon işlemi öncesi alınan kan örneklerinde plazma 6-keto-prostaglandin F<sub>1α</sub> düzeyleri için yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptandı (p=0,046). Gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda; duman inhalasyonu ile duman inhalasyonu + AT-III grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanırken (p=0,010), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmadı (p>0,017). Plazma 6-keto-prostaglandin F<sub>1α</sub> düzeylerindeki artışın en fazla duman inhalasyonu + AT-III grubunda olduğu gözlemlendi. Bu bulgular AT-III'ün kanda endojen PGI<sub>2</sub> düzeylerini arttırdığını bildiren çalışmalarla uyumlu olarak bulunmuştur (219,220). 6-keto-prostaglandin F<sub>1α</sub> düzeylerindeki en az artışın ise duman inhalasyon grubunda olduğu görüldü. Endojen PGI<sub>2</sub> salınımının kontrol grubunda, duman inhalasyon grubundan daha yüksek seviyelerde olduğunu saptandı. Ancak bilindiği üzere, dolaşımda hipoksiye yanıt olarak endojen PGI<sub>2</sub> salınımı artmakta ve duman inhalasyonu sonrası travmanın şiddetiyle paralel olarak duman inhalasyon grubunda, kontrol grubundan daha yüksek seviyelerde olması beklenmektedir (176,214). Duman inhalasyon grubundaki endojen PGI<sub>2</sub> salınımının azalmasına neden olan faktörün dolaşımdaki AT-III düzeyleri ile ilişkili olabileceğini düşünüldü. AT-III'ün yarılanma ömrü ağır travma, ciddi sepsis durumlarında ve duman inhalasyonu sonrası harcanmaya bağlı olarak

azalmaktadır (208,223). Ayrıca inflamatuvar süreçte sitokinlerin uyarısı ile aktive olan nötrofillerden salınan elastaz gibi proteolitik enzimlerin AT-III'ü yıktığı belirtilmektedir. Bu bilgilere dayanarak çalışmamızda duman inhalasyon grubunda, endojen AT-III'ün dokuda harcanmasına ve inflamatuvar hücrelerce yıkılmasına bağlı olarak kan düzeylerinin azalması ile PGI<sub>2</sub> salınımının azaldığı düşünülmektedir. Bunun yanında kontrol grubunda endojen PGI<sub>2</sub> salınımındaki artışın, duman odasına alınan ratlarda oluşturulan strese, verilen anestezi ve cerrahi prosedürün etkisine bağlı olabileceği düşünüldü.

Duman içeriğinde bulunan toksik kimyasal ajanlar mikrovasküler damar endotelini ve alveoler epiteli aktive ederek inflamatuvar cevabın başlamasına neden olurlar. Duman inhalasyonu sonrası, inhale edilen duman partikülleri alveoler makrofajlar tarafından fagosite edilir ve bu esnada güçlü kemotaktik ajanlar olduğu bilinen TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi proinflamatuvar sitokinler salınır. Bu proinflamatuvar sitokinler, araşidonik asit metabolitleri, kompleman sisteminin aktivasyonu, nötrofil degradasyonu ve serbest oksijen radikali oluşumu gibi çeşitli inflamatuvar mediyatörlerin salınımı ile de ilişkili olup doku harabiyetine en erken hücrel yanıtı oluşturmaktadırlar. Dolaşımda erken dönemde tespit edilen TNF- $\alpha$ 'nın maksimum düzeyi tüm dönemlerde prognostik öneme sahip olup bununla ilgili olarak yapılan çalışmalarda TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ 'nin sistemik dolaşımdaki seviyeleri ile akciğer hasarlanma derecesinin şiddetinin birbiri ile korele olduğu bildirilmiştir (38,121,122).

Bu proinflamatuvar sitokinler daha sonra akciğer hasarının oluşmasında majör rolleri olduğu bildirilen IL-6 ve IL-8 gibi diğer sitokinlerin salınımını indükleyerek inflamatuvar cevabı arttırlar (38,39). Yapılan çalışmalarda ARDS'li hastaların 48 saat içinde alınan bronkoalveoler lavaj sıvısı ve plazma örneklerinde TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ 'nin yanı sıra IL-6 ve IL-8'in de artmış oldukları bildirilmektedir (96-99). Yanık sonrası gelişen inflamasyon sırasında IL-6, PMNL aktivasyonunu indükler ve yaşlanmış ya da disfonksiyonel PMNL'lerin fagositozunu geciktirir. IL-6, doku harabiyeti ve cerrahi travmanın boyutu ile plazma/serum düzeyleri arasında korelasyon gösteren sensitif ve erken bir belirteç olarak görülmektedir (126). Yapılan çalışmalarda IL-6 aktivasyonu ve salınımına TNF- $\alpha$  bağımlı mekanizmaların aracılık ettiği bildirilmekte olup çoklu organ yetmezliğinden ölen hastalarda dolaşımda TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerinin dramatik olarak arttığı ve özellikle de IL-6'daki artışın %100 mortalite ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (127,128). Nötrofiller için güçlü bir kemoatraktan olan IL-8'in duman hasarı sonrası nötrofillerin pulmoner sekestrasyonu ve akciğer hasarında önemli rol oynadıkları bildirilmektedir (123,126). Yapılan çalışmalarda; IL-8'in, IL-6 ile de ilişkili olduğu bulunmuş

ve IL-6 ile birlikte çoklu organ yetmezliği gelişiminde önemli göstergelerden biri olarak kabul edilmektedir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada; biyokimyasal incelemelerde serum TNF- $\alpha$  düzeyleri için yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptandı ( $p=0,008$ ). Gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda; duman inhalasyonu ile duman inhalasyonu + AT-III grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmış olup ( $p= 0,004$ ) diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmadı ( $p>0,017$ ). Serum TNF- $\alpha$  düzeylerinin en fazla duman inhalasyon grubunda arttığı gözlemlendi. Bu aynı zamanda histopatolojik hasarın en yoğun olduğu grup olarak belirlendi. Bu sonuç TNF- $\alpha$ 'nın dolaşımdaki seviyeleri ile akciğer hasarlanma derecesinin birbiri ile korele olduğunu bildiren çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (38,121,122). Duman inhalasyonu + AT-III grubunda kanda TNF- $\alpha$  düzeylerinin en düşük seviyelerde olduğu ve bu düşüş ile korele olarak akciğer dokusundaki histopatolojik hasarın düzeldiği ve sonuçların kontrol grubuna benzediği saptandı. Bu bulgular AT-III'ün, inflamatuvar reaksiyonların başlangıç aşamasında rol oynayan TNF- $\alpha$  salınımını baskılanmada önemli rolü olduğunu ve bu sayede inflamatuvar cevabı azalttığı görüşünü desteklemektedir. Duman inhalasyon grubunda TNF- $\alpha$  düzeylerinin en yüksek değerlerde saptanmasına rağmen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. Bu sonuç sitokinlerin yarı ömrünün çok kısa olması nedeniyle, duman inhalasyonu sonrası hızla yükselerek sakrifiye edildiği 48. saatlerde bazal değerlere doğru düşüş göstermesi ile açıklanmaktadır. Diğer taraftan ilginç olarak TNF- $\alpha$  düzeyleri duman inhalasyonu + AT-III grubunda, kontrol grubundan daha düşük seviyelerde gözlenmiş olup istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Serum IL-6 düzeyleri için yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptandı ( $p=0,045$ ). Gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda; duman inhalasyonu ile duman inhalasyonu + AT-III grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmış olup ( $p= 0,004$ ) diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmadı ( $p>0,017$ ). Yapmış olduğumuz bu çalışmada serum IL-6 düzeylerinin TNF- $\alpha$  düzeylerindeki artışa paralel olarak arttığı izlendi. IL-6 düzeylerindeki en fazla artış duman inhalasyon grubunda izlendi. IL-6 ve TNF- $\alpha$  düzeylerindeki değişikliklerin birbirine paralel seyir göstermesi IL-6 aktivasyonu ve salınımına TNF- $\alpha$  bağımlı mekanizmaların aracılık ettiğini bildiren çalışmalar ile desteklenmekte (127,128) olup duman inhalasyonu + AT-III grubunda, IL-6 düzeyindeki bu düşüşler literatür ile uyumlu bulundu (235). Duman inhalasyon grubunda IL-6 düzeylerinin en yüksek değerlerde saptanmasına rağmen kontrol grubu ile



karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. Bu sonuç serum TNF- $\alpha$  düzeylerinde olduğu gibi sitokinlerin yarı ömrünün çok kısa olması nedeniyle, duman inhalasyonu sonrası hızla yükselerek sakrifiye edildiği 48. saatlerde bazal değerlere doğru düşüş göstermesi ile açıklanmaktadır. Diğer taraftan ilginç olarak IL-6 düzeyleri duman inhalasyonu + AT-III grubunda, kontrol grubundan daha düşük seviyelerde gözlenmiş olup istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Duman inhalasyonuna bağlı gelişen akciğer hasarının fizyopatolojisinin anlaşılması ve hasarın önlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda, akciğer parankim hasarının ortaya çıkmasına neden olan inflamatuvar cevap oluşumunda, dolaşımda bulunan uyarılmış lökositlerin ve özellikle nötrofiller tarafından salgılanan proteazlar ve toksik oksijen metabolitlerinin önemli rolü olduğu bildirilmektedir (7,8,22,28,42-47,91-94). ARDS'li hastalardan alınan bronkoalveoler lavaj sıvısı ve histolojik örneklerde egemen olan inflamatuvar hücrelerin nötrofiller olduğu ve bunların ürünü olan elastaz, kollajenaz, reaktif oksijen ürünleri ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinleri içeren mediatörlerin buralarda aşırı miktarda bulunduğu belirtilmektedir (95-101).

