

Sülfür mustardın oluşturduğu akciğer hasarı üzerine çeşitli antioksidanların etkinliklerinin karşılaştırılması ve serum parametreleri üzerine etkilerinin ortaya konması*

Comparison of the efficacy of the various antioxidants against lung damage caused by sulfur mustard and the exposition of their effects on serum parameters

Fatih Kalkan¹, Turgut Topal²

¹Dr., Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara, Türkiye. berdinur4822@gmail.com, 0000-0002-3157-9305

²Doç.Dr., Emekli Öğ. Üyesi, Ankara, Türkiye.turguttopal@gmail.com, 0000-0003-3497-1158

*Bu çalışma Fatih Kalkan'ın aynı başlıktaki yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

ABSTRACT

Aim: In our research on new and previously used agents it is intended to reach proposals to protect and reduce toxic effects of sulfur mustard against lungs. **Material-Methods:** Approximately 60 SD male rats in the same age and weight were used in our research. One of sulfur mustard group agent the 2-chloroethyl ethyl sulfide (CEES) known as half mustard was used to form the model. CEES in 1 mg / kg dose were applied by the intratracheal way. The study is initiated after creating the groups from experimental animals, sham, control (sulfur mustard), sulfur mustard+N-acetylcysteine, sulfur mustard+lipoic acid, sulfur mustard+mesna and the sulfur mustard+amifostine. After sulfur mustard toxicity model is created, in 15 minutes the therapeutic agents were begun to apply. Treatment was administered for 3 days. After this time the rats were surgically opened under anesthesia applying sternotomy and blood and lung tissue samples were taken for the purpose of serum analysis. Because of histopathological evaluation purposes this tissues are taken into Eppendorfs for 10% formalin, biochemical and ELISA assays and stored at -80°C and appropriate conditions in the refrigerator until the analysis process. **Result:** Looking at the results of the mortality rate, 60% mortality rate observed in pathological control (SM) group, was observed statistically significant to decrease only in Amifostine and lipoic acid group (respectively viii 10 % and 20%) In the histopathological evaluation; in routine H & E-stained tissue sections was made a general histopathological evaluation and scoring especially with pulmonary edema, hemorrhage and inflammation evaluations. In the evaluation, it was observed that more intense edema, hemorrhage and inflammation in pathological control group (SM) compared to sham group, decreased significantly only in the group treated with Amifostine and lipoic acid. It was not observed any significant difference between groups comparing in Serum malondialdehyde (MDA) levels showing the level of lipid peroxidation caused by oxidative stress, comparing NOx levels indicating the nitrostatif stress level, the antioxidant enzymes SOD and GPx levels indicating antioxidant defense level and neopiter levels accepted as one of inflammation criteria. **Conclusion:** As a result, in the light of the data obtained, it needs to be tested in a more appropriate model, whether serum MDA, SOD, GPx, NOx, as Neopterin oxido- nitrosative , antioxidant parameters would be used for condition detection and monitoring in acute lung toxicity. Besides new antioxidants such as Amifostine and α -lipoic acid has been shown to have promising hope in treatment of acute lung toxicity caused by sulfur mustard.

ÖZ

Amaç: Araştırmamızda, sülfür mustardın (SM) akciğer üzerinde oluşturduğu akut toksisiteye karşı, yeni ve daha önce kullanılmış tedavi edici ajanların, koruyucu ve/veya toksik etkileri azaltıcı etkileri ile ilgili önerilere ulaşılması amaçlanmıştır. **Gereç-Yöntem:** Araştırmada yaklaşık olarak aynı yaş ve ağırlıktaki 60 adet SD erkek sıçan kullanılmıştır. Modelin oluşturulmasında Sülfür mustard grubu bir ajan olan ve half-mustard olarak da bilinen "2-Chloroethyl ethyl sulfide" (CEES) kullanılmıştır. CEES 1 mg/kg dozunda intratrakeal yoldan uygulanmıştır. Çalışmaya deney hayvanları, sham, kontrol (sülfür mustard), sülfür mustard+N-Asetilsistein, sülfür mustard+lipoik asit, sülfür mustard+mesna, sülfür mustard+amifostin gruplarına ayrıldıktan sonra başlanmıştır. Sülfür mustard toksisitesi modeli oluşturulduktan sonra 15 dk. içinde tedavi edici ajanlar uygulamaya başlanmıştır. Tedaviler 3 gün süreyle uygulanmıştır. Bu sürenin sonunda sıçanlar cerrahi anestezi altında sternotomi uygulanarak açılmış ve serum incelemesi amacıyla kan ve akciğer doku örnekleri alınmıştır. Dokular histopatolojik değerlendirme amacıyla %10'luk formole, biyokimyasal ve ELISA analizleri için ise eppendorflara alınarak -80°C buzdolabında analiz işlemlerine kadar uygun koşullarda saklanmıştır. **Bulgular:** Ölüm oranlarına ait sonuçlara baktığımızda, patolojik kontrol (SM) grubunda görülen %60'lık ölüm oranının sadece istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde Amifostin ve Lipoik asit gruplarında (sırasıyla %10 ve %20) azaldığı gözlemlenmiştir. Histopatolojik değerlendirmede ise; Rutin H&E ile boyanan Akciğer doku kesitlerinde ödem, hemoraji, inflamasyon değerlendirilmesi başta olmak üzere genel histopatolojik değerlendirme ve skorlama yapılmıştır. Yapılan değerlendirmede sham grubuna göre patolojik kontrol (SM) grubunda görülen yoğun ödem, hemoraji ve inflamasyonun sadece Amifostin ve Lipoik asit verilen gruplarda anlamlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Serumda, oksidatif stresin neden olduğu lipid peroksidasyonu düzeyini gösteren malondialdehit (MDA) seviyeleri, nitrostatif stres düzeyini gösteren NOx seviyeleri, antioksidan savunmanın göstergesi olarak kullanılan antioksidan enzimlerden SOD ve GPx düzeyleri ve inflamasyon kriterlerinden biri olarak kabul edilen neopiterin düzeyleri yönüyle gruplar arasında herhangi bir anlamlı fark görülmemiştir. Sonuç olarak; elde edilen veriler ışığında serum MDA, SOD, GPx, NOx, Neopterin gibi oksido-nitrosatif, antioksidan, inflamatuvar parametrelerin akut akciğer toksisitesinde durumun tespit ve takibinde kullanılıp kullanılmayacağına daha uygun bir modelde test edilmesi gerektiği, Amifostin ve α -Lipoik Asit gibi yeni antioksidanların sülfür mustardın oluşturduğu akut akciğer toksisitesinde umut vaat ettiği görülmüştür.

ARTICLE INFO/MAKALE BİLGİSİ

Key Words: Sulfur Mustard, Oxidative Stress, Antioxidants, Acute Toxicity

Anahtar Kelimeler: Sülfür Mustard, Oksidatif Stres, Antioksidan, Akut Toksikite

DOI: 10.5281/zenodo.8061653

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Dr., Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara, Türkiye. berdinur4822@gmail.com

Received Date/Gönderme Tarihi: 10.05.2023

Accepted Date/Kabul Tarihi: 10.07.2023

Published Online/Yayımlanma Tarihi: 10.07.2023

GİRİŞ

Kimyasal savaş ajanları tarihsel süreçte, gerek askeri mücadelelerde gerekse siviller üzerinde defalarca kullanılan, kitleler halinde ölüm ve yaralanmalara yol açan bir grup kimyasalın ortak ismidir. Vezikan (yakıcı) ajanlar olarak bilinen ve doz bağımlı olarak etki gösteren bu ajanlardan mustard gazı, halen antidotu olmaması nedeniyle araştırmacıların ilgisini çekmeye devam etmektedir (1).

Son yüzyıl içerisinde birçok ülke tarafından silahlı mücadeleler sırasında kullanılan mustard gazı, büyük ölçekte son olarak Irak tarafından İran'lı asker ve siviller üzerinde kullanılmış, binlerce insanın yaralanmasına ve ölmesine neden olmuştur (2).

SM üretiminin kolay ve ucuz olması, depolanma süresinin uzun olması, mortaliteden çok morbiditesinin yüksek olması ve böylece insanları uzun yıllar boyunca bakıma muhtaç bırakması, onun halen popüler bir savaş ajanı olarak kalmasına neden olmaktadır. Bunun yanında rensiz ve kokusuz formunun uygulanması ile düşük farkındalık oluşturması, akut evrede çok hızlı bulguya rastlanmaması, sadece bir kez düşük düzeyli maruziyetinin bile ciddi akut ve kronik problemlere yol açması, toksisitesinin ne derece kuvvetli olduğunun göstergesidir (3,4).

