



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

PULMONER ENDOTELDE
İSKEMİYE BAĞLI HASARLA OLUŞAN
ENDOTEL FONKSİYON BOZUKLUKLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

DR. METİN ÖZTÜRK

DANIŞMAN

Doç. Dr. İbrahim KURT

AYDIN-2009

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

PULMONER ENDOTELDE
İSKEMİYE BAĞLI HASARLA OLUŞAN
ENDOTEL FONKSİYON BOZUKLUKLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

DR. METİN ÖZTÜRK

DANIŞMAN

Doç. Dr. İbrahim KURT

AYDIN-2009

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından **TPF-08003** numaralı proje olarak desteklenmiştir.

TEŐEKKÜR

Anesteziyoloji ve Reanimasyon konusunda bilgi ve deneyimlerini bilimsel bir sorumluluk ve özveriyle bizlere aktaran, yetiŐmemiz için bilgi, emek ve vakitlerini esirgemededen gerekli olanakları sağlayan sevgili hocalarıma teŐekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalıŐıp kendilerinden tıbbi ve sosyal anlamda çok Şey öğrenme fırsatı yakaladığım asistan arkadaşlarıma, tezimin uygulama aşamasında çok değerli yardımları olan ADÜBİLTEM Merkez Müdürü Doç. Dr. Serhan SAKARYA ve Biyolog Turgut ÖZTÜRK, son olarak sevgi ve özveriyle her yönden bana destek olan eşime ve aileme teŐekkür ederim.

Saygı ve sevgilerimle

Dr. Metin ÖZTÜRK

İÇİNDEKİLER

Konu	Sayfa no
Tablo Dizini	3
Şekil Dizini	4
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	5
Resimler Dizini	6
Giriş ve Amaç	7-8
Genel bilgiler	9-23
Gereç ve Yöntem	24-27
Bulgular	28-35
Tartışma	35-41
Sonuç	42
Özet	43-44
İngilizce isim ve özet	45-46
(Summary)	
Kaynaklar	47-51

TABLO DİZİNİ

Tablo no	Tablo Başlığı	Sayfa no
Tablo I	Endotelden salgılanan çeşitli mediatörler	10
Tablo II	Nitrik oksit sentezleyen enzimler	12
Tablo III	Gruplar	25
Tablo IV	% 5 CO ₂ verilen grupta apopitoz oranları	28
Tablo V	% 20 CO ₂ verilen grupta apopitoz oranları	29
Tablo VI	% 5 CO ₂ verilen grupta adezyon oranları	32
Tablo VII	% 20 CO ₂ verilen grupta adezyon oranları	33
Tablo VIII	Gruplara göre TNF- α düzeyleri (pg/ml)	34

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil no	Şekil başlığı	Sayfa no
Şekil 1	Damar endotel hücresi iskeleti. Protein, iyon, su ve çeşitli makromoleküllerin endotel tabakasından direkt ve indirekt yoldan parasellüler aralığa geçişleri	9
Şekil 2	Nitrik oksit (NO) kaynakları ve oluşumu	12
Şekil 3	% 5 CO ₂ apoptoz oranları (arg: L- arjinin, NAC: N-Asetil sistein. Sayılar ilaçların µM dozlarıdır)	29
Şekil 4	% 20 CO ₂ L- arjinin apoptoz oranları (arg: L- arjinin, Sayılar ilacın µM dozlarıdır)	30
Şekil 5	Farklı CO ₂ oranlarındaki L- arjinin apoptoz oranları (arg: L- arjinin, Sayılar ilacın µM dozlarıdır)	30
Şekil 6	% 5 CO ₂ adezyon oranları (arg: L- arjinin, NAC: N-Asetil sistein. Sayılar ilaçların µM dozlarıdır) *Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p < 0,05, # L-arjinin 30 grubu ile karşılaştırıldığında p < 0,05, † L-arjinin 100 grubu ile karşılaştırıldığında p < 0,05, ψ L-arjinin 100 grubu ile karşılaştırıldığında p < 0,01	32
Şekil 7	% 20 CO ₂ L- arjinin adezyon oranları (arg: L- arjinin, Sayılar ilacın µM dozlarıdır)	33
Şekil 8	Farklı CO ₂ oranlarındaki L- arjinin adezyon oranları (arg: L- arjinin, Sayılar ilacın µM dozlarıdır)	34

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

NOS	Nitrik oksit sentetaz	oxLDL	Okside low density lipoprotein
NO	Nitrik oksit	MCP	Monosit kemotaktan protein
COX-2	Siklooksijenaz-2	CRP	C-reaktif protein
PDH	Pirüvat dehidrogenaz	TNF-α	Tümör nekroz faktörü alfa
ATP	Adenozin tri fosfat	PAF	Trombosit aktive eden faktör
AMP	Adenozin mono fosfat	IFN-γ	İnterferon Gama
PECAM	Trombosit endotel yapışma molekülü	GM-CSF	Granülosit-monosit koloni stimule eden faktör
GAPDH	Gliseraldehid 3- fosfat dehidrogenaz	ARDS	Akut solunum sıkıntısı sendromu
PFK	Fosfofruktokinaz enzimi	LPS	Lipopolisakkarid
ROS	Reaktif oksijen köklerinin	Pi	İnorganik fosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit	MIP	Makrofaj enflamatuvar protein
NAC	N-asetilsistein	O₂⁻	Süperoksite
EDRF	Endotel kaynaklı gevşetici faktör	H₂O₂	Hidrojen peroksit
PGI₂	Prostoglandin I ₂ , prostasiklin	OH\cdot	Hidroksil radikali
VCAM	Damarsal hücre adezyon molekülü	PMN	Polimorf nüveli lökosit
ICAM	Hücreiçi hücre adezyon molekülü	MDA	Malondialdehit
PAI	Plasminojen aktivatör İnhibitörü	EGM	Endotel growth medium
IL	İnterlökin	FMN	Flavin mononükleotid
ACh	Asetilkolin	cGMP	Siklik guanozin monofosfat
FAD	Flavinadenin dinükleotid	DF	Doku faktörünün
ET	Endotelin	PAR	Protaz aktive edici reseptör
GP1b	Glikoprotein Ib	vWF	Von Willibrand faktörü
LBP	Lipopolisakkaride bağlanan protein	TAFI	Trombin ile aktive olan fibrinolizisinhibitörü
PBS	Fosfat tamponlu salin solüsyonu		

RESİMLER DİZİNİ

Resim no	Resim başlığı	Sayfa no
Resim 1	Apoptoz/ normal hücre (x10) Siyah ok normal hücre, kırmızı ok apoptotik hücre.	28
Resim 2	Adezyon (x100) 100 Hücre başına adere olan PMN	31

GİRİŞ:

Endotel eskiden sanıldığı gibi, dokularla kan arasında bulunan basit bir mekanik engel değil, tam tersine sentezlediği ve salgıladığı mediyatörlerle; vasküler tonusu, kan pıhtılaşmasını, hücre proliferasyonu, inflamasyonu, damar geçirgenliğini düzenleyen ve vücudun her tarafına yayılmış bir organ olarak kabul edilmektedir. Büyük arterleri, venleri, kapillerleri ve lenf yüzeyini döşeyen endotel hücrelerinin önemli yapısal ve işlevsel farklılıkları olmasına karşın temel fonksiyonları benzerlik göstermektedir.

İskemi endotel hücrelerinde bazı proinflamatuvar gen ürünlerinin (lökosit adezyon molekülü, sitokinler vb) ve biyoaktif bileşiklerin (endotelin, tromboksan A2 vb) sentezini artırırken, bazı koruyucu gen ürünlerinin (yapısal nitrik oksit sentetaz (eNOS), siklooksijenaz-2 (COX-2)) ve bu enzimlerin ürünlerinin (nitrik oksit (NO), prostasiklin) ekspresyon ve sentezini baskılamaktadır (1). Vasküler ve enflamatuvar hücrelerden kaynaklanan hidrojen peroksit, oksidatif stresi indükleyerek endotelde fonksiyon kaybına neden olmaktadır. Bu da koroner arter hastalığı, kalp yetmezliği, hipertansiyon, periferik arter hastalığı ve diyabet gibi hastalıklarda önemli rol oynamaktadır. İskemik dokunun reperfüzyonu ya da hipoksi/reoksijenasyon da hedef organ parankiminde ve damar endotelinde hasar oluşturan enflamatuvar bir yanıtı yol açar ve iskemi sonrası görülen hasarı artırır (2). Hipoksi, hücre hasarı ve ölümünün en önemli ve en yaygın nedenidir. En sık nedenleri damar hastalığı ya da damarın herhangi bir nedenle tıkanması, arteriyel ya da venöz kan akımının engellenmesi sonucu kan akımının kaybıdır. Hipoksinin diğer bir nedeni de solunum-dolaşım yetmezliğine bağlı kanın yetersiz oksijenasyonudur. Diğer bir neden ise anemi ya da karbon monoksit (CO) zehirlenmesinde olduğu gibi kanın oksijen taşıma kapasitesinin kaybıdır. Hipoksik devrenin şiddetine bağlı olarak hücrelerde adaptasyon, hasar ya da ölüm görülür (3).

Hipoksi hangi şekilde olursa olsun sonuçta aerobik metabolizmada kesintilere, hücresel disfonksiyon ve ölüme neden olur. Hücresel ölüm süresi dokunun metabolik ihtiyaçlarına, oksijen ve enerji depolarına ve anaerobik kapasiteye bağlıdır. Daha az süreli hipoksi durumları çeşitli organ sistemlerinde progresif fizyolojik etkiler oluşturabilir (4). Ortam oksijensiz olduğunda, pirüvat dehidrogenaz (PDH) enzimi, okside olamamış NADH₂ tarafından inhibe edilir ve sitrat çemberi gerçekleşemez. Enerji gereksinimi anaerobik glikoliz ile karşılanmaya çalışılır. Bu mekanizma, ATP ve sitrat açığını yerine koyamadığından glikoliz stimülasyonu sürer. Anaerobik glikoliz; adenosin mono fosfat (AMP), inorganik fosfat (Pi) ve hepsinden önemlisi laktat birikimine yol açar. İskemi ağırlaştıkça ve devam

ettikçe artan laktat birikimi, gliseraldehid 3- fosfat dehidrogenaz (GAPDH) enzimini ve enerji sentezini inhibe eder. Yine aynı şekilde, normalde, enerji açığında aktive olabilen fosfofruktokinaz enzimi (PFK), ağır iskemini doğurduğu intraselüler asidoz sonucunda işlev göremez ve glikoliz tamamen dururken, yıkım ürünleri hücre içinde kalır (5). Bu durum ise reaktif oksijen köklerinin (ROS) prekürsörü hipoksantin'in hücre içi birikimini artırır. İskemi sonrasında o bölgedeki kan akımının yeniden sağlanması (reperfüzyon) ve hücre içine moleküler oksijenin yeniden sunulması ile birlikte ROS türevleri hızla oluşmaktadır. ROS üretimi normal fizyolojik bir olaydır. Bununla birlikte bunların sentezindeki artışlar hücrelerde oksidasyona ve DNA hasarına yol açmaktadır (6). Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere de antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir. Belirli bir düzeye kadar olabilen oksidan molekül artışı yine vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal antioksidanlar tarafından etkisiz hale getirilmektedir.

L – arjininden sentezlenen NO inflamasyonun major mediyatörlerindendir, fizyolojik etkisi koruyucu ve antienflamatuvar yöndedir. Ancak yüksek miktarlarda salıverildiği zaman ve ortamın redoks ve oksijenasyon durumuna bağlı olarak hedef hücrelerde peroksinitrit oluşumu üzerinde moleküler hedeflerin nitrozilasyonu/nitrasyonuna neden olabilir. Ayrıca mitokondriyal solunumu, DNA sentezini inhibe edebilir (7).

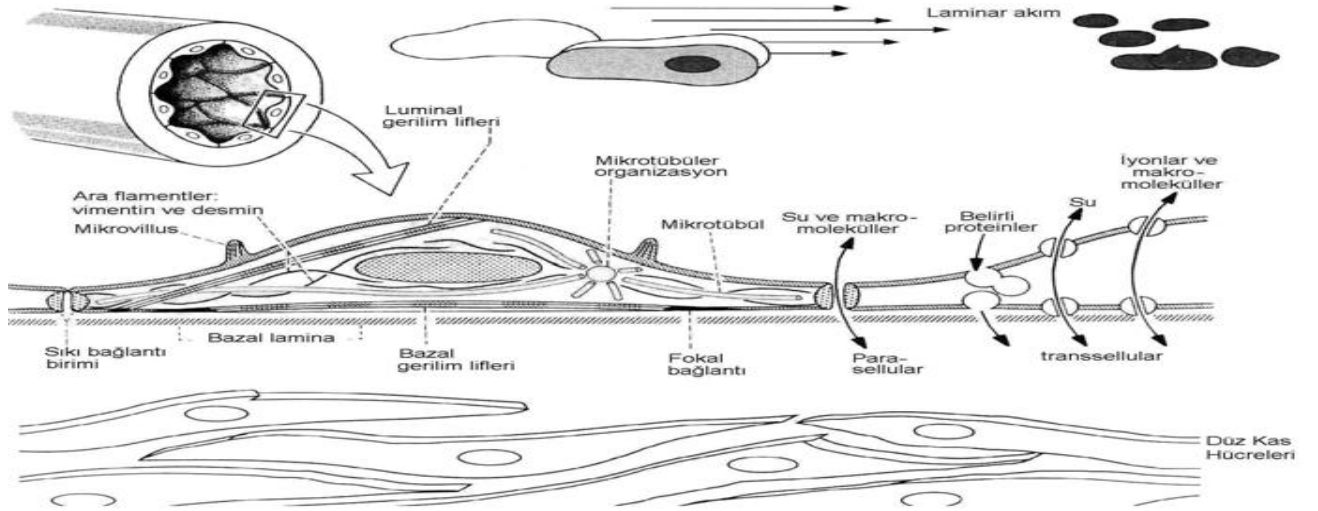
NAC (N-asetilsistein) bir tiyol bileşiği olmakla birlikte potent bir antioksidan ve antienflamatuvar özelliktedir. Aynı zamanda iyi bilinen bir glutatyon (GSH) prokürsörü ve direkt hareket etkileriyle serbest oksijen radikallerini, hidroksil radikallerini ve hipoklorik asidi esas indirgeyicisi olarak temizler (8).

Çalışmamızda deneysel hipoksi oluşturulan insan pulmoner endotel hücre kültüründe, L arjinin ve NAC'in hipoksi ile hasarlanmış pulmoner endotel hücresi üzerine etkilerini incelemeyi amaçladık.

GENEL BİLGİLER

2.1. NORMAL ENDOTEL:

Normal endotel bütün damar düz kaslarında bulunan, damar duvarını kaplayan ince bir squamöz epitel tabakasıdır. Vazodilatatör ve vazokonstriktör substratların yapımında etkili olarak, vasküler homeostazın sağlanmasında temel rol oynayan en küçük endokrin organdır (9). Yetişkin bir insanda endotelin kapladığı ortalama alan 6000 m² ve ağırlığı 2,5 kg civarındadır (10). Kaygan, parlak yüzeyle, vazodilatasyona eğilimli bir yapıdır (11). Endotel damar iç yüzeyini döşeyen tek sıra yassı hücrelerden oluşur ve kana geçirgen değildir. Pasif bir bariyer olmayıp son derece aktif olan endotel, endokrin, parakrin, otokrin fonksiyonlara sahiptir ve hemostaz ile vasküler fonksiyonların ayarlanmasında temel etkindir (Şekil 1).



Şekil 1. Damar endotel hücresi iskeleti. Protein, iyon, su ve çeşitli makromoleküllerin endotel tabakasından direkt ve indirekt yoldan parasellüler aralığa geçişleri (10, 12).

Endotel'in özgül fonksiyonları şu şekilde sıralanabilir (13):

1. Vazodilatatör veya vazokonstriktör mediyatörler salınımı ile vasküler vazomotor tonus kontrolü.
2. Dolaşımdan çevredeki dokulara madde geçişini düzenleyen yarı geçirgen bariyerin devamlılığının sağlanması.
3. Çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin sentezi ve salınımı.
4. Arter duvarındaki lipoproteinlerin değişimi ve oksidasyonu.
5. Lökosit ve trombositlere nontrombojenik yüzey sağlanması.