Akciğer parankim hasarının ortaya çıkmasına neden olan inflamatuvar cevap oluşumunda, dolaşımda bulunan uyarılmış lökositlerin neden olduğunun anlaşılması üzerine bu konu üzerindeki çalışmalar lökositlerin dokuya göçündeki basamakların engellenmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Yapılan çok sayıda deneysel çalışmada, pek çok hayvan modelinde nötrofil akımının engellenmesi ile akciğer hasarlanma derecesinin dramatik olarak azaldığı bildirilmektedir (102-104). Bu yolda önemli görevleri bulunan adezyon moleküllerinin selektif ve selektif olmayan inhibisyonlarının yanı sıra bu süreçte görev alan çok sayıda inflamatuvar mediatör inhibitörlerinin kullanımı ile de akciğer dokusunda oluşacak hasar engellenmeye çalışılmıştır (44,45,80). Bununla ilgili olarak birçok çalışma yayınlanmış olmasına rağmen az sayıda başarılı sonuçlar bildirilmekte ve tıropatik etkinliği kanıtlanmış bir ajan henüz bulunmamaktadır. Ayrıca bu uygulamalar tartışılabilir özellikler içermektedir. Bilindiği üzere lökosit kemotaksisi organizmanın ilk inflamatuvar yanıt mekanizması olup, organizmanın hücre aracılıklı savunma mekanizmalarına aracılık eden bir tür savunma mekanizmasıdır. Hastada bu faktörün doğal olmayan yollarla ortadan kaldırılması savunma mekanizmasını en baştan ortadan kaldırmakla eşdeğer tutulabilir.

Yapılan çalışmalarda; akciğer hasarının oluşmasında önemli rolü olan lökositlerin dokuya göçünde, trombinin de görev aldığı bildirilmektedir. Trombin P ve E-selektinlerinin ekspresyonunu uyararak lökositlerin kümelenmesini artırır. Ayrıca trombin, hızlı bir şekilde

hücreler arası bağlantı molekülü olan ICAM-1, IL-8 ve PAF üretimini artırır. Tüm bunların sonucunda lökositlerin endotele yapışması artmaktadır. Aynı zamanda trombin; TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  üretimini de artırarak inflamatuvar etkisini güçlendirir. Trombinin güçlü ve doğal bir inhibitörü olan AT-III ile inaktive edilerek birbiri ile ilişkili bu basamakların bloke edilmesi duman inhalasyonunu takiben gelişen akciğer hasarının önlenmesinde önemli etkileri olacağını düşündürmektedir.

Glutasyon (GSH) sistemi, oksidatif hasarın azaltılmasında rol oynayan en önemli mekanizmalardan biri olup oksidatif strese karşı öncül savunma rolü üstlenerek stres durumunda, antioksidan olarak fonksiyon göstermektedir. GSH, serbest radikallerin hücre içinde detoksifikasyonuna neden olan ve lipid peroksidasyonunu önleyen en önemli endojen mekanizmalardan birisidir (163,164).

Duman inhalasyonu sonrası gerçekleştirmiş olduğumuz akciğer hasarında, AT-III'ün oksidatif stresin azaltılmasında rol alan GSH enzim sistemi ile ilişkisi değerlendirildi. Doku GSH düzeyleri için yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptanmadı ( $p>0,017$ ). Yapmış olduğumuz bu çalışmada ilginç olarak doku GSH düzeylerindeki artış en fazla duman inhalasyon grubunda saptandı. GSH-redoks döngüsünün kritik bileşenleri olan doku glutasyon düzeyi, oksidatif stres sırasında önemli oranda azalır. Endojen ya da ekzojen olarak oluşan radikaller, GSH düzeyini azaltmakla birlikte, GSH metabolizmasına bağlı enzimlerin aktivitesini de inhibe ederek oksidanlar tarafından hasarın ilerlemesine neden olurlar. Sepsis olgularında doku GSH düzeylerinin azalması ile birlikte mortalite oranlarında artış görüldüğü bildirilmektedir (169). Bu bilgilerin ışığı altında duman inhalasyon grubunda doku GSH düzeylerinde daha düşük değerler beklenirken en yüksek değerlere sahip olması dumanda bulunan toksik kimyasal ajanların organizmada inflamatuvar yanıtı başlatarak GSH enzim sistemini indüklediğini düşündürmektedir. GSH seviyesindeki bu artış antioksidan etkiyi arttırarak, savunma sistemini güçlendirici olarak etki etmektedir. Duman inhalasyonu + AT-III grubunda doku GSH düzeylerindeki rölatif azalmanın nedeni ise; bu grupta aktive nötrofillerin neden olduğu lipid peroksidasyonunun azalması sonucu oksidatif stres azalmakta ve bununla ilişkili olarak GSH enzim sistem aktivasyonunun yetersiz kaldığı düşünülmektedir. Duman inhalasyonu + AT-III grubunda, duman inhalasyon grubuna göre doku MPO aktivitesinde anlamlı azalmaların ( $p=0,003$ ) saptanması bu görüşü desteklemektedir. Bilindiği gibi lökositlerin dokuya geçerek doku hasarını başlattıklarının en önemli kanıtlarından biri doku MPO düzeyidir. MPO, lökositlerin primer granüllerinden (azurofil) salınır ve hidrojen peroksidin klorit iyonları ile dokuya zararlı hipoklorik asit oluşturma reaksiyonunu katalize eder ve dokudaki oksidatif stresi yansıtmaktadır. (146,147). Ayrıca GSH düzeylerinin duman

inhalasyonu + AT-III grubunda, duman inhalasyon grubuna oranla daha düşük seviyelerde saptanması bu ajanın doku hasarını önleyici etkisinin antioksidan enzim sisteminden bağımsız olarak gerçekleştirdiği fikrini de telkin etmektedir.

Duman inhalasyonu sonrası aktive lökositlerin salgıladıkları doku proteazları ve serbest O<sub>2</sub> radikallerinin etkisiyle doku hasarı ile birlikte pulmoner vasküler permeabilite değişiklikleri de meydana gelmektedir. Ayrıca duman içeriğindeki toksik kimyasal ajanlar alveoler epitel ve vasküler endoteli aktive ederek araşidonik asit metabolitleri gibi pulmoner vasküler permeabilite değişikliklerine neden olabilen inflamatuvar mediatörlerin salımına neden olmaktadır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada duman inhalasyonu sonrası pulmoner vasküler permeabilite değişiklikleri Evans Blue metodu kullanılarak değerlendirildi. Evans Blue boyası albümine şiddetle bağlanır ve akut akciğer hasarı modellerinde protein ekstravazasyonunun değerlendirilmesinde iyi bilinen bir belirteçtir (167,168). Bu yöntemle akciğer dokusunun Evans Blue boyasını tutma miktarları hesaplandı ve elde edilen veriler değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı (p=0,000). Gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda; duman inhalasyonu ile duman inhalasyonu + AT III grupları arasında (p=0,000) ve duman inhalasyonu ile kontrol grupları arasında (p=0,014) istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanırken, duman inhalasyonu + AT III ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmadı (p>0,017). Duman inhalasyonu + AT-III grubunda boya tutulumun en az, duman inhalasyon grubunda ise akciğerlerdeki hasarlanma ile korele olarak tutulumun en fazla olduğu saptandı. İlginç olarak boya tutulumunun, duman inhalasyonu + AT-III grubunda, kontrol grubundan daha düşük seviyelerde olduğu saptanmış olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı.

AT-III'ün duman inhalasyonu sonrası gelişen akciğer hasarının önlenmesinde etkinliğini değerlendirmek üzere 48. saatte doku örnekleri alınarak histopatolojik incelemeler yapıldı. Akciğer dokusunun ışık mikroskopunda histopatolojik incelemelerinde; lökosit ve lenfosit hücre infiltrasyonu ile alveoler kollaps, intraalveoler septal kanama, intraalveoler septal konjesyon, amfizem ve telanjiektazi durumları değerlendirildi.

Tüm histopatolojik parametreler bir arada değerlendirilerek toplam histolojik skor ortalamaları hesaplandı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı (p=0,008). Yapılan değerlendirme sonucu; ağır-orta derece hasarlanmanın sadece duman inhalasyonu grubunda olduğu ve bu grupta hafif derecede histopatolojik değişikliklerin en az sıklıkta olduğu saptandı. Buna karşın duman inhalasyonu + AT III ve kontrol gruplarında ağırlıklı olarak hafif histopatolojik değişikliklerin olduğu gözlemlendi (Şekil 18). Bu verilere

dayanarak AT-III ile tedavinin akciğer dokusundaki histopatolojik hasarı azalttığı düşünülmektedir.

Doku lenfosit infiltrasyonunun değerlendirildiği histolojik skorlamada gruplar arası anlamlı farklılıklar saptandı ( $p=0,046$ ). Duman inhalasyon grubunda ileri derecede lenfosit infiltrasyona eğilim gözlenirken duman inhalasyonu + AT-III grubunda hafif derecede lenfosit infiltrasyonuna eğilim saptandı (Şekil 19). Bu verilere dayanarak AT-III'ün akciğer dokusunda lenfosit infiltrasyonunu azalttığı düşünülmektedir.

