

Sıçanlarda lipopolisakkarit ile indüklenen akciğer hasarında asetilsalisilat aşırı dozlarının etkileri: VEGF'nin rolü

[Effects of acetylsalicylate overdose on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats: the role of the VEGF]

Fahrettin Akyüz¹,
Özlem Aydın¹,
Tayfun Aydın²,
Neslihan Tekin³,
Halide Edip Temel⁴,
Dilek Burukoğlu⁵,
Erinç Aral⁵

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
¹Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, ⁵Histoloji
ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir,
²Dumlupınar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anestezi
ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Kütahya, ³Aksaray
Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü,
Biyokimya Anabilim Dalı, Aksaray, ⁴Anadolu
Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya
Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Özlem Aydın

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 26000
Tel: 222 2392979-4705,
E-mail: ozlem.aydn@gmail.com

Registered: 07 December 2011; Accepted: 24 March 2012
Kayıt Tarihi : 07 Aralık 2011; Kabul Tarihi : 24 Mart 2012

ÖZET

Amaç: Alveolar epitelyal hücre hasarına bağlı olarak vasküler endotelial büyüme faktörü üretimi azalmaktadır. Akciğer dokusunda vasküler endotelial büyüme faktörün akut aşırı ekspresyonu ise permeabilite oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Asetilsalisilat (ASA)'ın aşırı dozları pulmoner vasküler geçirgenliği artırarak pulmoner ödemini indükleyebilir. Bu çalışmada sıçanlarda lipopolisakkarit ile indüklenen akciğer hasarı varlığında asetilsalisilat aşırı dozlarının bronkoalveolar lavaj sıvısı vasküler endotelial büyüme faktörü seviyelerine etkileri değerlendirildi.

Gereç ve Yöntem: Akciğer hasarı intraperitoneal lipopolisakkarit (LPS) enjeksiyonu ile indüklendi. Sıçanlar, kontrol, ASA-300, ASA-500, LPS, LPS+ASA-300 ve LPS+ASA-500 olmak üzere 6 gruba (n=7) ayrıldı. ASA, 300 ve 500 mg/kg dozlarda gavaj yoluyla verildi. LPS+ASA gruplarına lipopolisakkarit enjeksiyonundan 24 saat sonra asetilsalisilat verildi. Sıçanlar, asetilsalisilat verildikten 6 saat sonra sakrifiye edildi ve bronkoalveolar lavaj uygulandı.

Bulgular: Bronkoalveolar lavaj sıvısında, vasküler endotelial büyüme faktörü, matriks metalloproteinaz-2 ve nitrik oksit seviyeleri ASA-500 grubunda artmış ve LPS+ASA gruplarında azalmıştı. Ayrıca, plazma salisilat yarılanma süresi LPS+ASA gruplarında uzamıştı.

Sonuç: Lipopolisakkarit varlığında asetilsalisilatın metabolize edilme süresi uzamış ve vasküler endotelial büyüme faktörü, matriks metalloproteinaz-2 ve nitrik oksit ilişkili mekanizmaların etkisiyle akciğer doku hasarı artarak iyileşme periyodu olumsuz etkilenmiştir. Ayrıca insanlarda akciğer dokusu üzerine şiddetli toksik etki oluşturabilen 300 ve 500 mg/kg asetilsalisilat dozlarının sıçanlarda toksik etkisinin daha az olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Asetilsalisilat, lipopolisakkarit, akciğer hasarı, vasküler endotelial büyüme faktörü

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması olmadığı bildirilmiştir.

ABSTRACT

Aim: Vascular endothelial growth factor production is decreased depending on the alveolar epithelial cell damage. Acute over expression of vascular endothelial growth factor in lung tissue contributes to the formation permeability. Excessive doses of acetylsalicylate (ASA) may induce pulmonary edema by increasing pulmonary vascular permeability. In this study, the effects of acetylsalicylate overdoses were evaluated on bronchoalveolar lavage fluid levels of vascular endothelial growth factor in the presence of lipopolysaccharide-induced lung injury in rats.

Materials and Methods: Lung injury was induced by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS). Rats were divided into six different sets consisting of 7 rats each for control, ASA-300, ASA-500, LPS, LPS+ASA-300 and LPS+ASA-500 series. ASA, 300 mg and 500 mg/kg doses were given by gavage. Acetylsalicylate was given 24 hours after lipopolysaccharide injection in LPS+ASA groups. Rats were sacrificed 6 hours after acetylsalicylate administration and bronchoalveolar lavage was performed.

Results: In bronchoalveolar lavage fluid, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-2 and nitric oxide levels were increased in group of ASA-500, and were decreased in groups of LPS+ASA. In addition, plasma salicylate half-life was prolonged in LPS+ASA groups.

Conclusion: Lipopolysaccharide increases the time of being metabolized of acetylsalicylate. The lung tissue damage increases due to vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-2 and nitric oxide related mechanisms and recovery period is affected adversely. Also in humans, severe toxic effects on the lung tissue that can be generated by 300 and 500 mg/kg acetylsalicylate doses in rats showed less toxic effect.

Key Words: Acetylsalicylate; lipopolysaccharide; lung injury; vascular endothelial growth factor

Conflict of Interest: Authors declare no conflict of interest

Giriş

Aspirin (asetilsalisilat) dünyada en yaygın kullanılan ilaçlardan biridir. Hafif ağrıları dindirmek için analjezik, ateş düşürmek için antipiretik ve antiinflamatuvar olarak sıklıkla kullanılır [1]. Kolay ulaşılabilişinden dolayı salisilat toksisitesi dünyanın her tarafında görülmektedir [2]. Aspirin toksisitesi akut ya da kronik olabilir [3]. Vücut ağırlığının kilogramı başına 150 mg'dan yüksek dozlar aspirinin akut toksik dozları olarak kabul edilir [4]. Ilımlı asetilsalisilat (ASA) toksisitesi 300 mg/kg'ın üzerindeki dozlarda, şiddetli toksisite ise 300 ile 500 mg/kg arasındaki dozlarda oluşur ve 500 mg/kg'ın üzerindeki dozlar potansiyel olarak ölümcül dozdur [5]. Aspirin toksisitesinde asit/baz bozuklukları görülür [6]. Pulmoner vasküler geçirgenlikte değişiklikler oluşabilir. Aşırı doz aspirin nonkardiyojenik pulmoner ödemini indükleyebilir ancak bu durum tersinirdir ve hızla giderilebilir. Yine de bazı hastalarda şiddetli akciğer hasarı oluşur ve klinik seyir akut respiratuvar distres sendromuna doğru ilerleyebilir [7].

