

T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI

**KANNABİNOİDLERİN, SIÇANLARDA GELİŞTİRİLEN DİREKT VE
İNDİREKT AKUT RESPIRATUVAR DİSTRES SENDROMU (ARDS)
MODELLERİNDE, MODELE ÖZGÜ POTANSİYEL ETKİ
FARKLILIKLARININ İNCELENMESİ VE KLİNİK UYGULAMA
AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Yusuf ELMA

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Emine YILMAZ CAN

ZONGULDAK

2023

T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI

**KANNABİNOİDLERİN, SIÇANLARDA GELİŞTİRİLEN DİREKT VE
İNDİREKT AKUT RESPIRATUVAR DİSTRES SENDROMU (ARDS)
MODELLERİNDE, MODELE ÖZGÜ POTANSİYEL ETKİ
FARKLILIKLARININ İNCELENMESİ VE KLİNİK UYGULAMA
AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Yusuf ELMA

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Emine YILMAZ CAN

ZONGULDAK

2023

*Bu çalışma, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. (Proje Numarası: 2022-43341027-03)*

ÖNSÖZ

Öncelikle; uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince sabrı ve hoşgörüsü ile her zaman yanımda olan, derin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Emine YILMAZ CAN'a,

Bilgisi ve tecrübesiyle her konuda görüş ve desteğini hiç esirgemeyen Ana bilim dalı'mız öğretim üyesi saygıdeğer hocam Prof.Dr. Günnur ÖZBAKIŞ DENGİZ'e,

Tez sürecimdeki ilgi ve katkılarından dolayı üniversitemiz Histoloji ve Embriyoloji Ana bilim dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH ve değerli abim Dr. Öğr. Üyesi Mete KEÇECİ'ye,

Deney sürecimdeki yardımlarından dolayı Veteriner Hekim Osman CENGİL ve Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi personellerine,

İstatistiksel analizlerde yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi M. Çağatay BÜYÜKUYSAL'a

Uzmanlık eğitimimde bana yol arkadaşı olan Ana bilim dalı'mız asistanı Arş. Gör. Dr. Seyde Nur UÇAR'a,

Beni yetiştirip büyüten değerli aileme,

Ve her zorlukta yanımda olan, benimle birlikte mücadele eden hayat arkadaşım ve aynı zamanda gurur duyduğum meslektaşım Arş. Gör. Dr. Nazan ELMA'ya

Teşekkür ederim.

Yusuf ELMA

Zonguldak, 2023

ÖZET

Yusuf ELMA, Kannabinoidlerin, Sıçanlarda Geliştirilen Direkt ve İndirekt Akut Respiratuvar Distres Sendromu (ARDS) Modellerinde, Modele Özgü Potansiyel Etki Farklılıklarının İncelenmesi ve Klinik Uygulama Açısından Değerlendirilmesi, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ana bilim dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Zonguldak, 2023

Bu çalışma; sıçanlarda direkt ve indirekt olmak üzere iki farklı akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) deney modelinde, meydana gelen akciğer hasarından sorumlu patofizyolojik mekanizmalar arasındaki farkların tespit edilmesi, kannabinoidlerin akciğer hasarı üzerine olası koruyucu etkilerinin araştırılması ve bu koruyucu etkilerdeki modele özgü farklılıkların aydınlatılması amacıyla planlanmıştır. Çalışmamızda, sıçanlarda indirekt ARDS modeli olarak intraperitoneal (i.p. 10mg/kg) yolla alfa-naftiltiyöre (ANTU) uygulaması, direkt ARDS modeli olarak ise intratrakeal lipopolisakkarit (LPS) instilasyonu (5 mg/kg) seçilmiştir. Endokannabinoidlerin yıkımından sorumlu enzim olan monoasil gliserol lipazı (MAGL) inhibe eden JZL184 tedavi ajanı olarak, ANTU ve LPS uygulamalarından 30 dakika önce 10mg/kg dozunda i.p. yolla uygulanmıştır.

Endotel hasarının ön planda olduğu ANTU grubundaki akciğer dokularının histopatolojik incelemesinde; belirgin perivasküler genişlemeye eşlik eden ödem, hemoraji, konjesyon, interstisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve alveolar duvar kalınlaşması görülmüştür. Epitel hasarının ön planda olduğu LPS grubundaki akciğer dokularının histopatolojik incelemesinde ise; bronşiol epitelinde yer yer deskuamasyon, bronşiol lümeninde artmış inflamatuvar hücre ve eritrosit varlığı, konjesyon ve alveolar duvar kalınlaşması görülmüştür. JZL184 her iki hasar modelinde ödem ve perivasküler genişlemeyi anlamlı düzeyde azaltırken; ANTU'ya bağlı indirekt akciğer hasarında interstisyumdaki inflamatuvar hücre infiltrasyonunu, LPS'ye bağlı direkt akciğer hasarında ise bronşiol lümenindeki inflamatuvar hücre varlığını anlamlı düzeyde azaltmıştır.

JZL184, antioksidan sisteme ait bir parametre olan katalaz seviyesini, ANTU ve LPS tedavi gruplarında sırasıyla ANTU ve LPS gruplarına göre artırdığı tespit edilmiş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca JZL184'ün LPS'ye bağlı akciğer

hasarında antioksidan sisteme ait bir başka parametre olan glutatyon (GSH) seviyesini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı saptanmıştır. İmmünohistokimyasal incelemelerde ise JZL184, hem ANTU hem de LPS'ye bağlı akciğer hasarında nükleer faktör-kappa B (NF-κB) ve kaspaz-3 boyanmasını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır. Bu azalma, patoloji gruplarındaki boyanma yoğunluğuyla uyumlu olarak ANTU tedavi grubunda daha çok alveolar duvar dokusunda, LPS tedavi grubunda ise özellikle bronşiol epiteli ve çevresinde tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, bir endokannabinoid olan 2-araşidonil gliserolün (2-AG) yıkımının inhibe edilmesi yoluyla düzey ve etkinliğinin artırılmasının; direkt ve indirekt akciğer hasarına bağlı meydana gelen inflamasyon, apoptoz ve doku hasarı üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar farmakoterapinin semptomatik düzeyde kaldığı ARDS için, farklı etiyolojilere bağlı olarak gelişen farklı patofizyolojik mekanizmalarda, kannabinoidlerin önemli bir terapötik ajan olabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: ARDS, kannabinoid, endokannabinoidler, MAGL inhibitörü, 2-araşidonil gliserol, JZL184

SUMMARY

Yusuf ELMA, Investigation of Model-Specific Potential Effects of Cannabinoids in Direct and Indirect Models of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) Developed in Rats and Evaluation in Terms of Clinical Practice, Zonguldak Bulent Ecevit University Faculty of Medicine, Department of Medical Pharmacology, Specialization Thesis in Medicine, Zonguldak, 2023

This study was planned to determine the differences between the pathophysiological mechanisms responsible for lung damage in two different acute respiratory distress syndrome (ARDS) experimental models, direct and indirect, in rats, to investigate the possible protective effects of cannabinoids on lung damage, and to elucidate model-specific differences in these protective effects. In our study, intraperitoneal (i.p. 10mg/kg) administration of alpha-naphthylthiourea (ANTU) was chosen as an indirect ARDS model, and intratracheal lipopolysaccharide (LPS) instillation (5 mg/kg) was chosen as a direct ARDS model in rats. JZL184, which inhibits monoacylglycerol lipase (MAGL), the enzyme responsible for the degradation of endocannabinoids, was administered as a treatment agent at a dose of 10mg/kg i.p. 30 minutes before ANTU and LPS applications.

In the histopathological examination of lung tissues in the ANTU group, in which endothelial damage was prominent, edema accompanied by significant perivascular enlargement, hemorrhage, congestion, inflammatory cell infiltration in the interstitium and alveolar wall thickening were observed. In the histopathological examination of the lung tissues in the LPS group in which epithelial damage is prominent, local desquamation in the bronchiole epithelium, increased presence of inflammatory cells and erythrocytes in the bronchiole lumen, congestion and alveolar wall thickening were observed. While JZL184 significantly reduced edema and perivascular enlargement in both injury models, it significantly reduced the inflammatory cell infiltration in the interstitium in indirect lung injury due to ANTU, and the presence of inflammatory cells in the bronchiole lumen in direct lung injury due to LPS.

It was determined that JZL184 increased the level of catalase, a parameter of the antioxidant system, in the ANTU and LPS treatment groups, respectively, compared to the ANTU and

LPS groups, but this increase was not statistically significant. In addition, it was determined that JZL184 statistically significantly increased the level of glutathione (GSH), another parameter of the antioxidant system in lung injury due to LPS. In immunohistochemical studies, JZL184 statistically significantly reduced nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and caspase-3 staining in lung injury due to both ANTU and LPS. This decrease was found mostly in the alveolar wall tissue in the ANTU treatment group, and especially in the bronchiol epithelium and its surroundings in the LPS treatment group, in line with the staining intensity in the pathology groups.

As a result, it was determined that increasing the level and activity of 2-arachidonoylglycerol (2-AG), an endocannabinoid, by inhibiting its degradation, has a protective effect on inflammation, apoptosis and tissue damage caused by direct and indirect lung injury. These results reveal that cannabinoids can be an important therapeutic agent for ARDS, where pharmacotherapy remains symptomatic, in different pathophysiological mechanisms due to different etiologies.

Key Words: ARDS, cannabinoid, endocannabinoids, MAGL inhibitor, 2-arachidonoyl glycerol, JZL184

İÇİNDEKİLER		
		Sayfa
Önsöz		ii
Özet		iii
İngilizce Özet (Summary)		v
İçindekiler		vii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini		xi
Tablolar Dizini		xiv
Şekiller Dizini		xv
1. Giriş		1
2. Genel Bilgiler		3
2.1. Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu		3
2.1.1. Berlin tanımı		4
2.1.2. ARDS insidansı ve mortalitesi		6
2.1.3. ARDS'nin etiyolojik faktörleri		7
2.1.4. ARDS patofizyolojisi		9
2.1.4.1. ARDS patogenezinin aşamaları		9
2.1.4.2. ARDS patofizyolojisindeki mediatörler		10
2.1.4.2.1. Alveolar makrofajlar		12
2.1.4.2.2. Nötrofiller		12
2.1.4.2.3. Alveolar epitel		13
2.1.4.2.4. Alveolar endotel		14
2.1.5. ARDS tedavisi		15
2.2. ARDS Deney Modelleri		16
2.2.1. Direkt yöntemler		16
2.2.1.1. İntratrakeal LPS		16
2.2.1.2. Asit aspirasyonu		17
2.2.1.3. Mekanik ventilasyon		17
2.2.1.4. Sürfaktan deplesyonu (salin lavajı)		18
2.2.1.5. Akciğer iskemi/reperfüzyonu		18
2.2.2. İndirekt yöntemler		19

2.2.2.1. Akciğer dışı İ/R	19
2.2.2.2. İntravenöz LPS	19
2.2.2.3. Çekal bağlama delme (ÇBD)	19
2.2.2.4. Oleik asit	20
2.2.2.5. İntraperitoneal ANTU	20
2.3. Endojen Antioksidan Sistemler	21
2.4. NF-κB	22
2.5. Apoptoz	24
2.5.1. Ekstrinsik yol	25
2.5.2. İntrinsik yol	25
2.6. Kannabinoidler	27
2.6.1. Kannabinoid genel bilgiler	27
2.6.2. Kannabinoidlerin etki mekanizmaları	30
2.6.3. Δ9-Tetrahidrokannabinol (THC)	31
2.6.4. Kannabidiol (CBD)	32
2.6.5. Endokannabinoid sistem (EKS)	34
2.6.5.1. Endokannabinoidler	36
2.6.5.2. Endokannabinoidlerin biyosentezi ve yıkılması	37
2.6.5.3. Kannabinoid reseptörler CB1 ve CB2	39
2.6.5.4. Kannabinoidlerden etkilenen kannabinoid olmayan reseptörler	40
2.6.5.4.1. Geçici reseptör potansiyel (TRP) kanalları	41
2.6.5.4.2. G protein kenetli reseptör 55 (GPR55)	41
2.6.5.4.3. Peroksizom proliferatörle aktive edilen reseptör (PPAR)	42
2.6.5.5. Endokannabinoid sistemin fizyolojik ve patolojik süreçlerdeki rolü	42
2.6.6. Kannabinoidler ve akciğer	44
2.6.7. Kannabinoid preparatları	45
2.6.8. Deneyde kullanılan tedavi ajanı (JZL184)	46
3. Gereç ve Yöntem	48
3.1. ARDS Deney Modellerinin Oluşturulması	48
3.1.1. ANTU (İndirekt ARDS) modeli	48
3.1.2. İntratrakeal LPS (Direkt ARDS) modeli	49

3.2. Deney Protokolü	51
3.2.1. Biyokimyasal inceleme metodları	51
3.2.1.1. Akciğer dokusunda MDA tespiti (nmol/L)	52
3.2.1.2. Akciğer dokusunda SOD tespiti (U/ml)	52
3.2.1.3. Akciğer dokusunda katalaz tespiti (U/ml)	52
3.2.1.4. Akciğer dokusunda GSH tespiti (mg/L)	53
3.2.2. Histopatolojik inceleme metodu (hematoksilen-eozin)	53
3.2.3. İmmünohistokimyasal inceleme metodu	54
3.3. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler	55
3.3.1. ANTU	55
3.3.2. LPS	55
3.3.3. Olive oil (saf zeytinyağı)	55
3.3.4. Serum fizyolojik (% 0.9 NaCl- salin solüsyonu)	56
3.3.5. JZL184	56
3.3.6. Dimetil sülfoksit (DMSO)	56
3.3.7. Etanol	56
3.3.8. Ketamin	56
3.3.9. Ksilazin	57
3.4. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi	57
4. Bulgular	58
4.1. Kontrol Grubu (Sağlıklı) Akciğerler	58
4.2. ANTU'nun Akciğer Üzerine Etkisi (İndirekt Model)	58
4.3. LPS'nin Akciğer Üzerine Etkisi (Direkt Model)	59
4.4. ANTU (İndirekt Model) ve LPS'nin (Direkt Model) Akciğer Üzerine Etkilerindeki Farklılıklar	60
4.5. JZL184'ün ANTU ile Oluşturulan Akciğer Hasarı Üzerine Etkileri	61
4.6. JZL184'ün LPS ile Oluşturulan Akciğer Hasarı Üzerine Etkileri	62
4.7. JZL184'ün ANTU (İndirekt Model) ve LPS (Direkt Model) ile Oluşturulan Akciğer Hasarları Üzerine Etkilerindeki Farklılıklar	63
4.8. Makroskopik Görüntüler	81
4.9. Hematoksilen-Eozin Görüntüleri	84
4.9.1. Kontrol grubu	84

4.9.2. ANTU grubu	85
4.9.3. LPS grubu	89
4.9.4. ANTU tedavi grubu	95
4.9.5. LPS tedavi grubu	97
4.10. İmmünohistokimya Görüntüleri	99
5. Tartışma	103
6. Sonuçlar	118
7. Kaynaklar	121
8. Ekler	153
8.1. Etik Kurul Onayı	153

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simge/Kısaltma	Açıklamalar
2-AG	2-araşidonil gliserol
5-HT	Serotonin
5-HT1A	Serotonin reseptörü 1a
A1	Adenozin reseptörü
AA/VA	Akciğer ağırlığı/vücut ağırlığı
AAM	Alternatif olarak aktive edilmiş makrofajlar
AEA	Anandamid
AECC	Amerikan-Avrupa konsensüs konferansı
AIDS	Edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu
Angpt	Anjiyopietin
ANTU	Alfa-naftiltiyöre
ARDS	Akut solunum sıkıntısı sendromu
Bak	Bcl-2 homolog antagonisti/öldürücü
BAL	Bronkoalveolar lavaj
Bax	Bcl-2 ile ilişkili x proteini
Bcl-xL	B hücreli lenfoma-ekstra büyük
BCO	Buzlu cam opasiteleri
cAMP	Siklik adenosin monofosfat
CBD	Kannabidiol
CD73	Farklılaşma kümesi 73
COX	Siklooksijenaz
CPAP	Devamlı pozitif hava yolu basıncı
CRS	İstirahatte akciğer kompliyansı
CXCL8	Kemokin ligandı 8
CYP	Sitokrom P450 enzim ailesi
ÇBD	Çekal bağlama delme
DAG	Diaçilgliserol lipaz

DMSO	Dimetil sülfoksit
EKS	Endokannabinoid sistem
ELISA	Enzim bağılı immünosorbent analizi
EMA	Avrupa tıbbi ürünler değerlendirme ajansı
ENaC	Epitelyal sodyum kanalı
FAAH	Yağ asidi amid hidrolaz
FDA	Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
FiO ₂	İnspire edilen oksijen oranı
GABA	Gama-aminobütirik asit
GPCR	G protein kenetli reseptör
HIF-2 α	Hipoksi ile indüklenebilir faktör-2 alfa
IFN	İnterferon
IgG	İmmünglobulin G
IL	İnterlökin
i.p.	intraperitoneal
İ/R	İskemi/reperfüzyon
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KAM	Klasik olarak aktive edilmiş makrofajlar
LIS	Akciğer hasarı skoru
LPS	Lipopolisakkarit
LTB ₄	Lökotrien B ₄
MAGL	Monoasil gliserol lipaz
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MDA	Malondialdehit
MMP	Matriks metalloproteinaz
MPO	Miyeloperoksidaz
N/A	Uygulanabilir değil
NADA	N-araşidonoil dopamin
NET	Nötrofil hücre dışı tuzakları
NF- κ B	Nükleer faktör-kappa B
PAI-1	Plazminojen aktivatör inhibitörü-1

PaO ₂	Parsiyel oksijen basıncı
PE	Plevral efüzyon
PEEP	Pozitif ekspirasyon sonu basıncı
PGI ₂	Prostasiklin
PMN	Polimorfonükleer lökosit
PPAR	Peroksizom proliferatörle aktive edilen reseptör
RAGE	İleri glikasyon son ürünlerinin reseptörü
ROS	Reaktif oksijen türleri
RSV	Solunum sinsityal virüs
SOD	Süperoksit dismutaz
SP-D	Sürfaktan proteini-D
SSS	Santral sinir sistemi
THC	Tetrahidrokannabinol
Tie-2	Transmembran tirozin kinazlar
TLR	Toll benzeri reseptör
TNF- α	Tümör nekrozis faktör-alfa
TRALI	Transfüzyonla ilişkili akut akciğer hasarı
TRP	Geçici reseptör potansiyel
TXB ₂	Tromboksan B ₂
vWF	von Willebrand faktörü
YBÜ	Yoğun bakım ünitesi

TABLolar DİZİNİ

Tablo Numarası	Tablonun Başlığı	Sayfa Numarası
1	Berlin tanımına göre ARDS sınıflandırması	5
2	ARDS'nin etiyolojik faktörlerine örnekler	7
3	Direkt ve indirekt ARDS arasında farklılık gösteren klinik özellikler	8
4	Deney grupları	51
5	Akciğer dokusu için hematoksilen-eozin boyama protokolü	54
6	AA/VA oranlarının gruplar arası karşılaştırması	64
7	Plevral efüzyon (PE) miktarının (ml) gruplar arası karşılaştırması	65
8	PE/VA oranlarının gruplar arası karşılaştırması	66
9	MDA seviyesinin gruplar arası karşılaştırması	67
10	SOD seviyesinin gruplar arası karşılaştırması	68
11	Katalaz seviyesinin gruplar arası karşılaştırması	69
12	GSH seviyesinin gruplar arası karşılaştırması	70
13	Ödemin gruplar arası karşılaştırması	71
14	Alveolar duvar kalınlaşmasının gruplar arası karşılaştırması	72
15	İnterstisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonunun gruplar arası karşılaştırması	73
16	Vakuolizasyonun gruplar arası karşılaştırması	74
17	Alveolar makrofajın gruplar arası karşılaştırması	75
18	Hemorajinin gruplar arası karşılaştırması	76
19	Perivasküler genişlemenin gruplar arası karşılaştırması	77
20	Konjesyonun gruplar arası karşılaştırması	77
21	Bronşiol lümeninde inflamatuvar hücre varlığının gruplar arası karşılaştırması	78
22	NF-κB boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması	79
23	Kaspaz-3 boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil Numarası	Şeklin Başlığı	Sayfa Numarası
1	ARDS patofizyolojisinde etkili mediatörler	11
2	NF-κB'nin çeşitli süreçlerdeki rolü	24
3	Apoptotik yollar	27
4	Endokannabinoidlerin retrograd sinyalizasyonu	37
5	JZL184 kimyasal yapısı	46
6	Efüzyon sıvısının ölçümü	49
7	LPS modeli	50
8	LPS modeli	50
9	LPS modeli	50
10	AA/VA oranlarının gruplar arası karşılaştırması	64
11	PE miktarının (ml) gruplar arası karşılaştırması	65
12	PE/VA oranlarının gruplar arası karşılaştırması	66
13	MDA seviyesinin gruplar arası karşılaştırması	67
14	SOD seviyesinin gruplar arası karşılaştırması	68
15	Katalaz seviyesinin gruplar arası karşılaştırması	69
16	GSH seviyesinin gruplar arası karşılaştırması	70
17	Ödemin gruplar arası karşılaştırması	71
18	Alveolar duvar kalınlaşmasının gruplar arası karşılaştırması	72
19	İnterstisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonunun gruplar arası karşılaştırması	73
20	Vakuolizasyonun gruplar arası karşılaştırması	74
21	Alveolar makrofajın gruplar arası karşılaştırması	75
22	Hemorajinin gruplar arası karşılaştırması	76
23	NF-κB boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması	79
24	Kaspaz-3 boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması	80
25	Kontrol	81
26	Kontrol	81

27	ANTU	81
28	ANTU	81
29	ANTU	81
30	ANTU	81
31	LPS	82
32	LPS	82
33	ANTU tedavi	82
34	ANTU tedavi	82
35	ANTU tedavi	82
36	ANTU tedavi	82
37	LPS tedavi	83
38	LPS tedavi	83
39	LPS tedavi	83
40	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-Kontrol grubu	84
41	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-ANTU grubu	85
42	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-ANTU grubu	85
43	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-ANTU grubu	86
44	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-ANTU grubu	86
45	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-ANTU grubu	87
46	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-ANTU grubu	87
47	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-ANTU grubu	88
48	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-LPS grubu	89
49	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-LPS grubu	89
50	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-LPS grubu	90
51	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-LPS grubu	90
52	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-LPS grubu	91
53	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-LPS grubu	91
54	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-LPS grubu	92
55	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-LPS grubu	92
56	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-LPS grubu	93
57	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-LPS grubu	93

58	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-LPS grubu	94
59	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-ANTU tedavi grubu	95
60	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-ANTU tedavi grubu	95
61	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-ANTU tedavi grubu	96
62	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-LPS tedavi grubu	97
63	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-LPS tedavi grubu	97
64	Hematoksilen-Eozin Görüntüleri-LPS tedavi grubu	98
65	İmmünohistokimya Görüntüleri-NF-κB (Ölçek çubuğu:50 μm)	99
66	İmmünohistokimya Görüntüleri-NF-κB (Ölçek çubuğu:20 μm)	100
67	İmmünohistokimya Görüntüleri-kaspaz-3 (Ölçek çubuğu:50 μm)	101
68	İmmünohistokimya Görüntüleri-kaspaz-3 (Ölçek çubuğu:20 μm)	102

1. GİRİŞ

Akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS); sepsis, pnömoni, ciddi travma ve yanıklar, akciğer transplantasyonu, yağ embolisi, duman inhalasyonu, kardiyopulmoner by-pass, akut pankreatit gibi çeşitli nedenlere bağlı olarak akciğerlerde doğrudan veya dolaylı hasarların olduğu, alveolo-kapiller permeabilitede artış sonucu nonkardiyak pulmoner ödemin geliştiği, inflamasyon, fibrozis gibi yapısal değişiklikler, oksijene yanıt vermeyen hipoksemi, azalmış komplians ve azalmış fonksiyonel rezidüel kapasite ile seyreden, akciğer grafisinde diffüz infiltratların bulunduğu karmaşık bir klinik tablodur (1–8).

ARDS patogenezinde inflamasyon ve apoptoz önemli rol oynamaktadır. İlk olarak tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinler, ardından da yoğun nötrofil birikimi ve aktivasyonu sonucunda reaktif oksijen türevleri gibi toksik mediyatörler salgılanmaktadır. Bu inflamatuvar süreç alveolar epitel ve kapiller endotelde harabiyete sebep olarak ARDS için tipik histopatolojik görüntüyü oluşturmaktadır (9).

Kannabinoidler, endojen kannabinoidler (endokannabinoidler), fitokannabinoidler ve sentetik kannabinoidler olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (10–13). Endokannabinoidler, başta anandamid (AEA) ve 2-AG olmak üzere canlı organizmalar tarafından araşidonik asitten sentezlenen ve endokannabinoid sistem üzerinde etki gösteren endojen bileşiklerdir ve klasik nörotransmitterlerin aksine depolanmayıp sadece ihtiyaç durumunda üretilmektedir. Bu endojen bileşikler serbest bırakıldıktan sonra ters yönde hareket ederek kannabinoid reseptörleri aktive etmekte ve presinaptik nörotransmitter salınımını baskılamaktadır. Endokannabinoidlerden AEA'nın kannabinoid reseptörler üzerindeki etkisi parsiyel agonist iken 2-AG ise full agonisttir. Bu endokannabinoidlerin salıverilmesinden sonra parçalanmak üzere hücreye geri alınımında endokannabinoid membran taşıyıcı enzimi (EMT) rol oynarken, AEA ile 2-AG'nin hücre içi yıkımından sorumlu olan enzimler ise sırasıyla yağ asidi amid hidrolaz (FAAH) ve MAGL'dir (14–18). Bahsedilen bu endokannabinoidler, CB₁ ve CB₂ başta olmak üzere kannabinoid reseptörleri ve bu kannabinoidlerin sentez ve yıkımından sorumlu enzimlerden oluşan sisteme endokannabinoid sistem adı verilmektedir (19). Bu reseptörlerin aktivasyonu/inhibisyonu ile yıkım enzimlerinin inhibisyonu, endokannabinoid sistem üzerinde modülasyona imkan

veren ilaç mekanizmaları arasındadır. Bir başka grup olan fitokannabinoidler bitkisel kökenli kannabinoidlerdir ve tetrahidrokannabinol (THC) ve kannabidiol (CBD) bu grubun en bilinen üyeleridir (20). Kannabinoidlerin son grubu olan sentetik kannabinoidler ise doğal yollarla elde edilemeyen analoglardır ve endokannabinoid sistem üzerinde etki oluşturmaktadır. Bu grupta kannabinoid reseptör agonist ve antagonistleri yer almaktadır.

Bir rodentisit olan ANTU, akciğer ödemi ve plevral efüzyon geliştirerek indirekt akciğer hasarına neden olan kimyasal bir ajandır. Gram negatif bakterilerin dış membranında bulunan ve bir glikolipid olan LPS ise, akut inflamatuvar yanıtı teşvik ederek direkt hasara yol açmaktadır. İntraperitoneal yolla ANTU ve intratrakeal instilasyon yoluyla LPS uygulaması ile sırasıyla indirekt ve direkt ARDS deney modellerinin oluşturulduğu çalışmamızda; bu iki ARDS deney modelinde hasardan sorumlu patofizyolojik mekanizmalar arasındaki farklılıklar, MAGL inhibitörü JZL184'ün akciğer hasarı üzerine olası koruyucu etkileri ve bu etkilerdeki modele özgü farklılıkların incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu

İlk kez 1967 yılında Ashbaugh ve arkadaşları, ani solunum yetmezliği olan 12 hastada “akut solunum sıkıntısı sendromu” (ARDS) olarak adlandırdıkları klinik tabloyu bildirmişlerdir (1). Geçmişte kardiyak veya pulmoner hastalık öyküsü bulunmayan bu hastalar, birkaç gün içinde hızla akut hipoksemi ve göğüs röntgeninde yaygın bilateral alveolar infiltrasyon geliştirmişler ve bu 12 hastanın 7'si (% 58) ölmüştür. Ölen tüm hastalara otopsi yapılmış ve 6'sında (% 86) hiyalin membranlar, ödem, hücre nekrozu veya fibrozis gibi yaygın alveolar hasarın tipik histolojik paterni tespit edilmiştir (1). 1971'de Petty ve Ashbaugh, yüksek FiO₂ (inspire edilen oksijen oranı) ve PEEP (ekspirasyon sonu pozitif basınç) kullanan, mekanik ventilasyona dayalı ARDS yönetiminin ilkelerini tanımlamışlardır (2). Oksijene dirençli siyanoz ARDS için klinik kriterlerden biri iken, yazarlar herhangi bir hipoksemi eşiği belirtmemişlerdir. Beş yıl sonra Bone ve arkadaşları, en az 0,5 FiO₂ ve PEEP'e rağmen 70 mmHg'nin altında bir hipoksemi eşiği öne sürmüşlerdir (3). 1982'de ise Pepe ve arkadaşları, bu tanıma göğüs röntgeninde yeni ve yaygın bilateral infiltratların varlığı ile 18 mmHg'dan düşük pulmoner kama basıncını eklemişler, böylece kardiyojenik pulmoner ödemin hariç tutulmasını sağlamışlardır (4). 1988'de Murray ve arkadaşları, parsiyel oksijen basıncı (PaO₂)/FiO₂ oranı, PEEP düzeyi, solunum sistemi kompliyansı ve göğüs X- ray'inde görülen infiltrasyonlu kadran sayısına göre ARDS şiddetini değerlendirmek amacıyla akciğer hasarı skorunu (LIS) önermişlerdir (5). ARDS'nin tanımı zaman içinde önemli ölçüde değişse de 1994 yılında yapılan uluslararası Amerikan-Avrupa Konsensüs Konferansı (AECC) ARDS'nin gerçek anlamda klinik tanımının temellerini atmıştır (6). Bu konsensüs konferansı epidemiyolojik çalışmalar ve araştırmalar ile klinik kullanım için, ARDS tanımına tek tiplilik getirmeyi amaçlamıştır (6). Sonuç olarak ARDS, şu dört kriter kullanılarak tanımlanmıştır:

- 1) akut hipoksemi başlangıcı,
- 2) PEEP seviyesinden bağımsız olarak PaO₂/FiO₂ oranı \leq 200 mmHg,

3) Göğüs röntgeninde iki taraflı infiltratların varlığı,

4) Pulmoner arter kama basıncı ≤ 18 mmHg veya klinik sol atriyal hipertansiyon belirtisi olmamasıdır (6).

Tüm bu kriterleri karşılayan ancak $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ oranı 201 ile 300 mmHg arasında olan ve daha az şiddetli hipoksemisi olan hastalar ARDS değil akut akciğer hasarı (ALI) olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte bu klinik tanım her kriter açısından yeniden tartışılmış (7) ve 2012'de "Berlin Tanımı" oluşturulmuştur (8).

2.1.1. Berlin tanımı

Berlin tanımı, daha iyi bir klinik tanım sağlamayı ve hastaları hastalığın şiddetine göre sınıflandırmayı amaçlamıştır. Daha sonra, hipoksi derecesine göre ventilasyon yönetimi ve tedavi protokolleri önerme amacıyla uzman paneli tarafından bir çalışma yayınlanmıştır (21). AECC tanımının ana sınırlamalarını ele almak için Berlin tanımında önerilmiş değişiklikler şunlardır: İlk olarak, ARDS'nin "akut başlangıcı" belirlenmiştir ve solunum semptomlarının klinik bir hasardan sonraki 7 gün içinde mevcut olması gerekmektedir. Zamanlamadaki bu belirleme, idiyopatik pulmoner fibroz, spesifik olmayan interstisyel pnömoni, kriptojenik organize pnömoni, polianjritli granülomatozis veya ilaca bağlı akciğer hastalığı gibi solunum semptomları geliştiren ve ARDS'yi taklit eden hastalıkların ekarte edilmesini sağlamıştır (22). İkinci olarak, hastalar hipoksemi açısından şiddetine göre sınıflandırılmış ve $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ oranı 201 ile 300 arasında hafif, 101 ile 200 arasında orta ve 100 mmHg'ya eşit veya altında ise ağır ARDS olarak sınıflandırılmıştır (8). Böylece $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ oranı 300 mmHg'ya kadar olan hastalar da dahil edilerek Berlin tanımı, daha önce akut akciğer hasarı olarak adlandırılan hafif ARDS'li hastaları da kapsar hale getirilmiştir. AECC tanımının önemli bir sınırlaması, kullanılan PEEP seviyesinden bağımsız olarak $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ oranının değerlendirilmesi olduğundan Berlin tanımı, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ oranının en az 5 cmH₂O olan bir PEEP seviyesi ile ölçülmesi gerektiğini belirtmiştir (8). Üçüncü olarak, AECC tanımı ARDS'de pulmoner arter kama basıncının 18 mmHg'yı geçmemesi gerektiği üzerinde dursa da (6), ARDS'li hastalarda yüksek pulmoner kama basıncı değerleri yaygın olarak gözlenmiş (23,24) ve hemodinamik durumun yönetimi için

pulmoner arter kateterinin rutin kullanımının anlamsız olduğu tespit edilmiştir (25). Bu nedenle pulmoner arter kama basıncı gereksinimi Berlin tanımından çıkarılmış ve var olan solunum yetmezliğinin bir klinisyen veya ekokardiyografik görüntüleme ile kalp yetmezliğine bağlı olarak açıklanamaması ve kardiyojenik pulmoner ödemin dışlanması gerekliliği eklenmiştir (8). Dördüncü olarak da, Berlin tanımı radyolojik bulgu kapsamında, göğüs röntgeninde ve bilgisayarlı tomografi (BT) taramasında efüzyon, akciğer kollapse veya nodüller ile tam olarak açıklanamayan bilateral opasiteleri almıştır (8).

Berlin tanımına göre hafif, orta ve ağır ARDS kriterleri aşağıda Tablo 1’de (26) gösterilmiştir:

Tablo 1. Berlin tanımına göre ARDS sınıflandırması

Kriterler	Hafif	Orta	Ağır
Zaman	Akut başlayan; bir hafta içinde başlamış klinik veya yeni-kötüleşen solunum bulguları		
Ödem sebebi	Sıvı yüklenmesi veya kalp yetmezliği ile tamamen açıklanamamış solunum yetmezliği*		
Hipoksi	$300 \geq PaO_2/FiO_2 > 200$ ile PEEP/CPAP ≥ 5	$PaO_2/FiO_2 \leq 200$ ile PEEP ≥ 5	$PaO_2/FiO_2 \leq 100$ ile PEEP ≥ 10
Radyolojik anormallik	Çift taraflı opasite**	Çift taraflı opasite**	En az üç kadranı kapsayan opasite**
Ek fizyolojik anormallik	N/A	N/A	CRS < 40 mL/cmH ₂ O veya VE _{corr} > 10 L/dakika

* Risk faktörünün olmaması durumunda objektif değerlendirilmelidir

** Kitle, nodül, efüzyon veya akciğer kollapse ile tamamen açıklanamamış

CPAP: Devamlı pozitif hava yolu basıncı, CRS: İstirahatte akciğer kompliyansı, VE_{corr} = VE x PaCO₂/40 (vücut yüzey alanı ile düzeltilmiş dakika ventilasyonu), N/A: uygulanabilir değil

2.1.2. ARDS insidansı ve mortalitesi

ARDS insidansı, PaO₂/FiO₂'si 300 mmHg'ya kadar olan hastaları içeren Berlin tanımı kullanıldığında beklendiği gibi daha yüksek olmuştur. 2000'lerin başında, üç çalışma, AECC tanımını kullanarak ARDS insidansını ve sonucunu değerlendirmiştir (27–29). Bu çalışmalarda, yoğun bakım ünitesine (YBÜ) kabul edilen hastaların yaklaşık % 7-8'i ARDS için klinik kriterleri karşılamış ve PaO₂/FiO₂'si 200 mmHg veya daha düşük olan hastalarda mortalite % 35 ile % 50 arasında değişmiştir.

50 ülkedeki 459 YBÜ arasında 4 haftalık bir süre içinde gerçekleştirilen büyük bir uluslararası araştırma, mevcut Berlin tanımına göre ARDS için klinik kriterleri karşılayan hastaları taramıştır (30). ARDS'li hastalar, AECC tanımını kullanan yukarıdaki çalışmalardan daha yüksek olacak şekilde tüm YBÜ yatışlarının % 10,4'ünü temsil etmiştir (27–29). YBÜ'deki entübe hastaların % 23'ü, YBÜ'de kaldıkları süre boyunca ARDS için klinik kriterleri karşılamış, bunların % 30'unda hafif, % 47'sinde orta ve % 23'ünde ise ağır ARDS görülmüştür. ARDS'yi tetikleyen risk faktörleri vakaların % 59'unda pnömoni, % 14'ünde aspirasyon, % 16'sında ekstrapulmoner sepsis ve % 7,5'inde kardiyojenik olmayan şok şeklinde tespit edilmiştir. Bazı hastalarda birkaç risk faktörü olabilirken, vakaların yaklaşık % 8'inde (ARDS'yi taklit edenler) olağan risk faktörlerinin hiçbiri tanımlanmamıştır. Bu çalışma aynı zamanda ARDS'li birçok hastanın bu hastalığa sahip olduğu sırada klinisyen tarafından teşhis edilemediğini de vurgulamıştır ve hafif ARDS'li hastaların yaklaşık yarısında bu durum görülmüştür. ARDS'nin klinik teşhisi, ağır ARDS için daha yüksek oranda olsa da % 21'i yine de teşhis edilememiştir. Bu çalışmada genel mortalite ise YBÜ'de % 34 iken, hastane içi % 40'tır. Ayrıca hastane içi mortalite; hafif ARDS'li hastalar için % 35, orta olanlar için % 40 ve ağır olanlar içinse % 46 olarak tespit edilmiştir (30).

ARDS'ye bağlı genel mortalite oranı % 40-50 gibi oldukça yüksek bir değerdir ve ARDS'li hastaların çoğu hipoksemiye değil, çoklu organ yetmezliğine bağlı olarak kaybedilmektedir. Pulmoner fonksiyon bozukluğu, kronik karaciğer hastalığı, sepsis ve ileri yaş, mortaliteyi belirleyen risk faktörleri arasındadır (31). Sepsisle ilişkili ARDS'de mortalite riski yüksekken, majör travmanın neden olduğu ARDS'li hastalarda ise daha olumlu bir prognoz mevcuttur.

2.1.3. ARDS'nin etiyolojik faktörleri

Hayatı tehdit eden solunum yetmezliğiyle seyreden ARDS'de mekanik ventilasyonun sağlanamaması durumunda hastaların büyük çoğunluğu kaybedilmektedir (32). Doğrudan veya dolaylı olarak akciğer parankiminde ya da damar yapısında gelişen bir hasarın söz konusu olduğu ARDS'nin akciğer patolojisinde, hasara yol açan nedene bağlı olarak bazı farklılıklar bulunmaktadır (33). ARDS'ye neden olan faktörler, direkt akciğeri ilgilendiren pulmoner nedenler (direkt ARDS) ve sistemik bir hastalık kaynaklı ortaya çıkan ekstrapulmoner nedenler (indirekt ARDS) olarak ikiye ayrılmaktadır ve Tablo 2'de bu nedenlerle ilgili örnekler gösterilmiştir (34).

Tablo 2. ARDS'nin etiyolojik faktörlerine örnekler

Direkt	İndirekt
Aspirasyon	Sepsis
Pnömoni (bakteriyal, viral, fungal)	Yanıklar
Toksik inhalasyon	Akut pankreatit
Pulmoner kontüzyon	Kafa travması
Suda boğulma	Çoklu travma

Direkt nedenli ARDS'de doğrudan bir akciğer hasarı, indirekt nedenli ARDS'de ise sistemik inflamatuvar süreç sonrası oluşan dolaylı bir akciğer hasarı söz konusudur. Sepsis, genel olarak ARDS oluşumunun en önemli nedenlerinden biriyken direkt ARDS nedenlerinin başında mide içeriğinin aspirasyonu yer almaktadır. Ayrıca pnömoni, boğulma, duman inhalasyonu ve akciğer kontüzyonu gibi nedenler de direkt ARDS'ye yol açabilecek nedenlerdir. İndirekt nedenler arasında ise yanıklar, akut pankreatit, kafa travması ve çoklu travma gibi nedenler bulunmaktadır (35). Klinik açıdan, direkt ve indirekt ARDS arasında gözlenen farklılıklar Tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 3. Direkt ve indirekt ARDS arasında farklılık gösteren klinik özellikler (36)

	Direkt	İndirekt
Patoloji	Epitel hasarı daha belirgindir	Endotel hasarı daha belirgindir
	Hyalin membranlar sürekli olmayıp kalın olma eğilimindedir	Hyalin membranlar daha eşit dağılmış ve ince olma eğilimindedir
	Artan fibrin ve kollajen daha belirgin olma eğilimindedir	Artan faktör VIII daha belirgin olma eğilimindedir.
Radyografi	Konsolidasyon, BCO'ya eşdeğer olma eğilimindedir	BCO, konsolidasyondan daha belirgin olma eğilimindedir
	BCO daha yaygın olma eğilimindedir	BCO daha merkezi konumda olma eğilimindedir
	Konsolidasyon daha asimetrik ve düzensiz olma eğilimindedir	Konsolidasyon daha az belirgin olma eğilimindedir
	Opaklıklar, bağımlı olmayan (ventile edilmeyen) akciğer bölgelerinde olma eğilimindedir	Opaklıklar bağımlı (ventile edilen) akciğer bölgelerinde olma eğilimindedir.
Solunum Mekanizmaları	Akciğer elastansı artma eğilimindedir	Akciğer ve göğüs duvarı elastansı artma eğilimindedir
	PEEP'e daha az cevap verme eğilimindedir	PEEP'e daha çok cevap verme eğilimindedir
Terapötik Cevap	Pron pozisyona daha çok cevap verme eğilimindedir	Alveolar yeniden işleve sokma manevralarına daha çok cevap verme eğilimindedir
	Sürfaktan ile daha iyidir	Sürfaktan ile daha kötüdür
Genetik Risk	Artmış RAGE seviyesine sahip olma eğilimindedir	Artmış Angpt-2 ve vWF seviyelerine sahip olma eğilimindedir
	TNF'nin -308A aleli (düşük risk)	TNF'nin TNFB22 aleli (düşük risk)
Klinik Sonuç	Yaşam kalitesinde daha hafif bozukluklar ile ilişkilidir	Yaşam kalitesinde daha ciddi bozukluklar ile ilişkilidir

Kısaltmalar: BCO: Buzlu cam opasiteleri, PEEP: Pozitif ekspirasyon sonu basıncı, RAGE: İleri glikasyon son ürünlerinin reseptörü, Angpt 2: Anjiyopoeitin-2, vWF: von Willebrand faktörü

2.1.4. ARDS patofizyolojisi

ARDS, alveolar-kapiller bariyerde şiddetli inflamatuvar hasar ile karakterize bir hipoksemik solunum yetmezliği şeklidir. Bu hasar, pnömoni veya bronşiyal aspirasyon vakalarında olduğu gibi epitelde (direkt ARDS) veya sepsis vakalarında olduğu gibi endotelde (indirekt ARDS) olabilmektedir (37–39). Son zamanlarda, bu iki etiyoloji arasında moleküler farklılıkları gösteren kanıtlar ortaya çıkmıştır (40). Ayrıca travma (travma ile ilişkili akciğer hasarı) sonrasında ARDS gelişen hastalar, diğer ARDS tiplerine kıyasla farklı klinik özellikler ve biyobelirteç profilleri sergileyebilmektedir (41). ARDS hastaları arasında sadece şiddet ayrımı değil, aynı zamanda travma, transfüzyon, kanser ve septik olaylar gibi farklı ARDS etiyolojileri arasındaki ayrım da önemli görünmektedir. Spesifik olarak bu ayrımları hedef alan yeni tedaviler umut verici sonuçlar ortaya koyabilme potansiyeline sahiptir.

2.1.4.1. ARDS patogenezinin aşamaları

Direkt veya indirekt ARDS, inflamatuvar yanıtla başlayan bir süreçtir. Bu süreçteki akciğer hasarı inflamatuvar aşama (akut, eksudatif), proliferatif aşama ve fibrotik aşama olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır. Histopatolojik dönemler akut akciğer hasarına neden olan faktöre, hastane kaynaklı pnömoninin eklenip eklenmemesine ve uygulanıyorsa ventilatör tedavisinin potansiyel etkilerine göre değişiklik gösterebilmektedir (42,43).

1. İnflamatuvar Aşama: İlk bir hafta içinde gözlenen bu aşama, endotel ve epitelyal bariyerlerin hasarlanması sonucunda lokal ve sistemik sitokin salınımı ile karakterizedir (44). Solunum yetmezliğinin görülmesinden itibaren, ilk iki gün içinde başlayarak bir hafta içinde sonlanan diffüz bir alveolar hasar oluşmaktadır. Alveolar nötrofil infiltrasyonu, makrofaj ve diğer pro-inflamatuvar hücrelerden salınan sitokinlerden

kaynaklanmaktadır (9). Bu süreçte, Tip 1 hücrelerde hasar, sürfaktan hasarı, hyalen membran oluşumu, hemoraji, kapiller konjesyon, intravasküler fibrin oluşumu, trombosit ve mikrotrombüs birikimi, protein birikimi, interstisyel ve alveolar ödem meydana gelmektedir. İnflamatuvar aşama, hasarın derecesiyle yakından ilişkilidir. Bu aşamanın sonunda, Tip 2 epitel hücrelerinde belirgin reaktivite ve hiperplazi gelişmektedir (45–47).

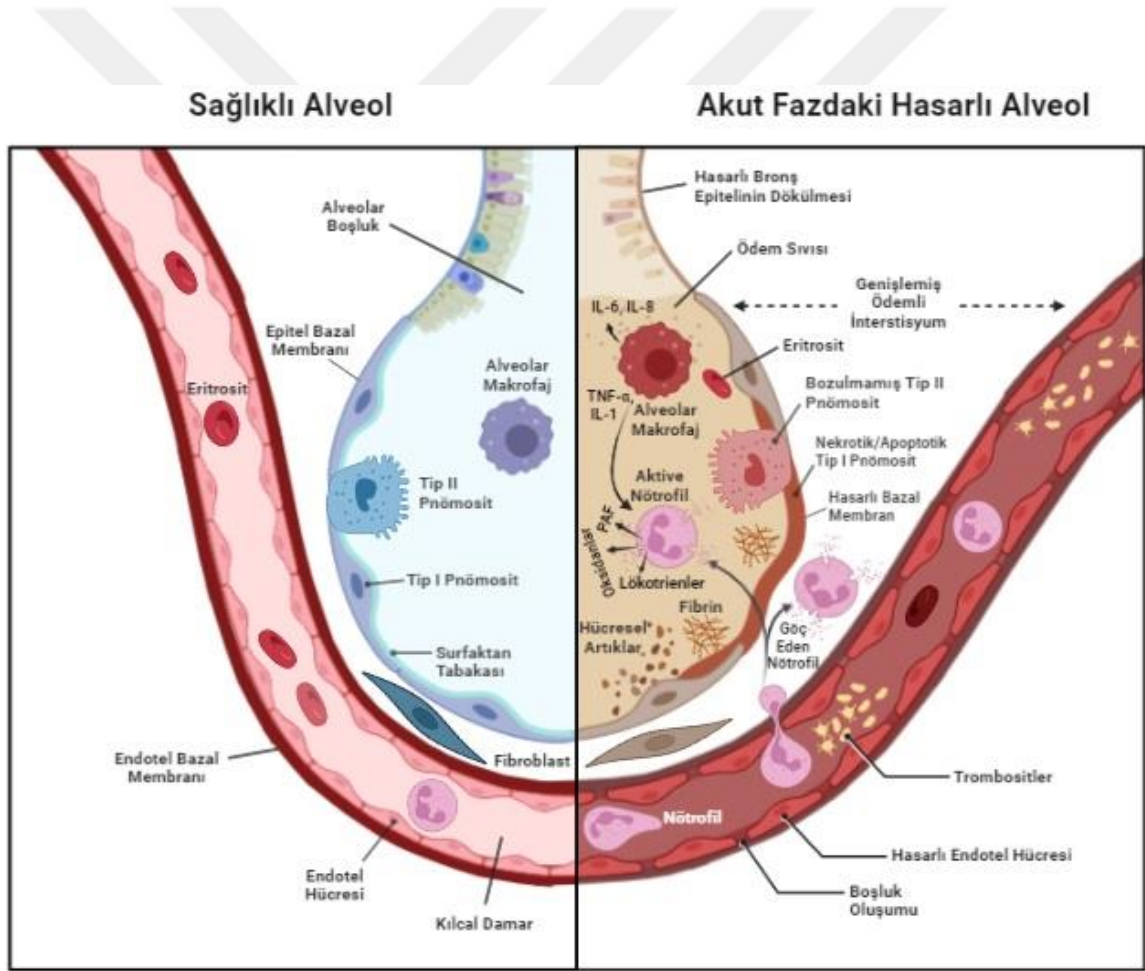
2. Proliferatif Aşama: Tip 2 hücreler tarafından epitelyumun yenilenmesini kapsamaktadır. Tip 2 hücreleri proliferasyona uğrayarak Tip 1 hücrelerine dönüşmektedir (44). Bu aşamada, fibroblastların proliferasyonu, migrasyonu ve eksüdaya geçişi sonucu eksüda granülasyon dokusuna çevrilmiştir. Kollajen birikimi, fibröz doku oluşumu ve vasküler tıkanmalar da alveol duvarında matriks oluşumuna yola açarak alveolar duvarın kalınlaşmasına neden olmakta (9) ve makrofaj-monosit infiltrasyonu sonucu bir hafta içinde başlayan ve iki hafta içinde sonlanan matriks hasarı oluşmaktadır (45,48).

3. Fibrotik Aşama: Tip 1 kollajene çevrilmek üzere, Tip 3 kollajen birikiminin olduğu aşamadır ve hasarın derecesine ve kişiye göre değişik zamanlarda sonlanmaktadır (49). İnterstisyel ve intraalveolar fibroz, matriks metalloproteinazları (MMP) ve jelatinazlarla azaltılmaya çalışılmaktadır. Bu aşamada kist oluşumu, skar ve amfizematöz değişiklikler meydana gelmektedir. Vasküler yapılarda fibroproliferatif ve trombotik değişiklikler gözlenmektedir (9). Akciğer sıvısı veya serumda yüksek prokollajen peptid konsantrasyonları, zayıf prognozla ilişkili olup erken fibroproliferasyonun derecesini belirtmektedir (45–47).

2.1.4.2. ARDS patofizyolojisindeki mediatörler

Doğuştan gelen bağışıklık cevabı, ARDS'nin patofizyolojisinde önemli bir yere sahiptir. Makrofajlar, nötrofiller, epitelyal ve endotelyal hücreleri içeren bağışıklık süreçleri, doku hasarına aracılık etmede rol oynamaktadır. Sitokinler ve diğer pro-inflamatuvar moleküller de bu süreçte yer almaktadır. Bu ajanlar, ARDS'de inflamatuvar cevabı başlatarak devam ettirmektedir. Sitokinler yalnızca inflamatuvar hücrelerden değil aynı zamanda fibroblastlar ve akciğer epitel hücrelerinden de salınabilmektedir.

TNF- α ve interlökin-1 β (IL-1 β); makrofajlar, nötrofiller ve diğer hücre tiplerinde oluşturulan önemli iki sitokindir. ARDS'li hastalarda veya risk altındakilerde TNF- α ve IL-1 β , BAL (bronkoalveolar lavaj) sıvısında tespit edilebilse de, düzeyleri morbidite ve mortalite ile ilişkili değildir. İnterlökin-2 (IL-2), interlökin-4 (IL-4), IL-6 ve interlökin-8 (IL-8) gibi diğer sitokinler de nötrofil kemotaksisini ve vasküler permeabiliteyi artırmakta ve ARDS'deki inflammatuar sürece katkı sağlamaktadır. Bu mediatörlerin ARDS patofizyolojisindeki rolü düşünüldüğünde; TNF, IL-1, IL-6, IL-8 ve diğer proteinler için bir regülatör transkripsiyon faktörü olması nedeniyle, NF- κ B'nin de ARDS patolojisinde önemli bir yere sahip olduğu açıktır. ARDS patofizyolojisindeki alveolar hasarda etkili mediatörler, sağlıklı alveolle karşılaştırmalı olarak Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. ARDS patofizyolojisinde etkili mediatörler

(Bu görsel, BioRender.com tarafından hazırlanan "Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)" şablonundan uyarlanmış (2023) ve "https://app.biorender.com/biorender-templates" internet sitesi üzerinden oluşturulmuştur.)