Doku nötrofil infiltrasyonunun değerlendirildiği histolojik skorlamada gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmadı ( $p=0,091$ ). Ancak ilginç olarak ileri ve orta derecede nötrofil infiltrasyonu sadece duman inhalasyon grubunda saptandı. Buna karşın hafif derecede nötrofil infiltrasyonu en fazla duman inhalasyonu + AT III ve kontrol gruplarında saptandı (Şekil 20). Bu verilere dayanarak AT-III'ün akciğer dokusunda nötrofil infiltrasyonunu azalttığı düşünülmektedir.

İntraalveoler septal kanama durumunun değerlendirildiği histolojik skorlamada gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p=0,016$ ). İleri derecede intraalveoler septal kanamaya hiçbir grupta rastlanmazken orta derecede intraalveoler septal kanamaya en fazla ve sadece duman inhalasyon grubunda rastlandı. Duman inhalasyonu + AT-III grubunda ise ağırlıklı olarak intraalveoler septal kanamaya rastlanılmadı (Şekil 21). Bu verilere dayanarak AT-III'ün kanama profilini bozmayan ve iyi tolere edilebilir bir antikoagülan olduğu düşünülmektedir.

İntraalveoler septal konjesyon durumlarının değerlendirildiği histolojik skorlamada gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p=0,017$ ). İleri derecede intraalveoler septal konjesyona sadece duman inhalasyon grubunda rastlandı. Duman inhalasyon grubunda orta-ileri derecede intraalveoler septal konjesyona eğilim saptanırken, duman inhalasyonu + AT-III grubunda hafif-orta derecede intraalveoler septal konjesyona eğilim saptandı (Şekil 22). Yapmış olduğumuz bu çalışmada AT-III tedavisi ile akciğer dokusunda intraalveoler septal konjesyonun belirgin olarak azaldığı saptanmış olup bunun da akciğer dokusundaki fonksiyonel düzelmelere katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Daha önce yapmış olduğumuz pulmoner mikrovasküler permeabilite analizinde de AT-III tedavisi sonrası düzelmelerin saptanması bu sonuç ile korele olup bu görüşü desteklemektedir.

Amfizem durumlarının değerlendirildiği histolojik skorlamada gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p=0,018$ ). İleri derecede amfizeme sadece duman inhalasyon grubunda rastlandı. Duman inhalasyon grubunda hafif-orta derecede amfizeme eğilim saptanırken, duman inhalasyonu + AT-III ve kontrol grubunun büyük bir kısmında

amfizeme rastlanılmadı (Şekil 23). Bu verilere dayanarak AT-III'ün duman inhalasyonu sonrası akciğer dokusunda amfizemi azaltarak fonksiyonel düzelmelere katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Telanjiektazi durumlarının değerlendirildiği histolojik skorlamada gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p=0,012$ ). İleri derecede telanjiektaziye sadece duman inhalasyon grubunda rastlandı. Duman inhalasyon grubunda orta-ileri derecede telanjiektaziye eğilim saptanırken, duman inhalasyonu + AT-III grubunun büyük bir kısmında hafif-orta derecede telanjiektazi gözlemlendi (Şekil 24).

Lökositlerin dokuya geçerek doku hasarını başlattıklarının en önemli göstergelerinden biri doku MPO düzeyidir. MPO, lökositlerin primer granüllerinden salınır ve hidrojen peroksidin klorit iyonları ile dokuya zararlı hipoklorik asit oluşturma reaksiyonunu katalize eder (146). Nötrofil degranülasyonu ile başta MPO olmak üzere nötrofil elastaz, laktoferrin,  $\beta$ -glukuronidaz, ve N-asetil glukozaminidaz gibi toksik sindirim enzimleri salınır. Bu reaksiyon doku harabiyetine ve immun direncin azalmasına neden olur (146).

Nötrofil sekestrasyonunun kantitatif olarak ölçülmesinde duyarlı bir gösterge olduğu kabul edilen MPO aktivitesi, iskemi-reperfüzyon modeline dayanan birçok çalışmada gelişen akut akciğer hasarı ile ilişkili olarak bulunmuştur (121,148,149). AT-III tedavisinin etkinliğini değerlendiren iskemi-reperfüzyon çalışmalarında; tedavinin etkinliği doku MPO aktiviteleri ile değerlendirilmiş ve tedavi sonrası doku MPO düzeylerinde azalmaların yanı sıra akciğer dokusundaki histolojik hasarın da anlamlı olarak düzeltildiği bildirilmiştir (151,152).

Nötrofil akümüülasyonunun kantitatif olarak ölçülmesinde duyarlı bir gösterge olduğu belirtilen MPO aktivitesi ile dokudaki hücre sayısı arasında lineer bir ilişki olduğunu gösteren verilere dayanarak yapmış olduğumuz bu çalışmada akciğer dokusu MPO aktivitesi immünohistokimyasal yöntemle değerlendirildi. (81,86,166,174,183). Akciğer dokusunun MPO aktivitesi değerlendirildiğinde; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p=0,003$ ). İlginç olarak ileri derecede MPO aktivitesi en fazla ve sadece duman inhalasyon grubunda gözlemlendi. Duman inhalasyonu + AT-III grubunda ise hafif-orta derecede MPO aktivitesine eğilim saptandı. Kontrol grubunun büyük bir kısmında ise hafif derecede MPO aktivitesi saptandı (Şekil 26). Yapmış olduğumuz bu çalışmada, doku MPO aktivitesindeki artışın en fazla duman inhalasyon grubunda olduğu ve bunun da doku lökosit infiltrasyonundaki artış ile korele olduğu saptandı. Duman inhalasyonu + AT-III grubunda ise doku MPO aktivitesinde azalma ile birlikte lökosit infiltrasyonunda belirgin azalmalar saptandı. Bu verilere dayanarak AT-III'ün MPO aktivitesini aktive lökositlerin dokuya

göçünü engelleyerek azalttığı sonucunu çıkartmaktayız ve bu sonuç literatür ile uyumlu bulunmuştur (151,152).

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, duman inhalasyonu + AT-III grubunda MPO aktivitesindeki bu anlamlı azalmalar ile korele olarak serum TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerinde de anlamlı azalmalar saptanırken histopatolojik bulgularda da anlamlı düzelmeler gözlemlendi ( $p=0,008$ ). Yapılan çalışmalarda, akciğer dokusu MPO aktivitesinde artış ile ortaya konan doku hasarının, ilginç olarak kompleman sisteminden bağımsız olarak gerçekleştiği bildirilmiş ve proinflatuar bir sitokin olan TNF- $\alpha$  inhibisyonunun MPO düzeyleri üzerine etkili olmadığı belirtilmiştir (149,150). Bu çalışmalar dikkate alındığında AT-III'ün, akciğer hasarını nötrofiller için güçlü kemotaktik ajanlar olan sitokinleri azaltarak önleyebileceğinin yanı sıra kompleman sisteminden bağımsız olarak da gerçekleştirebileceğini düşündürmektedir.

İnhalasyon hasarının eşlik ettiği yanık olgularında, iNOS aracılı NO üretiminin artışına neden olan inflammatuar yanıt oluşmaktadır. Artmış iNOS aktivitesinin yanık sonrası gelişen hücresel hasara katkısı olduğu gösterilmiştir. NO'in bu aşırı üretimi transkripsiyon faktör Nükleer Faktör kappa B (NF- $\kappa$ B)'yi arttırarak inflammatuar sinyal yollarını uyarabilir ve inflammatuar sitokinlerin salınımını tetikleyerek hücre hasarına neden olur (63,64). İnhalasyon hasarının eşlik ettiği yanık modelinde sepsis ve ARDS ile komplike hale gelen olgularda NO'in up-regülasyon gösterdiği ve bunun da vasküler rezistansta düşme ve endotoksin düzeyinde artış ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (31).

NO'lerin süperoksit radikaller ile etkileşime girerek doku hasarını arttıran bir bileşik olan peroksinitritlere dönüşüp DNA'daki kırıkları arttırarak hücre ölümüne neden olduğu bildirilmektedir. Reaktif nitrojen ürünlerinin aracılık ettiği hasarın nükleer enzim olan PARP'ın (Poly ADP-Ribose-Polymerase) aktivasyonu sonucu DNA hasarlanmasına yol açtığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda PARP'ın inflammatuar sürecin regülasyonunda rol aldığı, özellikle NF- $\kappa$ B olmak üzere önemli transkripsiyon faktörleri ile ilişkili fonksiyonları başlattığı gösterilmiştir (142).

Akciğerlerde endotel ve respiratuvar epitel hücrelerindeki iNOS aktiviteleri immünohistokimyasal yöntemle değerlendirildi. Daha önce AT-III'ün iNOS aktivitesini değerlendiren bir çalışma mevcut olmayıp yapmış olduğumuz bu çalışmada gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p=0,03$ ). Duman inhalasyon grubunda ileri derecede iNOS aktivitesine eğilim saptanırken, duman inhalasyonu + AT-III grubunda hafif-orta derecede iNOS aktivitesine eğilim saptandı. Kontrol grubunun büyük bir kısmında ise hafif derecede iNOS aktivitesi saptandı (Şekil 25).