Gram-negatif bakterilerin dış duvarının ana yapısal bileşeni olan bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) inflamatuvar cevabın potansiyel bir başlatıcısıdır. LPS, akciğer hastalıklarının bir kısmına katkıda bulunur ve akut akciğer hasarının hayvan modellerinde pulmoner inflamasyon modeli olarak yaygın şekilde kullanılır [8,9]. LPS, intrapulmoner sitokinlerde artışla beraber nötrofilik inflamatuvar yanıtı neden olur [10].

Vasküler permeabilite faktörü olarak da bilinen vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblastlar, vasküler düz kas hücreleri, endotelial hücreler ve makrofajlar gibi pek çok hücre tarafından üretilir [11,12]. VEGF, endotelial hücrelerin çoğalması ve göçünü uyarır, hücre sağ kalımını ve vasküler geçirgenliği düzenler ve vasodilatasyonu indükler [13]. Alveolar ve bronşiyal epitelyum, bronşların glandular hücreleri ve aktive olmuş alveolar makrofajları içeren yetişkin akciğer dokusunda bol miktarda eksprese edilir. Hayvan çalışmaları ve klinik veriler akciğerlerde VEGF'nin koruyucu rolünü desteklemektedir. Akciğer hasarının erken safhalarında permeabilite ödeminin oluşmasında VEGF'nin rolü olduğu bildirilmiştir [11]. Akciğer hasarının gelişim safhasında ise alveolar epitelyal hücrelerin hasarlanması VEGF üretimini azaltır [14].

Bu çalışma, lipopolisakkarit ile indüklenen akciğer hasarında ASA aşırı dozlarının BAL sıvısı ve plazma VEGF seviyelerine etkilerini araştırmak için planlandı.

Gereç ve Yöntem

Deney Hayvanları

Tüm deneyler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Etik Kurul'undan izin (Etik kurul no: 150/2010) alınarak yapıldı. Çalışmada kırk iki adet, 250-300 g ağırlığında erkek *Sprague dawley* (SD) türü sıçan kullanıldı. Hayvanlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi'nden sağlandı. Sıçanlar

kontrol edilebilir çevresel şartlarda (12 saat aydınlık-karanlık döngü ve 22±1.5°C sıcaklık) tutuldu. Standart sıçan diyeti ve su verilen hayvanlar 6 gruba ayrıldı:

Kontrol grubu: İntraperitoneal (ip) olarak fizyolojik su + standart sıçan yemi + su

ASA-300: Gavajla asetilsalisilat (ASA) (300 mg/kg) + standart sıçan yemi + su

ASA-500: Gavajla ASA (500 mg/kg) + standart sıçan yemi + su

LPS: İntraperitoneal olarak 1 mg/kg LPS [15] + standart sıçan yemi + su

LPS+ASA-300: Gavajla ASA (300 mg/kg) + ip olarak 1 mg/kg LPS + standart sıçan yemi + su

LPS+ASA-500: Gavajla ASA (500 mg/kg) + ip olarak 1mg/kg LPS + standart sıçan yemi + su

Lipopolisakkarit ve asetilsalisilat, fizyolojik su ile çözüldü. Gavajla eklenen ASA'nın ve tüm intraperitoneal enjeksiyonların total hacmi 2 mL/kg'dı. ASA dozları, LPS+ASA-300 ve LPS+ASA-500 gruplarına LPS enjeksiyonu yapıldıktan 24 saat sonra verildi. Sıçanlar, ASA verildikten 6 saat sonra (LPS verilen gruplarda 30. saatte) diyet eter anestezisi sonrası servikal dislokasyon ile sakrifiye edildiler.

Gereçler

Asetilsalisilat, ARİS (Ali Raif İlaç San, Türkiye)'den sağlandı. LPS (*E. coli*, serotip 055-B5), Sigma (Germany)'dan alındı. VEGF (Kat. No: RRV00, Lot No: 257032) ve Matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2), (Kat. No: DMP200, Lot No: 257348) Quantikine Elisa kitleleri R&D Systems (UK)'den alındı. Spektrofotometrik ölçümler için UV-1601 spektrofotometre (Model CPS-240, Shimadzu, Japan) kullanıldı.

Plazma ve Doku Örnekleri

Plazma örnekleri intrakardiyak yolla lityum heparinli tüplere alındı ve +4°C'de 1200 x g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kullanılmaya kadar -80°C'de saklandı. Akciğerler bronkoalveolar lavaj sonrası çıkarıldı. Sağ alt lob histopatoloji için kullanılmak üzere nötral formalin içine konuldu. Sağ orta lob soğuk fizyolojik su ile üç kez yıkandıktan sonra biyokimyasal çalışmalar için kullanılmaya kadar -80°C'de saklandı. Sağ üst lob yaş/kuru ağırlık oranı için kullanıldı.

Bronkoalveolar Lavaj (BAL) Sıvısının Toplanması

Sakrifiye edilen sıçanlara sternotomi uygulandıktan sonra trakeaya bir kanül yerleştirildi. Sağ bronş klampe edildi. Sol loba bronkoalveolar lavaj uygulandı ve 2 mL fizyolojik su ile 4 defa işlem tekrarlandı. Total hacmi 7 mL olan lavaj sıvısı (geri kazanım:%87.5) +4°C'de 1000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kullanılmaya kadar -80°C'de saklandı [16].