1.1 Sülfür Mustard Maruziyetinin Patolojik Etkileri

Son dönemde SM toksisitesi üzerine yapılan araştırmalar sonucunda bir takım ilaçların yararlı etkileri gözlemlense de bunlar SM'ye karşı kesin bir antidot olmaktan uzaktırlar. Bu ajanın kullanımı sonrasında hedef kitleler ölmekten çok iş göremez hale gelirler. SM'yi bir savaş ajanı olarak popüler kılan akciğer, göz ve deri üzerindeki etkileridir. SM, bunun yanında nazofarinkste, immün sistemde, sindirim sisteminde, üreme sisteminde, böbreklerde, büyüme ve gelişme üzerinde ciddi patolojilere yola açmaktadır. Ayrıca hematolojik sistem üzerinde önemli hasarlara neden olarak kanser riskinde belirgin bir artışa neden olmaktadır (5,6).

1.1.1 Akciğerler

SM'ye yoğun şekilde maruz kalmış insanlarda ilk birkaç haftadan sonra gelişen ölüm vakalarının çoğu solunum yolunda oluşan problemlerden kaynaklanmaktadır (7). Hasta için çok rahatsız edici olan bu problemler mustard gazının yüksek orandaki kimyasal tepkime özelliğinden dolayı akut safhada üst solunum yollarında gelişmeye başlar (8). Nazal mukozadan terminal bronşiyollere kadar tüm hava yollarında etkiler ortaya çıkar. Burun ve sinüslerde ağrıyla başlayan semptomlar sekresyon artışı, boğaz ağrısı ve sonrasında burun kanaması ile karakterizedir. Diferi hastalığına benzer psödömembranlar oluşarak havayollarında tıkaç

oluşumuna sebep olabilir (9). Yüksek dozda laringeal hasar sesin kısılması, çatallaşması ve sonrasında hastanın boğulma hissine kapılmasına sebep olabilir. İleri düzeyde maruziyet trakeobronşit, şiddetli öksürük, dispne ve alveoler kanama ile sonlanabilir. Bütün bunlara bağlı olarak solunum yolları enfeksiyonu ise akut dönemde beklenen bir durumdur. SM'nin inhalasyonu sonrasında taşipne ve buna bağlı olarak respiratuar alkaloz ortaya çıkabilir. Uzayan dönemde pulmoner ödem tablosu, epitel hücre hasarı ve surfaktan azalması büyük olasılıkla akut respiratuar distres sendromunda (ARDS) olduğu gibi asidoza yol açar (10).

SM'nin uzun dönem komplikasyonlarının akut dönem mekanizmalarından farklı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle akut dönemde ajan maruziyeti sonrasında hiçbir belirti vermeyen insanlar da bile çeşitli rahatsızlıkların ortaya çıkması beklenebilir. Kronik döneme bağlı semptomlar yine tüm hava yollarında oluşsa bile solunum ağacında ortaya çıkan bozukluklar bunların en sık olanıdır. Tek doz yüksek maruziyet dahi mukozada kalınlaşmaya ve inatçı öksürüklere sebep olabilmektedir. Bronşiyal duvar kalınlaşması ve bronşektazi görülebilir. İnterstisyel akciğer hastalığı ve amfizem gelişebilir. Pnömoni, bronşiyolit, pulmoner fibrozis ortaya çıkabilecek önemli problemlerdendir. Pulmoner ağaçta oluşan papiller tarzdaki oluşumlar zamanla stenoza neden olur. Ayrıca ajanın üretildiği fabrikalarda çalışan işçilerde bronşiyal sistemde kanser oluşumu ve KOAH hastalığı görülme riskinin arttığı bildirilmiştir (11).

1.2. Bilinen Mekanizmalar Işığında Mustard Gazının Fizyopatolojisi

Mustard gazı lipofilik özelliği nedeniyle kolayca ve hızlı biçimde vücuda girer. Bu aşamadan sonra SM etilen sülfonyum ara bileşiğine dönüşerek elektrofilik özellik kazanan bu ajanın temel olarak eğilimi DNA üzerindeki makromoleküler yapılara bağlanma yönündedir. Bu esnada oksidatif-nitrosatif strese, inflamasyon reaksiyonlarına ve DNA alkilizasyonuna yol açan mustard gazının vücutta oluşturmuş olduğu hasarı farklı birçok mekanizma üzerinden oluşturduğu düşünülmektedir (12,13).

Araştırmamız, bir SM türevi olan half-mustard ile oluşturulan akciğer hasarında, çeşitli antioksidan ajanların serum oksidatif/nitrosatif parametreleri, akciğer histopatolojisi ve sağkalım üzerine olan etkilerini ortaya koymayı amaçlamaktadır.

2. GEREÇ-YÖNTEM

2.1. Deneysel Hayvanları

Araştırmamız, GATA Komutanlığı Hayvan Deneysel Etik Kurulu'nun, 11 Temmuz 2014 tarih ve 13/120 sayılı

toplantı kararı ile onaylanmıştır. Çalışmamızda 200-250 g ağırlığındaki, toplam 60 adet Sprague-Dawley türü erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar basit rastgele örnekleme yöntemiyle Sham, patolojik kontrol (SM), SM+AMF, SM+LA, SM+Mesna ve SM+NAC olmak üzere 6 gruba ayrıldı.

Sıçanlar, GATA Araştırma ve Geliştirme Merkezi-Deney Hayvanları Bölümü'nden temin edilerek çalışma süresince aynı laboratuvar koşullarında tutuldu. Çalışmaya başlamadan önce 7 gün süreyle aklimatize edilen sıçanlar, 23-25 oC sıcaklıktaki ortamda tutularak, ticari sıçan yemi ve normal musluk suyuyla beslendi. Çalışmada mustard grubu ajan olarak half mustard olarak da bilinen Chlorethyl-ethyl Sulfide (CEES) kullanılmıştır.

2.2. Deney Grupları

1. Sham Grubu: Bu gruptaki hayvanlara kontrol ve deney gruplarına verilen miktarda (100µl) intratrakeal izotonik NaCL mayı uygulandı. Tedavi olarak ise herhangi bir uygulama yapılmadı.

2. SM Grubu: Bu gruptaki hayvanlara 1 mg/kg dozunda 100µl izotonik NaCL içinde çözölen CEES toksisite modelini oluşturmak amacıyla intratrakeal olarak uygulandı. Uygulamayı takiben 15. dk'da başlamak üzere üç gün boyunca sabah ve akşam intraperitoneal izotonik NaCL uygulandı.

3. SM + AMF Grubu: Bu gruptaki hayvanlara 1 mg/kg dozunda 100µl izotonik NaCL içinde çözölen CEES toksisite modelini oluşturmak amacıyla intratrakeal olarak uygulandı. Daha sonra amifostin 200 mg/kg/gün dozunda uygulamayı takiben 15 dk.'da başlamak üzere 72. saate kadar 12 saat arayla sabah ve akşam toplam 6 doz intraperitoneal yoldan tedavi amacıyla uygulandı.

4. SM + LA Grubu: Bu gruptaki hayvanlara 1 mg/kg dozunda 100µl izotonik NaCL içinde çözölen CEES toksisite modelini oluşturmak amacıyla intratrakeal olarak uygulandı. Daha sonra LA 100 mg/kg/gün dozunda uygulamayı takiben 15 dk.'da başlamak üzere

72. saate kadar 12 saat arayla sabah ve akşam toplam 6 doz intraperitoneal yoldan tedavi amacıyla uygulandı.

5. SM + Mesna; Bu gruptaki hayvanlara 1 mg/kg dozunda 100µl izotonik NaCL içinde çözölen CEES toksisite modelini oluşturmak amacıyla intratrakeal olarak uygulandı. Daha sonra Mesna 64 mg/kg/gün gün dozunda uygulamayı takiben 15 dk.'da başlamak üzere 72. saate kadar 12 saat arayla sabah ve akşam toplam 6 doz intraperitoneal yoldan tedavi amacıyla uygulandı.

6. SM + NAC: Bu gruptaki hayvanlara 1 mg/kg dozunda 100µl izotonik NaCL içinde çözölen CEES toksisite modelini oluşturmak amacıyla intratrakeal olarak uygulandı. Daha sonra NAC 150 mg/kg/gün dozunda uygulamayı takiben 15 dk.'da başlamak üzere 72. saate kadar 12 saat arayla sabah ve akşam toplam 6 doz intraperitoneal yoldan tedavi amacıyla uygulandı.