Yapmış olduğumuz bu çalışmada duman inhalasyonu sonrası akciğer hasarı gelişen olgularda AT-III tedavisi ile iNOS aktivitelerinde anlamlı azalmalar saptanmış olup bu sonuç AT-III'ün hasara uğramış akciğer dokusunda endotelial ve epitelial NOS aktivasyonunun regülasyonunda önemli rolü olduğunu düşündürmektedir. Bu sonuçlar AT-III'ün inhalasyon hasarında çok önemli rolleri olan artmış NO'in zararlı etkilerine karşı koruyucu etki gösterebileceği fikrini telkin etmektedir. Bu düşünce duman inhalasyonu + AT-III grubunda, iNOS aktivitesindeki azalmalar ile korele olarak histopatolojik düzelmelerin saptanması ile de desteklenmektedir.

iNOS aracılı NO'in PARP aktivasyonu ile inflamatuvar sürecin regülasyonunda rol oynadığı ve bunun supresyonu ile TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve MIP-1 (makrofaj inflamatuvar protein-1) gibi kemokinlerin azaldığı ve rat akciğerlerinde MPO aktivitesinin suprese edildiği bildirilmiştir (142,143). Duman inhalasyonu + AT-III grubunda, iNOS aktivitelerindeki azalmaların yanı sıra kanda sitokin ve doku MPO aktiviteleri de duman inhalasyon grubundan anlamlı miktarlarda azalmış olarak bulundu. Bu verilere dayanarak AT-III'ün iNOS aktivitesini azaltarak PARP aktivasyonunu engelleyebileceği düşünülmektedir. Bu düşünce ancak AT III tedavisi sonrası PARP aktivasyonunun değerlendirilmesiyle netleşecektir. Ancak bu görüş, duman inhalasyonu + AT-III grubundaki alveoler apoptozisde anlamlı azalmaların gösterilmesi ile desteklenmektedir (p=0,002). Bilindiği üzere; NO'ler süperoksit radikaller ile etkileşime girerek doku hasarını arttıran bir bileşik olan peroksinitritlere dönüşüp DNA'daki kırıkları arttırarak hücre ölümüne (apoptozis) neden olmakta ve bunu da bir nükleer enzim olan PARP'ın aktivasyonu sonucu gerçekleşmektedir.

Herhangi bir patoloji olmadan gerçekleşen programlı hücre ölümü olan apoptozis sırasında, yaşlanmış ve disfonksiyonel makrofajlar ve PMNL'ler diğer immünoitleri aktive etmeden ve proinflamatuvar içeriklerini serbestleştirmeden sistemik olarak ortamdaki yok edilirler. Ortamda inflamasyon olması, disfonksiyonel veya yaşlanmış hücrelerde apoptotik mekanizmanın bozulmasına yol açarak aktive makrofaj ve PMNL'lerin imhasının gecikmesine neden olur. İnflamatuvar immünoitlerin yaşam sürelerinin uzaması, travma ve infeksiyona olan inflamatuvar yanıtın artmasına ve uzamasına yol açar.

İnhalasyon hasarında akciğerlerde nötrofil ve endotelial hücre apoptozisi yapılan deneysel çalışmalarla gösterilmiş olup ARDS gelişen olgularda akciğerlerde nötröfil apoptozunun gecikmiş olduğu bildirilmiştir. Erken dönemde kaybedilen kişilerde Tip I pnömosit'lerin boyutlarının azaldığı ve nükleer kromatinlerin yoğunlaştığı gözlenmiştir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada AT-III'ün, akciğerlerde sürfaktan salgılayan ve duman inhalasyonu sonrası gelişen akut akciğer hasarında önemli rol oynayan pnömosit hücrelerindeki apoptozisi anlamlı bir şekilde azalttığı gösterildi ( $p=0,002$ ), (Şekil 28).

Hücresinin apoptozisi başlatmasında ya da devam ettirmesinde hücre içi GSH seviyelerinin önemli rolü olduğu bildirilmekte olup bu enzim sisteminin apoptozisi önlediği belirtilmektedir. Yapmış olduğumuz bu çalışmada doku GSH düzeyleri ile apoptozis ilişkisini değerlendirdiğimizde; duman inhalasyon grubunda apoptozisin en fazla olduğu saptandı. Bu grup aynı zamanda doku GSH seviyelerinin en yüksek saptandığı grup olup apoptozisin beklenilenin aksine GSH artışı ile negatif korelasyon gösterdiği görüldü. Daha önce belirttiğimiz gibi; hücre içi GSH seviyesi düşük olduğunda hücre içi serbest oksijen radikalleri artmakta ve bu da apoptotik süreçteki kaspaz aktivasyonunu uyarmaktadır (56,170). Duman inhalasyon grubunda, GSH düzeylerindeki bu artışın duman hasarının oluşturduğu inflamatuvar yanıt sonucu aktive lökositler tarafından ortaya çıkartılan oksidatif strese bağlı olabileceği düşünüldü. GSH düzeylerinin duman inhalasyonu + AT-III grubunda, duman inhalasyon grubundan daha düşük değerlerde saptanması ise AT-III'ün sitokin salınımını azaltarak oksidatif stresi azalttığı ve GSH antioksidan enzim sistemini indüklemeye yetersiz kaldığı fikrini telkin etmektedir. Duman inhalasyonu + AT-III grubunda histopatolojik düzelmelere ilave olarak alveoler apoptozisde de anlamlı azalmaların saptanması AT-III'ün doku hasarını önleyici etkisini GSH enzim sisteminden bağımsız olarak gerçekleştirdiğinin bir göstergesi olmaktadır. Çıkan sonuçlar doğrultusunda; AT-III'ün aktive lökositlerin dokuya göçünü engelleyerek lökositler tarafından oluşturulan oksidatif stresi azalttığı ve bu sayede alveoler apoptozisi önlediği düşünülmektedir.

TNF reseptörlerinin aktivasyonu ile programlı hücre ölümünü de içeren çeşitli hücreyel yanıtlar indüklenir. Bunlar apoptozis dışında sitotoksikite, endotelial hücrelerdeki adezyon moleküllerinin etkinliği, T hücrelerinin, fibroblastların, doğal öldürücü hücrelerin proliferasyonunu ve proinflamatuvar sitokinlerin salınımını ve nükleer faktör-kappa B'yi (NF- $\kappa$ B) indükleyerek inflamatuvar hücre ölümünün regülasyonunda rol oynar.

Akciğer dokusunda TNF- $\alpha$  reseptör aktivitesini değerlendirmek üzere yapmış olduğumuz analizde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p=0,003$ ). İleri derecede TNF- $\alpha$  reseptör aktivitesi sadece duman inhalasyon grubunda gözlemlendi. Duman inhalasyonu + AT-III grubunun büyük bir kısmında ise hafif derecede TNF- $\alpha$  reseptör aktivitesi saptandı (Şekil 27). Bu verileri serum TNF- $\alpha$  düzeyleri ile birlikte değerlendirdiğimizde; duman inhalasyonu + AT-III grubunda, doku TNF- $\alpha$  reseptör aktivitelerinin serum TNF- $\alpha$  düzeyleri ile korele olarak düşüş gösterdiği ve bu düşüşlerle ilişkili olarak akciğerlerdeki histolojik hasarın



ve alveoler apopitozisin anlamlı bir şekilde azaldığı saptandı. Bu sonuç; AT-III'ün TNF reseptörünün aracılık ettiği inflamatuvar yanıtın yanı sıra apopitozisi de önlediğinin bir başka göstergesi olmaktadır.

Yapmış olduğumuz bu çalışmanın sonucu olarak; AT-III'ün, endojen PGI<sub>2</sub> salınımını arttırmak suretiyle aktive lökositlerin dokuya göçünü önleyerek duman inhalasyonu sonrası akciğer dokusunda gelişen hasarı azalttığı histopatolojik olarak doğrulandı. Ayrıca duman inhalasyonu sonrası gelişen akciğer hasarının patogenezinde önemli rolü olduğu bildirilen iNOS aktivitesi, yapmış olduğumuz bu çalışmada AT-III tedavisi sonrası ilk kez değerlendirilmiş olup AT-III'ün respiratuvar endotelial NOS aktivitesinin modülasyonunda rol oynadığı gösterildi. AT-III'ün birbiriyle ilişkili olan bu etkilerini antioksidan etki gösteren GSH enzim sistemini aktive etmeden gerçekleştirdiği ortaya kondu. Ayrıca AT-III, duman inhalasyonu sonrası aktive olan koagülasyon enzim sistemini inhibe ederek hasarlanan dokuda trombüs ve fibrin oluşumunu önlemektedir. Bu da oluşacak doku hasarının artarak devam etmesinin önlenmesinde önemli bir basamaktır. Literatürde duman inhalasyonu sonrası gelişen akciğer hasarını azaltmak amacıyla değişik farmakolojik ajanlar kullanılmakla beraber, AT-III'ün, duman inhalasyonu sonrası akciğer hasarının gelişimindeki tüm bu basamakları engelleyebilen yegane ajan olması bunun yakın gelecekte klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

## VI. SONUÇLAR

AT-III'ün antienflamatuar etkilerini dikkate alarak yapmış olduğumuz bu çalışmada ratlarda duman inhalasyon modeli oluşturarak gelişen orta-ağır derecede akciğer hasarı üzerinde etkili faktörler ve ilacın tıropatik etkileri değerdendirildi. Yapmış olduğumuz bu çalışmadan çıkan sonuçlar;