BAL Sıvısı ve Plazmada VEGF ve MMP-2 Ölçümleri

Vasküler endotelial büyüme faktörü ve MMP-2 ölçüm-

leri, BAL sıvısı ve plazma örneklerinde üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda eliza kitleri ile yapıldı.

BAL Sıvısı Nitrik Oksit Ölçümü

Nitrik oksit seviyeleri Cortas and Wakid'in [17] spektrofotometrik yöntemiyle ölçüldü. Bu yöntemde nitrit ve nitrat miktarı NO üretiminin bir indeksi olarak kullanılmaktadır. BAL sıvısında Nitrat ölçümü, kadmiyum-reduksiyon metodunun modifikasyonu ile gerçekleştirildi; üretilen nitrit naftiletilendiamin ve sülfanilamidin diazotizasyonu ile belirlendi. Örnekler Somogyi reaktifi (55 mmol/L NaOH ve 75 mmol/L ZnSO₄, pH=7-7.5) ile deproteinize edildikten sonra nitrat pH=9.7'ye ayarlı glisin buffer içindeki bakır kaplı kadmiyum (2.2-3 gram kadmiyum granülleri) tarafından indirildi. Oluşan nitrit, naftiletilendiamin ve sülfanilamid reaktifleri ile karıştırılan örneklerde inkübasyon sonrası spektrofotometrik olarak ölçüldü ve sonuçlar proteine bölünerek µmol/mg protein olarak verildi. Standart olarak nitrat kullanıldı. BAL sıvısında total protein Bradford metoduyla ölçüldü [18].

Plazma Salisilat Ölçümü

Plazma örneklerinin (0.5 mL) üzerine 2 mL Trinder reaktifi (40 g Hg(II)Cl₂, 850 mL saf su ve 120 mL HCl (1 mol/L) içinde çözülür, 40 g sulu demir-3-nitrat ilave edilir, su ile 1 litreye tamamlanır) eklendi. 30 saniye vortexlendi. 500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatantların absorbansı 540 nm'de köre karşı okundu. Standart olarak sodyum salisilat kullanıldı [19].

Kan Gazları Analizi

Arteriyel kan örnekleri heparinle yıkanmış enjektöre sternotomiden sonra sol ventrikülden alındı ve IRMA TruPoint kan gazı analizörü (USA) ile ölçümleri yapıldı.

Akciğer Yaş/Kuru Ağırlık Oranı

Yaş/kuru ağırlık oranı akciğer su içeriğini belirleyebilmek için kullanıldı. Akciğerler çıkarıldıktan sonra sağ üst lob hemen tartıldı ve etiketlenerek 65°C'de fırında 48 saat boyunca tutularak kurutuldu ve tekrar tartılarak yaş/kuru ağırlık oranı belirlendi [20].

Miyeloperoksidaz (MPO) Ölçümü

Miyeloperoksidaz aktivitesi nötrofilik infiltrasyonun bir indeksi olarak akciğer doku homojenatlarında Deser ve arkadaşlarının spektrofotometrik yöntemiyle [21] belirlendi. 300 mg doku, 5 mL 0.02 M EDTA tampunu içerisinde homojenize edildi. 20000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve pellet, eş hacimdeki %0.5 heksadesiltrimetil amonyum bromür içerisinde yeniden süspanse edildi ve aynı devirde tekrar santrifüj edildi. Son süpernatant MPO ölçümü için kullanıldı. Substrat çözeltisi; 100 mM guaiacol ve % 0.0017 hidrojen peroksit 50 mM potasyum fosfat (pH=7.0'a 25°C'de 1 M KOH ile ayarlanarak) tamponunda hazırlandı. Analiz ve kör tüplerine 3'er mL substrat çözeltisi konuldu. Daha sonra kör tüpüne 0.035 mL deiyonize su, analiz tüpüne 0.035 mL süpernatant eklendi ve karıştırıldı. MPO

aktivitesi bir dakika sonra dalga boyu 470 nm'ye ayarlı spektrofotometre ile ölçüldü. Bir ünite, absorbansta bir dakikada 1.0 birimlik artış (pH=7.0 ve 25°C'de) yaratan enzim aktivitesi olarak tanımlandı. Sonuçlar proteine oranlanarak U/mg protein olarak verildi. Total protein Bradford metoduyla ölçüldü [18].

Histopatoloji

Nötral formalin içine alınan örnekler, doku takibi sonrası parafin içine gömüldü, 5 µm kalınlığında kesildi ve hematoksilin-eosin (H&E) ile boyandı.

İstatistiksel Analiz

Verilerin varyans analizi one-way ANOVA kullanılarak gerçekleştirildi. Çoklu karşılaştırmalar için LSD Tukey post hoc testleri kullanıldı. Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

BAL Sıvısı Ölçümleri

Tablo 1, BAL sıvısındaki VEGF, MMP-2, NO ve total protein değerlerini göstermektedir. VEGF, kontrol grubuna göre ASA-300 (p<0.05) ve ASA-500 (p<0.001) gruplarında artarken LPS+ASA-300 (p<0.001) ve LPS+ASA-500 (p<0.001) gruplarında azaldı. MMP-2, kontrol grubuna göre ASA-500 (p<0.01) grubunda arttı, ASA-300, LPS+ASA-500, and LPS+ASA-300 (p<0.001) gruplarında ise azaldı. VEGF ve MMP-2 seviyeleri ASA-300 grubuna göre ASA-500 (p<0.001) grubunda arttı. NO seviyeleri kontrol grubuna kıyasla ASA-300, ASA-500 ve LPS (p<0.001) gruplarında arttı ve LPS+ASA-500 ve LPS+ASA-300 (p<0.001) gruplarında kontrole ve LPS grubuna göre azaldı. Total protein seviyeleri kontrol grubuna göre ASA-300 hariç tüm gruplarda (p<0.01-p<0.001) arttı ve LPS grubuna göre LPS+ASA-300 ve LPS+ASA-500 (p<0.001) gruplarında arttı.

