



**SIÇANLARDA LPS İLE İNDÜKLENEN AKUT AKCİĞER  
HASARINDA FOSFODİESTERAZ-4 ENZİM  
İNİBİSYONUNUN ETKİLERİNİN  
AQUAPORİN-5 ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI**

**Ecz. Ayşe BOZKURT**  
**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. Elif ÇADIRCI**

**Doktora Tezi-2023**



**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
Graduate School of Health Sciences

**SIÇANLARDA LPS İLE İNDÜKLENEN AKUT AKCİĞER  
HASARINDA FOSFODİESTERAZ-4 ENZİM  
İNHİBİSYONUNUN ETKİLERİNİN AQUAPORİN-5  
ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI**

**Ecz. Ayşe BOZKURT**

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı  
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Elif ÇADIRCI**

**ERZURUM  
2023**



**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
Graduate School of Health Sciences

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı**

**SIÇANLARDA LPS İLE İNDÜKLENEN AKUT AKCİĞER  
HASARINDA FOSFODİESTERAZ-4 ENZİM İNHİBİSYONUNUN  
ETKİLERİNİN AQUAPORİN-5 ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI**

**Ecz. Ayşe BOZKURT**

**Tez Savunma Tarihi** : 31.10.2023

**Tez Danışmanı** : Prof. Dr. Elif ÇADIRCI (Atatürk Üniversitesi)

**Jüri Üyesi** : Prof. Dr. Zekai HALICI (Atatürk Üniversitesi)

**Jüri Üyesi** : Prof. Dr. Yasin BAYIR (Atatürk Üniversitesi)

**Jüri Üyesi** : Prof. Dr. Gökhan OTO (Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi)

**Jüri Üyesi** : Prof. Dr. Nihal ÇETİN (Selçuk Üniversitesi)

**Onay**

Bu çalışma yukarıdaki Jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Elif ÇADIRCI**  
Enstitü Müdürü

**Doktora Tezi**  
**ERZURUM - 2023**

# İÇİNDEKİLER

<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>I</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>VII</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>IX</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>X</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1.Akut Akciğer Hasarı .....	4
2.1.1.Akut Akciğer Hasarının Nedenleri .....	4
2.1.2.Sepsise Bağlı Akut Akciğer Hasarı .....	6
2.1.3.Sepsise Bağlı Akut Akciğer Hasarının Fizyolojisi .....	6
2.1.4.Sepsise Bağlı Akut Akciğer Hasarının Tedavisi.....	9
2.1.5.Akut Akciğer Hasarının Deneysel Modelleri .....	9
2.1.5.1.LPS ile oluşturulan Akut Akciğer Hasarı Modeli.....	10
2.2.Aquaporinler .....	11
2.2.1.Aquaporinlerin Türleri ve Fonksiyonları .....	12
2.2.2.Aquaporinlerin Molekül Yapısı .....	14
2.2.3.Aquaporinlerin Akciğerdeki Rollerini .....	15
2.2.4.Aquaporin-5'in Akciğerdeki Önemli Rollerini.....	17
2.3.PDE Enzimleri .....	19
2.3.1.PDE4 Enzimi Ve Fiziopatolojik Olaylardaki Rolü.....	22
2.3.2.PDE4 Enziminin ALI'deki Rolü.....	24
2.3.3.PDE İnhibitörleri.....	25

2.3.4.Rolipram .....	27
2.3.4.1.Rolipramın Farmakokinetiği .....	29
<b>3. MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>31</b>
3.1.Materyal .....	31
3.1.1.Deney Hayvanları .....	31
3.1.2.Kullanılan İlaçlar ve Hazırlanışları .....	31
3.1.3.Kullanılan Alet ve Cihazlar .....	32
3.2.Metot .....	33
3.2.1.Deney Planı .....	33
3.2.2.Moleküler Analizler .....	34
3.2.2.1.ELISA Analizi .....	34
3.2.2.2.Real Time-PCR Analizi .....	35
3.2.2.1.Rat Akciğer Dokusundan mRNA İzolasyonu.....	35
3.2.2.3.Real Time PCR Yöntemi ile AQP5 mRNA Ekspresyonunun Kantitatif Olarak Belirlenmesi .....	36
3.2.3.Biyokimyasal Çalışmalar .....	36
3.2.3.1.Akciğer Dokusunda Yapılan Analizler .....	36
3.2.4.Histopatolojik İnceleme .....	37
3.2.4.1.Histopatolojik Analizler.....	37
3.2.4.2.Doku Takip İşlemleri ve Kesitlerin Hazırlanması .....	37
3.2.4.3.Boyama Ön İşlemi .....	38
3.2.4.4.Masson Trikrom Triple Boyama.....	38
3.2.4.5.Mikroskopik İnceleme ve Fotoğraflama.....	39
3.2.4.6.İmmünohistokimyasal Boyama Metodu .....	39
3.2.5.Western Blot Analizi .....	40

3.2.6.İstatiksel Analizler .....	41
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>42</b>
4.1. ELISA Bulguları .....	42
4.1.1.İnflamatuvar Sitokin Bulguları .....	42
4.1.1.1.Akciğer Dokusunda TNF- $\alpha$ ELISA Sonuçları.....	42
4.1.1.2.Akciğer Dokusunda IL-6 ELISA Sonuçları.....	43
4.1.2.Akciğer Dokusunda NF- $\kappa$ B ELISA Sonuçları.....	44
4.1.3.Akciğer Dokusunda MAPK ELISA Sonuçları .....	45
4.1.4.Akciğer Dokusunda PDE4D ELISA Sonuçları .....	46
4.1.5.Akciğer Dokusunda cAMP ELISA Sonuçları .....	47
4.1.6.Akciğer Dokusunda AQP5 ELISA Sonuçları.....	48
4.2.Akciğer Dokusunda AQP5 mRNA Ekspresyon Sonuçları.....	49
4.3.Histopatolojik Bulgular.....	50
4.3.1.Masson-Trikrom Boyama Bulguları.....	50
4.3.2.İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları .....	53
4.4.Western Blot Bulguları .....	55
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>57</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>66</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>67</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>94</b>
<b>EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU.....</b>	<b>94</b>
<b>EK-2.ETİK KURUL ONAY FORMU .....</b>	<b>96</b>

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, değerli bilgi ve katkıları ile daima yanımda olan, başarılarıyla özellikle kadınlara rol model olan, bilim insanı yetiştirmek için gecesini gündüzüne katan, tezimin her aşamasında maddi manevi desteklerini esirgemeyen, bilgi, birikim ve tecrübeleriyle meslek hayatıma ışık tutan, onun öğrencisi olmaktan dolayı her zaman gurur duyduğum saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Elif ÇADIRCI'ya en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tezimin her aşamasında değerli bilimsel katkıları ile bana yol gösteren, bilgi ve birikimiyle bizlere sorgulamayı, farklı bakış açılarıyla düşünmeyi öğreten, kendisiyle çalışma fırsatı bulduğum için şanslı olduğumu hissettiren, Sayın Prof. Dr. Zekai HALICI'ya, desteklerini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yasin BAYIR'a; değerli hocam Sayın Prof. Dr. Abdülmecit ALBAYRAK'a; tez kapsamında protein analizlerine katkı sunan sayın Prof. Dr. Adem KARA'ya ve histopatolojik analizleri yapan Sayın Doç. Dr. Erdem TOKTAY'a; bu çalışmayı **16490** proje numarası ile destekleyen **Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı'na**; çalışmalarım sırasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Dr. Pelin AYDIN'a, Ecz. Zeynep KARAKÖY'e, Ecz. Emir Enis YURDGÜLÜ'ne; yoğun eğitim dönemim boyunca beni sabırla destekleyen anneme, babama ve kardeşlerime teşekkürü borç bilirim.

**Ecz. Ayşe BOZKURT**

## ÖZET

### Sıçanlarda LPS İle İndüklenen Akut Akciğer Hasarında Fosfodiesteraz-4 Enzim İnhibisyonunun Etkilerinin Aquaporin-5 Üzerinden Araştırılması

**Amaç:** Bu çalışma, LPS ile indüklenen bir akut akciğer hasarı (*ALI-acute lung injury*) modelinde, Fosfodiesteraz-4 (PDE4) ve Aquaporin-5 (AQP5) arasındaki ilişkiyi potansiyel hücre sinyal yolları üzerinden incelemeyi amaçlamıştır.

**Materyal ve Metot:** Bu çalışmanın ilk aşamasında 5 mg/kg LPS ile sıçanlarda ALI oluşturularak 10'ar hayvandan oluşan 6 grup oluşturuldu. Rolipramın (ROL) farklı dozlarının (1, 3 ve 5 mg/kg) etkisi ALI modelinde incelendi. Birinci grup Sağlıklı, ikinci grup Sağlıklı+ROL5, üçüncü grup ALI, dördüncü grup ALI+ROL1, beşinci grup ALI+ROL3 ve altıncı grup ALI+ROL5 olarak kurgulandı. Deney hayvanları LPS ile indüklendikten bir saat sonra PDE4 inhibitörü rolipram ile tedavi edildi. Çalışmamızın 24. saatinde sakrifiye edilen sıçanlardan elde edilen akciğer dokularındaki AQP5, IL-6, TNF- $\alpha$ , MAPK, NF- $\kappa$ B, PDE4D, cAMP düzeyleri ELISA ile ölçüldü ve akciğer dokuları histopatolojik olarak hasar açısından değerlendirilirken, akciğer dokusundaki AQP5 düzeyi RT-PCR ile ölçüldü. Ayrıca AQP5, NF- $\kappa$ B, Caspaz-3, IL-1 $\beta$ , TLR4 parametrelerin western blot analizi yapıldı.

**Bulgular:** ALI gruplarında kontrol gruplarına göre TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, IL-6, MAPK inflamatuvar düzeylerinde artış, cAMP ve AQP5 düzeylerinde ise düşüş gözlemlendi. Bu durum, PDE4 inhibitörü rolipram dozlarının uygulamasıyla birlikte düzeldi. RT-PCR sonucumuzda ise AQP5 düzeyinin ALI grubunda anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi. Bununla birlikte, histopatolojik sonucumuzda akciğer parankim yapısında alveol çaplarında belirgin derecede azalmalar tespit edildi. Rolipram tedavisinden sonra ise doza bağlı olarak alveol duvarlarındaki ödeme bağlı olarak genişleme ve alveol çaplarında belirgin derecede azalmalar önlemlendi.

**Sonuç:** Fosfodiesteraz-4 enzim inhibisyonunun ALI'de koruyucu etkisinin, AQP5 ve potansiyel hücre sinyal yolları tarafından düzenlenebileceği ve inflamasyonun eşlik ettiği akciğer hastalıklarında PDE4-AQP5 ilişkisinin önemli bir yeri olabileceği değerlendirildi.

**Anahtar Kelimeler:** ALI, AQP5, cAMP, LPS, PDE4, Rolipram

## ABSTRACT

### **Investigation of the Effects of Phosphodiesterase-4 Enzyme Inhibition via Aquaporin-5 on LPS-Induced Acute Lung Injury in Rats**

**Aim:** This study aimed to examine the relationship between Phosphodiesterase 4 (PDE4) and Aquaporin-5 (AQP5) under LPS induced-inflammatory condition via potential cell signaling pathways.

**Material and method:** In the first stage of this study, ALI was induced in rats with 5 mg/kg LPS and 6 groups of 10 animals were created. The effect of different doses (1, 3 and 5 mg/kg) of rolipram (ROL) was examined in the ALI model. The first group was designed as Healthy, the second group as Healthy+ROL5, the third group as ALI, the fourth group as ALI+ROL1, the fifth group as ALI+ROL3, and the sixth group as ALI+ROL5. Experimental animals were treated with the PDE4 inhibitor rolipram one hour after being induced with LPS. The levels of AQP5, IL-6, TNF- $\alpha$ , MAPK, NF- $\kappa$ B, PDE4D and cAMP, which are the parameters determined in the lung tissues obtained from rats sacrificed at the 24th hour of our study, were measured by ELISA and the lung tissues were evaluated histopathologically for damage. AQP5 level in lung tissue was measured by RT-PCR. Additionally, western blot analysis of AQP5, NF- $\kappa$ B, Caspase-3, IL-1 $\beta$ , TLR4 parameters was performed.

**Results:** An increase in inflammatory levels of TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, IL-6, MAPK, and a decrease in cAMP and AQP5 levels were observed in the ALI groups compared to the control groups. This situation improved with the administration of the Phosphodiesterase-4 enzyme inhibitor rolipram doses. In our RT-PCR result, it was observed that the AQP5 level decreased significantly in the ALI group. However, in our histopathological result, significant reductions in alveolar diameters were observed in the lung parenchyma structure. After the rolipram treatment, widening due to edema in the alveolar walls and significant reductions in alveolar diameters were prevented depending on the dose.

**Conclusion:** It was evaluated that the protective effect of phosphodiesterase-4 enzyme inhibition in ALI may be regulated by AQP5 and potential cell signaling pathways, and the PDE4-AQP5 relationship may have an important role in lung diseases accompanied by inflammation.

**Key Words:** ALI, AQP5, cAMP, PDE4, Rolipram

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AEC</b>	:	Alveolar epitel hücre
<b>ALI</b>	:	Akut akciğer hasarı
<b>AM</b>	:	Alveolar Makrofaj
<b>AQP</b>	:	Aquaporin
<b>ARDS</b>	:	Akut Respiratuar Distres Sendromu
<b>BALF</b>	:	Bronkoalveolar lavaj sıvısı
<b>cAMP</b>	:	Siklik AMP
<b>cGMP</b>	:	Bir Siklik Guanozin Monofosfat
<b>DMSO</b>	:	Dimetil sülfoksit
<b>ECMO</b>	:	Ekstrakorporal membran oksijenizasyonu
<b>MAPK</b>	:	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
<b>MODS</b>	:	Çoklu Organ İşlev Bozukluğu Sendromu
<b>MSS</b>		Merkezi Sinir Sistemi
<b>NADPH</b>	:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NF-κB</b>	:	Nükleer Faktör kappa B
<b>NO</b>	:	Nitrik oksit
<b>NPA</b>	:	Asparajin prolin-alanin
<b>LPS</b>	:	Lipopolissakarit
<b>PEC</b>	:	Pulmoner epitel hücre
<b>PDE</b>	:	Fosfodiesteraz
<b>PKA</b>	:	Protein kinaz A
<b>PMN</b>	:	Polimorfonükleer lökositler
<b>TNF-α</b>	:	Tümör nekroz faktör alfa

<b>UCR1</b>	:	Yukarı yönde korunmuş bölge 1
<b>UCR2</b>	:	Yukarı yönde korunmuş bölge 2



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1: Aquaporinin Molekül Yapısı .....	15
Şekil 2.2: AQP5'in hücre içi sinyal yolları .....	19
Şekil 2.3: TNF- $\alpha$ , PDE-PKA-cAMP, MAPK ve NF- $\kappa$ B yolları arasındaki etkileşimler .....	24
Şekil 4.1: Akciğer Dokusunda Ölçülen TNF- $\alpha$ Seviyeleri.....	42
Şekil 4.2: Akciğer Dokusunda Ölçülen IL-6 Seviyeleri.....	43
Şekil 4.3: Akciğer Dokusunda Ölçülen NF- $\kappa$ B Seviyeleri.....	44
Şekil 4.4: Akciğer Dokusunda Ölçülen MAPK Seviyeleri .....	46
Şekil 4.5: Akciğer Dokusunda Ölçülen PDE4D Seviyeleri .....	47
Şekil 4.6: Akciğer Dokusunda Ölçülen cAMP Seviyeleri .....	48
Şekil 4.7: Akciğer Dokusunda Ölçülen AQP5 Seviyeleri.....	49
Şekil 4.8: Akciğer Dokusunda Ölçülen AQP5 mRNA Ekspresyon Sonuçları .....	50
Şekil 4.9: Akciğer Dokusu Masson Trikrom Boyama Sonuçları.....	53
Şekil 4.10: Akciğer Dokusu İmmünohistokimya Boyama Sonuçları .....	55
Şekil 4.11: Akciğer Dokusu NF- $\kappa$ B -p65, Kaspaz-3, TLR4, IL-1 $\beta$ ve AQP5 Western Blot Analiz Sonuçları .....	56

## TABLolar DİZİNİ

<b><u>Tablo No</u></b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Tablo 2.1.</b> PDE'lerin Dağılımı, Biyolojik Etkileri ve İnhibitör Örnekleri .....	21
<b>Tablo 3.1.</b> Rolipram Tedavi Grupları.....	33
<b>Tablo 4.1.</b> Histopatolojik Bulgular Skorlaması.....	52
<b>Tablo 4.2.</b> İmmünohistokimyasal Boyama Skorlama Sonuçları.....	54



# 1. GİRİŞ

Akut akciğer hasarı (ALI), alveolar epitelyal membranın disfonksiyonuna neden olan akut inflamasyon ile karakterizedir (Gouda & Bhandary, 2019). Klinik olarak anlamlı hipoksemi, yaygın bilateral pulmoner infiltrasyon, pulmoner ödem, pulmoner kompliyansa azalma ve fonksiyonel rezidüel kapasitede azalma eşlik eder (Wheeler & Bernard, 2007). Şiddetli pulmoner mikrobiyal enfeksiyonlara yanıt olarak ALI, bir proinflamatuvar immün yanıtın indüklenmesinden sorumlu patojenin immünolojik olarak tanınmasının sonucu olarak ortaya çıkar. ALI ciddi doku hasarına neden olur ve ciddi vakalarda geri dönüşü olmayan pulmoner hasar ölüme yol açabilir (Bernard, 2017). Pnömoni veya sepsisten sorumlu akut mikrobiyal (bakteriyel veya viral) enfeksiyonlar akciğerlerde ciddi inflamatuvar hasara neden olarak kritik hastalarda ALI veya Akut Solunum Sıkıntısı Sendromunun (ARDS) gelişmesine yol açar (Rezoagli ve ark., 2017). Sepsis, konağın enfeksiyonunu takiben immün bozukluğunun neden olduğu ölümcül bir organ disfonksiyonudur (Singer ve ark., 2016). Her yıl, dünya çapında yaklaşık 48,9 milyon sepsis vakası ve 11 milyon sepsis ilişkili ölüm meydana gelmektedir (Rudd ve ark., 2020). Sepsis sırasındaki sitokin fırtınası, çözümlenemeyen akciğer iltihabına ALI veya ARDS gelişmesine yol açabilir. Diğer faktörlerin neden olduğu ALI/ARDS ile karşılaştırıldığında, sepsis ile ilişkili ALI/ARDS'de %30 ila %40 gibi daha yüksek bir ölüm oranına sahiptir (Bellani ve ark., 2016). Ek olarak, sıklıkla ALI hastalarında kötü prognozun göstergesi olan TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$  dahil olmak üzere pro-inflamatuvar sitokinler, özellikle inflamatuvar yanıtın erken aşamalarında ALI'nin başlatılması, gelişmesi ve pro-inflamatuvar yanıtın sürekli artması için önemlidir (Chen ve ark., 2021). LPS, inflamasyonu artırabilen, TLR4/NF-kB sinyal yolunu düzenleyebilen, ALI'de oksidatif stresi ve inflamatuvar basamakları aktive edebilen hücre yüzeyi reseptörlerine

bağlanır. Ayrıca ALI patogenezinde akciğer epitel hücrelerinin apoptozu da önemlidir; Aktive edilmiş Kaspaz-3, apoptozun baş uygulayıcısıdır.

Önceki çalışmalar, Mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolunun, sepsis kaynaklı ALI/ARDS ile ilişkili inflamatuvar süreçte önemli bir patojenik role sahip olabileceğini göstermiştir (Fang ve ark., 2017). Bir dizi patolojik durum (konjestif kalp yetmezliği, solunum sıkıntısı sendromu ve yaralanma veya enfeksiyondan kaynaklanan pulmoner ödem gibi) akciğeri etkileyebilir ve aquaporinler (AQP'ler) ile ilgili bozulmuş sıvı taşınması ile karakterize edilir (Sun ve ark., 2014). AQP'ler, birçok dokuda eksprese edilen ve plazma zarı su geçirgenliğini artırma ve hızlı sıvı hareketini destekleme işlevi gören su seçici kanalların bir grubudur (King & Agre, 1996). AQP ailesinin on üç üyesi, AQP0-AQP12, birçok memeli hücresinde tanımlanmıştır. AQP5 esas olarak akciğerde bulunmakta (Morishita ve ark., 2004) ve AQP5'in akciğer fizyolojisi ve patolojisinde önemli roller oynayabileceği öne sürülmüştür (Song ve ark., 2000). AQP5'in Lipopolissakarit (LPS) tarafından transkripsiyonel inhibisyonuapikalında NF- $\kappa$ B ve MAPK yollarının rol oynayabileceği gösterilmektedir ve AQP5'in ekspresyonunun bir siklik AMP/protein kinaz A (cAMP/PKA) bağımlı yol tarafından düzenlenebileceği gösterilmiştir.(Hosoi ve ark., 2020) Geniş bir enzim ailesi, siklik nükleotid fosfodiesterazlar (PDE'ler), şu anda, en az 11 farklı PDE(1-11) izoenzim ailesi bilinmektedir (Beavo, 1995) ve cAMP'nin bozunmasından sorumludur ayrıca PDE inhibisyonu, substrat siklik nükleotidin hücre içi konsantrasyonlarını yükseltmektedir (Conti ve ark., 2003). Geniş bir yelpazede anti-inflamatuvar özelliklere sahip ikinci bir haberci molekül olan cAMP, pulmoner doku yeniden şekillenmesini düzenlemektedir (Shepherd, 2006). Artan cAMP seviyelerinin potansiyel faydalı etkileri arasında pulmoner ödem inhibisyonu, inflamasyon inhibisyonu ve hava yolu hiperreaktivitesinin inhibisyonu yer alır (Chang ve ark.,

2012). PDE4 ailesi cAMP için yüksek afiniteye sahiptir ve bu molekülün terapötik potansiyelinden yararlanmak için PDE4 inhibitörleri geliştirilmiştir (Giembycz, 2000). Bir PDE4 seçici inhibitörü rolipram (Lipworth, 2005) ile tedavi medyan sağkalımı uzatarak alveolar fibrin birikimini, akciğer iltihabını ve vasküler sızıntıyı azaltmıştır ayrıca inflamasyon, fibrin birikimi ve alveolarizasyonla ilgili anahtar genleri azaltmıştır (de Visser ve ark., 2008). Ancak PDE4 inhibisyonunun akciğerdeki inflamatuvar süreçte akciğerlerde bronşiyal ve alveoler epitelyal hücrelerin apikal membranlarında ve seröz salgı yapan hücrelerinde varlığı gösterilmiş olan AQP5 (Ohinata ve ark., 2005) üzerinden değerlendirilmesi yapılmamıştır.

Dolayısıyla bizim amacımız PDE4 inhibisyonunun etkilerinin; LPS ile indüklenen akut akciğer hasarında vital organlardan akciğerdeki muhtemel etkilerini AQP5 üzerinden incelemek ve bu etkilerinde TNF- $\alpha$ , IL-6, Kaspaz-3, TLR4, IL-1 $\beta$ , MAPK, NF- $\kappa$ B, ve cAMP yollarının rolünü bütüncül olarak araştırmaktır. Böylece inflamatuvar hasara karşı PDE4 inhibisyonu ile değişen hücre içi yanıtta AQP5 proteinlerinin rolü ortaya konulacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Akut Akciğer Hasarı

ALI, alveolar kapiller bariyeri bozulması ve solunum yolundaki gaz değişiminin bozulmasıyla akciğerlere yoğun nötrofil infiltrasyon ve aktivasyonu ile kendini gösteren bir hastalıktır (Kosutova ve ark., 2018). ALI, sıklıkla ekstravasküler akciğer suyunun artması ve pulmoner ödem oluşumu ile kendini gösteren alveolar-kılcal bariyerin geçirgenliğinin bozulmasına yol açan alveolar epitel hasarı ile karakterizedir (Sun ve ark., 2015). ALI veya daha şiddetli klinik tezahürü olan ARDS, her yıl yüksek morbidite ve mortalite oranlarına yol açan akut inflamatuvar bir akciğer hastalığıdır (Zoulikha ve ark., 2022). ALI/ARDS'nin klinik seyri değişkendir: Bazı hastalar 1-2 hafta içinde iyileşirken, diğerleri uzun süreli mekanik ventilasyon ile daha uzun süreli bir seyir yaşarlar. Birincil solunum yetmezliğinden ölüm nispeten nadirdir ancak uzun süreli kritik hastalık ve mekanik ventilasyon ile üst üste enfeksiyon veya çoklu organ yetmezliği riski artar ve bu da mortalitenin artmasına neden olur. Yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde, yıllık 75.000 ölüme tekabül eden %40 ölüm oranına sahip yaklaşık 190.600 ALI/ARDS vakası vardır. Ölümlerin çoğu, birincil solunum yetmezliğinden ziyade sepsis veya çoklu organ işlev bozukluğu sendromuna (MODS) bağlanabilir (Tsushima ve ark., 2009). Pulmoner, nöromusküler, bilişsel ve psikiyatrik sekeller dahil olmak üzere, devam eden önemli morbidite, ALI/ARDS'den kurtulanların %50 ila %70'inde görülür ve toplum üzerindeki mali yük oldukça fazladır (Sun ve ark., 2014).

#### 2.1.1. Akut Akciğer Hasarının Nedenleri

ALI/ARDS; pnömoni, aspirasyon, toksik inhalasyon, boğulmaya yakın veya akciğer kontüzyonu gibi akciğerde doğrudan yaralanma dahil olmak üzere çeşitli etiyojilerin kritik hastalığının bir sonucu olarak ortaya çıkabilir; bunun yanı sıra

sepsis, yanık, pankreatit, jinekolojik rahatsızlıklar (plasenta anileşmesi, amniyotik emboli, eklampsi) veya yoğun kan transfüzyonu gibi dolaylı mekanizmalar da akut akciğer hasarında rol oynayabilir (Ware & Matthay, 2000). ALI/ARDS iki histopatolojik evreye ayrılabilir: Eksüdatif faz (1 ila 3 gün), tip I pnömositlerin çoğunluğunun nekrozu, yaygın mikrovasküler yaralanma ve inflamatuvar hücrelerin ve proteinli sıvının interstisyuma akışı ile yaygın alveolar hasar ile karakterizedir. Fibroproliferatif faz (3 ila 7gün) ise tip II pnömosit hiperplazisi ve fibroblast proliferasyonu olarak kendini gösteren bir akciğer onarımı sürecidir. ALI/ARDS'de inflamatuvar yanıtı başlatan ve güçlendiren proinflamatuvar mediatörlerin yanı sıra sitokinlerin karmaşık otokrin ve parakrin karşılıklı ilişkileri vardır (Tomashefski, 1990). ALI/ARDS'deki temel değişiklikler; alveolar kapiller membranın artan geçirgenliğini, lökositlerin ve trombositlerin aşırı birikimi ve aktivasyonunu, nötrofil aracılı inflamasyonu ve pıhtılaşma yollarının aktivasyonunu içerir (Matthay ve ark., 2012). ALI/ARDS'de hücrel tepkiler, endotelial yapışma moleküllerinin ekspresyonunun yanı sıra polimorf-nükleer hücrelerin marjını ve göçünü içerir. Ayrıca; sitokinler, lipid mediatörleri, proteazlar, oksidanlar, büyüme faktörleri nitrik oksit (NO), nöropeptidler ve NF- $\kappa$ B gibi hücrelere bağlı veya hücrelerden bağımsız hümoral tepkiler de vardır (Windsor ve ark., 2005). Akciğer dokusunda bulunan başlıca bağışıklık hücreleri olan alveolar makrofajlar (AM'ler), aşırı inflamatuvar sitokinler salarak ve akciğerde nötrofil infiltrasyonunu ve doku hasarını teşvik ederek ALI'nin patogenezinde merkezi bir rol oynar. Alveolar epitel hücrelerinin (AEC) ilk aracısının inflamasyonu indüklediği kesin mekanizma belirsizliğini korumaktadır. AEC'ler, alveolde ilk patojen savunma hattı olarak bir bariyer oluşturan geniş bir yüzey alanına sahip yapısal hücrelerdir. Alveolar epitel, bu süreçte sadece yaralanmakla kalmaz aynı zamanda akciğer hastalıklarının ilerlemesinde de itici bir güçtür (Liu ve ark., 2007). Alveolar epitel bütünlüğünün kaybı

ve tip II alveolar hücrelerin yaralanması normal sıvı taşınmasını bozabilir, böylece sıvının alveolar boşluktan çıkarılmasını bozabilir (Zapol ve ark., 1979).

### **2.1.2.Sepsise Bağlı Akut Akciğer Hasarı**

Enfeksiyona karşı düzensiz konak yanıtının neden olduğu yaşamı tehdit eden organ disfonksiyonu olarak tanımlanan sepsis, dünya çapında yüksek ölüm oranlarına sahip önemli bir sağlık sorunudur (Napolitano, 2018). Sepsis, ALI/ARDS ilerlemesine neden olan pulmoner inflamasyon yaparak akciğerlerde geri dönüşü olmayan hasara neden olmaktadır (V. Kumar & Chhibber, 2011). Daha önceki çalışmalar, sepsisin yalnızca ABD'de yılda 210.000'den fazla ALI/ARDS vakasından sorumlu olduğunu ve 74.500'den fazla ölüme neden olduğunu göstermiştir (Sarieddine ve ark., 2009). Sepsis ile ilişkili ALI/ARDS, diğer nedenlere bağlı oluşan ALI'ye kıyasla daha yüksek bir ölüm oranına sahiptir (Stapleton ve ark., 2005). Sepsis ile ilişkili ALI/ARDS, pulmoner epitel hasarına bağlı doğrudan akciğer hasarı veya endotel hücrelerini içeren dolaylı hasar dahil olmak üzere herhangi bir tarafta başlayabilir (Englert ve ark., 2019).