1. AT-III'ün, duman inhalasyonu sonrası akciğer hasarının oluşmasında majör rolleri olduğu bildirilen TNF- $\alpha$  ve IL-6 sitokinlerinin salınımını inhibe ettiği gösterildi.
2. AT-III'ün, duman inhalasyonu sonrası endojen PGI<sub>2</sub> (6-keto prostaglandin F<sub>1 $\alpha$</sub> ) salınımını arttırmak suretiyle aktive lökositlerin dokuya göçünü ve nötrofil degranülasyonu (MPO aktivitesi) azaltarak bu sayede akciğer dokusunda gelişen hasarı azalttığı histopatolojik olarak gösterildi.
3. AT-III'ün, duman inhalasyonu sonrası akciğer dokusunda TNF- $\alpha$  aktivitesini serum TNF- $\alpha$  düzeyleri ile korele olarak azalttığı ve bu sayede TNF-R ilişkili apoptozis ve histopatolojik hasarı azalttığı gösterildi.
4. AT-III'ün, duman inhalasyonu sonrası pulmoner vasküler permeabiliteyi anlamlı şekilde azaltarak akciğer hasarını azalttığı histopatolojik olarak gösterildi.
5. Daha önce AT-III'ün GSH antioksidan enzim sistemi ile ilişkisini gösteren bir çalışma mevcut olmayıp yapmış olduğumuz bu çalışmadan çıkan sonuçlar doğrultusunda; AT-III'ün toksik duman inhalasyonuna maruz kalan ratlarda lipid peroksidasyonuna karşı anlamlı bir koruma sağladığı ve bunu da GSH antioksidan enzim sisteminden bağımsız olarak gerçekleştirdiği ortaya kondu.
6. Duman inhalasyonu sonrası gelişen akciğer hasarının patogenezinde önemli rolü olduğu bildirilen iNOS aktivitesi yapmış olduğumuz bu çalışmada AT-III tedavisi sonrası ilk kez değerdendirilmiş olup AT-III'ün iNOS aracılı inflamatuvar süreci iNOS aktivitesini inhibe ederek önlediği gösterildi.

## VII. KAYNAKLAR

1. Kaufman T, Neuman RA, Weinberg A. Is post burn dermal ischemia enhanced by oxygen free radicals? *Burns* 1989;15:291-294.
2. Thompson PB, Herndon DN, Traber DL, Abston S. Effect on mortality of inhalation injury. *J Trauma* 1986;26:163-165.
3. Shirani KZ, Pruitt BA, Mason AD. The influence of inhalation injury and pneumonia on burn mortality. *Ann Surg* 1987;205:82-87.
4. Tredget EE, Shankowsky HA, Taerum TV, Moyasa GL, Alton JD. The role of inhalation injury in burn trauma. *Ann Surg* 1990;212:720-727.
5. Çeliköz B. İnhalasyon yanıkları. *Ankara/GATA* 1998;25-59.
6. Gavino R, Johnson L, Bhandari V. Release of cytokines and apoptosis in fetal rat Type II pneumocytes exposed to hyperoxia and nitric oxide: modulatory effects of dexamethasone and pentoxifylline. *Cytokine* 2002;20:247-255.
7. Basadre JO, Sugi K, Traber DL, Traber LD, Niehaus GF, Nerndon DN. The effect of leukocyte depletion on smoke inhalation injury in the sheep. *Surgery* 1988;104:208-215.
8. Till GO, Beauchamp C, Menapace D. Oxygen radical dependent lung damage, following thermal injury of rat skin. *J Trauma* 1983;23:269-277.
9. Welbourn R, Goldman G, O'riordain M. Role for tumor necrosis factor as mediator of lung injury following lower torso ischemia. *J Appl Physiol* 1991;70:2645-2649.
10. Deitch EA. Multiple Organ Failure: Pathophysiology and Potential Future Therapy. *Ann Surg* 1992;216:117-134.
11. Hollingsed TC, Saffle JR, Barton RG: Etiology and consequences of respiratory failure in thermally injured patients. *Am J Surg* 1993;166:592-597.
12. Dancy DR, Hayes J, Gomez M. ARDS in patients with thermal injury. *Inten Care Med* 1999;25:1231-1236.
13. Goss CH, Brower RG, Hudson LD. Incidence of acute lung injury in the United States. *Crit Care Med* 2003;31:1607-1611.
14. Rao VM, Rapaport SI, Hoang AD. Binding of factor VIIa to tissue factor permits rapid antithrombin III/heparin inhibition factor VIIa. *Blood* 1993;81:2600-2607.
15. Okajima K, Uchiba M. The anti-inflammatory properties of antithrombin III: new therapeutic implications. *Semin Thromb Hemost* 1998;24:27-32.
16. Ohira H, Obara K, Kuroda M. Antithrombin III stimulates prostaglandin I<sub>2</sub> production by cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells. *Int Hepatology Commun* 1996;6:71-78.
17. Mitsuhiro Uchiba, Kenji Okajima. Antithrombin III (AT III) Prevents LPS-Induced Pulmonary Vascular Injury: Novel Biological Activity of AT III. *Semin Thromb Hemost* 1997;23:583-590.
18. Rue LW, Cioffi WG, Mason AD. Improved survival of burned patients with inhalation injury. *Arch Surg* 2001;128:772.
19. Muller MJ, Pegg SP, Rule MR. Determinants of death following burn injury. *Br J Surg* 2001;88:583.
20. Herndon DN, Barrow RE. Inhalation injury in burned patients: Effects and treatment. *Burns* 1988;14:34.

21. Shusterman DA. Predictors of carbon monoxide and hydrogen cyanide exposure in smoke inhalation injury. *J Toxicol Clin Toxicol* 1996;34:61.
22. Herndon DN, Traber DL, Niehaus GD. The pathophysiology of smoke inhalation injury in a sheep model. *J Trauma* 1984;24:1044-51.
23. Guy JS, Peck MD. Smoke inhalation injury: Pulmonary implications. *Respir Care* 1999;3: 904-912.
24. Demling RH, Ayres SM. Smoke inhalation injury. *Critical Care* 1995;1506-1515.
25. Clark WR. Smoke inhalation: Diagnosis and treatment. *World J Surg* 1992;16:24-26.
26. Teofilo L, Lee-Chiong. Smoke inhalation injury. *Postgraduate Medicine* 1999;2:105.
27. Shpakov IF, Venevitinov IO, Inshakov LN. Bronchoscopic methods in complex diagnosis and treatment of burned patients with inhalation injuries. *Ventn Khir Im II Grek* 1999;158:34-37.
28. Herndon DN, Traber DL, Niehaus GD. The pathophysiology of smoke inhalation injury in a sheep model. *J Trauma* 1984;24:1044-51.
29. Toor A, Tomashefski JJ, Kleinerman JJ. Respiratory tract pathology in patients in severe burns. *Hum Pathol* 1990;21:1212.
30. Baud FJ, Barriot P, Toffis V. Elevated blood cyanide concentrations in victims of smoke inhalation. *N Engl J Med* 1991;325:1761.
31. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342:1334-1349.
32. Ware LB, Matthay MA. Maximal alveolar epithelial fluid clearance in clinical acute lung injury: an excellent predictor of survival and the duration of mechanical ventilation. *Am J Resp Crit Care Med* 1999;159:694.
33. Soejima K, Schmalstieg FC, Sakurai H, Traber LD, Traber DL. Pathophysiological analysis of combined burn and smoke inhalation injuries in sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:1233-1241.
34. Pugin J, Verghese G, Widmer MC. 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.
35. Isago T, Noshima S, Traber LD, Herndon DN, Traber DL. Analysis of pulmonary microvascular permeability after smoke inhalation. *J Appl Physiol* 1991;71:1403-1408.
36. Enkhbaatar P, Traber DL. Pathophysiology of acute lung injury in combined burn and smoke inhalation injury. *Clin Sci (Lond)* 2004;107:137-143.
37. Traber DL, Traber LD, Sakurai H. Pulmonary microvascular changes seen with acute lung injury role of the bronchial circulation. *Jpn J Burn Inj* 2000;24:233-246.
38. Riyami BS, Tree R, Kinsella J. Changes in alveolar macrophage, monocyte, and neutrophil cell profiles after smoke inhalation injury. *J Clin Pathol* 1990;43:43-45.
39. Yamamoto H, Teramoto H, Uetani K. Cyclic stretch upregulates interleukin-8 and transforming growth factor- $\alpha$ 1 production through a protein kinase C-dependent pathway in alveolar epithelial cells. *Respirology* 2002;7:103-109.
40. Kavaz GÖ. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri* 1989;1:1-8.
41. Isago T, Fujioka K, Traber LD, Herndon DN, Traber DL. Derived pulmonary capillary pressure changes after smoke inhalation in sheep. *Crit Care Med* 1991;19:1407-1413.
42. Ogura H, Cioffi WG, Jordan BS. The effect of inhaled nitric oxide on smoke inhalation injury in an ovine model. *J Trauma* 1994;37:294-302.