6. Bazal membran yapısındaki kollajen ve proteokliganlarının devamlılığının sağlanması

Endotel'in sağlıklı insanlarda normal fizyolojinin sürdürülmesinde üç ana rolü vardır (13):

1. Vasküler vazomotor regülasyonun idamesi
2. Lökosit adezyonunun ve enflamasyonun kontrolü ve denetimi
3. Tromboz ve fibrinolizis arasındaki dengenin idamesi

Normal fizyolojinin idamesi salınan birçok mediatör ile sağlanır (Tablo I)

Tablo I: Endotelden salgılanan çeşitli mediatörler (9)

Vazodilatatörler	Hücrel (Sellüler) Adezyon Molekülleri	Koagulan/Fibrinolitikler
Nitrik Oksit (NO= Endotel kaynaklı gevşetici faktör (Endothelium derived relaxing factor (EDRF)) Hiperpolarizan faktörler Prostasiklin (PGI ₂ = Prostaglandin I ₂) Bradikinin Asetilkolin	Damarsal hücre adezyon Molekülü-1 (VCAM-1= Vascular cell adhesion molecule) Hücre içi hücre adezyon molekülü (ICAM= Intracellular cell adhesion molecule) E-selektin P-selektin	von Willebrand faktör Doku tipi plazminojen aktivatörü Plazminojen aktivatör İnhibitörü (PAI)
Vazokonstriktörler	Büyüme Faktörleri	Kimokinler
Endotelin Anjiotensin II Tromboksan A ₂	Damar endoteli büyüme faktörü Trombosit kaynaklı büyüme faktörü Transformasyon büyüme faktörü Heparin- bağlayıcı epidermal büyüme faktörü M-koloni uyarıcı faktörü	Monosit kemotaktik protein Interlökin-8 (IL-8)

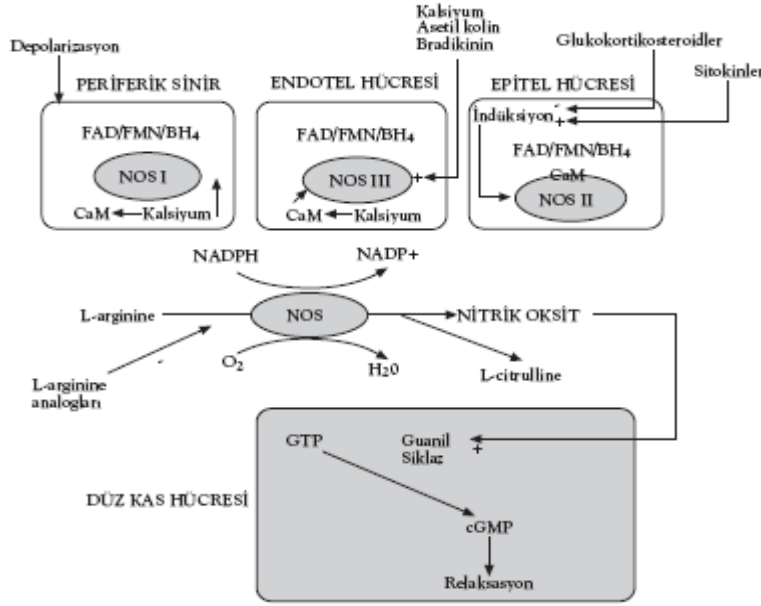
2.1.1 Endotelyal vazomotor tonus kontrolü

Vasküler yatakta vazomotor tonus kontrolü, vasküler relaksasyonla kontraksiyon arasındaki denge tarafından belirlenir. Endotel kaynaklı en önemli vazodilatatör Nitrik Oksittir (NO).

İlk olarak 1980 yılında Furchgot ve Zawadski tarafından tanımlanan tavşan aortik damar şeritlerinde noradrenalin, fenilefrin veya başka bir kesici agonistle maksimal bir kasılmanın % 60-70'i bir kasılma sağladıktan sonra ortama asetilkolin (ACh) ilavesi ile gevşemelerin oluştuğu gösterildi. Furchgot ve Zawadski bu gevşemenin endotele bağımlı olduğunu ve bu etkiden endotelden düz kasa geçebilen non-prostanoid labil bir maddenin sorumlu olduğunu ileri sürdüler. Endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) olarak adlandırılan bu maddenin, daha sonra venler, arterler ve mikrodamarlarda yapılan çalışmalarda, ACh' den başka trombin, adenin nükleotidler, P maddesi, bradikinin, bir kalsiyum iyonoforu olan A23187 ve elektriksel stimülasyonla da salınımının uyarıldığı bildirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda EDRF'nin nitrik oksit (NO) veya NO ilişkili bileşikler olduğu saptanmıştır (7, 10).

Nitrik oksit

Molekül ağırlığı 30 olup gaz tabiatındadır. Yağda çözünür ve biyolojik membranlardan kolaylıkla geçer. Çok kısa yarılanma ömrüne (3-5 sn) sahiptir. Basit kimyasal yapıya sahip olmasına rağmen oldukça farklı ve zıt etkileri bulunmaktadır (7). Nitrik oksit sentezleyen enzimlerin (NOS) katalize ettiği bir dizi reaksiyon sonucunda L-arjinin, L-sitrullin ve NO'ya dönüşür. Bu reaksiyon için ortamda oksijen ve bazı diğer ko-faktörlerin (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavinadenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN), tetrahidrobiopterin ve kalmodulin) bulunması gerekir (14, 15, 16).



Şekil 2. Nitrik oksit (NO) kaynakları ve oluşumu (14).

NO oluşumunu katalizleyen en az üç farklı enzim başka bir deyişle üç farklı NO- sentetaz (NOS) izoformu olduğu bildirilmiştir (10. Tablo II).

Tablo II. Nitrik oksit sentezleyen enzimler (14)

NOS İzoform	Diğer Adı	Salınım	Kaynak	Regülasyon	NO Miktarı	Kromozom
Tip I	nNOS	Devamlı	Sinir hücreleri	Kalsiyuma bağımlı	Düşük (picomol)	12
Tip II	iNOS	İndüklendiğinde	Makrofaj, damar düz kası, miyokard, endokard, hepatosit, immün hücreler, hava yolu epitelyumyumi	Sitokinler, endotoksin ve oksidanlar tarafından indüklenme	Yüksek (nanomol)	17
Tip III	eNOS	Devamlı	Vasküler endotel hücreleri, trombositler, miyokard, endokard. nötrofil ve mast hücreleri	Kalsiyuma bağımlı	Düşük (picomol)	7

NO: nitrik oksit, NOS: nitrik oksit sentetaz, nNOS: nöral NOS, iNOS: indüklenebilen NOS, eNOS: endotel kökenli NOS.

Endotel hücrelerinde bulunan 135 kDa ağırlığında olan endotelial NOS (eNOS) kalsiyuma bağımlı bir enzim olduğundan, intrasellüler kalsiyum (Ca^{+2}) yoğunluğun yükselmesiyle aktive olur. Nöronlarda bulunan 168 kDa ağırlığında nöronal NOS (nNOS)'da Ca^{+2} iyonuna bağımlılık gösterir. Makrofajlarda ise bakteriyel endotoksinler ve iltihabi sitokinler tarafından uyarılan, 130 kDa ağırlığında olan, indüklenebilir NOS (iNOS) enzimi bulunur. iNOS Ca^{+2} iyonuna bağımlılık göstermez. iNOS uyarıldığında eNOS nNOS enzimlerine oranla daha fazla miktarlarda ve uzun süreli NO salınımı olur (10).

Nitrik oksit bir kez sentezlendikten sonra hızla hedef dokulara yayılır ve hücre içinde guanilat siklaz enzimini aktive ederek düz kas kasılmasını sağlayan siklik guanozin monofosfat (cGMP) miktarını artırır. Oluşan bu biyokimyasal olaylar düz kas kasılması, vasküler tonüs ve kan akışının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Nitrik oksit aynı zamanda trombositler içindeki çözülebilir guanilat siklaz aktivitesini de artırarak trombosit yapışma ve kümelenmesini azaltır. Ayrıca mikroorganizmaların mitokondrial proteine bağlı demir bileşikleriyle reaksiyona girip DNA sentezini bozarak ölmelerine yol açar ve savunma sisteminde rol oynar (14).

Prostaglandinler

Endotel hücreleri çeşitli prostaglandin molekülü üretebilir. Hangi prostaglandin molekülünün üretileceği endotelin bulunduğu dokuya bağlıdır. Prostaglandin I_2 (PGI₂= Prostasiklin) vazodilatasyon yapan endotel kaynaklı bir başka mediatördür. Prostasiklin, araşidonik asit metabolizmasının bir ürünü olarak damar endotel ve düz kas hücreleri tarafından sentez edilir. Trombosit aktivasyonu, sekresyonu ve kümeleşmeyi ayrıca monositlerin endotel ile etkileşimini baskılar. Aynı zamanda düz kas hücresinin gevşemesine neden olur. Prostasiklin ve NO trombosit kümeleşmesini geriye çevirmek için sinerjik olarak rol oynarlar (17).

Endotelinler

Endotel hücrelerinin sentezlediği bir diğer grup mediatör de endotelinlerdir. Bilinen birbirine benzer 3 ayrı endotelin vardır; bunlardan endotelin-1 (ET-1), şu ana kadar izole edilmiş en güçlü vazokonstriktör ajandır. Genel olarak endotelinler vasküler tonus üzerinde lokal etki gösterirler. ET-1, ağırlıklı olarak endotel hücreleri, böbrek ve beyinde, ET-2 başlıca ince barsaklar ve böbrekte, ET-3 ise daha çok kanda bulunmaktadır. Endotelinler salgı granüllerinde depolanmaz ve her biri farklı bir gen tarafından kodlanır (18). Endotelin

hidrofilik olduğundan plazma membranını geçemez. Etkisini spesifik reseptörleri aracılığı ile gösterir. Başlıca iki reseptörü vardır; Endotelin A (ET-A) ve endotelin B (ET-B). Vasküler düz kas hücreleri ile her iki reseptör de vazokonstriksiyonda rol oynar. Vasküler endotel hücrelerinde ET-B ile NO ve PGI₂ salgılanmasında rol oynayarak vazodilatasyona yol açar (19). ET-A; ET-1 ve ET-2'ye yüksek affinite gösterirken ET-3'e affinitesi çok düşüktür. ET-B ise her üçünde de eşit affinite gösterir (9). Endotelinlerin salgılanması üzerine etkili düzenleyici faktörler de bu etkilerini gen transkripsiyonu üzerinden gerçekleştirmektedir (18).

2.1.2 Endotelial doku ve lökosit

Normal arteriyel endotelial doku lökositlerin endotel hücrelerine yapışmasına karşı dirençlidir. İnflamasyonun olduğu dokuda ekstravasküler alana lökosit geçişi arterlerden değil postkapiller venüllerden olur. Endotel hücreleri lökositleri bağlamak için özel adezyon molekülleri sentezleyip kendi hücre zarlarında sergilerler. Endotelial dokunun sentezlediği bu yapışma molekülleri immünglobülin ailesi üyeleri (VCAM ve ICAM) ve E-selektindir (20).

Endotel hücresi kendi sentezlediği E selektin dışında trombosit tarafından sentezlenen P-selektini alır ve kendi hücre zarında sergiler. Ayrıca endotel hücre zarında lökositlerdeki L-selektine bağlanan moleküller (ligand) vardır (21). Bir lökositin transmigrasyonu altı aşamada gerçekleşir (21):

1. Endotel hücresinin aktivasyonu. Endotel hücre zarında E-selektin ve P-selektin düzeyi artar.
2. Lökositin endotele geri dönüşümlü (reversible) yapışması: Selektin- reseptör etkileşimi.
3. Lökositin endotel üzerinde yuvarlanması Selektin-reseptör etkileşimi.
4. Lökositin aktivasyonu: Kemokinlerle aktive olan lenfosit yüzeyinde VCAM-1 ile bağlanan ligandların miktarı artar.
5. Lökosit, endotel bağlantısının güçlendirilmesi: Lökositlerdeki ligandların, VCAM ve ICAM ile etkileşmesi ile.
6. Lökositin iki endotel hücresi arasından dokuya geçmesi (transmigrasyon): Trombosit endotel yapışma molekülü (platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1) ve diğer birçok molekül görev alır.

2.1.3 Endotelial doku ve koagülasyon

Antikoagülasyon

Arter, ven ve kapillerde bulunan endotel hücreleri önemli fizyolojik ve morfolojik farklılıklar olmasına karşın temel işlevleri benzerlik göstermektedir. Endotel hücreleri kan hücrelerinin damar duvarına yapışmasına engel olan nontrombojenik bir yüzey oluşturarak trombozise karşı doğal bir engel oluşturur (10). Endotel hücrelerinin yüzeyindeki trombomodulin trombinin bağlar, bu kompleks trombinin koagulan özelliğini inhibe eder, trombinin protein C'ye afinitesini artırır ve protein C'yi aktive eder. Esas olarak endotelial hücreler tarafından sentezlendiği düşünülen protein S, protein C'nin kofaktörü olarak rol oynar, aynı zamanda aktive protein C olmadan da antikoagulan özellik taşır. Protrombinaz ve intrinsik tenaz kompleksini inhibe eder ve faktör Va ve VIIIa ile doğrudan etkileşir. Heparan sülfat proteoglikanlar endotelin luminal yüzeyine ve subendotel bölgelerine salgınır. Heparan sülfatlar antitrombine bağlanarak aktive ederler, böylece prokoagulan olan trombin, faktör Xa ve faktör IX a'nın inaktivasyonunu hızlandırır (17).

Prokoagülasyon

Endotel hücre yüzeyini prokoagulan hale çeviren esas olay doku faktörünün (DF) salgınımıdır. Endotel hücresi faktör IX, X trombin bağlar. Trombin endotel hücresine Protaz aktive edici reseptör (Protease-activated receptor (PAR)-1 reseptörü ile bağlanır ve hücrenden DF, PAI-1, NO, endotelin, prostasiklin salgılatır. Endotel hücresi üzerinde fibrin ve fibrin yıkım ürünleri için reseptörler vardır. Bu reseptörlere fibrin ve yıkım ürünlerinin bağlanması endotel hücresine lökosit adezyonunu artırır, endotel hücresinde deformiteye ve lökosit transmigrasyonuna yol açar. Kültüre endotel hücre zarında Von Willibrand faktörü (vWF) bağlayan glikoprotein Ib (GP1b) reseptörü saptanmıştır (21).

Fibrinolizis

Canlılarda fibrinolizis, normalde fizyolojik olarak endotel tabakasının yerine getirdiği bir işlemdir. Bu tabaka, glikozaminoglikanlar, plazminojen aktivatörleri, trombomodulin, prostoglandin I2 (PGI2) gibi antitrombotik ve antikoagulan maddeler salgılayarak, lokal olarak pıhtılaşmayı önler (22).

Endotel hücresi t-PA plazminojen aktivatör inhibitörü salgılar, plazminojeni membranına bağlar. Lipoprotein(a) plazminojen ile endotel zarına bağlanmak için yarışır. Trombomodüline bağlı formdaki trombin TAFI₁ (trombin ile aktive olan fibrinolizis

inhibitörü) aktive eder. Aktive olan TAFI fibrinden bir peptid dizisini koparır. Geride kalan fibrin molekülüne plazminojen/plazmin ve t-PA bağlanamaz ve sonuçta fibrinolizis engellenir (21).

2.2 Endotel disfonksiyonu

Endotel fonksiyonlarından biri ya da birkaçında bozulma, endotel disfonksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Endotel disfonksiyonu akut ve kronik dönemde, vasküler sistemin bütünlüğünü bozan patolojilerin gelişimine zemin hazırlamaktadır. Endotel disfonksiyonu sonucu gelişen bu patolojiler, vazokonstriksiyon, düşük dereceli inflamasyon, koagülasyona eğilim ve arter elastikiyetinde azalma olarak özetlenebilir. Bu yönüyle endotel disfonksiyonu, damar duvarında endotel tarafından sentez edilen nitrik oksidin (NO) azalması sonucu, endotele bağlı vazodilatasyonun bozulması olarak algılanmaktadır (23). Endotel disfonksiyonu terimi genellikle endotel bağımlı vazodilatasyondaki bozulmayı tanımlamak için kullanılmasına rağmen lökosit, trombosit ve düzenleyici maddelerle endotel arasındaki ilişkideki anormalliklerle, normal dışı endotel aktivasyonuna yol açan durumları da kapsar (13).