2.1.4.2.1. Alveolar makrofajlar

Alveolar makrofajlar, havadaki partiküllere ve mikroorganizmalara karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır ve patojenleri algılamak ve fagosite etmek için çeşitli reseptörler ve tanıma mekanizmaları kullanmaktadırlar (50). Akciğer inflamasyonu sırasında, klasik olarak aktive edilmiş makrofajlar (KAM) ve alternatif olarak aktive edilmiş makrofajlar (AAM) olmak üzere iki ana farklılaşma mevcuttur. KAM'lar M1 makrofaj fenotipini göstermektedir ve interferon gama (IFN- γ) tarafından parakrin sinyallemesine yanıt olarak, interferon beta (IFN- β) tarafından ise otokrin sinyallemesine yanıt olarak yüksek düzeyde IL-1 β , TNF- α , interlökin-12 (IL-12) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) gibi proinflamatuvar sitokinler üretmektedir (51,52). AAM'ler ise, M2 makrofaj fenotipini göstermektedir ve IL-4 ve interlökin-13'ten (IL-13) gelen sinyale yanıt olarak anti-inflamatuvar sitokinler olan interlökin-10 (IL-10) ve interlökin-1Ra (IL-1Ra) üretmektedir.

Mekanik ventilasyon altındaki ARDS ve kardiyojenik pulmoner ödemli hastalardan ve ventile edilmemiş sağlıklı gönüllülerden alınan BAL sıvısı karşılaştırmasında; ARDS hastalarından alınan alveolar makrofajların, klasik olarak aktive edilmiş makrofajlara, yani M1 fenotipine meyilli olduğu gösterilmiş ve M1 fenotipi kalıcılığının daha kötü sonuçlarla ilişkili olduğu belirtilmiştir (53).

2.1.4.2.2. Nötrofiller

Nötrofiller; aktive makrofajlar, pulmoner epitelyal ve endotelyal hücreler tarafından salınan kemotaktik faktörlere yanıt olarak inflamasyon bölgesine toplanan ilk lökositlerdir (54). ARDS'li hastaların BAL sıvısındaki nötrofil konsantrasyonunun, hastalık şiddeti ve kötü sonuç ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (55). Ayrıca nötrofillerin endotelyal-epitelyal bariyer bozulmasında rol oynadığı da öne sürülmüştür (56). Öte yandan, nötropenik hastalarda da ARDS gelişebilmektedir (57) ve bu da, ARDS'nin nötrofil bağımlı ve nötrofilden bağımsız süreçleri içerebildiğini göstermektedir. CXCL8 olarak da bilinen kemokin IL-8'in ARDS'de akciğere nötrofil toplanmasında merkezi rol oynadığı

düşünülmektedir (58). Pulmoner ödem aspiratları ve BAL sıvısından oluşan ARDS örneklerinde; artmış IL-8 konsantrasyonları, hastalık şiddeti (59) ve hava boşluklarına nötrofil göçü (60) arasında önemli korelasyonlar tespit edilmiştir. IL-8, ARDS hastalarından alınan BAL sıvısındaki en güçlü nötrofil kemoatraktanı olarak kabul edilmiştir ve LPS ile uyarılan insan alveolar makrofajlarından salınan baskın nötrofilik kemokindir (61). Sadece izole IL-8 değil, kompleksleri de ARDS patofizyolojisi ile ilişkilidir. IL-8 immün kompleksleri, IL-8'in endojen immünoglobulin G'ye (IgG), esas olarak da IgG3 ve IgG4 alt sınıflarına bağlanmasıyla karakterizedir. ARDS'li hastalarda ve ARDS geliştirme riski taşıyanlarda yüksek IL-8 immün kompleks seviyeleri kötü klinik sonuçla ilişkilendirilmiştir (62). Olası bir mekanizma, Bcl-xL ekspresyonundaki artış ve Bak ve Bax'taki azalma ile ilişkili nötrofil apoptozundaki düşüştür (63). Bu doğrultuda, ARDS'li hastalarda nötrofil apoptozunun geciktiği bilinmektedir (64), bu da proteinaz-3, katepsin-G ve matriks metalloproteinaz gibi nötrofil ürünlerinin salınmasıyla, doku hasarının devam etmesini açıklayabilmektedir. Nötrofil etkisinin bir başka mekanizması, NETosis olarak bilinen hücre ölümü sürecinde, nötrofil hücre dışı tuzaklarının (NET) salınmasıdır (65). NET oluşumu; nükleer membranın parçalanmasını, kromatin yoğunlaşmasını ve DNA ile granül proteinlerinin hücre dışı boşluğa salınmasını kapsamaktadır (66). NET'ler güçlü antimikrobiyal özelliklere sahip olsalar da, konak hücreler için doğrudan toksik olan histon, enzim ve peptidler içermektedir ve hastalardaki steril transfüzyonla ilişkili akut akciğer hasarında (TRALI) da gözlenmiştir (67).

2.1.4.2.3. Alveolar epitel

Epitel hasarı; alveolar ödeme (68), alveolar boşluktan bu ödem sıvısının atılımının azalmasına (69), sürfaktan üretiminin ve döngüsünün azalmasına (70) ve fibroze (71) yol açmaktadır. İki farklı hasta grubuyla yapılan bir çalışma (40), direkt ARDS'nin indirekt ARDS ile karşılaştırıldığında daha şiddetli akciğer epitel hasarı ile karakterize olduğunu ve bunun tersine, indirekt ARDS'nin ise daha şiddetli endotel hasarı ve inflamasyon ile karakterize olduğunu ortaya koymuştur.

Sümfaktan proteini-D (SP-D), IL-6, IL-8, anjiyopoietin-2 (Angpt-2), ileri glikasyon son ürünlerinin reseptörü (RAGE) ve von Willebrand faktörü (vWF) gibi analiz edilen çok çeşitli plazma biyobelirteçleri ve bunların ilgili prognostik değerleri arasında SP-D, direkt akciğer hasarının en güvenilir moleküler göstergesi olmuştur. Tip 2 epitel ve klara hücreleri tarafından üretilen SP-D, gram pozitif ve gram negatif bakterileri kapsayan mikroorganizmaların yüzeyindeki karbonhidrat tanıma bölgesi (CRD) aracılığıyla glikokonjugatlar ve lipidlerle etkileşime giren büyük bir hidrofilik proteindir (72). Bu protein, bakterilerin aglütinasyonuna neden olabilmekte, konakçı hücrelere girişini ve yayılmasını engelleyebilmekte ve bakteri hücre duvarı geçirgenliğini ve fagositik hücreler tarafından opsonizasyonunu artırarak bakteri ölümüne yol açabilmektedir (73).

2.1.4.2.4. Alveolar endotel

Vasküler endotel, damardan alveollere geçen sıvı veya inflamatuvar hücrelerin karşılaştığı ilk bariyerdir. Endotelyal bariyer, vasküler ve interstisyel boşlukların uygun şekilde bölümlere ayrılmasını sağlarken aynı zamanda küçük moleküllerin difüzyonuna ve makromoleküller ile bağışıklık hücrelerinin ise kontrollü alışverişine izin verecek şekilde sıkı düzenlenmiştir (74). Endotelyal bariyer bütünlüğünün bozulması, damar sisteminden hava boşluğuna aşırı sıvı ve protein sızıntısı ile sonuçlanmaktadır. Nötrofillerin akciğerin mikro dolaşımında birikerek aktive olup, daha sonra degranüle olarak reaktif oksijen türleri (ROS), proteazlar, proinflamatuvar sitokinler ve prokoagülan moleküller dahil olmak üzere çeşitli toksik mediatörlerin salınımına neden olduğu bir aktivitenin sonucu olarak, bu bariyer bütünlüğü kaybı meydana gelmektedir. Nötrofiller tarafından yapılan bu hasar, fokal adezyonları, transmembran integrinleri ve endotel hücrelerinin hücre iskeletini değiştirerek vasküler geçirgenliği artırmaktadır. Diğer inflamatuvar mediatörler de akciğer kılcal damarları üzerinde etki ederek, lökosit adezyonu için önemli olan kemokinlerin ve hücre yüzeyi moleküllerinin ekspresyonunun artmasına neden olabilmektedir (75,76). Ayrıca, endotelyal bariyerin hasarına, aktive edilmiş lökositlerin etkilerinden bağımsız olarak bakteriyel veya viral faktörler de aracılık edebilmektedir. Örneğin, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* tarafından üretilen toksinler, epitelial bariyerin yanı sıra endotelyal bariyeri de yıkmaktadır (77,78).

ARDS patofizyolojisinde NF-κB yolundaki inflamatuvar mediatörlerler dışında anjiyopietin reseptörü olan spesifik transmembran tirozin kinazlar da (Tie-2) önemli bir rol oynamaktadır. Nanomolar afiniteye sahip Angiopoietin 1 (Angpt-1) ve Angiopoietin 2 (Angpt-2) ligandları, endotel hücre fonksiyonu üzerinde zıt etkilere sahip olabilmektedir. Angpt-1 büyük ölçüde periendotelial hücreler ve trombositler tarafından sentezlenip salgılanırken, Angpt-2 endotelde sentezlenmektedir ve Weibel-Palade cisimcikleri adı verilen granüllerde hızlı salınım için depolanmaktadır (79). Angpt-1'in N-terminal bölgesi, hücre dışı matrisle lokal yapışmayı destekleyebildiğinden (80) dolaşımda düşük seviyelerine rağmen yüksek doku konsantrasyonuna erişebilmektedir. Sepsis, ARDS ve ilgili durumlarda, dolaşımdaki Angpt-1 baskılanmış görünmektedir (81) ve sepsis veya ARDS durumunda Angpt-1, dolaşımdaki Angpt-2'nin 5 ila 20 kat artışıyla karşılaştırıldığında, iki ila üç kat düşmektedir. Dolaşımdaki Angpt-2 konsantrasyonları, Angpt-1'den çok daha geniş dinamik bir aralığa sahiptir. Parikh ve arkadaşları, komplike olmayan sepsisli hastalar ve hastanede yatan sağlıklı deneklerle karşılaştırıldığında, yoğun bakım ünitesine kabul sırasında şiddetli sepsisi olan hastaların dolaşımındaki Angpt-2 düzeylerinde 10 ila 20 kat artış bildirmiştir. Ayrıca şiddetli sepsisi olan hastaların komplike olmayan sepsisi olanlara göre daha yüksek Angpt-2 pik konsantrasyonları geliştirdiğini ve bozulmuş akciğer gaz alışverişi olan bireylerin normal gaz değişimi olanlardan daha yüksek Angpt-2 değerlerine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir (82). Tek merkezli ve çok merkezli kohort çalışmalarında Angpt-2, indirekt ARDS'nin sağlam bir göstergesi olmuştur (40). Enfeksiyon şüphesi olan 270 yetişkinin acil servis temelli bir çalışmasında, hastaneye yatışın ilk saatinde ölçülen dolaşımdaki Angpt-2'nin yatan hasta ölümünü öngördüğü tespit edilmiştir (83). Hoeboer ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise, birkaç ilgili biyobelirteçle karşılaştırıldığında Angpt-2'nin, altta yatan risk faktöründen bağımsız olarak ateşli kritik hastalarda geç başlangıçlı ARDS'nin ciddiyetini öngörme, seyrini izleme ve sonuçlarını tahmin etme yeteneğine sahip bir biyobelirteç olduğu belirtilmiştir (84).

2.1.5. ARDS tedavisi

ARDS'de temel tedavi; primer nedenin tedavisi, yeterli oksijenasyonun sağlanması, metabolik destek, komplikasyonların önlenmesi ve komplikasyonların tedavisinden

oluşmaktadır. Mekanik ventilasyon ana terapötik yöntem olsa da farmakot tedavi yaklaşımları da giderek artmaktadır. Bu yaklaşımlar arasında; anti-inflamatuvar ajanlar, kortikosteroidler, araşidonik asit metabolizması inhibitörleri, beta-2 agonistler, antioksidanlar, mezenşimal kök hücreler, eksojen sürfaktan, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) gibi ajanlarla yapılan tedaviler yer almaktadır. Bu tedavilerin deneysel araştırmalardaki sonuçları ile insandaki etkileri arasında farklılıklar bulunmaktadır (43,85,86).

ARDS tedavisi için çalışılan ajanlardan olan nanopeptid AP301, pulmoner epitelyal (ENaC) ve endotelyal sodyum kanallarını aktive ederek alveolar sıvı klirensini artırmaktadır (87). AP301'in faydalı etkisi, hayvan pulmoner ödem modellerinde gösterilmiştir (88). ARDS'nin altında yatan patofizyolojik süreci doğrudan hedefleyen SB-681323 isimli ajan ise, selektif P38 alfa inhibitörüdür ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yoluyla etkileşerek inflamatuvar cevabı baskılamaktadır. İnterferon beta-1a ise endotelyal bariyer fonksiyonundan sorumludur ve CD73 upregülasyonunu sağlayarak ARDS'de önemli rol oynayan vasküler sızıntıyı önlemektedir (89). FG-4497, hipoksi ile indüklenebilir faktör-2 alfa (HIF-2 α) sinyallemesini aktive ederek VE-kadherin fosforilasyonunu azaltan ve böylece hücre bağlantı bütünlüğünü destekleyen yeni bir moleküldür. FG-4497, ARDS gibi akciğer hastalıklarında endotel hücre onarımını hedefleyen yeni bir farmakolojik seçenektir (90).

2.2. ARDS Deney Modelleri

2.2.1. Direkt yöntemler

2.2.1.1. İntratrakeal LPS

LPS, gram negatif bakterilerin dış membranında bulunan bir glikolipittir ve içeriğinde bulunan lipid A, LPS'nin biyolojik etkilerinin büyük kısmından sorumludur. İmmün sistemin potent bir aktivatörü olan LPS, gram negatif bakteriyel sepsisin önemli bir mediyatörüdür ve sistemik LPS uygulaması, bakteriyel sepsis modeli oluşturmadaki ilk yaklaşımlardan biridir (91–93). Makrofajlardan TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi inflamatuvar

sitokinlerin salınımını indükleyen LPS, septik şok ve çeşitli inflamatuvar hastalıkların patogenezinde önemli rol oynamaktadır (94,95).

LPS, hayvanlarda sistemik bir inflamatuvar yanıtı uyarmak için i.p. veya intravenöz (i.v.)/damar içi olarak verilebilmekte ve böylece sepsis modellenenmektedir. İntraperitoneal LPS uygulaması sistemik inflamasyon aracılığıyla hafif bir akciğer hasarına sebep olurken, LPS'nin intratrakeal verilmesi akciğere akut inflamatuvar hücre akışına ve direkt hasara yol açmaktadır. İntratrakeal LPS uygulaması ile murin ARDS modeli oluşturulmuş bir çalışmada, LPS sonrası belirgin bir nötrofilik inflamasyon, akciğer doku hasarı belirtileri ve alveollere protein ekstravazasyonu gözlenmiştir (96). Uygulanacak LPS dozu, LPS'nin tipine bağlı olduğu kadar hayvanın türüne göre de değişiklik göstermektedir. Örneğin düşük doz LPS uygulaması; kedi, koyun ve domuzlarda pulmoner inflamasyona neden olurken, köpekler ve rodentlerde bu etki oluşmamaktadır (97).

2.2.1.2. Asit aspirasyonu

Mide içeriğinin aspirasyonu ARDS için önemli bir risk faktörüdür ve aside bağlı akciğer hasarı modellerinde de mide suyu aspirasyonunun klinik durumu taklit edilmeye çalışılır. Bu modelde genellikle deney hayvanlarının solunum yollarına, 1-2 arası pH değerinde 1-4 mL/kg HCl damlatılmaktadır (98). Bu uygulama sonucunda nötrofil bağımlı akut akciğer hasarı oluşmaktadır ve bu hasar fizyolojik açıdan akciğer hacminde azalmaya, histolojik açıdan ise alveolar epitel ve endotelde hasar, akut nötrofilik inflamasyon, intra-alveolar ve interstisyel ödem, nekroz ve hemorajiye sebep olmaktadır.

2.2.1.3. Mekanik ventilasyon

Hayvanlarda pulmoner inflamasyona ve akciğer hasarına neden olabilen mekanik ventilasyon, insanlardaki ventilatör ile indüklenen akciğer hasarı ile ilişkilidir (92,99,100). Bu modelin ana avantajı, klinikle ilişkili olması ve klinik uygulamada değişiklik yapma

fırsatı sağlamasıyken, dezavantajı ise modelin karmaşıklığıdır (92). Ayrıca bu modelde daha ciddi yaralanma elde etmek için daha yüksek tidal hacimler kullanılmalıdır (99–101).

2.2.1.4. Sürfaktan deplesyonu (salin lavajı)

Protein ve fosfolipid karışımından oluşan ve alveol yüzey sıvısının önemli bir komponentini oluşturan sürfaktan, alveolar tip 2 hücrelerince sentezlenerek salgılanmaktadır ve akciğerin normal fonksiyonu için gerekli bir faktördür (102). Sürfaktan, yüzey gerilimini düşürmekte ve düşük akciğer volümünde alveolar alanların kollabe olmasını önlemektedir. Sürfaktanı stabilize eden sürfaktan proteinleri aynı zamanda akciğerlerdeki immün savunmayı da modüle etmektedir.

Salin lavaj (% 0.9 NaCl) uygulaması ile sürfaktanın tüketilmesine dayanan bu ARDS modelinde tekrarlanan salin lavajı, alveolar yüzey sıvısındaki sürfaktan lipid konsantrasyonunu azaltarak alveolar yüzey gerilimini değiştirmektedir. Sürfaktandaki bu azalma daha sonra alveolar kollapsa ve alveolar konak savunmasının bozulmasına yol açmaktadır (92,103).

2.2.1.5. Akciğer iskemi/reperfüzyonu

Akciğer iskemi/reperfüzyon (I/R) modeli; pulmoner arter veya hilumun klemplenmesiyle gerçekleştirilmektedir (104) ve pulmoner vasküler permeabilitede artış, ödem oluşumu, oksidatif stres, hemoraji, polimorfonükleer lökosit (PMN) infiltrasyonu ve bozulmuş gaz alışverişi sonucunda endotel ve epitel yapının hasarlanması ile karakterizedir. Reperfüzyon esnasında akciğerlerde doğal immün hücreler hızla aktive olmaktadır ve bir akciğerde I/R hasarı oluşturulduğunda diğer akciğerde de inflamatuvar yanıt gözlenmektedir (105).

2.2.2. İndirekt yöntemler

2.2.2.1. Akciğer dışı İ/R

Bu modelle oluşturulan akciğer hasarı; iskemiye uğratılan alan, bu alanın büyüklüğü ve İ/R'nin süresi ile ilişkilidir. Akciğer dışı İ/R modeli, superior mezenterik arter veya supraçölyak aort klemplenecek, ameliyatsız olarak ise ekstremitelere turnike uygulanarak gerçekleştirilebilmektedir (92). Bu modelin oluşturulması için genel olarak mezenter arter kullanılmaktadır (106,107).

2.2.2.2. İntravenöz LPS

LPS'nin i.v. uygulamasını takiben kapiller endotel, hasar alan ilk bölgedir. LPS ile indüklenen hücresel hasar apoptoz ile ilişkilidir ve endotel hücrelerinin apoptozu, LPS uygulamasından sonra hızla gelişmektedir (108,109). İntravenöz LPS'ye hemodinamik yanıt; lökopeninin başlangıç fazı, azalmış kalp debisi ve arter basıncında düşüş ile karakterizedir. Pulmoner arter basıncı, esas olarak postkapiller venlerin direncindeki artışa bağlı olarak artmaktadır (110). Bu ilk aşamayı lökosit sayılarındaki yavaş iyileşme izlemektedir. Alveolar-arteriyel oksijen farkının arttığı bir hipoksemiye içeren akciğer değişiklikleri 2-4 saat içinde belirgin hale gelmektedir. Akciğerlerde i.v. LPS uygulamasıyla PMN deformabilitesinde değişiklikler ve PMN'nin pulmoner kapillerde tutulması meydana gelmektedir (111).

2.2.2.3. Çekal bağlama delme (ÇBD)

ÇBD, en çok kullanılan sepsis modellerinden biridir. Diğer modellerle karşılaştırıldığında ÇBD, insanlarda görülen sepsisin karmaşık mekanizmasını daha iyi temsil etmektedir (93,112,113) ve birçok araştırmacı tarafından insan sepsisinin tedavisi için

önemli bir pre-klinik test olarak kabul edilmektedir (112,114). Dejager ve ark. bu yöntemin avantajlarını ve popülerlik nedenini; basit bir prosedür olması, bu yöntemde patojenin konağın içinden köken alması ve bu sayede insanlarda peritonite yol açan travmatik yaralanmayı taklit etmesi, polimikrobiyal ortam ve periferde salınan bakteriyel ürünlerin septisemiye yol açması şeklinde belirtmişlerdir (112).

2.2.2.4. Oleik asit

Oleik asit, akciğer hasarının bir başka modelidir. Bu model, daha çok uzun kemik kırıkları veya majör travmalar sonucu görülen lipid embolisinin taklit edilebilmesi için geliştirilmiştir. İntravenöz uygulamadan sonra 1 dakika içinde endotel hasarı başlamaktadır (92) ve oleik asit doğrudan endotel toksisitesine neden olmaktadır (115).

2.2.2.5. İntraperitoneal (ANTU)

Rodentisit olarak geliştirilmiş bir kimyasal ajan olan ANTU'nun (alfa-naftiltiyöüre) i.p. uygulaması da hayvanlarda akut pulmoner vasküler hasar ile karakterize indirekt bir akciğer hasarı modeli yaklaşımıdır (93,116–119). Elektron ve ışık mikroskopunda yapılan morfolojik çalışmalar, ANTU'nun akciğer hasar mekanizmasındaki hedef yapısının kapiller endotel hücreler olduğunu ortaya koymuştur (120–126).

Endotel hücre hasarı nedeniyle endotel bariyer fonksiyonu ortadan kalkarak kapiller geçirgenlik artmakta ve bunu takiben interstisyel ve alveolar ödem gelişmektedir. Meydana gelen bu ödem ise ilerleyerek hayvanın ölümüne sebep olmakta veya bir-iki gün içinde tamamen yok olmaktadır. ANTU'nun yarattığı akciğer ödeminin, hava yolu ve pulmoner vasküler yatak kökenli bazı vazoaaktif maddelerle veya doğrudan hasar mekanizması sonrası bu maddelerin oluşması ile meydana gelmesi mümkün gözükse de kesin etki mekanizması bilinmemektedir. 1980'de yayımlanan bir çalışmada, ANTU'nun pulmoner toksisitesinin kısmen de olsa, sitokrom P-450 monooksijenaz katalizli bir metabolitinin pulmoner makromoleküllere kovalent bağlanmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (127).

ANTU aracılı akciğer ödeminde, L-arginin-nitrik oksit (NO) yolunun rolü ile ilgili laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada, NO sentaz inhibitörü olan NG-nitro-L-arginin metil esterinin (L-NAME) ANTU öncesi uygulanmasının, doza bağlı bir şekilde plevral efüzyon (PE) ve akciğer ağırlığı/vücut ağırlığı (AA/VA) oranında önemli bir inhibisyon sağladığı gösterilmiştir (121). Benzer şekilde, ANTU uygulaması sonrası oluşan akciğer hasarında endotelin peptidlerinin de önemli bir role sahip olduğu (120) ve anjiyotensin sistemi üzerinde de etkiye sahip olan ANTU'nun anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) aktivitesinde önemli bir düşüşe neden olarak, anjiyotensin I'in anjiyotensin II'ye dönüşümünü azalttığı ve bu azalmanın derecesinin ANTU dozu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (128,129).

Anestezik maddelerin anestezik özelliklerinin yanı sıra, akciğerdeki inflamatuvar yanıtları da modüle edebildiği görülmüştür. Bu konuda laboratuvarımızda yapılmış bir çalışmada, ANTU öncesi morfin uygulamasının, ANTU'nun neden olduğu pulmoner inflamatuvar reaksiyon üzerinde önleyici bir etkiye sahip olduğu ve bu etkiye periferik opioid reseptörlerinin aracılık ettiği belirtilmiştir (123). Benzer şekilde ANTU öncesi üretan, tiyopental ve pentobarbital sodyum uygulamasının da, sıçanlarda ANTU'nun neden olduğu akciğer hasarı üzerinde profilaktik bir etki gösterdiği tespit edilmiştir (124).

Sonuç olarak, doza ve zamana bağlı olarak akut akciğer hasarı oluşturan ANTU, hayvanlara (çoğunlukla sıçan ve fareler) i.p. olarak verildiğinde, 4 saat içinde maksimum seviyeye ulaşan pulmoner ödem ve plevral efüzyon ile karakterize ARDS modeli oluşturulabilmektedir.

2.3. Endojen Antioksidan Sistemler

Moleküler oksijenin suya dönüşümündeki redoks reaksiyonu sırasında üretilen ara ürünlere serbest oksijen radikalleri adı verilmektedir. İskemiye uğramış bir dokuya reperfüzyon sonrası oksijen iletimi, serbest oksijen radikallerinin (SOR) oluşmasına neden olmaktadır. Dış yörüngesinde çiftlenmemiş elektrona sahip kimyasallardan oluşan bu serbest radikaller, fizyolojik koşullarda endojen antioksidan sistemler tarafından elimine edilmektedir ancak reperfüzyonla aşırı miktarda SOR oluşması, oksidatif stresi meydana getirmekte ve ilgili dokuda bir hasar süreci başlatmaktadır (130).

Endojen antioksidanlar arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon vb. yer alırken, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) ise oksidan sisteme ait bir göstergedir. Hücre içi en etkili antioksidan enzimler arasında yer alan SOD, süperoksit anyon radikalini (O_2^-) daha az reaktif bir tür olan hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürmektedir. Bu enzim, geçiş metallere oksidasyon ve redüksiyonunu sağlayıp yüksek bir hızda süperoksit radikalini yok etmektedir (131). Riaz ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, intestinal İ/R uygulanmış sıçanlarda, serbest oksijen radikallerinin lökosit yuvarlanmasını ve adezyonunu tetiklediği, SOD uygulamasının ise lökositlerin bu cevabını azalttığı ve bu sayede de oksidatif stresi düşürdüğü gösterilmiştir (132). Sıçanlarda, mezenter İ/R ile indüklenen akut akciğer hasarının oluşturulduğu laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada ise, İ/R grubunun ileum MDA düzeyleri ve serum TNF- α , IL-6, IL-1 β düzeyleri ile total antioksidan kapasitenin kontrol grubuna göre yüksek olduğu bulunmuştur (133).

Hücre içindeki peroksizomlarda lokalize olan katalaz, hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlamaktadır. Bir katalaz molekülü, bir dakikada yaklaşık olarak 6 milyon hidrojen peroksit molekülünü su ve oksijene dönüştürebilme kapasitesine sahiptir (134). Sitoplazma, mitokondri ve çekirdekte yüksek miktarda ve çözünür halde bulunan glutatyon ise indirgenmiş formunda GSH, okside formunda ise glutatyon disülfid (GSSG) olarak adlandırılmaktadır. Glutatyon oksidatif strese karşı koruyucu rolünü; plazma membranından aminoasit taşınmasına katılarak, oksidatif strese karşı detoksifikasyon yapan enzimlerin kofaktörü olarak görev yaparak, vitamin C ve E'nin aktif formlarına dönüşümünü sağlayarak göstermektedir (134).

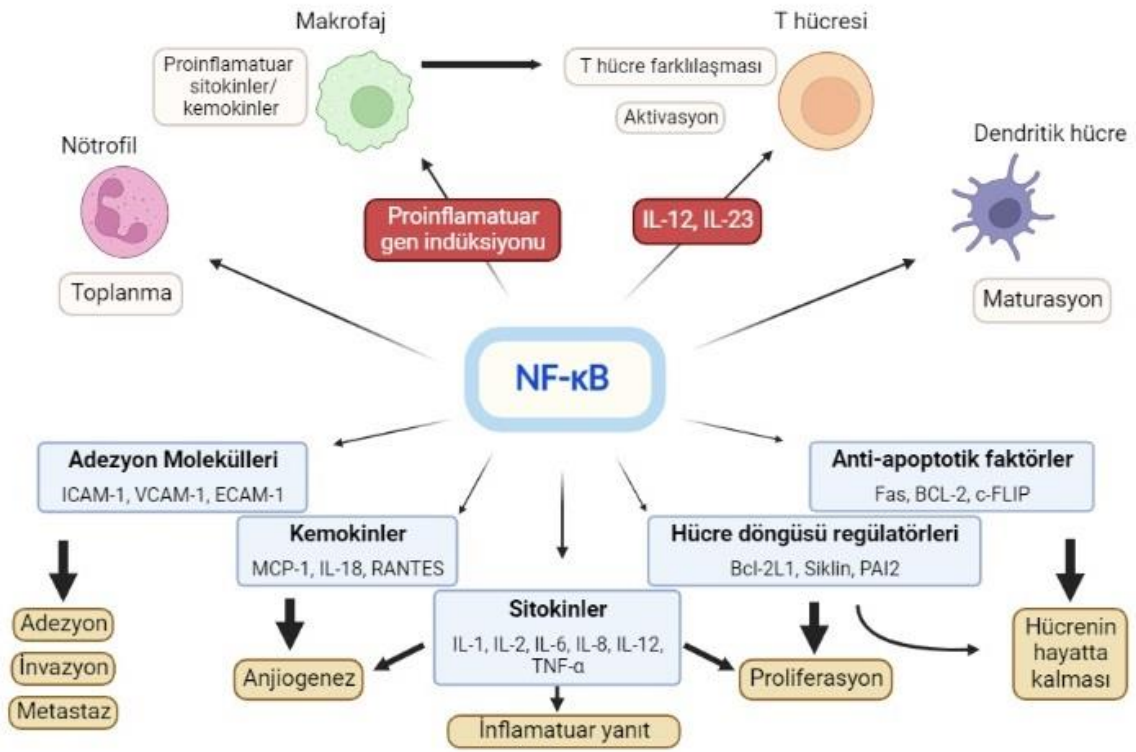
2.4. NF- κ B

NF- κ B, immün ve inflamatuvar yanıtların farklı süreçlerinde görevli bir dizi geni düzenleyen indüklenbilir transkripsiyon faktörleri ailesini kapsamaktadır (135). Sitoplazma içinde inaktif halde bulunmakta, aktive olduğunda çekirdeğe taşınmaktadır. Doğuştan gelen bağışıklık hücrelerindeki çeşitli proinflamatuvar genlerin indüklenmesine aracılık etmenin yanı sıra NF- κ B, T hücrelerinin aktivasyonu, farklılaşması ve fonksiyonunu da

düzenlemektedir (136,137). Ayrıca NF- κ B'nin inflamazomların aktivasyonunu kontrol etmede de rolü olduğu gösterilmiştir (138).

İnflamasyon, konakçının enfeksiyon ve doku hasarına karşı verdiği koruyucu yanıt olarak tanımlanmakta ve vazodilatasyon, bağışıklık hücreleri ile plazma proteinlerinin hasar bölgesine toplanması gibi bir dizi reaksiyonla karakterize edilmektedir (139). Normal koşullarda inflamasyon, konakçı için faydalıdır ancak düzensiz inflamatuvar yanıtlar, akut veya kronik inflamatuvar hastalıkların gelişimine ve uzun süren doku hasarlarına neden olabilmektedir. Proinflamatuvar gen indüksiyonunu ve doğal ve edinilmiş bağışıklık hücrelerinin fonksiyonunu düzenleyebilen NF- κ B'nin aktivasyonundaki bir düzensizlik, kronik inflamatuvar hastalıkların ayırt edici özelliğidir. Bununla uyumlu olarak NF- κ B; romatoid artrit (RA), tip I diyabet, inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH), sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi çeşitli inflamatuvar hastalıkların patogenezinde yer almaktadır (140). Bu nedenle bu transkripsiyon faktörünün aktivasyonu ve proinflamatuvar fonksiyonu, inflamatuvar hastalıkların tedavisindeki stratejiler için büyük önem taşımaktadır.

Farklı tipteki immün hücrelerde proinflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve diğer inflamatuvar mediatörlerin transkripsiyonel indüksiyonundan sorumlu olan NF- κ B'nin çeşitli süreçlerdeki rolü Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. NF-κB'nin çeşitli süreçlerdeki rolü

(Bu görsel, "https://app.biorender.com" internet sitesi üzerinden oluşturulmuştur.)

2.5. Apoptoz

Apoptoz terimi ilk kez 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından hücre ölümünün morfolojik olarak farklı bir biçimini tanımlamak için kullanılmıştır (141–143). Gelişme ve yaşlanma sırasında meydana gelen ve dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma olan apoptoz, ayrıca bağışıklık reaksiyonlarında ve hücreler hastalık veya zararlı ajanlar tarafından hasar gördüğünde bir savunma mekanizması olarak da ortaya çıkabilmektedir (144). Apoptozu tetikleyebilen hem fizyolojik hem de patolojik çok çeşitli uyarın ve koşullar olmasına rağmen, tüm hücreler aynı uyarana yanıt olarak ölmemektedir. Kanser kemoterapisi için kullanılan ilaçlar, bazı hücrelerde DNA hasarına neden olmaktadır ve bu da p53'e bağlı bir yoldan apoptotik ölüme yol açabilmektedir. Kortikosteroidler gibi bazı hormonlar ise bazı hücrelerde (örneğin timositler) apoptotik ölüme yol açabilirken diğer hücreler etkilenmemekte hatta stimüle edilmektedir. Apoptoz,

“kaspazlar” olarak adlandırılan bir grup sistein proteazın aktivasyonunu ve bir dizi karmaşık olayı içeren koordineli ve genellikle enerji bağımlı bir süreçtir.

2.5.1. Ekstrinsik yol

Apoptozu başlatan ekstrinsik sinyal yolları, transmembran reseptör aracılı etkileşimleri içermektedir. Bunlar, TNF reseptör gen süper ailesinin üyeleri olan ölüm reseptörlerini kapsamaktadır (145). TNF reseptör ailesinin üyeleri, sisteinden zengin benzer hücre dışı bölgeleri paylaşmaktadır ve “ölüm bölgesi (death domain)” olarak adlandırılan yaklaşık 80 amino asitlik bir sitoplazmik alana sahiptir (146). Bu ölüm bölgesi, ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yollarına iletilmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Bugüne kadar, en iyi karakterize edilmiş ligandlar ve karşılık gelen ölüm reseptörleri, FasL/FasR, TNF- α /TNF reseptörü-1 (TNFR-1), Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5'tir (146–150).

Apoptozun ekstrinsik yolunu tanımlayan olaylar dizisi en iyi şekilde FasL/FasR ve TNF- α /TNFR-1 modelleri ile karakterize edilmektedir. Fas ligandının Fas reseptörüne bağlanması, adaptör protein FADD'nin (Fas associated death domain) bağlanmasıyla ve TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanması, adaptör protein TRADD'nin (TNFR-1 associated death domain) bağlanmasıyla sonuçlanmaktadır (151,152). FADD daha sonra ölüm efektör bölgesinin dimerizasyonu yoluyla prokaspaz-8 ile etkileşmektedir. Bu noktada, prokaspaz-8'in oto-katalitik aktivasyonu ile sonuçlanan, ölüm indükleyici sinyalleşme kompleksi (DISC) oluşmaktadır (153). Aktive edilmiş kaspaz-8, kaspaz-3 gibi uygulayıcı kaspazları aktive ederek apoptozu başlatmaktadır (Şekil 3).

2.5.2. İntrinsik yol

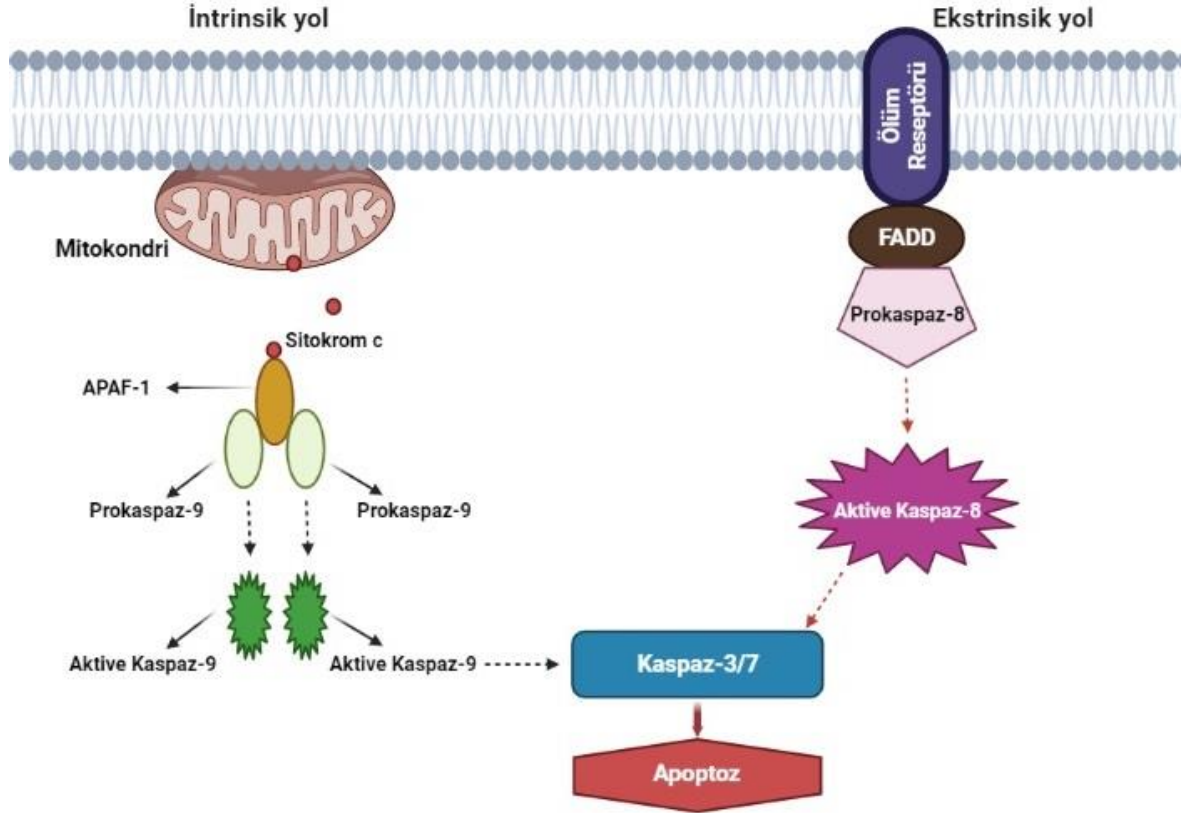
Hücre içi ATP üretiminden sorumlu olan mitokondri, iç ve dış olmak üzere iki zara ve hücre zarında olduğu gibi bir zar potansiyeline sahiptir. Hücre içi ve dışı yollarla gelen ölüm sinyalleri bu organelde birleşmektedir. İntrinsik yolu başlatan uyarılar, pozitif veya

negatif hareket edebilen hücre içi sinyaller üretmektedir. Negatif sinyaller, programlanmış ölümün baskılanmasının başarısız olmasına ve dolayısıyla apoptozun tetiklenmesine neden olmaktadır. Bir başka ifadeyle, apoptotik baskılamanın inhibisyonu ve dolayısıyla da apoptoz aktivasyonu meydana gelmektedir. Negatif sinyaller belirli büyüme faktörlerinin, hormonların ve sitokinlerin yokluğunu içermekte iken pozitif hareket eden uyaranlar radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar, serbest radikalleri vs. kapsamaktadır. Tüm bu uyaranlar iç mitokondriyal zar da değişikliklere neden olmaktadır ve bu da mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneginin (MPT) açılması, mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybı ve pro-apoptotik proteinlerin iki ana grubunun sitozole salınmasıyla sonuçlanmaktadır (154). İlk grup; sitokrom c, SMAC/DIABLO (kaspazın ikincil mitokondriyal aktivatörü/düşük pI'li direkt IAP bağlayıcı protein) ve serin proteaz HtrA2/Omi'den oluşmaktadır (155,156). Bu proteinler kaspaz bağımlı mitokondriyal yolu aktive etmektedir. Sitokrom c, apoptotik proteaz aktive eden faktör (APAF-1) ve prokaspaz-9'u bağlayıp aktive ederek bir "apoptozom" oluşturmaktadır. Prokaspaz-9'un bu şekilde kümelenmesi de kaspaz-9 aktivasyonuna yol açmaktadır (157,158). Ardından kaspaz-3/7 aracılığıyla apoptoz başlamaktadır (Şekil 3).

Proapoptotik proteinlerin ikinci grubu, AIF, endonükleaz G ve CAD, apoptoz sırasında mitokondriden salınmaktadır, ancak bu hücre ölümüne karar verildikten sonra meydana gelen geç bir olaydır. AIF, çekirdeğe geçerek DNA'nın bölünmesine ve periferik nükleer kromatinin yoğunlaşmasına neden olmaktadır (159). Endonükleaz G de oligonükleozomal DNA fragmanları üretmek için nükleer kromatini parçaladığı çekirdeğe geçmektedir (160). AIF ve endonükleaz G'nin her ikisi de kaspazdan bağımsız bir şekilde işlev görmektedir. CAD (kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz) daha sonra mitokondriden salınarak çekirdeğe geçmektedir ve burada kaspaz-3 tarafından aktive edildikten sonra, oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna ve daha belirgin ve ileri bir kromatin yoğunlaşmasına yol açmaktadır (161).

Bu apoptotik mitokondriyal olayların kontrolü ve düzenlenmesi, Bcl-2 protein ailesinin üyeleri aracılığıyla gerçekleşmektedir (162). Tümör baskılayıcı protein p53, Bcl-2 protein ailesinin düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir (163). Bcl-2 protein ailesi, mitokondriyal zar geçirgenliğini yönetmektedir ve proapoptotik veya antiapoptotik olabilmektedir. Bugüne kadar Bcl-2 ailesinde toplam 25 gen tanımlanmıştır. Anti-apoptotik proteinlerin bazıları Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG iken proapoptotik

proteinlerin bazıları ise Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik ve Blk'yi içermektedir. Bu proteinler, hücrenin apoptoza devam edip etmeyeceğini belirleyebildikleri için özel bir öneme sahiptir.



Şekil 3. Apoptotik yollar

(Bu görsel, "https://app.biorender.com" internet sitesi üzerinden oluşturulmuştur.)

2.6. Kannabinoidler

2.6.1. Kannabinoid genel bilgiler

Kannabinoidler genel olarak endojen kannabinoidler (endokannabinoidler), fitokannabinoidler ve sentetik kannabinoidler şeklinde üç gruba ayrılmaktadır (10–13). Canlı organizmalar tarafından üretilen endokannabinoidler, endokannabinoid sistem

üzerinde etki oluşturan endojen bileşiklerdir. Endokannabinoid sistem ise kannabinoid reseptör tip 1 (CB₁) ve kannabinoid reseptör tip 2 (CB₂) başta olmak üzere çeşitli reseptörler, araşidonik asitten sentezlenerek bu reseptörlere bağlanan AEA ve 2-AG gibi endokannabinoidler ile bu endokannabinoidlerin sentez ve yıkımından sorumlu enzimlerden oluşmaktadır.

Endokannabinoidlerin en bilinenleri arasında yer alan AEA, N-türevi; 2-AG ise O-türevi uzun zincirli yağ asididir. Veziküllerde depolanan ve salınmayı bekleyen nörotransmitterlerin aksine, endokannabinoidler talep üzerine sentezlenmekte ve ardından presinaptik reseptörlere bağlanmak için sinaptik aralığa salınmaktadır. AEA fosfolipaz D tarafından, 2-AG ise diaçilgliserol lipaz (DAG) adlı başka bir enzim tarafından sentezlenmektedir (14). Her iki endokannabinoid, membran taşıma işlemi ile hızla uzaklaştırılmakta ve inaktive edilmektedir. AEA, bu mekanizma yoluyla postsinaptik membran boyunca taşınarak hücre içi FAAH tarafından araşidonik asit ve etanolamin'e parçalanmaktadır. Bunun aksine 2-AG ise presinaptik membran boyunca taşınarak MAGL enzimi tarafından enzimatik olarak deaktive edilmektedir (15).

Hem AEA hem de 2-AG, genellikle hücre zarı ve beyinde belirgin oranda bulunan ve çoklu doymamış bir yağ asidi olan araşidonik asit türevleridir. Araşidonik asidin hücrenel sinyalleşmede ve inflamasyonda bir mediatör olarak yer aldığı bilinmektedir. AEA, beyin ve periferik dokular gibi CB₁ reseptörünün hem yüksek konsantrasyonda olduğu hem de sınırlı dağılıma sahip olduğu yerlerde mevcut olabilmektedir, bu da molekülün kannabinoidlerden bağımsız diğer süreçlerde de önemli rollere sahip olduğunu göstermektedir. AEA, CB₁ reseptöründe kısmi agonisttir ve CB₂'de zayıf kısmi agonist/antagonist olarak hareket etmektedir. 2-AG ise ana kannabinoid reseptörleri için birincil endokannabinoiddir (16). AEA'dan farklı olarak 2-AG, hem CB₁ hem de CB₂ reseptörlerinin tam agonistidir ve konsantrasyon ile kannabinoid reseptörüne bağlanma afinitesindeki farklılıklar nedeniyle, bu iki endokannabinoidin hücre içinde farklı rolleri olduğu düşünülmektedir (17,18). Ayrıca diğer araşidonik asit türevlerinin de kannabinoid reseptörleri üzerinde etkili olduğu bilinmektedir: 2-araşidonoil gliseril eter (noladin) (164), virodhamin (165) ve N-araşidonoil dopamin (NADA) gibi (166).

Uzun zincirli yağ asitlerinden oluşan endokannabinoidlerden farklı olarak üç halkalı yapıya sahip fitokannabinoidler ise başta endüstriyel kenevir olan Cannabis sativa (C.sativa) ve medikal kenevir olan Cannabis indica olmak üzere kenevir bitkisi türlerinden

elde edilen kannabinoid grubunu oluşturmaktadır. Fitokannabinoidler, 11 tip kannabinoid olarak gruplandırılmıştır. THC, psikoaktif özellikleri nedeniyle en iyi bilinen fitokannabinoiddir. CBD, fitokannabinoidlerin diğer ana bileşenidir ve psikoaktif özellikleri bulunmamaktadır. Diğer fitokannabinoid türleri arasında (-)- Δ^8 -trans-tetrahidrokannabinol, kannabigerol (CBG), kannabikromen (CBC), kannabinodiol (CBND), kannabielsoin (CBE), kannabisiklol (CBL), kannabinol (CBN) ve kannabitriol (CBT) yer almaktadır (167). THC, hem CB₁ hem de CB₂ reseptörlerinde kısmi bir agonist olarak etki göstermektedir ve endokannabinoidlerle karşılaştırıldığında daha düşük bir reseptör afinitesine sahiptir. CBD ise psikoaktif olmamasıyla birlikte önemli fizyolojik süreçlerde görev almaktadır. Araştırmalar CBD'nin CB₁ ve CB₂ reseptörleri üzerinde negatif bir allosterik modülatör olarak etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Antiinflamatuvar, immünsüpresif, antidepresan, anksiyolitik, analjezik, antikonvülzan, nöroprotektif, antioksidan gibi koruyucu etkilere sahip olmasının yanısıra CBD; epilepsi, psikiyatrik bozukluklar ve uyku bozuklukları gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde de önemli faydalar sağlamaktadır. CBD ayrıca antioksidan etkilere sahiptir ve Alzheimer ve Parkinson hastalıkları ile MS gibi nörodejeneratif hastalıklarda nöroprotektif rol oynayabilmektedir. CBD'nin inflamatuvar süreçlerdeki rolüyle ilgili bir çalışmada, % 59,1 CBD ve % 20,2 THC içeren kenevir yağı özütünün (cannabis oil extract) sıçanlarda oluşturulan pençe ödemi üzerine etkileri araştırılmış, söz konusu özütün histopatolojik incelemede pençe ödemi ve inflamasyonunu azalttığı belirtilmiştir (168). CBD'nin ayrıca akut akciğer hasarında antiinflamatuvar etkilere sahip olduğunu gösteren kanıtlar da bulunmaktadır (169). Üçüncü ve son grup kannabinoid sınıfı, laboratuvar ortamında üretilerek kannabinoid reseptörüne bağlanan ve çeşitli kimyasal yapılardan oluşan sentetik moleküllerdir. Bu moleküller, birçok patolojik süreçte potansiyel terapötik etkileri nedeniyle araştırılmaktadır.

Kannabinoid reseptörlerinin iki ana alt tipi olan CB₁ ve CB₂, G-protein bağlı 7-transmembran içeren reseptörlerdir (GPCR) ve inhibitör G proteinlerine bağlanmaktadır. Bu reseptörler, cAMP üretimini inhibe ederken MAPK yolağını aktive etmektedir. En çok bazal gangliyonlar ve limbik sistem olmak üzere beyinde, ayrıca spinal kordda ve periferik sinir sisteminde bulunan CB₁ reseptörleri, pre ve post sinaptik hücre membranlarında lokalizedir ve biliş, hafıza regülasyonu ve hareket kontrolünden sorumludur. İmmün fonksiyonlarla ilişkili periferik dokularda bulunan ve immünmodulatör etkiye sahip CB₂ reseptörleri ise inflamasyonun inhibisyonunu sağlamaktadır. CB₂ reseptör aktivasyonu ile immün sistem ve

inflamasyonun modülasyonunu temel alan potansiyel terapötik hedefler üzerine çalışmalar mevcuttur (170,171). Kannabinoidlerin kendi reseptörleri dışında ayrıca G protein kenetli reseptör 55 (GPR55), G protein kenetli reseptör 119 (GPR119), geçici reseptör potansiyel vanilloid 1 (TRPV1), peroksizom proliferatörle aktive edilen reseptör (PPAR) gibi reseptörleri de aktive edebildikleri bildirilmiştir (172–177).

2.6.2. Kannabinoidlerin etki mekanizmaları

Kannabinoidler, vücuttaki kannabinoid reseptörlerine bağlanarak nörotransmitter salınımını değiştiren moleküllerdir. Kannabinoid reseptörleri, hücre dışı moleküler mesajlaşmanın hücre içi yanıtı iletilmesinde yer alan 7-transmembran protein reseptörleri ailesi olan G protein kenetli reseptör (GPCR) süper ailesi içinde bulunmaktadır. Kannabinoidlerin kannabinoid reseptörüne bağlanması adenil siklaz enziminin Gi/o transdüksiyonlu inhibisyonu ile sonuçlanmakta ve hücre içi sinyal iletimi için ikinci haberci olan siklik adenosin monofosfatın (cAMP) sentezi azalmaktadır. Bu ikinci haberci sistem aracılığıyla, kannabinoid bağlanması sonucu hücre içindeki çeşitli sinyal yollarını etkileyen mitojenle aktive protein kinaz aktive edilmektedir (178).

Kannabinoid reseptörüne bağlanarak cAMP'nin azaltılması, hücre içine kalsiyum akışının inhibisyonuna neden olmaktadır ve bu, muhtemelen nörotransmitter salınımındaki azalmada önemli role sahiptir. Reseptöre bağlanan kannabinoidler, nörotransmitter salınımını azaltsa da aktivasyon veya inhibisyonun genel etkisi, inhibe edilen nörotransmitter tarafından belirlenmektedir. Örneğin, glutamat ve gama-aminobütirik asit (GABA), santral sinir sistemindeki (SSS) başlıca nörotransmitterlerdir ve bu nöronal membranlarda CB₁ reseptörleri bulunmaktadır. CB₁ reseptörünün aktivasyonuna bağlı glutamat inhibisyonu, azalmış aktivasyon ve hatta nöro koruma ile sonuçlanırken buna karşılık CB₁ reseptörleri GABA nöronlarında da bulunduğu ve GABA SSS'deki birincil inhibitör nörotransmitter olduğundan CB₁ aktivasyonuna sekonder GABA inhibisyonu, artan aktivasyon ve kaygıya neden olmaktadır. Ayrıca nörolojik ve psikiyatrik hastalıklarda kilit sistemler olan noradrenerjik ve kolinerjik sistemlerin de CB₁ reseptör aktivasyonundan etkilendiği bilinmektedir (179).

CB₁ reseptörlerinin beyindeki yoğunluğu ve organlardaki geniş dağılımı nedeniyle, kannabinoidler reseptöre bağlandığında önemli fizyolojik fonksiyonları etkilemektedir. CB₁ bağlanma bölgesinin yakınında, membran üzerinde bir allosterik bölge bulunur ve aktive edildiğinde birincil CB₁ bölgesini etkiler. Allosterik bağlanmanın neden olduğu CB₁ aktivitesinin bu modülasyonu, kannabinoide verilen yanıtın azalması veya sonlanması dahil olmak üzere önemli rollere sahip olabilmektedir (180).