43. Stewart RJ, Yamaguchi KT, Knost PM. Effects of ibuprofen on pulmonary oedema in an animal smoke inhalation model. *Burns* 1990;16:409-413.
44. Zwischenberger JB, Cox CS, Minifee PK. Pathophysiology of ovine smoke inhalation injury treated with extracorporeal membrane oxygenation. *Chest* 1993;103:1582-1586.
45. Sakurai H, Schmalstieg FC, Traber LD. Role of L-selectin in physiological manifestations after burn and smoke inhalation injury in sheep. *J Appl Physiol* 1999;86:1151-1159.
46. Basadre JO, Sugi K, Traber DL. The effect of leukocyte depletion on smoke inhalation injury in sheep. *Surgery* 1988;104:208-215.
47. Nişancı M, Selmanpakoğlu N. Yanık fizyopatolojisi. *Ankara/GATA* 1998:25-59.
48. Wang Cheng-Zhong, Li A Ngao, Yang Zong-Cheng. The pathophysiology of carbon monoxide poisoning and acute respiratory failure in a sheep model with smoke inhalation injury. *Chest* 1990;97:736-742.
49. Gaissert H, Lofgren RH. Upper airway compromise after inhalation injury. Complex strictures of the larynx and trachea and their management. *Ann Surg* 1993;218:672.
50. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL. 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.
51. Tomashefski JF. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin in Chest Med* 2000;21:435-466.
52. Frutos Vivar F, Nin N, Esteban A. Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2004;10:1-6.
53. Westphal M, Noshima S, Isago T. Selective thromboxane A2 synthase inhibition by OKY-046 prevents cardiopulmonary dysfunction after ovine smoke inhalation injury. *Anesthesiology* 2005;102:954-961.
54. Köksoy C, Kuzu A, Ergün H. Intestinal ischemia and reperfusion impairs vasomotor functions of pulmonary vascular bed. *Ann Surg* 2000;231:105-111.
55. Sener G, Kabasakal L, Cetinel S, Contuk G, Gedik N, Yegen BC. Leukotriene receptor blocker montelukast protects against burn-induced oxidative injury of the skin and remote organs. *Burns* 2005;31:587-596.
56. Richard BG, Jerome P, Janet SL, Michael AM. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2003;14:523-535.
57. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-526.
58. Yates DH, Kharitonov SA, Robbins RA. Effect of a nitric oxide synthase inhibitor and a glucocorticosteroid on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:892-896.
59. Moncada S, Higgs A. The L-arginine nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 1993;329:2002-2012.
60. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *Biochem Pharmacol* 1989;38:1709-1715.
61. Garthwaite J. Glutamate: nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci* 1991;14:60-67.
62. Horton JW. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology* 2003;189:75-88.
63. Szabo C. The role of peroxynitrite in the path physiology of shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 1996;6:79-88.

64. Szabo C. Potential role of the peroxynitrite-poly (ADP-ribose) synthetase pathway in a rat model of severe hemorrhagic shock. *Shock* 1998;9:341-344.
65. Soejima K, Traber LD, Schmalstieg FC. Role of nitric oxide in vascular permeability after combined burns and smoke inhalation injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:745-52.
66. Quinn DA. Combined Smoke Inhalation and Scald Burn in the rat. *Journal of Burn Care & Rehabilitation* 2003;24:208-216.
67. Soejima K, Schmalstieg FC, Sakurai H, Traber LD, Traber DL. Pathophysiological analysis of combined burn and smoke inhalation injuries in sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:1233-1241.
68. Stoclet JC, Flemming I, Gray GA. Nitric oxide and endotoxemia. *Circulation* 1993;87:77-80.
69. Cristopherson KS, Bredt DS. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J Clin Invest* 1997;100:2424-2429.
70. Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 1997;28:1283-1288.
71. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Cell Biochem Biophys* 2001;34:237-256.
72. Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 1997;74:1-20.
73. Efron DT, Kirk SJ, Regan NC. Nitric oxide generation from L Arginine is required for optimal human peripheral blood lymphocyte DNA synthesis. *Surgery* 1991;110:327-334.
74. Enkhbaatar P, Murakami K, Shimoda K. Inducible nitric oxide synthase dimerization inhibitor prevents cardiovascular and renal morbidity in sheep with combined burn and smoke inhalation injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:2430-2436.
75. Perenlei Enkhbaatar, Kazunori Murakami, Katsumi Shimoda, Akio Mizutani, Lillian Traber. The Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitor BBS-2 Prevents Acute Lung Injury in Sheep after Burn and Smoke Inhalation Injury *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2003;167:1021-1026.
76. Enkhbaatar P, Murakami K, Shimoda K. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole attenuates acute lung injury in an ovine model. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285:366-372.
77. Aytekin OF, Tekin Koray, Kabay Burhan. Antithrombin III attenuates pulmonary tissue injury caused by mesenteric ischemia-reperfusion. *The American Journal of Surgery* 2005;189:161-166.
78. Smith CW. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Semin Hematol* 1993;30:45-53.
79. Simpson R, Alon R, Kozbik L. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 1993;218:444-454.
80. Ley K, Linnemann G, Meinen M. Fucoidin but not yeast polyphosphomannan PPME inhibits leukocyte rolling in venules of the rat mesentery. *Blood* 1993;81:177-185.
81. Omata M, Matsui N, Inomata N. Protective effects of polysaccharide fucoidin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *J Cardiovascular Pharmacology* 1997;30:717-724.
82. Katahira J, Murakami K, Schmalstieg FC. Role of anti-L-selectin antibody in burn and smoke inhalation injury in sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:1043-1050.
83. Cetin C, Ozyilmaz M, Baycu C, Kose AA, Karabagli Y. Effects of rolling inhibition on smoke inhalation injury. *Burns* 2003;29:307-314.

84. Chandra A, Katahira J, Schmalstieg FC. P-selectin blockade fails to improve acute lung injury in sheep. *Clin Sci (Lond)* 2003;104:313-321.
85. Rosengren S, Olofsson AM, Von Andrian UH, Lundgren-Akerlund E, Arforske. Leukotriene B<sub>4</sub>-induced neutrophil-mediated endothelial leakage in vitro and in vivo. *J Appl Physiol* 1991;71:1322-1330.
86. Çetin C, Köse AA, Erinc A. Protective effect of Fucoidin (a neutrophil rolling inhibitor) on ischemia reperfusion injury: Experimental study in rat epigastric island flaps. *Ann Plast Surg* 1999;47:540-546.
87. Horgan MJ, Ge M, Gu J. Role of ICAM-1 in neutrophil mediated vascular injury after occlusion and reperfusion. *Am J Physio* 1991;1259:315-319.
88. Bellingan GJ. The pulmonary physician in critical care 6: The pathogenesis of ALI/ARDS. *Thorax* 2002;57:540-546.
89. Folkesson HG, Matthay MA. Inhibition of CD18 and CD11b attenuates acute lung injury after acid installation in rabbits. *J Appl Physiol* 1997;82:1743-1750.
90. Nişancı M, Selmanpakoğlu N. Yanıklar ve tedavileri. *Ankara/GATA* 1998;25-59.
91. Ischiropoulos H, Mendiguren I, Fisher D. Role of neutrophils and nitric oxide in lung alveolar injury from smoke inhalation. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:337-341.
92. Tasaki O, Mazingo DW, Ishihara S. Effect of Sulfo Lewis C on smoke inhalation injury in an ovine model. *Crit Care Med* 1998;26:1238-1243.
93. Ahn SY, Sugi K, Talke P. Effect of allopurinol on smoke inhalation in the ovine model. *J Appl Physiol* 1990;68:228-234.
94. Niehaus GD, Kimura R, Traber LD. Administration of a synthetic antiprotease reduces smoke-induced lung injury. *J Appl Physiol* 1990;69:694-699.
95. Weiland JE, Davis WB, Holter JF. Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiologic significance. *Am Rev Respir Dis* 1986;133:218-225.
96. Pittet JF, MacKersie RC, Martin TR, Matthay MA. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1187-1205.
97. Chollet Martin S, Jourdain B, Gibert J. Interactions between neutrophils and cytokines in blood and alveolar spaces during ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:594-601.
98. Armstrong L, Millar AB. Relative production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome. *Thorax* 1997;52:442-446.
99. Martin TR. Lung cytokines and ARDS: Roger S Mitchell Lecture. *Chest* 1999;116:2-8.
100. Lee CT, Fein AM, Lippmann M. Elastolytic activity in pulmonary lavage fluid from patients with adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1981;304:192-196.
101. Zhang H, Slutsky AS, Vincent JL. Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction. *Intensive Care Med* 2000;26:474-476.
102. Heflin AC, Brigham KL. Prevention by granulocyte depletion of increased lung vascular permeability of sheep following endotoxaemia. *J Clin Invest* 1981;68:1253-1260.
103. Till GO, Johnson KT, Kunkel R. Intravascular activation of complement and acute lung injury. Dependency on neutrophils and toxic oxygen intermediates. *J Clin Invest* 1982;69:1126-1135.
104. Winn R, Maunder R, Chi E. Neutrophil depletion does not prevent lung edema after endotoxin infusion in goats. *J Appl Physiol* 1987;62:116-121.