2.3. Sülfür Mustard Akut Akciğer Toksisitesi Modelinin Oluşturulması

Mustard grubu ajanların neden olduğu akut toksisite modelinin oluşturulması amacıyla sıçanlar, 45 mg/kg ketamin + 5 mg/kg ksilazin anestezisi uyutularak sıcak ortamda beklemeye alındı (Şekil 1-2). Uygulama sırasında oluşabilecek olası SM kontaminasyonu riskine karşı koruyucu tedbirler alındı. Daha sonra Sham ve SM gruplarından başlayarak intratrakeal uygulamalar gerçekleştirildi (Şekil 3-4). Uygulamayı takiben uygun bir süre gözlem altında tutularak 15dk sonra tedavileri verilen sıçanlar kafeslerine alındı.

2.4. Doku ve Serum Örneklerinin Alınması

Üçüncü günün sonunda sıçanlara ketamin (100mg/kg) + ksilazin (5mg/kg) uygulanarak cerrahi anestezisi oluşturuldu. Anestezisi gerçekleştikten sonra, sıçanlar için özel olarak hazırlanmış cerrahi işlem bölümünde, supine pozisyonda iğneler yardımıyla cerrahi işlemin yapılacağı masaya sabitlendi (Şekil 5). İşlem için kullanılması planlanan diseksiyon seti yardımıyla torasik kavite sternum altından koltuk altına kadar açıldı (Şekil

Tablo 1. Deney ve kontrol gruplarının uygulama-zaman ve doz çizelgesi

Gruplar	Uygulama Günleri				Doz
	15. dk	1. gün	2. gün	3. gün	
Sham (n=10)	-	-	-	-	-
SM (n=10)	SF	SF	SF	SF	250µl
SM + AMF (n=10)	AMF	AMF	AMF	AMF	200 mg/kg/gün
SM + LA (n=10)	α-LA	α-LA	α-LA	α-LA	100 mg/kg/gün
SM + Mesna (n=10)	M	M	M	M	64 mg/kg/gün
SM + NAC (n=10)	NAC	NAC	NAC	NAC	1 150 mg/kg/gün



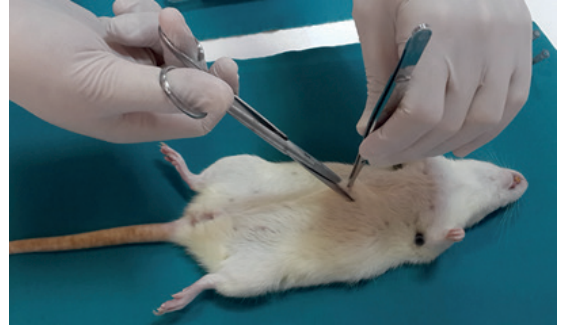
Şekil 1. Anestezi amacıyla insülin iğnesi kullanılarak sol ayak quadriseps kası içine ketamin (45mg/kg) + ksilazin (5mg/kg) uygulaması.



Şekil 2. İntratrakeal sülfür mustard uygulaması için kullanılan platform üzerinde sıçan'a uygun pozisyonun verilmesi.



Şekil 3. Gerekli koruyucu tedbirlerin alınarak uygulama için gerekli olan aletler yardımıyla intratrakeal sülfür mustard uygulamasının yapılması



Şekil 4. Cerrahi anestezi düzeyi sağlandıktan sonra işlem masasına sıçanların supine pozisyonunda sabitlenmesi.



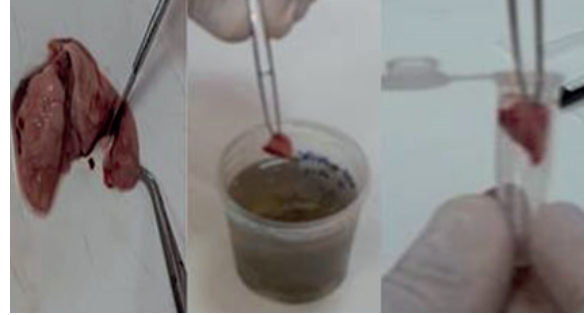
Şekil 5. Cerrahi aletler yardımıyla sternum altı median kesi yöntemi ile kesi hattının koltuk altlarına kadar genişletilmesi ile sternotomi ve toraks ekspozisyonu.



Şekil 6. Toraks ekspozisyonu sonrasında 10 cc'lik enjektör yardımıyla kan örnekleme amacıyla sağ atrium ponksiyonu ile kanın alınarak düz tüpe koyulması.



Şekil 7. Kan örnekleme sonrasında akciğer dokusunun hızla çıkarılması.



Şekil 8. Akciğer dokusunun histopatolojik inceleme amacıyla %10'luk formaldehite, biyokimyasal analizler için ependorflara alınması.

6). Toraks'ın açılarak ortaya konmasından sonra 10cc'lik enjektör yardımıyla sağ atriumdan kan örnekleri alındı (Şekil 7). Sağ ventrikül aracılığı ile akciğer dokusundaki muhtemel kan dokusu kalıntısı izotonik mayi ile yıkanarak temizlendi. Daha sonra akciğer dokusu derhal çıkartıldı (Şekil 8). Sağ akciğer histopatolojik değerlendirme amacıyla %10'luk formaldehit içerisine, sol akciğer ise üç ayrı parçaya ayrılıp ependorfa konularak sıvı nitrojen yardımıyla donduruldu ve -80°C'de muhafaza edildi. Alınan kan örnekleri ise 4500 devirde 10 dk süreyle santrifüje (ependorf-centrifuge 5804 R) edilerek, alınan süpernatantlar iki ayrı alikot halinde -80°C'de muhafaza edildi.

2.5. Histopatolojik Analizler

2.5.1. Doku Takibi

Akciğer dokusu, doku takip cihazında (Thermo Scientific, Tissue Excelsior ES, İngiltere) formalin (1,5 saat), alkol (6 saat), ksilen (3 saat) ve parafinden (4 saat) geçirildi.

2.5.2. Parafine Gömme

Takibi biten dokular, doku gömme cihazına (Sakura, Tiysue TEK, Japonya) alınarak Miller metodu ile parafin blok haline getirildi. Her sıçanın akciğerinden alınan üçer adet dokunun aynı preparat üzerinde incelenebilmesi amacıyla Miller metodu kullanılmıştır.

2.5.3. Kesit Alınması

Parafin bloklardan mikrotom cihazında (Microm, HM 355S, Almanya) 5 mikron kalınlığında birer kesit alındı, deparafinizasyon sonrası dokulardaki histopatolojik değişikliklerin incelenebilmesi amacıyla hematoksil-eozin boyası ile boyandı. Bir patolog tarafından tek körlü çalışma prensibi ile ışık mikroskopunda incelendi.

2.5.4. Hematoksil-eozin (H&E) Boyama Yöntemi

Sülfür mustard akut akciğer toksisitesi modeli uygulanmış ve uygulanmamış gruplar arasında akciğer hasar farkını histolojik olarak gösterebilmek amacıyla

bu yöntem uygulanmıştır. Lam üzerine alınan dokular deparafinizasyon için 70°C lik etüvde 30 dakika (üzerindeki parafin tamamen eriyene kadar) tutulduktan sonra (Leica, ST5020, Almanya) doku boyama cihazında H&E boyama için önce sıra ile; ksilen 2x15 dk, %100 alkol 10 dk, %90 alkol 10 dk, %70 alkol 10 dk geçirilerek deparafinize edildi.

Son olarak dokular dehidratasyon için sıra ile; % 70 alkol (3-5 sn), %90 alkol (3-5 sn), %100 alkol (3-5 sn), ksilen (2x10 dk)' den geçirilerek entellan ve lamel ile dokular kapatıldı. Amonyak solüsyonu; 500 ml distile suya, 2 damla amonyak damlatılarak, asit-alkol solüsyonu; 1400 ml distile su içine 600 ml etil-alkol, 6 ml hidroklorik asit (HCL) eklenecek şekilde hazırlandı.