CB₁ reseptörünün başlangıçta sadece SSS'de olduğu düşünüldüğü gibi, CB₂ reseptörünün de periferik bir kannabinoid reseptörü olduğuna ve protein hasarına karşı bağışıklık tepkisinde yer aldığına inanılmaktaydı. Daha sonraki çalışmalar, CB₂ reseptörünün SSS'de özellikle mikroglial dokuda da bulunduğunu doğrulamıştır. SSS'de CB₂ reseptör sayısı, CB₁ reseptörü ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha az olmasına rağmen, CB₂ reseptörü kardiyovasküler, üreme, gastrointestinal, pulmoner ve hepatik sistemler dahil olmak üzere vücutta geniş bir dağılıma sahiptir, bu da reseptörün önemli rolleri olduğunu göstermektedir.

2.6.3. Δ9-Tetrahidrokannabinol (THC)

THC, kenevir bitkisinin birincil psikoaktif bileşenidir ve *C. sativa*'da en çok bulunan fitokannabinoiddir. İlk olarak 1964'te Hebrew Üniversitesi'nde Gaoni ve Mechoulam tarafından izole edilmiştir (181). Sonraki 25 yıl içinde, vücutta bitki bazlı fitokannabinoidler tarafından aktive edilen en az iki kannabinoid reseptörü (CB₁ ve CB₂) tanımlanmıştır. Fitokannabinoidler (THC ve CBD) endokannabinoid sistemin (EKS) bir parçası değildir, ancak vücut üzerindeki etkilerinin çoğunu bu sistem aracılığıyla gerçekleştirmektedir. THC'nin tam bir agonistten ziyade hem CB₁ hem de CB₂ reseptörlerinde kısmi bir agonist olduğu anlaşılmıştır. Fitokannabinoidlerin, uzun zincirli yağ asitleri olan ve doğal olarak oluşan endokannabinoidlerden farklı olarak üç halkalı bir moleküler yapıya sahip olması nedeniyle aslında bu durum şaşırtıcı değildir. Ayrıca fitokannabinoidler *C. sativa* için faydalı bir işleve hizmet edecek şekilde evrimleşmiştir ve bunların EKS ile aktiviteleri muhtemelen tesadüfi olmuştur.

THC'nin kısmi CB₁ agonisti olarak psikoaktif etkileri büyük ilgi görmüştür. İlk keşfedildiğinde CB₁ reseptörünün sadece SSS'de olduğu düşünülmüşse de daha sonra CB₁'in kardiyovasküler, pulmoner, gastrointestinal, deri, immün ve oftalmik sistemler ile diğer

organlarda da bulunduğu kabul edilmiştir. CB₁ reseptörünün SSS’de yüksek oranda eksprese edilmesine rağmen diğer sistemlerde de bulunması EKS'nin vücutta önemli bir işleve hizmet ettiğini gösterirken, fitokannabinoidlerin vücuttaki kannabinoid olmayan reseptörler üzerindeki ek aktivitesi de bu bulguları güçlendirmektedir. SSS’de CB₁ reseptörü özellikle korteks, bazal ganglionlar ve serebellum dahil olmak üzere birçok bölgede bol miktarda bulunmaktadır. CB₁'in bol olduğu ikinci bir alan, limbik lob ve hipokampusdur. CB₁'in bu beyin bölgelerindeki yüksek ekspresyonu muhtemelen THC'nin motor aktiviteyi ve duygu durumu nasıl modüle edebildiğinin temelini oluşturmaktadır. Kemirgen çalışmaları, THC ve diğer kannabinoidlerin beynin bu bölgelerine olan afinitesini sağlam bir şekilde ortaya koymuştur. Daha sonra yapılan hayvan çalışmaları, hipotermi, katapleksi ve antinosisepsiyon dahil olmak üzere SSS üzerindeki diğer etkileri de ortaya çıkarmıştır (20,182). Bu sonuçlar hareket, hipotermi, katapleksi ve antinosisepsiyon olmak üzere kannabinoidlerin “dörtlü etkisi” olarak kabul edilmiştir. Bunu takiben insanlarda THC’nin motor kontrol üzerinde, ince motor kontrolünün bozulmasını içeren ek etkileri de tanımlanmıştır (183). İştah simülasyonu, bulantı ve kusmanın düzenlenmesi, analjezi ve uyku gibi diğer etkiler de THC ile ilişkilendirilmiş ve kabul görmüş özelliklerdir.

2.6.4. Kannabidiol (CBD)

CBD ilk olarak Illinois Üniversitesi'nde Roger Adams tarafından ekstrakte edilmiş ve daha sonra 1942'de kimyasal olarak sentezlenmiştir. İzole edilen CBD’deki tam saflaştırma ve tanımlama, 20 yıldan fazla bir süre sonra dahi tamamlanamamıştır. Teknik sınırlamalar molekülün saflaştırılmasına engel teşkil etse de, 1940'lar aynı zamanda ABD’de esrarın yasaklandığı bir dönem olduğundan, CBD ve diğer kannabinoidlerle ilgili araştırmalar da engellenmiştir. THC, 1964’te Raphael Mechoulam ve İsrail’deki ortakları tarafından keşfinin ardından hızla psikoaktif olarak tanımlanmış ve kenevir bitkisi içindeki CBD de dahil olmak üzere birçok molekülü tanımlamak ve öğrenmek için araştırmalar hızla genişletilmiştir.

Psikoaktif özelliklerden yoksun olan CBD, esrarda THC’den sonra en bol bulunan ikinci fitokannabinoiddir ve çoklu etkileri nedeniyle yoğun bilimsel araştırmaların konusu haline gelmiştir. Psikoaktif etkilerin olmaması gibi bariz bir faydasının yanı sıra epilepsi ve şizofreni tedavisinde de etkili olduğu gösterilmiş ve ABD ile AB’de çocukluk çağının nadir

görülen epilepsilerinde kullanımı için saflaştırılmış CBD özütü olarak onaylanmıştır (184,185).

CBD, diğer fitokannabinoidlerin üç halkalı yapısını paylaşmakta ve THC'den yalnızca bu üç yapıdan birindeki farklılıkla ayrılmaktadır. Ancak yapıdaki bu küçük farklılık, üç boyutlu moleküler yapıda ve CBD'nin EKS ile etkileşiminde önemli değişikliklere neden olmaktadır. CBD, THC ve diğer kannabinoid agonistlerini bağlayan ortosterik bölge için çok az doğrudan afiniteye sahiptir ve yakındaki allosterik bölgeye bağlanmaktadır. Bu allosterik bağlanma, ana ortosterik bölgede konformasyonel değişiklikleri başlatarak, endokannabinoidler olan AEA ve 2-AG'ye ek olarak THC gibi CB₁ agonistlerine de afiniteyi değiştirmektedir. Bu nedenle CBD, CB₁ reseptöründeki ortosterik bölge üzerinde çok az doğrudan etkiye sahip olmasına rağmen kannabinoid reseptörlerinin modülasyonu yoluyla büyük etkiler meydana getirmektedir.

EKS, CBD'den etkilenen birçok sistemden yalnızca birini oluşturmaktadır ve CBD'nin endokannabinoid dışı sistemler üzerinde de çeşitli etkileri mevcuttur. Bu kannabinoid olmayan aktiviteler, CBD'nin fizyolojik rolünün çoğunu temsil etmektedir. GPR55 ve periferik GPR18, CBD'nin önemli hedefleri arasında bulunmaktadır ve GPR55, kannabinoid reseptörlerinin transmembran alanları ile paylaşılan yapısal homolojiler nedeniyle bazen "üçüncü kannabinoid reseptörü" olarak anılmaktadır. CBD, GPR55 ve GPR18'e karşı bir antagonist veya invers agonist görevi görürken, endokannabinoidler CBD'nin bu etkilerinin aksine bu reseptörler üzerinde agonist etkiye sahiptir (186). CBD ayrıca glisin, serotonin, kolinerjik, opioid ve PPAR'lar gibi diğer kannabinoid olmayan reseptörlere de bağlanabilmektedir.

Glisin reseptörleri ile kannabinoid etkileşimi, kronik ağrının azaltılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bir çalışmada, CBD'nin sistemik ve intratekal enjeksiyonlarının, analjezik etkiye tolerans geliştirmeden inflamatuvar ve nöropatik ağrıyı önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (187). Adenozin reseptörünün de CBD'nin bir hedefi olduğu bilinmektedir. En az dört farklı adenozin reseptörü mevcuttur ve CBD, koroner kan akışının ve oksijen tüketiminin düzenlenmesi için miyokarda (188), uyku ve vücut sıcaklığının düzenlenmesi içinse muhtemelen ön beyinde yer alan A₁ reseptörü ile etkileşmektedir. CBD, adenozinin hücresel alımı üzerindeki etkisi yoluyla nötrofillerin inflamatuvar özelliklerinin güçlü bir inhibitörüdür. Ayrıca CBD'nin nöroprotektif özellikler de gösterebileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (189,190).

Serotonin (5-HT), CBD için bir başka önemli hedefdir. Serotonin reseptörlerinin en az sekiz farklı alt tipi vardır ve CBD'nin 5-HT1A ve 5-HT2A reseptörlerine bir agonist olarak bağlandığı bildirilmiştir. İki reseptördeki özelliklerini karşılaştıran in vitro bir çalışma, CBD'nin 5-HT2A reseptörü için daha zayıf afiniteye sahip olduğunu ve kısmi agonist olarak davrandığını göstermiştir (191). Ayrıca CBD'nin in vitro araştırmalarda μ ve δ opioid reseptörlerini (192) ve nikotinik asetilkolin reseptörlerini modüle edebildiğine dair bulgular da mevcuttur (193). İnsan kanser hücre dizilerinde ise CBD'nin nükleer membran PPAR- γ reseptörü ile etkileşime girdiği ve tümör hücresi canlılığını inhibe ettiği bulunmuştur (194,195).

CBD'nin enzim sistemleriyle etkileşimi konusunda; CYP2C9, CYP2D6 ve CYP2C19'un inhibisyonu yoluyla sitokrom P450 sistemi ile etkileşime girdiği belirtilmiştir (196). Ayrıca CBD'nin sitokrom P450 sistemine ek olarak redoks reaksiyonları, kolesterol metabolizması, apoptoz süreçlerinde etkili enzimler, endokannabinoid AEA'nın parçalanmasında önemli olan FAAH ve fosfolipazlar gibi 32 spesifik enzim üzerinde de etkisi olduğu tespit edilmiştir (197).

2.6.5. Endokannabinoid sistem (EKS)

Endokannabinoid sistem; CB₁ ve CB₂ başta olmak üzere cannabinoid reseptörleri, araşidonik asitten sentezlenerek bu reseptörlere bağlanan AEA ve 2-AG gibi endojen cannabinoidler ve bu endokannabinoidlerin sentez ve yıkımından sorumlu enzimlerden oluşmaktadır. Her iki cannabinoid reseptörünün vücudun birçok bölgesinde yerleşik olması nedeniyle endokannabinoid sistemin ağrı, kan basıncı, açlık-tokluk, gastrik ve intestinal motilite, inflamasyon gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte önemli rolleri bulunmaktadır.

Kannabinoid reseptörler izole edildikten sonra, vücutta neden var olduklarını ve nasıl çalıştıklarını araştırmak için çalışmalar başlamıştır. Sonraki yıllarda endokannabinoidler olarak adlandırılan ve doğal olarak oluşan ligandlar bulunmuş ve bunların biyosentetik ve parçalayıcı yolları belirlenmiştir. Bunların sonucunda cannabinoid reseptörleri, endokannabinoidler ve bunlarla ilişkili enzimatik süreçler endokannabinoid sistem (EKS) olarak adlandırılmıştır (19). EKS'yi oluşturan parçalar

hakkında artık çok şey bilinmesine rağmen, karmaşık fizyolojik mekanizmalar ve bunların ne işe yaradığı sorusu hala yanıtlanmayı beklemektedir.

Hem CB₁ hem de CB₂, G protein-bağlı reseptör (GPCR) süper ailesinin üyeleridir. GPCR'ler, insanlarda tanımlanmış 1000'den fazla ayrı tip ile ökaryotlarda bilinen en büyük membran reseptörleri sınıfını oluşturmaktadır. SSS bozukluklarında kullanılan ilaçların çoğu GPCR'ler üzerinde etki etmektedir ve bu reseptörler şu an kullanımda olan ilaçların yaklaşık yarısı için moleküler hedef sağlamaktadır (198). CB₁ ve CB₂ dahil tüm GPCR'ler, nörotransmitterleri bağlayan guanin nükleotid bağlayıcı proteinlerle birleştirilmiş transmembran reseptörleridir.

SSS'de, GPCR'ler en yüksek sayıda olan reseptördür ve hücreler arasındaki kimyasal sinyallemede merkezi bir rol oynamaktadır. Sinaptik aralıkta N-terminaline nörotransmitterlerin bağlanması, hücre içi aktiviteyi ve zara bağlı adenil siklaz aktivitesini başlatarak adenosin trifosfatın (ATP) siklik adenosin monofosfata (cAMP) dönüştürülmesini sağlamaktadır. Bu süreç boyunca sinaptik aralıktaki nörotransmitterler, cAMP'nin hücre içi ikinci haberci sistemini aktive ederek bir dizi olayı tetiklemektedir (199,200). GPCR'ler, büyük bir karmaşıklığa sahip α , β ve γ alt birimlerinden oluşan heterotrimer proteinlerdir ve α alt birimleri, diğer iki alt birim arasındaki daha büyük benzerlikle karşılaştırıldığında çok daha heterojendir. Bir ligand reseptöre bağlandığında, α alt biriminin reseptörle birleşmesine ve bunların β ve γ alt birimlerinden ayrılmasına izin veren konformasyonel değişiklikler meydana gelmektedir ve bu sayede hücre içi süreçler uyarılmaktadır (201).

CB₁ ve CB₂, hipokampusün 1. ve 4. tabakalarında daha az, bazal ganglia ve serebellumda ise yüksek oranda eksprese edilen GPCR'lerdir (202,203). Ligandlar kannabinoid reseptörlerine bağlandığında G proteinindeki konformasyonel değişiklikler adenil siklazı veya voltaj kapılı Ca⁺² kanallarını inhibe etmekte ya da içe doğrultucu K⁺ kanallarını açmaktadır. Bu yapısal ve iyon kanalı değişiklikleri, ikinci haberci sistemleri üzerinden fosforilasyon yoluyla hücre içinde çeşitli karmaşık moleküler süreçlere neden olmakta ve presinaptik veziküllerde bulunan nörotransmitterlerin salınımını engellemektedir (204).

2.6.5.1. Endokannabinoidler

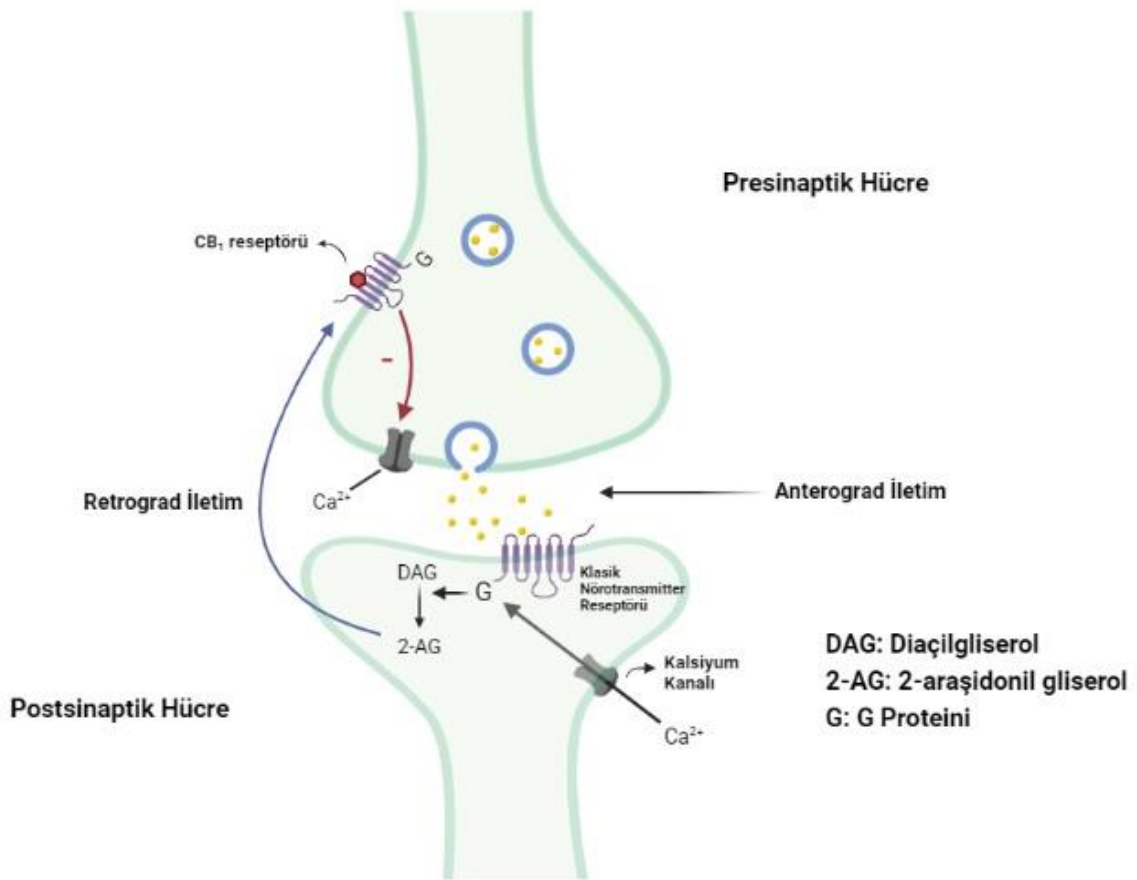
Endokannabinoidler, araşidonic asitten türetilir ve SSS ile periferik sinir sisteminde bulunan lipid habercileridir. AEA ve 2-AG olmak üzere iki endokannabinoid tanımlanmıştır ve her ikisi de çoklu doymamış yağ asitleridir. Endokannabinoidler, nöronlar arasındaki kimyasal mesajlaşmada birçok role hizmet etse de monoaminler ve asetilkolin gibi klasik nörotransmitterlerden önemli ölçüde farklılardır. Bu farklar arasında endokannabinoidlerin oldukça hidrofobik yapıda olması, veziküllerde depolanmak yerine yalnızca talep üzerine üretilmeleri ve sinaptik aralıkta geriye doğru hareket ederek presinaptik CB₁ ve CB₂ reseptörlerine bağlanmaları bulunmaktadır (Şekil 4). Bağlandıktan sonra birkaç milisaniye içinde bir alım mekanizması yoluyla sinaptik aralıktan hızla çıkarılmakta ve bu yolla kimyasal iletişim sona ermektedir. THC dahil olmak üzere fitokannabinoidler, potansiyel reseptörlerinin tümüne bağlanarak uzun süre aktif kalabilmektedir, bu nedenle bitki bazlı kannabinoidler hücreler arası iletişimde geniş ve kalıcı bir etkiye sahipken endokannabinoidler, diğer nörotransmitterlere benzer şekilde hızla sonlanan, daha sınırlı bir etkiye sahiptir. Endokannabinoidler hem eksitator hem de inhibitör nörotransmitterlerin salınımını inhibe etmekte ve nörotransmittere bağlı olarak postsinaptik hücreyi de inhibe etmekte veya uyarmaktadır. Örneğin, beyindeki en belirgin eksitator nörotransmitter olan glutamat ve en sık görülen inhibitör nörotransmitter olan gama-aminobütirik asit (GABA) endokannabinoidler tarafından modüle edilmektedir. Dopamin, serotonin ve norepinefrin ise daha az olmak kaydıyla GPCR'lere bağlanarak kannabinoidlerle etkileşime girmektedir.

AEA, 1992'de keşfedilen ilk endokannabinoiddir ve SSS ile periferik dokularda bulunmaktadır (205,206). Başlangıçta AEA, domuz beyininden izole edilmiş ve SSS'de dopamin ve serotonin nörotransmitterlerine benzer miktarlarda mevcut olduğu tespit edilmiştir. CB₁ reseptörü vücuttaki en önemli kannabinoid reseptörüdür ancak AEA'nın dağılımı bu reseptörün dağılımıyla yakından ilişkili değildir ve AEA, reseptörde sadece kısmi bir agonist olarak hareket etmektedir. CB₁ reseptörünün ve AEA'nın lokalizasyonundaki bu farklılık ve sınırlı bağlanma afinitesi, bu endokannabinoid için ek roller olduğunu göstermektedir (207).

Keşfedilen ikinci endokannabinoid 2-AG de yine beyin dokusundan izole edilmiştir (208). AEA gibi 2-AG de bir araşidonic asit türevidir ve talep üzerine hücre içi kalsiyumun artmasını takiben gerçekleşen hücre aktivasyonu ile sentezlenmektedir. AEA'dan farklı

olarak SSS'de önemli ölçüde daha yüksek miktarlarda bulunan 2-AG, hem CB₁ hem de CB₂ reseptöründe tam agonist olarak etki göstermektedir (16,207).

AEA ve 2-AG, endokannabinoidler olarak sınıflandırılırsa da diğer moleküller için de bazen "endokannabinoidler gibi" ifadesi kullanılmaktadır. Omega-6 türevleri, noladin eter (2-arakidonoil gliseril eter) (164), virodhamin (165) ve NADA (166) klasik endokannabinoidler olarak tanımlanmasalar da farklı afinitelerle CB₁ ve CB₂ reseptörlerine bağlanabilmektedir.



Şekil 4. Endokannabinoidlerin retrograd sinyalizasyonu

(Bu görsel, "https://app.biorender.com" internet sitesi üzerinden oluşturulmuştur.)

2.6.5.2. Endokannabinoidlerin biyosentezi ve yıkılması

Endokannabinoidler yüksek oranda lipofildir ve veziküllerde depolanmamaktadır. Veziküllerde depolanan tipik nörotransmitterlerden farklı olarak endokannabinoidler, postsinaptik nöronun depolarizasyonu ve kalsiyumun hücre içine girişi ile aktive edilen

hücrede "talep üzerine" üretilmektedir. Hem AEA hem de 2-AG, postsinaptik membrana gömülü araşidonik asitten sentezlense de, her endokannabinoid biyosentez ve yıkım için ayrı yollardan geçmektedir.

AEA'nın biyosentezi, birden fazla yoldan ilerleyebilen iki aşamalı bir süreçtir. AEA sentezi için öncü görevi gören ve biyolojik membranların ana fosfolipid bileşeni olan fosfatidiletanolamin (PE), N-asetiltransferaz enziminin etkisiyle N-araşidonil-PE'ye dönüştürülmektedir ve fosfolipaz D enzimi ise AEA ve fosfatidik asit sentezi ile süreci tamamlamaktadır (209).

AEA'ya benzer şekilde, 2-AG de postsinaptik nöronun aktivasyonu ile "talep üzerine" üretilmektedir. Bir membran fosfolipidi olan fosfatidilinositol ve araşidonik asit, 2-AG üretmek için enzimatik modifikasyona uğramaktadır. 1,2-Diaçilgliserol (DAG), 2-AG'nin öncülüdür ve AEA'da olduğu gibi, DAG'nin sentezi ve 2-AG'ye dönüştürülmesi için de birden fazla yol bulunmaktadır. DAG lipaz enzimi ile hidroliz, 2-AG'nin biyosentezinde birincil adım olarak kabul edilmektedir (16).

Eksojen fitokannabinoidlerin aksine endokannabinoidler, birçok nörotransmitter gibi hızla yıkılarak hücreler arasındaki kimyasal mesajlaşmayı sonlandırmaktadır. Her endokannabinoid farklı enzimatik yollarda ilerlemesine rağmen hidroliz, bozunmanın ana yoludur. AEA, zara bağlı iki postsinaptik enzim olan FAAH 1 ve FAAH 2 tarafından araşidonik asit ve etanolamine yıkılmaktadır (210). CB₁ reseptör ekspresyonunun yüksek olduğu bölgelerde yerleşik olan FAAH 1 ve FAAH 2 enzimleri, postsinaptik nöronlarda daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. AEA presinaptik reseptörden salındığında sinaptik aralıkta yayılarak serotonerjik ve noradrenerjik sistemdekine benzer şekilde bir taşıma sistemi tarafından postsinaptik hücreye alınmaktadır. Postsinaptik nörona girdikten sonra AEA, proteinler tarafından zarın sitozole bakan yüzeyine bağlı FAAH'a taşınarak araşidonik asit ve etanolamin'e parçalanmaktadır. FAAH ile hidrolize ek olarak daha az önemli olan diğer yollar da AEA'nın yıkılmasında rol oynamaktadır. AEA hidroliz yerine siklooksijenazlar (COX-1 ve COX-2), lipoksijenazlar ve epoksijenazlar dahil olmak üzere birkaç enzim ailesi tarafından oksidasyona da uğrayabilmekte ve AEA'yı parçalayan bu karmaşık oksidatif süreçlerden prostaglandin türevleri oluşmaktadır (211).

2-AG de benzer süreçlerden geçerek hidroliz veya oksidatif yollarla yıkılabilmektedir fakat birincil yıkılma yolu MAGL enzimi ile presinaptik nöronda meydana gelmektedir (15). 2-AG ayrıca, presinaptik veya postsinaptik nöronda ikincil bir hidroliz

olarak FAAH tarafından da parçalanabilmektedir. COX-2 ve lipoksijenaz enzimlerinin kullanıldığı oksidasyon yolağı ise daha az öneme sahip bir yıkılma yoludur (212).

2.6.5.3. Kannabinoid reseptörler CB₁ ve CB₂

CB₁ ilk olarak SSS'de bulunmuş ve bu, reseptörün beyinle sınırlı olduğu inancına yol açmıştır. Daha sonra dalakta keşfedilen CB₂'nin de yalnızca bağışıklık sistemi ile ilişkili periferik bir reseptör olduğu düşünülmüştür ancak daha sonraki çalışmalarda CB₁ ve CB₂ reseptörlerinin farklı konsantrasyonlarda hem merkezi hem de periferik yerleşimli olduğu kabul edilmiştir (213).

CB₁, fitokannabinoid THC'nin psikoaktif etkilerini gerçekleştirdiği, SSS içinde en yüksek konsantrasyona sahip vücuttaki en yaygın kannabinoid reseptörüdür. CB₁ reseptörü, kemirgen beyinde bazal ganglionlarda ve serebellumda, daha az miktarda hipokampus, amigdala ve serebral korteksin bazı katmanlarında eksprese edilmektedir. CB₁ reseptörü ayrıca kalp, damar, bağırsak, bağışıklık hücreleri ve testisler dahil olmak üzere SSS dışında da birçok bölgede bulunmaktadır (177,214,215), bu da reseptörün çeşitli işlevlere hizmet ettiğini göstermektedir. Benzer aminoasit dizisine sahip memeli türleri arasında CB₁ reseptöründe de dikkate değer bir benzerlik vardır. Ayrıca, CB₁ ve CB₂ reseptörleri arasındaki aminoasit dizilerinde, iki reseptör arasında ortak bir genetik köken olduğunu düşündüren önemli bir homoloji bulunmaktadır (216).

CB₁ reseptörü nörotransmitter salınımını inhibe etmesine ve hücreler arası iletişime aracılık etmesine rağmen, öncelikle mitokondri, endoplazmik retikulum ve tübüller dahil olmak üzere hücre içi organellerde lokalizedir ve ortosterik ve allosterik bölgeler olarak adlandırılan iki bağlanma bölgesinden oluşmaktadır. Ortosterik bölge, THC dahil çoğu kannabinoid agonisti için ana bağlanma bölgesi olarak hizmet ederken, bitişiğindeki allosterik bölge ise diğer moleküllere bağlanma bölgesi sunmaktadır (217). Allosterik bölgeye bağlanan moleküller, allosterik bölgede konformasyonel değişikliklere sebep olarak ana bölgenin bağlanma özelliklerini önemli ölçüde etkileyebilmektedir (218). Aynı şekilde CB₂ reseptörünün de ortosterik ve allosterik bağlanma bölgelerine sahip olduğuna inanılmaktadır.

Allosterik agonistler genellikle sadece ortosterik bölgeye bağlanan moleküllerin varlığında aktivite gösterebilmektedir ve allosterik bölge üzerinden ortosterik bölgenin bağlanma özelliklerindeki bu değişiklikler, örneğin THC'nin bağlanmasını engelleyerek istenmeyen psikoaktif özellikleri potansiyel olarak değiştirebilecek terapötik ajanların geliştirilmesinde önemli roller oynayabilmektedir. Ayrıca farmasötik geliştirme için, ortosterik bölgenin yapısında birçok reseptör alt tipinin varlığını kanıtlayan büyük bir çeşitlilik de mevcuttur (219).

CB₂ reseptörü ilk olarak dalakta ve dolaşımdaki lenfositlerde tanımlanmış olmasına rağmen daha sonra bu reseptörün mikroglia, monositler, mast hücreleri, B-lenfositleri, mikroglia ve astrositler de dahil olmak üzere hem merkezi hem de periferik bölgelerde bulunduğu tespit edilmiştir (220). CB₁ reseptörleri SSS'de ve çok sayıda periferik bölgede yüksek oranda eksprese edilirken, CB₂'nin ekspresyonu ise daha az fakat yüksek oranda indüklenebilir (221). CB₁ reseptörüne benzer şekilde, CB₂ reseptörü de Gi/o proteinine bağlanarak bir ligand etkisiyle adenil siklazı inhibe etmekte ve mitojenle aktive protein kinazları aktive etmektedir.

Potansiyel olarak CB₂ reseptörü, inflamasyon, osteoporoz, kanser, anksiyete ve bağımlılık gibi nöropsikiyatrik durumlar dahil olmak üzere birçok süreçte önemli roller oynayabilmektedir. Ayrıca CB₂ reseptörünün kardiyovasküler, nörodejeneratif, nöropsikiyatrik ve ağrı dahil doku hasarının sınırlı olduğu birçok patolojik durumda endokannabinoidler ve diğer reseptör agonistleri için afiniteye sahip olması nedeniyle vücut için invazyon ve hasara karşı koruyucu olduğu ileri sürülmüştür (222).

2.6.5.4. Kannabinoidlerden etkilenen kannabinoid olmayan reseptörler

CB₁ ve CB₂ dışındaki reseptörler de fitokannabinoidleri ve endokannabinoidleri bağlayabilmektedir. CB₁ ve CB₂'ye afinite, AEA ve 2-AG tarafından paylaşılan bir özellik olmasına rağmen, her iki endokannabinoid de kannabinoid reseptörleri dışında birçok reseptörle etkileşime girebilmekte ve bu da endokannabinoidlerin sadece CB₁ ve CB₂ reseptörleri ile sınırlı kalmadığını göstermektedir.

2.6.5.4.1. Geçici reseptör potansiyel (TRP) kanalları

TRP kanalları, sodyum, kalsiyum ve magnezyumun membran geçirgenliğini etkileyen ve seçici olmayan katyon kanal reseptörleri ailesidir. Sıcaklık, dokunma, basınç, ışık, tat ve koku alma gibi bir dizi uyaran, TRP reseptör ailesini etkilemektedir.

TRPV1, tanımlanan ilk TRP kanalıdır ve hücrenin sitozole bakan iç zarında bulunan postsinaptik bir reseptördür. TRPV1 sadece duyuşal nöronlarda değil aynı zamanda epitelyal, endotelyal, kas ve lenfositleri içeren diğer dokularda da bulunmaktadır (223). Bu reseptörün ayrıca dorsal kök ve omurilik dokusunda CB₁ reseptörleri ile dimerize olduğu ve bunun da karmaşık hücreşel iletişimle sonuçlandığı bulunmuştur (224). Kapsaisin (acı biber), allisin (sarımsak) ve alil izotiyosiyanat (wasabi ve yaban turpu), TRPV'yi aktive ettiği bilinen birçok uyaran arasındadır. TRPV1 kanalı, ağrı ve nosisepsiyon algısında önemli bir modülatördür. AEA ve fitokannabinoidler THC ve CBD, TRPV1 reseptöründe tam agonist etki göstermektedir.

TRPV1 reseptörü postsinaptik hücrenin iç tabakasında yer aldığından AEA, bu reseptöre hücre içi bağlanırken, kannabinoid reseptörlerine sinaps boyunca retrograd iletimden sonra bağlanmaktadır (225). CBD ve THC gibi fitokannabinoidlere ek olarak kannabinoid olmayan NADA dahil diğer moleküller de (166) bu reseptörde tam agonist etki göstermektedir (226,227). Buna karşılık CB₁ ve CB₂ reseptörleri için tam bir agonist olan 2-AG, TRPV1 için afiniteye sahip değildir. İlerleyen yıllarda en az beş TRPV kanalı daha tanımlanmış ve bu reseptörlerin çeşitli sıcaklık, ağrı ve basınç uyarılarına yanıt verdiği gösterilmiştir (207).

2.6.5.4.2. G protein kenetli reseptör 55 (GPR55)

GPR55 1999'da keşfedilmiş (228) ve başlangıçta üçüncü bir kannabinoid reseptörü olduğuna inanılmıştır (229) ancak daha sonraki çalışmalar bu reseptör ile CB₁ ve CB₂ arasında çok az dizi benzerliği olduğunu ortaya koymuştur (230). Bununla birlikte, üçü de G protein kenetli reseptördür (GPCR) ve GPR55 dorsal kök gangliyonunda yüksek oranda eksprese edilmektedir. AEA, Ca⁺² girişi ile aktivasyonu artıran GPR55 reseptöründe kısmi bir agonist olarak hareket etmektedir ve bazı çalışmalarda CB₁ ve CB₂'ye kıyasla GPR55 için

daha yüksek bir afiniteye sahip olduğu bildirilmiştir (231,232). GPR55, uyarıcı glutamat nöronlarında bulunmaktadır ve CBD'nin bu reseptör üzerindeki antagonistik etkilerinin nöbet ve yeme bozuklukları gibi rahatsızlıklarda kritik rol oynayabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (233,234).

2.6.5.4.3. Peroksizom proliferatörle aktive edilen reseptör (PPAR)

PPAR proteinleri, PPAR α , PPAR γ ve PPAR β/δ olmak üzere üç izoformdan oluşmakta ve lipid molekülleri tarafından aktive edilen bir nükleer hormon reseptörü ailesinde yer almaktadır. PPAR'lar iskelet kası, endotel, yağ dokusu ve karaciğerde farklı derecelerde bulunmaktadır (207) ve bu reseptörler tek bir ligand tarafından aktive edilmemekte, bunun yerine metabolizmadaki değişikliklere yanıt veren lipid sensörleri olarak kabul edilmektedir. Endokannabinoidler de yağ asidi türevleri olduğundan hem AEA hem de 2-AG en az iki PPAR izoformunun agonistleridir. Aktive edildikten sonra bu proteinler, çekirdekteki gen ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla metabolizmayı ve hücrel farklılaşmayı kontrol eden transkripsiyon faktörleri olarak görev yapmaktadır (235). Aktive PPAR'lar gen ekspresyonu, inflamatuvar yanıt, hücre büyümesi/farklılaşması ve apoptozu düzenlemekle birlikte ayrıca kardiyovasküler sistem ve endoteldeki inflamatuvar yanıtı da azaltmaktadır (236,237).

2.6.5.5. Endokannabinoid sistemin fizyolojik ve patolojik süreçlerdeki rolü

Endokannabinoid sistem gastrointestinal sistemde; salgı, mide hareketliliği, hassasiyet, inflamasyon, kusma ve tokluk gibi birçok fizyolojik olayda rol oynamaktadır. Tokluk, kusma, ishal ve inflamasyon gibi durumlarda endokannabinoidlerin düzeyi beyin ve bağırsakta değişmektedir. Kusma ve bağırsakların motor fonksiyonu; CB₁, CB₂ ve TRPV reseptörleri aracılığıyla beyin sapındaki endokannabinoidler tarafından düzenlenmektedir. Ayrıca endokannabinoid sistem, stresin gastrointestinal sistem üzerindeki etkilerinin azalması ve viseral duyu modülasyonu ile de ilişki halindedir (238).

Endokannabinoid sistem, vücuttaki enerji dengesinin sağlanmasında önemli bir role sahiptir. AEA ve 2-AG düzeyleri, açken limbik sistem ve daha az belirgin şekilde hipotalamusta yükselmekte ve yükselen AEA ve 2-AG düzeylerinin CB₁'i aktive etmesi ile gıda alım ihtiyacı oluşmaktadır. Bu da mezolimbik ödül sistemi ve hipotalamusun iştah kontrol yolu ile enerji metabolizması üzerinde etki etmektedir. CB₁ reseptörünün inaktive edilmesi ile de plazma leptin ve insülin seviyeleri düşmektedir ve bu, metabolik bozuklukların tedavisinde endokannabinoid sistemin değerli bir terapötik hedef olduğunu göstermektedir (239–241).

Sinaptik fonksiyonların önemli modülatörleri olan endokannabinoidler, santral sinir sisteminde bulunan kannabinoid reseptörlerinin aktivasyonu ile çeşitli fonksiyonları düzenleyebilmektedir. Endokannabinoid sistem üzerinden norepinefrin ve kortizol gibi nörotransmitterlerin salınımı, hipotalamus-hipofiz-adrenal aksı aktive ederek biliş, ruh hali ve aktivasyon değişikliklerine sebep olmaktadır (242,243). Ayrıca kronik ağrı üzerine etkileri bulunan endokannabinoid sistem, endojen bir ağrı kontrol sistemidir (244).

SSS ve periferik sinir sisteminde de çeşitli fizyolojik rollere sahip endokannabinoid sistem, aşırı aktivasyonu sonucunda bazal gangliyadaki dopaminerjik tonusu azaltarak Parkinson hastalığının patofizyolojisine katkı sağlarken; Huntington, Alzheimer, amyotrofik lateral skleroz, MS ve şizofreni gibi hastalıklarla da ilişkilidir (245–247).

Endokannabinoidler, kardiyovasküler fonksiyonların modülasyonunda kısıtlı bir etkiye sahiptir, ancak inme gibi nörovasküler bozukluklarda CB₁, CB₂, PPAR α ve TRPV1 reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla koruyucu rol oynamaktadır. Ayrıca 2-AG'nin, kardiyomiyositlerde inflamatuvar yanıtı azalttığı, glikoz alımını artırdığı ve inflamatuvar stres kaynaklı insülin direncini iyileştirdiği gösterilmiştir, bu nedenle endokannabinoidlerin kardiyovasküler bozukluklarda da faydalı olabileceği düşünülmektedir (248,249).

Endokannabinoidlerin solunum yolunda oluşan epitel hasarı ve pulmoner lökositözü büyük ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Bu konudaki bir çalışmada, CB₂ reseptör aktivasyonunun sitokin salınımını azaltarak akciğer patolojisini hafiflettiği belirtilmiştir (250). Bir başka çalışmada ise akciğer iskemisinden önce MAGL enzim inhibitörü kullanılarak 2-AG düzeyleri artırılmış, bunun da araşidonik asit (AA), tromboksan B2 (TXB2), prostasiklin (PGI2), lökotrien B4 (LTB4), TNF- α ve IL-6 seviyelerinde azalma

sağladığı ve İ/R'ye bağlı akciğer hasarı ve inflamasyonu üzerinde olumlu bir etki gösterdiği bildirilmiştir (251).

2.6.6. Kannabinoidler ve akciğer

Son yirmi yılda bilim topluluğu, kannabinoid sistemin aktivasyonunun ağrıyı hafiflettiğini ve iltihabı azalttığını destekleyen çok sayıda kanıtla ulaşmıştır. Eksojen ve endojen kannabinoidler, immün hücre fonksiyonları üzerindeki inhibe edici etkileri nedeniyle akciğer iltihabında terapötik potansiyele sahiptir.

Akciğerlerde, kannabinoid reseptörleri (CB₁ ve CB₂) yapısal hücrelerde ve lökositlerde bulunmaktadır. Kannabinoid reseptörlerinin organlar arasındaki dağılımına ilişkin bir çalışmada, akciğerlerde ve bronş dokusunda hem CB₁ hem de CB₂ mRNA'sı bulunmuş; CB₁ mRNA seviyesinin CB₂ 'ninkininden önemli ölçüde daha yüksek olduğu görülmüştür (252,253). Solunum yollarında bulunan bağışıklık hücreleri arasında alveolar makrofajlar (AM'ler) açık farkla en çok sayıda olandır ve bronkoalveolar lavajla geri kazanılan hücrelerin % 90'ından fazlasını oluşturur (254). Adenokarsinomlu hastalardan izole edilen akciğer dokusunda yerleşik makrofajlar üzerinde yapılan bir çalışmada CB₁ ve CB₂ mRNA ve proteinleri hem tümörle ilişkili hem de tümörle ilişkili olmayan makrofajlarda tespit edilmiş ve CB₂ seviyeleri CB₁'den daha yüksek bulunmuştur (255).

İnsan monosit türevli dendritik hücreler, hem CB₁ hem de CB₂ reseptörlerini eksprese etmektedir ve ayrıca AEA ve 2-AG'yi sentezleme kabiliyetine de sahiptir (256). Her iki CB reseptörü kemirgen kemik iliğinden türetilmiş dendritik hücrelerde de bulunmuştur (257,258). Kannabinoid reseptörlerinin dolaşımdaki lökositler üzerindeki varlığı akciğer bağışıklığını da etkileyebilmektedir, çünkü bu hücrelerin çoğu, inflamatuvar yanıtın farklı aşamalarında akciğerlere alınmaktadır. Eozinofiller büyük miktarda CB₂ reseptörü eksprese ederken (259–261), monositler ağırlıklı olarak CB₂ olmak üzere her iki kannabinoid reseptörünü eksprese etmektedir (252,262–264). Nötrofillerin CB₂ 'yi eksprese edip etmediği daha az açıktır çünkü ekspresyonuyla ilgili farklılıklar bildirilmiştir (252,261,265).

Kannabinoidlerin akciğer patolojisi üzerindeki rolünü incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada insan ve farelerde solunum sinsityal virüs (RSV) enfeksiyonunda CB₂

reseptörünün etkilerine bakılmıştır. CB₂ 'nin JWH133 tarafından aktivasyonunun akciğer patolojisini hafifleterek BAL sıvısı hücrelerinin akışını ve sitokin/kemokin üretimini azalttığı gösterilmiş ve böylece CB₂'nin RSV enfeksiyonunda terapötik bir hedef olarak hizmet edebileceği belirtilmiştir (250). Fibrozis ile ilgili yapılan bir çalışmada ise endokannabinoid/CB₁ reseptör sisteminin artan aktivitesi ile idiyopatik pulmoner fibrozisli hastaların ve bleomisin ile indüklenen pulmoner fibrozisli farelerin akciğerlerindeki hastalığın ilerlemesi arasında paralellik olduğu bildirilmiştir (266). Buna karşın bir başka çalışmada, farelerde nikotinle interstisyel akciğer fibrozisi indüklenmiş ve bu fibrozisin CB₂ agonisti (JWH 133) ile azaldığı tespit edilmiştir. Bu nedenle, CB₂ agonistinin fibroze karşı bir koruma sağlayabileceği belirtilmiştir (267).

CB₂ agonistinin inflamasyondaki etkisini inceleyen Zeng ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, farelerin JWH133 ile ön tedavisi sonucunda İ/R ile indüklenen akciğer ödemi ve akciğerdeki histopatolojik değişikliklerin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Ayrıca JWH133, PaO₂/FiO₂ oranını iyileştirmiş, akciğer TNF- α , IL-6, MDA düzeylerini ve miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesini azaltarak SOD aktivitesini artırmıştır (268). Yine bir akciğer hasarı modelinde, CB₂ reseptör up-regülasyonunun NF- κ B aktivitesini inhibe ettiği, proinflamatuvar faktörlerin (TNF- α , IL-6) salınımını azalttığı ve antiinflamatuvar faktörlerin (IL-10 ve IL-4) üretimini artırdığı tespit edilmiştir (269). Özetle bu bulgular, CB₂ reseptör aktivasyonunun, bağışıklık hücrelerinin inhibisyonu yoluyla akciğer hastalıklarının tedavisinde yeni bir immün modülatör hedef olabileceğini doğrulamaktadır.

2.6.7. Kannabinoid preparatları

THC'nin *C. sativa*'dan izole edilmesinin ardından ilaç geliştirme çalışmaları başlamış ve THC'nin ilk sentetik analogu nabilon (Cesamet) sentezlenmiştir. Daha sonra kimyasal sentez yoluyla üretilen dronabinol (Marinol) ise nabilondan farklı olarak bir THC analogu olmasa da THC ile benzer moleküler yapıya sahiptir. Dronabinol ve nabilonun endikasyonları arasında kanser kemoterapisine eşlik eden bulantı ve kusma yer almaktadır. Ayrıca dronabinol edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu (AIDS) hastalarında kilo kaybına eşlik eden anoreksiya tedavisinde de kullanılmaktadır (270,271). Fitokannabinoid sınıfında bulunan moleküller THC ve CBD'nin 1:1 oranındaki kombinasyonundan oluşan Sativex'in

ise kanserli hastalarda analjezik etki gösterdiği (272) ve MS'e bağlı nöropatik ağrıları azalttığı (273,274) bildirilmiştir. Epidiolex de kenevir bitkisinden elde edilmiş bir kannabidioldür ve tedaviye dirençli çocukluk çağı epilepsisi için kullanılmaktadır (184,185).

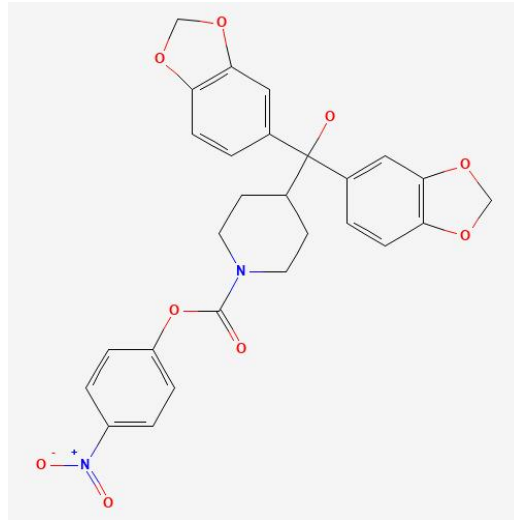
Son olarak, selektif CB₁ reseptör antagonisti rimonabant içeren Acomplia ve Zimulti adlı ilaçlar obezite tedavisinde kullanılmak üzere Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa Tıbbi Ürünler Değerlendirme Ajansı (EMA) tarafından 2006'da onaylanmış fakat psikiyatrik etkileri nedeniyle geri çekilmiştir (275).

2.6.8. Deneyde kullanılan tedavi ajanı (JZL184)

JZL184, endokannabinoid 2-AG'nin araşidonik asit ve gliserole yıkımından sorumlu enzim olan MAGL'yi güçlü ve selektif olarak inhibe etmektedir.

Benzodioksol grubunda bulunan ve moleküler formülü C₂₇H₂₄N₂O₉ olan JZL184, 4-nitrofenil-4-(dibenzo[d][1,3]dioksol-5-yl(hidroksi)metil)piperidin-1-karboksilat şeklinde adlandırılmaktadır ve organik çözücüler (DMSO, dimetilformamid vb.) ile çözünmektedir.

Kimyasal yapısı Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. JZL184 kimyasal yapısı (276)

Long ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada JZL184'ün, farelerde MAGL aktivitesini bloke ettiği ve bunun da beyin 2-AG seviyelerinde en az 8 saat devam eden 8 katlık bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (277). İnflamasyondaki rolü ile ilgili yapılan bir başka çalışmada 10 mg/kg i.p. uygulanan JZL184'ün, sıçan frontal korteksinde LPS ile indüklenmiş IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-10 artışını azalttığı ve yine frontal korteksteği araşidonik asit seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca, LPS ile indüklenmiş plazma TNF- α ve IL-10 seviyelerindeki artışın da JZL184 ile hafiflediği belirtilmiştir (278). JZL184'ün fare karagenan modelindeki inflamatuvar ağrı üzerine olan etkisinin incelendiği Ghosh ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise, karagenan'dan önce veya sonra uygulanan JZL184'ün karagenan kaynaklı pençe ödemini ve ağrıyı hafiflettiği tespit edilmiştir. JZL184'ün ağrıdaki azalmayı sağlayan etkisinin hem CB₁ hem de CB₂ reseptörlerini gerektirdiği, ancak anti-ödem etkisine yalnızca CB₂ reseptörlerinin aracılık ettiği ortaya konmuştur (279).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Aralık 2022-Mart 2023 tarihleri arasında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Ana bilim dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Deneyimizde kullanılan 200-250 gram (g) ağırlığında, 10-12 haftalık 50 adet erkek Wistar albino sıçan Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden temin edilmiştir. Sıçanlar standart laboratuvar koşullarında ($22 \pm 1^\circ\text{C}$ oda ısısı ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortam düzeni) yetiştirilmiş, deney süresince de günlük içme suyu ve % 21 ham protein içerikli pelet yemlerle ad libitum olarak beslenerek aynı standart laboratuvar koşulları altında tutulmuştur. Çalışmamız etik kurallara uygun olarak gerçekleştirilmiş ve hayvanlar üzerinde yapılan uygulamalar ve protokoller için Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Protokol No: 2021-25-21/09) (Ek 1). Bu çalışma, 2022-43341027-03 nolu proje olarak Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir.

3.1. ARDS Deney Modellerinin Oluşturulması

Tüm hayvanlar deney öncesi ve sakrifiye edilmeden hemen önce tartılarak ilk ve son ağırlıklar kaydedilmiştir.

3.1.1. ANTU (İndirekt ARDS) modeli

ANTU hayvanlara zeytinyağında 4 miligram/mililitre (mg/ml) olacak şekilde süspansiyon haline getirilerek uygulanmıştır. Sıçanlara 10 mg/kg dozunda i.p. uygulanan ANTU, 4 saat içinde maksimum düzeye ulaşan bir akut akciğer hasarı oluşturmaktadır. 4 saat sonunda ketamin-ksilazin anestezisi (70 mg/kg i.p. - 5 mg/kg intramüsküler (i.m.)) uygulanıp abdominal aorta kanatılarak hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Kanamanın tamamen durmasının ardından, göğüs kafesi dikkatlice açılarak plevral aralıkta birikmiş efüzyon sıvısı (ml) enjektörle çekilip miktarı ölçülmüştür (Şekil 6). Bu işlem sırasında çevre dokulardan

herhangi bir kanama olmamasına ve efüzyon sıvısına kan karışmamasına da özen gösterilmiştir.



Şekil 6. Efüzyon sıvısının ölçümü

Akciğer çıkarılıp çevre dokulardan temizlenerek hassas terazide tartılmıştır (g). Hayvanlar arası standardizasyonun sağlanabilmesi için, plevral efüzyon miktarı ve akciğer ağırlığı, vücut ağırlığına oranlanarak incelenmiştir. Efüzyon sıvısının miktarı (PE), plevral efüzyon/vücut ağırlığı (PE/VA) ve akciğer ağırlığı/vücut ağırlığı (AA/VA) oranları ARDS göstergeleri olarak değerlendirilmiştir.

3.1.2. İntratrakeal LPS (Direkt ARDS) modeli

Ketamin-ksilazin anestezisi altında, hayvanların boyun bölgesi tıraşlanarak antiseptik solüsyonla (povidon iyot) temizlenmiştir. Daha sonra supin pozisyona alınmış ve orta hattan yaklaşık 1 cm'lik kesi açılmıştır (Şekil 7). Bu kesiden künt disseksiyon ile trakea görünür hale getirilip serum fizyolojik (SF) içinde çözdürülmüş LPS (O111:B4) intratrakeal olarak 5 mg/kg dozunda instilasyon yoluyla uygulanmıştır (Şekil 8). Takiben hayvanlar dik pozisyona getirilip hafifçe sallanarak LPS'nin akciğerlere dağılması sağlanmıştır. Ardından 6.0 numara cerrahi iğne ve ipek iplik kullanılıp boyun kesisi suture ile kapatılmış ve bu bölgeye tekrar antiseptik solüsyon uygulanmıştır. Solunumlarının rahat devam edebilmesi için hayvanlar uyanana kadar kafesinde 45 derecelik açıyla yatırılmıştır (Şekil 9).



Şekil 7. LPS modeli



Şekil 8. LPS modeli



Şekil 9. LPS modeli

LPS instilasyonunu takip eden 24. saatin sonunda ketamin-ksilazin anestezisi uygulanıp abdominal aorta kanatılarak hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Kanamanın tamamen durmasının ardından, göğüs kafesi açılıp akciğerler çıkarılarak çevre dokulardan temizlendikten sonra hassas terazide tartılmıştır. Oluşan akciğer hasarının tespiti amacıyla ANTU ile uygulanan modelde olduğu gibi AA/VA oranları incelenmiş ve ARDS göstergeleri olarak değerlendirilmiştir. ANTU uygulamasından farklı olarak LPS uygulaması sonucunda plevral efüzyon oluşumu tespit edilmemiştir.