Plazma Ölçümleri

Plazma VEGF seviyeleri kontrol ve LPS+ASA-300 gruplarına kıyasla ASA-500 (p<0.01-p<0.001) grubunda arttı. Diğer tüm gruplarda ise azaldı (p<0.001). MMP-2 seviyeleri ASA-300 grubuna göre ASA-500 (p<0.001) grubunda arttı ve kontrole göre ASA-500 (p<0.001) hariç tüm gruplarda azaldı (Tablo 1).

Plazma salisilat seviyeleri ASA verilen gruplarda belirlendi. Salisilat seviyeleri ASA-300 grubuna göre ASA-500 (p<0.001) grubunda daha yüksekti. LPS+ASA-500 (p<0.001) grubunda da LPS+ASA-300 grubuna göre yüksekti (Tablo 2).

Kan Gazları Analizi

Arteriyel kan gazları sonuçları Tablo 3'te verilmiştir. ASA-500 ve LPS+ASA-500 grubunun pH değerleri kontrol grubuna göre düşüktü. Kontrole göre kıyaslandığında pO₂ seviyeleri LPS+ASA-300 ve LPS+ASA-500 gruplarında; O₂ saturasyon seviyeleri LPS, LPS+ASA-300 ve

Tablo 1. BALF'de VEGF, MMP-2, NO ve Total protein ile plazmada MMP-2 ve VEGF seviyeleri

Grup	VEGF (pg/mL)		MMP-2 (ng/mL)		NO (μ mol/mg protein)	T. Protein (mg/mL)
	BALF	Plasma	BALF	Plasma	BALF	BALF
Kontrol	39.17 \pm 2.63	17.29 \pm 1.49	0.82 \pm 0.08	201.21 \pm 11.72	205.92 \pm 10.46	0.11 \pm 0.01
ASA-300	43.16 \pm 3.51*	13.83 \pm 1.31***	0.54 \pm 0.05***	170.30 \pm 12.54***	258.82 \pm 13.37***	0.11 \pm 0.01
ASA-500	46.15 \pm 4.37***	20.11 \pm 2.14**@@@	0.96 \pm 0.10**@@@	206.52 \pm 13.19 @@@	246.57 \pm 17.75***	0.13 \pm 0.01 **@@
LPS	36.64 \pm 2.33	10.01 \pm 0.98***	0.75 \pm 0.06	127.25 \pm 9.01***	255.43 \pm 18.45***	0.13 \pm 0.01**
LPS+ ASA-300	27.99 \pm 1.91***,###	10.63 \pm 0.82***	0.25 \pm 0.02***,###	119.86 \pm 7.99***	156.08 \pm 12.16 ***###	0.19 \pm 0.01 ***###
LPS+ ASA-500	29.66 \pm 2.30***,###	10.36 \pm 1.43***	0.35 \pm 0.03***,### \square	134.71 \pm 14.23 *** \square	147.59 \pm 15.30 ***###	0.19 \pm 0.01 ***###

Veriler ortalama \pm S.D. olarak verildi, n=7

*Kontrole göre fark (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

#LPS grubuna göre fark (###p<0.001)

@ASA-300 grubuna göre fark (@@p<0.01, @@@p<0.001)

€LPS+ ASA-300 grubuna göre fark (€p<0.05)

Tablo 2. Akciğer dokularının MPO aktivitesi, akciğer yaş/kuru ağırlık oranı ve plazma salisilat seviyeleri

Grup	Yaş/kuru oranı	MPO aktivitesi (U/mg protein)	Salisilat (mg/L)
Kontrol	4.87 \pm 0.34	5.40 \pm 0.58	-
ASA-300	5.09 \pm 0.33	6.06 \pm 0.61	149.14 \pm 12.10
ASA-500	5.42 \pm 0.36	6.68 \pm 0.84**	187.14 \pm 14.53@@@
LPS	5.18 \pm 0.83	11.11 \pm 0.93***	-
LPS+ ASA-300	4.79 \pm 0.39	14.03 \pm 0.83***,###	181.57 \pm 12.73
LPS+ ASA-500	4.91 \pm 0.37	13.99 \pm 0.78***,###	208.14 \pm 16.12 $\square\square\square$

Veriler ortalama \pm S.D. olarak verildi, (-) belirlenmedi, n=7

*Kontrole göre fark (**p<0.01, ***p<0.001)

#LPS grubuna göre fark (###p<0.001)

@ASA-300 grubuna göre fark (@@@p<0.001)

€LPS+ ASA-300 grubuna göre fark (€€€p<0.001)

Tablo 3. Arteriyel kan gazlarının analizi

Grup	pH	pCO ₂ (mmHg)	pO ₂ (mmHg)	O ₂ Sat(%)	HCO ₃ (mM)	TCO ₂ (mM)
Kontrol	7.38 \pm 0.02	37.41 \pm 3.72	171.62 \pm 4.81	98.55 \pm 0.76	23.37 \pm 1.23	26.65 \pm 2.17
ASA-300	7.38 \pm 0.06	34.48 \pm 0.91	168.22 \pm 6.24	98.65 \pm 0.35	22.44 \pm 1.91	25.95 \pm 1.80
ASA-500	7.32 \pm 0.04**@	34.22 \pm 1.74	171.41 \pm 5.36	98.88 \pm 0.40	21.60 \pm 2.59	24.98 \pm 1.18*
LPS	7.35 \pm 0.03	35.28 \pm 0.84	167.64 \pm 1.79	97.24 \pm 0.56***	23.91 \pm 2.91	28.28 \pm 0.75*
LPS+ ASA-300	7.34 \pm 0.01	35.3 \pm 2.76	164.27 \pm 3.53**	97.12 \pm 0.59***	22.90 \pm 1.49	27.97 \pm 0.90
LPS+ ASA-500	7.33 \pm 0.01*	36.12 \pm 3.91	162.67 \pm 3.10**.#	97.04 \pm 0.91***	21.12 \pm 1.49	27.47 \pm 1.43

Veriler ortalama \pm S.D. olarak verildi, n=7

*Kontrole göre fark (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

#LPS grubuna göre fark (#p<0.05)

@ASA-300 grubuna göre fark (@p<0.05)

LPS+ASA-500 gruplarında düşüktü. TCO₂ seviyeleri kontrole göre ASA-500 grubunda düşük, LPS grubunda yüksekti.