2.5.5. Histopatolojik Değerlendirme

Mikroskopik olarak akciğerlerdeki histopatolojik değişiklikler; grade 0-1; normal görünümde akciğer, grade 1-2; İnterstisyumda hafif derecede ödem ve konjesyon, grade 3-5; İnterstisyumda orta derecede ödem ve konjesyon, grade 6-8; İnterstisyumda belirgin konjesyon, ödem, grade 9-11; İnterstisyumda belirgin konjesyon, ödem, alveollerde yaygın ödem, konjesyon, grade 12-15; İnterstisyumda belirgin konjesyon, ödem, alveollerde yaygın ödem, konjesyon, fokal hyalen membran oluşumu oluşumu olarak değerlendirildi.

2.6. Biyokimyasal Analizler

Öncelikle, serum protein seviyeleri BCA kiti (Thermo Scientific Pierce™ BCA Protein Assay Kit) ile ölçülmüştür (14). Lipid peroksidasyon düzeyleri Ohkawa yöntemi kullanılarak tiyobarbitürik asit (TBA) reaksiyonu ile ölçüldü (15). Bu yöntem, 535 nm'de MDA (MDA) ile TBA'nın reaksiyonu sırasında oluşturulan rengin bir spektrofotometrik ölçümünün elde edilmesi için kullanılmıştır. Bu amaçla, 100g/2.5ml trikloroasetik asit çözeltisi 0.5 ml seruma her bir santrifüj tüpü içinde olacak şekilde ilave edildi ve 15 dakika süre ile kaynar su banyosuna yerleştirildi. Karışım soğutuldu ve 10 dakika süre ile 1000 g'de santrifüje edildi. Daha sonra, serumun

2 ml'si, 6.7 g/l TBA solüsyonun 1 ml'sine ilave edildi ve 15 dakika boyunca bir kaynar su banyosuna yerleştirildi. Çözelti daha sonra soğutuldu ve absorban derecesi bir spektrofotometre (Molecular Device Filter Max F5 Multi-Made Microplate Reader) kullanılarak ölçüldü. MDA seviyeleri mmol/gprotein olarak ifade edildi.

SOD aktivitesi Sun'in nitroblue tetrazolyum (NBT) yöntemi kullanılarak ölçüldü (16). Sığır karaciğerinden elde edilmiş 10 mg Cu-Zn SOD içeren stok çözeltisi 10 ml izotonik tuzlu su içinde çözündürüldükten sonra analiz sırasında kullanılmadan önce 600 µg/l oranında distile su yardımıyla dilüe edildi. SOD analiz reaktifi takip eden reaktif gruplarının kombinasyonundan oluşmaktaydı: 80 ml'lik 0.3 mmol/L ksantin çözeltisi, 40 ml'lik 0.6 mmol/L etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) çözeltisi, 40 ml'lik 150 umol/L NBT solüsyonu, 24 ml'lik 400 mmol/l Na₂CO₃ çözeltisi ve 12 ml sığır serum albümini. Numuneler, enzim aktivitesinin analizinden önce etanol-kloroform (62.5/ %37.5) ekstresine tabi tutulmuştur. Kısaca, 400 µl buz soğukluğunda etanol/kloroform karışımı 250 µl'lik numune tam olarak karıştırılmıştır. 30 saniyelik vorteks uygulamasından sonra 5 dakika boyunca 4°C'de 3000g de santrifüje edilen numunenin üst tabakasındaki sulu bölüm toplandı. Toplanan serum, 100 kat dilüe edildikten sonra, seyreltilen bu solüsyondan alınan 0.5 ml'lik bölüm üzerine 2.5 ml SOD analiz reaktifi eklenerek ortaya çıkan karışım analiz için kullanıldı. NBT süperoksit anyonu yardımıyla 560nm'de kuvvetli absorpsiyon yeteneğine sahip olan mavi formazan'a indirgendii. Bir birim (U) SOD, NBT redüksiyonunu % 50 önleyen protein miktarı olarak tanımlanır. Hesaplanan SOD aktivitesi U/gprotein olarak ifade edilmiştir.

GPx aktivitesi Paglia&Valentine tarafından tarif edilen metod kullanılarak ölçülmüştür (17). Bu metod kullanılarak GPx aktivitesi, glutatyon redüktaz ve NADPH oksidasyonu ile birleştirilir. NADPH oksidasyonu, 37°C'de 340 nm'de spektrofotometrik olarak takip edildi. Reaksiyon karışımı, 50 mmol potasyum fosfat tampon (pH 7), 1 mmol EDTA, 1 mmol NaN₃, 0.2 mmol NADPH, 1 mmol glutatyon ve 1 U/ml glutatyon redüktaz'dan oluşuyordu. 340 nm'deki absorpsiyon, 5 dakika boyunca kaydedildi. Aktivite her dakikada okside NADPH'in mmol olarak çizgilerinin eğimi ile tanımlandı. GPx aktivitesi U/gprotein olarak sunuldu.

Neopterin çalışması için Akgül ve ark. (18) tarafından modifiye edilen Alrashad ve ark.'nın (19) geliştirdiği metod kullanıldı. Yöntem, şu işlemlerden oluşmaktaydı; elde edilen serum örnekleri, çalışma yapılincaya kadar -80oC'de saklandı. Örnek hazırlamak için 400 µL örnek üzerine 100 µL 2M TCA çözeltisinden eklenip vortekslelendikten sonra +4oC'de, 10.000 g'de, 10 dk santrifüj edildi ve serum alınarak neopterin ölçümü için kullanıldı. Örnek temini ve analize hazırlık aşamalarında örnekler ışıktan korundu.

Örneklerin neopterin konsantrasyonlarının hesaplanması için, seri dilüsyonla hazırlanmış olan neopterin standart çözeltilerinin HPLC ölçümüyle elde edilen pik alanları, Mikrosoft Excel 2013 programı kullanılarak konsantrasyon–alan eğrisi oluşturuldu. Elde edilen regresyon denklemi kullanılarak örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

Örnekler Nitrit+Nitrat (NO_x) konsantrasyonlarının analizi için GATA Halk Sağlığı laboratuvarındaki iyon kromatografi cihazı kullanıldı (Dionex ICS – 1000, Sunnyvale, CA, USA). Nitrik Oksit çözülümünün son ürünleri olan nitrit-nitrat seviyelerini belirlemek için 22 nm enjektör filtreler kullanılarak serum filtrelendi. Seçici anyon kolon ve aksesuarları kullanıldı (AS-9 HC, AG-9 HC, Sunnyvale, CA, USA). Örneklerin nitrat ve nitrit değerlerini ölçmek için çeşitli konsantrasyonlarda standart iyon karışımları kullanıldı.

2.7. İstatiksel Analiz

Önce tüm gruplar arasında “Kruskal Wallis” testi ile analiz yapıldıktan sonra, anlamlı sonuç veren grupların ikişerli olarak karşılaştırılmalarında denek sayısına uygun olarak nonparametrik bir yöntem olan “Mann Whitney U Test” kullanıldı. Tüm gruplardaki sağkalım için “Chi-Square Tests” kullanıldı. Sonuçlar “Median±SEM” veya “Median(Min-Max)” olarak ifade edildi. İstatistiksel olarak p<0.05 değeri anlamlı olarak kabul edildi.

3.BULGULAR

3.1. Klinik Bulgular

Deneyin sonunda sülfür mustard ve tedavi uygulanan tüm gruplarda kilo kaybı, hareketlerde azalma, uyanlara tepkilerde azalma olduğu görüldü. SM+LA grubunda muhtemelen tedavi için kullanılan LA'nın sıvı yağda çözündürülmesi ve İ.P.uygulanmasından dolayı ishal görüldü. Sülfür mustard'ın direk olarak akciğerlere verilmesinden dolayı solunum problemleri, ağız ve burun çevresinde kanlı sekresyon görüntüsü mevcuttu. LA ve AMF grubundaki sıçanların kontrol ve diğer tedavi gruplarına göre daha hareketli oldukları, uyanan yanıtında daha iyi tepki verdikleri ve kanlı sekresyon görüntüsünün belirgin olarak az olduğu gözlemlendi.

3.1.1 Sağkalım Oranlarının Değerlendirilmesi

Sülfür mustard uygulaması sonrasında tedavi süresince sıçanlarda gözlenen ölüm oranları çalışma kapsamında değerlendirmeye alındı. Uygulama öncesi ve süresince gözlenen ölümler kaydedildi. Sham grubu hariç tüm gruplarda ölümler gözlemlenmesine karşın sadece SM+AMF ve LA grubundaki ölüm oranlarının istatistiksel olarak anlamlı bir sağkalım oranı ifade ettiği gözlemlendi (Tablo 2).