3.2. Deney Protokolü

Sıçanlar, 1'i kontrol 4'ü deney grubu olmak üzere toplam 5 gruba rastgele ve eşit sayıda (n=10) olacak şekilde ayrılmıştır (Tablo 4). Sıçanlara; 10 mg/kg dozunda ANTU i.p. olarak, 5 mg/kg dozunda LPS ise intratrakeal olarak uygulanmış ve sırasıyla indirekt ve direkt akciğer hasarı gelişimi incelenmiştir. MAGL inhibitörü JZL184 ise, ANTU ve LPS uygulamalarından 30 dakika önce i.p. olarak 10 mg/kg dozunda verilmiş ve akciğer hasarı üzerine olası koruyucu etkileri araştırılmıştır.

Tablo 4. Deney grupları

Gruplar	Kimyasallar	Uygulama Yolu
1	Kontrol	
2	ANTU (10 mg/kg)	i.p.
3	LPS (5 mg/kg)	intratrakeal
4	ANTU+JZL184 (10 mg/kg)	i.p./ i.p.
5	LPS+JZL184 (10 mg/kg)	intratrakeal/ i.p.

Histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için tüm hayvanların akciğer sol lobları, % 10 formaldehitte 2-3 gün bırakılıp fikse edilmiştir. Akciğer sağ lobları ise, % 0,9 NaCl solüsyonu ile yıkandıktan sonra alüminyum folyoya sarılıp biyokimyasal incelemelerin yapılacağı tarihe kadar -80 °C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.2.1. Biyokimyasal inceleme metodları

Dokular 1/9 oranında potasyum klorür tamponu (0,1 gr doku/0,9ml 140 mmol KCl) ile homojenize edildikten sonra 7000 rpm +4°C'de 5 dk santrifüj edilmiştir.

3.2.1.1. Akciğer dokusunda MDA tespiti (nmol/L)

MDA seviyesi, 100 °C'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona dayalı bir yöntemle belirlenmiştir. TBA test reaksiyonunda, MDA veya MDA benzeri maddeler ile TBA, reaksiyona girerek 532 nm'de maksimum absorpsiyon veren pembe bir pigment oluşturmaktadır. Reaksiyon, pH 2-3 ve 100 °C'de 15 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Numuneler, proteinin çökmesi için iki hacim soğuk % 10 (a/h) trikloroasetik asit ile karıştırılmıştır. Çökelti, santrifüj yoluyla peletlenmiş ve süpernatanın bir alikvotu, eşit hacimde % 0.67 (w/v) TBA ile kaynar su banyosunda 15 dakika reaksiyona sokulmuştur. Soğutmanın ardından absorbans 532 nm'de okunmuştur. Ölçümlerde Rel Assay Diagnostics firması tarafından üretilmiş ticari kitler kullanılmıştır.

3.2.1.2. Akciğer dokusunda SOD tespiti (U/ml)

SOD'nin rolü, oksidatif süreçler sırasında üretilen toksik radikalin hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırmaktır. Bu yöntemde, kırmızı bir formazan boyası oluşturmak üzere 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorür ile reaksiyona giren süperoksit radikallerini üretmek amacıyla ksantin ve ksantin oksidaz kullanılmıştır. Daha sonra, SOD aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülmüştür. Ölçümler Mindray BS-400 biyokimya analizörü ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.3. Akciğer dokusunda katalaz tespiti (U/ml)

Katalazın H_2O_2 'yi parçaladığı reaksiyon, amonyum molibdat tarafından hızla durdurulabilmektedir. Kalan H_2O_2 , sarımsı bir kompleks oluşturmak için amonyum molibdat ile reaksiyona girmektedir. Katalaz aktivitesi, oluşan bu sarımsı kompleksin 405 nm'de okunmasıyla ölçülmüştür. Ölçümlerde Rel Assay Diagnostics firması tarafından üretilmiş ticari kitler kullanılmıştır.

3.2.1.4. Akciğer dokusunda GSH tespiti (mg/L)

ELISA rat GSH kiti (BT-Lab) enzim bağlantılı bir immünosorbent testidir. Standartlar ve numuneler, bir monoklonal antikör ile önceden kaplanmış oyuklara eklenmiştir. Daha sonra kuyucuklara biotinle konjuge hedef antijenler konmuştur. Standartlardaki veya numunelerdeki antijenler, yakalayıcı antikora bağlanmak ve inkübe etmek için biotinle konjüge antijenle rekabet etmektedir. Bağlanmamış antijen, yıkama adımıyla uzaklaştırılmıştır. Ardından avidin-HRP eklenmiş ve inkübe edilmiştir. Bağlanmamış avidin-HRP, bir diğer yıkama adımıyla uzaklaştırılmıştır. Daha sonra TMB (Tetrametilbenzidin) substrat eklenerek renk oluşumu sağlanmıştır. Bu reaksiyon, asidik stop solüsyonu eklenerek durdurulmuş ve renk 450 nm'de ölçülebilen sarıya dönmüştür. Renk yoğunluğu, numunedeki GSH konsantrasyonu ile ters orantılı olarak gelişmiştir. Ardından numunedeki GSH konsantrasyonu, numunelerin optik yoğunluğunun standart eğri ile karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir. Ölçümlerde Bio-Tek microplate okuyucu kullanılmıştır.

3.2.2. Histopatolojik inceleme metodu (hematoksilen-eozin)

Histopatolojik inceleme için akciğerler, % 10 formaldehitte 2-3 gün bırakılıp fikse edilmiş, daha sonra değişik derecelerdeki etanol ile dehidrate edilerek ksilen ile berraklaştırılmasının ardından parafine gömülmüştür. Elde edilen parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alınmış ve bu kesitler hematoksilen-eozin ile boyanmıştır. Boyama protokolü tablo 5'te verilmiştir.

Tüm akciğer dokuları ışık mikroskobu altında histolojik olarak incelenmiş ve her kesitte 10 alan taranarak ödem, alveolar duvar kalınlaşması, interstisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, vakuolizasyon, alveolar makrofaj, hemoraji, perivasküler genişleme, konjesyon ve bronşiol lümeninde inflamatuvar hücre varlığı açısından değerlendirilmiştir. Bu parametreler 0-3 arasında skorlanmış ve 0 normal, 1 hafif hasarlı, 2 orta düzey hasarlı, 3 ağır hasarlı olarak kabul edilmiştir. Ayrıca skora dışında akciğer dokusundaki histomorfolojik değişiklikler de tespit edilmiştir (280).

Tablo 5. Akciğer dokusu için hematoksilen-eozin boyama protokolü

Kimyasal	Süresi
Toluen-1	15 dk
Toluen-2	15 dk
% 100 Alkol	1 dk
% 96 Alkol	3 dk
% 90 Alkol	3 dk
% 70 Alkol	5 dk
Durgun su	3 dk
Hematoksilen	15 dk
Asit alkol	Batır çıkar
Morartma	20 dk
Eozin	5 dk
% 70 ve % 90 Alkol	Batır çıkar
% 96 Alkol	5 dk
% 100 Alkol	2 kez 10 dk
Toluen-1 ve Toluen-2	2 kez 15 dk

3.2.3. İmmünohistokimyasal inceleme metodu

Akciğerlerde NF- κ B ve kaspaz 3 ifadelerinin immünohistokimyasal yöntemle tespit edilmesi amacı ile dokular, % 10 formaldehit çözeltisine alınıp, daha sonra elde edilen 5 μ m kalınlığındaki parafin kesitlere ABC (Avidin-Biotin Kompleks) yöntemi uygulanmıştır.

Formaldehit fiksasyonu nedeniyle ortaya çıkan antijen maskelenmesini bertaraf etmek için 1/10 oranında dilüe edilmiş sitrat buffer tamponu içerisine alınan lamlara mikrodalga fırında ısı aracılı antijen retrieval uygulanmıştır. PBS ile iki yıkamanın ardından permeabilizasyon amacıyla % 0,2 konsantrasyonda triton X ile muamele edilen kesitler, tekrar PBS ile yıkamanın ardından endojen peroksidaz aktivitesini nötralize etmek için % 3 H₂O₂ ile 20 dakika muamele edilmiştir. Tekrar PBS ile yıkanan dokulara nonspesifik bağlanmayı önlemek amacıyla yapılan 7 dk'lık Ultra V block uygulamasını takiben üretici tarafından tavsiye edilen dilüsyonlarda kaspaz-3 (Cell Signaling-Massachusetts, USA) ve NF- κ B (Novus Bio-Colorado, USA) primer antikörleri nemli bir ortamda 1 saat oda ısısında uygulanmıştır. Primer antikör aşamasından sonra, kesitler PBS'ye alınmış, ardından uygun sekonder antikör ile 30 dk muamele edildikten sonra tekrar PBS'ye alınan kesitlere 20 dk Streptavidin peroksidaz kompleksi uygulanmıştır. Süre bitiminde PBS'ye alınan kesitlere mikroskop altında kromojen olarak diaminobenzidine (DAB) uygulanmıştır. Ardından zıt

boyama Mayer's hematoksilen ile yapılmış ve kesitler alkol serilerinden geçirilip, toluen ile muamale edildikten sonra entellan ile kapatılmıştır. Son olarak Zeiss marka Axio Lab araştırma mikroskobu kullanılarak H-SCORE yapılmıştır. Böylece ekspresyon düzeyleri semikantitatif (0: boyanma yok; 1+: zayıf fakat tespit edilebilir boyanma; 2+: orta ya da belirgin boyanma; 3+: yoğun boyanma) olarak değerlendirilmiştir.

3.3. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.3.1. ANTU

Moleküler formülü C₁₁H₁₀N₂S olan ANTU (Sigma-45328), rodentisit olarak geliştirilmiştir ve pulmoner ödem, plevral efüzyon ve pulmoner yetmezliğe bağlı ölüme neden olan kimyasal bir ajandır. Standart bir ARDS deney modelinde i.p. olarak uygulanan ANTU, 4 saat içinde maksimum düzeyde akciğer ödemi ve plevral efüzyon geliştirmektedir. Deneyimizde “indirekt ARDS modeli” oluşturmak amacıyla kullanılmıştır.

3.3.2. LPS

Endotoksin olarak da bilinen LPS (Sigma-L2630, Escherichia coli O111:B4), esas olarak gram-negatif bakterilerin dış membranında lokalizedir. İçeriğinde yer alan Lipid A, LPS'nin pirojenik doğasına katkıda bulunmaktadır. Etkili bir immünostimülan olan LPS, Toll benzeri reseptör 4'ü (TLR4) aktive ederek inflamatuvar ve immün yanıtları indüklemektedir. Çalışmamızda “direkt ARDS modeli” oluşturmak amacıyla kullanılmıştır.

3.3.3. Olive oil (saf zeytinyağı)

Olive oil (Sigma-O1514); fenolik bileşen, skualen glukozit ve tekli doymamış uzun zincirli yağ asitleri bakımından zengindir ve oksidasyona meyilli değildir. Deneyimizde ANTU çözücüsü olarak kullanılmıştır.

3.3.4. Serum fizyolojik (% 0.9 NaCl- salin solüsyonu)

% 0.9 sodyum klorür (NaCl) ve su karışımı olan serum fizyolojik, i.v. yolla dehidratasyonu tedavi etmek için kullanılan ana çözeltilerdir. Çalışmamızda LPS çözücüsü olarak kullanılmıştır.

3.3.5. JZL184

JZL 184 (Cayman-13158) 2-AG'nin araşidonik asit ve gliserole yıkımından sorumlu enzim olan MAGL'nin selektif inhibitörüdür. Çalışmamızdaki "tedavi edici ajandır".

3.3.6. Dimetil sülfoksit (DMSO)

Formülü (CH₃)₂SO olan DMSO, renksiz bir organokükürt bileşimidir ve hem polar hem apolar bileşiklere çözebilmektedir. Deneyimizde etanol ile birlikte 1:1 oranında JZL184 çözücüsü olarak kullanılmıştır.

3.3.7. Etanol

Kimyasal formülü C₂H₆O olan etanol; uçucu, yanıcı ve renksiz bir sıvıdır. Çalışmamızda DMSO ile birlikte 1:1 oranında JZL184 çözücüsü olarak kullanılmıştır.

3.3.8 Ketamin

Ketamin (Ketalar 500 mg/10ml, Pfizer) NMDA reseptör antagonistidir ve i.p. yolla 70 mg/kg dozunda anestezi amacıyla kullanılmıştır.

3.3.9 Ksilazin

Ksilazin (Xylazinbio % 2, Bioveta) alfa-2 reseptör agonistidir ve i.m. yolla 5 mg/kg dozunda anestezi amacıyla kullanılmıştır.

3.4. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 19.0 (Chicago, ABD) paket programıyla yapılmıştır. Çalışmada yer alan nicel değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler ortanca, minimum ve maksimum değerleriyle; nitel değişkenler frekans ve yüzde ile verilmiştir. Nicel değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile incelenmiştir. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerin bağımsız grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Anlamli çıkan değişkenler için 2'li alt grup karşılaştırmalarında Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Nitel değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında Fisher-Freeman-Halton ki-kare testi kullanılmıştır. Çalışmadaki tüm istatistiksel analizlerde, p değeri 0,05'in altındaki sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Kontrol Grubu (Sağlıklı) Akciğerler

Sağlıklı sıçan akciğerlerinde hemoraji, ödem ve plevral efüzyon saptanmamıştır. Makroskopik olarak açık pembe görünümde (Şekil 25,26). Histopatolojik incelemede de normal görünümlü akciğer dokusu mevcuttur (Şekil 40).

4.2. ANTU'nun Akciğer Üzerine Etkisi (İndirekt Model)

ANTU, sıçanlara 10 mg/kg dozunda i.p. olarak uygulandıktan 4 saat sonra; akciğerlerin makroskopik olarak hemorajik ve ödemli görünümde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 27-30). AA/VA oranında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış tespit edilmiştir ($p<0.001$). AA/VA oranı kontrol grubunda ortanca (minimum-maksimum) cinsinden 46,0 (36,2-53,6), ANTU grubunda ise 112,75 (86,04-169,33) olarak saptanmıştır (Tablo 6, Şekil 10).

Sağlıklı kontrol grubunda plevral efüzyon saptanmamıştır. ANTU verilen grupta, eksuda özelliğinde ve hemorajik olmayan efüzyon gelişimi tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ANTU grubunda istatistiksel olarak anlamlı miktarda plevral efüzyon (PE) gelişimi 4,75 ml (3,5-5,7) gözlenmiştir ($p<0.001$) (Tablo 7, Şekil 11). PE/VA oranında da, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış tespit edilmiştir ($p<0.001$). PE/VA oranı ANTU grubunda 194,23 (134,61-241,02) olarak tespit edilmiştir (Tablo 8, Şekil 12). Ödem sıvısı Şekil 27'de ok ile gösterilmiştir.

Biyokimyasal incelemelerde, ANTU grubunda akciğer dokusunda MDA seviyesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş ($p=0.024$) (Tablo 9, Şekil 13), SOD seviyesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edilmiştir ($p=0.05$) (Tablo 10, Şekil 14). Katalaz ve GSH seviyelerinde ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 11,12 ve Şekil 15,16).

Histopatolojik incelemede, ANTU grubunda hematoksilen-eozin boyamada akciğer dokusunda belirgin perivasküler genişleme, alveol içi ve septal ödem, alveolar duvar kalınlaşması ve buna bağlı vakualizasyonlar, konjesyon, alveol içi kanama alanları ile artmış

alveol içi makrofajlar görülmüştür. İnflamatuvar hücre olarak lenfosit hakimiyeti mevcuttur (Şekil 41-47).

ANTU grubunda, ödem ($p<0.001$), alveolar duvar kalınlaşması ($p<0.001$), interstisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ($p<0.001$), vakuolizasyon ($p=0.001$), alveolar makrofaj ($p<0.001$), hemoraji ($p<0.001$), perivasküler genişleme ($p<0.001$) ve konjesyon ($p=0.001$), kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır (Tablo 13-20, Şekil 17-22). Bronşiol lümeninde inflamatuvar hücre tespit edilmemiştir (Tablo 21).

İmmünohistokimyasal incelemede, ANTU grubunda özellikle alveolar duvar dokusunda kontrol grubuna göre NF- κ B ($p<0.001$) ve kaspaz-3 ($p<0.001$) boyanmasında istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (Tablo 22,23 ve Şekil 23,24,65-68).

4.3. LPS'nin Akciğer Üzerine Etkisi (Direkt Model)

LPS, sıçanlara 5 mg/kg dozunda intratrakeal olarak uygulandıktan sonra; akciğerlerin makroskopik olarak hiperemik görünümde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 31,32). AA/VA oranında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış tespit edilmiştir ($p=0.002$). AA/VA oranı kontrol grubunda 46,0 (36,2-53,6), LPS grubunda ise 70,27 (55,64-98,78) olarak saptanmıştır (Tablo 6, Şekil 10). Plevral efüzyon tespit edilmemiştir (Tablo 7, Şekil 11).

Biyokimyasal incelemelerde, LPS grubunda akciğer dokusunda MDA, SOD, katalaz ve GSH seviyelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 9-12, Şekil 13-16).

Histopatolojik incelemede, LPS grubunda hematoksilen-eozin boyamada akciğer dokusunda belirgin vasküler konjesyon, hemoraji, perivasküler genişleme, peribronşioler dokuda ve bronşiol lümeninde başta nötrofil olmak üzere artmış inflamatuvar hücreler, bronşiol lümeninde yer yer eritrosit varlığı, daha çok septumlarda lokalize makrofajlar ve alveolar duvar kalınlaşması ile buna bağlı vakualizasyonlar görülmüştür. Epitelde belirgin bir değişiklik olmamakla birlikte bazı epitel hücrelerinde kondanse çekirdekler, yer yer deskuamasyon ve lamina propriada nötrofiller tespit edilmiştir (Şekil 48-58).

LPS grubunda, ödem ($p=0.006$), alveolar duvar kalınlaşması ($p<0.001$), interstisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ($p<0.001$), vakuolizasyon ($p<0.001$),

alveolar makrofaj ($p<0.001$), hemoraji ($p<0.001$), perivasküler genişleme ($p<0.001$), konjesyon ($p<0.001$) ve bronşiol lümeninde inflamatuvar hücre varlığı ($p<0.001$) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır (Tablo 13-21, Şekil 17-22).

İmmünohistokimyasal incelemede, LPS grubunda özellikle bronşiol epiteli ve çevresinde inflamatuvar hücre infiltrasyonuna eşlik eden, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış NF- κ B ($p<0.001$) ve kaspaz-3 ($p<0.001$) boyanması görülmüştür (Tablo 22,23 ve Şekil 23,24,65-68).

4.4. ANTU (İndirekt Model) ve LPS'nin (Direkt Model) Akciğer Üzerine Etkilerindeki Farklılıklar

Pulmoner ödem ve plevral efüzyon değerlendirmesinde AA/VA oranı, ANTU grubunda LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). AA/VA oranı ANTU grubunda 112,75 (86,04-169,33), LPS grubunda ise 70,27 (55,64-98,78) olarak saptanmıştır (Tablo 6, Şekil 10). Plevral efüzyon ANTU grubunda mevcutken LPS grubunda tespit edilmemiştir (Tablo 7, Şekil 11).

Biyokimyasal incelemelerde akciğer dokusunda SOD seviyesi, ANTU grubunda LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p=0.001$). MDA, katalaz ve GSH seviyelerinde ise iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 9-12, Şekil 13-16).

Histopatolojik incelemede, ödem ($p<0.001$) ve perivasküler genişleme ($p<0.001$) LPS grubuyla karşılaştırıldığında, ANTU grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (Tablo 13,19 ve Şekil 17). LPS grubunda bronşiol lümeninde inflamatuvar hücre mevcutken, ANTU grubunda bronşiol lümeninde inflamatuvar hücre tespit edilmemiştir ($p<0.001$, Tablo 21) ve bu bulgu, direkt akciğer hasar modelinde epitel etkilenmesinin ön planda olduğunu göstermektedir (Şekil 56,57). Diğer histopatolojik değişkenlerde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 14-18,20 ve Şekil 18-22).

İmmünohistokimyasal incelemede kaspaz-3 boyanması, LPS grubuyla karşılaştırıldığında ANTU grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.001$) (Tablo 23, Şekil 24). NF- κ B boyanmasında ise iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 22, Şekil 23). NF- κ B ve

kaspaz-3 boyanması, ANTU grubunda daha çok alveolar duvar dokusunda, LPS grubunda ise bronşiol epiteli ve çevresinde yoğun izlenmiştir. Bu bulgu, indirekt akciğer hasar modelinde endotel, direkt akciğer hasar modelinde ise epitel etkilenmesinin ön planda olduğunu göstermektedir (Şekil 65-68).

4.5. JZL184'ün ANTU ile Oluşturulan Akciğer Hasarı Üzerine Etkileri

JZL184 sıçanlara 10 mg/kg dozunda i.p. olarak uygulandıktan sonra, ANTU tedavi grubundaki akciğerlerin makroskopik olarak ANTU grubundaki akciğerlere göre daha az hemorajik ve ödemli görünümde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bazı bölgelerde sağlıklı akciğer dokusuna benzer şekilde açık pembe alanlar görülmüştür (Şekil 33-36). AA/VA oranında, ANTU grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan düşüş tespit edilmiştir ($p>0.05$). AA/VA oranı ANTU grubunda 112,75 (86,04-169,33), ANTU tedavi grubunda ise 95,41 (50,92-145,14) olarak saptanmıştır (Tablo 6, Şekil 10).

ANTU grubu ile karşılaştırıldığında (4,75 ml), ANTU tedavi grubunda, plevral efüzyon gelişiminde belirgin oranda düşüş saptanmıştır (2,3 ml) fakat bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Plevral efüzyon gelişimi ANTU tedavi grubunda 2,3 ml (0-4,8) olarak tespit edilmiştir (Tablo 7, Şekil 11). Benzer şekilde, PE/VA oranında da, ANTU grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan düşüş tespit edilmiştir ($p>0.05$). PE/VA oranı ANTU grubunda 194,23 (134,61-241,02), ANTU tedavi grubunda ise 103,87 (0-192) olarak saptanmıştır (Tablo 8, Şekil 12).

Biyokimyasal incelemelerde, ANTU tedavi grubunda akciğer dokusunda MDA, SOD ve GSH seviyelerinde ANTU grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Katalaz seviyesi ise ANTU tedavi grubunda ANTU grubuna göre artmış ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 9-12, Şekil 13-16).

Histopatolojik incelemede, ANTU tedavi grubunda hematoksilen-eozin boyamada sınırlı alanda alveol içi ve septal ödem ile hafif perivasküler genişleme içeren normale yakın görünümde akciğer dokusu tespit edilmiştir (Şekil 59-61). Ödem ($p=0.018$), interstisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ($p=0.033$) ve perivasküler genişleme ($p<0.001$) ANTU grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır (Tablo 13,15,19 ve Şekil 17,19). Alveolar duvar kalınlaşması, vakuolizasyon, alveolar makrofaj, hemoraji ve konjesyonda ise

ANTU grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan düşüş tespit edilmiştir ($p>0.05$) (Tablo 14,16-18,20 ve Şekil 18,20-22). Bronşiol lümeninde inflamatuvar hücre tespit edilmemiştir (Tablo 21).

İmmünohistokimyasal incelemede, ANTU tedavi grubunda özellikle alveolar duvar dokusunda ANTU grubuna göre NF- κ B ($p=0.033$) ve kaspaz-3 ($p=0.031$) boyanmasında istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmüştür (Tablo 22,23 ve Şekil 23,24,65-68).

4.6. JZL184'ün LPS ile Oluşturulan Akciğer Hasarı Üzerine Etkileri

JZL184 sıçanlara 10 mg/kg dozunda i.p. olarak uygulandıktan sonra, LPS tedavi grubundaki akciğerlerin makroskopik olarak LPS grubundaki akciğerlere göre daha az hiperemik görünümde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bazı bölgelerde sağlıklı akciğer dokusuna benzer şekilde açık pembe alanlar görülmüştür (Şekil 37-39). AA/VA oranında, LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). AA/VA oranı LPS grubunda 70,27 (55,64-98,78), LPS tedavi grubunda ise 78,25 (56,06-87,56) olarak saptanmıştır (Tablo 6, Şekil 10). Plevral efüzyon tespit edilmemiştir (Tablo 7, Şekil 11).

Biyokimyasal incelemelerde, LPS tedavi grubunda akciğer dokusunda MDA ve SOD seviyelerinde LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Katalaz seviyesi, LPS tedavi grubunda LPS grubuna göre artmış ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). GSH seviyesi ise LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır ($p<0.001$) (Tablo 9-12, Şekil 13-16).

Histopatolojik incelemede, LPS tedavi grubunda hematoksilen-eozin boyamada hafif duvar kalınlaşması içeren normal görünümlü alveoller, ılımlı vazokonjesyon ve lümenleri inflamatuvar hücre içermeyen normal görünümlü bronşioler tespit edilmiştir (Şekil 62,63). Bronşiol epitelinde yer yer deskuamasyon, lamina propria da nötrofil varlığı ile bazı epitel hücrelerinde kondanse çekirdeklerin bulunduğu LPS grubunun aksine LPS tedavi grubundaki bronşiol epiteli normal görünümde (Şekil 64). Ödem ($p=0.03$), perivasküler genişleme ($p<0.001$) ve bronşiol lümeninde inflamatuvar hücre varlığı ($p<0.001$), LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır (Tablo 13,19,21 ve Şekil 17). Alveolar duvar kalınlaşması, interstisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, vakuolizasyon, alveolar makrofaj, hemoraji ve konjesyonda ise LPS grubuna göre

istatistiksel olarak anlamlı olmayan düşüş tespit edilmiştir ($p>0.05$) (Tablo 14-18,20 ve Şekil 18-22).

İmmünohistokimyasal incelemede, LPS tedavi grubunda özellikle bronşiol epiteli ve çevresinde, LPS grubuna göre NF- κ B ($p=0.033$) ve kaspaz-3 ($p=0.027$) boyanmasında istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmüştür (Tablo 22,23 ve Şekil 23,24,65-68).

4.7. JZL184'ün ANTU (İndirekt Model) ve LPS (Direkt Model) ile Oluşturulan Akciğer Hasarları Üzerine Etkilerindeki Farklılıklar

JZL184, ANTU ile oluşturulan ARDS modelinde PE oluşumu, AA/VA ve PE/VA oranlarında düşüş sağlamıştır fakat bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). LPS ile oluşturulan ARDS modelinde ise AA/VA oranında anlamlı düzeyde bir değişiklik sağlamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 6-8, Şekil 10-12).

Biyokimyasal incelemelerde, ANTU ile oluşturulan ARDS modelinde akciğer dokusundaki MDA, SOD ve GSH seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değiştirmemiştir ($p>0.05$). Katalaz seviyesini ise artırmış ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). LPS ile oluşturulan ARDS modelinde ise MDA ve SOD seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değiştirmemiştir ($p>0.05$). Katalaz seviyesini ise artırmış ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). GSH seviyesini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırmıştır ($p<0.001$) (Tablo 9-12, Şekil 13-16).

JZL184, histopatolojik incelemede, ANTU ile oluşturulan ARDS modelinde akciğer dokusunda ödem ($p=0.018$), perivasküler genişleme ($p<0.001$) ve interstisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ($p=0.033$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmışken; LPS ile oluşturulan ARDS modelinde ödem ($p=0.03$), perivasküler genişleme ($p<0.001$) ve bronşiol lümeninde inflamatuvar hücre varlığını ($p<0.001$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır (Tablo 13,15,19,21 ve Şekil 17,19).

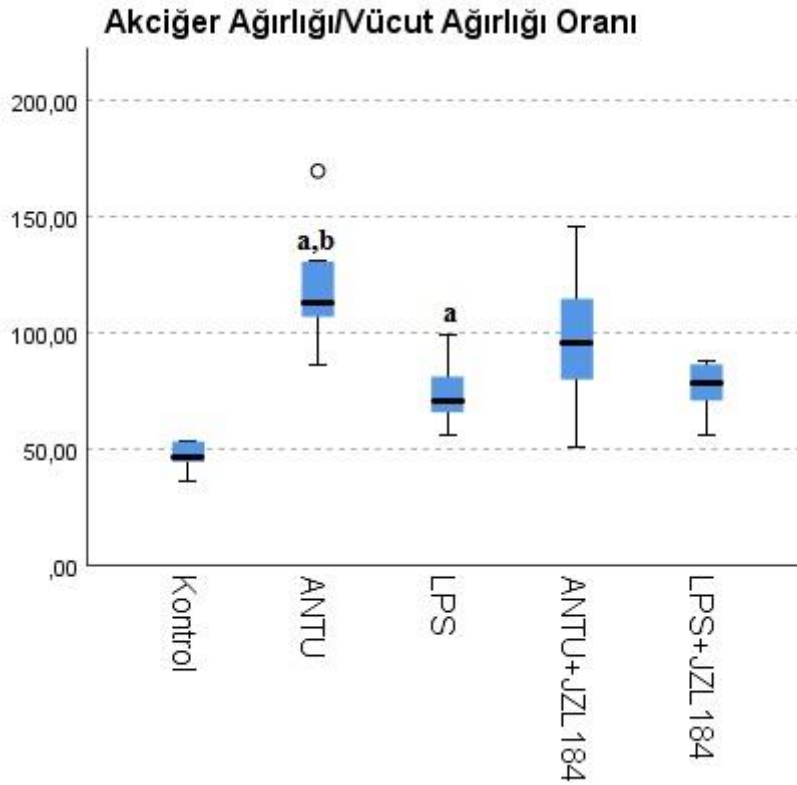
JZL184, immünohistokimyasal incelemede, hem ANTU hem de LPS ile oluşturulan ARDS modellerinde akciğer dokusunda NF- κ B ($p=0.033$, $p=0.033$) ve kaspaz-3 ($p=0.031$, $p=0.027$) boyanmasını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır (Tablo 22,23 ve Şekil 23,24). Bu azalma, patoloji gruplarındaki boyanma yoğunluğuyla uyumlu

olarak ANTU tedavi grubunda daha çok alveolar duvar dokusunda iken LPS tedavi grubunda ise özellikle bronşiol epiteli ve çevresinde izlenmiştir (Şekil 65-68).

Tablo 6. AA/VA oranlarının gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	ANTU	LPS	ANTU+JZL 184	LPS+JZL 184	p
AA/VA	46,00 (36,20-53,60)	112,75 (86,04-169,33) ^{a,b}	70,27 (55,64-98,78) ^a	95,41 (50,92-145,14)	78,25 (56,06-87,56)	<0.05

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: Kontrol grubuna, b: LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

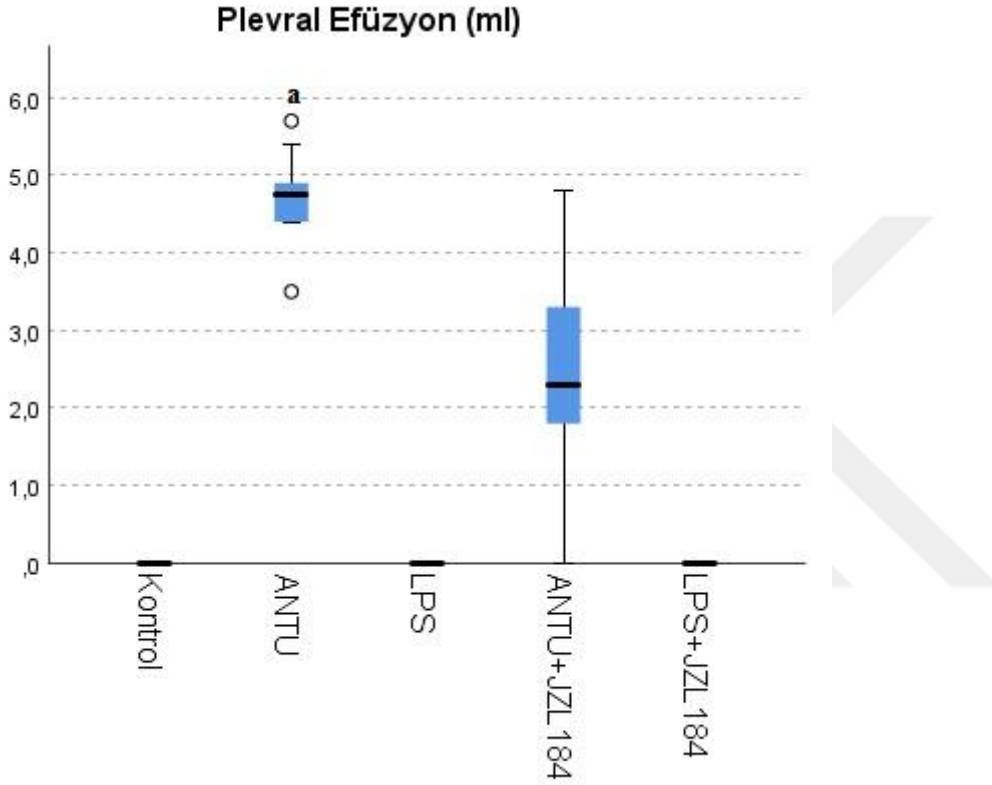


Şekil 10. AA/VA oranlarının gruplar arası karşılaştırması. a: Kontrol grubuna, b: LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 7. Plevral efüzyon (PE) miktarının (ml) gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	ANTU	LPS	ANTU+JZL 184	LPS+JZL 184	p
PE (ml)	0,00 (0,00-0,00)	4,75 (3,50-5,70) ^a	0,00 (0,00-0,00)	2,30 (0,00-4,80)	0,00 (0,00-0,00)	<0,05

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

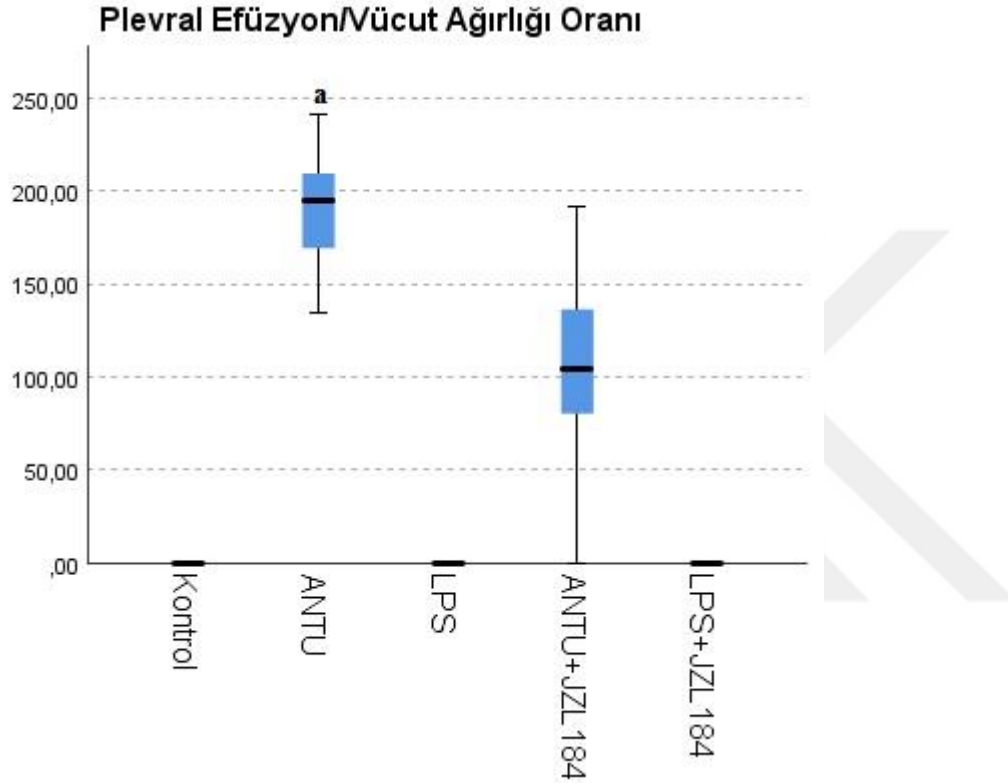


Şekil 11. PE miktarının (ml) gruplar arası karşılaştırması. a: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 8. PE/VA oranlarının gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	ANTU	LPS	ANTU+JZL 184	LPS+JZL 184	p
PE/VA	0,00 (0,00-0,00)	194,23 (134,61-241,02) ^a	0,00 (0,00-0,00)	103,87 (0,00-192,00)	0,00 (0,00-0,00)	<0,05

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

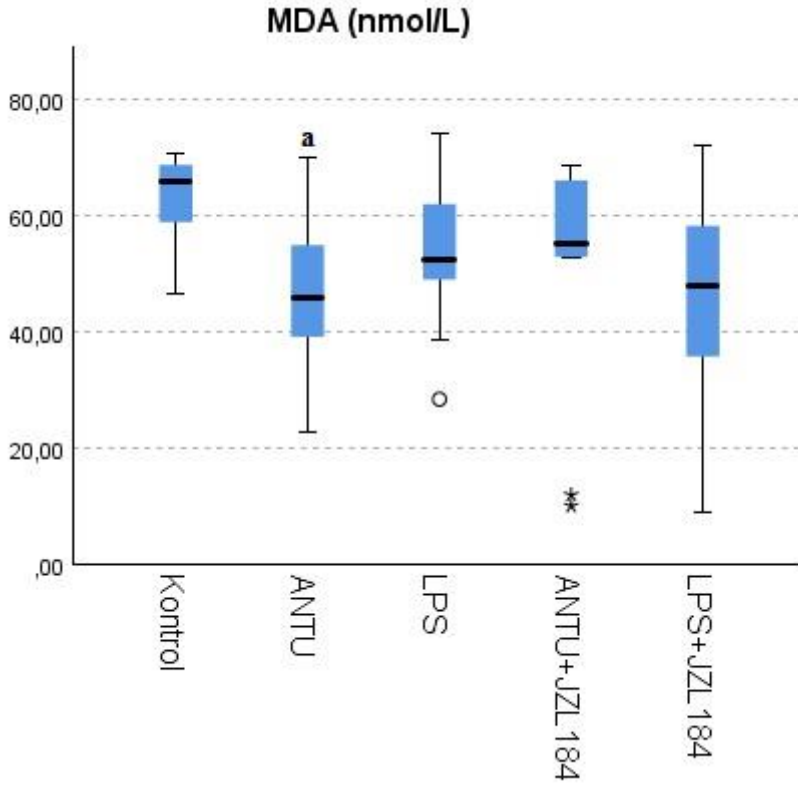


Şekil 12. PE/VA oranlarının gruplar arası karşılaştırması. a: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 9. MDA seviyesinin gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	ANTU	LPS	ANTU+JZL 184	LPS+JZL 184	p
MDA (nmol/L)	65,92 (46,60-70,70)	45,70 (22,70-70,02) ^a	52,41 (28,34-74,07)	55,13 (10,00-68,56)	47,81 (8,97-72,00)	<0.05

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

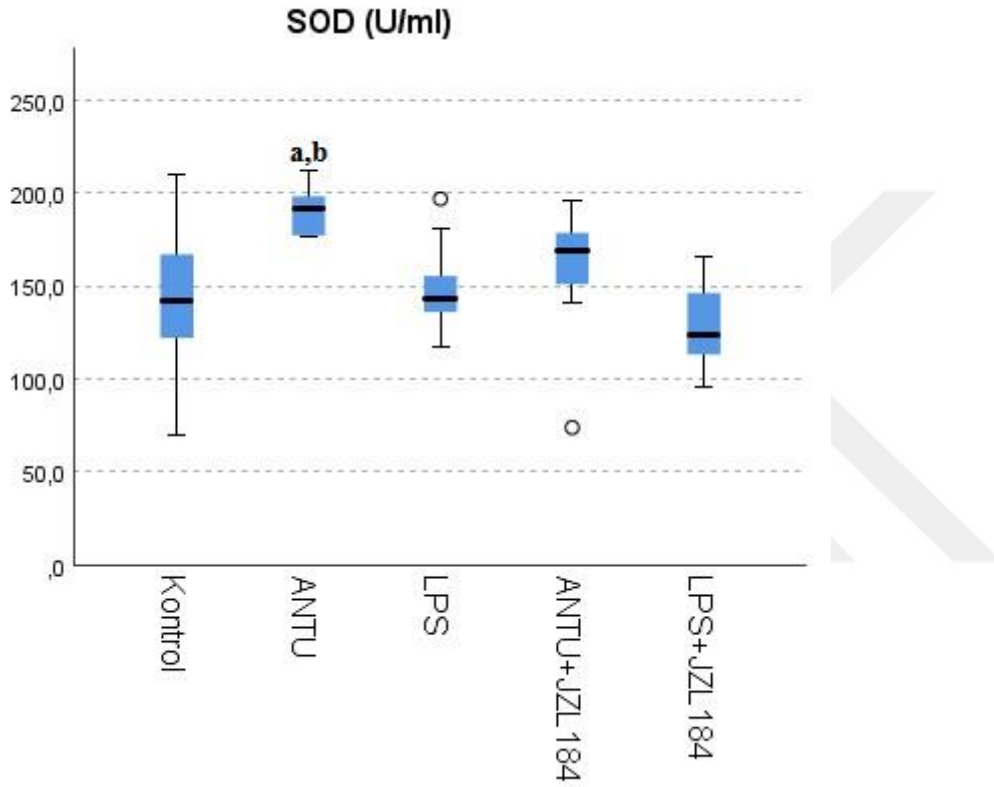


Şekil 13. MDA seviyesinin gruplar arası karşılaştırması. a: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 10. SOD seviyesinin gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	ANTU	LPS	ANTU+JZL 184	LPS+JZL 184	p
SOD (U/ml)	142,15 (69,90-209,70)	191,20 (176,10-212,30) ^{a,b}	143,15 (117,50-196,70)	169,15 (73,90-196,00)	123,80 (95,60-165,70)	<0.05

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: Kontrol grubuna, b: LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

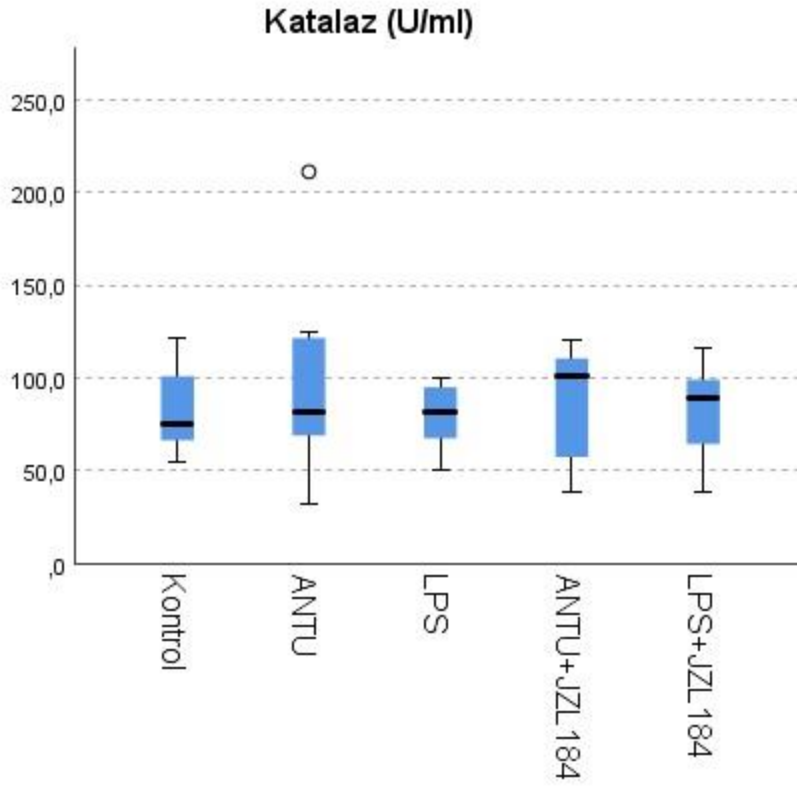


Şekil 14. SOD seviyesinin gruplar arası karşılaştırması. a: Kontrol grubuna, b: LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 11. Katalaz seviyesinin gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	ANTU	LPS	ANTU+JZL 184	LPS+JZL 184	p
Katalaz (U/ml)	75,50 (54,50-121,50)	81,50 (32,50-211,00)	81,75 (51,00-100,00)	101,50 (38,50-120,50)	89,25 (38,50-116,50)	>0,05

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir.

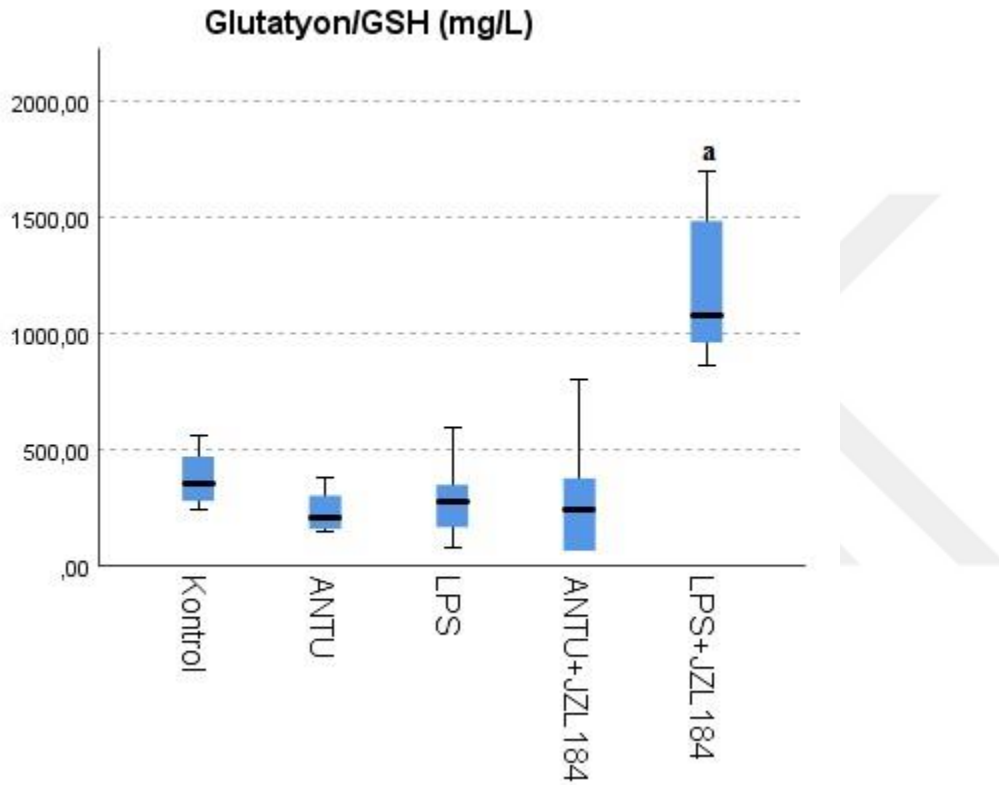


Şekil 15. Katalaz seviyesinin gruplar arası karşılaştırması.

Tablo 12. GSH seviyesinin gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	ANTU	LPS	ANTU+JZL 184	LPS+JZL 184	p
GSH (mg/L)	350,72 (236,45-556,43)	203,64 (142,74-380,57)	275,83 (78,53-595,71)	239,33 (63,56-800,29)	1077,88 (863,01-1691,46) ^a	<0.05

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

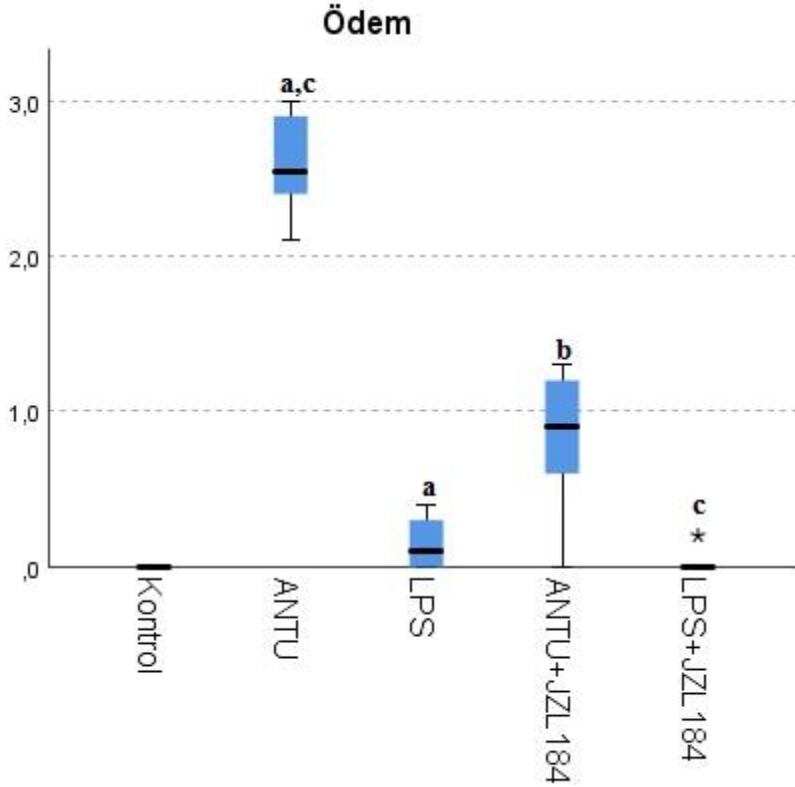


Şekil 16. GSH seviyesinin gruplar arası karşılaştırması. a: LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 13. Ödemin gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	ANTU	LPS	ANTU+JZL 184	LPS+JZL 184	p
Ödem	0,00 (0,00-0,00)	2,55 (2,10-3,00) ^{a,c}	0,10 (0,00-0,40) ^a	0,90 (0,00-1,30) ^b	0,00 (0,00- 0,20) ^c	<0,05

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: Kontrol grubuna, b: ANTU grubuna, c: LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

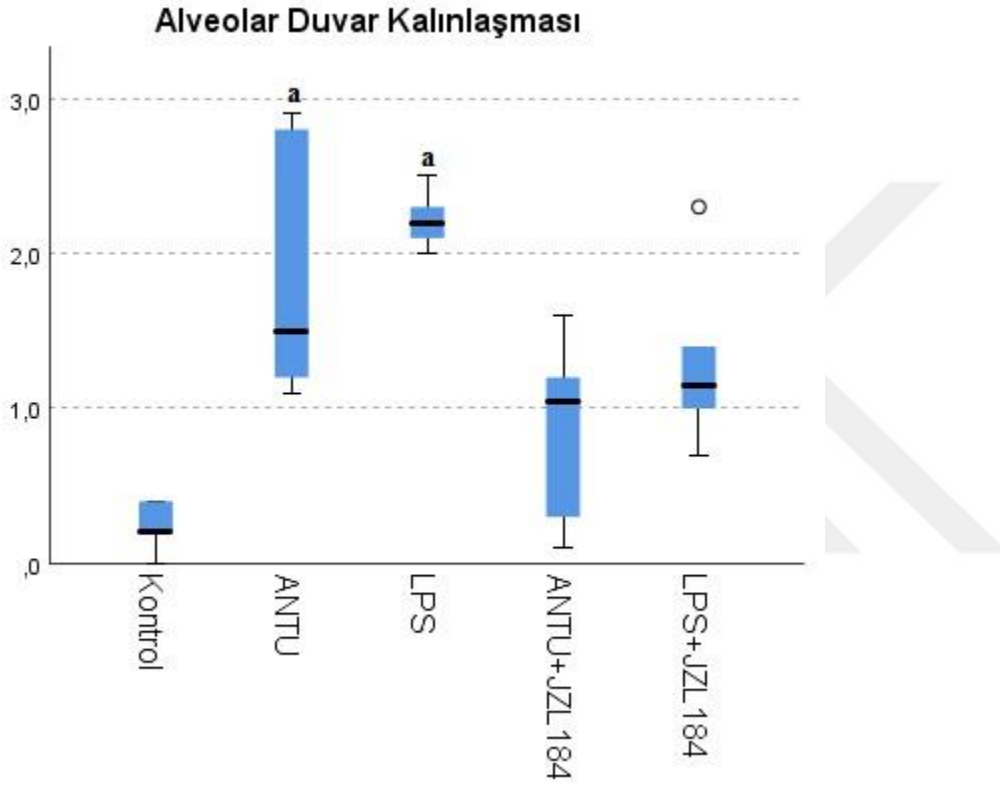


Şekil 17. Ödemin gruplar arası karşılaştırması. a: Kontrol grubuna, b: ANTU grubuna, c: LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 14. Alveolar duvar kalınlaşmasının gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	ANTU	LPS	ANTU+JZL 184	LPS+JZL 184	p
Alveolar duvar kalınlaşması	0,20 (0,00-0,40)	1,50 (1,10-2,90) ^a	2,20 (2,00-2,50) ^a	1,05 (0,10-1,60)	1,15 (0,70-2,30)	<0.05

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.