2.2.1 Endotel ve Enflamasyon

Enflamasyon, enflamatuvar bir uyarıya cevap olarak elde edilen dinamik, olaylar zinciridir. Enflamasyon alanında vazodilatasyon takiben kan akımı değişiklikleri, damar permeabilite artışı, ödem sıvısı oluşumu, lokal lökosit birikimi gözlenir. Bu birbirini takip eden olayların gelişiminde çeşitli mediatörler sorumludur.

Endotelial hücre, normal fonksiyon görebilen sağlıklı bir vasküler sistemin varlığı için hayati önem taşır. Endotel tabakası metabolik olarak oldukça aktif bir doku olup, sürekli hormonal ve hemodinamik uyarılar ile karşılaşır. Etkilerinin endokrin, parakrin ve otokrin komponentleri vardır. Başlıca fonksiyonları arasında, hemen altında yer alan vasküler düz kas hücrelerin tonusu düzenlenmesi ve öncü aterojenik olayların inhibisyonu sayılabilir ki bunlar arasında monosit ve platelet adezyon – agregasyonun önlenmesi, okside low density lipoprotein (oxLDL) yapımının baskılanması, enflamatuvar sitokinlerin sentezinin baskılanması, antitrombotik ve fibrinolitik etkiler sayılabilir (24).

Hipertansiyon, diyabet ve hiperkolesterolemi gibi geleneksel kardiyovasküler risk faktörleri endotelin koruyucu fonksiyonunun bozulmasına neden olur. Hiperkolesterolemi normal koşullarda lökositlerin sıkı adezyonuna dirençli olan endotel tabakasına kandaki

lökositlerin bağlamasına neden olur. OxLDL endotelial aktivasyona ve NO'nun hücre içi konsantrasyonunu azaltarak biyolojik karakterinin değişmesine neden olur. Hipertansiyon ile ilişkili angiotensin II vazokonstriktördür ve NO'un karşıtı olarak etkir. Angiotensin II reaktif oksijen köklerinin (ROS) üretimine, proenflamatuvar sitokinler interlökin (IL)-6 ve monosit kemotaktan protein-1 (MCP-1) ekspresyonlarının artmasına ve endotel hücrelerinde vasküler hücre adezyon molekül -1 (VCAM-1) in etkinliğinin artmasına neden olur. Yeni risk faktörlerinden C-reaktif protein (CRP) seviyesinin artması; NO üretimini baskılayarak ve biyoaktivitesini azaltarak endotelial disfonksiyona neden olabilir. Bu endotelial değişiklikler damar duvarında enflamasyona yol açarak aterosklerotik lezyonların bağlama ve ilerlemesinde bir ilk basamak oluşturur (17).

2.2.2 Endotel ve sepsis

Sepsis nonspesifik bir bakterinin organizmanın herhangi bir yerine yerleşerek uygun koşullarda üremesi sonucu, zaman zaman veya devamlı kana karışmasıyla oluşan klinik tabloya denir.

Sepsisteki fizyopatolojik olaylar oldukça karmaşıktır. Bakteri hücre duvarında yer alan birçok antijenik yapılar ve toksinler, dolaşımdaki mononükleer fagositler, endotel hücreleri ve diğer hücrelerden birçok güçlü mediyatörlerin salınımını başlatırlar. Bunların en önemlileri; tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), interlökin – 1, 2, 6 ve 8 (IL-1, IL-2, IL-6 ve IL-8) ve trombosit aktive eden faktör (PAF)'dür. Sepsiste araşidonik asit metabolitleri de önemli rol oynar. Siklooksijenaz yolla prostoglandinler ve tromboksan A2, lipooksijenaz yolla ise lökotrienler açığa çıkar. Endotoksin ve TNF, IL-1 gibi mediatörler araşidonik asit metabolitlerinin açığa çıkmasını ve sentezini aktive eder. Tromboksan A2 kuvvetli vazokonstriktör ve prostoglandinler ise vazodilatör etkiye sahiptir. Araşidonik asit metabolitleri, ateş, taşikardi, takipne, ventilasyon-perfüzyon bozukluğu ve laktik asidoz oluşumunda rol alırlar. IL-1 ve IL-6, T hücrelerini aktive eder. Gama interferon (IFN- γ), IL-2, IL-4 ve granülosit-monosit koloni stimule eden faktör (GM-CSF) oluşur. Bu sırada koagülasyon kaskadı ve kompleman sistemi de aktive olur (25).

Sepsiste hedef organ damar endotelidir ve hemen hemen bütün mediyatörler damarlar üzerine etkilidir. Endotoksin, TNF- α , IL-1, PAF, lökotrienler, tromboksan A2 ve NO endotel permeabilitesini artırır. Komplemanın aktivasyonu, damar permeabilitesini direkt veya nötrofilleri aktive ederek indirekt yolla bozar. Ayrıca degranülasyon esnasında nötrofillerden

açığa çıkan toksik oksijen radikalleri ve lizozomal enzimler de endotel permeabilitesini artırır. Damar permeabilitesinin artması ve endotel hasarı, ekstrevasyon ve mikrotrombüslerin oluşumunu kolaylaştırır. Septik şok tedavisinde naloksan, nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar (indometazin, ibuprofen), antihistaminikler, pentoksifilin denenmiş olup, klinik kullanıma girmemiştir. Doğal veya sentetik antioksidanlar; ksantin oksidaz inhibitörü (allopürinol), süperoksit dizmutaz, katalaz, NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin gibi), desferroksamin, N-asetilsistein, vitamin C ve E ile deneysel düzeyde çalışmalar devam etmektedir. Bazı hayvan modellerinde NO sentez inhibitörlerinin olumlu etkisi gösterilmiştir. Bilinen NO sentetaz inhibitörü N-monometil-L-arjinindir. L-arjinin ile az sayıda hasta ile yapılan klinik çalışmada olumlu etkisi ortaya konulamamıştır (25).

2.2.3 Endotel ve Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu (ARDS)

İlk olarak Ashbaugh 1967 yılında, adult/akut solunum yetersizliği sendromunu (ARDS), infant hiyalin membran hastalığına benzeyen pulmoner infiltrasyonların zemininde gelişen ağır bir solunum yetersizliği sendromu olarak tanımlamıştır. Bundan sonraki dönemde ARDS ile ilgili yazılarda çoğu kez adult RDS kullanılmış fakat 1987'den sonra akut RDS sözcüğünün daha doğru bir tanımlama olacağı ortak fikri ağırlık kazanmıştır (26).

Pulmoner aspirasyon veya toksik gaz inhalasyonu gibi lokalize olaylar ya da pankreatit veya sepsis gibi sistemik olayların tetiklemesi ile vücuttaki enflamatuar yanıt aktive olduğunda pulmoner ve sistemik dolaşıma birçok enflamatuar mediatör salınmaktadır (27). Enflamasyonun rol aldığı doku onarımı ile doku hasarı arasında çok hassas bir denge bulunduğu için enflamasyon iki ucu keskin bir bıçağa benzetilebilir. ARDS'de bu hassas denge bozulmakta ve enflamasyon aşırı doku zedelenmesine yol açmaktadır. Karşı konulmayan enflamasyonun sonucunda hedef organ olan akciğerlerde belirgin akciğer endotel ve epitel hücre hasarı ortaya çıkmaktadır (28). Deneysel çalışmaların bazılarında ARDS' nin enflamatuar yanıtı bir lipopolisakkarid (LPS) ile oluşturulmaktadır. Akut fazda, bu lipopolisakkaride bağlanan protein (LBP), endotoksine yapışmakta ve CD18 regülasyonu değişime uğramakta, nötrofiller endotele yapışmakta, alveolar makrofajlardan da sitokinler (TNF- α) açığa çıkmakta ve ARDS tablosunu oluşturmaktadır. Sonraki fazda LPS/LPB kompleksi CD18 ile etkileşime uğramakta ve ortaya çıkarttığı intraselüler yanıtla akciğer hasarını tetiklemektedir (29).

Meydana gelen endotel hasarı pulmoner ödeme, ayrıca pulmoner ve sistemik mikrosirkülasyon bozukluklarına yol açar. Bu enflamatuar yanıtın temel komponenti

nötrofillerdir, temel mediatör ise nötrofil aktivasyonuna ve nötrofillerin endotele yapışmasını tetikleyen TNF'dir. Interlökin-8 ve diğer sitokinler nötrofil kemoatraktanı olup nötrofil aktivasyonuna yol açarlar. Nötrofiller tetiklendiğinde degranüle olurlar, proteazlar, reaktif oksijen radikalleri ve lökotrienlerin salınımına yol açarlar. Lipid mediatörler ve platelet activating factor (PAF) azaltarak enflamasyonun daha da artmasına neden olur. Koagülasyon ve kompleman sistemleri de aktive olarak koagülasyonda artış ve fibrinolizde azalma oluşur. Endotel hasarı kapiller sızıntıya, bu da non-kardiyojenik pulmoner ödem ve pulmoner mikrosirkülasyon bozukluklarına neden olur. Bu enflamatuvar yanıtın sonucu ise solunum yetmezliği, sistemik oksijenasyonda bozulma ve ölümdür (27).

2.2.3 Endotel ve Pnömoni

Akciğer parankiminin iltihabına pnömoni adı verilmektedir. Anatomik olarak pnömoniler bir veya birkaç lobda konsolidasyon gösteriyorsa lobar pnömoni, önce bronşiol ve daha sonra çevre loblarda konsolidasyon oluşuyorsa bronkopnömoni veya lobuler pnömoni olarak adlandırılırlar. Intertisyel olarak ve bronşioelleri içine alan pnömoni şeklinde ise intertisyel pnömoni veya pnömonitis adı verilir. Pnömoniler anatomik tutulum dışında yaşa, etkene radyolojik tutulumu göre de sınıflandırılabilirler (30). Herhangi bir yolla alt solunum yollarına ulaşabilen enfeksiyon ajanlarının bir kişide enfeksiyon hastalığı geliştirmesinde (pnömoni oluşturmada), mikroorganizma ve konak arasında bir dizi etkileşim rol oynar (31). Konak savunmasında endotel fonksiyonları önemi rol oynar. Alveol içine ulaşan bakteriyel ürünler (örn. toksinler, lipopolisakkaridler gibi) alveolar makrofajları ve vasküler endotel hücrelerini aktive eder ve hızla sitokin üretimi olur (TNF-(IL-1, IL-6, IL-8, LTB₄, kemokinler). Sitokinler akut enflamatuvar yanıtın oluşmasında çok önemlidir. Nötrofil ve monositlerin damar endoteline yapışmasına yol açar. TNF ve IL-1 endotel hücrelerinden, fibroblastlardan, pulmoner epitel hücrelerinden kemokinlerin ve IL-8'in salgılanmasını artırır. Bu da enflamatuvar yanıtın oluşması ve sürdürülmesinde rol oynar. Kemotaktik aktiviteyi gösterir. Enflamasyon alanına nötrofil göçüne hizmet eder. Akut bakteriyel enfeksiyonlar esnasında respiratuar sekresyonlarda bile artmış IL-8 saptanır. Yine TNF- α MIP-2'nin *K. pneumoniae* enfeksiyonunu takiben hemen arttığı kaydedilmiştir. Anti MIP-2 antikollarının verilmesi ile *K. pneumoniae* klirensinin azaldığı gösterilmiştir. IL-8, MIP-2 (makrofaj enflamatuvar protein) fagositozu arttırdığı gösterilmiştir (31). Psödomonas pnömonisi oluşturulan hayvan modeli çalışmalarında İNO etkisi olduğu bildirilmiştir (32).

2.2.4 Endotel ve lipopolisakkarid

Gram negatif bakterilerinin hücre duvarının (dış membranının) Lipopolisakkarid (LPS) karakterindeki yapısal bir komponentidir. LPS, başlıca 3 kısımdan oluşmaktadır. Bunlardan biri, lipid porsiyonu (lipid A) toksik bir karakter taşır. Buna, merkez polisakkaridleri ile O spesifik karbonhidratlar (O antijeni) bağlanmıştır. LPS, yapısal bir özellik taşıdığından ekzotoksinler gibi dışarı salgılanamaz ancak bakteriler lizise uğradıkları zaman ortama geçerler. LPS'ler endotoksin olarak ta bilinirler. Lipid A'nin aktivitesinde, komplementin alternatif yoldan aktivasyonunun ve sitokin sentezinin uyarılmasının rolü oldukça fazladır.

Endotoksine karşı oluşan, makrofajlar/monositler, nötrofiller, trombositler ve endotel hücreleri arasında hemen her organı etkileyebilen kompleks bir etkileşime bağlıdır. Ciddi enfeksiyonlarda bu etkileşim belirgin ve uzamış yanıt genellikle zararlıdır ve yaygın organ disfonksiyonu ile sonuçlanır (33).

Makrofajların patojen mikroorganizmayı fagosite etmesi ve uyarılması ile proenflamatuvar sitokinler olan TNF- α , IL-1 ve IL-6 salınmaktadır. Daha önce de belirtildiği gibi, bu sitokinlerin yerel ve sistemik etkileri vardır ve bu etkiler doza bağımlı olarak görülmektedir. Yerel etkileri arasında en önemlisi vasküler endotel hücreleri üzerinde nötrofil göçünü sağlayacak adezyon moleküllerinin eksprese edilmesini uyarmalarıdır (34).

ICAM-1 yapısal olarak endotel hücrelerinde eksprese olur. Tümör nekroz faktör (TNF), interlökin-1 beta (IL-1 β) ve lipopolisakkarid (LPS) uyarısını takiben 24 saat içerisinde ekspresyonları artar ve 72 saat yüksek seviyede eksprese olurlar (35).

Endotel yüzeyinden eksprese edilen ICAM-1 gibi adezyon moleküllerine tutunması ile gerçekleşir. İkinci aşamada nötrofiller yüzey integrinleri ile endotel yüzeyine sıkıca tutunurlar ve endotel aralıklarından dokuya geçerler (34).