Tablo 2. Deney sonundaki sağkalım oranları (Chi-Square Tests)

GRUPLAR	İlk Sayı (Adet)	Son Sayı (Adet)	İlk Sayıya göre % kayıp
Sham	10	10	%100
SM	10	4	%40
SM+Mesna	10	6	%60
SM+NAC	10	5	%50
SM+AMF	10	9	%90 ^b
SM+LA	10	8	%80 ^b

^ap<0.05 Sham grubuna göre diğer gruplarda anlamlı artma veya azalma

^bp<0.05 SM grubuna göre tedavi gruplarında anlamlı artma veya azalma

^cp<0.05 SM+Mesna veya SM+NAC gruplarına göre SM+AMF ve SM+LA gruplarında anlamlı artma veya azalma

^dp<0.05 SM+AMF grubuna göre ve SM+LA grubunda anlamlı artma veya azalma

3.1.2. Kilo Takibinin Değerlendirilmesi

Sülfür mustard'ın akut dönemde yol açtığı toksisite nedeniyle sıçanlarda oluşan kilo kaybı da araştırıldı. Deneyin başlangıcında ve tedaviler sonrasında yapılan ağırlık kontrollerinde, sıçanların kilo kaybettikleri gözlemlendi. Tüm gruplarda Sham grubuna göre kilo kaybı görülmesine rağmen sadece SM+LA gruptaki kilo kaybının istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi (p<0.05) (Tablo 3).

3.2. Biyokimyasal Analizlerin Değerlendirilmesi

Serumda, oksidatif stresin neden olduğu lipid peroksidasyonu düzeyini gösteren malondialdehit

Tablo 3. Deney başında ve sonunda hayvan ağırlıkları (Median±SEM)

GRUPLAR	İlk Ağırlık (gram)	Son Ağırlık (gram)	İlk Ağırlığa göre % kayıp
Sham	330.0±19.6	322.0±20.3	%1
SM	303.0±16.5	298.0±10.3	%12
SM+Mesna	344.0±11.8	307.0±11.1	%14
SM+NAC	340.0±9.1	303.0±9.7	%16
SM+AMF	358.0±12.2	294.0±13.2	%18
SM+LA	318.0±19.0	270.0±11.6 ^a	%27 ^a

^ap<0.05 Sham grubuna göre diğer gruplarda anlamlı artma veya azalma

^bp<0.05 SM grubuna göre tedavi gruplarında anlamlı artma veya azalma

^cp<0.05 SM+Mesna veya SM+NAC gruplarına göre SM+AMF ve SM+LA gruplarında anlamlı artma veya azalma

^dp<0.05 SM+AMF grubuna göre ve SM+LA grubunda anlamlı azalma

Tablo 4. Serum oksidatif/nitrosatif stres, antioksidan enzim, inflamasyon kriterlerine ait seviyeler (Median±SEM)

GRUPLAR	MDA (mmol/gprotein)	SOD (U/gprotein)	GPx (U/gprotein)	NOx (µM)	Neopterin (nmol/L)
Sham	0.030±0.003	38.85±5.00	8.72±1.02	0.170±0.068	21.03±1.05
SM	0.030±0.002	28.31±1.79	8.69±0.40	0.165±0.118	17.02±1.38
SM+Mesna	0.030±0.001	28.62±2.76	7.46±0.59	0.095±0.065	20.38±0.51
SM+NAC	0.029±0.002	22.09±3.57	8.78±0.55	0.000±0.762	21.83±0.59
SM+AMF	0.033±0.001	29.31±3.76	9.30±0.44	0.260±0.378	20.39±1.01
SM+LA	0.030±0.001	21.66±2.75	9.19±0.68	0.225±0.079	19.42±1.38

^ap<0.05 Sham grubuna göre diğer gruplarda anlamlı artma veya azalma

^bp<0.05 SM grubuna göre tedavi gruplarında anlamlı artma veya azalma

^cp<0.05 SM+Mesna veya SM+NAC gruplarına göre SM+AMF ve SM+LA gruplarında anlamlı artma veya azalma

^dp<0.05 SM+AMF grubuna göre ve SM+LA grubunda anlamlı artma veya azalma

(MDA) seviyeleri, nitrostatif stres düzeyinin dolaylı bir göstergesi olan NOx seviyeleri, antioksidan savunmanın göstergesi olarak kullanılan antioksidan enzimlerden SOD ve GPx düzeyleri ve inflamasyon kriterlerinden biri olarak kabul edilen neopterin düzeyleri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak gruplar arasında herhangi bir anlamlı fark bulunamamıştır (Tablo 4).

3.3. Histopatolojik Bulgular

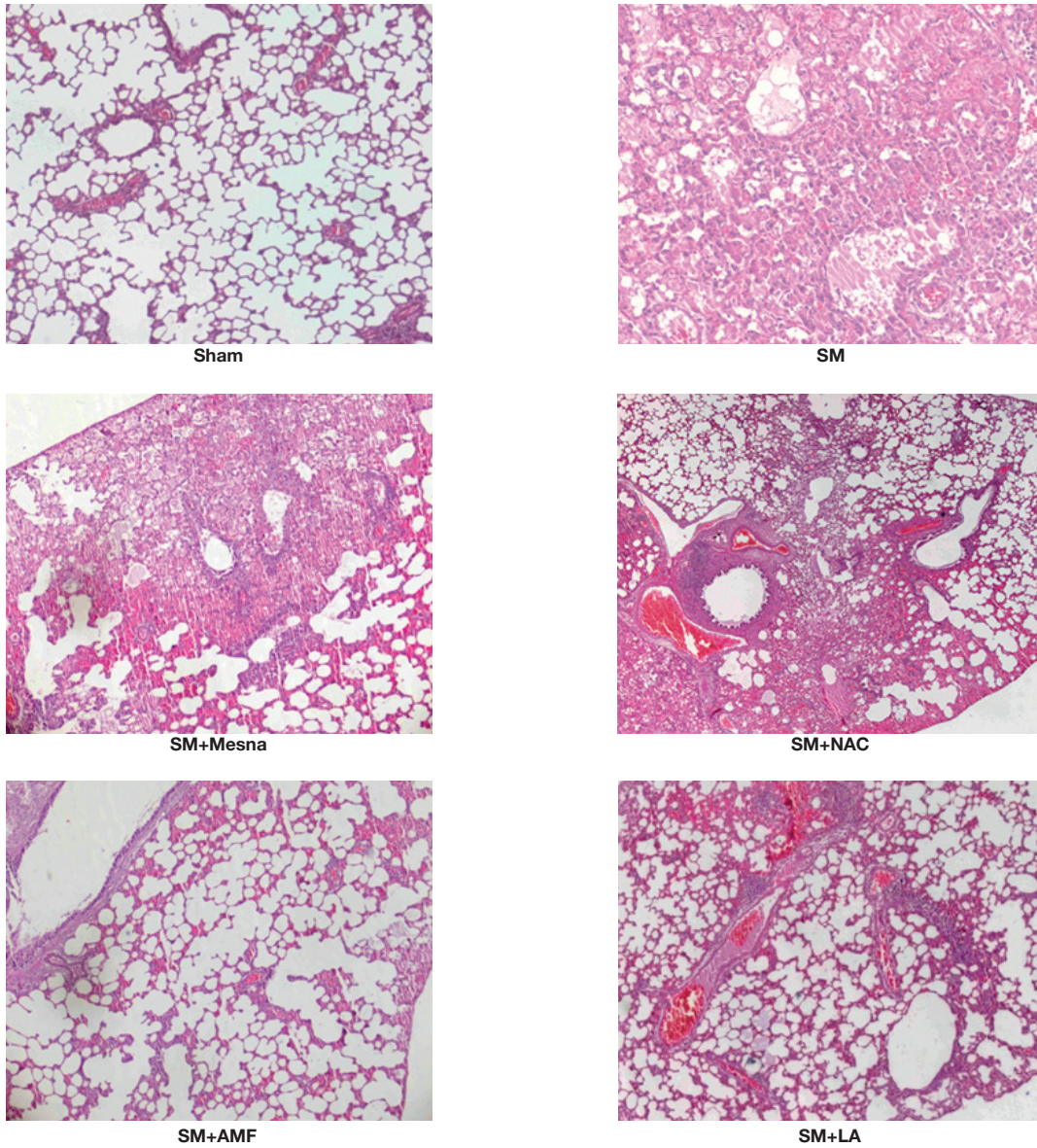
Akciğer dokusunun H&E boyaması ile rutin histopatolojik değerlendirmesinde, Gereç ve Yöntem bölümde ayrıntıları açıklanan Ödem, İnflamasyon, Hemoraji ve Total hasarın değerlendirildiği skorlamada Sham grubuna göre diğer tüm gruplarda Ödem, İnflamasyon,

Hemoraji ve Total hasar istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştı ($p<0.05$). SM grubuna göre tüm tedavi uygulanan gruplar değerlendirildiğinde ise sadece SM+AMF, SM+LA gruplarında Ödem, İnflamasyon, Hemoraji ve Total hasar yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma gözlemlendi ($p<0.05$). Yine SM+AMF ve SM+LA gruplarında diğer tedavi grupları olan SM+Mesna ve SM+NAC gruplarına göre Ödem, İnflamasyon, Hemoraji ve Total hasar yönünden istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ($p<0.05$). SM+AMF ve SM+LA grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise sadece Total hasar yönünden istatistiksel olarak SM+AMF grubunda anlamlı bir şekilde azalma gözlemlendi ($p<0.05$). Tüm gruplara ait skorlar Tablo

5'te, grup ortalamasını yansıtan rutin H&E ile boyanmış akciğer dokusu kesitleri ise Şekil 9'da gösterilmiştir.