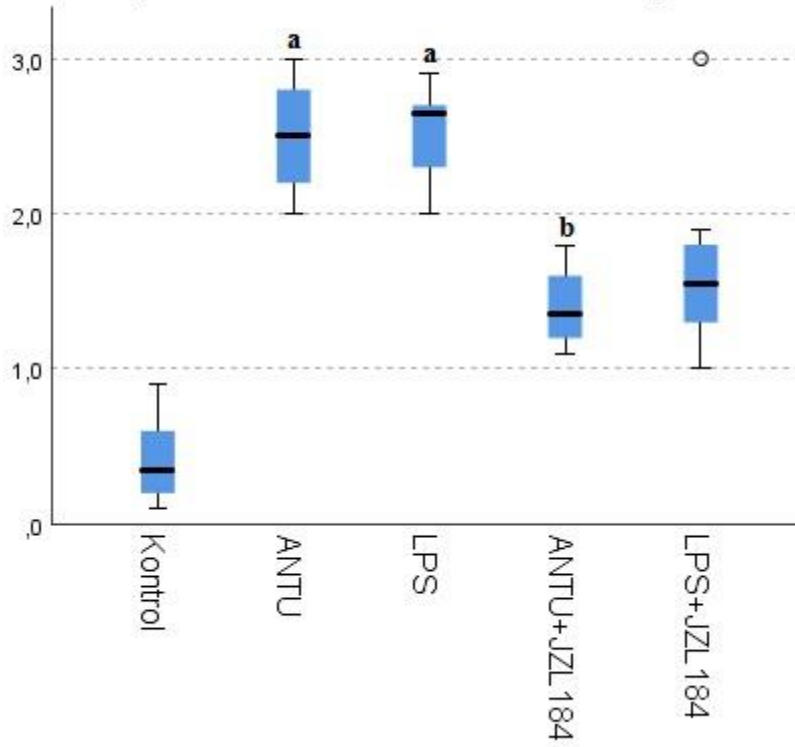
Şekil 18. Alveolar duvar kalınlaşmasının gruplar arası karşılaştırması. a: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 15. İnterstisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonunun gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	ANTU	LPS	ANTU+JZL 184	LPS+JZL 184	p
İnterstisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonu	0,35 (0,10-0,90)	2,50 (2,00-3,00) ^a	2,65 (2,00-2,90) ^a	1,35 (1,10-1,80) ^b	1,55 (1,00-3,00)	<0.05

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: Kontrol grubuna, b: ANTU grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

İnterstisyumda İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu

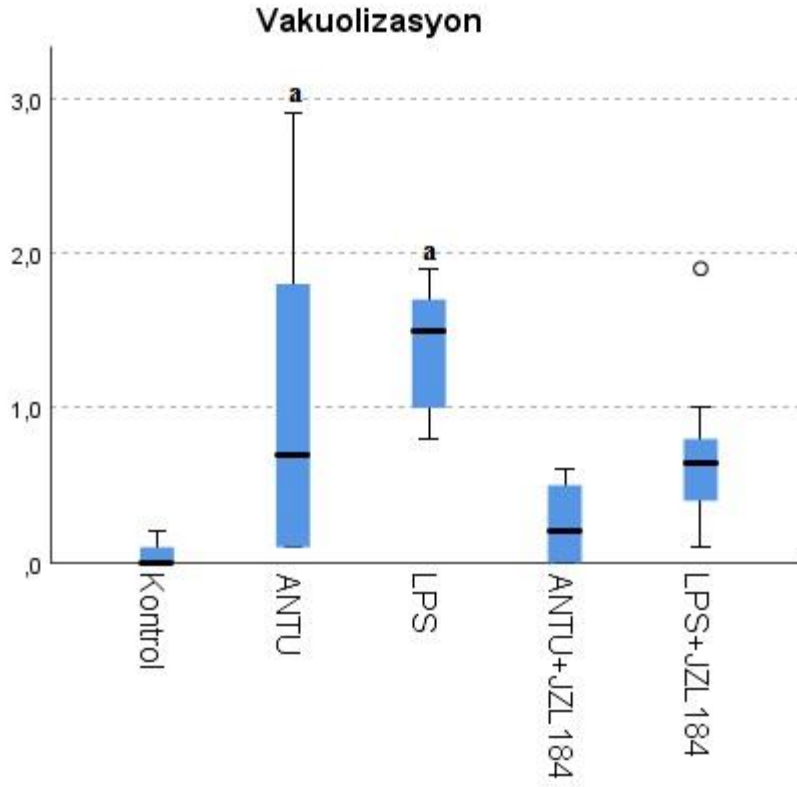


Şekil 19. İnterstisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonunun gruplar arası karşılaştırması. a: Kontrol grubuna, b: ANTU grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 16. Vakuolizasyonun gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	ANTU	LPS	ANTU+JZL 184	LPS+JZL 184	p
Vakuolizasyon	0,00 (0,00- 0,20)	0,70 (0,10-2,90) ^a	1,50 (0,80-1,90) ^a	0,20 (0,00-0,60)	0,65 (0,10-1,90)	<0.05

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

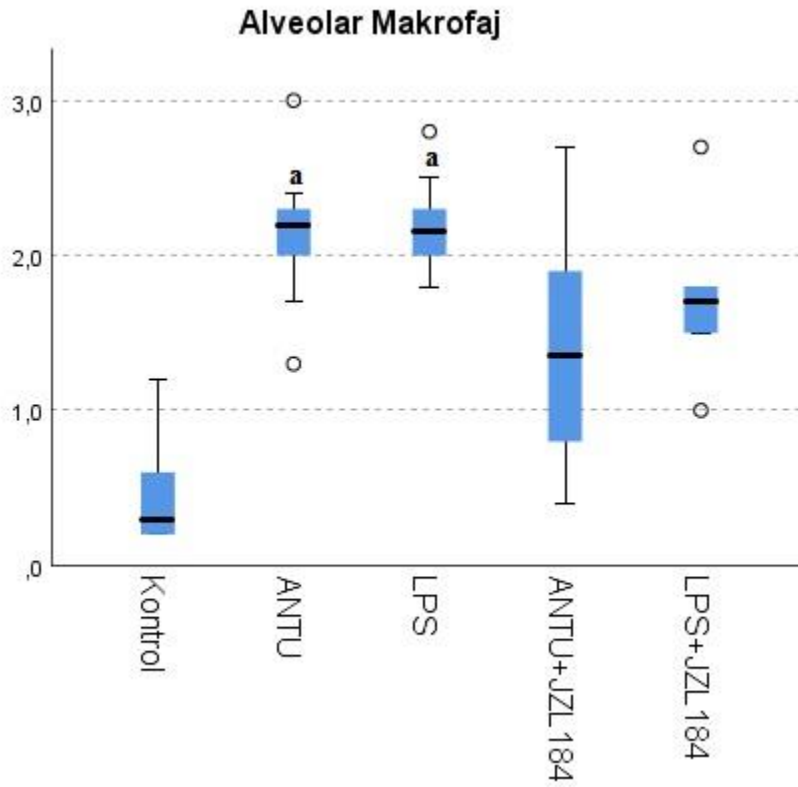


Şekil 20. Vakuolizasyonun gruplar arası karşılaştırması. a: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 17. Alveolar makrofajın gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	ANTU	LPS	ANTU+JZL 184	LPS+JZL 184	p
Alveolar makrofaj	0,30 (0,20-1,20)	2,20 (1,30-3,00) ^a	2,15 (1,80-2,80) ^a	1,35 (0,40-2,70)	1,70 (1,00-2,70)	<0.05

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

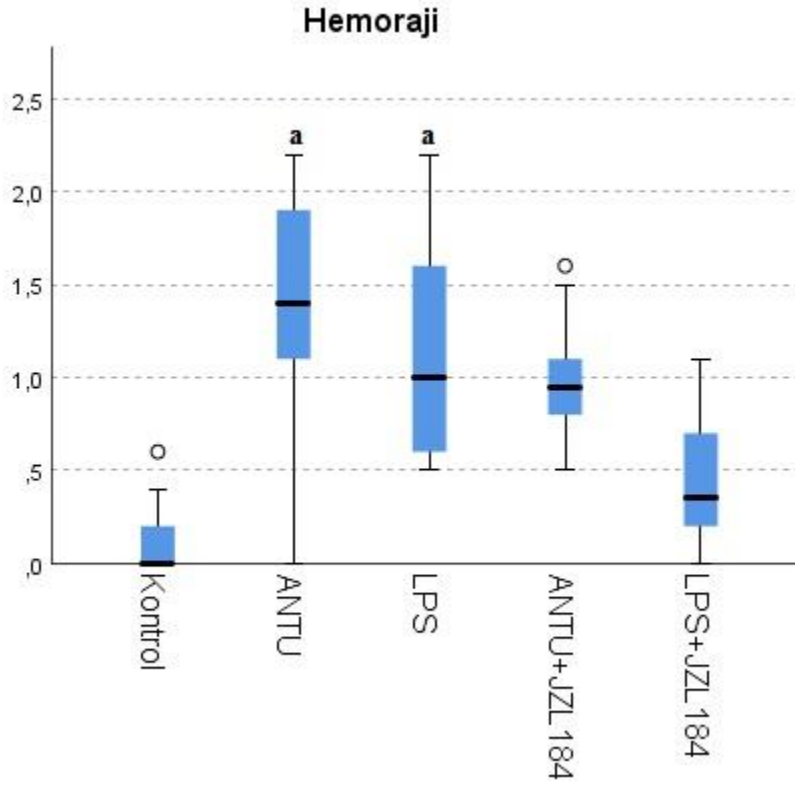


Şekil 21. Alveolar makrofajın gruplar arası karşılaştırması. a: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 18. Hemorajinin gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	ANTU	LPS	ANTU+JZL 184	LPS+JZL 184	p
Hemoraji	0,00 (0,00-0,60)	1,40 (0,00-2,20) ^a	1,00 (0,50-2,20) ^a	0,95 (0,50-1,60)	0,35 (0,00-1,10)	<0.05

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 22. Hemorajinin gruplar arası karşılaştırması. a: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 19. Perivasküler genişlemenin gruplar arası karşılaştırması

		Kontrol	ANTU^{a,c}	LPS^a	ANTU+JZL184^b	LPS+JZL184^c
Normal	Sayı	10	0	2	0	8
	Grup içi yüzde (%)	% 100	% 0	% 20	% 0	% 80
Hafif	Sayı	0	0	8	2	2
	Grup içi yüzde (%)	% 0	% 0	% 80	% 20	% 20
Orta	Sayı	0	0	0	5	0
	Grup içi yüzde (%)	% 0	% 0	% 0	% 50	% 0
Ağır	Sayı	0	10	0	3	0
	Grup içi yüzde (%)	% 0	% 100	% 0	% 30	% 0
Toplam	Sayı	10	10	10	10	10
	Grup içi yüzde (%)	% 100	% 100	% 100	% 100	% 100

Değerler frekans ve yüzde olarak verilmiştir. a: Kontrol grubuna, b: ANTU grubuna, c: LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 20. Konjesyonun gruplar arası karşılaştırması

		Kontrol	ANTU^a	LPS^a	ANTU+JZL184	LPS+JZL184
Normal	Sayı	5	0	0	0	0
	Grup içi yüzde (%)	% 50	% 0	% 0	% 0	% 0
Hafif	Sayı	5	3	0	5	3
	Grup içi yüzde (%)	% 50	% 30	% 0	% 50	% 30
Orta	Sayı	0	4	5	5	3
	Grup içi yüzde (%)	% 0	% 40	% 50	% 50	% 30
Ağır	Sayı	0	3	5	0	4
	Grup içi yüzde (%)	% 0	% 30	% 50	% 0	% 40
Toplam	Sayı	10	10	10	10	10
	Grup içi yüzde (%)	% 100	% 100	% 100	% 100	% 100

Değerler frekans ve yüzde olarak verilmiştir. a: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 21. Bronşiol lümeninde inflamatuvar hücre varlığının gruplar arası karşılaştırması

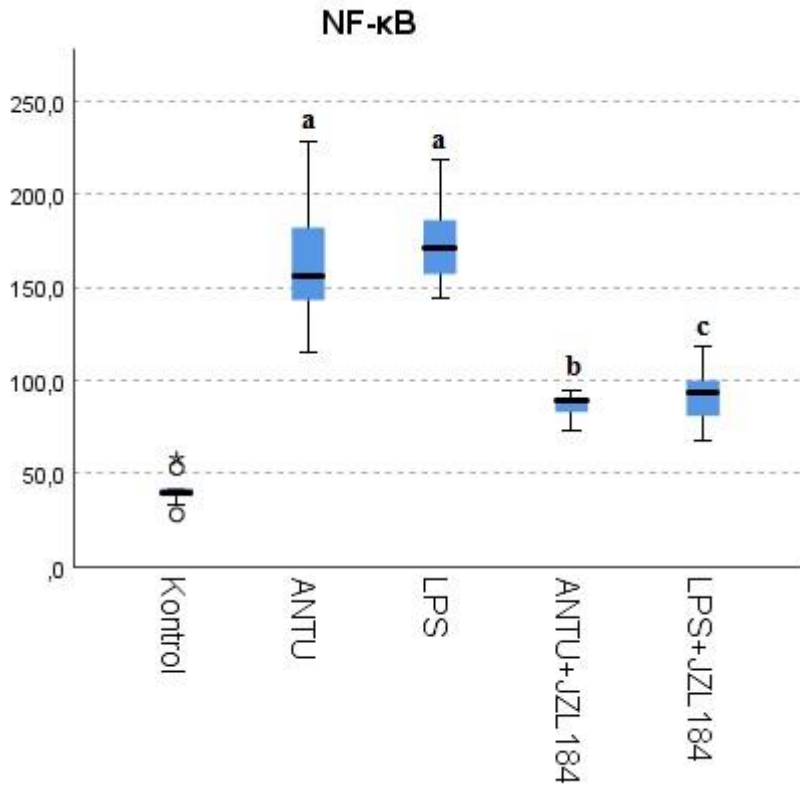
		Kontrol	ANTU^b	LPS^a	ANTU+JZL184	LPS+JZL184^b
Normal	Sayı	10	10	0	10	0
	Grup içi yüzde (%)	% 100	% 100	% 0	% 100	% 0
Hafif	Sayı	0	0	1	0	8
	Grup içi yüzde (%)	% 0	% 0	% 10	% 0	% 80
Orta	Sayı	0	0	3	0	1
	Grup içi yüzde (%)	% 0	% 0	% 30	% 0	% 10
Ağır	Sayı	0	0	6	0	1
	Grup içi yüzde (%)	% 0	% 0	% 60	% 0	% 10
Toplam	Sayı	10	10	10	10	10
	Grup içi yüzde (%)	% 100	% 100	% 100	% 100	% 100

Değerler frekans ve yüzde olarak verilmiştir. a: Kontrol grubuna, b: LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 22. NF-κB boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması

	Kontrol	ANTU	LPS	ANTU+JZL 184	LPS+JZL 184	p
NF-κB	39,50 (28,00-58,00)	155,50 (115,00-228,00) ^a	171,50 (144,00-218,00) ^a	89,50 (73,00-95,00) ^b	93,00 (68,00-118,00) ^c	<0.05

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: Kontrol grubuna, b: ANTU grubuna, c: LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

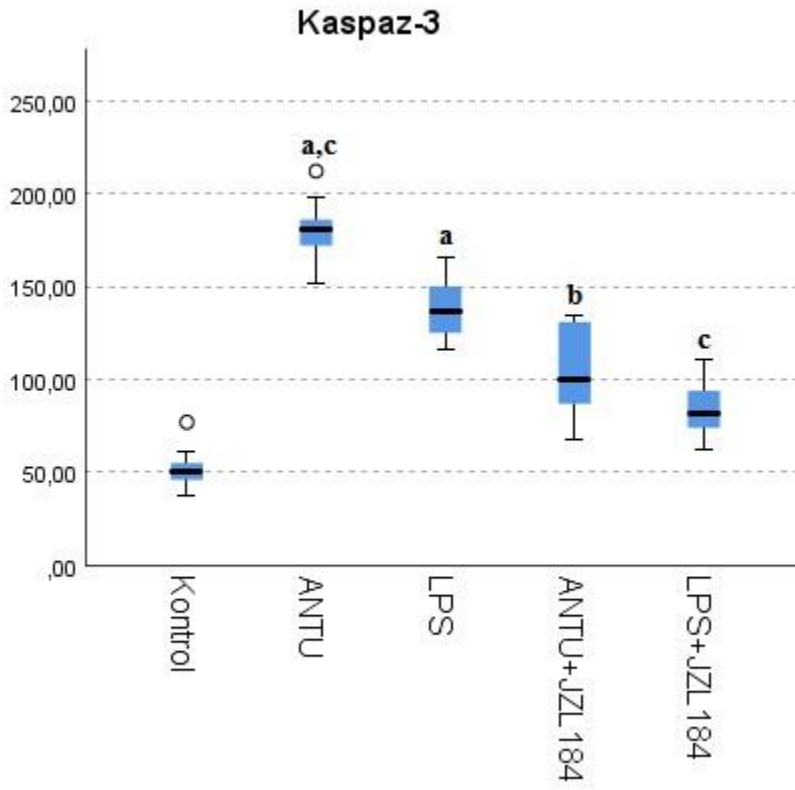


Şekil 23. NF-κB boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması. a: Kontrol grubuna, b: ANTU grubuna, c: LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 23. Kaspaz-3 boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması

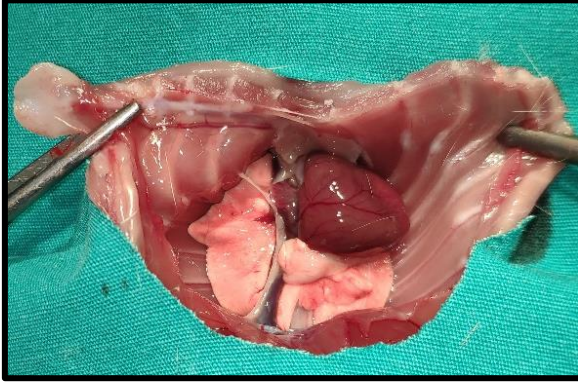
	Kontrol	ANTU	LPS	ANTU+JZL 184	LPS+JZL 184	p
Kaspaz-3	51,00 (38,00-77,00)	181,00 (152,00-212,00) ^{a,c}	137,00 (116,00-166,00) ^a	100,00 (68,00-134,00) ^b	81,50 (62,00-111,00) ^c	<0.05

Değerler ortanca (min.-max.) olarak verilmiştir. a: Kontrol grubuna, b: ANTU grubuna, c: LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 24. Kaspaz-3 boyanma yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırması. a: Kontrol grubuna, b: ANTU grubuna, c: LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

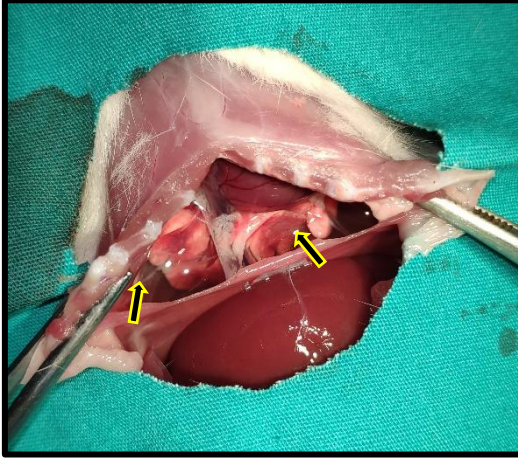
4.8. Makroskopik Görüntüler



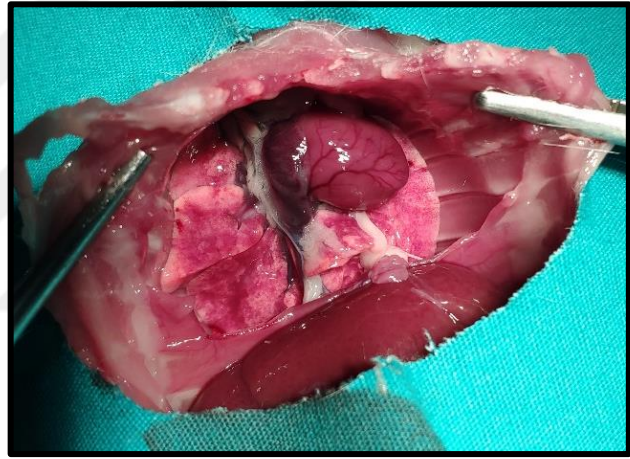
Şekil 25. Kontrol



Şekil 26. Kontrol



Şekil 27. ANTU



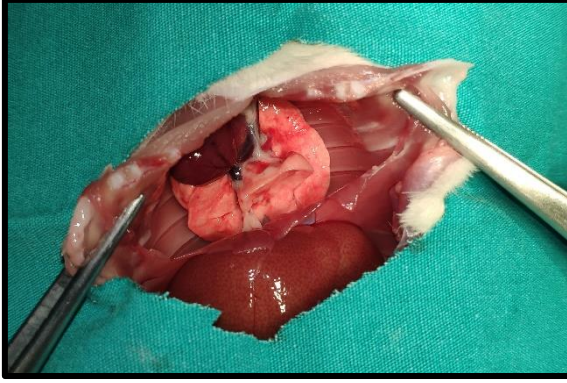
Şekil 28. ANTU



Şekil 29. ANTU



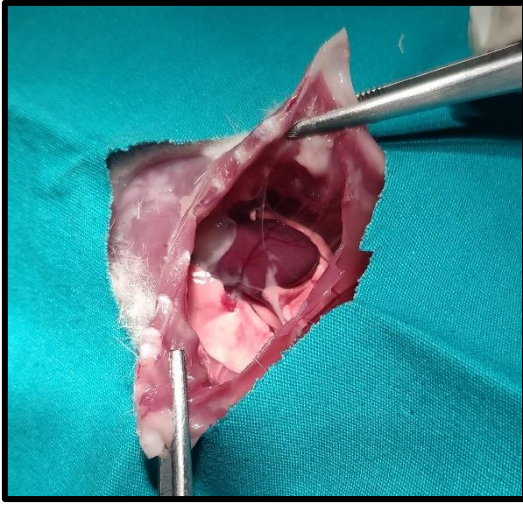
Şekil 30. ANTU



Şekil 31. LPS



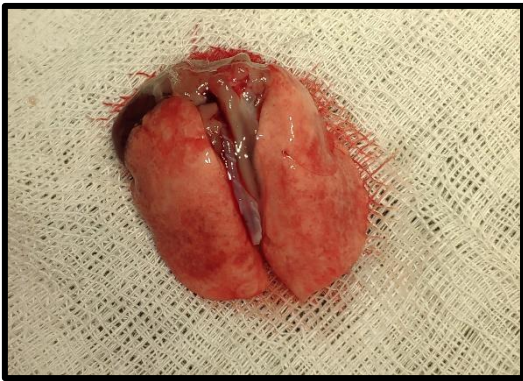
Şekil 32. LPS



Şekil 33. ANTU tedavi



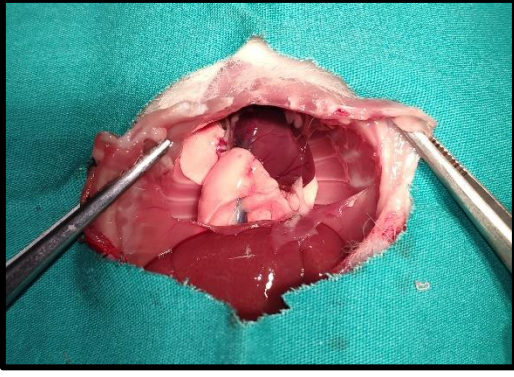
Şekil 34. ANTU tedavi



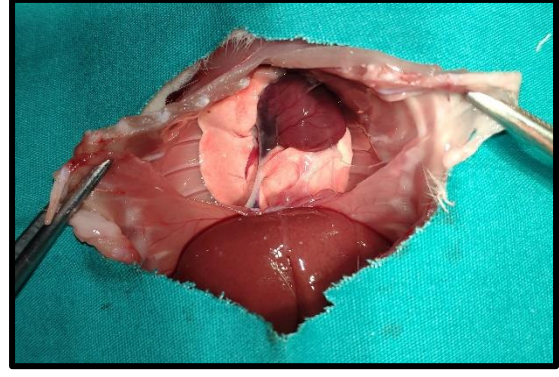
Şekil 35. ANTU tedavi



Şekil 36. ANTU tedavi



Şekil 37. LPS tedavi



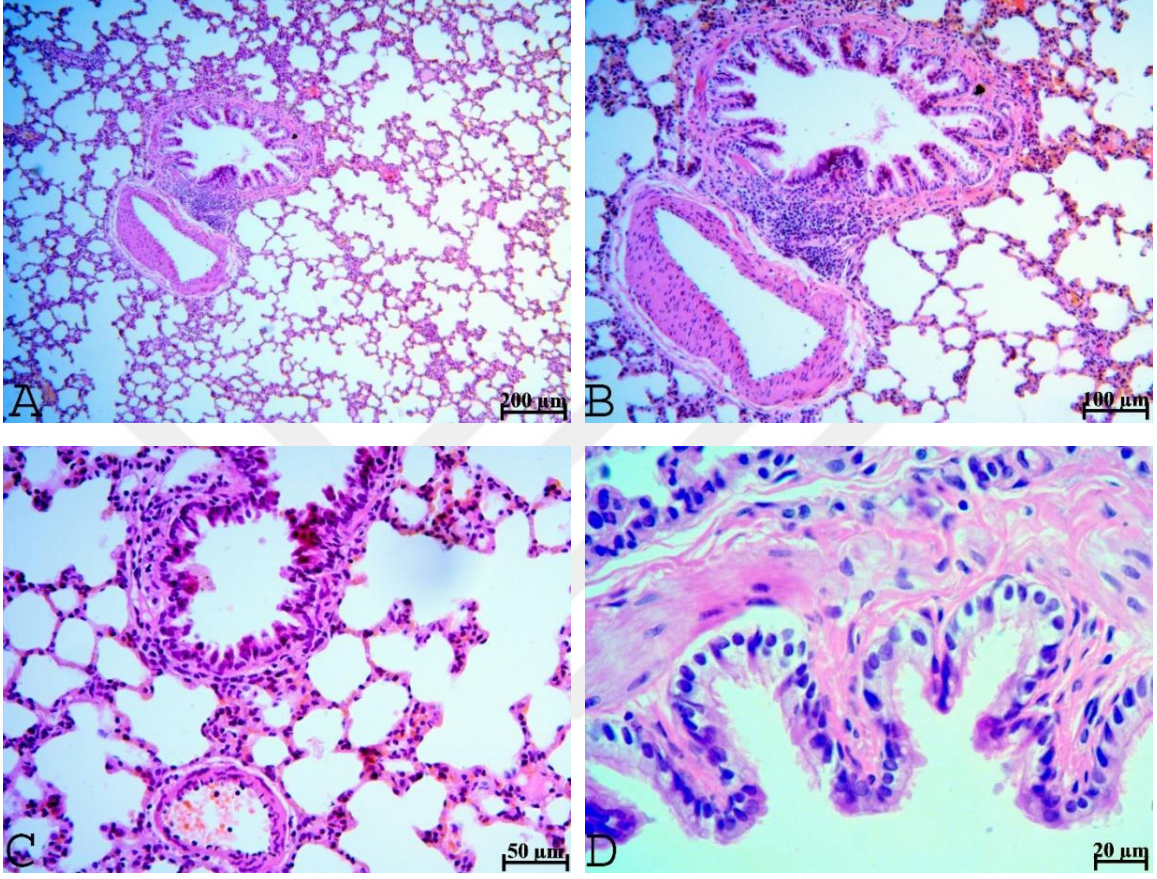
Şekil 38. LPS tedavi



Şekil 39. LPS tedavi

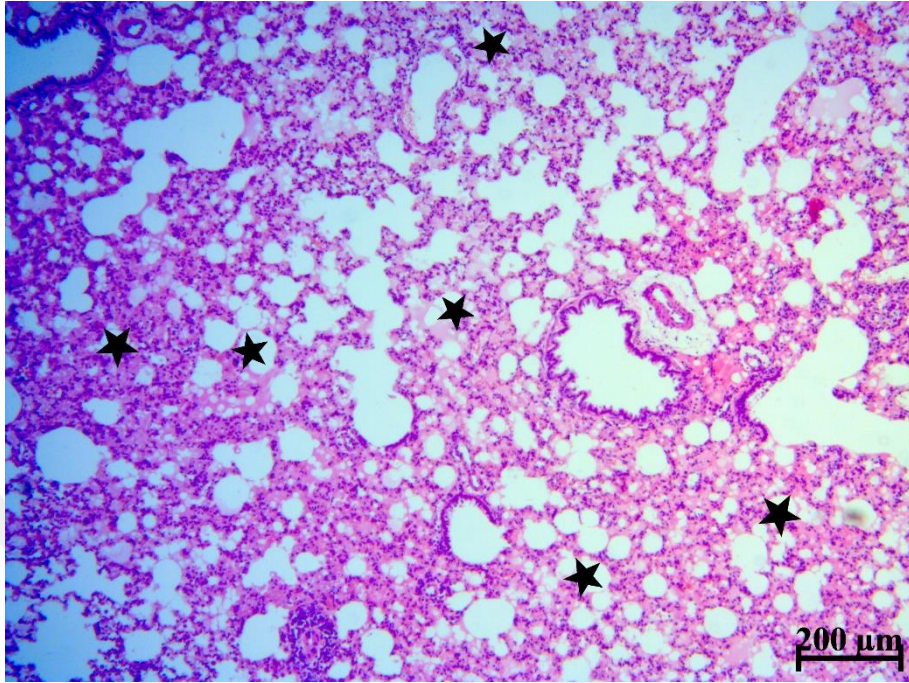
4.9. Hematoksilen-Eozin Görüntüleri

4.9.1. Kontrol grubu

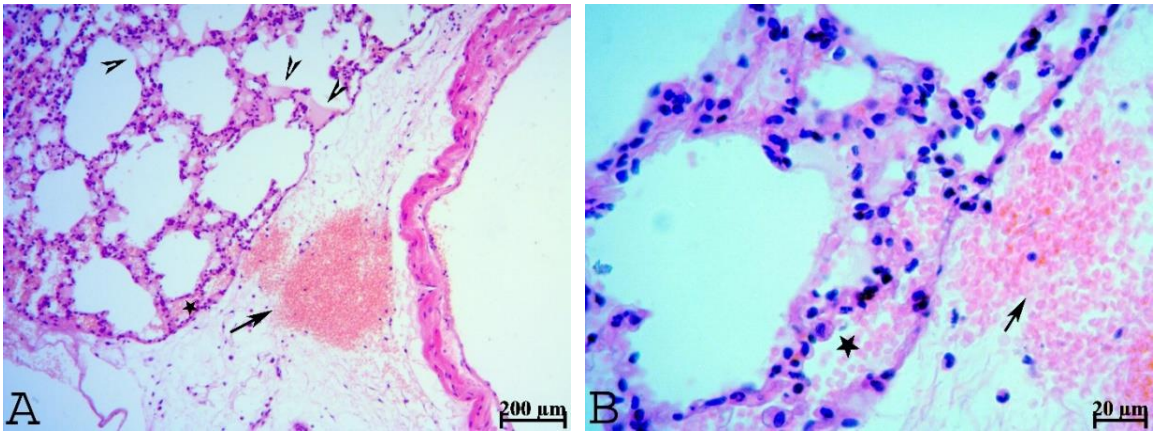


Şekil 40. Kontrol grubuna ait normal görünümlü akciğer doku kesitleri. A-C: Normal kalınlıkta alveolar septumlar, normal görünümlü alveolar kese ve duktuslar, vasküler konjesyonun eşlik etmediği arter ve arteriyoller, olağan duvar yapısına sahip bronşioller. D: Normal görünümlü bronşiol epiteli (Ölçek çubuğu=A:200 µm, B:100 µm, C:50 µm, D:20 µm).

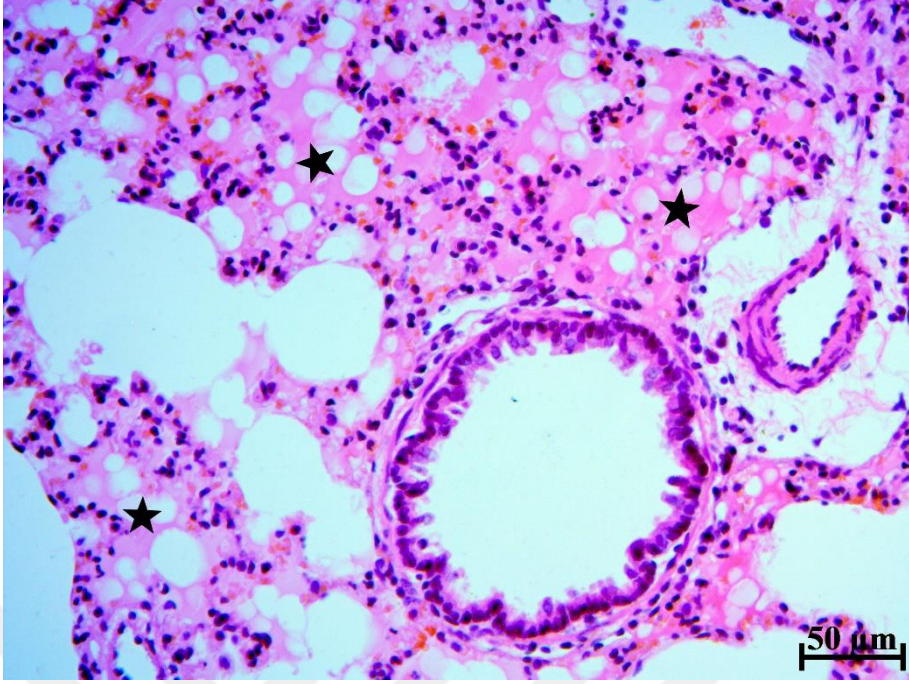
4.9.2. ANTU grubu



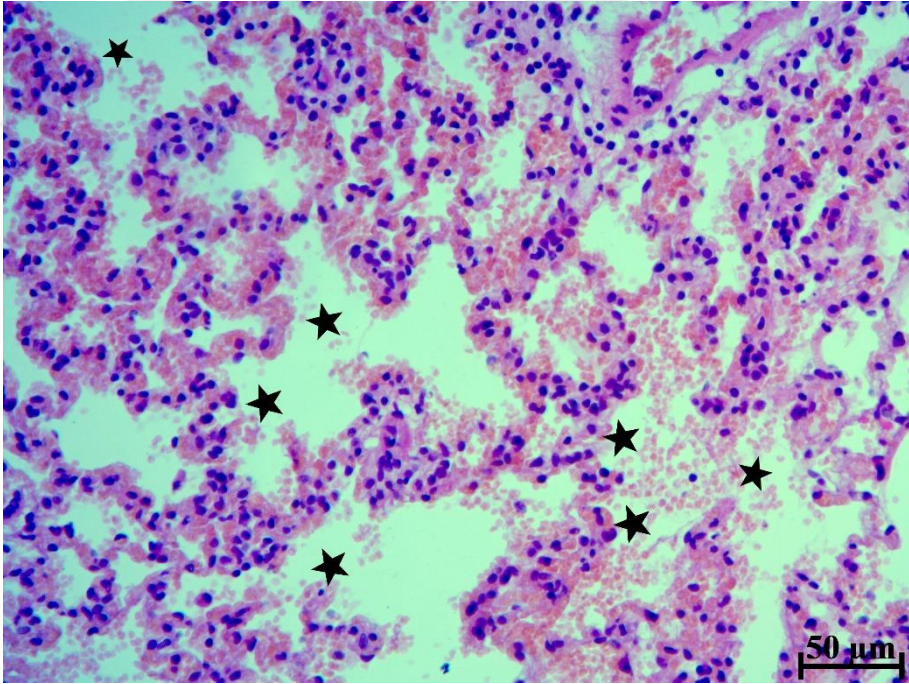
Şekil 41. ANTU grubuna ait doku görüntüsünde yaygın alveol içi ödem ve vakuolizasyon alanları (yıldız). (Ölçek çubuğu:200 µm).



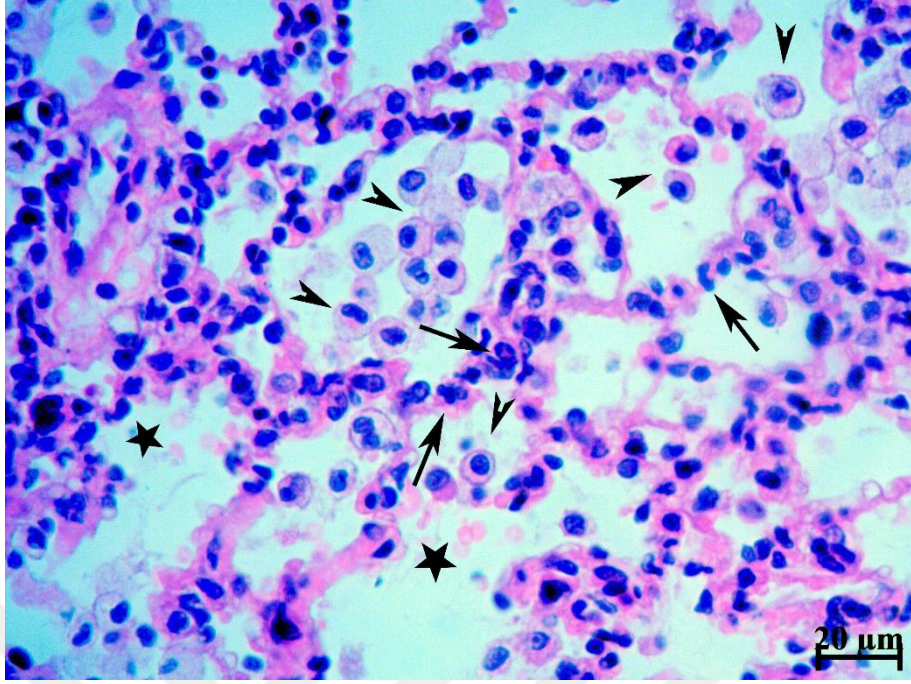
Şekil 42. Postkapiller venülde konjesyon (yıldız) ve komşuluğundaki orta çaplı venin adventisyası içerisine kanama (ok) (Ölçek çubuğu=A:200 µm, B:20 µm).



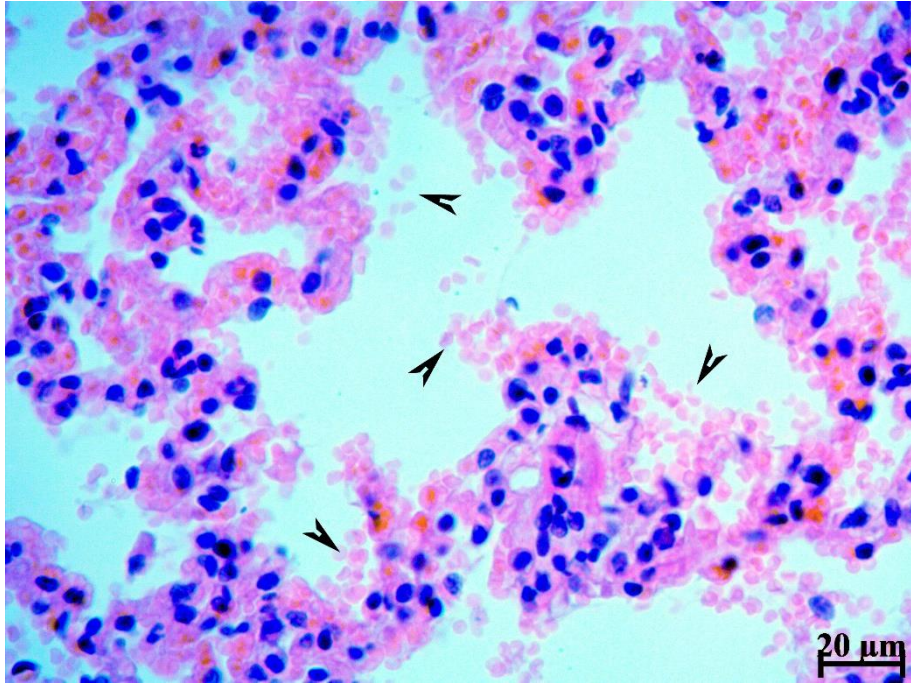
Şekil 43. Yaygın alveol içi ve septal ödem ile vakuolizasyonlar (yıldız) (Ölçek çubuğu:50 µm).



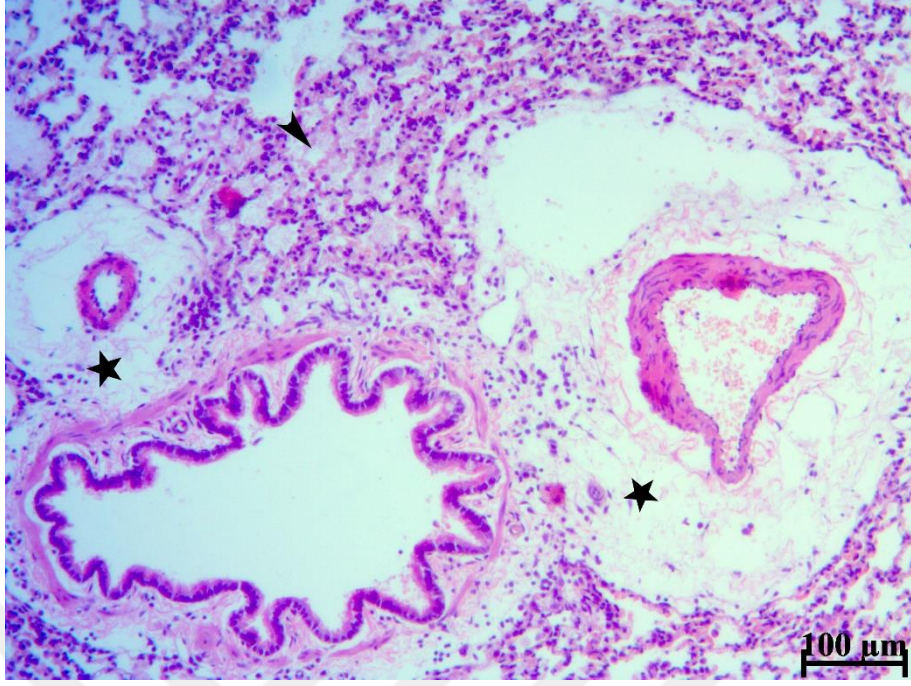
Şekil 44. Yaygın alveol içi kanama alanları (yıldız) (Ölçek çubuğu:50 µm).



Şekil 45. Alveol içi kanamaya işaret eden eritrositler (yıldız), yoğun alveol içi makrofaj varlığı (ok başı) ve alveolar duvarda inflamatuvar hücre infiltrasyonları (ok) (Ölçek çubuğu:20 µm).

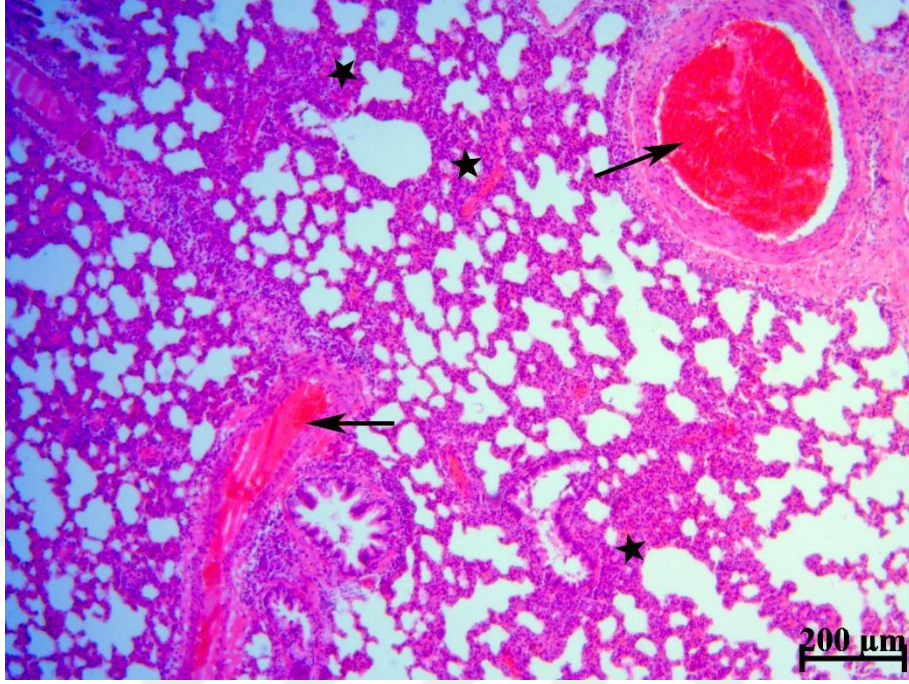


Şekil 46. Alveol içi kanamaya işaret eden eritrositler (ok başı) ve alveolar duvarda inflamatuvar hücre infiltrasyonları (Ölçek çubuğu:20 µm).

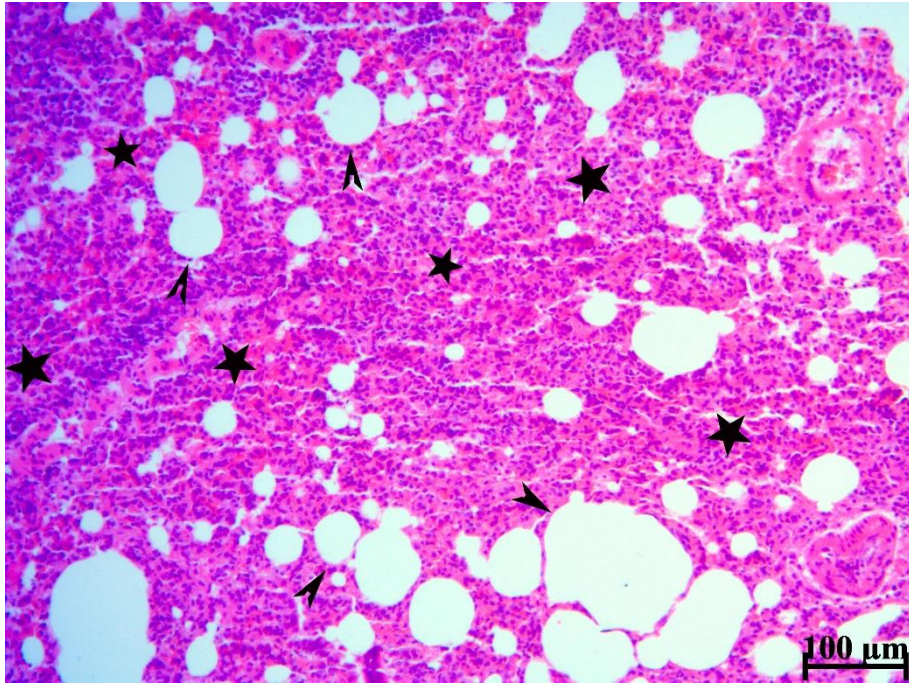


Şekil 47. Küçük arter ve arteriölün ileri derecede genişlemiş adventisyası (yıldız) ve yaygın alveol içi ödem (ok başı) (Ölçek çubuğu: 100 µm).

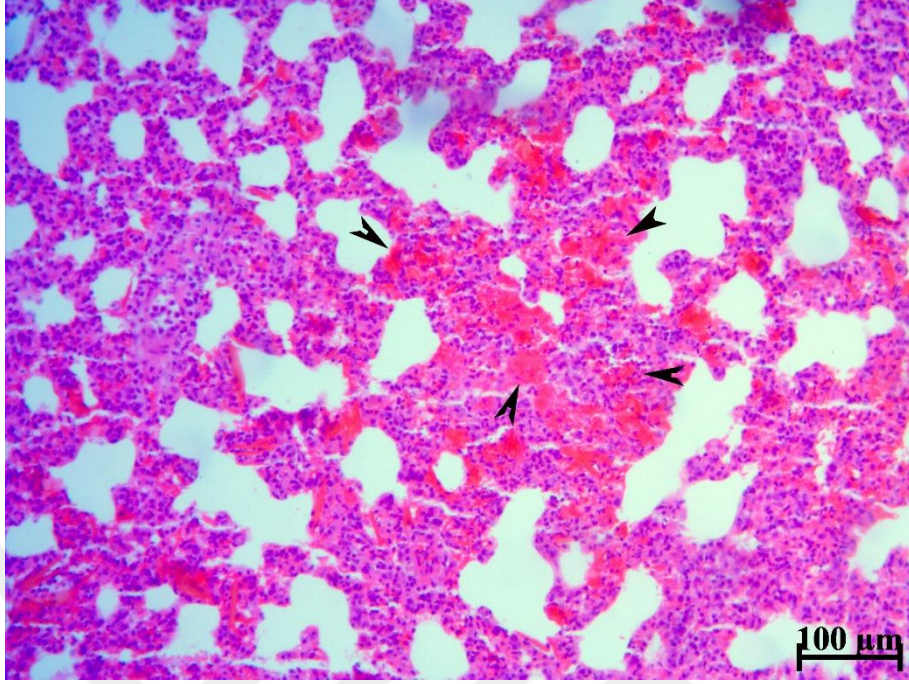
4.9.3. LPS grubu



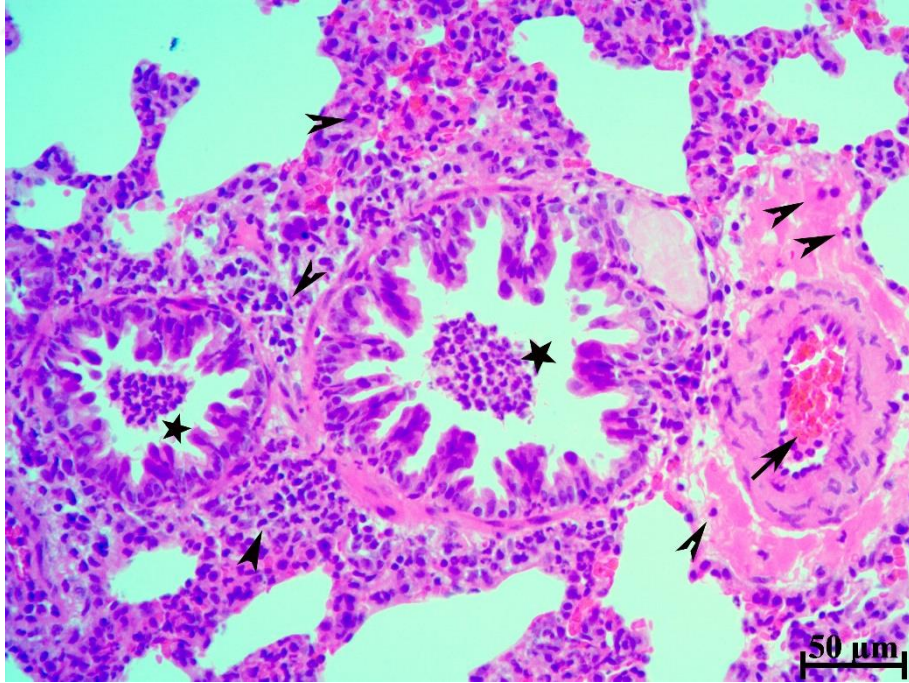
Şekil 48. Yoğun vasküler konjesyon (ok) ve alveolar duvar kalınlaşması (yıldız) (Ölçek çubuğu:200 µm).



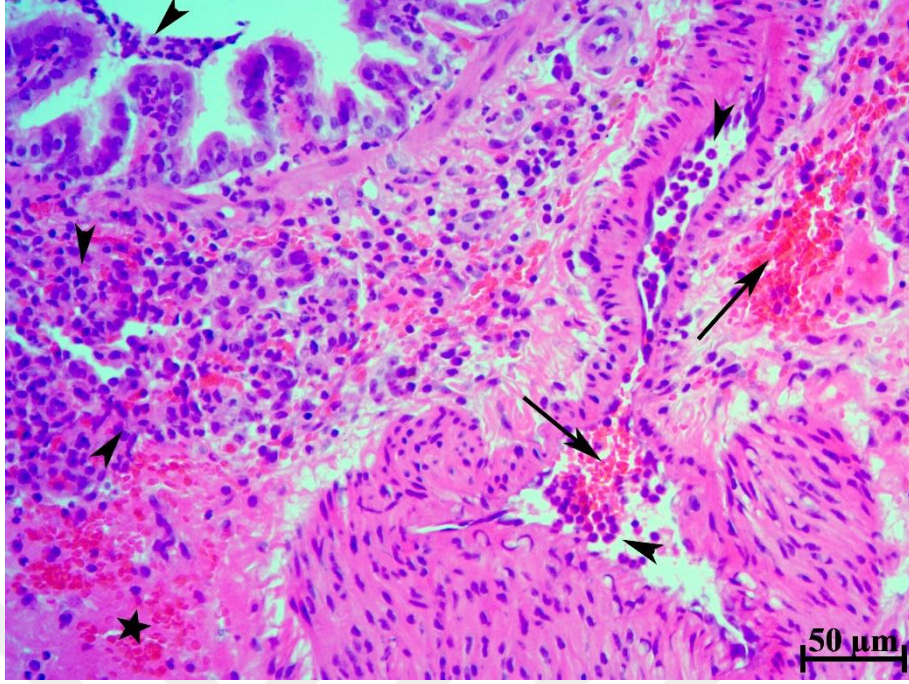
Şekil 49. Yoğun alveolar duvar kalınlaşması (yıldız) ve vakuolizasyon alanları (ok başı) (Ölçek çubuğu:100 µm).