105. Laffon M, Pittet JF, Modelska K. Interleukin-8 mediates injury from smoke inhalation to both the lung endothelial and the alveolar epithelial barriers in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1443-1449.
106. Azouley E, Darmon M, Delclaux C. Deterioration of previous acute lung injury during neutropenia recovery. *Crit Care Med* 2002;30:781-786.
107. Ognibene FP, Martin SE, Parker MM. Adult respiratory distress syndrome in patients with severe neutropenia. *N Engl J Med* 1986;315:547-551.
108. Sener G, Sehirli AO, Satiroglu H, Keyer Uysal M, C Yegen B. Melatonin improves oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. *Burns* 2002;28:419-425.
109. Nelson S, Belknap SM, Carlson RW. A randomized controlled trial of filgrastim as an adjunct to antibiotics for treatment of hospitalized patients with community acquired pneumonia. CAP Study Group. *J Infect Dis* 1998;178:1075-1080.
110. Malik AB, Horgan M J. Mechanisms of thrombin-induced lung vascular injury and edema. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:467-470.
111. Anrather D, Millan MT, Palmetshofer A. Thrombin activates nuclear factor-kappaB and potentiates endothelial cell activation by TNF. *J Immunol* 1997;159:5620-5628.
112. Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004;202:145-156.
113. Strieter RM, Kunkel SL, Keane MP. Chemokines in lung injury. *Chest* 1999;116:103-110.
114. Yang H, Wang H, Tracey KJ. HMG-1 rediscovered as a cytokine. *Shock* 2001;15:247-253.
115. Kurdowska AK, Geiser TK, Alden SM. Activity of pulmonary edema fluid interleukin-8 bound to alpha(2)-macroglobulin in patients with acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:1092-1098.
116. Edward Lin, Stephen Lowry, Steve Calvano. The systemic response to injury. *Principles of Surgery Seymour I. Schwartz Seventh International Edition* 1999;1:3-51.
117. Dagmar K, Schubert T, Horch ER, Jauch WK, Jeschke GM. Insulin treatment improves hepatic morphology and function through modulation of hepatic signals after severe trauma. *Ann Surg* 2004;240:340-349.
118. Hales CA, Elsasser TH, Ocampo P, Efimova O. TNF-alpha in smoke inhalation lung injury. *J Appl Physiol* 1997;82:1433-1437.
119. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994;84:2068-2101.
120. Sakr M, Zetti G, McClain C. The protective effect of FK506 pretreatment against renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Transplantation* 1992;53:987-991.
121. Schmeling DJ, Caty MG, Oldham KT. Evidence for neutrophil-related acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *Surgery* 1989;106:195-202.
122. Caty MG, Guice KS, Oldham KT. Evidence for tumor necrosis factor-induced pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion injury. *Ann Surg* 1990;212:694-700.
123. Windsor AC, Mullen PG, Fowler AA, Sugarman HJ. Role of the neutrophil in adult respiratory distress syndrome. *Br J Surg* 1993;80:10-17.
124. Shapira L, Takashiba S, Champagne C, Amar S, Van Dyke TE. Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF-alpha and IL-1 beta production by human monocytes. *J Immunol* 1994;153:1818-1824.



125. Park WY, Goodman RB, Steinberg KP. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1896-1903.
126. Hasleton PS, Roberts TE. Adult respiratory distress syndrome-an update. *Histopathology* 1999;13:285-294.
127. Svoboda P, Kantrova I, Ochmann J. Dynamics of interleukin 1,2 and 6 and tumor necrosis factor alpha in multiple trauma patients. *J Trauma* 1994;36:336-340.
128. Jirik F, Podor TJ, Hirano T. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immunol* 1989;142:144-147.
129. Groeneveld A, Raijmakers P, Hack CE, Thijs LG. Interleukin 8-related neutrophil elastase and the severity of the adult respiratory distress syndrome. *Cytokine* 1995;7:746-752.
130. Donnelly SC, Haslett C, Reid PT. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nat Med* 1997;3:320-323.
131. Pretto EA Jr. Reperfusion injury of the liver. *Transplant Proc* 1991;23:1912-1914.
132. Horton JW, Mileski WJ, White DJ, Lipsky P. Monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 reduces cardiac contractile dysfunction after burn injury in rabbits. *J Surg Res* 1996;64:49-56.
133. Basadre JO, Sugi K, Traber DL, Niehaus GD, Herndon DN. The effect of leukocyte depletion on smoke inhalation injury in sheep. *Surgery* 1988;104:115-208.
134. Horton JW, White DJ. Role of xanthine oxidase and leukocytes in postburn cardiac dysfunction. *J Am Coll Surg* 1995;181:129-137.
135. Mileski W, Winn R, Harlan J, Rice C. Transient inhibition of neutrophil adherence with monoclonal antibody 60.3 does not increase susceptibility to abdominal sepsis. *Surgery* 1991;109:497-501.
136. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985;312:159-163.
137. Perry MO. Skeletal muscle ischemia and revascularization injury. Quality Medical Publishing 1991:330-335.
138. Kukreja RC, Hess ML. The oxygen free radical system: from equations through membrane protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res* 1992;26:641-655.
139. Loesser KE, Qian YZ, Wei EP. In vivo protection of ischemia reperfusion injury by histidine, a singlet oxygen scavenger. *FASEB J* 1992;6:1342.
140. Szabo C, Hoshima H. DNA injury induced by peroxynitrite. *Nitric Oxide Biol Chem* 1997;1:323-385.
141. Murakami K, Enkhbaatar P, Shimoda K. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase attenuates acute lung injury in an ovine model of sepsis. *Shock* 2004;21:126-133.
142. Liaudet L, Pacher P, Mabley JG. Activation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 is a central mechanism of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:372-377.
143. Pulido EJ, Shames BD, Selzman CH. Inhibition of PARS attenuates endotoxin-induced dysfunction of pulmonary vasorelaxation. *Am J Physiol* 1999;277:769-776.
144. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion-induced leukocyte infiltration: role of elastase. *Am J Physiol* 1990;259:390-394.
145. Shimoda K, Murakami K, Enkhbaatar P. Effect of poly (ADP ribose) synthetase inhibition on burn and smoke inhalation injury in sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;85:240-249.
146. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Bio* 1998;179:169-187.

147. Allan G, Bhattacharjee P, Brook CD. Myeloperoxidase activity as a quantitative marker of polymorphonuclear leukocyte accumulation into an experimental myocardial infarct-the effect of ibuprofen on infarct size and polymorphonuclear leukocyte accumulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985;7:1154-1160.
148. Kyriakides C, Austen WG, Wang Y. Neutrophil mediated remote organ injury after lower torso ischemia and reperfusion is selectin and complement dependent. *J Trauma* 2000;48:32-38.
149. Gaines GC, Welborn MB, Moldawer LL. Attenuation of skeletal muscle ischemia/reperfusion injury by inhibition of tumor necrosis factor. *J Vasc Surg* 1999;29:370-376.
150. Lindsay TF, Hill J, Ortiz F. Blokade of complement activation prevents local and pulmonary albumin leak after lower torso ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 1992;216:677-683.
151. Özden A, Sarioğlu A, Demirkan NŞ. Antitrombin III reduces renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Res Exp Med* 2001;200:195-203.
152. Özden A, Tetik C, Bilgihan A. Antitrombin III prevents 60 min warm intestinal ischemia reperfusion injury in rats. *Res Exp Med* 1999;198:237-246.
153. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982;47:412-425.
154. Richard BG, Jerome P, Janet SL, Michael AM. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury: Cytokine&Growth Factor Reviews 2003;14:523-535.
155. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81:637-647.
156. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991;161:488-503.
157. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry* 1984;222:1-15.
158. Demling R, Ikegami K, LaLonde C. Increased lipid peroxidation and decreased antioxidant activity correspond with death after smoke exposure in the rat. *J Burn Care Rehabil* 1995;16:104-110.
159. Demling RH, LaLonde C. Systemic lipid peroxidation and inflammation induced by thermal injury persists into the post-resuscitation period. *J Trauma* 1990;30:69-74.
160. Taylor AE, Matalon S, Ward PA. Physiology of Oxygen Radicals. American Physiological Society 1986.
161. Daryani R, LaLonde C, Zhu D, Weidner M, Knox J, Demling RH. Effect of endotoxin and a body burn on lung and liver lipid peroxidation and catalase activity. *J Trauma* 1990;30:1330-1334.
162. Murray JD, Nelms CD, Kaufman TM, Horton JW. Lipid peroxidation in plasma and heart tissue after burn injury. *FASEB J* 1992;6:2042.
163. Demir S, Erden MI. Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clinica Chimica Acta* 1998;275:127-135.
164. Todisco T, Polidori R. Effect of N-acetylcysteine in subjects with slow pulmonary mucociliary clearance. *Eur J Respir Dis* 1985;139:136-141.
165. Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M. The regulation of hepatic glutathione. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1985;25:715-744.
166. Maellaro E, Casini AF, Del Bello B, Comporti M. Lipid peroxidation and antioxidant systems in the liver injury produced by glutathione depleting agents. *Biochem Pharmacol* 1990;39:1513-1521.
167. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991;161:488-503.

168. Forman MB, Puett DW. Glutathione redox pathway and reperfusion injury effect of N-acetylcysteine on infarct size and ventricular function
169. Molnar Z, Shearer E, Lowe D. N-acetylcysteine treatment to prevent the progression of multisystem organ failure: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Crit Care Med* 1999;27:1100-1104.
170. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review *J Biomed Sci* 2000;7:444-458.
171. Tomaszewski JF. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin in Chest Med* 2000;21:435-466.
172. Aldridge AJ. Role of neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome. *Eur J Surg* 2002;168:204-214.
173. Hasleton PS, Roberts TE. Adult respiratory distress syndrome-an update. *Histopathology* 1999;34:285-294.
174. Lew TW, Kwek TK, Tai D. Acute respiratory distress syndrome in critically ill patients with severe acute respiratory syndrome. *JAMA* 2003;290:374-380.
175. Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004;202:145-156.
176. Sheeren T, Radermacher P. Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>): new aspects of an old substance in the treatment of critically ill patients. *Intensive Care Med* 1997;23:146-158.
177. Thomas Martin, Morio Nakamura, Gustavo Matute Bello. The role of apoptosis in acute lung injury. *Crit Care Med* 2003;31:184-188.
178. Martin T, Nakamura M, Matute B. The role of apoptosis in acute lung injury. *Crit Care Med* 2003;31:184-188.
179. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemiareperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:15-26.
180. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992;53:957-78.
181. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000;32:169-173.
182. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemiareperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:15-26.
183. Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *Am J Med* 2000;108:567-574.
184. Shpakov IF, Venevitinov IO, Inshakov LN. Bronchoscopic methods in complex diagnosis and treatment of burned patients with inhalation injuries. *Ventn Khir Im II Grek* 1999;158:34-37.
185. Bingham HG, Gallagher TJ, Powell MD. Early bronchoscopy as a predictor of ventilatory support for burned patients. *J Trauma* 1987;27:1286.
186. Thom SR, Mendiguren I, Fisher D. Smoke inhalation-induced alveolar lung injury is inhibited by hyperbaric oxygen. *Undersea Hyperb Med* 2001;28:175-179.
187. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med* 2000;342:1301.
188. Clark WR. Smoke inhalation: Diagnosis and treatment. *World J Surg* 1992;16:24.
189. Walden TL, Farzaneh MS. Biological assessment of radiation damage. *Textbook of Military Medicine* 1989;2.
190. Thompson BT. Glucocorticoids and acute lung injury. *Crit Care Med* 2003;31:253.