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda, intratrakeal yoldan 1 mg/kg dozunda kullanılan CEES uygulamasından 3 gün sonra tedavi edilmeyen patolojik kontrol grubunda (SM) %60 oranında ölüm görüldü. Ölüm oranını, tedavi gruplarından sadece AMF ve LA (sırasıyla %10 ve %20) düşürmüş ve bu değerlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. SM gastrointestinal sorunlara yol açmaktadır. Bu sorunların en sık görülenleri bulantı, kusma, iştah kaybı, karın ağrısı ve ishaldir (20-22). Çalışmamızda patolojik



Şekil 9. Rutin H&E ile boyanmış tüm gruplara ait akciğer dokusu kesitleri

Tablo 5. Akciğer dokusu histopatoloji (Rutin H&E) skorları (Median(Min-Max))

GRUPLAR	Ödem	İnflamasyon	Hemoraji	Total
Sham	0 [0-1]	0 [0-1]	0 [0-0]	0 [0-1]
SM	4 [0-5] ^a	4 [0-4] ^a	2 [0-3] ^a	10 [0-11] ^a
SM+Mesna	3 [2-5] ^a	3 [2-4] ^a	2 [2-3] ^a	9 [7-12] ^a
SM+NAC	4 [3-4] ^a	3[1-4] ^a	3 [1-3] ^a	9 [8-11] ^a
SM+AMF	1 [1-3] ^{a,b,c}	1 [0-3] ^{a,b,c}	1 [0-2] ^{a,b,c}	4 [2-8] ^{a,b,c}
SM+LA	2 [0-3] ^{a,b,c}	2 [1-3] ^{a,b,c}	1.5[1-2] ^{a,b,c}	5 [2-7] ^{a,b,c,d}

^ap<0.05 Sham grubuna göre diğer gruplarda anlamlı artma veya azalma

^bp<0.05 SM grubuna göre tedavi gruplarında anlamlı artma veya azalma

^cp<0.05 SM+Mesna veya SM+NAC gruplarına göre SM+AMF ve SM+LA gruplarında anlamlı artma veya azalma

^dp<0.05 SM+AMF grubuna göre ve SM+LA grubunda anlamlı artma veya azalma

kontrol grubu dahil (SM) diğer gruplarda olmayan ancak sadece LA grubunda gözlenen (istatistiksel olarak anlamlı) %27 oranındaki ağırlık kaybı dikkat çekiciydi. Sağkalım oranını anlamlı olarak artıran LA'nın ağırlıkları bu oranda düşürmesi beklenen bir sonuç değildi. Ancak tedavi uygulaması sırasında LA'nın sıvı bitkisel yağ içerisinde çözülerek intraperitoneal yolla verilmesi 2. günde ishal görülmesine yol açmıştır. Her ne kadar SM'nin gastrointestinal sistemdeki toksik etkileri bilinmesine rağmen diğer gruplarda gözlenmeyen bu durumun, uygulama şekliyle ilişkili olarak ortaya çıkan ishal sonucu meydana gelebileceği değerlendirilmiştir.

Sülfür Mustard toksisitesinden etkilenen primer organ olan ve uzun vadedeki etkilerden büyük oranda sorumlu olan akciğer dokusunun ne düzeyde etkilendiği, araştırmalarda genel olarak rutin akciğer histopatolojik incelemesiyle ortaya konur. Geçmiş dönemlerde yapılan deneysel çalışmalar üst hava yollarında belirgin düzeyde olmak üzere inflamasyona ait bulguların akut ve kronik dönemin en ciddi problemi olduğunu göstermiştir (23). Epitel doku hasarı başta olmak üzere meydana gelen komplikasyonların en önemli sonucu olarak gösterilen inflamasyon, solunum membranına hasar vererek solunum işlemi sırasında gaz değişimini büyük oranda azaltan veya önleyen pulmoner hemoraji ve alveoler ödem tablosu ile seyredir (24). Daha ileri dönemlerde ise makrofajlardan salınan pro-inflamatuar ve antiinflamatuar sitokinlerin akciğerdeki tabloyu ağırlaştırarak pulmoner fibrozis ve karsinogenezis oluşumunu tetiklediği bilinmektedir (25). Sülfür mustard'a bağlı akciğer hasarını değerlendirmek için yapmış olduğumuz histopatolojik değerlendirmede Sham grubu hariç tüm gruplarda akciğerlere ait kesitlerde birbirinden farklı düzeylerde ödem, inflamasyon ve hemoraji gözlemlendi. Patolojik kontrol (SM) grubundaki sıçan akciğerlerinin histopatolojik incelenmesinde alveoler boşlukta nötrofil ve epitel hücre infiltrasyonu, yine alveollerin çok büyük bir bölümünde ödem ve hemoraji göze çarpıyordu. Alveol ve bronş duvarlarında inflammatuar hücre infiltrasyonu ve ödem nedeniyle

genişleme mevcuttu. Ayrıca ana bronş lümenlerinde ölü doku, interstisyel aralıkta inflamasyon ve ödem ile perivasküler boşluklarda ödem ve fibrin dokuya ait bulgular izlendi. Klinik durum ve sağkalım oranlarına paralel olarak AMF ve LA uygulanan grupların akciğer dokularının histopatolojik incelemesinde, patolojik kontrol (SM) grubunda görülen hasarın istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi. Ancak diğer tedavi grupları olan mesna ve NAC gruplarında literatürden kısmen farklı olarak anlamlı bir iyileşme gözlenmedi. Bunun yanında SM+AMF grubunun genel histopatolojik skor bakımından LA'dan daha etkin tedavi gösterdiği görüldü. Tedavi gruplarından mesna ve NAC'ın sağkalım ve histopatolojik skorlarına bakıldığında, klinik tabloda gözlenen hareketsiz ve tepkisizlik durumları ile örtüşmekteydi. Çalışmadaki gruplar içerisinde histopatolojik skorlamaya göre en iyi grup olan SM+AMF grubunda hasarın ana bronş ve alveol duvarında kalınlaşma yanında interstisyel boşlukta kısmi ödem ve hemoraji ile sınırlı kaldığı gözlemlenmekteydi.

Araştırmamızda serumda seviyelerine baktığımız MDA, SOD, GPx, NOx, Neopterin yönüyle, tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir farka rastlanmamıştır. Bu literatürle bağdaşmıyor gibi gözükse de (26-34) araştırmamızda intratrakeal yolla uygulanan SM'nin oluşturduğu akciğer hasarı, dokuda lokal olarak serumu etkilememiş olabilir. Bunun yanında serumun tüm organların ortak kullanım alanı olması, antioksidan kapasitesinin yüksek oluşu, akciğerde oluşan oksidant nitrosatif ve inflammatuar hasarın seruma yansımalarını engellemiş olabilir. Bu yönden bakıldığında SM'nin akciğerde oluşturduğu hasarı tespit etmek maksadıyla non invazif bir yöntem olan serum oksidant nitrosatif, antioksidan ve inflammatuar seviyelerini kullanmak mantıklı gibi görünmemektedir. Ancak başka bir yönden bakıldığında ise araştırmamızda bu soruyu cevaplamak üzere kullandığımız yöntem uygun değildir. Normal şartlarda SM saldırısı esnasında lokal olarak sadece akciğer dokusu değil, deri ve gözler de etkilenmektedir. Tüm bu dokuların serum üzerinde oluşturacağı oksido-

nitrosatif, antioksidan, inflamatuvar etkiler çok daha farklı olabilir. Her ne kadar tedavi için kullandığımız ajanların akciğer üzerindeki iyileştirici etkilerini tespit etmek üzere kullandığımız bu model kullanışlı olsa da, serumla ilgili oluşturduğumuz hipotezi test etmek için kullanışlı gözükmemektedir.