2.2.5 Hipoksi ve enflamasyon

Hipoksi; dokuların yeterince oksijen alamama durumu olarak tanımlanmaktadır. Dokuda azalan oksijen miktarı ile beraber; dokunun enerji metabolizmasında değişiklikler olduğu, doku adenozin trifosfat (ATP) miktarının azaldığı ve biriken adenozin moleküllerinin aşırı oranda yıkıma uğradığı bildirilmektedir. Ayrıca normal koşullarda reaktif oksijen köklerinin (ROS) oluşumuna yol açmayan ksantin dehidrogenazın, hipoksik koşullarda aşırı adenozin yıkımı sonucu oluşan hipoksantin enzimatik yıkımı sırasında ROS üretimine neden olduğu

bildirilmektedir (36). İskemi sürecinde mikrovasküler endotelde bulunan ksantin dehidrogenaz enzimi ksantin oksidaz enzimine dönüştürülür. Reperfüzyonda reoksijenizasyonun sağlanmasıyla, iskemi sırasında oluşan ksantin oksidaz enzimi, biriken hipoksantini ksantine dönüştürürken çok sayıda serbest oksijen radikalinde ortaya çıkmasına neden olur. Oksijen öncelikle süperoksite (O_2^-), ardından da hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikaline ($OH\cdot$) dönüşür. Nötrofillerde bulunan membrana bağımlı NADPH oksidaz enzimi ise, iskemi sırasında hücre içerisine kalsiyum akışıyla birlikte aktive olur. Aktive olan enzim NADPH'yi $NADP^+$ 'ye çevirirken reperfüzyonda sağlanan moleküler oksijenide süperoksite (O_2^-) indirger. Oksijen serbest radikallerinin reperfüzyonda ani ve çok sayıda açığa çıkması direkt endotel hasara neden olduğu gibi postiskemik dokulara nötrofil infiltrasyonuna neden olarak oksidatif hasarı daha da artırır. Nötrofillerin postiskemik dokulara toplanmasıyla birlikte yüzeylerindeki adezyon molekülleride (CD11 / CD18) aktive olur ve vasküler endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan karşı reseptörlerle (ICAM-I) reaksiyona girerler. Oluşan CD18 /ICAM-I kompleksi, nötrofillerdeki oksidanların kas hücrelerine geçişini sağlarken, endotel hasarıyla mikrovasküler bariyeride bozarak iskemi sonrasında kaslarda kapiller düzeyde akımın olmamasına neden olur (37). Pulmoner arter tromboendarrektomisini takiben reperfüzyon sonrasında görülen pulmoner ödem, endotel hücrelerinin iskemi-reperfüzyona maruz kalması sonucu değişen vasküler denge, reperfüzyon sırasında azalan NO: siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeylerine bağlı olarak gelişen vasküler disfonksiyon sonucu bozulan koagülasyon, vasküler permeabilite, vazomotor tonus, lökositlerin adezyon ve agregasyon fonksiyonunda artış klinikte akciğerlerde iskemiye takiben reperfüzyon ile karşılaşılan en önemli sorunlar olarak değerlendirilmektedir (1). Yapışmış olan nötrofiller süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen metabolitleri üreterek, direkt veya indirekt olarak pulmoner endoteli hasara uğratabilirler. Nötrofillerin akciğer ve diğer organlara sekestrasyonu multisistem organ yetmezliği gelişiminde önemli bir basamaktır. Degranülasyona bağlı olarak nötrofiller pulmoner endotel ve parankim hücrelerini hasara uğratan elastaz ve diğer proteazları serbestleştirirler. Ayrıca aktive nötrofiller, aktive olmayan hücrelerden daha serttirler. Bu da onları pulmoner kapillerler boyunca ilerlerken Reperfüzyon Hasarı şekil değişikliğine daha dirençli hale getirir. Pulmoner mikrovasküler yatakta lökosekestrasyona ilave olarak alveoler boşluklar içerisinde de enflamatuvar hücrelerin varlığı gösterilmiştir. Akciğerler aktive nötrofillere karşı özellikle duyarlı olup, seçici olarak bu hücreleri tutarlar. Bu tutulan PNL'in ileri aktivasyonu

daha sonra direkt olarak tromboksan A2 üretimini indükleyebilir, ya da indirekt olarak pulmoner parankimal tromboksan A2 sentezine neden olarak solunum disfonksiyonuna ve permeabilite değişikliğine yol açabilir (36).

Oluşan serbest radikaller yapılarındaki "eşlenmemiş elektron" nedeniyle oldukça reaktiftirler ve hücrenin DNA, protein ve lipit yapılarında hasara yol açarak hücre fonksiyonlarını bozarlar. Hücredeki tüm biyomoleküller içerisinde oksidatif hasara en hassas olan membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitleridir. Reperfüzyonla açığa çıkan süperoksit radikali ($O_2\cdot$) hidroksil radikaline ($OH\cdot$) dönüşerek hücre membranında lipit peroksidasyonunu başlatabileceği gibi, endotel kaynaklı nitrik oksitle (NO) reaksiyona girip "peroksinitrit" oluşumuna neden olarak da lipit peroksidasyonunu başlatabilir. Lipit peroksidasyonu bir kez başladıktan sonra kendi kendini devam ettiren zincirleme bir dizi reaksiyon şeklinde ilerler. Bu reaksiyonun sonucunda malondialdehit (MDA) gibi biyolojik olarak aktif ve hücre membranında parçalanmaya neden olan aldehitler açığa çıkar (37).

HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hastalıkların anlaşılmasına dönük çalışmaların canlı ortamında (in vivo) ortamda canlılar üzerinde yapılması, risk faktörlerinin araştırılması ve tedaviye yönelik girişimlerin uygulanması çoğunlukla güvenli olmamakta ve ciddi yasal-etik sorunları beraberinde getirmektedir. Bu nedenle çeşitli organ ve dokulardan alınan eksplantlardan hücre kültürleri elde etme yoluna gidilmekte, böylece in vivo ortamda yapılamayan deneysel çalışmalar in vitro ortamda hücreler üzerinde yapılabilmektedir. Hücre kültürü hücrelerin kontrollü koşullar altında yaşatılmasına dayanan bir laboratuvar işlemidir. Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar günümüzde araştırma çalışmalarının önemli bir yerini tutmaktadır. Çeşitli patolojik durumlarda (örneğin kanser) belli bir maddenin etkilerini, bir hücre ya da dokuda üretilen belli bir maddenin işlevlerini (örneğin bir protein) belirlemek amacıyla belli bir hücre serisinden çoğaltılan hücrelerde çalışmalar yapılarak canlı ortamında elde edilebilecek sonuçlara ulaşılabilir. Hücre (doku) kültürü çalışmalarının geçmişi yüz yılı aşkın bir süreyi kapsamaktadır. İlk olarak 1885'te Roux embriyonik tavuk hücrelerinin hayvanın vücudunun dışında tuz çözeltisinde canlılığını sürdürebildiğini göstermiştir. Carrel 1913'te hücrelerin aseptik koşullar altında düzenli olarak beslenmeleri halinde kültür ortamında uzun süre artabildiklerini göstermiştir. Earle ve arkadaşları 1948'de L hücre serisinden izole ettikleri hücrelerin hücre kültüründe klonlar oluşturduklarını; 1952'de de Gey ve arkadaşları bir insan servikal karsinomasından türeyen hücrelerin sürekli (continuous) serisini ortaya koymuşlardır

ki, bu bugün iyi bilinen HeLa hücre serisi olmuştur. Dünya genelinde süregelen çalışmaların devamında 1986'da Martin ve Evans ile arkadaşları fareden pluripotent embriyonik kök hücrelerini izole ederek kültürünü yapmışlar ve 1998'de de Thomson ve Gearhart ile yardımcıları insan embriyonik kök hücrelerini izole etmeyi başarmışlardır. Hücre kültürleri primer doku eksplantlarından ya da hücre süspansiyonlarından türetilebilir. Primer hücre kültürleri tipik olarak sınırlı bir yaşam süresine sahipken (belli bir bölünme sayısından sonra çoğalma durur), sürekli hücre serileri anormal (kanser hücreleri gibi) ya da transformasyona uğratılmış hücre serileridir. Tek bir hücre tipi hakkında elde edilebilecek en iyi bilgiyi edinmek için o hücrenin dokudan diğer hücre tiplerinden ayrılarak izole edilmesi gerekir. Bunun sonucunda oluşan homojen hücre popülasyonu ya doğrudan ya da kültür ortamında (besi yeri, medium) çoğaltıldıktan sonra analiz edilebilir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma ADÜBİLTEM Merkez Araştırma laboratuvarında yapılmıştır.

3.1. Hücre Kültürü

Kullanılan Malzemeler

Human Arteria Pulmonaris Endotel (HAPE) hücre kültürü, Endotel Growth Medium - 2 MV (EGM- 2 MV Lonza cc 4147), 75 cm²'lik flasklar, 24 kuyucuklu flask.

Hücre kültürünün yapılması

Hücreler azot tankından donmuş olarak çıkartılıp, 37° C'de 5 dk bekletildi ve çözüldükten sonra 75 cm²'lik flaska alındı. Üzerine hücre kültür medyumundan 10 mL ilave edilerek hafifçe çalkalandı, P₂ pasajı oluşturuldu. Hazırlanan P₂ kültür ortamı ışık mikroskobu altında kontrol edildi ve %5'lik CO₂ içeren etüvde 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Hücre kültürü ekiminin 48. saatinde ışık mikroskobunda hücrelerin canlılık durumu kontrol edildi. Daha sonra, laminer kabinde, önce 10 mL fosfat tamponlu salin solüsyonu (Phosphat Buffered Saline (PBS)) ile yıkandı ve hazırlanan hücre kültür besiyerinden 10 mL ilave edildi. Bu işlem her 48 saatte bir tekrarlandı ve hücre kültürü % 5'lik CO₂ içeren etüvde 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Üreyen hücreler flask zemininin yaklaşık % 70-80'ini doldurduğunda, hücre kültürü laminer kabinde 3 kez 5 mL PBS ile yıkandıktan sonra, 2 mL Tripsin- EDTA eklendi. 3 dk sonra hücrelerin -flasktan ayrılmışsa- 10 mL hücre kültür besiyeri eklendi. Flasktan ayrılmış olan hücreler 15 mL polipropilen tüpe alındı ve 4° C 2100 dönme hızı/dk 10 dk santrifüje edildi. Santrifüj sonrası dibe çöken hücreler, mililitrede 4x10⁵ hücre olacak şekilde seyreltildi. Daha sonra hücreler 24 kuyucuklu flasklara, her kuyucukta 2x10⁵ olacak şekilde ekim yapıldı. Her 48 saate hücreleri medyumları değiştirildi ve ışık mikroskobunda büyümeleri değerlendirildi. Hücreler flastaki kuyucukların zeminini % 70-80 oranında kapladığında gruplar oluşturuldu ve çalışmanın diğer aşamalarına geçildi.

3.2 Grupların oluşturulması:

Yirmi dört kuyucuklu flasklar inkübatörden laminer kabine alındılar, TNF- α değerlerine *ELİSA* yöntemiyle bakılmak için epandorflara 200 μ M besiyeri alındı. Daha sonra kuyucuklar iki defa PBS ile yıkandı, üzerine 500 μ M EGM ve aşağıda belirtilen dozlarda NAC(Hüsnü Arsan, Bilim İlaç) ve L-arjinin (Sigma-Aldrich) eklenerek gruplar dört saat normal ortam sağlayan % 5 CO₂ ve hipoksik ortam oluşturmak için % 20 CO₂ inkübasyona bırakıldı. Dört saatin sonunda flasklar inkübatörlerden laminer kabine alındılar. TNF- α değerlerine *ELİSA*

yöntemiyle bakmak için epandorflara 200 µL besi yeri alındı. Daha sonra gruplardaki üçüncü kuyucuktaki endotel hücreleri Mg ve Ca içermeyen PBS ile bir defa yıkandı. Üzerlerine daha önceden hazırlanan 500 µL Mg ve Ca içermeyen PBS’de 5×10^5 olan PMN eklendi ve otuz dk % 5 ve % 20 CO₂ inkübatörde inkübe edildi. Otuz dakikanın sonunda flasklar inkübatörlerden alındılar apopitoz/ normal hücre oranına, PMN’in endotel hücrelerini yapışmasına bakıldı. Yirmi dört kuyucuklu flasttaki hücreler her grupta üç kuyucuk olacak şekilde on gruba ayrılarak dört saat inkübe edildi.

Tablo III: Gruplar

	% 5 CO ₂	%20 CO ₂
Arjinin 30	30 µM L- arjinin	30 µM L- arjinin
Arjinin 100	100 µM L- arjinin	100 µM L- arjinin
NAC 10	10 µM NAC	10 µM NAC
NAC 30	30 µM NAC	30 µM NAC
Kontrol	Media	Media

NAC = N-Asetil sistein

3.2.Nötrofil hazırlanması:

Kullanılan malzemeler

İnsan kanı, 50 mL ve 15 mL polipropilen tüp, % 0,9 NaCl + % 2 Dekstran + 25 mM Na sitrat solüsyonu, Ficoll- Hypeque (Lenfosit ayıran medyum: dansite 1.077- Bio Whittaker), Distile su, % 3,5 NaCl, Ca ve Mg içermeyen PBS.

Metot:

Elli mililitre polipropilen tüpe 10 mL kan alınarak üzerine 10 ml % 0,9 NaCl + % 2 Dekstran + 25 mM Na sitrat solüsyonu eklendi. Yavaşça üç kere ters düz edilerek ve baloncuklar patlatılarak oda ısısında 45 dk bekletildi. Kırk beş dakika sonra yeni 50 mL polipropilen tüpe yüzeyde kalan lökosit zengin plazma alındı. ½ oranında dansite farkı oluşturacak şekilde tüpün dip kısmına yavaşça Ficoll- Hypeque eklendi. Karışım 400 dönme hızı/dk 20°C’de 40 dk santrifüje edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan kısım atıldı. Altta kalan kısım alındı ve üzerine 6 ml 4°C distile ve 2 mL % 3,5 NaCl eklendi 30-40 sn bekletildi. Karışım 400 dönme hızı/dk 4°C’de 15 dk Santrifüj edilerek üste kalan kısım atıldı. Altta kalan çökeltiliye nötrofilleri canlandırılmak için Ca ve Mg içermeyen PBS eklendi. Hematometrede hücre sayımı yapılarak mililitrede 10^6 Polimorf Nüveli Lökosit (PMN) olacak şekilde seyreltildi.

3.5 Apoptotik/ Normal Hücre Tayini

Dört saat otuz dakika % 5- % 20 CO₂ ve gruplarda belirtilen dozlarda maddeler ile inkübasyonu dolan hücrelerin, her grubun bir kuyucuğunda apoptotik/ normal hücre tayini aşağıda anlatılan yöntemle yapıldı.

Boya için kullanılan malzemeler

Fiksatif solüsyon (2 mg/ mL malaşit yeşili (metanolde))

Lökostat solüsyonu 1 (% 0,1 eozin Y, % 0,1 formaldehid, % 0,4 sodyum fosfat dibazik (Na₂ HPO₄), % 0,5 potasyum fosfat monobazik (KH₂PO₄))

Lökostat solüsyonu 2 (% 0,04 metilen mavisi, % 0,04 azur A, % 0,4 sodyum fosfat dibazik (Na₂ HPO₄), % 0,5 potasyum fosfat monobazik (KH₂PO₄))

Metot:

Hücre içeren tüm petripler PBS ile 2 kez yıkandı. On saniye fiksatif solüsyonda inkübe edildi. Boya dökülerek kurutma kâğıdı üzerine ters çevrilip boyanın tamamen boşalması sağlandı. On saniye lökostat solüsyonu 1’de inkübe edildi. Boya dökülerek kurutma kâğıdına ters çevrilerek boya tamamen boşaltıldı. Lökostat solüsyonu 2’de 10 saniye bekletilerek boya döküldü. PBS ile iki kez yıkanarak havada kurutuldu. Işık mikroskobu ile apoptotik ve normal hücreler sayıldı.

3.6 PMN hücresinin endotel hücresine adezyonu

Dört saat % 5 ve % 20 CO₂’de inkübe edilen hücre gruplarının, daha sonra her grubun birer kuyucuğu Mg ve Ca içermeyen PBS iki defa yıkandı ve Mg ve Ca içermeyen PBS’de 5×10^5 olan PMN eklenerek 30 dk inkübe edildi. Otuz dk inkübasyondan sonra hücre gruplarının her bir kuyucuğunda önce iki defa Mg ve Ca içermeyen PBS ile yıkandı ve Giemsa boyasıyla boyama yapılarak PMN hücresinin endotel hücresine adezyonuna bakıldı.

Kullanılan malzemeler

GIEMSA (1 mL *Giemsa* boyası 8 mL su ile seyreltildi),% 70 etil alkol

Metot:

Kuyucuklar 5 dk kurutulduktan sonra üzerlerini kaplayacak şekilde % 70 etil alkol eklendi ve 1,5 dk bekletildi. İki kez Mg ve Ca içermeyen PBS ile yıkandı. Üzerini kaplayacak şekilde seyreltilmiş *Giemsa* boyası eklendi ve 8 dk bekletildi. İki kez Mg ve Ca içermeyen

PBS ile yıkandı. PMN' in hücresinin endotel hücreğine yapışmasına ışık mikroskopunda bakıldı.

3.7 TNF- α değerlerine ELİSA yöntemiyle bakılması

Standart hazırlama

Human TNF- α Standart diluent Buffer cell ile 2000 pq/mL olacak şekilde hazırlanarak on dk karıştırıldı. 300 μ L Standart diluent Bufferd cell'de 1000 pq, 500 pq, 250 pq, 125 pq, 62,5 pq, 31,2 pq, 15,6 pq Human TNF- α Standart olacak şekilde dilüe edildi. Streptavidin–HRP dört çubuk kullanımı için 40 μ L 4 mL'de Streptavidin– HRP dilüentle dilüe edildi. Wash buffer 1/24 oranında distile su ile dilüe edildi.