Akciğer Yaş/Kuru Ağırlık Oranı

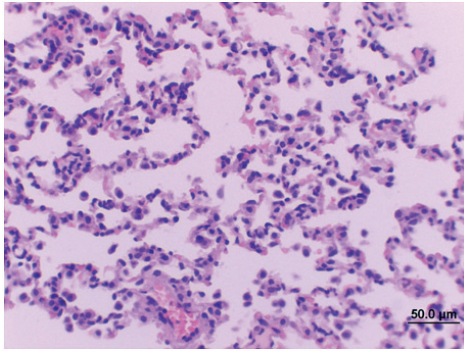
Akciğer yaş/kuru ağırlık oranları bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi (Tablo 2).

MPO Aktivitesi

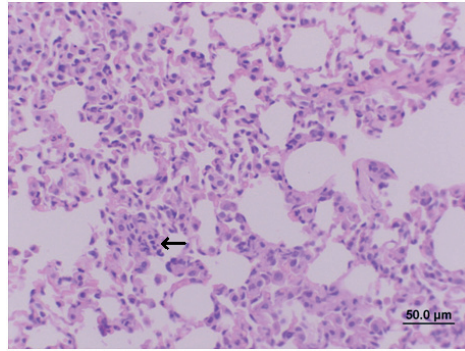
Akciğer dokusu MPO aktivitesi kontrol grubuna göre ASA-300 grubu hariç tüm gruplarda artmıştı ($p<0.01$ - $p<0.001$) ve LPS grubuna göre de LPS+ASA-300 ve LPS+ASA-500 ($p<0.001$) gruplarında artmıştı (Tablo 2).

Histopatoloji

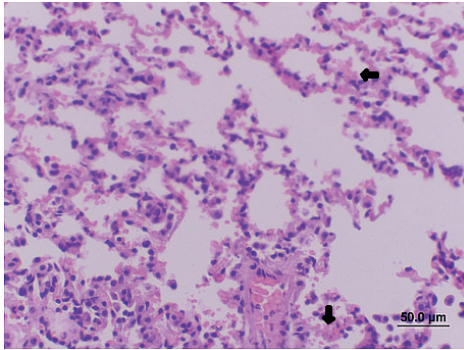
ASA-500 grubunda bronşiyal epitelyal hasar, alveol duvarında kalınlaşma ve kısmi lökosit infiltrasyonu bulguları mevcuttu. Aynı zamanda kısmi hemorajik alanlar da gözlendi. ASA-300 grubunda kısmi interalveolar infiltrasyon alanları vardı. LPS grubunda ılımlı lökosit infiltrasyonu görülürken LPS+ASA-500 ve LPS+ASA-300 gruplarında yoğun lökosit infiltrasyonu ve epitelyal hasarın yanısıra hemorajik alanlar gözlendi. Ancak grupların hiçbirinde histopatolojik olarak ödem bulgusu mevcut değildi (Şekil 1A - 1F).



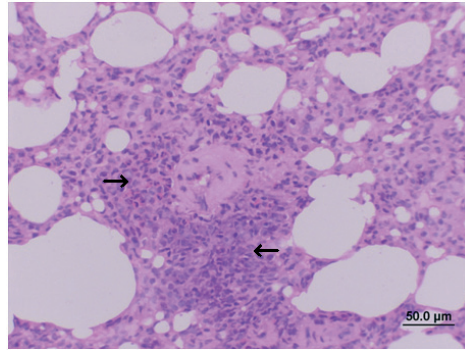
Şekil 1A: Kontrol grubuna ait normal histolojik akciğer dokusu. Orijinal büyütme x10 ve ölçek çubuğu = 50µm



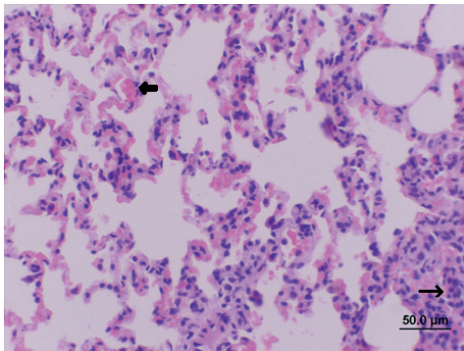
Şekil 1B: ASA-300 grubuna ait akciğer dokusunda kısmi hücresel inflamasyon. Orijinal büyütme x10 ve ölçek çubuğu = 50µm



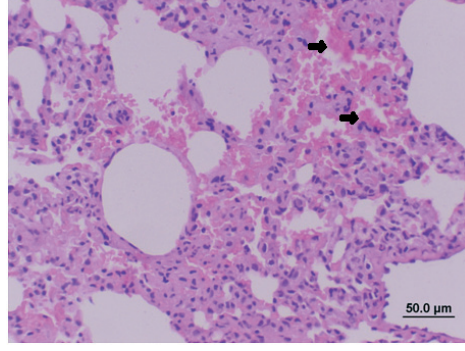
Şekil 1C: ASA-500 grubuna ait akciğer dokusu hemorajik damar yapıları. Orijinal büyütme x10 ve ölçek çubuğu = 50µm



Şekil 1D: LPS grubuna ait akciğer dokusunda yoğun hücresel infiltrasyon. Orijinal büyütme x10 ve ölçek çubuğu = 50µm



Şekil 1E: LPS+ASA-300 grubuna ait akciğer dokusunda kısmi hücresel infiltrasyon ve hemoraji. Orijinal büyütme x10 ve ölçek çubuğu = 50µm



Şekil 1F: LPS+ASA-500 grubuna ait akciğer dokusu interalveolar bölgelerde yoğun hemorajik alanlar. Orijinal büyütme x10 ve ölçek çubuğu = 50µm

Tartışma

Bu çalışmada insanlarda şiddetli toksisite oluşturduğu bilinen 300 mg/kg ve 500 mg/kg asetilsalisilat dozları kullanıldı. Aynı zamanda LPS ile indüklenen akciğer hasarındaki etkileri değerlendirildi. Histopatolojik olarak ASA-500 ve LPS+ASA-500 gruplarında lökosit infiltrasyonu, epitelyal hasar ve hemorajik alanlar gözlenirse de kan gazları analiz edildiğinde sonuçlar ılımlı bir asidozla uyumlu oldu. 300 mg/kg ASA ise lökosit infiltrasyonu dışında histopatolojik hasar ya da asidoz bulgusuna neden olmadı.