### **2.1.3.Sepsise Bağlı Akut Akciğer Hasarının Fizyolojisi**

ALI/ARDS tetikleyici koşulları olan sistemik sendromlar (sepsis veya şok) veya akciğerin yaralanması veya akciğer enfeksiyonu gibi sistemik sepsis veya inflamatuvar yanıt sendromuna neden olan sistemik belirtilere sahiptir (St John ve ark., 1993). Sepsis, akciğer dokusunda aşırı inflamatuvar yanıt üretimi, alveolar yapılarda değişiklik, endotelial ve alveolar geçirgenlik artışı ve alveolar sıvı klirensinin azalması ile ilişkili olarak ALI gelişiminin önemli bir nedenidir, bu nedenle akciğer fonksiyonunu ciddi olarak bozar (Hong-min ve ark., 2016). ALI/ARDS'den çoklu organ yetmezliği oluşumuna; inflamasyonun aktivasyonu, endotelial değişikliklerle sonuçlanan kemoatraktanlar ve TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımı, immünosupresif etkileri olan karşı-inflamatuvar sitokinlerin salınımı, modüle

nötrofillerin marjı ve monositlerin sistemik aktivasyonu ve doku nekrozuna neden olan mikrodolaşım hasarı dahil olmak üzere birçok çalışma yapılmıştır (Goris, 1985). Aşağıda bu çalışmalardan bahsedilmiştir: Pnömoni ile ilişkili sepsisli hastalarda görülen ALI/ARDS sırasında pulmoner epitel hasarı, sürfaktan protein-D'nin yükselmesi ile gösterilebilir. Bununla birlikte, bu hastalarda endotel hasarının belirteçleri olan von Willebrandfaktör, IL-6 ve IL-8 seviyeleri düşüktür. Doğrudan sepsis ile ilişkili ALI sırasında görülen pulmoner epitel hasarı, dolaylı pnömoni aracılı olmayan sepsise kıyasla daha şiddetlidir (Calfée ve ark., 2015). Ayrıca CCL-3 veya makrofaj inflamatuvar protein-1 $\alpha$  nötrofil infiltrasyonununa, pulmoner vasküler sızıntıya ve erken mortaliteye neden olarak sepsis kaynaklı ALI'ye aracılık eder. (Kellner ve ark., 2017) Proinflamatuvar moleküllerin (sitokinler, ROS ve RNS) üretimi ve hipoksi, sepsis kaynaklı ALI sırasında pulmoner epitel bariyerine zarar verir. Pulmoner epiteldeki bu hasar, bariyer fonksiyonunu değiştirerek alveolar boşluğa sıvı ve protein sızıntısına neden olur. Sepsis sırasında hem tip I hem de II AEC'lerin yaralanması, daha önce tarif edildiği gibi çeşitli biyobelirteçlerin varlığı ile hem plazma hem de pulmoner lavaj sıvısında kolayca değerlendirilebilir (Chawla ve ark., 2016). Sepsis sırasında pulmoner epitel hasarı ve geçirgenliğinin artması, aktin organizasyonundaki değişikliği içerir. Septik akciğerin pulmoner epitel hücreleri (PEC) artmış bir  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin gösterir ancak sepsis ile ilişkili ALI sırasında inhibisyonunun, endotel geçirgenliğini ve dolayısıyla sepsis ile ilişkili ALI'yi artırabileceğinden araştırılması gerekir (Sheppard, 2012). Sepsis sırasında ALI'nin sonraki (proliferatif veya fibroproliferatif) evreleri, hasarlı epitel hücrelerinin mitokondriyal ROS ve hipoksi ile indüklenebilir faktör-1a gerektiren fibroblast benzeri hücrelere epitelyal-mezenkimal geçiş dönüşümünü içerir (Zhou ve ark., 2009). Sepsis sırasında üretilen en aktif inflamatuvar peptitlerden biri olan C5a seviyesi, (Guo & Ward, 2005) C5aR1 veya C5aR'ye bağlanma yoluyla ciddi ALI'ye

neden olabilir, bu da septik akciğere artan bir nötrofil infiltrasyonuna ve sitokin/kemokin fırtınasına neden olur. Bu nedenle, sepsis ile ilişkili ALI sırasında akciğerlere göç eden nötrofiller, bakteriyel pnömoniye kıyasla akciğerlere daha fazla zarar verici etkiler gösterir (Russkamp ve ark., 2015). Akciğer alveollerindeki nötrofil infiltrasyonu, sepsis sırasında AM aktivasyonuna yanıt olarak pulmoner transendotelyum yoluyla gerçekleşir. Pulmoner endoteldeki NADPH (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) oksidaz aktivasyonu, sepsis ile ilişkili ALI sırasında transendotelyal nötrofil göçünde çok önemli bir rol oynayan AM aktivasyonuna yanıt olarak süperoksit anyonu üretir (Wang ve ark., 2008). Bu nötrofiller apoptotik hücre ölümüne daha az eğilimlidir ve sepsis kaynaklı şiddetli ALI'de önemli bir rol oynar. Ayrıca, bu infiltre nötrofiller, ölü boşluğu indükleyen kılcal damarlarda uzun süreli tutulmaları nedeniyle pulmoner mikrosirkülasyonu bloke eder, bu da sepsis kaynaklı ALI'yi daha da kötüleştirir (Park ve ark., 2019). ALI'ye neden olan mekanizmalar ve inflamasyonun çözülmesi sepsis ile ilişkili ALI/ARDS sırasında paralel olarak meydana gelir.

İlk resolution adımı, alveolar-kılcal bariyerin yeniden kurulmasını ve dokuda yerleşik progenitör hücrelerin proliferasyonunu takiben hasarlı alveoler tip I epitel hücrelerinin yerini almak üzere alveoler tip II epitel hücrelerinin göçünü içerir (Englert ve ark., 2019). Bununla birlikte, şiddetli ALI'ye neden olan kontrolsüz inflamatuvar süreç, apoptoza dirençli nötrofillerle akciğerlerin birikmesi ve Bronkoalveolar lavaj sıvısı (BALF)'de proinflamatuvar sitokinin IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  yükselmesi ile gösterildiği gibi gram-negatif bakterilerin neden olduğu sepsis sırasında geri dönüşü olmayan hasara neden olan rezolüsyon sürecini bastırır (V. Kumar & Chhibber, 2011). Bu nedenle, sepsis ile indüklenen ALI sırasındaki ciddi PEC hasarı nedeniyle, sepsis olmaksızın sadece bakteriyel pnömoni sırasında gözlenen ALI'ye kıyasla daha zararlı ve geri

döndürülemezdir (Ray ve ark., 2003). Son zamanlarda, pulmoner ödem oluşumu ile yakından ilişkili olan ekstrasvasküler akciğer suyunun septik şoklu hastalarda yoğun bakım ünitesi mortalitesinin bağımsız bir belirleyicisi olduğu gösterilmiştir. Buna göre, biyolojik membranlar boyunca su taşıma mekanizmalarını anlamak ve şiddetli sepsis ve septik şok sırasında pulmoner ödemi hafifletmek, akciğer hasarının ilerlemesini tersine çevirebilir (Sun ve ark., 2015).

#### **2.1.4.Sepsise Bağlı Akut Akciğer Hasarının Tedavisi**

Şu anda sepsis kaynaklı ALI için spesifik bir tedavi yoktur. Genel tedavi stratejileri, yüksek akışlı nazal kanül ve noninvaziv ventilasyon, yüzüstü pozisyonlandırma, nöromüsküler blokaj, ekstrakorporal membran oksijenizasyonu (ECMO), destekleyici bakım ve anti-inflamatuar tedaviyi içerir (Kim & Hong, 2016). Son çalışmalar, nöromüsküler bloke edici ajanların erken kısa süreli kullanımının, endikeyse sepsis kaynaklı ALI'li hastalarda yararlı olabileceğini düşündürmektedir (Papazian ve ark., 2010). Steroidler anti-inflamatuar tedavide önemli ve etkili bir tedavi aracıdır ancak sepsis kaynaklı ALI'de kortikosteroidin rolü kesin değildir (Annane ve ark., 2009). Statinlerin inflamasyonu azalttığı bildirilmiştir ancak yakın zamanda yapılan çok merkezli bir çalışmada sepsis kaynaklı ALI'de hiçbir mortalite yararı göstermemiştir (Wang ve ark., 2019).

#### **2.1.5.Akut Akciğer Hasarının Deneysel Modelleri**

Akciğer hasarının mekanizmalarını araştırmak için deneysel akciğer hasarının farklı hayvan modelleri kullanılmıştır. Çoğu; sepsis, kemik kırığına sekonder lipid embolisi, asit aspirasyonu, pulmoner veya distal vasküler yatakların iskemi-reperfüzyonu ve diğer klinik riskler gibi ARDS için bilinen risk faktörlerinin hayvanlarda oluşturulmasına dayanır. Bununla birlikte, bu modellerin hiçbiri insan akciğer hasarının özelliklerini tam olarak temsil etmez. Bu sınırlamalara rağmen,

ALI/ARDS'nin hayvan modellerini kullanan çalışmalar elzemdir çünkü şu anda akciğer hasarının patofizyolojisi hakkında bilgi üretmek ve karmaşık biyolojik sistemlerde yeni terapötik müdahaleleri test etmek için araç olarak hayvan modellerinin yerini alacak hiçbir şey yoktur. Hayvanlarda, insan akut akciğer hasarının özelliklerini oluşturmaya yönelik olarak çok sayıda farklı model stratejileri geliştirilmiştir.

İntratrakeal veya intranazal olarak bakteri veya LPS gibi bir ürünün verilmesi, hidroklorik asit gibi aspirasyon oluşturmak üzere bir asitin veya gastrik partiküllerin verilmesi, %0.9 sodyum klorür ile seri lavajlar yapılarak sürfaktanın tüketilmesi, oksijenin yüksek inspirasyon fraksiyonunda verilmesi, hilusun klempe edilerek iskemi/reperfüzyon oluşturulması veya yüksek tidal volümlerde mekanik ventilasyon kullanarak mekanik germeye maruziyet gibi modeller zararlı bir stimulusla akciğerin direkt olarak hasarlandığı modellere örnek verilebilir. Akciğerin indirekt olarak hasarlandığı modeller ise sepsis oluşturma temeline dayanan modelleri içerir. Örneğin; çekal bağlama ve delme, intravenöz olarak bakteri veya LPS verilmesi ve mezenterik iskemi/reperfüzyon gibi. Ayrıca multipl kemik kırıklı hastalarda kemik iliğinden oleik asit serbestleşmesini taklit etme temeline dayanan oleik asit modeli de bu kategoriye dahil edilmektedir (Matute-Bello ve ark., 2008).

#### **2.1.5.1.LPS ile oluşturulan Akut Akciğer Hasarı Modeli**

LPS, bir polar lipid baş grubu (lipid A) ve tekrarlayan disakkaritler zincirinden oluşan gram negatif bakterilerin dış zarında bulunan bir glikolipiddir (Rezaiguia ve ark., 1997). LPS, gram negatif bakterilere yanıt olarak sepsisin önemli bir aracısıdır ve LPS'nin sistemik uygulaması, bakteriyel sepsisin sonuçlarını modellemek için kullanılan en eski yaklaşımlardan biridir. Endotel hücrelerinin apoptozu, LPS uygulamasının ardından hızla gelişir ve diğer doku hasarlarından önce gelir (Matute-Bello ve ark., 2008). LPS'nin hava yoluyla uygulanması, küçük hayvan modellerinde pulmoner

inflamasyonu ve ALI'yi incelemenin yaygın bir yoludur. Aerosol haline getirilmiş LPS'nin solunması ve ayrıca nazal veya intratrakeal uygulama gibi çeşitli yaklaşımlar tarif edilmiştir. Örneğin, intraperitoneal sedasyondan sonra trakea açığa çıkarılır ve 22 G venöz kateter yoluyla LPS uygulanır. Kullanılan LPS dozajına bağlı olarak, lökosit invazyonu, proinflamatuvar sitokinlerin upregülasyonu ve alveolo-kapiller bariyerin bozulması ile güçlü ve tekrarlanabilir bir inflamatuvar reaksiyon, saatler veya günler içinde indüklenir (Ehrentraut ve ark., 2019). LPS'nin 1 ila 4 ng/kg arasında değişen dozlarda intratrakeal uygulanması; BALF, polimorfonükleer (PMN) lökositler, albümin ve proinflamatuvar sitokinlerde artışlarla karakterize edilen erken bir faz takip eder. LPS'nin intratrakeal uygulanmasından 24-48 saat sonra bronkoalveolar lavajdaki sitokin konsantrasyonlarının normalleşmesi ile BALF'deki PMN, monosit, makrofaj ve lenfosit sayılarında artışları ile karakterize edilen daha sonraki bir faz takip eder (O'grady ve ark., 2001).

## **2.2.Aquaporinler**

Yaygın olarak "su kanalları" olarak adlandırılan aquaporinler; akciğerler, böbrekler, MSS (merkezi sinir sistemi), kalp, cilt, gözler dahil olmak üzere çeşitli organ sistemlerinde suyun zarlardan seçici olarak taşınmasına aracılık eden küçük entegre zar proteinleridir (Verkman, 2012). Hücreler ve dokular arasında su taşınması fizyolojik olarak homeostazın korunmasına yardımcı olan temel bir süreçtir. Normal transselüler su taşınması, zarın lipid tabakası boyunca difüzyon yoluyla veya diğer çözünen maddelerle pasif difüzyon yoluyla gerçekleşebilirken, aquaporin su kanalları, sıvı taşınması için yüksek su geçirgenliği gerektiren alanlarda yer alır. 1992 yılında John Hopkins Üniversitesi'nden Peter Agre tarafından AQP keşfi ona 2003 yılında Nobel Ödülü kazandırmıştır (Agre ve ark., 1993). Bu değişken sıvı taşıma süreçlerini karşılamak için aquaporinler, farklı organ sistemlerinde çeşitli doku ve hücre dağılımı

gösterir. AQP'lerin, su taşınmasındaki değişikliklerle karakterize edilen hastalıklarda rol oynadığı yaygın olarak düşünülmektedir (Kunzelmann & Mall, 2002). AQP'ler, akciğer ve bağırsağın su homeostazını sürdürmede çok önemli bir rol oynar ancak spesifik tedavi oldukça sınırlıdır. Bu nedenle etkili tedaviler geliştirilmelidir (Gonen & Walz, 2006).

### **2.2.1. Aquaporinlerin Türleri ve Fonksiyonları**

AQP'ler, çeşitli insan dokularında dağılmış küçük, transmembran, su taşıma proteinlerinin bir ailesidir (Verkman, 2005). Plazma membranları su taşınması için en büyük engeldir. AQP'ler, plazma zarı yoluyla su geçirgenliğini düzenleyen hayati proteinlerdir. AQP ailesinin on üç üyesi, AQP0-AQP12, birçok memeli hücresinde tanımlanmıştır (Jiang ve ark., 2015). 1988'de keşfedilen 28 kDA'lık bir zar proteini olan AQP1, ilk su kanalı proteini (Ahmed ve ark., 2012). AQP ailesinin üç alt grubu vardır: AQP, aquagliseroprin ve süperaquaporin. AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 ve AQP8 yalnızca su taşımacılığında sorumludur. Aquagliseroprinler sadece küçük, suda çözünür olan su, gliserol ve üre gibi maddelere geçirgendir. Aquagliseroprinler arasında AQP3, AQP7, AQP9 ve AQP10 bulunmaktadır. Süperaquaporinler ise AQP11 ve AQP12'dir (Ishibashi ve ark., 2009). AQP'lerin çoğu, ozmotik gradyanlara bağlı su taşınmasını sağlamak için plazma zarında bulunurken, süperaquaporinler olarak AQP11 ve AQP12, hücre içi su taşınmasını, organel hacmini veya veziküler homeostazı düzenlemek için sitoplazmada eksprese edilir (Badaut ve ark., 2014). İnsan AQP'leri farklı normal dokularda dağılır ve çoğu epitel ve endotelyumun yanı sıra eritrosit, astrositler, adipositler ve iskelet kası gibi diğer bazı tipik hücrelerde bulunur (Verkman, 2005). AQP0, lens şeffaflığı ve homeostazı içeren insan lensinde bulunmaktadır (Harries ve ark., 2004). AQP1; kırmızı kan hücreleri, beyin, akciğerler ve böbreklerde bulunur ayrıca su geri emilimi ve sıvı salgılanması ile

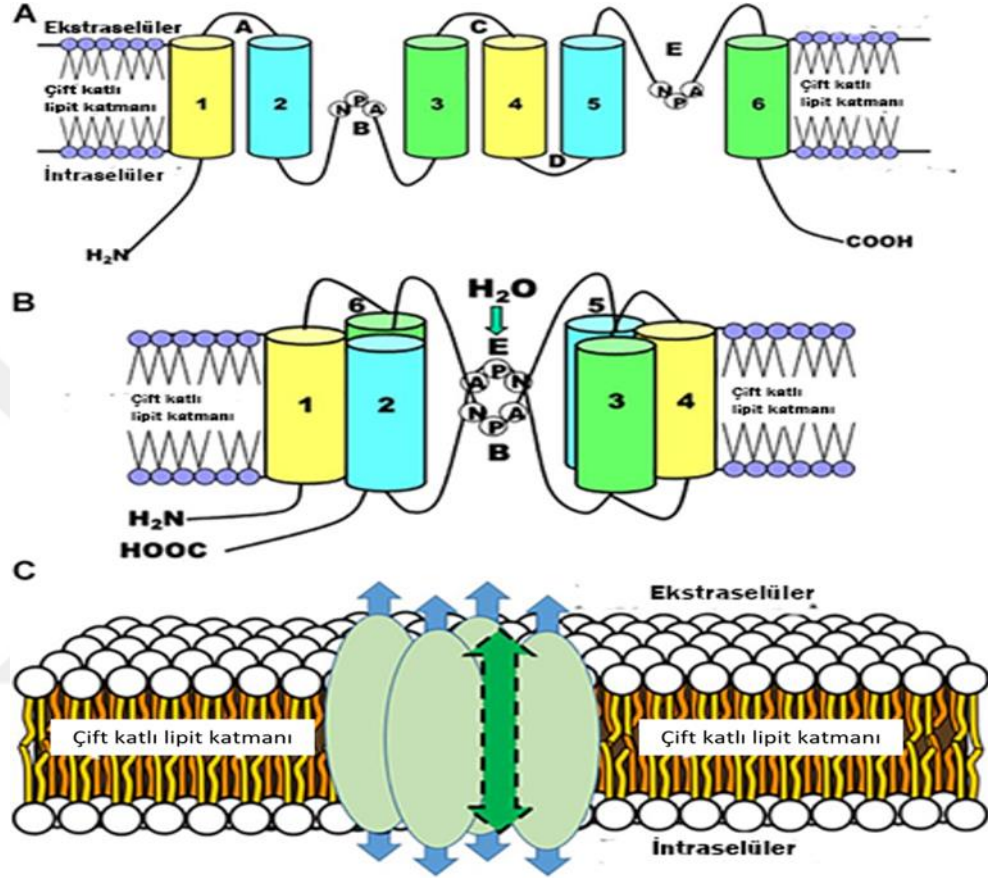
ilişkilidir. AQP1 en çok, özellikle proksimal nefronda suyun emilmesini sağlayan proksimal tübülde bulunmaktadır (Nielsen ve ark., 1999). AQP2 esas olarak böbrekte eksprese edilir ve protein mutasyonu diabetes insipidus ile ilişkilidir (Deen ve ark., 1994). AQP2, üreme sistemindeki fonksiyonel rolü hala bilinmemekle birlikte, köpeklerin rete testislerinde, efferent kanallarında ve epididiminde de bulunmuştur (Cheidde & Schor, 1999). AQP3, böbrek toplama kanalında ve konjonktival epitel deri ve gözler de dahil olmak üzere gibi çok çeşitli organlarda bulunmuştur (Hamann ve ark., 1998). *X. laevis* oositlerini kullanan birkaç çalışmada, AQP3'ün gliserol ve etilen glikol, propilen glikol ve asetamid gibi diğer maddeleri taşıdığını göstermiştir (Yamaji ve ark., 2006). AQP4 beyin, omurilik ve optik sinirde en bol bulunan su kanalıdır ve beyin suyu homeostazını kontrol eder (Mader & Brimberg, 2019). AQP5, esas olarak alveolar epitel, trakea ve üst bronşta eksprese edilir (Gomes ve ark., 2009). AQP5, muhtemelen proteinli salgılara su taşımak için pankreas, gözyaşı ve tükürük bezlerinin ekzokrin kısımlarında eksprese edilir (Nielsen ve ark., 1997). Bu protein aynı zamanda epitel şeffaflığını koruyan kornea hücrelerinde ve onun altındaki stroma üzerinde de bulunmuştur (Ishibashi, 2009). AQP6 ile ilgili çalışmalar ise bu proteinin hücre içi veziküllerin zarlarında bulunduğunu, esas olarak nitrat taşıdığını ve böbrek kanalında klorür iyonu gibi bazı iyonlara karşı geçirgenlik gösterdiğini ortaya koymuştur (Gomes ve ark., 2009). AQP7 molekülleri esas olarak yağ dokusu, testis, kalp, iskelet kası ve böbreklerde eksprese edilir ve su geçirgenliğinin yanı sıra çözünen maddelerde de rol oynar (Rodríguez ve ark., 2006). AQP8 başta pankreas, karaciğer, tükürük bezleri, böbrekler, testisler, epididim, duodenum, mide, jejunum, akciğer, trakea ve plasenta olmak üzere birçok organ ve dokuda eksprese edilir (Liu ve ark., 2006). AQP9; karaciğer, lökositler, testis, beyin ve yumurtalıkta tanımlanmıştır (Gomes ve ark., 2009). AQP9 ayrıca dişi domuzların yumurta kanalında ve uterusunda gelişen foliküllerden

elde edilen granüloza hücrelerinde de lokalize olmuştur (Skowronski ve ark., 2009). AQP10, gastrointestinal sistemin diğer bölümlerinde değil fakat duodenum ve jejunumda seçici olarak eksprese edilmiştir (Hatakeyama ve ark., 2001). AQP11 böbrekler, beyin, karaciğer, testisler, kalp, bağırsak ve yağ dokusunda eksprese edilir (Gorelick ve ark., 2006) ancak işlevi hala bilinmemektedir. AQP12 sadece pankreas asiner hücrelerinde bulunur (Barbara, 2010). Bu alt aile için spesifik konum belirlenmemiştir, ancak pankreastaki varlığı, sindirim enzimi salgılanması ve pankreas hücre sıvılarında olası bir yol anlamına gelir (Rojek ve ark., 2008).

### **2.2.2. Aquaporinlerin Molekül Yapısı**

Her AQP monomeri yaklaşık 28 ila 30 kDa ağırlığındadır ve plazma zarını kapsayan fiçı benzeri bir yapı oluşturmak için altı başlıklı a-sarmal alana sahiptir. Yapıdaki polipeptit, yaklaşık 270 amino asitli tek bir zincirden oluşmakta olup, sitoplazmada amino (N) ve karboksil (C) terminalleri yer almaktadır (Sales ve ark., 2013). Tüm AQP'ler arasındaki, gözenek oluşumunda önemli bir rol oynadığı kuvvetle düşünülen Asparajin Prolin-Alanin (NPA) konsensüs motifi ortak özelliktir (Gonen & Walz, 2006). Kısa bir sarmal ile yüksek oranda korunmuş iki dizi motif NPA, monomerin zıt taraflarında bulunur. NPA motifleri, birbirleriyle eşleşerek suyu geçirmek için moleküle bükülür (Preston ve ark., 1993). AQP monomeri bağımsız olarak su gözenek içerir ve sıvı taşınmasına katkıda bulunmak için homotetramerler olarak toplanır (Wang ve ark., 2015). İlk ve en dar nokta, hücre dışı gözenek ağzına yakın bir yerde bulunur. Suyu özgü su porinlerinde, bir su molekülününkiyle yaklaşık olarak aynı çapta 2,8'dir ve gliserol gibi poliollerin bir karbon hidroksil grubunun çapına uyan su gliseroporinlerde yaklaşık 3,4'tür (B. Wu & Beitz, 2007). AQP monomerleri topluluğu homotetramerlerde merkezi bir gözenek oluşturur. Birkaç çalışmada; merkezi gözeneğin AQP1, AQP4 ve AQP5'te O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> veya nitrik oksit gazları için geçirgen

olduğunu gösterilmiştir. AQP'lere bağlı gaz taşınması, serbest difüzyondan daha hızlıdır ve biyolojik işlevde önemli rol oynar (Wang ve ark., 2015). Aquaporinin molekül yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir (Azad ve ark., 2021).



Şekil 2.1: Aquaporinin Molekül Yapısı

### 2.2.3. Aquaporinlerin Akciğerdeki Roller

AQP 1, 3, 4 ve 5 akciğerde bulunmakla birlikte; (H. Liu & Wintour, 2005) AQP8 ve AQP9 akciğerdeki bronş epitel hücrelerinde bulunabilir. Bununla birlikte AQP'ler; akciğer kompartımanlarındaki dağılımlarında tür varyasyonları gösterir (Kang ve ark., 2017). AQP1, AQP3, AQP4, AQP5'in akciğer ekspresyonu, hava yolları epiteli, alveolar epitel, ilişkili mikrovasküler endotel ve submukozal bezler dahil olmak üzere çeşitli akciğer hücre tiplerinde geniş hücresel dağılım gösterdiği sıçan çalışmalarında

gösterilmiştir. AQP1 esas olarak alveol kılcak endotel hücrelerinde eksprese edilir ve hücre zarları boyunca su taşınmasını kolaylaştırır (Ablimit ve ark., 2013). AQP3, bazal epitel hücrelerinde (nazofarenks ve büyük hava yolları) eksprese edilir. İnsan küçük hava yolu epitelinde de bu protein olduğu gösterilmiştir. AQP4, üst solunum yollarındaki çeşitli epitel bölgelerinin (nazofaringeal, trakeal, bronşiyal) siliyer sütunlu hücrelerinde eksprese edilir (Verkman, 2007). Sıçan ve farede, AQP5 esas olarak akciğerdeki alveolar tip I ve tip II hücrelerin apikal membranında eksprese edilir ve alveolar sıvının oluşumu ile ilişkili gibi görünmektedir (Ablimit ve ark., 2013). Hücresel lokalizasyon açısından, AQP3 ve AQP4 birincil olarak bazolateral membranda eksprese edilirken, AQP5 proteininin eksprese edilen hücrelerin apikal membranda lokalize olduğu gösterilmiştir. Bu dört AQP'nin akciğer dokusunda bu tür hücreye özgü ekspresyonu ve lokalizasyonu, akciğer dokusundaki çeşitli bölmeler boyunca su taşıma bariyerlerinin üstesinden gelmeye yardımcı olur. Örneğin, submukozal bez epiteli ve hava yolu epitelindeki AQP ekspresyonu, hava yollarını kaplayan ince bir sıvı tabakası olan ASL'yi korumak için hava yolu yüzeyine sıvının (glikoproteinlerin yanı sıra) salgılanmasına izin verir. Benzer şekilde, alveolar epitel ve vaskülatür endotelindeki AQP'ler, sıvının alveolar hava boşluğu ve ilişkili damar sistemi arasında hareketine izin verir. AQP1, AQP3, AQP4 ve AQP5'ten yoksun farelerde su geçirgenliği ölçümleri sonuçları, AQP'lerin hava yolları, alveoller ve plevradaki epitelyal ve endotelyal bariyerler boyunca ozmotik olarak yönlendirilen su hareketi için büyük bir yol sağladığını göstermiştir (Verkman, 2007). Çeşitli akciğer patolojilerinde AQP'lerin değişmiş ekspresyonuna ilişkin ilginç veriler, bunların akciğer patofizyolojisi ve hastalığındaki rollerini güçlendirmektedir. Bu bağlamda, birçok çalışmada; enfeksiyon, inflamasyon, akciğer hasarı ve fibrozis gibi çeşitli akciğer patoloji modellerinde AQP'lerin ekspresyonunda değişiklik olduğunu göstermiştir dolayısıyla bu durum

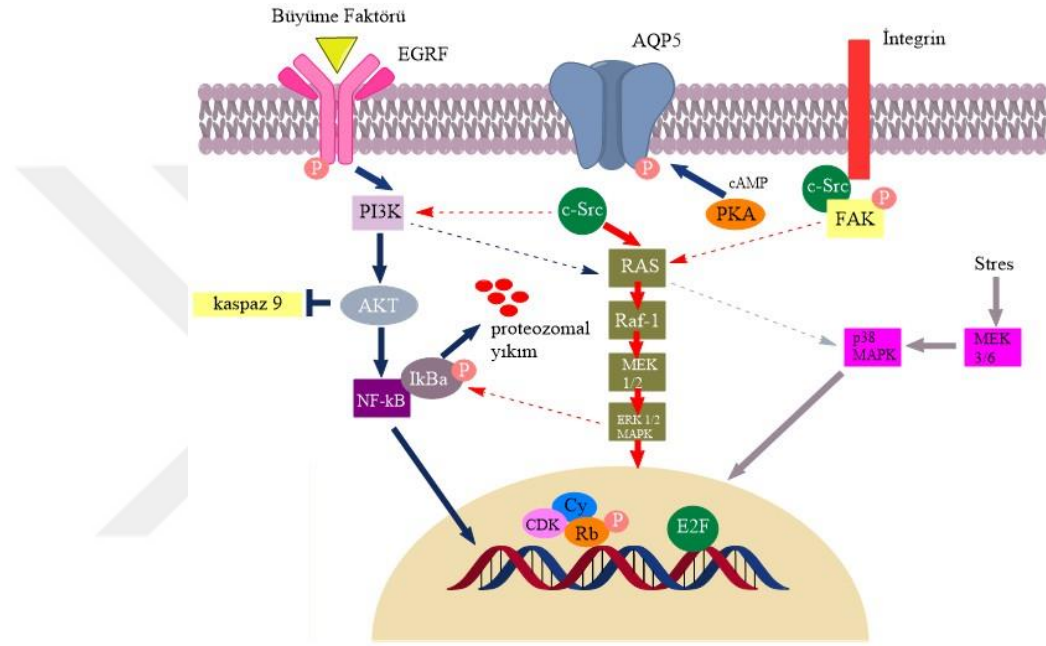
AQP'lerin akciğer patolojilerindeki rolünü ima etmiştir. Ayrıca; AQP'lerin hücre proliferasyonu ve göçündeki geleneksel olmayan hücre rolleri, embriyonik gelişim sırasında (diğer organ sistemlerinde olduğu gibi) akciğer epitelyal ve endotelyal hücrelerinde ve ayrıca akciğer kanseri ve akciğer hasarından sonra yeniden şekillenme/iyileşme gibi patolojik koşullar altında doğrudan ilgili olabilir (Saadoun ve ark., 2005). Akciğerde su birikmesi ile karakterize pulmoner ödem, farklı akciğer hasarı modellerinde belirgin bir fenotiptir. Mevcut veriler; hava boşluğu ve hücreler, interstisyel veya vasküler bölmelerin arasındaki sıvı kaçakçılığının akciğer AQP'leri tarafından düzenlenmesinde ilginç bir katkıyı göstermektedir. Ek olarak, kanıtlar AQP'lerin ekspresyonunun solunum fizyolojisindeki büyüme faktörleri, inflamatuvar araçlar ve ozmotik stres tarafından modüle edildiğini göstermektedir (King ve ark., 2000). Dolayısıyla AQP'ler; ödem, hücre göçü ve inflamatuvar sitokinler ve araçların salınımını modüle etmede terapötik potansiyel hedef olarak yeni olası adaylardır (Towne ve ark., 2000).

#### **2.2.4. Aquaporin-5'in Akciğerdeki Önemli Rollerini**

Akciğerlerde, AQP'lerin olası işlevleri, doğum sırasında alveolar sıvının emiliminde ve yetişkin akciğerlerinde akut ve subakut akciğer hasarına yanıt olarak gaz değişiminde ve akciğer su içeriğinin düzenlenmesinde yer alır (Li ve ark., 2011). İnsan vücudundaki 13 AQP'den (AQP0 ila AQP12) dördü (AQP 1, 3, 4 ve 5) hava yollarında ve akciğerlerde bulunmaktadır (Sun ve ark., 2014). Bu AQP'ler arasında AQP5, tip I alveolar epitel hücrelerinde bulunan baskın su kanalıdır (Wang ve ark., 2019) ve hava sahası-kılcal ozmotik su geçirgenliğini düzenlemek için önemlidir (Ma ve ark., 2000) çünkü AQP5, hava sahası ve kılcal bölmeler arasında ozmotik olarak yönlendirilen su taşımacılığı için ana yolu sağlar (Li ve ark., 2011). Hayvan ve hücre kültürü modellerinde yapılan çalışmalarda, deneysel bir ALI'den sonra su ve iyon kanallarının

bozulduğunu bildirilmiştir. Bununla birlikte, şu anda insan akciğerlerinde bu kanallardaki değişiklikler hakkında çok az veri bulunmaktadır (Liu ve ark., 2007). Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, AQP5'in normal akciğer su homeostazının korunmasında kilit bir rol oynadığını ve AQP5'in hücre yüzeyi ekspresyon miktarındaki değişikliklerin çeşitli akciğer hastalıklarında anormal su metabolizmasına katkıda bulunabileceğini göstermiştir (Nagai ve ark., 2007). Ayrıca, pulmoner kapiller membran bariyeri hasarının olası sonucu olarak gözlemlenen azalmış AQP5 ekspresyonu, bunların bu membran boyunca bu sıvı kaçakçılığı mekanizmalarının düzenlenmesinde olası rollerini ortaya koymaktadır (Towne ve ark., 2000). Bazı çalışmalar, AQP5'in ekspresyon değişikliğinin, inflamasyonla ilişkili pulmoner ödem için bir yanıtı temsil edebileceğini düşündürmektedir. Akciğerdeki aquaporin ile ilgili son çalışmalar, AQP5'in sıçanlarda alveolar tip I'in apikal membranında inflamasyona yanıtta rol alabileceği ve sıvı taşınmasında daha önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Akciğer AQP5 ekspresyonunun, ALI'li farelerde artmış inflamatuvar reaksiyon ve alveolar epitelyal ve vasküler endotelyal hücrelerin apoptozisi ile birlikte önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Hasan ve ark., 2014). Farelerde AQP5 eksikliğinin akciğerlerdeki alveolar kılcal bariyerin ozmotik su geçirgenliğinde on kat azalma sonucunu doğurduğu ve radyasyon, viral enfeksiyon ve şiddetli akut pankreatit ile ilişkili akciğer hasarı modelinde AQP5 ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2019). AQP5'in LPS tarafından transkripsiyonel inhibisyonunda, NF- $\kappa$ B ve MAPK yollarının rol oynadığı gösterilmektedir ve AQP5'in cAMP'ye bağlı fosforilasyonu, hücre zarındaki yapısal ekspresyonu ve yanal difüzyonunda rol oynayabilmektedir (Hosoi ve ark., 2020). Bir çalışmada, AQP5 knock-out hayvanlarda, *Pseudomonas aeruginosa*'nın neden olduğu ALI'yi ağırlaştırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu çalışmalar AQP5'in normal su hareketini sürdürmede ve ALI'de pulmoner

inflamasyonu inhibe etmede çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Wang ve ark., 2019). Dolayısıyla bu çalışmalar, AQP5'in normal doku su homeostazını sürdürmede çok önemli bir rol oynadığını ve AQP5'in anormal ekspresyonu ve/veya işlev bozukluğunun akciğerde anormal su metabolizmasına neden olabileceği ve bunun da pulmoner ödem oluşumuna yol açabileceğini göstermiştir (Sun ve ark., 2015). AQP5'in hücre içi sinyal yolları Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2: AQP5'in hücre içi sinyal yolları

### 2.3.PDE Enzimleri

PDE'ler, 11 aileden (PDE1-PDE11) oluşan siklik nükleotitlerin bozunması için mevcuttur (Kumar ve ark., 2013). PDE isimlendirmesi (PDE1-PDE11) ürünü oldukları genlere, biyokimyasal özelliklerine, düzenlemelerine ve farmakolojik ajanlara duyarlılıklarına göre oluşturulmuştur (Beavo, 1995). PDE alt ailelerinin dağılımları, inflamasyon, biliş, lipogenez, çoğalma, apoptoz ve farklılaşma alanındaki farmakolojik araştırmaları için önemli bir destek sağlayabilen farklı hücre ve dokularda çeşitlilik gösterir (Chiricozzi ve ark., 2016). Yapısal olarak, tüm PDE'ler korunmuş karboksi-

terminal katalitik çekirdeklere sahipken, amino-terminal bölgeleri aileler, alt aileler ve spesifik izoformlar arasında farklılık gösterir. N-terminal bölgelerinin bir dizi işlevsel rolü vardır: Bunlar, belirli hücre altı konumlarını ve sinyalozomları hedeflemeyi ve düzenleyici moleküllerden veya translasyon sonrası modifikasyonlardan gelen sinyallere verilen yanıtların modülasyonunu içerir (Ke & Wang, 2007). Bazı PDE'ler spesifik olarak cGMP'yi (PDE5, 6 ve 9), bazıları spesifik olarak cAMP'yi (PDE4, 7 ve 8) bozar ve bazılarının (PDE1, 2, 3, 10 ve 11) ikili özgülüğü vardır (Bolger, 2021). Döngüsel nükleotid PDE'ler, hücreler içinde önemli bir ikinci haberci olan cAMP'yi parçalamak için tek yolu sağlar, böylece cAMP seviyelerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. cAMP, adenilil siklazın etkisiyle ATP'den üretilirken, PDE'ler cAMP'yi aktif olmayan 5'-monofosfata hidrolize eder. İkinci haberci olarak cAMP; hücre göçünü, mitokondriyal homeostaziyi, gen transkripsiyonunu, hücre çoğalmasını ve hücre ölümünü düzenler (Lefkimiatis & Zaccolo, 2014). Hücre içi ikinci haberciler, cAMP ve cGMP; vasküler direnç, kalp debisi, nöroplastisite, bağışıklık tepkisi ve inflamasyon dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar. Bu siklik nükleotitlerin hücre içi seviyeleri, özellikle aktif olmayan 5-AMP ve 5-GMP ürünlerini oluşturmak için cAMP ve cGMP'deki bir siklik fosfat bağının hidrolizini katalize eden enzimler fosfodiesterazlar tarafından düzenlenir. Böylece, PDE'ler, cAMP ve/veya cGMP'nin parçalanması yoluyla hücre sinyalini modüle edebilir (Lugnier, 2006). PDE'lerin dağılımı, biyolojik etkileri ve inhibitör örnekleri Tablo 2.1'de verilmiştir (Mokra & Mokry, 2021).

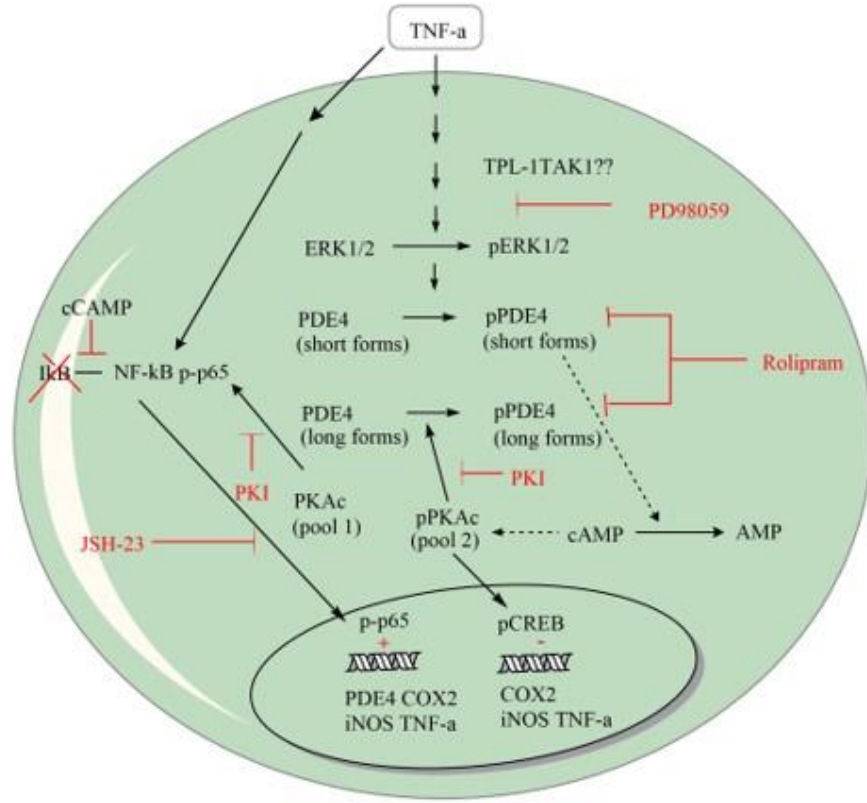
**Tablo 2.1.PDE'lerin Dağılımı, Biyolojik Etkileri ve İnhibitör Örnekleri**

PDE'LER	SUBSTRAT	PDE'LERİN BİRİNCİL DOKU DAĞILIMI	PDE'LERİN ETKİLERİ	İNHİBİTÖR ÖRNEKLERİ
PDE1	cAMP/cGMP	Düz kas, adiposit, pankreas, nöronlar, makrofajlar/monositler, testisler/spermatozoa	Beyin, kalp, akciğer, damar düz kasının düzenlenmesi, bağışıklık hücrelerinin hayatta kalması ve aktivasyonu, nöronal fonksiyonlar, spermatogenez	Vinpocetine Nicardipine nimodipine
PDE2	cAMP/cGMP	Böbrek üstü bezi, kalp, akciğer, karaciğer, trombositler, endotel hücreleri, adiposit, beyin	Endotel geçirgenliği ve trombosit fonksiyonlarının düzenlenmesi, aldosteron salgılanmasının düzenlenmesi, nöronal fonksiyonlar,	EHNA BAY-60-7750 oxindole
PDE3	cAMP/cGMP	Kalp, düz kas, akciğer, karaciğer, trombositler, adiposit, pankreas, bağışıklık hücreleri, beyin, endotel, epitel, oositler	Miyokardiyal kontraktilite, trombosit agregasyonu, damar ve hava yolu düz kas kasılması, inflamasyonun düzenlenmesi ve fibrozis, trombosit işlevleri, aracılık insüline yanıt, hücrenin düzenlenmesi çoğalma	Milrinone cilostazol olprinone ensifentrine (RPL554)
PDE4	cAMP	Beyin, Sertoli hücreleri, böbrek, karaciğer, kalp, düz kas, akciğer, adiposit, endotel hücreleri, bağışıklık hücreleri, pankreas	Nöronal fonksiyonlar, inflamasyonun düzenlenmesi, mikrovasküler geçirgenlik ve fibrozis, vasküler ve hava yolu düz kas kasılma ve proliferasyon, miyokardiyal kasılma, doğurganlık	Rolipram cilomilast roflumilast apremilast
PDE5	cGMP	Akciğer, trombositler, düz kas, kalp, endotel hücreleri, beyin, böbrek, mide bağırsak sistemi	Damar ve hava yolu düz kas kasılması, yeniden şekillenme, trombosit işlevler, katılım iltihap ve oksidatif stres, nöronal fonksiyonlar	Sildenafil dipyridamole zaprinast tadalafil vardenafil
PDE6	cGMP	Fotoreseptörler, epifiz bezi	Sinyal iletimi ve fotoreaksiyon, melatonin salınımının düzenlenmesi	Non-selektif
PDE7	cAMP	İskelet kası, damar düz kas, akciğer, kardiyomiyositler, böbrek, beyin, pankreas, T- ve B-lenfositleri, dalak	T-lenfositlerin ve diğer bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu, bronkokonstriksiyon	BRL 50481 IC242 ACB16165
PDE8	cAMP	Testis, göz, karaciğer, iskelet kası, kalp, böbrek, yumurtalık, beyin, T-lenfositler, tiroid bezi, pankreas	T hücrelerinin aktivasyonu, spermatogenez ve Leydig hücrelerinin düzenlenmesi, bronkokonstriksiyon	PF-04957325
PDE9	cGMP	Böbrek, dalak, karaciğer, akciğer, beyin, bağırsak hücreleri, iskelet kası, duymak	Nöronal fonksiyonlar, inflamasyona katılım ve bronkokonstriksiyon	BAY-73-6691 PF-04447943
PDE10	cAMP/cGMP	Testis, beyin, tiroid bezi, pankreas	Nöronal fonksiyonlar, öğrenme, hafıza süreçler	Papaverine TP-10 MP-10
PDE11	cAMP/cGMP	İskelet kası, prostat, böbrek, karaciğer, hipofiz ve tükürük bezleri, testisler	Spermatogenez	Non-selektif

### 2.3.1.PDE4 Enzimi Ve Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü

PDE4; cAMP'ye özgü, beyinde, kardiyovasküler dokularda, düz kaslarda, keratinositlerde ve immünoositlerde (T hücreleri, monositler, makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler, eozinofiller dahil) yüksek oranda eksprese edilir (Chiricozzi ve ark., 2016). Bugüne kadar ~20'si bilinen birçok PDE4 izoformu, bu ailenin eylem yelpazesini anlamak için önemli bir zorluk teşkil etmektedir. Bununla birlikte, seçici ifade yoluyla, bu çeşitlilik, PDE4 izoformları farklı hedefleme ve düzenleyici özellikler sergilediği için, hücre tipine özgü bir temelde cAMP sinyalini uyarlama yeteneği sunar (Conti ve ark., 2003). Şu anda, PDE4 ailesi, uzun PDE4 ve kısa PDE4 izozimlerini kodlayan çeşitli alternatif mRNA ekleri, en az 35 farklı PDE4 proteini ile 4 genden (PDE4A, PDE4B, PDE4C ve PDE4D) oluşan en büyük PDE ailesini temsil eder (Lugnier, 2006). PDE4 izoformları üç gruba ayrılır: Uzun izoformlar, izoforma özgü N-terminal bölgesi ile katalitik birim arasında yer alan, yukarı yönde korunmuş bölge 1 (UCR1) ve yukarı yönde korunmuş bölge 2 (UCR2) olarak adlandırılan iki düzenleyici alana sahiptir. Kısa izoformlar ve süper kısa izoformlar UCR1'den yoksundur ve kesik bir UCR2'ye sahiptir. UCR modüllerinin önemli bir işlevsel rolü, PKA ve ERK (Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz) fosforilasyonu yoluyla PDE4 düzenlemesinin belirlenmesidir (Houslay & Adams, 2003). UCR1, bir PKA fosforilasyon bölgesi içerir, bu enzim tarafından uzun izoformların etkinleştirilmesine izin verir, böylece cAMP bozunması için hücrel kapasiteyi artırarak cAMP sinyali için hücrel desensitizasyonun önemli bir bölümünü sağlar (Sette & Conti, 1996). cAMP ve cGMP hidrolizinden sorumlu hücre içi enzimlerin bir süper ailesi olan fosfodiesterazlar, PDE4'e özel bir önem verilerek yeni terapötik hedefler olarak ortaya çıkmıştır. PDE4, bağışıklık hücrelerinde ve hava yolu düz kas hücrelerinde eksprese edilir ve inflamatuvar yanıtları düzenler (Houslay ve ark., 2005). PDE4; cAMP seviyelerinin modülasyonu

yoluyla, monositlerin, T hücrelerinin ve nötrofillerin pro-inflamatuar etkileri, hava yolu ve vasküler düz kas daralması ve adenilil siklaz bağlantılı G-proteinine bağlı reseptörler aracılığıyla nörotransmitter sinyalleri dahil olmak üzere lökosit tepkileri düzenler (Castro ve ark., 2005). Bazı çalışmalarda PDE4D knock-out farelerde antidepresan benzeri bir profil gözlemlenmiştir dolayısıyla bu durum PDE4D tarafından düzenlenen cAMP sinyalinin depresyonun patofizyolojisinde ve farmakoterapisinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Öte yandan, PDE4B eksikliği olan makrofajların, LPS tehdidine yanıt olarak TNF- $\alpha$  'yı eksprese etme yeteneği ciddi şekilde bozulmuştur. Bu nedenle, belirli bir PDE4 genini devre dışı bırakmanın, bireysel izoformlar tarafından seçici fonksiyonel düzenleme için bir rolü destekleyen hücre davranışı üzerinde sınırlı ancak tutarlı bir etkiye sahip olduğu görülmektedir (Shepherd, 2006). PDE4, kan basıncı ve son organ komplikasyonları gibi metabolik sendromun yönlerini de düzenleyebilir. PDE4D polimorfizmleri ile iskemik inme arasında pozitif bir ilişki, farklı popülasyonlarda tutarlı bir şekilde rapor edilmiştir. Ayrıca; PDE4C ve PDE4D, pankreatik  $\beta$ -hücrelerinde eksprese edilir ve insülin sekresyonunu kontrol ettiği düşünülmektedir. PDE4 kontrollü cAMP-PKA sinyali, glukagon benzeri peptid-1'in transkripsiyonu için güçlü bir uyarıcıdır (Heimann ve ark., 2010). TNF- $\alpha$ , PDE-PKA-cAMP, MAPK ve NF- $\kappa$ B yolları arasındaki etkileşimler Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3: TNF- $\alpha$ , PDE-PKA-cAMP, MAPK ve NF- $\kappa$ B yolları arasındaki etkileşimler

### 2.3.2. PDE4 Enziminin ALI'deki Rolü

PDE, hücre içi ikinci habercileri hidrolize eden ve sinyal transdüksiyonunda önemli bir rol oynayan bir enzim sınıfıdır (Omar ve ark., 2019). PDE4, hava yolu inflamasyonunun önemli bir modülatörü olarak hizmet eder (Michalski ve ark., 2012). Akciğer hastalıklarında PDE4 (PDE4A, PDE4B, PDE4C ve PDE4D) dikkat çeken bir alt tiptir ve PDE4B, inflamatuvar yanıtla yakın ilişkisi nedeniyle daha fazla ilgi çekicidir (Amata ve ark., 2014). Önceki çalışmalarda, PDE4B'nin inflamatuvar hastalıklarda yukarı regüle edildiği ve PDE4B'nin inhibisyonunun inflamatuvar yanıtı önemli ölçüde hafifletebileceği gösterilmiştir ve bu durum PDE4B'nin terapötik bir hedef olabileceğini düşündürmektedir. Daha önce bahsedildiği gibi, PDE4B ağırlıklı olarak inflamasyon ile ilişkili görünmektedir. PDE4B nakavt ratlarda, akciğer epitel hücreleri, pulmoner

mikrovasküler endotel hücreleri ve vasküler düz kas hücreleri dahil olmak üzere birçok hücre tipinde LPS kaynaklı NF- $\kappa$ B, aktivasyonunu ve inflamatuvar yanıtı inhibe etmiştir. Ek olarak, PDE4B silinmesi LPS kaynaklı ROS oluşumunu zayıflatmıştır (Ma ve ark., 2014). Dolayısıyla bir çalışmada PDE4B'nin inhibisyonunun ALI üzerinde bir anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğunu gözlemlenmiştir (Zhou ve ark., 2022). Son araştırmalar, PDE4B'nin ablasyonunun, akut *P. aeruginosa* enfeksiyonunun bir fare modelinde akciğer hasarını hafiflettiğini bulmuştur (Abou Saleh ve ark., 2020). PDE4, nötrofiller ve lenfositler gibi çoğu inflamatuvar hücrede bulunur. Dolayısıyla; PDE4, inflamasyonun düzenlenmesinde rol oynayan ana PDE'dir ve bu nedenle pulmoner hava embolisi ile ilgili ALI'de kritik olması beklenir (Peng ve ark., 2019). Dolayısıyla ALI/ARDS patogenezinde akciğer epitel ve endotel hücrelerinin, nötrofillerin, makrofajların, T-lenfositlerin, vasküler düz kas hücrelerinin vb. temel rolü nedeniyle, bahsedilen hücrelerde dağılan PDE4 izoformlarının inhibisyonu, ya seçici olmayan PDE inhibitörleri ya da seçici, PDE4 inhibitörleri ARDS'de özel bir ilgi konusudur (Mokra & Mokry, 2021).

### **2.3.3.PDE İnhibitörleri**

PDE'lerin dağılımı, farklı hücre ve dokularda çeşitlilik gösterirken, bazı hücreler birkaç tip PDE üretebilir. PDE inhibitörleri, bir veya birkaç PDE izoenzimini hedefler ve böylece siklik nükleotidlerin metabolizmasını inhibe eder ve biyolojik etkilerini uzatır.(Lugnier, 2006) Dolayısıyla; spesifik PDE inhibitörlerinin geliştirilmesine ve bunların immünomodülasyon süreçlerindeki rolüne olan ilgi yenilenmiştir. Bu nedenle, cAMP'ye özgü PDE'lerin seçici inhibitörleri, başta bağışıklık bozuklukları olmak üzere multipl skleroz ve inflamatuvar sistemler ve ayrıca depresyon, iskemi-reperfüzyon hasarı ve Alzheimer hastalıkları gibi çeşitli insan hastalıklarının tedavisi için terapiler olarak önerilmiştir (Houslay ve ark., 2005).

## **PDE'lerin Seçici Olmayan İnhibitörleri**

PDE'lerin seçici olmayan inhibitörleri, çeşitli dokularda dağıtılan birkaç PDE'nin bir eylemini aynı anda modüle edebilir; ancak bu geniş spektrumlu etki genellikle istenmeyen yan etkilerle ilişkilendirilir. Seçici olmayan PDE inhibitörleri, (teofilin (1,3-dimetilksantin), kafein (1,3,7-trimetilksantin) veya teobromin (3,7-dimetilksantin)) çayda doğal alkaloidler olarak mevcut olduğundan, bir grup kahve, kakao vb. ksantin ile temsil edilir.

## **PDE'lerin Seçici İnhibitörleri**

PDE1 inhibitörleri, PDE1'i modüle eden vazokonstriksiyon, vasküler ve kardiyak remodeling ve nörotransmisyonu hedefleyen, voltaj kapılı sodyum kanallarını hedefleyen, hücre toksisitesinin ve ölümün düzenlenmesine katılan ve IKK' (Ikappa B kinaz) yı hedefleyen, hücrel bir inflamatuvar yanıtı etkileyen çok etkili ajanlardır (Zhang ve ark., 2018). PDE2 inhibitörleri bilişsel bozuklukların, özellikle anksiyete ve depresyonun ve diğer nörodejeneratif hastalıkların tedavisine dahil edilebilir (Zhang ve ark., 2017). PDE3 inhibitörleri pozitif inotropik (PDE3A yoluyla), vazodilatör ve zayıf kronotropik etkiler göstermektedir. Ek olarak, PDE3 inhibitörleri, miyokardiyal iskemi-reperfüzyon ile ilişkili baskılanmış inflamatuvar değişikliklerde gösterildiği gibi, güçlü inflamasyon modülatörleridir (Gresele ve ark., 2011). PDE4 inhibitörleri, inflamatuvar hücrelerin ve ilgili sitokinlerin aktivasyonunun ve alımının azaltması ve ayrıca akciğer yapısal hücrelerinden (alveolar ve bronş epitel hücreleri, mikrovasküler endotel hücreleri, hava yolu düz kas hücreleri, fibroblastlar vb.) sitokinlerin ve diğer biyolojik olarak aktif maddelerin salınımının azaltması nedeniyle geniş anti-inflamatuvar etkiler gösterir (Zuo ve ark., 2019). PDE4 inhibitörleri, küçük hava yolunun yeniden şekillenmesine yol açan epitelyalden mezenkimal geçişi baskılamada da etkilidir (Milara ve ark., 2014). Ek olarak, PDE4 inhibitörleri, hava yolu inflamasyonu hava yolu

hiperreaktivitesini azaltır ve öksürür ve siliyer motiliteyi iyileştirir (Mokra & Mokry, 2021). PDE4'ün seçici inhibisyonu, birçok inflamatuvar ve immünomodülatör hücrede cAMP içeriğini artırır, bu da inflamatuvar yanıtın çeşitli yönlerinin baskılanmasına ve ayrıca düz kas ve pulmoner sinirler üzerindeki etkilere yol açar (Torphy, 1998). PDE5 inhibitörleri, hipoksik durumlar ve vasküler hipertrofi ve yeniden şekillenme inhibitörleri dahil olmak üzere güçlü pulmoner vazodilatörler olarak işlev görür (Ghofrani ve ark., 2006). PDE7 inhibitörleri, özellikle T-lenfositlerin aracılık ettiği inflamatuvar hastalıklarda faydalı olabilir (M. Giembycz & Smith, 2006). PDE7 inhibitörlerinin bir diğer önemli özelliği, PDE4 inhibitörlerinin etkilerini artırma yetenekleridir (Mokra & Mokry, 2021). PDE8'in inhibisyonu PDE8'in hava yolu düz kas hücrelerinde ve T-lenfositlerinde ekspresyonundan dolayı T-hücreleri aracılı inflamasyon ve bronkokonstriksiyonda ek bir hedefi temsil ettiğini gösterir (Vang ve ark., 2016). Son zamanlarda, PDE9 inhibitörleri, Alzheimer hastalığının tedavisi için potansiyel terapötikler olarak çok dikkat çekmiştir (Tajima ve ark., 2018). PDE9 inhibitörlerinin, idrar dokusunda hücre içi cGMP seviyelerinin artırılması yoluyla dizüri için tedavi etkileri beklentileri tarafından yönlendirildiği gösterilmiştir (Nagasaki ve ark., 2012).

#### **2.3.4.Rolipram**

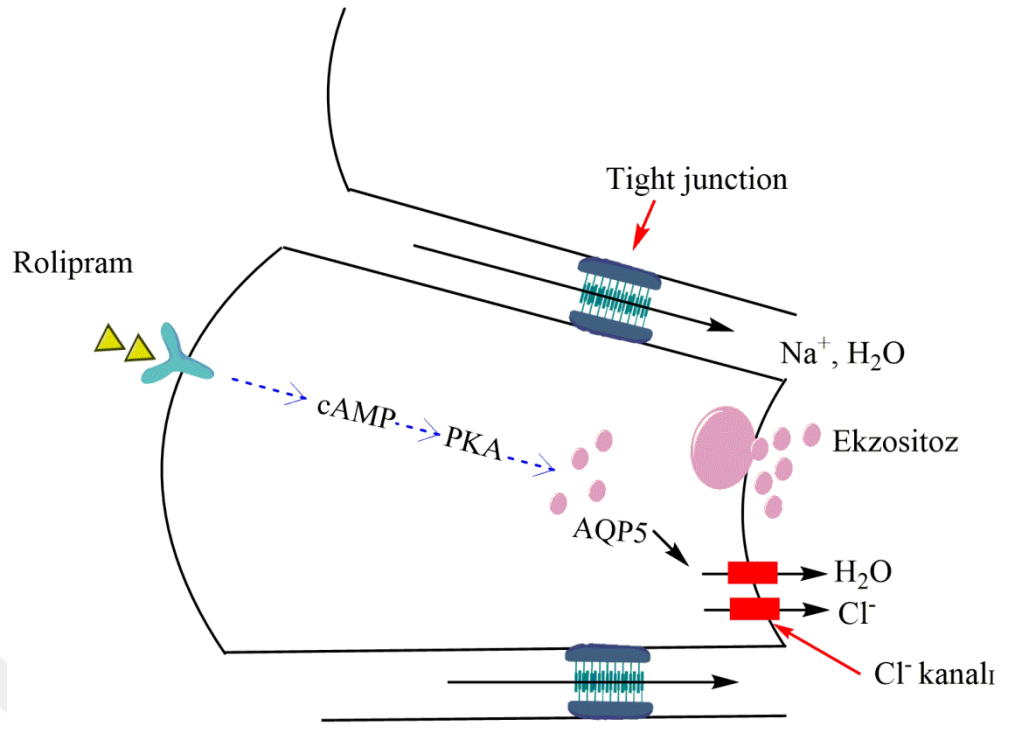
Rolipram, 1990'ların başında Schering AG tarafından mükemmel bir antidepresan ilaç olarak tanımlanan ilk prototipik PDE4 inhibitörüdür (O'Donnell & Zhang, 2004). Daha fazla araştırma üzerine, PDE4'lerin iki konformasyonda var olduğu belirlenmiştir: Yüksek afiniteli rolipram bağlayıcı konformasyon ve düşük afiniteli bir rolipram bağlayıcı konformasyonu (Torphy ve ark., 1999). PDE4'ün yüksek afiniteli konformerini rolipramı nanomolar potens ile bağlar, ağırlıklı olarak MSS ve

gastrointestinal sistemin kısımlarında dağılmış gibi görünmektedir ayrıca belirli gastrointestinal ve MSS etkileriyle ilişkilidir. Buna karşılık, PDE4'ün düşük afiniteli formu, mikromolar afinite ile rolipramı bağlar ve immün ve inflamatuvar hücrelerde baskın görünmekle beraber seçici PDE4 inhibitörlerinin anti-inflamatuvar ve antiastmatik etkilerinin tümü olmasa da çoğu, bu formun inhibisyonu ile ilişkilidir (Barnette & Underwood, 2000). Oldukça seçici PDE4 inhibitörü rolipram, PDE4 izoenzimlerinin hastalık durumlarına ve ikinci haberci yollarına katkısının belirlenmesinde araştırma aracı olarak birkaç yıldır kullanılmaktadır. Başlangıçta antidepresan özellikleri için tarif edilen ek anti-inflamatuvar etkisi, otoimmün bozuklukların tedavisinde PDE4 inhibitörlerinin kullanılmasına olan ilgiyi yenilemiştir (Castro ve ark., 2005). Rolipram ayrıca, inflamasyon sürecine dahil olan hemen hemen tüm hücrelerin aktivitesini modüle etmede önemli bir rol oynar. Rolipram, öncelikle LPS ile aktive olan makrofajlar ve monositler tarafından salınan güçlü bir sitokin olan ve bir dizi patolojik durumda önemli bir rol oynayan TNF- $\alpha$  'nın inhibisyonu ile bağlantılı olan antiinflamatuvar etkiler gösterir. Hayvan deneylerinde rolipramın toksik ve yan etkileri esas olarak miyokardiyal ve karaciğer dejenerasyonu, artrit ve hipotermiyi içerir. Ek olarak, rahatsız edici davranışsal aktivite ve baş seğirmeleri ile mide bulantısı bildirilmiştir (Zhu ve ark., 2001). Rolipram gibi geleneksel PDE4 inhibitörleri katalitik alana bağlanır. Yüksek konsantrasyonlarda, rolipram cAMP'nin enzimin katalitik cebine erişmesini engeller böylece cAMP seviyesini yükseltir (Müller ve ark., 1996). Spesifik PDE4 inhibitörü rolipramın, sıçanlarda LPS'nin neden olduğu mortaliteyi ve ağır pulmoner hasarı azalttığı bildirilmiştir ve bu durum, serum TNF seviyelerindeki artışların baskılanmasına bağlanmıştır (Turner ve ark., 1993). Rolipram ile tedavi medyan sağkalımı uzatarak, alveolar fibrin birikimini, akciğer iltihabını ve vasküler

sızıntıyı azaltmıştır ve inflamasyon, fibrin birikimi ve alveolarizasyonla ilgili anahtar genleri azaltmıştır (de Visser ve ark., 2008).

#### **2.3.4.1. Rolipramın Farmakokinetiği**

Rolipramın farmakokinetiği sıçan, tavşan, rhesus maymunu ve sinomolgus maymununda 14C veya 3H etiketli rolipram ve değişmemiş ilacın ölçümü için bir radyoimmünoanaliz kullanılarak incelenmiştir. Rolipram, 50 mg/kg'a kadar olan oral dozlardan sonra hızla ve tamamen emilmiştir. Biyoyararlanım rhesus maymunda %0-1, sinomolgus maymununda %3-7, tavşanda %3-6, sıçanda %35 olarak ölçülmüştür. Rolipram, beyinde plazmadakinin iki katı konsantrasyona ulaşan kan-beyin bariyerini geçebilmiştir. Araştırılan tüm türlerde değişmemiş ilacın plazma seviyeleri, 1-3 saatlik benzer yarı ömürle azalmıştır. Sıçanda, iki rolipram enantiyomerinin farklı klirensi için endikasyonları gözlemlenmiştir. Ana eliminasyon yolu idrar olan etiketli rolipram hızla ve tamamen atılmıştır (Krause & Kühne, 1988). Bir çalışmada; rolipramın farmakokinetiği, sağlıklı erkek gönüllülerde 3H-rolipram ve değişmemiş ilacın ölçümü için bir radyoimmünoanaliz kullanılarak incelenmiştir. Rolipram, 1 mg'lık bir oral dozdan sonra hızla ve tamamen emilmiştir. Biyoyararlanım %73 olarak ölçülmüştür. Değişmeyen ilacın plazma seviyeleri, 2 saatlik bir terminal yarılanma ömrü ile azalmıştır. Rolipramın toplam klerensi kg başına 2 ml/dk ölçülmüştür. Etiketli rolipram ana eliminasyon yolu olan idrarla hızla ve tamamen atılmıştır (Krause ve ark., 1989). Rolipramın muhtemel etki mekanizması Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.3:** Rolipramın Muhtemel Etki Mekanizması

### 3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Farmakoloji Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Deneysel Hayvanları

Bu çalışmamızda, Atatürk Üniversitesi Tıbbi ve Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi deney hayvanları laboratuvarından (Erzurum/Türkiye) alınan, ağırlıkları 200-250 gram ve yaşları 6-8 hafta arasında değişen toplam 60 adde albino Wistar erkek sıçan kullanıldı. Deneysel boyunca, ratlara gerektiği kadar (ad libitum) su ve yem verildi (Tam rat yemi; ham kül %8, ham protein %23, ham yağ %3, ham selüloz %7; Bil-yem, Erzurum, Türkiye). Deneysel öncesi hayvanlar 12/12 saat gündüz/gece döngüsünde ve normal oda sıcaklığında (22 °C) barındırılarak gruplar halinde ayrıldı. Deneyselimizin tüm aşamalarının etik kurallara göre uygun olduğu, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneysel Yerele Etik Kurulunun 28.02.2022 tarih ve 2 sayılı oturumunun 26 numaralı kararı ve 17.02.2022 tarihli ve E-42190979-000-2200055143 sayılı yazısı ile ve Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 28.04.2022 tarih ve 2022/22/7 numaralı kararı ile onaylandı.

##### 3.1.2. Kullanılan İlaçlar ve Hazırlanışları

**LPS:** Serum fizyolojik ile sulandırılmış 5mg/kg doz LPS (L2880 Sigma-Aldrich-Lipopolysaccharides from Escherichia coli O55:B5) trakeaya yavaşça enjekte edildi.

**Rolipram** (1:1000) (Dimetil sülfoksit (DMSO)/serum fizyolojik) çözeltisinde çözerek) rolipram dozları intraperitoneal olarak uygulandı.

**Ksilazin (Xylasinbio, İntermed ecza deposu Ltd.Şti., Ankara, Türkiye):** Çalışmada 5 mg/kg intraperitoneal olarak sedasyon için verildi.

**Ketamin (Ketalar, Pfizer, 50 mg/ml flakon, İstanbul, Türkiye):** Çalışmada 75 mg/kg intraperitonel olarak anestezi için verildi. Anestezide ksilazin ile birlikte verildi.

**%10 Povidon İodine Antiseptik Solüsyon (Diagnokim, İstanbul, Türkiye):**  
Cerrahi insizyon alanlarının dezenfeksiyonu için kullanıldı.

### 3.1.3.Kullanılan Alet ve Cihazlar

<b>CİHAZLAR</b>	<b>MODELİ VE FİRMASI</b>
TissueLyser II	QIAGEN, Hilden, Germany
QIAcube	QIAGEN, Hilden, Germany
Thermal Cycler	Veriti Applied Biosystems, CA, ABD
Real-Time PCR	Applied Biosystems, CA, ABD
ELISA Okuyucu	Epoch Microplate Spectrophotometer BioTek, ABD
Mikroplate Yıkayıcı	Stat Fax 2600 Microplate Washer, ABD
Santrifüj(Soğutmalı)	Hettich Zentrifugen 320R, Germany
pH Metre	SCHOTT Instruments Lab 850, Germany
Manyetik Karıştırıcı	Wisd WiseStir MSH-20A, Germany
Doku Homojenizatörü	Ika-Werke
Hassas Terazı	Shimadzu ATX224, ABD
Etüv	Memmert WNB 7-45, Germany
Karıştırıcı	IKA- MS 3 basic, ABD
Ultra derin dondurucu(-86°C)	Nuaire NU-9483E, ABD
Derin Dondurucu	Vestel BZP-XL3402W, Türkiye
Otomatik Multikanal Pipet	Eppendorf Research Pro (20-300µl)
Pipet Seti	Eppendorf Research Plus
Cerrahi set	Cerrahi set F.S.T. Germany
Otoklav Wac47	DAIHAN, Güney Kore
Kafes	Tecniplast,
Tartı	SKS 4511, Sinbo, Türkiye

## 3.2. Metot

### 3.2.1. Deney Planı

Sıçanlar ağırlıklarına göre gruplara ayrıldı. ALI çalışmalarında mortalite oranı yüksek olmasından dolayı deney gruplarındaki hayvan sayısı fazla tutuldu. Çalışmamızda 60 adet erkek sıçanlarda intratrakeal LPS yöntemiyle akut akciğer hasarı oluşturulup deney gruplarında PDE4 inhibitörü rolipramın farklı dozlarda kullanımı sonucu elde edeceğimiz etkileri incelendi.

Çalışma gruplarında sıçanlar sağlıklı kontrol, ALI kontrol grubu, üç farklı doz rolipram grubu ve sağlıklı+en yüksek doz rolipram grubu olarak altı deney grubuna randomize şekilde ayrılarak standartizasyon sağlandı.

Deney grupları Tablo 3.1. de gösterilmiştir.

**Tablo 3.1. Rolipram Tedavi Grupları**

Grup Numarası	Grup Adı
1	Sağlıklı Grup
2	Sağlıklı + Rolipram 5 mg/kg
3	ALI Kontrol Grubu
4	ALI + Rolipram 1 mg/kg
5	ALI + Rolipram 3 mg/kg
6	ALI + Rolipram 5 mg/kg

### Deneyin yapılışı

Bu çalışmamızda LPS ile indüklenmiş ALI modeli kullanıldı. Sıçanlar deney öncesi 12 saat boyunca aç bırakılıp, 12. saatin sonunda 15 mg/kg ksilazin ve 100 mg/kg ketamin kombinasyonunun intraperitoneal uygulanması ile anestezi altına alındı. Sıçanlar sırt üstü-supin pozisyona getirildikten sonra servikal orta hat kesisi ile cilt kesildi. Doku

harabiyetini en aza indirmek amacıyla pamuklu swab çubuklarıyla fasyalar, sternocleidomastoideus kası ve paratiroid bezleri ekarte edildikten sonra trakea cerrahi olarak ortaya çıkarıldı. 26 G'lik steril insülin enjektörü kullanılarak trakeal kartilajların arasından intratrakeal alana girildi. Enjektör pistonu geri çekilip enjektör içine hava gelip trakea içinde olduğumuzdan emin olununca izotonik NaCl ile sulandırılmış 5 mg/kg doz LPS (L2880 Sigma-Aldrich-Lipopolysaccharides from Escherichia coli O55:B5) trakeye yavaşça enjekte edildi. Enjeksiyon sonrası sıçanlar LPS'nin akciğerin tamamına homojen bir şekilde dağılması için el yardımıyla üç ekseninde döndürüldü. Cilt Covidien Appose ULC AutoSuture Slim Body Skin Stapler 35 W kullanılarak kapatıldı. LPS uygulamasından bir saat sonra Sağlıklı+Rolipram ve ALI+Rolipram grubundaki her sıçana taze olarak hazırlanan (Rolipram (1:1000) (DMSO/serum fizyolojik) çözeltilisinde çözerek) rolipram dozları intraperitoneal olarak uygulandı.(F. Liu ve ark., 2021) Sıçanlar deneyin 24.Saatinde 50 mg/kg dozda tiyopental sodyum ile ötenazi edildi. Deney sonlandırıldıktan dokuların yarısı %10 formalin çözeltilisi içinde histopatolojiye gönderildi. Kalan dokular ise -80°C ultra soğutucuda uygun şartlarda saklanıp moleküler ve/veya biyokimyasal ve histopatolojik çalışmalar için bekletildi (Aydin ve ark., 2022).

### **3.2.2.Moleküler Analizler**

#### **3.2.2.1.ELISA Analizi**

Cerrahi işlemleri takiben dokular -80°C'de saklandı. Her bir sıçandan alınan doku örnekleri, bir TissueLyser II öğütme kavanoz seti kullanılarak sıvı nitrojen içinde öğütüldü. Yaklaşık 100 mg öğütülmüş doku, TissueLyser II içeren bir Eppendorf tüpünde 2 ml fosfat tamponlu salin homojenat tamponunda homojenize edilerek örnekler daha sonra santrifüjlendi. Elde edilen süpernatantlardan AQP5, NF-κB, MAPK, PDE4D, cAMP, TNF-α ve IL-6 seviyeleri ELISA yöntemi ile Epoch

Spectrophotometer System and Take3 Plate cihazında ölçüldü. Standart bir eğri çizilerek standartların absorbansından bir denklem oluşturuldu. Doğrusal AQP5, NF-κB MAPK, PDE4, cAMP, IL-6 ve TNF-α konsantrasyonları bu denkleme göre değerlendirildi. ELISA prosedürü kit protokolünde yazılan basamaklara uygun olarak gerçekleştirildi (Cadirci ve ark., 2019). ELISA kitleri sırasıyla: TNF-α (Catalog #201-11-0765), IL-6 (Catalog #201-11-0136), cAMP (Catalog #201-11-029), AQP-5 (Catalog #201-11-0570), MAPK (Catalog #201-11-1064), NF-κB (Catalog #201-11-0288), Camp Spesific (PDE4D) (Catalog #201-12-4539) SunRed (Shanghai, China) olarak kullanıldı.

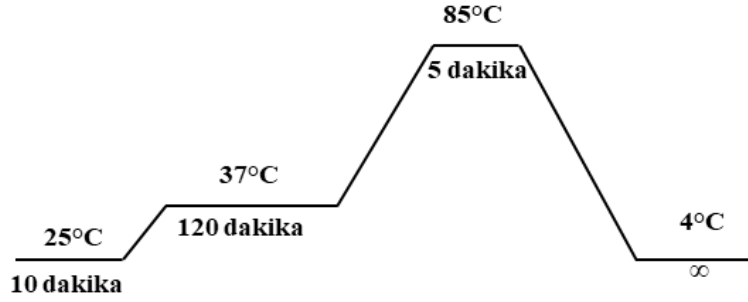
### **3.2.2.2.Real Time-PCR Analizi**

#### **3.2.2.1.Rat Akciğer Dokusundan mRNA İzolasyonu**

Sıçan Akciğer Dokusu tek tek tartılarak, Tissue Lyser II cihazında (20-30 mg dokuya 350 µl RLT buffer koyularak) homojenize edildikten sonra QIAcube RNA izolasyon cihazında RNA ekstraksiyonu yapıldı. Qiacube RNA izolasyon cihazında RNeasy Mini Kit kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı. Nano drop spektrofotometri ile total mRNA miktarı 260/280 nm'de ölçüldü.

#### **3.2.2.2.Revers Transkriptaz Reaksiyonu ve cDNA Sentezi**

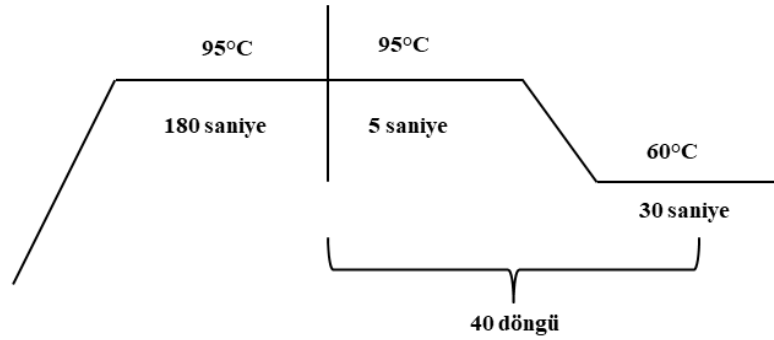
Total RNA'dan cDNA sentezi High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit enzimi kullanımı ile yapıldı. Her reaksiyon 10 µl RNA ile gerçekleştirildi ve cDNA sentezi üretici firmanın önerdiği miktarda total RNA ve reaktifler eklenerek (10 µl total RNA; 10 X RT Random Primers 2 µl; 25 X dNTPs mix 0.8 µl; MultiScribe Reverse Transcriptase 1 µl; 10 X RT 30 Buffer 2 µl; DEPC-H<sub>2</sub>O 4.2 µl). Belirtilen sıcaklık değerleri Thermal Cycler cihazı ile (Veriti 96 Well, Applied Biosystem) sağlandı. Nano drop spektrofotometri ile cDNA miktarı belirlenerek -20°C'de saklandı.



cDNA Sentezi Protokolü

### 3.2.2.3. Real Time PCR Yöntemi ile AQP5 mRNA Ekspresyonunun Kantitatif Olarak Belirlenmesi

TaqMan Gene Expression Master Mix kiti kullanılarak, AQP5 mRNA ekspresyonu kantitatif olarak belirlendi. Kantifikasyon ve Amplifikasyon işlemi StepOne Plus Real Time PCR System cihazında gerçekleştirildi. Ct değerleri cihazda otomatik olarak delta Ct'ye dönüştürüldü (Cadirci ve ark., 2019).



RT-PCR mRNA Ekspresyon Protokolü

### 3.2.3. Biyokimyasal Çalışmalar

#### 3.2.3.1. Akciğer Dokusunda Yapılan Analizler

Deney hayvanlarına ait akciğer doku örnekleri büyük ölçekli analiz işlemlerinden sonra -80°C'de muhafaza edildi ve 100 mg'lık sıçan akciğer dokularının homojenizasyon işlemi spesifik homojenat tampon solüsyonunda (uygun bufferda) buz

üzerinde 3 dk süresince 30 Hz titreşimde Tissue Lyser ile yapıldı. Akabinde kitte belirtilen talimatlara uyularak doku santrifüjü yapıldı. Biyokimyasal analizler için her bir sıçan akciğerindeki AQP5, NF-κB, MAPK, PDE4, cAMP, IL-6 ve TNF-α seviyeleri ise ELISA kitleriyle ölçüldü ve kit protokolüne uygun olarak değerlendirildi (Cadirci ve ark., 2019).

### **3.2.4.Histopatolojik İnceleme**

#### **3.2.4.1.Histopatolojik Analizler**

Histopatolojik değerlendirmeler için yapılan doku takip, boyama ve analizlerin tamamı Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında yapıldı.

#### **3.2.4.2.Doku Takip İşlemleri ve Kesitlerin Hazırlanması**

Cerrahi işlemler bittikten sonra %3,7'lik formaldehit çözeltisine alınan akciğer doku örnekleri, 72 saat fiksasyon sonunda etiketlenerek plastik doku takip kasetleri içine konulmuştur. Ardından doku takibi protololüne geçilmiştir. Buna göre; Akan su altında 2 saat yıkandıktan sonra doku örnekleri, %50'lik (2 saat), %70'lik (1 saat), %80'lik (1 saat), %96'lık (1 saat), %99'luk alkol (1 saat) serilerine sırasıyla koyularak dehidratasyon işlemi ile dokudan su uzaklaştırması yapıldı. Akabinde üç farklı saf ksilen solüsyondan (3x15 dakika) bekletilerek doku şeffaflaştırma işlemi uygulandı. Son olarak dokular iki ayrı erimiş sert parafin serilerinde (56-58°C - 1 saat x2) bekletilerek takip işlemi yapıldı. Doku takip işlemi bittiğinde plastik takip kasetler açıldı ve doku örnekleri metal bloklama kalıbı içine uygun kesit düzlemine göre sabitlendi ve erimiş parafin ile eklenerek oda sıcaklığında donmaya bırakıldı ve bloklama işlemi tamamlandı.

Hazırlanan bloklar rutin doku mikrotom cihazına koyularak 5'er mikrometre kalınlığındaki her bir bloktan ardışık seri kesitler alındı. Mikrotomdan çıkan seri

kesitler, sıcak su havuzuna aktarıldı ve lam daldırma yöntemi ile yardımıyla kesitler polilizin lam yüzeyine alındı. Akabinde slaytlar boya solüsyonu öncesinde ön işlemler protokolü uygulandı.

### **3.2.4.3.Boyama Ön İşlemi**

Akciğer doku örnekleri polilizin kaplı lam üzerine alınarak dokunun lam üzerine iyice sabitlenmesi ve parafinin tamamen uzaklaştırılması amacıyla 20 dakika boyunca 60°C'deki etüvde bekletildi. Akabinde etüvden alınan slaytlar ksilen solüsyonunda 45 dakika bekletilerek parafinin yüzeyden tamamen uzaklaşması sağlandı. Ardından ise bu kez, ksileni dokudan uzaklaştırıp suya yaklaştırmak için lamlar azalan alkol serilerinde (%99, %96, %80, %70, %50) ikişer dakika bekletildi. Alkolün uzaklaştırılması için son olarak akan suda altında 5 dakika yıkama işlemi gerçekleştirildi (Aksak Karamese ve ark., 2015). Sonuçta lamların yüzeyindeki doku su bazlı boyalar için yüzey hazır hale getirildi.

### **3.2.4.4.Masson Trikrom Triple Boyama**

Boyama ön işlemi sonunda slaytlar boyama kalitesini artırmak için bouin solüsyonunda 56°C'de 1 saat yeniden fiksasyona işlemi yapıldı. Bouin solüsyonunun spesifik rengi olan sarı rengin giderilinceye kadar için akan su altında 5 dakika yıkama yapıldı. Akabinde; lamlar, weigert'in demirli hematoksilin solüsyonunda 10 dakika bekletilerek doku nükleus boyaması yapıldı ve fazla boyanın giderilmesi için tekrar akan su altında 10 dakika yıkama gerçekleştirildi. Ardından, Biebrich kırmızı asitli fuksin solüsyonunda 10 dakika boyama yapıldı ve boyadan çıkınca distile suda yıkanarak fazla boya giderildi. Akabinde fosfomolibdik-fosfotungstik asit solüsyonunda 10 dakika bekletildi. Daha sonra kesitleri doğrudan (durulama yapmadan) anilin mavisi solüsyonuna konuldu ve 5 dakika boyanması için bekletildi. Boyadan çıkan slaytlar distile su ile hızlıca yıkandı ve %1'lik asetik asit solüsyonunda 2 dakika bekletildi. Bu

işlemin sonunda tekrar, distile suda yıkama yapıldı. Son olarak rutin lamel yüzey kapatma kapatma protokolü takip edilerek (%95 etil alkol, %99 etil alkol ve ksilen içinde bekletme ve kapatma) entellan yapıştırma solüsyonu ile lam yüzeyleri lamel ile kapılır. Mikroskopik incelemeye kadar iyice kurularak ve saklandı.

#### **3.2.4.5.Mikroskopik İnceleme ve Fotoğraflama**

Masson-trikrom boyama işlemi bittikten sonra hazırlanan preparatlar, kamera eklentili ve bilgisayar destekli mikroskop ile incelenerek fotoğraflandı.

Çekilen mikrograflar karşılaştırmalı incelemenin kolay olmasından dolayı Adobe Photoshop CS6 programı ile bir araya getirildi (Toktay ve ark., 2020).

#### **3.2.4.6.İmmünohistokimyasal Boyama Metodu**

Tüm kesitler adhezivli (poly-L-Lysin) lamlara alındıktan sonra alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek, deparafinize ve dehidre edildi. Daha sonra distile suda 5 dakika yıkandı. Antijen yüzeylerin açılması için sodyum sitrat solüsyonunda 1 dakika yüksek basınç altında slaytlar 100 derecede bekletildi. Bu işlemin sonunda slayt yüzeyindeki akciğer doku alanları hidrofobik kalem ile sınırlanarak, doku yüzeyine uygulanacak solüsyon alanı sınırlandı. Akabinde slaytlar bu solüsyondan çıkarılarak Fosfat tamponu (PBS, pH 7.2) ile 5 dakika yıkandı, %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10 dakika tutularak, endojen peroksidaz inaktive edildi. Slaytların yüzeyi PBS de 3 kez yıkandıktan sonra, nonspesifik zemin boyanmasını önlemek için tüm sekonder ve primer antikolarla uyumlu olan protein blok ile 5 dakika inkübasyonda bekletildi. İnkübasyonun bitmesiyle doku kesitleri üzerinde kalan blok solüsyonunun fazlası dökülerek yıkanma yapılmadan primer antikolar damlatıldı. Primer antikora uygun olarak 1 gece 4°C'de bekletildi. Ertesi sabah antikor yüzeyleri PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı, biotinize sekonder antikor ile oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Kesitler PBS ile tekrar yıkanarak streptavidin-peroksidaz da 10 dakika bekletilerek PBS ile aynı şekilde

yıkandı. Yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra kesitlere 3-3' Diaminobenzidine (DAB) kromojen damlatıldı ve kromojeni almasına göre 15 dakika bekletildi. Mayer's hematoksilende zemin boyanması için 2 dakika bekletildikten sonra musluk suyuyla yıkandı. Daha sonra ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek lamelle kapatılarak ışık mikroskobu (Olimpus CX41 ) ile incelendi.

Kesitler immun pozitifliklerine göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

### **3.2.5. Western Blot Analizi**

Akciğer dokularında AQP5, IL-1 $\beta$ , TLR4, Kaspaz-3, NF- $\kappa$ B parametrelerin araştırılması amacıyla ilgili proteinlerin seviyeleri Western Blot ile araştırılmıştır. Bu süreçte sıvı nitrojen (-196°C) ile dondurulan ve -80°C'de saklanan dokular sıvı nitrojen ile toz edilerek içinde RIPA, fosfataz inhibitörü (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 200 nM) ve PİK, (1:100) bulunan tüplere alındı. Dokular ultrasonik homojenizatör ile homojenize edildikten sonra +4°C'de 2 saat çalkalandı. +4°C'de 16 000 g'de 30 dak santrifüj edildikten sonra süpernatant ayrılarak sonraki analizler için -80°C'de saklandı. Denatürasyon çözeltisinin (Laemmlı Sample Buffer) ve örnek lizatları karışımı jele yüklenecek olan her örnekte eşit miktarda protein olacak şekilde hazırlandı. Örnekler denatürasyonun gerçekleşmesi için 37°C'de 30 dak bekletildi. Lizat ve denatürasyon çözeltisinin karışımı, SDS jel elektroforezi için incelenecek proteinin molekül ağırlığına bağlı olarak %8, %10 veya %15 konsantrasyonlarda hazırlanmış poliakrilamid jele yüklendi. Elektroforez ile örnekler jel üzerinde molekül ağırlıklarına göre ayrılarak antikorla muamele edilmeye uygun olan nitroselüloz ya da PVDF membranlara transfer edildi. Membranlar spesifik olmayan antikor bağlanmalarını en aza indirmek için yağsız süt tozu ya da %3-5 BSA içeren tampon çözeltide (TBS-Tween20 (TBS-T)) çalkalanarak 1 sa bekletilip (bloklama işlemi) sonrasında yıkandı. Membranlar, primer antikorla üretici firma

önerileri doğrultusunda %5 BSA içeren TBS-T tampon çözeltisinde 1/500, 1/750 ya da 1/1000 konsantrasyonda gece boyunca +4°C’de çalkalandı. İnkübasyon ve rutin yıkama işlemleri sonrasında membranlar bu kez primer antikora uygun sekonder antikorla 1 sa inkübe edildi. Yıkanan membranlar doğrudan Fusion FX cihazında görüntülendi (Güven ve ark., 2020).

### **3.2.6.İstatiksel Analizler**

Deneyimizin verileri IBM 20.00 SPSS paket programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Değişkenler homojen dağılım gösterdiği için istatistikleri Post Hoc çoklu karşılaştırmalı ve One-Way ANOVA analizi testlerden Tukey testi kullanılarak yapıldı (  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi). Deneyimizin veri analizleri ve grafik çizimi için GraphPad 8.0 Prism yazılımı kullanıldı.

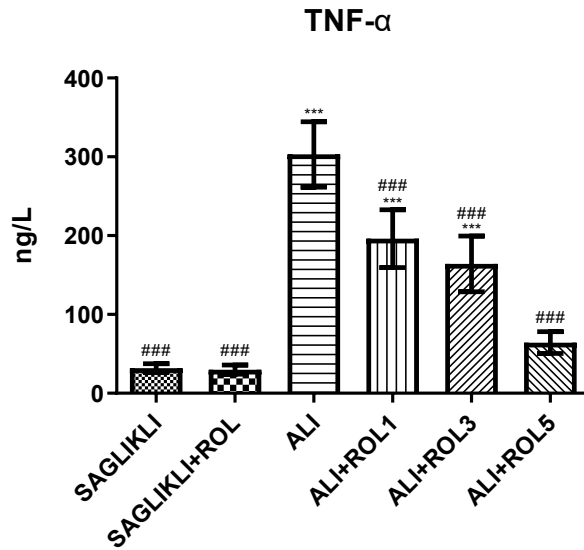
## 4. BULGULAR

### 4.1. ELISA Bulguları

#### 4.1.1. İnflamatuvar Sitokin Bulguları

##### 4.1.1.1. Akciğer Dokusunda TNF- $\alpha$ ELISA Sonuçları

LPS'nin inflamatuvar sitokinlerinden biri olan ve ekspresyonunu aktive ettiği TNF- $\alpha$  seviyesi akciğer dokusunda ölçüldü. LPS verilen hayvanların akciğer dokusunda TNF- $\alpha$  seviyeleri sağlıklı gruba göre anlamlı bir şekilde artış gözlemlendi ( $p<0,001$ ). PDE4 inhibitörü rolipram uygulaması ile TNF- $\alpha$  seviyeleri LPS ile indüklenen gruba göre ALI+ROL1 ( $p<0,001$ ), ALI+ROL3 ( $p<0,001$ ), ALI+ROL5 ( $p<0,001$ ) gruplarında doza bağımlı olarak azalma gözlemlendi ( $p<0,001$ ). Sağlıklı gruba verilen rolipramın anlamlı olmasa da hafif bir azalma yapmış olduğu değerlendirildi.



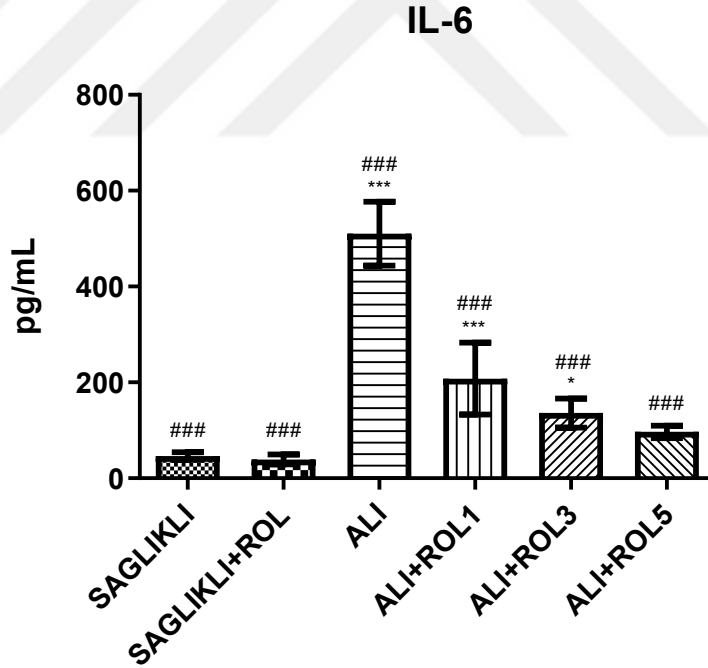
Şekil 4.1: Akciğer Dokusunda Ölçülen TNF- $\alpha$  Seviyeleri

ALI: LPS İle İndüklenen Akut Akciğer Hasarı, ALI+ROL1, ALI+ROL3, ALI+ROL5, \*(Sağlıklı gruba göre kıyaslama), \*:  $p<0,05$ 'i \*\*:  $p<0,01$ 'i \*\*\*:  $p<0,001$ 'i

ifade etmektedir. #(ALI gruba göre kıyaslama), #:  $p<0,05$ 'i ##:  $p<0,01$ 'i : ###  $p<0,001$ 'i ifade etmektedir.

#### 4.1.1.2. Akciğer Dokusunda IL-6 ELISA Sonuçları

ALI'de genellikle akciğer dokusuna zarar veren IL-6 gibi inflamatuvar faktörlerin büyük bir salınımı eşlik eder. Çalışmamızda IL-6 seviyeleri akciğer dokusunda ölçüldü. LPS verilen hayvanların akciğer dokusunda IL-6 seviyeleri sağlıklı gruba göre anlamlı bir şekilde artış gözlemlendi ( $p<0,001$ ). PDE4 inhibitörü rolipram uygulaması ile IL-6 seviyeleri LPS ile indüklenen gruba göre ALI+ROL1 ( $p<0,001$ ), ALI+ROL3 ( $p<0,001$ ), ALI+ROL5 ( $p<0,001$ ) gruplarında doza bağımlı olarak azalma gözlemlendi ( $p<0,001$ ). Sağlıklı gruba verilen rolipramın anlamlı olmasa da hafif bir azalma yapmış olduğu değerlendirildi.



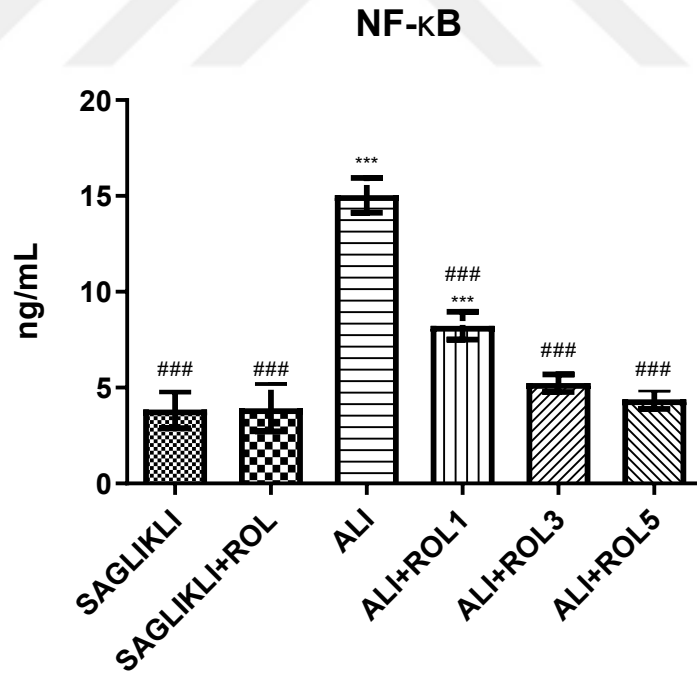
Şekil 4.2: Akciğer Dokusunda Ölçülen IL-6 Seviyeleri

ALI: LPS İle İndüklenen Akut Akciğer Hasarı, ALI+ROL1, ALI+ROL3, ALI+ROL5, \*(Sağlıklı gruba göre kıyaslama), \*:  $p<0,05$ 'i \*\*:  $p<0,01$ 'i \*\*\*:  $p<0,001$ 'i

ifade etmektedir. #(ALI gruba göre kıyaslama), #:  $p<0,05$ 'i ##:  $p<0,01$ 'i : ###  $p<0,001$ 'i ifade etmektedir.

#### 4.1.2. Akciğer Dokusunda NF- $\kappa$ B ELISA Sonuçları

LPS kaynaklı akciğer inflamasyonunda, sırasıyla sitokinlerin, kemokinlerin ve adezyon moleküllerinin transkripsiyonunu destekleyen NF- $\kappa$ B sinyali çalışmamızda akciğer dokusunda ölçüldü. LPS verilen hayvanların akciğer dokusunda NF- $\kappa$ B seviyeleri sağlıklı gruba göre ALI grubunda anlamlı bir şekilde artış gözlemlendi ( $p<0,001$ ). PDE4 inhibitörü rolipram uygulaması ile NF- $\kappa$ B seviyeleri LPS ile indüklenen gruba göre doza bağımlı olarak ALI+ROL1 ( $p<0,001$ ), ALI+ROL3 ( $p<0,001$ ), ALI+ROL5 ( $p<0,001$ ) gruplarında azalma gözlemlendi. Sağlıklı gruba verilen rolipramın sağlıklı gruba göre anlamlı değişim gözlemlenmedi.

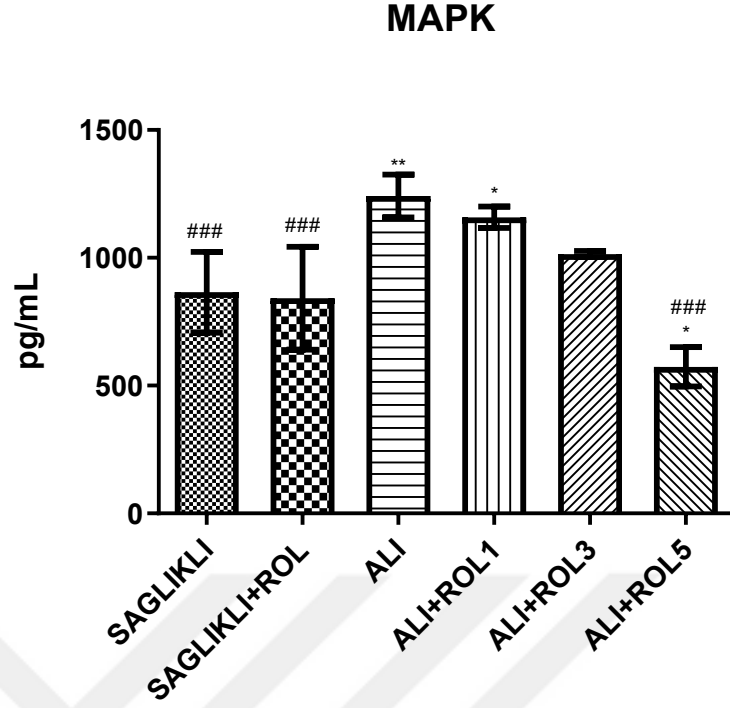


Şekil 4.3: Akciğer Dokusunda Ölçülen NF- $\kappa$ B Seviyeleri

ALI: LPS ile İndüklenen Akut Akciğer Hasarı, ALI+ROL1, ALI+ROL3, ALI+ROL5, \*(Sağlıklı gruba göre kıyaslama), \*:  $p<0,05$ 'i \*\*:  $p<0,01$ 'i \*\*\*:  $p<0,001$ 'i ifade etmektedir. #(ALI gruba göre kıyaslama), #:  $p<0,05$ 'i ##:  $p<0,01$ 'i : ###  $p<0,001$ 'i ifade etmektedir.

#### **4.1.3.Akciğer Dokusunda MAPK ELISA Sonuçları**

Proinflamatuvar faktörler tarafından aktive edilebilen ve inflamasyonun gelişiminde anahtar rol oynayan MAPK yolu, çalışmamızda akciğer dokusunda ölçüldü. LPS verilen hayvanların akciğer dokusunda MAPK seviyeleri sağlıklı gruba göre anlamlı bir şekilde artmıştır ( $p<0,01$ ). PDE4 inhibitörü rolipram uygulaması ile MAPK seviyeleri LPS ile indüklenen gruba göre doza bağımlı olarak azalmıştır. ALI grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş ALI+ROL5 azalma gözlemlenmiştir ( $p<0,001$ ). Rolipramın diğer dozlarında (1 ve 3 mg/kg) ALI grubuna göre azalma eğilimi olmasına rağmen fark anlamlı bulunmadı. ALI+ROL5 grubunun MAPK değerleri sağlıklı gruptan da daha düşük bulundu ( $p<0,05$ ). Sağlıklı gruba verilen rolipramın sağlıklı gruba göre anlamlı olmasa da hafif bir azalış yaptığı gözlemlendi.



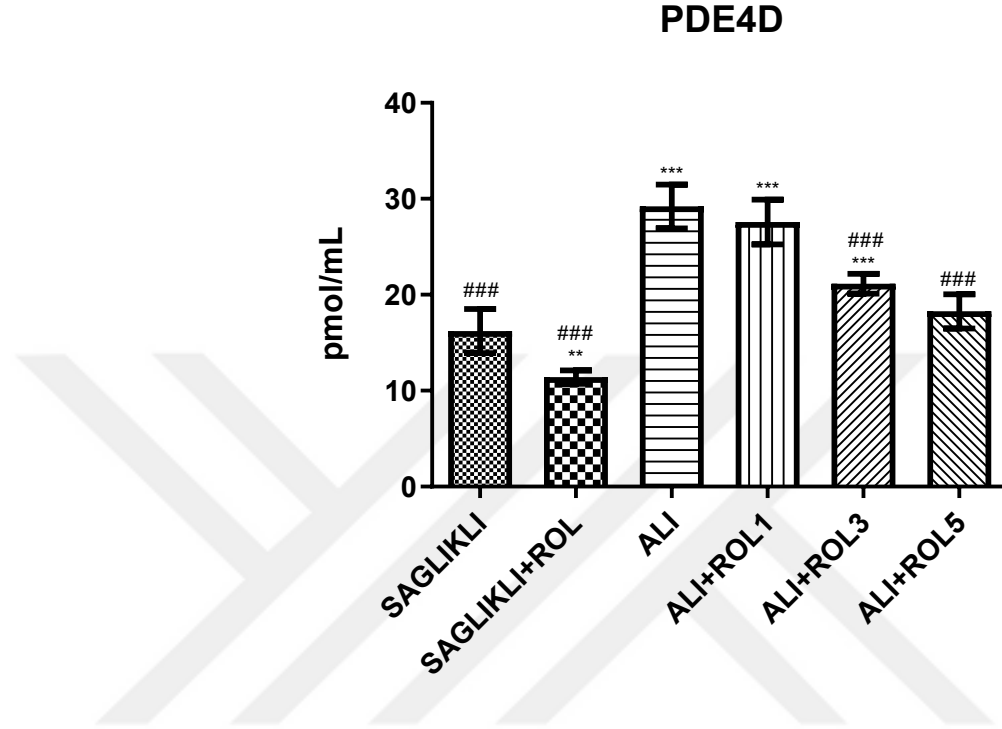
**Şekil 4.4:** Akciğer Dokusunda Ölçülen MAPK Seviyeleri

ALI: LPS İle İndüklenen Akut Akciğer Hasarı, ALI+ROL1, ALI+ROL3, ALI+ROL5, \*(Sağlıklı gruba göre kıyaslama), \*:  $p<0,05$ 'i \*\*:  $p<0,01$ 'i \*\*\*:  $p<0,001$ 'i ifade etmektedir. #(ALI gruba göre kıyaslama), #:  $p<0,05$ 'i ##:  $p<0,01$ 'i : ###  $p<0,001$ 'i ifade etmektedir.

#### 4.1.4.Akciğer Dokusunda PDE4D ELISA Sonuçları

PDE4 familyasına ait dört genden biri olan ve akciğerde baskın olan PDE4D seviyeleri akciğer dokusunda ölçüldü. LPS verilen hayvanların akciğer dokusunda PDE4D seviyeleri sağlıklı gruba göre anlamlı bir şekilde artmıştır ( $p<0,001$ ). ALI yapılan hayvanlara PDE4 inhibitörü rolipram verilmesi ise PDE4 seviyesinde doza bağımlı bir azalma yapmıştır. Şöyleki ALI+ROL1 grubundaki azalma ALI grubuna göre anlamlı değilken ALI+ROL3 ( $p<0,001$ ) ve ALI+ROL5 ( $p<0,001$ ) gruplarında anlamlı azalma gözlemlenmiştir. ALI grubuna göre en anlamlı düşmenin gözlemlendiği ALI+ROL5 grubu sağlıklı grupla karşılaştırıldığında fark anlamsız olmuş böylece bu grupta sağlıklı

düzeyinde iyileşme gözlenmiştir. Ayrıca sağlıklı gruba verilen rolipramın PDE4D seviyelerinde sağlıklı hayvanlara göre de anlamlı bir azalma yapmış olduğu değerlendirildi ( $p<0,01$ ).



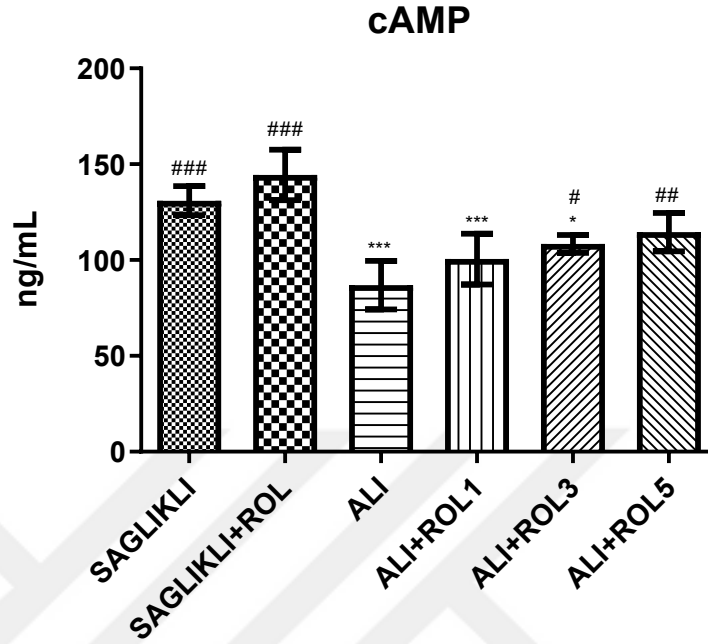
**Şekil 4.5:** Akciğer Dokusunda Ölçülen PDE4D Seviyeleri

ALI: LPS İle İndüklenen Akut Akciğer Hasarı, ALI+ROL1, ALI+ROL3, ALI+ROL5, \*(Sağlıklı gruba göre kıyaslama), \*:  $p<0,05$ 'i \*\*:  $p<0,01$ 'i \*\*\*:  $p<0,001$ 'i ifade etmektedir. #(ALI gruba göre kıyaslama), #:  $p<0,05$ 'i ###:  $p<0,01$ 'i : ####  $p<0,001$ 'i ifade etmektedir.

#### 4.1.5. Akciğer Dokusunda cAMP ELISA Sonuçları

ALI/ARDS patogenezinin inflamatuvar hücreler ve immün hücreler tarafından düzenlenmesinde yer alan önemli ikinci haberci olan cAMP seviyeleri akciğer dokusunda ölçüldü. LPS verilen ALI grubundaki hayvanların akciğer dokusunda cAMP seviyeleri sağlıklı gruba göre anlamlı bir şekilde azalmıştır ( $p<0,001$ ). PDE4 inhibitörü rolipram uygulaması ile cAMP seviyeleri LPS ile indüklenen gruba göre doza bağımlı

olarak artış gözlemlendi ( $p<0,01$ ). Sağlıklı gruba verilen rolipramın anlamlı olmasa da hafif bir artış yapmış olduğu değerlendirildi.



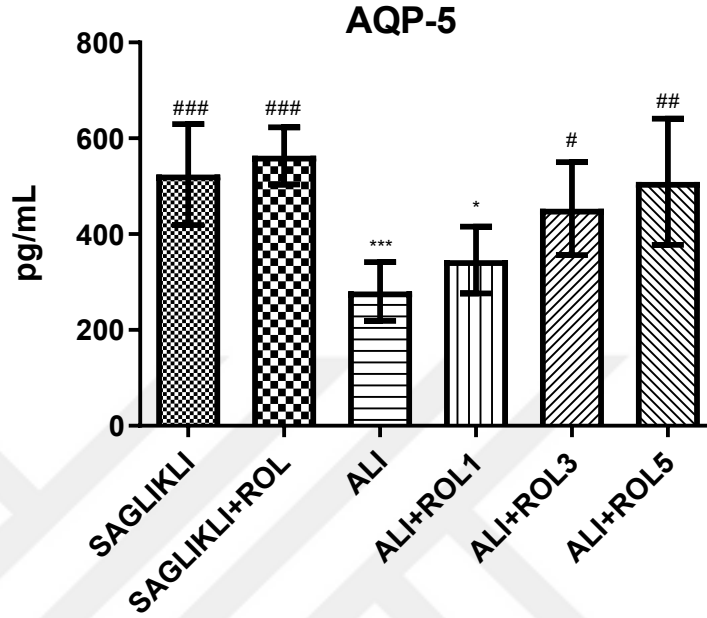
**Şekil 4.6:** Akciğer Dokusunda Ölçülen cAMP Seviyeleri

ALI: LPS İle İndüklenen Akut Akciğer Hasarı, ALI+ROL1, ALI+ROL3, ALI+ROL5, \*(Sağlıklı gruba göre kıyaslama), \*:  $p<0,05$ 'i \*\*:  $p<0,01$ 'i \*\*\*:  $p<0,001$ 'i ifade etmektedir. #(ALI gruba göre kıyaslama), #:  $p<0,05$ 'i ##:  $p<0,01$ 'i : ###  $p<0,001$ 'i ifade etmektedir.

#### 4.1.6.Akciğer Dokusunda AQP5 ELISA Sonuçları

Çalışmamızda akciğer alveol hücrelerinde bulunan ve sıvı taşınmasında önemli rol oynayan AQP5 seviyeleri akciğer dokusunda ölçüldü. LPS verilen hayvanların akciğer dokusunda AQP5 seviyeleri sağlıklı gruba göre anlamlı bir şekilde azalmıştır ( $p<0,001$ ). PDE4 inhibitörü rolipram uygulaması ile ALI+ROL1 grubunda, AQP5 seviyeleri LPS ile indüklenen gruba göre anlamlı bir artış gözlemlenmedi. ALI+ROL3 grubunda, AQP5 seviyeleri LPS ile indüklenen gruba göre artış gözlemlenmiştir ( $p<0,05$ ). Rolipramın en yüksek dozunun uygulandığı ALI+ROL5 grubunda ise, AQP5

seviyeleri LPS ile indüklenen gruba göre en fazla artışı göstermiştir ( $p<0,01$ ). Sağlıklı gruba verilen rolipramın sağlıklı gruba göre anlamlı olmasa da hafif bir artış yapmış olduğu gözlemlendi.



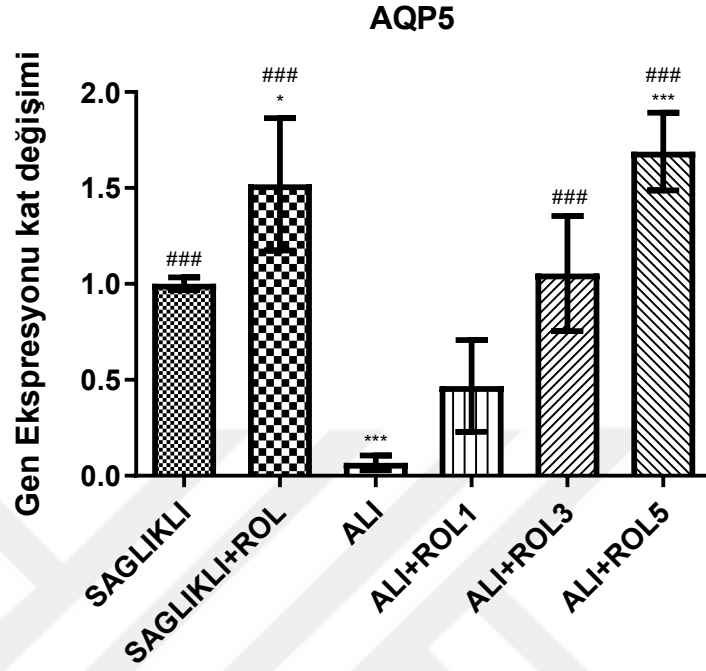
Şekil 4.7: Akciğer Dokusunda Ölçülen AQP5 Seviyeleri

ALI: LPS İle İndüklenen Akut Akciğer Hasarı, ALI+ROL1, ALI+ROL3, ALI+ROL5, \*(Sağlıklı gruba göre kıyaslama), \*:  $p<0,05$ 'i \*\*:  $p<0,01$ 'i \*\*\*:  $p<0,001$ 'i ifade etmektedir. #(ALI gruba göre kıyaslama), #:  $p<0,05$ 'i ###:  $p<0,01$ 'i : ####  $p<0,001$ 'i ifade etmektedir.

#### 4.2.Akciğer Dokusunda AQP5 mRNA Ekspresyon Sonuçları

LPS ile indüklediğimiz ALI modelinde akciğer dokusundaki AQP5 mRNA ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, ALI grubunda sağlıklı gruba kıyasla anlamlı bir düşüşün olduğu gözlemlendi ( $p<0,001$ ). PDE4 inhibitörü rolipram uygulaması ile ALI+ROL1 grubunda AQP5 mRNA ekspresyon seviyeleri LPS ile indüklenen gruba göre anlamlı bir artış gözlemlenmezken, ALI+ROL3 ve ALI+ROL5 grubunda ise AQP5 mRNA ekspresyon seviyeleri LPS ile indüklenen gruba göre anlamlı bir artış

gözlemlendi ( $p<0,001$ ). Sağlıklı gruba verilen rolipramın sağlıklı gruba göre ise anlamlı bir artış yapmış olduğu gözlemlendi ( $p<0,05$ ).



**Şekil 4.8:** Akciğer Dokusunda Ölçülen AQP5 mRNA Ekspresyon Sonuçları

ALI: LPS İle İndüklenen Akut Akciğer Hasarı, ALI+ROL1, ALI+ROL3, ALI+ROL5, \*(Sağlıklı gruba göre kıyaslama), \*:  $p<0,05$ 'i \*\*:  $p<0,01$ 'i \*\*\*:  $p<0,001$ 'i ifade etmektedir. #(ALI gruba göre kıyaslama), #:  $p<0,05$ 'i ##:  $p<0,01$ 'i : ###  $p<0,001$ 'i ifade etmektedir.

### 4.3.Histopatolojik Bulgular

#### 4.3.1.Masson-Trikrom Boyama Bulguları

**Sağlıklı grupta** akciğer dokusundaki histopatolojik incelemede; bronşlar, terminal bronşiyoller, respiratuvar bronşiyoller, alveolar keseler, alveol duvarları, arter, ven ve kapiller damar yapıları ayrıntılı olarak incelenmiştir. Tüm bu yapılarda herhangi bir patolojik görünüme rastlanmamıştır (Şekil 4.9).

**Sağlıklı+ROL5 grupta** yapılan mikroskopik incelemede sağlıklı gruba benzer şekilde herhangi bir patolojik bulguya rastlanmamıştır. Organ içindeki bronşlar,

terminal bronşiyoller, respiratuvar bronşiyoller, alveolar keseler, alveol duvarları, arter, ven ve kapiller damar yapıları sağlıklı görünümde olduğu izlenmiştir (Şekil 4.9).

**ALI grupta** bronş ve bronşiol çevresindeki submukozada ileri düzeyde ödem alanları (yıldız) izlenmiştir. Bu ödem alanında çok sayıda inflamatuvar hücreler görülmüştür. Özellikle bazı terminal bronşiyol yapılarında bronşiyol lümeninde kümelenmiş olarak izlenen inflamasyon hücreleri dikkat çekiciydi. Akciğer parankim yapısına bakıldığında alveol duvarlarındaki ödeme bağlı olarak genişleme (alveolar septum kalınlaşması=kalın çubuklar) ve alveol çaplarında belirgin derecede azalmalar izlenmiştir (Şekil 4.9).

**ALI+ROL1 grupta** ALI grubunda izlenen terminal bronşiyollerdeki submukozada ileri düzeyde ödem alanları ve bronşiyol lümeninde kümelenmiş olarak izlenen inflamasyon hücreleri bu grupta da görülmüştür. Bu grupta alveol çapları ALI grubuna göre nispeten daha fazlaydı. Ayrıca alveolar septum kalınlaşmaları nispeten daha az olduğu görülmüştür (Şekil 4.9).

**ALI+ROL3 grupta** terminal bronşiyol çevresinde belirgin derecede ödem alanlarının azaldığı izlenmiştir. Alveoller septum kalınlaşmalarının belirgin derecede azaldığı ve alveol çaplarının arttığı izlenmiştir. Ancak terminal bronşiyoller içinde kümelenmiş inflamatuvar hücreler belirgin şekilde azalmasına rağmen hala varlığını koruduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.9).

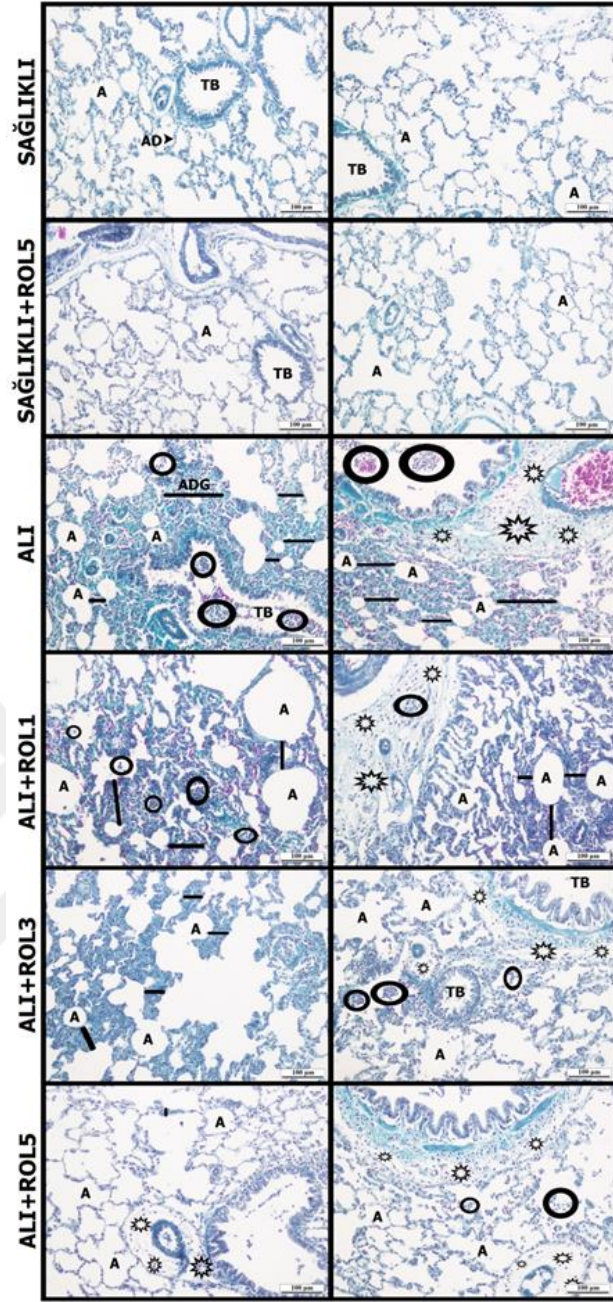
**ALI+ROL5 grupta** bronşiyol ve damar çevrelerindeki ödem alanının neredeyse hiç kalmadığı ve alveoller septum kalınlaşmalarının görülmediği alveol boyutlarının normal boyutlarda olduğu görülmüştür. Yalnızca nadiren alveoller içinde inflamatuvar küçük hücre kümeleri şeklinde görülmüştür. Bu grupta genel olarak sağlıklı gruba benzer bir histolojik görünüm izlenmiştir (Şekil 4.9).

Akciğer dokusunda yapılan histopatolojik bulguları olarak alveolar septum

kalınlık artışı, peri vasküler ödem ve submukozal ödem, inflamasyon alanları ve alveol kesesi büyüklükleri yönünden incelendi ve semi-kantitatif bir değerlendirme ile puanlandırma kullanılarak değişikliklerin düzeyini skorlanmıştır. Buna göre yok (0), hafif (1), orta (2) ve fazla (3) olacak şekilde derecelendirilmiştir (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** Histopatolojik Bulgular Skorlaması

<b>GRUPLAR</b>	<b>Perivascular ve submukozal ödem</b>	<b>Alveolar septum kalınlaşması</b>	<b>İnflamatuar hücre artışı</b>	<b>Alveolar kese boyutlarında azalma</b>
<i><b>SAĞLIKLI</b></i>	0	0	0	3
<i><b>SAĞLIKLI+ROL5</b></i>	0	0	0	3
<i><b>ALI</b></i>	3	3	3	1
<i><b>ALI+ROL1</b></i>	3	2	3	1
<i><b>ALI+ROL3</b></i>	2	1	2	2
<i><b>ALI+ROL5</b></i>	1	0	1	3



**Şekil 4.9:** Akciğer Dokusu Masson Trikrom Boyama Sonuçları

(**A:** Alveol, **TB:** Terminal Bronşiyol, **AD:** Alveol Duvarı, **ADG:** Alveolar duvar Genişlemesi, **Yıldız:** Perivasküler veya Submukozal ödem, **Kalın çubuk:** Alveoller Septum kalınlaşmaları, **Yuvarlak:** İnflamatuvar hücre kümelenmeleri)

#### 4.3.2. İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

İmmünohistokimyasal boyamada akciğer dokusunda NF- $\kappa$ B, MAPK ve AQP5 antikorları boyanmıştır. Akciğer dokusunda görülen görülen immünpozitiflik derecesi

gruplar arasında boyanma yoğunluğu ve boyanan hücre sayısına göre skorlama yapılmıştır. Buna göre immün negatif (%0-1) için -, immün pozitiflik hafif (%10-33) için +, immün pozitiflik orta (%33-66) için ++ ve immün pozitiflik şiddetli (%66-99) için +++ olarak skorlanmıştır (Tablo 4.2).

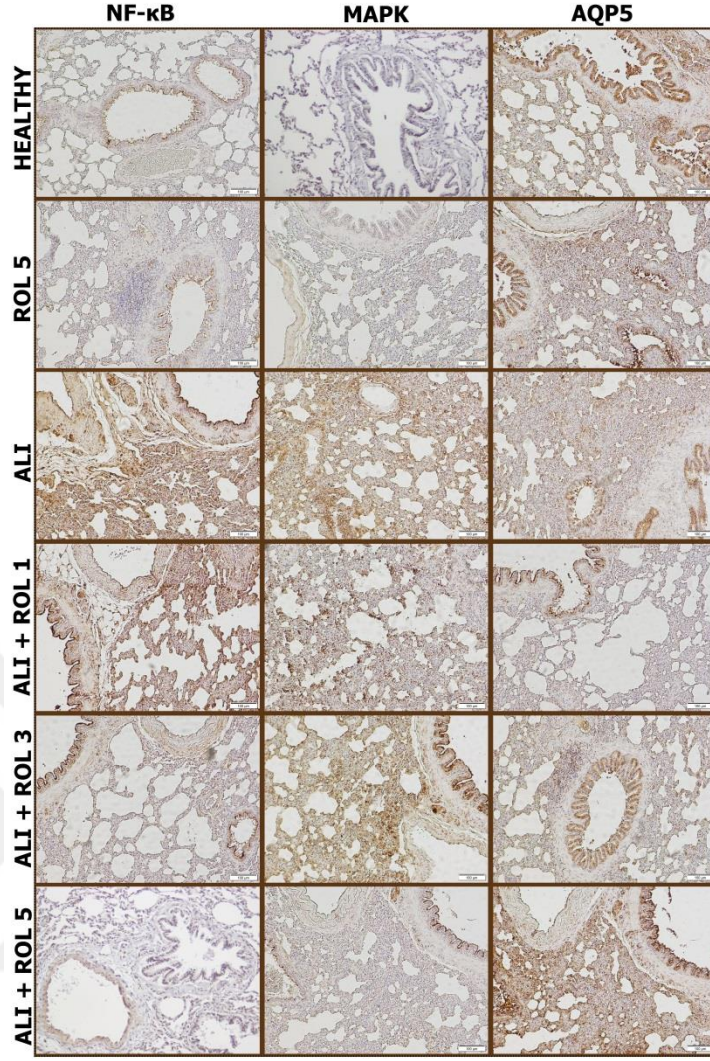
NF-κB antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda; Sağlıklı, Sağlıklı+ ROL5 ve ALI+ ROL5 gruplarında hafif (+), ALI+ROL3 grubunda orta (++) , ALI ve ALI+ ROL1 grubunda ise şiddetli (+++) immün pozitiflik görülmüştür (Şekil 4.10).

MAPK antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda; Sağlıklı, Sağlıklı+ ROL5, ALI+ ROL3 ve ALI+ ROL5 gruplarında hafif (+), ALI ve ALI+ROL1 grubunda orta (++) immün pozitiflik görülmüştür (Şekil 4.10).

AQP5 antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda; ALI ve ALI+ ROL1 gruplarında hafif (+), ALI+ROL3 grubunda orta (++) , Sağlıklı, Sağlıklı+ ROL5 ve ALI+ ROL5 grubunda ise şiddetli (+++) immün pozitiflik görülmüştür (Şekil 4.10).

**Tablo 4.2.** İmmünohistokimyasal Boyama Skorlama Sonuçları

<b>Gruplar</b>	<b>NF-κB</b>	<b>MAPK</b>	<b>AQP 5</b>
<b><i>SAĞLIKLI</i></b>	+	+	+++
<b><i>SAĞLIKLI+ROL5</i></b>	+	+	+++
<b><i>ALI</i></b>	+++	++	+
<b><i>ALI+ ROL 1</i></b>	+++	++	+
<b><i>ALI+ ROL 3</i></b>	++	+	++
<b><i>ALI+ ROL 5</i></b>	+	+	+++

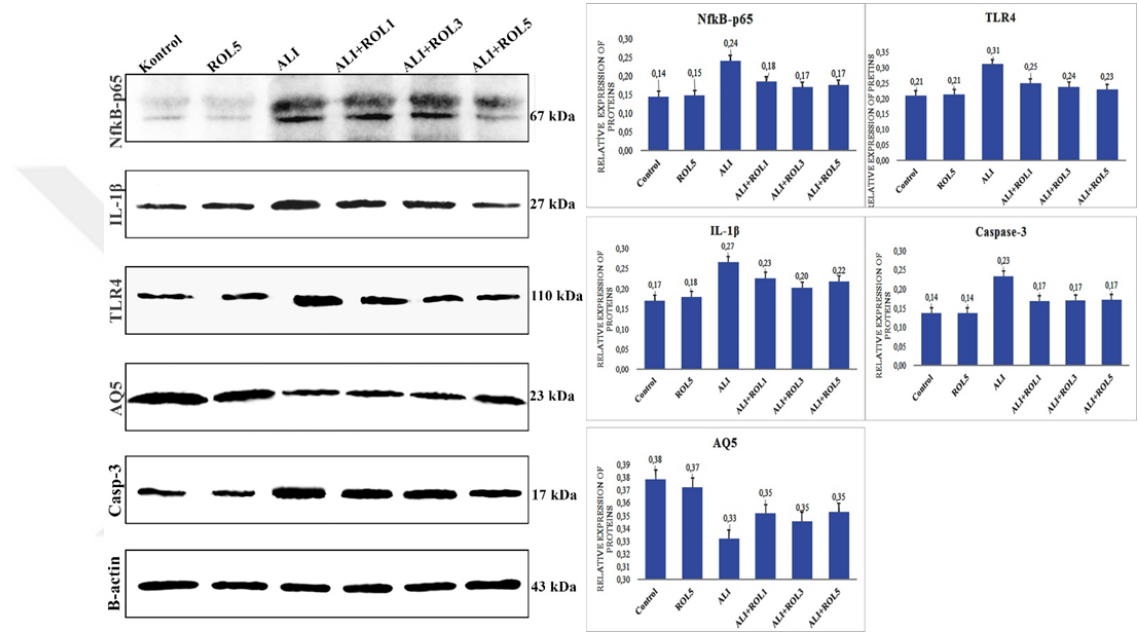


**Şekil 4.10:** Akciğer Dokusu İmmünohistokimya Boyama Sonuçları

#### 4.4. Western Blot Bulguları

Protein ekspresyonlarının belirlenmesinde, NF-κB, TLR4, IL-1β, ve Kaspaz-3 seviyelerinin analizinde SAĞLIKLI ve SAĞLIKLI + ROL5 gruplarındaki ekspresyon seviyelerinin diğer gruplara göre düşük olduğu belirlenirken, protein ekspresyonları ALI grubunda önemli bir oranda artış göstermiştir. Ancak ALI+ROL1, ALI+ROL3 ve ALI+ROL5 gruplarında bu ekspresyon değeri nispeten azalmıştır. Bu proteinlere ait ekspresyon miktarları ve karşılaştırmaları Şekil 4.11’de sunulmuştur.

AQP5 ekspresyonu analizinde, SAĞLIKLI ve SAĞLIKLI + ROL5 gruplarında ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu belirlenirken, ALI grubunda bu seviye azalmıştır. ALI+ROL1, ALI+ROL3 ve ALI+ROL5 gruplarında ekspresyon SAĞLIKLI ve SAĞLIKLI + ROL5 gruplarına göre düşük ancak, ALI grubuna göre ise nispeten yüksek olarak belirlenmiştir. AQP5 proteinine ait ekspresyon miktarı ve karşılaştırması Şekil 4.11’de sunulmuştur.



Şekil 4.11: Akciğer Dokusu NF-κB -p65, Kaspaz-3, TLR4, IL-1β ve AQP5 Western Blot Analiz Sonuçları

## 5. TARTIŞMA

ALI, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, inflamatuvar mediatörlerin aşırı üretimi ve yaygın akciğer inflamasyonu ile karakterizedir (Shi ve ark., 2014). ALI ve daha ciddi formu olan ARDS, sıklıkla çoklu organ disfonksiyonu ile ilişkilidir ve yoğun bakım ünitesindeki hastalarda yüksek mortaliteye neden olur (Su ve ark., 2021). Şu anda, ALI için etkili terapötik stratejiler mevcut değildir ve yeni ilaçların kullanılmasında acilen ihtiyaç duyulmaktadır. PDE inhibitörleri, inflamasyonu baskılama, ödem oluşumunu, oksidatif stresi ve akciğer epiteli ve endotelindeki hasarı hafifletme, trombosit aktivasyonunu azaltma ve hiper pıhtılaşma durumunu önleme yetenekleri nedeniyle özellikle ARDS'de, geniş avantajlar sağlayabilir. Tüm PDE inhibitörleri arasında, PDE4 inhibitörleri ALI/ARDS tedavisinde en umut verici olanıdır (Sanz ve ark., 2007). PDE4 inhibitörleri, inflamatuvar hücrelerin (nötrofiller, eozinofiller, lenfositler, monositler, makrofajlar) ve ilgili sitokinlerin aktivasyonunun ve alımının azaltması ayrıca akciğer yapısal hücrelerinden (alveolar ve bronşiyal epitel hücreleri, mikrovasküler endotelial hücreler, hava yolu düz kas hücreleri, fibroblastlar) diğer biyolojik olarak aktif maddeleri ve ilgili sitokinlerin salınımını azaltması nedeniyle geniş anti-inflamatuvar etkiler gösterir (Zuo ve ark., 2019). Bu çalışmada, intratrekeal LPS enjeksiyonu ile indüklenen bir septik ALI sıçan modeli kullanılmış ve PDE4 inhibitörü rolipram tedavisinin sepsis ve akciğer hasarı üzerine terapötik bir etkisinin olup olmadığını araştırmak ve AQP5 ile ilişkisini incelemek için her bir sıçan grubunda inflamatuvar seviyeleri tespit edilmiştir. LPS uyarımı, nötrofilleri ve makrofajları aktive etmenin yanı sıra TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$  dahil olmak üzere çok sayıda proinflamatuvar sitokinin salgılanmasını aktive edebilir (Tang ve ark., 2018). NF- $\kappa$ B, sırayla sitokinlerin, kemokinlerin ve adezyon moleküllerinin transkripsiyonunu destekleyen LPS kaynaklı akciğer inflamasyonunda iyi bilinen bir sinyaldir (Q. Li & Verma, 2002). NF- $\kappa$ B sinyal

yolunun aracılık ettiği çeşitli inflamatuvar araçılar, ALI'nin patogeneğinde hayati bir rol oynar. Ayrıca, NF-κB sinyal yolu, proinflamatuvar faktörlerin aktivasyonunun anahtarıdır (Kang ve ark., 2001). LPS'nin IL-6 ve TNF-α gibi inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu aktive ettiği ve NF-κB sinyalini indükleyerek sonuçta sitokin fırtınasına ve endotoksik şoka yol açtığı yaygın olarak bilinmektedir (Huang ve ark., 2017). Ayrıca, endotoksin tarafından indüklenen inflamasyon sürecinde, ALI gelişimi için yaygın olarak gerekli olan TLR4 ve NF-κB dahil olmak üzere iki ana sinyal yolu aktivasyonunda inflamatuvar sitokinlerin salgılanması rol oynar (Tang ve ark., 2018). Bu sitokinler sırayla tahrip olmuş alveoler ve vasküler bariyer yoluyla makrofajların ve nötrofillerin akciğere birikmesini sağlar ve bir inflamatuvar basamaklı amplifikasyon oluşturur. ALI hastalığına genellikle akciğer dokusuna zarar veren bu inflamatuvar faktörlerin büyük bir salınımı eşlik eder. İnflamatuvar faktörlerin kontrolsüz birikimi de sepsis ve çoklu organ fonksiyon bozukluğu sendromuna neden olur (Karpurapu ve ark., 2018). Bu bağlamda bizim çalışmamızda da ALI grubunda artan seviyede TNF-α, IL-1β, IL-6, TLR4, NF-κB seviyeleri gözlemlenmiştir.

PDE4 inhibitörü rolipramın in vitro ve in vivo olarak farklı modellerde sitokin ekspresyonu üzerinde önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda, rolipramın bağımsızlık hücrelerini etkili bir şekilde stabilize ettiği ve bunun da TNF-α gibi proinflamatuvar sitokin düzeylerinin düşmesine neden olduğu gösterilmiştir (Flemming ve ark., 2014). Son zamanlarda, rolipramın proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu ve sepsisli hayvanlarda ölüm oranını azalttığı bulunmuştur (Ji ve ark., 2020). Başka bir çalışmada ise inhale LPS ile indüklenen ALI'de, intraperitoneal olarak verilen PDE4 inhibitörü rolipramın; TNF-α ve IL-6'yı azalttığı gösterilmiştir (Konrad ve ark., 2015). Bizim çalışmamızda da literatüre uygun sonuçlar elde edilmiştir. Rolipram, artan dozlarına bağılı olarak akciğer hasarının varlığını gösteren TNF-α, IL-6 ve IL-1β gibi

inflamasyon faktörlerinin salınımını azaltmıştır. Dolayısıyla bulgularımız, PDE4 inhibisyonunun proinflamatuvar sitokinlerini inhibe etmesi, rolipramın antiinflamatuvar etkilerinin bu mekanizmayla ilişkili olabileceğini göstermiştir.

Rolipramın inflamatuvar kaskadı kontrol ederek konakçıda şok ve çoklu organ yetmezliğini nasıl önlediğine dair kesin mekanizma henüz bilinmemektedir. Bununla birlikte, NF- $\kappa$ B yolunun, inflamatuvar gen ekspresyonunun düzenlenmesinde çok önemli olduğu bilinmektedir. Nükleer translokasyon, inflamasyon ve bağışıklık tepkisi ile yakından ilişkili olan çeşitli sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin transkripsiyonunu ve ekspresyonunu aktive eder (Chen & Greene, 2004). Ayrıca; LPS'nin etkilerini, NF- $\kappa$ B aracılı inflamasyon ve hücre apoptozunun en güçlü indükleyicilerinden biri olan TLR4 yoluyla gösterdiği bilinmektedir (Gao ve ark., 2020). Çünkü bakteriler dolaşıma girdiğinde ilk önce TLR4 sinyal zincirini aktive eder ve NF- $\kappa$ B'nin fosforilasyonu yoluyla hedef proinflamatuvar genlerin transdüksiyonunu teşvik ederler. Dolayısıyla çalışmalarda LPS'nin indüklediği ALI'de, TLR4/NF- $\kappa$ B sinyal yolunu aktive edilerek inflamatuvar faktörlerin seviyelerini potansiyel olarak arttırdığı gösterilmiştir (Tang ve ark., 2021). Çalışmamızda, akciğer dokularında TLR4 varlığını araştırdığımızda LPS stimülasyonuna bağlı olarak ALI gruplarında artmış TLR4 miktarı belirlerken rolipram ile yapılan tedavi TLR4 miktarını doza bağımlı olarak azalttı. Bu durum Rolipramın etkisinin TLR4- NF- $\kappa$ B -sitokin kaskadı üzerinden ilerlediğini düşündürdü. Buna ek olarak ALI patogenezinde akciğer epitel hücrelerinin hasarına eşlik eden inflamatuvar ve nekrotik süreçlerde rebound olarak ortaya çıkan apoptotik yanıtlar da önemlidir; dolayısıyla apoptozun aşırı aktivasyonunun azaltılması önemli bir terapötik strateji olarak karşımıza çıkabilir. Bu bağlamda akciğer dokularında apoptoz yolağının da değerlendirilmesi açısından dokularda apoptotik yolağın ana indükleyicilerinden Kaspaz-3 değerlendirilmiş ve ALI gruplarında yüksek olan bu enzimin rolipram

uygulanmasıyla doza bağılı olarak azaldığı gözlenmiştir. Bu bağlamda akciğer dokusunda değerlendirilen tüm protein bulguları birlikte değerlendirildiğinde, LPS'nin TLR4 üzerinden NF- $\kappa$ B'yi ve onun sinyal yollarını aktive ettiğini ve rolipramın bu aktivasyonu kısıtladığını düşünmekteyiz. Ayrıca LPS'nin, sağlıklı grubuna kıyasla ALI grubunda Kaspaz-3 protein seviyelerini önemli ölçüde arttırdığını, rolipram tedavisinin uygulanmasıyla birlikte azaldığını gözlemledik. Dolayısıyla yukarıdaki bulgularla birlikte sonuçlarımız, rolipramın, muhtemelen TLR4/NF- $\kappa$ B/Kaspaz-3 yolunun aşağı regülasyonu yoluyla, LPS kaynaklı hücre ölümüne karşı koruyucu etkiler gösterdiğini göstermektedir. Bu yolakların indirgenmesi akciğer dokusunda inflamatuvar sürece katkıda bulunan ve rolipramın etkileriyle ilişkili diğer yolaklarla bağlantılı olabilir. Bu nedenle çalışmamızda rolipram tedavisinin ALI üzerindeki koruyucu etkilerini ve avantajlarını değerlendirmek için ayrıca LPS kaynaklı akciğer inflamasyonuna yanıt veren MAPK sinyal yolağına da odaklandık. MAPK sinyal yolu inflamasyonu ve bağışıklık tepkisini düzenlemede kritik bir rol oynamaktadır (Sun ve ark., 2012). MAPK yolu, proinflamatuvar faktörler tarafından aktive edilebilen ve inflamasyonun gelişiminde anahtar rol oynayan P38, ERK ve JNK sinyal yollarından oluşur (Sabio & Davis, 2014). Önceki çalışmalar, MAPK sinyal yolunun akut ve kronik inflamatuvar hastalıklarla yakından ilişkili olduğunu, LPS ve TNF- $\alpha$  gibi uyaranlar tarafından aktive edilebileceğini göstermiştir (Xu ve ark., 2015). MAPK sinyal yolunun aktivasyonundan sonra, çekirdeğe fosforile edilmiş ERK, p38 ve JNK transferi, ilgili inflamatuvar faktörlerin hedef genlerinin ekspresyonunu indükler ve bir inflamatuvar yanıtı teşvik eder (Xie ve ark., 2014). Başka çalışmalarda, MAPK yolunun sepsis kaynaklı ALI/ARDS ile ilişkili inflamatuvar süreçte önemli bir patojenik role sahip olabileceğini gösterilmiştir (Fang ve ark., 2017). Bazı çalışmalarda ise çeşitli ilaçların MAPK yolunu veya fosforilasyonu bloke ederek LPS'nin neden olduğu inflamatuvar yanıtın başlamasını

engellediği gösterilmiştir (Cong ve ark., 2020). Bizim alışmamızda ise, rolipram tedavisinin önemli ölçüde MAPK sinyal yolunu inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Dolayısıyla bu sonuçlara dayanarak, rolipramın MAPK yolu aracılığıyla LPS ile indüklenen ALI'de koruyucu bir rol oynayabileceğini dşunmekteyiz.

Fosfodiesteraz süper ailesi, aralarında PDE4'n özellikle ilgi çekici olduğu 11 enzim ailesi içerir. PDE4 izoformları yapı, substrat özgüllüğü, doku ve hücre dağılımı, hücre içi lokalizasyon ve diğer proteinler tarafından regülasyon açısından birbirinden farklıdır (Korhonen ve ark., 2013). PDE4, makrofajlar, monositler ve nötrofil gibi inflamatuvar ve immün hücrelerde yaygın olarak bulunmaktadır (Spadaccini ve ark., 2017). PDE4, cAMP'nin hidrolizinden sorumlu ve dört alt tipi PDE4A/4B/4C/4D'ye ayrılan PDE ailelerinden biridir (Burgin ve ark., 2010). PDE4 familyasına ait dört gen (PDE4A-D), akciğerde tamamı bulunmakla birlikte çeşitli doku ve hücrelerde dağılmıştır ve PDE4C dışında inflamasyonlu hücrelerde de bulunurlar (Zuo ve ark., 2019). PDE4D özellikle akciğer, korteks, beyincik ve T hücrelerinde baskındır (Lagente ve ark., 2005). Bir alışmada; LPS'nin neden olduğu akciğer inflamasyonu sırasında nötrofil alımı için PDE4B ve PDE4D'nin önemli olduğu tespit edilmiştir (Ariga ve ark., 2004). PDE4'n seçici inhibisyonu, birçok inflamatuvar ve immünomodülatör hücrede cAMP içeriğini arttırır ve bu durum inflamatuvar yanıtın çeşitli yönlerinin baskılanmasına neden olur. Rolipram, seçici bir fosfodiesteraz-4 (PDE4) inhibitörüdür ve birçok hücre tipinde ve dokuda hücre içi siklik adenzin monofosfat (cAMP) seviyelerini yükseltir (Montana & Dyke, 2002). ALI/ARDS patogenezinin inflamatuvar hücreler ve immün hücreler tarafından düzenlenmesinde yer alan cAMP ve cGMP, hücrelerin önemli ikinci habercileridir. cAMP ve cGMP, çeşitli patofizyolojik süreçleri düzenleyerek birçok substratın fosforilasyonuna yol açan spesifik protein kinaz ile birleşebilir (Tang ve ark., 2010). Hayvan çalışmalarında hücre içi cAMP

konsantrasyonundaki bir artış, aşırı aktif nötrofillerin neden olduğu akciğer hasarını azaltmıştır (Tsai ve ark., 2015). Az sayıdaki çalışmalarda ise, cAMP bir artışına bağlı olarak inflamatuvar hücrelerin aktivasyonuna dair sinyallerin olduğu bildirilmiştir (VanUffelen ve ark., 1998). Bununla birlikte, cAMP sinyallemesinin aktivasyonunun inflamatuvar hücrelerin genel tepkileri üzerindeki önemi büyük ölçüde bilinmemektedir (Ariga ve ark., 2004). PDE, siklik nükleotidin bozunmasının tek yoludur ve bu tür ikinci habercileri hücre düzeyinde düzenlemede kilit bir rol oynar (Tang ve ark., 2010). PDE4 enzimi, hava yolu düz kasının gevşemesine aracılık eden ve inflamatuvar hücre fonksiyonunu baskılayan cAMP aktivitesini modüle edebilir (Houslay & Adams, 2003). PDE4 inhibitörleri cAMP seviyesini artırabilir ve çeşitli hayvan modellerinde anti-inflamatuvar etki göstermiştir. PDE4 inhibitörlerinden rolipram, hücre içi sinyal molekülü cAMP'nin hidrolizini engeller. Artan cAMP seviyelerinin potansiyel faydalı etkileri arasında pulmoner ödem inhibisyonu, inflamasyon inhibisyonu ve hava yolu hiperreaktivitesinin inhibisyonu yer alır. Yine bir çalışmada; PDE4 inhibitörlerinden rolipramın sistemik olarak uygulanması sonrası, endotelial cAMP aktivasyonu ile birlikte; LPS ile indüklenen sistemik inflamasyon sıçanlarında kapiler sızıntıyı hafifletmiş ve mezenterik venüllerde endotel bariyer özelliklerini stabilize etmiştir (Chang ve ark., 2012). Bununla birlikte, LPS'nin sağlam mikrodamarlarda cAMP'yi in vivo olarak azalttığı ve cAMP seviyelerindeki kaybın rolipramın sistemik uygulanmasıyla ortadan kaldırıldığı gerçeği göz önüne alındığında, doğrudan bir etkinin varsayılması gerekir (Schick ve ark., 2012). Dolayısıyla bu bulguları destekler nitelikte cAMP sinyalini etkinleştirmenin inflamatuvar akciğer hasarını azaltıp azaltmayacağını ele aldık. Bu bağlamda cAMP'nin, PDE4 aracılı hidrolizini seçici olarak inhibe eden rolipram kullanarak cAMP ile ilişkisini inceledik ve rolipramın artan dozlarına bağlı olarak cAMP seviyelerinde artış tespit ettik. Literatürün geneline paralel olarak biz de

rolipramın, cAMP konsantrasyonlarında LPS kaynaklı azalmayı önlediğini düşünmekteyiz.

AQP'ler başlangıçta suyun plazma membranına taşınmasını kolaylaştırmak için kanallar olarak tanımlanmıştır (Jasiewicz & Myśliwiec, 2006). AQP'ler, küçük moleküllerin (su ve çözünen maddeler) geçirgenliğinde ve enerji metabolizması, hücresel proliferasyon, göç ve farklılaşma gibi çeşitli hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde hayati bir rol oynar. AQP konsantrasyonundaki değişimin nedenleri belirsizliğini korumakla birlikte ekspresyonları; fiziksel ve kimyasal faktörlerden (pH ve ozmotik basınç), inflamatuvar faktörlerden, hormonlardan ve diğer proteinlerden etkilenebilir (Perina, 2003). Bugüne kadar 13 AQP bilinmektedir ve insan vücudu boyunca yaygın olarak dağılmaktadır (Hachez & Chaumont, 2010). Bu AQP'ler arasında, AQP5 özellikle submukozal bezlerdeki seröz hücrelerin apikal membranında ve akciğerlerdeki alveoler tip I epitel hücrelerinde eksprese edilir ve alveolar kapiller bariyerin ozmotik su geçirgenliğinde önemli rol oynar (Ohinata ve ark., 2005). Hava sahası ve kılcıl bölmeler arasında osmotik basınç ile su taşınması için temel rol olan AQP5, alveoler membranın yüzey alanının %90'ından fazlasını kapsayan Tip I pnömositlerde tanımlanmıştır (Verkman, 2005).

Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, AQP5'in normal akciğer su homeostazının korunmasında kilit bir rol oynadığını ve AQP5'in hücre yüzeyi ekspresyon miktarındaki değişikliklerin çeşitli akciğer hastalıklarında anormal su metabolizmasına katkıda bulunabileceğini göstermiştir (Nagai ve ark., 2007). Bir çalışmada, AQP5 kaybının neden olduğu intrauterin su dengesinin bozulması, farelerde %60'tan fazla mortalite oranı ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca başka bir çalışmada, akciğer bariyerinin koruyucu fonksiyonları, akciğer enfeksiyonu riskini artırabilecek AQP5'in aşağı regülasyonu ile zayıflatıldığını gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2011). Akciğer

AQP5 ekspresyonunun, ALI'li farelerde artmış inflamatuvar reaksiyon ve alveolar epitelyal ve vasküler endotelyal hücrelerin apoptozisi ile birlikte önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Hasan ve ark., 2014). Bir çalışmada, AQP5 knock-out hayvanlarda, *Pseudomonas aeruginosa*'nın neden olduğu ALI'yi ağırlaştırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu çalışmalar AQP5'in normal su hareketini sürdürmede ve ALI'de pulmoner inflamasyonu inhibe etmede çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Wang ve ark., 2019). Literatürdeki bu bilgilere paralel olarak bizim bulgularımıza göre ALI'li ratlarda AQP5 ekspresyonu, artmış inflamatuvar reaksiyon ve alveolar epitelyal ve vasküler endotelyal hücrelerin apoptozisi Kaspaz-3 ile birlikte önemli ölçüde azalmıştır ve rolipram tedavisinden sonra ise bu azalma engellenmiştir. Histopatolojik olarak elde edilen bu bulgular inflamatuvar belirteçler, immünohistokimyasal boyamalar ve apoptoz göstergesi olan ve ALI grubunda artmış olan Kaspaz-3 seviyesi ile de doğrulanmıştır. Ayrıca histopatolojik sonucumuzda akciğer parankim yapısında alveol duvarlarındaki ödeme bağlı olarak genişleme ve alveol çaplarında belirgin derecede azalmalar izlenmiştir. Dolayısıyla biz, akciğer alveolar hücrelerinde eksprese edilen ve sıvı taşınmasında önemli bir rol oynayan AQP5 düzeyinin azalmasının alveol membranındaki bu hasarla ilişkili olduğu da değerlendirdik. Bildiğimiz kadarıyla, çalışmaların çoğu in vitro yapıldığından, cAMP'nin AQP5'in in vivo ifadesindeki rolünü araştıran çok az çalışma vardır (Wu ve ark., 2016). Bir çalışmada; cAMP'nin, AQP5 mRNA'nın sentezini artırarak ve AQP5'in plazma zarına translokasyonunu tetikleyerek AQP5'i birçok seviyede düzenlediğini gösterdiği tespit edilmiştir (Yang ve ark., 2003). Diğer bir çalışmada tavşan ALI modelinin akciğer dokusunda AQP5 protein ekspresyonunun düzenlenmesinin cAMP yoluyla indüklenebileceği belirtilmiştir (Sun ve ark., 2015). Başka bir çalışmada cAMP-PKA sinyal yolunun AQP5'in akciğer epitel hücrelerinde dağılımı ve bolluğu üzerindeki etkilerini incelenmiş ve AQP5 dağılımının

ve bolluğunun cAMP tarafından dinamik olarak düzenlenmesi, AQP5 ifade eden dokularda membran su geçirgenliğinin kısa ve uzun vadeli düzenlenmesi için potansiyel bir mekanizma sağladığı gösterilmiştir (Sidhaye ve ark., 2005). Bizim bulgularımızda da AQP5 protein ekspresyonu ve cAMP seviyesi rolipramın dozuna bağlı bir şekilde yükseldi ve akciğer dokusunun patolojik hasarı açıkça iyileşti. Ek olarak, LPS tarafından indüklenen ALI geliştirme sürecinde, AQP5 protein ekspresyonunun aşağı regülasyonunun, LPS uygulamasından sonra salınan çok sayıda inflamatuvar mediatör ve NF- $\kappa$ B'yi ve/veya MAPK sinyali aktive eden sitokinlerle yakından ilişkili olabileceğini tespit ettik. Dolayısıyla biz bu sonuçlara dayanarak PDE4 inhibisyonunun; potansiyel olarak inflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu inhibe ederek ve cAMP yolunu aktive ederek akut akciğer hasarlı sıçanların akciğer dokusunda AQP5 ekspresyonunu arttırdığını düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, sepsisli sıçanların akciğer dokusunda AQP5 ekspresyonu üzerine PDE4 inhibisyonunun etkisi LPS ile indüklenen ALI modeli kurularak araştırılmıştır. Çalışmamız; PDE4 inhibisyonunun, cAMP-PKA-MAPK sinyal yolunu regüle ederek AQP5 ekspresyonunda iyileşmeye neden olabileceğini göstermiştir. Dolayısıyla yukarıdaki bulguları bütüncül olarak ele aldığımızda, PDE4 inhibisyonunun; TLR4, NF- $\kappa$ B, MAPK aktivasyonunu inhibe ederek, TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$  gibi sitokin seviyelerini azaltarak hücre membranında meydana gelen inflamatuvar hasar ve apoptozisi önlediğini ve böylece membran yıkımına bağlı olarak oluşan AQP5 seviyesindeki düşmeyi geri çevirerek LPS'nin neden olduğu akciğer hasarını azaltabileceğini öne sürebiliriz. AQP5 proteinlerindeki değişim rolünün PDE4 inhibisyonu ile doğrudan bu protein seviyesine ve ekspresyonuna olan regülatör etkisine de bağlanabilir. Böylece bu çalışma PDE4 enzimi ile AQP5 proteinlerinin inflamatuvar akciğer hastalıklarındaki rolüne ışık tutabilir. Ancak bütün bu bağlantıların detaylı incelenmesi için ileri deneysel ve klinik araştırmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

- Ablimit, A., Hasan, B., Lu, W., Qin, W., Wushouer, Q., Zhong, N., & Upur, H. (2013). Changes in water channel aquaporin 1 and aquaporin 5 in the small airways and the alveoli in a rat asthma model. *Micron*, 45, 68–73.  
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.10.016>
- Abou Saleh, L., Aragon, I. V., Boyd, A., McDonough, W., Koloteva, A., Spadafora, D., Mneimneh, W., Barrington, R. A., & Richter, W. (2020). Ablation of PDE4B Protects from Lung Injury in a Mouse Model of Acute P. Aeruginosa Infection. *D35. Lung Injury And Repair: Cellular Mechanisms*, A6543–A6543.  
[https://doi.org/10.1164/ajrccm-conference.2020.201.1\\_MeetingAbstracts.A6543](https://doi.org/10.1164/ajrccm-conference.2020.201.1_MeetingAbstracts.A6543)
- Agre, P., Preston, G. M., Smith, B. L., Jung, J. S., Raina, S., Moon, C., Guggino, W. B., & Nielsen, S. (1993). Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 265(4), F463–F476.  
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1993.265.4.F463>
- Ahmed, M. E.-R., Bando, H., Hirota, R., Sakaguchi, H., Koike, S., El-Adawy, A. A.-S. N., Kotby, M. N., & Hisa, Y. (2012). Localization and regulation of aquaporins in the murine larynx. *Acta Oto-Laryngologica*, 132(4), 439–446.  
<https://doi.org/10.3109/00016489.2011.644253>
- Aksak Karamese, S., Toktay, E., Unal, D., Selli, J., Karamese, M., & Malkoc, I. (2015). The protective effects of beta-carotene against ischemia/reperfusion injury in rat ovarian tissue. *Acta Histochemica*, 117(8), 790–797.  
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.07.006>
- Amata, E., Bland, N. D., Hoyt, C. T., Settimo, L., Campbell, R. K., & Pollastri, M. P. (2014). Repurposing human PDE4 inhibitors for neglected tropical diseases: Design, synthesis and evaluation of cilomilast analogues as Trypanosoma brucei

- PDEB1 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(17), 4084–4089.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.07.063>
- Annane, D., Bellissant, E., Bollaert, P.-E., Briegel, J., Confalonieri, M., De Gaudio, R., Keh, D., Kupfer, Y., Oppert, M., & Meduri, G. U. (2009). Corticosteroids in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock in Adults. *JAMA*, 301(22), 2362.  
<https://doi.org/10.1001/jama.2009.815>
- Ariga, M., Neitzert, B., Nakae, S., Mottin, G., Bertrand, C., Pruniaux, M. P., Jin, S.-L. C., & Conti, M. (2004). Nonredundant Function of Phosphodiesterases 4D and 4B in Neutrophil Recruitment to the Site of Inflammation. *The Journal of Immunology*, 173(12), 7531–7538. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.12.7531>
- Aydin, P., Magden, Z. B. A., Uzuncakmak, S. K., Halici, H., Akgun, N., Mendil, A. S., Mokhtare, B., & Cadirci, E. (2022). Avanafil as a Novel Therapeutic Agent Against LPS-Induced Acute Lung Injury via Increasing CGMP to Downregulate the TLR4-NF- $\kappa$ B-NLRP3 Inflammasome Signaling Pathway. *Lung*, 200(5), 561–572. <https://doi.org/10.1007/s00408-022-00564-9>
- Azad, A. K., Raihan, T., Ahmed, J., Hakim, A., Emon, T. H., & Chowdhury, P. A. (2021). Human Aquaporins: Functional Diversity and Potential Roles in Infectious and Non-infectious Diseases. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.654865>
- Badaut, J., Fukuda, A. M., Jullienne, A., & Petry, K. G. (2014). Aquaporin and brain diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(5), 1554–1565. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.032>
- Barbara, B. (2010). Aquaporin Biology and Nervous System. *Current Neuropharmacology*, 8(2), 97–104. <https://doi.org/10.2174/157015910791233204>
- Barnette, M. S., & Underwood, D. C. (2000). New phosphodiesterase inhibitors as

- therapeutics for the treatment of chronic lung disease. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 6(2), 164–169. <https://doi.org/10.1097/00063198-200003000-00014>
- Beavo, J. A. (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiological Reviews*, 75(4), 725–748. <https://doi.org/10.1152/physrev.1995.75.4.725>
- Bellani, G., Laffey, J. G., Pham, T., Fan, E., Brochard, L., Esteban, A., Gattinoni, L., van Haren, F., Larsson, A., McAuley, D. F., Ranieri, M., Rubenfeld, G., Thompson, B. T., Wrigge, H., Slutsky, A. S., & Pesenti, A. (2016). Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA*, 315(8), 788. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0291>
- Bernard, G. (2017). Acute Lung Failure — Our Evolving Understanding of ARDS. *New England Journal of Medicine*, 377(6), 507–509. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1706595>
- Bolger, G. B. (2021). The PDE-Opathies: Diverse Phenotypes Produced by a Functionally Related Multigene Family. *Trends in Genetics*, 37(7), 669–681. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.03.002>
- Burgin, A. B., Magnusson, O. T., Singh, J., Witte, P., Staker, B. L., Bjornsson, J. M., Thorsteinsdottir, M., Hrafnisdottir, S., Hagen, T., Kiselyov, A. S., Stewart, L. J., & Gurney, M. E. (2010). Design of phosphodiesterase 4D (PDE4D) allosteric modulators for enhancing cognition with improved safety. *Nature Biotechnology*, 28(1), 63–70. <https://doi.org/10.1038/nbt.1598>
- Cadirci, E., Ugan, R. A., Dincer, B., Gundogdu, B., Cinar, I., Akpınar, E., & Halici, Z. (2019). Urotensin receptors as a new target for CLP induced septic lung injury in

- mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 392(2), 135–145.  
<https://doi.org/10.1007/s00210-018-1571-8>
- Calfee, C. S., Janz, D. R., Bernard, G. R., May, A. K., Kangelaris, K. N., Matthay, M. A., & Ware, L. B. (2015). Distinct Molecular Phenotypes of Direct vs Indirect ARDS in Single-Center and Multicenter Studies. *Chest*, 147(6), 1539–1548.  
<https://doi.org/10.1378/chest.14-2454>
- Castro, A., Jerez, M. J., Gil, C., & Martinez, A. (2005). Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in immunomodulatory responses: Advances in the development of specific phosphodiesterase inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 25(2), 229–244. <https://doi.org/10.1002/med.20020>
- Chang, W., Chen, J., Schlueter, C. F., Rando, R. J., Pathak, Y. V., & Hoyle, G. W. (2012). Inhibition of chlorine-induced lung injury by the type 4 phosphodiesterase inhibitor rolipram. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 263(2), 251–258.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.06.017>
- Chawla, L. S., Fink, M., Goldstein, S. L., Opal, S., Gómez, A., Murray, P., Gómez, H., & Kellum, J. A. (2016). The Epithelium as a Target in Sepsis. *Shock*, 45(3), 249–258. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000518>
- Cheidde, L., & Schor, N. (1999). Revisão: transportadores de água. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 45(1), 71–78. <https://doi.org/10.1590/S0104-42301999000100013>
- Chen, H., Li, N., Zhan, X., Zheng, T., Huang, X., Chen, Q., Song, Z., Yang, F., Nie, H., Zhang, Y., Zheng, B., & Gong, Q. (2021). Capsaicin Protects Against Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury Through the HMGB1/NF- $\kappa$ B and PI3K/AKT/mTOR Pathways. *Journal of Inflammation Research*, Volume 14, 5291–5304. <https://doi.org/10.2147/JIR.S309457>

- Chen, L.-F., & Greene, W. C. (2004). Shaping the nuclear action of NF- $\kappa$ B. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(5), 392–401. <https://doi.org/10.1038/nrm1368>
- Chiricozzi, A., Caposiena, D., Garofalo, V., Cannizzaro, M. V., Chimenti, S., & Saraceno, R. (2016). A new therapeutic for the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis: apremilast. *Expert Review of Clinical Immunology*, 12(3), 237–249. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2016.1134319>
- Cong, Z., Li, D., Tao, Y., Lv, X., & Zhu, X. (2020).  $\alpha$  2A -AR antagonism by BRL-44408 maleate attenuates acute lung injury in rats with downregulation of ERK1/2, p38MAPK, and p65 pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 235(10), 6905–6914. <https://doi.org/10.1002/jcp.29586>
- Conti, M., Richter, W., Mehats, C., Livera, G., Park, J.-Y., & Jin, C. (2003). Cyclic AMP-specific PDE4 Phosphodiesterases as Critical Components of Cyclic AMP Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 5493–5496. <https://doi.org/10.1074/jbc.R200029200>
- de Visser, Y. P., Walther, F. J., Laghmani, E. H., van Wijngaarden, S., Nieuwland, K., & Wagenaar, G. T. M. (2008). Phosphodiesterase-4 inhibition attenuates pulmonary inflammation in neonatal lung injury. *European Respiratory Journal*, 31(3), 633–644. <https://doi.org/10.1183/09031936.00071307>
- Deen, P. M. T., Verdijk, M. A. J., Knoers, N. V. A. M., Wieringa, B., Monnens, L. A. H., van Os, C. H., & van Oost, B. A. (1994). Requirement of Human Renal Water Channel Aquaporin-2 for Vasopressin-dependent Concentration of Urine. *Science*, 264(5155), 92–95. <https://doi.org/10.1126/science.8140421>
- Ehrentraut, H., Weisheit, C. K., Frede, S., & Hilbert, T. (2019). Inducing Acute Lung Injury in Mice by Direct Intratracheal Lipopolysaccharide Instillation. *Journal of Visualized Experiments*, 149. <https://doi.org/10.3791/59999>

- Englert, J. A., Bobba, C., & Baron, R. M. (2019). Integrating molecular pathogenesis and clinical translation in sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *JCI Insight*, 4(2). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.124061>
- Fang, W., Cai, S.-X., Wang, C.-L., Sun, X.-X., Li, K., Yan, X.-W., Sun, Y.-B., Sun, X.-Z., Gu, C.-K., Dai, M.-Y., Wang, H.-M., & Zhou, Z. (2017). Modulation of mitogen-activated protein kinase attenuates sepsis-induced acute lung injury in acute respiratory distress syndrome rats. *Molecular Medicine Reports*, 16(6), 9652–9658. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7811>
- Flemming, S., Schlegel, N., Wunder, C., Meir, M., Baar, W., Wollborn, J., Roewer, N., Germer, C.-T., & Schick, M. A. (2014). Phosphodiesterase 4 Inhibition Dose Dependently Stabilizes Microvascular Barrier Functions and Microcirculation in a Rodent Model of Polymicrobial Sepsis. *Shock*, 41(6), 537–545. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000152>
- Gao, J., Liu, Q., Li, J., Hu, C., Zhao, W., Ma, W., Yao, M., & Xing, L. (2020). Fibroblast Growth Factor 21 dependent TLR4/MYD88/NF- $\kappa$ B signaling activation is involved in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *International Immunopharmacology*, 80, 106219. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106219>
- Ghofrani, H. A., Osterloh, I. H., & Grimminger, F. (2006). Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(8), 689–702. <https://doi.org/10.1038/nrd2030>
- Giembycz, M. A. (2000). Phosphodiesterase 4 Inhibitors and the Treatment of Asthma. *Drugs*, 59(2), 193–212. <https://doi.org/10.2165/00003495-200059020-00004>
- Giembycz, M., & Smith, S. (2006). Phosphodiesterase 7A: A New Therapeutic Target for Alleviating Chronic Inflammation? *Current Pharmaceutical Design*, 12(25), 3207–3220. <https://doi.org/10.2174/138161206778194123>

- Gomes, D., Agasse, A., Thiébaud, P., Delrot, S., Gerós, H., & Chaumont, F. (2009). Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(6), 1213–1228. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.03.009>
- Gonen, T., & Walz, T. (2006). The structure of aquaporins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 39(4), 361–396. <https://doi.org/10.1017/S0033583506004458>
- Gorelick, D. A., Praetorius, J., Tsunenari, T., Nielsen, S., & Agre, P. (2006). Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain. *BMC Biochemistry*, 7, 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-7-14>
- Goris, R. J. A. (1985). Multiple-Organ Failure. *Archives of Surgery*, 120(10), 1109. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1985.01390340007001>
- Gouda, M. M., & Bhandary, Y. P. (2019). Acute Lung Injury: IL-17A-Mediated Inflammatory Pathway and Its Regulation by Curcumin. *Inflammation*, 42(4), 1160–1169. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-01010-4>
- Gresele, P., Momi, S., & Falcinelli, E. (2011). Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 72(4), 634–646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2011.04034.x>
- Guo, R.-F., & Ward, P. A. (2005). ROLE OF C5A IN INFLAMMATORY RESPONSES. *Annual Review of Immunology*, 23(1), 821–852. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115835>
- Güven, B., Kara, Z., & Onay-Beşikci, A. (2020). Metabolic effects of carvedilol through  $\beta$ -arrestin proteins: investigations in a streptozotocin-induced diabetes rat model and in C2C12 myoblasts. *British Journal of Pharmacology*, 177(24), 5580–5594. <https://doi.org/10.1111/bph.15269>
- Hachez, C., & Chaumont, F. (2010). *Aquaporins: A Family of Highly Regulated*

- Multifunctional Channels* (pp. 1–17). [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6315-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6315-4_1)
- Hamann, S., Zeuthen, T., Cour, M. La, Nagelhus, E. A., Ottersen, O. P., Agre, P., & Nielsen, S. (1998). Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1–5 in human and rat eye. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *274*(5), C1332–C1345. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.274.5.C1332>
- Harries, W. E. C., Akhavan, D., Miercke, L. J. W., Khademi, S., & Stroud, R. M. (2004). The channel architecture of aquaporin 0 at a 2.2-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(39), 14045–14050. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405274101>
- Hasan, B., Li, F., Siyit, A., Tuyghun, E., Luo, J., Upur, H., & Ablimit, A. (2014). Expression of aquaporins in the lungs of mice with acute injury caused by LPS treatment. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, *200*, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2014.05.008>
- Hatakeyama, S., Yoshida, Y., Tani, T., Koyama, Y., Nihei, K., Ohshiro, K., Kamiie, J.-I., Yaoita, E., Suda, T., Hatakeyama, K., & Yamamoto, T. (2001). Cloning of a New Aquaporin (AQP10) Abundantly Expressed in Duodenum and Jejunum. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *287*(4), 814–819. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5661>
- Heimann, E., Jones, H. A., Resjö, S., Manganiello, V. C., Stenson, L., & Degerman, E. (2010). Expression and Regulation of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Human and Rat Pancreatic Islets. *Plos One*, *5*(12), e14191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014191>
- Hong-min, F., Chun-rong, H., Rui, Z., Li-na, S., Ya-jun, W., & Li, L. (2016). CGRP 8-37 enhances lipopolysaccharide-induced acute lung injury and regulating

- aquaporin 1 and 5 expressions in rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 73(3), 381–386. <https://doi.org/10.1007/s13105-017-0563-3>
- Hosoi, K., Yao, C., Hasegawa, T., Yoshimura, H., & Akamatsu, T. (2020). Dynamics of Salivary Gland AQP5 under Normal and Pathologic Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4). <https://doi.org/10.3390/ijms21041182>
- Houslay, M. D., & Adams, D. R. (2003). PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochemical Journal*, 370(1), 1–18. <https://doi.org/10.1042/bj20021698>
- Houslay, M. D., Schafer, P., & Zhang, K. Y. J. (2005). Keynote review: Phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discovery Today*, 10(22), 1503–1519. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03622-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03622-6)
- Huang, X., Zeng, Y., Jiang, Y., Qin, Y., Luo, W., Xiang, S., Sooranna, S. R., & Pinhu, L. (2017). Lipopolysaccharide-Binding Protein Downregulates Fractalkine through Activation of p38 MAPK and NF- $\kappa$ B. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2017/9734837>
- Ishibashi, K. (n.d.). New Members of Mammalian Aquaporins: AQP10–AQP12. In *Aquaporins* (pp. 251–262). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9_13)
- Ishibashi, K., Hara, S., & Kondo, S. (2009). Aquaporin water channels in mammals. *Clinical and Experimental Nephrology*, 13(2), 107–117. <https://doi.org/10.1007/s10157-008-0118-6>
- Jasiewicz, M., & Myśliwiec, J. (2006). [Current knowledge on aquaporin water channels: clinical implications]. *Endokrynologia Polska*, 57(2), 149–157. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16773591>

- Ji, J., Liu, Z., Hong, X., Liu, Z., Gao, J., & Liu, J. (2020). Protective effects of rolipram on endotoxic cardiac dysfunction via inhibition of the inflammatory response in cardiac fibroblasts. *BMC Cardiovascular Disorders*, 20(1), 242. <https://doi.org/10.1186/s12872-020-01529-7>
- Jiang, X. X., Fei, X. W., Zhao, L., Ye, X. L., Xin, L. Bin, Qu, Y., Xu, K. H., Wu, R. J., & Lin, J. (2015). Aquaporin 5 Plays a Role in Estrogen-Induced Ectopic Implantation of Endometrial Stromal Cells in Endometriosis. *PLOS ONE*, 10(12), e0145290. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145290>
- Kang, J. L., Lee, H. W., Lee, H. S., Pack, I. S., Chong, Y., Castranova, V., & Koh, Y. (2001). Genistein Prevents Nuclear Factor-Kappa B Activation and Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(12), 2206–2212. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.12.2104017>
- Kang, X., Lu, X.-G., Zhan, L.-B., Liang, Z.-K., Guo, W.-X., Ma, Q., Wang, Y., Song, J.-B., Feng, J.-Y., Wang, C.-H., Bai, L.-Z., Song, Y., & Liu, G.-H. (2017). Dai-Huang-Fu-Zi-Tang alleviates pulmonary and intestinal injury with severe acute pancreatitis via regulating aquaporins in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 288. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1789-x>
- Karpurapu, M., Lee, Y. G., Qian, Z., Wen, J., Ballinger, M. N., Rusu, L., Chung, S., Deng, J., Qian, F., Reader, B. F., Nirujogi, T. S., Park, G. Y., Pei, D., & Christman, J. W. (2018). Inhibition of nuclear factor of activated T cells (NFAT) c3 activation attenuates acute lung injury and pulmonary edema in murine models of sepsis. *Oncotarget*, 9(12), 10606–10620. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24320>
- Ke, H., & Wang, H. (2007). Crystal Structures of Phosphodiesterases and Implications on Substrate Specificity and Inhibitor Selectivity. *Current Topics in Medicinal*

- Chemistry*, 7(4), 391–403. <https://doi.org/10.2174/156802607779941242>
- Kellner, M., Noonepalle, S., Lu, Q., Srivastava, A., Zemskov, E., & Black, S. M. (2017). ROS Signaling in the Pathogenesis of Acute Lung Injury (ALI) and Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) (pp. 105–137). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-63245-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-63245-2_8)
- Kim, W.-Y., & Hong, S.-B. (2016). Sepsis and Acute Respiratory Distress Syndrome: Recent Update. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 79(2), 53. <https://doi.org/10.4046/trd.2016.79.2.53>
- King, L. S., & Agre, P. (1996). Pathophysiology of the Aquaporin Water Channels. *Annual Review of Physiology*, 58(1), 619–648. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.58.030196.003155>
- King, L. S., Nielsen, S., & Agre, P. (2000). Respiratory Aquaporins in Lung Inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 22(1), 8–10. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.22.1.f176>
- Konrad, F. M., Bury, A., Schick, M. A., Ngamsri, K.-C., & Reutershan, J. (2015). The Unrecognized Effects of Phosphodiesterase 4 on Epithelial Cells in Pulmonary Inflammation. *Plos One*, 10(4), e0121725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121725>
- Korhonen, R., Hömmö, T., Keränen, T., Laavola, M., Hämäläinen, M., Vuolteenaho, K., Lehtimäki, L., Kankaanranta, H., & Moilanen, E. (2013). Attenuation of TNF production and experimentally induced inflammation by PDE4 inhibitor rolipram is mediated by MAPK phosphatase-1. *British Journal of Pharmacology*, 169(7), 1525–1536. <https://doi.org/10.1111/bph.12189>
- Kosutova, P., Mikolka, P., Kolomaznik, M., Balentova, S., Adamkov, M., Calkovska, A., & Mokra, D. (2018). Reduction of Lung Inflammation, Oxidative Stress and

- Apoptosis by the PDE4 Inhibitor Roflumilast in Experimental Model of Acute Lung Injury. *Physiological Research*, S645–S654.  
<https://doi.org/10.33549/physiolres.934047>
- Krause, W., & Kühne, G. (1988). Pharmacokinetics of rolipram in the rhesus and cynomolgus monkeys, the rat and the rabbit. Studies on species differences. *Xenobiotica*, 18(5), 561–571. <https://doi.org/10.3109/00498258809041693>
- Krause, W., Kühne, G., & Matthes, H. (1989). Pharmacokinetics of the Antidepressant Rolipram in Healthy Volunteers. *Xenobiotica*, 19(6), 683–692.  
<https://doi.org/10.3109/00498258909042306>
- Kumar, N., Goldminz, A. M., Kim, N., & Gottlieb, A. B. (2013). Phosphodiesterase 4-targeted treatments for autoimmune diseases. *BMC Medicine*, 11(1), 96.  
<https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-96>
- Kumar, V., & Chhibber, S. (2011). Acute Lung Inflammation in Klebsiella pneumoniae B5055-Induced Pneumonia and Sepsis in BALB/c Mice: A Comparative Study. *Inflammation*, 34(5), 452–462. <https://doi.org/10.1007/s10753-010-9253-9>
- Kunzelmann, K., & Mall, M. (2002). Electrolyte Transport in the Mammalian Colon: Mechanisms and Implications for Disease. *Physiological Reviews*, 82(1), 245–289.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2001>
- Lagente, V., Martin-Chouly, C., Boichot, E., Martins, M. A., & Silva, P. M. (2005). Selective PDE4 inhibitors as potent anti-inflammatory drugs for the treatment of airway diseases. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(suppl 1), 131–136.  
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000900023>
- Lefkimmiatis, K., & Zaccolo, M. (2014). cAMP signaling in subcellular compartments. *Pharmacology & Therapeutics*, 143(3), 295–304.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.03.008>

- Li, J., Xu, M., Fan, Q., Xie, X., Zhang, Y., Mu, D., Zhao, P., Zhang, B., Cao, F., Wang, Y., Jin, F., & Li, Z. (2011). Tanshinone IIA ameliorates seawater exposure-induced lung injury by inhibiting aquaporins (AQP) 1 and AQP5 expression in lung. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 176(1–2), 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2011.01.005>
- Li, Q., & Verma, I. M. (2002). NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 2(10), 725–734. <https://doi.org/10.1038/nri910>
- Lipworth, B. J. (2005). Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet*, 365(9454), 167–175. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17708-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17708-3)
- Liu, F., Peng, W., Chen, J., Xu, Z., Jiang, R., Shao, Q., Zhao, N., & Qian, K. (2021). Exosomes Derived From Alveolar Epithelial Cells Promote Alveolar Macrophage Activation Mediated by miR-92a-3p in Sepsis-Induced Acute Lung Injury. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 646546. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.646546>
- Liu, H., & Wintour, E. M. (2005). Aquaporins in development – a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-18>
- Liu, K., Nagase, H., Huang, C. G., Calamita, G., & Agre, P. (2006). Purification and functional characterization of aquaporin-8. *Biology of the Cell*, 98(3), 153–161. <https://doi.org/10.1042/BC20050026>
- Liu, Y. L., Matsuzaki, T., Nakazawa, T., Murata, S.-I., Nakamura, N., Kondo, T., Iwashina, M., Mochizuki, K., Yamane, T., Takata, K., & Katoh, R. (2007). Expression of aquaporin 3 (AQP3) in normal and neoplastic lung tissues. *Human Pathology*, 38(1), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.07.015>
- Lugnier, C. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new

- target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 109(3), 366–398. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.07.003>
- Ma, H., Shi, J., Wang, C., Guo, L., Gong, Y., Li, J., Gong, Y., Yun, F., Zhao, H., & Li, E. (2014). Blockade of PDE4B limits lung vascular permeability and lung inflammation in LPS-induced acute lung injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(4), 1560–1567. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.024>
- Ma, T., Fukuda, N., Song, Y., Matthay, M. A., & Verkman, A. S. (2000). Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(1), 93–100. <https://doi.org/10.1172/JCI8258>
- Mader, S., & Brimberg, L. (2019). Aquaporin-4 Water Channel in the Brain and Its Implication for Health and Disease. *Cells*, 8(2), 90. <https://doi.org/10.3390/cells8020090>
- Matthay, M. A., Ware, L. B., & Zimmerman, G. A. (2012). The acute respiratory distress syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 122(8), 2731–2740. <https://doi.org/10.1172/JCI60331>
- Matute-Bello, G., Frevert, C. W., & Martin, T. R. (2008). Animal models of acute lung injury. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 295(3), L379-99. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00010.2008>
- Michalski, J. M., Golden, G., Ikari, J., & Rennard, S. I. (2012). PDE4: A Novel Target in the Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 91(1), 134–142. <https://doi.org/10.1038/clpt.2011.266>
- Milara, J., Peiró, T., Serrano, A., Guijarro, R., Zaragoza, C., Tenor, H., & Cortijo, J. (2014). Roflumilast N-oxide inhibits bronchial epithelial to mesenchymal

- transition induced by cigarette smoke in smokers with COPD. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 28(2), 138–148.  
<https://doi.org/10.1016/j.pupt.2014.02.001>
- Mokra, D., & Mokry, J. (2021). Phosphodiesterase Inhibitors in Acute Lung Injury: What Are the Perspectives? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1929. <https://doi.org/10.3390/ijms22041929>
- Montana, J. G., & Dyke, H. J. (2002). Update on the therapeutic potential of PDE4 inhibitors. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 11(1), 1–13.  
<https://doi.org/10.1517/13543784.11.1.1>
- Morishita, Y., Sakube, Y., Sasaki, S., & Ishibashi, K. (2004). Molecular Mechanisms and Drug Development in Aquaporin Water Channel Diseases: Aquaporin Superfamily (Superaquaporins): Expansion of Aquaporins Restricted to Multicellular Organisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, 96(3), 276–279.  
<https://doi.org/10.1254/jphs.FMJ04004X7>
- Müller, T., Engels, P., & Fozard, J. R. (1996). Subtypes of the type 4 cAMP phosphodiesterases: structure, regulation and selective inhibition. *Trends in Pharmacological Sciences*, 17(8), 294–298. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(96\)10035-3](https://doi.org/10.1016/0165-6147(96)10035-3)
- Nagai, K., Watanabe, M., Seto, M., Hisatsune, A., Miyata, T., & Isohama, Y. (2007). Nitric oxide decreases cell surface expression of aquaporin-5 and membrane water permeability in lung epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(2), 579–584. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.026>
- Nagasaki, S., Nakano, Y., Masuda, M., Ono, K., Miki, Y., Shibahara, Y., & Sasano, H. (2012). Phosphodiesterase type 9 (PDE9) in the human lower urinary tract: an immunohistochemical study. *BJU International*, 109(6), 934–940.

<https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2011.10429.x>

- Napolitano, L. M. (2018). Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. *Surgical Infections*, *19*(2), 117–125. <https://doi.org/10.1089/sur.2017.278>
- Nielsen, S., King, L. S., Christensen, B. M., & Agre, P. (1997). Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *273*(5), C1549–C1561. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.5.C1549>
- Nielsen, S., Kwon, T.-H., Christensen, B. M., Promeneur, D., Frøkiær, J., & Marples, D. (1999). Physiology and Pathophysiology of Renal Aquaporins. *Journal of the American Society of Nephrology*, *10*(3), 647–663. <https://doi.org/10.1681/ASN.V103647>
- O'Donnell, J. M., & Zhang, H.-T. (2004). Antidepressant effects of inhibitors of cAMP phosphodiesterase (PDE4). *Trends in Pharmacological Sciences*, *25*(3), 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.01.003>
- O'grady, N. P., Preas, H. L., Pugin, J., Fiuza, C., Tropea, M., Reda, D., Banks, S. M., & Suffredini, A. F. (2001). Local Inflammatory Responses following Bronchial Endotoxin Instillation in Humans. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *163*(7), 1591–1598. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.7.2009111>
- Ohinata, A., Nagai, K., Nomura, J., Hashimoto, K., Hisatsune, A., Miyata, T., & Isohama, Y. (2005). Lipopolysaccharide changes the subcellular distribution of aquaporin 5 and increases plasma membrane water permeability in mouse lung epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *326*(3), 521–526. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.216>
- Omar, F., Findlay, J. E., Carfray, G., Allcock, R. W., Jiang, Z., Moore, C., Muir, A. L., Lannoy, M., Fertig, B. A., Mai, D., Day, J. P., Bolger, G., Baillie, G. S.,

- Schwiebert, E., Klussmann, E., Pyne, N. J., Ong, A. C. M., Bowers, K., Adam, J. M., ... Henderson, D. J. P. (2019). Small-molecule allosteric activators of PDE4 long form cyclic AMP phosphodiesterases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(27), 13320–13329. <https://doi.org/10.1073/pnas.1822113116>
- Papazian, L., Forel, J.-M., Gacouin, A., Penot-Ragon, C., Perrin, G., Loundou, A., Jaber, S., Arnal, J.-M., Perez, D., Seghboyan, J.-M., Constantin, J.-M., Courant, P., Lefrant, J.-Y., Guérin, C., Prat, G., Morange, S., & Roch, A. (2010). Neuromuscular Blockers in Early Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine*, *363*(12), 1107–1116. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1005372>
- Park, I., Kim, M., Choe, K., Song, E., Seo, H., Hwang, Y., Ahn, J., Lee, S.-H., Lee, J. H., Jo, Y. H., Kim, K., Koh, G. Y., & Kim, P. (2019). Neutrophils disturb pulmonary microcirculation in sepsis-induced acute lung injury. *European Respiratory Journal*, *53*(3), 1800786. <https://doi.org/10.1183/13993003.00786-2018>
- Peng, C.-K., Huang, K.-L., Wu, C.-P., Wu, Y.-K., Tzeng, I.-S., & Lan, C.-C. (2019). Phosphodiesterase-4 Inhibitor Roflumilast Attenuates Pulmonary Air Emboli-Induced Lung Injury. *Journal of Surgical Research*, *241*, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2019.03.028>
- Perina, D. G. (2003). Noncardiogenic pulmonary edema. *Emergency Medicine Clinics of North America*, *21*(2), 385–393. [https://doi.org/10.1016/S0733-8627\(03\)00020-8](https://doi.org/10.1016/S0733-8627(03)00020-8)
- Preston, G. M., Jung, J. S., Guggino, W. B., & Agre, P. (1993). The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(1), 17–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7677994>

- Ray, P., Devaux, Y., Stolz, D. B., Yarlagadda, M., Watkins, S. C., Lu, Y., Chen, L., Yang, X., & Ray, A. (2003). Inducible expression of keratinocyte growth factor (KGF) in mice inhibits lung epithelial cell death induced by hyperoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(10), 6098–6103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1031851100>
- Rezaiguia, S., Garat, C., Delclaux, C., Meignan, M., Fleury, J., Legrand, P., Matthay, M. A., & Jayr, C. (1997). Acute bacterial pneumonia in rats increases alveolar epithelial fluid clearance by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism. *Journal of Clinical Investigation*, *99*(2), 325–335. <https://doi.org/10.1172/JCI119161>
- Rezoagli, E., Fumagalli, R., & Bellani, G. (2017). Definition and epidemiology of acute respiratory distress syndrome. *Annals of Translational Medicine*, *5*(14), 282–282. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.06.62>
- Rodríguez, A., Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., & Frühbeck, G. (2006). Role of aquaporin-7 in the pathophysiological control of fat accumulation in mice. *FEBS Letters*, *580*(20), 4771–4776. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.080>
- Rojek, A., Praetorius, J., Frøkiaer, J., Nielsen, S., & Fenton, R. A. (2008). A current view of the mammalian aquaglyceroporins. *Annual Review of Physiology*, *70*, 301–327. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100452>
- Rudd, K. E., Johnson, S. C., Agesa, K. M., Shackelford, K. A., Tsoi, D., Kievlan, D. R., Colombara, D. V., Ikuta, K. S., Kisssoon, N., Finfer, S., Fleischmann-Struzek, C., Machado, F. R., Reinhart, K. K., Rowan, K., Seymour, C. W., Watson, R. S., West, T. E., Marinho, F., Hay, S. I., ... Naghavi, M. (2020). Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*, *395*(10219), 200–211.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7)

- Russkamp, N. F., Ruemmler, R., Roewe, J., Moore, B. B., Ward, P. A., & Bosmann, M. (2015). Experimental design of complement component 5a-induced acute lung injury (C5a-ALI): a role of CC-chemokine receptor type 5 during immune activation by anaphylatoxin. *The FASEB Journal*, 29(9), 3762–3772. <https://doi.org/10.1096/fj.15-271635>
- Saadoun, S., Papadopoulos, M. C., Hara-Chikuma, M., & Verkman, A. S. (2005). Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature*, 434(7034), 786–792. <https://doi.org/10.1038/nature03460>
- Sabio, G., & Davis, R. J. (2014). TNF and MAP kinase signalling pathways. *Seminars in Immunology*, 26(3), 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.02.009>
- Sales, A. D., Lobo, C. H., Carvalho, A. A., Moura, A. A., & Rodrigues, A. P. R. (2013). Review Structure, function, and localization of aquaporins: their possible implications on gamete cryopreservation. *Genetics and Molecular Research*, 12(4), 6718–6732. <https://doi.org/10.4238/2013.December.13.5>
- Sanz, M.-J., Cortijo, J., Taha, M. A., Cerdá-Nicolás, M., Schatton, E., Burgbacher, B., Klar, J., Tenor, H., Schudt, C., Issekutz, A. C., Hatzelmann, A., & Morcillo, E. J. (2007). Roflumilast inhibits leukocyte-endothelial cell interactions, expression of adhesion molecules and microvascular permeability. *British Journal of Pharmacology*, 152(4), 481–492. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707428>
- Sarieddine, M. Z. R., Scheckenbach, K. E. L., Foglia, B., Maass, K., Garcia, I., Kwak, B. R., & Chanson, M. (2009). Connexin43 modulates neutrophil recruitment to the lung. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(11–12), 4560–4570. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00654.x>
- Schick, M. A., Wunder, C., Wollborn, J., Roewer, N., Waschke, J., Germer, C.-T., &

- Schlegel, N. (2012). Phosphodiesterase-4 inhibition as a therapeutic approach to treat capillary leakage in systemic inflammation. *The Journal of Physiology*, 590(11), 2693–2708. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.232116>
- Sette, C., & Conti, M. (1996). Phosphorylation and Activation of a cAMP-specific Phosphodiesterase by the cAMP-dependent Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(28), 16526–16534. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.28.16526>
- Shepherd, M. C. (2006). Phosphodiesterase 4 regulation of cyclic AMP in pulmonary remodelling: Potential roles for isoform selective inhibitors. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 19(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2005.05.002>
- Sheppard, D. (2012). Modulation of Acute Lung Injury by Integrins. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 9(3), 126–129. <https://doi.org/10.1513/pats.201112-052AW>
- Shi, D., Zheng, M., Wang, Y., Liu, C., & Chen, S. (2014). Protective effects and mechanisms of mogroside V on LPS-induced acute lung injury in mice. *Pharmaceutical Biology*, 52(6), 729–734. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.867451>
- Sidhaye, V., Hoffert, J. D., & King, L. S. (2005). cAMP Has Distinct Acute and Chronic Effects on Aquaporin-5 in Lung Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3590–3596. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411038200>
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J.-D., Coopersmith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J.-L., & Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), 801.

<https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>

Skowronski, M. T., Kwon, T.-H., & Nielsen, S. (2009). Immunolocalization of Aquaporin 1, 5, and 9 in the Female Pig Reproductive System. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 57(1), 61–67.

<https://doi.org/10.1369/jhc.2008.952499>

Song, Y., Fukuda, N., Bai, C., Ma, T., Matthay, M. A., & Verkman, A. S. (2000). Role of aquaporins in alveolar fluid clearance in neonatal and adult lung, and in oedema formation following acute lung injury: studies in transgenic aquaporin null mice.

*The Journal of Physiology*, 525(3), 771–779. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00771.x>

Spadaccini, M., D'Alessio, S., Peyrin-Biroulet, L., & Danese, S. (2017). PDE4 Inhibition and Inflammatory Bowel Disease: A Novel Therapeutic Avenue.

*International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1276. <https://doi.org/10.3390/ijms18061276>

St John, R. C., Mizer, L. A., Kindt, G. C., Weisbrode, S. E., Moore, S. A., & Dorinsky, P. M. (1993). Acid aspiration-induced acute lung injury causes leukocyte-dependent systemic organ injury. *Journal of Applied Physiology*, 74(4), 1994–

2003. <https://doi.org/10.1152/jappl.1993.74.4.1994>

Stapleton, R. D., Wang, B. M., Hudson, L. D., Rubenfeld, G. D., Caldwell, E. S., & Steinberg, K. P. (2005). Causes and Timing of Death in Patients With ARDS.

*Chest*, 128(2), 525–532. <https://doi.org/10.1378/chest.128.2.525>

Su, Y., Guo, H., & Liu, Q. (2021). Effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles in acute respiratory distress syndrome (ARDS): Current understanding and future perspectives. *Journal of Leukocyte Biology*, 110(1), 27–

38. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MR0321-545RR>

- Sun, C.-Y., Zhao, Y.-X., Zhong, W., Liu, D.-W., Chen, Y.-Z., Qin, L.-L., Bai, L., & Liu, D. (2014). The expression of aquaporins 1 and 5 in rat lung after thoracic irradiation. *Journal of Radiation Research*, 55(4), 683–689. <https://doi.org/10.1093/jrr/rru008>
- Sun, C.-Z., Shen, H., He, X.-W., Bao, L., Song, Y., Zhang, Z., & Qin, H.-D. (2015). Effect of dobutamine on lung aquaporin 5 in endotoxine shock-induced acute lung injury rabbit. *Journal of Thoracic Disease*, 7(8), 1467–1477. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.08.22>
- Sun, X., Liu, Y., Liu, B., Xiao, Z., & Zhang, L. (2012). Rolipram promotes remyelination possibly via MEK-ERK signal pathway in cuprizone-induced demyelination mouse. *Experimental Neurology*, 237(2), 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.07.011>
- Tajima, T., Shinoda, T., Urakawa, N., Shimizu, K., & Kaneda, T. (2018). Phosphodiesterase 9 (PDE9) regulates bovine tracheal smooth muscle relaxation. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(3), 499–502. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0011>
- Tang, F., Fan, K., Wang, K., & Bian, C. (2018). Atractylodin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome and TLR4 pathways. *Journal of Pharmacological Sciences*, 136(4), 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2017.11.010>
- Tang, H.-F., Lu, J.-J., Tang, J.-F., Zheng, X., Liang, Y., Wang, X.-F., Wang, Y.-J., Mao, L.-G., & Chen, J.-Q. (2010). Action of a Novel PDE4 inhibitor ZL-n-91 on lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *International Immunopharmacology*, 10(4), 406–411. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.01.003>
- Tang, J., Xu, L., Zeng, Y., & Gong, F. (2021). Effect of gut microbiota on LPS-induced

- acute lung injury by regulating the TLR4/NF-kB signaling pathway. *International Immunopharmacology*, 91, 107272. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107272>
- Toktay, E., Selli, J., Gurbuz, M. A., Tastan, T. B., Ugan, R. A., Un, H., & Halici, Z. (2020). Effects of soy isoflavonoids (genistein and daidzein) on endometrial receptivity. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(12), 1603–1609. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.48294.11089>
- Tomashefski, J. F. (1990). Pulmonary pathology of the adult respiratory distress syndrome. *Clinics in Chest Medicine*, 11(4), 593–619. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2268992>
- Torphy, T. J. (1998). Phosphodiesterase Isozymes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157(2), 351–370. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.2.9708012>
- Torphy, T. J., Barnette, M. S., Underwood, D. C., Griswold, D. E., Christensen, S. B., Murdoch, R. D., Nieman, R. B., & Compton, C. H. (1999). Ariflo™(SB 207499), a Second Generation Phosphodiesterase 4 Inhibitor for the Treatment of Asthma and COPD: from Concept to Clinic. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 12(2), 131–135. <https://doi.org/10.1006/pupt.1999.0181>
- Towne, J. E., Harrod, K. S., Krane, C. M., & Menon, A. G. (2000). Decreased expression of aquaporin (AQP)1 and AQP5 in mouse lung after acute viral infection. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 22(1), 34–44. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.22.1.3818>
- Tsai, Y.-F., Yu, H.-P., Chung, P.-J., Leu, Y.-L., Kuo, L.-M., Chen, C.-Y., & Hwang, T.-L. (2015). Osthonol attenuates neutrophilic oxidative stress and hemorrhagic shock-induced lung injury via inhibition of phosphodiesterase 4. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 387–400. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.008>

- Tsushima, K., King, L. S., Aggarwal, N. R., De Gorordo, A., D'Alessio, F. R., & Kubo, K. (2009). Acute Lung Injury Review. *Internal Medicine*, 48(9), 621–630. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.48.1741>
- Turner, C. R., Esser, K. M., & Wheeldon, E. B. (1993). Therapeutic intervention in a rat model of ARDS: IV. Phosphodiesterase IV inhibition. *Circulatory Shock*, 39(3), 237–245. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8384094>
- Vang, A. G., Basole, C., Dong, H., Nguyen, R. K., Housley, W., Guernsey, L., Adami, A. J., Thrall, R. S., Clark, R. B., Epstein, P. M., & Brocke, S. (2016). Differential Expression and Function of PDE8 and PDE4 in Effector T cells: Implications for PDE8 as a Drug Target in Inflammation. *Frontiers in Pharmacology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00259>
- VanUffelen, B., de Koster, B., & Elferink, J. . (1998). Interaction of cyclic GMP and cyclic AMP during neutrophil migration: involvement of phosphodiesterase type III. *Biochemical Pharmacology*, 56(8), 1061–1063. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00147-6](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00147-6)
- Verkman, A. S. (2005). More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *Journal of Cell Science*, 118(15), 3225–3232. <https://doi.org/10.1242/jcs.02519>
- Verkman, A. S. (2007). Role of aquaporins in lung liquid physiology. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 159(3), 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2007.02.012>
- Verkman, A. S. (2012). Aquaporins in Clinical Medicine. *Annual Review of Medicine*, 63(1), 303–316. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-043010-193843>
- Wang, J.-J., Kong, H., Xu, J., Wang, Y.-L., Wang, H., & Xie, W.-P. (2019). Fasudil alleviates LPS-induced lung injury by restoring aquaporin 5 expression and

- inhibiting inflammation in lungs. *Journal of Biomedical Research*, 33(3), 156–163.  
<https://doi.org/10.7555/JBR.31.20170024>
- Wang, J., Feng, L., Zhu, Z., Zheng, M., Wang, D., Chen, Z., & Sun, H. (2015). Aquaporins as diagnostic and therapeutic targets in cancer: How far we are? *Journal of Translational Medicine*, 13(1), 96. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0439-7>
- Wang, Y.-M., Ji, R., Chen, W.-W., Huang, S.-W., Zheng, Y.-J., Yang, Z.-T., Qu, H., Chen, H., Mao, E.-Q., Chen, Y., & Chen, E.-Z. (2019). Paclitaxel alleviated sepsis-induced acute lung injury by activating MUC1 and suppressing TLR-4/NF- $\kappa$ B pathway. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 13, 3391–3404. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S222296>
- Wang, Z., Rui, T., Yang, M., Valiyeva, F., & Kvietys, P. R. (2008). Alveolar Macrophages from Septic Mice Promote Polymorphonuclear Leukocyte Transendothelial Migration via an Endothelial Cell Src Kinase/NADPH Oxidase Pathway. *The Journal of Immunology*, 181(12), 8735–8744. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8735>
- Ware, L. B., & Matthay, M. A. (2000). The Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 342(18), 1334–1349. <https://doi.org/10.1056/NEJM200005043421806>
- Wheeler, A. P., & Bernard, G. R. (2007). Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *The Lancet*, 369(9572), 1553–1564. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60604-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60604-7)
- Windsor, A. C. J., Mullen, P. G., Fowler, A. A., & Sugerman, H. J. (2005). Role of the neutrophil in adult respiratory distress syndrome. *British Journal of Surgery*, 80(1), 10–17. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800800106>

- Wu, B., & Beitz, E. (2007). Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(18), 2413–2421. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7163-2>
- Wu, Z. Y., Yao, Y., Hu, R., Dai, F. F., Zhang, H., & Mao, Z. F. (2016). Cyclic adenosine monophosphate-protein kinase A signal pathway may be involved in pulmonary aquaporin-5 expression in ischemia/reperfusion rats following deep hypothermia cardiac arrest. *Genetics and Molecular Research*, 15(1). <https://doi.org/10.4238/gmr.15017377>
- Xie, X., Sun, S., Zhong, W., Soromou, L. W., Zhou, X., Wei, M., Ren, Y., & Ding, Y. (2014). Zingerone attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *International Immunopharmacology*, 19(1), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.12.028>
- Xu, Y., Zhang, R., Li, C., Yin, X., Lv, C., Wang, Y., Zhao, W., & Zhang, X. (2015). Dexmedetomidine attenuates acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mouse through inhibition of MAPK pathway. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 29(5), 462–471. <https://doi.org/10.1111/fcp.12138>
- Yamaji, Y., Valdez, D. M., Seki, S., Yazawa, K., Urakawa, C., Jin, B., Kasai, M., Kleinhans, F. W., & Edashige, K. (2006). Cryoprotectant permeability of aquaporin-3 expressed in *Xenopus* oocytes. *Cryobiology*, 53(2), 258–267. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2006.06.008>
- Yang, F., Kawedia, J. D., & Menon, A. G. (2003). Cyclic AMP Regulates Aquaporin 5 Expression at Both Transcriptional and Post-transcriptional Levels through a Protein Kinase A Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 32173–32180. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305149200>
- Zapol, W. M., Trelstad, R. L., Coffey, J. W., Tsai, I., & Salvador, R. A. (1979).

- Pulmonary fibrosis in severe acute respiratory failure. *The American Review of Respiratory Disease*, 119(4), 547–554. <https://doi.org/10.1164/arrd.1979.119.4.547>
- Zhang, C., Lueptow, L. M., Zhang, H.-T., O'Donnell, J. M., & Xu, Y. (2017). *The Role of Phosphodiesterase-2 in Psychiatric and Neurodegenerative Disorders* (pp. 307–347). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-58811-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-58811-7_12)
- Zhang, Y., Li, J., & Yan, C. (2018). An update on vinpocetine: New discoveries and clinical implications. *European Journal of Pharmacology*, 819, 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.11.041>
- Zhang, Z.-Q., Song, Y.-L., Chen, Z.-H., Shen, Y., & Bai, C.-X. (2011). Deletion of Aquaporin 5 Aggravates Acute Lung Injury Induced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Trauma: Injury, Infection & Critical Care*, 71(5), 1305–1311. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3182128528>
- Zhou, G., Dada, L. A., Wu, M., Kelly, A., Trejo, H., Zhou, Q., Varga, J., & Sznajder, J. I. (2009). Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 297(6), L1120–L1130. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00007.2009>
- Zhou, Q., He, D.-X., Deng, Y.-L., Wang, C.-L., Zhang, L.-L., Jiang, F.-M., IRAKOZE, L., & Liang, Z.-A. (2022). MiR-124-3p targeting PDE4B attenuates LPS-induced ALI through the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *International Immunopharmacology*, 105, 108540. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108540>
- Zhu, J., Mix, E., & Winblad, B. (2001). The antidepressant and antiinflammatory effects of rolipram in the central nervous system. *CNS Drug Reviews*, 7(4), 387–398. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2001.tb00206.x>
- Zoulikha, M., Xiao, Q., Bofo, G. F., Sallam, M. A., Chen, Z., & He, W. (2022).

Pulmonary delivery of siRNA against acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(2), 600–620.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.08.009>

Zuo, H., Cattani-Cavalieri, I., Musheshe, N., Nikolaev, V. O., & Schmidt, M. (2019). Phosphodiesterases as therapeutic targets for respiratory diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 197, 225–242. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.02.002>



## **EKLER**

### **EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU**



**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
Graduate School of Health Sciences

**ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU<sup>1</sup>**

Öğrencinin Adı ve Soyadı	Ayşe BOZKURT
Öğrencinin Numarası	18024001007
Ana Bilim Dalı	<b>Tıbbi Farmakoloji</b>
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora

Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	% 1	% 15
II. Genel Bilgiler	% 3	% 35
III. Materyal ve Metod	% 30	% 35
IV. Bulgular	% 11	% 15
V. Tartışma	% 1	% 20

*Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.*

<b>Tez Yazarı (Öğrenci)</b>	<b>Tez Danışmanı</b>
Ayşe BOZKURT	Prof. Dr. Elif ÇADIRCI
31.10.2023	31.10.2023
İmza:	İmza:

<sup>1</sup> Bu form bilgisayar ortamında doldurulmalı, çıktısı imzalanıp Tez Savunması Jüri Öneri Formu'yla birlikte Ana Bilim Dalı Başkanlığı aracılığıyla ÜBYS üzerinden Enstitüye iletilmelidir.

## EK-2.ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Rektörlük



Hayvan Hımetinde, Hay Deneyi...

Sayı : E-75296309-050.01.04-2200074544  
Konu : HADYEK Kararı.

02.03.2022

### TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 17.02.2022 tarihli ve E-42190979-000-2200055143 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 28.02.2022 tarihli ve 2022/2 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 26 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmanın Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülmesine ve taahhütname hükümlerine göre çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu: DB3E0500500  
Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum  
Tel: +90 442 2317222  
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/#/birim=veteriner-fakultesi>  
Kep Adresi: [atauni@hs01.kep.tr](mailto:atauni@hs01.kep.tr)

Belge Doğrulama Adresi: <https://www.turkiye.gov.tr/ataurk-universitesi-ebys>

Bilgi: Mehmet KOCA  
Faks: +90 442 2317244  
E-Posta: [vctfak@atauni.edu.tr](mailto:vctfak@atauni.edu.tr)



**TOPLANTI TARİHİ : 28.02.2022**

**TOPLANTI SAYISI : 2022/2**

**KARAR NO 26:** Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Elif ÇADIRCI'nın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan "Sıçanlarda LPS ile İndüklenen Akut Akciğer Hasarında Fosfodiesteraz-4 Enzim İnhibisyonunun Etkilerinin Aquaporin-5 Üzerinden Araştırılması" isimli araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 17.02.2022 tarihli ve E-42190979-000-2200055143 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, taahhütname hükümleri gereğince çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabulüne; **(Yönetmeliğin 8.maddesinin 8/h bendi gereğince, Prof.Dr.Elif ÇADIRCI görüşmeye katılmadı ve oy kullanmadı)**, karar verildi.

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ  
Kurul Başkanı

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.

Bu belge; güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu: DB3E0500500  
Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum  
Tel: +90 442 2317222  
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/#birim=veteriner-fakultesi>  
Kep Adresi: [atauni@hs01.kep.tr](mailto:atauni@hs01.kep.tr)

Belge Doğrulama Adresi: <https://www.turkiye.gov.tr/ataurk-universitesi-ebys>

Bilgi: Mehmet KOCA  
Faks: +90 442 2317244  
E-Posta: [vetfak@atauni.edu.tr](mailto:vetfak@atauni.edu.tr)