Metot:

Bir adet kromotojen kuyucuğu boş olarak ayrıldı ve içerisine bir şey konulmadı. 50 μ L inkübatör bufferleri kuyucuklara koyularak (kromotojen kuyucuk hariç) üzerine 100 μ L standart ve endotel hücre kültürlerinden alınan örnekler konuldu. Üzerleri kapatıldı ve iki saat oda ısısında inkübe edildi. İki saat sonra içindekiler boşaltıldı dört kez yıkama solüsyonuyla yıkandı. Kromotojen kuyucuk hariç olmak üzere üzerlerine 100 μ L Biotin anti TNF- α konularak kapatıldı, bir saat oda ısısında inkübe edildi. Bir saat sonra içindekiler boşaltıldı ve dört kez yıkama solüsyonuyla yıkandı. 100 μ L Streptavidin-HRP working solüsyon konulup üzeri kapatılarak otuz dk oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra içindekiler boşaltıldı ve dört kez yıkama solüsyonuyla yıkandı. Hepsinin üzerine 100 μ L Stabilize Kromotojen solüsyonu konuldu ve otuz dk karanlıkta oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra üzerlerine 100 μ L Stop solüsyonu konularak hafif karıştırıldı ve 450 nm dalga boyunda fotometrik olarak okundu.

İstatistik yöntem:

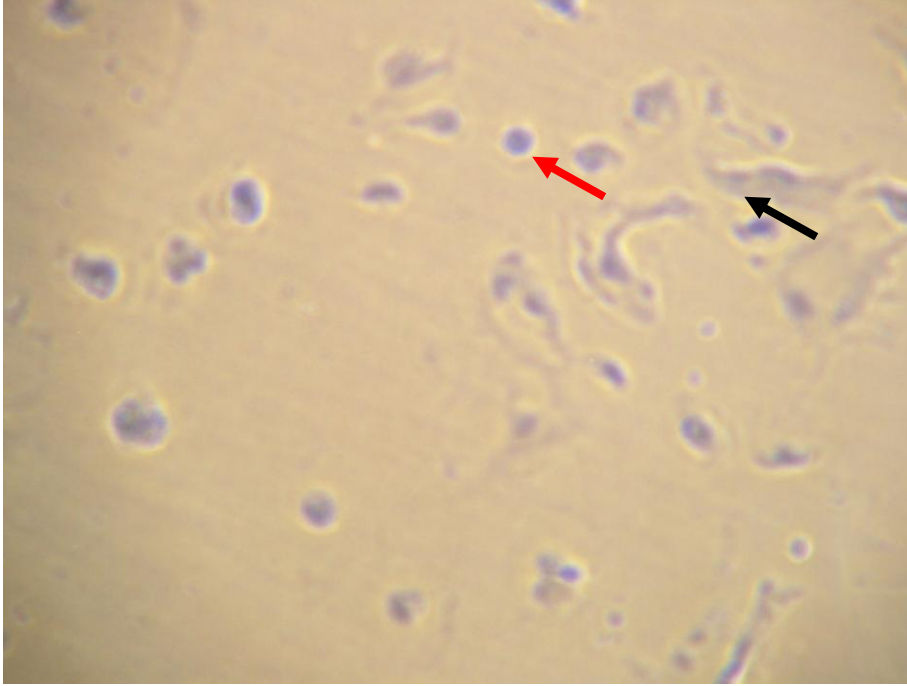
Tüm veriler ortalama \pm standart hata (SE) olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz ve grafik çizimleri GraphPad Inc Prism 2,01 (GraphPad Inc, La jolla, CA, USA) programı kullanılarak yapılmıştır. Grup içi ve gruplar arası apopitoz ve adezyon değerleri tek yönlü ANOVA, L- arjininin iki gruptaki etkileri student-t testi kullanılarak değerlendirilmiştir. p değeri 0,05 altında olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Bu çalışmada hipoksinin pulmoner arter endotel hücresinde oluşturduğu apoptoz/hücre ölümü, adezyon yanıtı ve TNF- α düzeyleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Hipoksi sonucunda hücre ölümü saptanmıştır. L- Arjinin hipoksinin neden olduğu hücre ölümünü ve adezyon artışını önlemiştir.

Hücre ölümü ve apoptoz:

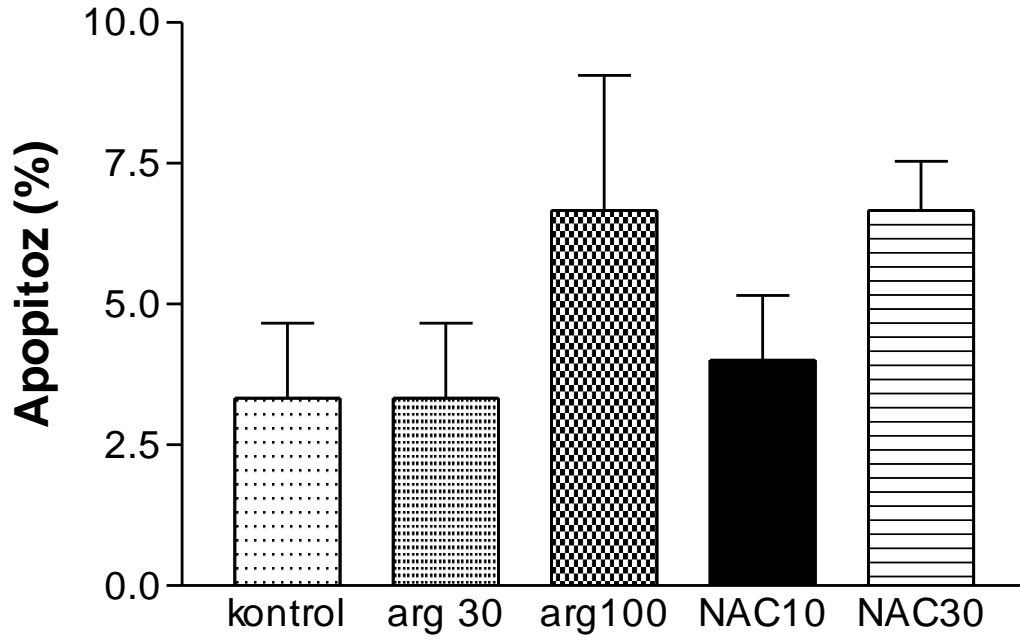
% 5 CO₂ grubunda N-asetilsistein ve L-arjinin kullanılan gruplarda kontrol grubuna göre apoptozda doz bağımlı olarak bir yükselme saptanmasına karşın (Resim 1) istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe rastlanmamıştır (Tablo IV, Şekil 3).



Resim 1: Apoptoz/ normal hücre (x10) Siyah ok normal hücre, kırmızı ok apoptotik hücre.

Tablo IV: % 5 CO₂ verilen grupta apoptoz oranları

	Ortalama	St. hata
Kontrol	3,333	1,333
Arjinin 30 μM	3,333	1,333
Arjinin 100 μM	6,667	2,403
N-Asetil sistein 10 μM	4	1,154
N-Asetil sistein 30 μM	6,667	0,882



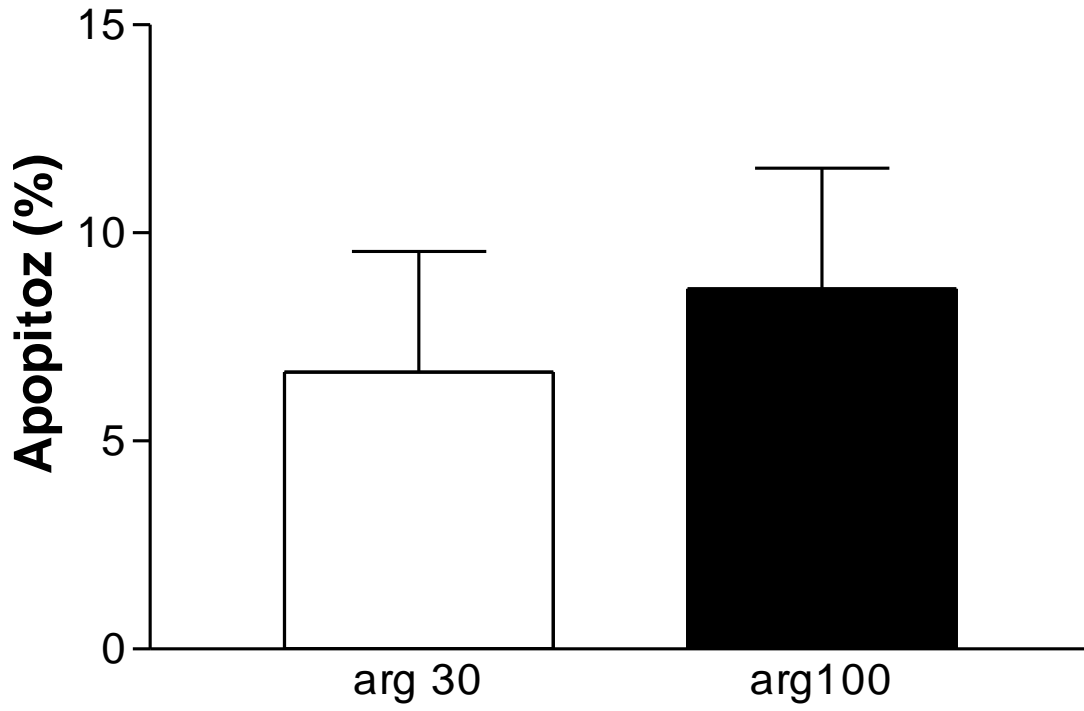
Şekil 3: % 5 CO₂ apoptoz oranları (arg: L- arjinin, NAC: N-Asetil sistein. Sayılar ilaçların µM dozlarıdır)

% 20 CO₂ verildiğinde kontrol grubu ve N-asetilsistein grubunda yaygın hücre ölümü saptanmıştır. Kontrol grubu ve N-asetilsistein grubunda hiçbir hücre saptanamadığı için istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır. L-arjininin ise her iki dozda da hücre ölümünü engellediği gözlenmiştir (Tablo V, Şekil 4).

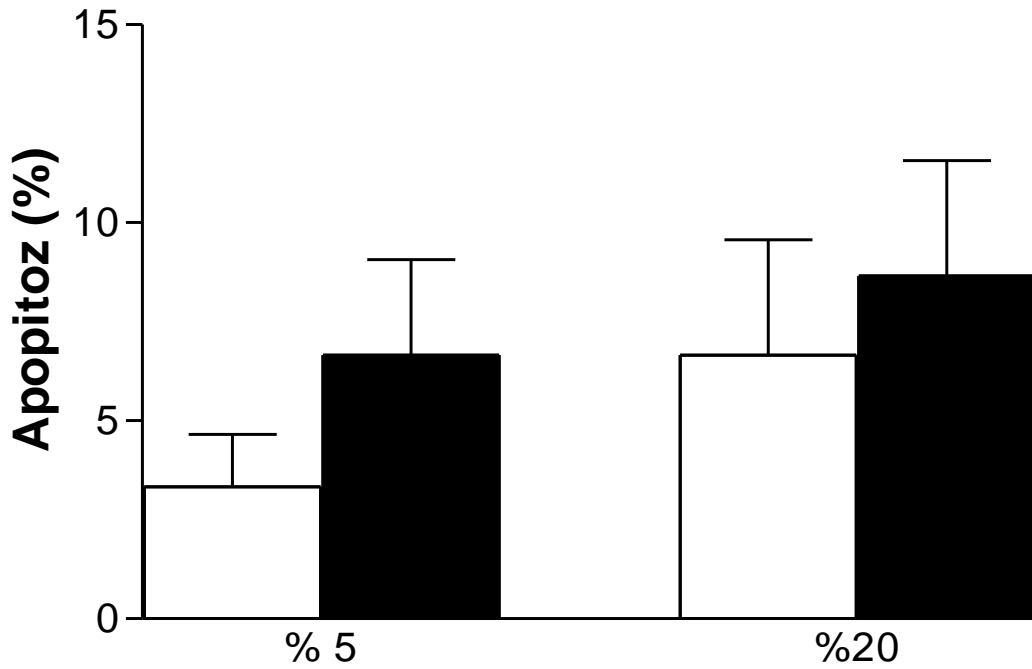
L- arjininin % 20 CO₂ altında neden olduğu apoptoz % 5 CO₂ verilen gruba göre artmasına karşın, istatistiksel olarak bir fark saptanamamıştır (Şekil 5).

Tablo V: % 20 CO₂ verilen grupta apoptoz oranları

	Ortalama	St. hata
Kontrol	Hücre yok	Hücre yok
Arjinin 30 µM	6,666667	2,905933
Arjinin 100 µM	8,666667	2,905933
N-Asetil sistein 10 µM	Hücre yok	Hücre yok
N-Asetil sistein 30 µM	Hücre yok	Hücre yok



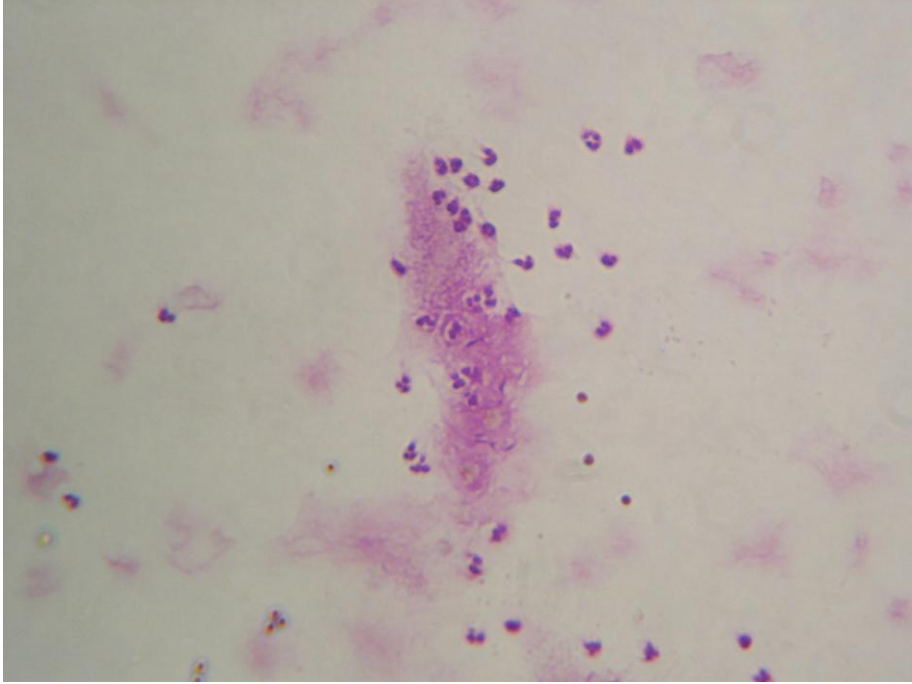
Şekil 4: % 20 CO₂ L- arjinin apoptoz oranları (arg: L- arjinin, Sayılar ilacın μM dozlarıdır)



Şekil 5: Farklı CO₂ oranlarındaki L- arjinin apoptoz oranları (arg: L- arjinin, Sayılar ilacın μM dozlarıdır)

Adezyon üzerine etki:

% 5 CO₂ verilen kontrol grubunda saptanan bazal adezyon değerleri kullanılan ilaçlara göre değişiklikler göstermiştir. L-arjinin 30 µM dozda kontrol grubuna benzer bir adezyon oluşturmaya karşılık 100 µM dozda istatistiksel anlamlı olmayan adezyon düşüklüğüne neden olmuştur (Resim 2, Tablo VI, Şekil 6). N-asetilsistein 30 µM dozda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak ($p < 0,05$) adezyon artışına yol açmıştır (Tablo VI, Şekil 6). L-arjinin 30 µM ile karşılaştırıldığında N-asetilsistein 30 µM dozda ($p < 0,05$), L-arjinin 100 µM ile karşılaştırıldığında ise N-asetilsistein gerek 10 µM dozda ($p < 0,05$) gerekse 30 µM dozda ($p < 0,01$) istatistiksel anlamlı olarak adezyon artışına yol açmıştır (Tablo VI, Şekil 6).