Diğer kan gazı parametreleri pCO_2 , pO_2 , O_2 Sat (%), HCO_3 ve TCO_2 'nin sonuçları klinik olarak kabul edilebilir aralıktaydı. Kan gazlarını doğrulamak için idrar örneklerinin toplanması ve analizi yapılabildi ancak bu çalışmada idrar örnekleri toplanmadı. Gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmayışı bu ASA dozlarının LPS varlığında verilmesi de dahil olmak üzere SD sıçanlarda ciddi bir asit/baz bozukluğu tablosu oluşturmadığını göstermektedir.

Yalnızca ASA alan gruplarda görülen BAL sıvısındaki VEGF artışı muhtemelen alveolar epitelyal hücrelerdeki hasar sonucu VEGF'nin hücre dışına salınmasından kaynaklanmıştır. Çünkü bu hücreler normalde fazla miktarda VEGF içerirler [22]. Aynı zamanda akciğer hasarının erken safhalarında proinflamatuvar sitokinlerin stimülasyonu ile tip II hücreler, alveolar makrofajlar ve nötrofillerden VEGF'nin üretimi ve salınması [14] özellikle 500 mg/kg ASA grubundaki artışa katkıda bulunmuş olabilir. VEGF ile sitokinler arasında olası bir bağlantı vardır. Örneğin IL-6, ARDS'li hastaların serumlarında artmış bulunur ve VEGF'nin potansiyel bir indükleyicisidir. İnflamatuvar kaskaddaki TNF- α ve IL-1b gibi sitokinler de VEGF sentezini indüklerler [23]. İntratrakeal LPS uygulandıktan 3 saat sonra BAL sıvısındaki VEGF seviyelerinin arttığı çalışmada 24, 48 ve 72. saatlerde VEGF'nin azaldığı bildirilmiştir [24]. Bir başka çalışmada intratrakeal LPS eklenmesinden 24 saat sonra BAL sıvısı VEGF seviyelerinde artış gözlenmiş ve VEGF'nin 72 saat sonra başlangıç seviyesine gerilediği bildirilmiştir [11]. Bu bilgilerin ışığında değerlendirildiğinde LPS ve LPS+ASA verilen gruplarda BAL sıvısı ölçümlerinde total protein artışına rağmen VEGF'nin kontrole göre LPS grubunda değişmemiş, LPS+ASA grubunda ise azalmış olması sıçanlar sakrifiye edilmeden önce bir zamanda VEGF'de bir yükselme olduğunu düşündürmektedir. Bu bağlamda olasılıklar: LPS grubunda, LPS eklenmesinden sonraki ilk 24 saatte ya da 24. saatten sonraki bir zamanda VEGF artmış ve bu gruptaki sıçanların sakrifiye edildiği 30. saatten önce bazal seviyeye gerilemiş olabilir. LPS+ASA gruplarında VEGF, LPS verilmesinden sonra artmış, ASA eklendikten sonra azalmış olabilir ya da VEGF, LPS verilmesinden sonraki ilk 24 saatte değişmemiş, ASA eklendikten sonra artmış sonra azalarak 30. saatteki düşük seviyeye gelmiş olabilir. LPS+ASA gruplarında VEGF'nin azalması akciğer hasarının gelişimi sırasında alveolar epitelyal hücrelerin zedelenmesi sonucu VEGF üretimindeki azalmayla ilişkili olabilir ve bu da VEGF'nin BAL sıvısında düşük konsantrasyonda bulunmasına neden olur [14].

Bronkoalveolar lavaj sıvısı ve plazmadaki VEGF değerlerinin yanı sıra MMP-2 değerlerinde de gözlenen azalma LPS+ASA gruplarındaki alveolar hücrelerin hasarı ve belki bazı hücrelerin ölümü ile ilişkili görünmektedir. Bu proteinlerin sentezinin azalması VEGF ve MMP-2 düşüşünü açıklayabilir. Endotel hücrelerin yanı sıra alveolar epitelyum hücrelerinde de sentezlenen MMP-2 hasarlanan alveolar epitelin tamirinde önemli rol oynamaktadır. Çünkü MMP-2 endotel hücreler, fibroblastlar ve alveolar epitel hücrelerin dahil olduğu birçok hücre tarafından sentezlenir ve MMP'ler akut akciğer hasarı sırasında hücre dışı matriks bileşenlerinin yıkılması yoluyla alveolar epitelyumun tamirinde rol alabilirler [25].

500 mg/kg ASA verilen grupta gözlenen BAL sıvısındaki MMP-2 artışı akciğer dokusu hasarına sekonder olarak gelişen "remodeling" ile ilişkili olabilir. LPS+ASA gruplarında MMP-2 azalması ise doku "remodeling"ini olumsuz etkileyecektir. Alveolar epitelyum hücreler için mitojen ve stimulant etkilere sahip VEGF değerlerindeki azalma da iyileşme sürecini geciktirecektir. Lipopolisakkaritin akciğerlerde indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS)'in ekspresyonunu indüklediği ve pulmoner NO üretimini ilerlettiği bilinmektedir [26]. LPS grubunda gözlenen NO artışı bu literatürle uyumludur. Hem 300 hem de 500 mg/kg ASA gruplarında BAL sıvısındaki NO artışı ASA'nın yüksek dozlarının etkisiyle olabileceği gibi bu gruplardaki yüksek VEGF seviyeleri ile de ilişkili olabilir. ASA, nötrofillerde NO üretimini artırır. Ayrıca akut yüksek doz ASA insanlarda trombositlerin bazal nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesinde artışa neden olur [27]. NO hem normal hem de hastalık durumlarında solunum sistemindeki çeşitli hücreler tarafından üretilir [13]. Akciğer hasarının yanı sıra hasarın tamirinde de çoklu role sahiptir [28]. NO hava yolu tonüsü, bronşiyal dolaşım, mukus ve elektrolit salgılanması ve hava yolu nöranal aktivitesi gibi pek çok işlevi düzenler [13]. Aynı zamanda apoptozun bir modülatörüdür ve akciğerdeki inflamatuvar hücrelerin bakterisidal etkili bir ögesidir. NO'nun temel moleküler kaynakları NOS enzimleridir [28]. VEGF, NOS'un ve NO üretiminin güçlü bir uyarıcısıdır [13]. NO, VEGF'nin permeabilite etkisine aracılık eder [29]. Yalnızca LPS ve yalnızca ASA alan gruplarda yükselmiş bulunan BAL sıvısı NO'sunun LPS+ASA gruplarında azalması, NO üreten nitrik oksit sentaz enzim sentezindeki azalma ve/veya VEGF düşüşüne bağlı NOS uyarılmasındaki azalma ile bağlantılı olabilir. Bu da aşırı hasarlanan ya da ölen hücrelerin varlığına işaret etmektedir.

Beşyüz mg/kg ASA verilen grupta lökosit infiltrasyonunun bir belirtici olan MPO aktivitesindeki [30] artışta akciğer hasarının yanı sıra VEGF'nin nonvasküler dokular üzerindeki inflamatuvar etkilerinin [13] katkısı olabilir. LPS grubunda artan MPO aktivitesi, LPS+ASA

gruplarında ASA'nın akciğer doku hasarını arttırması nedeniyle histopatolojik yoğun lökosit infiltrasyonu ile uyumlu olarak daha fazla artmıştı. 500 mg/kg ASA grubunda BAL sıvısındaki total protein seviyeleri yüksekti ancak ne histopatolojik olarak ödem bulgusu vardı ne de akciğer yaş/kuru ağırlık oranında fark vardı. BAL sıvısındaki yüksek total protein ve VEGF seviyelerine rağmen ödem bulgusunun olmayışı hızla geri dönen geçici bir ödem olayının hayvanların sakrifiye edimesinden önce gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir. LPS ve LPS+ASA gruplarında da BAL sıvısındaki total protein oranları yüksekti. BAL sıvısında normal ya da azalmış VEGF seviyesi, akciğer yaş/kuru ağırlık oranlarında gruplar arasında fark olmayışı ASA-500 grubuna benzer şekilde geri dönüşümlü geçici bir ödem olayının sakrifikasyon öncesi yaşanmış olabileceğini göstermektedir. Çünkü BAL sıvısında yükselen protein seviyeleri muhtemelen VEGF'nin kapiller katmandaki fenestre oluşumunu indükleyerek endotelial morfolojiyi etkilemesiyle [23] ilişkilidir.

Asetilsalisilat ya da aspirin oral alımdan sonra sindirim sisteminden tamamen emilir ve emilimi takiben salisilik aside hidrolize edilir. Sindirim sisteminden emilim oranı dozaj şekline, besin bulunup bulunmamasına, gastrik pH'ya ve diğer fizyolojik faktörlere bağlıdır. Salisilik asidin plazma yarılanma ömrü yaklaşık 6 saattir. Salisilat metabolizması doyurulabilir ve karaciğerin hem salisilürik asit hem de fenolik glukuronidleri oluşturma kabiliyeti sınırlı olduğunda serum konsantrasyonları yükselerek total vücut klerensi azalır [31].

Çalışmamızda plazma salisilat seviyeleri ASA verildikten 6 saat sonra ölçüldü. ASA-500 ve LPS+ASA-500 gruplarının salisilat plazma yarılanma ömürleri sırasıyla ASA-300 ve LPS+ASA-300 gruplarından beklenen aksine daha kısaydı. LPS verilen ya da verilmeyen ASA gruplarının plazma salisilat seviyeleri karşılaştırıldığında ise LPS+ASA gruplarının salisilat seviyelerinin ASA gruplarınıninkinden daha yüksek olması muhtemelen LPS'nin hepatik sitokrom p450-aracılı ilaç metabolizmasını azaltmasıyla [32] ilişkilidir. Bu azalma IL-1, TNF- α ve muhtemelen IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin aracılığıyla da görülebilir [32]. LPS varlığının salisilik asidin plazma yarılanma ömrünü uzatıyor olması, salisilatın dolaşımında daha fazla kalması ve dokuların daha toksik etkilere maruziyeti anlamına gelebilir.

Sonuç olarak insanlarda nonkardiyojenik pulmoner ödem, akut akciğer hasarı ve asit/baz bozukluklarıyla ilgili şiddetli toksisiteye neden olan ASA dozlarının SD sıçanlarda daha hafif bulgulara neden olduğu gözlenmiştir. LPS ile oluşturulan akciğer hasarı varlığında ASA'nın metabolize edilmesi azalmakta ve salisilatın plazma yarılanma ömrü uzamaktadır. Böylece dolaşımında daha uzun süre kalan salisilat daha toksik etkilere neden olmaktadır. LPS+ASA'nın indüklediği VEGF, MMP-2 ve NO'nun BAL sıvısı seviyelerindeki azalma akciğer dokusu hasarının ilerlemesine ve iyileşme süresinin gecikmesine neden olacaktır.

Bilgi ve Teşekkür

Çalışma, 2010 yılında aşağıdaki kongrede poster (P214) olarak sunulmuştur. Effects of Aspirin Overdose on BALF VEGF of Endotoxemic Rats. 9th International ISSX Meeting. 4-8 September 2010, İstanbul- Turkey.