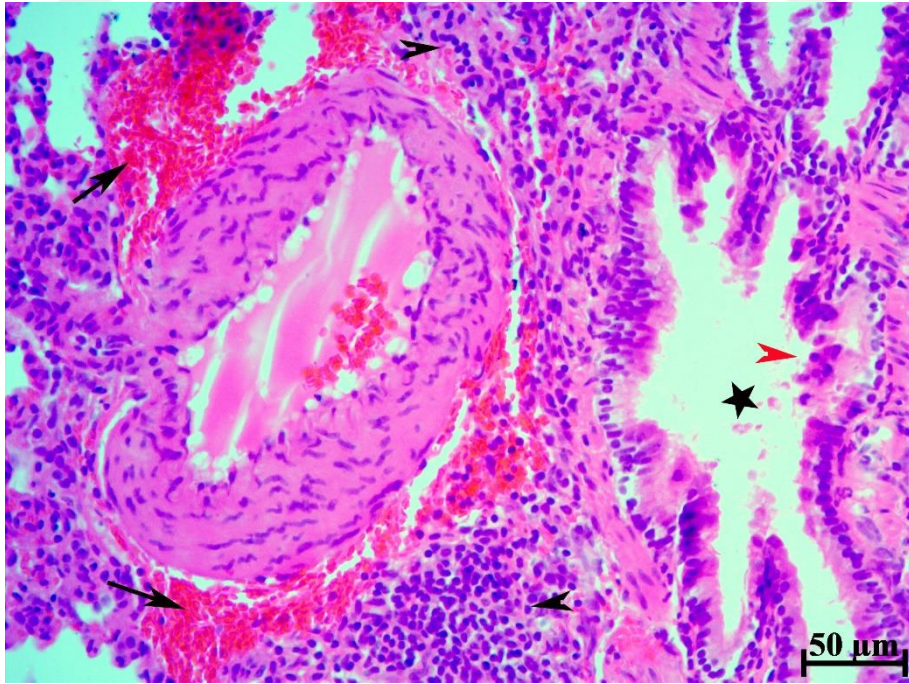
Şekil 50. Kalınlaşmış alveolar duvar içerisinde yoğun kanama odakları (ok başı) (Ölçek çubuğu:100 μm).



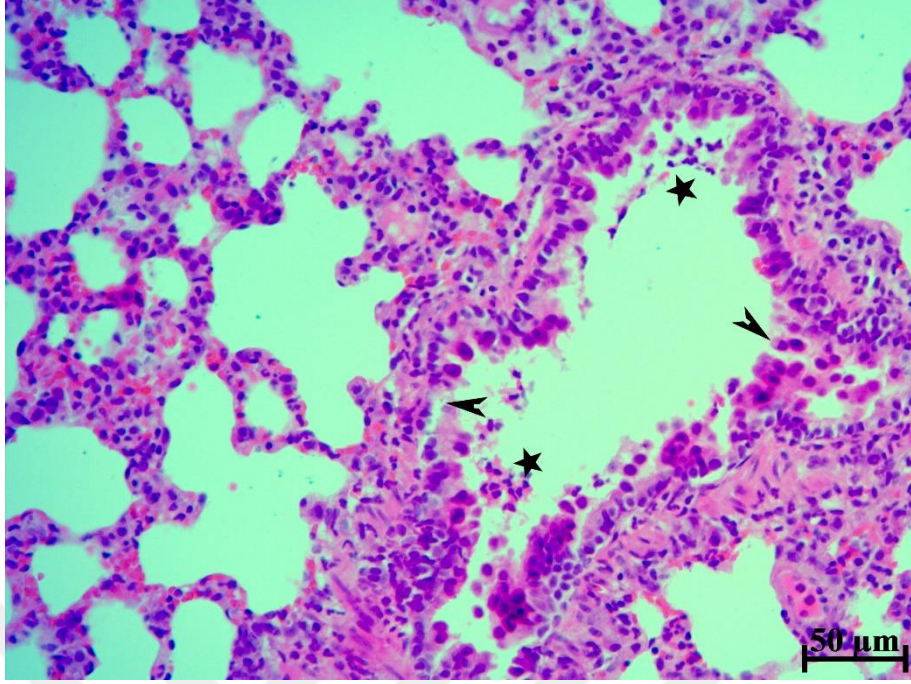
Şekil 51. Bronşiol lümenlerinde yoğun inflamatuvar hücre varlığı (yıldız), küçük arterin genişlemiş adventisya tabakası ve peribronşiyoler dokuda yaygın inflamatuvar hücreler (ok başı), küçük arter lümeninde konjesyon (ok) (Ölçek çubuğu:50 μm).



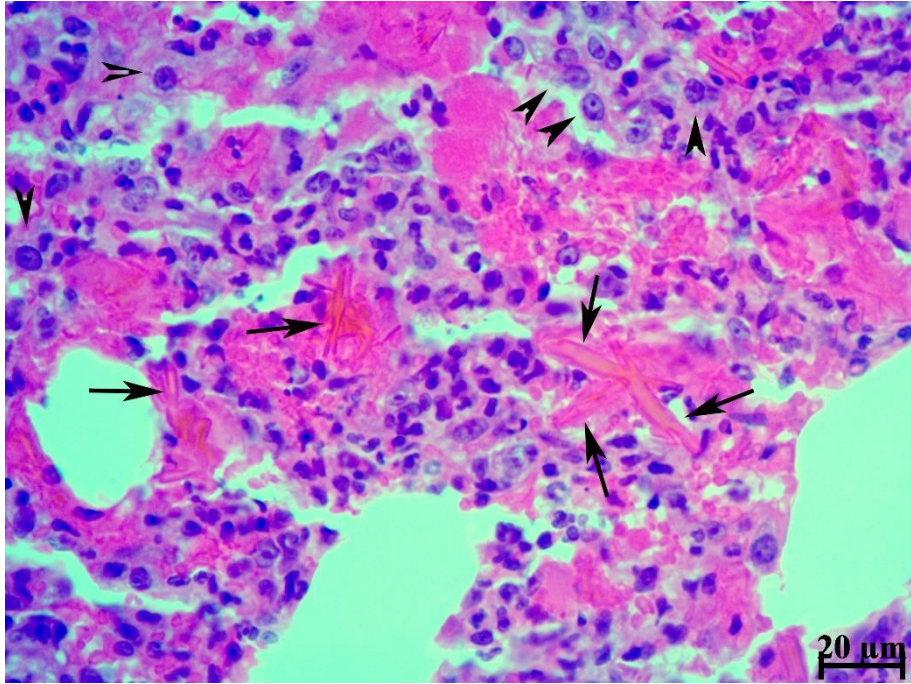
Şekil 52. Bronşiol ve damar lümenleri ile peribronşiyoler dokuda yoğun inflamatuvar hücre varlığı (ok başı), arter ve yakınındaki kapiller lümende konjesyon (ok), peribronşiyoler dokuda kanama alanı (yıldız) (Ölçek çubuğu:50 µm).



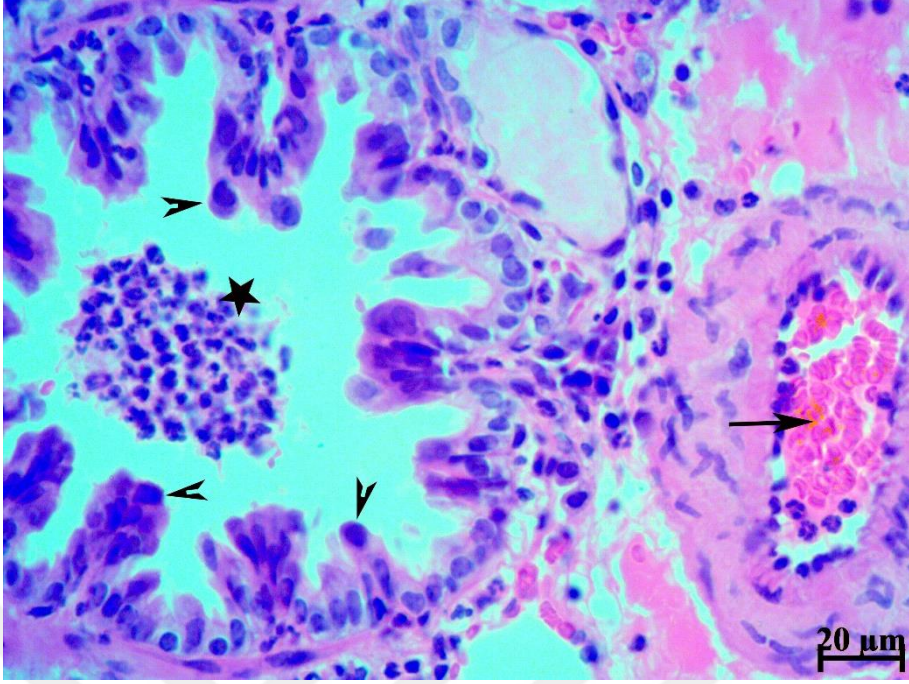
Şekil 53. Musküler arterin adventisiasında yoğun kanama odakları (ok) ile buna yakın komşulukta inflamatuvar hücre infiltrasyonları (siyah ok başı), bronşiol lümeninde eritrositler (yıldız), bronşiol epitelinde deskuamasyon (kırmızı ok başı) (Ölçek çubuğu:50 µm).



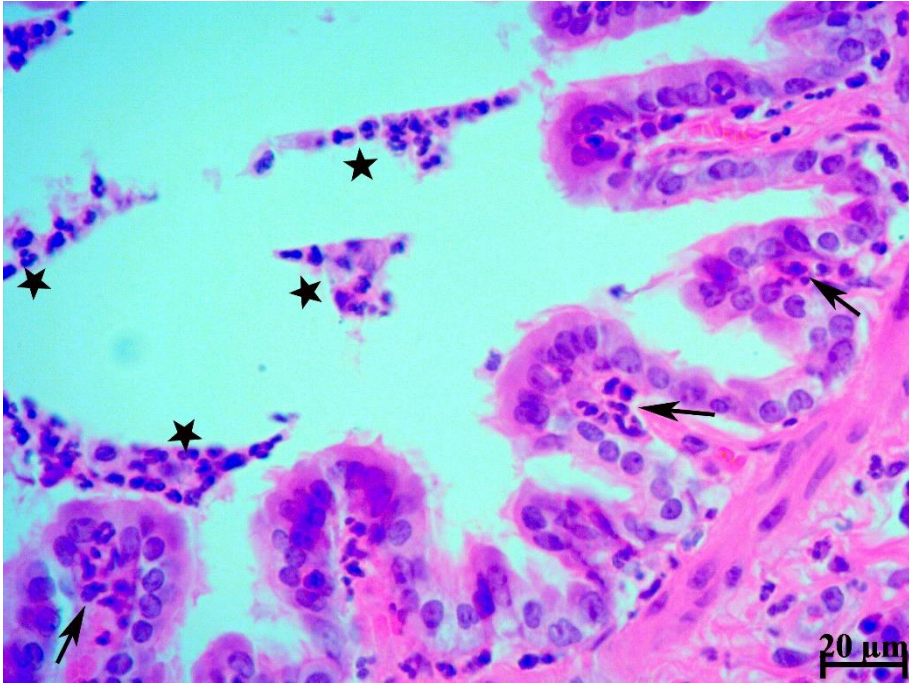
Şekil 54. Bronşiol epitelinde deskuamasyon alanları (ok başı), bronşiol lümeninde inflamatuvar hücre varlığı (yıldız) (Ölçek çubuğu:50 µm).



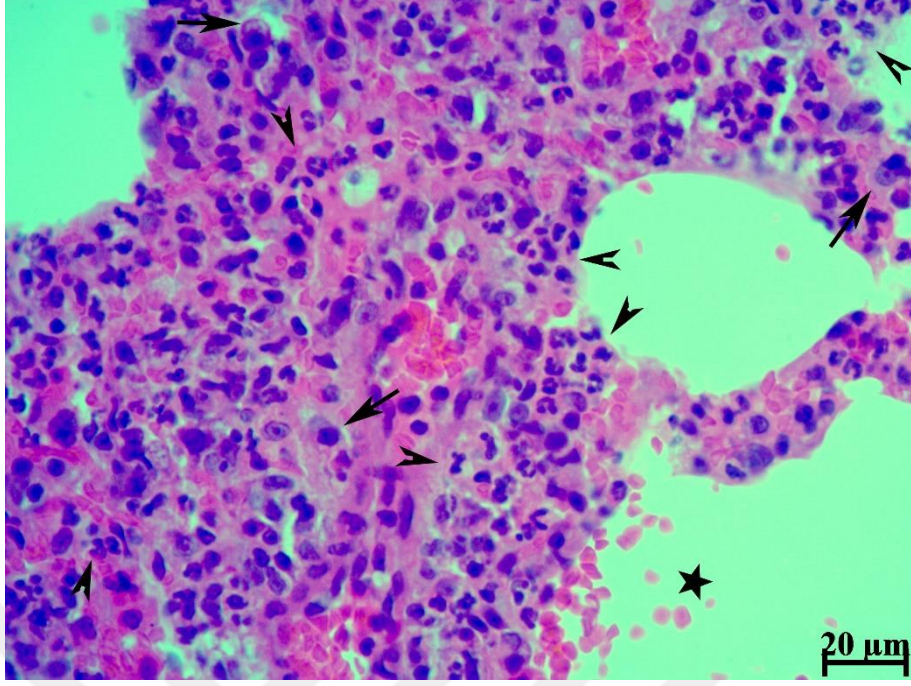
Şekil 55. Kalınlaşmış alveolar duvar içerisinde çok sayıda eritrosit kristaloidleri (ok) ile yine alveolar duvar içerisinde yoğun makrofaj varlığı (ok başı) (Ölçek çubuğu:20 µm).



Şekil 56. Bronşiol lümeninde çok sayıda nötrofil (yıldız), bronşiol epitel hücre çekirdeklerinde kondansasyon (ok başı), küçük arter lümeninde konjesyon (ok) (Ölçek çubuğu:20 µm).

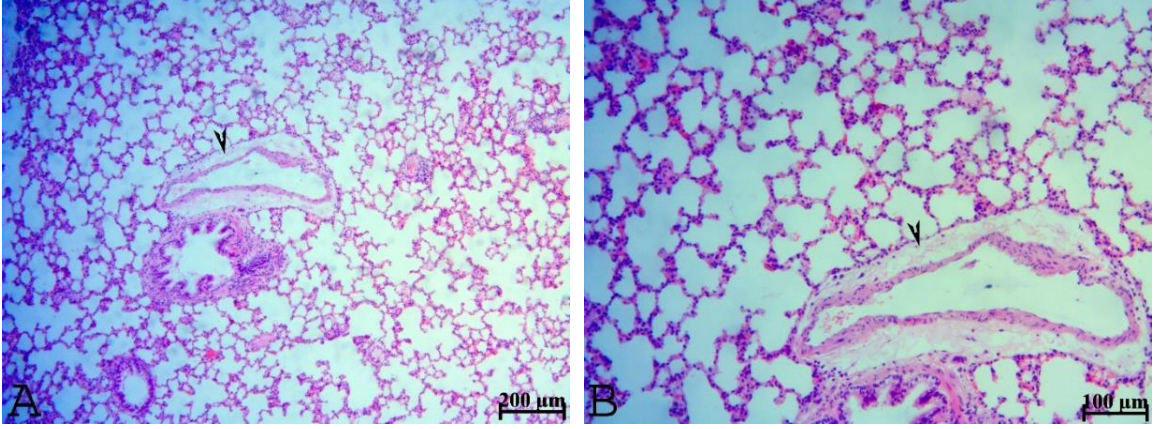


Şekil 57. Bronşiol lümeninde (yıldız) ve bronşiolün lamina propriasında (ok) çok sayıda nötrofil (Ölçek çubuğu:20 µm).

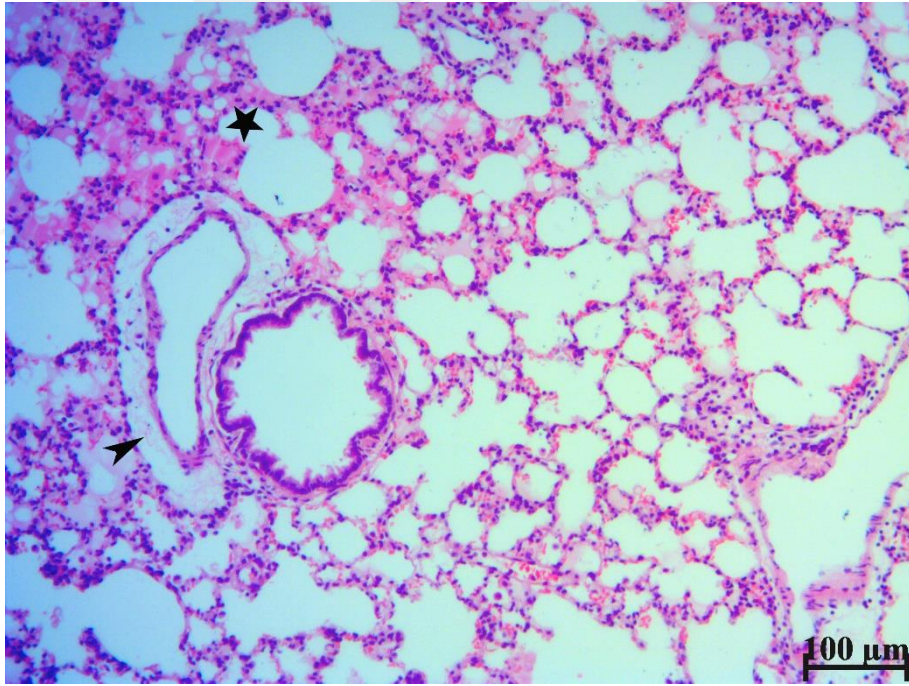


Şekil 58. Kalınlaşmış alveolar duvarda yoğun nötrofilik infiltrasyon alanları (ok başı) ve makrofaj varlığı (ok) ile alveol içi eritrositler (yıldız) (Ölçek çubuğu:20 µm).

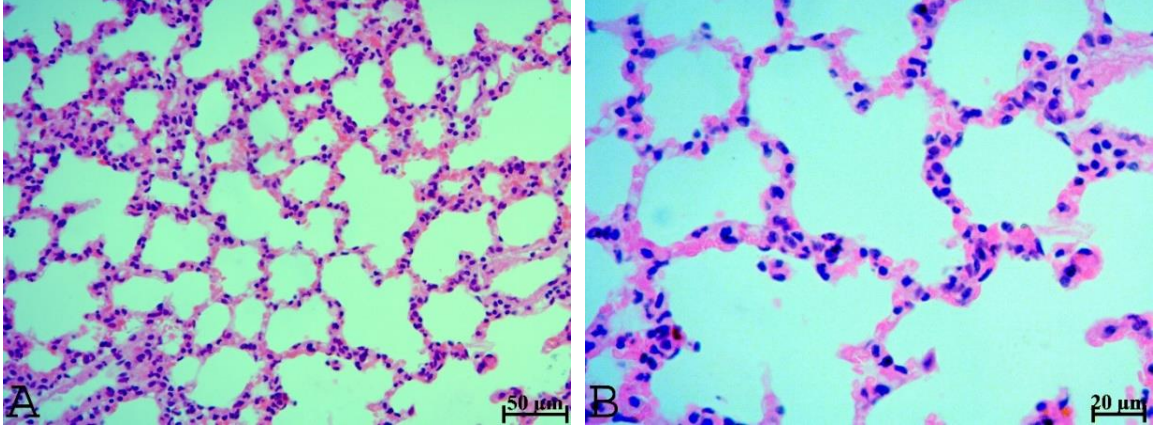
4.9.4. ANTU tedavi grubu



Şekil 59. Ödem içermeyen ve ince duvarlara sahip alveoller ile hafif perivasküler genişleme (ok başı) içeren ven (Ölçek çubuğu=A:200 µm, B:100 µm).

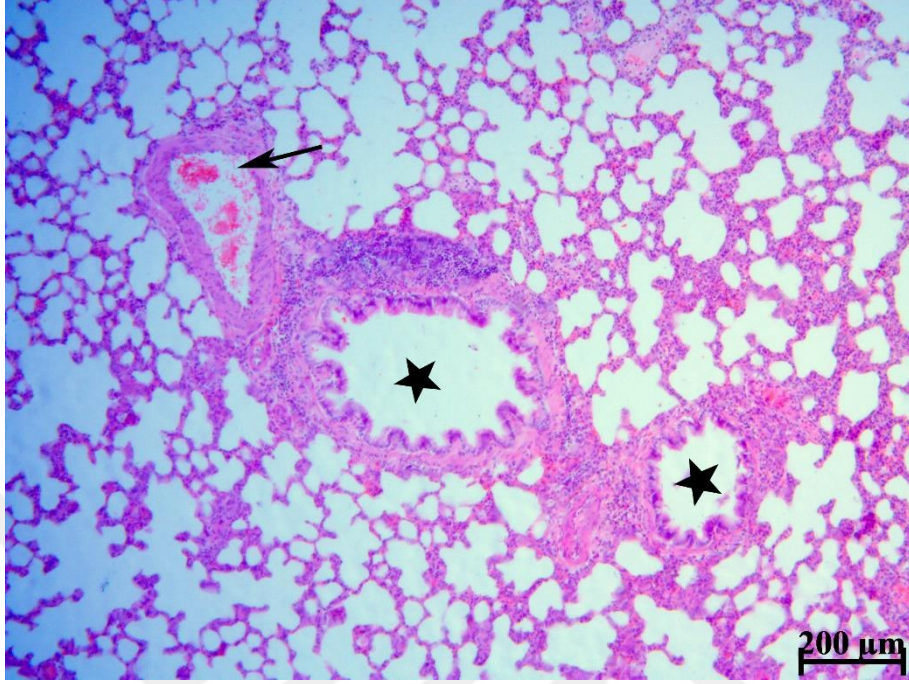


Şekil 60. Sınırlı bir alanda alveol içi ve septal ödem (yıldız) ile hafif perivasküler genişleme (ok başı) içeren normale yakın görünümde akciğer dokusu (Ölçek çubuğu:100 µm).

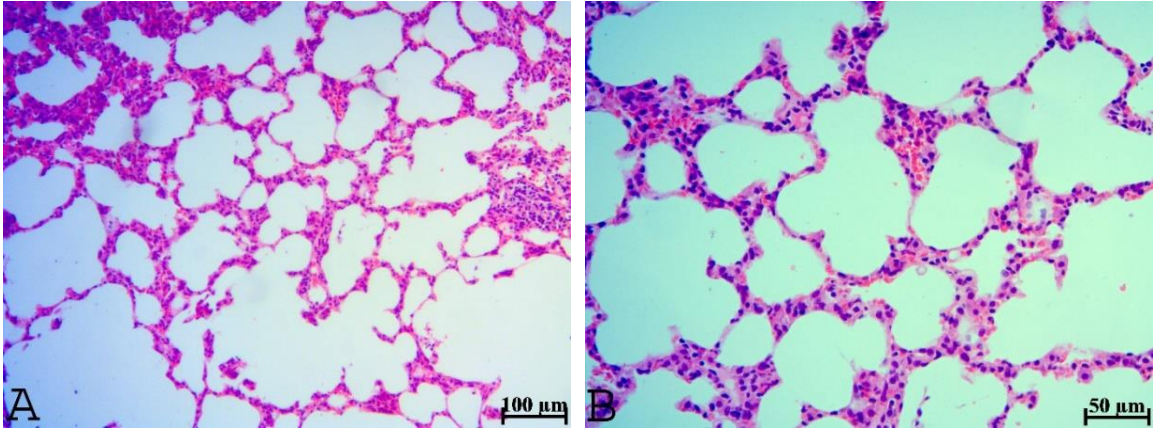


Şekil 61. Çoğunlukla normal kalınlıkta olmakla beraber yer yer hafifçe kalınlaşmış alveolar duvarlar içeren normale yakın görünümde akciğer dokusu (Ölçek çubuğu=A:50 µm, B:20 µm).

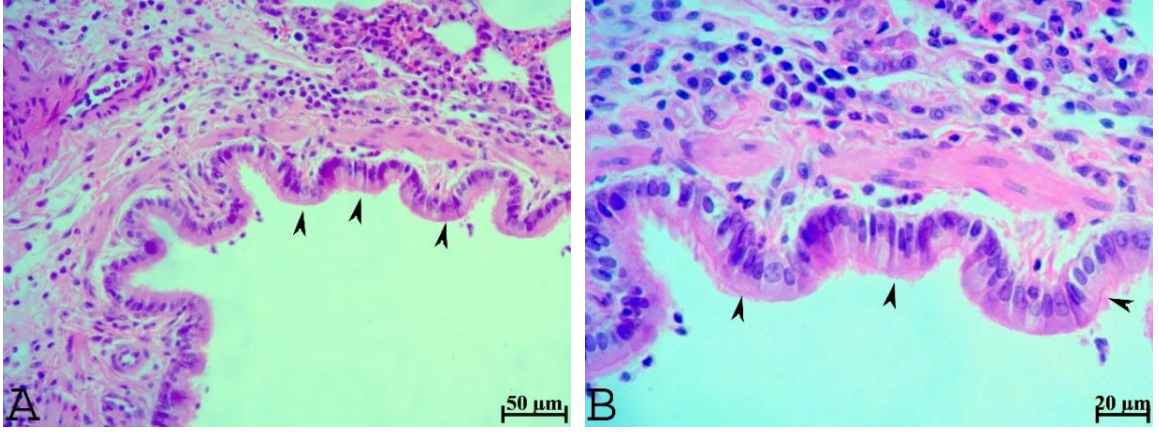
4.9.5. LPS tedavi grubu



Şekil 62. Sınırlı alanlarda hafif duvar kalınlaşması içeren normal görünümlü alveoller, ılımlı vazokonjesyon (ok) ve lümenleri inflamatuvar hücre içermeyen normal görünümlü bronşiyoller (yıldız) (Ölçek çubuğu:200 µm).



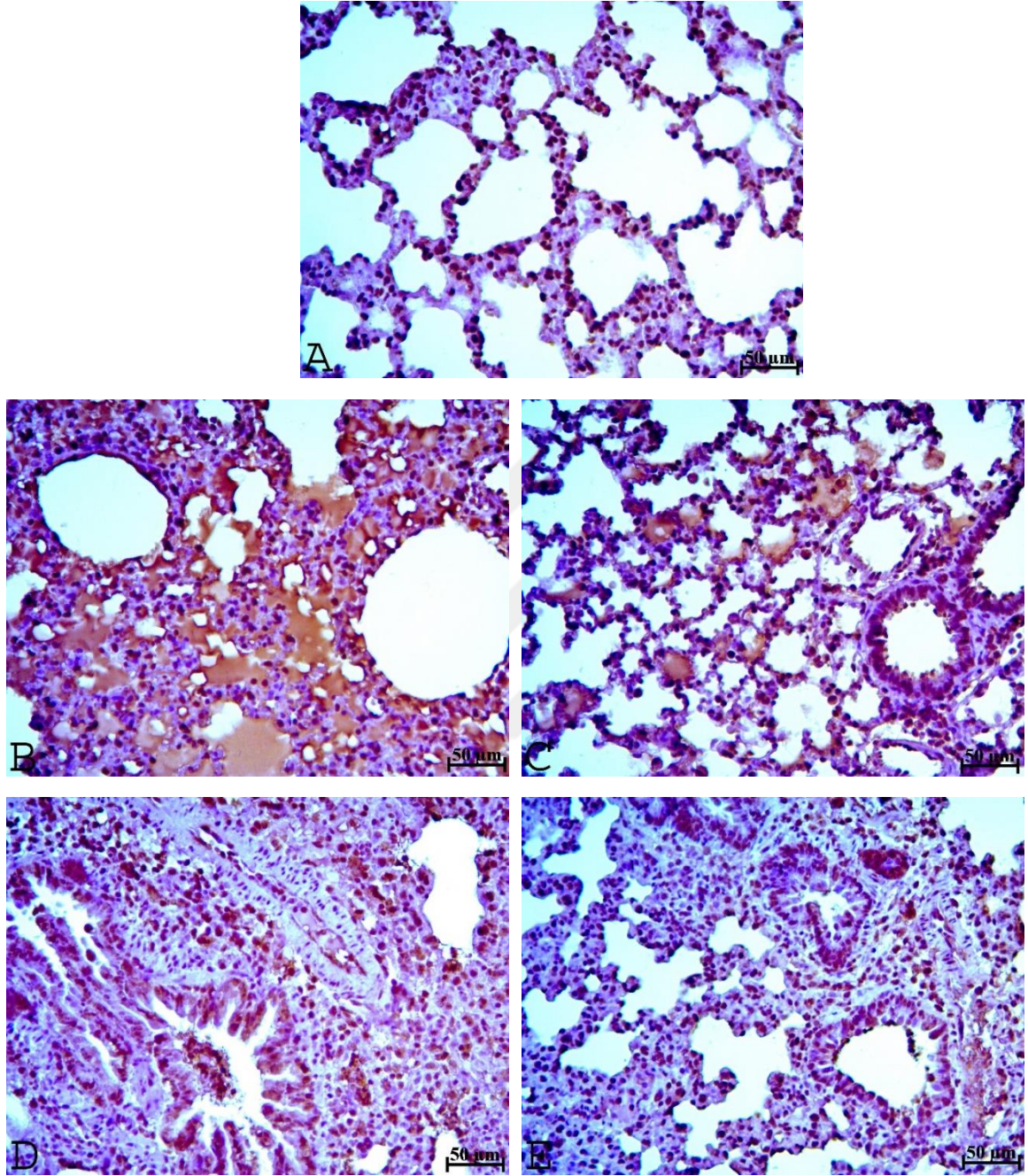
Şekil 63. Sınırlı alanlarda hafif duvar kalınlaşması içeren normal görünümlü alveoller (Ölçek çubuğu=A:100 µm, B:50 µm).



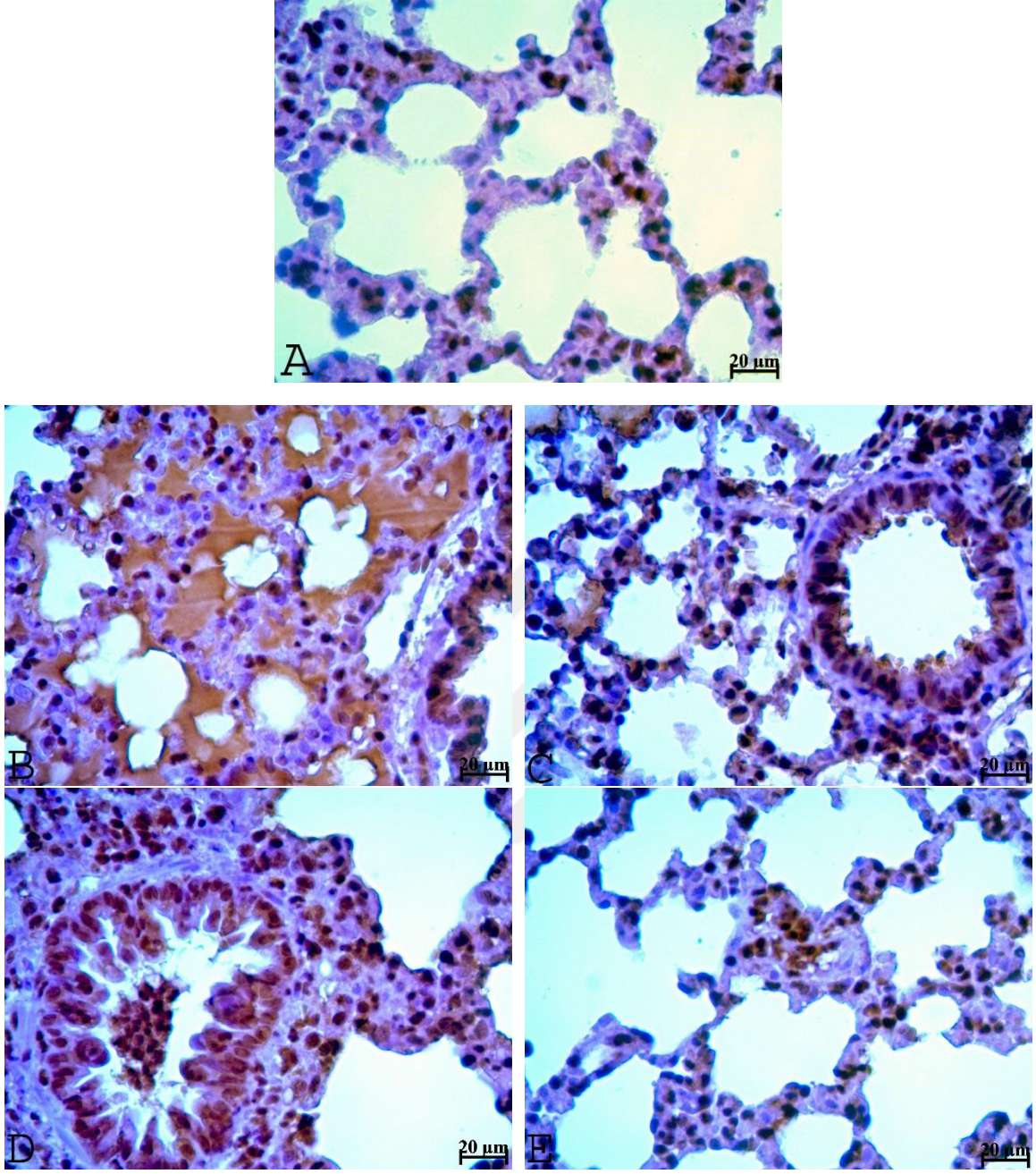
Şekil 64. Normal görünümlü bronşioler epitelde silli hücrelerin apikal plazma membranında siller ile bazal cisimcik çizgisi (ok başı) (Ölçek çubuğu=A:50 µm, B:20 µm).



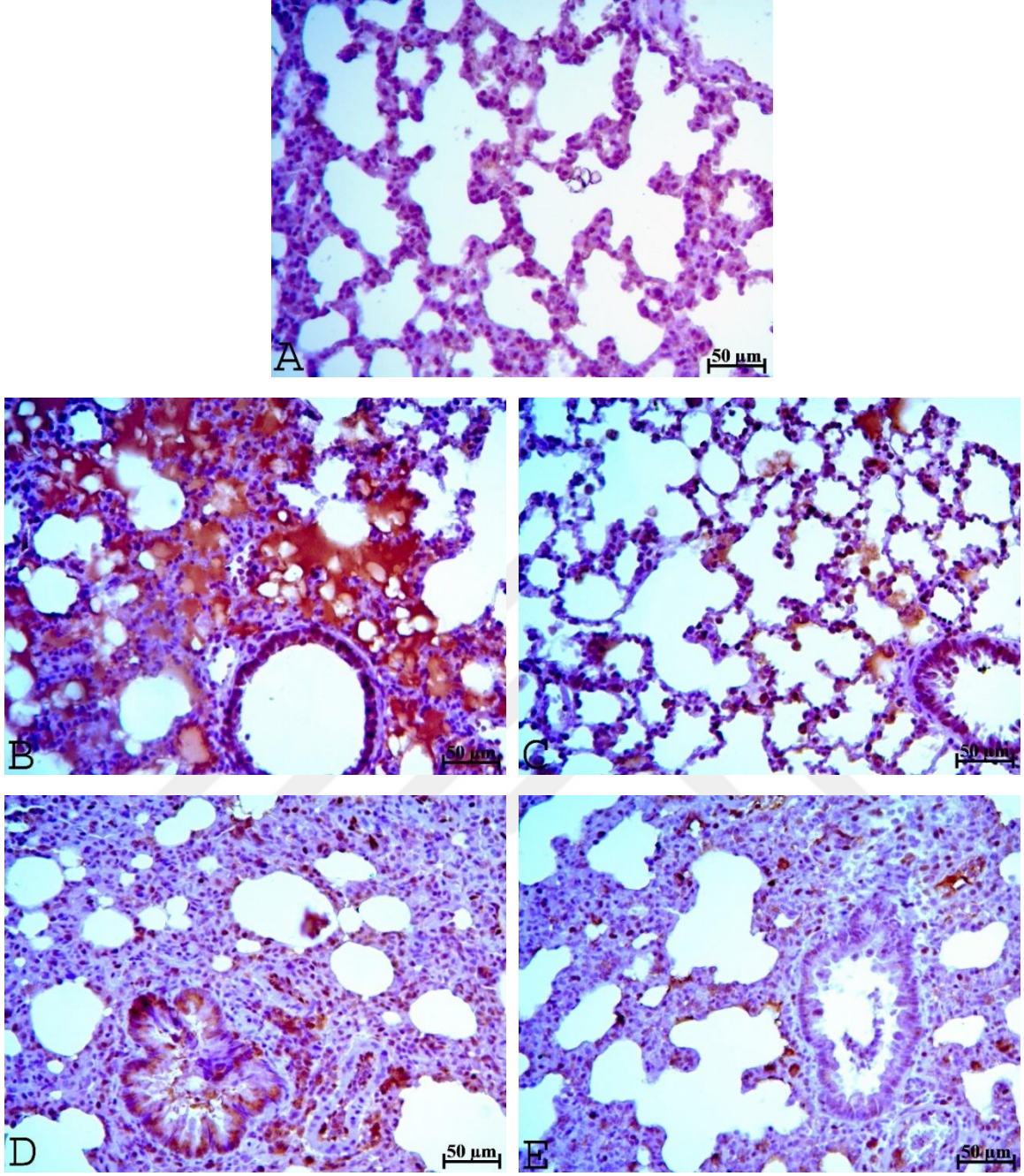
4.10. İmmünohistokimya Görüntüleri



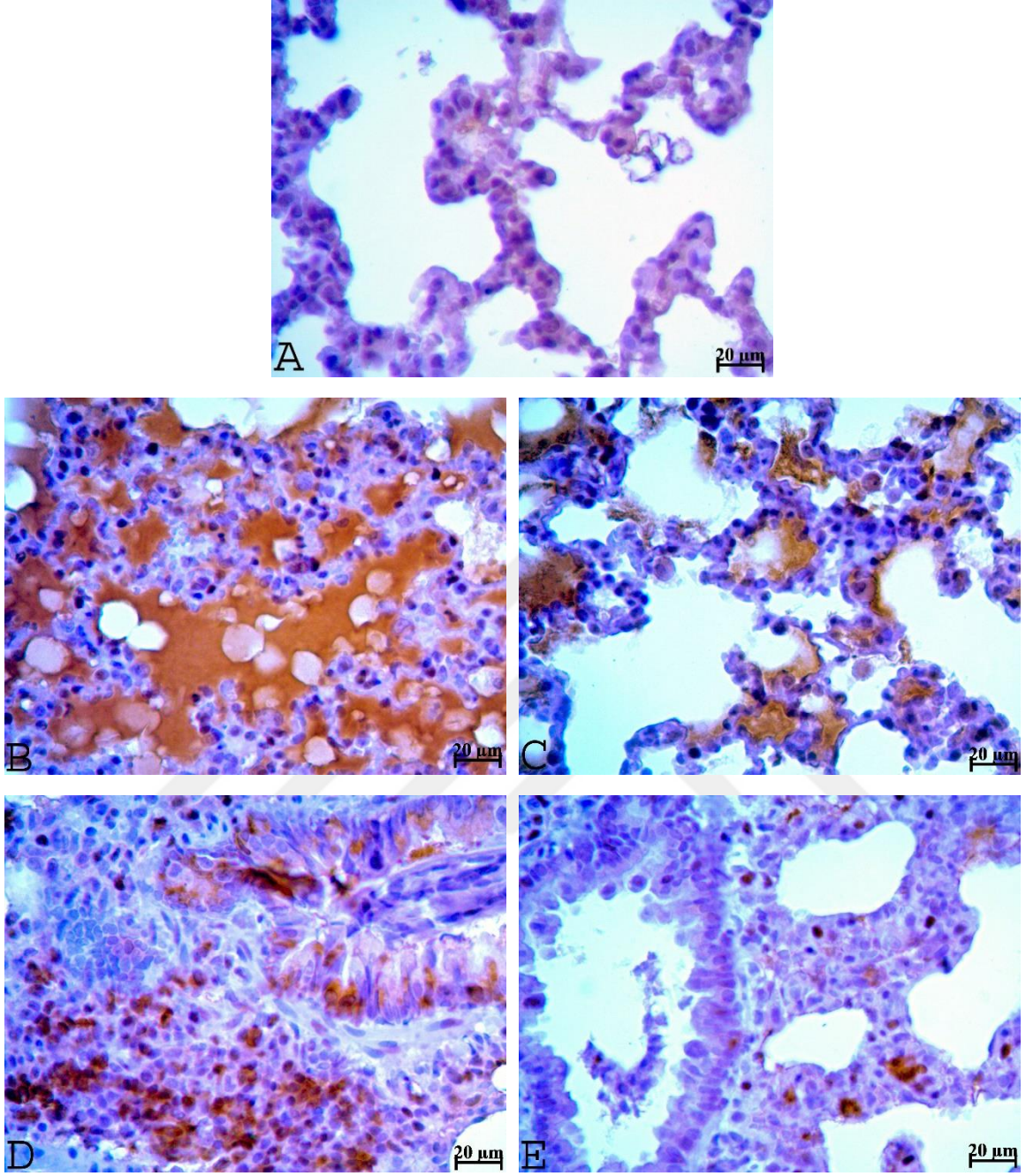
Şekil 65. Tüm gruplarda NF- κ B ifadesini belirlemek için yapılan immünohistokimyasal boyama görüntüleri. A: Kontrol, B: ANTU, C: ANTU+JZL184, D: LPS, E: LPS+JZL184. ANTU ve LPS gruplarında kontrol ve tedavi gruplarına kıyasla daha yoğun boyanma görülmektedir (Ölçek çubuğu:50 μ m).



Şekil 66. Tüm gruplarda NF-κB ifadesini belirlemek için yapılan immünohistokimyasal boyama görüntüleri. A: Kontrol, B: ANTU, C: ANTU+JZL184, D: LPS, E: LPS+JZL184. ANTU ve LPS gruplarında kontrol ve tedavi gruplarına kıyasla daha yoğun boyanma görülmektedir (Ölçek çubuğu:20 μm).



Şekil 67. Tüm gruplarda kaspaz-3 ifadesini belirlemek için yapılan immünohistokimyasal boyama görüntüleri. A: Kontrol, B: ANTU, C: ANTU+JZL184, D: LPS, E: LPS+JZL184. ANTU ve LPS gruplarında kontrol ve tedavi gruplarına kıyasla daha yoğun boyanma görülmektedir (Ölçek çubuğu:50 µm).



Şekil 68. Tüm gruplarda kaspaz-3 ifadesini belirlemek için yapılan immünohistokimyasal boyama görüntüleri. A: Kontrol, B: ANTU, C: ANTU+JZL184, D: LPS, E: LPS+JZL184. ANTU ve LPS gruplarında kontrol ve tedavi gruplarına kıyasla daha yoğun boyanma görülmektedir (Ölçek çubuğu:20 µm).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda; indirekt akciğer hasarı yapan ANTU ve direkt akciğer hasarı yapan LPS ile oluşturulmuş ARDS deney modellerinde, hasardan sorumlu patofizyolojik mekanizmalar arasındaki farklılıklar, MAGL inhibitörü JZL184'ün akciğer hasarındaki inflamasyon, doku hasarı ve apoptoz mekanizmalarında rol oynayan faktörler üzerine olası koruyucu etkileri ve bu etkilerdeki modele özgü farklılıklar incelenmiştir.

İnsan vücudunda endojen olarak sentezlenebilen ve kendilerine ait reseptörleri bulunan kannabinoidler, çok çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde görev almaktadır, bu nedenle bu sistem üzerinde etkisi olan ajanlar birçok hastalıkta terapötik fayda sağlama potansiyeline sahiptir. İki farklı ARDS modelinde kannabinoidlerin inflamasyon, apoptoz ve doku hasarı üzerine olan etkileri ilk kez çalışmamızda incelenmiştir. Kannabinoidlerin var olan klinik endikasyonları dışında, akciğerdeki doku hasarı ve inflamasyon üzerine etkisi deneysel bulgularla sınırlıdır. Bu nedenle çalışmamızdaki sonuçlar, kannabinoidlerin farklı endikasyonlarının oluşmasını sağlayarak klinik kullanım alanını genişletecek ve ARDS tedavisinde yeni bir yaklaşım doğurabilecektir. Elde ettiğimiz bulgulara göre, JZL184'ün akciğerde doku hasarı, inflamasyon ve apoptozda rol oynayan mekanizmalar üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu ve bu mekanizmaları modüle edebildiği gösterilmiştir. Ayrıca iki ARDS modelindeki farklı patofizyolojik süreçlerle uyumlu olarak, JZL184'ün koruyucu etkilerinde de farklılıklar bulunduğu ortaya konmuştur.

Sepsis, akut pankreatit ve hemorajik şok gibi birçok klinik durumda hasar sonrası organ disfonksiyonu ve yetmezliği önemli bir sorun teşkil etmektedir. İnsanlarda çoklu organ disfonksiyonu sendromunun önemli bir bileşeni olan ARDS'de akut gelişen bir solunum yetmezliği mevcuttur. Yoğun bakım ünitelerindeki hastaların yaklaşık % 10-15'i ve mekanik ventilasyona bağlı hastaların ise yaklaşık % 20'sinde tanı kriterlerine rastlanılan ARDS, ciddi morbidite ve mortalite ile sonuçlanmaktadır. Akut olarak başlayan ve inflamasyon, proliferasyon ve fibrozis gibi yapısal değişikliklerle seyreden ARDS'de hipoksemi, fonksiyonel rezidüel kapasitede azalma ve akciğer grafisinde diffüz infiltratlar görülmektedir. Ayrıca alveolokapiller geçirgenlik artışına bağlı kardiyak olmayan bir pulmoner ödem tablosu da oluşmaktadır.

Hücresel düzeyde ARDS, alveolar-kılcal membran bütünlüğünün kaybına, kapiller

endotel geçirgenliğinde artışa, aşırı nötrofil göçüne ve proinflamatuvar mediatörlerin salınımına neden olmaktadır (281,282). Bu nedenle, epitelyal bariyer fonksiyonundaki bir azalma, hücreler ve makromoleküller açısından zengin bir sıvının akciğer alveolar boşluğuna akışını kolaylaştırmaktadır. İnterstisyuma ve bronkoalveolar boşluğa nötrofil akışı, ARDS'nin ilerleyişinde önemli role sahiptir fakat akciğerlere nötrofil göçü ARDS'ye neden olmak için yeterli değildir. Bunun için nötrofil aktivasyonu ve proinflamatuvar sitokin salınımı da gereklidir (283).

Bağıklık sistemi hücreleri, inflamatuvar ajanları inflamasyon bölgesine toplamak ve inflamatuvar süreci başlatmak için sitokin ve kemokinler üretmektedir. TNF- α , LPS'ye maruz kaldıktan sonraki ilk 30-90 dakikada salınmakta ve sitokinler, lipid mediyatörleri ve ROS dahil olmak üzere ikinci bir inflamatuvar kaskadı aktive etmektedir. Ayrıca hücre adezyon molekülleri up-regüle edilerek dokulara inflamatuvar hücre göçünün başlaması da sağlanmaktadır (284). TNF- α , ARDS'si olan veya ARDS riski taşıyan hastaların bronkoalveolar lavaj sıvısında tespit edilmiştir (285). IL-6 ise, monositler/makrofajlar, endotelyal hücreler, fibroblastlar ve düz kas hücreleri de dahil olmak üzere çok çeşitli hücreler tarafından; endotoksin, IL-1 β ve TNF- α stimülasyonuna yanıt olarak üretilmektedir (284,286–288). Dolaşımdaki IL-6 düzeylerinin akut pankreatit ve sepsis gibi farklı etiolojilerle oluşmuş ARDS'nin şiddetini göstermede önemli bir belirteç olduğu bildirilmiştir (289,290). İnflamatuvar bir sürecin varlığında, kan hücreleri inflamasyon bölgesine toplanmakta; kemik iliği ise, kan dolaşımına geçerek inflamatuvar odağa yönlendirilmek üzere yüksek miktarda lökosit üretmektedir (291). Nötrofiller başta olmak üzere artmış inflamatuvar hücrelerin akciğer dokusuna zarar verme potansiyeli nedeniyle lökositlerin inflamasyon bölgesine migrasyonunun önemli olduğu bilinmektedir (292).

ARDS'nin pnömoni, mide içeriğinin aspirasyonu, toksik gaz inhalasyonu, kan transfüzyonu gibi doğrudan; sepsis, akut pankreatit, yanık, travma gibi dolaylı yoldan hasar yaratan çok sayıda nedeni bulunmaktadır. Direkt nedenli ARDS'de ön planda epitel hasarı bulunmaktadır. Bu hasar sonucunda alveolar makrofajlar aktive olup pulmoner inflamasyon gelişmektedir. İndirekt nedenli ARDS'de ise ön planda endotel hasarı bulunmaktadır. Bu hasarda pulmoner sistem dışındaki faktörler, hücresel ve humoral yanıtı tetiklemekte ve sistemik dolaşıma mediyatörler salınmaktadır.

Farklı patofizyolojik mekanizmaların olması, ARDS'de kabul gören spesifik bir tedavi bulunamamasına ve tedavinin destek tedavisiyle sınırlı kalmasına neden olmuştur.

Deneysel çalışmalarda bu mekanizmaları aydınlatılabilmek için, farklı etkenlere bağılı oluşan ARDS tablosunu taklit edebilecek çeşitli hayvan deney modelleri kullanılmaktadır ve bu modellerin hasar mekanizmaları da farklılık göstermektedir. Direkt ARDS deney modelleri arasında intratrakeal LPS, salin lavajı, asit aspirasyonu, akciğer I/R gibi yöntemler yer alırken; indirekt ARDS deney modelleri arasında ise ANTU, çekal bağlama delme, oleik asit, akciğer dışı I/R gibi yöntemler yer almaktadır. Laboratuvarımızda yapılmış önceki çalışmalarda da ARDS deney modelleriyle fizyopatolojiye yönelik pek çok mekanizma aydınlatılmaya çalışılmıştır (93,117–124).

ANTU aracılı akciğer ödeminde, L-arginin-NO yolunun rolü ile ilgili laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada, NO sentaz inhibitörü olan L-NAME'nin ANTU öncesi uygulanmasının, doza bağılı şekilde plevral efüzyon ve AA/VA oranında önemli bir düşüş sağladığı gösterilmiştir (121). ANTU ile indüklenmiş akciğer ödeminde, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidatif modifikasyonunun araştırıldığı çalışmamızda ise; 4 saat içinde maksimum seviyeye ulaşan plevral efüzyon ve akciğer ödeminin oluştuğu ANTU grubunda pozitif bir okside LDL (oxLDL) immün-floresan boyanması gözlenmişken, kontrol sıçan akciğerlerinde ise boyanma tespit edilmemiştir. Böylece ANTU kaynaklı akciğer hasarında, oksidatif strese bağılı LDL oksidasyonu olduğu ve oxLDL birikiminin ANTU aracılı akciğer patogenezinde rol oynadığı ortaya konmuştur (122). ANTU ile oluşturulmuş ARDS modelinde ketamin, midazolam ve ketamin/ksilazin kombinasyonunun etkilerinin incelendiği bir başka çalışmamızda; ketamin, midazolam ve ketamin/ksilazin kombinasyonunun, plevral efüzyonu anlamlı bir şekilde azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca ketaminin inflamasyon, kanama ve ödem skorlamasında; midazolam ve ketamin/ksilazin kombinasyonunun ise inflamasyon ve ödem skorlamasında anlamlı bir düşüşe neden olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular ışığında NMDA reseptörlerinin pulmoner sistemdeki inflamatuvar yanıtta rol oynadığı ve bu ajanların inflamatuvar yanıtları iyileştirebildiği belirtilmiştir (118). Endotelin reseptör antagonisti olan tezosentanın ANTU uygulaması öncesi verilmesinin de PE/VA oranını anlamlı şekilde azalttığı ve plevral efüzyon oluşumu üzerinde profilaktik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (119).