191. Li HP, He GJ, Kaplan AP. The influence of dexamethasone on the proliferation and apoptosis of pulmonary inflammatory cells in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Respirology* 2004;9:25-32.
192. Ren Y, Gu J, Gong C. The inhibitory effects of chloroquine and dexamethasone on the formation of pulmonary edema in the early stage of smoke inhalation injury in rats. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi* 2000;16:150-152.
193. Peng Y, Yuan Z, Li H. Removal of inflammatory cytokines and endotoxin by veno-venous continuous renal replacement therapy for burned patients with sepsis. *Burns* 2005;31:623-628.
194. Sheridan RL, Zapol WM, Ritz RH. Lowdose inhaled nitric oxide in acutely burned children with profound respiratory failure. *Surgery* 1999;126:856.
195. Shun-Zhen Q, Hong-Hang Z. The effects of inhaled nitric oxide on the levels of cGMP plasma and lung tissue in a canine model of smoke inhalation injury. *Burns* 2002;28:299-304.
196. Bloomfield GL, Holloway S, Ridings PC, Fisher BJ, Blocher CR, Sholley M, Bunch T, Sugerman HJ, Fowler AA. Pretreatment with inhaled nitric oxide inhibits neutrophil migration and oxidative activity resulting in attenuated sepsis-induced acute lung injury. *Crit Care Med* 1997;25:584-593.
197. Soejima K, McGuire R, Snyder N 4th, Uchida T, Szabo C, Salzman A, Traber LD, Traber DL. The effect of inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibition on smoke inhalation injury in sheep. *Shock* 2000;13:261-266.
198. Naidu BV, Woolley SM, Farivar AS. Simvastatin ameliorates injury in an experimental model of lung ischemia-reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:482-489.
199. Parker RA, Huang Q, Tesfamariam B. Influence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors on endothelial nitric oxide synthase and the formation of oxidants in the vasculature. *Atherosclerosis* 2003;169:19-29.
200. Kaneta S, Satoh K, Kano S. All hydrophobic HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptotic death in rat pulmonary vein endothelial cells. *Atherosclerosis* 2003;170:237-243.
201. Cetinkale O, Konukoglu D, Senel O. Modulating the functions of neutrophils and lipid peroxidation by FK506 in a rat model of thermal injury. *Burns* 1999;25:105-112.
202. Murakami K, Cox RA, Hawkins HK. Cepharanthin, an alkaloid from *Stephania cepharantha*, inhibits increased pulmonary vascular permeability in an ovine model of sepsis. *Shock* 2003;20:46-51.
203. Preobrazhenskaya ME, Berman AE, Mikhailov HI. Fucoïdan inhibits leukocyte recruitment in a model peritoneal inflammation in rat and blocks interaction of P-selectin with its carbohydrate ligand. *Biochem Moll Biol Int* 1997;43:443-51.
204. Shimaoka M, Ikeda M, Iida T. Fucoïdin, a potent inhibitor of leukocyte rolling, prevents neutrophil influx into phorbol - ester - induced inflammatory sites in rabbit lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:307-311.
205. Enkhbaatar P, Murakami K, Cox RA, Westphal M, Morita N. Aerosolized tissue plasminogen inhibitor improves pulmonary function in sheep with burn and smoke inhalation. *Shock* 2004;22:70-75.
206. Murakami K, McGuire R, Cox RA, Jodoin JM, Bjertnaes LJ, Katahira J, Traber LD. Heparin nebulization attenuates acute lung injury in sepsis following smoke inhalation in sheep. *Shock* 2002;18:236-241.
207. Murakami K, McGuire R, Cox RA. Recombinant antithrombin attenuates sepsis following smoke inhalation and pneumonia in sheep. *Crit Care Med* 2003;31:577-583.
208. Murakami K, Enkhbaatar P, Morita N. The elevation of airway antithrombin level in smoke inhalation with pneumonia in sheep. *Crit Care Med* 2004;31:28.

209. Murakami K, Enkhbaatar P, Shimoda K. High-dose heparin fails to improve acute lung injury following smoke inhalation in sheep. *Clin Sci (Lond)* 2003;104:349-356.
210. Murakami K, Cox R, Hawkins H, Schmalstieg FC, Traber LD, Traber DL. Recombinant antithrombin (RhAT) inhibits airway obstruction after smoke inhalation in sheep. *FASEB J* 2002;16:76.
211. Wong SS, Sun NN, Hyde JD. Drotrecogin alfa (activated) prevents smoke-induced increases in pulmonary microvascular permeability and proinflammatory cytokine IL-1beta in rats. *Lung* 2004;182:319-330.
212. Pratt CW, Church FC. Antithrombin: Structure and Function. *Seminars in Hematology* 1991;28:3-9.
213. Gunther A, Mosavi P, Heinemann S. Alveolar fibrin formation caused by enhanced procoagulant and depressed fibrinolytic capacities in severe pneumonia. Comparison with the acute respiratory distress syndrome. *Am Respir Crit Care Med* 2000;161:454-462.
214. T Scheeren, P Radermacher. Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>): new aspects of an old substance in the treatment of critically ill patients. *Intensive Care Med* 1997;23:146-158.
215. Opal SM, Kessler CM, Roemisch J, Knaub S. Antithrombin, heparin, and heparan sulfate. *Crit Care Med* 2002;30:325-331.
216. Y Matzner, G Marx, R Drexler, A Eldor. The inhibitory effect of heparin and related glycosaminoglycans on neutrophil chemotaxis. *Thromb Haemost* 1984;52:134-137.
217. Uchiba M, Okajima K. Antithrombin III (AT III) prevents LPS-induced pulmonary vascular injury: novel biological activity of AT III. *Semin Thromb Hemost* 1997;23:583-590.
218. Kenji Okajima, Mitsuhiro Uchiba. The Anti-Inflammatory Properties of Antithrombin III: New Therapeutic Implications. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1998;24:27-32.
219. Okano K, Kokudo Y, Okajima K. Protective effects of Antitrombin III supplementation on warm ischemia and reperfusion injury in rat liver. *World J Surg* 1996;20:1069-1075.
220. Uchiba M, Okajima K, Murakami K. Effects of Antithrombin III (AT III) and Trp 49- modified AT III on plasma level of 6-keto-PG F<sub>1α</sub> in rats. *Thromb Res* 1995;80:201-208.
221. Ostrovsky L, Woodman RC, Payne D. Antithrombin III prevents and rapidly reverses leukocyte recruitment in ischemia-reperfusion. *Circulation* 1997;96:2302-2310.
222. Fourrier F, Jourdain M, Tournays A. Clinical trial results with antithrombin III in sepsis. *Crit Care Med* 2000;28:38-43.
223. Eisele B, Lamy M, Thijs LG. Antithrombin III in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 1998;24:663-672.
224. Mammen EF. Antithrombin III and sepsis. *Intensive Care Med* 1998;24:649-650.
225. Riess H. Antithrombin in severe sepsis - new indication of an old drug? *Intensive Care Med* 2000;26:657-659.
226. Ilias W, List W, Decruyenaere J. Antithrombin III in patients with severe sepsis: a pharmacokinetic study. *Intensive Care Med* 2000;26:704-715.
227. Opal SM. Therapeutic rationale for antithrombin III in sepsis. *Crit Care Med* 2000;28:34-37.
228. Okada Y, Zuo XJ, Marchevsky AM. Antitrombin III treatment improves parameters of acute inflammation in a highly histoincompatible model of rat lung allograft rejection. *Transplantation* 1999;67:526-528.
229. Çetin C, Özyılmaz M, Bayçu C, Köse AA, Karabağlı Y. Effects of roling inhibition on smoke inhalation injury. *Burns* 2003;29:307-314.

- 230.Özyılmaz M. Duman inhalasyon hasarının önlenmesinde nötrofil rolling inhibitörü Fucoidin'in etkileri, uzmanlık tezi, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı Eskişehir, 2002.
- 231.Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;53:302-310.
- 232.Ellman GL. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-77.
- 233.Lowry OH. Protein measurement with the folin phenolreagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
- 234.Köksoy C, Kuzu MA, Kuzu I. Role of tumour necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischaemia-reperfusion. *Br J Surg* 2001;88:464-468.
- 235.Souter PJ, Thomas S, Hubbard AR. Antithrombin inhibits lipopolysaccharide induced tissue factor and interleukin-6 production by mononuclear cells, human umbilical vein endothelial cells, and whole blood. *Crit Care Med* 2001;29:134-139.
- 236.Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81:637-647.
- 237.Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991;78:651-655.