Resim 2: Adezyon (x100) 100 Hücre başına adere olan PMN

Tablo VI: % 5 CO₂ verilen grupta adezyon oranları

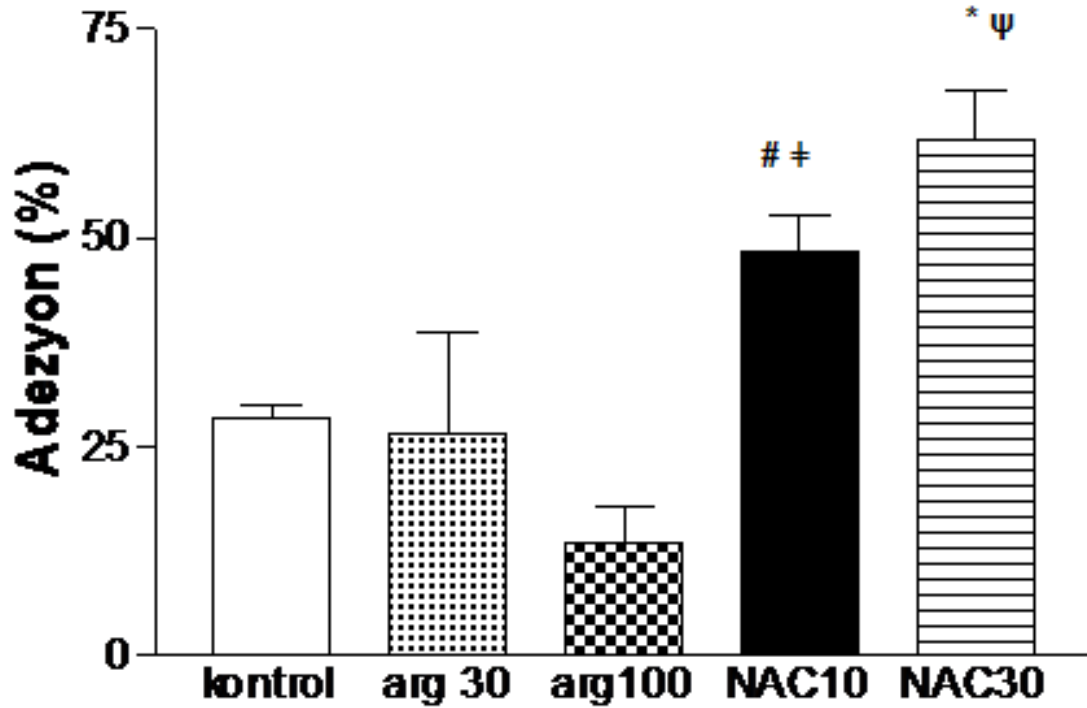
	Ortalama	St. hata
Kontrol	28,333	1,667
Arjinin 30 µM	26,667	12,018
Arjinin 100 µM	13,333	4,409
N-Asetil sistein 10 µM	48,333	4,409 # ‡
N-Asetil sistein 30 µM	61,667	6,009 * ψ

*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$

L-arjinin 30 grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$

‡ L-arjinin 100 grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$

ψ L-arjinin 100 grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,01$



Şekil 6: % 5 CO₂ adezyon oranları (arg: L- arjinin, NAC: N-Asetil sistein. Sayılar ilaçların µM dozlarıdır) *Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$, # L-arjinin 30 grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$, ‡ L-arjinin 100 grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$, ψ L-arjinin 100 grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,01$

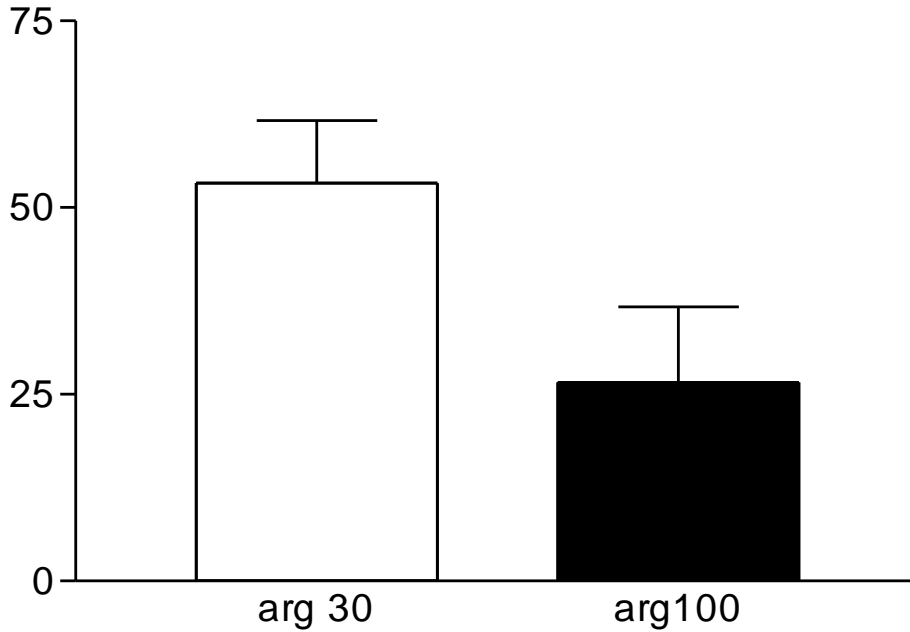
% 20 CO₂ verildiğinde kontrol grubu ve N-asetilsistein grubunda yaygın hücre ölümü saptandığı için adezyon açısından istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır. L-arjinine bakıldığında her iki dozda da istatistiksel anlamlı olmayan adezyon artışına neden olmuştur (Tablo VII, Şekil 7).

L- arjininin % 20 CO₂ altında neden olduğu adezyon % 5 CO₂ verilen gruba göre artmasına karşın, istatistiksel olarak bir fark saptanmamıştır (Şekil 8).

Tablo VII: % 20 CO₂ verilen grupta adezyon oranları

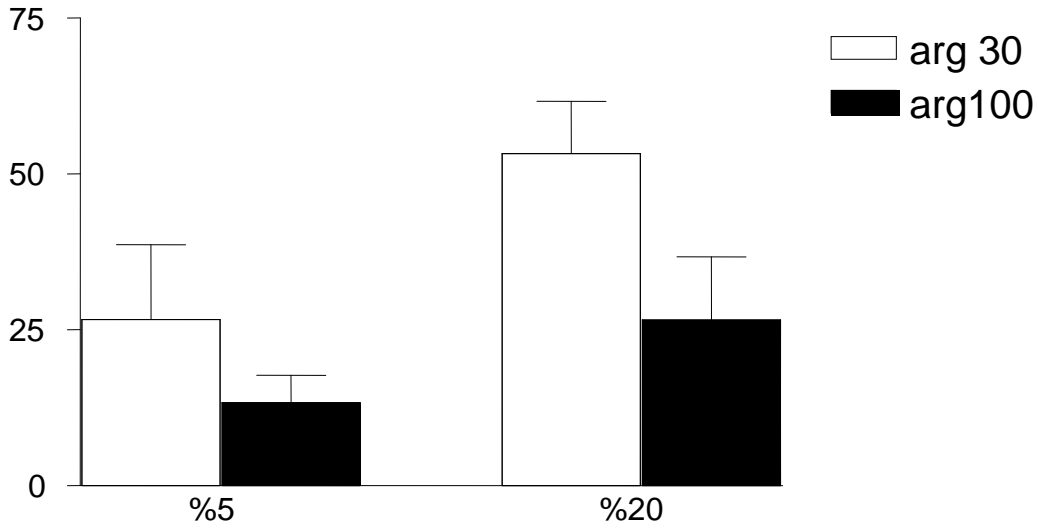
	Ortalama	St. hata
Kontrol	Hücre yok	Hücre yok
Arjinin 30 µM	53,333	8,333
Arjinin 100 µM	26,667	10,138
N-Asetil sistein 10 µM	Hücre yok	Hücre yok
N-Asetil sistein 30 µM	Hücre yok	Hücre yok

Adezyon (%)



Şekil 7: % 20 CO₂ L- arjinin adezyon oranları (arg: L- arjinin, Sayılar ilacın µM dozlarıdır)

Adezyon (%)



Şekil 8: Farklı CO₂ oranlarındaki L- arjinin adezyon oranları (arg: L- arjinin, Sayılar ilacın µM dozlarıdır)

TNF-α düzeylerine etki:

Gerek % 5 CO₂ gerekse % 20 CO₂ verilen gruplarda kullanılan ilaçlarla TNF-α düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo VIII).

Tablo VIII: Gruplara göre TNF-α düzeyleri (pg/ml)

		Bazal	Çalışma
% 5 CO ₂	Kontrol	4,607582	1,428037
	Arjinin 30 µM	0,474174	4,289628
	Arjinin 100 µM	4,925537	1,428037
	N-Asetil sistein 10 µM	3,653719	4,289628
	N-Asetil sistein 30 µM	3,971673	0,792128
% 20 CO ₂	Kontrol	3,971673	0,792128
	Arjinin 30 µM	2,699855	1,745991
	Arjinin 100 µM	2,381901	2,381901
	N-Asetil sistein 10 µM	0,792128	4,607582
	N-Asetil sistein 30 µM	3,01781	2,699855

TARTIŞMA:

Bu çalışmada hipoksinin pulmoner arter endotel hücresinde oluşturduğu apoptoz/hücre ölümü, adezyon yanıtı ve TNF- α düzeyleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Hipoksi sonucunda hücre ölümü saptanmıştır. L- Arjinin hipoksinin neden olduğu hücre ölümü ve adezyon artışını önlemiştir.

Endotel hücreleri çevresel faktörler ile fonksiyonel ve fenotipik değişiklikler oluştururlar. Endotel aktivasyonu denilen bu durum çeşitli faktörler ile endotel reseptörlerinin etkileşimi ile gelişir. Endotel yanıtı hemodinamik ve diğer mekanik güçler ile hücre içi yolağa ait sinyallerin tetiklenmesini sağlar. Bu tetikleme vazoregülasyon, damar geçirgenliği, yara gelişim ve onarım süreci ile her organda oluşur. Endotel fonksiyon bozukluğu başta sepsis, iskemi-reperfüzyon sendromu, oksidan veya toksinlere maruz kalma gibi olaylarla oluşabilir. Bunların sonucunda her organa ait bozukluklar ve sistemik bir yanıt meydana gelir. Endotel hücre aktivasyonunun mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Bu mekanizma anlaşıldığında oluşan durumların tedavisi için çeşitli yöntemlerin belirlenmesi kolaylaşacaktır.

Pulmoner endotel bozuklukları akut respiratuar distres sendromu (ARDS) gibi organa özel bozukluk yanında çoklu organ yetmezliğine (MOF) yol açabilmektedir.

Endotel hücresi aktivasyonu enflamasyonun lökosit kontrolündeki çeşitli adımlarını başlatır. Endotel aktive olunca nötrofil (PMN) yaklaşık beş dakika içinde adere olur. Bu adezyon trombini aktive eder ve hepta helikal proteaz aktive edici reseptörleri (PARs) uyarır. Böylece depo granüllerinden P-selektin açığa çıkar. Bu da trombosit aktive edici faktör'ün (PAF) hızlı sentezine neden olur. Bütün bu olaylar PMN'leri tekrar uyararak sinyali güçlendirir. Böylece enflamatuvar ve trombotik yolak aktive olur.

ARDS'de uyarılabilir adezyon molekülleri (ICAM-, E-selektin ve VCAM) pulmoner endotel hücrelerinde belirgin olarak artar (38). Bu durum akut ve kronik enflamasyonda topografik olarak gelişen heterojen gen ekspresyonuna bağlıdır. İleri çalışmalara gerek duymasına karşın bu durum pulmoner enflamasyon tedavisinde yeni yaklaşımlara öncü olacaktır.

Sheridan ve arkadaşları (39) ratlara 1 mL salin içinde 500 μ g / kg salmonella typhimurium endotoksini verirken kontrol ratlara eşit miktarda sadece salin vermişler endotoksin verilmesinden 4 saat sonra izole pulmoner arter halkalarında pulmoner vazomotor kontrol mekanizmalarını çalışmışlardır ve 4 saat sonunda nötrofil adezyonunu saptamışlardır. Endotoksin verilmesinden 30 dakika önce eksojen D veya L arjinin (300 mg/kg) verilenlerde

cGMP aracılıklı vazorelaksasyon saptanmıştır. Endotoksin artmış pulmoner vasküler rezistans, artmış nötrofil adezyonu, artmış albumin kaçağı ve pulmoner vasküler düz kas relaksasyonunu ortadan kaldırmak suretiyle akciğer hasarı oluştururken eksojen L-arjininin verilmesiyle akciğerde endotoksine bağlı gelişen PMN adezyonunu engellediğini bildirmektedirler.

Bizim çalışmamızda da Sheridan ve arkadaşlarının (39) yapmış olduğu çalışmaya benzer L-arjinin 30 µM dozda kontrol grubuna benzer bir adezyon oluşturmasına karşılık 100 µM dozda istatistiksel anlamlı olmayan adezyon düşüklüğüne neden olmuştur. N-asetilsistein 30 µM dozda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak ($p < 0,05$) adezyon artışına yol açmıştır. L-arjinin 30 µM ile karşılaştırıldığında N-asetilsistein 30 µM dozda ($p < 0,05$), L-arjinin 100 µM ile karşılaştırıldığında ise N-asetilsistein gerek 10 µM dozda ($p < 0,05$) gerekse 30 µM dozda ($p < 0,01$) istatistiksel anlamlı olarak adezyon artışına yol açmıştır.

Hipoksi gibi inflamatuvar olay sırasında, nötrofillerin endotele bağlanması, endotel hücrelerinin zararlanmasına neden olan oksidanların oluşumu ve permeabilitenin artması ile sonuçlanır. Çalışmamızda da L-arjinin nötrofillerin endotele adezyonunu azaltarak apoptozdan korumuştur.

L-arjinin, protein metabolizmasında, poliamin sentezinde ve nitrik oksit (NO) yapımında rol alan bir aminoasittir. Growth hormon, İnsülin growth faktör ve İnsülin salınımını artırır. Böylece yara iyileşmesinde ve protein sentezinin uyarılmasında rol alır. L-arjinaz ile L- ornitine metabolize olur. NO, NOS tarafından oluşturulur. Normal koşullarda NO küçük miktarlarda doku oksijenlenmesi ve immün fonksiyon üzerine olumlu etkiye sahiptir. Dışarıdan L- arjinin verildiğinde NOS-bağımlı NO artar. Bu da lenfosit, monosit proliferasyonunu artırır. Yardımcı T hücrelerini artırarak, makrofaj uyarımını, doğal öldürücü fonksiyonunu ve atık fagositozunu artırır. Bu nedenle giderek artan oranda supramaksimal dozda kullanılmaya başlanmıştır. Ancak uyarılabilir NOS'un (iNOS) aşırı uyarılması ile doğrudan enflamatuvar etki, vazodilatasyon, gastrointestinal motilite artışı, mukozal geçiş bozukluğu ve hücre solunumun bozulmasına neden olabilir. iNOS uyarımı Th1 sitokinler (iL-1, TNF ve INF gama) aracılığı ile olur. Ancak yüksek doz L-arjinin Th2 sitokinlerin (iL-4, iL-10 ve TGF beta) uyarımına da neden olur.

Kawkitinarong ve arkadaşları (40) alveoler epitel ve endotel hücrelerinde akut akciğer hasarını engelleyen sıkı kavşak kompleksi ile güçlü bir ilişkide olan periferel aktomyozin

halkalarının trombinin uyardığı adezyonun engellenmesinde bir bariyer gibi rol aldığını bildirmişlerdir. Trombin uyarımlı A549 tek katlı zarı, ZO-1 (bariyer fonksiyondaki anahtar protein) ile normalde trombinin etkisine ters bir etki oluşur.

Thickett ve arkadaşları (41) akut akciğer hasarı ve ARDS' li 9 hasta ile 14 sigara içmeyen gönüllünün olduğu kontrol grubu arasında plazma vasküler endotelial Growth Faktör(VEGF) değerlerini karşılaştırmışlardır. Plazma VEGF düzeyleri ELİSA yöntemiyle çalışılmıştır. Oluşan renk reaksiyonunu yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve böylece biyolojik olarak aktif VEGF 121 ve VEGF 165 çalışılmıştır. Sonuçta ARDS grubunda özellikle persistan sistolik hipotansiyonu olanlarda VEGF düzeylerinin belirgin olarak yüksek olduğu saptanmıştır. ARDS'de artmış vasküler geçişin VEGF tarafından sağlandığını ve ilk örnekten 72 saat sonra alınan plazmadaki VEGF düzeylerinin ARDS' li hastalarda ve ARDS' li olup 4 gün içinde ölen hastalarda arttığını bildirmişlerdir.

Adezyon ve vasküler kaçak en az dolaşımdaki mediyatörler kadar VEGF'ede bağlıdır. Klinikte kullanılan ilaçlar için bu faktöre etki düzeylerinin tedavide etkili olabileceği belirtilmektedir.

Bizim çalışmamızda hipoksiye maruz bırakılmış endotel hücrelerine L-arjinin ve NAC ekleyerek PMN'nin endotel hücrelerine adezyonu değerlendirilmiştir. L-arjinin grubunda kontrol ve NAC grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Ancak daha ileri çalışmalarda VEGF ve endotel hasarı arasındaki ilişkinin ayrıntılı olarak çalışılması bizim çalışmamızda yer almamış olup aynı konuya destek vermesinden ötürü çalışmamızın geliştirilebilir bir yönü olarak düşünmekteyiz.

Özel ürünler ile uygulanan enteral beslenme immün sistemin modülasyonu, yara iyileşmesinin düzelmesi ve oksidatif stresin azalmasını sağlayabilir. L-arjinin, L-glutamin, omega-3-yağ asitleri, selenyum, A, C, E vitaminleri ve karoten supramaksimal dozlarda immün beslenme amacı için kullanılırlar. Bu ürünlerin tek başına veya birlikte mi daha fazla etkili oldukları bilinmemektedir. Buna karşın özellikle L-arjinin ve L-glutamin tek başlarına veya balık yağı ve antioksidanlarla birlikte kullanılırlar.

Çeşitli çalışmalarda diğer ürünlerle birlikte kullanılan L-arjininin yoğun bakım hastalarında mortalite ve enfeksiyon gelişimini önlemede etkisiz olduğu gösterilmiştir (42-45). Bu çeşit kullanım yalnızca hastanede kalış süresinde azaltmakta faydalı olmaktadır (46). Tüm bu nedenlerle L-arjininin klinik kullanımı giderek kısıtlanmaktadır. Ancak son dönemde bazı çalışmalarda L- arjininin olumlu etkileri olduğu şeklinde yayınlar olmaktadır (47).

Nelin ve arkadaşları (48) sığır pulmoner arter endotel hücrelerini yaklaşık 250 mM L-arjinin içeren 5 ml' lik EGM' ye ekmişlerdir ve 0,1 ile 0,01 mg/ ml LPS' nin tek başına eklenmesiyle NO ve üre üretiminde çok az artış olması üzerine TNF-alfa ve LPS kombinasyonunu kullanmışlardır. Bu kombinasyonun verilmesi eNOS ve iNOS proteinlerinde artışa neden olmuştur. Bu artışın özellikle iNOS tarafından sağlandığı saptanmıştır. Hem kontrol hem de kombinasyon grubunda artmış ekstrasellüler arjinin konsantrasyonunun doza bağımlı NO artışına neden olduğu saptanmıştır. Buna bağlı olarak da artmış NO yapımının olduğu ARDS ve septik şokta L-arjinin veya taşıyıcılarının alımının kesilmesinin tedavinin bir parçası olacağını bildirmektedirler.

Bizim çalışmamızda kullandığımız L-arjinin dozları Nelin ve arkadaşlarının (48) yapmış olduğu dozlara göre daha düşük olduğundan adezyonu ve endotel hücrelerinin apoptozunu engellediği bulunmuştur. Çalışmamızda % 20 CO₂ verildiğinde kontrol grubu ve N-asetilsistein grubunda yaygın hücre ölümü saptanmıştır. Kontrol grubu ve N-asetilsistein grubunda hiçbir hücre saptanamadığı için istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır. L-arjininin ise her iki dozda da hücre ölümünü engellediği gözlenmiştir.

Lang ve arkadaşları (49) fetal rat akciğeri tip 2 alveoler hücreleri olarak İFN-g, TNF- α , İL-1 β , LPS ve L-NMMA(N-monometil L-arginin) ekleyip %5 ve %15 'lik CO₂ li ortamlarda bekletmişler. Tip 2 alveoler hücreler 48 saat boyunca çeşitli işlemlere tutulup apoptoz değerlendirilmiştir. Hiperkapni ile sağlanan sitokin aracılıklı NO üretimini saptamak için hücresel NO₂ ve NO₃ üretimine bakılmıştır. %5 CO₂ maruz bırakılan grupta NO₂ ve NO₃ üretimi belirgin olmasına rağmen % 15 CO₂ grupta daha fazla üretim olmuştur. Apoptotik nükleus %5 CO₂ li grupta minimalken %15 lik CO₂ li grupta belirgin olarak artmıştır. LPS ve sitokin kombinasyonu verilen hücrelerde oksidatif ve nitrik oksit aracılıklı stresi içeren inflamatuvar cevapların arttığını saptamışlardır. Ve bu etkinin NOS inhibitörü olan N-monometil-L-arjinin tarafından azaltıldığını bildirmişlerdir. Sonuç olarak ARDS akciğerine gidişte pulmoner hücre iNOS hücre ekspresyonu ve NO üretimi proinflamatuvar süreci hızlandırmaktadır.

Bizim çalışmamızda N-asetilsistein eklenen %20 CO₂ grubunda hiç hücre saptanamazken, düşük doz L arginin eklenen grupta daha az apoptotik aktivite gözlenmiştir. Lang ve arkadaşlarının (49) çalışma grubunda %15 CO₂ kullanılmasına karşın bizim çalışmamızda %20 CO₂ kullanılması yüksek doz L-arjininden iNOS hücre ekspresyonu ve NO üretimini arttırarak proinflamatuvar süreci hızlandırmıştır.

N- asetilsistein klinikte sık olarak kullanılan, antioksidan özelliğe sahip bir tiyol türevidir. Glutatyon (GSH) prokürsörü ve direkt hareket etkileriyle serbest oksijen radikallerini, hidroksil radikallerini ve hipoklorik asidi esas indirgeyicisi olarak temizler (8). NAC yüksek dozlarda iNOS'ın etkili bir inhibitörüdür. Antioksidan etkilerinin ötesinde sitokin ekspresyon ve salınımını baskılayarak, adezyon molekülü ekspresyonunu ve NF-KB ekspresyonunu inhibe ederek direkt antienflamatuar etki göstermektedir (8).

NAC son dönemlerde immün tedavi kapsamında giderek daha sık oranda yoğun bakım hastalarında kullanılmaktadır (50-53). Deneysel çalışmalarda NAC'in antioksidan olmasının yanı sıra adezyonu ve enflamasyonu azaltmasına karşın çok merkezli kontrollü çalışmalarda bu etkilerinin klinik olarak olumlu yansımaları gösterilememiştir.

Bizim çalışmamızda son zamanlardaki sonuçların tersine L- arjininin hücreleri iskemiden koruduğu, adezyonu engellediği; N- asetilsisteinin ise koruyucu etkisinin neredeyse hiç olmadığı saptanmıştır. Ancak yine de immün beslenme lehine olan ilk dönem (39) ve son zamanlardaki yayınları (54,55) destekler sonuçlar elde edilmiştir.

Hajime Kin ve arkadaşlarının (56) yaptığı çalışmada anestezi altındaki ratlar 4 gruba ayrılmıştır. Otuz dk'lık iskemi ve 3 saatlik reperfüzyon sürecinde PMN baskılanması izlenmiştir. İskemiden 6 saat önce antiPMN serum ve yine iskemiden önce ve reperfüzyon döneminde NAC verilmiştir. DNA fragmantasyonu ve TUNEL yöntemiyle apoptoz, immunohistokimyasal yöntemiyle PMN adezyonu ELİSA ile TNF-alfa IL-6 ve caspase-3 seviyeleri son olarakta Western blot yöntemiyle NFkB, Bcl-2 ve Bax ekspresyonları çalışılmıştır. Sonuç olarak NAC tedavisinin TNF-alfa ve IL-6 düzeylerini ve PMN adezyonunu azalttığı saptanmıştır. Apoptotik hücre sayısı antiPMN ve NAC verilen grupta kontrol grubuna göre belirgin düzeyde azalmıştır.

Bizim çalışmamızda NAC verilen grupta adezyon apoptoz ve TNF-alfa düzeylerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında bir fark bulunamamıştır. L-arjinin grubuyla kıyaslandığında adezyon ve apoptozda artış saptanmıştır. Farklı ve yüksek dozlarda NAC kullanarak çalışmamızı geliştirdiğimizde olumlu sonuçlar alacağımızı düşünmekteyiz.

Boger ve arkadaşları (54) kanda L-arjinin analogu olan asimetrik dimetil arjinin (ADMA) düzeylerinin artmasının NO formasyonunu inhibe ederek çeşitli hastalıklarda vasküler fonksiyonu düzelttiğini bildirmişlerdir.

Bu sonuçlar bizim çalışma protokolümüzdeki farklılıklardan kaynaklanabilir. Çalışmamızdaki L-arjinin dozu klinik olarak yüksek ve çok yüksek dozlara karşılık gelmesine karşın olumsuz bir etkisine rastlanmamıştır.

NAC açısından ise beklenti hücreleri koruması ve antiinflamatuvar etki göstermezken, iskemide hiçbir koruyucu etki saptanamamıştır.

Apopitoz, ekstresek (hücre ölümü reseptörleri uyarılır), intrinsek mitokondrial yolak ve endoplazmik retiküler yolak (stres ile aktive olur) olacak şekilde üç ana yoldan biri ile gelişir. PMN, ARDS’de innat apopitozu tetikler. PMN’in kendi apopitozunun yanında diğer hücrelerin apopitozunu da desteklediği ileri sürülmüş, ancak kanıtlanamamıştır. Apopitoz hücre nekrozundan farklı olarak inflamatuvar süreci etkilemez, ancak apopitoza uğrayan hücreleri içeren organın fonksiyonları bozulur. Nekrozun neden olduğu enflamasyonu önlemeye çalışan tedavi protokolleri yanında farklı görüşler olmasına karşın apopitozu engellemeye yönelik tedavi protokolleri de güncel araştırma konularındandır.

Çalışmamızda TNF- α düzeylerinde anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. ARDS’nin erken ve geç fazında insan akciğer mikrovasküler endotel hücrelerinde apopitoz saptanmıştır. Ek olarak TNF- α ve anjiostatin düzeylerindeki artış anjiogenezisi önlemektedir (57).

Stefanec (58), Chest’te yayımladığı derlemesinde akciğerdeki apopitozun PMN ve lenfositler kadar endotel hücreler içinde önemli olduğunu belirtmiştir. N-asetilsisteinin antiapopitotik özelliği nedeniyle diğer antiapopitotikler gibi giderek artan oranda kullanılacağını tahmin etmektedir. Özellikle kanser olguları ile başlayan bu tedavi sürecinin daha da yaygınlaşacağını düşünmektedir.

Hashimoto ve arkadaşları (59) N-asetilsisteinin hücre içi glutatyon aracılığı ile TNF- α ’nın indüklediği p38 MAP kinaz yolağını aktifleştirerek akut akciğer hasarını azalttığını bildirmişlerdir.

Yoğun bakım servislerinde en fazla yatak işgaline neden olan hastalık ve sendromlar ARDS, ALİ, SİRS, Sepsis, Pnömoni ve MODS olduğu gözlenmektedir. Yoğun destek tedavisine rağmen genellikle yüksek mortalite ve morbidite ile seyretmektedir. Bu sendrom ve hastalıklardaki patofizyolojik temel mekanizma apoptotik yollardaki değişiklikler parankimal organ ve vasküler endotel hücrelerdeki apoptotik hücre ölümünde artış olarak düşünülmekte. Yoğun bakım servislerinde hemen her hastada kullandığımız ve faydalı etkileri olduğu düşündüğümüz NAC, deneysel çalışmamızda antiapopitotik özelliği gösterilememiştir;

ancak çalışmamızı farklı dozlarda N-asetilsistein, daha düşük konsantrasyonda CO₂ ve farklı sürelerde hipoksi maruziyeti ile modifiye edilebilir ve daha kapsamlı bilgiler ulaşılabilir.

L-arjinin de ise doz bağımsız olarak hücre ölümünü ve adezyonu engellemektedir. Bu sonuçlara göre immün beslenme pulmoner endotel hücrelerinde belirgin bir koruma sağlayabilir.

SONUÇ:

Bu çalışmanın sonuçlarına göre iskemi oluşturulduğunda L-arjininin doz bağımsız olarak pulmoner endotel hücre ölümünü ve adezyon artışını engellediği saptanmıştır. İmmün beslenme pulmoner endotel hücrelerinde koruma sağlayabilir. N-asetilsistein iskemi varlığında beklenen koruyucu fonksiyonları sağlayamamaktadır. İskeminin pulmoner endotel hücresinde albümin geçirgenliği, lökosit geçirgenliği ve enfeksiyon varlığında neden olabileceği durumlar için ileri çalışmalara gerek vardır.

ÖZET

Pulmoner endotelde iskemiye bağlı hasarla oluşan endotel fonksiyon bozukluklarının değerlendirilmesi

Dr. Metin ÖZTÜRK

Amaç: Bu çalışmada deneysel hipoksi oluşturulan insan pulmoner endotel hücre kültüründe, L-arjinin ve N-asetilsistein'in, hipoksi ile hasarlanmış pulmoner endotel hücresi üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Yöntem: Human Arteria Pulmonaris Endotel (HAPE) hücre kültürü kullanılarak, flastaki kuyucukların zeminini % 70-80 oranında kapladığında gruplar oluşturuldu. L-arjinin ve N-asetilsistein eklenerek gruplar dört saat normal ortam sağlayan % 5 CO₂ ve hipoksik ortam oluşturmak için % 20 CO₂ inkübasyonuna bırakıldı. Dört saatin sonunda flasklar inkübatörlerden laminer kabine alındı. Üzerlerine daha önceden hazırlanan insan kanından elde edilen 500 µL 5x10⁵ olan PMN eklendi ve otuz dk % 5 ve % 20 CO₂ inkübatörde inkübe edildi. Otuz dakikanın sonunda flasklar inkübatörlerden alınarak Işık mikroskobu aracılığı ile Lökostat solüsyonu ile boyanıp apoptoz/ normal hücre oranına, Giemsa boyasıyla da PMN hücresinin endotel hücresine yapışmasına bakıldı. TNF-α değerleri ELİSA yöntemiyle 450 nm dalga boyunda fotometrik olarak okundu.

İstatistik yöntem: Grup içi ve gruplar arası apoptoz ve adezyon değerleri tek yönlü ANOVA, L- arjininin iki gruptaki etkileri student-t testi kullanılarak değerlendirildi. p değeri 0,05 altında olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Çalışmada % 5 CO₂ grubunda apoptozda istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe rastlanmadı. % 20 CO₂ verildiğinde kontrol grubu ve N-asetilsistein grubunda yaygın hücre ölümü saptandı. L-arjininin her iki dozda da hücre ölümünü engellediği gözlemlendi. % 5 CO₂ verilen kontrol grubunda L-arjinin 30 µM dozda kontrol grubuna benzer bir adezyon oluşturmaya karşılık 100 µM dozda istatistiksel anlamlı olmayan adezyon düşüklüğüne neden oldu. N-asetilsistein 30 µM dozda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak (p < 0,05) adezyon artışına yol açtı. % 20 CO₂ verildiğinde kontrol grubu ve N-asetilsistein grubunda yaygın hücre ölümü saptandığı için adezyon açısından istatistiksel değerlendirme yapılamadı. L-arjinin her iki dozda da istatistiksel anlamlı olmayan adezyon artışına neden oldu. Gerek % 5 CO₂ gerekse % 20 CO₂ verilen gruplarda kullanılan ilaçlarla TNF-α düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Sonuç: Bu çalışmanın sonuçlarına göre iskemi oluşturulduğunda L-arjininin doz bağımsız olarak pulmoner endotel hücre ölümünü ve adezyon artışını engellediği saptanmıştır. İmmün beslenme pulmoner endotel hücrelerinde koruma sağlayabilir. N- asetilsistein iskemi varlığında beklenen koruyucu fonksiyonları sağlayamamaktadır. İskeminin pulmoner endotel hücresinde albümin geçirgenliği, lökosit geçirgenliği ve enfeksiyon varlığında neden olabileceği durumlar için ileri çalışmalara gerek vardır.