AMF kanser kemoterapi ve radyoterapisinde kullanılan, geniş spektrumlu potansiyel bir hücre koruyucu ajandır. Amifostin alkalin fosfataz tarafından defosforile edilerek serbest tiyol yapısındaki aktif metaboliti olan WR-1065'e dönüşerek etkisini gösterir. Serbest tiyol yapısındaki WR-1065 hızla hücre içine girer ve serbest radikallere elektron sağlayarak ortadan kaldırır. Klinik çalışmalar amifostinin bu etkiyi gösterirken kemoterapinin oluşturmuş olduğu toksisiteye karşı normal dokuları seçici şekilde koruduğunu göstermiştir (35-37). Bizim araştırmamızda da SM toksisitesinde yeni yeni denenmeye başlanan bir ajan olan AMF en iyi koruyucu etkiyi göstermiştir (38). Sawale ve ark. yaptığı bir çalışmada CEES'nin perkütan uygulanarak mouse'larda oluşturulan SM toksisitesi modelinde AMF türevi olan DRDE-07'nin artan oksidan stres ve inflamatuvar sitokinleri azaltarak normal düzeylere yaklaştırdığı gösterilmiştir (39). Başka bir araştırmada da Anand ve ark. CEES'nin perkütan uygulanarak dişi mouselarda oluşturulan sülfür mustard karaciğer toksisitesi modelinde DRDE-07'nin karaciğer fonksiyonlarını iyi yönde etkilediğini ortaya koymuşlardır (40). Gautam ve ark yaptığı araştırmada ise farklı AMF türevlerinin kombine edilmesiyle oluşturulan SMF toksisite modelinde vücut ağırlıklarının ve glutatyon seviyelerinin iyi yönde etkilendiği görülmüştür (41). Araştırmamızda da SM+AMF grubu diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sağkalımı artırmıştır. Ayrıca akciğer rutin histopatolojik analizlerinde de ödem, hemoraji ve inflamasyon miktarını anlamlı olarak düşürmüştür. Bu da literatürde yapılan az sayıdaki araştırma sonucu ile örtüşmektedir.

LA, oktanoik asit türevi bir disülfid bileşiği olup çok güçlü bir ROT ve peroksinitrit süpürücüsüdür (42). Çeşitli hücrel enzim komplekslerinin kritik öneme sahip değerli bir bileşendir. LA ve indirgenmiş formu olan dihidrolipolik asit (DHLA) oksidatif stres koşullarında efektif bir rol üstlenir. LA'ya direk serbest radikal temizleyicisi olarak yada indirek işlevselliğini yitirmiş olan antioksidanları işlevsel hale getirerek fonksiyon gösterir. Mitokondrial dehidrogenaz multienzim kompleksinin koenzimi olarak mitokondride doğal olarak bulunur. Doğal bileşikler ile hastalıklar üzerinde tedavi edici etki gösteren LA enerji kullanımını kolaylaştıran metabolik reaksiyonlar için gerekli kofaktör fonksiyonu da görür. Genç ve yaşlılarda iskelet kası, karaciğer, kalp ve beyindeki antioksidan seviyelerini artırdığı ve lipid

peroksidasyonunu önlediği ortaya konmuştur. Özellikle diyabetlilerde diyabetik nöropatiye bağlı patolojik durumlarda kullanılmaktadır (43,44). Araştırmamızda da kullandığımız ve SM toksisitesinde daha önce hiç kullanılmamış bir ajan olan LA tıpkı AMF gibi sağkalım oranını artırmış, akciğer rutin histopatolojisinde de ödem, hemoraji ve inflamasyon miktarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürmüştür. Böylece daha önce güçlü antioksidan etkinliği kanıtlanmış olan LA'nın etki yolları ile sülfür mustard toksisitesinde de etkili olabileceği ortaya konmuştur.

Mesna (sodyum2-mercaptoethan) kanser tedavisinde kullanılan nitrojen mustard türevi siklofosamid'in yol açtığı hemorajik sistit tedavisinde kullanılan sentetik bir tiyol bileşiğidir. Siklofosamid karaciğerdeki P-450 enzimi yardımıyla aktif metabolitleri olan fosforamid mustard ve acrolein'e dönüşür. Acrolein ise güçlü bir ürotelyal iritan olarak kabul edilir. Acrolein'in yüksek düzeyde ROT üreterek oksidatif strese yol açtığı düşünülmektedir. Oksidatif stres belirteçlerinden biri olan MDA seviyelerini'de yükselttiği gösterilmiştir (45). Mesna kimyasal yapısındaki sülfidril grupları ile antioksidan etki göstererek acrolein'in üriner sistemde oluşturduğu hasarı azalttığı ortaya konmuştur. Acrolein ile birleşmesi sonucu oluşan indirgenmiş form olan tioester üriner sistem epitelinde ortaya çıkan hasarı azaltır (46,47). Daha önce sülfür mustard türevlerine karşı etkinliği araştırılmamış bir ajan olan Mesnanın nitrojen mustard türevlerinden siklofosamide karşı etkinliği kanıtlanmıştır. Hatta rutin siklofosamid tedavisinde kullanılan bir antioksidan ajandır. Bizim araştırmamızda Mesnanın sülfür mustard ile oluşturulan akciğer hasarı modelinde sağkalıma, akciğer histopatolojik skorlarına, serum oksidan-antioksidan ve inflamasyon parametreleri üzerine tedavi edici herhangi bir etkinliği ortaya konamamıştır. Bunun nedeni nitrojen mustardın oluşturduğu hasara spesifik olarak mesnanın etki göstermesi olabilir. Mesna, mustard ailesinin genel hasar oluşturma mekanizması üzerinden değil de siklofosamidin mesane üzerinde oluşturduğu hasara özel patolojik mekanizmalar üzerinden etkinlik gösteriyor olabilir.

NAC mukolitik bir ajan olup L-sistein ve indirgenmiş glutatyonun ön maddesidir ve etkili bir antioksidan olan glutatyonun oluşumunda rol oynar. NAC sistein metabolizması üzerinden glutatyon sentezini artırarak oksidatif stresi önler. NAC'ın antioksidan etkinliğini oksijen radikalleri üzerindeki süpürücü etkisi ve glutatyon seviyesini koruması ile iki ayrı mekanizma üzerinden gösterdiği söylenebilir (48,49). SM'nin oluşturduğu akciğer toksisitesinde daha önce literatürde etkinliği ortaya konmuş bir ajan olan NAC'ın, araştırmamızda literatürden farklı olarak sağkalım, akciğer histopatolojisi,

serum oksidan-antioksidan ve inflamatuvar parametreleri üzerine anlamlı bir etkisi görülmemiştir. Literatürde profilaktik NAC uygulamalarının daha başarılı olduğu, sülfür mustard ile karşılaşmadan sonra uygulama süresinin gecikmesi ile etkinliğinin azaldığı belirtilmiştir (50). Araştırmamızda maruziyetten 15 dk sonra uygulanan NAC'ın etkili olamamasının sebebi bu nedenle olabilir.