Çıkar çatışması

Bu çalışmada yazarlar, konuyla ve/veya herhangi başka bir yazar ile ilgili maddi veya manevi bir çıkar ilişkisi içinde bulunmamaktadır.

Kaynaklar

- [1] Lewis HDJr, Davis JW, Archibald DG, Steinke WE, Smitherman TC, et al. Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N Engl J Med* 1983; 309: 396-403.
- [2] Krepleick LW. "Toxicity, Salicylate." Toxicity, Salicylate: eMedicine Emergency Medicine. Medscape 2010. <http://emedicine.medscape.com/article/818242>. (Last accessed: May 2010).
- [3] Gaudreault P, Temple AR, Lovejoy FH Jr. The relative severity of acute versus chronic salicylate poisoning in children: a clinical comparison. *Pediatrics* 1982; 70: 566-9.
- [4] Chyka PA, Erdman AR, Christianson G, Wax PM, Booze LL, et al. American Association of Poison Control Centers; Healthcare Systems Bureau, Health Resources and Services Administration, Department of Health and Human Services. Salicylate poisoning: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management. *Clin Toxicol (Phila)* 2007; 45: 95-131.
- [5] Temple AR. Acute and chronic effects of aspirin toxicity and their treatment. *Arch Intern Med* 1981; 141: 364-9.
- [6] Gabow PA, Anderson RJ, Potts DE, Schrier RW. Acid-base disturbances in the salicylate-intoxicated adult. *Arch Intern Med* 1978; 138 (10): 1481-4.
- [7] Verma SK and Mahajan V. Drug induced pulmonary diseases. *Internet J Pulm Med* 2008; Vol 9: Num 2.
- [8] Antonicelli F, Brown D, Parmentier M, Drost EM, Hirani N, et al. Regulation of LPS-mediated inflammation in vivo and in vitro by the thiol antioxidant Nacystelyn. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: 1319-27.
- [9] Mei SH, McCarter SD, Deng Y, Parker CH, Liles WC, et al. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1. *PLoS Med* 2007; 4 (9): 1525-1573.
- [10] Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295: L379-99.
- [11] Ito Y, Betsuyaku T, Nagai K, Nasuhara Y, Nishimura M. Expression of pulmonary VEGF family declines with age and is further down-regulated in lipopolysaccharide (LPS)-induced lung injury. *Exp Gerontol* 2005; 40: 315-23.
- [12] Kim CO, Huh AJ, Kim MS, Chin BS, Han SH, et al. LPS-induced vascular endothelial growth factor expression in rat lung pericytes. *Shock* 2008; 30: 92-7.
- [13] Bhandari V, Choo-Wing R, Chapoval SP, Lee CG, Tang C, et al. Essential role of nitric oxide in VEGF-induced, asthma-like angiogenic, inflammatory, mucus, and physiologic responses in the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 11021-6.
- [14] Papaioannou AI, Kostikas K, Kollia P, Gourgoulis KI. Clinical implications for vascular endothelial growth factor in the lung: friend or foe? *Respir Res* 2006; 17: 128.

- [15] Le Ferrec E, Ilyin G, Maheo K, Bardiau C, Courtois A, et al. Differential effects of oltipraz on CYP1A and CYP2B in rat lung. *Carcinogenesis* 2001; 22: 49-55.
- [16] Ricard JD, Dreyfuss D, Saumon G. Production of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury: a reappraisal. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1176-80.
- [17] Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmiumreduction method. *Clin Chem* 1990; 36: 1440-3.
- [18] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-53.
- [19] Trinder P. Rapid determination of salicylate in biological fluids. *Biochem J* 1954; 57: 301-3.
- [20] Staub NC. Pulmonary edema. *Physiol Rev* 1974; 54: 678-811.
- [21] Desser RK, Himmelhoch SR, Evans WH, Januska M, Mage M, et al. Guinea pig heterophil and eosinophil peroxidase. *Arch Biochem Biophys* 1972; 148: 452-65.
- [22] Medford AR, Millar AB. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS): paradox or paradigm. *Thorax* 2006; 61: 621-6.
- [23] Kaner RJ, Ladetto JV, Singh R, Fukuda N, Matthay MA, et al. Lung overexpression of the vascular endothelial growth factor gene induces pulmonary edema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 657-64.
- [24] Harris JF, Aden J, Lyons CR, Tesfaigzi Y. Resolution of LPS-induced airway inflammation and goblet cell hyperplasia is independent of IL-18. *Respir Res* 2007; 8: 24.
- [25] Corbel M, Boichot E, Lagente V. Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33: 749-54.
- [26] Fujii Y, Goldberg P, Hussain SN. Contribution of macrophages to pulmonary nitric oxide production in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1645-51.
- [27] O'Kane PD, Queen LR, Ji Y, Reebye V, Stratton P, et al. Aspirin modifies nitric oxide synthase activity in platelets: effects of acute versus chronic aspirin treatment. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 152-9.
- [28] Bratt JM, Williams K, Rabowsky MF, Last MS, Franzi LM, et al. Nitric Oxide Synthase Enzymes in the Airways of Mice Exposed to Ovalbumin: NOS2 Expression Is NOS3 Dependent. *Mediators Inflamm* 2010; pii: 321061.
- [29] Thickett DR, Armstrong L, Millar AB. A Role for Vascular Endothelial Growth Factor in Acute and Resolving Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1332-7.
- [30] Okutan H, Savas C, Delibas N. The antioxidant effect of melatonin in lung injury after aortic occlusion-reperfusion. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2004; 3 (3): 519-22.
- [31] C F R. Food and Drugs. Chapter 1. Food and Drug Administration Subpart C. Part 343. Department of Health and Human Service US Government Printing Office Washington DC. <http://law.justia.com/us/cfr/title21/21-5.0.1.1.18.3.html>. (Last accessed: May 2010).
- [32] Shedlofsky SI, Israel BC, McClain CJ, Hill DB, Blouin RA. Endotoxin administration to humans inhibits hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism. *J Clin Invest* 1994; 94: 2209-14.