Anahtar kelimeler: L-arjinin, N- asetilsistein, iskemi, pulmoner endotel hücre, hücre kültürü, adezyon, apoptoz, TNF- α

Yazışma adresi: Dr. Metin ÖZTÜRK

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı,
AYDIN

SUMMARY:

Management of endothelial dysfunction at pulmonary endothel induced by ischemia
Metin ÖZTÜRK. MD.

Aim: In this study, the effects of L-arginin and N- acetylsystein on damaged pulmonery endothelial cell by hypoxia at the experimentaly hypoxia created human pulmonery endothelial cell medium.

Methods: By using HEPE cell medium the groups acured when it cvered the % 70-80 of the ground of the wells at flask. By edding L- arginin and N- N-acetylsystein the groups are leaved in % 5 CO₂ that provides normal situation and % 20 CO₂ that provides hypoxic situation to incubate for four hours. At the end of 4 hours the flasks are taken from incubator to laminer cabin. 500 µL 5x10⁵ PMN been prepared from humen blood before added on them and incubated for 30 minutes % 5 and % 20 CO₂ incubator. At the end of the 30 minutes, the flasks are taken from incubator and under the microscope, te apopitosis/normal rate and; adhesion of PMN to endothelial cell which painted with Giemsa are seen. The volues of TNF-α are read at the 450 nm wau lenghet fotometriciy by ELISA.

Statisticaliy method: Apopitosis and adhesion values within each group and betueen groups ate evaluted by one sideol ANOVA and the effects of L-arginin on two groups are evaluateol by using student test. The results that's p values are below 0,05 are not accepted stastistically meaninful.

Findings: In the study especially in the % 5 CO₂ group there wasn't meaninful at apopitosis when % 20 CO₂ edded, widespred cell death found in the control group and N- acetylsystein group. It has been doserved that L- aginin prevented the cell death in both groups. Alt in he control group in wthich % 5 CO₂ added, L- arginin at 30 µM dose mode the similr adhesion like the control group, at 100 µM dose it has mode a statisticcally not meaninful decrease in adhesion. At 30 µM dose of N- acetylsystein, compared to control group there vas a stastistically important increase in adhesion p< 0,05. When % 20 CO₂ edded to control and N- acetylsystein groups, there coldn't make a statisticcally evaluattion because at widespred cell death. In both doses L- aginin mode an statisticcally not important increase in adhesion. Both in % 5 CO₂ and % 20 CO₂ odDED there wasn't a statisticcally important difference between TNF-α by the dnegs used.

Results: According to the resulb of this study; when ischemia been mode; it has been found thet L- aginin preventth pulmonery endothelial cell deathe and increases adhesion

independently from doses. Immune nutrition can supply support at pulmonary endothelial cells. In the presence of ischemia; N-acetylcysteine can't show the expected protective functions. Advanced studies are needed in order to show that what may ischemia cause at the pulmonary endothelial cell at the presence of infection the effects of it on albumin Leucocyte permeability.

Key words: L-arginine, N-acetylcysteine, ischemia, pulmonary endothelial cell, cell culture, adhesion, apoptosis, TNF- α

Correspondence address: Metin ÖZTÜRK. MD.

ADÜ Faculty of Medicine Department of Anesthesiology and Reanimation, AYDIN

KAYNAKLAR

1. Kandilci H. B, Gümüşel B. Akciğerlerde İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve İskemik Önkoşullama. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi 2005; 25: 35- 49.
2. Sayın O, Arslan N, Güner G. Resveratrol ve Kardiyovasküler Sistem. Türk Biyokimya Dergisi 2008; 33: 117- 121.
3. Ökten T. Patolojiye giriş (hücre hasarı ve ölümü) http://tip.erciyes.edu.tr/Ders_Notlari/Cerrahi_Tip/Patoloji/Turhan%20Okten/PATOL_OJ%C4%B0YE%20G%C4%B0R%C4%B0%C5%9E.doc 01.12.2008.
4. Hekimoğlu A. Terapötik Gazlar: Oksijen, Karbondioksit, Nitrik Oksid ve Helyum. Dicle Tıp Dergisi 2007; 34: 61- 9.
5. Barlas S, Tireli E, Dayıoğlu E, Barlas C. Miyokard Korunması - II: Miyokard Metabolizması ve Harabiyeti. GKD Cerrahisi Dergisi 1994; 2: 313- 7.
6. Sikka S.C. Oxidative Stress and Role of Antioxidants in Normal and Abnormal Sperm Function. Frontiers in Bioscience 1996; 1: 78- 86.
7. Büyükaşar K. Nitrik Oksitin Farmakolojisi. Türk Farmakoloji Derneği, Farmakoloji Eğitim Sempozyumları Programı Mersin. Mayıs 2005. Seminer Özetleri.
8. Duran A, Kafalı M.E, Şahin M, Köylü Ö, Gökalp A, Arslan U, Toy H. Tavşanlarda Oluşturulan Deneysel Sepsis Modelinde Düşük Doz N-asetilsistein Tedavisinin Etkinliği. Selçuk Tıp Dergisi 2004; 20: 140- 9.
9. Torun E, Bayram F. Endokrin Bir Organ Olarak Endotel ve Endotelinin Hipertansiyondaki Rolü. Erciyes Tıp Dergisi 2004; 26: 126- 131.
10. Emre M. Endotel Hücresinin Genel Yapısı ve Özellikleri. Şen M (Ed). Endotel ve Sistemlerimiz, Birinci Baskı. İstanbul: Printaş Basım A.Ş, 2005: 1- 32.
11. Dursunoğlu N. Dursunoğlu D. Obstrüktif Uyku Apne Sendromu, Endotel Disfonksiyonu ve Koroner Ateroskleroz. Tüberküloz ve Toraks Dergisi 2005; 53: 299- 306.
12. Emre M, Özcal I, Şan M. Endoteldeki İyon Kanalları ve İşlevleri. Erciyes Tıp Dergisi 2004; 26: 186-193.
13. Anderson T. J. Assessment and Treatment of Endothelial Dysfunction in Humans. Journal of the American College of Cardiology 1999;34: 631–8.
14. Özkan M. Yükseköl İ, Nitrik Oksit ve Akciğerler. Toraks Dergisi 2003; 4: 88- 94.

15. Nathan C. Nitric Oxide as a Secretary Product of Mammalian Cells. The FASEB Journal 1992; 6: 3051- 64.
16. Shaul P. W, North A. J, Wu L.C, Wells L.B, Brannon T.S, Lau K.S, Thomas M, Margraf L. R, Star R. A. Endothelial Nitric Oxide Synthase Is Expressed in Cultured Human Bronchiolar Epithelium. Journal Clinical Investigation 1994; 94: 2231-6.
17. Özdođu H.İnflamasyonda Bir Bař Aktör: Endotel. Türk Hemotoloji Derneği, 6. İlk Basamak Kursu Ankara. Ekim 2007.
18. Korkmaz A, Öter ř. Damarların Fizyolojik Özellikleri. www.gata.edu.tr/dahilibilimler/ichastalikler/egitim 01.12.2008.
19. Sylvain H, Weitzberg E, Alving K. Endothelin-İnduced Vascular And Bronchial Effects In Pig Airways: Role In Acute Allergic Responses J Appl Physiol 2002; 93: 1608- 15.
20. Libby P, Ridker P. M, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. Circulation 2002; 105: 1135- 43.
21. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. The Journal of The American Society of Hematology 1998; 91: 3527- 3561.
22. Darçın O.T, Özardalı İ, Ganidağlı S, Kaya M, Andaç M H. Endotel Harabiyeti Oluşturulan Arterde Açık Kalma Oranını Artırıcı bir Yöntem Olarak İntroluminal Streptokinaz Uygulaması: Deneysel Çalışma. Damar Cerrahisi Dergisi 2003; 12: 21- 5.
23. Çolak N. Endokrin Hastalıklarda Endotel Fonksiyonu. Endokrinolojide Diyalog 2008; 4 (Özel Sayı): 222- 3.
24. Tekiner T, Kırım S. Endokrin Hastalıklar Endotel Disfonksiyonu şen M (Ed). Endotel ve Sistemlerimiz, Birinci Baskı. İstanbul: Printaş Basım A.ř, 2005: 117- 32.
25. Dođanay M. Sepsis http://tip.erciyes.edu.tr/Ders_Notlari/Dahili_Tip/Klinik_Mikrobiyoloji/Mehmet_Doganay/2/SEPSIS.pdf 01.12.2008.
26. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. Lancet 1967; 12: 319-23.

27. Çakar N, Tulunay M, Uyar M. Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu (ARDS) ve Güncel Yaklaşım. [http://db.datex-ohmeda.com/evadb/fi3037.nsf/WebMaterialCentre/AF23C404CC5D5592C225714F003B25CA/\\$File/Sols.%2012.pdf](http://db.datex-ohmeda.com/evadb/fi3037.nsf/WebMaterialCentre/AF23C404CC5D5592C225714F003B25CA/$File/Sols.%2012.pdf) 01.12.2008.
28. Fındık B. Akut Respiratuvar Distres Sendromu: Patogenez ve Patofizyoloji. Türkiye Klinikleri: Cerrahi Tıp Bilimleri Anesteziyoloji Reanimasyon 2007; 3: 20- 9.
29. Bahar M. Akut Solunum Yetersizliği Sendromu ALI ve ARDS. Solunum 2003; 5: 303- 6.
30. Akçakaya N. Pnömonilerde Akılcı Antibiyotik Kullanımı. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi 2002; 33: 35- 9.
31. Tosun Günay A. Pnömoni Patogenezi. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Solunum Yolu Enfeksiyonları Sempozyumu 2000; 1: 127- 139.
32. Narlı N. Nitrik Oksit'in Klinik kullanımı. Şen M (Ed). Endotel ve Sistemlerimiz, Birinci Baskı. İstanbul: Printaş Basım A.Ş, 2005: 51- 74.
33. Ünal N. Yoğun Bakım Sepsis ve Septik Şok. Tolunay M, Çuhruk H (Eds). Klinik Anesteziyoloji, Dördüncü Baskı. İstanbul. Güneş Tıp Kitabevi 2008: 1018-64.
34. Gülay Z. İnfeksiyon Patogenezi. http://www.toraks.org.tr/toraks-kitap-pdf/solunum_sistemi_PDF/03.pdf 01.12.2008
35. Güç D. Adezyon Molekülleri. Astım Allerji İmmünoloji 2004; 2: 95-102.
36. Ayan E, İlhan N. Deneysel Akciğer Ototransplantasyonu Sonrası Reperfüzyon Hasar Modelinde N-Asetilsisteinin Etkileri. Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi 2004; 12: 98- 105.
37. Yağmurdur H, Başar H. Ekstremitte Cerrahisinde Turnike Uygulamasına Bağlı İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve Anestezik Yaklaşım. Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi 2007; 6: 30-5.
38. Müller AM, Cronen C, Müller KM, Kirkpatrick JC. Heterogeneous expression of cell adhesion molecules by endothelial cells in ARDS. J Pathol 2002; 198: 270–275.
39. Sheridan BC, McIntyre RC, Meldrum DR, Fullerton DA. L-Arginine Prevents Lung Neutrophil Accumulation And Preserves Pulmonary Endothelial Function After Endotoxin. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 274:337-342, 1998.

40. Kawkitinarong K, -McGillem LL, Birukov KG, Garcia JGN. Differential Regulation of Human Lung Epithelial and Endothelial Barrier Function by Thrombin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* Vol. 31, pp. 517–527, 2004.
41. Thickett DR, Armstrong L, Christie SJ, Millar AB. Vascular Endothelial Growth Factor May Contribute to Increased Vascular Permeability in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1601–5.
42. Suchner U, Heyland DK, Peter K: Immune-modulating actions of arginine in the critically ill. *Br J Nutr* 2002;8 7(Suppl 1): S121-S132.
43. Ochoa JB, Bernard AC, O'Brien WE, et al: Arginase I expression and activity in human mononuclear cells after injury. *Ann Surg* 2001; 233: 393-9.
44. Dent, DL, Heyland DK, Levy H, et al: Immunonutrition may increase mortality in critically ill patients with pneumonia: Results of a randomized trial. *Crit Care Med* 2003; 30: A17
45. Bower RH, Cerra FB, Bershadsky B, et al: Early enteral administration of a formula (Impact) supplemented with arginine, nucleotides, and fish oil in intensive care unit patients: Results of a multicenter, prospective, randomized, clinical trial. *Crit Care Med* 1995; 23: 436-49.
46. Bertolini G, Iapichino G, Radrizzani D, et al: Early enteral immunonutrition in severely septic patients: Results of an interim analysis of a randomized multicenter trial. *Intensive Care Med* 2003; 29: 834-40.
47. Galban C, Montejo JC, Mesejo A, et al: An immune-enhancing enteral diet reduces mortality rate and episodes of bacteremia in septic intensive care unit patients. *Crit Care Med* 2000; 28: 643-648.
48. Nelin LD, Nash HE, Chicoine LG. Cytokine Treatment Increases Arginine Metabolism and Uptake in Bovine Pulmonary Arterial Endothelial Cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: 1232– 9.
49. Lang, JD, Chumley P, Eiserich JP, Estevez A, Bamberg T, Adhami A, Crow J, Freeman BA. Hypercapnia induces injury to alveolar epithelial cells via a nitric oxide-dependent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: 994–1002.
50. Grimm H, Mayer K, Mayser P, Eigenbrodt E: Regulatory potential of w3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. *Br J Nutr* 2002; 87: S59-S67.

51. Preiser JC, Van Gossum A, Berré J, et al: Enteral feeding with a solution enriched with antioxidant vitamins A, C, E enhances the resistance to oxidative stress. *Crit Care Med* 2000; 28: 3828-3832.
52. Nathens AB, Neff MJ, Jurkovich GJ, et al: Randomized, prospective trial of antioxidant supplementation in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 2002; 236: 814-822.
53. Ortolani O, Conti A, Raffaele De Gaudio A, et al: The effect of glutathione and N-acetylcysteine on lipoperoxidative damage in patients with early septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1907-1911.
54. Böger RH; Ron ES L-Arginine Improves Vascular Function by Overcoming the Deleterious Effects of ADMA, a Novel Cardiovascular Risk Factor. *Altern Med Rev* 2005;10:14-23.
55. Böger RH. The Pharmacodynamics of L-Arginine. *J. Nutr* 2007; 137: 1650S–5S.
56. Kin H, Wang N-P, Halkos E M, Kerendi F, Guyton A R, Zhao Z-Q. Neutrophil Depletion Reduces Myocardial Apoptosis and Attenuates NF_Β Activation/TNF-α Release After Ischemia and Reperfusion. *Journal of Surgical Research* 2006; 135: 170–178
57. Li X, Shu R, Filippatos G, Uhal BD. Apoptosis in lung injury and remodeling. *J Appl Physiol* 2004; 97: 1535-42.
58. Stefanec T. Endothelial Apoptosis: Could It Have a Role in the Pathogenesis and Treatment of Disease? *Chest* 2000; 117:841–854.
59. Hashimoto S, Gon Y, Matsumoto K, Takeshita I, Horie T. N-acetylcysteine attenuates TNF-a-induced p38 MAP kinase activation and p38 MAP kinase-mediated IL-8 production by human pulmonary vascular endothelial cells. *British Journal of Pharmacology* 2001; 132: 270- 6.