5. SONUÇ

Araştırmamızda elde edilen veriler ışığında serum MDA, SOD, GPx, NOx, Neopterin gibi oksido-nitrosatif, antioksidan, inflamatuvar parametrelerin akut akciğer toksisitesinde durumun tespit ve takibinde kullanılıp kullanılmayacağına daha uygun bir modelde test edilmesi gerektiği, Amifostin ve α -Lipoik Asit gibi yeni antioksidanların sülfür mustardın akut akciğer toksisitesinde umut vaat ettiği görülmüştür. Bu tip etkinliği ortaya konan antioksidanların uygulama zamanı, süresi ve formunun ileri araştırmalarla deneyerek daha etkin hale getirilmesi sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- Cooper G, Rice P, Greaves I. Chemical casualties-special issue. J R Army Med Corps 2002;4:328-404.
- Khateri S, Wangerin R. Denied Truths. The center for Women and Family Affairs: Tehran. 2008.
- Davison C, Rozman RS, Smith PK. Metabolism of bis-bis-chloroethyl sulfide (sulfur mustard gas). Biochem Pharmacol.1961;7:65-74.
- Ghabili K, Agutter PS, Ghanei M, Ansarin K, Shoja MM. Mustard gas toxicity: The acute and chronic pathological effects. J Appl Toxicol. 2010;30:627-643.
- Erdelyi K, Bakondi E, Gergely P, Szabo C, Virag L. Pathophysiological role of oxidative stress-induced poly (ADP-ribose) polymerase-1 activation: focus on cell death and transcriptional regulation. Cell Mol Life Sci. 2005;62:751-759.
- Saladi RN, Smith E, Persaud AN. Mustard; a potential agent of chemical warfare and terrorism. Clin Exp Dermatol. 2006;31(1):1-5.
- Hosseini K, Moradi K, Mansouri A, Vessal K. Pulmonary manifestations of mustard gas injury: a review of 61 cases. Iran. J. Med. Sci. 1989;14:20-26.
- Dahl AR. Contemporary issues in toxicology. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1990;103:185-197.
- Foroutan SA. Medical notes on chemical warfare, part II (in persian). Kowsar Med J. 1997;1:159-177.
- Greenfield RA, Brown BR, Hutchins JB, et al. Microbiological, biological, and chemical weapons of warfare and terrorism. J. Appl. Toxicol. 2002; 22:257-262.
- Easton D, Peto J, Doll R. Cancers of the respiratory tract in mustard gas workers. Br J Ind Med. 1988;45:652-659.
- Kehe K, Szinicz L. Medical aspects of sulphur mustard poisoning. Toxicology. 2005;214(3):198-209.
- Rappenau S, Baeza-Squibian A, Braut-Boucher F, Aubery M, Gendorm MC, Marano F. Use of fluorescent probes to assess the early sulfhydryl depletion and oxidative stress induced by mechlorethamine on airway epithelium. Toxicol In Vitro. 1999;13:765-771.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193:265-275.
- Okhawa H, Ohshi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 1979; 95:351-358.
- Sun Y, Oberley LW, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem. 1988;34:497-500.
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med. 1967; 70: 158-169.
- Akgül EÖ, Aydın İ, Çaycı T, Kurt YG, Aydın FN, Ağilli M. The indicator of cellular immune response in body fluids: neopterin. Gulhane Med J. 2013; 55(3):237-243.
- Alrashed M, Abougoush M, Akgul EO, Erbil MK. Detection method of serum and urine neopterin levels by high performance liquid chromatography. Gulhane Med J. 2002;44:273e7.
- Bismuth C, Borron SW, Baud FJ, Barriot P. Chemical weapons: documented use and compounds on the horizon. Toxicol Lett. 2004;149:11-18.
- Ghazanfari T, Faghihzadeh S, Aragizadeh H, et al. Sardasht-Iran cohort study of chemical warfare victims: design and methods (J). Arch Iran Med. 2009; 12(1):5-14.
- Balali-Mood M, Navaeian A. Clinical and paraclinical findings in 233 patients with sulphur mustard poisoning, in: Heyndricks B. (Ed.), Proceedings of the Second World Congress on New Compounds in Biological and Chemical Warfare, Rijksuniversiteit, Ghent, Belgium. 1986;464-473.
- Ucar M, Korkmaz A, Reiter RJ, et al. Melatonin alleviates lung damage induced by the chemical warfare agent nitrogen mustard. Toxicol Lett. 2007;173:124-131.
- Chatterjee D, Mukherjee S, Smith MG, Das SK. Signal transduction events in lung injury induced by 2-chloroethyl ethyl sulfide, a mustard analog. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology. 2003;17(2):114-121.
- Laskin DL, Gardner CR, Laskin JD. Phagocytes, In: Lawrence, D. (Ed), Comprehensive Toxicology, 2nd edition.: Immune System Toxicology, vol.5. Elsevier, UK. 2010;133-153.
- Beckman JS, Crow JP. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. Biochemical Society Transactions. 1993;21:330-334.
- Di Ilio C, Sacchetta P, Del Boccio G, La Rovere G, Federici G. Glutathione peroxidase, glutathione s-transferase and glutathione reductase activities in normal and neoplastic human breast tissue. Cancer Letters. 1985; 29: 37-42.
- Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. Ann Rev Toxicol. 1983;23:239-257.
- Sugiyama M. Role of cellular antioxidants in metal-induced damage. Cell Biology and Toxicology. 1994;10:1-22.
- De Rosa S, Cirillo P, Pacileo M, et al. Neopterin: from forgotten biomarker to leading actor in cardiovascular pathophysiology. Curr Vasc Pharmacol. 2011;9:188-199.
- Murr C, Fuih LC, Widner B, Wirleitner B, Baier-Bitterlich G, Fuchs D. Increased neopterin concentrations in patients with cancer: indicator of oxidative stress? Anticancer Res. 1999; 19:1721-1728.
- Jenny M, Klieber M, Zaknun D, et al. In vitro testing for anti-inflammatory properties of compounds employing peripheral blood mononuclear cells freshly isolated from healthy donors. Inflamm Res. 2011;60:127-135.
- Topal T, Oztas Y, Korkmaz A, et al. Melatonin ameliorates bladder damage induced by cyclophosphamide in rats. J Pineal Res. 2005;38:272-277.
- Korkmaz A, Oter S, Sadir S, et al. Peroxynitrite may be involved in bladder damage caused by cyclophosphamide in rats. J Urol. 2005;173:1793-1796.
- Korkmaz A, Yaren H, Topal T, Oter S. Molecular targets against mustard toxicity: implication of cell surface receptors, peroxynitrite production, and PARP activation. Arch Toxicol. 2006; 80: 662-670.
- Koukourakis MI. Amifostine in clinical oncology: current use and future applications. Anticancer Drugs. 2002;13:181-209.
- Culy CR, Spencer CM. Amifostine: An update on its clinical status as a cytoprotectant in patients with cancer receiving chemotherapy or radiotherapy and its potential the therapeutic application in myelodysplastic syndrome. Drugs. 2001;61:641-684.
- Gautam A, Vijayaraghavan R. Drde-07: a possible antidote for sulphur mustard toxicity. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2010;56 Suppl:OL1334-40.

39. Sawale SD, Ambhore PD, Pawar PP, Pathak U, Deb U, Satpute RM. Ameliorating effect of S-2(ω -aminoalkylamino) alkylaryl sulfide (DRDE-07) on sulfur mustard analogue, 2-chloroethyl ethyl sulfide-induced oxidative stress and inflammation. *Toxicol Mech Methods*. 2013;23(9):702-710.
40. Anand T, Vijayaraghavan R, Rao PV, Bansal I, Bhattacharya BK. Attenuation of sulfur mustard toxicity by S-2(2-aminoethylamino) ethyl phenyl sulfide (DRDE-07) in mouse liver. *Toxicol Mech Methods*. 2011;21(8):596-605.
41. Gautam A, Gupta A, Lomash V, Pant SC, Vijayaraghavan R. Prophylactic efficacy of combination of DRDE-07 and its analogues with amifostine against sulphur mustard induced systemic toxicity. *Indian J Exp Biol*. 2010;48(7):752-61.
42. Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and the therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790:1149-1160.
43. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 227-250
44. Suzuki YJ, Tsuchiya M, Packer L. Antioxidant activities of dihydrolipoic acid and its structural homologues. *Free Radic Res Commun*. 1993;18:115-122.
45. Kehrer JP, Biswal SS. Themoleculareffects of acrolein.*Toxicol Sci*. 2000;57:6-15.
46. Goren MP, McKenna LM, Goodman TL. Combined intravenous and oral mesna in outpatient streated with ifosfamide. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1997;40:371-375.
47. Kurovski V, Wagner T. Urinary excretion of ifosfamide, 4-hydroxyfosfamide, 3- and 2-dechloroethyl ifosfamide, mesna, and di mesna in patients on fractionated intravenous ifosfamide and concomitant mesna therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1997;39:431-439.
48. Ventresca GP, Cicchetti V, Ferrari V. Acetylcysteine.In: Braga PC, Allegra L, eds. *Drugs in bronchial mucology*.New York, RavenPress 1989;77-102.
49. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid. *Free Rad Biol Med*. 1989;6:593-597.
50. Weinberger B, Laskin JD, Sunil VR, Sinko PJ, Heck DE, Laskin DL. Sulfur mustard-induced pulmonary injury: therapeutic approaches to mitigating toxicity. *Pulm Pharmacol Ther*. 2011;24(1):92-99.