Morfinin akciğerlerdeki etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmamızda; ANTU verilmeden önce uygulanan morfinin, ANTU'ya bağılı pulmoner inflamatuvar yanıt üzerinde önleyici bir etki gösterdiği ve bu etkiye periferik opioid reseptörlerinin aracılık ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca ANTU'nun neden olduğu akciğer hasarında aşırı NO üretiminin rol

oynadığını gösteren çalışmamızdan hareketle (121), morfinin akciğer hasarındaki bu profilaktik etkisinde iNOS ekspresyonunu inhibe etmesinin de rol oynadığı belirtilmiştir (123). Benzer şekilde ANTU'dan önce uygulanan üretan, tiyopental ve pentobarbitalin de ANTU'ya bağlı akciğer hasarı üzerinde profilaktik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiş ve bu profilaktik etkiden anesteziğin pulmoner damar sistemi üzerindeki vazokonstriktör etkilerinin ve kısmen NO inhibisyonunun sorumlu olabileceği bildirilmiştir (124). Sonuç olarak birçok anestezi ajanının, anestezi özelliklerinin yanı sıra fizyolojik ve metabolik değişikliklere neden olarak inflamatuvar yanıtları modüle edebileceği ve bu etkilerinin klinik ve deneysel uygulamalarda dikkate alınması gerektiği ortaya konmuştur. Anestezi maddelere benzer şekilde, kannabinoidlerin de NO yoluyla ilişkili olduğu, kardiyak iNOS ekspresyonunu düşürerek kalp üzerinde koruyucu etki gösterdiği (293) ve iNOS'a bağlı NO'nun nörotoksik aktivitesini inhibe ederek nöronal oksidatif stresi azalttığı (294) bildirilmiştir. Bu bulgulardan hareketle, kannabinoidlerin akciğer hasarındaki olası faydalı etkilerine oksidatif stres mekanizmaları üzerindeki rolünün aracılık edebileceği mümkün görünmektedir.

Direkt ARDS modelinin oluşturulduğu, Liu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, erkek sıçanlara 5 mg/kg dozunda LPS intratrakeal olarak uygulanmış ve LPS'nin BAL sıvısındaki MPO ve MDA aktivitelerini anlamlı ölçüde artırdığı ve SOD seviyesini azalttığı gösterilmiştir (295). Bir diğer çalışmada, intratrakeal LPS uygulamasının pulmoner ödeme ve BAL sıvısındaki protein konsantrasyonunda artışa neden olduğu; ayrıca alveolar makrofajlarda interlökin-33 (IL-33) ve TNF- α salgılanmasını indüklediği belirtilmiştir (296). Benzer şekilde intratrakeal LPS uygulamasıyla oluşturulan bir başka direkt ARDS modelinde, farelere aynı doz LPS'nin intratrakeal instilasyonunun ardından; inflamatuvar hücre infiltrasyonu, alveolar duvar kalınlaşması ve inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunda yükselme olduğu tespit edilmiştir (297). Kuyruk veninden LPS enjeksiyonu ile indirekt ARDS modelinin oluşturulduğu laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada ise, histopatolojik incelemede interstisyel ödem, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve kanamanın eşlik ettiği akciğer hasarı görülmüştür. Ayrıca AA/VA oranında da kontrol grubuna göre artış tespit edilmiştir (93).

Çalışmamızda iki farklı ARDS patogenezi incelemek amacıyla, indirekt ARDS modeli olarak i.p. 10 mg/kg dozunda ANTU, direkt ARDS modeli olarak ise intratrakeal 5 mg/kg dozunda LPS uygulaması seçilmiştir.

Endotel hasarın ön planda olduğu, indirekt bir ARDS modeli olan ANTU grubundaki akciğer dokularının histopatolojik incelemesinde; endotel hasarına bağlı belirgin perivasküler genişlemeye eşlik eden alveol içi ve perivasküler ödem, hemoraji, konjesyon, interstisyumda başta lenfosit olmak üzere inflamatuvar hücre infiltrasyonu, artmış alveol içi makrofajlar ve alveolar duvar kalınlaşması görülmüştür. Bu bulgulardan ödem ve perivasküler genişlemenin LPS grubuyla karşılaştırıldığında ANTU grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür. Aynı zamanda ANTU grubunun AA/VA oranının da LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olması, ANTU grubunda daha fazla ödem oluştuğunu desteklemektedir. Bu durum, indirekt ARDS modeliyle uyumlu olarak ANTU'daki hedef hasar noktasının endotel hücreleri olmasıyla açıklanabilmektedir. Endotel hasarı sonucunda damar içi sıvının akciğer interstisyumuna ve ardından alveollere geçişi belirgin akciğer ödemiyle sonuçlanmaktadır. Ayrıca ANTU grubunda bu pulmoner ödeme eşlik eden non-hemorajik, eksüda özelliğinde plevral efüzyon görülmüşken, LPS grubunda plevral efüzyon tespit edilmemiştir.

Epitel hasarının ön planda olduğu, direkt bir ARDS modeli olan LPS grubundaki akciğer dokularının histopatolojik incelemesinde ise; bronşiol epitelinde yer yer deskuamasyon, lamina propriada nötrofil, bazı epitel hücrelerinde kondanse çekirdekler, bronşiol lümeninde başta nötrofil olmak üzere artmış inflamatuvar hücre ve eritrosit varlığı, konjesyon, daha çok septumlarda lokalize makrofajlar ve alveolar duvar kalınlaşması görülmüştür. LPS'ye bağlı akciğer hasarındaki hedef mekanizmanın endotel yerine epitel olması nedeniyle, ANTU'ya bağlı akciğer hasarındakine kıyasla daha sınırlı bir ödem oluşumu saptanmıştır. Buna karşın ANTU grubunda bronşiol lümeninde inflamatuvar hücre görülmemişken, LPS grubunda bronşiol lümeninde yaygın inflamatuvar hücre varlığı tespit edilmiştir. Bu durum, bir endotoksin olan LPS'nin direkt olarak intratrakeal yolla uygulanmasının ardından meydana gelen inflamatuvar süreç sonucu, bronşiol lümenine başta nötrofil olmak üzere iltihabi hücre göçü ile açıklanabilmektedir. Ayrıca LPS grubunda gözlenen belirgin konjesyonda da LPS endotoksininin neden olduğu vazodilatasyonun etkili olduğu düşünülmektedir. Histopatolojik inceleme sonucunda elde ettiğimiz bu bulgular, indirekt ve direkt akciğer hasarında rol oynayan temel patofizyolojik mekanizmalarla uyumludur.

Mevcut çalışmamızdaki verilere paralel olarak, sıçanlarda mezenter İ/R'ye bağlı indirekt akciğer hasarının oluşturulduğu laboratuvarımızda yapılan çalışmamızda, akciğer

dokusunun histopatolojik incelemesinde alveolar konjesyon, hemoraji, nötrofilik infiltrasyon ve alveolar duvar kalınlaşması tespit edilmiştir (133). Benzer şekilde ANTU ile oluşturulan indirekt ARDS modelinde akciğer dokusunda yaygın lökosit infiltrasyonu, alveoler ödem ve intraalveolar hemoraji saptanmıştır. Ayrıca AA/VA oranında ANTU grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür (298). Bir başka çalışmamızda da ANTU, interstisyel ve intraalveolar ödem, alveoler duvar yıkımı ve interstisyel inflamatuvar hücre infiltrasyonunu tetiklemiştir (118). ANTU, i.v. LPS, mezenter İ/R ve ÇBD olmak üzere dört farklı indirekt akciğer hasarı modelinin incelendiği bir çalışmamızda ise, ANTU; alveolar duvar yıkımı, interstisyel inflamatuvar hücre infiltrasyonu, alveolar ödem ve perialveolar hemorajiye neden olurken, i.v. uygulanan LPS'nin; ödem, hemoraji ve interstisyel inflamatuvar hücre infiltrasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Mezenter İ/R ve ÇBD ile indüklenen akciğer hasarlarında ise hemoraji ve interstisyel inflamatuvar hücre infiltrasyonu tespit edilmiştir (93). Bu sonuçlara göre, çeşitli deney modelleriyle oluşturulan indirekt akciğer hasarına bağlı bulgular ile mevcut çalışmamızdaki ANTU aracılı indirekt akciğer hasarına bağlı bulgular arasında histopatolojik açıdan benzerlikler bulunmaktadır. Ayrıca, i.v. LPS ile oluşturulmuş indirekt akciğer hasarında ödem, hemoraji ve interstisyel inflamatuvar hücre infiltrasyonunun görülmesi, mevcut çalışmamızdaki intratrakeal LPS ile oluşturulmuş direkt akciğer hasarında ise bronşiol epitelinde yer yer deskuamasyon, bazı epitel hücrelerinde kondanse çekirdekler ve bronşiol lümeninde artmış inflamatuvar hücre varlığı gibi bulguların görülmesi, indirekt ARDS modelinde endotel hasarının, direkt ARDS modelinde ise epitel hasarının ön planda olduğunu ortaya koymaktadır.

SOR, moleküler oksijenin suya dönüşümü sırasındaki indirgenme yükseltgenme reaksiyonları sonucunda üretilmektedir ve oksidatif DNA hasarı dahil olmak üzere çok çeşitli etkilere sahiptir (130). Bu radikaller, doku hasarını ve pulmoner ödemi şiddetlendiren proinflamatuvar sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırmakta ve oluşan oksidatif stres, yoğun nötrofil penetrasyonu ile sonuçlanan endotelial ve epitelyal bariyer bozukluklarına neden olmaktadır. Vasküler homeostazi için gerekli olan oksidan-antioksidan denge, ARDS ilerlemesi ile akciğer hasarında önemli rol oynadığından, aşırı SOR üretiminden sorumlu sistemler ARDS tedavisinde terapötik hedef olabilmektedir.

SOR'lerin akciğer patolojisindeki rolü ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda; LPS'nin, çeşitli mekanizmalarla SOR ekspresyonuna neden olduğu (299) ve LPS ile

indüklenen SOR üretiminin, yüksek protein tirozin fosfataz oksidasyonu yoluyla endotelial bariyer disfonksiyonunu artırdığı bildirilmiştir (300). Yine LPS ile oluşturulmuş akciğer hasarında, anti-inflamatuvar ve anti-oksidan özelliklere sahip *Portulaca oleracea* (PO) yaprağı ekstraktının etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; LPS'nin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, özellikle MDA, MPO ve NO seviyelerini artırdığı, SOD ve katalaz aktivitesini ise düşürdüğü tespit edilmiştir. Bununla birlikte PO gruplarında; MDA, MPO ve NO seviyelerinin azaldığı ve oksidan-antioksidan dengenin geri dönerek SOD ve katalaz aktivitesinin yükseldiği gösterilmiştir (301). Sıçanlarda oleik asitle ARDS modelinin oluşturulduğu bir başka çalışmada, akciğer hasarına bağlı olarak SOD ve GSH seviyelerinin düştüğü, MPO ve lipid peroksidasyonu (LPO) seviyesinin ise arttığı bildirilmiştir (302).

Mezenter İ/R ile indüklenen akut akciğer hasarının oluşturulduğu laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada ise, İ/R sonucu ile MDA düzeyleri ve serum TNF- α , IL-6, IL-1 β düzeyleri ile total antioksidan kapasitenin kontrol grubuna göre yüksek olduğu bulunmuştur (133). ANTU ile indüklenen ARDS modelinde, selektif periferik benzodiazepin reseptör (TSPO) ligandı Ro5-4864'ün akciğer hasarı üzerine etkisinin incelendiği bir başka çalışmamızda, akciğerlerin immünohistokimyasal incelemesinde ANTU grubunda TNF- α boyanmasının arttığı ve inflamatuvar süreçte ve doku hasarında rol oynayan serum monosit kemotaktik proteini (MCP-1) seviyelerinin anlamlı düzeyde yükseldiği tespit edilmiştir (298).

Çalışmamızda endojen oksidan/antioksidan sistemin rolünü incelemek için; oksidan parametre olarak MDA, antioksidan parametre olarak SOD, katalaz ve GSH'nin akciğer doku düzeyleri incelenmiştir. Her iki hasar modelindeki mekanizmalarda da oksidatif stresin rol oynamasına karşın, çalışmamızda bu durumu destekleyecek yeterli bulgular elde edilememiştir. ANTU grubunda paradoksik olarak MDA seviyesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş, SOD seviyesinde ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür. Katalaz ve GSH seviyelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. LPS grubunda ise MDA, SOD, katalaz ve GSH seviyelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir.

NF- κ B; inflamasyon, bağışıklık, çoğalma ve hücre ölümü gibi önemli fizyolojik süreçlerde görevli yüzlerce genin ekspresyonunu düzenleyen bir grup uyarılabilir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmaktadır (303). Sitoplazma içinde inaktif halde

bulunan ve aktive olduğunda çekirdeğe taşınan NF-κB, yalnızca inflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve adezyon moleküllerinin üretimini artırarak değil, aynı zamanda apoptozu, hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını da düzenleyerek inflamasyon sürecinde etki göstermektedir.

NF-κB sinyal yolağının karaciğer yağlanması, servikal kanser, koroner arter hastalığı, Alzheimer hastalığı ve romatoid artrit gibi birçok hastalığın patogeneğinde önemli rolleri bulunmaktadır (304–308). Romatoid artrit hastalığında NF-κB'nin rolü ile ilgili Ilchovska ve ark. tarafından yapılan bir araştırmada, NF-κB aktivasyonunu azaltan vitamin D ve omega 3 gibi besinlerin potansiyel faydası vurgulanmıştır (304).

ARDS, astım, bronkoalveolar displazi gibi akciğer inflamatuvar hastalıkları, düzensiz NF-κB aktivasyonu ile ilişkilendirilmektedir (309–313). Bunlardan ARDS'de meydana gelen endotel hücrelerinin işlev bozukluğu büyük ölçüde NF-κB tarafından kontrol edilmektedir (314,315). Özellikle, pnömoni veya sepsisin neden olduğu ARDS'nin şiddeti ve öldürücülüğü, NF-κB'nin aracılık ettiği, yoğun PMN ekstrasvazasyonu ve sitokin salınımıyla karakterize bir sitokin fırtınası ile ilişkili görülmektedir (316,317). Yakın zamanda, şiddetli akut solunum sendromu-koronavirus-2 (SARS-CoV-2) spike proteininin, endotel hücreleri ve makrofajlar dahil olmak üzere birçok hücre tipinde NF-κB'yi aktive ettiği de gösterilmiştir (318).

Bu bulgulara paralel olarak, yapılan bir çalışmada sıçanlara 3 saat boyunca tek akciğer ventilasyonu yapılmış ve bir gruba tek akciğer ventilasyonu öncesi NF-κB inhibitörü pirolidin ditiyokarbamat (PDTC) uygulanırken diğer gruba uygulanmamıştır. PDTC uygulanmış grupta alveolar sıvı eksudasyonu, pulmoner interstisyel kalınlaşma ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunda önemli ölçüde düzelme görülmüşken TNF-α, IL-1β, IL-6 ve IL-8 seviyelerinde PDTC uygulanmamış gruba göre anlamlı düzeyde düşüş tespit edilmiştir. Sonuç olarak NF-κB'nin akciğer hasarı oluşumuna katkıda bulunabileceği ve NF-κB inhibisyonunun tedavi için yeni bir yol olabileceği belirtilmiştir (319).

Çalışmamızda NF-κB yolağının ARDS'deki rolünü araştırmak amacıyla NF-κB immünohistokimyasal incelemesi yapılmıştır. Her iki hasar modelinde de inflamatuvar mekanizmaların rol oynaması nedeniyle, immünohistokimyasal incelemede ANTU ve LPS gruplarının akciğer dokularındaki NF-κB boyanmasının, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir. ANTU grubunda boyanma daha çok

alveolar duvar dokusunda iken; LPS grubunda ise bronşiol epiteli ve çevresinde daha yoğun boyanma gözlenmiştir. Bu durum, ANTU'ya bağlı indirekt akciğer hasarında rol oynayan temel mekanizmanın endotel hasarı; LPS'ye bağlı direkt akciğer hasarında rol oynayan temel mekanizmanın ise epitel hasarı olduğunu desteklemektedir. Ayrıca NF-κB boyanmasında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir.

Apoptoz, çok hücreli organizmalarda genetik materyal tarafından hücrenin kontrollü olarak ölmesini, yani programlı hücre ölümünü sağlayan fizyolojik bir süreçtir. Bu süreçteki bazı biyokimyasal tepkimelerin sonucunda hücre buruşup küçülerek genetik materyal parçalanmaktadır. Apoptoz mekanizmasının merkezinde yer alan kaspazlar, hem başlatıcı hem de uygulayıcı role sahiptirler ve ekstrinsik (ölüm reseptörü) ile intrinsik (mitokondriyal) olmak üzere iki temel apoptoz yolunda görev almaktadırlar.

Ekstrinsik yol; hücre yaşlanması, hipoksi, radyasyon, kemoterapi gibi hücre dışı uyaranlar, büyüme faktörleri ve sitotoksik T lenfositleri ile tetiklenen ölüm reseptörlerine bağlı olarak başlamaktadır. Daha sonra prokaspaz-8 aktive edilerek kaskad şeklinde ilerleyen kaspaz aktivasyonları başlamaktadır. Aktive olan kaspaz-8; kaspaz-3, 6 ve 7'nin aktifleşmesini sağlamak ve bu aktivasyon, hücrede tipik apoptoz görüntüsünü meydana getirmektedir. Mitokondrinin önemli rol oynadığı intrinsik yol ise hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, hücre içi pH'sında azalma, DNA hasarı gibi faktörlere bağlı olarak mitokondri geçirgenliğinde görevli pro ve antiapoptotik moleküller arasındaki dengenin bozulmasıyla tetiklenmektedir. Bunun sonucunda proapoptotik bir ajan olan sitokrom c sitoplazmaya salınmaktadır. Sitoplazmaya salınımı sonucunda; apoptozom olarak bilinen bir kompleks aracılığıyla kaspaz-3 aktive edilmektedir.

Apoptozun ekstrinsik veya intrinsik yol aracılığıyla başlamasının ardından, kaspaz-8 ya da kaspaz-9 aktivasyonunun sonucunda bitirici (executioner) kaspaz olarak bilinen kaspaz-3 aktivasyonu meydana gelmektedir. Bu bitirici kaspaz, çok sayıda hücre bileşenini etkileyerek apoptozun gerçekleşmesini sağlamaktadır (320–325).

Akciğer hasarında apoptotik mekanizmaların rolünü inceleyen bir çalışmada; antioksidan etkilere sahip Ligustrazin (Tetrametilpirazin, TMP) adlı ajanın, LPS ile artan kaspaz-1, kaspaz-3 ve kaspaz-8 ekspresyonlarını düşürdüğü tespit edilmiş ve gelecekte ARDS tedavisinde TMP kullanımına ilişkin teorik bir temel sağlandığı belirtilmiştir (326). Liang ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada ise sıçanlarda akciğer I/R hasarında

deksmedetomidin ön tedavisinin akciğer dokusunda kaspaz-3 ve kaspaz-9'un mRNA ekspresyonlarını azalttığı gösterilmiştir (327). Mezenter İ/R ile indüklenen akut akciğer hasarının oluşturulduğu laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada, İ/R grubunun akciğer dokularında kaspaz 3, 8 ve 9 ekspresyonlarının, immunohistokimyasal incelemede kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir (133). ANTU ile indüklenen ARDS modelinin oluşturulduğu bir başka çalışmamızda ise, ANTU grubunun akciğerler dokularının immünohistokimyasal incelemesinde kaspaz-3 boyanmasının arttığı gösterilmiştir (298).

Geleneksel çin tıbbi müstahzarı olan Qingwenzhike (QWZK) adlı ajanın akut akciğer hasarı üzerindeki koruyucu etkilerini test etmek için sıçanlarda i.p. uygulanmış LPS ile indüklenen ARDS modelinin oluşturulduğu bir çalışmada, akciğer hasarına bağlı alveolar duvar kalınlaşması, alveoler boşluğa nötrofil infiltrasyonu, akciğer interstisyumunda kanama tespit edilmiş ve proinflamatuvar faktörler olan IL-6, TNF- α , MCP-1, IL-1 β , interlökin-18 (IL-18) ve IFN- γ ile fosfo-NF- κ B (p-NF- κ B), NOD benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren 3 (NLRP3) ve bölünmüş kaspaz-1 gibi proteinlerin ekspresyonunda artış saptanmıştır (328). Sıçanlarda duman inhalasyonu ile indüklenen ARDS modelinin kullanıldığı bir başka çalışmada ise periferik oksijen satürasyonunda azalma ve göğüs röntgeni üzerinde yaygın bilateral pulmoner infiltrat gelişimi gözlenmiş, ayrıca akciğer dokusunda inflamasyon, ödem ve artmış kaspaz-3 seviyeleri tespit edilmiştir (329).

Çalışmamızda apoptotik mekanizmaların ARDS'deki rolünü araştırmak amacıyla kaspaz-3 immünohistokimyasal incelemesi yapılmıştır. İmmünohistokimyasal incelemede ANTU ve LPS gruplarının akciğer dokularındaki kaspaz-3 boyanmasının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Hem ekstrinsik hem intrinsik apoptotik yolda ortak olarak etkili olan kaspaz-3'ün yükselmesi, apoptotik mekanizmaların her iki hasar modelindeki akciğer patolojisinde de rol oynadığını göstermektedir. Kaspaz-3 boyanması NF- κ B'ye benzer şekilde, ANTU grubunda daha çok alveolar duvar dokusunda, LPS grubunda ise bronşiol epiteli ve çevresinde daha yoğun gözlenmiştir. Bu bulgu; indirekt ve direkt akciğer hasarındaki patofizyolojik mekanizmalardan sorumlu olan sırasıyla endotel ve epitel hasarında, apoptozun da rol oynadığını ortaya koymaktadır. Ayrıca kaspaz-3 boyanması, LPS grubuyla karşılaştırıldığında ANTU grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

Kannabinoidler; endokannabinoidler, fitokannabinoidler ve sentetik kannabinoidler olmak üzere üç gruptur. En bilinen üyeleri arasında AEA ve 2-AG'nin yer aldığı endokannabinoidler, depolanmayarak sadece ihtiyaç durumunda araşidonik asitten sentezlenmektedir. AEA, kannabinoid reseptörlerde (CB₁ ve CB₂) parsiyel agonist, 2-AG ise full agonist etki göstermektedir. Bu endojen moleküller CB₁ ve CB₂ reseptörleri dışında; GPR55, GPR119, TRPV1, PPAR gibi farklı reseptörleri de aktive edebilmektedir. Endokannabinoid membran taşıyıcı enzimi (EMT), endokannabinoidlerin parçalanmak için hücreye geri alımını sağlarken, FAAH ve MAGL ise hücre içinde sırasıyla AEA ile 2-AG'nin yıkımından sorumludur. Endokannabinoid sistem; endokannabinoidlerle, başta CB₁ ve CB₂ olmak üzere kannabinoid reseptörleri ve kannabinoidlerin yapım ve yıkımından sorumlu enzimlerden oluşmaktadır. Bir başka grup olan fitokannabinoidlerin en önemli üyeleri arasında THC ve CBD bulunmaktadır ve bu moleküller bitkisel kökenli kannabinoidlerdir. CB reseptör agonist ve antagonistleri ise kannabinoidlerin son grubu olan sentetik kannabinoidleri oluşturmaktadır.

Yapılan çalışmalarda CB₂ reseptörlerinin monositler, makrofajlar, B ve T hücreleri gibi bağışıklık sistemine ait hücrelerde bol miktarda eksprese edildiği ve bu hücrelerde, CB₂ reseptör aktivasyonunun proinflamatuvar sitokinlerin salınımını azalttığı gösterilmiştir (255,330,331). Ayrıca CB₂ reseptörlerinin, bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu ve göçünü kontrol etme yeteneğine sahip olduğu da bildirilmiştir (332,333). ARDS patogenezinde inflamatuvar mediatörlerin önemli bir yeri olduğu düşünüldüğünde; inflamasyon üzerine olan bu etkileri nedeniyle kannabinoidlerin, ARDS için terapötik bir ajan olma potansiyeline sahip oldukları düşünülmektedir. Nitekim ARDS modellerinin kullanıldığı bazı çalışmalarda da kannabinoidlerin faydalı etkileri gösterilmiştir.

Sıçanlarda mezenter İ/R ile oluşturulan ARDS modelinde kannabinoid sisteminin etkilerinin araştırıldığı çalışmamızda; MAGL inhibitörü JZL184, CBD ve CB₂ agonisti JWH133, iskemiden 30 dakika önce uygulanmış, ardından bağırsak ve akciğer dokularında inceleme yapılmıştır. CBD ve JZL184 bağırsakta kaspaz-3, 8 ve 9 immünohistokimyasal boyanmasını azaltmıştır. Akciğer dokusunda ise CBD, kaspaz-3, 8 ve 9 immünohistokimyasal boyanmasını anlamlı olarak azaltırken; JZL184, kaspaz-8 boyanmasını anlamlı olarak azaltmıştır. Ayrıca JZL184'ün alveolar tıkanıklık, hemoraji, nötrofilik infiltrasyon ve alveolar duvar kalınlaşmasını; JWH133'ün ise nötrofilik infiltrasyon ve alveolar duvar kalınlaşmasını anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir (133). Bir

başka çalışmada ise, farelerin JWH133 ile ön tedavisinin; İ/R ile indüklenen akciğer ödemi ve akciğerlerdeki histopatolojik değişiklikleri önemli ölçüde azalttığı, akciğer TNF- α , IL-6, MDA düzeyleri ve MPO aktivitesini azaltarak SOD aktivitesini artırdığı belirtilmiştir (268). CBD ile indüklenmiş sepsise bağlı bir diğer akciğer hasarı modelinde ise, CB₂ reseptör up-regülasyonunun NF- κ B aktivitesini inhibe ettiği, proinflamatuvar faktörlerin (TNF- α , IL-6) salınımını azalttığı ve antiinflamatuvar faktörlerin (IL-10 ve IL-4) üretimini artırdığı gösterilmiştir (269).

Daha önce bahsedildiği üzere LPS gibi endotoksinler de pulmoner ödem ve nötrofiliye sebep olduğundan, hayvanlarda ARDS deney modeli oluşturmak için kullanılmaktadır. Bu ARDS deney modellerinde endokannabinoidlerin, fitokannabinoidlerin ve sentetik CB reseptör agonistlerinin etkileri incelenmiş ve kannabinoid tedavisinin hastalık üzerinde olumlu etkiler sağladığı ortaya konmuştur (334–337). Başka çalışmalarda da bu bulgular desteklenmiş (169,338), fakat bir çalışmada CBD tedavisinin LPS'nin neden olduğu ARDS'yi kötüleştirdiği belirtilmiştir (339).

Kannabinoidlerin enfektif akciğer patolojisi üzerindeki rolü ile ilgili Tahamtan ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, RSV enfeksiyonunda CB₂ reseptörünün etkileri incelenmiş ve CB₂'nin JWH133 tarafından aktivasyonunun ise akciğer patolojisini hafifleterek BAL hücre akışını ve sitokin/kemokin üretimini azalttığı tespit edilmiştir (250). Kannabinoidlerin akciğer fibrozisindeki etkilerini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada ise, farelerde nikotinle indüklenen interstisyel akciğer fibrozisi oluşturulmuş ve bu fibrozisin CB₂ antagonisti AM630 ile arttığı, CB₂ agonisti JWH 133 ile azaldığı gösterilmiştir. Bu sonuçlardan hareketle CB₂ agonistinin fibrozise karşı bir koruma sağlayabileceği belirtilmiştir (267).

Kannabinoidlerin oksidatif stres üzerine etkisi ile ilgili deneysel tip 2 diyabet modelinde, kannabinoid agonisti WIN 55,212-2'nin (WIN) miyokardiyal İ/R hasarındaki etkisinin incelendiği bir çalışmada, WIN'nin İ/R sonrası kardiyak iNOS ekspresyonunu azalttığı ve kalp üzerinde koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (293). Bir başka çalışmada ise CB₂ reseptör aktivasyonunun iNOS'a bağlı NO'nun nörotoksik aktivitesini inhibe ettiği ve anti-oksidatif protein olan Hsp70 seviyelerini artırdığı gösterilmiştir. Bu sayede nöronlardaki oksidatif/nitratif stresin azaldığı ve astrosit ve mikrogial aktivasyonun önlendiği belirtilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada anti-apoptotik mekanizmalara aracılık eden proteinlerin (Bcl-2) seviyelerinin arttığı da tespit edilmiştir (294). Benzer şekilde, CB₂

reseptörünün JWH-133 ile aktivasyonunun diyabete bağlı inflamasyon, oksidatif stres, fibrozis, hücre ölümü ve bunun sonucunda oluşan kardiyak işlev bozukluğunu hafiflettiği ve kaspaz-3/kaspaz-7 aktivitesi ile miyokard apoptozunu azalttığı gösterilmiştir (340).

JZL184 etkilerini, endokannabinoid 2-AG'yi parçalayan enzim olan MAGL'yi inhibe ederek göstermekte ve böylece 2-AG düzeylerini artırmaktadır (277). JZL184'ün güçlü immünsupresif ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (341). JZL184 aracılığıyla CB₁ ve esas olarak CB₂ reseptör aktivasyonunun, farelerde ilaca bağlı gastrik kanamalar sırasında (342) ve kolit modellerinde, inflamatuvar yanıtı azalttığı tespit edilmiştir (341). İnflamasyondaki rolü ile ilgili bir başka çalışmada, 10 mg/kg i.p. uygulanan JZL184'ün sıçan frontal korteksinde LPS ile indüklenmiş IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-10 artışını azalttığı, frontal kortekste araşidonik asit seviyelerini düşürdüğü ve plazma TNF- α ve IL-10 seviyelerindeki artışı hafiflettiği gösterilmiştir (278). LPS ile indüklenen bir murin ARDS modelinde ise, JZL184 ile tedavi edilen farelerde iltihaplı kontrol grubuna göre proinflamatuvar sitokin (TNF- α ve IL-6) ve kemokin (MCP-1) üretiminde bir azalma gözlenmiştir. Ayrıca JZL184'ün lökositlerin akciğere göçünü ve damar geçirgenliğini azalttığı, BAL'deki sitokin ve kemokin seviyeleri ile kan ve BAL'deki adezyon molekülü ekspresyonunu düşürdüğü belirtilmiştir (343). Bir başka çalışmada farelerde, intranasal (i.n.) LPS uygulamasıyla indüklenen deneysel hava yolu inflamasyonu ve trakeal hiperaktivitede, sistemik ve lokal FAAH ve MAGL inhibitörü tedavilerinin etkileri incelenmiştir. JZL184 ile sistemik ve lokal tedavinin, peribronşiyal ve parankimal inflamasyonu azalttığı ve hava yolu inflamasyonu ile hiperreaktivitesinde koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (344).

Çalışmamızda direkt ve indirekt akciğer hasarı üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla 10 mg/kg dozunda i.p. olarak uyguladığımız JZL184'ün; literatürde yer alan çalışmalarda elde edilmiş bulgularla uyumlu olarak, akciğer hasarı üzerine olumlu etkilerinin bulunduğu tespit edilmiştir.

ANTU aracılığıyla oluşturulmuş indirekt akciğer hasarında JZL184, AA/VA ile PE/VA oranlarını düşürerek pulmoner ödem ve plevral efüzyon oluşumunu azaltırken; LPS'ye bağlı direkt akciğer hasarında AA/VA oranını değiştirmemiştir. JZL184 ayrıca; ANTU'ya bağlı akciğer hasarında ödem, perivasküler genişleme ve interstisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltırken; alveolar duvar kalınlaşması, vakuolizasyon, alveolar makrofaj, hemoraji ve konjesyonda ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan düşüş sağlamıştır. JZL184'ün indirekt akciğer

hasarındaki bu olumlu etkileri, laboratuvarımızda yapılan önceki çalışmamızdaki bulgularla da uyumludur (133).

JZL184, LPS'ye bağlı direkt akciğer hasarında ise; ödem, perivasküler genişleme ve bronşiol lümeninde inflamatuvar hücre varlığını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltırken; alveolar duvar kalınlaşması, vakuolizasyon, interstisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, alveolar makrofaj, hemoraji ve konjesyonda ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan düşüş sağlamıştır. JZL184, her iki hasar modelinde ortak olarak ödem ve perivasküler genişlemeyi anlamlı düzeyde azaltırken; ANTU'ya bağlı indirekt akciğer hasarında interstisyumdaki inflamatuvar hücre infiltrasyonunu, LPS'ye bağlı direkt akciğer hasarında ise bronşiol lümenindeki inflamatuvar hücre varlığını anlamlı düzeyde azaltmıştır. Bu durum; indirekt akciğer hasarında, ANTU uygulaması sonucu oluşmuş endotel harabiyetine bağlı olarak akciğer interstisyumuna inflamatuvar hücre göçü ile; direkt akciğer hasarında ise intratrakeal uygulanmış LPS sonucu bronşiol lümenine inflamatuvar hücrelerin geçişi ile açıklanabilmektedir. Ayrıca JZL184, LPS grubunun bronşiol epitelindeki kondanse çekirdekli hücreler, lamina propriadaki nötrofil varlığı ile yer yer görülen deskuamasyon üzerine de olumlu etkiler göstermiştir. Bu bulgulardan hareketle, endotel hasarın ön planda olduğu indirekt ve epitel hasarın ön planda olduğu direkt ARDS modellerinde, modele özgü olarak JZL184'ün faydalı etkilerinde de farklılıkların bulunduğu görülmektedir. Bunlara ek olarak JZL184'ün her iki modelde alveolar duvar kalınlaşması, hemoraji, konjesyon gibi diğer patolojik parametreleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da azaltması, ilacın akciğer doku hasarı üzerinde çeşitli koruyucu etkilere sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

JZL184'ün her iki hasar modelinde rol oynayan oksidatif stres mekanizmaları üzerinde belirgin bir etkisi gösterilememiş olsa da, ilacın antioksidan sisteme ait bir parametre olan katalaz seviyesini, ANTU ve LPS tedavi gruplarında sırasıyla ANTU ve LPS gruplarına göre artırdığı tespit edilmiş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca JZL184'ün LPS'ye bağlı akciğer hasarında antioksidan sisteme ait bir başka parametre olan GSH seviyesini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı saptanmıştır. Bu bulgular JZL184'ün akciğer hasarında antioksidan parametreleri artırarak oksidatif stresi azaltabileceğini göstermektedir.

İmmünohistokimyasal incelemelerde ise JZL184, hem ANTU hem de LPS'ye bağlı akciğer hasarında NF- κ B ve kaspaz-3 boyanmasını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde

azaltmıştır. Bu azalma, patoloji gruplarındaki boyanma yoğunluğuyla uyumlu olarak ANTU tedavi grubunda daha çok alveolar duvar dokusunda, LPS tedavi grubunda ise özellikle bronşiol epiteli ve çevresinde tespit edilmiştir. Böylece JZL184'ün birçok patofizyolojik süreçte rol oynayan NF- κ B ve apoptotik yollarda etkili kaspaz-3 aracılığıyla, akciğer hasarında inflamatuvar ve apoptotik mekanizmalar üzerinde etki ettiği ortaya konmuştur. Bu düzenleyici etkilerdeki iki tedavi grubu arasındaki fark, indirekt akciğer hasar modelinde endotel, direkt akciğer hasar modelinde ise epitel etkilenmesinin ön planda olduğu şekilde izlenmiştir.

Tüm sonuçlar göz önüne alındığında çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular; indirekt ve direkt ARDS modellerinde akciğer hasarından sorumlu patofizyolojik mekanizmalar arasında fark bulunduğunu, JZL184'ün doku hasarı, inflamasyon ve apoptotik mekanizmaları düzenleyerek akciğer hasarında koruyucu etkilere sahip olduğunu ve modellerin farklı patofizyolojik mekanizmalarıyla uyumlu olarak, bu koruyucu etkilerde de farklılıkların bulunduğunu ortaya koymaktadır. Sonuç olarak MAGL inhibisyonunun, farklı nedenlere bağlı olarak gelişen ARDS mekanizmaları üzerinde, nedene özgü faydalı etkilere sahip olduğu ve bu sayede gelecekte ARDS tedavisi için etkili bir terapötik mekanizma olma potansiyeli taşıdığı gösterilmiştir.

6. SONUÇLAR

Tez çalışmamızda, ANTU ile indirekt, LPS ile direkt ARDS modelleri oluşturulmuştur. İki deney modelindeki farklı patofizyolojik mekanizmalar, MAGL enzim inhibitörü JZL184'ün bu deney modellerinde meydana gelen akciğer hasarı üzerine olası koruyucu etkileri ve bu koruyucu etkilerde modele özgü olası farklılıklar incelenmiştir.

1. 10 mg/kg i.p. uygulanan ANTU ve 5 mg/kg intratrakeal uygulanan LPS ile oluşturulan sırasıyla indirekt ve direkt ARDS modellerinde;

- AA/VA oranı, ANTU grubunda LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir.
- Plevral efüzyon ANTU grubunda mevcutken LPS grubunda tespit edilmemiştir.
- Biyokimyasal incelemelerde, akciğer dokusunda SOD seviyesi, ANTU grubunda LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekken; MDA, katalaz ve GSH seviyelerinde ise iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir.
- Histopatolojik incelemede, akciğer dokusunda ödem ve perivasküler genişleme ANTU grubunda LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir. Ayrıca LPS grubunda bronşiol lümeninde inflamatuvar hücre mevcutken ANTU grubunda bronşiol lümeninde inflamatuvar hücre tespit edilmemiştir.
- İmmünohistokimyasal incelemede, akciğer dokusunda kaspaz-3 boyanması ANTU grubunda LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekken, NF-κB boyanmasında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir.

2. 10 mg/kg i.p. uygulanan JZL184, ANTU ile oluşturulan ARDS modelinde;

- AA/VA oranı, PE oluşumu ve PE/VA oranında, istatistiksel olarak anlamlı olmayan düşüş sağlamıştır.
- Biyokimyasal incelemelerde, akciğer dokusunda MDA, SOD ve GSH seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değiştirmemiştir. Katalaz

seviyesini ise artırmış ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

- Histopatolojik incelemede, akciğer dokusunda ödem, interstisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve perivasküler genişlemeyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır.
- İmmünohistokimyasal incelemede, akciğer dokusunda NF- κ B ve kaspaz-3 boyanmasını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır ve bu azalma patoloji grubundaki boyanma yoğunluğuyla uyumlu olarak daha çok alveolar duvar dokusunda tespit edilmiştir.

3. Aynı doz ve yolla uygulanan JZL184, LPS ile oluşturulan ARDS modelinde;

- AA/VA oranını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değiştirmemiştir.
- Biyokimyasal incelemelerde, akciğer dokusunda MDA ve SOD seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değiştirmemiştir. Katalaz seviyesini artırmış ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. GSH seviyesini ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırmıştır.
- Histopatolojik incelemede, akciğer dokusunda ödem, perivasküler genişleme ve bronşiol lümeninde inflamatuvar hücre varlığını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır.
- İmmünohistokimyasal incelemede, akciğer dokusunda NF- κ B ve kaspaz-3 boyanmasını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır ve bu azalma patoloji grubundaki boyanma yoğunluğuyla uyumlu olarak daha çok bronşiol epiteli ve çevresinde tespit edilmiştir.

4. Bu sonuçlara göre, farklı patofizyolojik mekanizmalara sahip iki akciğer hasarı modelinden, indirekt ARDS modelinde endotel hasarın, direkt ARDS modelinde ise epitel hasarın ön planda olduğu gösterilmiştir.

5. JZL184'ün MAGL inhibisyonu yoluyla endojen 2-AG seviyelerini artırarak doku hasarı, inflamasyon ve apoptotik mekanizmaları düzenlediği ve akciğer hasarında koruyucu etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir.

6. Farklı patofizyolojik süreçlerle uyumlu olarak iki farklı akciğer hasarı modelinde, JZL184'ün koruyucu etkilerinde de modele özgü farklılıklar bulunduğu ortaya konmuştur.

7. Çalışmamızdan elde ettiğimiz tüm bulgular sonucunda, JZL184'ün farklı etiyojilere bağlı gelişen ARDS'de, etiyojiiye özgü olarak potansiyel tedavi hedefi olabileceği gösterilmiştir.



7. KAYNAKLAR

1. Ashbaugh D, Boyd Bigelow D, Petty T, Levine B. Acute Respiratory Distress In Adults. *Lancet*. 1967 Aug;290(7511):319–23.
2. Petty TL, Ashbaugh DG. The Adult Respiratory Distress Syndrome. *Chest*. 1971 Sep;60(3):233–9.
3. Bone RC, Francis PB, Pierce AK. Intravascular coagulation associated with the adult respiratory distress syndrome. *Am J Med*. 1976 Nov;61(5):585–9.
4. Pepe PE, Potkin RT, Reus DH, Hudson LD, Carrico CJ. Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome. *Am J Surg*. 1982 Jul;144(1):124–30.
5. Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR. An Expanded Definition of the Adult Respiratory Distress Syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1988 Sep;138(3):720–3.
6. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Mar;149(3):818–24.
7. Phua J, Stewart TE, Ferguson ND. Acute respiratory distress syndrome 40 years later: Time to revisit its definition*. *Crit Care Med*. 2008 Oct;36(10):2912–21.
8. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, et al. Acute Respiratory Distress Syndrome. *JAMA*. 2012 Jun 20;307(23):2526–33.
9. Lumb A, Thomas C. Nunn’s applied respiratory physiology. Elsevier Health Sciences; 2005.
10. Shevyrin VA, Morzherin YY. Cannabinoids: structures, effects, and classification. *Russ Chem Bull*. 2015 Aug;64(6):1249–66.
11. Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2020 Jan 12;16(1):9–29.
12. Ye L, Cao Z, Wang W, Zhou N. New Insights in Cannabinoid Receptor Structure and Signaling. *Curr Mol Pharmacol*. 2019 Jul 29;12(3):239–48.
13. An D, Peigneur S, Hendrickx LA, Tytgat J. Targeting Cannabinoid Receptors:

- Current Status and Prospects of Natural Products. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 17;21(14):5064.
14. Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L. The Biosynthesis, Fate and Pharmacological Properties of Endocannabinoids. In 2005. p. 147–85.
 15. Dinh TP, Kathuria S, Piomelli D. RNA Interference Suggests a Primary Role for Monoacylglycerol Lipase in the Degradation of the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol. *Mol Pharmacol.* 2004 Nov;66(5):1260–4.
 16. Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids.* 2002 Feb;66(2–3):173–92.
 17. Maccarrone M, Dainese E, Oddi S. Intracellular trafficking of anandamide: new concepts for signaling. *Trends Biochem Sci.* 2010 Nov;35(11):601–8.
 18. Alger BE, Kim J. Supply and demand for endocannabinoids. *Trends Neurosci.* 2011 Jun;34(6):304–15.
 19. Mechoulam R, Parker LA. The Endocannabinoid System and the Brain. *Annu Rev Psychol.* 2013 Jan 3;64(1):21–47.
 20. Adams IB, Martin BR. Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction.* 1996 Nov;91(11):1585–614.
 21. Ferguson ND, Fan E, Camporota L, Antonelli M, Anzueto A, Beale R, et al. The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. *Intensive Care Med.* 2012 Oct 25;38(10):1573–82.
 22. Guérin C, Thompson T, Brower R. The ten diseases that look like ARDS. *Intensive Care Med.* 2015 Jun 20;41(6):1099–102.
 23. Pulmonary-Artery versus Central Venous Catheter to Guide Treatment of Acute Lung Injury. *N Engl J Med.* 2006 May 25;354(21):2213–24.
 24. Ferguson ND, Meade MO, Hallett DC, Stewart TE. High values of the pulmonary artery wedge pressure in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* 2002 Aug 11;28(8):1073–7.
 25. Richard C. Early Use of the Pulmonary Artery Catheter and Outcomes in Patients With Shock and Acute Respiratory Distress Syndrome: A Randomized Controlled

- Trial. JAMA. 2003 Nov 26;290(20):2713.
26. Çalışkan T. Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu (ARDS): Dün, Bugün, Yarın. Yoğun Bakım Derg. 2013;11(1):13–20.
 27. Bersten AD, Edibam C, Hunt T, Moran J. Incidence and Mortality of Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome in Three Australian States. Am J Respir Crit Care Med. 2002 Feb 15;165(4):443–8.
 28. Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, Brazzi L, Pimentel J, Lewandowski K, et al. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Intensive Care Med. 2004 Jan 1;30(1):51–61.
 29. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, et al. Incidence and Outcomes of Acute Lung Injury. N Engl J Med. 2005 Oct 20;353(16):1685–93.
 30. Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. JAMA. 2016 Feb 23;315(8):788.
 31. Phua J, Badia JR, Adhikari NKJ, Friedrich JO, Fowler RA, Singh JM, et al. Has Mortality from Acute Respiratory Distress Syndrome Decreased over Time? Am J Respir Crit Care Med. 2009 Feb 1;179(3):220–7.
 32. Fanelli V, Vlachou A, Ghannadian S, Simonetti U, Slutsky AS, Zhang H. Acute respiratory distress syndrome: New definition, current and future therapeutic options. Vol. 5, Journal of Thoracic Disease. 2013. p. 326–34.
 33. Raghavendran K, Napolitano LM. ALI and ARDS: Challenges and Advances. Crit Care Clin. 2011 Jul;27(3):xiii–xiv.
 34. Aslan AT, Doğru D, Özçelik U. Akut respiratuar distres sendromu. Vol. 47, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi. 2004. p. 209–21.
 35. Altıntaş ND, Topeli İskit A. Akut solunum sıkıntısı sendromu tanisi ve tedavisinde güncel yaklaşımlar. Vol. 57, Tuberkuloz ve Toraks. 2009. p. 228–36.
 36. Shaver CM, Bastarache JA. Clinical and Biological Heterogeneity in Acute Respiratory Distress Syndrome. Clin Chest Med. 2014 Dec;35(4):639–53.
 37. Menezes SLS, Bozza PT, Faria Neto HCC, Laranjeira AP, Negri EM, Capelozzi VL, et al. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and

- ultrastructural analyses. *J Appl Physiol*. 2005 May;98(5):1777–83.
38. Rocco PRM, Pelosi P. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: myth or reality? *Curr Opin Crit Care*. 2008 Feb;14(1):50–5.
 39. Santos FB, Nagato LKS, Boechem NM, Negri EM, Guimarães A, Capelozzi VL, et al. Time course of lung parenchyma remodeling in pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. *J Appl Physiol*. 2006 Jan;100(1):98–106.
 40. Calfee CS, Janz DR, Bernard GR, May AK, Kangelaris KN, Matthay MA, et al. Distinct Molecular Phenotypes of Direct vs Indirect ARDS in Single-Center and Multicenter Studies. *Chest*. 2015 Jun;147(6):1539–48.
 41. Calfee CS, Eisner MD, Ware LB, Thompson BT, Parsons PE, Wheeler AP, et al. Trauma-associated lung injury differs clinically and biologically from acute lung injury due to other clinical disorders. *Crit Care Med*. 2007 Oct;35(10):2243–50.
 42. McCormack V, Tolhurst-Cleaver S. Acute respiratory distress syndrome. *BJA Educ*. 2017 May;17(5):161–5.
 43. Butt Y, Kurdowska A, Allen TC. Acute Lung Injury: A Clinical and Molecular Review. *Arch Pathol Lab Med*. 2016 Apr 1;140(4):345–50.
 44. Tsushima K, King LS, Aggarwal NR, De Gorordo A, D'Alessio FR, Kubo K. Acute Lung Injury Review. *Intern Med*. 2009;48(9):621–30.
 45. Crimi E, Slutsky AS. Inflammation and the acute respiratory distress syndrome. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2004 Sep;18(3):477–92.
 46. Prudhomme JB, Ware LB. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: mechanisms and potential new therapies. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2004 Oct;1(1):123–8.
 47. Jain S, Bellingan G. Basic science of acute lung injury. *Surg*. 2007 Mar;25(3):112–6.
 48. Wheeler AP, Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *Lancet*. 2007 May;369(9572):1553–64.
 49. Broaddus VC, Ernst J, King JTE, Lazarus S, Sarmiento KF, Schnapp LM, et al. *Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine*. Elsevier; 2005.
 50. Aggarwal NR, King LS, D'Alessio FR. Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2014 Apr

15;306(8):L709–25.

51. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol*. 2011 Nov 25;11(11):750–61.
52. Toshchakov V, Jones BW, Perera P-Y, Thomas K, Cody MJ, Zhang S, et al. TLR4, but not TLR2, mediates IFN- β -induced STAT1 α/β -dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol*. 2002 Apr 18;3(4):392–8.
53. Rosseau S, Hammerl P, Maus U, Walmrath H-D, Schütte H, Grimminger F, et al. Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2000 Jul 1;279(1):L25–35.
54. Wilhelmsen K, Mesa KR, Prakash A, Xu F, Hellman J. Activation of endothelial TLR2 by bacterial lipoprotein upregulates proteins specific for the neutrophil response. *Innate Immun*. 2012 Aug 20;18(4):602–16.
55. Matthay MA, Eschenbacher WL, Goetzl EJ. Elevated concentrations of leukotriene D4 in pulmonary edema fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *J Clin Immunol*. 1984 Nov;4(6):479–83.
56. Fox ED, Heffernan DS, Cioffi WG, Reichner JS. Neutrophils from critically ill septic patients mediate profound loss of endothelial barrier integrity. *Crit Care*. 2013;17(5):R226.
57. Ognibene FP, Martin SE, Parker MM, Schlesinger T, Roach P, Burch C, et al. Adult Respiratory Distress Syndrome in Patients with Severe Neutropenia. *N Engl J Med*. 1986 Aug 28;315(9):547–51.
58. Williams AE, Chambers RC. The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS? *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2014 Feb 1;306(3):L217–30.
59. Miller EJ, Cohen AB, Matthay MA. Increased interleukin-8 concentrations in the pulmonary edema fluid of patients with acute respiratory distress syndrome from sepsis. *Crit Care Med*. 1996 Sep;24(9):1448–54.
60. Miller EJ, Cohen AB, Nagao S, Griffith D, Maunder RJ, Martin TR, et al. Elevated Levels of NAP-1/Interleukin-8 Are Present in the Airspaces of Patients with the Adult Respiratory Distress Syndrome and Are Associated with Increased Mortality. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Aug;146(2):427–32.

61. Kurdowska A, Noble JM, Grant IS, Robertson CR, Haslett C, Donnelly SC. Anti-interleukin-8 autoantibodies in patients at risk for acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 2002 Oct;30(10):2335–7.
62. Kurdowska AK, Geiser TK, Alden SM, Dziadek BR, Noble JM, Nuckton TJ, et al. Activity of pulmonary edema fluid interleukin-8 bound to $\alpha 2$ -macroglobulin in patients with acute lung injury. *Am J Physiol Cell Mol Physiol.* 2002 May 1;282(5):L1092–8.
63. Fudala R, Krupa A, Matthay MA, Allen TC, Kurdowska AK. Anti-IL-8 autoantibody:IL-8 immune complexes suppress spontaneous apoptosis of neutrophils. *Am J Physiol Cell Mol Physiol.* 2007 Aug;293(2):L364–74.
64. Lee A, Whyte MKB, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol.* 1993 Oct;54(4):283–8.
65. Brinkmann V, Laube B, Abu Abed U, Goosmann C, Zychlinsky A. Neutrophil Extracellular Traps: How to Generate and Visualize Them. *J Vis Exp.* 2010 Feb 24;(36).
66. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science.* 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.
67. Thomas GM, Carbo C, Curtis BR, Martinod K, Mazo IB, Schatzberg D, et al. Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. *Blood.* 2012 Jun 28;119(26):6335–43.
68. Wiener-Kronish JP, Albertine KH, Matthay MA. Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to *Escherichia coli* endotoxin. *J Clin Invest.* 1991 Sep 1;88(3):864–75.
69. Modelska K, Pittet J-F, Folkesson HG, Courtney Broaddus V, Matthay MA. Acid-induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Nov 1;160(5):1450–6.
70. Greene KE, Wright JR, Steinberg KP, Ruzinski JT, Caldwell E, Wong WB, et al. Serial Changes in Surfactant-associated Proteins in Lung and Serum before and after Onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Dec 1;160(6):1843–50.

71. Bitterman PB. Pathogenesis of fibrosis in acute lung injury. *Am J Med.* 1992 Jun;92(6):S39–43.
72. Hartshorn KL, Crouch E, White MR, Colamussi ML, Kakkanatt A, Tauber B, et al. Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria. *Am J Physiol Cell Mol Physiol.* 1998 Jun 1;274(6):L958–69.
73. Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, Kamran MF, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D: Structure, function and receptors. *Mol Immunol.* 2006 Mar;43(9):1293–315.
74. Mehta D, Ravindran K, Kuebler WM. Novel regulators of endothelial barrier function. *Am J Physiol Cell Mol Physiol.* 2014 Dec 15;307(12):L924–35.
75. Matthay MA, Zimmerman GA. Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005 Oct;33(4):319–27.
76. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2008 Oct;8(10):776–87.
77. Diep BA, Chan L, Tattevin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, et al. Polymorphonuclear leukocytes mediate Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc Natl Acad Sci.* 2010 Mar 23;107(12):5587–92.
78. Wiener-Kronish J, Pittet J-F. Therapies against Virulence Products of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. *Semin Respir Crit Care Med.* 2011 Apr 19;32(02):228–35.
79. Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt JM, et al. The Tie-2 ligand Angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood.* 2004 Jun 1;103(11):4150–6.
80. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, et al. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med.* 2000 Apr;6(4):460–3.
81. Ricciuto DR, dos Santos CC, Hawkes M, Toltl LJ, Conroy AL, Rajwans N, et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 as clinically informative prognostic biomarkers of morbidity and mortality in severe sepsis. *Crit Care Med.* 2011 Apr;39(4):702–10.

82. Parikh SM, Mammoto T, Schultz A, Yuan H-T, Christiani D, Karumanchi SA, et al. Excess Circulating Angiopoietin-2 May Contribute to Pulmonary Vascular Leak in Sepsis in Humans. Barnes PJ, editor. *PLoS Med.* 2006 Jan 24;3(3):e46.
83. David S, Mukherjee A, Ghosh CC, Yano M, Khankin E V, Wenger JB, et al. Angiopoietin-2 may contribute to multiple organ dysfunction and death in sepsis*. *Crit Care Med.* 2012 Nov;40(11):3034–41.
84. Hoeboer SH, Groeneveld AJ, der Heijden M van, Oudemans-van Straaten HM. Serial inflammatory biomarkers of the severity, course and outcome of late onset acute respiratory distress syndrome in critically ill patients with or at risk for the syndrome after new-onset fever. *Biomark Med.* 2015 Jun;9(6):605–16.
85. Johnson ER, Matthay MA. Acute Lung Injury: Epidemiology, Pathogenesis, and Treatment. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2010 Aug;23(4):243–52.
86. Maniatis NA, Kotanidou A, Catravas JD, Orfanos SE. Endothelial pathomechanisms in acute lung injury. *Vascul Pharmacol.* 2008 Oct;49(4–6):119–33.
87. Shabbir W, Scherbaum-Hazemi P, Tzotzos S, Fischer B, Fischer H, Pietschmann H, et al. Mechanism of Action of Novel Lung Edema Therapeutic AP301 by Activation of the Epithelial Sodium Channel. *Mol Pharmacol.* 2013 Dec;84(6):899–910.
88. Tzotzos S, Fischer B, Fischer H, Pietschmann H, Lucas R, Dupré G, et al. AP301, a synthetic peptide mimicking the lectin-like domain of TNF, enhances amiloride-sensitive Na(+) current in primary dog, pig and rat alveolar type II cells. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013 Jun;26(3):356–63.
89. Wohlrab P, Kraft F, Tretter V, Ullrich R, Markstaller K, Klein KU. Recent advances in understanding acute respiratory distress syndrome. *F1000Research.* 2018 Mar 5;7:263.
90. Silva PL, Rocco PRM, Pelosi P. FG-4497: a new target for acute respiratory distress syndrome? *Expert Rev Respir Med.* 2015 Jul 4;9(4):405–9.
91. Matthay MA, Zimmerman GA, Esmon C, Bhattacharya J, Coller B, Doerschuk CM, et al. Future Research Directions in Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Apr 1;167(7):1027–35.
92. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J*

- Physiol Cell Mol Physiol. 2008 Sep;295(3):L379–99.
93. Kaynar G, Yurdakan G, Comert F, Yilmaz-Sipahi E. Effects of peripheral benzodiazepine receptor ligand Ro5-4864 in four animal models of acute lung injury. *J Surg Res*. 2013 Jun;182(2):277–84.
 94. Martin TR, Mathison JC, Tobias PS, Letúrcq DJ, Moriarty AM, Maunder RJ, et al. Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide. Implications for cytokine production in normal and injured lungs. *J Clin Invest*. 1992 Dec 1;90(6):2209–19.
 95. Yasuda T. Hyaluronan Inhibits Akt, Leading to Nuclear Factor- κ B Down-Regulation in Lipopolysaccharide-Stimulated U937 Macrophages. *J Pharmacol Sci*. 2011;115(4):509–15.
 96. Khadangi F, Forgues A-S, Tremblay-Pitre S, Dufour-Mailhot A, Henry C, Boucher M, et al. Intranasal versus intratracheal exposure to lipopolysaccharides in a murine model of acute respiratory distress syndrome. *Sci Rep*. 2021 Apr 8;11(1):7777.
 97. Yilmaz Sipahi E, Atalay F. Experimental Models of Acute Lung Injury. *Eurasian J Pulmonol*. 2014 Sep 2;16(2):69–77.
 98. Reiss LK, Uhlig U, Uhlig S. Models and mechanisms of acute lung injury caused by direct insults. *Eur J Cell Biol*. 2012 Jun;91(6–7):590–601.
 99. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, et al. An Official American Thoracic Society Workshop Report: Features and Measurements of Experimental Acute Lung Injury in Animals. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 May;44(5):725–38.
 100. Bastarache JA, Blackwell TS. Development of animal models for the acute respiratory distress syndrome. *Dis Model Mech*. 2009 Apr 30;2(5–6):218–23.
 101. Lai C-C, Liu W-L, Chen C-M. Glutamine Attenuates Acute Lung Injury Caused by Acid Aspiration. *Nutrients*. 2014 Aug 5;6(8):3101–16.
 102. Griese M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J*. 1999 Jun 1;13(6):1455–76.
 103. Muellenbach RM, Kredel M, Bernd Z, Johannes A, Kuestermann J, Schuster F, et al. Acute Respiratory Distress Induced By Repeated Saline Lavage Provides Stable

- Experimental Conditions For 24 Hours In Pigs. *Exp Lung Res.* 2009 Jan 2;35(3):222–33.
104. Fard N, Saffari A, Emami G, Hofer S, Kauczor H-U, Mehrabi A. Acute respiratory distress syndrome induction by pulmonary ischemia–reperfusion injury in large animal models. *J Surg Res.* 2014 Jun;189(2):274–84.
 105. Altemeier WA, Liles WC, Villagra-Garcia A, Matute-Bello G, Glenny RW. Ischemia-Reperfusion Lung Injury Is Attenuated in MyD88-Deficient Mice. Eltzschig HK, editor. *PLoS One.* 2013 Oct 11;8(10):e77123.
 106. Gubernatorova EO, Perez-Chanona E, Koroleva EP, Jobin C, Tumanov A V. Murine Model of Intestinal Ischemia-reperfusion Injury. *J Vis Exp.* 2016 May 11;2016(111).
 107. Sheu EG, Wakatsuki K, Oakes S, Carroll MC, Moore FD. Prevention of intestinal ischemia-reperfusion injury in humanized mice. *Surgery.* 2016 Aug;160(2):436–42.
 108. Fujita M, Kuwano K, Kunitake R, Hagimoto N, Miyazaki H, Kaneko Y, et al. Endothelial Cell Apoptosis in Lipopolysaccharide–Induced Lung Injury in Mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 1998;117(3):202–8.
 109. Wang HL, Akinci IO, Baker CM, Urich D, Bellmeyer A, Jain M, et al. The Intrinsic Apoptotic Pathway Is Required for Lipopolysaccharide-Induced Lung Endothelial Cell Death. *J Immunol.* 2007 Aug 1;179(3):1834–41.
 110. Kuida H, Hinshaw LB, Gilbert RP, Visscher MB. Effect of Gram-Negative Endotoxin on Pulmonary Circulation. *Am J Physiol Content.* 1958 Jan 31;192(2):335–44.
 111. Reutershan J, Cagnina RE, Chang D, Linden J, Ley K. Therapeutic Anti-Inflammatory Effects of Myeloid Cell Adenosine Receptor A2a Stimulation in Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury. *J Immunol.* 2007 Jul 15;179(2):1254–63.
 112. Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol.* 2011 Apr;19(4):198–208.
 113. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, Bland KI, et al. Cecal Ligation And Puncture. *Shock.* 2005 Dec;24(Supplement 1):52–7.
 114. Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, H??ser N, et al. Cecal Ligation And Puncture Versus Colon Ascendens Stent Peritonitis: Two Distinct

- Animal Models For Polymicrobial Sepsis. *Shock*. 2004 Jun;21(6):505–12.
115. Lee SM, Choi H, Yang G, Park KC, Jeong S, Hong S. microRNAs mediate oleic acid-induced acute lung injury in rats using an alternative injury mechanism. *Mol Med Rep*. 2014 Jul;10(1):292–300.
 116. Cunningham AL, Hurley J V. Alpha-naphthyl-thiourea-induced pulmonary oedema in the rat: A topographical and electron-microscope study. *J Pathol*. 1972 Jan;106(1):25–35.
 117. Adar A, Can EY, Elma Y, Akpolat-Ferah M, Kececi M, Muderrisoglu H, et al. A new and simple parameter for diagnosis pulmonary edema: Expiratory air humidity. *Hear Lung*. 2022 Mar;52:165–9.
 118. Erdem M, Yurdakan G, Yilmaz-Sipahi E. The Effects of Ketamine, Midazolam and Ketamine/Xylazine on Acute Lung Injury Induced by α -Naphthylthiourea in Rats. *Adv Clin Exp Med*. 2014;23(3):343–51.
 119. Atalay F, Yurdakan G, Yilmaz-Sipahi E. Effect of the endothelin receptor antagonist tezosentan on alpha-naphthylthiourea-induced lung injury in rats. *Kaohsiung J Med Sci*. 2012 Feb 13;28(2):72–8.
 120. Sipahi (Yilmaz) E. Acute Effect Of Endothelin-1 On Lung Oedema Induced By Alpha-Naphthylthiourea (Antu). *Pharmacol Res*. 1996 Jun;33(6):375–8.
 121. Sipahi (Yilmaz) E, Hodoğlugil U, Üstün H, Zengil H, Türker RK, Ercan ZS. An unexpected interaction between NG-nitro-l-arginine methyl ester and l-arginine in α -naphthylthiourea-induced pulmonary oedema in rats. *Eur J Pharmacol*. 1997 Feb;321(1):45–51.
 122. Sipahi E, Ozeltekin I, Comert M, Barut F, Ustun H, Sipahi T. Oxidized low-density lipoproteins accumulate in rat lung after experimental lung edema induced by alpha-naphthylthiourea (ANTU). *Pharmacol Res*. 2004 Dec;50(6):585–91.
 123. Comert M, Yilmaz Sipahi E, Ustun H, Isikdemir F, Numanoglu G, Barut F, et al. Morphine modulates inducible nitric oxide synthase expression and reduces pulmonary oedema induced by α -naphthylthiourea. *Eur J Pharmacol*. 2005 Mar;511(2–3):183–9.
 124. Sipahi E, Üstün H, Niyazi Ayoglu F. Acute effects of pentobarbital, thiopental and

- urethane on lung oedema induced by alpha-naphthylthiourea (antu). *Pharmacol Res.* 2002 Mar;45(3):235–9.
125. Hancı V, Yurdakan G, Yurtlu S, Turan İÖ, Sipahi EY. Protective effect of dexmedetomidine in a rat model of α -naphthylthiourea-induced acute lung injury. *J Surg Res.* 2012 Nov;178(1):424–30.
 126. Richter CP. The Physiology And Cytology Of Pulmonary Edema And Pleural Effusion Produced In Rats By Alpha-naphthyl thiourea (ANTU). *J Thorac Surg.* 1952 Jan;23(1):66–91.
 127. Lee PW, Arnau T, Neal RA. Metabolism of α -naphthylthiourea by rat liver and rat lung microsomes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1980 Mar 30;53(1):164–73.
 128. Ercan ZS, Eren S, Zengil H, Türker RK. Possible Involvement of Eicosanoids in Alpha-Naphthylthiourea-Induced Pulmonary Oedema and Alteration of Angiotensin-Converting Enzyme Activity. *Pharmacology.* 1993 May;46(5):274–80.
 129. O'brien RF, Makarski JS, Rounds S. Studies on the Mechanism of Decreased Angiotensin I Conversion in Rat Lungs Injured with Alpha-Naphthylthiourea. *Exp Lung Res.* 1985 Jan 2;8(4):243–59.
 130. Epstein FH, McCord JM. Oxygen-Derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury. *N Engl J Med.* 1985 Jan 17;312(3):159–63.
 131. Matés JM, Pérez-Gómez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999 Nov;32(8):595–603.
 132. Riaz AA, Wan MX, Schäfer T, Dawson P, Menger MD, Jeppsson B, et al. Allopurinol and superoxide dismutase protect against leucocyte–endothelium interactions in a novel model of colonic ischaemia–reperfusion. *Br J Surg.* 2002 Dec 2;89(12):1572–80.
 133. Yilmaz-Can E, Gulle K, Akpolat-Ferah M, Can M, Guven B, Kokturk F, et al. The Effects of Cannabinoid System on Acute Lung Injury Induced by Mesenteric Ischemia/Reperfusion in Rats. *Int J Pulm Respir Sci.* 2021 Sep 30;5(3).
 134. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006 Mar 10;160(1):1–40.

135. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Oct 1;1(4):a000034–a000034.
136. Lawrence T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Dec 1;1(6):a001651–a001651.
137. Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest.* 2001 Jan 1;107(1):7–11.
138. Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci.* 2014 Jun;1319(1):82–95.
139. Zhang H, Sun S-C. NF- κ B in inflammation and renal diseases. *Cell Biosci.* 2015 Dec 16;5(1):63.
140. Pai S, Thomas R. Immune deficiency or hyperactivity-Nf- κ b illuminates autoimmunity. *J Autoimmun.* 2008 Nov;31(3):245–51.
141. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239–57.
142. Paweletz N. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Jan;2(1):72–5.
143. Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology.* 2002 Dec;181–182:471–4.
144. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular Responses to DNA Damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001 Apr;41(1):367–401.
145. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF Receptor Superfamilies. *Cell.* 2001 Feb 23;104(4):487–501.
146. Ashkenazi A, Dixit VM. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science (80-).* 1998 Aug 28;281(5381):1305–8.
147. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu Y-M, Scott H, Hession C, et al. TWEAK, a New Secreted Ligand in the Tumor Necrosis Factor Family That Weakly Induces Apoptosis. *J Biol Chem.* 1997 Dec 19;272(51):32401–10.
148. Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol.* 1998 Oct;10(5):545–51.
149. Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. Intracellular mechanisms of TRAIL:

- apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*. 2001 Apr 19;20(17):2122–33.
150. Rubio-Moscardo F. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*. 2005 Nov 1;106(9):3214–22.
 151. Hsu H, Xiong J, Goeddel D V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell*. 1995 May 19;81(4):495–504.
 152. Wajant H. The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm. *Science* (80-). 2002 May 31;296(5573):1635–6.
 153. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 1995 Nov 15;14(22):5579–88.
 154. Saelens X, Festjens N, Walle L Vande, Gorp M van, Loo G van, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004 Apr 12;23(16):2861–74.
 155. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell*. 2000 Jul 7;102(1):33–42.
 156. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*. 2006 Sep 1;13(9):1423–33.
 157. Chinnaiyan AM. The Apoptosome: Heart and Soul of the Cell Death Machine. *Neoplasia*. 1999 Apr;1(1):5–15.
 158. Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J*. 2004 May 19;23(10):2134–45.
 159. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CYJ, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001 Mar 29;410(6828):549–54.

160. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001 Jul 5;412(6842):95–9.
161. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):43–50.
162. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002 Sep 1;2(9):647–56.
163. Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*. 2001 Dec 1;29(6):684.
164. Hanuš L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, et al. 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB 1 receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 2001 Mar 27;98(7):3662–5.
165. Porter AC, Sauer J-M, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, et al. Characterization of a Novel Endocannabinoid, Virodhamine, with Antagonist Activity at the CB1 Receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Jun 1;301(3):1020–4.
166. Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci*. 2002 Jun 11;99(12):8400–5.
167. Iversen LL. *The Science of Marijuana*. The Science of Marijuana. Oxford University Press; 2007. 1–290 p.
168. Shebawy W, Saliba J, Faour WH, Ismail J, El Hage M, Daher CF, et al. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity evaluation of Lebanese Cannabis sativa L. ssp. indica (Lam.). *J Ethnopharmacol*. 2021 Apr;270:113743.
169. Ribeiro A, Almeida VI, Costola-de-Souza C, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Vitoretti LB, et al. Cannabidiol improves lung function and inflammation in mice submitted to LPS-induced acute lung injury. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2015 Jan 2;37(1):35–41.
170. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Pan H, Patel V, Mukhopadhyay B, Bátkai S, et al. Cannabinoid-2 receptor limits inflammation, oxidative/nitrosative stress, and cell death in nephropathy. *Free Radic Biol Med*. 2010 Feb 1;48(3):457–67.

171. Turcotte C, Blanchet M-R, Laviolette M, Flamand N. The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cell Mol Life Sci.* 2016 Dec 11;73(23):4449–70.
172. Fasinu PS, Phillips S, ElSohly MA, Walker LA. Current Status and Prospects for Cannabidiol Preparations as New Therapeutic Agents. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther.* 2016 Jul;36(7):781–96.
173. O’Sullivan SE. An update on PPAR activation by cannabinoids. *Br J Pharmacol.* 2016 Jun;173(12):1899–910.
174. Muller C, Morales P, Reggio PH. Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. *Front Mol Neurosci.* 2019 Jan 15;11.
175. Patwardhan AM, Jeske NA, Price TJ, Gamper N, Akopian AN, Hargreaves KM. The cannabinoid WIN 55,212-2 inhibits transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and evokes peripheral antihyperalgesia via calcineurin. *Proc Natl Acad Sci.* 2006 Jul 25;103(30):11393–8.
176. Bisogno T, Hanuš L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol.* 2001 Oct;134(4):845–52.
177. Mackie K. Cannabinoid Receptors: Where They are and What They do. *J Neuroendocrinol.* 2008 May;20(s1):10–4.
178. Mechoulam R, Hanuš LO, Pertwee R, Howlett AC. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat Rev Neurosci.* 2014 Nov 15;15(11):757–64.
179. Jain KK. Neuropharmacology: Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience. *Trends Pharmacol Sci.* 2002 Feb;23(2):99.
180. Price MR, Baillie GL, Thomas A, Stevenson LA, Easson M, Goodwin R, et al. Allosteric Modulation of the Cannabinoid CB 1 Receptor. *Mol Pharmacol.* 2005 Nov;68(5):1484–95.
181. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc.* 1964 Apr 1;86(8):1646–7.
182. Martin BR, Compton DR, Thomas BF, Prescott WR, Little PJ, Razdan RK, et al.

- Behavioral, biochemical, and molecular modeling evaluations of cannabinoid analogs. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991 Nov;40(3):471–8.
183. Greenberg HS, Werness SAS, Pugh JE, Andrus RO, Anderson DJ, Domino EF. Short-term effects of smoking marijuana on balance in patients with multiple sclerosis and normal volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* 1994 Mar;55(3):324–8.
 184. Arzimanoglou A, Brandl U, Cross JH, Gil-Nagel A, Lagae L, Landmark CJ, et al. Epilepsy and cannabidiol: a guide to treatment. *Epileptic Disord.* 2020;22(1):1–14.
 185. Gunning B, Mazurkiewicz-Beldzińska M, Chin RFM, Bhathal H, Nortvedt C, Dunayevich E, et al. Cannabidiol in conjunction with clobazam: analysis of four randomized controlled trials. *Acta Neurol Scand.* 2021 Feb 22;143(2):154–63.
 186. Brown AJ. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol.* 2007 Nov;152(5):567–75.
 187. Xiong W, Cui T, Cheng K, Yang F, Chen S-R, Willenbring D, et al. Cannabinoids suppress inflammatory and neuropathic pain by targeting $\alpha 3$ glycine receptors. *J Exp Med.* 2012 Jun 4;209(6):1121–34.
 188. Gonca E, Darıcı F. The Effect of Cannabidiol on Ischemia/Reperfusion-Induced Ventricular Arrhythmias. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2015 Jan 22;20(1):76–83.
 189. Sagredo O, García-Arencibia M, de Lago E, Finetti S, Decio A, Fernández-Ruiz J. Cannabinoids and Neuroprotection in Basal Ganglia Disorders. *Mol Neurobiol.* 2007 Aug 23;36(1):82–91.
 190. Sagredo O, Pazos MR, Satta V, Ramos JA, Pertwee RG, Fernández-Ruiz J. Neuroprotective effects of phytocannabinoid-based medicines in experimental models of Huntington's disease. *J Neurosci Res.* 2011 Sep;89(9):1509–18.
 191. Russo EB, Burnett A, Hall B, Parker KK. Agonistic Properties of Cannabidiol at 5-HT_{1a} Receptors. *Neurochem Res.* 2005 Aug;30(8):1037–43.
 192. Kathmann M, Flau K, Redmer A, Tränkle C, Schlicker E. Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2006 Feb 18;372(5):354–61.
 193. Mahgoub M, Keun-Hang SY, Sydorenko V, Ashoor A, Kabbani N, Al Kury L, et al. Effects of cannabidiol on the function of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol.* 2013 Nov;720(1–3):310–9.

194. Ramer R, Heinemann K, Merkord J, Rohde H, Salamon A, Linnebacher M, et al. COX-2 and PPAR- γ Confer Cannabidiol-Induced Apoptosis of Human Lung Cancer Cells. *Mol Cancer Ther.* 2013 Jan 1;12(1):69–82.
195. Hinz B, Ramer R. Anti-tumour actions of cannabinoids. *Br J Pharmacol.* 2019 May;176(10):1384–94.
196. Jiang R, Yamaori S, Takeda S, Yamamoto I, Watanabe K. Identification of cytochrome P450 enzymes responsible for metabolism of cannabidiol by human liver microsomes. *Life Sci.* 2011 Aug;89(5–6):165–70.
197. Ibeas Bih C, Chen T, Nunn AVW, Bazelot M, Dallas M, Whalley BJ. Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders. *Neurotherapeutics.* 2015 Oct 12;12(4):699–730.
198. Höller C, Freissmuth M, Nanoff C. G proteins as drug targets. *Cell Mol Life Sci C.* 1999 Feb;55(2):257–70.
199. Collins S, Caron MG, Lefkowitz RJ. From ligand binding to gene expression: new insights into the regulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Biochem Sci.* 1992 Jan;17(1):37–9.
200. Carman C V, Benovic JL. G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs. *Curr Opin Neurobiol.* 1998 Jun;8(3):335–44.
201. Rodbell M. The complex regulation of receptor-coupled G-proteins. *Adv Enzyme Regul.* 1997 Jan;37:427–35.
202. Elphick MR, Egertova M. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc London Ser B Biol Sci.* 2001 Mar 29;356(1407):381–408.
203. Pertwee RG, Ross RA. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids.* 2002 Feb;66(2–3):101–21.
204. Murillo-Rodríguez E. The Endocannabinoid System: Genetics, Biochemistry, Brain Disorders, and Therapy. *The Endocannabinoid System: Genetics, Biochemistry, Brain Disorders, and Therapy.* Academic Press; 2017. 1–240 p.
205. Devane WA, Hanuš L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. *Science (80-).* 1992 Dec 18;258(5090):1946–9.

206. Zoerner AA, Gutzki F-M, Batkai S, May M, Rakers C, Engeli S, et al. Quantification of endocannabinoids in biological systems by chromatography and mass spectrometry: A comprehensive review from an analytical and biological perspective. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2011 Nov;1811(11):706–23.
207. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SPH, Di Marzo V, Elphick MR, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB 1 and CB 2. *Pharmacol Rev*. 2010 Dec 15;62(4):588–631.
208. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995 Jun;50(1):83–90.
209. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Nov;4(11):873–84.
210. Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 1996 Nov;384(6604):83–7.
211. Hermanson DJ, Hartley ND, Gamble-George J, Brown N, Shonesy BC, Kingsley PJ, et al. Substrate-selective COX-2 inhibition decreases anxiety via endocannabinoid activation. *Nat Neurosci*. 2013 Sep 4;16(9):1291–8.
212. Yates ML, Barker EL. Inactivation and Biotransformation of the Endogenous Cannabinoids Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol. *Mol Pharmacol*. 2009 Jul;76(1):11–7.
213. Howlett AC. The CB1 Cannabinoid Receptor in the Brain. *Neurobiol Dis*. 1998 Dec;5(6):405–16.
214. Pertwee RG. Evidence for the presence of CB1 cannabinoid receptors on peripheral neurones and for the existence of neuronal non-CB1 cannabinoid receptors. *Life Sci*. 1999 Jul;65(6–7):597–605.
215. Mackie K. Distribution of Cannabinoid Receptors in the Central and Peripheral Nervous System. In: *Cannabinoids*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; 2005. p. 299–325.

216. Onaivi ES, Leonard CM, Ishiguro H, Zhang PW, Lin Z, Akinshola BE, et al. Endocannabinoids and cannabinoid receptor genetics. *Prog Neurobiol.* 2002 Apr;66(5):307–44.
217. Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. *Pharmacol Rev.* 2003 Dec;55(4):597–606.
218. Christopoulos A. G Protein-Coupled Receptor Allosterism and Complexing. *Pharmacol Rev.* 2002 Jun 1;54(2):323–74.
219. Nguyen T, Li J-X, Thomas BF, Wiley JL, Kenakin TP, Zhang Y. Allosteric Modulation: An Alternate Approach Targeting the Cannabinoid CB1 Receptor. *Med Res Rev.* 2017 May;37(3):441–74.
220. Onaivi ES, Ishiguro H, Gu S, Liu Q-R. CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. *J Psychopharmacol.* 2012 Jan 29;26(1):92–103.
221. Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN. Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem.* 2005 Oct;95(2):437–45.
222. Pacher P, Mechoulam R. Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Prog Lipid Res.* 2011 Apr;50(2):193–211.
223. Starowicz K, Nigam S, Di Marzo V. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther.* 2007 Apr;114(1):13–33.
224. Ahluwalia J, Urban L, Bevan S, Nagy I. Anandamide regulates neuropeptide release from capsaicin-sensitive primary sensory neurons by activating both the cannabinoid 1 receptor and the vanilloid receptor 1 in vitro. *Eur J Neurosci.* 2003 Jun;17(12):2611–8.
225. Alger B. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol.* 2002 Nov;68(4):247–86.
226. De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allarà M, Bisogno T, Petrosino S, et al. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels

- and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol*. 2011 Aug;163(7):1479–94.
227. Morales P, Reggio PH, Jagerovic N. An Overview on Medicinal Chemistry of Synthetic and Natural Derivatives of Cannabidiol. *Front Pharmacol*. 2017 Jun 28;8(JUN).
 228. Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HHQ, et al. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, ΨGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Mol Brain Res*. 1999 Feb;64(2):193–8.
 229. Moriconi A, Cerbara I, Maccarrone M, Topai A. GPR55: Current Knowledge and Future Perspectives of a Purported "Type-3" Cannabinoid Receptor. *Curr Med Chem*. 2010 May 1;17(14):1411–29.
 230. McPartland JM, Matias I, Di Marzo V, Glass M. Evolutionary origins of the endocannabinoid system. *Gene*. 2006 Mar;370(1–2):64–74.
 231. Lauckner JE, Jensen JB, Chen H-Y, Lu H-C, Hille B, Mackie K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci*. 2008 Feb 19;105(7):2699–704.
 232. Henstridge CM, Balenga NAB, Ford LA, Ross RA, Waldhoer M, Irving AJ. The GPR55 ligand L- α -lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation. *FASEB J*. 2009 Jan 29;23(1):183–93.
 233. Sylantsev S, Jensen TP, Ross RA, Rusakov DA. Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proc Natl Acad Sci*. 2013 Mar 26;110(13):5193–8.
 234. Parker LA. Cannabinoids and the Brain. *Cannabinoids and the Brain*. The MIT Press; 2017. 1–237 p.
 235. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacol Rev*. 2006 Dec;58(4):726–41.
 236. Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM. PPARs: the vasculature, inflammation and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009 Mar;18(2):128–33.

237. Cantini G, Lombardi A, Borgogni E, Francalanci M, Ceni E, Degl'Innocenti S, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is required for modulating endothelial inflammatory response through a nongenomic mechanism. *Eur J Cell Biol.* 2010 Sep;89(9):645–53.
238. Storr MA, Sharkey KA. The endocannabinoid system and gut–brain signalling. *Curr Opin Pharmacol.* 2007 Dec;7(6):575–82.
239. Silvestri C, Di Marzo V. The Endocannabinoid System in Energy Homeostasis and the Etiopathology of Metabolic Disorders. *Cell Metab.* 2013 Apr;17(4):475–90.
240. Gatta-Cherifi B, Cota D. New insights on the role of the endocannabinoid system in the regulation of energy balance. *Int J Obes.* 2016 Feb 16;40(2):210–9.
241. D'Addario C, Micioni Di Bonaventura MV, Pucci M, Romano A, Gaetani S, Ciccocioppo R, et al. Endocannabinoid signaling and food addiction. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014 Nov;47(1):203–24.
242. Castillo PE, Younts TJ, Chávez AE, Hashimoto Y. Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function. *Neuron.* 2012 Oct;76(1):70–81.
243. Riebe CJ, Wotjak CT. Endocannabinoids and stress. *Stress.* 2011 Jul 11;14(4):384–97.
244. Woodhams SG, Chapman V, Finn DP, Hohmann AG, Neugebauer V. The cannabinoid system and pain. *Neuropharmacology.* 2017 Sep;124:105–20.
245. Chanda D, Neumann D, Glatz JFC. The endocannabinoid system: Overview of an emerging multi-faceted therapeutic target. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids.* 2019 Jan;140:51–6.
246. Basavarajappa BS, Shivakumar M, Joshi V, Subbanna S. Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders. *J Neurochem.* 2017 Sep;142(5):624–48.
247. Rodrigo C, Rajapakse S. Cannabis and Schizophrenia Spectrum Disorders: A Review of Clinical Studies. *Indian J Psychol Med.* 2009 Jul 1;31(2):62–70.
248. O'Sullivan SE. Endocannabinoids and the Cardiovascular System in Health and Disease. In: *Endocannabinoids.* 2015. p. 393–422.
249. Chanda D, Oligschlaeger Y, Geraets I, Liu Y, Zhu X, Li J, et al. 2-Arachidonoylglycerol ameliorates inflammatory stress-induced insulin resistance in

- cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2017 Apr;292(17):7105–14.
250. Tahamtan A, Samieipoor Y, Nayeri FS, Rahbarimanesh AA, Izadi A, Rashidi-Nezhad A, et al. Effects of cannabinoid receptor type 2 in respiratory syncytial virus infection in human subjects and mice. *Virulence*. 2018 Dec 31;9(1):217–30.
251. Xiong Y, Yao H, Cheng Y, Gong D, Liao X, Wang R. Effects of monoacylglycerol lipase inhibitor URB602 on lung ischemia-reperfusion injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Nov;506(3):578–84.
252. Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, et al. Expression of Central and Peripheral Cannabinoid Receptors in Human Immune Tissues and Leukocyte Subpopulations. *Eur J Biochem*. 1995 Aug;232(1):54–61.
253. Papadaki E. Comment on A. Ghemigian, et al Familial isolated primary hyperparathyroidism due to HRPT2 mutation. *Hormones*. 2013 Oct 15;12(4):602–3.
254. Hunninghake GW, Gadek JE, Kawanami O, Ferrans VJ, Crystal RG. Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: Evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am J Pathol*. 1979 Oct;97(1):149–205.
255. Staiano RI, Loffredo S, Borriello F, Iannotti FA, Piscitelli F, Orlando P, et al. Human lung-resident macrophages express CB 1 and CB 2 receptors whose activation inhibits the release of angiogenic and lymphangiogenic factors. *J Leukoc Biol*. 2016 Apr;99(4):531–40.
256. Matias I, Pochard P, Orlando P, Salzet M, Pestel J, Di Marzo V. Presence and regulation of the endocannabinoid system in human dendritic cells. *Eur J Biochem*. 2002 Aug;269(15):3771–8.
257. Do Y, McKallip RJ, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Activation through Cannabinoid Receptors 1 and 2 on Dendritic Cells Triggers NF- κ B-Dependent Apoptosis: Novel Role for Endogenous and Exogenous Cannabinoids in Immunoregulation. *J Immunol*. 2004 Aug 15;173(4):2373–82.
258. Lu T, Newton C, Perkins I, Friedman H, Klein TW. Role of cannabinoid receptors in Delta-9-tetrahydrocannabinol suppression of IL-12p40 in mouse bone marrow-derived dendritic cells infected with *Legionella pneumophila*. *Eur J Pharmacol*. 2006 Feb;532(1–2):170–7.

259. Oka S, Ikeda S, Kishimoto S, Gokoh M, Yanagimoto S, Waku K, et al. 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces the migration of EoL-1 human eosinophilic leukemia cells and human peripheral blood eosinophils. *J Leukoc Biol.* 2004 Nov;76(5):1002–9.
260. Chouinard F, Lefebvre JS, Navarro P, Bouchard L, Ferland C, Lalancette-Hébert M, et al. The Endocannabinoid 2-Arachidonoyl-Glycerol Activates Human Neutrophils: Critical Role of Its Hydrolysis and De Novo Leukotriene B4 Biosynthesis. *J Immunol.* 2011 Mar 1;186(5):3188–96.
261. Chouinard F, Turcotte C, Guan X, Larose M-C, Poirier S, Bouchard L, et al. 2-Arachidonoyl-glycerol- and arachidonic acid-stimulated neutrophils release antimicrobial effectors against *E. coli*, *S. aureus*, HSV-1, and RSV. *J Leukoc Biol.* 2013 Feb 1;93(2):267–76.
262. Montecucco F, Burger F, Mach F, Steffens S. CB 2 cannabinoid receptor agonist JWH-015 modulates human monocyte migration through defined intracellular signaling pathways. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2008 Mar;294(3):H1145–55.
263. Han KH, Lim S, Ryu J, Lee C-W, Kim Y, Kang J-H, et al. CB1 and CB2 cannabinoid receptors differentially regulate the production of reactive oxygen species by macrophages. *Cardiovasc Res.* 2009 Dec 1;84(3):378–86.
264. Castaneda JT, Harui A, Kiertscher SM, Roth JD, Roth MD. Differential Expression of Intracellular and Extracellular CB2 Cannabinoid Receptor Protein by Human Peripheral Blood Leukocytes. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013 Mar 10;8(1):323–32.
265. Kurihara R, Tohyama Y, Matsusaka S, Naruse H, Kinoshita E, Tsujioka T, et al. Effects of Peripheral Cannabinoid Receptor Ligands on Motility and Polarization in Neutrophil-like HL60 Cells and Human Neutrophils. *J Biol Chem.* 2006 May;281(18):12908–18.
266. Cinar R, Gochuico BR, Iyer MR, Jourdan T, Yokoyama T, Park JK, et al. Cannabinoid CB1 receptor overactivity contributes to the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *JCI Insight.* 2017 Apr 20;2(8).
267. Wawryk-Gawda E, Chłapek K, Zarobkiewicz MK, Lis-Sochocka M, Chylińska-Wrzos P, Boguszewska-Czubara A, et al. CB2R agonist prevents nicotine induced lung fibrosis. *Exp Lung Res.* 2018 Aug 9;44(7):344–51.

268. Zeng J, Li X, Cheng Y, Ke B, Wang R. Activation of cannabinoid receptor type 2 reduces lung ischemia reperfusion injury through PI3K/Akt pathway. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019;12(11):4096–105.
269. Liu M, Su M, Wang Y, Wei W, Qin L, Liu X, et al. Effect of melilotus extract on lung injury by upregulating the expression of cannabinoid CB2 receptors in septic rats. *BMC Complement Altern Med*. 2014 Dec 11;14(1):94.
270. A. U. Medical use and therapeutic targets for cannabinoids. *Turkiye Klin J Pharmacol-Special Top*. 2018;6(1):42–50.
271. Kaur R, R. Ambwani S, Singh S. Endocannabinoid System: A Multi-Facet Therapeutic Target. *Curr Clin Pharmacol*. 2016 Aug 1;11(2):110–7.
272. Johnson JR, Burnell-Nugent M, Lossignol D, Ganae-Motan ED, Potts R, Fallon MT. Multicenter, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Parallel-Group Study of the Efficacy, Safety, and Tolerability of THC:CBD Extract and THC Extract in Patients with Intractable Cancer-Related Pain. *J Pain Symptom Manage*. 2010 Feb;39(2):167–79.
273. Rog DJ. Cannabis-based medicines in multiple sclerosis – A review of clinical studies. *Immunobiology*. 2010 Aug;215(8):658–72.
274. Collin C, Ehler E, Waberszinek G, Alsindi Z, Davies P, Powell K, et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of Sativex, in subjects with symptoms of spasticity due to multiple sclerosis. *Neurol Res*. 2010 Jun 19;32(5):451–9.
275. Sam AH, Salem V, Ghatei MA. Rimonabant: From RIO to Ban. *J Obes*. 2011;2011:1–4.
276. JZL184-2D Structure [Internet]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
277. Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG, Schlosburg JE, et al. Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol*. 2009 Jan 23;5(1):37–44.
278. Kerr D, Harhen B, Okine B, Egan L, Finn D, Roche M. The monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 attenuates LPS-induced increases in cytokine expression in the rat frontal cortex and plasma: differential mechanisms of action. *Br J Pharmacol*. 2013

- Jun;169(4):808–19.
279. Ghosh S, Wise LE, Chen Y, Gujjar R, Mahadevan A, Cravatt BF, et al. The monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 suppresses inflammatory pain in the mouse carrageenan model. *Life Sci.* 2013 Mar 19;92(8–9):498–505.
 280. Kurt A, Tumkaya L, Yuce S, Turut H, Cure MC, Sehitoglu I, et al. The protective effect of infliximab against carbon tetrachloride-induced acute lung injury. *Iran J Basic Med Sci.* 2016 Jun;19(6):685–91.
 281. Johnson ER, Matthay MA. Acute Lung Injury: Epidemiology, Pathogenesis, and Treatment. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2010 Aug;23(4):243–52.
 282. Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol.* 2004 Feb;202(2):145–56.
 283. Grommes J, Soehnlein O. Contribution of Neutrophils to Acute Lung Injury. *Mol Med.* 2011 Mar 18;17(3–4):293–307.
 284. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002 Dec;420(6917):885–91.
 285. Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, Ruzinski JT, Radella F, Park DR, et al. Cytokine Balance in the Lungs of Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Nov 15;164(10):1896–903.
 286. Bhatia M, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis. *Curr Opin Investig Drugs.* 2001 Apr;2(4):496–501.
 287. Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol.* 2000 Feb;190(2):117–25.
 288. M. Bhatia. Novel Therapeutic Targets for Acute Pancreatitis and Associated Multiple Organ Dysfunction Syndrome. *Curr Drug Target -Inflammation Allergy.* 2002 Dec 1;1(4):343–51.
 289. Leser H-G, Gross V, Scheibenbogen C, Heinisch A, Salm R, Lausen M, et al. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology.* 1991 Sep;101(3):782–5.
 290. Remick DG, Bolgos GR, Siddiqui J, Shin J, Nemzek JA. Six at Six: Interleukin-6 Measured 6 H After the Initiation of Sepsis Predicts Mortality Over 3 Days. *Shock.* 2002 Jun;17(6):463–7.

291. Opdenakker G, Fibbe WE, Van Damme J. The molecular basis of leukocytosis. *Immunol Today*. 1998 Apr;19(4):182–9.
292. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 2005 May;77(5):598–625.
293. González C, Herradón E, Abalo R, Vera G, Pérez-Nievas BG, Leza JC, et al. Cannabinoid/agonist WIN 55,212-2 reduces cardiac ischaemia-reperfusion injury in Zucker diabetic fatty rats: role of CB2 receptors and iNOS/eNOS. *Diabetes Metab Res Rev*. 2011 May;27(4):331–40.
294. Oddi S, Latini L, Viscomi MT, Bisicchia E, Molinari M, Maccarrone M. Distinct regulation of nNOS and iNOS by CB2 receptor in remote delayed neurodegeneration. *J Mol Med*. 2012 Apr 24;90(4):371–87.
295. Liu Y, Zhou J, Luo Y, Li J, Shang L, Zhou F, et al. Honokiol alleviates LPS-induced acute lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis via Nrf2 activation in vitro and in vivo. *Chin Med*. 2021 Dec 29;16(1):127.
296. Liang Y, Yang N, Pan G, Jin B, Wang S, Ji W. Elevated IL-33 promotes expression of MMP2 and MMP9 via activating STAT3 in alveolar macrophages during LPS-induced acute lung injury. *Cell Mol Biol Lett*. 2018 Dec 31;23(1):52.
297. Baffour Tonto P, Yasuma T, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza C, Toda M, Saiki H, et al. Protein S is Protective in Acute Lung Injury by Inhibiting Cell Apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 2;20(5):1082.
298. Dereli B, Yurdakan G, Tekin IO, Arasli M, Kokturk F, Yilmaz-Can E. Effect of TSPO Ligand, Ro5-4864, on Lung Injury in ARDS Model Induced by ANTU in Rats. *Int J Pulm Respir Sci*. 2021 Oct 28;5(3).
299. Gross CM, Rafikov R, Kumar S, Aggarwal S, Ham III PB, Meadows ML, et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Deficient Mice Are Protected from Lipopolysaccharide Induced Acute Lung Injury. Zhao Y-Y, editor. *PLoS One*. 2015 Mar 18;10(3):e0119918.
300. Grinnell KL, Chichger H, Braza J, Duong H, Harrington EO. Protection against LPS-Induced Pulmonary Edema through the Attenuation of Protein Tyrosine Phosphatase–1B Oxidation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012 May;46(5):623–32.

301. Baradaran Rahimi V, Rakhshandeh H, Raucci F, Buono B, Shirazinia R, Samzadeh Kermani A, et al. Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Activity of Portulaca oleracea Extract on LPS-Induced Rat Lung Injury. *Molecules*. 2019 Jan 1;24(1):139.
302. Koc K, Ozek NS, Aysin F, Demir O, Yilmaz A, Yilmaz M, et al. Hispidulin exerts a protective effect against oleic acid induced-ARDS in the rat via inhibition of ACE activity and MAPK pathway. *Int J Environ Health Res*. 2023 Jan 9;1–12.
303. Zinatizadeh MR, Schock B, Chalbatani GM, Zarandi PK, Jalali SA, Miri SR. The Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) signaling in cancer development and immune diseases. *Genes Dis*. 2021 May;8(3):287–97.
304. Ilchovska DD, Barrow DM. An Overview of the NF- κ B mechanism of pathophysiology in rheumatoid arthritis, investigation of the NF- κ B ligand RANKL and related nutritional interventions. *Autoimmun Rev*. 2021 Feb;20(2):102741.
305. Ye M, Tang Y, He J, Yang Y, Cao X, Kou S, et al. Alleviation of non-alcoholic fatty liver disease by Huazhi Fugan Granules is associated with suppression of TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Clínica e Investig en Arterioscler*. 2021 Sep;33(5):257–66.
306. Thawkar BS, Kaur G. Inhibitors of NF- κ B and P2X7/NLRP3/Caspase 1 pathway in microglia: Novel therapeutic opportunities in neuroinflammation induced early-stage Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*. 2019 Jan 15;326:62–74.
307. Ghasemi F, Shafiee M, Banikazemi Z, Pourhanifeh MH, Khanbabaei H, Shamshirian A, et al. Curcumin inhibits NF- κ B and Wnt/ β -catenin pathways in cervical cancer cells. *Pathol - Res Pract*. 2019 Oct;215(10):152556.
308. Coto E, Reguero JR, Avanzas P, Pascual I, Martín M, Hevia S, et al. Gene variants in the NF- κ B pathway (NFKB1, NFKBIA, NFKBIZ) and risk for early-onset coronary artery disease. *Immunol Lett*. 2019 Apr;208:39–43.
309. Ye X, Ding J, Zhou X, Chen G, Liu SF. Divergent roles of endothelial NF- κ B in multiple organ injury and bacterial clearance in mouse models of sepsis. *J Exp Med*. 2008 Jun 9;205(6):1303–15.
310. Janssen-Heininger YMW, Poynter ME, Aesif SW, Pantano C, Ather JL, Reynaert NL, et al. Nuclear Factor B, Airway Epithelium, and Asthma: Avenues for Redox Control. *Proc Am Thorac Soc*. 2009 May 1;6(3):249–55.

311. Fan J, Ye RD, Malik AB. Transcriptional mechanisms of acute lung injury. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2001 Nov 1;281(5):L1037–50.
312. Yoshida T, Mett I, Bhunia AK, Bowman J, Perez M, Zhang L, et al. Rtp801, a suppressor of mTOR signaling, is an essential mediator of cigarette smoke–induced pulmonary injury and emphysema. *Nat Med*. 2010 Jul 16;16(7):767–73.
313. Liu SF, Malik AB. NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2006 Apr;290(4):L622–45.
314. Rieger-Fackeldey E, Hentschel R. Bronchopulmonary dysplasia and early prophylactic inhaled nitric oxide in preterm infants: current concepts and future research strategies in animal models. *J Perinat Med*. 2008 Jan 1;36(5):442–7.
315. Castranova V. Signaling Pathways Controlling The Production Of Inflammatory Mediators in Response To Crystalline Silica Exposure: Role Of Reactive Oxygen/Nitrogen Species. *Free Radic Biol Med*. 2004 Oct;37(7):916–25.
316. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol*. 2017 Jul 29;39(5):517–28.
317. Fajgenbaum DC, June CH. Cytokine Storm. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 2020 Dec 3;383(23):2255–73.
318. Robles JP, Zamora M, Adan-Castro E, Siqueiros-Marquez L, Martinez de la Escalera G, Clapp C. The spike protein of SARS-CoV-2 induces endothelial inflammation through integrin $\alpha 5\beta 1$ and NF- κ B signaling. *J Biol Chem*. 2022 Mar;298(3):101695.
319. Pan W-Z, Du J, Zhang L-Y, Ma J-H. The roles of NF- κ B in the development of lung injury after one-lung ventilation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(21):7414–22.
320. Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH. Molecular Mechanisms of Death-Receptor-Mediated Apoptosis. *ChemBioChem*. 2001 Jan 5;2(1):20–9.
321. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun 25;35(4):495–516.
322. Ghatage D, Gosavi S, Hazarey V, Ganvir S. Apoptosis: Molecular mechanism. *J Orofac Sci*. 2012;4(2):103.
323. Wu H, Che X, Zheng Q, Wu A, Pan K, Shao A, et al. Caspases: A Molecular Switch Node in the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis. *Int J Biol Sci*.

- 2014;10(9):1072–83.
324. Nagata S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu Rev Immunol*. 2018 Apr 26;36(1):489–517.
325. McLuskey K, Mottram JC. Comparative structural analysis of the caspase family with other clan CD cysteine peptidases. *Biochem J*. 2015 Mar 1;466(2):219–32.
326. Jiang R, Xu J, Zhang Y, Zhu X, Liu J, Tan Y. Ligustrazine Alleviate Acute Lung Injury Through Suppressing Pyroptosis and Apoptosis of Alveolar Macrophages. *Front Pharmacol*. 2021 May 28;12:680512.
327. Liang S, Wang Y, Liu Y. Dexmedetomidine alleviates lung ischemia-reperfusion injury in rats by activating PI3K/Akt pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019 Jan;23(1):370–7.
328. Zhang C, Wang X, Wang C, He C, Ma Q, Li J, et al. Qingwenzhike Prescription Alleviates Acute Lung Injury Induced by LPS via Inhibiting TLR4/NF-kB Pathway and NLRP3 Inflammasome Activation. *Front Pharmacol*. 2021 Dec 23;12.
329. Leiphrakpam PD, Weber HR, Ogun T, Buesing KL. Rat model of smoke inhalation-induced acute lung injury. *BMJ Open Respir Res*. 2021 Jul;8(1):e000879.
330. Matias I, Di Marzo V. Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab*. 2007 Jan;18(1):27–37.
331. Pertwee RG. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *Int J Obes*. 2006 Apr 29;30(S1):S13–8.
332. Malan TP Jr, Ibrahim MM, Lai J, Vanderah TW, Makriyannis A, Porreca F. CB cannabinoid receptor agonists: pain relief without psychoactive effects? *Curr Opin Pharmacol*. 2003 Feb;3(1):62–7.
333. Whiteside G, Lee G, Valenzano K. The Role of the Cannabinoid CB2 Receptor in Pain Transmission and Therapeutic Potential of Small Molecule CB2 Receptor Agonists. *Curr Med Chem*. 2007 Apr 1;14(8):917–36.
334. Rao R, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. $\Delta(9)$ Tetrahydrocannabinol attenuates Staphylococcal enterotoxin B-induced inflammatory lung injury and prevents mortality in mice by modulation of miR-17-92 cluster and induction of T-regulatory cells. *Br J Pharmacol*. 2015 Apr;172(7):1792–806.

335. Berdyshev E, Boichot E, Corbel M, Germain N, Lagente V. Effects of cannabinoid receptor ligands on LPS-induced pulmonary inflammation in mice. *Life Sci.* 1998 Jul;63(8):PL125–9.
336. Fujii M, Sherchan P, Soejima Y, Doycheva D, Zhao D, Zhang JH. Cannabinoid Receptor Type 2 Agonist Attenuates Acute Neurogenic Pulmonary Edema by Preventing Neutrophil Migration after Subarachnoid Hemorrhage in Rats. In 2016. p. 135–9.
337. Liu Z, Wang Y, Zhao H, Zheng Q, Xiao L, Zhao M. CB2 Receptor Activation Ameliorates the Proinflammatory Activity in Acute Lung Injury Induced by Paraquat. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1–10.
338. Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Vitoretti LB, Mariano-Souza DP, Quinteiro-Filho WM, et al. Cannabidiol, a non-psychotropic plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: Role for the adenosine A2A receptor. *Eur J Pharmacol.* 2012 Mar;678(1–3):78–85.
339. Karmaus PWF, Wagner JG, Harkema JR, Kaminski NE, Kaplan BLF. Cannabidiol (CBD) enhances lipopolysaccharide (LPS)-induced pulmonary inflammation in C57BL/6 mice. *J Immunotoxicol.* 2013 Sep 23;10(3):321–8.
340. Rajesh M, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Arif M, Varga Z V., Mátyás C, et al. Cannabinoid receptor 2 activation alleviates diabetes-induced cardiac dysfunction, inflammation, oxidative stress, and fibrosis. *GeroScience.* 2022 Jun 22;44(3):1727–41.
341. Alhouayek M, Lambert DM, Delzenne NM, Cani PD, Muccioli GG. Increasing endogenous 2-arachidonoylglycerol levels counteracts colitis and related systemic inflammation. *FASEB J.* 2011 Aug 6;25(8):2711–21.
342. Kinsey SG, Nomura DK, O’Neal ST, Long JZ, Mahadevan A, Cravatt BF, et al. Inhibition of Monoacylglycerol Lipase Attenuates Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Gastric Hemorrhages in Mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011 Sep;338(3):795–802.
343. Costola-de-Souza C, Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Calefi AS, Aloia TPA, Gimenes-Júnior JA, et al. Monoacylglycerol Lipase (MAGL) Inhibition Attenuates Acute Lung Injury in Mice. Idzko M, editor. *PLoS One.* 2013 Oct 25;8(10):e77706.

344. Abohalaka R, Bozkurt TE, Nemutlu E, Onder SC, Sahin-Erdemli I. The effects of fatty acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase inhibitor treatments on lipopolysaccharide-induced airway inflammation in mice. *Pulm Pharmacol Ther.* 2020 Jun;62:101920.



8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onayı



T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



TOPLANTI TARİHİ : 21/09/2021
TOPLANTI NO : 2021/08

- 4- Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2021-25-21/09 Protokol no'lu "Kannabinoidlerin, Sıçanlarda Geliştirilen Direkt ve İndirekt Akut Respiratuvar Distressendromu (ARDS) Modellerinde, Modele Özgü Potansiyel Etki Farklılıklarının İncelenmesi ve Klinik Uygulama Açısından Değerlendirilmesi" konulu çalışmasının Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

Prof. Dr. Emine YILMAZ CAN
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı